

全身性エリテマトーデスにおける 尿中の低分子蛋白

第 1 編

尿中遊離 light chain に関する検討

岡山大学医学部第三内科(主任：大藤 眞教授)

難 波 義 夫

(昭和55年11月12日受稿)

Key words: 全身性エリテマトーデス
遊離 L 鎖

緒 言

自己免疫疾患の代表である全身性エリテマトーデス(以下 SLE)は、種々の免疫学的異常を認め、多種の臓器の障害を伴う疾患である。SLE の活動性の指標としては、各種の臨床症状のほか、抗核抗体、抗 DNA 抗体、血清補体価などの血清学的所見が有力なデータとして参考にされているが、近年、Epstein ら¹⁾は、低分子蛋白の1つである尿中遊離 light chain(以下 L 鎖)の測定もほぼ同様の臨床的意義があると報告している。

そこで、著者は、当科にてコントロール中の SLE 患者61例につき、尿中遊離 L 鎖を測定し、臨床像、血清検査所見との関連について観察をおこない、遊離 L 鎖を尿中で測定することの診断的意義、SLE の活動性及び経過予測に関する指標としての意義の有意について検討を加えたので報告する。

1) 対象

岡山大学医学部第三内科にてコントロール中の ARA の予備診断基準²⁾を4項目以上満した definite の SLE 患者61症例、対照として健康人37例を用い、尿は、早朝尿をさけ新鮮尿を濃縮しないまま使用した。

2) 抗遊離 L 鎖抗血清の作成³⁾

ヒト Cohn FII を 2ME, iodoacetamide にて還元アルキル化後、Sephadex G166(G200 : G100

=2 : 1) に 2 回通し、遊離 L 鎖を単離、これを complete adjuvant と共に家兎に免疫し、抗 L 鎖抗血清を作成した。それをヒト Cohn FII で正常人血清とオクタロニー法にて沈降線を形成しなくなるまで吸収した。その後、骨髄腫患者の尿より単離した K 型、あるいは入型 Bence Jones 蛋白にて再度吸収し、K 鎖あるいは入鎖に特異な抗遊離 L 鎖抗血清を作成した。この抗血清は、正常人血清、intact IgG, IgG Fc, IgG Fab とは反応しなかった。

3) 遊離 L 鎖の測定

前述の遊離 L 鎖抗血清を 2% アガロース (ペロナル緩衝液, pH8.6, 0.05M) に約 30% の割合に混ぜて immunoplate を作成し、Single Radial Immunodiffusion 法にて遊離 L 鎖を測定した。標準曲線の作成は、多発性骨髄腫患者尿より精製した Bence Jones 蛋白を使用した。

4) 抗核抗体⁴⁾

ヒト末梢白血球核を核材として、FITC 標識抗ヒト IgG ウサギ血清を用い、蛍光抗体間接法にて調べた。

5) 抗 DNA 抗体価⁵⁾

³H-アクトキノマイシン D 標識 DNA を抗原とした Farr の方法で測定した。

6) 血清補体価 (CH50)⁶⁾

Mayer の 50% 溶血法にて測定した。

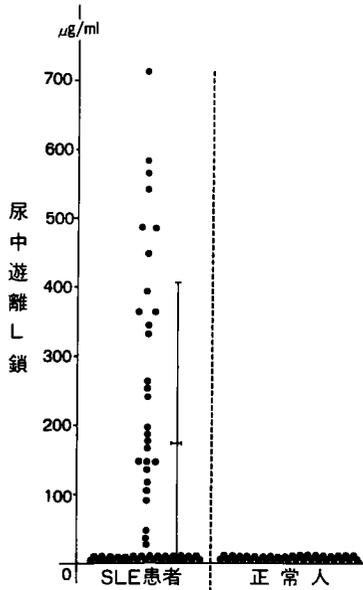


図1 全身性エリテマトーデス患者と正常人における尿中遊離L鎖

結果

1) 正常人では全例尿中遊離L鎖を検出し得なかった。SLEでは61例中32例に陽性であり、SLE患者の平均値は、 $175 \pm 247 \mu\text{g/ml}$ であった(図1)。

また、K鎖入差の鎖は、尿中遊離L鎖陽性者32例で検討すると、入鎖の方が高値を示すのは1例のみで、残りは全例K鎖の方が高値を示し、また、21例では入鎖は陰性であった。

2) 抗核抗体との相関(図2)。

抗核抗体が Shaggy pattern を示す群の尿中

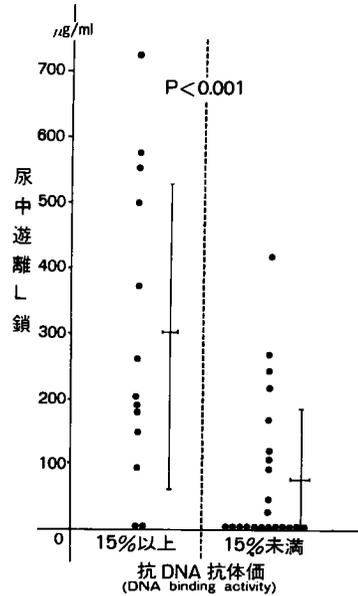


図3 全身性エリテマトーデス患者における尿中遊離L鎖と抗DNA抗体価

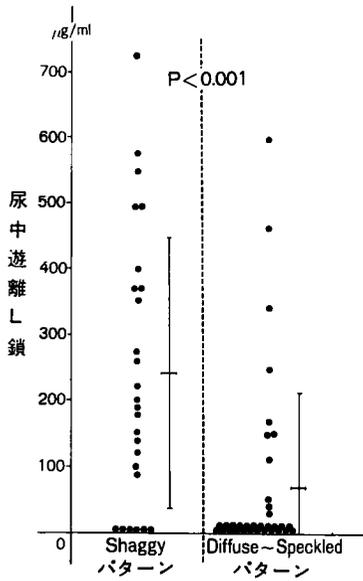


図2 全身性エリテマトーデス患者における尿中遊離L鎖と抗核抗体

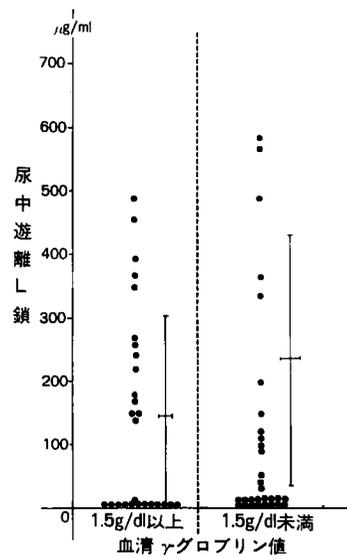


図4 全身性エリテマトーデス患者における尿中遊離L鎖と血清γグロブリン値

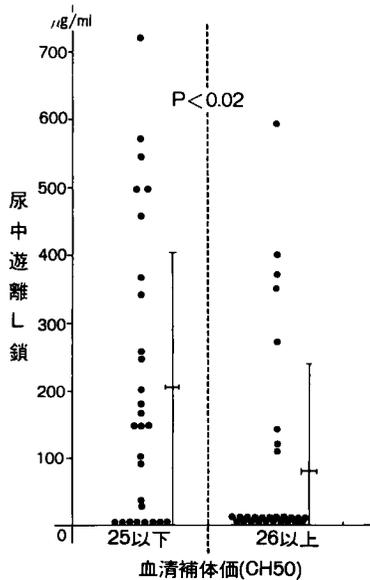


図5 全身性エリテマトーデス患者における尿中遊離L鎖と血清補体価

遊離L鎖は $240 \pm 207 \mu\text{g/ml}$, Diffuse~Speckled Patternを示す群は, $61 \pm 143 \mu\text{g/ml}$ で,危険率0.1%未満でShaggy patternを示す群の方が尿中遊離L鎖は有意に高値を示した。

3) 抗DNA抗体価との相関(図3)

DNA bindingが15%以上を示す群の尿中遊離L鎖は $292 \pm 231 \mu\text{g/ml}$, 15%未満を示す群は, $76 \pm 111 \mu\text{g/ml}$ で,危険率0.1%未満で15%以上を示す群の方が尿中遊離L鎖は有意に高値を示した。

4) 血清γグロブリン値との相関(図4)

血清γグロブリン値が 1.5g/dl 以上と高値を示す群の尿中遊離L鎖は $143 \pm 164 \mu\text{g/ml}$, 1.5g/dl 未満を示す群は $233 \pm 202 \mu\text{g/ml}$ で,両者の間に有意の差は認めなかった。

5) 血清補体価(CH50)との相関(図5)

CH50が25以下を示す群の尿中遊離L鎖は201

$\pm 205 \mu\text{g/ml}$, CH50が26以上を示す群は, $81 \pm 158 \mu\text{g/ml}$ でCH50が25以下を示す群の方が危険率2%以下で尿中遊離L鎖は有意に高値を示した。

6) 尿蛋白量との相関(図6)

尿蛋白量を 300mg/dl 以上とそれ未満, 100mg/dl 以上とそれ未満の2通りで検討を行った。

尿蛋白量 300mg/dl 以上の群では,尿中遊離L鎖 $235 \pm 250 \mu\text{g/ml}$, 300mg/dl 未満の群では, $126 \pm 168 \mu\text{g/ml}$ で両者の間に有意の差は認めなかった。しかし,尿蛋白量 100mg/dl 以上の群では,尿中遊離L鎖 $204 \pm 231 \mu\text{g/ml}$, 100mg/dl 未満の群では $100 \pm 148 \mu\text{g/ml}$ と,危険率5%未満で尿蛋白 100mg/dl 以上の方が尿中遊離L鎖は有意に高値を示した。

7) 症例呈示(図7)

図7に示したM.K.例は,昭和49年秋頃より暮までSLEの精神症状を呈し,昭和50年の初めより3月頃まで血清学的に急性像を呈した。急性期に尿中遊離L鎖は高値を示し,臨床的に寛解した頃より,尿中遊離L鎖も陰性となり,同時にCH50も上昇し,抗核抗体もShaggy patternからDiffuse patternとなった。

考 按

従来より,正常人の血清および尿中に Bence

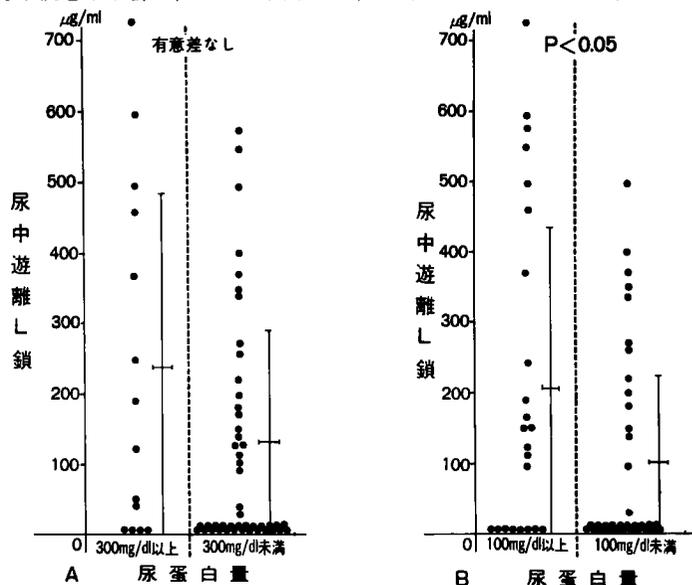


図6 全身性エリテマトーデス患者における尿中遊離L鎖と尿蛋白量

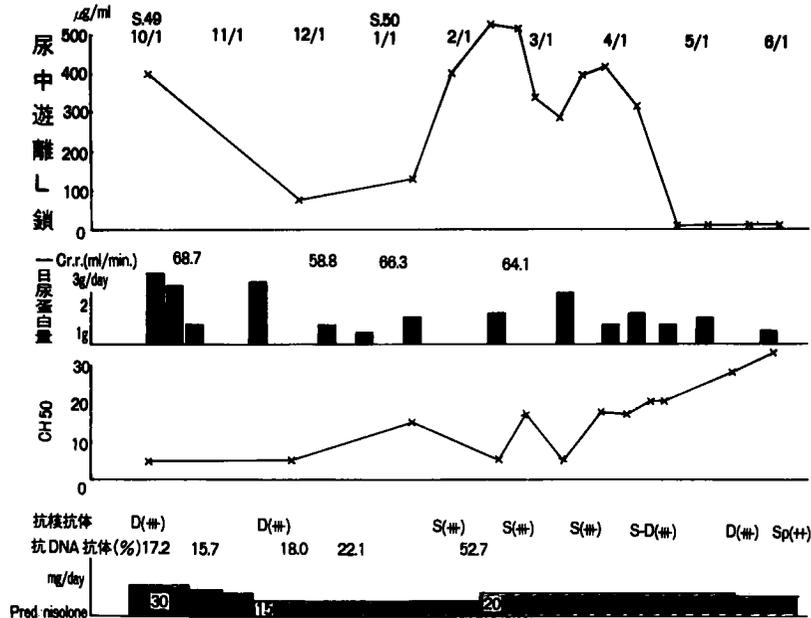


図7 尿中遊離L鎖の変動
M.K. 女性, 30才, SLE

Jones 蛋白の性格を持ったもの、あるいは、免疫グロブリンのL鎖に相当する蛋白が認められていた^{7),8),9)}。Tanら¹⁰⁾も正常人血清および尿中に少量の遊離L鎖を証明し、SLE患者の血清や尿において、また、慢性関節リウマチ患者の関節液においては、正常人より多くの遊離L鎖を検出し得たと報告している。その他にも、各研究者が、血清、尿中、関節液中に遊離L鎖が増加していることを報告している。すなわち、Gordonら¹¹⁾は、慢性関節リウマチ患者の尿中に、Cooperら¹²⁾は、SLE、慢性関節リウマチ患者の尿中および関節液内に、また、Vaughanら¹³⁾は、抗原抗体複合物がその病態となる血清病の尿中に、各々遊離L鎖の上昇がみられると報告している。自己免疫疾患以外でも、Ferminら¹⁴⁾は、腎移植患者の血清で遊離L鎖の上昇を認めている。日本でも、正木ら¹⁵⁾は、慢性骨髄性白血病、胃癌などで血清遊離L鎖の上昇を報告している。

今回著者は、Tanら³⁾が使用した方法に準じて遊離L鎖に対する特異抗血清を作成した。この遊離L鎖特異抗血清は免疫グロブリンGを還元アルキル化し、Heavy chain (H鎖)とLight chain (L鎖)に分け、L鎖を分離後、家兎に免

疫し、得られた抗血清を正常人のプール血清で吸収したものである。本抗血清には、免疫グロブリンに結合しているL鎖とは反応せず、遊離しているL鎖のみと反応する特徴が認められた。こうした反応特異性は、正木ら¹⁶⁾によると、免疫グロブリンの分解によってあらわれたL鎖のconstant部分のhidden antigenicityとの反応に由来するものであろうとされている。この抗血清を使用し、アガロース内免疫拡散法にて尿中遊離L鎖の測定をおこなった。

正常人37例では、尿中遊離L鎖は陰性であったが、SLE患者では、61例中32例が陽性であった。また、SLEの活動性の指標となる抗核抗体、抗DNA抗体価、血清補体価などと尿中遊離L鎖は相関を示し、SLEの急性増悪期に高値を示した。この結果は、従来の報告のEpstein & Tanら¹⁰⁾、Cooperら¹²⁾、Epsteinら¹⁾の結果と一致していた。しかし、血中ガンマグロブリン値と尿中遊離L鎖とは有意の相関を示しておらず、これらの疾患でしばしば認められる高ガンマグロブリン血症が尿中遊離L鎖の増加の原因とは考えられなかった。また、尿蛋白量と尿中遊離L鎖との関係は、尿蛋白量100mg/dl以上と

それ未満でわけてみると、危険率5%未満で有意の差をもって尿蛋白が多い群に尿中遊離L鎖が高値を示していたが、尿蛋白量300mg/dl以上とそれ未満でわけた場合は、両者の間に有意の差は認められなかった。以上より、尿中遊離L鎖の増加は、単純に尿蛋白量の増加に比例するものとも考えられなかった。

自験例では、遊離K鎖が入鎖に比べて高値を示したが、その理由として次の2点が考えられた。第1点は尿中遊離L鎖が実際にK鎖有意に上昇していること。第2点は自験抗入鎖抗血清の力価が低いこと、または反応特異性が狭いこと。後者については、自験抗血清は、K鎖より入鎖の方が低濃度の蛋白を検出でき、特異性もCohn FIIを還元アルキル化して多クローン性の遊離L鎖を得、それを抗原として抗血清を作成している点から、反応特異性も広いことが考えられた。したがって、実際に遊離K鎖の方が高値を示していることが考えられた。

図7のごとく、同一症例で尿中遊離L鎖を追跡した場合は、臨床的、血清学的に急性増悪を示した時期に尿中遊離L鎖は高値を示し、臨床的に急性期を脱した頃より尿中遊離L鎖も陰性となり、血清学的にも落ち着いている。つまり、尿中遊離L鎖は、臨床像かつ血清学的所見と平衡して動くことが推測された。Epsteinら¹¹⁾は、急性増悪の臨床像に先立ち数ヶ月前より尿中遊離L鎖が上昇し、特に腎障害増悪を早期に把握する指標となり、SLE 35例を4~6ヶ月観察した中で、尿中遊離L鎖が20 μ g/ml以下の症例では、腎障害の進展はみられなかったと報告している¹⁷⁾。著者は、1例急性増悪に先立ち3ヶ月前に尿中遊離L鎖の上昇を認めた症例を経験した。

正常人では、一般に分子量60,000以上の蛋白は糸球体では濾過されないが、分子量50,000以下の低分子蛋白は糸球体を容易に通過し、尿細管でほとんど100%再吸収され異化される。したがって、蛋白尿の原因として次の3点が考えられる。第1点は、糸球体障害による蛋白の漏出、第2点は、尿細管における再吸収および異化の障害、第3点は、血中に異常に増加したある種の蛋白が糸球体濾液中に排出され、尿細管再吸

収の極量を越えた場合、以上の3点である。遊離L鎖は低分子蛋白であるので、糸球体を容易に通過し尿細管で再吸収される蛋白であるから、遊離L鎖が尿中に増加する原因として第2点と第3点が考えられる。すなわち、尿細管の再吸収、異化の障害と血中の遊離L鎖の増加である。また、後者の原因として、遊離L鎖の産生増加と免疫グロブリンの破壊による血中遊離L鎖の増加の2点が考えられる。

遊離L鎖の由来については、Putnamら¹⁸⁾が、多発性骨髄腫の患者に、Gordonら¹¹⁾が、慢性関節リウマチの患者や正常人にアイソトープを標識したアミノ酸を投与した実験結果より、intactの免疫グロブリンの破壊によるよりはむしろ遊離L鎖そのものの産生によると報告している。また、Vassalliら¹⁹⁾は、免疫動物のリンパ節を使った実験で、intactの免疫グロブリンの合成においてH鎖よりL鎖が過剰に合成されることを報告している。

ところで、遊離L鎖の代謝あるいは異化は生体内でどのようにおこなわれているのだろうか。Jensenら²⁰⁾、Solomon²¹⁾の研究によると、アイソトープを標識したBence Jones蛋白を正常人、腎不全のない多発性骨髄腫の患者に静注すると早急に代謝され、その大部分は体内で異化されるが、約10%がintactな形で尿中に排出されると報告している。異化される場所について、Solomonら²¹⁾は、腎不全を伴う多発性骨髄腫の患者で、BUN 30mg/dl以上の患者では明らかに異化率は低下していると報告し、また、Wochnerら²²⁾は、腎摘をしたマウスを使用した研究で、血中遊離L鎖の異化率の低下をみたことより、遊離L鎖の異化に大きな役割を果す器管は腎であろうと報告している。

ところで、SLEにおける尿中遊離L鎖の上昇について、Epsteinら¹¹⁾は、SLE腎症に基づいてL鎖の異化が減少し、血清の遊離L鎖の量が増すために、尿中遊離L鎖の量も増加すると推測している。一方、Cooperら¹²⁾は、SLEにおいて、血中あるいは尿中の遊離L鎖と腎障害の程度との間に相関がない事、また、腎障害を欠く慢性関節リウマチ患者の尿中遊離L鎖の増加は、腎アミロイドーシスを伴った慢性関節リウ

マチ患者より多い事などより、腎障害とは関係なく、なんらかの免疫異常によって遊離L鎖の産生が増加したために、血中ならびに尿中L鎖が上昇、あるいは増加するのではないかと考察している。

著者の成績より考察してみると、血中ガンマグロブリン値と尿中遊離L鎖、また、尿蛋白質と尿中遊離L鎖との間に関連性がなく、SLEの血清学的所見と有意の相関を認めたことから、intactの免疫グロブリンの破壊によるもの、また、腎障害による異化率の低下のためというより、SLEの急性期で認められる免疫異常の結果、遊離L鎖の産生増加が惹起され、血中レベルが増加し、その結果として尿細管再吸収極量を超えた量の遊離L鎖が尿中に排出されるという機序が最も妥当と考えられる。

なお、腎組織の生検組織像との関連については、後報で述べる予定である。

結 論

- 1) 遊離L鎖は、正常人尿中では検出されず、

SLE 61例中32例の尿中に陽性であり、平均値は $175 \pm 247 \mu\text{g/ml}$ であった。

2) 尿中遊離L鎖は、K鎖が入鎖より高値を示した。

3) 尿中遊離L鎖は、SLEの活動性の指標となる抗核抗体、抗DNA抗体価、血清補体価と有意の相関を示した。

4) 同一症例でみた場合、尿中遊離L鎖は、SLE病態の活動性と平衡して変動を示したことより、尿中遊離L鎖の測定は、SLEの活動性を知る一指標となり得る。

5) SLEの尿中遊離L鎖の上昇は、intactの免疫グロブリンの破壊、腎障害による異化率の低下のためより、なんらかの免疫異常の結果、遊離L鎖の産生増加がおり、尿細管再吸収の極量を超えて尿中に増加したものと考えられる。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜った恩師大藤眞教授に深甚の謝意を表します。また、終始、多大の御指導と御援助をいただいた宮脇昌二講師に深謝いたします。なお本論文の要旨は1976年第23回日本臨床病理学会総会にて発表した。

文 献

1. Epstein, W.V.: Immunologic events preceding clinical exacerbation of systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 54, 631—636, 1973.
2. Cohen, A.S., Reynolds, W.E., Franklin, E.C., Kulka, J.P., Ropes, M.W., Shulman, L.E., and Wallace, S.L.: Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.* 21, 643—648, 1971.
3. Tan, M. and Epstein, W.V.: A direct immunologic assay of human sera for Bence Jones proteins (L-chain). *J. Lab. Clin. Med.* 66, 344—356, 1965.
4. 宮脇昌二, 倉田典之, 西村隆夫, 大藤 眞: 抗核抗体の staining pattern に関する研究. *アレルギー*, 19, 282—293, 1970.
5. 西村隆夫, 宮脇昌二, 倉田典之, 垂水禧直, 大藤 眞: Actinomycin-D (^3H)-DNA (AM-DNA) 法による DNA 抗体の検索. *リウマチ*, 11, 328—335, 1971.
6. 森田 実, 西下駿三, 天野哲基, 大藤 眞: SLE 血清補体価に関する研究. *アレルギー*, 20, 159—168, 1971.
7. Berggård, I.: On a γ -globulin of low molecular weight in normal human plasma and urine. *Clin. Chim. Acta.* 6, 545—549, 1962.
8. Berggård, I. and Edelman, G.M.: Normal counterparts of Bence Jones proteins: free L polypeptide chains of human γ -globulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 49, 330—337, 1963.
9. Stevenson, G.T.: Further studies of the gamma related proteins of normal urine. *J. Clin. Invest.* 41,

- 1190—1198, 1962.
10. Epstein, W.V. and Tan, M.: Increase of L-chain proteins in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and the synovial fluids of patients with peripheral rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **9**, 713—719, 1966.
 11. Gordon, D.A., Eisen, A.Z., and Vaughan, J.H.: Studies on urinary gamma-globulin in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **9**, 575—588, 1966.
 12. Cooper, A. and Bluestone, R.: Free immunoglobulin light chains in connective tissue diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **27**, 537—543, 1968.
 13. Vaughan, J.H., Barnett, E.V., and Leadley, P.J.: Serum sickness: evidence in man of antigen-antibody complexes and free light chains in the circulation during the acute reaction. *Ann. Intern. Med.* **67**, 596—602, 1967.
 14. Fermin, E.A., Johnson, C.A., Eckel, R.E., and Bernier, G.M.: Renal removal of low molecular weight proteins in myeloma and renal transplant patients. *J. Lab. Clin. Med.* **83**, 681—694, 1974.
 15. 正木章二, 谷内 昭, 和田武雄, 赤保内良和: 各種病態における血中, 尿中遊離 L 鎖の変動解析. 日本血液学会雑誌, **39**, 481—482, 1976.
 16. 正木章二, 谷内 昭, 和田武雄, 赤保内良和: 遊離 L 鎖の hidden antigenicity に関する研究. 日本血液学会雑誌, **40**, 751—752, 1977.
 17. Epstein, W.V. and Grausg, H.: Favorable outcome in diffuse proliferative glomerulonephritis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **17**, 129—142, 1974.
 18. Putnam, F.W. and Hardy, S.: Proteins in multiple myeloma III Origin of Bence Jones protein. *J. Biol. Chem.* **212**, 361—369, 1955.
 19. Vassalli, P., Lasowska-Bernstein, B., Lamm, M.E., and Benacerraf, B.: Studies on cell-free synthesis of rat immunoglobulins. II. Synthesis of immunoglobulin and of antibody to the dinitrophenyl hapten. *Acad. Sci.* **58**, 2422—2429, 1967.
 20. Jensen, K.B.: Metabolism of Bence Jones proteins in non myeloma patients. *In Protides of the Biological Fluids. Proc. 14th Coll. Bruges*, ed. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, pp 367, 1966.
 21. Solomon, A., Waldmann, T.A., and Fahy, J.L., and McFarlane, A.S.: Metabolism of Bence Jones proteins. *J. Clin. Invest.* **43**, 103—117, 1964.
 22. Wochner, R.D., Strober, W. and Waldmann, T.A.: The role of the kidney in the catabolism of Bence Jones proteins and immunoglobulin fragments. *J. Exp. Med.* **126**, 207—221, 1967.

**Low molecular proteins in the urine of patients
with systemic lupus erythematosus
Part 1. Measurement of urinary free light chains**

Yoshio NAMBA

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. T. Ofuji)

The concentration of urinary free light chains was measured in 61 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) by single radial immunodiffusion. The concentration was significantly increased in these patients, and was associated with hypocomplementemia and a high level of antibody to DNA. It also correlated with the clinical disease activity of SLE. It is postulated that increased free light chain in the urine of SLE patients is derived mostly from increased synthesis of light chain rather than from increased breakdown of intact immunoglobulins or decrease of catabolism during renal insufficiency. The measurement of urinary free light chains may offer information for evaluating disease activity in SLE patients.