

人胎盤由来の腎炎惹起性糖蛋白について (胎盤よりの抽出法)

奈良県立医科大学産婦人科学教室

飯岡 秀晃 森山 郁子 一條 元彦

国立病院医療センター臨床研究部

柴田 整 一

Nephritogenic Glycoprotein Isolated from Human Placenta (Methods of Isolation from Placenta)

Hideaki IIOKA, Ikuko MORIYAMA and Motohiko ICHIJO

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara

Seiichi SHIBATA

Clinical Research Institute, National Medical Center, Tokyo

概要 1) 人胎盤より人腎(糸球体基底膜)由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の物質の抽出に成功した。抽出に用いた手段は、腎より抽出する場合と同様に、mesh操作で終末絨毛を得、更に超音波処理して絨毛基底膜を分離し、次いで、トリプシン酵素消化で可溶化し、更に可溶化試料をプロナーゼ酵素消化した。

2) 人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白、並びに、今回胎盤より抽出した物質、各々に対する両抗血清を用いて、Ouchterlony法によるgel内二重拡散法を行った結果、人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白、並びに胎盤より抽出した物質との間に唯一本の共通の沈降線が形成された。

3) 今回胎盤より抽出した物質の糖組成、並びにアミノ酸組成について調べた結果、糖組成ではグルコースを多く含むことが判明し、またアミノ酸組成では、コラーゲン成分を欠くことが判明した。

4) 絨毛基底膜をトリプシン酵素消化し可溶化されたサンプル、並びに更にトリプシン可溶化サンプルをプロナーゼで消化を進めたサンプルの両者をBio-Gel P200カラムクロマトグラフィーを用いて分画した結果、人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白活性はvoid分画に存在した。

Synopsis In our experiments, we succeeded in obtaining from human placenta a substance comparable to human renal nephritogenic glycoprotein prepared from GBM (glomerular basement membrane).

The procedure was quite similar to that for preparation from the kidney. At first, placental terminal villi were isolated by the successive use of three metal sieves. Then trophoblast basement membranes (TrBM) were isolated from placental terminal villi by ultrasonic disruption. Finally TrBM were made soluble by trypsin digestion, after which they were further digested by pronase.

Ouchterlony gel diffusion demonstrated the existence of a common precipitin line between antiserum to human renal nephritogenic glycoprotein prepared from GBM and antiserum to the sample prepared from human placental TrBM, and human renal nephritogenic glycoprotein prepared from GBM and the sample prepared from human placental TrBM.

The monosaccharide composition of the sample prepared from human placental TrBM was rich in glucose (glucose, galactose and mannoside in the ratio of 1.00:0.74:1.00), and the amino acid composition of the sample contained no collagenous components.

As a result of fractionation of the sample prepared from human placental TrBM by Bio Gel P200 column chromatography, the activity of renal nephritogenic glycoprotein was found within the void fraction.

Key words: Placenta • Trophoblast basement membrane • Nephritogenic glycoprotein • Kidney • Toxemia

緒 言

妊娠中毒症の病因は未だ不明である。しかし、その主病変は腎にあり、又、高血圧、浮腫、蛋白

尿といった主症状も腎の機能障害と密接に関係している。今回、我々は、腎障害と妊娠中毒症の関連という見地から、柴田らが発見した腎由来の腎

炎惹起性糖蛋白¹⁰⁾に注目した。本物質は腎糸球体基底膜を酵素消化で可溶化し更に精製した物質であり、動物実験で慢性腎炎、萎縮腎に進行する腎炎を惹き起こすことが判明している¹⁰⁾。又、本物質は、腎のみならず、肺、大動脈、肝等の他臓器にも広く分布することが知られており¹¹⁾、さらに本物質は、S.L.E., 膜性腎炎等の腎疾患をもつ患者の尿中にも存在することも知られている¹³⁾¹⁴⁾。また、本物質は、ラット、イヌ、ヒト等種差を超え存在していることも判明している¹²⁾。今回、我々は、人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の物質を胎盤より抽出することを試み成功したのでここに報告する。

実験方法

1) 終末絨毛の分離

実験材料としてヒト妊娠満期分娩直後の正常胎盤を用いた。最初に胎盤から脱落膜、卵膜、臍帯を除き絨毛組織のみとした。次にこの絨毛組織を2~3cmの細片にし、生理的食塩水中で数回洗滌して血液を除去した後、Gang et al.⁶⁾の変法を用い metal mesh で濾過した。すなわち最初は No. 80, 次いで No. 200 の metal mesh で生理的食塩水を用いながら濾過した。さらにこの濾液を No. 325 の metal mesh を用いて、濾過した。mesh 上に残った終末絨毛を集めて生理的食塩水に懸濁し、1,500r.p.m.15分間遠心した。遠心後、沈渣を再び生理的食塩水に懸濁し、1,500r.p.m.15分間の遠心の操作を5回くり返し上清が清澄になるようにした。

2) 絨毛基底膜の分離

実験方法 1) で得た終末絨毛分画を生理的食塩水に懸濁し、Sonic Oscillator (久保田 KMS 250) を用い超音波処理を行つた。超音波処理最大出力 (150w, 100v) の条件で基底膜と細胞成分の分離を試みた。また超音波処理を行いつつ検鏡して細胞成分が破壊されて、基底膜が帯状に解きほぐされてくる状態を確認した。超音波処理に要する時間は、用いる終末絨毛の量と濃度により、異なるが今回の条件は約5分間であつた。

次いで、超音波処理後懸濁状となつた試料を遠心管に移し、5,000r.p.m.15分間遠心した。基底膜

図1 絨毛基底膜の分離法

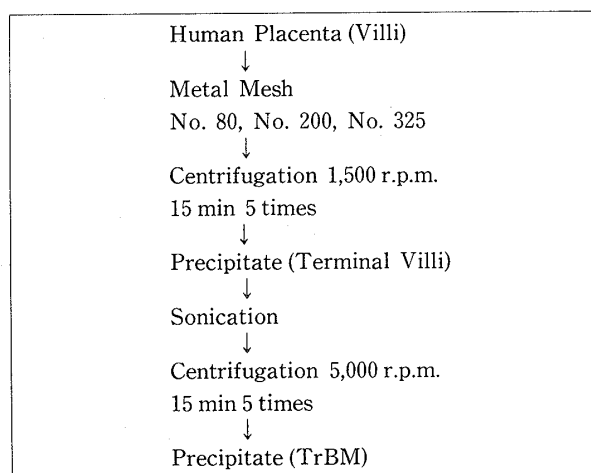
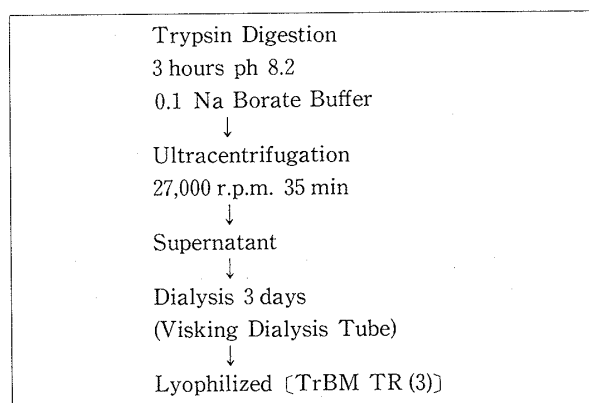


図2 絨毛基底膜の可溶化法



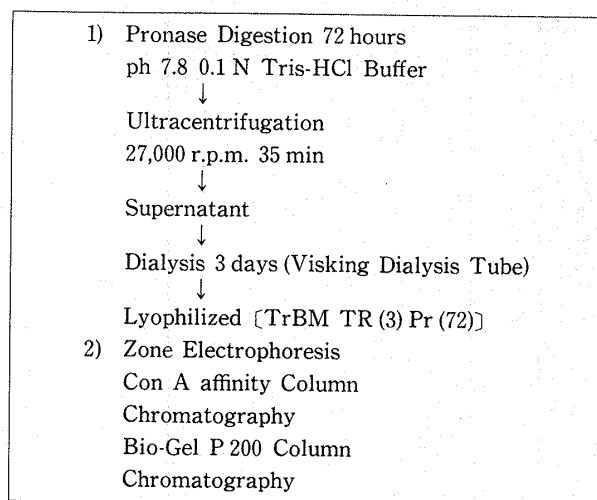
は沈渣分画として得られた。再び生理的食塩水に懸濁し、5,000r.p.m.15分間遠心操作を5回程繰り返した (図1)。

3) 絨毛基底膜の可溶化

実験方法 2) で得た絨毛基底膜は短時間酵素消化を行つて可溶化を行つた (図2)。

絨毛基底膜を生理食塩水に懸濁してから0.1M sodium borate を用い、pH を8.2に調整した。湿重量10gの絨毛基底膜に対して crystalline trypsin (Sigma chemical Co. St. Louis Mo. type III) 50mg を加え37℃、3時間消化した。pH は30分毎に0.1M sodium borate を加えて8.2に調整した。trypsin 消化後、60℃の水浴中で30分間非働化し、水冷後、27,000r.p.m.35分間の超遠心を行つた。得られた遠沈上清分画を採取して、Visking cellulose tube に移し72時間透析を行つた。透析後

図3 可溶化絨毛基底膜の精製



試料を凍結乾燥し、すなわち可溶化された絨毛基底膜（以下、TrBM TR (3) とする）が得られた。

4) 可溶化絨毛基底膜 (TrBM TR (3)) の精製

a) TrBM TR (3) のプロナーゼ消化

TrBMTR(3)を生理食塩水に溶解し、次に Tris HCl buffer にて pH 7.8に調整した（図3）。pronase P（科研化学 Ca 調整済）を初回試料の乾燥重量の1/30量を加え以後24時間毎に初回使用量の半分量を加えて、連続72時間、37℃の条件で消化した。なお pH は1日数回調整した。消化が終了後の試料は、27,000r.p.m.35分間超遠心した。

遠沈上清を72時間 Visking cellulose tube で透析した後、凍結乾燥し、プロナーゼ徹底消化された可溶化絨毛基底膜（以下 TrBM TR (3) Pr (72) とする）を得た。

b) ELISA 法

人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白でウサギを免疫して得られた抗血清（anti NG-GP-human-GBM

serum 柴田）を用い、ELISA 法を行って分画された各試料の腎炎惹起性糖蛋白の活性を調べた（図4）。

分画された各試料を一定量 polystyrene tube（栄研）に乾燥固着させた後、1,000倍希釈した抗血清（anti NG-GP-human-GBM serum）1mlを加え37℃ 1時間反応させた。つぎに1% BSA Tris HCl buffer pH 7.8 で3回洗浄した。さらに1,000倍希釈した peroxidase ラベル抗ウサギ IgG、ヒツジ IgG（peroxidase labelled sheep anti rabbit-IgG serum）1ml 加え、37℃ 1時間反応させた。その後、上述の buffer および0.1% Triton X を含有 buffer で洗浄した。最後に基質として O-phenylene diamine 溶液 1ml を加え約10分間37℃で反応後、NaF を加えて反応を止めて445mμ で吸光度を測定した。

c) ゾーン電気泳動

1.5×7×40cm のセルを使用し、支持体として Zeon Resin(400×150ML)を用い、0.05M borate buffer (pH 9.2) により4℃の条件下で電気泳動を行つた。各試料100~200mg を始点部に置いて150v12~15時間電気泳動した。電気泳動後ブロックを2cm 毎に切断し、ガラスフィルターに移し、蒸留水 5ml を加え、濾液を集めた。

分画された各試料は、透析後、蛋白量・糖量を測定し、一方 ELISA 法を行つた。

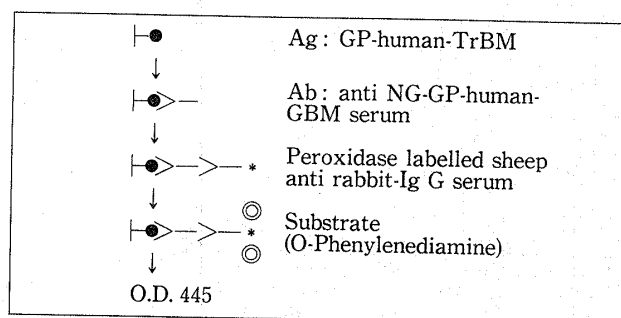
d) Bio Gel-P200 カラム

0.05M pyridine acetate buffer pH5.5で平衡化された Bio Gel-P200 カラム（1.4×65cm）を用いて、流速毎時 6ml で試料の分画を行つた。流出液は1.8ml 毎に分画し、各分画につき蛋白量・糖量を測定し又 ELISA 法を行つた。

5) 抗血清の作製

可溶化させた絨毛基底膜（TrBM TR (3)）をゾーン電気泳動を用いて精製後、ウサギを免疫して抗血清を作製した。試料は初回に2mgを投与し、4週および6週後に booster として1mgを与えた。投与方法は完全アジュバンと十分に混合させた後、初回は足蹠および背部に各2カ所ずつ計4カ所、booster は背部2カ所に注射した。8週後に全採血し、56℃30分間非働化した後、血清を分

図4 ELISA 法による人胎盤由来の腎炎惹起性糖蛋白物質の検定



離した。

6) Ouchterlony 法

人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白に対する抗血清及び今回作製した実験方法⁵⁾で述べた抗血清を用いて Ouchterlony の方法⁷⁾に従い、ゲル内二重拡散法を行つた。

7) 蛋白含量・糖含量の測定

ゾーン電気泳動、カラムクロマトグラフィー等によつて分画された各分画中の蛋白含量は O.D. 280m μ により測定した。一方各分画中の糖質含量は、glucose を基準にして Anthrone 法⁸⁾によつた。

8) 化学組成の決定

試料中の糖組成は、ガスクロマトグラフィー(島津製作所 GC-RIA)を用いて決定した。またアミノ酸組成は、アミノ酸自動分析装置(日本電子 type 200A)を用いて決定した。

成 績

1. 胎盤抽出糖蛋白物質の収量について

抽出糖蛋白物質の収量は、図5に示す如く、胎盤絨毛組織250g(湿重量)より出発して得られた絨毛基底膜は20g(湿重量)であつた。さらに、この絨毛基底膜20g(湿重量)をトリプシンで消化して可溶化した結果、可溶化絨毛基底膜試料(TrBM TR (3))は1,100mg(乾燥重量)が得られた。さらに、可溶化絨毛基底膜1,100mg(乾燥重量)をプロナーゼで徹底消化して得られた試料(TrBM TR (3) Pr (72))は220mg(乾燥重量)であつた。

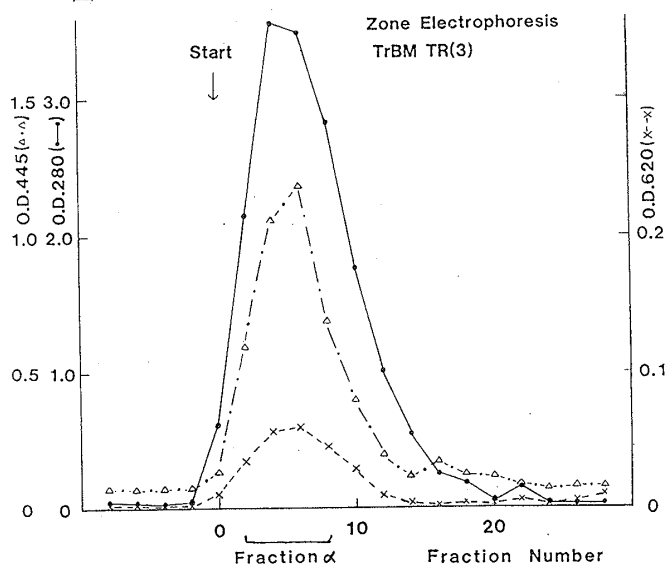
2. Zone Electrophoresis による胎盤抽出物質の分画パターン

可溶化絨毛基底膜試料(TrBM TR (3))を Zone Electrophoresis を用いて分画した結果、図6のごとく一つの対称的な糖のピークが得られ、その活

図5 人胎盤抽出糖蛋白物質の収量

Placental villi	250 g
	(wet weight)
↓	
TrBM (insoluble)	20 g
	(wet weight)
↓	
TrBM TR (3)	1100 mg
	(dry weight)
↓	
TrBM TR (3) Pr (72)	220 mg
	(dry weight)

図6 Zone Electrophoresis による胎盤抽出物質の分画パターン



性は糖ピークの前半部に特に高値を認めた。この活性の高い分画を集め(Fraction α と名づける)、ウサギを免疫して抗血清を作製した。

3. Bio-Gel P200 column chromatography による胎盤抽出物質の分画パターン

TrBM TR (3) を Bio-Gel P 200 column chromatography を用いて分画した結果、図7のごとく、腎炎惹起性糖蛋白活性は ELISA 法による O.D. 445m μ の値で標示すると void 分画にのみ存在した。

図7 Bio-Gel P200 column chromatography による胎盤抽出物質〔TrBM TR (3)〕の分画パターン

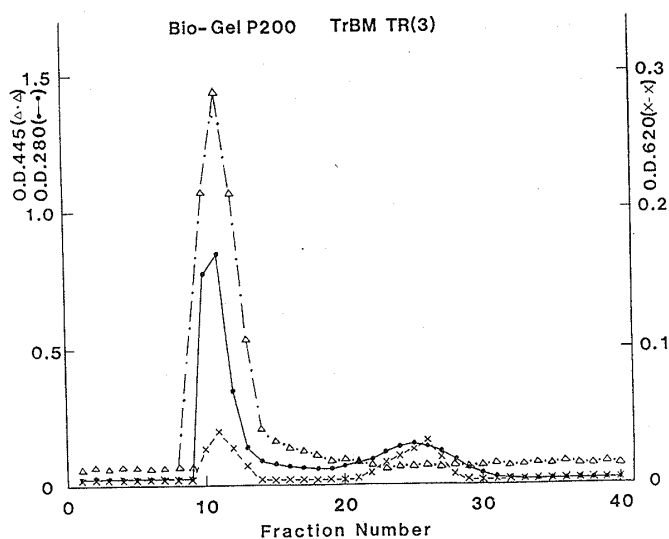
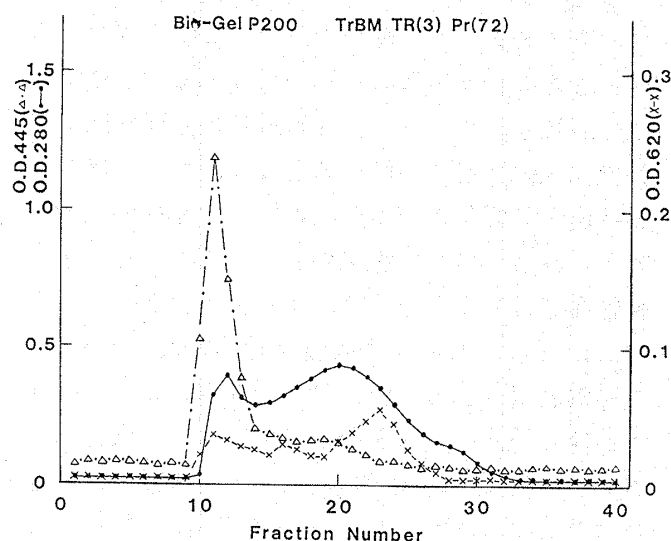


図8 Bio-Gel P200 column chromatography による胎盤抽出物質〔TrBM TR (3) Pr (72)〕の分画パターン



一方, TrBM TR (3) Pr (72) について, 分画した結果, 図8のごとく活性は同様に void 分画にのみ, 認められた. ゲル濾過により得られた結果から, 胎盤由来物質が void 分画に存在する結果は, 腎炎惹起性糖蛋白の性質とよく一致した. この性質は本物質が凝集しやすいためと考えられているが, 今回, 我々が胎盤より抽出した糖蛋白物質も同様の性質を有することが判明した.

4. Ouchterlony 法

今回, 我々が胎盤より抽出した物質ならびに人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白の各々に対する両抗血

清を作製して, Ouchterlony 方法にしたがつて, 二重拡散法を施行したところ図9のごとくであった.

我々が今回胎盤より抽出した物質 (TrBM TR (3) Pr (72)) と人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白との両物質の間に唯一本の完全に融合する共通の沈降線が形成された.

この結果から胎盤より抽出した物質は人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と免疫学的に同一物質であることが確認された.

5. 胎盤抽出物質の化学組成について

今回我々が胎盤より抽出した物質のうち, TrBM TR (3) Pr (72) の試料について糖組成およびアミノ酸組成について分析を行った.

その結果, 表1のごとく糖組成では glucose を多く含むことが判明し, glucose: galactose: mannose の比は1.00:0.74:1.00であった. また, アミノ酸組成では表2のごとく hydroxyproline hydroxylysine 等のコラーゲン成分を欠くことが判明した. 腎炎惹起性糖蛋白は glucose を主体とした non collagenous な物質であることが判明しているが¹⁵⁾, 今回我々が胎盤より抽出した物質もその化学組成がよく一致し, 腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の構造をもつ糖蛋白であると考えられる.

考 察

妊娠中毒症の病因については, 従来よりさまざ

図9 Ouchterlony 法による人胎盤由来腎炎惹起性物質の証明

Center Well: Anti NG-GP-Human-GBM Serum. NG-GP-Human-GBM=人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白. GP-Human-TrBM=胎盤より抽出した物質

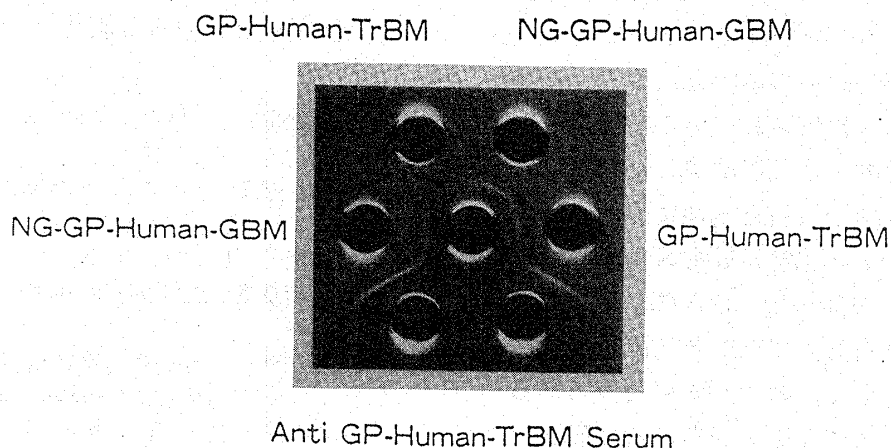


表1 Monosaccharide composition ratio

	Glucose	Galactose	Mannose
TrBM TR (3) Pr (72)	1.00	0.74	1.00

* Estimated by gas-liquid partition chromatography

表2 Amino acid composition

Amino acid	TrBM TR (3) Pr (72)
Glycine	17.58
Alanine	8.63
Valine	5.72
Leucine	7.01
Isoleucine	3.85
Proline	6.52
Phenylalanine	2.51
Tyrosine	Trace
Threonine	5.58
Serine	6.72
Cysteic acid	2.88
Cystein	—*
Methionine	—
Arginine	2.14
Histidine	2.33
Lysine	4.63
Aspartic acid	11.25
Glutamic acid	12.62
Hydroxyproline	—
Hydroxylysine	—

* not detectable

まの学説があり現在までに結論されるには至っていない。単独な病因から妊娠中毒症のすべての病態を、説明することは困難であり、複数の原因が、その病態の基礎となつていていると考えられている。すでに妊娠中毒症の病因論のうち、胎盤に起源する物質によつて妊娠中毒症が発症することが古くから報告されてきている³⁾⁹⁾。一方、妊娠中毒症の主病変は腎臓にあることが多く、そのことから胎盤由来の物質が腎病変の原因となつていている可能性を示唆する研究も報告されている¹⁾²⁾¹⁶⁾。

今回、我々が胎盤より抽出精製した物質は、人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様にその本体が糖蛋白であり、またその化学組成も腎由来の腎炎惹起性糖蛋白とよく一致した。さらに糖組成ではグルコースを多く含有し、またアミノ酸組成ではコラーゲン成分を欠いているのがその特長である。Ouchterlonyの方法によるゲル内二重拡散法で、

人腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と、完全に融合する単一の共通の沈降線を形成した。

以上の点から腎由来の腎炎惹起性糖蛋白と同様の物質であることが確認された。腎疾患等の合併があるとき、重症型の妊娠中毒症を発症しやすいことが知られているが、妊娠維持に必要な胎盤が腎炎惹起性糖蛋白の供給源となり、すでに存在する腎病変を悪化させる要因となる可能性が十分に考えられる。また腎疾患の合併がなくとも、子宮胎盤血流量減少等により、また絨毛の老化や変性をもたらした場合⁵⁾、腎炎惹起性糖蛋白が絨毛より遊離放出されて、腎に障害をひきおこし、妊娠中毒症の発症の要因をなしていることも考えられる。一方腎炎惹起性糖蛋白は、肺、大動脈、肝等の他臓器にも広く分布し¹¹⁾、腎のみならず、広くこれらの臓器の細小血管の基底膜の病変もひきおこすと考えられている⁴⁾。妊娠中毒症では、腎以外に胎盤にも著明な病変が存在するが、この胎盤病変像にも腎炎惹起性糖蛋白が関与している可能性がある。

さらに腎炎惹起性糖蛋白は、S.L.E., 膜性腎炎等、腎疾患をもつ患者の尿中に多量に排泄され、またその排泄量が腎障害の病像の重症度とほぼ比例することが明らかにされている¹³⁾¹⁴⁾。したがって妊娠中毒症の予防の面で将来、腎疾患を合併した妊娠中毒症患者の場合、尿中の本物質の排泄量を調べることで、その腎障害の程度、予後等を判断することができるものと考えられる。また腎疾患の合併のない妊婦の場合でも、腎炎惹起性糖蛋白の尿中排泄量の推移をみることで、妊娠中毒症発症の予知、治療の有効度、予後等を判断する一つの指標になり得る可能性があると考えられる。

文 献

1. 加来道隆：妊娠中毒症の本態に関する研究。日産婦誌，4：301，1952。
2. 加来道隆，中山道男，水谷房之：妊娠中毒症のアレルギー説に関する我教室その後の研究成績。最新医学，13：114，1958。
3. 眞柄正直：妊娠中毒症の成因。日産婦誌，43：5，1948。
4. 柴田整一：腎炎惹起物質 nephritogenoside について。蛋白質・核酸・酵素，26：1，1981。
5. Beker, J.C.: Aetiology of eclampsia. J. Ob-

- stet. Gynaec. Br. Emp., 55 : 756, 1948.
6. *Gang, N.F. and Gelfand, M.M.* : Isolation of trophoblast basement membrane from full-term human placenta. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140 : 188, 1972.
 7. *Ouchterlony, O.* : Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 26 : 507, 1949.
 8. *Roe, J.H.* : The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265, 1951.
 9. *Schneider, C.L.* : Fibrin embolism (disseminated intra vascular coagulation) and the etiology of eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Emp.*, 58 : 538, 1951.
 10. *Shibata, S., Nagasawa, T., Miyakawa, Y. and Naruse, T.* : Nephritogenic glycoprotein. I. Proliferative glomerulonephritis induced in rats by a single injection of the soluble glycoprotein isolated from homologous glomerular basement membrane. *J. Immunol.*, 106 : 1284, 1971.
 11. *Shibata, S. and Nagasawa, T.* : Nephritogenic glycoprotein. II. Immunochemical studies on nephritogenic activity of homologous water-soluble glycoprotein extracted from various rat organs. *Immunology*, 26 : 217, 1974.
 12. *Shibata, S. and Nagasawa, T.* : Nephritogenic glycoprotein. IV. Induction of proliferative glomerulonephritis with immunofluorescent "Mesangial pattern" in rats by a single injection of heterologous renal glycoprotein. *Immunology*, 26 : 855, 1974.
 13. *Shibata, S., Sakaguchi, H. and Nagasawa, T.* : Nephritogenic glycoprotein. VI. Induction of proliferative glomerulonephritis with the immunofluorescent "Mesangial pattern" in rats by a single injection of soluble glycoprotein isolated from human urine. *Contr. Nephrol.*, 4 : 22, 1977.
 14. *Shibata, S. and Nagasawa, T.* : Glycoproteinuria, as an indicator of the glomerular basement membrane damage. *J. Lab. Clin. Med.*, 39 : 207, 1977.
 15. *Shibata, S.* : Nephritogenic glycopeptide (Nephritogenoside): Noncollagen glycopeptide isolated from glomerular basement membrane. *Glomerulonephritis* (eds. Y. Yoshitoshi and Y. Ueda), 23. University of Tokyo Press, Tokyo, 1979.
 16. *Steblay, R.W.* : Localization in human kidney of antibodies formed in sheep against human-placenta. *J. Immunol.*, 88 : 434, 1962.

(特別掲載 No. 5259 昭58・3・9 受付)