原 著

尿中低分子量蛋白に関する研究

A Study on the Urinary Low Molecular Proteins

森 三 樹 雄*
MIKIO MORI, M.D.

正常尿を100~1000倍に濃縮すると、アルブミン、 α_1 -抗トリプシン、トランスフェリン、 γ -グロブリンなどが出現する。腎疾患の患者尿中には上記の蛋白が正常人に比較し多量に出現するが、腎臓の障害の部位によりその出現する蛋白の種類や量が異なる。腎糸球体の障害により起こる糸球体性蛋白尿では中分子量(60,000~160,000)のアルブミン、トランスフェリン、IgGなどの蛋白が主体となり、疾患としてはネフローゼ症候群、腎炎、高血圧性腎症、糖尿病性腎症などがある。これに対し近位尿細管障害による尿細管性蛋白尿では低分子量(10,000~50,000)のL鎖、 β_2 -ミクログロブリン、血清酵素などが出現し、疾患としては慢性カドミウム中毒、Fanconi 症候群、ウィルソン病などがある。この他糸球体と尿細管がともに障害されることによって起こる尿毒症性蛋白尿では低および中分子量蛋白が同時に出現し、尿毒症の時にみられる。著者は糸球体性蛋白尿をきたした慢性腎疾患患者尿中の低分子量 γ -グロブリンとアルブミンについて物理化学的および免疫学的検索をした。尿中低分子量 γ -グロブリンの分子量は約12,000でIgGのH鎖フラグメントであるFcとFab およびL鎖を含んでいた。尿中低分子量アルブミンは分子量約10,000の minialbumin が出現し、免疫原性を有した。

蛋白尿は正常人でも1日20~80 mgのごく微量排泄されているという^{1,2,3,4)}。血清蛋白はその分子量の大小により腎糸球体基底膜の小孔より濾過される。即ち高分子量血清蛋白は濾過されにくい、分子量約69,000のアルブミンおよび分子量がそれ以下の血清蛋白は基底膜を通過する。しかし、糸球体で濾過された血清蛋白は近位^{5,6)} および一部遠位尿細管⁷⁾ で大部分が再吸収されるので正常人ではごく微量にしか排泄されない。尿中に排泄される蛋白を測定するためには尿を濃縮しなければならない。このため現在用いられている尿の濃縮法には、(1)強制蒸発、(2)凍結乾燥、(3)滲透圧濃縮、(4)限外濾過などがある^{8~11,62~65)}。正常尿を100~1,000倍に濃縮し電気泳動分析を行なうとアルブミンは20~35.7%、グロブリンは64.3~80%を占める^{12,13,14,82)}。これを免疫電気泳動法で検

索すると、正常人尿に8~20種類の血清蛋白が出現することが報告されている^{17,18,19)}。ゲル濾過法や免疫学的分析を行なってこれらの尿蛋白を調べたところ、分子量40,000~90,000までの血清蛋白由来のものであった^{15,16)}。血漿由来の尿蛋白の主なものは、アルブミン、 α_1 -抗トリプシン、トランスフェリン、 β -グロブリン、 γ -グロブリンなどである^{17,18,19)}。この他正常人尿にはごく微量ながら分子量90,000以上の高分子蛋白と分子量40,000以下の低分子量蛋白が認められる。この低分子量蛋白中には carboxyl esterase, pepsin, lysozyme, LDH, ribonuclease などの各種酵素群が存在し近位尿細管で処理されるという^{20,22,23,24)}。これらとは別に、正常尿中に血清蛋白由来以外の組織蛋白²⁵⁾、分泌型IgA²⁶⁾、uromucoidなどが混在している。腎疾患患者尿においても正常人尿中にみられたと同様な蛋白が認められるが、腎疾患の種類により、また腎実質障害の程度により出現する蛋白の種類や量が異なる。通常、腎実質障害による蛋白尿を糸球体性蛋白尿、尿細管性蛋白尿、尿毒

*順天堂大学医学部助手(臨床病理学)
Department of Clinical Pathology, Juntendo
University, School of Medicine
(Dec. 11, 1975 受付)

症性蛋白尿の3種類に分ける^{27,107)}。

糸球体性蛋白尿 (Glomerular proteinuria) : 糸球体基底膜の異常によりアルブミンを主体とする血清蛋白が多量に濾過され、尿細管の蛋白吸収極量を越えたため尿中に排泄される。通常、アルブミン、トランスフェリン、IgG などの中分子量蛋白 (60,000~160,000) が主体となり、そのうち沈降係数が 4.0~4.5S の蛋白が特に多量に出現する^{31,107)}。

糸球体蛋白尿の生成機序は Kroch, Lambert⁶⁸⁾ Arturson ら⁶⁹⁾ の pore theory によって説明される。すなわち糸球体基底膜には small size pore と large size pore の2種類があり、これが約10,000:1の割合で分布している。small size pore は平均直径 25nm, large size pore は約40nm である。アルブミンは直径が約 33nm であるため糸球体基底膜を通過できるという。この糸球体基底膜の選択的透過性を“篩い分け効果 (sieving effect)”と呼ぶ。糸球体障害を主とする腎疾患では糸球体基底膜の small size pore の絶対的減少と large size pore の相対的增加により、高分子量蛋白の漏出が顕著になるという^{60,67,70,71,91)}。糸球体性蛋白尿をきたす疾患としては、ネフローゼ症候群、急性腎炎、慢性腎炎、ループス腎炎、高血圧性腎症、糖尿病性腎症などがある^{28,29,36,41)}。

尿細管性蛋白尿 (Tubular proteinuria) : 普通糸球体基底膜より濾過された血清低分子量蛋白は近位尿細管で99%は再吸収され異化される。尿細管障害が起こると尿細管の再吸収機能が低下するため尿細管性蛋白尿が出現する⁸⁰⁾。

尿細管性蛋白尿は、尿細管細胞の破壊および壊死による低分子量蛋白の代謝障害や、先天性代謝酵素の欠損などでも起こることが報告されている^{27,38)}。尿細管性蛋白尿の特徴は通常尿蛋白の排泄量が少ないこと (1日 1g 以下⁷⁸⁾)、しかも構成成分が沈降係数 2.2~2.8S の低分子量蛋白 (10,000~50,000) である^{81,107)}。この蛋白尿を cellulose acetate 膜電気泳動法で分けると、各分画間の分離が不明確となり、 γ および β 位に peak を作る。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いると γ

~ β 位, post γ -globulin 位に低分子量蛋白のバンドが出現する⁷²⁾。尿細管性蛋白尿のうち多量に排泄されるものは分子量が11,600で直径15nm, アミノ基 100個よりなる。免疫電気泳動を行うと β -グロブリン位に出現するので β_2 -ミクログロブリンと名づけられた^{27,40)}。Smithies ら⁷⁵⁾はこの蛋白のアミノ酸配列の最初の46個のうち24個は G-1 骨髄腫蛋白の H鎖のアミノ酸配列と類似し、Peterson ら⁷⁶⁾は、この蛋白の28個のアミノ酸残基と H鎖の CH₃ 部分との類似性を報告している。 β_2 -ミクログロブリンは正常血清に存在し、正常人でも尿中に排泄される。尿細管に障害が生ずると β_2 -ミクログロブリンの異化作用が低下し⁷⁷⁾、尿細管からの再吸収も減少するので尿中排泄が増えるという⁷⁸⁾。尿細管性蛋白としては、 β_2 -ミクログロブリンの他に free light chain, lysozyme, retinal binding protein, ribonuclease などの低分子量蛋白が報告されている^{27,34,38,39)}。尿細管性蛋白尿をきたす疾患としては、慢性カドミウム中毒^{80~84)}、Fanconi 症候群^{80,85,86)}、Lowe 症候群⁸⁶⁾、Wilson 病⁸⁵⁾、Laurence-Moon-Biedel 症候群、Cystinosis、移植腎³⁷⁾、バルカン地域性腎症⁷⁴⁾などがある。

尿毒症性蛋白尿 (Uremic proteinuria) : 糸球体から尿細管までを含めた全ネフロンが障害された場合で、糸球体性尿と尿細管性尿に出現する低および中分子量蛋白が出現する¹⁰⁷⁾。

実 験

著者は糸球体性蛋白尿をきたす慢性腎炎の患者4例について、低分子量 γ -グロブリンの構成成分の解明とその物理化学的および免疫学的検索を行った。

1. 検体の採取

順天堂大学付属医院に入院中の慢性腎炎の患者4例の一日尿を採取した。防腐剤は蛋白質の変性を防ぐため使用しなかった。採取した一日尿は直ちに濾過滅菌し濃縮・精製した。

2. 試料の濃縮

原尿蛋白濃度 300~500mg/dl 前後の患者尿の合

計 150 l をバイオエンジニアリング社の濃縮器 MC-6 型 (図 1) と Amicon 社の Model DC 2 Hollow fiber system に Amicon 社の限外濾過膜 XM-50, UM-10 を用い, 順次加圧濾過し^{9,10,11)}, 分子量 1~5 万の低分子量蛋白質を濃縮し, 最終蛋白濃度 1.7g/dl のものが 3,000ml 得られた。

3. 試料の精製

濃縮尿 2,000 ml を低温室内で攪拌しながら 20% 硫酸を加え塩析しアルブミンを除去した。さらに

図 1 バイオエンジニアリング社の濃縮器 MC-6 型

図 2 Method of Purification

24 hour urine from chronic nephritis patient	
	Diaflo ultrafilters
	10,000 to 50,000
Concentrated urine	
Affinity Chromatography	
	4 M urea
Sephadex G-75	
	0.1 Tris buffer
	pH 8.0
Purified urinary low molecular IgG	

1 万回転で 30 分超遠沈し透析した。これをアフィニティー・クロマトグラフィー法で精製分離した^{45~51)}。CNBr-Activated Sepharose 4B を 15g とし 700 ml の 0.1 モル重炭酸ナトリウムで洗浄し, グラスフィルター上で吸引濾過し, これに抗ウサギ IgG 抗体 140mg を加えセファロース 4B に結合させた。スターラーを用い, 1 時間室温で攪拌し, 一晚冷所に保存した。これをガラスフィルター上で 0.2 モル重炭酸ナトリウムと 0.1 モル食塩, 次いで 0.01 モルのリン酸バッファーでおおの 1500ml を用い洗浄し, 結合していない抗ウサギ IgG 抗体を洗い流した。これに分子量が 1~5 万の間の濃縮低分子量蛋白尿を 30ml 入れ, 0.01 モルのリン酸バッファー 700ml で洗浄する。次に 4 モルの尿素で抗 IgG 血清に結合した蛋白を抽出し, 0.01 モルのリン酸バッファーで透析し, これをセファデックス G-75 を用い分離精製した。上記の操作を繰返し, 集めた精製物質を超遠沈し分子量を求めた (図 2)。

4. 蛋白濃度の測定

ビュレット法⁵³⁾, 紫外部吸収 280nm を用いて測定した。

5. 免疫拡散法⁵⁴⁾と免疫電気泳動法^{55,56)}

上記二法とも バルビタール 緩衝液 pH 8.6, μ 0.06 を 2 倍希釈したものに泳動用寒天末を 1% とかして使用した。免疫電気泳動法での泳動条件は定電圧 200 V, 90 分とし, 反応条件は両方法とも 37°C, overnight とした。

6. ディスク電気泳動法

Ornstein & Davis 法により行なった^{57,58)}。

試料層の蛋白量: 200 μ g

細孔ゲル: アクリルアミド濃度 7.5%

ゲルカラム: 内径 5 mm, 長さ 70mm

泳動条件: ゲル管 1 本あたり 4 mA で 1 時間

染色: 0.05%, Coomassie brilliant blue, 12.5% トリクロール酢酸溶液

7. 使用した抗血清および免疫拡散板

抗血清は Hyland 社製の抗ヒト全血清やギ血清と Behringwerke 社の抗ヒト IgG ウサギ血清およびその他特異抗血清を使用した。特異抗

血清を含む免疫拡散板は Hyland 社の Immuno plate を用いた。

8. クロマトグラフィー用の装置

カラムはアフィニティークロマトグラフィー用に硝英精作所の SM-160, セファデックス G-75 用には SM-450 を用いた。ペルスタルチクポンプおよびフラクシオンコレクターはそれぞれ LKB 社の Perpex peristaltic pump 10200 と Ultrorac fraction collector 7000 を使用した。

9. 超遠心分析法

装置は日立UCA-1A型を使用し、4.9 mg/ml の尿中 IgG について、沈降速度 (M_{SD}) 法および沈降平衡法で測定した。測定温度は 20°C で、バッファーには 0.1M トリス塩酸緩衝液を用いた。

結 果

1. 免疫学的性状

慢性腎炎患者尿 4 例のうち、代表例の一例における分子量 10,000~50,000 の濃縮蛋白は免疫拡散法、免疫電気泳動法 (図 3), ディスク電気泳動 (図 4) で検索すると、アルブミン, α_1 -抗トリプシン, トランスフェリン, IgG, ペンス・ジョーンズ蛋白, Fab, Fc, Fd などの血清蛋白が存在した。アフィニティークロマトグラフィー (図 5) およびセファデックス G-75 カラムクロマトグラフィーにより分離精製された尿中低分子量蛋白は図 3, 図 4 で示すごとく, IgG およびそのフラグメントである。この精製された低分子量蛋白を免疫拡散法でも同定し, IgG およびそのフラグメントであることを確認した。

2. 物理化学的性状

正常ヒト血清 IgG と尿中低分子量 IgG 蛋白について免疫電気泳動法により相対易動度を比較すると, 尿中低分子量 IgG は正常ヒト IgG にくらべて易動度がやや速かった (図 3)。

3. 分子量

超遠心分析法の沈降速度 (M_{SD}) 法で測定すると S のシュリーレンパターンは図 6 の如く, S は 60,000rpm で, 7.3×10^{-13} sec, D は 18,000rpm で 11.3×10^{-7} cm/sec となり, 分子量は 12,500 とな

図 3 NHS : 正常人血清
CU : 分子量10,000~50,000の濃縮尿
EU : 尿中低分子量 IgG

図 4 ポリアクリルアミド電気泳動
NS : 正常人血清
CU : 分子量10,000~50,000の濃縮尿
EU : 精製尿 (低分子量 IgG)

った (図 7). 同一試料を沈降平衡法で測定したところ分子量は 11,500 であった (図 8)。

図5 尿中低分子量蛋白のアフィニティークロマトグラフィー

図6 超遠心分析法によるSのシュリーレンパターン

考 察

尿中の主な血清蛋白成分および低分子量蛋白と各疾患との関連について考察する。

尿中アルブミン：アルブミン尿をきたす疾患としてはネフローゼ症候群、急性および慢性腎炎、糖尿病性腎症、多発性骨髄腫などがある⁵⁹⁾。血清アルブミンの分子量は約69,000であるが^{18, 27, 39, 59, 60, 61)}、正常人の尿中アルブミンも血清アルブミンと分子量が殆ど変わらない⁶⁰⁾。ネフローゼ症候群

や腎炎の患者尿中のアルブミンも正常血清アルブミンとほぼ同じ分子量をもつという。しかしながら、慢性カドミウム中毒患者尿中に低分子量アルブミンが他の低分子量蛋白とともに出現することがFribergによって報告された²⁹⁾。この低分子量アルブミンは沈降係数2.3~2.45S、分子量20,000~30,000でminialbuminと命名された⁴³⁾。慢性カドミウム中毒になるとアルブミンの代謝が障害され、minialbuminが肝で合成され、これが尿中に排泄されるという³²⁾。その後、Kench⁴³⁾や野見山ら³²⁾も同様に低分子量アルブミンの存在を報告している。minialbuminのアミノ酸構造はほぼ共通しているが、正常血清アルブミンと比較するとリジンとシスチンが欠如している⁶⁰⁾。minialbum-

図7 Molecular Weight of Urinary IgG

Material : Purified low molecular IgG
 Method of purification : Affinity chromatography Sephadex G-75
 Ultracentrifugation : M_{SD} method
 Hitachi UCA-1 A type
 Rotor : RA-60H
 Optics : schieren
 Bar angle : 65 degree
 Buffer : 0.1 M Tris buffer
 Concentration of protein : 4.9 mg/ml
 D = 11.3×10 cm/sec. 18,000 rpm
 S = 7.3×10⁻¹³ sec. 60,000 rpm
 Molecular weight : 12,500

図8 Molecular Weight of Urinary IgG

Material : Purified low molecular IgG
 Method of purification : Affinity chromatography Sephadex G-75
 Ultracentrifugation :
 Sedimentation equilibrium method
 Meniscus depression method
 Rayleigh interference optics
 Speed : 27,000 rpm
 7 hour up to speed
 Cell : multichannels
 Protein concentration : 2.45 mg/ml
 Molecular weight : 11,500

in は容易に凝集を起こし、通常分子量 (66,000) であつたり、低食塩液では高分子量 (170,000) になつたりする⁸³⁾。兎や犬の慢性カドミウム中毒動物では、沈降係数が 1.99 S という低分子量アルブミンと 4.07 S の正常分子量のアルブミンが尿中にみられた⁵²⁾。カドミウム中毒の猿の血清アルブミン総量の半分は minialbumin の凝集したものであり、尿中アルブミンについては約 13 % が minialbumin の凝集したものであるという⁶⁶⁾。Press ら⁴²⁾はヒト血清アルブミンをキモトリプシンで人工的に消化し、分子量が 7,100~23,400 の低分子量アルブミンを作つたが、7,100 のものでは抗アルブミン血清と沈降反応を起こさなかつたという。著者らは多発性骨髄腫および糖尿病性腎症の患者尿中に、分子量が約 10,000 の低分子量アルブミンが存在し、しかも、免疫原性を有することを慢性カドミウム中毒以外の疾患で初めて明らかにした⁴⁴⁾。これは血清アルブミンが糸球体で濾過され、尿細管で再吸収されるが⁶⁷⁾、低分子量アルブミンは再吸収されずに排泄されるためと推測される⁴¹⁾。

尿中 γ -グロブリン：急性腎炎、慢性腎炎、糖尿病性腎症、ループス腎炎、アミロイド腎、多発性骨髄腫などで尿中の γ -グロブリンが増加する。Webb らや Franklin は正常人尿中に低分子量 γ -グロブリンが存在し、分子量がそれぞれ、10,600 および 35,000 であることを報告した^{79,84,87)}。これは血清 7S γ -グロブリンと交差反応を起こし、しかも拡散速度が速い蛋白である。この尿中低分子量 γ -グロブリンは同じものが血清中にも存在し、これが尿中に出てくるという^{79,84)}。この低分子量 γ -グロブリンは血清 7S γ -グロブリンの分解産物であり、ベンス・ジョーンズ蛋白に類似するが交差反応を起こす⁸⁶⁾。Takatsuki らによると正常人尿中の低分子量 γ_2 -グロブリンはパペインで消化した γ_2 -グロブリン (分子量160,000) のフラグメントと同じ抗原性を持ち、高ガンマグロブリン血症では尿中に増え、低ガンマグロブリン血症では減少するという⁸⁸⁾。Ikenaka ら⁸⁹⁾は正常人血清中の 3S γ_1 -グロブリンと低分子量 γ_2 -グロブリンおよびベンス

・ジョーンズ蛋白を比較したところ、アミノ酸配列および電気泳動の易動度の点で相違した。3S γ_1 -グロブリンは沈降係数 2.9 S、分子量 25,000 であり、正常人尿中出现する低分子量 γ -グロブリンとは相違する。Poortmans らによるとこの 3S γ_1 -グロブリンは正常腎組織中に多量に含まれており、尿中 3S γ_1 -グロブリンは運動後に約80倍に濃縮されるという。いままで報告されている尿中 γ -グロブリンの沈降係数は 7S, 3.5S, 3 S, 2.0 S, 1.2 S である^{79,84,87,88,89,90,92)}。尿中には γ -グロブリンの代謝産物として L 鎖が出現する^{93,94)}。さらに重労働の後では H (γ) 鎖が尿中出现する⁹⁵⁾。Franklin ら⁹⁶⁾や Osserman ら⁹⁷⁾によって H 鎖病患者尿中に多量の異常 γ 鎖 (Fc 様フラグメント) の出現が報告された。正常人尿中に微量ながら γ -グロブリンの H 鎖の一部である Fc 様フラグメントが出現し^{92,98)}、これが尿中 γ -グロブリンの 15 % を占めているという。しかも尿中 Fc 様フラグメントは血清 γ -グロブリンの異化物質である⁹²⁾。正常人尿中の L 鎖は全 γ -グロブリンの 50 % 以上を占める⁹²⁾。無ガンマグロブリン血症の患者では尿中の Fc 様フラグメントは欠如したが、L 鎖は正常の $\frac{1}{10}$ 存在した。無ガンマグロブリン血症患者に γ -グロブリンを非経口的に投与すると尿中に Fc 様フラグメントが出現するという⁹²⁾。尿中 Fc 様フラグメントの分子量は Neff ら⁹⁹⁾によると 35,000 で、Franklin ら⁹⁶⁾によると 50,000 である。7 S 以下の尿中蛋白は抗 Fd 血清とは反応しない^{100,101,102)}。尿中 Fc フラグメントは比較的容易に見つけられるが、Fab は殆ど認められないという。これは血中 Fab の半減期が Fc にくらべて極端に短く¹⁰³⁾、その上、腎で Fab が分解されるためだという^{104,105)}。著者の実験例でも慢性腎炎の患者尿中に γ -グロブリン (IgG) のフラグメントが多量に出現した。この低分子量蛋白の沈降係数は 1.1 S で分子量が平均 12,000 で、Webb らの報告した 10,600 の低分子量 γ -グロブリンに近い蛋白である。これは IgG の H 鎖のフラグメントである Fc および Fab を含み、また L 鎖も含んでいた。糸球体性蛋白尿をきたした慢性腎炎の患者尿

中にも低分子量 γ -グロブリンが存在することを明らかにした。尿中IgAは正常人尿中に認められ、沈降係数が11.8 Sで分泌型IgA分子量と、抗原性において変わらないという²⁶⁾。正常尿中のIgAの1日平均排泄量は1.1mgである²⁶⁾。Petersonら¹⁶⁾は分泌型IgAが血清由来のIgAの2倍あり、正常尿中の分泌型IgAの約半分は尿管由来のものであり、IgAと尿路感染との関連が推測されている¹⁰⁶⁾。IgMは正常尿中には認められない。しかしながら、慢性腎炎やネフローゼ加味腎炎では高分子量のIgMが出現する場合もあるという⁹¹⁾。

結 論

蛋白尿には大別して糸球体性蛋白尿、尿細管性蛋白尿があるが、著者は糸球体性蛋白尿のうち低分子量蛋白について検索した。尿中低分子量蛋白はアルブミン、 α_1 -抗トリプシン、トランスフェリン、IgG、ベンス・ジョーンズ蛋白が出現した。このうちアルブミンとIgGの低分子量蛋白について検索した結果を考察した。多発性骨髄腫および糖尿病性腎症の患者尿中に分子量が約10,000の血清由来と思われるminialbuminの存在を確認し、さらに抗体産生能を有することを証明した。また慢性腎炎の患者尿中より低分子量 γ -グロブリン(IgG)をアフィニティークロマトグラフィーおよびセファデックスG-75を用いて分離精製し、沈降係数1.1 S、分子量が約12,000の低分子量蛋白を確認した。この低分子量 γ -グロブリンはIgGのH鎖フラグメントであるFc, FabとL鎖を含んでいた。

文 献

- 1) Franklin, E. C., : Physicochemical and immunologic studies of gamma globulins of normal human urine., J. clin. Invest. **38**, 2159, 1959.
- 2) Rigas, D. A., et al : The amount and nature of urinary proteins in normal human subjects., J. Clin. Invest. **30**, 853, 1951.
- 3) Boyce, W. H., et. al : Proteins and other biocolloids of urine in health and calculous disease., J. Clin. Invest. **33**, 1287, 1954.
- 4) Mc Garry, E., et al : The isolation and electrophoretic characterization of the proteins in the urine of normal subjects., J. Clin. Invest. **34**, 832, 1955.
- 5) Pitts, R. F. : Physiology of the kidney and body fluids., 2nd Ed. Year Book Medical Pub. p. 86, Chicago, 1968.
- 6) 大島研三 : 腎臓 '73, 中山書店, p.87, 1973.
- 7) Cortney, M. A., et al. : Renal tubular protein absorption in the rat., J. Clin. Invest. **49**, 1, 1970.
- 8) Miyasato, F., et al. : Serum proteins in urine ; An examination of the effects of some methods used to concentrate the urine., J. Lab. Clin. Med. **67**, 1036, 1966.
- 9) Pollak, V. E., et al. : Serum proteins in urine ; An examination of new method for concentrating urine., J. Lab. Clin. Med. **71**, 338, 1968.
- 10) 橋本光一, 他 : 膜分離技術の進歩, 科学と工業, **44**, 347, 1970.
- 11) Blatt, W. F., et. al. : Protein solutions ; Concentration by a rapid method., Science **150**, 224, 1965.
- 12) Seitz, W., et al. : Papierelektrophoretische Untersuchungen der Protein in Harn Gesunder und Kranker., Z. Klin. Med. **152**, 196, 1953.
- 13) 乾 成美, 他 : 蛋白尿の電気泳動的研究, 生物物理化学, **7**, 71, 1960.
- 14) 木村 登, 他 : 尿蛋白に関する研究, 生物物理化学, **3**, 12, 1956.
- 15) Pootmans, J., et al : Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in human urine collected before and after exercise., J. Clin. Invest. **47**, 386, 1968.
- 16) Peterson, P. A., et al. : Urinary immunoglobulin components in normal, tubular and glomerular proteinuria ; Quantities and characteristics of free light chains, IgG, IgA, and Fc fragment., Europ. J. Clin. Invest. **1**, 255, 1971.
- 17) Grant, G. H. : The proteins of normal urine., J. Clin. Path. **10**, 360, 1957.

- 18) Rowe, D. S., et al. : Serum proteins in normal urine., *Clin. Sci.* **21**, 75, 1961.
- 19) Berggard, I. : Studies on the plasma proteins in normal human urine., *Clin. Chim. Acta* **6**, 413, 1961.
- 20) Bernier, G. M., et al. : Catabolism of human β_2 -microglobulin by the rat kidney., *Am. J. Physiol.* **217**, 1359, 1969.
- 21) Hansen, N. E., et al. : Lysozyme turnover in the rat., *J. Clin. Invest.* **50**, 1473, 1971.
- 22) Prockop, D. J., et al. : A study of urinary and serum lysozyme in patients with renal disease., *N. Engl. J. Med.* **270**, 269, 1964.
- 23) Noble, R. E., et al. : Urine and serum lysozyme measurement in renal homotransplantation., *Proc. Soc. Epl. Biol. Med.* **120**, 737, 1965.
- 24) Harrison, J. F., et al. : Urinary lysozyme, ribonuclease and low-molecular-weight protein in renal disease, *Lancet* **1**, 371, 1968.
- 25) Antoine, B., et al. : Proteins in normal and pathological urine, p.224, Ed. Manuell, 1970.
- 26) Bienenstock, J., et al. : Secretory γ A in normal urine., *J. Clin. Invest.* **47**, 1162, 1968.
- 27) Peterson, P. A., et al. : Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria ; Determinations of urinary excretion of β_2 -microglobulin, albumin, and total protein., *J. Clin. Invest.* **48**, 1189, 1969.
- 28) Wolvius, D., et al. : The diagnostic value of the protein excretion pattern in various types of proteinuria., *J. Clin. Path.* **10**, 80, 1957.
- 29) Friberg, L. : Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning., *Acta Med. Scand.* **138**, Suppl. **240**, 1, 1950.
- 30) 斉藤 寛 : 尿蛋白 (1), 尿細管性蛋白尿の臨床的意義, 生物物理化学 **18**, 91, 1974.
- 31) Creeth, J. M., et al. : An ultracentrifuge study of urine proteins with particular reference to the proteinuria of renal tubular disorders *Clin. Chim. Acta*, **8**, 406, 1963.
- 32) 野見山一生 : カドミウム中毒における腎障害と蛋白尿, 医学のあゆみ, **74**, 249, 1970.
- 33) Piscator, M. : Proteinuria in chronic cadmium poisoning. IV. Gel filtration and ion-exchange chromatography of urinary proteins from cadmium workers., *Arch. Environ. Health.* **12**, 345, 1966.
- 34) Vesterberg, O., et al. : Urinary proteins studied by use of isoelectric focusing. I. Tubular malfunction in association with exposure to cadmium., *Clin. Chem.* **19**, 1179, 1973.
- 35) Butler, E. A., et al : The proteinuria of renal tubular disorders., *Lancet* **2**, 978, 1958.
- 36) 古田 格 : 尿蛋白, (2), 生物物理化学, **18**, 99, 1974.
- 37) Debray-Sachs, M., et al : Proteinuria in patients with homotransplanted kidneys., *Nature*, **212**, 209, 1966.
- 38) Johansson, B. G., et al. : The serum level and urinary excretion of β_2 -microglobulin and lysozyme in renal disease., *Scand. J. Urol Nephrol.* **6**, 249, 1972.
- 39) 木村正己 : 血清・尿蛋白, 総合臨床 **23**, 107, 1974.
- 40) Berggard, I., et al. : Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids., *J. Biol. Chem.* **243**, 4095, 1968.
- 41) Merler, E., et al., : Differences between urinary albumin and serum albumin., *Nature* **196**, 1207, 1962.
- 42) Press, E. M., et al. : Isolation and characterization of fragments of human serum albumin containing some of the antigenic sites of the whole molecule., *Biochem. J.* **83**, 172, 1962.
- 43) Kench, J. E., et al : A biochemical study of the minilbumin to be found in the urine of men and animals poisoned by cadmium., *S. Afr. Med. J.* **39**, 1191, 1965.
- 44) 森三樹雄, 他 : 尿中低分子量アルブミンに関する検討, 生物物理化学, **19**, 162, 1975.
- 45) Palmer, W. G. : Affinity chromatography : Interactions between sepharose-linked and soluble γ -globulin., *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 299, 1972.
- 46) 加藤郁之進 : 生体試料の分析法 (XIV), affinity

- chromatography による生体高分子の精製(その1), 代謝, **8**, 696, 1971.
- 47) 同上(その2), 代謝 **8**, 772, 1971.
- 48) 同上(その3), 代謝 **8**, 849, 1971.
- 49) 同上(その4), 代謝 **8**, 938, 1971.
- 50) Plotz, P. H., et al. : Removing substances from blood by affinity chromatography. I. Removing bilirubin and other albumin-bound substances from plasma and blood with albumin-conjugated agarose beads., *J. Clin. Invest.* **53**, 778, 1974.
- 51) 藤井節郎, 他: アフィニティー・クロマトグラフィー, 医学のあゆみ, **86**, 338, 1973.
- 52) Kench, J. E., et al. : Some observations on the proteinuria of rabbits poisoned with cadmium., *S. Afr. Med. J.* **36**, 390, 1962.
- 53) 金井 泉, 他: 臨床検査法提要, 金原出版, 1975.
- 54) Ouchterlony, Ö. : Diffusion in gel methods for immunological analysis., *Progr. Allergy* **5**, 1, 1958.
- 55) Grabar, P., et al. : Immuno-electrophoretic analysis., p.114, Elsevier Pub. Co., 1964.
- 56) 大谷英樹, 他: 免疫電気泳動法, 医学書院, 1973.
- 57) Ornstein, L., et al. : Distillation products industries, 1961.
- 58) Raymond, S., et al. : Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis., *Science* **130**, 711, 1959.
- 59) Putnum, F. W. : The plasma proteins., **1**, 233, 1960.
- 60) Joachim, G. R., et al. : Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome., *J. Clin. Invest.* **43**, 2332, 1964.
- 61) H. Jensen, et al. : Albumin metabolism in the nephrotic syndrome in adults., *Clin. Sci.* **33**, 445, 1967.
- 62) 永井一男, 他: 尿蛋白の免疫学的分析, 診断と治療, **56**, 147, 1968.
- 63) Pesce, A. J., et al. : Selectivity of proteinuria ; An evaluation of the immunochemical and gel filtration techniques., *J. Lab. Clin. Med.* **75**, 586, 1970.
- 64) Davis, J. S., et al. : The characterization of urine protein by gel filtration., *Clin. Chim. Acta*, **21**, 357, 1968.
- 65) Harrison, J. F., et al. : Low molecular weight proteinuria in chronic renal disease., *Clin. Sci.* **33**, 381, 1967.
- 66) Reading article, Cadmium and metabolism of albumin., *Lancet* **1**, 133, 1968.
- 67) Hardwicke, J., et al. : Renal disease, p. 252, 1968.
- 68) Lambert, P. P., et al. : Proc. 4th. Int. Cong. Nephrol. **1**, 60, 1970.
- 69) Artuson, G., et al. : Human glomerular membrane porosity and filtration pressure ; Dextran clearance data analysed by theoretical models., *Clin. Sci.* **40**, 137, 1971.
- 70) Cameron, J. S., et al. : The simple assesment of selectivity in heavy proteinuria., *Lancet* **2**, 242, 1966.
- 71) 上田 泰, 他: Nephrose 症候群患者における副腎皮質 Steroid 剤の治療効果の予知, 日本臨床, **26**, 1124, 1968.
- 72) 石本二見男: 蛋白尿, その成因と臨床面との関連について, 診断と治療, **60**, 1557, 1972.
- 73) Spitz, I. M., et al. : Urine insulin in renal disease., *J. Lab. Clin. Med.* **75**, 998, 1970.
- 74) Hall, P. W., et al. : Beta 2-microglobulin excretion as an index of renal tubular disorders with special reference to endemic Balkan nephropathy., *J. Lab. Clin. Med.* **81**, 897, 1973.
- 75) Smithies, O., et al. : Initiation of protein synthesis at an usual position in an immunoglobulin gene ? , *Science*, **175**, 187, 1972.
- 76) Peterson, P. A., et al. : β_2 -Microglobulin-A free immunoglobulin domain., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1697, 1972.
- 77) Berliner, G. M., et al. : Catabolism of human β_2 -microglobulin by the rat kidney., *Am. J. Physiol.* **217**, 1359, 1969.
- 78) Flynn, F. V., et al. : The origin of the proteins excreted in tubular proteinuria., *Clin. Chim. Acta* **21**, 377, 1968.
- 79) Webb, T. : Biocolloids in normal human urine. I. The amount and electrophoretic character-

- istics., *Can. J. Biochem. Physiol.* **36**, 1159, 1958.
- 80) Smith, J. C., et al. : Observations on the urinary protein of men exposed to cadmium dust and fume., *Brit. J. Industr. Med.* **18**, 70, 1961.
- 81) Rowe, D. S. : The molecular weight of the proteins of normal and nephrotic sera and nephrotic urine, and a comparison of selective ultrafiltrates of serum proteins with urine proteins., *Biochem. J.* **67**, 435, 1957.
- 82) 市場謙二 : 尿蛋白, 臨床病理, 特集, **12**, 72, 1971.
- 83) Kench, J. E., et al. : The nature and origin of the minialbumin found in cadmium poisoned animal., *S. Afr. Med. J.* **40**, 1109, 1966.
- 84) Franklin E. C. : Physicochemical and immunological studies of gamma globulins of normal human urine., *J. Clin. Invest.* **38**, 2159, 1959.
- 85) Stevenson, G. T. : Detection in normal urine of protein resembling Bence Jones protein., *J. Clin. Invest.* **39**, 1192, 1960.
- 86) Putnum, F. W. : The plasma proteins, Vol. 2, 345, Academic Press, New York, 1960.
- 87) Berggard, I. : On a γ -globulin of low molecular weight in normal human plasma and urine., *Clin. Chim. Acta*, **6**, 545, 1961.
- 88) Takatsuki K., et al. : Demonstration of two types of low molecular weight γ -globulins in normal human urine., *J. Immunol.* **92**, 100, 1964.
- 89) Ikenaka, T., et al. : Preparation and characterization of the low molecular weight human plasma 3S γ_1 -globulins., *J. Biol. Chem.* **240**, 2868, 1965.
- 90) Poortmans, J. R., et al., : 3S γ_1 -globulin levels of normal human serum and urine, *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 363, 1967.
- 91) 永井一男, 他 : 免疫電気泳動による尿たんぱくの研究, とくに腎炎を中心として, 内科, **18**, 779, 1966.
- 92) Vaughn, J. H., et al. : Light and heavy chain components of gamma globulins in urines of normal persons and patients with agammaglobulinemia., *J. Clin. Invest.* **46**, 266, 1967.
- 93) Stevenson, G. T., et al. : Further studies of the gamma-related proteins of normal urine., *J. Clin. Invest.* **41**, 1190, 1962.
- 94) Gordon, D. A., et al., : Studies on urinary γ -globulins in patients with rheumatoid arthritis., *Arthr. & Rheum.* **9**, 575, 1966.
- 95) Freedman, M. H., et al. : The heterogeneity of gamma-globulin in post-exercise urine., *Canad. J. Biochem.* **42**, 1065, 1964.
- 96) Franklin, E. C., et al., : Heavy chain disease-a new disorder of serum γ -globulins., *Amer. J. Med.* **37**, 332, 1964.
- 97) Osserman, E. F., et al. : Plasma cell myeloma; Gamma globulin synthesis and structure. A review of biochemical and clinical data, with the description of a newly-recognized and related syndrome, "H^{r-2}-chain (Franklin's) disease.", *Medicine (Baltimore)* **42**, 357, 1963.
- 98) Turner, M. W., et al. : A naturally occurring fragment related to the heavy chains of immunoglobulin G in normal human urine., *Nature (Lond.)* **210**, 130, 1966.
- 99) Neff, J. C., et al. : Antigen-antibody reactions in agar. III. Rate of change of band migration with antigen concentration., *J. Immunol.* **78**, 5, 1957.
- 100) Hanson, L. A., et al. : Characterization of antibodies in human urine., *J. Clin. Invest.* **44**, 703, 1965.
- 101) Remington, J. S., et al. : Antibodies of low molecular weight in normal human urine., *Nature (Lond.)* **194**, 407, 1962.
- 102) Remington, J. S., et al. : Precipitating antibody in normal human urine., *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* **107**, 765, 1961.
- 103) Gitlin, D., et al. : The selectivity of the human placenta in the transfer of plasma proteins from mother to fetus., *J. Clin. Invest.* **1938**, 1964.
- 104) Solomon, A., et al. : Metabolism of Bence Jones proteins., *J. Clin. Invest.* **43**, 103, 1964.
- 105) Spiegelberg, H. L., et al. : The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments., *J. Exp. Med.* **120**, 691, 1965.
- 106) Burdon, P. W. : Immunoglobulins of normal human urine and urethral secretions., *Immunology* **21**, 363, 1971.
- 107) Waldmann, T. A., et al. : The renal handling of low molecular weight proteins, II. Disorders of serum protein catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome, or uremia., *J. Clin. Invest.* **51**, 2162, 1972.

Summary

A Study on the Urinary Low Molecular Weight Proteins

Urinary low molecular weight proteins were studied on 4 cases of glomerular proteinuric patients physicochemically and immunologically. Immunoelectrophoretic analysis of those urinary low molecular proteins demonstrated the antigenic properties of albumin, α_1 -antitrypsin, transferrin, γ -globulin and Bence Jones protein. Urinary low molecular albumin and γ -globulin (IgG) were separated and purified by gel filtration and/or affinity chromatography. The approximate molecular weight of the albumin and γ -globulin were 10,000 and 12,000 respectively by ultracentrifugal analysis. The antigenicity of urinary low molecular albumin was confirmed in experiments of rabbit. Urinary low molecular weight γ -globulin contained IgG, Fc, Fab and light chain of immunoglobulin.

Mikio MORI, M.D.

*Department of Clinical Pathology,
Juntendo University, School of Medicine*