

妊婦尿中の pregnancy-specific β_1 -glycoprotein (SP₁) に関する研究

三重大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 杉山陽一教授)

伊東 雅純 西山 幸男 能勢 義正
前田 一範 沢木 泰仁 今泉 博充
早川 滋彦 杉山 陽一

Study on the Properties of Pregnancy-specific β_1 -glycoprotein (SP₁) in Urines of Pregnant Women

Masazumi ITO, Yukio NISHIYAMA, Yoshimasa NOSE, Kazunori MAEDA, Yasuhito SAWAKI,

Hiromichi IMAIZUMI, Shigehiko HAYAKAWA and Youichi SUGIYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Mie University, Mie

(Director: Prof. Youichi Sugiyama)

概要 我々は今回妊婦尿中に排泄される SP₁ の性状について、その種類、分子量および免疫学的性格を検索し、血清中における SP₁ と対比し検討を行つたところ、以下の結論をえた。

- 1) 妊婦尿を硫酸アンモニウムで塩析し、さらにそれを生理食塩水で透析して濃縮尿を作製した。
 - 2) 妊婦濃縮尿で抗 SP₁ 血清を用いた Ouchterlony 法を行うと2本の沈降線を認め、また SRID を行うと2重沈降輪が認められた。
 - 3) 妊婦濃縮尿を用いて Sephadex G-150 gel filtration を行い、各 fraction を抗 SP₁ 血清を用いた SRID で観察すると、fraction No. 58 は明瞭な1重沈降輪であり、fraction No. 61 は内側が明瞭で外側がうすい2重沈降輪であり、fraction No. 66 ではうすい1重沈降輪を認めた。
 - 4) fraction No. 58 と fraction No. 66 とを等量混合したもので抗 SP₁ 血清を用いた SRID を行うと、fraction No. 61 と同様な2重沈降輪を形成した。
 - 5) 抗 SP₁ 血清を用いた Ouchterlony 法で fraction No. 58 は血清 SP₁ と融合を示し、fraction No. 66 と spur を形成した。
 - 6) 分子量を測定すると fraction No. 58 は血清と同じ110,000で、fraction No. 66 は75,000であつた。
 - 7) 免疫電気泳動を行うと fraction No. 58, No. 66 ともに血清と同じ部位にあり、 β_1 分画に存在した。
- 妊婦尿中には2種類の SP₁ の存在することが判明し、我々は No. 58 における SP₁ fraction を SP₁-A、No. 66 における SP₁ fraction を SP₁-B と仮称した。

Synopsis The properties of pregnancy-specific β_1 -glycoprotein (SP₁) were examined in urines of pregnant women. Two cross-reactive substances with rabbit antisera to SP₁ were observed in the urines of pregnant woman.

By agar gel immunodiffusion method two lines were formed and by single radial immunodiffusion (SRID) double rings were detected in concentrated pregnancy urines. The immunoprecipitate of the inner ring in SRID was distinct, while that of the outer ring was rather indistinct, compared with the former. The substance to make inner ring (tentatively called SP₁-A) was found to be the same as SP₁ in pregnant serum. The SP₁-like substance to make outer ring (tentatively called SP₁-B) appeared to be specific to pregnant urine.

Although the precipitation lines of urinary SP₁ were slightly different from that of serum SP₁, both SP₁-A and SP₁-B were migrated towards the β_1 -globulin region in immunoelectrophoresis. The molecular weights were estimated by gel filtration method and calculated to be 110,000 for SP₁-A and 75,000 for SP₁-B, respectively.

Key word: Pregnancy-specific β_1 -glycoprotein (SP₁)

緒 言

妊婦血清中に特異的に出現する糖蛋白として、Bohn⁶⁾ (1971) の発表した pregnancy-specific β_1 glycoprotein (以下 SP_1 と略す) は、その血清濃度が胎盤機能や胎児発育の指標になり得る¹⁾³⁾⁹⁾ として注目されており、近年では SP_1 の radioimmunoassay の完成とともに切迫流産、絨毛性疾患などに際しての種々の臨床成績が報告されつつある²⁾⁸⁾。しかしながら SP_1 の生物学的作用と意義については、母体内において妊娠時に急増する各種 hormone と結合性を示すという成績⁴⁾ を除くとなお全く不明であり、また胎盤の syncytiotrophoblast で産生された SP_1 が、母体内でいかなる経路を経て代謝されているかについてもほとんど分っていない。

そこで我々は SP_1 の体内における代謝経路を追求する研究の一環として、尿中への排泄状況に注目し、尿中における SP_1 の性状について、その種類、分子量および免疫学的性格を検索し、血清中における SP_1 と対比し検討を加えたので報告する。

研究材料及び研究方法

1. 研究材料

妊娠38週の妊婦5名より得た各々750mlの尿(トルエンを数滴添加の24時間蓄尿)、およびそれぞれ同一妊婦の肘静脈より採取した血清10mlを研究材料とした。

2. 研究方法

1) 濃縮尿の作製方法

妊婦尿750mlを遠心分離(5,000r.p.m. 15min.)して沈渣を除去し、上清に硫酸アンモニウム285gを加え、50%飽和硫酸アンモニウム溶液として、一昼夜氷室(2~4°C)に放置して蛋白を塩析した。この溶液を再度遠心分離(1,000r.p.m. 4°C 20min.)することにより尿蛋白沈殿物を取り出し、それを生理食塩水20mlで溶出させ、透析膜を用いて生理食塩水で十分に透析した。この透析した溶液中の沈殿物は遠心分離(3,000r.p.m. 20min.)によつて除去し、上清に生理食塩水を加え37mlの濃縮尿が得られるように工夫した。

同一操作を他の4例の尿についても行つた。

2) Ouchterlony 法および一元免疫拡散板法による濃縮尿中 SP_1 の検出方法

Ouchterlony 法では厚さ1.5mm 1.2% agarose gel 寒天平板 (Barbital buffer pH 8.6) を作製し、直径2.0mmの小孔を間隔7mmであけ、一方に濃縮尿、他方に抗 SP_1 血清を入れた。これを恒湿槽内で約24時間放置反応させ、沈降線の出現を観察した。

一元免疫拡散板法(以下 SRID と略す)では1.2% agarose gel 20ml に対して抗 SP_1 血清200 μ lを加え、厚さ1mmの寒天平板を作製し、直径2.5mmの小孔をあけて6 μ lの濃縮尿を滴下し、Ouchterlony 法と同様に反応させ、その沈降輪の直径を測定した。

測定に際しては、寒天平板を生理食塩水中に約1日浸し除蛋白を行い、30分間水洗を行い、0.1%タンニン酸溶液に30分浸してから沈降輪を観察測定した。

なお、抗血清は Beringwerke A.G. 製の抗 SP_1 血清を使用した。

3) 濃縮尿の gel filtration 法による SP_1 の種類の検討方法

濃縮尿4.5mlを Sephadex G-150 を詰めた直径2.5cm、長さ100cmのcolumnに添加し、0.2M NaCl+0.05M Tris HCl buffer (pH 8.0) を用いて流速17ml/hで gel filtration を行い、fraction collector を用いて1-tube あたり120滴(4.95ml)で採取した。各 tube の吸光度を O.D. 280nm で測定したうへ、 SP_1 の存在部位を Ouchterlony 法および SRID で観察した。

各 SRID で SP_1 の存在の確認された各 tube は、コロジオン膜を用いて10倍に濃縮したうへ、以下の SP_1 の種類の検定に用いた。

種類の検定については各々の濃縮された fraction tube の溶液を用いて SRID による沈降輪の出方、すなわち、大きさあるいは2重沈降輪および1重沈降輪などの出現の仕方、また Ouchterlony 法による血清 SP_1 との沈降線の結びつきの有無などにより判定した。

4) 濃縮尿中 SP_1 の分子量の検定方法

Andrews⁵⁾ の gel filtration による蛋白分子量測定法により尿中 SP_1 の分子量を測定した. すなわち Protein molecular weight marker として Schwarz-MANN 社の Apo-Ferritin (分子量 480,000), Gamma globulin (分子量160,000), Ovalbumin (分子量45,000), Myoglobin (分子量 17,800) の4種を用意し, buffer 4.5ml に溶解したうえ尿と同じ column で gel filtration を行い, 各蛋白の吸光度が peak 時の流出量を求めた. 片側対数グラフ用紙の縦軸に分子量, 横軸に流出量を取り, 4種の標準蛋白の流出最高点を plot し標準曲線を作成した. この曲線上に, 濃縮尿の SP_1 濃度の peak 時の液量を plot することにより, 分子量を算定した.

また, 対照として妊婦血清についても濃縮尿と同じ条件で column に添加して分子量を算定した.

5) 免疫電気泳動による濃縮尿中 SP_1 と血清 SP_1 の比較方法

濃縮尿と妊婦血清を対比して通常の免疫電気泳動を行い (barbital buffer pH 8.6 イオン強度 0.05, 100v. 2h), 沈降線の出現部位および出現の仕方を観察した.

研究成績

1) 濃縮尿の作製

妊婦尿 750ml を 50%飽和硫酸アンモニウムで処理したことにより, 尿中の蛋白成分を濃縮した状態の溶液37ml が得られた. そこで, これを妊婦濃縮尿として以下の実験に用いた.

2) Ouchterlony 法および一元免疫拡散板法による濃縮尿中 SP_1 の検出

妊婦濃縮尿を妊婦血清と対比して Ouchterlony 法で抗 SP_1 血清と反応させた結果は, 図1に示すように血清では沈降線が1本であるのに対して, 濃縮尿では2本の沈降線が認められた. 一方妊婦濃縮尿を妊婦血清と対比して抗 SP_1 血清を用いて SRID で反応させると, 図2に示すように血清では強い沈降輪が1重に認められるのみであるが, 尿では2重の沈降輪が認められ, その内

図1 Relation of urinary and serum SP_1 by Ouchterlony method. No. 58 and No. 66 are fractions flowed from column of concentrated pregnant urine.

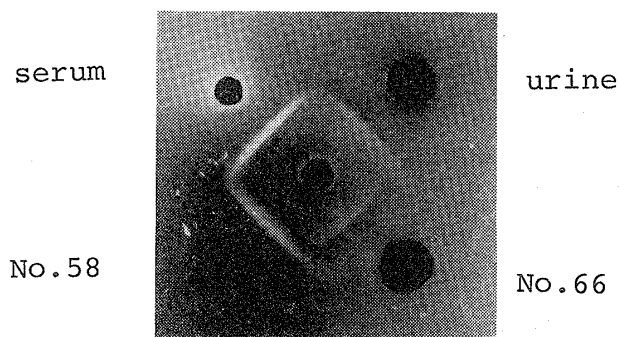
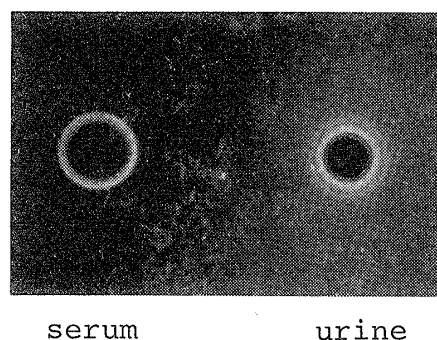


図2 SP_1 of pregnant urine and serum by SRID



側のものは明瞭な沈降輪であり, 外側のものはやややすい沈降輪であつた. 他の4例の濃縮尿についても同様の成績を得た.

3) 濃縮尿中 SP_1 の gel filtration 法による種類に関する検討成績

(a) 濃縮尿の gel filtration 法による検討成績
濃縮尿4.5ml を Sephadex G-150 の column に流し, 各 fraction の吸光度を O.D. 280nm で測

図3 Urinary SP_1 concentration of fraction by SRID compared with gel filtration pattern of pregnant urine

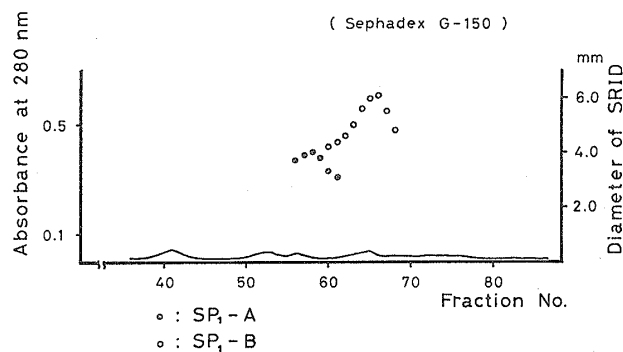
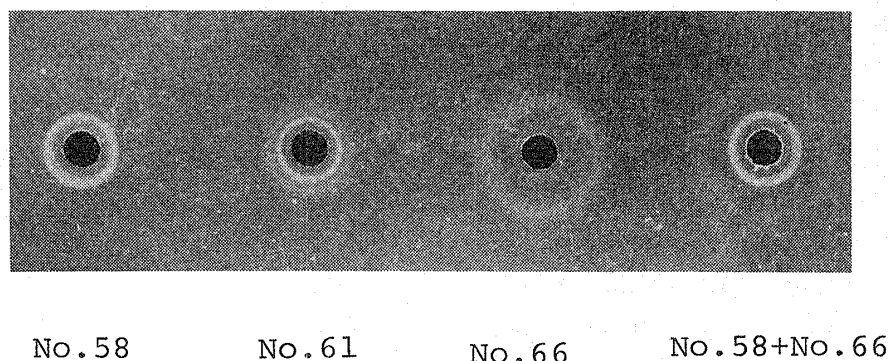
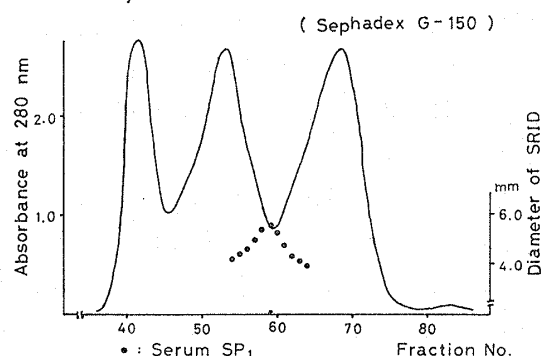


図4 SP_1 of urinary G-150 fraction by SRID

定したところ、塩類部分では著明な peak を認めるものの、図3に示すごとくそれまでの所では特に peak は認めなかつた。この各 fraction について SP_1 の出現部位を SRID で検索すると、はつきりとした沈降輪をもつものが fraction No. 56 (以下 No. 56 と呼ぶ) より No. 61 まで出現し、No. 58 で最高濃度を示した。次にうすい沈降輪をもつものが No. 60 より No. 68 まで出現し、No. 66 で最高濃度を示した。したがって No. 60, No. 61 において、図4に示すごとく沈降輪は濃縮尿で見られたのと同じ状態の2重沈降輪であつた。

一方、妊婦血清について同一条件で行つた成績では塩類部分以外に図5に示すように、蛋白部

図5 Gel filtration pattern of pregnant serum compared with serum SP_1 concentration of each fraction by SRID

分に3つの peak を認めた。各 fraction について SP_1 の出現部位を SRID で調べると、 SP_1 は No. 54 より出現し始め No. 59 で最高濃度を示し、以後漸減して No. 65 以上では検出されなかつた。

つた。

(b) 濃縮尿中 SP_1 の一元免疫拡散板法による検討成績

濃縮尿を gel filtration して得た各 fraction のうち No. 58, No. 61, No. 66 をコロジオン膜を使って10倍に濃縮し、SRID で観察した。その結果は図4に示すように No. 58 は明瞭な1重沈降輪を示し、No. 61 は2重沈降輪を示した。No. 61 の内側の沈降輪は No. 58 より小さいが、明瞭な沈降輪であり、外側の沈降輪はやや不明瞭な沈降輪であつた。また、No. 66 は No. 61 の外側の沈降輪と同様にうすいが大きい1重沈降輪として観察された。

さらに、No. 58 と No. 66 を小孔に $6\mu l$ ずつ等量に入れて実験を行うと、図4右端に示すような2重沈降輪がみられた。その内側の沈降輪は No. 58 とほぼ同じ直径で濃い明瞭な沈降輪であり、外側の沈降輪は No. 66 とほぼ同じ直径でうすい沈降輪であつた。

(c) 濃縮尿中 SP_1 の Ouchterlony 法による種類に関する検討成績

前項の成績により分子量の異なる SP_1 fraction が No. 58 と No. 66 に分かれて存在し、No. 61 にはその両者が混在していると考えられるので、この検体について Ouchterlony 法を用いて検討し、妊婦血清中にみられる SP_1 との関連をみた。

図1に示すように寒天平板の4つの小孔にそれぞれ No. 58, No. 66, 濃縮尿および妊婦血清を添

加し、中央の小孔に抗 SP₁ 血清を満した。その結果 No. 58, No. 66 および妊婦血清と抗 SP₁ 血清との間には1本の沈降線ができ、濃縮尿と抗 SP₁ 血清との間には2本の沈降線が認められた。抗 SP₁ 血清と濃縮尿との間に出来た2本の沈降線のうち抗原(検体)側の沈降線は、抗 SP₁ 血清と妊婦血清との間に出来た沈降線および No. 58 との間に出来た沈降線と融合像を示した。また、抗 SP₁ 血清と濃縮尿との間に出来た2本の沈降線のうち抗体(抗 SP₁ 血清)側の沈降線は、抗 SP₁ 血清と No. 66 との間に出来た沈降線と融合像を示した。さらにそれらは抗 SP₁ 血清と No. 58 との間に出来た沈降線と spur を形成した。

以上の実験成績から No. 58 は血清中に存在する SP₁ と同一物質であり、No. 66 は尿中に特有な SP₁ fraction であると判明した。そこで我々は No. 58 における SP₁ fraction を SP₁-A, No. 66 における SP₁ fraction を SP₁-B と仮称することとした。

4) 濃縮尿中 SP₁ の分子量に関する検討成績
尿中の SP₁-A, SP₁-B および血清中 SP₁ の分子量を Andrews⁵⁾ の方法で求めた。濃縮尿5例について流出量の平均をとると、SP₁-A は289.7ml, SP₁-B は327.3ml であり、さらに妊婦血清5例の平均をみると287.4ml で peak を示した。その値を標準曲線に入れ、それぞれの分子量を求めると、図6に示すごとく尿中 SP₁-A は110,000, 尿中 SP₁-B は75,000, また血清 SP₁ は110,000 であつた。

5) 免疫電気泳動法による濃縮尿中 SP₁ と血清中 SP₁ に関する比較検討成績

図7に示すように濃縮尿においてみられる2本の SP₁ の沈降線は同じ部位に泳動され、また血清中にみられる1本の SP₁ の沈降線の部位よりやや陰極寄りであるが、ほぼ同じ位置にある。また、免疫電気泳動は Ouchterlony 法に電気泳動を組み合わせたものであるから、拡散による位置関係は Ouchterlony 法の時と同じである。図7を図1と比較してみると、図7において抗原(濃

図6 Molecular weight estimation of each SP₁ by gel filtration of sephadex G-150

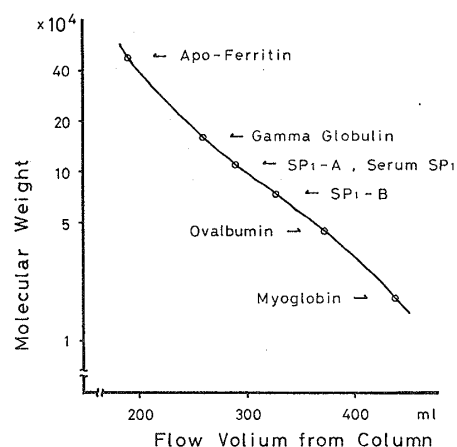
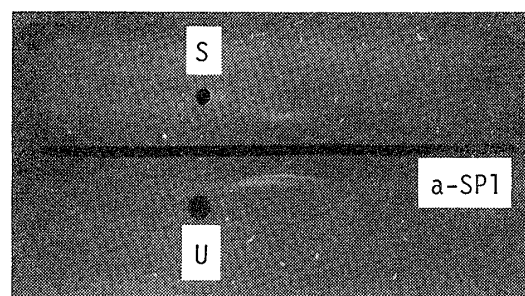


図7 Immunoelectrophoresis of pregnant concentrated urine and serum by anti-SP₁



S : serum U : urine a-SP₁ : anti-SP₁

縮尿)に近い明瞭な沈降線が SP₁-A で、その外側のうすい沈降線が SP₁-B に相当すると考えられる。血清 SP₁ が β_1 分画であることにより、濃縮尿でできた2本の沈降線つまり SP₁-A および SP₁-B は β_1 分画に存在することを示した。

総括ならびに考案

SP₁ は妊婦血清中に出現する妊娠特異蛋白として1971年に Bohn⁶⁾ により発見、命名された糖蛋白であるが、この蛋白は妊婦尿にも微量に存在することが Bohn 自身により指摘されていた。しかしながら、尿中における SP₁ の量的動態など詳細については今なお不明な点が多い。教室の西山ら³⁾は1977年に SRID を用いた測定実験において、原尿では妊娠33週以後に微量に検出していることを報告したものの、その測定時に一部の検体において、うすい2重沈降輪を認めており、今後の問題点としていた。

そこで我々は、 SP_1 の母体内における代謝過程を追う上からも、尿中における SP_1 の排泄動態を知る必要性を感じ、あらたに濃縮尿を用いて検討を加えた。

濃縮尿としては、濃縮操作そのものによる影響をみる目的で原尿を直接凍結乾燥したものと、今一つは50%飽和硫酸アンモニウムによる一般的な蛋白濃縮法にしたがつたものの2種類を用意した上で、それらと市販の抗 SP_1 血清とを反応させた。その結果は両濃縮尿とも Ouchterlony 法で明らかな2本の沈降線を認めることができ、また SRID では2重沈降輪を認めることができた。Ouchterlony 法によつて2本の沈降線を認めるということは、尿中の SP_1 には抗 SP_1 血清と反応する共通抗原を持つ2種類の SP_1 が存在することを意味している。すなわち、そのうちの1種類は血清 SP_1 と沈降線の融合が認められるので、尿中に存在する2種類のうち1種類は血清中のものと同一のものと考えられ、残りの1種類は尿中に特有なものであると考えられた。

一方、SRID によつて2重沈降輪を示すことも、分子量の異なる2種類の SP_1 の存在を示唆するものである。一般に SRID で2重沈降輪を示す場合注意すべき事項として、(1) lipoprotein などは抗体がなくても沈降輪を作ることがあること、(2) 市販の抗血清自身に抗 SP_1 以外の非特異抗体が含まれているかもしれない、の2点がある。まず(1)の点については、反応終了後除蛋白の目的で寒天平板全体を生理食塩水中に入れてイオン強度を上げてやると、lipoprotein の沈降輪は消失することが知られている。我々も本実験において寒天平板を生理食塩水中に24時間放置したが、2重沈降輪は消失しないことを確認している。次に(2)の点については、健康男子や非妊娠婦人の濃縮尿および血清を用いて同様に検討したが、それらの場合沈降輪が形成されず、一方妊婦血清においては1重の沈降輪が形成されており、以上の成績より抗 SP_1 以外の非特異抗体は存在しないと考えられた。

そこで具体的に gel filtration による尿中の

SP_1 の分析を試みたところ、gel filtration で最初に溶出されてくる分子量の大きい SP_1 (これを SP_1 -A と仮称する) は、Ouchterlony 法でみると血清 SP_1 と同一物質であり、遅く溶出される分子量の小さい SP_1 (これを SP_1 -B と仮称する) は尿中に特有なものであると判明した。これら尿中 SP_1 の分子量を調べると、 SP_1 -A は110,000で、 SP_1 -B は75,000という結果が得られた。この点については近年 Bohn⁷⁾ が報告している尿中特有の SP_1 の分子量は65,000であるとする成績とほぼ一致しており、Towler et al.¹⁰⁾ の指摘する尿中における variant type SP_1 を裏づける一つの事実が得られたこととなる。

この2種類の SP_1 が SRID における2重沈降輪においてそれぞれの位置を占めるかという点について、我々は今回の実験において外側のうすい沈降輪が尿中に特有なものであると結論した。その理由は、一般に分子量の小さい蛋白ほど寒天中における拡散速度が速いこと、および gel filtration により区分された SP_1 -B と SP_1 -A とを混じて SRID を行つた実験による成績などによつた。

尿中における SP_1 -A および SP_1 -B の存在意義に関しては、 SP_1 -A は血清中の SP_1 の一部が腎よりそのまま排泄されたと考えられるが、 SP_1 -B については分子量がやや小さいということから推察すると、血清中の SP_1 が体内のどこかで代謝された結果、分子構造が一部切断された形で排泄される代謝産物とも考えることができる。しかし、それらの詳細については今後の検索が必要と思われる。

稿を終るにあたり本研究に対して御懇篤なる御指導をいただいた三重大学医学部法医学教室石本剛一助教授に深謝致します。

なお本論文の内容の一部は第63回東海産科婦人科学会および第32回日本産科婦人科学会学術講演会において報告した。

文 献

1. 前田一範, 西山幸男, 能勢義正, 山口博司, 杉山陽一: SP_1 (β_1 - SP_1 -glycoprotein) および SP_2 (α_2 AP-glycoprotein) 濃度と胎児発育につ

- いて、産婦の世界, 30:1168, 1978.
2. 前田一範: 妊娠性蛋白 SP₁ の Radioimmunoassay 法の検討と本法にもとづく低濃度域の測定成績; 日内分泌誌投稿中.
 3. 西山幸男, 能勢義正, 山口博司, 二井 栄, 杉山陽一: 妊婦血清および尿中の SP₁ (β_1 -SP₁-glycoprotein), SP₃ (α_2 -AP-glycoprotein) および HPL の消長と胎盤機能に関する研究. 日産婦誌, 29:593, 1977.
 4. 西山幸男, 能勢義正, 山口博司, 前田一範, 村田和平, 梅川宏司, 山本稔彦, 池田洋子, 杉山陽一: 妊娠性蛋白 SP₁ (β_1 -SP₁-glycoprotein) および SP₃ (α_2 -AP-glycoprotein) の分離精製とその基礎的, 臨床的研究. 日産婦誌, 30:1005, 1978.
 5. Andrews, P.: Estimation of the molecular weight of protein by sephadex gel filtration. Biochem. J., 91: 222, 1964.
 6. Bohn, H.: Detection and characterization of pregnancy protein in the human placenta and their quantitative immunochemical determination in sera from pregnant women. Arch. Gynäk., 210: 440, 1971.
 7. Bohn, H. und Kraus, W.: Isolierung und Charakterisierung des schwangerschafts-spezifischen β_1 -Glykoproteins aus dem Urin schwangeren Frauen. Arch. Gynäk., 223: 33, 1977.
 8. Seppälä, M., Rutanen, E.-M., Heikinheimo, M., Jalanko, H. and Engvall, E.: Detection of trophoblast tumor activity by pregnancy-specific β_1 -glycoprotein (SP₁). Scand. J. Clin. Lab. Invest., 37: 537, 1977.
 9. Tatra, G., Breitenecker, G. and Gruber, W.: Serum concentration of pregnancy specific β_1 -glycoprotein (SP₁) in normal and pathological pregnancies. Arch. Gynäk., 217: 383, 1974.
 10. Towler, C.M., Robyn G. Glover and Horne, C.H.W.: Problems encountered in the measurement of pregnancy-specific β_1 -glycoprotein. Clinica. Chimica. Act., 87: 289, 1978.

(No. 4799 昭55・11・10受付)