〔教育講演〕

血漿蛋白質研究の歩み

—ムチンから α_1 -T 糖蛋白質まで—

河 合 忠

はじめに

著者自身の蛋白質研究の端緒となったのは昭和 30 年 (1955 年) 札幌医科大学附属病院におけるインターン研修である。当時、同院内科では和田武雄先生がリーダーで、胃液ムチンのポーラログラフィーによる研究が行われており、インスリン刺激時の胃癌患者胃液に特徴的な所見が指摘された¹⁻⁴⁾。一方、谷内昭先生はポーラログラフ以外に、濾紙電気泳動法、デン粉ブロック電気泳動法、Ouchterlony 二重拡散法を用いて血清蛋白の病的変動を体系化し、serum protein profile を提唱した⁵⁾。その後、血清蛋白・癌に関する多彩な研究へと拡大された⁶⁻⁹⁾。

昭和 31 年 (1956 年) に著者が渡米し、University of Miami School of Medicine & Jackson Memorial Hospital の病理学教室 (主任: W. A. D. Anderson) で臨床病理学を研修した。当時、Jon V. Straumfjord 助教授の直接指導のもとに濾紙電気泳動法による血清蛋白分画の研究を始めた¹⁰⁾。昭和 37 年 (1962 年) 帰国後、国鉄 中央鉄道病院 (現・JR 東京総合病院) 臨床検査科での研究へと継続された。このときに寒天ゲル免疫電気泳動法などの新しい分析技術を導入して研究を続け、それらをまとめたのが「濾紙電気泳動法による血清蛋白分画の臨床的応用」である¹¹⁻¹⁷⁾。昭和 41 年 (1966 年) から日本大学医学部臨床病理学教室・日大駿河台病院検査科に移り、スペシャル・レファレンス・ラボラトリー (SRL) からの症例検索も加わり、M-蛋白血症、免疫グロブリン欠乏症、リボ蛋白分画の異常などの研究が進み、それらの業績を集大成したのが「血漿蛋白その基礎と臨床」である¹⁸⁾。昭和 49 年 (1974 年) に自治医科大

学臨床病理学教室に移ってからは、従来の研究テーマに加えて、低分子蛋白、とくに β_2 -ミクログロブリン、 α_1 -ミクログロブリンの研究に従事し、ごく最近では α_1 -T 糖蛋白の研究に発展しつつある。

電気泳動法などの蛋白分析技術の開発と改良の
あゆみ

中央鉄道病院では、従来から用いられていたチセリウス電気泳動法から、より多数検体の処理に適した濾紙電気泳動法に切り換え、日大駿河台病院ではセルロースアセテート膜電気泳動法に変えた。免疫電気泳動法では、美麗な分析パターンを保存するために、未乾燥ゲルをそのまま染色し、脱色後直接エンラージャーによる焼付け法を工夫した。

分子サイズによる分析としては、以前は分析用超遠心機が用いられていたが、日常検査では利用できないため、Sephadex G-200 superfine を用いた薄層ゲル濾過法と免疫ゲル濾過法を新しく開発し、M-蛋白、アイソザイムの分析に広く使われるようになった¹⁹⁻³⁰⁾。

リボ蛋白の電気泳動では、Lees & Hatch 改良法を逸早く導入するとともに³¹⁾、セルロースアセテート膜電気泳動法によるリボ蛋白分画をより良いパターンを得るために、オゾン発生装置を開発し、オゾン・シッフ染色法の導入を可能とした³²⁻³⁷⁾。また、リボ蛋白分画中の脂質成分の染色法、リボ蛋白 X(Lp-X) の定量法などの開発にも成功した³⁸⁻⁴¹⁾。

以上の生化学的・免疫化学的分析法の導入に加えて、血清蛋白異常症の病態を詳しく解析するために、粘度測定⁴²⁻⁴⁴⁾、電子顕微鏡検査、組織化学的・免疫組織学的検査を随時取り入れた。

Past and present of plasma protein research in clinical laboratory—From mucin to α_1 -T glycoprotein—.

Tadashi Kawai; 自治医科大学臨床病理学教室

Correspondence address: Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School, Minami-kawachi-machi, Kawachi-gun 329-04, Japan.

(22) 生物物理化学

電気泳動法による体液中蛋白分析の臨床的
意義の研究のあゆみ

濾紙電気泳動法による血清蛋白分画の臨床的应用について、まず日常検査としての測定技術を確立することが前提であったが、臨床症例のデータを整理するために、血清蛋白分画専用の検査依頼票を作成した。そして、検査依頼票に臨床データの記入された症例については、血清蛋白分画所見とそれから考えられる病態を検査報告書に記入して主治医に返送し、それらの写しを検査室にファイルした。国鉄中央鉄道病院では血清蛋白分画の依頼のあった全症例について、また日大病院、SRL、自治医大病院などでは免疫電気泳動分析の依頼のあった全症例について、上記のシステムを採用してきている。これらの検査結果をすべて詳細に検討することによって研究は順調に展開された。そのなかで、とくに濾紙・セア膜電気泳動法については、次の3点に留意した。すなわち、①人為的影響の明確化：技術的因子の他に、患者自身の病態変化ではない検体保存、溶血、高脂血などがどのように分画像に影響を及ぼすか^{12,13)}、②各分画値(%およびg/dl)のほかに、分画パターンの異常を重視、たとえば β - γ bridging¹⁵⁾、リバノール沈殿法によるM-蛋白帯の鑑別¹⁷⁾、セパラックス膜上の波形帯⁴⁵⁾などに注目し、その臨床的意味付けと発生機序を解明した、③各分画の相対易動度の数値化：たとえばalb分画と β -glob分画の距離を1.0とし、グラフ用紙または算定によって他のglob分画の相対易動度を求め、病態像との対比を行い、ネフローゼ症候群における α_2 -glob分画の遅れ¹³⁾、多クローン性IgGについての γ -glob分画のモードの易動度の変動¹⁸⁾、M-蛋白帯の相対易動度の分布⁴⁶⁾などの意義を指摘した。

以上の研究成果を中心に集大成したのが、1969年医学書院から出版された「血漿蛋白その基礎と臨床」であり¹⁸⁾、その後一部の改訂を含めて翻訳されたのが「Clinical Aspect of the Plasma Proteins」(1973年発行)とスペイン語翻訳版である。また、これらの業績が認められて1969年に第8回電気泳動学会賞、1973年に第10回日本翻訳文化賞を受賞した。また、これらのおもな業績の詳細は電気泳動学会の教育講演の記録を参照していただきたい⁴⁷⁻⁴⁹⁾。

尿蛋白分析の低蛋白分子に関する研究のあゆみ

日常臨床検査の対象として、血液に次いで多いのが尿である。まず、ネフローゼ症候群などの尿蛋白分画結果から、①各分画について透過比を求めることによって糸球体基底膜の破壊度を推定すること、および②糸球体性蛋白尿と尿細管性蛋白尿を鑑別すること、を試みた⁴⁸⁾。濾紙・セア膜電気泳動法による血清・尿蛋白分画によって、ある程度の目的を達した。しかし、より精度の高い病態像を知るために分子ふるい効果を利用した薄層ゲル濾過法を開発し十分な成果を上げ²⁴⁾、さらに近年になってポリアクリルアミド電気泳動法を研究的に用いるようになった。このような日常検査のデータのなかから注目されはじめたのが尿中低分子蛋白成分の挙動である。

低分子蛋白 (low molecular weight proteins; LMP) は分子量約6万ダルトン以下の蛋白質で、血漿から糸球体基底膜を容易に通過して糸球体濾液中に移行し、主として近位尿細管から約95%強が再吸収・異化され、尿中にごく微量が排泄されている⁵⁰⁾。その代表的な成分を表1に列記した。これらのうち、著者らがとくに研究の対象としたのが β_2 -ミクログロブリン(β_2 -m)⁵¹⁻⁵⁴⁾と α_1 -ミクログロブリン(α_1 -m)⁵⁵⁻⁶¹⁾である。

表 1. 主要な低分子蛋白の性状

蛋白成分	分子量 ($\times 10^3$)	糖質 (%)	
β_2 -ミクログロブリン	11.8	0	HLA のL鎖
リゾチーム	14.6	0	単球に多く含まれる
レチノール結合蛋白	21.0	0	プレアルブミンとの結合
免疫グロブリンL鎖	22.0~	0	免疫グロブリンのフラグメント
α_1 -ミクログロブリン	33.0	19.5	肝細胞・リンパ球で産生
β_2 -糖蛋白Ⅲ	35.0	10.0	
β_2 -糖蛋白Ⅰ	40.0	18.8	
Zn- α_2 -糖蛋白	41.0	18.2	
ビタミンD結合蛋白	41.0	4.2	GC成分
α_1 -酸性糖蛋白	44.1	37.9	急性期蛋白
α_2 -HS-糖蛋白	49.0	13.4	小児期に高値

β_2 -m と α_1 -m の間のおもな違いは、分子量、荷電（電気易動度、等電点）、糖質の有無、産生細胞（ β_2 -m はすべての有核細胞； α_1 -m は主として肝細胞）、ならびに尿中での安定性（ β_2 -m は酸性尿中で不安定； α_1 -m は比較的安定）などである。その他に、確証は得られていないが、近位尿細管での処理のされ方（量的または質的？；糖鎖の有無と関連？）が異なるように思われる。また、血液中で β_2 -m はすべて monomer として存在するが、 α_1 -m の過半数以上は IgA と複合体を形成している。しかし、尿中に排泄されるのは β_2 -m、 α_1 -m とともに monomer である。

尿管障害があると、上記の低分子蛋白成分の再吸収・異化が妨げられて尿中への排泄量が著しく増加する。この場合、排泄量そのものよりも、アルブミンなどの高分子蛋白などとのクリアランスを比較することによってきわめて有効に糸球体性蛋白尿との鑑別が容易となる。腎糸球体障害では、これらの低分子蛋白の血中濃度は血清クレアチニンよりも早期に上昇しはじめ、 β_2 -m より α_1 -m のほうがより早期の腎不全をとらえることができる。その他に、いろいろな低分子蛋白の間にも違いがあって、尿管上皮における再吸収に差が認められるようである。すなわち、 β_2 -m やレチノール結合蛋白 (RBP) のように糖質をもたない低分子蛋白群と、 α_1 -m や α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AG) のように糖質を多量に含有する低分子蛋白群では異なった態度をとるようである。すなわち、nonselective tubular proteinuria (非選択的尿管性蛋白尿) では上記のすべての低分子蛋白の再吸収は妨げられて尿中排泄量が増加し、近位尿管に局在する N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) の排泄も伴っている。たとえば、重金属中毒（とくに Cd）、感染後慢性間質性腎炎、アミノ配糖体抗生剤投与による腎障害、上部尿路感染症、熱傷後の腎障害、急性ショック後の腎障害、カリウム代謝異常、ときには糖尿病性腎症、高血圧性腎硬化症などにおいて、血清クレアチニンの明らかな上昇が現れない早期にすでに非選択的尿管性蛋白尿が認められる。しかし、上記の病態から回復しつつある時期や骨髄腫腎における早期の腎障害では β_2 -m や RBP の排泄がほとんど増加がなく、NAG の他 α_1 -m や α_1 -AG の増加を伴うような selective tubular proteinuria (選択的尿管性蛋白尿) が認められることがある^{50, 62, 63)}。

α_1 -T 糖蛋白の研究

α_1 -T 糖蛋白 (α_1 -T glycoprotein; α_1 -T) は、1964 年

に Haupt らにより初めて報告された⁶⁴⁾。 α_1 -T はトリプトファン含量が少なく、約 18% の糖質を含有することから tryptophan-poor α_1 -glycoprotein とも呼ばれている。Haupt らの原法では精製の再現性が悪く、和田らは Con A Sepharose カラムで始まる 5 段階のクロマトグラフィー操作にて精製し、収率約 3% であった。モノクローナル抗体作成後はアフィニティクロマトグラフィーを組み合わせるにより、より簡潔化し、収率約 8% までに改善した。精製 α_1 -T は SDS-PAGE で分子量 77,500 ダルトンの位置に単一の蛋白帯を形成し、等電点分画では pI が 4.5 であった⁶⁵⁾。

測定は、抗 α_1 -T ウサギ抗血清と抗 α_1 -T モノクローナル抗体を用いて一元放射状免疫拡散法 (SRID)、ELISA 法、およびラテックス凝集法により行った。SRID 法の測定範囲は 0.5~25 mg/dl、ELISA 法では 10~1,000 ng/ml であった。これらの測定法による健常者血清 α_1 -T 濃度は正規分布を示し、 $m \pm SD$ の範囲は 5~9 mg/dl であり、各年代間および男女間に有意差は認められない。血液以外の種々の体液中にもごく微量検出された⁶⁶⁾。

各種患者血清についての α_1 -T 濃度は、慢性腎炎、膠原病、多発性骨髄腫などで低値を示す症例が多く、肝炎、肝硬変、肝癌においても低値が認められた。高値例は肝炎や急性骨髄性白血病の一部にみられた。 α_1 -T の腎からのクリアランスは、正常人に比して慢性腎不全患者で約 10 倍も増加していたが、排泄量そのものはきわめて小さく、腎不全での血清 α_1 -T の低値の原因とは考えられなかった。したがって、肝実質細胞との関連が疑われた。血清 α_1 -T 値と血清アルブミン値、コリンエステラーゼ値との相関係数はそれぞれ $r=0.529$, 0.507 と相関傾向が認められた。さらに、20 名の入院患者について、経時的に測定した結果でも、血清中の α_1 -T はアルブミンとコリンエステラーゼと並行して動き、しかもより大きな変動を示した。また、白血病症例についても、肝毒性の強い抗腫瘍剤、抗生剤の投与にあわせて変動した。これらのことから、 α_1 -T の主要産生部位は肝臓と推定された。一方、白血病の寛解期や肝炎の回復期など血清 α_1 -T が高値を示すことは、肝細胞再生による蛋白合成能の上昇に由来すると考えられ、肝細胞の予備能を反映する一つの指標となりうると推定される^{66, 67)}。

結 語

著者らの蛋白質研究は、電気泳動法という貴重な分離分析技術によって、ほとんどすべての患者をスクリーニ

(24) 生物物理化学

ングし、細心の観察によって、より多くの情報を読み取り、まず蛋白異常を示す患者を見逃さないことに重点を置いてきた。そして、ある異常が見つければ、さらにいろいろな特殊な分析技術を駆使して病気の本態を探究するという方向であった。過去 30 年を振り返って、電気泳動分析が蛋白研究と日常診療にいかにな大きな役割を果たし、そして今後もいままです以上に重要な役割を果たすであろうと思う。

著者の長年の研究にご指導とご協力をいただいた札幌医科大学内科、国鉄中央鉄道病院検査科、順天堂大学医学部臨床病理学教室、日本大学医学部臨床病理学教室検査部、自治医科大学臨床病理学教室臨床病理部、スペシャル・レファレンス・ラボラトリー、の各位ならびに平井秀松会長はじめ多くの電気泳動学会会員諸兄姉に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 和田武雄：診断と治療，31：963，1956.
- 2) 和田武雄，大原弘通：日本臨牀，15：520，1957.
- 3) 和田武雄，他：癌の臨牀，4：189，1958.
- 4) 和田武雄：日内会誌，50：651，1961.
- 5) Yachi, A.: 札幌医学雑誌，17：389，1960.
- 6) 和田武雄，他：日新医学，49：507，1962.
- 7) 和田武雄：最新医学，19：849，1964.
- 8) 和田武雄，他：最新医学，23：2087，1968.
- 9) 和田武雄，谷内 昭：臨牀免疫，4：847，1972.
- 10) Kawai, T.: Bull. Univ. Miami Sch. Med., 16：89，1962.
- 11) 河合 忠：最新医学，19：2980，1964.
- 12) 河合 忠：最新医学，19：1001，1964.
- 13) 河合 忠：臨牀病理，12：162，1964.
- 14) 河合 忠：生物物理化学，10：111，1964.
- 15) 河合 忠：臨牀病理，13：502，1965.
- 16) 河合 忠，他：生物物理化学，11：266，1966.
- 17) 河合 忠：臨牀血液，7：279，1966.
- 18) 河合 忠：血漿蛋白その基礎と臨牀，医学書院，東京，1969.
- 19) 河合 忠，高橋和子：生物物理化学，12：184，1967.
- 20) 河合 忠：生物物理化学，13：213，1968.
- 21) 河合 忠，青木紀生：医学のあゆみ，66：25，1968.
- 22) 青木紀生，他：生物物理化学，13：285，1968.
- 23) 青木紀生，他：生物物理化学，14：84，1968.
- 24) 古田 格，他：臨牀病理，17：106，1969.
- 25) 青木紀生，他：生物物理化学，14：362，1970.
- 26) 青木紀生，他：臨牀病理，18：357，1970.
- 27) 河合 忠，他：臨牀検査，14：865，1970.
- 28) 山岸安子，他：生物物理化学，15：323，1971.
- 29) 青木紀生，他：生物物理化学，16：129，1971.
- 30) 青木紀生，他：生物物理化学，16：219，1972.
- 31) 中野栄二，他：生物物理化学，13：259，1968.
- 32) 蓮沼 進，他：臨牀病理，17 (補冊)：221，1969.
- 33) 中野栄二，他：生物物理化学，14：319，1970.
- 34) 河合 忠，他：臨牀検査，15：662，1971.
- 35) 河合 忠：生物物理化学，16：11，1971.
- 36) Kawai, T. and Hasunuma, S.: Protides Biolog. Fluids, 25：35，1972.
- 37) 櫻林郁之介：日大医誌，33：1，1974.
- 38) 桜林郁之介，他：医学のあゆみ，105：37，1978.
- 39) 桜林郁之介，他：動脈硬化，7：631，1980.
- 40) 山中恒夫，他：肝臓，21：16，1980.
- 41) 浦田武義，他：臨牀化学シンポジウム，21：151，1981.
- 42) 河合 忠，只野寿太郎：臨牀病理，15：385，1967.
- 43) 河合 忠，只野寿太郎：臨牀血液，8：455，1967.
- 44) 只野寿太郎，河合 忠：生物物理化学，13：14，1967.
- 45) 河合 忠：生物物理化学，13：307，1968.
- 46) 山田秀雄，他：生物物理化学，16：206，1972.
- 47) 河合 忠：生物物理化学，15：125，1970.
- 48) 河合 忠：生物物理化学，21：159，1977.
- 49) 河合 忠：生物物理化学，22：23，1978.
- 50) 河合 忠：臨牀泌尿器科，39：183，1985.
- 51) 河合 忠，金 衡仁：最新医学，31：354，1976.
- 52) 金 衡仁，河合 忠：臨牀病理，24：681，1976.
- 53) 河合 忠，金 衡仁：臨牀科学，13：379，1977.
- 54) Kin, K. et al.: Gann, 68：427，1977.
- 55) Takagi, K. et al.: 臨牀化学，6：298，1978.
- 56) Takagi, K. et al.: J. Clin. Invest., 63：318，1979.
- 57) 高木皇輝，他：臨牀免疫，11：713，1979.
- 58) Itoh, Y. et al.: Clin. Exp. Immunol., 37：134，1979.
- 59) 榎本博光，他：臨牀病理，28：653，1980.
- 60) 河合 忠，高木皇輝：日医会誌，85：1483，1981.
- 61) 伊藤喜久：自治医大・学位論文，ヒト α_1 -ミクログロブリンの臨牀病理学的解析，1987.
- 62) Yu, H. et al.: J. Clin. Pathol., 36：253，1983.
- 63) Cooper, E. H. et al.: J. Clin. Pathol., 37：852，1984.
- 64) Haupt, H. et al.: Clin. Chim. Acta, 10：555，1964.
- 65) 和田守史，他：生物物理化学，31：7，1987.
- 66) 和田守史，他：臨牀病理，35：663，1987.
- 67) Itoh, Y. et al.: Protides Biolog. Fluids, 35：269，1987.