原著 3

尿酸ナトリウム結晶の析出に影響する高分子物質の検出

岩田 英信

要 約

微量の体液から尿酸ナトリウム (NaU) 結晶の析出に影響する高分子物質をスクリーニングし、同定する方法を考案した。この方法を用いて血清と血漿を分析したところ、アガロースゲル電気泳動の γ -グロブリンの泳動位置に NaU 結晶の析出抑制を認めたが、アルブミンの泳動位置には認められなかった。また、 α および β -グロブリンの泳動範囲に少なくとも 5 つの NaU 結晶の析出抑制物質が検出され、ひとつはフィブリノーゲンと同定した。

緒 言

痛風は尿酸ナトリウム (NaU) の過飽和状態、NaU 結晶の析出、白血球による NaU 結晶の貪食、の 3 つの段階を経て発症する。このうち NaU 結晶の析出については温度と pH が影響することは明らかであるが、生体内の高分子物質の影響に関しては一致した見解が得られていない。

すなわち、アルブミンは尿酸の溶解度を高めるとする報告¹⁾がある一方で、NaU 結晶の析出を促進するという報告²⁾、ほとんど影響がないという報告³⁾もある。

α および β -グロブリン分画の高分子物質は、抑制するという報告¹⁾とほとんど影響がないという報告³⁾が見られる。

また、 γ -グロブリンは促進するという報告³⁾と痛風患者の γ -グロブリンは促進するが痛風以外の関節炎患者の γ -グロブリンは促進しないという報告⁵⁾がある。

この分野の研究があまり進展していないのは、数多くの生体高分子物質を含む体液から、短時

間に NaU 結晶の析出に影響を及ぼす物質を検出可能な実験系が存在しないことも理由の一つと考えられる。そこで著者はこの目的に適した方法を考案した。この方法は条件を変えれば結晶析出を促進する物質の検出にも適用できると考えられるが、今回は NaU 結晶の析出を抑制する物質の検出に焦点を当てて報告する。

材料と方法

・アガロースゲル電気泳動法

ユニバーサルゲル/8 (ヘレナ研究所 470100) と 0.05 mol/l バルビタール Na 緩衝液、pH 8.6 (Wako 020-13415) を用い、レーン 1 と 5 に痛風患者発作時の血清、レーン 2 と 6 に健常者の血清、レーン 3 と 7 に健常者の血漿、レーン 4 と 8 にヒトフィブリノーゲン (CALBIOCHEM 341576) を濃度 1 g/dl にバルビタール Na 緩衝液で溶解したものをそれぞれ 1 μ l 添加し、90V の定電圧で 50 分間泳動した。

・リン酸緩衝食塩液 (PBS)

ナトリウム濃度 150 mmol/l の PBS を、NaCl 7.72 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.28 g を純水に溶解し、1 mol/l 塩酸を滴下して pH 7.4 に調整したのち 1 l とすることで作製した。

・NaU 過飽和アガロース溶液

純水 90 ml を入れたビーカーをホットスターラーで攪拌しながら 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液 (Wako 192-02175) 5 ml を加え 80°C に加熱した。無水尿酸 (Sigma U-2625) 605 mg (最終尿酸濃度 36 mmol/l) または 650 mg (最終尿酸濃度 39 mmol/l) を溶解したのち、温度補正電極付き pH メータを用いて 1 mol/l 塩酸 (Wako 083-01095) を

pH7.2 $\pm$ 0.2まで滴下し、さらに加熱しながらアガロースLE (Wako 045-13981) 1gを溶解した。アガロースが完全に溶解したのち、溶液が100mlになるまで純水を加え (最終ナトリウム濃度50mmol/l)、ポアサイズ0.45 μ mのシリンジフィルター (Whatman 6872-2504) にて不溶物を除去し、密封ガラス瓶に入れて60℃に設定した乾熱滅菌器に保存し、3時間以内に使用した。

・電気泳動後の実験方法

電気泳動終了後、レーン4と5の間でゲルフィルムを半切し、レーン1～4はPBSに浸して振盪した (10分 $\times$ 3)。ゲルフィルムを1～2分立てた状態にして水滴を除いたのち水平な台の上に置き、60℃に保ってあるNaU過飽和アガロース溶液を6mlまたは8ml (1レーン当たり1.5 mlまたは2ml) 重層した。重層したアガロース溶液がゲル化したのち、水で湿らせたペーパータオルを敷いた透明な蓋付きプラスチックケースに入れて、20℃の恒温室に静置し、結晶の析出を2日間観察した。

レーン5～8は電気泳動終了後すぐにアミドブラック (酢酸50ml, エタノール450mlの混合液に1gのアミドブラック10Bを溶解) で30分間染色したのち、5%酢酸で脱色した。

・結果の判定および保存

結晶の析出は12～48時間で完了する。アミドブラックで染色したレーン5～8をレーン1～4に重ね、結晶析出が抑制された泳動位置を判定した。写真撮影はレーン1～4のゲルフィルムの下に黒のシート、レーン5～8の下に白のシートをそれぞれ敷いて行った。ゲルフィルムは90%エタノールに浸けて洗浄し、室温または60℃で乾燥し保存した。

結 果

NaU過飽和アガロース溶液の重層後6～12時間で結晶の析出が始まり、肉眼的にゲルは白濁してくるが、結晶の析出が抑制された部分は48時間後も透明なまま残った (図1, 2のレーン1から4)。顕微鏡による結晶形の観察から、析出した結晶は針状の尿酸ナトリウム1水和物であっ

た。

アルブミンの泳動位置には結晶析出の抑制はみられず (図1, 2のレーン1から3)、むしろ結晶が最初にこの位置に析出し始めた。

α および β -グロブリンの泳動範囲には複数の結晶析出抑制域を認め、 α_1 -グロブリンの泳動位置に1つ、 α_2 -グロブリンの泳動位置に少なくとも2つ、 β -グロブリンの泳動位置に1つ、 β -グロブリンと γ -グロブリンの間に1つの結晶析出抑制域が確認できた (図2Bのレーン2と3)。そのうち泳動位置が β -グロブリンと γ -グロブリンの間のNaU結晶析出抑制物質は血清には存在せず、同位置に泳動するフィブリノーゲンで結晶析出が抑制されたことから、フィブリノーゲンと同定できた (図1A, 2Aのレーン3と4)。

γ -グロブリンの泳動位置の結晶析出も抑制された (図1, 2のレーン1から3)。

また、繰り返し行った実験を通じて、 α_2 -グロブリン分画の結晶析出抑制が最も顕著であった。

考 察

ゲル内の拡散を利用して結晶形成に影響を及ぼす物質を研究する方法は古くから用いられているが⁶⁾、比較的多量の試料と時間を必要とする欠点があった。本実験系では高分子物質を分離した電気泳動後のゲルフィルム上にNaU過飽和アガロースゲルを直接重層することで、わずか1 μ lの体液試料から結晶析出に影響する物質の検出を可能にすると同時に反応時間を短縮した。本実験系で用いた各条件の設定理由を以下に述べる。

・NaU過飽和溶液の条件設定

1) ナトリウムおよび尿酸濃度

針状のNaU結晶の作製には一般にナトリウム濃度30mmol/l強の水酸化ナトリウム溶液を60℃以上に加熱し、無水尿酸を500mg/dl (30mmol/l) の濃度に溶解してpH7.2以上で23℃に冷却する方法が用いられている⁷⁻¹⁰⁾。しかし血清に尿酸結晶を溶解すると400mg/dl近くの尿酸濃度に達するとされており¹¹⁾。イオン化合物の溶解度積は一定であるから、血清濃度の約1/3の

ナトリウム濃度50mmol/lでは3倍の1,200 mg/dl近くの尿酸が溶解すると予想される．そこでナトリウム濃度を50mmol/lに固定し，尿酸濃度500mg/dlから750 mg/dlの範囲で予備実験を行った結果，本抑制実験系では600～700mg/dlが適切と考えられた．

2) pH

pHの範囲は7.2±0.2と幅をもたせたが，この溶液は緩衝液でないため微妙なpH調整が難しく，またNaUの過飽和状態はこのpHの範囲で最も安

定であり¹²⁾，しかも605 mg/dl (36mmol/l)以上の尿酸濃度においても無水尿酸は析出しなかった．しかしこの尿酸濃度におけるNaUの過飽和状態はかなり不安定で，60℃では数時間以内に微小なNaU結晶の析出が始まるため，作製後3時間以内に使用した．

3) 温度

本実験系ではNaU過飽和とアガロースゲルを尿酸を含まないゲルフィルムに重層するため，拡散によって尿酸濃度は低下することになる．そ

Fig.1
Result of experiments using 36 mmol/l uric acid solution. A: Supersaturated NaU-agarose solution was overlaid on lanes 1 to 4, 1.5 ml/lane after agarose-gel electrophoresis. B: Supersaturated NaU-agarose solution from the same batch that was used in A was overlaid on lanes 1 to 4, 2 ml/lane after agarose-gel electrophoresis on the same day. Areas, where NaU crystallization was inhibited, remain translucent therefore are seen black because photographs were taken setting a black sheet under lanes 1 to 4. NaU crystallization was inhibited at the travel distance of gamma-globulin, but not at that of albumin in lanes 1 to 3. NaU crystallization was also inhibited at the travel range of alpha- and beta-globulins in lanes 1 to 3. Fibrinogen inhibited NaU crystallization in lanes 3 and 4. Note that the inhibited areas in A are wider than those in B. Lanes 5 to 8: Amido black stained half of the gelfilm. Lanes 1 and 5: serum from a patient during a gouty attack. Lanes 2 and 6: serum from a healthy subject. Lanes 3 and 7: plasma from a healthy subject. Lanes 4 and 8: human fibrinogen.

れにも関わらずNaU結晶の析出を促進させるには、温度を下げる方法とナトリウム濃度を上げる方法がある。予備実験で4℃まで冷却したところ、結晶の析出は20℃に比べて早く始まったが結晶形態は小球状となった^{10, 13)}。このため冷却温度は20℃に設定し、電気泳動後のゲルフィルムをナトリウム濃度150mmol/lのPBSに浸して緩衝液を置換することで、生理的なpHに戻すとともにナトリウム濃度を高めた。

4) 重層量

ユニバーサルゲル/8の1レーンは約15cm³であり、1レーン当たり1.5~2mlのNaU過飽和アガロース溶液を重層するとゲルの厚みがほぼ均一となる。1.5ml/レーン(図1 A)と2ml/レーン(図1 B)で比較すると、重層量の多い方が結晶の析出が抑制される範囲が狭くなった。重層量を一定にして尿酸濃度36mmol/l(図1 A)と39mmol/l(図2 A)を比較すると、濃度の高い方が結晶の析出が抑制される範囲が狭くなった。尿酸濃度39mmol/l、重層量2ml/レーンではゲ

Fig.2

Result of experiments using 39 mmol/l uric acid solution. A: Supersaturated NaU-agarose solution was overlaid on lanes 1 to 4, 1.5 ml/lane after agarose-gel electrophoresis. B: Supersaturated NaU-agarose solution from a different batch that was used in A was overlaid on lanes 1 to 4, 1.5 ml/lane after agarose-gel electrophoresis on the separate day.

Although experimental condition is same both in A and B, inhibited areas of NaU crystallization are wider in A than those in B except in lane 1.

In lanes 1 and 2 of A, inhibition of NaU crystallization is stronger at the travel range of alpha 2-globulin than at that of other globulins. At least five inhibited bands of NaU crystallization are detectable at the travel range of alpha- and beta-globulins in lane 3 of B.

Lanes 5 to 8: Amido black stained half of the gelfilm. Same samples were adapted in the order same to Fig.1

ルフィルム全面に結晶が析出した。

・実験系の再現性と有用性

本実験系における結晶析出抑制域の広さは、結晶析出の早さと抑制物質の拡散速度に左右される。不安定過飽和状態から結晶を析出させる実験系ではいかに厳密な条件設定を行っても実験ごとに結晶析出が始まる時間が変動するとされるが³⁾、本実験系でも同様で、同じ条件で別の日に実験を行うと結晶析出の抑制域の広さが変動した(図2, AとB)。

また本法は微量な試料で分析できる利点をもつが、逆に試料を正確に1 μ l添加することが困難なため、同一のゲルフィルム内でもレーン相互間で抑制の強さを比較することは難しい。しかし同一レーン内でどの泳動位置の物質が最も結晶析出を抑制したかを判断することは、条件を変えて行った実験間での比較と、結晶析出の早さと抑制物質の拡散速度のマッチングが適切であった実験から可能である。本実験系の最大のメリットは、高分子物質が体液中に存在する濃度比での結晶析出抑制の強さが検出できることであり、血清および血漿を用いた今回の実験では、泳動位置が α_2 -グロブリン分画にある高分子物質がNaU結晶の析出を最も強く抑制すると判断した(図2A, レーン1と2)。

現在、 α -および β -グロブリン分画の生体高分子物質の精製品を一つ一つチェックしているが、この方法で同定された物質の血中濃度が痛風患者では低いことが確認されて初めて本実験系の有用性が証明されると考える。

文 献

- 1) Kippen I, Klinenberg JR, Weinberger A et al: Factors affecting urate solubility in vitro. *Ann Rheum Dis* 33:313-317,1974.
- 2) Perl-Treves D, Addadi L: A structural approach to pathological crystallizations; Gout, the possible role of albumin in sodium urate crystallization. *Proc R Soc Lond* 235:145-159,1988.
- 3) McGill NW, Dieppe PA: The role of serum and synovial fluid components in the promotion of urate crystal formation. *J Rheumatol* 18:1042-1045,1991.
- 4) Alvsaker JO: Genetic studies in primary gout. Investigations on the plasma levels of the urate binding α_1 - α_2 -globulin in individuals from two gouty kindreds. *J Clin Invest* 47:1254-1261,1968.
- 5) Kam M, Perl-Treves D, Caspi D et al: Antibodies against crystals. *FASEB J* 6:2608-2613,1992.
- 6) Bisailon S, Tawashi R: Growth of calcium oxalate in gel system. *J Pharm Sci* 64:458-460,1975.
- 7) Seegmiller JE, Howell RR, Malawista SE et al: The inflammatory reaction to sodium urate. Its possible relation to the genesis of acute gouty arthritis. *JAMA* 180:469-475,1962.
- 8) Denko CW, Whitehouse MW: Experimental inflammation induced by naturally occurring microcrystalline calcium salts. *J Rheumatol* 3:54-62,1976.
- 9) Mandel NS: structural changes in sodium urate crystals on heating. *Arthritis Rheum* 23:772-776,1980.
- 10) Fam AG, Schumacher HR, Clayburne G et al: A comparison of five preparations of synthetic monosodium urate monohydrate crystals. *J Rheumatol* 19:780-787,1992.
- 11) Seegmiller JE: The acute attack of gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 8:714-724,1965.
- 12) 岩田英信, 西尾俊治, 松本充司 他: 尿酸の尿中溶解度に関する研究-尿酸ナトリウムおよび尿酸の過飽和状態について-. *尿酸* 12:1-8,1988.
- 13) Fiechtner JJ, Simkin PA: Urate spherulites in gouty synovia. *JAMA* 245:1533-1536,1981.

Detection of the macromolecules affecting crystallization of monosodium urate

Hiddenobu Iwata

A novel method for screening out and identifying the macromolecules which affect monosodium urate (NaU) crystallization in a small amount of biological fluid is presented. Using this method, serum and plasma were analyzed, and the inhibition of NaU crystallization was observed at the travel distance of gamma-

globulin by agarose-gel electrophoresis, but not at that of albumin. Moreover, at least five inhibitory substances were detected at the travel range of alpha- and beta-globulins, and one of them was found to be fibrinogen.