慢性関節リウマチ患者の血清 sialyltransferase 活性の等電点カラム電気泳動法による解析

渡辺勇四郎・藤井 守・岡部和彦・須階二郎*, 吉沢久嘉**

Studies on sialyltransferase in serum from patients with rheumatoid arthritis In order to clarify the specificity of serum sialyltransferase in patients with rheumatoid arthritis (RA), we studied the serum which was free of platelet components, by isoelectric focusing. Isoelectric focusing was performed using isoelectric focusing apparatus (110 ml capacity). 2.5% ampholine (pH 3-10) were used in a gradient of 0-50 w/v % sucrose. The starting amperage was 3.0 mA and 800V. After 23 hours the voltage was adjusted to 1400V. Electrofocusing was conducted for 47 hours at 0-1°C. After electrofocusing 2.0-ml fractions were collected. 30- μ l aliquots of each fraction were assayed for asialofetuin sialyltransferase activity using CMP-(9-³H) sialic acid as substrate. Isozymic forms were showed at pI 4.20, 4.65, 5.10, 6.20 and 6.80 in serum from patient with RA. Platelet lysate showed a large peak of ST activity at pI. 6.20.

Concludingly, we found by isoelectric focusing that acid ST isozymic forms were in serum and that platelet-derived ST (pI 6.20) was contaminated in circulating plasma.

Yoshiro Watanabe・Mamoru Fujii・Kazuhiko Okabe・Jiro Sugai*
Hisayoshi Yoshizawa**

*The Second Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine

**National Sagami Hospital Research Center of Rheumatoid Arthritis

key words: rheumatoid arthritis, isoelectric focusing,
serum sialyltransferase, sialic acid, isozymic form

慢性関節リウマチ (RA) 患者の血清では、急性相反応物質¹⁾ やシアル酸²⁾ が増加し、臨床的に重要な指標とされている。糖蛋白や糖脂質の糖鎖にシアル酸を転移する酵素である sialyltransferase (EC 2.4.99.1 CMP-N-acetylneuraminatase; D-galactosylglycoprotein N-acetylneuraminyltransferase) (ST) 活性も、RA 患者血清で上昇する³⁾。しかしながら、炎症時に血清で上昇する ST 活性の生理的意義、由来臓器や疾患の特異性はまだ明らかにされたわけではない。ST 活性は血小板にも多量に存在し⁴⁾、血清を作製する際に血小板 ST が多量に血清中に混入することが明らかにされている⁵⁾。特に RA 患者では、血小板が増加する症例がある⁶⁾ ことから、RA 患者の血清で上昇する ST 活性の特異性を明らかにするためには、血清から血小板由来の ST 活性を除去して解析することが必要であると考えられる。酵素の isozymic form の違いは、種々の糖鎖分子の分布の違いによることが知られ、新しい興味の対象とされている⁷⁾。

この論文では、血清作成時に生ずる血小板 ST の混入を除去した血清を作成し、従来の血清と比較しながら

ら、等電点電気泳動法で解析し、RA 患者で上昇する血清 ST 活性の疾患特異性を得ようと試みた。

材料と方法

(1) 材料

ampholine carrier ampholite (pH 3-10) は Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala 社 (Sweden) より購入した。CMP-[9-³H] sialic acid (18.9 Ci/mmol) は、New England Nuclear 社 (Boston, Mass. USA) より、fetuin (Type III) は Sigma 社 (St. Louis, Mo USA) より購入した。他の試薬は市販の分析用試薬を用いた。

(2) 対象

国立相模原病院リウマチ特殊外来に通院中の RA 患者10例および健康成人10名を対象とした。

(3) 血清

肘静脈より採血し、1分血清と60分血清を作製し、測定まで -70°C に保存した。1分血清 (1'-S) とは採血後1分以内にフィッシャー遠心機59型を用いて 5,000 ×g、2分間遠心、血球成分を除き、上清の血漿をガラス試験管に移し、室温 (20~25°C) で60分間放置後、フィブリン塊を除いた血清で、血液凝固時に生ずる血小

*聖マリアンナ医科大学第二内科教室

**国立相模原病院リウマチ特殊外来

板 ST および血小板内容物の血清中への混入を避ける目的で作成された血清である。60分血清 (60'-S) とは採血後ガラス試験管中で室温に60分間放置し、十分凝固させた後、1,500×g, 15分間遠心分離した血清で、従来の血清とほぼ同一である。

(4) 血小板 lysate

健康成人4名より 3.13% sodium citrate 1容に血液9容を採血し、血小板を分離、15% acid-citrate-dextrose-anticoagulant (ACD-A) を含むリン酸緩衝液 (PBS) (ー) で3回洗浄後に得られた 10.8×10^8 血小板を、非働化 (56°C 30分) した健康者の 1'-S に浮遊、凍結融解を6回行い、血小板を破壊、4°C で 2,000×g, 30分間遠心、その上清を血小板 lysate とした。

(5) 血清シアル酸の測定法

チオバルビツール酸法⁹⁾ で測定した。

(6) 血清 sialyltransferase 活性の測定法

既報に従って測定した。

(7) 血清の等電点カラム電気泳動

① 対象

患者は73歳の女性で、31年前に RA と診断され、寛解と再燃を繰り返し、増悪期にあった。血液検査では CRP (3+), RA (2+), 赤沈 80 mm/1h, 血小板数 $42.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ と増加。血清シアル酸は 116.0 mg/dl, ST 活性は 1'-S では 11,956 dpm/min/ml で 60'-S では、16,450 dpm/min/ml とともに高値であった。対照は40歳の健康男性で、3週間以上は薬物の服用がなかった。

② 方法

容量 110 ml の等電点電気泳動用カラムを既報⁹⁾ に従って作製して用いた。ampholine (pH 3-10) の濃度を 2.5% とし、10v/v % glycerin を含む 50-0 w/v % sucrose で linear gradient を作製、血清 1.5ml をカラムの中間位に添加した。800V 23時間、さらに 1400V, 24時間泳動した。泳動中のカラムの温度は循環装置 (Iwaki Magnetic Pump) を用いて 0~1°C とした。泳動終了後、カラム内容はカラム底から流出させ、2 ml/fraction/70秒で分画した。フラクションの ST 活性および pH は直ちに測定した。

③ ST 活性

CMP-[9-³H] sialic acid を基質とし asialofetuin を受容体として測定した。反応混合液はフラクション内容 30 μl , 107.4 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 70 μl , 0.1M MgCl₂ 10 μl , 0.1M MnCl₂ 10 μl , asialofetuin 20 μl (蛋白質として約 300 μg), 蒸留水 7.5 μl および CMP-[9-³H] sialic acid 2.5 μl (0.25 μCi) からなり、氷水中で作成した。37°C の恒温槽中で正確に30分間反応させ、0.1N HCl の 1% 隣タングステン酸溶液 2.0ml を加え反応を停止した。以後の操作は血清の場合と同様に行い、酵素活性を求めた。非働化 (56°C 30分) し

図1 sialyltransferase activity in serum (1'-S) which was free of platelet components was well correlated with serum sialic acid value ($r=0.79$, $p<0.01$)

たフラクションで ST 活性を求めブランクとした。asialofetuin は酸水解放法¹⁰⁾で調製した。

④ シアル酸量

Bensadoun & Weinstein の方法¹¹⁾ で sucrose および ampholine を除去し、Warren 法⁸⁾ で測定した。

⑤ pH

Expandomatic SS-2, Beckman, UK を用い、4°C で測定した。

(8) 加熱失活

加熱による酵素の失活は 37°C 120分間あるいは 56°C 20分間の加熱後に ST 活性を測定して求めた。フラクション内容の場合にはそれぞれに終濃度 50mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加え pH を 7.4 とした後、加熱した。

成績

(1) 血清シアル酸値と ST 活性

RA 患者の血清シアル酸値は 90.0 ± 13.7 mg/dl と健康者の 66.9 ± 2.0 mg/dl に比べ明らかな高値 ($p<0.01$) であった。血清シアル酸値は 1'-S と 60'-S 間に差を認めなかった。1'-S の ST 活性は RA 患者では $9,506.1 \pm 2,116.3$ dpm/min/ml と健康者の $6,304.0 \pm 1,431.5$ dpm/min/ml に比べ、明らかに高値 ($p<0.01$) であった。RA 患者ではシアル酸値と 1'-S の ST 活性が $r=0.79$ ($p<0.01$) と 60'-S の $r=0.65$ ($p<0.05$) に比べより強い相関を示した (図1)。

(2) 血清 ST の等電点

健康者の 1'-S では pI 4.40, 6.65 および 7.00 に ST 活性を認め、RA 患者では pI 4.20, 4.65, 5.10, 6.20 および 6.80 に ST isozymic form が存在した。一方、60'-S では健康者で pI 4.35, 5.80, 6.55 およ

表 1 sialyltransferase activity and percentage of total activity were determined in fractions isolated by isoelectric focusing

serum	pH	sialyltransferase activity (dpm/min/ml)	percent rate of total activity
normal 1'-S	4.40	406.4	20.4
	6.65	1128.3	56.7
	7.00	455.2	22.9
60'-S	4.35	686.7	12.9
	5.80	1405.7	26.3
	6.55	2874.7	53.8
	7.90	373.8	7.0
	7.90	373.8	7.0
RA 1'-S	4.20	390.0	10.6
	4.65	624.7	17.1
	5.10	859.8	23.5
	6.20	488.5	13.3
	6.80	1300.8	35.5
	6.80	1300.8	35.5
	6.20	4768.1	56.7
	6.80	432.7	5.1
	7.30	727.5	8.6
	7.30	727.5	8.6
platelet lysate	6.20	826.3	80.6
	7.85	145.2	14.2
	8.10	53.3	5.2

び 7.90 に ST 活性を認め、RA 患者では pI 4.95, 5.35, 6.20, 6.80 および 7.30 に ST isozymic form を認めた。

それぞれの pI における酵素活性と総活性に対するパーセント活性を表 1 に示した。すなわち、健常者 1'-S では pI 6.65 に最大 ST 活性 (56.7%) が存在した。RA 患者の 1'-S では pI 5.10 (23.5%) と 6.80 (35.5%) に主たる酵素活性を示した。60'-S では健常者で pI 6.55 に主活性 (53.8%) を、RA 患者では pI 6.20 に 56.7% の ST 活性が存在した。一方、血小板 lysate の等電点電気泳動の結果では、pI 6.20 に最大活性 (80.6%) を認めた。この血小板 lysate の結果と RA 患者の 1'-S に pI 6.20 の ST 活性が存在した事実から、RA 患者の循環血漿中に血小板由来の ST 活性がすでに存在することが示唆された。

(3) 加熱失活率

37°C 120分間の加熱により、健常者 1'-S では酵素は失活せず、60'-S では 42.05% が失活し、血小板 lysate では 85.50% と大部分が失活した。つぎに 56°C 20分間の加熱では 1'-S で 40.27% の失活にすぎないが、60'-S では 63.87% と大きく失活した。血小板 lysate では 90.29% が失活した。これらの成績から、加熱処理により血小板 ST の大部分が失活し、60'-S でも血小板由来 ST の失活が大きく影響したといえる。つぎに等電点電気泳動の各分画の加熱処理では、著明な失活が 1'-S の pI 6.20 と 60'-S の pI 6.20 さらに 6.55 に特徴的に認められた (表 2)。

表 2 thermostability of sialyltransferase activity was performed by preincubating at 37°C for 120 minutes or at 56°C for 20 minutes

	sialyltransferase activity (dpm/min/ml)	percent inactivation of sialyltransferase activity after incubating	
		at 37°C for 120 min	at 56°C for 20 min
normal 1'-S	6515.9	1.83	40.27
normal 60'-S	7897.3	42.05	63.87
platelet lysate	5948.2	85.50	90.29
isoelectric focusing subfraction			
pH			
4.40(1'-S)	351.2		25.46
5.10(1'-S)	631.4		23.76
6.20(1'-S)	791.2		90.76
6.20(60'-S)	3650.3		90.23
6.55(60'-S)	1953.8		84.01
6.80~			
7.15(1'-S)	981.6		33.44

以上の結果より、RA 患者 1'-S の pI 6.20 の ST 活性は血小板 ST の存在を示すものであり、健常者 60'-S の pI 6.55 および RA 患者 60'-S の pI 6.20 はともに血清作成時に血小板 ST が混入し、修飾され、生じたものと考えられた。

考 察

ST 活性は、ほぼすべての組織の細胞に存在する、血液細胞では赤血球、リンパ球および血小板⁴⁾で測定されている。これらの細胞間には血清作成時の *in vitro* の血液凝固に際し、血小板は凝集、変形し、融解するが、他の血球は形態学的に大きな変化を示さないという差異がある。

血小板に存在する ST は、主として膜結合性であるが、血液凝固時に生ずるトロンビンの作用により血小板が融解され、ST が遊離し、従来の血清中には血小板 ST が多量に混入していることが明らかにされた⁵⁾。健常者の循環血漿中には血小板由来 ST が存在しないと考えられる。一方、RA 患者では血小板増多と RA の重症度が直接的関係にあり⁶⁾、血清 ST 活性の高値例は活動期の RA 患者である³⁾といわれている。さらに、血小板が増加する RA 患者では血小板寿命が短縮し、血小板 turnover が亢進している¹²⁾。すなわち、RA 患者の血小板数の増加は、血小板の産生および消費の亢進を示唆している。RA 患者の循環血漿中の免疫複合物により血小板が凝集、融解され、serotonine, ADP や lyso-somal enzyme¹³⁾を放出したり、クリオグロブリンの関与により微小循環系で血栓形成を起こす¹⁴⁾といわれている。これらの成績から RA 患者の循環血漿中には、血小板由来 ST の存在が示唆された。筆者らは、血液成分から病態解析を行う場合には、循環血漿に近い血液成分

図2 representative isoelectric focusing patterns of serum (1'-S) fetuin sialyltransferase activity and sialic acid value in (A) a normal adult and (B) a patient with rheumatoid arthritis

図3 isoelectric focusing profile of sialyltransferase activity and sialic acid value in serum (60'-S) from (A) healthy adult, (B) a patient with rheumatoid arthritis, and those in (C) platelet lysate. For details of the preparative procedure, see methods.

で解析することを心掛け、血清作成時に生じる血球の影響を除いた独自の血清 (1'-S) を作成して用いた。このような血清を用いることにより、RA 患者で ST 活性が高値を示し、血清 ST とシアル酸値との間に正相関を認めた (図1)。すなわち、血清 ST 活性は血清シ

アル酸値と同様に RA の病態をよく反映することが明らかとなった。

この研究で等電点電気泳動により解析した RA 患者には、明らかな血小板増多があり、他の臨床検査成績からも活動期の患者であった。1'-S の等電点電気泳動の結果では、酸性領域に存在する ST isozymic form が認められたほかに、循環血漿中に pI 6.20 の血小板由来の ST が示され、RA 患者では血管内で血小板の破壊や消費の存在することが示された。従来の血清 (60'-S) を用いて解析した場合には、RA 患者血清の特徴が認められなかった (図3) が、これは採血後の血清作成時に起こる血小板 ST および lysosomal enzyme などの混入により血清の ST が大きく修飾されたためと考えられた。

血清の急性相反応物質や血清シアル酸の変動が、RA 患者や癌患者の病態解析のうえで臨床的に重要視され、糖転移酵素 (glycosyltransferase) と病態との関係も注目されている。等電点電気泳動による ST の解析は平板ゲル等電点電気泳動による乳癌患者血漿の成績が報告されている¹⁵⁾が、RA を含む炎症性疾患の ST をこの方法で解析した成績は見当たらない。

結語

RA 患者の血清を等電点カラム電気泳動法で解析した結果、酸性域に特異な ST isozymic form が検出され、同時に循環血漿中に血小板 ST の存在が示された。

文献

- 1) Koj, A.: Acute phase reactants. Their synthesis, turnover and biological significance. Structure and Function of plasma protein. (ed. A.C. Allison), vol. 1, New York Plenum 1974, p 73-125.
- 2) 蔵 治言, 山田悦子, 塩川優一: 慢性関節リウマチにおける血中シアル酸および急性相反応物質の動態. 臨床病理(特集) 54: 113-119, 1983.
- 3) Silver, H.K.B., Karim, K.A., Archibald, E.L., Salinas, F.A.: Serum sialic acid and sialyltransferase as monitors of tumor burden in malignant melanoma patients. Cancer Res. 39: 5036-5042, 1979.
- 4) Bosmann, H.B.: Platelet adhesiveness and aggregation. II. Surface sialic acid, glycoprotein: N-acetylneuraminic acid transferase and neuraminidase of human blood platelets. Biochim. Biophys. Acta. 279: 456-474, 1972.
- 5) 渡辺勇四郎, 清水昭一, 岡部和彦, 吉沢久嘉: 血清シアルルトランスフェラーゼ活性の測定とその臨床的意義—慢性関節リウマチ患者における変動—. 炎症 3: 457-458, 1983.
- 6) Selroos, O.: Thrombocytosis in rheumatoid arthritis. Scand. J. Rheum. 1: 136-140, 1972.
- 7) Yamashita, K., Tachibana, Y., Hitoi, A.,

- Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, N., Kobata, A.: Difference in the sugar chains of two subunits and of isozymic forms of rat kidney- γ -glutamyltranspeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 225-232, 1983.
- 8) Warren, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* 234: 1971-1975, 1959.
 - 9) Vesterberg, O., Wadstrom, T., Besterberg, K., Svensson, H., Malmgren, B.: Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. I. Separation and characterization of enzymes and toxins by isoelectric focusing. *Biochim. Biophys. Acta.* 133: 435-445, 1967.
 - 10) Spiro, G.R.: Studies of fetuin, a glycoprotein of fetal serum. I. Isolation, chemical composition, and physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* 235: 2860-2869, 1960.
 - 11) Bensadoun, A., Weinstein, D.: Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70: 241-250, 1976.
 - 12) Hutchinson, R., Davis, P., Jayson M.: Thrombocytosis in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 35: 138-142, 1976.
 - 13) Smith, A.F., Castro, C.W.: Connective tissue action XII; Platelet abnormalities in patients with rheumatoid arthritis. *J. Reum.* 5: 177-183, 1978.
 - 14) Schumacher, H.R., Kitridou, R.C.: Synovitis of recent onset. A clinicopathologic study during the first month of disease. *Arthritis Rheum.* 15: 465-485, 1972.
 - 15) Kessel, H.D., Chou, T.-H., Coomber, R.C.: Studies on sialyltransferase isoenzymes in plasma of patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 17: 1035-1040, 1981.