尿中 Arylsulfatase A の研究

丸 彰 夫
三 橋 公 美
北海道大学医学部泌尿器科 小 杉 雅 郎
(主任: 小柳知彦教授) 関 利 盛
小 柳 知 彦

A STUDY OF ARYLSULFATASE A IN HUMAN URINE

Akio Maru, Kimiyoshi Mitsuhashi, Masao Kosugi,
Toshimori Seki and Tomohiko Koyanagi

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan
(Director: Prof. T. Koyanagi)

Arylsulfatase A activity was measured in urine from patients with various genitourinary tract disorders.

When the enzyme activity was expressed on the basis of volume or protein amount of urine, no significant difference was found between normal and affected urine. However, the arylsulfatase A in affected urine was significantly heat labile as compared with control urine enzyme, although the heat stability test at 62.5°C for 10 min could not differentiate the urinary tract disorders each other.

Upon isoelectric focusing, the pI (5.2–5.3) for the arylsulfatase A of nephrostomic urine, which showed remarkably lower activity and lower heat stability than that of normal voided urine in patients with congenital obstruction of the pelvi-ureteric junction and voided urine in a half of patients with advanced bladder cancer or renal cell carcinoma was clearly different from the pI (4.6–4.7) of the enzymes in healthy and the other urogenital disorders. Furthermore, the nephrostomic and voided urine enzyme were found to have different immunological characteristics. These results suggest that the arylsulfatase A from nephrostomic and voided urine is an enzyme of a different type.

要旨: 泌尿器疾患を主とした各種疾患の尿中 Arylsulfatase A (ASA) 活性を測定して次の結果をえた。

1) 各種泌尿器疾患における単位尿量および単位蛋白量あたりの ASA 活性は、正常人尿と疾患尿との間で有意差を認めなかった。

2) 各種疾患群の尿 ASA は熱処理 (62.5°C, 10分間) に対して正常群に比し著るしく不安定であった。しかし各種疾患相互を区別することは出来なかった。

3) 尿 ASA の等電点分画を行うと、先天性腎盂尿管移行部狭窄症術後患者の腎瘻尿および約半数の腎癌、浸潤性膀胱癌患者の膀胱尿の PI は 5.2–5.3 であるのに対し、正常人および他の各種疾患の膀胱尿、尿管尿の PI は 4.6–4.7 であった。

4) 腎瘻尿 ASA は膀胱尿 ASA に比し約 1/7 の活性しか示さず、熱処理に対しても著るしく不安定であった。また両酵素は等電点および抗原性も異にしており、腎瘻尿 ASA は従来から研究されてきた膀胱尿 ASA とは異なるタイプの酵素であると思われる。

結 言

尿中には種々の酵素が存在し、 β -glucuronidase^{1)~4)}, lactic dehydrogenase⁵⁾⁶⁾, alkaline phosphatase⁷⁾, poliamine⁸⁾⁹⁾ などが、尿路腫瘍においてその活性が上

昇し、診断や予後の判定の指標になりうるとの報告がなされているが、未だ臨床的に確立されておらず、今後の研究が待たれるところである。

Posey ら¹⁰⁾は膀胱癌患者の尿中の Arylsulfatase A,

B(以後, ASA, ASB と略), Alkaline phosphatase 及び lactic dehydrogenase 活性を測定し, 活動期の膀胱癌患者での ASA, ASB は正常群に比べ, 高値を示し, 早期発見に対してのスクリーニングに役立つ可能性を報告している。

今回, 著者らは ASA について, 各種泌尿器疾患や子宮癌など他領域の癌患者の尿中の活性を測定し, さらに生化学的に検討を加えたので報告する。

対 象

泌尿器科疾患として, 先天性腎盂尿管移行部狭窄症, 腎盂腎炎, 尿道膀胱炎, 膀胱腫瘍, 睪丸腫瘍, 前立腺癌, 腎癌を対象とし, 他領域疾患としては, 子宮癌, 直腸癌, 胃癌, 膵頭部癌患者の尿及び正常成人男子の尿を対象とした。

方 法

1) ASA 活性測定法

Baum¹¹⁾らの方法により, 原則として早朝尿を3,000回転で10分間遠心し, その上清を0~4℃脱イオン水で18~24時間透析し, この0.5mlと人工基質(p-nitrocatechol sulfate) 0.5mlを混ぜ, 37.5℃で1時間incubateした後, 1規定加性ソーダ1.5mlを加え, 反応を停止させた後, 515nmで比色した。

2) 蛋白定量法

Lowry 法¹²⁾の方法により測定した。

3) 熱処理

透析した尿0.5mlを62~63℃に10分間おき, 液体窒素で急速冷却して反応を止め, その後融解させ, ASA活性を測定して無操作時の活性に対する低下率を検討した。

4) 等電点分画

対象尿を50%の硫酸分画し, 脱イオン水で18~24時間透析したものを, anpholine pH 4~6で, 4℃以下, 500voltで48時間泳動した後, ASA活性を測定した。

5) Disc 電気泳動

Ornstein & Davis¹³⁾の方法により, 7.5%アクリルアミドディスク電気泳動をおこなった。

6) 膀胱尿 ASA の精製

正常成人男子尿20lを硫酸分画(50%飽和)し, DEAE Cellulose, Con A Sepharose, Sephadex G200のクロマトを順次おこない, 約500倍まで精製した(表1)。

7) 抗体の作成

上記の如く, 膀胱尿から精製したASA酵素のディスク電気泳動をおこない, 活性染色した後, 活性部分を切り取り, アジュバンドと混ぜ, 2カ月間に3回ウサギに免疫して抗体を作成した。抗血清は硫酸分画(50%飽和)後, DEAE CelluloseのクロマトをおこないIgGまで精製した。

結 果

1) ASA 活性値

各種泌尿器疾患におけるASA活性値は, 図1に示す如く, 一定尿量(1ml)あたりの活性は, 正常人尿に比べ膀胱腫瘍, 睪丸腫瘍, 前立腺癌, 腎癌で比較的高値を示しているが有意差はない(t検定)。

単位蛋白量あたりの活性でも, 疾患群と正常群の間で有意差はない。

2) 熱処理による活性低下率

正常人尿及び膀胱腫瘍患者尿各3症例について, 62.5℃で2.5分, 5分, 10分, 20分間の熱処理後のASA活性(50μg蛋白量)の低下率をみると, 図2の如く, 正常人尿では, 10分間熱処理後の活性低下率が20%以内であるのに比べ, 膀胱腫瘍例では, 70%以上の低下率を示した。

正常成人男子, 膀胱腫瘍, 睪丸腫瘍及び尿道膀胱炎について, 62.5℃ 10分間の熱処理によるASA活性の低下率について検討してみると, 正常人尿に比べ, 各疾患群の尿は熱に対して著しく不安定であり, 正常群と疾患3群との間では, $p<0.001$ 以下で有意の差を認

表1 正常人膀胱尿20lからのASAの精製

Procedure	Protein (mg)	S.A. (units/mg)	Total activity (units)	Yield (%)	Purification (-fold)
Urine	2650	0.005	13.3	100	1
AmSO ₄ (0-50%)	630	0.02	12.6	94.7	4
DEAE-Cellulose	11	0.33	3.6	27.1	66
Con A-Sepharose	1.74	1.16	2.0	15.0	232
Sephadex-G 200	0.75	2.31	1.7	12.8	462

図1 一定尿量，単位蛋白量あたりの ASA 活性

図2 熱処理後（62.5℃）の活性低下率

図3 熱処理後（62.5℃，10分間）の活性低下率

めたが，尿道膀胱炎群と膀胱腫瘍群，睪丸腫瘍群の間には有意差はなかった（図3）。

先天性腎盂尿管移行部狭窄術後の患者の腎瘻尿と膀胱尿の熱処理による影響をみると，図4の如く，膀胱尿に比較して腎瘻尿は熱に対して著しく不安定であった。

3) 等電点分画

a) 図5の如く，正常人尿の場合は，pH 4.7に大きなピーク I と pH 5.25に小さなピーク II を認めた。G1 pT₂ の移行上皮癌の場合も正常例とほぼ同様のパターンを示したが，G3pT₃b の浸潤癌では，pH 4.75に大きなピーク I と pH 5.35に大きなピーク II を認めた。

b) 図6は男子の先天性腎盂尿管移行部狭窄症の腎盂形成術後の自排尿と腎瘻尿の等電点分画で，自排尿では pH 4.6に大きなピーク I があり，腎瘻尿では pH 4.7に小さなピーク I，pH 5.0にやや大きなピークがあり，pH 5.2に更に大きなピーク II を認めた。

c) 図7は外傷性尿道狭窄患者の膀胱瘻尿の等電点分画で pH 4.6のピーク I が pH 5.3のピーク II より大きい。

d) 図8は膀胱上皮内癌で，膀胱全摘，両側尿管皮膚瘻術後の患者尿の等電点分画である。tubeless 尿では pH 4.7にピーク I を認め，intubated 尿では pH 5.3に大きなピーク II を認めた。

e) 表2は子宮癌など泌尿系以外の癌疾患および種々の泌尿器疾患の膀胱尿，腎瘻尿，尿管瘻尿などを等電点分画し，症例7に示すごとく，pH 4.6～4.7にあるピーク I を V-type，pH 5.2～5.3にあるピーク II を

図4 腎瘻尿と膀胱尿の熱処理後(62.5℃)の活性低下率

図5 膀胱尿の等電点分画

図6 先天性腎盂尿管移行部狭窄症術後の腎瘻尿と膀胱尿の等電点分画

N-type として、活性値を N/V 比で表示した。即ち、N/V が 1.0 以上では、ピーク II がピーク I より高いことを示す。結果は子宮頸癌と腎切石術後の腎瘻尿、腎

図7 膀胱瘻尿の等電点分画

図8 両側尿管皮膚瘻尿の等電点分画

図9 ディスク電気泳動(等電点分画後)

a) 膀胱尿 pH 4.6 の蛋白染色。b) 腎瘻尿 pH 5.2 の蛋白染色。c) 膀胱尿 pH 4.6 の ASA 活性染色(矢印)。d) 腎瘻尿 pH 5.2 の ASA 活性染色(矢印)。

結核および膀胱癌術後の intubated 尿管皮膚瘻尿および腎癌 4 例中の 2 例の膀胱尿で N/V 比が 1.0 以上を示した。表 3 は膀胱移行上皮癌 7 例の N/V 比をみたもので、全例術前の膀胱尿を対象としているが、うち 3 例で 1.0 以上を示した。しかし、腫瘍の発育様式、異形度、深達度による差は認めなかった。

表2 各種疾患の等電点分画における等電点比
(N=PI 5.2~5.3
V=PI 4.6~4.7)

症例	年齢	性	臨床診断	採尿法	N/V比
1	68	女	子宮内膜癌	膀胱	0.16
2	61	女	直腸癌	膀胱	0.52
3	55	男	膵頭部癌	膀胱	0.08
4	65	男	胃癌	膀胱	0.26
5	61	女	子宮頸癌	腎瘻	1.50
6	34	女	腎結石	腎瘻	6.80
7	34	男	尿路結核	尿管皮フ瘻 チューブ入	1.65
8	53	男	膀胱肉腫	回腸導管	0.07
9	63	男	前立腺癌	膀胱	0.13
10	65	男	膀胱上皮内癌	尿管皮フ瘻 チューブ入	7.59
				尿管皮フ瘻 チューブなし	0.16
11	57	女	腎癌(肺転移)	膀胱	1.27
12	56	男	腎癌	膀胱	0.12
13	53	女	腎癌	膀胱	0.27
14	31	男	腎癌	膀胱	1.17

4) Disc 電気泳動

先天性腎盂尿管移行部狭窄術後患者の膀胱尿と腎瘻尿を等電点分画して得られた pH 4.6 と pH 5.2 の尿を Disc 電気泳動にかけて活性染色をおこなったが、図 9 の如く、ほぼ同じ位置に染色された。

5) 腎瘻尿と膀胱尿の生化学的検討

比活性：腎瘻尿は膀胱尿の約1/7であった。基質(p-nitrocatechol sulfate)に対する Km と Vmax : Km は膀胱尿で1.7mM、腎瘻尿で2mM とほぼ同じ値を示した。Vmax は腎瘻尿が膀胱尿の約1/100であった。

6) 免疫学的結果

表3 膀胱癌(移行上皮)の等電点分画における等電点比

症例	年齢	性	発育形態	異形度	深達度	N/V比
1	65	男	乳頭状有茎, 単発	G2	pT1	0.17
2	67	男	乳頭状有茎, 多発	G3	pT3a	0.20
3	72	男	乳頭状有茎, 多発	G1	pT1	0.90
4	69	女	非乳頭状, 多発 広基性	G3	pT3a	0.46
5	59	女	乳頭状有茎, 多発	G2	pT2	1.64
6	54	男	乳頭状有茎, 多発	G3	pT3a	1.13
7	66	女	乳頭状有茎, 多発	G3	pT3a	2.67

正常成人男子膀胱尿から精製した(表1)ASAを用いて、方法7)の如き方法で作成した抗体を用いておこなった Mancini¹⁴⁾、Ouchterlony¹⁵⁾どちらの方法でも図10に示す如く、膀胱尿及び膀胱瘻尿とは沈降線をつくるが、腎瘻尿とは沈降線をつくらず、免疫電気泳動(図11)においても同様の結果をえた。

考 按

Arylsulfatase は動植物界に広く分布し、人工基質アリル硫酸を用いて分析される酵素で、哺乳類には、リソゾーム由来の可溶性で酸性のシアル酸糖蛋白質であるタイプA、可溶性で塩基性蛋白質のタイプB、およびマイクロソーム起源で膜結合不溶性のタイプCが知られており、人の遺伝性疾患である異染性脳白質ジストロフィーの患者にタイプAの Arylsulfatase が特異的に欠損もしくは減少していることの発見¹⁶⁾¹⁷⁾により、ASA の機能と酵素的性質が明らかとなってきた¹⁸⁾。一方、ASA 活性の増加が観察される疾患としては、筋ジストロフィー患者の筋肉の中で、他のリソゾーム活性の上昇とともに認められている¹⁹⁾。又各臓器間において、ASA は腎臓に最も高い活性を示し、その値の1/5~1/10の活性が肝、膵、脾、心、肺に分布し、尿、血清、唾液、人乳などにも存在しており、人尿²⁰⁾や各種動物臓器の ASA の精製に成功している。

Posey ら¹⁰⁾は活性期の膀胱癌患者尿の ASA は、正常群に比べ、明らかな活性の上昇を認めているが、著者ら²¹⁾の場合は、対象が異形度、深達度とも種々であることや、1日尿量による測定でないことが関与しているのか、単位尿量、単位蛋白量による尿中 ASA 活性値

図10 Single radial immunodiffusion (Mancini 法)

N₁, N₂ : 腎瘻尿, V₁ : 膀胱尿, V₂ : 膀胱尿1/2希釈, C₁ : 膀胱瘻尿, C₂ : 膀胱瘻尿1/2希釈

Doube immunodiffusion (Ouchterlony 法)

N : 腎瘻尿, V : 膀胱尿, C : 膀胱瘻尿, Ab : Anti-V 抗体

図11 免疫電気泳動
Immunoelectrophoresis

C : 膀胱瘻尿, V : 膀胱尿, N : 腎瘻尿, Ab : 抗膀胱尿抗体

Crossed immunoelectrophoresis

矢印, 活性染色 (膀胱尿)

の測定では、正常群と疾患群の間に有意差は無く、何らかの差を検索すべく、熱処理による方法で検討した。

基礎的実験において、正常群、膀胱腫瘍群ともに、50℃、20分間の熱処理では活性の低下率に変化なく、62.5℃、10分間の熱処理で明らかな活性の低下率の差を認めた(図2)。しかし、この方法では、炎症性疾患と癌との鑑別は出来ず、臨床的には役立たない結果であった。

そこで、等電点分画による検討をおこなった。正常人尿や low grade, low stage 膀胱腫瘍及び泌尿器以外の癌疾患患者尿では、pH 4.7前後に大きなピーク(ピーク I)を認め、pH 5.2前後に、ごく小さいピーク(ピーク II)がみられる。これに対し、浸潤性膀胱癌の1例では、ピーク II が著明に増大した(図5)。

このピーク II が何に由来するかを知るために以下の実験をおこなった。

まず、このピーク I, II についてディスク電気泳動をおこなったが、活性染色、蛋白染色による移動度の差はなかった(図9)。

次いで、膀胱尿ばかりでなく、腎瘻尿など各種尿路変更尿について検討した。先天性腎盂尿管移行部狭窄例の術後の腎瘻尿および膀胱尿では、図6の如く、膀胱尿では main peak が pH 4.7にあるのに対し、腎瘻尿の main peak は pH 5.2にあり、他の同様な疾患の腎瘻尿についても同様の等電点(PI)を示した。図8に示すごとく、膀胱上皮内癌で膀胱全摘および両側尿管皮膚瘻術を施行した例の、tubeless 側では pH 4.7に、intubated 側では pH 5.3に main peak を認めたこと、および表2、表3のごとく、N/V 比が1.0以上、即ちピーク II の方が大きい等電点を示した例は、一部の腎癌および浸潤性膀胱癌の膀胱尿を除けば、各種疾患の腎瘻尿、intubated 尿管皮膚尿に認められたことから、腎盂内尿と尿管、膀胱尿の ASA は異なるタイプの酵素ではないかと考えられた²²⁾。

そこで、この事実を確認するために、膀胱尿と腎瘻尿 ASA 酵素の生化学的、免疫学的な差を検討した²³⁾。

生化学的には、至適 pH は両者ともほぼ pH 5.0にあり、基質の p-nitrocatechol sulfate に対する Km(ミカエリス定数)は膀胱尿で1.7mM、腎瘻尿で2mM とほぼ同じ値を示し、分子量はともに130,000程度であり、両者に対する種々の試薬の影響にも差はなかった。しかし、等電点分画で、膀胱尿酵素は等電点が pH 4.7に存在するが、腎瘻尿酵素は pH 5.2に認める(図6)。

熱安定性についても図2のごとく、膀胱尿の ASA は 62.5℃、20分間の熱処理をおこなっても約90%の活性を保持して安定であるが、腎瘻尿酵素は、5分間の加熱で22%まで活性は減少し、熱に対して著しく不安定であり、なおかつ蛋白量あたりの活性が低かった(約1/7)。また腎瘻尿酵素の最大反応速度(V max)は膀胱尿酵素の約1/100であった。

免疫学的検討からは、Ouchterlony, Mancini 法により、抗膀胱尿酵素 IgG は膀胱尿酵素とは沈降線をつくるが、腎瘻尿酵素とは反応せず、これの免疫学的特異性は免疫電気泳動でも確かめられた(図10, 11)。

以上のことから、腎瘻尿の ASA は、従来から研究されてきた膀胱尿 ASA とは異なるタイプの酵素と考えられる。又先に述べたが、一部の腎癌、浸潤性膀胱癌で膀胱尿であるにもかかわらず等電点が pH 5.2~5.3(N-type)を示すものがあり、この点については非常に興味があるが、因果関連は不明である。

尿中 ASA について臨床的に検討した報告は散見されるが、膀胱尿や尿管尿の活性についての検討であり^{24)~26)}、我々のように腎瘻尿との違いを生化学的に研究した文献は見あたらない。ASA と同様にリソゾーム由来の酵素である β -glucuronidase については、米瀬²⁷⁾が各種泌尿器疾患の膀胱尿と腎尿の活性の差を調べ、膀胱尿が腎尿より高値を示したものは、悪性膀胱腫瘍および前立腺癌であり、その他の疾患には両者間の差は無く、左右腎尿の酵素活性に差が認められたのは、腎盂尿管乳頭腫瘍例のみであり、腫瘍と尿の接触による酵素活性の移行が、尿中活性値を上昇せしめる主因であるとしている。また千田ら²⁸⁾も β -glucuronidase 活性は正常人では分腎瘻尿に差は無く、腎尿と膀胱尿との間にも差は認められず、膀胱癌患者では、膀胱尿の活性値は高値を示したにもかかわらず、左右分腎尿は大略正常値を示したとしている。

今回の我々の研究では、いかなる過程で腎瘻尿と膀胱尿で ASA の差が生じたか、また等電点分画で膀胱尿でも腎癌、浸潤性膀胱癌の半数以上に腎瘻尿型を示した原因については、今後さらに検討したいと思っている。

結 語

正常成人男子及び泌尿器科疾患を主とした各種疾患の尿中 Arylsulfatase A (ASA) 活性を測定し、次の結果をえた。

1) 各種泌尿器疾患における単位尿量および単位蛋白量あたりの ASA 活性値は、正常成人男子尿と疾患

尿との間で有意差を認めなかった。

2) 62.5°C, 10分間, 熱処理後の ASA 活性値の低下率は, 正常人尿に比べ各疾患群の尿は, 熱に対して著るしく不安定であり, 正常群と疾患群との間では $p < 0.001$ で有意差を認めたが, 尿道膀胱炎群と膀胱腫瘍, 睪丸腫瘍群との間には有意差は無かった。

3) 先天性腎盂尿管移行部狭窄症術後患者の腎瘻尿 ASA は膀胱尿 ASA に比べ活性が低く, 又熱処理後の ASA 活性は膀胱尿に比べ, 腎瘻尿は著るしく熱に不安定であった。

4) 等電点分画により, 正常成人男子尿および各種疾患膀胱尿, tubeless の尿管皮膚瘻尿では, 等電点が pH 4.6~4.7 であるのに対し, 各種疾患の腎瘻尿, intubated 尿管皮膚瘻尿および腎癌, 浸潤性膀胱癌の半数の膀胱尿では pH 5.2~5.3 に等電点を認めた。

5) 先天性腎盂尿管移行部狭窄症術後患者の腎瘻尿と膀胱尿 ASA は, 等電点, 熱安定性, 最大反応速度 (V_{max}) を異にした。

6) 正常成人男子膀胱尿から ASA を精製し, ウサギに免疫して作成した抗体を用いた免疫学的検討 (Mancini, Ouchterlony, 免疫電気泳動法) から腎瘻尿と膀胱尿酵素は抗原性を異にした。

以上のことから, 腎瘻尿の ASA は従来から研究されてきた膀胱尿 ASA とは異なるタイプの酵素であり, 一部の腎癌や浸潤性膀胱癌の膀胱尿では腎瘻尿タイプの等電点も示すことから, その意味づけが今後の課題として残されている。

稿を終わるにあたり, 御指導戴いた本学医学部第2生化学教室, 今井陽教授, 石橋輝雄助教授ならびに医学部附属癌研生化学教室, 牧田章教授に深謝致します。

なお, 本論文の要旨は第51回日本生化学会大会および第67回, 第68回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Boyland, E., Wallace, D.M. and Williams, D.C.: Urinary enzymes in bladder cancer. *Brit. J. Urol.*, 27, 11—14, 1955.
- 2) 東 国雄: 泌尿器科領域に於ける尿中 β -Glucuronidase の研究 (β -Glucuronidase の研究第一報)。日泌尿会誌, 49, 50—73, 1958.
- 3) 園田孝夫: β -Glucuronidase の生化学的並びに組織学的研究 (泌尿器科領域に於ける酵素の研究: 第一報)。日泌尿会誌, 53, 163—178, 1959.
- 4) 今村一夫: 尿中及び血清中の β -Glucuronidase の研究特に前立腺癌に於ける治療による組織変化と該酵素との関係について。日泌尿会誌, 53, 613—654, 1962.
- 5) Wacker, W.E.C. and Dorfman, L.E.: Urinary lactic dehydrogenase activity. *J.A.M.A.*, 181, 972—978, 1962.
- 6) Riggins, R.S. and Kiser, W.S.: A study of lactic dehydrogenase in urine and serum of patients with urinary tract disease. *J. Urol.*, 90, 594—601, 1963.
- 7) Amador, E., Zimmerman, T.S. and Wacker, W.E.C.: Urinary alkaline phosphatase activity. *J.A.M.A.*, 185, 769—775, 1963.
- 8) Russell, D.H., Levy, C.C., Schimpff, S.C. and Hawk, I.A.: Urinary poliamines in cancer patients. *Cancer Res.*, 31, 1555—1558, 1971.
- 9) 赤坂雄一郎, 町田豊平, 田中 彰: 尿路悪性腫瘍と尿中ポリアミン。臨泌, 35, 657—663, 1981.
- 10) Posey, L.E. and Morgan, L.R.: Urinary enzyme activity in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin. Chim. Acta*, 74, 7—10, 1977.
- 11) Baum, H., Dodgson, K.S. and Spencer, B.: The assay of arylsulfatases A and B in human urine. *Clin. Chim. Acta*, 4, 453—455, 1959.
- 12) Lorwy, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Ramdall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
- 13) Ornstein, L. and Davis, B.J.: Disc electrophoresis-I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321—427, 1964.
- 14) Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2, 235—254, 1965.
- 15) Ouchterlony, O.: Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 26, 507—515, 1949.
- 16) Austin, J., McAfee, D. and Shearer, L.: Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis. *Arch. Neurol.*, 12, 447—455, 1965.
- 17) Austin, J., Armstrong, D. and Shearer, L.: Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis. *Arch. Neurol.* 13, 593—614, 1965.
- 18) 岩森正男: アリルスルファターゼ, 蛋白質・核酸・酵素, 22, 191—208, 1977.
- 19) Maggio, B., Maccioni, H.M. and Cdmar, F.A.: Arylsulfatase A activity in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurochem.*, 20, 503—510, 1973.
- 20) Stevens, R.L., Fluaharty, A.L., Skokut, M.H. and Kihara, H.: Purification and properties of arylsulfatase A from human urine. *J. Biol.*

- Chem., 250, 2495—2501, 1975.
- 21) Maru, A., Ishibashi, T., Imai, Y., Makita, A. and Tsuji, I.: Arylsulfatase A activity of urine in patients with various genitourinary tract disorders. *Clin. Chim. Acta*, 107, 155—161, 1980.
- 22) Kosugi, M., Maru, A., Mitsuhashi, K., Koyanagi, T., Ishibashi, T. and Imai, Y.: Clinical significance of a variant form of urinary arylsulfatase A. *Japan. J. Exp. Med.*, 53, 73—76, 1983.
- 23) Ishibashi, T., Maru, A., Imai, Y., Makita, A. and Tsuji, I.: A variant form of arylsulfatase A in human urine derived directly from the renal pelvis. Kinetic and immunological characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 616, 218—227, 1980.
- 24) Boyland, E., Wallace, D.M. and Williams, D.C.: The activity of the enzymes sulphatase and β -glucuronidase in the urine, serum and bladder tissue. *Brit. J. Cancer*, 9, 62—79, 1955.
- 25) Dzialoszynski, L.M.: The clinical value of arylsulfatase estimation in urine. *Clin. Chim. Acta*, 2, 542—547, 1957.
- 26) Dzialoszynski, L.M. and Gniot-Sznlsycka, J.: Some clinical aspects of arylsulfatase activity. *Clin. Chim. Acta*, 15, 381—386, 1967.
- 27) 米瀬泰行: 泌尿器科領域における β -Glucuronidase の研究. *日泌尿会誌*, 54, 211—238, 1963.
- 28) 千田八朗, 瀬川昭夫, 三矢英輔: 膀胱腫瘍と β -Glucuronidase. *日泌尿会誌*, 60, 331—345, 1969.
(1983年10月28日受付)
-