

## カドミウム汚染地住民検診のための 尿検査方法に関する研究

### 〔Ⅲ〕 Tubular proteinuria のスクリーニング方法について

金沢大学医学部衛生学教室 (主任: 石崎有信教授)

福 島 匡 昭

(昭和50年1月8日受付)

Cd 曝露によって引き起される蛋白尿は、いわゆる Tubular proteinuria であることが明かにされている<sup>1-6)</sup>。Cd汚染地の神通川流域に発生したイタイタイ病(イ病)患者の蛋白尿も Tubular proteinuria であることをすでに報告した<sup>7)</sup>が、その後のCd汚染地の検診では、電気泳動法によってこの種の蛋白尿が発見されるかどうかということのスクリーニングに応用してきた<sup>8)9)</sup>。その際、著者らはアセテート膜による尿蛋白電気泳動を行ったのであるが、予め尿蛋白を濃縮することが必要なため、手数と日数がかかりスクリーニングテストとしては余り実際的ではなかった。一般には予め尿蛋白を濃縮する操作をしなくても実施出来る Disc 泳動法<sup>10)</sup>が広く利用されているのはそのためであろう。

しかしながらアセテート膜を用いる電気泳動法は操作が簡単で特別な技術を要せず、短時間で結果を知りうる利点がある。多量の試料を塗布出来るアセテート膜 Cellogel RS を用いれば、通常は尿蛋白を濃縮しなくても泳動像の観察が可能であり、Tubular proteinuria をスクリーニング出来ることを経験したのでここに報告することとした。また、電気泳動法より簡易な方法として、Tubular proteinuria を特徴づける特異な蛋白についての、免疫化学的検出法を利用することが考えられるが、金井ら<sup>11)</sup>の報告している Retinol-binding protein (RBP) について検討し、泳動法より容易に多数の試料を処理でき、より実際的なスクリーニング方法と考えられるのであわせてここに報告することとした。

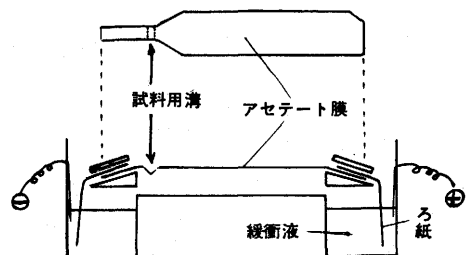
#### 実験方法および成績

##### 1. Cellogel RS による尿蛋白電気泳動法

###### 1) 実験方法

Cellogel RS (矩形, 5×23 cm, Chemetron, Milano) は Tris-Glycine 緩衝液 (Tris 14.1g, Glycine 22.6g を蒸留水に溶解し1000mlとする。pH 9.5) に30~60分間浸した後、2.5×11.5cmの「クサビ」形(図1参照)に切断して用いた。試料塗布部は約6mm巾の溝にし、泳動槽(東洋科学SE-2型)に浸透面を上にしてセットした後、尿試料25~100 $\mu$ lを溝に入れる。(図1参照)軽く送風して尿試料が完全に吸い込まれるのを待ち220~250Vで30~50分泳動した。染色は Amido black 10B (0.1gを5%酢酸100 mlに溶解)で7分間行ない、脱色には5%酢酸溶液と95%エタノール(和光、試薬特級)を用いた。泳動像の記録はデンストメーター (Beckman R-110) によった。

図1 泳動槽とアセテート膜



Studies on some urinary screening tests for renal dysfunction induced by cadmium exposure. 3. Simple screening tests for tubular proteinuria. **Masaaki Fukushima**, Department of Hygiene (Director : prof. A. Ishizaki), School of Medicine, Kanazawa University.

## 2) 成 績

Cellogel RS アセテート膜に正常血清および濃縮したイ病患者尿を常法通り線状に塗布し、やゝ長時間泳動した結果は図2の如くであった。イ病患者尿蛋白の泳動像では血清蛋白のそれに比しグロブリン分画が著しく多いが、両者を比較して特に目立った相違点の一つはイ病尿蛋白ではトランスフェリンと $\gamma$ -グロブリン分画の中間にアルブミンに匹敵する量の分画が見られる点である。この分画は泳動位置等からみて  $\beta_2$ -microglobulin と推定してよいと思われる。以下これを  $\beta_2$ 分画と表現する。

実験方法の項に記載した通りに多量の試料を塗布し、泳動を行った場合の各種蛋白泳動像は、図3(a) (16倍希釈血清)、図3(b) (腎炎患者尿)、図3(c) (10倍濃縮健康人尿)、図3(d) および (e) (Cd汚染地住民蛋白尿) に例示した。Cd汚染地住民尿では、イ病患者尿の場合と同様アルブミンに匹敵する量の  $\beta_2$ 分画がみられ、この分画は腎炎などの尿では認められない

からグロブリン分画の増加とともに Cellogel RS による電気泳動像で Tubular proteinuria であるか否かを判定する際のよい指標となる。なお、図3(c) に示した健康人尿では、アルブミン以外に特定の分画は認められなかったが、健康人尿でもしばしばア

図2 Cellogel RS による電気泳動像

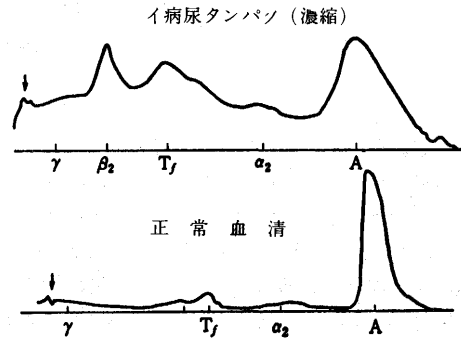
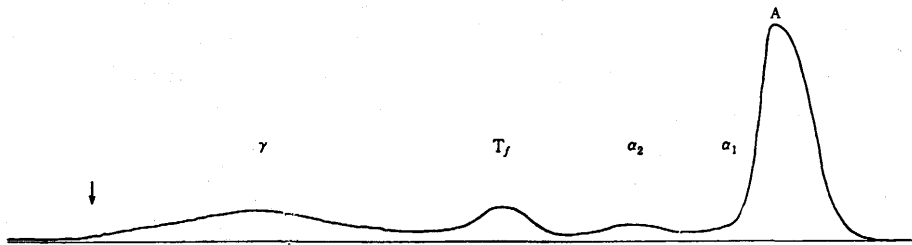
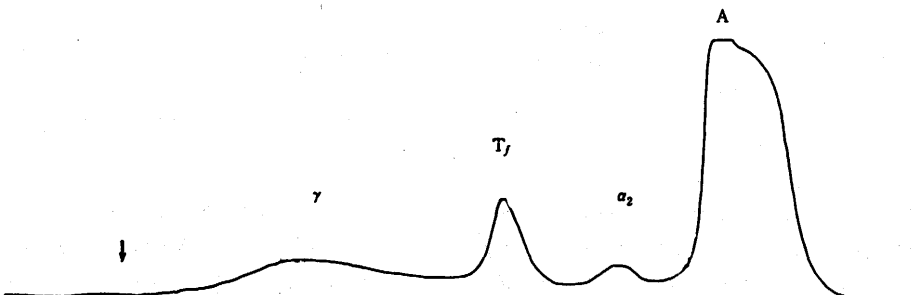
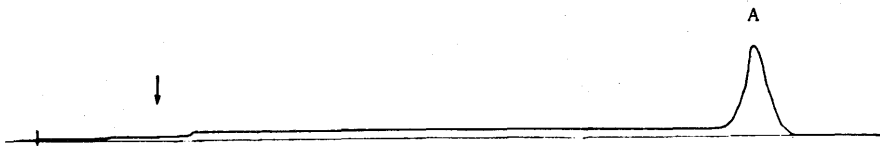


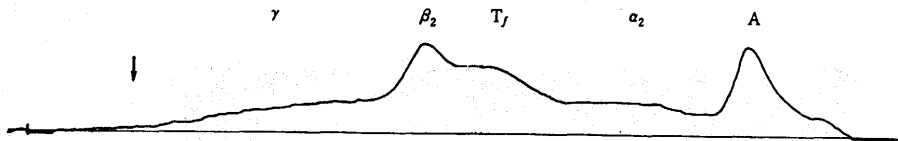
図3 Cellogel RS (クサビ型) による泳動像

(a) 16倍希釈正常血清 10  $\mu$ l(b) 腎炎患者尿 (N-1) 10  $\mu$ l

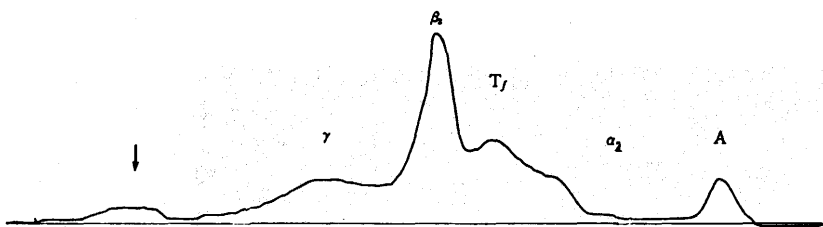
(c) 正常尿 (T) 10倍濃縮 50  $\mu$ l



(d) Cd 汚染地住民尿 (No. 32) 25  $\mu$ l



(e) Cd 汚染地住民尿 (No. 34) 40  $\mu$ l



ルブミン分画に比し著しく僅かではあるが $\alpha_1$ および $\alpha_2$ グロブリン分画が認められる。(図4)

2. RBP の免疫学的検出法

1) 実験方法

アセテート膜を支持体とする二重拡散法によった。すなわち、アセテート膜 (Millipore) を Barbitol 緩衝液 (イオン強度0.075, pH8.6) に浸した後水平に張り、抗 RBP 血清 (Behringwerke AG) 20 $\mu$ l を 6 cm の線状に塗布し、その両側 6 mm の点に試料 2  $\mu$ l

を塗布する。アセテート膜の抗血清および試料塗布部には予め「くぼみ」をつけて実施した。流動パラフィン中で48時間保った後、石油エーテル、生理食塩水で処理<sup>12)</sup>し、Amido Black 10B (前述) で染色した。脱色には5%酢酸水溶液を用いた。

2) 成績

健康人2名の血清を2, 4, 8, 16倍に稀釈して実施したところ、両試料での反応の程度はよく一致しており、8倍稀釈が沈降線を認める限界で、16倍稀釈

図4 健康人尿の電気泳動像

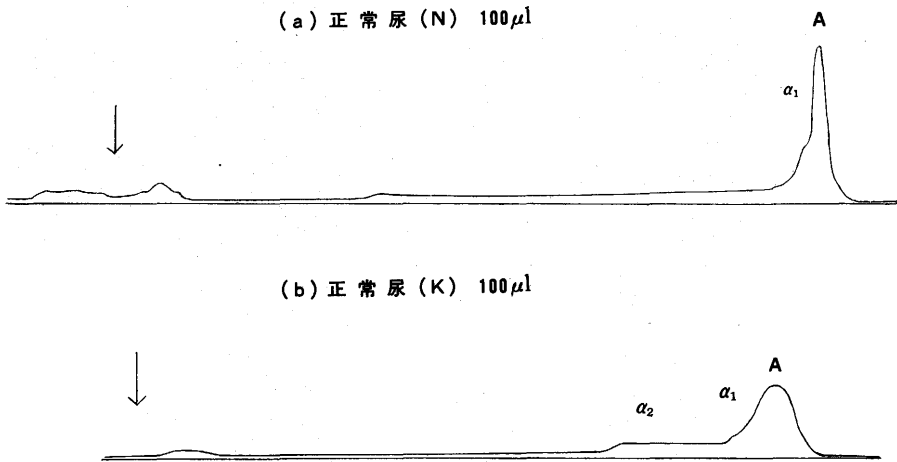
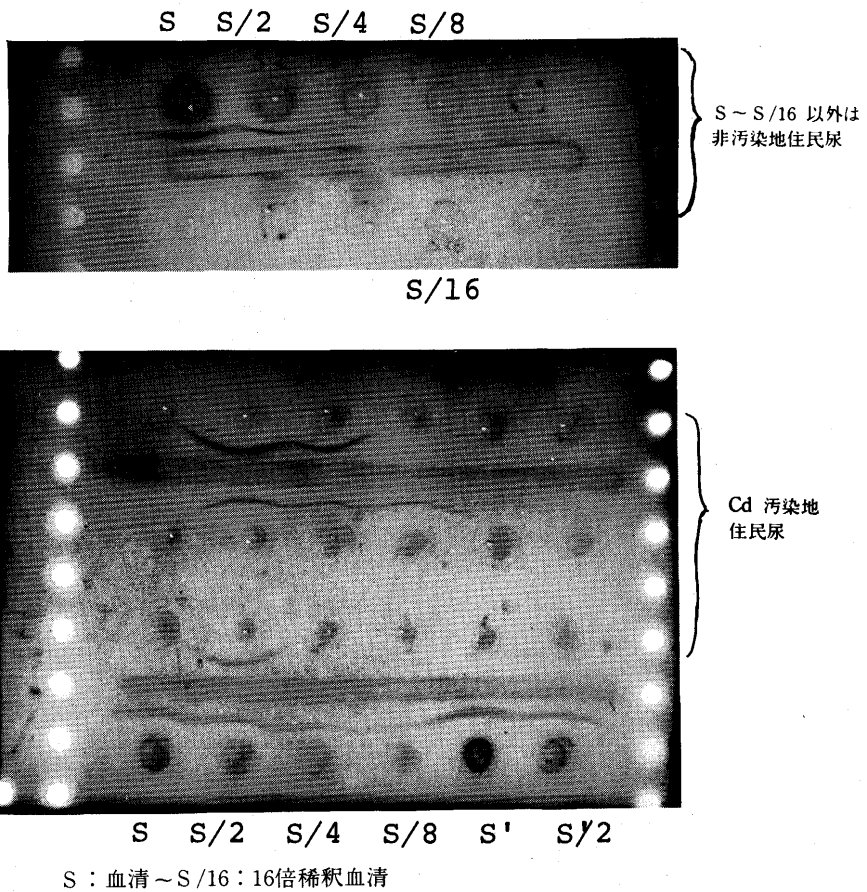


図5 アセテート膜による RBP の検出



では沈降線を認めることが出来なかった。(図5参照)そこで、血清と同程度の反応を+++、それ以上を++++、2、4、8倍稀釈血清と同程度の場合をそれぞれ++、+、±と表示することにした。血清のRBPは3~6mg/dlと報告<sup>13)14)</sup>されているから、本法の検出限界は約0.5mg/dlと思われる。

神通川流域のイ病患者尿5試料では++~++++を示し、研究室勤務の健康人7名では沈降線が認められなかった。またそのうち50才以上の女子2名の尿については10倍に濃縮して実施したが、沈降線は観察されなかった。

### 3. Cd汚染地住民尿における電気泳動像と RBP 検出成績との関係

Cd汚染地である兵庫県市川流域(75名)<sup>15)16)</sup>および福井県文室川流域(43名)<sup>17)</sup>の住民合計118名の早朝尿について、尿蛋白電気泳動成績と RBP 測定結果の関係を Kingsbury-Clark 法(K-C法)による尿蛋白濃度測定値<sup>18)</sup>との関係で示したのが図6である。

RBP が検出されたのは、電気泳動像が典型的な Tubular pattern を示し、かつ尿蛋白濃度がK-C法で10mg/dl以上を示す尿であった。尿蛋白濃度が10

mg/dl未満の尿で RBP が検出されたのは(±)の1例のみであり、Glomerular pattern を示す蛋白尿では RBP は検出されなかった。Tubular proteinuria では尿蛋白濃度が高いものほど RBP 濃度も高くなる傾向を示していた。

## 考 察

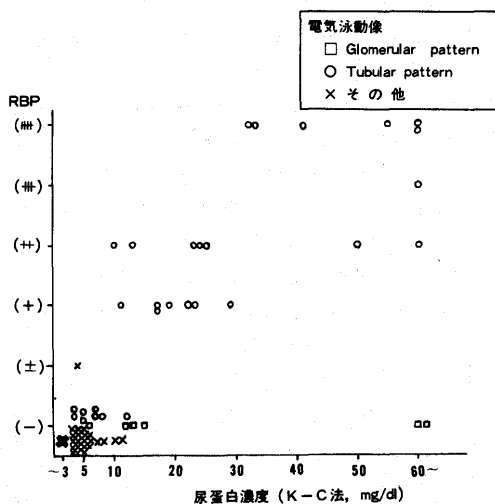
Cd 作業者にみられる蛋白尿では、腎炎などの糸球体障害に際して出現する蛋白尿とは異り、アルブミンが比較的少なく、泳動上グロブリン分画が多く、しかもこれらは分子量の小さい蛋白の多いことが特徴とされ、腎尿細管の障害に際してみられる蛋白尿と考えられ、Tubular proteinuria と呼ばれている。

Cd 環境汚染のみられる神通川流域のイタイイタイ病患者にみられる蛋白尿も Tubular proteinuria であるが、神通川流域の住民では本病患者以外の者でもこの種の蛋白尿の多いことが観察されている<sup>19)~21)</sup>。

Tubular proteinuria のスクリーニングは、各種の電気泳動法によるのが最も実際のであり、種々の電気泳動法が利用されている<sup>22)</sup>が、集団検診におけるスクリーニングとしての最大の難点は、尿蛋白濃度が低いため泳動用の試料としては濃縮を必要とする点であった。Cd 汚染地における住民検診のための尿蛋白電気泳動法として、Disc electrophoresis が採用され<sup>10)</sup>、この方法では尿を濃縮しなくても泳動像の観察が可能であるとされている<sup>23)</sup>。

著者らは、操作が簡単でしかも保存に適しているアセテート膜電気泳動法を、Cd汚染地の住民検診に利用していた<sup>9)9)</sup>が、各種のアセテート膜のうち Cellogel RS を用いると多量の試料を塗布出来るため濃縮操作を行わずに泳動像を観察することが出来た。しかもこのアセテート膜によれば、血清蛋白を約20の分画に分けうる特徴を有する<sup>24)</sup>。そのため通常のアセテート膜では Tubular proteinuria を特徴づける主要な蛋白の一つである  $\beta_2$ -microglobulin は、Transferrin などとともに  $\beta$ -globulin 分画に含まれてしまうが、Cellogel RS では別の分画として検出される。この分画は、Cd汚染地住民尿の Tubular proteinuria では、アルブミン分画に次いで多い蛋白分画として認められ、Glomerular proteinuria ではこの分画は認められなかった。したがってこの分画の有無は、Tubular proteinuria であるかどうかの判定に際してよい目標の一つとなる。Cd汚染地住民では尿蛋白濃度が蛋白尿とはいえない低濃度の場合でも、アルブミン分画に次いで多い分画としてこの分画の認められる場合があった。

図6 尿蛋白濃度と RBP 検出状況



注1) RBP (-) : <0.5(mg/dl)

(±) : 0.5

(+) : 1

(++) : 2

(###) : 4

(####) : >4

注2) × : 60名

$\beta_2$ -microglobulin は Berggard ら<sup>25)</sup> によって Tubular proteinuria の患者尿から分離された。Peterson ら<sup>26)</sup> によると健康人の尿中へも0.06~0.21 mg (平均0.12mg)/24hの排泄がみられるが、これはアルブミンの1/92 (1/33~1/163) であったと報告されている。

腎糸球体障害患者では、健康人と同程度からやゝ多い程度の排泄がみられるけれども、その量はアルブミンの1/1100~1/14200であり、これに対し Tubular proteinuria では  $\beta_2$ -microglobulin の排泄増加は著しく、アルブミンの1/1.0~1/13.3 (慢性 Cd 中毒6例では1/1.0~1/5.5) であったと報告されている。著者の Cellogel RS による電気泳動法では、健康人尿および Glomerular proteinuria では  $\beta_2$  分画が認められず、Tubular proteinuria では  $\beta_2$  分画がアルブミン分画に次いで多い分画として認められ、これは Peterson らの観察成績とよく一致している。またCd汚染地住民尿では、前述したように尿蛋白濃度の増加が明かでない場合でもこの  $\beta_2$  分画の認められる例のあることは、Cd汚染地住民での初期の尿変化として理解することが出来る。

Cellogel RS 電気泳動法での  $\beta_2$  分画、特に短時間の泳動でのこの分画は、 $\beta_2$ -microglobulin 以外の  $\beta$  ~  $\gamma$ -globulin を含んでいるが、スクリーニングとしての目的には充分であろう。また本法は、操作が煩雑で判定までに数日を要する Disc electrophoresis に比較すると、操作に特別な技術を要せず、かつ2時間程度で結果を判定することが出来るから、臨床検査での蛋白尿の検査にも利用してよいと考える。

Tubular proteinuria を特徴づけている低分子蛋白の1つとして、Peterson ら<sup>27)</sup> は Kanai ら<sup>13)</sup> が人血漿中に見出した Retinol-binding protein (RBP) を分離している。金井ら<sup>11)</sup> はイタイイタイ病患者尿中に RBP が種々の形で存在することを報告しており、たまたま抗 RBP 血清を入手し得たので、Cd汚染地の住民尿検査に際して電気泳動法と併用して、尿中RBPの免疫学的検出を実施し比較検討を行ってきた。

著者のアセテート膜を利用する方法では、稀釈血清の成績からみて、凡そ0.5mg/dlが検出限界であり、I病患者の尿では++以上 (2mg/dl以上) のRBPが検出され、健康人尿は10倍に濃縮しても検出されなかった。これらは、正常尿のRBP量は0.02~0.05mg/24hであり、I病患者では20~89mg/24hであったと云う報告<sup>11)</sup> とよく一致した成績と考えられる。Cd汚染地住民について尿蛋白濃度、電気泳動像とRBP検出成

績との関係を観察したところ(図6参照)、K-C法で10mg/dl以上を示す Tubular proteinuria では、ほとんどの例でRBPが検出され、これ以下の蛋白濃度の Tubular pattern を示す尿ではRBPは検出されなかった。他方 Glomerular proteinuria ではRBPは検出されず、また尿蛋白陰性の尿では73例中僅か1例が±の反応を呈しただけであった。したがって典型的 Tubular proteinuria をスクリーニングする目的には、尿蛋白、尿糖の定量や尿蛋白電気泳動を行うことの代りに、RBPの検出のみを実施すればすむ場合も多いことと考えられる。また、電気泳動による成績の確認の目的にも役立つであろう。もちろんRBPは Glomerular proteinuria でも軽度の排泄増加がみられる<sup>11)</sup> が、本法の検出限界以上になることはそれ多くはないであろうし、そのような場合には尿の総蛋白濃度、アルブミン濃度も著しく高まっているであろうから、容易に区別出来るものと考えられる。

## 結 論

Tubular proteinuria の Screening test としては、種々の電気泳動法が利用出来るが、特に Disc electrophoresis では、尿蛋白を濃縮することなしにでも観察出来るので、各地のCd汚染地住民の尿検査に採用されてきた。著者はセルロースアセテート膜の Cellogel RS を支持体とする電気泳動法について検討したが、濃縮操作を行なうことなく、蛋白尿の種別を判定出来る上短時間で結果が得られるから、Tubular proteinuria の Screening test として最も簡易な方法であり、集団検診や臨床検査で利用してよい方法であると考えられる。

Tubular proteinuriaで排泄増加の著しい蛋白の一つとしてRBPがあるが、Cd汚染地住民尿についてその免疫化学的検出を試み、泳動像が Tubular patternを示す尿のうち蛋白濃度の高い例ではRBPが検出されたが、Glomerular pattern を示す尿ではRBPは検出されなかった。したがって、Tubular proteinuria の Screening には、この方法が実用的、効率的な集団検診方法であると結論してよいであろう。

恩師石崎有信教授の御校閲に深く感謝する。また、抗RBP血清を市販に先立ち入手する便宜を与えられた本学癌研究所右田俊介教授の御厚意に感謝する。

## 文 献

- 1) Friberg, J. : Acta med. scand., 138, Suppl. 240, 1 (1950).
- 2) Kekwick, R. A. : Brit. J. Ind. Med., 12, 196 (1955).
- 3) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, 4, 607 (1962).
- 4) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, 5, 325 (1962).
- 5) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, 12, 335 (1966).
- 6) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, 12, 345 (1966).
- 7) 福島匡昭・杉田良樹 : 日本公衛誌, 17, 759 (1970).
- 8) 石崎有信・福島匡昭・坂元倫子・能川浩二・倉知照・小林悦子 : 日本公衛誌, 17, 757 (1970).
- 9) 石崎有信・福島匡昭・能川浩二・坂元倫子・倉知照・小林悦子 : 日本公衛誌, 17, 758 (1970).
- 10) 土屋健三郎他 : カドミウム中毒症等に関する分析法の標準化に関する研究, 昭和45年度研究報告, 9頁, 日本公衆衛生協会, 1971.
- 11) 金井正光・野本昭三・笹岡澄子・内貴正治 : 臨床化学シンポジウム, 11, 194 (1971).
- 12) Spinco Division of Beckman Instruments Inc : Model R-103 immunoelectrophoresis accessory, Instruction manual, p25, Palo Alto, California, 1967.
- 13) Kanai, M., Raz, A. and Goodman, D. S. : J. Clin. Invest., 47, 2025 (1968).
- 14) Peterson, P. A. and Berggard, I. : J. Biol. Chem., 246, 25 (1971).
- 15) 石崎有信・福島匡昭・能川浩二・小林悦子 : 日本公衛誌 : 19 (10, 附録), 404 (1972).
- 16) 石崎有信・福島匡昭・能川浩二・坂元倫子・小林悦子 : 日本公衛誌, 20(10, 附録), 462 (1973).
- 17) 福島匡昭・能川浩二・坂元倫子・小林悦子・石崎有信 : 日本公衛誌, 21(10, 附録), 350 (1974).
- 18) 福島匡昭・坂元倫子 : 十全医会誌, 83, 741 (1974).
- 19) Piscator, M. and Tsuchiya, K. : Cadmium in the environment, by L. Friberg, M. Piscator and G. Nordberg, p112, Cleveland, Ohio, CRC Press, 1971.
- 20) 福山裕三・久保田憲太郎 : 医学と生物学, 84, 249 (1972).
- 21) 荻野 昇 : 日衛誌, 27, 60 (1972).
- 22) Manuel, Y. and Laterre, E. C. : Proteins in normal and pathological urine., Eds. Y. Manuel, J. P. Revillard and H. Betuel, p172, Basel/New York, S. Karger, 1970.
- 23) 久保田憲太郎・福山裕三・城石和子 : 日衛誌, 26, 169 (1971).
- 24) Campo, G. B. D. : Clin. Chim. Acta, 22, 475 (1968).
- 25) Berggard, I. and Bearn, A. G. : J. Biol. Chem., 243, 4095 (1968).
- 26) Peterson, P. A., Evrin, P. E. and Berggard, I. : J. Clin. Invest., 48, 1189 (1969).
- 27) Peterson, P. A. and Berggard, I. : J. Biol. Chem., 246, 25 (1971).

## Abstract

It is well established that Cd workers and inhabitants living in Cd-Polluted areas show a tubular proteinuria.

Any of the techniques of zone electrophoresis, immunoelectrophoresis, gel filtration and others may be used to detect tubular proteinuria. Most of all these techniques take much time. We find, however, that Cellogel R S, a sort of cellulose acetate membrane, can be used for electrophoresis of urinary proteins in low concentration without preliminary concentration. The procedure is applicable as mass-screening test because it is simple and saves us time.

It is also found that the qualitative test of immunodiffusion technique to detect retinol-binding protein can be used as the screening test of tubular proteinuria, and this is considered to be more practical than electrophoresis for mass-examination screening test.