

(東女医大誌 第55巻 第1号)
頁 55~63 昭和60年1月)

妊娠時における尿中の N-acetyl- β -D-glucosaminidase 活性

東京女子医科大学 生化学教室 (主任: 降矢 熒教授)

フリヤ ケイ ヨシダ マサミ
降矢 熒・吉田 真美

産科婦人科学教室 (指導: 吉田茂子教授)

ヨシダ シゲコ イソノ サトコ
吉田 茂子・磯野 聡子

第一解剖学教室 (主任: 串田つゆ香教授)

ナガ ノ ティ
永 野 貞子

生化学セミナー学生

3 学年 カクタ ユミ シオザキ ミオコ タケウチ ミキ
角田 裕美・塩崎美織子・竹内 三紀
モリカワ シミズ マユミ ヤマギシ アキ
森川 みぎ・2 学年 清水真由美・山岸 亜紀

(受付 昭和59年10月29日)

Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Activity during Pregnancy

Kei FURIYA and Masami YOSHIDA

Department of Biochemistry (Director: Prof. Kei FURIYA)

Shigeko YOSHIDA and Satoko ISONO

Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. Shigeko YOSHIDA)

Teiko NAGANO

Department of Anatomy (Director: Prof. Tsuyuka KUSHIDA)

Yumi KAKUTA, Mioko SHIOZAKI, Miki TAKEUCHI, Miki MORIKAWA (III grade)

Mayumi SHIMIZU and Aki YAMAGISHI (II grade)

Seminar Students of Biochemistry

Tokyo Women's Medical College

As a clue to find effects of development of pregnancy on renal function concerning tubular lysosomal enzymes, urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.30) activities were determined for 122 cases of pregnant women of various week's gestation and 50 cases of control nonpregnant women. The values obtained were 59.9 ± 21.0 , 105.7 ± 45.4 , 198.2 ± 98.1 , 195.0 ± 119.0 nmol/h/mg creatinine for controls, pregnant women less than 16 weeks' gestation, pregnant women between 16.1 and 36.6 weeks' gestation and pregnant women over 37.0 weeks' gestation respectively. The elevation of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in pregnant women tended to be accompanied by a change in the SDS-polyacrylamide gel pattern of urinary proteins.

In pregnant urine with high N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity the B-form of the enzyme was detected on Cellogel, while it was not detectable in urine samples from normal controls under the same experimental condition. It seems that subclinical impaired renal function could occurred temporarily during development of pregnancy.

はじめに

N-acetyl- β -D-glucosaminidase, EC 3, 2, 1, 30 (以下 NAG と省略)は腎尿管上皮細胞に存在するライソゾーム酵素の1つであり、尿中の総 NAG 活性の上昇は腎尿管障害の存在を示唆する。妊娠時に尿中への本酵素の排出については、Ellis ら¹⁾、Saifer ら²⁾が腎疾患あるいは Tay-Sachs 病の患者の体液中の NAG について研究する間に部分的に記述されているが、詳細については報告されていない。一方、妊娠時には腎血流量、糸球体濾過値の増加があり、腎尿管再吸収も増加した糸球体濾過値を代償するといわれているが、妊娠末期にみられるいわゆる妊娠腎、妊娠中毒症の病因本体は不詳とされている。これらの点を明らかにするがかりとして、122例の妊婦尿について妊娠の進行に伴う尿中の総 NAG 活性の変動を調べ、部分的に NAG アイソザイムパタン、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク像を調べ、興味ある知見を得たので、報告する。

実験方法

1. 試料

種々の妊娠週数の妊婦122例、対照として健康非妊女子(18~53歳)50例、産後1カ月の女子3例について、早朝尿を採取、直ちに凍結して -20°C に保存し、使用直前に融解し試料とした。妊婦尿は主として本学産婦人科教室外来に提出されたものである。

2. NAG 活性の測定

4-methylumbelliferyl-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucoside (Koch-Light 社製、以下4-MUG と省略)を基質として Leback らの蛍光測定法³⁾により実施した。4-MUG を0.15M リン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液、pH 4.5に溶解して0.4mM に調整して基質液とし、この1ml を 37°C 、5分間ブレインキュベーションを行ない、20倍希釈した試料1ml を加え混和後、 37°C 、30分間インキュベートし、この間に基質から生成される4-methylumbelliferone (以下4MU と省略)量を、励起波長364nm 蛍光波長448nm の条件下で、日立 MPF-2 型分光蛍光光度計を用いて測定した。NAG の反応停止

は0.5M グリシン-NaOH, pH 10.4 3ml の添加による。NAG 活性を、クレアチニン1mg を含む尿により1時間当り基質から生成される4-MU 量 (nmol/h/mg クレアチニン)として表わした^{3,4)}。蛍光測定の標準として4mg/L 硫酸キニーネ(0.1N 硫酸に溶解)を用い、4-MU を用いて標準曲線を作製した。

3. クレアチニン測定

前述の20倍希釈した試料について Folin 法の変法により測定した⁵⁾。

4. Cellogel 電気泳動⁶⁾

12×12cm サイズの Cellogel を支持体として0.04M リン酸カリウム, pH 6.5を用いて 4°C で電気泳動を行なった。試料をマイクロダイアフローシステム(アミコン社)により YM-2膜を用いて約50倍に濃縮後、陰極端近くの部位に塗布し、3mA/試料、200V、約2時間通電した。

泳動終了後、 $500\mu\text{M}$ 4-MUG, pH 4.4を用いて NAG 活性帯を染色、1M グリシン, pH 10により反応停止後、直ちに暗室で365nm UV 照射により蛍光性スポットを確認した。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

約50倍に濃縮した試料を1%SDS、2-メルカプトエタノールを含む0.01M リン酸ナトリウム、pH 7.0で処理したものを泳動用試料として Weber の方法⁷⁾により電気泳動を行った。泳動終了後、アミドブラック10Bを用いて染色、酢酸：メタノール：水(7:10:100, V/V/V)により脱染、東洋デンシトメータ DMU-2型を用いてデンシトグラムを描き Boesken らに⁹⁾¹⁰⁾より提唱された半定量的なタンパク組成の解析を行なった。

6. スラブ型 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

3~15%のゲル濃度の濃度勾配ゲルを調製し Weber らの方法に準じて電気泳動を行ない⁷⁾⁸⁾、クマシーブリリアントブルー-Rを用いて染色、型の如く脱染を行なった⁹⁾。

結 果

1. 尿中 NAG 活性

対照非妊女子50例についての結果を Fig. 1に

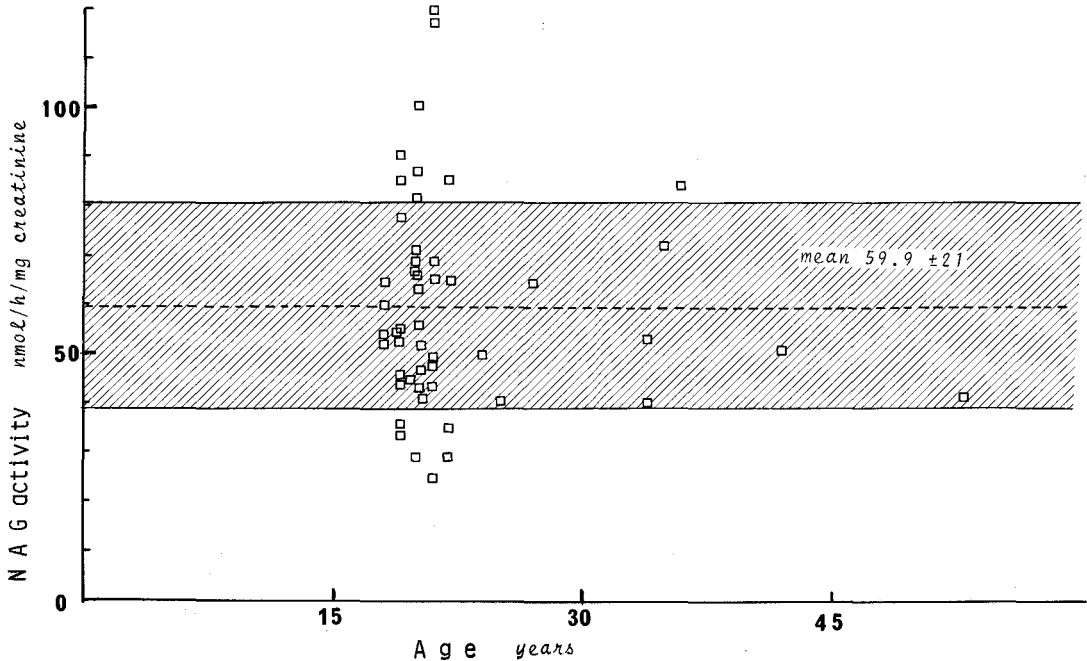


Fig. 1 Urinary NAG excretion of normal non pregnant. Enzyme activities are expressed as nmol 4-methylumbelliferone released per hour.

示す。平均値は 59.9 ± 21 nmol/h/mg クレアチニンであった。Fig. 2は妊婦122例についての結果を図示したものであり、妊娠の進行に伴う尿中NAG活性の上昇傾向がみられた。定性反応によるタンパク陽性の妊婦尿が数例認められたが、必ずしも高いNAG活性を示したわけではなく、高いNAG活性を示した試料が総てタンパク陽性であるとは限らなかった。次に Fig. 2 に示した結果(842, 968 nmol/h/mg クレアチニンを除く)を妊娠16.0週までの群 ($n=30$)、16.1~36.6週群 ($n=72$)、37.0週以上の群 ($n=18$) に分けて各群の平均値を求めると、Fig. 3に示すようにそれぞれ 105.7 ± 45.4 、 198.2 ± 98.1 、 189.7 ± 117.8 nmol/h/mg クレアチニンとなった。対照群と妊娠 ≤ 16.0 週群との間には $p < 0.001$ で有意の差が認められ、妊娠 ≤ 16.0 週群と妊娠16.1~36.6週群間にも同様 $p < 0.001$ で有意の差が認められたが、後者と妊娠 ≥ 37.0 週群間の有意差は認められなかった。

胎盤の形成は妊娠16~20週の間完了するとされており、胎盤形成の完了の前後の群について比

較するために、妊娠16.1~36.6週群を16.1~20.0週群と20.1~36.6週群に2分してそれぞれの群の平均値を求め、対照群および妊娠 ≤ 16.0 週群のそれらを合わせて図示した (Fig. 4)。

Fig. 4 にみられるように、妊娠 ≤ 16.0 週群と妊娠16.1~20.0週群との間には $p < 0.01$ で有意の差が認められた(平均値は前者で 105.7 ± 45.4 、後者で 155.0 ± 53.9 nmol/h/mg クレアチニンであった)。

妊娠16.1~20.0週と20.1~36.6週群の間にはかなりの差異が期待されたが、帰無仮説の検定により、 $p < 0.02$ で有意差を示すに止まった。なお、産後2週~4週の子供3例についての尿中NAG活性は、それぞれ 57.5 、 17.1 、 26.8 nmol/h/mg クレアチニンであった。妊婦1例について妊娠の経過に伴う尿中NAG活性の変動を Fig. 5に図示する。妊娠週数の増加に伴う尿中NAG排出の上昇がみられ、産後の尿ではNAG活性が急激に低下した。

2. Cellogel 電気泳動による NAG アイソザイム像

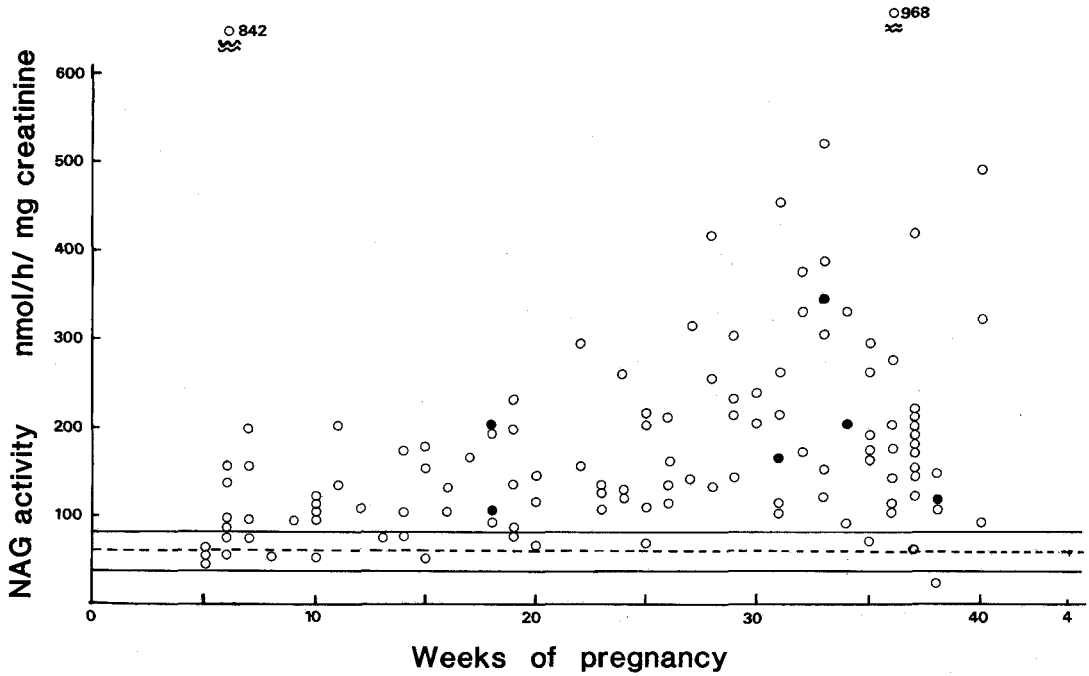


Fig. 2 Urinary NAG excretion in pregnant. ● denote proteinuria. Enzyme activities are expressed as nmol 4-methylumbelliferone released per hour.

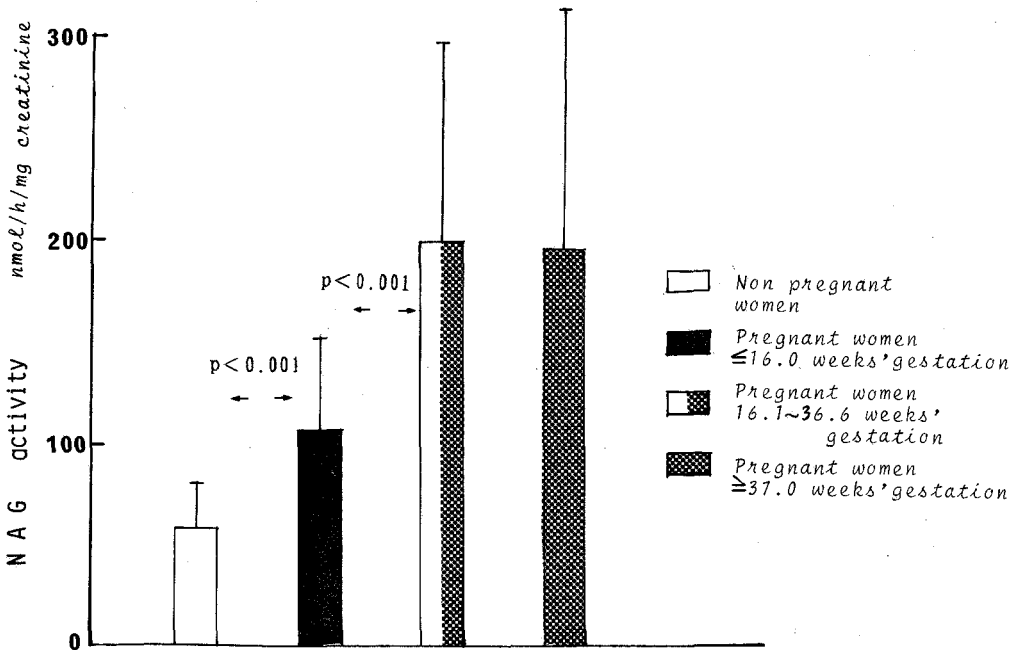


Fig. 3 Urinary NAG excretion of normal non pregnant and pregnant.

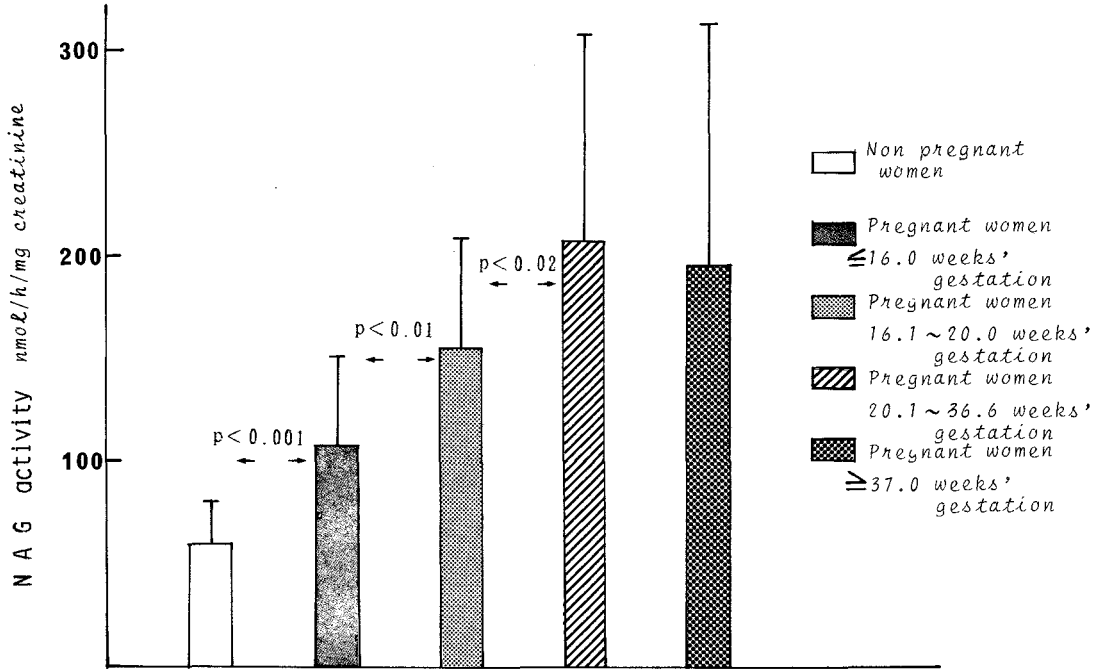


Fig. 4 Urinary NAG excretion of normal non pregnant and pregnant.

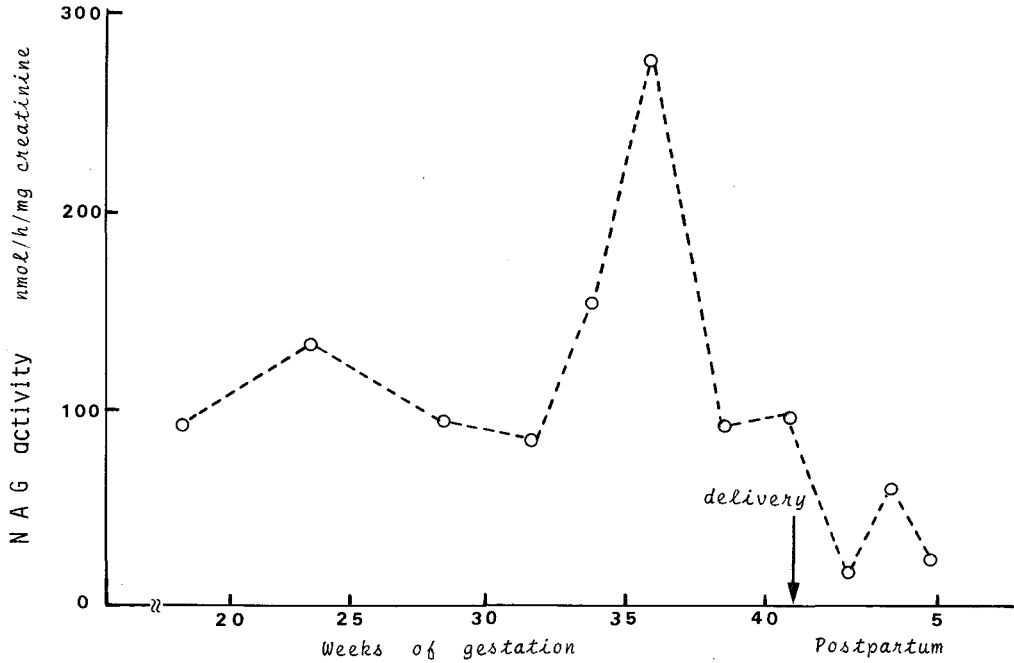
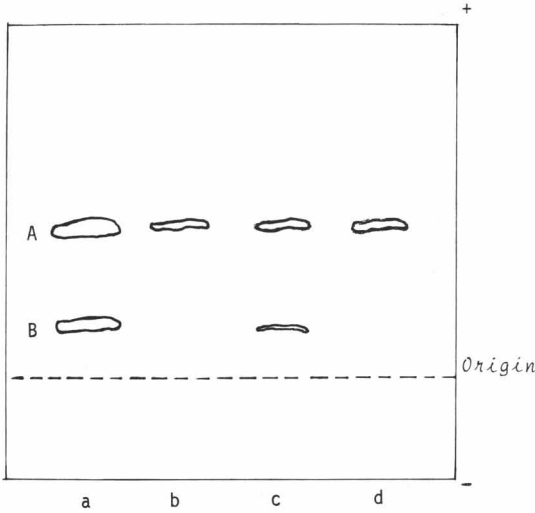


Fig. 5 Urinary NAG excretion during pregnancy and postpartum.



(a) Liver homogenate, (b) normal urine concentrate, (c) pregnant urine with high NAG activity concentrate, (d) pregnant urine with normal NAG activity concentrate

Fig. 6 Cellogel electrophoresis of NAG. Incubation time: 30min. The fluorescent spots were visualized with UV. Band A and B represent isozymes.

対照女子，妊婦の尿を前述のように限外濾過により約50倍に濃縮したものを試料として電気泳動を行うと，Fig. 6に示すように対照および対照と近似のNAG活性を示した妊婦の試料ではNAG-Aアイソザイムのみが検出されたが，高いNAG活性を示した妊婦尿ではNAG-Aおよびより塩基性のNAG-Bアイソザイムが検出された。

3. SDS-PAGE およびスラブ型 SDS-PAGE による尿中タンパクの解析

正常なNAG値を示した非妊女子，高いNAG活性を示した妊娠後半期の妊婦尿，腎機能障害を伴う異常高NAG活性を示したもの(成人，小児)の数例についての電気泳動像をFig. 7, Fig. 9に示す。Fig. 8はFig. 7の電気泳動像のデンストグラムである。Fig. 7, 9にみられるように，対照尿では低分子のタンパク帯が陽極側にほとんど認められないか，あるいは僅かに認められたに過ぎない。一方，妊婦尿では何れの例でも多くの低分子タンパク帯を陽極側に認めた。Lubega⁹⁾に従って糸球体性タンパク/尿細管タンパク比(Glomer-

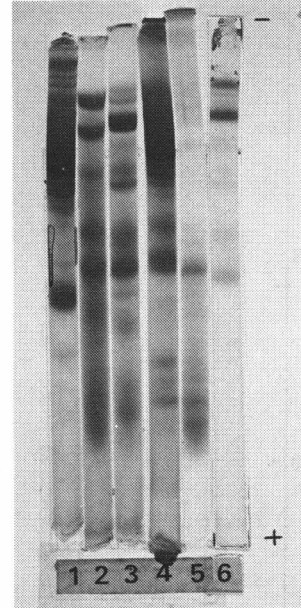


Fig. 7 Various SDS-PAGE patterns of urinary proteins. (1) human serum, (2)(3) pregnant with high NAG activity, (4)(5) patients with impaired renal function with high NAG activity, (6) non-pregnant woman with normal NAG activity.

ular tubular protein ratio) を求めると，Fig. 8の(a), (b), (d), (e)ではそれぞれ0.18, 0.19, 0.20, 0.24となり，SDS-PAGE像は尿細管性タンパク尿型を示した。

考 察

尿中に出現するNAGは腎尿細管上皮細胞のライソゾームおよび非ライソゾーム画分由来のものと考えられており，尿中の総NAG活性の上昇は腎尿細管障害の存在を示唆する¹²⁾¹³⁾。NAGは分子量が約130,000~150,000であり，かなり大きく，また血中に存在するNAGは肝において速やかに異化されるので，糸球体基底膜の透過性が亢進する病態時でも尿中には排出されないといわれている¹¹⁾。妊娠時には血漿中に本酵素活性が上昇し，A^S-型に加えてP-型アイソザイムが出現すること，妊婦5例につき尿中NAGを測定し総NAG活性の上昇をみたが，P-型アイソザイムは検出されなかったという¹¹⁾。今回，著者らは122例の妊婦尿につき，妊娠週数別にNAG活性を測定した結

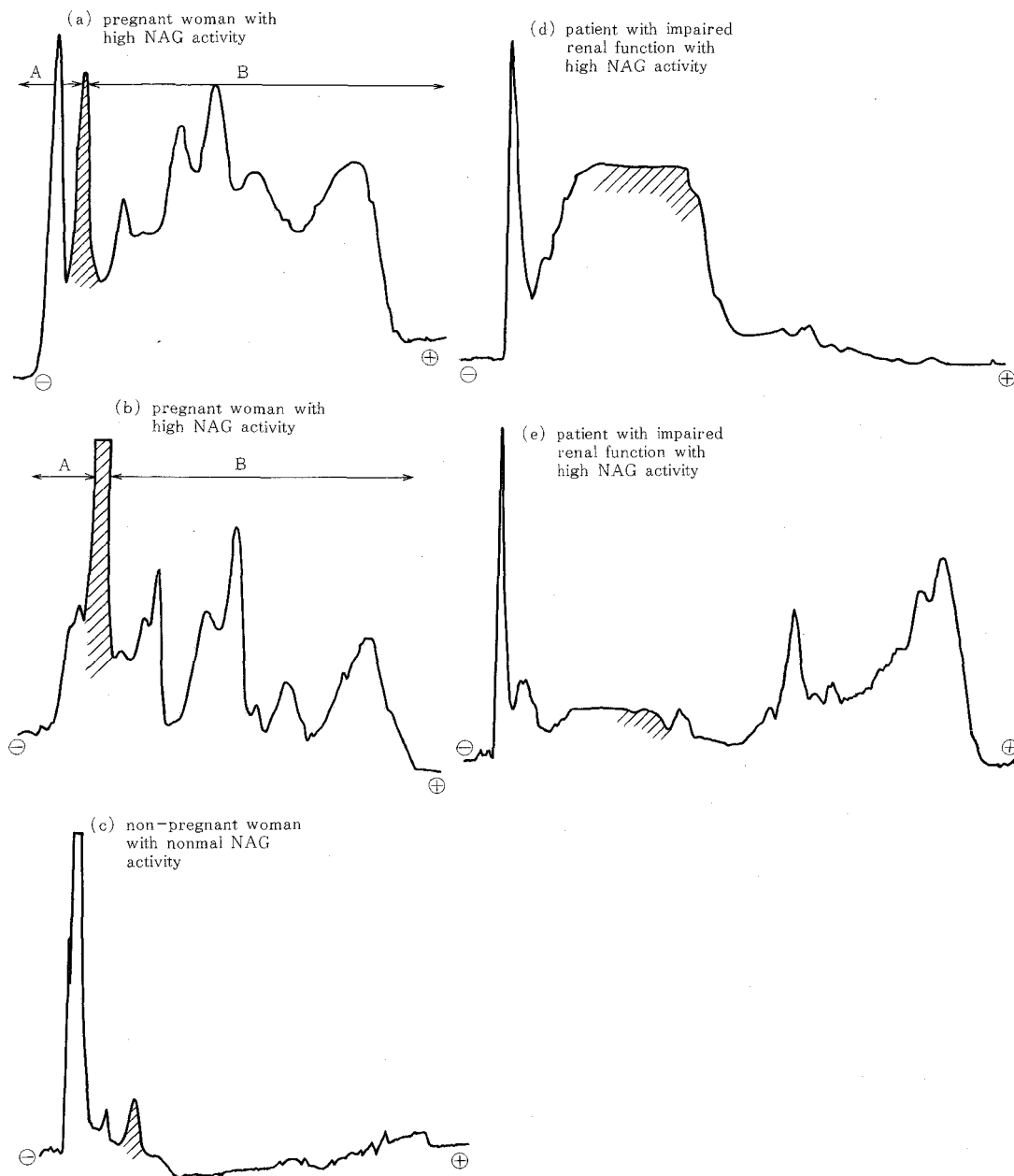


Fig. 8 Densitometric sketches of scans for various SDS-PAGE patterns of urinary proteins. The ratio of A : B depicts the glomerular tubular protein ratio according to Lubega⁹⁾. Hatched area represents albumin band.

果を、対照群から得られた結果と比較した。対照群の値は 59.9 ± 21 nmol/h/mg クレアチニンであり、Tucker らの報告⁴⁾とほぼ同じであった。妊娠初期より妊娠36.6週までは妊娠経過に伴う尿中 NAG 活性の有意な上昇がみられたが、37.0週以

降はほとんど変化せず、出産後は急激に下降して対照群とほぼ同じ値 (57.5, 17.1, 26.8 nmol/h/mg クレアチニン) を示した。妊娠時には腎血流量、糸球体濾過値の増加 (妊娠末期には40%にもおよぶ) があり、腎尿細管再吸収も増加した糸球

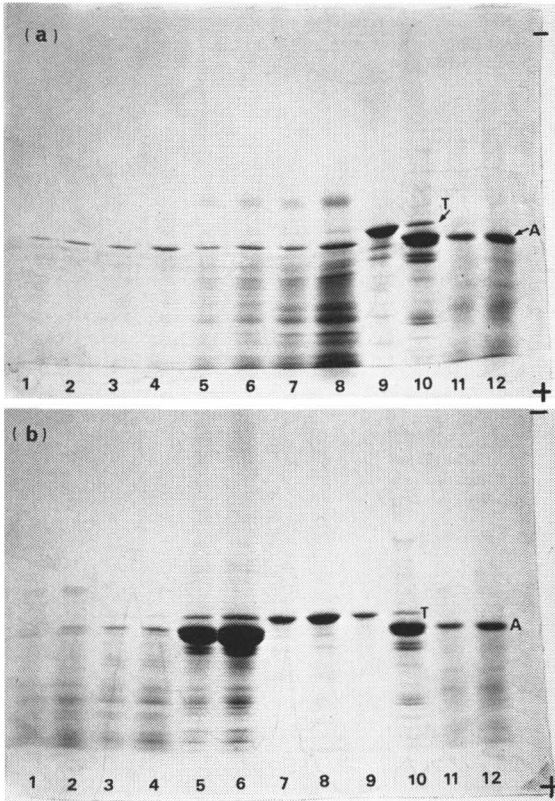


Fig. 9 Various patterns of proteins in human urine using slab gradient gel electrophoresis. A and T bands show albumin and transferrin respectively. (a) 1~4, normal non-pregnant subjects; 5~8, pregnant subjects with high NAG activity; 9, transferrin; 10, human serum; 11, 12, bovine serum albumin. (b) 1~4, pregnant subjects with high NAG activity; 5~8, patients with impaired renal function with high NAG activity; 9, transferrin; 10, human serum; 11, 12, bovine serum albumin.

体濾過値を代償するといわれているが、今回得られた妊娠中期、後期の尿中のNAG活性値は対照群の2~3倍強を示しているの、何らかの原因による尿細管上皮細胞の障害が考えられる。

一方、ポリアクリルアミドゲルを支持体として2種類の電気泳動を行なったところ、妊婦尿では、アルブミン(分子量66,000)よりも低分子のタンパク帯が陽極側に多数出現し、陰極側にはトランスフェリン、アルブミン2量体などもみられた(Fig. 7, 9)。これらはLubegaら⁸⁾のいう糸球体性

タンパクであり、糸球体基底膜の透過性の上昇を思わせるが、糸球体性タンパク/尿細管性タンパク比を求めると、0.18, 0.19となり、尿細管性タンパク尿型を示し(Fig. 8)、尿細管の再吸収の低下ないしは機能障害を示唆する結果が得られた。

さらに、対照5例、妊婦13例について尿中の α_1 -ミクログロブリンおよび β_2 -ミクログロブリンを酵素免疫法により測定したところ妊娠の進行に伴う増加がみられたが、このような分子量4万以下の低分子のタンパクの排出の増加は尿細管の再吸収能の低下を反映するものであり、現在検討中である。

尿中のNAGにはA型とB型の主なアイソザイムが存在し、正常尿では総NAG活性の約90%がA型(I型をも含めて)でありB型は極く僅かであり、B型アイソザイムの増加は腎障害を反映するという^{11,12)}。pIが5.4であるA型と7.9であるB型の両アイソザイムの分画はDEAE-支持体を用いて0~0.5M NaClの濃度勾配による溶出を行なえば比較的容易に実施できるが¹⁾、今回は定性的にCellogel電気泳動により妊婦では対照に比し、B型アイソザイムの尿中への排出の増加がみられた。

以上の結果から、妊娠時には一過性の準臨床的(subclinical)な腎尿細管上皮細胞障害が起こるものと考えられる。妊娠時にはプロゲステロン、エストリオールなど種々のホルモンの産生分泌が急増することから、原因の1つとなる可能性もありうるだろう。

なお、今回の実験に供した122例の妊婦尿のうちでNAG活性が300 nmol/h/mgクレアチニン以上の値を示した例は16例であり、うち2例は軽症の糖尿病で330.9, 418.2 nmol/h/mgクレアチニンであった。後者の例では5.068gの児を分娩している。その他、2例が持記すべき所見が認められなかったが、尿中NAG活性値が331.4, 306.1 nmol/h/mgクレアチニンであり、それぞれ3,878 g, 3,972gの児を分娩した。一方、3例に未熟児の分娩がみられた。842.1および968.1 nmol/h/mgクレアチニンという高NAG活性を示した例は何れも尿中のタンパク反応は陰性であったが、前者

は腎炎の合併症を伴い、後者は高年初産婦で子宮筋腫を合併していた。妊娠29.5週で303.4 nmol/h/mg クレアチンを示した例は NAG 測定当時は浮腫が認められなかったが、33.5週より浮腫が現われ、さらに37.5週では尿中タンパク反応を陽性を示した。今回の実験で得られた結果から、尿中の NAG 活性が300 nmol/h/mg クレアチン以上の場合には何等かの臨床所見が認められる頻度が高いことが観察されたが、今後この点についても追求していく予定である。

結 語

種々の妊娠週数の妊婦122例、褥婦3例、対照非妊女子50例の早朝尿につき、NAG 活性の測定と SDS-PAGE によるタンパク分画像を調べて次の結果を得た。

1) 対照非妊女子の尿中 NAG 活性は 59.9 ± 21 nmol/h/mg クレアチンであり、Cetlogel 電気泳動により NAG-A アイソザイムのみを認めた。

2) 妊婦122例を妊娠16.0週以下の群 ($n=31$)、16.1~36.6週群 ($n=73$)、37.0週以上の群 ($n=18$) の3群に分けて尿中 NAG 活性を測定した。異常な高値を示した2例を除いた平均値はそれぞれ 105.7 ± 45.4 , 198.2 ± 98.1 , 195 ± 119.0 nmol/h/mg クレアチンであり、対照群との間に有意の差が認められた。Cetlogel 電気泳動により、高 NAG 活性を示した例では NAG-A アイソザイムの他に NAG-B アイソザイムも認められた。褥婦では対照に準ずる結果が得られた。

3) SDS-PAGE (ディスク法およびスラブ型濃度勾配ゲル法) によるタンパク泳動像は、対照例および妊娠前期の例ではアルブミン帯を主成分とし、他のタンパク画分は極く僅かであった。妊娠後期の尿では、アルブミンの他に、より低分子の多数のタンパク帯が認められ尿細管性タンパク尿型に準ずる像が得られた。

4) 以上の結果から、妊娠時には一過性の sub-clinical な腎尿細管上皮細胞の機能障害の惹起が示唆される。

5) 尿中 NAG 活性が300 nmol/h/mg クレアチン以上の値を示した妊婦16例の大半が何等かの形で異常な臨床所見を示したことは興味深く、今

後この点についても追求する。

文 献

- 1) Ellis, B.G., et al.: Presence of serum and tissue forms of N-acetyl- β -glucosaminidase in urine from patients with renal disease. Clin Chim Acta 64 195~202 (1975)
- 2) Saifer, A., et al.: Identification of Tay-sachs genotypes by hexaminidase analysis of urine and tear samples. Adv Exp Med Biol 68 339~366 (1976)
- 3) Leadback, D.H. and Walker, P.G.: Studies on glucosaminidase. Biochem J 78 151~156 (1961)
- 4) Tucker, S.M., et al.: Automated assay of N-acetyl- β -glucosaminidase in normal and pathological human urine. Clin Chim Acta 62 333~339 (1975)
- 5) 降矢 燐: クレアチン・クレアチニン測定法. 臨床病理 22 32~52 (1975)
- 6) Poenal, L. and Dreyfus, J.D.: Electrophoretic study of hexaminidase. Clin Chim Acta 43 439~442 (1973)
- 7) Weber, K., et al.: Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In: Colowick and Kaplan, eds. Methods in Enzymology, Vol. 26, Academic Press, New York (1972) 3~27
- 8) Lubega, J.: Evaluation of urinary proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide disc gel electrophoresis and molecular mass analysis. Clin Chim Acta 128 151~167 (1983)
- 9) Boesken, W.H., et al.: Differentiation of proteinuric diseases by disk electrophoretic molecular weight analysis of urinary proteins. Clin Nephrol 1 311~317 (1973)
- 10) Boesken, W.H., et al.: Polymeric albumin in the urine of patients with nephrotic enzyme. Clin Nephrol 8 395~399 (1977)
- 11) Stahl, P., et al.: Clearance of lysosomal hydrolases following intravenous infusion kinetic competition experiments with β -glucuronidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase. Arch Biochem Biophys 177 594~605 (1976)
- 12) Hultberg, B., et al.: Isoenzymes of four acid hydrolases in human kidney and urine. Clin Chim Acta 52 239~243 (1974)
- 13) Tucker, S.M., et al.: Characterisation of human N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzymes as an indicator of tissue damage in disease. Clin Chim Acta 102 29~40 (1980)