〔シンポジウム〕“血漿蛋白質の臨床”

4. α_2 -マクログロブリンの臨床*

安 藤 宏・小 島 峯 雄**

α_2 マクログロブリン (以下 α_2 M と略す) は沈降恒数 19.3S, 分子量約 82 万の糖蛋白で通常血清蛋白の 2 乃至 5 % を占めるとされ, ネフローゼ症候群, 肝硬変, 糖尿病, 感染症, 等で増加することが知られている。近年になってこの蛋白の生化学的知見がふえ, trypsin, plasmin, elastase 等の protease 作用に影響を及ぼし, 又 growth hormone や insulin と結合する作用がある等, 生理的機能の面も次第に明らかになって来た。

我々はこれら α_2 M に関する問題点のうち, α_2 M の分離法, 測定法, ついで α_2 M 正常値の年令的变化並びに性差について, 更に各種疾患時の血清 α_2 M の生理的機能のうち, trypsin と plasmin に対する作用について述べることにする。

I. α_2 M の分離

高純度の α_2 M 標品は免疫学的測定の際の標準蛋白及び, 抗血清作成の際の抗原としてのみならず, この蛋白の生物学的諸機能を検討する上で必要であるが, α_2 M の分離精製には実際上かなりの困難が伴う。分離法は Schultze¹⁾ 等の最初の記載以来数多くの方法が報告されているが, これらの方法の多くは, 第 1 段階でエタノール分画の Fr III-O から出発するものや硫酸塩析, リバノール沈殿, 澱粉ブロック電気泳動等のいずれかを行ない, 第 2 段階で分離用超遠心又はセファデックス G-200 ゲル濾過を用い, 第 3 段階には DEAE セルローズ又は DEAE セファデックスによるクロマトグラフィー等を用いて精製している。最終的に β -lipoprotein や haptoglobin の混入が生じやすいので, デキストラン硫酸を用いたり, 塩析に際しあらかじめ hemoglobin を加える等の工夫がなされている。

我々の教室では小スケールの分画には通常第 1 段階に澱粉ブロック電気泳動を用いているが, 血清 100~200 ml から出発する際は第 1 段階に硫酸塩析を用いている。硫酸塩析による方法は血清をあらかじめ pH 5.0, 0.1 M の磷酸緩衝液で 4 倍に稀釈し硫酸塩析を行なう。硫酸濃

度 2.07 M と 2.40 M との間で沈殿する蛋白を透析濃縮したのち 0.5 M 食塩加 pH 7.0 磷酸緩衝液でセファデックス G-200 ゲル濾過を行なう。溶出した第 1 峰の前半を 0.015 M, pH 5.0 酢酸緩衝液を starting buffer にし DEAE セルローズカラムでイオン強度を変えた gradient elution を行なうと 0.040 M で溶出する第 1 峰は haptoglobin の混入がない高純度の α_2 M である。この様にして得た標品を我々は抗血清作成の際の抗原と, 免疫学的測定の際検量線を作るのに用いている。抗血清は家兎にて作成しているが α_2 M 標品を微量 (1 回量 1 mg, 2 回感作) 免疫することにより, 単一の沈降線を示す特異抗血清が得られる (図 1-1)。図 1-2 は α_2 M 標品の電顕像である。

しかしながらこの様な分離法にかなりの時間 (約 5 日)

図 1-1 上は α_2 M 分画 図 1-2 α_2 M の電顕像及び模式図, scale は 200Å* Clinical studies on α_2 -macroglobulin

**Hiroshi Ando and Mineo Kojima 岐阜大学医学部第 1 内科

を要する為変性が生じやすいことや、又 α_2M 自身 protease と結合したままの状態できとり出されることが多いこと²⁾ 等、生物学的活性の検討に使用出来る標品を取り出すことは今日なおむずかしく、これまでに報告されている生物学的諸作用についても各研究者の間でかなりかけ離れた結果が示されており、分画法の一層の改良が望まれところである。

II. α_2M の測定法

血清 α_2M の測定には従来、特異抗血清を用いた種々の免疫学的定量法が用いられているが、我々はこれまで比較的再現性が良く、又多数の検体を一度に処理出来る利点をもった single radial immunodiffusion 法を行なってきた。この方法は著しい高値を示す検体では抗原過剰となる為沈降輪が不鮮明となり、又 α_2M 濃度との間に直線性が保たれない為、最適比の領域まで検体を希釈して測定を行なう必要がある。したがって寒天板の厚さと、抗体及び測定する試料を適当に希釈することにより最低 20mg/dl までの試料が測定可能であり、それ以下の試料、例えば尿や他の体液等の α_2M を測定する場合は、immunoelectrodiffusion 法を用いている。この方法を用いると最低 1mg/dl の濃度までが測定可能である。これら免疫学的測定法の他に、 α_2M の trypsin-protein esterase 活性を利用した測定法があるが、あとで述べることにする。

III. α_2M 正常値の年令的変動及び性差

各種疾患時の α_2M を測定するにあたり、まず健康者

図2 Serum α_2M level in normal subjects

血清 α_2M 値を測定してこれを年令別並に性別の各群に分けて各群の差を検討した。対象としては健康診断等の機会を利用して3才から80才までの男女約800名から採血し、そのうち肝機能や尿検査、血球検査等に異常を認めたものを除く男子318例、女子329例について血清 α_2M 値を測定し、これらを5才毎の群に分けてそれぞれの平均値と標準偏差を求めた(図2、表1)。男女共

表1 各年令群男女の正常値

年 令 構 成	例 数	平 均 値	標 準 偏 差
1~5才	♂ 10	718.4	129.5
	♀ 9	599.7	122.2
6~10	♂ 52	717.5	122.0
	♀ 32	559.5	136.5
11~15	♂ 18	580.5	131.5
	♀ 21	623.0	126.4
16~20	♂ 59	403.4	93.0
	♀ 74	385.5	98.5
21~25	♂ 43	292.0	77.5
	♀ 19	296.5	69.5
26~30	♂ 24	240.0	47.6
	♀ 12	279.0	51.4
31~35	♂ 21	215.6	41.0
	♀ 28	298.4	67.6
36~40	♂ 33	220.8	39.8
	♀ 28	297.0	61.6
41~45	♂ 24	223.2	28.6
	♀ 26	306.8	42.8
46~50	♂ 10	256.0	46.0
	♀ 18	263.6	42.8
51~60	♂ 16	239.2	46.6
	♀ 31	286.5	73.8
61~70	♂ 3	477.0	—
	♀ 15	320.0	51.6
71~80	♂ 4	374.5	—
	♀ 13	327.0	43.4
81~	♂ 1	(427.0)	—
	♀ 3	275.3	—

小児期では健康成人の値の2乃至2.5倍に及ぶ高値を示し、20才頃までには成人の値まで下がる。女子では10才から15才までの思春期に相当する時期に最高値を示し、以後40才から50才頃まで男子より高値を保っている。このうち21才から60才までの男女(男166例、女165例)について各々の平均値と標準偏差を求めると、男 $245.2 \pm 59.4 \text{mg/dl}$ 、女 $290.0 \pm 63.2 \text{mg/dl}$ で有意水準 0.01 で女子の高値が認められる。この値は Ganrot³⁾ の正常値や Haverback⁴⁾ のものよりやや高いが、James⁵⁾ や Housley⁶⁾ の値より低い。これは測定法による差の他に、対象とした健康者の年令層の差にもよるものと思われる。又男女差については女子が男子より約20%高く Ganrot³⁾ の報告と一致している。小児期に高値を示す

理由については growth hormone⁷⁾ 乃至 growth factor⁸⁾ との関係が論ぜられているが、女子で高い理由については議論が分かれており、今日尚推察の域を出ない。しかし女子で思春期に相当して最高値を示すことや妊娠の後半に高値を示すこと⁹⁾ 等体内ホルモン環境の差が男女差の形成に関与している様に思われる。いずれにしてもこの様に α_2M は年令の変動や性差が著しいので、疾患時の変動をみる際には、この様な正常値の特徴を十分考慮する必要がある。

IV. 各種疾患時の α_2M 値について

腎疾患で高値を示すものはネフローゼ症候群に多い

が、なかでも著しい高値を示すものは20才以下のものが大部分を占めている。腎生検所見ではネフローゼ症候群のうちmembranous type, proliferative type を示すもので高いものが多い。次に腎の蛋白クリアランスについて検討を行なった(表2)。IgG クリアランスと Tf クリアランスの比、即ち C_{IgG}/C_{Tf} の値が0.20 以上のものは尿中に α_2M が出現しており、これらの群では臨床ステロイドが無効か又は殆んど効果が認められなかった。

ネフローゼ症候群での α_2M の増加について Kluthe 等¹⁰⁾ は turnover の研究から、糸球体選択性による血中貯留と循環血漿量の減少に原因があるとしている。我々

表2 尿 α_2M と分子量別蛋白クリアランス

	症 例	年	性	生 検 所 見	Steroid 効 果	T. P mg/dl	IgG/Tf	α_2M/Tf	C_{IgG}/C_{Tf}	$C\alpha_2M/C_{Tf}$
1	H. K	33	♀	Membranous	無	600	1.95	0.004	0.32	0.046
2	G. T	73	♂	Minimal change	不完 (A)	200	0.20	—	0.05	—
3	R. N	17	♀	Proliferative	不完 (B)	1,100	0.17	—	0.06	—
4	S. U	13	♂	Lobular	未 不 変	350	0.84	0.027	0.21	0.014
5	H. T	35	♂	Proliferative	未 完	340	0.13	—	0.05	—
6	M. T	18	♂	Sclerosing	不完 (A)	400	0.28	—	0.10	—
7	S. T	27	♂	Acute nephritis	未 完	90	0.45	—	0.19	—
8	R. M	19	♀	"	未 完	650	0.39	—	0.12	—
9	I. I	30	♀	S L E	無 (死)	580	2.00	0.039	0.21	0.023

図3 α_2M と肝組織像

の症例で著しい高値を呈するものはすべて 20 才以下の症例であって、若年者では α_2M 産生の盛んなことと、血中貯留、循環血漿量の減少等の原因が加わって著明な高値を示すものと考えられる。したがって腎疾患の臨床に重要なことは、 α_2M の血中濃度よりもむしろ尿中への出現であって、尿中への α_2M 出現の有無を知ることにはステロイド効果を予測する上で有用である様に思われる。

次に肝疾患についてみると、肝生検を施行した 28 例のうち、急性肝炎では α_2M はすべて正常範囲にあるが、慢性肝炎、肝硬変と進むにしたがって α_2M は上昇する傾向にある。肝組織像では α_2M 高値を示すものは、すべてにグ氏鞘内細胞浸潤が認められるが、浸潤の程度とは必しも平行関係になく、むしろ細胞浸潤が中等度の群で α_2M は高い。これに対して結合組織増生の程度とは良い相関を示している (図 3)。

糖尿病では α_2M がしばしば高値を示すものがあり、糖尿病患者を Boas の式にしたがい、やせ型、正常型、肥満型の 3 群に分けて α_2M をみると、やせ型に高いものが集中しているのに対し、正常型では中等度上昇をみるものがあり、肥満型ではほとんど正常範囲内にある (図 4)。これを合併症の有無からみると、腎障害や肝障害を合併するものは一般に高く、網膜症を合併する

ものの一部が軽度上昇している。合併症が臨床に認められない群で、罹病期間 5 年以上の群では中等度上昇を示している。次に insulin との関係が論ぜられている¹¹⁻¹²⁾ ので、血清 IRI 値との関係をみてみたが特に相関を示さず、又血糖負荷曲線から耐糖能との関係をみたが、耐糖能の悪いものでも必ずしも α_2M は高くなかった。

感染症では比較的慢性の経過をとる胆石症や胸膜炎等で軽度上昇がみられ、悪性腫瘍でも軽度上昇を示すが、血液疾患では年令的要因を除くとほぼ正常値にあり、ロイマチ様関節炎では従来報告されている様な増加は認められなかった。又甲状腺機能亢進症で軽度上昇がみられた。

この様に α_2M は疾患の急性期に増加するいわゆる急性相反応因子ではなく、肝疾患や糖尿病及び慢性感染症等にみられる様に、長期に渉る経過中に徐々に増加する蛋白の様である。 α_2M は trypsin, plasmin, thrombin, elastase 等の antiprotease として作用することがわかっているが、この様な protease は炎症の治療過程で重要な働きをもつものと思われ¹³⁾、こうした protease の増加に伴って血清中の normal inhibitor である α_2M の増加が生ずるのではなからうか。

V. α_2M の抗 plasmin 及び抗 trypsin 作用について

一般に α_2M 高値を示すものの全血清抗 plasmin を clot lysis time で測定すると、10 時間以上延長するものが多く認められる。しかし血清中には α_2M の他に、 α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, inter- α -trypsin inhibitor¹⁴⁾ 等があって、いずれも抗 plasmin 作用をもつものとされている。我々は α_2M を分離する第 1 段階と同一の塩析条件で血清の硫酸塩析を行ない、これをセファデックス G-200 でゲル透過を行ない、それぞれの分画の clot lysis time と α_2M 及び α_1 -antitrypsin の濃度を測定した。第 1 峰に一致して lysis の延長がみられ、 α_2M の分布ともよく一致している (図 5)。しかし α_2M の抗 plasmin 作用は他の血清中抗 plasmin に比してはるかに弱いものの様である。分離精製した α_2M について抗 plasmin 作用をみてみたが、各 lot で変性の割合が異なる為か一定の結果が得られなかった。

次に trypsin に対する作用についてみてみた。trypsin 活性の測定は基質 benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilid-HCl が加水分解を受ける際の吸光度の増加を 410m μ で測定した。血清 30 μ l に trypsin を漸増して加えると、trypsin 活性は僅かに上昇したあと、血清中の抗 trypsin が一定の活性に留まるが、trypsin が 100 μ g を越えると

図 4 糖尿病患者の体型と α_2M

図5 血清硫酸塩析分画 (2M~2.3M) の Sephadex G-200 ゲル濾過による anti-pl の分布

急に上昇する。次に trypsin 5mg をあらかじめ血清 3ml に加えてセファデックス G-200 ゲル濾過を行なったところ trypsin 活性は高分子の Fr I のみにあるが、この血清の抗 trypsin 作用は未だかなり残っている。このことは trypsin と高分子蛋白が速やかに結合し、又他の抗 trypsin よりこの結合の affinity が強い為、trypsin 活性が protect されるものと思われる。trypsin 活性を保持して血清蛋白と結合した複合体は trypsin-protein binding complex¹⁵⁾ と呼ばれている。この場合保持された活性は又 trypsin-protein esterase 活性 (以下 TPE 活性) と呼ばれている。血清のセファデックス G-200 分画では (図 6) TPE 活性は Fr I にのみ存在し、抗 trypsin 活性に

は 3 つの peak があり、Fr I の小さな抗 trypsin 活性は TPE 活性と平行してその約 18% に相当する。この Fr I に IgM, IgA, β -lipoprotein 等の抗血清を加えると、抗 α_2 M を加えたもののみの活性の低下があり TPE 活性は α_2 M によるものと思われる。この TPE 活性によっても α_2 M を測定することが可能で、正常者と各種疾患患者血清について TPE 活性と immunodiffusion 法で測定した α_2 M 値との関係は $r=0.86$ の相関が認められる (図 7)。TPE 活性の生理的意義ははっきりしないが、 α_2 M が他の inhibitor の作用を protect して運ぶいわゆる carrier protein の働きをするものの様に思われる。

次に我々は精製した α_2 M を 1% 燐タングステン酸カリで、negative staining を行なって電子顕微鏡で観察したところ H 型、H+I 型等の粒子が散見せられた。この粒子が α_2 M の分子そのものかどうかは不明であるが、 α_2 M が trypsin と結合して protect する作用をもち、他の protease の inhibitor として作用し、growth hormone と結合する等の性質を考え合せるとき示唆に富んだ構造である様に思われる。

終りに臨み終始御指導をたまわった恩師乾成美教授に深く感謝致します。

図6 Sephadex G-200 により gel 濾過分画した血清の TPE 活性と抗 trypsin 活性

図7 患者及び正常者の血清中 TPE 活性と α_2M

文 献

- 1) H. E. Schultze, I. Göllner, K. Heide, M. Schönenberger, and G. Schwick: Z. Naturforsch. **106**, 463 (1955)
- 2) M. Steinbuch, L. Pejaudier, M. Quentin, V. Martin: Biochim. Biophys. Acta **154**, 228 (1968)
- 3) D. O. Ganrot and B. Scherstén: Clin. Chim. Acta **15**, 113 (1967)
- 4) N. F. Adham, P. Wilding, J. Mehl and B. J. Haverback: J. Lab. J. Clin. Med **7**, 271 (1968)
- 5) K. James, G. Johnson and H. H. Fudenberg: Chin. Chim. Acta **14**, 207 (1966)
- 6) J. Houslly: J. Chin. Path. **21**, 27 (1968)
- 7) D. R. Hadden, and T. E. Prout: Nature **202**, 1342 (1964)
- 8) G. M. Healy and R. C. Parker: J. Cell Biol. **30**, 539 (1966)
- 9) D. O. Ganrot and B. Bjerre: Acta Obst. et Gynec. Scand. **46**, 126 (1967)
- 10) R. Kluthe, U. Hagemann and N. Kleine: Vox Sang. **12**, 308 (1967)
- 11) G. R. Zahnd, and J. J. Scheidegger: Helv. Med. Acta **30**, 506 (1963)
- 12) M. F. Keehan, M. J. Smith, S. M. Howard, J. W. Mehl and P. M. Beigelman: Clin. Chim. Acta **16**, 215 (1967)
- 13) K. Udaka, and H. Hayashi: Biochem. Biophys. Acta **97**, 251 (1965)
- 14) H. G. Schwick, N. Heimbürger und H. Hanpt:

Zschr. inn. Med. **21**, 193 (1966)

- 15) B. J. Haverback, B. Dyce, H. F. Bundy S. K. Wirtschafter and H. A. Edmondson: J. Clin. Invest **41**, 972 (1962)

〔追加〕 日大・医・臨床病理 河 合 忠

日常検査として、小児期の血清をセ・ア電気泳動法および免疫電気泳動法で分析している際に α_2 分画とくに α_2 -マクログロブリンが著しく高値を示す事に注目した。種々の年齢層について α_2 -マクログロブリンを検索すると、生後次第に増加し1~2才に最高値を示し正常成人値の2~3倍に達する。その後漸次減少し思春期になって正常成人値を示すようになる。この増加傾向は小児期の成長曲線によく類似しており、 α_2 -マクログロブリンと成長の間に密接な関連性を有することと推定し現在検索中である。Ganrot (Scand. J. Clin. Lab. Investi. **21**, 177, 1968) は trypsin-protein esterase (TPE) 活性を用いて種々の動物血清中の α_1 -マクログロブリンを測定した成績を報告している。すなわち、ラットおよびウシでは成長するにつれて逆に増加を示し、イヌでは成長するにつれてごくわずかに増加するに過ぎないという。したがって、ヒト α_2 -マクログロブリンとは異なった態度を示しており、 α_2 -マクログロブリンが成長ホルモン作用をもっているとは考えられない。

〔質問〕 東大・医・小児科 吉 野 加津哉

- 1) α_2M の正常値がかなり高いが、抗原として用いた α_2M が β -リポ蛋白、 γM などを微量に含んでいるため、それに対する抗体ができていないためではないか。
- 2) インスリンと結合する蛋白に対して否定的な見解であると考えてよいか。また糖尿病のやせ型に α_2M が高いというが、他疾患（感染症）との合併のためではないか。
- 3) 臍帯血の α_2M の測定値は如何。

〔答〕 岐阜大・医・1内 安 藤 宏

- 1) α_2M の値が特に小児で高いのは、抗原の純度の問題よりも、むしろ、試料が少なかつたため、適度な稀釈で測定できなかったものがあるめかと考えるので今後検討したい。（河合氏の追加参照）
- 2) インスリンとの関係は血清 IRI 値との相関からの結論である。また糖尿病の型別についての検討は、本文中の通りであるが、今後尚例数を重ねて検討する。
- 3) 臍帯血についての分析は適当な試料のないため行っていない。