妊娠中毒症の尿中 TM に関する研究

矢谷 達樹* 安達 知子* 渡辺由佳里*
下島 千穂* 岩下 光利** 中林 正雄**
武田 佳彦* 坂元 正一** 石井 秀美***
中野 昌彦*** 風間 睦美*** 丸山 征郎****

Studies on urinary thrombomodulin in toxemia of pregnancy

Tatsuki YATANI*, Tomoko ADACHI*, Yukari WATANABE*,
Chiko SHIMOZIMA*, Mitsutoshi IWASHITA**, Masao NAKABAYASHI**,
Yoshihiko TAKEDA*, Shoichi SAKAMOTO**, Hidemi ISHII***,
Masahiko NAKANO***, Mutsumi KAZAMA*** and Ikuro MARUYAMA****

Key words : Thrombomodulin, Protein C, toxemia of Pregnancy

Thrombomodulin(TM) is known to exist in the glomerulus and to be excreted in urine. To elucidate biochemical properties of urinary TM in normal and toxemic pregnancy, the levels of immunoreactive TM (TM antigen) and its activities were measured by ELISA and by a protein C activation method, respectively. The samples for measurements were prepared from urine by DIP-thrombin agarose affinity chromatography.

The urinary protein fraction bound to DIP-thrombin agarose, obtained from normal pregnant, pregnant with early onsets type toxemia (24-28 weeks of gestation), and with late onset type toxemia (later than 32 weeks) commonly showed a single band with a mol. wt. 63 Kd in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with silver staining.

The levels of urinary TM antigen and TM activity in normal pregnancy increased with gestation weeks. Those in late onset type pregnancy showed similar changes.

* 東京女子医科大学産婦人科教室〔〒162 東京都新宿区河田町8-1〕; Department of obstetrics and Gynecology, Tokyo Women's Medical college, Tokyo, Japan

** 東京女子医科大学母子総合医療センター, Maternal and Perinatal Center, Tokyo Women's Medical college, Tokyo, Japan

*** 帝京大学薬学部臨床生化学教室, Faculty of Pharmaceutical Science, Teikyo University, Kanagawa, Japan

**** 鹿児島大学第三内科学教室, The Third Department of Internal Medicine, Kagoshima university, Kagoshima, Japan. 受付: 1989. 1. 16, 受理: 1989. 3. 8.

There was no difference in the ratio of TM activity/antigen between these two types of pregnancy. However, in early onset type toxemia the level of TM activity was low, and, further, the ratio of TM activity/antigen was extremely low.

The TM in early onset type toxemia had a significantly lower V_{max} than that in normal pregnancy. These findings suggested that the TM in early onset type toxemia was functionally impaired as a cofactor for thrombin.

I. 緒 言

Thrombomodulin(以下 TM) は、血管内皮に存在して凝固系を抑制しているが、腎糸球体にも存在することが知られている¹⁾²⁾。われわれは、妊娠中毒症(以下中毒症)の尿中 TM の生化学的性状を分析し、中期発症型中毒症の特異性について検討したので報告する。

II. 方 法

ヒト尿中 TM の抽出は、早朝尿 100 ml を限外濾過にて約 5 倍濃縮後、DIP-thrombin agarose affinity chromatography を用いて行った。TM 活性は、抽出した sample に thrombin (40 U/ml 5 l), protein C (500 μ g/ml 10 μ l) を加え、37°C 30 分 incubate し、thrombin-TM complex (T-TM complex) を形成させ、T-TM complex による protein C の活性化を protein C 特異的 MCA 基質 (100 μ M 250 μ l) を用いて螢光測定した。TM 抗原量測定は、2 種類の抗 TM monoclonal 抗体を用いた ELISA 法にて行った³⁾。

III. 結 果

(1) 尿中より DIP-thrombin agarose を用いて抽出した TM を SDS-PAGE (還元処理銀染色) により分析したところ、正常妊娠、中期発症型中毒症 (24-28 週発症)、晩期発症型中毒症 (32 週以降発症) いずれにおいても、分子量 63Kd の 1 本のバンドが認められた (図 1)。

(2) 尿中 TM 活性は正常妊婦では、妊娠 20 週で 3.5 ± 1.2 n mol/ml/min (Mean $\pm$ SE, $n=7$), 30 週で 6.2 ± 1.3 n mol/ml/min ($n=10$), 40 週で 8.9 ± 1.1 n mol/ml/min ($n=7$)

a: normal pregnancy
b: early onset type of toxemia
c: late onset type of toxemia

Fig. 1 SDS-PAGE of urinary TM

と妊娠週数に伴い増加傾向を示した。晩期発症型中毒症では、 8.6 ± 1.1 n mol/ml/min ($n=18$) と同週数正常妊娠と有意差を認めなかったが、中期発症型中毒症では 3.8 ± 0.8 n mol/ml/min ($n=18$) と同週数の正常妊娠に比較し、低い傾向 ($p<0.1$) を示した。尿中 TM 抗原量は、正常妊娠 20 週で 37.1 ± 12.3 ng/ml ($n=7$), 30 週で 37.6 ± 5.7 ng/ml ($n=17$), 40 週で 78.8 ± 8.4 ng/ml ($n=16$) と妊娠週数に伴って増加した。晩期中毒症では、 96.9 ± 12.8 ($n=22$) と同週数の正常妊娠と有意差を認めなかったが、中期中毒症では 82.1 ± 7.7 ng/ml ($n=22$) と同週数の正常妊娠と比較して明らかに高値を示した ($p<0.005$)。尿中 TM の比活性 (活性値/抗原量) の回帰直線を求めたところ、正常妊娠、晩期中毒症とも回帰係数は 0.17 であったが、中期中毒症は 0.044 と全く異なった回帰係数を示した (図 2)。さらに正常妊婦、中期中毒症尿より精製した一定量の TM (1 μ g/ml) を用いて protein C 濃度依存性 aPC 産生量を比較すると、その V_{max} は中期中群症

Fig. 2 Regression lines of TM antigen and activity in urine

Fig. 3 Affinity of urinary TM for protein C in normal and toxemia of pregnancy

では正常妊婦と比較して著明な低値を示した(図 3)。

IV. 考 察

尿中 TM の由来については、いまだ不明であるが、正常妊娠末期の尿中 TM 活性、抗原量の増加は妊娠による腎血流量の増加や凝固亢進による影響が推測されるが、その意義は今後の検討が必要である。

正常妊娠および中毒症ともに、DIP-thrombin agarose を用いて抽出した尿中 TM は、

SDS-PAGE 後銀染色で 1 本のバンドを示し、分子量は 63 Kd であった。Western blotting による検討では尿中には、56 Kd と 28 Kd の TM が存在することが確認されている⁵⁾。この 56 Kd の TM はわれわれの得た 63 Kd のものに相当すると想定されるが、今回われわれが 28 Kd の TM を検出しえなかったのは、濃縮尿中の TM 濃縮および分析法の違いによるものと考えられる。

尿中 TM の比活性は正常妊娠および晩期中毒症では一定であるが、中期中毒症で低値を示

した。その理由としては、尿中 TM の heterogeneity や、質的異常、あるいは中期中毒症では TM 活性を阻害する物質が生成されるなどの可能性が考えられるが、今後更に検討すべき問題と思われる。

中期中毒症では分娩後軽快しても、5~10年後に高率に高血圧を発症することが報告されているが⁴⁾、これらの臨床成績と尿中 TM の生化学的性状との関連性は興味深い問題である。

文 献

- 1) Maruyama, I., Bell, C.E. and Majerus, P.W.: Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J.Cell. Biol.*, **101**; 363~371, 1985.
- 2) Ishii, H. and Majerus, P.W.: Thrombomodulin is present in human placenta and urine. *J.Clin. Invest.*,
- 3) 坪内二郎, 中野昌彦, 石井秀美, 風間睦美: 血中および尿中トロンボモジュリンの定量法の開発. 日本臨床化学会年会記録, **27**; 17~21, 1987.
- 4) 中林正雄, 坂元正一, 関 博之, 水野正彦, 佐藤和雄; 妊娠中毒症の遺伝的背景. 臨床産婦人科, **39**; 849~852, 1985.
- 5) Ishii, H., Nakamura, M., Tsubouti, J., et al.: Establishment of enzyme immuno assay of human thrombomodulin in plasma and urine using monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* (印刷中)