[シンポジウム：尿蛋白一病態解析へのアプローチ]

尿蛋白と運動

佐藤豊二*・池田孝和*・小川真知子*・折笠久美子*・吉田邦子*
 古賀良夫**・土屋康雄***・荻田二一†・De Broe ME††

SUMMARY

In order to gain a bit more understanding of the effects of exercise on healthy subjects, we analysed urine samples obtained before and after strenuous exercise. In the first group, consisting of 7 male students, the excretion of total protein, total alkaline phosphatase (ALP) and intestinal ALP (IAP) peaked, 1 h after running 3 km. Increases were also noted in high molecular mass ALP and IAP. From other group, made up of 20 male and 10 female high-schoolers, we examined samples of Tamm-Horsfall protein (THP) procured approximately 3 h after the exercise regimen. It should be noted, here, that the subjects involved were all members of their school's track and field teams. Increases in the protein were seen in 4 of the males (3 of whom were jumpers, while the 4th was a middle long-distance runner) and in 1 of the females (also a middle long-distance runner). ALP and THP are GPI-anchor proteins. IAP and THP localize on the segment S3 of the proximal tubule, and on the distal tubule of the kidney, respectively. Macromolecular ALP also increased after running. These findings may indicate that strenuous exercises induce the intermittent renal injuries.

Key words: urine, protein, exercise, alkaline phosphatase, isozyme.

はじめに

各種スポーツが老若男女を問わず盛んになってきている。はたして、スポーツが生体に有益なのかあるいは有害なのか。この問題には簡単には答えられない。この問題を理解するためには、スポーツが生体にいかなる影響を与えるかを検討するのが一般的である。一般的な研究方法としては、生理学的方法と生化学的方

法がある。以前にも述べたように、われわれは主に走運動前後の尿蛋白の変化を検討してきた¹⁻³⁾。尿を試料に選んだ主な理由は、試料を採取する際に、被験者に苦痛を与えないことと、採取の準備が簡単なことなどである。Poortmansらの報告では、100 km 走前後の血清蛋白濃度の変化と尿蛋白排泄の変化を検討したところ、尿の変化のほうが大きかった。つまり、血清蛋白では、走運動終了後には haptoglobulin が前値の

Urinary protein and exercises.

* Toyoji Sato, Takakazu Ikeda, Machiko Ogawa, Kumiko Orikasa, Kuniko Yoshida; 新潟がんセンター生化学検査室

** Yoshio Koga; 新潟小針病院整形外科

*** Yasuo Tsuchiya; 新潟県保健衛生センター

† Tsugikazu Komoda; 埼玉医科大学第1生化学

†† De Broe ME; Antwerp 大学

Correspondence address: Toyoji Sato, Division of Clinical Chemistry, Niigata Cancer Center Hospital, 2-15-3, Kawagishicho, Niigata 951, Japan.

第47回日本電気泳動学会春季大会・シンポジウム

Fig. 1. Changes of proteins in serum and urine after 100 km run (modified from the reference 3).

Folds of control value, folds of the corresponding protein value before run; end, at the end of the run; next day, on the next day of the run; TP, total protein; Alb, albumin; α₁-AG, α₁-acid glycoprotein; α₁-AT, α₁-antitrypsin; Cer, ceruloplasmin; α₂-M, α₂-macroglobulin; Hapt, haptoglobin; Tf, transferrin.

Fig. 2. Time-courses of total urinary protein and ALP excretion before and after 3 km run (modified from the reference 1).

A, Total urinary protein excretion. Reference range: 30-100 $\mu\text{g/min}$ (hatched zone); B, Total ALP excretion. Reference range: 2700-13200 $\mu\text{U/min}$ (hatched zone); C, Intestinal ALP excretion. Reference range: 5.67-66.00 $\mu\text{U/min}$ (hatched zone).

40%に低下し, lysozymeが前値の140%に増加したほかは10%前後の変化であった。一方, 尿では α_1 -acid glycoproteinが前値の約7倍に, albuminとtransferrinが前値の約4倍に増加しており, 全体的に血清蛋白濃度の変化よりも尿蛋白排泄の変化が大きい (Fig. 1)。先に記した尿を試料に選んだ理由に, この報告も加わり, 尿蛋白と運動の関連にはさらに興味が増した。今回はこれまで検討してきた運動前後の尿蛋白の変化, alkaline phosphatase (ALP) isozymes と isoforms の変化および最近はじめたTamm-Horsfall protein (THP)の変化などを報告する。

試料と方法

尿試料は次のものを用いた。

1) 男子中学生各学年でクラブ活動をしている者7人, していない者7人からなる計42人の午前8時と午後4時に採取した尿。

2) 男子大学生7人の3 km (Borgスケール15~17) 走前1時間 (control fraction), 直後 (5~15 min fraction), 1時間後 (1 h fraction), 3時間後 (3 h fraction) に採取した尿¹⁾。

3) 高校陸上部員 (男子20人, 女子10人) の春の合宿中に練習後約3時間に採取した尿。

4) 男性ボランティア10人の随時尿 (THPの遠心効果をみるため)。

なお, 採取した尿はできるだけ早く冷蔵庫に入れるか, 窒化ソーダ (終濃度0.1%) を添加して4°Cに保存し1週間以内に分析した。

尿蛋白は以前に報告した以下の方法で分析した^{1,2)}。

(1) 蛋白濃度の測定

(2) ALP 活性の測定, isozymes および isoforms の検査

(3) SDS-PAGE

結 果

1) 中学生ではクラブ活動の有無による尿蛋白濃度の差は認められなかった。全体的にみて午前8時の尿よりも午後4時の尿の蛋白濃度が約10%程上昇していた。SDS-PAGEでは, 主成分はalbumin (Alb)であったが, Albより高分子領域および低分子領域にも蛋白バンドが認められる例もあった⁵⁾。

2) 7人の大学生の3 km 走後の総蛋白の排泄は1 h fraction にピークがあった。このパターンは総ALP活性, 小腸型ALP (IAP) 活性でも同様であった (Fig. 2)。1 h fractionの尿にはSDS-PAGE後のwestern blottingにより, 主成分のAlbのほかにtransferrin (Tf), IgG, IgA, さらに, 高分子の α_2 -macroglobulin (α_2 -M) も認められた^{1,2)}。一方, ALP isozymes 分析では血清中の肝型ALP (L-ALP), 骨型ALP (B-ALP), IAP, 高分子ALPに相当するパターンがみられた。control fractionよりも1 h fractionにはIAPと高分子ALPに相当する成分が増加する傾向がみられた (Fig. 3)。

3) 合宿中の高校生の尿のSDS-PAGEではTHPが増加している例が5人いた。3人は跳躍, 2人は中・長距離を専門にしていた (Fig. 4)。

Fig. 3. Profiles of urinary ALP isozymes before and after 3 km run.

ALP isozymes were analysed by PAGE. The ALP activity bands were designated as 1, 2, 3, 4 and 5 from the cathodal site. Electropherogram (left) and drawing (right) are shown. Band 1-3 are high molecular mass ALP, band 4 is intestinal like ALP and band 5 is liver like ALP. B, before run (control fraction); 1H, one hour after run (1 h fraction).

Fig. 4. Electrophoretic profiles of urinary proteins.

Urine samples were collected from high school students about 3 h after training in the morning. They belong to track and field club of their schools. A, subject 1-10; B, subject 11-20; C, subject 21-30; S, serum, used as reference; THP, Tamm-Horsfall protein; Alb, albumin; Fd, front dye; f, female; h, high jumper; t, triple jumper; b, broad jumper.

考 察

1) 中学生ではクラブ活動の有無による差は、尿蛋白濃度としては現れなかった。SDS-PAGE では Alb が主成分で、これより分子量の大小の蛋白バンドが数本認められた例もあった。SDS-PAGE の結果は染色感度のよい銀染色でもすれば、よかったのかも知れない。しかし、運動の負荷が軽い可能性も考えられたので、運動量がほぼ一定にしやすい走運動を負荷することにして、次の作業を試みた。

Fig. 5. ALP zymograms after butanol extraction.

A, After urinary protein was precipitated with acetone, butanol extraction was followed; B, The extract of the cortex of human kidney was treated with butanol as A; C, The extract of the medulla of human kidney was treated with butanol as A.

2) 男子大学生の 3 km 走では蛋白排泄のピークは 1 h fraction にみられた。3 h fraction の蛋白排泄は control fraction に近づいていた^{1,2)}。この所見は Poortmans らの報告⁶⁾ とほぼ一致する。

腎には L-ALP, B-ALP がある⁷⁾。さらに、IAP も近位尿細管の S3 segment に局在することも知られている⁸⁾ から、1 h fraction に IAP が出現する可能性はある。事実、3 km 走後の 1 h fraction では IAP のピークが認められた (Fig. 2C)。

ALP⁹⁾ も後述する THP¹⁰⁾ も GPI-anchor 蛋白である。運動後に誘導された活性酸素¹¹⁾ により、いろいろな分子サイズの ALP が排泄されると思われる。事実、高分子 ALP が運動後に増加していた (Fig. 3)。

しかし、尿を直接 PAGE で分析しても zymogram が不明瞭なことが多い。そこで、荻田らの報告¹²⁾ に準じて、健康人の尿蛋白を冷アセトン (終濃度 70%) で沈殿させ、これを 10 mM Tris・HCl-1 mM MgCl₂-10 μM Zn (CH₃COO)₂ に透析後ブタノール (終濃度 30%) で抽出し、さらに上記の緩衝液に透析したものを PAGE で分析してみた。Fig. 5 に示したように、ブタノール処理後の尿中 ALP は、同様の処理後のヒト腎皮質と随質の ALP とほぼ同じ移動度を示した。このことから、尿中には腎に由来する ALP が存在すると思われる。正確には特異抗体によって決定しなければならないことはいうまでもなからう。

3) 合宿中の高校生 30 人中 5 人に THP が多く検出された。4 人は男子で走り高跳び 1 人、三段跳び 1

ている可能性もあり興味深い。つぎは、運動と腎糸球体成分について検討してみたい。

今回の検討に関してご協力いただいた新潟大学名誉教授屋形稔先生はじめ、新潟大・医・検査診断学教室の岡田正彦先生、松戸隆之先生、新潟看護短大の杉田収先生、昭和医大・臨床病理学教室の木村聡先生、自治医大・臨床病理学教室の伊藤喜久先生、山田俊幸先生、東京医科歯科大・医・保健衛生学教室の芝紀代子先生、新潟こばり病院の蒲沢壮夫先生、故阿部礼男先生、新潟県立豊高校の高山俊彦先生に謝意を表します。

文 献

- 1) Sato T, Sugimoto H, Yan WX, Endo K, Yamamoto M. Alkaline phosphatase isozymes of serum and urine and urinary protein in young men before and after running 3 km. *Eur J Appl Physiol* 1994; 69: 355-60.
- 2) Takahashi T, Sugimoto H, Ikeda T, Ogawa M, Koyama A, Sato K, Yamamoto M, Sato T. Urinary proteins were studied before and after exercises. *Prog Clin Biochem (ICS 991)* 1991: 839-40.
- 3) 佐藤豊二, 杉本英夫. 尿タンパク(アルカリフォスファターゼを中心に). *臨床病理* 1996; 44: 622-6.
- 4) Poortmans JR, Haralabie G. Biochemical changes in a 100 km run: Proteins in serum and urine. *Eur J Appl Physiol* 1979; 40: 245-54.
- 5) 杉本英夫, 永田 威, 山本正治, 佐藤豊二. 尿成分の分析による学童の生体負担の検討. *保健の科学* 1990; 32: 125-7.
- 6) Poortmans JR, Labilloy D. The influence of work intensity on postexercise proteinuria. *Eur J Appl Physiol* 1988; 57: 260-3.
- 7) 荻田二一. 新知見より見た ALP 構造と悪性腫瘍. *日本医事新報* 1997; 3797: 106-7.
- 8) Verpooten GF, Nuyts GD, Hoylaerts MF, Nouwen EJ, Vassanyiova Z, Dlhopolcek P, De Broe ME. Immunoassay in urine of a specific marker for proximal tubular S3 segment. *Clin Chem* 1992; 38: 642-7.
- 9) Ferguson MAJ. Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 285-320.
- 10) Hoops TC, Rindler MJ. Isolation of the cDNA encoding glycoprotein-2, the major zymogen granule membrane protein. *J Biol Chem* 1991; 266:4257-63.
- 11) 大野英樹, 瀬川雅彦, 大河原知水, 木崎節子. 活性酸素と SOD. *臨床検査* 1997; 41: 46-51.
- 12) 荻田二一, 小山岩雄, 三浦雅一, 中島孝則. 尿中アル

Fig. 6. Effect of centrifugation of the detection of urinary THP.

A, Urine samples were not centrifuged; B, Urine samples were centrifuged at 20000g for 10 min; THP, Tamm-Horsfall protein; Alb, albumin; Fd, front dye.

人, 走り幅跳び 1 人, 中・長距離 1 人, 女子ではただ 1 人で中・長距離を専門の生徒であった。とくに THP が多かった例は男子の走り高跳び, 走り幅跳び, 中・長距離の選手であった。THP は Coomassie Brilliant Blue では染色されにくく, 見落とすことがある。芝らは尿中の THP は銀染色で検出しており, 優れた方法と思われる。尿の上清にばかり目を向けると, THP を見失うことを経験した。つまり, 尿を強い遠心処理すると, THP は沈殿してしまうことがある (Fig. 6)。Fig. 6 では, THP がみやすいように, 先の ALP の場合と同様に約 10 倍に濃縮してある。なお, データは示さないが western blotting で THP を確認している。

尿蛋白と運動というテーマで述べてきた。運動により, 血清蛋白のほかに腎に由来する ALP [組織非特異性 ALP (tissue non-specific ALP, TNAP) と IAP] と腎の遠位尿細管に局在する THP も検出できた。これらのデータは運動が一過性に腎障害を誘導し

- カリ性ホスファターゼ(ALP). 日本臨床 1995; 53: 454-9.
- 13) 芝紀代子. 尿中 Tamm-Horsfall 蛋白. 臨床検査 1993; 37: 759-64.
- 14) Siba KS, Kanamori K, Cho H, Furuhashi N, Harada T, Shiba A, Nakao M. Re-evaluation of normal human urinary proteins fractionated by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Clin Chim Acta 1988; 172: 77-84.

要 旨

運動が生体にどのような影響を与えたかを尿を試料

にして検討した。次の結果が得られた。1)健康な男子大学生7人の3km走ゴール前後の尿を検討した。総蛋白, 総ALP, IAPの排泄のピークは走後1時間の尿にみられた。また, この尿には高分子ALPとIAPが走前の尿よりも増加していた。2)高校生の陸上部の生徒男子20人, 女子10人の練習後約3時間の尿蛋白をSDS-PAGEで検討した。男子4人(3人は跳躍, 1人は中・長距離を専門にしていた)と女子1人(長距離を専門)にTHPが増加していた。ALPもTHPもGPI-anchor蛋白である。運動後に高分子ALPsとTHPが尿中に増加したことから, 運動により一過性に腎にも障害が及んだ可能性が示唆された。