

Polymerization of β 2-microglobulin as an Amyloidogenic Process

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8434

β_2 -ミクログロブリンの重合によるアミロイド形成について

金沢大学がん研究所分子免疫部 (主任: 右田俊介教授)

長谷部 保彦

(平成5年2月4日受付)

β_2 ミクログロブリン (β_2 -microglobulin, β_{2m}) はアミロイド前駆タンパクの1つであって、長期間人工透析を続けている腎疾患の患者では血清中の β_{2m} が高値となり、手根管症候群 (carpal tunnel syndrome) としてアミロイド沈着をおこすことが知られている。Connors らは完全な β_{2m} 分子が試験管内でアミロイド線維に変ることを報告した。しかし β_{2m} の全量が真のアミロイド線維に変ったのか、一部だけ変ったのかについては述べられていない。この研究では β_{2m} からアミロイド線維への試験管内での変化を確かめ、その中間状態の検索を行った。 β_{2m} はカドミウム汚染地区でイタイイタイ病として知られるカドミウム中毒患者の尿に多く含まれることが知られているので、それを出発材料とした。その尿を Amicon 社のホローファイバー濃縮器によって濃縮し、分子篩ゲル濾過のカラムを2回通して精製した。精製された β_{2m} の純度は寒天電気泳動、免疫電気泳動、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) において単一成分として確かめられた。精製 β_{2m} を重合させ沈殿を作るために、1) リン酸緩衝化生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) 中で濃縮する、2) 溶媒の塩濃度を低下させる、3) 溶媒を酸性の pH とする、の3つの条件を試みた。沈殿からアミロイド形成の中間状態を分析するために、蛋白定量、混濁度測定、円偏光二色性 (circular dichroism, CD) 測定、SDS-PAGE、寒天および免疫電気泳動などを用いた。上記の3つの条件において沈殿の形成はいずれも混濁度の増加として認められた。1) と 2) の条件では CD および寒天電気泳動上変化はなかったが、3) の pH 4.3 にする条件では CD に急速な変化があり、寒天電気泳動では陽極側に新しいバンドが出現した。沈殿物をコンゴ赤により染めて見ると 1) の沈殿はよく染まり、2) は染まるものが少なく、3) では更に少なかった。偏光顕微鏡、電子顕微鏡によってもコンゴ赤に染まる沈殿はアミロイド線維であることが確認された。以上のことから β_{2m} の高次構造を変えないでゆっくり沈殿を形成させると、 β_{2m} からアミロイドに変わることが確かめられた。またこれに関連して、臨床検査においては尿の β_{2m} を定量することは困難であるといわれており、その理由として酸性尿では尿中にある酸性プロテアーゼにより β_{2m} が分解されるためであると考えられていた。しかし本研究により、それは酸性プロテアーゼによって分解されるのではなく、 β_{2m} の酸性条件下における沈殿形成によることが明らかとなった。

Key words amyloidogenesis, β_2 -microglobulin, CD spectra, nephelometry, polymerization

β_2 -ミクログロブリン (β_2 -microglobulin, β_{2m}) は1968年に Berggård ら¹⁾により尿細管障害の患者尿から精製された分子量 11,800、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの蛋白である²⁾。 β_{2m} は100アミノ酸からなり、57アミノ酸の分子内 SS 結合のループを作っている。細胞膜のクラス I 組織適合抗原の L 鎖であり、免疫グロブリンドメインとしての高次構造をもつことが明らかになっている³⁾。

一方腎疾患の患者に対して、人工透析療法が始まって以来、長期透析の患者では手根管症候群、弾発指、多発性関節痛などの骨・関節障害を併発することが多く、これらの患者では組織学的にアミロイドの沈着があることが判明した⁴⁾⁻⁶⁾。これが β_{2m} の沈着によるアミロイドであることが、Gejyo ら⁷⁾により明らかにされた。

β_{2m} の血中正常濃度は $1.8\mu\text{g/ml}$ 程度であるが⁸⁾⁻¹⁰⁾、透析膜を

通過しないために人工透析の患者では、その40倍程度まで増加している¹¹⁾⁻¹³⁾。増加した β_{2m} がどのようにしてアミロイドに変わるのかが問題である。アミロイドの組織を可溶化すると完全な分子の β_{2m} が得られたという報告¹⁴⁾と、N末端が短くなった β_{2m} が得られたという報告¹⁵⁾があって一定しない。一方では Connor ら¹⁶⁾は精製した β_{2m} を精製水に透析し、濃縮することにより、試験管内においてアミロイド様の沈殿形成することを報告した。

しかし、その中間状態はどうであるのか、アミロイド形成を左右する要因は何であるかは明らかでない。もし β_{2m} 単独で試験管内においてもアミロイド形成がおりうるのであれば、 β_{2m} の分子の性状を究明することによりアミロイドへの変化を解明できるのではないだろうか。

また、臨床検査の分野で尿中の β_{2m} は酸性では著しく不安定

Abbreviations: β_{2m} , β_2 -microglobulin; BLN, Behring Laser Nephelometer; CD, circular dichroism; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IgG, immunoglobulin G; PBS, phosphate buffered saline; POD, peroxidase; RBP, retinol binding protein; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

で、濃度が急速に低下するため、 β_2 m 測定のためには酸性尿は早く中性にすべきであると言われている¹⁷⁻¹⁹。これは酸性プロテアーゼによって β_2 m が分解されるためと考えられている。

そこで、 β_2 m が酸性条件を含めた種々の条件下でどのような変化をするのか、またどのような過程を経てアミロイド線維になるのか、そこにどのような分子間相互作用が関与するのかについて、精製 β_2 m を用いて検索した結果を報告する。

材料および方法

1. 材料

1. β_2 m の精製

β_2 m は出発材料としてイタイタイ病患者尿を用いた。患者尿は富山市・萩野医院より富山医科薬科大学・公衆衛生学・寺西秀豊先生を介して供与された。これを下記の操作手順により分離精製した。

1) イタイタイ病患者尿を Amicon ホローファイバークロマトリッジ, H1P10-20 (Danvers, U. S. A.) を用いた限外濾過により10~20倍に濃縮した。

2) スーパーデックス200カラム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (XK 26/60-内径 26mm, 長さ 60cm; 0.2M リン酸緩衝液 pH6.8; 流速, 20ml/hr) を用いたゲル濾過法により溶出した4つの主要なピークのうち、ウサギ抗ヒト β_2 m 血清 (DAKOPATTS, Glostrup, Denmark) を用いた二重免疫拡散法にて沈降線を認めた第2ピークを集めた。

3) 第2ピークを Amicon スタンダード型攪拌式セル (8050型, 8200型) を用いた限外濾過により濃縮した。

4) セファデックス G-50 カラム (Pharmacia) (XK 26/60-内径 26mm, 長さ 60cm; 0.2M リン酸緩衝液 pH6.8; 流速, 20ml/hr) を用いたゲル濾過法により溶出した主要な2つのピークをウサギ抗ヒト β_2 m 血清 (同上) およびウサギ抗ヒトレチノール結合タンパク (retinol binding protein, RBP) (Behringwerke, Marburg, Germany) を用いた二重免疫拡散法により分析したところ、第1ピークは RBP, 第2ピークは β_2 m に対する抗血清と各々反応した。ウサギ抗ヒト β_2 m 血清とのみ反応した第2ピークを集め、精製 β_2 m とした。

2. 精製 β_2 m の検定

精製した β_2 m はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 免疫電気泳動法および寒天電気泳動法によりその純度を検定した。実験に用いる水はすべて高純度のイオン交換純水装置 (KSJ-M-18 型, 栗田工業, 東京) を用いて精製した。

II. 実験方法

1. β_2 m の定量

1) 吸光度測定

分光光度計 UV-2200 (島津製作所, 京都) を用いて β_2 m の波長 280nm における吸光度を測定し、 β_2 m の 280nm における分子吸光係数を19.85²⁰として β_2 m の濃度を求めた。

2) 酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA ワンステップ競合法を原理としたエンザイグノスト β_2 -m micro キット (Behringwerke) を用いて免疫反応37°C, 1時間, 呈色反応18~25°C, 30分の常法に従い β_2 m の濃度を測定した。 β_2 m は沈殿を作りやすいので、測定前には β_2 m を

12,000rpm 15分間遠心し、その上清を試料として測定に用いた。

2. SDS-PAGE およびウエスタンブロットニング

精製した β_2 m を SDS を含まない12.5%のアクリルアミドゲルと0.05% SDS を含有する電極液を用いて SDS-PAGE を実施した後、トランスファー装置 (マリソル, 東京) を用いて、ゲル中の蛋白をクリアプロット・P膜 (アトー, 東京) 上に15V 定電圧にて80分間通電し、転写した。転写後、0.5%カゼイン含有トリス緩衝化生理食塩水中で4時間ブロッッキングした後、同じ緩衝液にて400倍希釈したウサギ抗ヒト β_2 m 血清 (同上) 中に浸漬し、室温にて1晩1次反応させた。0.05%ツイーン20含有リン酸緩衝化生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) にて5分間4回洗浄した後、ブロッッキングに用いた緩衝液にて2500倍希釈したヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G (Immunoglobulin G, IgG) ペルオキシダーゼ (peroxidase, POD) 標識抗体中にクリアプロット・P膜を浸漬し、室温にて3時間2次反応を行った。再び、0.05%ツイーン20含有 PBS にて5分間5回洗浄した後、0.0025% O-dianisidine/0.01% H_2O_2 /0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) 中で室温にて5~10分間呈色反応を実施した。発色バンドを確認した後、精製水にて充分洗浄し、乾燥した。

3. β_2 m の重合度の検定

β_2 m の重合過程をベーリングレーザーネフェロメーター (Behring Laser Nephelometer, BLN) (Behringwerke)²¹ を用いて、重合による混濁を光散乱強度の変化として測定した。BLN は波長 633nm の He-Ne レーザーを光源とするもので、専用キューベット内の試料により引き起こされる散乱光はフォトディテクターに収束した後、電気信号としてデジタルボルトメーターによりボルト単位 (V) で表示された。

4. 円偏光二色性

円偏光二色性 (circular dichroism, CD) の測定は JASCO-J500-C スペクトロフォトメーターに CD 装置を連結した装置で行い、androsterone 0.5mg/ml dioxane により CD 感度校正を行った。2mm 光路のセルを用い、 β_2 m 濃度0.3mg/ml 0.2M リン酸緩衝液 pH6.8のものを試料として用いた。酸性条件下での時間経過は、 β_2 m 溶液を 1M 酢酸緩衝液により 1:1 に希釈し、CD スペクトルの変化で追跡した。

5. アミロイド染色

β_2 m の重合不溶物を遠心により沈渣として集め、少量の0.2M リン酸緩衝液 pH6.8に懸濁し、あらかじめゼラチン薄膜にて表面をコートしたスライドガラス上に滴下し、37°Cで乾燥した。次にコンゴ赤染色し、光学顕微鏡および偏光顕微鏡下で染色状態を観察した。

6. 電子顕微鏡による観察

β_2 m の重合不溶物を遠心により集め、少量の0.2M リン酸緩衝液 pH6.8に懸濁したものを電子顕微鏡用試料とした。金属メッシュの上にコロジオン膜を作り、カーボン蒸着して補強し、その上に滴下した。水分を濾紙により吸い取って乾燥させ、酢酸ウラニルにより37°C, 20分間およびクエン酸鉛にて室温5分間染色し、電子顕微鏡 H500 (日製産業, 東京) により観察した。

7. 寒天電気泳動および免疫電気泳動

寒天冷却電気泳動槽 ACE21 (和光純薬, 大阪) と Agafix フィルム CNG (バイオメイト, 東京) を用い、ペロナール・トリリス・グリシン緩衝液に溶かした K-88 アガロース (バイオメ

イト)により0.5mm厚さのプレートを作った。寒天電気泳動ではこれをフィルムマスクにて覆い、1.5 μ l ずつの試料を添加した。免疫電気泳動では溝と穴を備えたテンプレートによりプレートを作った。泳動は250V、45分間行い、その後、常法によりクマシーブリアントブルー染色した²¹⁾。

8. β_{2m} の濃縮による重合

蛋白分子量3,000カットの濾過膜 YM3 を装着した攪拌式セル8010型および8050型 (Amicon) を用いて、精製 β_{2m} を限外濾過により濃縮し重合をみた。

9. β_{2m} の塩濃度低下による重合

Connors ら¹⁶⁾の方法にほぼ準拠し、0.14M NaCl を含む0.01M PB pH7.2 (PBS) にて β_{2m} 濃度を調整し、透析膜 Spectra/Por6/MWCO 3,500 (SPECTRAM, Houston, U. S. A.) に0.1~1ml を封入した。この β_{2m} を精製水にて2倍希釈したPBSに1日透析した後、透析外液を4倍希釈したPBSに変え、同様に1日透析し、次いで8倍希釈したPBSに変えてさらに1日透析した。最後に透析外液を精製水に変え同様に1日透析し、重合の様子を検討した。すべての透析は6℃の冷室にて実施した。

10. β_{2m} の酸性条件下による重合

1) 段階的 pH の酸性化

0.2M リン酸緩衝液 pH6.8中の β_{2m} を透析膜 Spectra/Por6/MWCO 3,500 (同上) に0.3~0.5ml 封入し、0.2M 酢酸緩衝液 pH6.0 を外液として1日透析した後、0.2M 酢酸緩衝液

pH5.5 に外液を交換し、再び1日透析した。次いで0.2M 酢酸緩衝液 pH5.0に同様に1日透析した後、最終的に0.2M 酢酸緩衝液 pH4.3に1日透析し重合を検討した。透析はすべて6℃の冷室にて実施した。

2) 0.2M 酢酸緩衝液 pH4.3 への透析

1)と同様に0.2M リン酸緩衝液 pH6.8中の β_{2m} を透析膜 Spectra/Por6/MWCO 3,500 (同上) に封入して透析を実施したが、透析外液はすべて0.2M 酢酸緩衝液 pH4.3とし、毎日1回新しい緩衝液と交換して4日間にわたり透析を行い、重合をみた。透析はすべて6℃の冷室にて実施した。

成 績

I. 精製 β_{2m} の純度の検定 (図 1-A, B, C)

イタイイタイ病患者尿より精製した β_{2m} の純度を調べたところ、SDS-PAGE においては分子量12,000の位置に単一なバンドが認められ、寒天電気泳動法においても、 β 分画に単一なバンドが認められた。免疫電気泳動法においては抗 β_{2m} 血清との間に β 分画において単一な沈降線を認め、かつ抗ヒト血清との間には何らの沈降線も認められなかった。これらの分析結果から β_{2m} はほぼ単一標品であることが確認されたので、以下の検討に用いた。

II. β_{2m} の重合

1. β_{2m} の濃縮による重合 (図 2)

β_{2m} 115 μ g/ml を濃縮し、その濃度過程6段階における

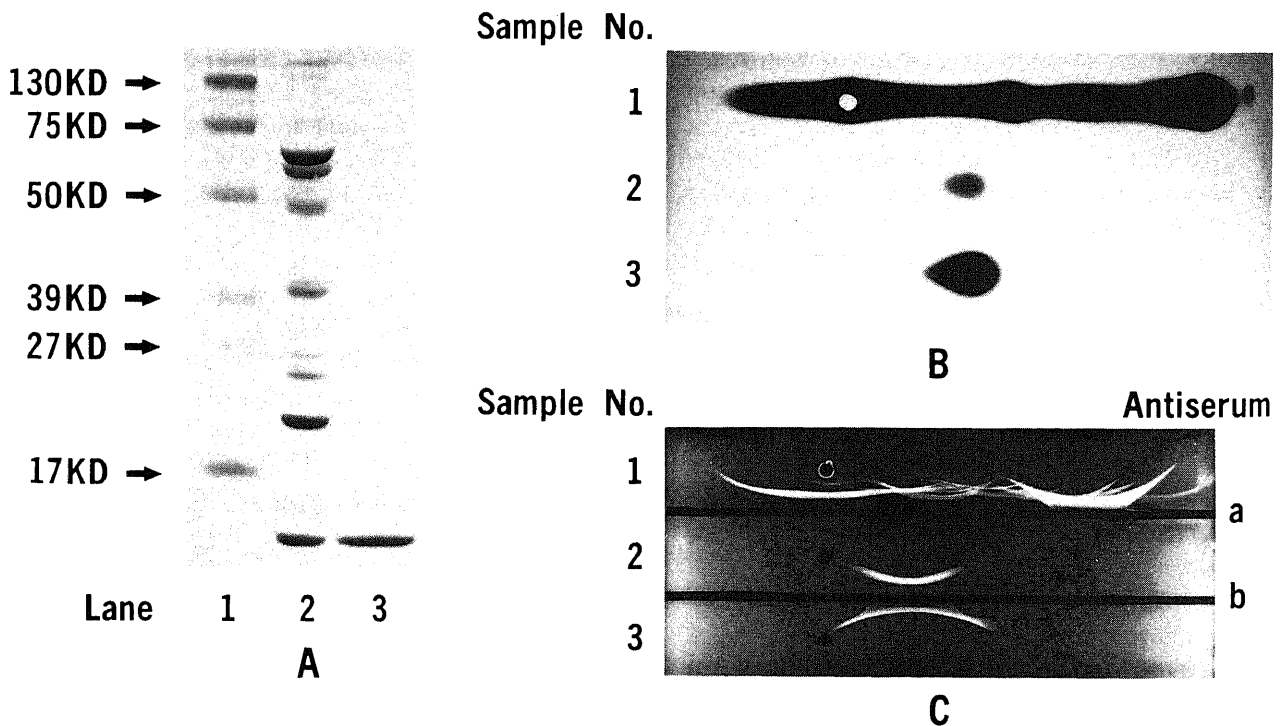


Fig. 1. Analysis of the purified β_{2m} . Purified β_{2m} was analyzed on characteristic and purity by three kinds of electrophoresis. A, SDS-PAGE in 12.5% polyacrylamide gel was performed in 40 mA for 120 mins. The molecular weight markers in kilodalton (KD) are indicated on the left. Lane 1; pre-stained SDS-PAGE standards; Lane 2, concentrated patient urine; Lane 3, purified β_{2m} ; B, Agarose-electrophoresis was performed in 250 V for 45 mins, and agarose gel was stained with Coomassie brilliant blue. Sample No.1, normal human serum as control; No.2, purified β_{2m} ; No.3, concentrated No.2 β_{2m} ; C, Immunoelectrophoresis was performed in 250 V for 45 mins, and agarose gel was incubated for 16 hours after an application of antiserum. Sample No.1, normal human serum as control; No.2, purified β_{2m} ; No.3, concentrated No.2 β_{2m} ; Antiserum a, rabbit anti human serum; b, rabbit anti human β_{2m} serum.

280nmの吸光度とBLNにより測定した光散乱強度を混濁度として各々縦軸にとった。横軸の β_2m の濃度は、濃縮前の β_2m 濃度を280nmの吸光度より求め、この時の容量と濃縮各段階での容量との比較計算により β_2m の濃度を算出した。280nmの吸光度測定においては、 β_2m 濃度402 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは直線的増加が認められたが、それ以上では直線からはずれ、計算値から

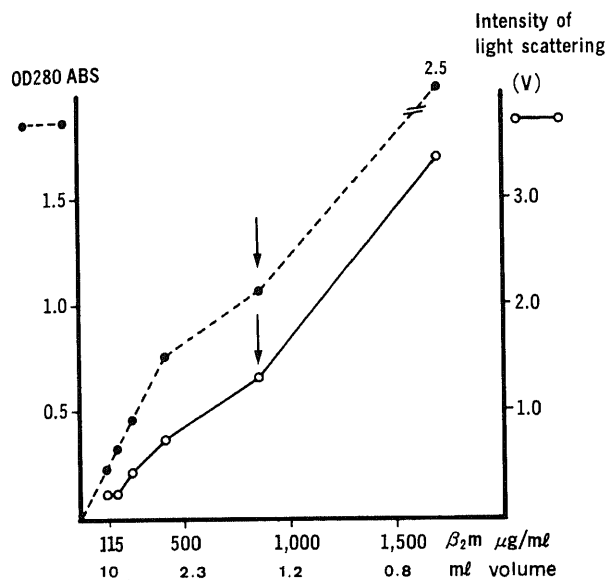


Fig. 2. Changes of absorbance (ABS) at 280 nm and intensity of light scattering (turbidity) by BLN as a function of β_2m concentration. Initial concentration of purified β_2m (10 ml) was 115 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and it was concentrated to 0.77 ml by ultrafiltration. At the volume of 1.34 ml (855 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pointed by arrow), turbidity was observed by the naked eye. Closed circle, absorbance at 280 nm; open circle, intensity of light scattering by BLN.

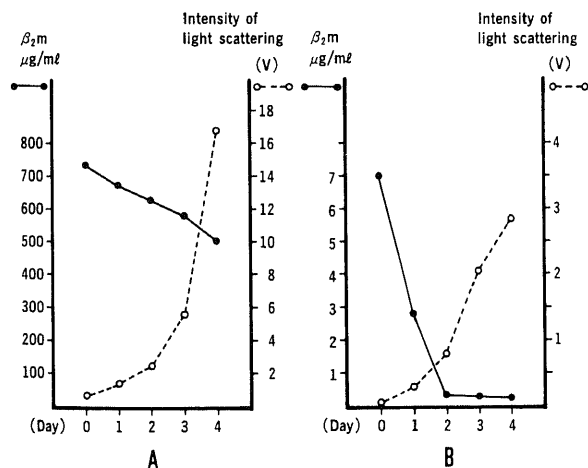


Fig. 3. Changes of concentration of β_2m and intensity of light scattering by BLN during dialysis for 4 days (decreasing of salt concentration in PBS). A, Initial concentration of purified β_2m was 727 $\mu\text{g}/\text{ml}$; B, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Day 0, both of β_2m were in 0.01 M PBS (0.14 M NaCl) at pH 7.2, and Day 1 was after 1 day of dialysis in 1/2 PBS of original, Day 2 in 1/4 PBS, Day 3 in 1/8 PBS, finally Day 4 in deionized water. Closed circle, concentration of β_2m ($\mu\text{g}/\text{ml}$) measured by ELISA; open circle, intensity of light scattering by BLN.

期待される吸光度より低い値を示し、855 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では肉眼的観察でも明らかな濁りが β_2m 溶液に生じた。BLNによる混濁度の測定においては β_2m 濃度115~239 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの範囲では0.5V以下の低い光散乱強度を示していたが、402 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で0.72Vに上昇し、855 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で1.30V、1,709 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で3.36Vと高値を示し、吸光度から求めた β_2m 濃度と肉眼的な濁りの関係とがよく一致する結果が得られた。

2. β_2m の塩濃度低下による重合 (図3-A, B)

β_2m 727 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の異なる2つの試料について段階的の塩濃度低下におけるELISAによって求めた β_2m 濃度とBLNによる混濁度を示す光散乱強度との関係を図3に示した。PBSを段階的に2倍希釈、4倍希釈、8倍希釈と塩濃度を下げるに従い、727 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の β_2m ともBLNによる光散乱強度が増加した。 β_2m 濃度が高い時の濃度の減少度は小さく緩やかであるのに対して、 β_2m が低濃度の時は塩濃度の減少とともに急激な β_2m 濃度の減少が認められた。重合による不溶

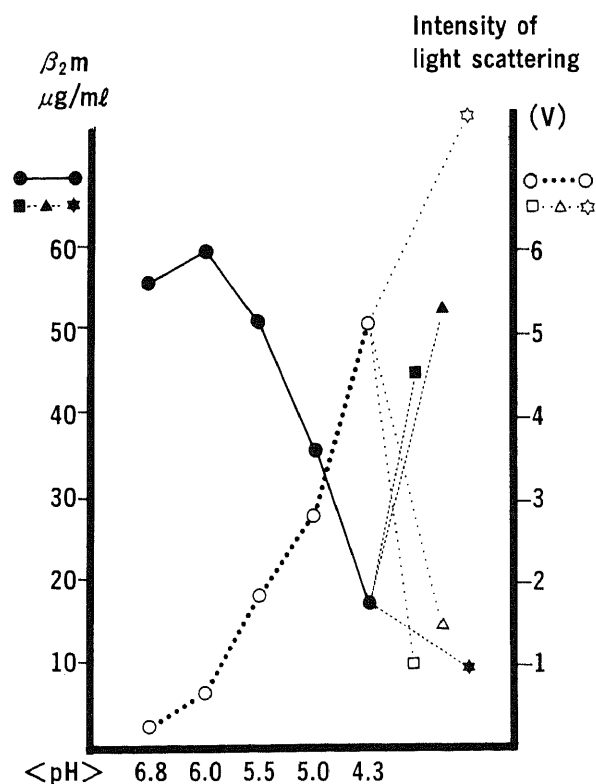


Fig. 4. Changes of concentration of β_2m and intensity of light scattering by BLN in acidic pH solution. Initial concentration of purified β_2m was 55.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.2 M phosphate buffer pH 6.8, the sample was dialysed for 1 day against 0.2 M acetate buffer pH 6.0, then 1 day against pH 5.5, following 1 day against pH 5.0 and finally 1 day against pH 4.3. Closed circle, concentration of β_2m ($\mu\text{g}/\text{ml}$) measured by ELISA; open circle, intensity of light scattering by BLN. After that, β_2m in 0.2 M acetate buffer pH 4.3 was dialysed against 8 M urea containing PBS (closed square, concentration of β_2m ; open square, intensity of light scattering by BLN) or 0.05% SDS containing PBS (closed triangle, concentration of β_2m ; open triangle, intensity of light scattering by BLN) or 0.3 M 2-mercaptoethanol containing PBS (closed star, concentration of β_2m ; open star, intensity of light scattering by BLN).

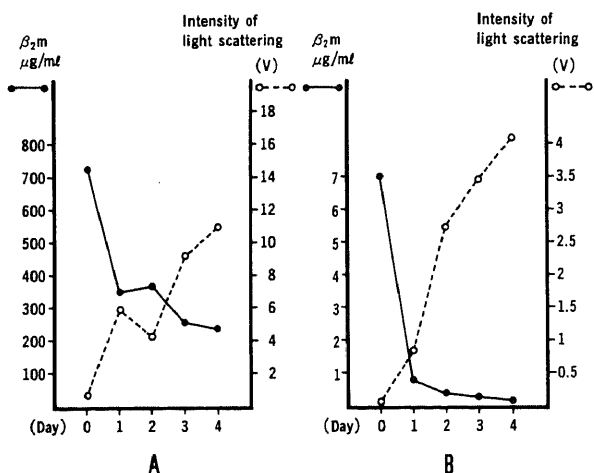


Fig. 5. Changes of concentration of β_{2m} and intensity of light scattering by BLN during dialysis against 0.2 M acetate buffer pH 4.3. A, Initial concentration of purified β_{2m} was 727 $\mu\text{g/ml}$; B, 7 $\mu\text{g/ml}$; Acetate buffer was daily exchanged with new buffer. Closed circle, concentration of β_{2m} ($\mu\text{g/ml}$) measured by ELISA; open circle, intensity of light scattering by BLN.

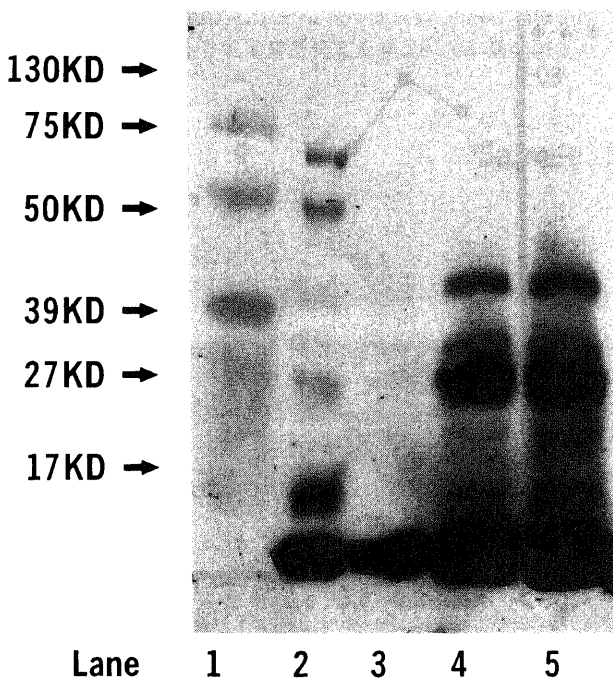


Fig. 6. Analysis for polymerization of β_{2m} by SDS-PAGE and Western blotting. Initial concentration of purified β_{2m} (10 ml) was 100 $\mu\text{g/ml}$, and it was concentrated to 8-fold and 10-fold concentrates by ultrafiltration. SDS-PAGE in 12.5% polyacrylamide gel was performed in 40 mA for 120 mins, and were transferred onto a sheet of clearblot P membrane, which was incubated with rabbit anti-human β_{2m} serum, then incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated with POD, and finally stained with H_2O_2 and O-dianisidine in 0.05 M tris-HCl buffer pH 7.6. Lane 1, pre-stained SDS-PAGE standards; Lane 2, patient urine; Lane 3, purified β_{2m} before concentration; Lane 4, purified β_{2m} after 8-fold concentrate; Lane 5, purified β_{2m} after 10-fold concentrate.

物は BLN による測定で、最終的な精製水への透析後、 β_{2m} 高濃度では 16.28V と極めて高値を示したのに対し、低濃度では 2.83V を示すにとどまり、光散乱強度は β_{2m} 濃度に依存することが示された。

3. β_{2m} の酸性条件下による重合

1) 段階的 pH の低下 (図 4)

0.2M リン酸緩衝液 pH6.8 に溶かした β_{2m} 55.6 $\mu\text{g/ml}$ の pH を 0.2M 酢酸緩衝液を用いて透析により 6.0, 5.5, 5.0, 4.3 と段階的に低下させた時の ELISA による β_{2m} 濃度と BLN による光散乱強度の関係を図 4 に示した. pH5.5 までは濃度に大きな変化はないが, pH5.0 において有意な減少を認め, pH4.3 では pH6.8 における濃度の 3 分の 1 以下にまで減少した. これに対して BLN による光散乱強度は pH6.8 および pH6.0 では 1V 以下の低い値であったが, pH5.5 では 1.87V, pH5.0 では 2.78V, pH4.3 では 5.12V と pH が低下するに伴い高い光散乱強度を示した. しかも次にこれを 8M 尿素 SDS 含有 PBS, 0.05% SDS 含有 PBS および 0.3M 2-メルカプトエタノール含有 PBS の 3 種類の PBS に透析すると, 8M 尿素含有 PBS と 0.05% SDS 含有 PBS では β_{2m} の濃度が回復し混濁度の減少が認められた. これに対して 0.3M 2-メルカプトエタノール含有 PBS に透析すると, β_{2m} の濃度は減少し混濁度はさらに増加した.

2) 0.2M 酢酸緩衝液 pH4.3 への透析 (図 5-A, B)

β_{2m} 727 $\mu\text{g/ml}$ と 7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の異なる 2 つの試料につい

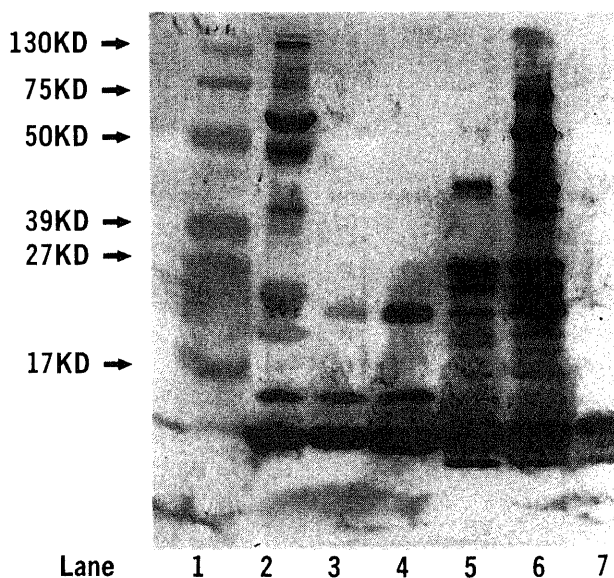


Fig. 7. Analysis for depolymerization of β_{2m} by SDS-PAGE and Western blotting. β_{2m} was concentrated, and the concentrated β_{2m} was dialysed for the following three kinds of PBS. SDS-PAGE and Western blotting was performed as in Fig. 6. Lane 1, pre-stained SDS-PAGE standards; Lane 2, patient urine; Lane 3, purified β_{2m} before concentration; Lane 4, purified β_{2m} after concentration; Lane 5, dialysed β_{2m} concentrate against 8 M urea containing PBS; Lane 6, dialysed β_{2m} concentrate against 0.05% SDS containing PBS; Lane 7, dialysed β_{2m} concentrate against 0.3 M 2-mercaptoethanol containing PBS.

て、pH4.3酢酸緩衝液に透析した場合のELISAによる β_{2m} 濃度とBLNによる光散乱強度の経日変化を図5に示した。両試料とも濃度が低下するのに伴い、光散乱強度は増加した。すなわち高濃度 β_{2m} では透析1日後に当初濃度の48.7%に、4日後には31.9%まで減少した。低濃度 β_{2m} では透析による濃度減少がさらに急激であり、1日後に当初濃度の12%に、4日後には2%にまで著減した。これに対し、光散乱強度は高濃度 β_{2m} で透析1日後に0.65Vから5.98Vに急増、4日後には10.82Vまで増加した。又、低濃度 β_{2m} でも1日後に0.09Vから0.86V、4日後には4.08Vまで上昇した。

III. SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング

濃縮前の β_{2m} 100 μ g/mlでは分子量12,000の単量体のみのものであったものが、8倍および10倍濃縮した後には、新たに重合により形成された分子量26,000(2量体)、40,000(3量体)と中間分子量を示す位置とに染色バンドが出現した

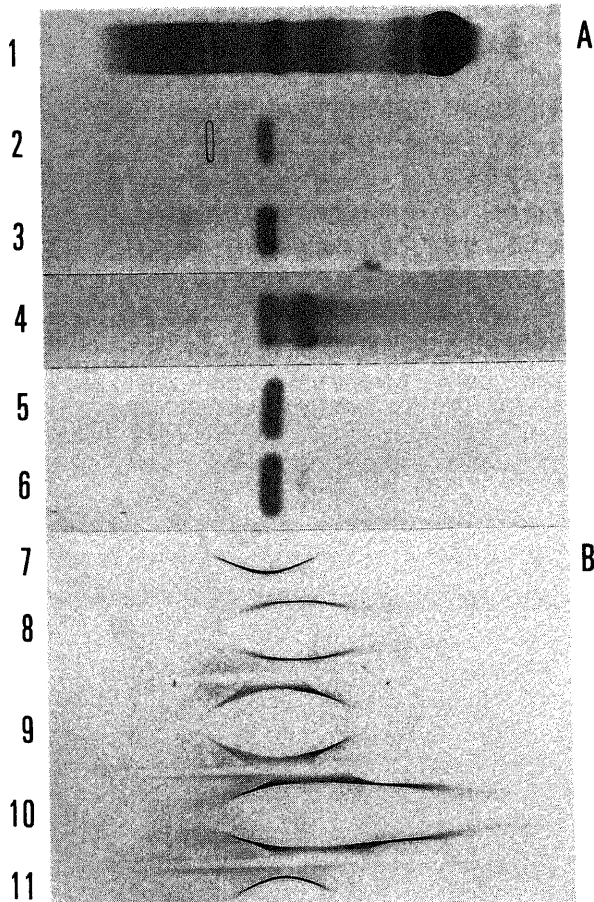


Fig. 8. Electrophoretic mobility of polymerized β_{2m} . A, Agarose-electrophoresis was performed in 250 V for 45 mins, and agarose gel was stained with Coomassie brilliant blue; B, Immunoelectrophoresis was performed in 250 V for 45 mins, and agarose gel was incubated for 16 hours after an application of rabbit anti-human β_{2m} serum. Lane 1, normal human serum; Lane 2, 7, purified β_{2m} ; Lane 3, 9, precipitated β_{2m} by concentration; Lane 4, 10, precipitated β_{2m} in pH 4.3; Lane 5, 8, supernatant β_{2m} in pH 4.3; Lane 6, 11, precipitated β_{2m} by dialysis against H_2O .

(図6)。

β_{2m} の重合により形成された不溶物を8M尿素含有PBS、0.05% SDS含有PBSおよび0.3M 2-メルカプトエタノール含有PBSの3種類の透析外液に対して3日間透析した後の泳動パターンは透析前のものと比べて大きな変化を示した。すなわち、8M尿素含有PBSおよび0.05% SDS含有PBSに透析したものは単量体、2量体に加え3量体、4量体及びその中間分子量に位置する染色バンドが出現し、単量体のバンド幅が増加した。これに対し、2-メルカプトエタノール含有PBSに透析したものは単量体のみのものであり、そのバンド幅も減少した(図7)。図7のレーン4, 5, 6, 7は同量の試料を用いているが、原点(図7の上部)に残る染色像が図にはあらわれていない。即ちレーン4と7の染色パターンが少ないということは原点に不溶物として残る部分が多いことを示している。

IV. 寒天電気泳動・免疫電気泳動(図8-A, B)

精製された β_{2m} は β_1 に近い β_2 移動度に1本のバンドとして泳動し、ウサギ抗ヒト β_{2m} 抗血清とは明確な沈降線を作った。これを濃縮、または精製水に透析してできた沈渣をとって原点に添加しても、泳動の条件下で再び可溶性となり、本来の移動度と抗原性を示した。しかし、pH4.3による沈殿は可溶化して泳動されたが、本来の移動度のバンドに加えそれよりやや陽極寄りにもう1本のバンドを形成し(図8A)、免疫電気泳動によって融合した沈降線となった(図8B)。

V. 円偏光二色性

図9に β_{2m} の酸性条件下における200-350nm波長域の円偏光二色性のスペクトルを示した(図9)。

$$\text{モル楕円率} [\theta] \text{ は } [\theta] = \frac{Q \times 100}{C \times L}$$

Cはモル濃度、Lはセル長、Qは実測楕円角により求めた。pH6.8においては221nmに $[\theta] = -1,182 \text{ degree} \cdot \text{cm}^2 / \text{decimole}$ と240nmに $[\theta] = -136$ の2つの極大を示すカーブが得られた。この値はKarlsson²³⁾の報告に近い。予備試験によ

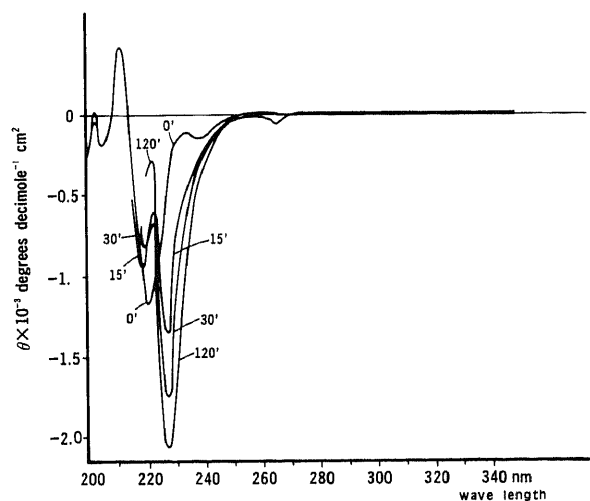


Fig. 9. Changes of circular dichroism of β_{2m} in acidic pH. β_{2m} in 0.2 M phosphate buffer (0') was mixed with 1 M acetate buffer pH 4.3 (1:1), and measured the CD spectrum after 15 min (15'), 30 min (30') and 120 min (120').

り pH4.9 の緩衝液の添加までは著しい変化がないが、pH4.3 になると急速にスペクトルが変化することが判明したので、0.2 M リン酸緩衝液 pH6.8 の β_2m に 1M の pH4.3 酢酸緩衝液を加え、15分、30分、120分後に CD スペクトルを測定した (図 9)。その結果 240nm の負のピークは消失、221nm の負のピークは次第に減少し、代わりに 227nm に新しい負のピークが出現し、 $[\theta]$ は 15分後 $-1,382$ 、30分後 $-1,890$ 、120分後 $-2,110$ と変化した。しかし、 β_2m 溶液に 0.01M 2-メルカプトエタノールを添加したり、精製水により希釈しても、120分程の短時間では CD スペクトルには著しい変化はなかった。

VI. アミロイド染色 (図 10-A, B)

β_2m を濃縮、塩濃度変化および酸性条件下で不溶性にした沈殿をスライドガラスに塗抹し、コンゴ赤染色を行った。その後、光学顕微鏡にて各不溶化条件のスライドを 400 倍拡大で 50 視野の観察をし、コンゴ赤染色の陽性視野の比率を求めた。いずれもタンパクの無定形の沈殿が主であるが、コンゴ赤に染まる部分が点々とあり、その比率は塩濃度変化では 12/50、濃縮 5/50、酸性条件下 1.5/50 であった。すなわち、塩濃度を 3 日間かけて減少させ、最後に精製水に透析して得られた沈殿が最もコンゴ赤に染まり、酸性条件下のものはほとんど染まらなかった。図 10 に示したのは濃縮により不溶化した沈殿を染色したものである。偏光顕微鏡 (図 10B) では、コンゴ赤染色された沈殿に緑黄色の複屈折が観察された。その染色比率は光学顕微鏡観察時のものと同様であった。

VII. 電子顕微鏡による観察 (図 11)

日立 H500 電子顕微鏡により倍率を 30,000 として β_2m の重合不溶物を観察した (図 11)。多くの部分は無定形の点であるいは凝集のタンパクであったが、部分的にアミロイド線維特有の 40nm の細線維あるいはその集積した線維が認められた。

考 察

精製されたヒトの β_2m の水溶液は溶媒の pH 変化、塩濃度変化および濃縮の操作により溶解度の著しい低下が認められた。

特に pH 変化に対しては pH5.5 以下で不溶物の形成が始まり、pH の低下に伴って不溶物の形成は増大した。この β_2m の

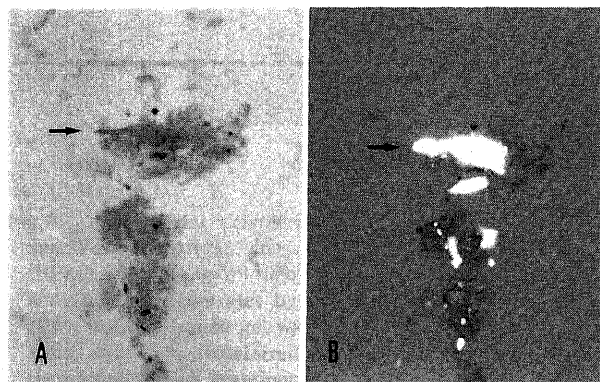


Fig. 10. Identification of precipitates of polymerized β_2m as amyloid fibril by Congo-red staining. Precipitate of polymerized β_2m by simple concentration was applied on gelatin coated glass slide, dried at 37°C and stained with Congo-red. A, Light micrograph, $\times 200$; B, Micrograph in polarized light, $\times 200$. The arrow indicates one position of the precipitates of the polymerized β_2m .

肉眼では認められない不溶物をネフェロメトリーを原理とする BLN により測定した²¹⁾。BLN は波長 633nm の He-Ne レーザーを光源とし、溶液中の不溶物の粒子径が波長より大きくなる場合に起こる Mie 散乱を測定に利用したものであることから、不溶物は 633nm よりかなり大きく成長しているか、あるいは 633nm 付近の不溶物が数多く形成されていることを示している。pH 低下による重合不溶物の形成は、 β_2m 濃度が 727 $\mu\text{g/ml}$ 、7 $\mu\text{g/ml}$ のいずれでも同様に起こった。

β_2m の高次構造を CD スペクトルで調べた報告は Karlsson²²⁾ 以外にない、これでは β 構造が主成分であることを確かめただけであったが、今回は環境条件を変えた場合の β_2m の高次構造の変化を CD スペクトルにより観察した。pH6.8 では β 構造による 216nm 付近のネガティブピークが明瞭であるが、pH4.3 にすると 15分後でスペクトルの波長が移動することから、既に高次構造の変化が始まっており、30分、60分、120分、7日となるに従い、227nm のネガティブピークの深さが変化した。60分および 7日のデータは図 9 には示さなかったが、 $[\theta]$ はそれぞれ $-2,163$ と $-1,854$ であってピークの深さが異なるがカーブには大差はなかった。7日後には沈殿形成によりピークが減少したと考えられた。BLN による混濁度の測定においても pH 6.8 で 0.33V であったものが pH4.3、15分では 0.80V、以降 30分では 0.92V、60分では 0.97V、120分では 1.09V と光散乱強度が徐々に増加し、1日後には 1.52V まで達し、227nm のネガティブピークの深さに比例して重合不溶物が成長していることが伺えた。この変化は寒天電気泳動では陽極寄りのバンドの出現となった。これは高次構造の変化により内部に隠れていた負荷電の露出であろうと考えられる。しかし、それによって多

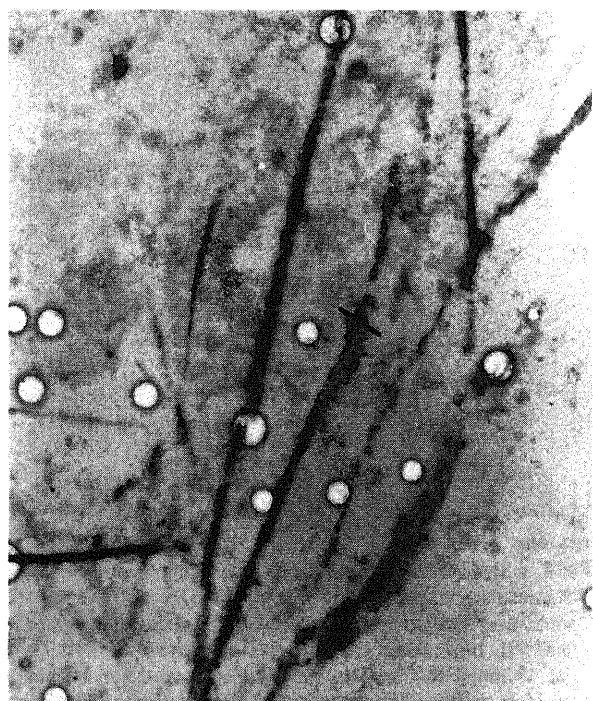


Fig. 11. Electron micrograph of precipitates of polymerized β_2m . Precipitate of polymerized β_2m was stained with uranyl acetate for 20 mins at 37°C and with lead citrate for 5 mins at room temperature. $\times 30,000$.

クローン抗体に対する抗原性に変化がなかったことは、主な高次構造はなお保たれていることを示している。この pH による変化がアミロイド線維の形成に結びつくかどうかは、急激に pH を変えた場合コンゴ赤染色により染まる部分がかかなり少なく、無定形沈殿が主であったことにより否定的であるが、pH を透析により徐々に変えた場合にコンゴ赤染色部分が、増大したのでその可能性も否定できない(長谷部保彦 未発表データ)。

β_{2m} は pH6.8 で濃縮した場合にも可溶性が低下し、400 μ g/ml を超えると沈殿が認められ始めた。この濃度は人工透析患者の血清中の β_{2m} 濃度の最高値¹⁹ よりかなり高い値ではあるが、血管外に出て少し濃縮されると容易に重合が始まりうることを示唆している。

濃縮により重合不溶物となった β_{2m} を 0.05% SDS 含有 PBS あるいは 8M 尿素含有 PBS に透析すると、重合不溶物が再溶解し、可溶性の多量体および元の単量体に復帰することが、寒天および免疫電気泳動、SDS-PAGE およびウエスタンブロットの染色パターン(図 7, 8) と ELISA による β_{2m} 濃度の増加および BLN での光散乱強度の低下(図 4) から示された。これは、重合不溶物の中には完全なアミロイド線維となっていない部分の方が多く存在するため無定形沈殿は SDS や尿素により重合物間の結合がはずれ、可溶性の多量体あるいは元の単量体の β_{2m} に復帰することを推測させる。しかし重合不溶物を 0.3M 2-メルカプトエタノール含有 PBS に透析すると、SDS-PAGE およびウエスタンブロットの染色パターンでは多量体のバンドが完全に消失し単量体みのバンドとなった。そのバンドの幅も狭くなっており(図 7)、ELISA による β_{2m} 濃度の低下と BLN での光散乱強度の増加(図 4) を考え合わせると、 β_{2m} 分子内の SS 結合が切れて高次構造が変化すると、 β_{2m} 分子間により重合を強める力が働き、単量体から多量体への重合が促進されるのではないかと推測している。

アミロイドは構造的には絹に類似した β 構造のタンパクから構成される線維であって、その安定性のために一旦形成されたアミロイドは吸収されることがなく、その蓄積が徐々に進行すると、周囲の組織を圧排して機能障害をもたらす。アミロイドの形成にはその前駆タンパクの増加とともに、タンパク分解酵素の関与¹⁹、プロテオグリカン²⁰ およびアミロイド P 成分²¹ との結合、amyloid enhancing factor の関与²²、フィブロンectin とマクロファージの関与²³ など、さまざまな補助要因が挙げられている。しかし、補助要因を必要とせず、前駆タンパク単独で試験管内でアミロイド線維が形成された報告も散見する^{19,24}。アミロイドはコンゴ赤に染色され、電子顕微鏡により独自の線維成分として同定されるが、これに加えて pH 変化、尿素、SDS、dimethyl sulfoxide (DMSO) の添加などでは可溶化されない安定性もその特徴とされている²⁵。今回の実験はアミロイド形成の第一段階を見たのであって、試験管内で一部分の β_{2m} がコンゴ赤染色陽性に変ったが、その部分だけ取り出すことは成功していない。また尿素や SDS に不溶性の線維が形成されているかどうかは明らかでない。沈殿の大部分を占める無定形沈殿は尿素にも、SDS にも可溶性であった。従ってアミロイド形成の機構の解明にはさらにコンゴ赤染色性の効率のよい重合をおこさせる必要がある、それには時間をかけて、高次構造を保ったまま沈殿形成をさせる必要があると推測される。

本研究において β_{2m} の溶媒に対する安定性を調べていると、臨床検査室においては酸性尿中における β_{2m} の不安定性が問題になっていることが判明した。即ち患者尿中の β_{2m} を定量するときに、尿の pH が中性、アルカリ性であると β_{2m} を測定できるが、酸性であると経時的な減少があって正確な測定が不可能である。その原因として尿中に酸性プロテアーゼが混在するためであると今まで考えられてきた¹⁷⁻¹⁹。しかし尿中の酸性プロテアーゼを実証した成績はなかった。本実験の結果から、これは明らかに誤りであって、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのタンパクは重合しやすい共通性があり²⁶、尿のような β_{2m} の希薄溶液は酸性条件下で重合しても、沈殿形成として肉眼では認められない。しかし溶液状態の β_{2m} の減少のために濃度が低下するように見えたものである。そこで β_{2m} 濃度が減少したときに図 4 のように 0.05% SDS あるいは 8M 尿素を添加すると β_{2m} の濃度が回復することから、臨床検査において β_{2m} を測定する時に可溶化剤を添加することにより従来測定不能であった問題点が解決すると思われる。

結 論

β_2 ミクログロブリンの重合によるアミロイド線維の形成条件について検討し、以下の結論を得た。

1. β_2 ミクログロブリンの水溶液は濃縮、塩濃度低下、酸性条件下などで重合がおこり沈殿を形成した。その時の CD スペクトルにおいて、酸性条件下では高次構造の変化が認められたが、濃縮・塩濃度の低下においては CD スペクトルの変化が認められなかった。これらの沈殿形成は可逆的に元に戻ることで変性によるのではなく、分子の規則性を保ったままの重合であった。

2. β_2 ミクログロブリンの重合による沈殿の形成までの時間は濃縮および酸性条件下で早く、塩濃度低下では遅かった。アミロイド染色において、コンゴ赤に染まる沈殿は、沈殿形成までの時間の遅い塩濃度低下の場合に多く、濃縮の場合は少なく酸性条件下ではほとんど認められなかった。染まった沈殿がアミロイド線維であることは偏光顕微鏡による緑黄色の複屈折と電子顕微鏡の観察にて確認した。

3. これらの結果から、 β_2 ミクログロブリンからアミロイド線維への変換は高次構造を保ったまま長時間かけて環境変化させて重合することにより、 β_2 ミクログロブリン単独でも自律的におこりうる結論した。

4. 現在、臨床検査の分野では尿中の β_2 ミクログロブリンの測定の際に、 β_2 ミクログロブリンが酸性尿で消失もしくは減少していくことで正確な定量が困難であるとされている。この原因は酸性プロテアーゼによるものと考えられたいたが、SDS または尿素によって濃度の減少が回復するので β_2 ミクログロブリンの高次構造の変化による沈殿形成である事が明らかになった。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御指導と御校閲を賜りました恩師右田俊介教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に多大な御教示・御協力を頂きました金沢大学医学部第一病理学教室河原 栄講師、金沢大学医療技術短期学部部長井雅子教授および金沢大学薬学部薬品分析学高荷昌子講師に心より深謝いたします。さらに貴重な試料を御提供いただきました富山医科薬科大学公衆衛生学寺西秀豊助教授に感謝の意を表します。最後に研究内容につき、御教示御助言いただきました大阪大学理学部浜

口浩三名誉教授に深謝の意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は、第21回日本免疫学会総会(1991年、熊本)および8th International Congress of Immunology(1992年、Budapest)において発表した。

文 献

- 1) Berggård, I. & Bearn, A. G.: Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids. *J. Biol. Chem.*, **243**, 4095-4103 (1968).
- 2) Cunningham, B. A., Wang, J. L., Berggård, I. & Peterson, P. A.: The complete amino acid sequence of β_2 -microglobulin. *Biochemistry*, **12**, 4811-4822 (1973).
- 3) Biorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominglr, J. L., & Wiley, D. C.: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, **329**, 506-512 (1987).
- 4) Assenat, H., Caemard, E., Charra, B., Laurent, G., Terrat, J. C. & Vanel, T.: Hémodialyse syndrome du canal carpien et substance amyloïde. *Nouv. Presse Méd.*, **9**, 1715 (1980).
- 5) Durroux, R., Benovaich, L., Bouissou, H., Mansat, M. & Clanet, M.: Ténosynovite du canal carpien et dépôts amyloïdes chez les insuffisants rénaux chroniques hémodialysés. *Nouv. Presse Méd.*, **10**, 45 (1981).
- 6) Kachel, H. G., Altmeyer, P., Baldamus, C. A. & Koch, K. M.: Deposition of an amyloid-like substance as a possible complication of regular dialysis treatment. *Contrib. Nephrol.*, **36**, 127-132 (1983).
- 7) Gejyo, F., Yamada, T., Odani, S., Nakagawa, Y., Arakawa, M., Kunimoto, T., Kataoka, H., Suzuki, M., Hirasawa, Y., Sirahama, T., Cohen, A. S. & Schmidl, K.: A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β_2 -microglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 701-706 (1985).
- 8) 金 衛仁, 河合 忠: 血清 β_2 -microglobulin の正常値ならびに日内変動. *医学のあゆみ*, **96**, 62-63 (1976).
- 9) Bernard, A. M., Vyskocil, A. & Lauwerys, R. R.: Determination of β_2 -microglobulin in human urine and serum by latex immunoassay. *Clin. Chem.*, **27**, 832-837 (1981).
- 10) Swanson, R. A., Tracy, R. P., Katzmman, J. A., Wilson, D. M. & Young, D. S.: β_2 -microglobulin determined by radioimmunoassay with monoclonal antibody. *Clin. Chem.*, **28**, 2033-2039 (1982).
- 11) Vincent, C., Revillard, J. P., Galland, M. & Traegar, J.: Serum β_2 -microglobulin in hemodialyzed patients. *Nephron*, **21**, 260-268 (1978).
- 12) Gejyo, F., Homma, N., Suzuki, Y. & Arakawa, M.: Serum levels of β_2 -microglobulin as a new form of amyloid protein in patients undergoing long-term hemodialysis. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 585-586 (1986).
- 13) Stein, G., Schneider, A., ToB, H., Linke, R., Schafer, K. & Ritz, E.: Serumspiegel und organablagerungen von β_2 -microglobulin bei dialysepatienten. *Klin. Wochenschr.*, **68**, 1150-1155 (1990).
- 14) Gorevic, P. D., Munoz, P. C., Casey, T. T., DiRaimondo, C. R., Stone, W. J., Prelli, F. C., Rodrigness, M. M., Poulik, M. D. & Frangione, B.: Polymerization of intact β_2 -microglobulin in tissue causes amyloidosis in patients on chronic hemodialysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 7908-7912 (1986).
- 15) Linke, R. P., Kunert, U., Lobeck, H., Hampl, H. & Eulitz, M.: Chemical analysis of beta₂-microglobulin derived amyloid in patients on long-term hemodialysis. *T. Isobe, S. Araki, F. Uchino, S. Kito & E. Tsubura (eds.), Amyloid and Amyloidosis*, 1st ed., p611-616, Plenum. New York, 1988.
- 16) Connors, L. H., Shirahama, T., Skinner, M., Fenves, A. & Cohens, A. S.: In vitro formation of amyloid fibrils from intact β_2 -microglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1063-1069 (1985).
- 17) Davey, P. G. & Gosling, P.: β_2 -microglobulin instability in pathological urine. *Clin. Chem.*, **28**, 1330-1333 (1982).
- 18) Donaldson, M. D. C., Chambers, R. E., Woolridge, M. W. & Whicher, J. T.: Stability of alpha₁-microglobulin, beta₂-microglobulin and retinol binding protein in urine. *Clin. Chem. Acta*, **179**, 73-78 (1989).
- 19) Blumsohn, A., Morris, B. W., Griffiths, H. & Ramsey, C. F.: Stability of β_2 -microglobulin and retinol binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine. *Clin. Chem. Acta*, **195**, 133-138 (1990).
- 20) 右田俊介, 平山千里: 主要血漿タンパク質の構造と機能. 血漿タンパク質-構造・機能・病体(平山千里, 右田俊介編), 第1版, 129頁, 医歯薬出版, 東京, 1979.
- 21) Sieber, A. & Gross, J.: Quantitation of specific serum proteins by Laser nephelometry. *Laboratriumsblatter*, **26**, 117-123 (1976).
- 22) 右田俊介: 免疫電気泳動法. 電気泳動実験法(電気泳動学会編), 第1版, 166-212頁, 文光堂, 東京, 1989.
- 23) Karlsson, F.: Physical-chemical properties of β_2 -microglobulin. *Immunochemistry*, **11**, 111-114 (1973).
- 24) Snow, A. D.: Peripheral distribution of a dermatan sulfate proteoglycan (Decorin) in amyloid plaques and their presence in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *In J. B. Natvig, Ø. FØrre, G. Husby, A. Husebekk, B. Skogen, K. Sletten & P. Westermark (eds.), Amyloid and Amyloidosis*, 1st ed. p757-760, Kluwer. Acad. Press, Dordrecht, 1990.
- 25) 右田俊介, 山本健一, 城尾昌宏, 橋本 茂, 中島広志, 久住治男: 血清アミロイドP成分(SAP): アミロイドーシスの共通因子. *免疫と疾患*; **7**, 447-460 (1984).
- 26) Yokota, T., Ishihara, T., Takahashi, M., Yamashita, Y., Gonda, T., Kawamura, S., Hoshi, Y., Koga, M., Iwata, T. & Uchino, F.: Isolation of amyloid enhancing factor (AEF). *In J. B. Natvig, Ø. FØrre, G. Husby, A. Husebekk, B. Skogen, K. Sletten & P. Westermark (eds.), Amyloid and Amyloidosis*, 1st ed., p307-310, Kluwer. Acad. Press, Dordrecht, 1990.
- 27) Kawahara, E., Shiroo, M., Nakanishi, I. & Migita, S.: The role of fibronectin in the development of experimental amyloidosis. *Am. J. Pathol.*, **134**, 1305-1314 (1989).

- 28) Glenner, G. G., Ein, D., Eanes, E. D., Terry, W. & Page, D. L.: Creation of amyloid fibril from Bence Jones protein in vitro. *Science*, 174, 712-714 (1971).
- 29) Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A. & Franklin, E. C.: The characterization of

soluble amyloid prepared in water. *J. Clin. Invest.*, 47, 924-933 (1968).

- 30) Hood, L. & Hunkapiller, T.: 免疫グロブリンスーパーファミリーの進化. *科学*, 62, 312-322 (1992).

Polymerization of β_2 -microglobulin as an Amyloidogenic Process Yasuhiko Hasebe, Department of Molecular Immunology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 228—237 (1993)

Key words amyloidogenesis, β_2 -microglobulin, CD spectra, nephelometry, polymerization

Abstract

β_2 -microglobulin (β_2m) is one of the amyloid precursor proteins. In patients on long-term hemodialysis, serum β_2m increases in concentration and changes to amyloid as seen in the carpal tunnel syndrome. Connors et al. reported the in vitro formation of amyloid fibril from intact β_2m . However, whether all or part of β_2m changed to real amyloid fibril was not stated. The present study was performed to confirm the in vitro change from β_2m to amyloid fibril and to investigate the intermediate state. β_2m was obtained from urine of patients with Itai-Itai disease caused by cadmium intoxication in the area of polluted soil. Urine samples were concentrated by hollow fiber Amicon Concentrator and then passed through two gel filtration columns. The characteristic and purity of the purified β_2m were confirmed by several electrophoresis. In order to make precipitate of the purified β_2m , three procedures such as 1) concentration of the solution in PBS, 2) decrease of salt concentration, 3) change to acidic pH were employed. The intermediate state was analyzed by protein determination, nephelometry, circular dichroism, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), agarose electrophoresis and immunoelectrophoresis. The formation of precipitate of β_2m was seen in all of these three procedures by nephelometry analysis. There was no change in CD spectra of β_2m in procedures 1) and 2), but CD spectra revealed a rapid change in procedure 3) at pH 4.3. In agarose electrophoresis, a new band appeared in procedure 3) at pH 4.3 in addition to the original band of β_2m . However, in procedures 1) and 2), such a new band did not appear. Stained precipitates with Congo-red were plentiful in procedure 1), few in procedure 2) and fewer still in procedure 3). Observation by microscope in polarized light and electron microscope confirmed that the precipitates were amyloid fibrils. These results proved that intact β_2m changed to amyloid fibril when the precipitates were formed gradually without any change in conformation of β_2m . In the field of clinical laboratories, determination of β_2m is difficult because of instability of β_2m in acidic urine. It has been explained that acid protease in urine decreased β_2m concentration. However, this study proved that it was not due to protease digestion, but due to formation of precipitate.