尿中低分子量アルブミンに関する検討*

森 三樹雄**・林 康之・川村 明子***

Summary

Low molecular proteins contained in the urine of the patients of multiple myeloma and diabetes mellitus were studied physicochemically and immunologically. Urinary low molecular proteins, approximately 10,000 to 50,000 in molecular weight, were concentrated about 100 times by ultrafiltration.

Immunoelectrophoresis of these low molecular proteins revealed fractions common in antigenic properties with albumin, α_1 -antitrypsin, ceruloplasmin, transferrin, IgG and Bence-Jones protein. The low molecular weight albumin was separated and purified by chromatography on Sephadex G-75 and DEAE-cellulose. Purity of this albumin was checked by double immunodiffusion and polyacrylamide gel disc electrophoresis. The approximate molecular weight of this albumin was measured as 10,000 by ultracentrifugal and light scattering analysis. The ability of the low molecular fraction to induce formation of antibody was confirmed with experimental inoculation to rabbits.

はじめに

正常人および腎疾患の患者尿中には8~20種類の血清蛋白が出現することは既に知られている^{1,3,4,12,17,19,27,28)}。その主なものはalb, α_1 -抗トリプシン(α_1 -AT), セルロプラスミン(Cp), ハプトグロビン(Hp), トランスフェリン(Tf), β -glob, γ -glob²⁰⁾等があり, 多量にしかも出現頻度の高いのはalbである。尿中のalbは血中のalbが腎糸球体を通して出てきたもので, 分子量は血清中のものと同じく約7万であると考えられてきた^{2,6,7,19)}。しかしながら1950年に Friberg がカドミウム中毒患者尿中に沈降係数2.3~2.45Sで分子量2~3万の低分子量albの出現を報告して以来²²⁾, Merler ら(1962)²⁾, Press ら(1962)²³⁾, Kench ら(1965)¹⁵⁾により低分子量albの存在が報告されている。我々は多発性骨髄腫患者のBence-Jones蛋白の精製過程において, 市販の抗ヒトalbウサギ血清と反応する分子量の小さい蛋白質を認め, その免疫学的, 物理化学的性状を検索した結果を報告する。

試料および検討方法

1. 検体の採取

順天堂大学付属医院に入院中の多発性骨髄腫および糖

尿病を伴った腎疾患の患者尿を採取した。防腐剤は蛋白質の変性を防ぐため使用せず, -20℃の冷凍庫に保存した。使用時は室温に放置し溶解させザイツ型滅菌器にて汙過滅菌した。

2. 試料の濃縮

原尿蛋白濃度300mg/dl前後の患者からの尿をプールし合計50lをバイオエンジニアリング社の濃縮器MC-2型にAmicon社のDiaflo限外汙過膜XM-50, UM-10を用い順次加圧汙過し^{8,29,30)}, 分子量10,000~50,000の蛋白質を濃縮し, 最終蛋白濃度1.5g/dlのものが2,500ml得られた。

3. 試料の精製

濃縮プール尿の1部2lを低温室内で攪拌しながら, 2.46Mとなるように硫酸を少しずつ加え, 1晩低温室内で塩析し, 沈殿物を10,000rpm, 30分遠沈後, トリス塩酸緩衝液で透析し, 2.55g/dlの蛋白溶液170mlが得られた。これをSephadex G-75に, DEAE-celluloseカラムには再濃縮したものをを用いて分離精製した^{14,16,37)}。Sephadex G-75カラムの溶出は2.63×90cmのガラスカラムを用い, 流速25ml/hr, トリス塩酸緩衝液, pH 8.0, 0.1Mで溶出した。DEAE-celluloseでは2.6×12.6cmのカラム, 流速75ml/hr, pH 8.0, 0.005M リン酸緩衝液

* Studies on urinary low molecular albumin.

** Mikio Mori, Yasuyuki Hayashi, 順天堂大学医学部臨床病理学教室。

*** Akiko Kawamura, 順天堂大学医学部付属病院中央検査室。

より始め、stepwise 法で漸次塩濃度を高め、1.0 M の NaCl を加えた 0.02M リン酸緩衝液で溶出した単一のピークを取り出し、これを数回くり返して試料として用いた。尚、このピークより得られた試料が免疫拡散法で、 α_1 -AT, Cp, Tf, IgG, IgM, IgA の抗血清に対して反応せず、抗ヒト alb 血清のみに反応することを確認した。

ディスク電気泳動法でこの試料が alb の近くに単一のバンドを作ることを確認した。

4. 蛋白濃度の測定

ビュレット法³⁶⁾ および 280nm の紫外吸収で測定した^{21,34)}。

5. ディスク電気泳動

Ornstein & Davis の法によった^{10,35)}。

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 70 mm。

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。

6. 免疫拡散法³⁸⁾と免疫電気泳動法³⁹⁾

ともにバルビタール緩衝液 pH 8.6, μ 0.06 を 2 倍希釈したものゝ泳動用寒天末を 1% にとかして使用。免疫電気泳動法での泳動時間は定電圧 (200 V) 90 分とし、反応条件は免疫拡散法および免疫電気泳動法とも 37°C, 1 晩とした。

7. 使用抗血清

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

8. 抗体産生能

体重 2 kg の家兎に Freund complete adjuvant を用いて免疫した。1 回免疫量 12~15 mg/ml 濃度の抗原液 1 ml に adjuvant 1 ml を加えたもので、これをフットパッドおよび頸脊部皮下に注入した。

9. 分子量の測定

試料の分子量測定は超遠心分析法^{31~33)}と光散乱分析法³⁴⁾を用いた。

1) 超遠心分析法

装置は Beckman 社のスピノモデル E を使用し、0.02M リン酸緩衝液 pH 8.0 に 0.3% の蛋白濃度の試料について沈降係数および分子量測定 (沈降平衡法の干渉法)を行なった。測定は 20°C で行なった。

2) 光散乱分析法

装置は島津光散乱光度計 PG-21 型を使用し、pH 8.0

0.02M リン酸緩衝液を溶媒として、試料の蛋白濃度 0.026%, 温度 24°C の条件で測定した。試料の光学的精製はスピノモデル L₄, 分離用遠心機で 30,000rpm で 60 分遠沈後、コーニング社のウルトラファイニングラスフィルターで光散乱測定用セル中に汙過したものを試料として測定した。

結 果

1. 免疫学的性状

濃縮した患者尿を免疫電気泳動法およびディスク電気泳動法によって検索したものが Fig. 1, Fig. 2 である。即ち患者尿中に血清蛋白が数種類確認された。その主なものは alb, Tf, IgG, Bence-Jones protein 等である。Sephadex G-75 を用いたカラムクロマトグラフィー (Fig. 3) および DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィー (Fig. 4) により分離精製された尿中の低分子単一蛋白と正常ヒト血清 alb は抗ヒト alb ウサギ血清を用いた 2 重拡散法で共に沈降反応をおこし、共通の抗原性が認められた。

2. 物理化学的性状

正常ヒト血清 alb と尿中低分子単一蛋白について免疫電気泳動法により易動度を比較すると、尿中低分子単一蛋白は正常ヒト血清 alb にくらべて易動度が 10~16% 速かった。吸収曲線については 240nm よりも短い

Fig. 1. Immunoelectrophoretic patterns.

Sample well : A, normal human serum (3 μ l); B, patient's urine (300mg/dl, 8 μ l); C, concentrated patient's urine (M. W. 1.5×10^4 fraction, 1,952mg/dl, 8 μ l); D, eluate from DEAE-cellulose by 0.005M phosphate buffer (300mg/dl, 8 μ l); E, eluate from DEAE-cellulose by 0.02M phosphate buffer + 1.0M NaCl (300mg/dl, 8 μ l).

Antiserum : anti-whole human serum.

Fig. 2. Disc electrophoretic patterns.

A, Salted out urine; B, eluate from Sephadex G-75; C, eluate from DEAE-cellulose by 0.02M phosphate buffer + 1.0M NaCl.

Fig. 3. Elution pattern of concentrated urine obtained by gel filtration on Sephadex G-75 column.

Column size, 2.63×90cm; sample, 10ml of concentrated urine (25.5mg/ml); buffer solution, 0.1M Tris-HCl buffer at pH 8.0; flow rate, 25ml/hr; fraction size, 5ml.

波長によると吸収が大きくなり、正常ヒト血清 alb との間に差は認められなかった。

3. 抗体産生能

市販の抗ヒト alb 血清と沈降反応をおこす尿中低分子量単一蛋白を抗原として家兎に免疫を行なうと、初回免疫後5週目に抗体産生を認めた。即ち我々の尿中低分子量単一蛋白は抗体産生能を有し、その抗体はヒト alb とも沈降反応をおこし、ヒト血清 alb と共通の抗原性を有することを認めた (Fig. 5)。

Fig. 4. Elution pattern of concentrated urine by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose.

Column size, 2.6×12.6cm; sample, 20 ml of concentrated urine (39mg/ml); flow rate, 75ml/hr; fraction size, 15ml.

Elution buffer: I, 0.005M phosphate; II, 0.02M phosphate; III, 0.02M phosphate + 0.1M NaCl; IV, 0.02M phosphate + 0.4M NaCl; V, 0.02M phosphate + 1.0M NaCl; pH, 8.0.

The fraction eluted by the buffer V is the purified fraction.

Fig. 5. Immunological analysis by Ouchterlony's test.

Ag, purified albumin fragment; Ab and As, antibody against the purified albumin fragment; A-Al, antihuman albumin serum; Al, human serum albumin; S, normal human serum.

Fig. 6. Ultracentrifugal pattern of the purified fraction. 56,000rpm, 48 minutes.

4. 分子量

超速心分析法による沈降図形 (Fig. 6) は、56,000 rpm 48分で僅かにピークのできかけているのが観察され、沈降係数が1 S 以下であることが推定された。また沈降平

衡法(干渉法)による分子量の測定は20,000rpmで求めると、 1.05×10^4 であった。これに対し光散乱法による1濃度近似法で測定した分子量は9,700であった。尚、偏光解消度については実測補正を行なった。又 $\rho_v = 0.629$ dn/dc は 0.190 (cc/g) を用いて算出した。

考 察

以上述べた如く、我々は分子量約1万で血清 alb と同様の免疫学的性状をもつ蛋白質が尿中に排泄されたことを確認した。その由来については未だ検討するに至っていないが、先人の業績をふりかえて我々の実験成績に関する2, 3の考察を述べる。尿蛋白の免疫学的性状の検討は Visking tube や、いわゆるメンブランフィルターの製品化普及と共に多数行なわれるようになり、腎疾患^{6,7,11,12,19,27)}、健康人^{1,2,3,9,13)}に関して数多くの報告がみられる。血漿蛋白成分のうち、出現頻度の高いものは alb, Tf, IgG で、 α_1 -糖蛋白, IgA, Cp, Hp などがこれに次ぐものとされている^{1,2)}。また、尿蛋白成分として多少とも疾患特異性が高い点で注目されているのは、ミエロームおよび腎移植患者尿における β_2 -microglob, 尿細管疾患における β_2 -microglob, free light chain, lysozyme, retinal binding protein, ribonuclease^{6,7,26,44)} などがあげられている。また永井ら¹²⁾は腎疾患で α_2 -macroglob, α_2 -リボ蛋白, β -リボ蛋白, IgM など高分子蛋白の出現を報告している。Harrison ら¹⁸⁾は Fanconi 症候群で 23 Å の α_2 -蛋白と 17 Å の post γ -蛋白が増加すると述べ、かなり巨大な分子量をもつ蛋白も尿中に排出されることを示した。一方尿中 alb に関しては、Friberg がカドミウム中毒例について、沈降係数 2.3~2.45 S (分子量 2~3 万) の小分子量 alb を認め、抗ヒト血清 alb と反応することを証明した²²⁾。そして Press²³⁾ らは血清 alb をキモトリプシンで消化し、分子量 19,000 のフラグメントでは抗原性をもち 7,100 では認められないと報告している。我々の結果では約 10,000 の分子量であるが、抗血清と沈降反応を示しかつ抗体産生能をもつことも証明された。元来血清 alb は平均分子量約 7 万の蛋白質とされ、尿中 alb もほぼ血清 alb 同様に考えられてきたわけである。Press らの報告は人為的に alb をフラグメントとし、約 2 万まで抗ヒト血清に対する抗原性を認めたのであるが、われわれはさらにその約 1/2 の分子量をもつ尿中排出 alb が、抗原性ととも抗体産生能をもつことも確かめた。これは現在のところ alb としての免疫学的性状を有する蛋白に関して、最小単位を示したものと考えられる。しかし、この低分子蛋白が血漿 alb をポリマーとしたとき、モノマーであるか否かについては未だ証

拠不十分で、今後検討されねばならない。

また、臨床的に、尿細管障害は糸球体病変による蛋白尿より一般に微小分子蛋白尿がみられるとする考え方が強く^{24,25,41)}、われわれも糖尿病性腎症ではかなり小分子の蛋白質を認めている。そして alb に関していえば、腎疾患のとき腎は alb の degradation の主要臓器^{42,43)}と目されており、われわれの認めた低分子 alb は血漿中に存在した低分子 alb が流出したものと簡単に考えることはできない。しかしこの低分子 alb が腎で生じた alb フラグメントであるとの考え方も無菌尿中で放置したときフラグメントを生じない。また尿はペプチターゼ酵素をもたないのが一般的なことから考え難い。

結 論

以上尿中に分子量が約 1 万の低分子量 alb の存在を明らかにし、それが免疫原性をもつことを証明した。この低分子量 alb が既に血中に存在していたのか、あるいは腎臓の糸球体あるいは尿細管由来のものかは不明である。

文 献

- 1) Grant, G. H. : The protein of normal urine. *J. Clin. Path.* **10**, 360 (1957).
- 2) Rowe, D. S. and Scoothill, J. F. : Serum proteins in normal urine. *Clin. Sci.* **21**, 75 (1961).
- 3) Berggard, I. : Studies on the plasma proteins in normal human urine. *Clin. Chim. Acta* **6**, 413 (1961).
- 4) Beauchene, R. E. et al. : The interrelationships of age, tissue protein synthesis, and proteinuria. *J. Geront.* **25**, 359 (1970).
- 5) Merler, E. et al. : Differences between urinary albumin and serum albumin. *Nature* **196**, 1207 (1962).
- 6) Peterson, R. A. et al. : Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria : Determinations of urinary excretion of microglobulin, albumin and total protein. *J. Clin. Invest.* **48**, 1189 (1969).
- 7) 木村正己 : 生体障害の検出法, 血清, 尿蛋白, 総合臨床 **23**, 107 (1974).
- 8) Pollak, V. E. et al. : Serum proteins in urine : Examination of new method for concentrating urine. *J. Lab. Clin. Med.* **71**, 338 (1968).
- 9) Rigas, D. A. and Heller C. G. : The amount and nature of urinary proteins in normal human subjects. *J. Clin. Invest.* **30**, 853 (1951).
- 10) Orstein, L. and David. B. J. : Disc electrophoresis, Rochester, New York : Distillation Products Industries (1961).

- 11) Dillard, M. G. et al. : Proteinuria and renal protein clearances in patients with tubular disorders. **78**, 203 (1971).
- 12) 永井一男, 有村博行: 尿蛋白の免疫学的分析 **56**, 147 (1968).
- 13) Poortman, J. and Jeanloz R. W. : Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in human urine collected before and after exercise. *J. Clin. Invest.* **47**, 386 (1968).
- 14) Pesce, A. J. et al. : Selectivity of proteinuria: An evaluation of immunochemical and gel filtration techniques. *J. Lab. Clin. Med.* **75**, 588 (1968).
- 15) Kench, J. E. et al. : A biochemical study of the minialbumin to be found in the urine of men and animals poisoned by cadmium. *S. A. Med. J.* **39**, 1191 (1965).
- 16) Davis, J. S. et al. : Characterization of urine protein by gel filtration. *Clin. Chim. Acta* **21**, 357 (1968).
- 17) Harrison, J. F. and Northam, B. E. : Low molecular weight urine investigated by gel filtration. *Clin. Chim. Acta* **14**, 679 (1966).
- 18) Harrison, J. F. and Blainey, J. D. : Low molecular weight proteinuria in chronic renal disease. *Clin. Sci.* **33**, 381 (1967).
- 19) Joachim, G. R. et al. : Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* **43**, 2332 (1964).
- 20) Franklin, E. C. : Physicochemical and immunologic studies of gamma globulins of normal human urine. *J. Clin. Invest.* **38**, 2159(1959).
- 21) 久野春己, 木原弘二: 医学のあゆみ **63**, 530 (1967).
- 22) Friberg, L. : Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med. Scand.* **138**, 1 (1950).
- 23) Press, E. M. and Porter, R. R. : Isolation and characterization of fragments of human serum albumin containing some of the antigenic sites of the whole molecule. *Biochem. J.* **83**, 172 (1962).
- 24) Greeth, 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).
- 25) Gerard, P. : Comparative histophysiology of the vertebrate nephron. *J. Anat.* **70**, 354 (1936).
- 26) Johansson, B. G. and Ravnskov, U. : The serum level and urinary excretion of α_2 -microglobulin and β_2 -microglobulin and lysozyme in renal disease. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **6**, 249 (1972).
- 27) Kühn, R. A. : Die grosse Proteinurie, *Ves Gustav Fischer Verlag, Jena* (1966).
- 28) Putnam, F. W. : The Plasma protein **1**, 233, Academic Press (1960).
- 29) 橋本光一, 岸田比出子: , 膜分離技術の進歩, *科学と工業* **44**, 347 (1970).
- 30) Blatt, W. F. et al. : Protein solutions: Concentration by a rapid method, *Science* **150**, 224 (1965).
- 31) 磯見二郎: 超遠心法, 蛋白質, 核酸, 酵素別冊 **29** (1968).
- 32) 河原一男: 超遠心機による蛋白質の拡散係数および分子量の推定法 蛋白質, 核酸, 酵素 **13**, 768 (1958).
- 33) 藤田 博, 小高忠男, 内山敬康: 続生物物理学講座II, 物理的測定法II, 日本生物物理学会編集, 吉岡書店 (1968).
- 34) 内山敬康: 光散乱法: 続生物物理学講座I, 物理的測定法I, 日本生物物理学会編集, 吉岡書店 (1968).
- 35) Raymond, S. and Weintraub, L. : Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711 (1959).
- 36) 金井 泉, 金井正光: 臨床検査法提要, 金原出版 (1972).
- 37) 林 康之, 安藤成代, 川村明子: 抗ヒトアルブミン血清と反応する尿中低分子タンパク質について, *臨床病理* **19**, 別冊, 456 (1971).
- 38) Ouchterlony, Ö. : Antigen-antibody reaction in gels. IV. Types of reaction in coordinated systems of diffusion, *Acta Path. Microbiol. Scand.* **32**, 230 (1953).
- 39) Williams, C. A. and Grabar, P. : Immuno-electrophoretic studies on serum protein, antigen of human serum. *J. Immunol.* **74**, 397 (1955).
- 40) Rothschild, M. A. et al. : Albumin metabolism. *Gastroenterol.* **64**, 324 (1973).
- 41) Schultze, H. E. and Heremans, J. F. : The urinary proteins. In molecular biology of human proteins, **1**. 670, Elsevier, Amsterdam (1966).
- 42) Waldmann, T. A. and Strober, W. : Metabolism of immunoglobulins. *Prog. Allergy* **13**, 1 (1969).
- 43) Jensen, H. et al. : Albumin metabolism in nephrotic syndrome in adults. *Clin. Sci.* **33**, 445 (1967).
- 44) Vesterberg, O. and Nise, G. : Urinary proteins studied by use of isoelectric focusing. **1**. Tubular malfunction in association with exposure to cadmium. *Clin. Chem.* **19**, 1179(1973).