尿酸カルシウム結晶の成長を抑制する 高分子物質についての研究

第4編 尿中ペプシノーゲンおよびムコポリサッカライドの

尿酸カルシウム結晶成長抑制活性について

千葉大学医学部泌尿器科学教室 伊 藤 晴 夫
 (主任: 島崎淳教授) 島 崎 淳

HIGH MOLECULAR WEIGHT SUBSTANCES WHICH INHIBIT CALCIUM OXALATE CRYSTAL GROWTH

4: Studies on the role of urinary pepsinogen and mucopolysaccharide as inhibitors of calcium oxalate crystal growth

Haruo Ito, and Jun Shimazaki

Department of Urology, Chiba University School of Medicine

(Director: Prof. J. Shimazaki)

Pepsinogen has relatively strong inhibitory activity as anticipated from its high content of aspartic acid and glutamic acid. Urinary pepsinogen level in human was not so high as reported by Gottlieb, so that the percent of the contribution of pepsinogen to the activity of dialysed urine was only 0.8–3.4. The hypothesis that mucopolysaccharide is the main urinary high molecular weight inhibitor cannot be accepted because its activity is weak compared to dialysed urine.

It is concluded from these results that the urinary high molecular weight inhibitor is an absolutely unknown material.

はじめに

第1編で、ヒト尿中に存在する未知の高分子物質である尿酸カルシウム(以下 CaOx と略す)結晶成長抑制因子がきわめて重要であることを報告した。又、第3編で酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸の homopolymer が強い CaOx 結晶成長抑制活性を有することを発表した。これらの酸性アミノ酸を特に多く含有する特異な蛋白である pepsinogen は尿中に大量排泄されるといわれる¹⁾²⁾。したがって、尿中高分子抑制物質の本態が pepsinogen である可能性が考えられた。又、mucopolysaccharide が尿中抑制物質であるとする説³⁾がある。そこで、この両者の意義について検討し、若干の知見を得たので、ここに報告する。

材料ならびに方法

hog pepsinogen および bovine serum albumin は gma 社より購入した。chondroitin sulfate A, B, C,

およびその disaccharide unit である Δ Di-OS, Δ Di-4S, Δ Di-6S, ならびに hyaluronic acid は生化学工業より購入した。

1) 尿酸カルシウム結晶成長の測定法は第1編に記した。

2) 尿の透析については第1編参照。

3) pepsinogen の測定

Herriot⁴⁾ の記載した方法で行なった。hog pepsinogen を用いて得た0.2~10 μ g/ml までの検量線を使用した。

結 果

1) pepsinogen の活性はその assay 系中の濃度が4.25 μ g/ml では弱く、0.425 μ g/ml ではさらに弱い、42.5 μ g/ml ではかなり強い(図1)。この結果は pepsinogen のアスパラギン酸およびグルタミン酸含量が高いことから推測された通りであつた。これに対して、albumin は、その濃度が42.5 μ g/ml でも活性を持たなかつ

図1 ペプシノーゲンおよびアルブミンの尿酸カルシウム結晶成長抑制活性

縦軸には抑制活性 (% oxalate in filtrate) を示す。各点は3回の測定値の平均±S.E.である。横軸には hog pepsinogen および bovine serum albumin の assay tube 中の濃度を示す。pepsinogen の42.5μg/ml は分子あたりの濃度に換算すると 10^{-6} Mである。

表1 凍結、融解の尿中ペプシノーゲン値に与える影響

検 体	新鮮尿中ペプシノーゲン濃度	新鮮尿を凍結、融解、濾過した後のペプシノーゲン濃度
1	1.4	0.4
2	0.3	0.4
3	1.1	0.1
4	1.2	0.5
5	1.6	0.3
6	4.7	1.3
	平均1.7	平均0.5

濃度の単位は μg/ml である。

た。したがって、pepsinogen の示した活性が蛋白質の非特異性性質ではないことが分る。

2) 尿を凍結、融解することの尿中ペプシノーゲン値に与える影響

6検体の新鮮尿中 pepsinogen 濃度を測定した後、それらを凍結、融解、濾過し、再び、その pepsinogen 濃度を測定した(表1)。すると、凍結、融解後の尿中 pepsinogen レベルは、平均0.5μg/ml であり、新鮮尿中の平均値1.7μg/ml より低かった。よつて、24時間尿を凍結、保存後その pepsinogen を測定することは中止し

表2 新鮮尿中のペプシノーゲン濃度

男子(17才~49才, 平均33才)				女子(18才~46才, 平均31才)			
検体	測定 値		平 均	検体	測定 値		平 均
1	2.3	0.8	1.6	1	0.3	1.1	0.7
2	5.8	3.6	4.7	2	1.2	1.6	1.4
3	4.1	2.6	3.4	3	0.4	0.2	0.3
4	3.4	2.3	2.9	4	3.0	1.4	2.2
5	2.4	2.0	2.2	5	1.2	1.0	1.1
6	3.0		3.0	6	1.7	0.7	1.2
7	1.2		1.2	7			0.8
8	0.0		0.0	8	2.4		2.4
9				9	0.0		0.0
10				10	1.0		1.0
11				11	0.2		0.2
			平均2.4				平均1.0

濃度の単位は μg/ml である。

図2 ペプシノーゲンの濃度—活性曲線

縦軸には抑制活性 (% oxalate in filtrate) を示す。各点は3回の測定値の平均±S.E.である。横軸の数値は pepsinogen の assay 系中の濃度を示す。

た。

3) 新鮮尿中ペプシノーゲン濃度

新鮮尿中 pepsinogen 濃度は男子8例の平均2.4μg/ml, 女子11例の平均1.0μg/ml であり、男子の値が女子の値よりも高いという結果であつた(表2)。なお、この値は以前報告された値よりはるかに低い。

4) ペプシノーゲンの濃度と尿酸カルシウム結晶成長抑制活性

尿中に存在する pepsinogen 濃度の範囲で、その濃度—活性曲線をしらべた。すると、図2に示したごとく、きれいな曲線が得られた。したがって、pepsinogen 濃度とその活性は1:1に対応させることが出来ることがわかつた。

表3 透析後の尿の持つ蓚酸カルシウム結晶成長抑制活性にしめるペプシノーゲンの割合

被検者	24時間尿中のペプシノーゲン濃度 (μg/ml)	尿中レベルのペプシノーゲンの活性**	被透析尿の活性***	尿中レベルのペプシノーゲン活性の被透析尿全活性に占める割合 (%)
R. G.	1.5	4.3	184.8	2.3
B. A.	1.0	3.7	128.4	2.9
T. B.	3.2	5.5	164.4	3.4
R. M.	0.2	1.7	216.0	0.8
B. W.	0.7	3.3	252.0	1.3
G. O.	1.0	3.7	180.0	2.1

* thymol 1gをあらかじめ加えて蓄尿した
** pepsinogen を assay tube に個々の尿中レベルとなるように加えた場合の抑制活性 (% oxalate in filtrate) と control との差 (%)
*** 被透析尿 1ml を total 12ml の assay tube に加えた場合の抑制活性 (% oxalate in filtrate) と control との差 (%) を12倍したもの

図3 chondroitin sulfate A, B, C, および hyaluronic acid と透析後のヒト尿との蓚酸カルシウム結晶成長抑制活性の比較

縦軸には抑制活性 (% oxalate in filtrate) を示す。各点は3回の測定値の平均±S.E.である。縦軸に示した chondroitin sulfate A, B, C, および hyaluronic acid の濃度は、その構成単位である disaccharide としての濃度(モル)である。すなわち、前三者は 43.5μg/ml, 後者は37.9μg/ml である。又横軸の右半分の I ~IV は4例のヒト尿を透析し、その1ml を total 12ml の assay tube に加えたことを示す。

5) 尿中レベルのペプシノーゲンが示す蓚酸カルシウム結晶成長抑制活性の被透析尿全活性に占める割合

6例の24時間尿を使用して、その尿中レベルの pepsinogen が持つ活性は透析後の尿の持つ活性にどの程度寄与しているかを調べた(表3)。尿中 pepsinogen レベルは0.2~3.2μg/ml の間であつた。この濃度の pepsinogen の活性は透析後の尿の持つ全活性の0.8~3.4%で

図4 コンドロイチン硫酸の構成単位である disaccharide unit の蓚酸カルシウム結晶成長抑制活性

すべての disaccharide unit の assay tube 中の濃度は 10^{-4} Mである。これらの構造式については考案の部参照。

あつた。したがつて、 pepsinogen は尿の主要な高分子 inhibitor ではないことが判明した。

6) コンドロイチン硫酸 A, B, C, およびヒアルロン酸と透析後のヒト尿との蓚酸カルシウム結晶成長抑制活性の比較

図3から分るごとく, chondroitin sulfate A, B, C (各 43.5μg/ml), および hyaluronic acid (37.9μg/ml) の活性は12倍に希釈された透析後のヒト尿の活性よりも弱い。この濃度はこれらの mucopolysaccharide の disaccharide unit 当りの濃度で表わすと 10^{-4} M である。ヒト尿中の mucopolysaccharide 濃度は10μg/ml 程度⁵⁾で、その約2/3は chondroitin sulfate といわれる⁶⁾ので、尿中の mucopolysaccharide は透析後の尿の持つ活性にさほ

ど寄与していないことが分る。

7) コンドロイチン硫酸の構成単位である disaccharide unit の硫酸カルシウム結晶成長抑制活性

Δ Di-4S と Δ Di-6S は全く活性を持たないのに対して、硫酸基を失った Δ Di-OS (考案参照) のみは、わずかではあるが、活性を示した (図4)。

考 按

胃で合成される pepsinogen の約1%は尿中に排泄されるといわれる²⁾。そして、尿中では活性型の pepsin ではなく、pepsinogen のままで存在する^{7,9)}。その尿中濃度は20~60 μ g/ml と報告された¹⁾。pepsinogen はそのアスパラギン酸およびグルタミン酸含量から予想された通り CaOx 結晶成長抑制活性を持つことが判明した。したがって、pepsinogen の尿中濃度が、報告されたように高いものであれば、これが尿中の高分子 inhibitor である可能性が考えられた。そこで、先ず、尿中の pepsinogen の定量を行なつてみた。著者は、はじめ24時間尿を-20°Cの freezer に蓄えた後、融解・濾過したものの pepsinogen を測定した。しかし、この操作後には pepsin 活性が落ちることが分つたので、チモール1gを、あらかじめ、蓄尿ビンに加えて24時間尿を集め、蓄尿の翌日に測定することとした。チモールは pepsinogen の定量に影響を及ぼさなかつた。なお、Bucherによれば、尿 pH が一定で、細菌が増殖しない場合には、尿中 pepsinogen は室温で4日間安定であるという⁹⁾。

著者が Herriott の方法⁴⁾で尿中 pepsinogen を測定した所、Gottlieb¹⁾の報告した値よりもはるかに低い値が得られた。そこで、個々の尿で、その尿に含まれている pepsinogen が示す活性は透析後の尿の持つ全活性のどの位の割合であるか調べた所、0.8%~3.4%という結果であつた。したがって、尿中 pepsinogen が尿の活性に少しは寄与していることは確かであるが、尿中の主要な inhibitor ではないということが判つたわけである。

次に、尿中高分子 inhibitor として Robertson ら³⁾は mucopolysaccharide を考えているので、これが尿中の主要な inhibitor であるかどうか検討した。尿中には血中と同様に、chondroitin sulfate などの proteoglycan 断片が10 μ g/ml 程度含まれると云われる⁹⁾。尿中 mucopolysaccharide の31%, 1%, 34%はそれぞれ chondroitin sulfate A, B, C がしめ、その他は chondroitin 25%, heparitin sulfate 8%, hyaluronic acid 1%, keratosulfate 1%であるという⁹⁾。したがって、chondroitin sulfate でほぼ尿中 mucopolysaccharide を代表できると考えた。

そこで、chondroitin sulfate の活性をみたわけであるが、透析後のヒト尿は12倍に稀釈されても、43.5 μ g/ml の chondroitin sulfate より活性が強かつた。この chondroitin sulfate の濃度は尿中のその約4倍と思われるので、尿中の mucopolysaccharide が尿のもつ全抑制活性にしめる割合はそれ程高くないであろう。ただ、ここで注意しなければならない点は inhibitor の濃度-活性曲線は semi-logarithmic (すなわち、inhibitor の濃度が10倍になつてはじめて活性は2倍になる)に近いので、このような単純な計算では間違いを起こす可能性はある。このことは pepsinogen の場合にもいえることである。以上より、mucopolysaccharide も尿中の主要な高分子 inhibitor ではないと考えられた。

一方、chondroitin sulfate がある程度の CaOx 結晶成長抑制活性をもつこともたしかめられた。ところで、p-nitrophenyl β -D-xyloside と 4-methylumbelliferyl β -D-xyloside が protein core と結合しない遊離の chondroitin sulfate の合成を刺激することが分つている^{10,11)}。したがって、これらの薬剤が結石形成を抑制する可能性はあるであろう。

図5 コンドロイチン硫酸の構造式

A: R₁ = SO₃H, R₂ = H

B: R₁ = SO₃H, R₂ = H

C5' epimer

C: R₁ = H, R₂ = SO₃H

A: chondroitin sulfate A

B: chondroitin sulfate B

C: chondroitin sulfate C

ここで、chondroitin sulfate (ChS) の構造式をみると図5のごとくであり、disaccharide unit が重合したものである。chondroitin sulfate は下に記すような様式で分解される¹³⁾。

結果の所で示したごとく、3つの disaccharide unit である $\Delta\text{Di-4S}$ 、 $\Delta\text{Di-6S}$ 、 $\Delta\text{Di-OS}$ のうち $\Delta\text{Di-OS}$ のみが少しではあるが活性を持っていた。すると、 $\Delta\text{Di-4S}$ および $\Delta\text{Di-6S}$ を分解して $\Delta\text{Di-OS}$ とする chondro-sulfatase が何らかの意味を持つている可能性もあろう。しかも、 SO_4^{--} は CaOx の溶解度を高めることが知られている¹⁴⁾。このことと関連して興味深いのは Foye ら¹⁵⁾ の報告である。Foye らによれば stone-former の尿中 mucopolysaccharide は正常人のそれに比して sulfation の度合が高度であるという。そして、高度に sulfated した mucopolysaccharide が Ca 結石形成の重要な因子であるとした。

以上、pepsinogen も chondroitin sulfate も尿中の主な高分子 inhibitor ではないことが判明したが、両者ともわずかでも尿の持つ活性に寄与していることも確からしい。とくに、chondroitin sulfate についてはなお検討の余地があるようである。

まとめ

pepsinogen は、そのアスパラギン酸およびグルタミン酸含量が高いことから予想された通り、比較的強い CaOx 結晶成長抑制活性を有していた。そこで、ヒト尿中 pepsinogen を定量したところ、報告されていた値よりはるかに少なかった。尿中 pepsinogen 濃度が Gottlieb の報告した値なら、その活性は高いことが期待されたが、個々の尿中に測定された濃度の pepsinogen の持つ活性は、透析後の尿のもつ全活性の0.8~3.4%ほどにしかなかった。よつて、pepsinogen が尿中の主な高分子 inhibitor であることは考えられない。

また、尿中の高分子 inhibitor は mucopolysaccharide であるとする説がある。しかし、尿中 mucopolysaccha-

ride の約2/3をしめる chondroitin sulfate の蔭酸カルシウム結晶成長抑制活性は強くなかった。したがつて、この説も受け入れがたい。

以上より、尿中の主な高分子 inhibitor は pepsinogen でもなく、mucopolysaccharide でもない未知の物質であると結論した。

文 献

- 1) Gottlieb, E.: Skand. Arch fur Physiol., **46**, 1, 1924.
- 2) Høstrup, H., Bastrup-Madsen, P.: Acta Med. Scand., **158**, 193, 1957.
- 3) Robertson, W.G., Knowles, F., Peacock, M.: In: Urolithiasis Research, edited by H. Fleisch, W.G. Robertson, L.H. Smith and W. Vahlensieck, London, Plenum, **1976**, p 331—340.
- 4) Herriott, R.M., In: Methods in Enzymol., **2**, 3, 1955. Academic Press, New York.
- 5) 鈴木 旺: In: 生化学実験講座 10. 糖質の代謝, pp. 485—508, 日本生化学会編, 東京化学同人, 1975.
- 6) Varadi, P., Cifonelli, J.A. and Dorfman, A.: Biochem. Biophys. Acta, **141**, 103, 1967.
- 7) Seijffer, M.J., Segal, H.L. and Miller, L.L.: Am. J. Physiol., **206**, 1106, 1964.
- 8) Samloff, I.M. and Townes, P.L.: Gastroenterology, **58**, 462, 1970.
- 9) Bucher, G.R.: Gastroenterology, **8**, 627, 1947.
- 10) Fukunaga, Y., Sobue, M., Suzuki, N., Kushida, H., Suzuki, S. and Suzuki, S.: Biochim. Biophys. Acta, **381**, 443, 1975.
- 11) Okayama, M., Kimata, K. and Suzuki, S.: J. Biochem., **74**, 1069, 1973.
- 12) Galligani, L., Hopwood, J., Schwartz, N.B. and Dorfman, A.: J. Biol. Chem., **250**, 5400, 1975.
- 13) Saito, H., Yamagata, T. and Suzuki, S.: J. Biol. Chem., **243**, 1536, 1968.
- 15) Foye, W.O., Hong, H.S., Kim, C.M. and Prien, E.L. Sr.: Invest. Urol., **14**, 33, 1976.

(1978年3月9日受付)