

## 各種病態時におけるヒト prostaglandin-D-synthase の尿中排泄の検討

西垣戸伸哉

近畿大学医学部第2生化学教室

### 抄 録

Prostaglandin-D-synthase (PGDS) は主に脳周辺の膜組織に存在し、睡眠を調節する PGD<sub>2</sub> を合成する酵素として報告されているが、ヒトの尿中においてその存在を確認した。尿中の PGDS は微量で精製して抗体を作ることができなかったため、組換え PGDS を作製し、それを抗原とした抗体を作製し、尿中に存在する PGDS の定量法を確立した。一方、mRNA が脳の外に、心臓・肝臓・腎臓にも存在することを確認した。そして、組換え PGDS をコントロールとした immunoblot で PGDS の定量を行い、種々の疾患について尿中 PGDS を定量した。クモ膜下出血では増加傾向を示し、脳梗塞では変化が認められなかった。急性心筋梗塞の場合、発病後3日目までは徐々に増加し、4・5病日目と減少傾向を示した。PGDS は組織壊死が生じることで逸脱し、分子量約30,000と低分子量であるため糸球体から、濾過され尿中に排泄されると考えられる。

**Key words :** prostaglandin-D-synthase (PGDS), nested PCR, recombinant, acute myocardial infarction, immunoblot

### 緒 言

生体内に多く存在するプロテアーゼインヒビターの内で、インター- $\alpha$ -トリプシンインヒビター (ITI) はトリプシン阻害作用の他に、細胞増殖促進作用を示すことが知られている。ITI は2本の重鎖と1本の軽鎖が並列に共有結合した蛋白質で、その中の軽鎖がトリプシン阻害活性をもっている<sup>1</sup>。

Yamamoto らはハムスターの実験的膀胱癌の発生過程でこの軽鎖が尿中に増加することを見出した<sup>2</sup>。そこでヒトの尿中トリプシン阻害活性について種々の疾患 (悪性腫瘍、脳血管疾患、呼吸・循環器疾患、感染症、代謝性疾患) で測定を行ったところ、これらの疾患の急性期においては、阻害活性が亢進することを見出した。経時的変化の特に著しい急性心筋梗塞患者で尿中トリプシン阻害活性が発病後2~3病日目にピークに達することが分かったので、それがITI軽鎖によるものかどうかを検索中に、Prostaglandin D synthase (PGDS)<sup>3</sup> の存在を確認した。この蛋白質の尿中排泄は今まで報告されていない。そこで、この蛋白質の尿中排泄量を種々

の疾患について検討を行った。1961年 Clausen は脳脊髄液中、微量に存在する蛋白質を発見し  $\beta$ -trace と命名した<sup>4</sup>。その後 PGDS の遺伝子がクローニングされその塩基配列を決定したところ、 $\beta$ -trace と同一の蛋白質であることが判明した。PGDS は PGH から PGD への異性化を触媒とする酵素で、Prostaglandin-H<sub>2</sub>D-Isomerase と呼ばれている。この異性化酵素には二つの異なった分子種が報告されている<sup>5,6</sup>。Urade らがラットの脳から分離精製した glutathione (GSH)-independent PGDS<sup>5</sup> と Christ Hazelhof らがラットの脾臓から分離精製した GSH-required PGDS である<sup>6</sup>。今回、筆者が尿中から認めた PGDS は N 末端アミノ酸配列から GSH-independent PGDS であった<sup>3</sup>。この PGDS は主として脳周辺の膜組織、即ちクモ膜と脳室内脈絡叢および脳実質のグリア細胞特に、oligodendrocyte に存在することが明らかにされ<sup>7</sup>、睡眠物質 PGD<sub>2</sub> を産生し<sup>8,9</sup>、睡眠調節の鍵を握っている蛋白質である<sup>10</sup>。さらに、中枢神経系以外では、心臓・軟骨・皮膚・腎臓・肺・前立腺・肝臓での存在が確認されており<sup>11</sup>、各組織の分化・維持に重要な酵素であると考えられ

ている<sup>12,13</sup>。PGDSは構造上、リポカリンスーパーファミリーに属するがこの構成員は主として小分子リカンドとの結合・移送の性質を有している<sup>14</sup>。今までのところ、酵素活性を有するのは、このPGDS以外は知られていない。今回、PGDSの組換え蛋白質を合成し、それをを用いてPGDSに対する抗体を作製し、種々の疾患における尿中排泄量の比較検討を行った。

## 方 法

### 1. N末端アミノ酸配列の決定

サンプルをLaemmli<sup>15</sup>の方法に従い、12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)を行い、得られたゲルをプロッティング装置 (BIO CRAFT 東京)を用い300 mAで30分間、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜に電気転写した。転写膜をCoomassie brilliant blue (和光純薬)による染色を行い、蛋白質バンドを切りだし、100%メタノールで脱色後、超純水で一晩洗浄し、シークエンサー (Applied Biosystem model, 477A gas phase sequencer)を用い、N末端アミノ酸配列分析を行った。

### 2. リシルエンドペプチダーゼ処理<sup>16</sup>

1) 方法1で得られたバンドを切り取り、さらに細かく刻んでファルコンチューブにいれて、中性緩衝液 (0.1M Tris-HCl pH 7.5)、蒸留水で洗浄した。膜をPVP溶液 (0.5% polyvinylpyrrolidone-40; 和光純薬, 100 mM 酢酸)内に1時間浸透した後、蒸留水にて膜片を洗浄した。次に、リシルエンドペプチダーゼ反応緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 9.0) 500 µlをファルコンチューブ内に入れ、アセトニトリルを最終濃度が10%になるように加え、リシルエンドペプチダーゼ1.5 µg (和光純薬)を加え、37°Cで

一晩反応させた。翌日アセトニトリル濃度が最終的に5%になるように、反応液を1 mM 塩酸で希釈した。

2) 0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA, 和光純薬)で平衡化したC<sub>18</sub> (RP-300, Applied Biosystem) カラム (2.1×30 mm)に前途の反応液を注入し、Smart system (ファルマシア)を用いて、60分間かけての0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線的濃度勾配溶液 (0~70%)により溶出し、溶出されたピークをとりシークエンサーにてアミノ酸配列を確認した。

### 3. RNAの抽出

各種組織や培養細胞を均質化し、ISOGEN Kit (ニッポンジーン, 東京)を用いてRNAを抽出した<sup>17</sup>。

### 4. PGDS cDNAの増幅

RT-PCRはRNA LA PCR Kit (TaKaRa)を用いて行った。

1) 既報のcDNA配列をもとにヒトPGDSのPCR用の4種類のプライマーを作製した (表1)。ヒト神経膠芽腫より抽出したRNAを70°C10分間加熱後急冷し、変性したもの1 µgに、20 µM プライマー2を1 µl, 5 U/µl Avian Myeloblastosis Virus由来逆転写酵素 (RTase) 1 µl, 25 mM 塩化マグネシウム 4 µl, 10×RNA PCR 緩衝液 2 µlを加え、各々2.5 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 混合液 2 µlを加え、RNase-free 蒸留水8.5 µlで20 µlに調整し、50°Cで25分間逆転写反応を行い、99°Cで5分間加熱しRTaseを失活させた。その反応液に20 µM プライマー11 µl, 5 U/µl TaKaRa LA Taq polymerase 0.5 µl, 25 mM 塩化マグネシウム 6 µl, 10×LA PCR™ 緩衝液 (Mg<sup>2+</sup> free) 8 µlを加え、滅菌蒸留水で100 µlに調整後PCRを行った<sup>18</sup>。PCR装置はGeneAmp PCR System 2400 (PERKIN

表1 ヒトPGDSのクローニングプライマー

プライマー1; sense	5'-ATGGCTACTCATCACACGCT-3'
プライマー2; antisense	3'-ACAAAGGCGAGACAAGGAAG-5'
プライマー3; sense	5'-A <sup>①</sup> GAATTCGCACCCGAGGCCAG-3'
プライマー4; antisense	3'-TACTGCCTTGTTATC <sup>②</sup> TTCGAACT-5'

既報のPGDS cDNA塩基<sup>3</sup>配列を参考に合成しRT-PCR, nested-PCRに使用したプライマー。

プライマー1はcDNA配列の86番目から105番目のATGGC~ACGCTの配列に相当する。プライマー2はcDNA配列の716番目から735番目のTGTTT~CCTTCの相補的な配列。

プライマー3はcDNA配列の151番目から165番目のGCACC~CCCAGの配列に相当する。プライマー3の5'末端側に制限酵素EcoR I認識配列 (GAATTC)を導入した。プライマー4はcDNA配列の644番目から658番目のATGAC~CAATAに相補的な配列に相当する。プライマー4の5'側末端に制限酵素Hind III認識配列 (AAGCTT)を導入した。

プライマー3・4は成熟蛋白質をコードする部分を挟む様に設計した。

①;制限酵素EcoR I, ②;Hind IIIと.....は各認識配列部位を示す。

ELMER, Foster City, CA USA) を使用した。条件は、最初の熱変性を94°Cで2分、次回以降の変性を94°Cで30秒、アニーリングを58°Cで30秒、伸長反応を72°Cで1分30秒、これらを1サイクルとして28サイクルを繰り返し、最後に72°Cで7分の伸長反応を加え、DNAの増幅を行った<sup>19,20</sup>。

2) 得られたPCR産物をより不純物を除くために、表1で示したプライマー3・4を用い nested PCRを行った<sup>21</sup>。そして得られたPCR産物の両端に制限酵素配列を導入するため、プライマー3の5'側にEcoR I配列を、プライマー4の5'側にHind III配列を付加した。nested PCR産物を1.0%アガロースゲル電気泳動を行い、1 µg/ml エチジウムブロマイド溶液に15分間浸し、UVランプをつけてDNAバンドを確認した。その単一バンドを切り出し、フェノール処理を行い精製しジデオキシ法で塩基配列を決定し、既報のPGDS cDNA配列と一致することを確認した。

3) 切り出したcDNAをpMOS Blue T vector (Amersham, England)に入れ、クローン化した<sup>22</sup>。ついで、このpMOS Blue T vectorを大腸菌(JM109) competent cellに形質転換し増幅した<sup>23</sup>。増幅したプラスミドを精製し、制限酵素EcoR I (New England Biolabs)・Hind III (New England Biolabs)で同時に切断後、アガロースゲル電気泳動を行い両端がEcoR I・Hind IIIに揃えられた成熟蛋白質部分をコードするPGDS cDNAを得た。このPGDS cDNAをタンパク質として発現させるため、EcoR I・Hind III配列で切断されている発現ベクターpMAL-c2 (New England Biolabs)に挿入した。

#### 5. 組換えPGDSの合成

1) PGDS cDNAを挿入したpMAL-c2をJM109 competent cellに形質転換し、アンピシリン添加寒天平板上で繁殖した。得られたコロニーを1個選択し、10 ml LB液体培地(1%トリプトン、0.5%イーストエキス、0.5% NaCl、0.2%グルコース+50 µg/ml アンピシリン) 10 ml中で37°C、一晚培養した。翌日にそのうちの5 mlを1.0 l LB液体培地と50 µg/ml アンピシリン内で2時間振盪し、さらに0.1M isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG, TaKaRa) 1.5 mlを加え2時間培養した。培養後、遠心し沈殿した細胞(4 g)に溶解緩衝液(10 mM リン酸緩衝液、30 mM NaCl、0.25% Tween 20、10 mM EDTA・2Na、10 mM EGTA) 40 mlを加え、-20°Cで一晩保存した。翌日、室温にて溶解したものを超音波処理し、細胞を破壊し、0.5M NaClの濃度に調整した。

2) 試料を9,000 gにて30分間遠心し、上清を緩衝液①(10 mM リン酸緩衝液、0.5M NaCl、1 mM NaN<sub>3</sub>) + 0.25% Tween 20で5倍希釈した。次いで、緩衝液①で平衡化されたAmylose Resinカラム(2.5×10 cm, New England Biolabs)に試料を入れ、緩衝液①と0.25% Tween 20でカラム体積の3倍量で洗浄した。次にカラムの5倍量の緩衝液①のみで洗浄した。ついで緩衝液①に10 mM Maltoseを加えたカラム緩衝液で、Maltose binding protein (MBP)との融合蛋白質を溶出した<sup>24-26</sup>。

3) 得られた融合蛋白質20 mgとFactor Xa (New England Biolabs) 5 µlを室温で12時間反応させ、MBPと組換えPGDSを切断した。ついで緩衝液②(10 mM Tris-HCl pH 8.0、25 mM NaCl、1 mM NaN<sub>3</sub>)にて平衡化したQ-Sepharose column(1×10 cm, ファルマシア)を用い、緩衝液②を含むNaClの直線的濃度勾配溶液(25~500 mM)により、組換え蛋白質と融合蛋白質を溶出分離した<sup>27</sup>。次いで、12.5% SDS-PAGEを行い、そのゲルをブロットリング装置を用い、300 mAで30分間PVDF膜に電気転写し、蛋白染色で得られたバンドを切り出し100%メタノールで脱色後、超純水にて一晚洗浄し、シーケンサーを用い、組換えPGDSのN末端配列を解析し、成熟PGDSと一致することを確認した。

#### 6. 抗PGDS血清の作製

組換えPGDS 0.4 mgをフロイント完全アジュバント1.5 ml(和光純薬)と混合した後、ウサギに皮下注射した。ついで2・3週間後はPGDS 0.4 mgと不完全アジュバント1.5 mlを混合したもので追加免疫を行った。4週間後、ウサギから1 ml採血し、合成したPGDSを抗原とし、後述するimmunoblot法でPGDSに対する抗体ができていることを確認した。ついで、pentobarbital全身麻酔下で全採血を行いPGDSの抗血清を採取した。

#### 7. immunoblot法

PGDS 0.4 mgを12.5% SDS-PAGEを行い、そのゲルをブロットリング装置を用い、300 mAで30分間、PVDF膜に電気転写し、Towbinの方法<sup>28</sup>によりブロッキングを施行した。1次抗体として得られたPGDSの抗血清(10 µl)をSTN緩衝液(5%スキムミルク、0.15M NaCl Tris-HCl pH 7.5、0.05% NaN<sub>3</sub>) 10 mlと混和し、室温で90分間振盪した。次に、TNT緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.15 M NaCl、0.05% Triton X-100)でPVDF膜を洗浄し、TNT緩衝液10 ml中に2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体5 µl(MBL)を加え、室温で30分間振盪した後、3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩12.5 µg(和光純薬)、過酸化水素15 µl

(三菱瓦斯), 8%塩化ニッケル250  $\mu$ l (和光純薬) を用いて発色させた。

#### 8. 抗体カラムの作製<sup>29</sup>

1) トリス緩衝液にて平衡化した DEAE AffiGel Blue Column (Bio-Rad Laboratories) に方法6で得られた抗 PGDS 血清 3 ml をのせ, 素通り分画から, 抗 PGDS-IgG 分画を得た。

2) HiTrap affinity column (1.0 ml, ファルマシア) を 1 mM HCl で洗浄し, 得られた抗 PGDS-IgG 分画 (1.0 ml) をカラム内に注入し, 室温で30分間静置した。ついで, 洗浄用緩衝液 A (0.5M エタノールアミン, 0.5M NaCl pH 8.3) 2 ml で3回, 次に洗浄用緩衝液 B (0.1M 酢酸, 0.5M NaCl pH 4.0) 2 ml で3回, さらに緩衝液 A 2 ml で3回洗浄し, 1時間静置した。次に緩衝液 B 2 ml で3回, 緩衝液 A 2 ml で3回, 緩衝液 B 2 ml で3回の順でカラム内を洗浄した後, トリス緩衝液 2 ml を注入し抗体カラムを作製した。

#### 9. 尿中から PGDS の分離・精製

1) ヒトの尿 2.5 ml を トリス緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5) 3.0 ml で平衡化した PD-10 カラムにのせ, トリス緩衝液による溶出液 1.0 ml を作製した抗体カラムに注入し, 吸光度 (280 nm) が 0 になるまで, トリス緩衝液で抗体カラムを洗浄した。

2) 洗浄後, 0.2M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.2) を抗体カラム内に注入し得られた溶出液を トリス緩衝液で平衡化した PD-10 カラムにて pH を調整後, 濃縮し終濃度が 1% になるように DTT で還元し, 12.5% SDS-PAGE を行い前述と同様にして N 末端アミノ酸分析を行った。さらに, 溶出液を抗原とし immunoblot<sup>27</sup> を行った。

#### 10. PGDS mRNA の量の測定

ヒト心臓の cDNA ライブラリー (STRATAGENE, USA) およびヒトの培養肝細胞, 腎組織 (腎細胞癌), 脳組織 (神経膠芽腫) から ISOGEN Kit を用いて RNA を抽出し, RT-PCR により PGDS cDNA を増幅した。そしてヒトの  $\beta$ -アクチンをコントロールとして同条件で増幅を行った。各々の PCR 産物の一部 (5  $\mu$ l) を 1.5% アガロースゲル電気泳動を行い, 各細胞間での PGDS-mRNA の発現状態を比較検討を行った。

#### 11. 尿中 PGDS の定量

1) 24時間尿の一部 (2.5 ml) を トリス緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5) 3.0 ml で平衡化した PD-10 カラムにのせ得られた試料のうちの, 80  $\mu$ l~125  $\mu$ l を凍結乾燥し, 乾燥後 トリス緩衝液 (30  $\mu$ l) で溶解し30秒間煮沸後, 1% DTT で還元し組換え PGDS をコントロールとして同一ゲル内において12.5%

SDS-PAGE を行い, immunoblot 後発色した。

2) 発色後, スキャナーにて画像処理 (NIH image 1.55) を行い, 既知濃度の組換え PGDS をコントロールとして各疾患別での尿中 PGDS の定量を行った。

### 成 績

1. 急性心筋梗塞患者の尿中トリプシン阻害活性蛋白質を検索中に, 分子量約30,000の蛋白質 (図1・レーン3) が増加していることを認めた。そ

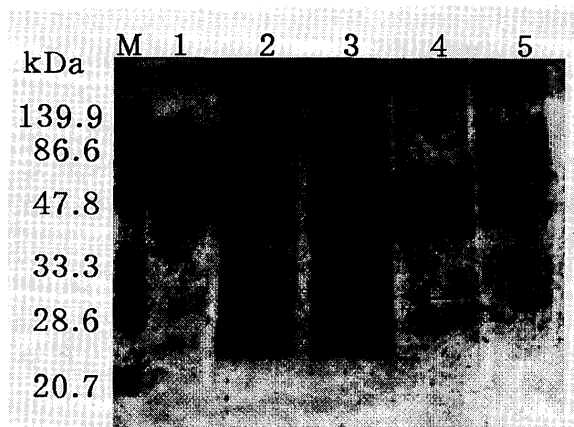


図1 尿蛋白質の12.5% SDS-PAGE.

急性心筋梗塞患者尿を「方法1」で示した如く, 濃縮し SDS-PAGE を行った。矢印は N 末端分析を行ったバンドを示す。

レーン1; 第1病日, レーン2; 第2病日, レーン3; 第3病日, レーン4; 第5病日, レーン5; 第7病日。M; 分子量マーカー。

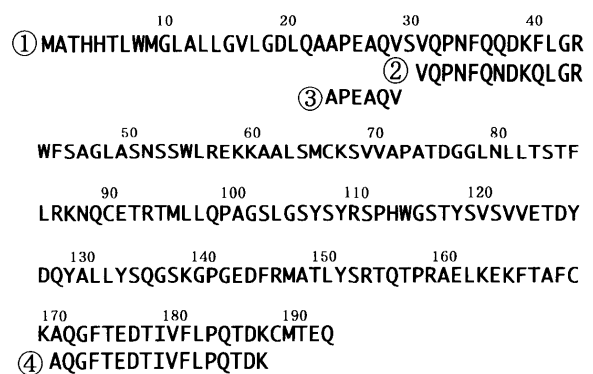


図2 PGDS のアミノ酸配列。

①; 既報の PGDS アミノ酸配列。  
②; 新しく見出したバンドの N 末端アミノ酸配列。③; 組換え PGDS。  
④; PGDS バンドをリシルエンドペプチダーゼ処理後の断片アミノ酸配列。

の蛋白質についての N 末端アミノ酸分析の結果、VQPNFQNDKQLGR の配列が得られた (図 2-②)。これはヒト PGDS 成熟蛋白質の N 末端アミノ酸配列と一致していることがデータベースを検索した結果分かった。さらにリシルエンドペプチダーゼ処理による、断片アミノ酸分析の結果からも、PGDS の配列と一致していることが分かった (図 2-④)。以上の結果から尿中での PGDS の存在が確実なものとなった。当初、PGDS を分離精製し、抗 PGDS 抗体の作製を試みたが、充分量を得られなかったため組換え PGDS の合成を行った。

2. 組換え PGDS の合成

前節の「方法」に示したように、組換え PGDS を作成した。その PGDS の電気泳動を行い、蛋白染色と immunoblot において単一のバンドを認めた。また、このバンドを切り出してアミノ酸配列を調べたところ PGDS との一致を認めた (図 2-③)。

3. 抗 PGDS 抗体の特異性の検討

1) 急性心筋梗塞患者尿を PGDS 抗体カラムに通して得られた溶出液を、12.5% SDS-PAGE を行ったところ、単一バンドの蛋白質が染色された (図 3

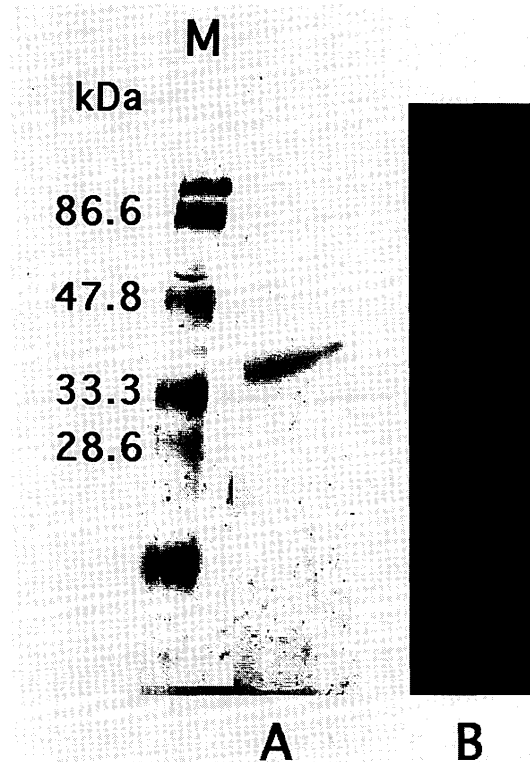


図 3 抗体カラムによる溶出液の12.5% SDS-PAGE.  
A; 蛋白染色.  
B; immunoblot.  
M; 分子量マーカー.

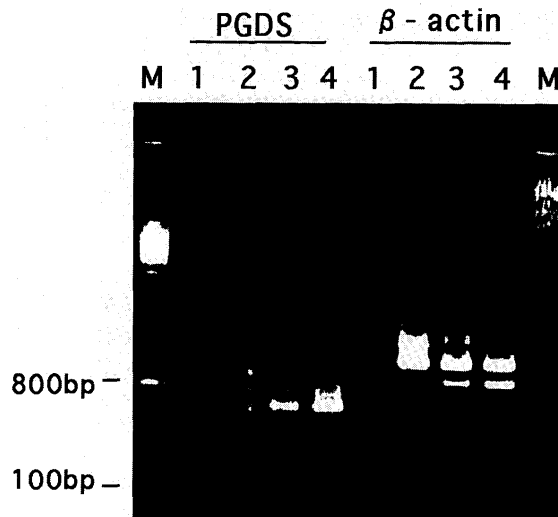


図 4 種々の組織における PGDS mRNA および  $\beta$ -actin mRNA の検出。

PGDS および  $\beta$ -アクトチンの mRNA を1.5% アガロースゲル電気泳動で検出。

レーン 1; 心臓の cDNA ライブラリー (STRATAGEN), レーン 2; 肝臓 (HepG2), レーン 3; 腎細胞癌手術時に得られた腎組織, レーン 4; 脳外科手術時に得られたヒト神経膠芽腫。

M; 塩基対マーカー (bp; base-pair).

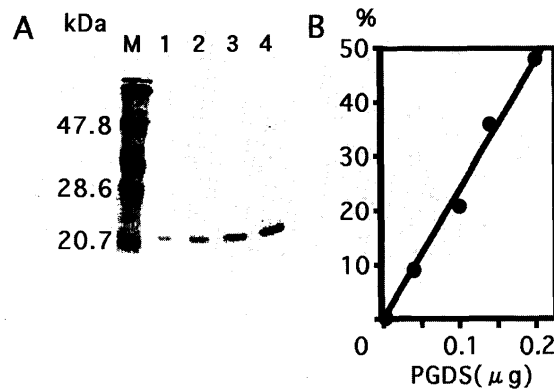


図 5 PGDS の定量。

A; PGDS の各濃度別の immunoblot.

レーン 1; 0.04 µg, レーン 2; 0.10 µg,

レーン 3; 0.14 µg, レーン 4; 0.20 µg.

B; 各 PGDS 濃度に対しての濃度強度とをプロットしたグラフ (Y=610.96X, n=5, R=0.998, p<0.01).

X 軸; 各 PGDS 濃度, Y 軸; 256階調 (黒を 255, 白を 0) のグレースケール画像から得られる各バンドの数値を黒 (255) を 100%, 白 (0) を 0% とした比率で表わした。

表2 各疾患別での尿中 PGDS 排泄量

	PGDS/uP			
	Range	Mean	SD	n
脳出血	0.00—34.5	5.72	6.65	43
脳梗塞	0.00—11.1	2.71	2.91	30
急性心筋梗塞	0.42—7.20	3.67	2.08	8
癌性胸・腹膜炎	0.11—81.3	25.2	21.1	18
消化管出血	0.52—15.0	5.84	3.85	15
急性腹膜炎	1.19—13.7	5.46	5.68	4
急性膵炎	0.13—5.62	2.44	2.41	5
糖尿病	0.67—1.25	1.03	0.32	3
慢性腎不全	0.15—1.16	0.70	0.39	6

PGDS/uP；PGDS 定量値を尿中総蛋白量で除した値。

脳出血；脳内出血・クモ膜下出血・急性硬膜下血種。癌性胸・腹膜炎；肺癌から胸膜炎。S 状結腸癌から胸膜炎。胃癌から腹膜炎。消化管出血；食道静脈瘤破裂・胃潰瘍・十二指腸潰瘍。急性腹膜炎；S 状結腸穿孔・十二指腸潰瘍穿孔。

Range；最小値—最大値，Mean；平均値，SD；標準偏差，n；サンプル数

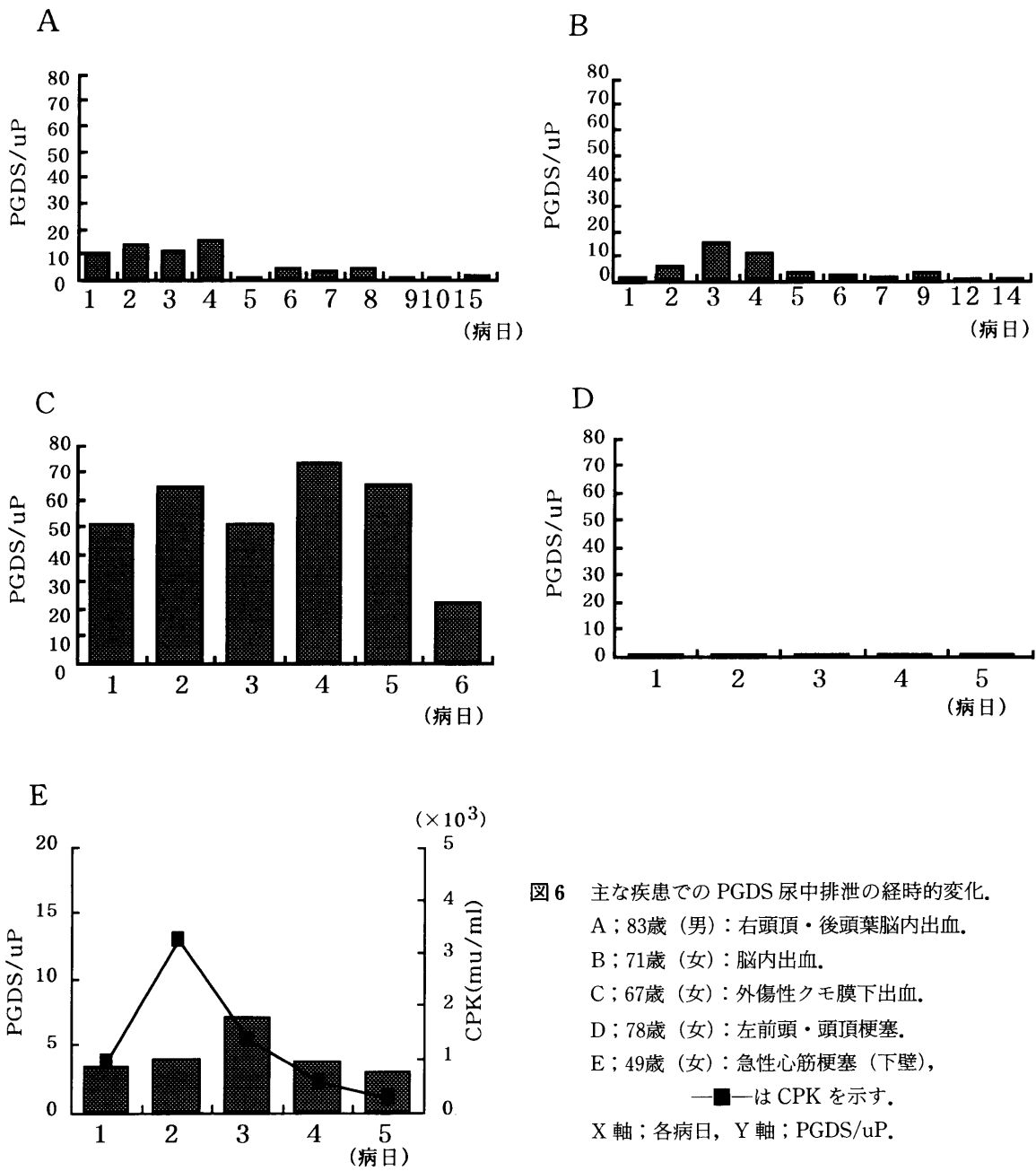


図6 主な疾患での PGDS 尿中排泄の経時的変化。

A；83歳（男）：右頭頂・後頭葉脳内出血。

B；71歳（女）：脳内出血。

C；67歳（女）：外傷性クモ膜下出血。

D；78歳（女）：左前頭・頭頂梗塞。

E；49歳（女）：急性心筋梗塞（下壁），

—■—は CPK を示す。

X 軸；各病日，Y 軸；PGDS/uP。

-A)。さらに、immunoblot においても陽性であった (図 3-B)。

#### 4. PGDS mRNA 量の測定

ヒトの心臓・肝臓・腎臓・脳由来の cDNA ライブラリーから PGDS とコントロールとして  $\beta$ -アクチンを方法 4 と同条件で PCR にて増幅し、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、心臓・肝臓・腎臓・脳で PGDS mRNA の発現を認めた (図 4)。

#### 5. PGDS の定量

1) 標準直線の作製として、0.04から0.20  $\mu$ g の PGDS を抗原とした immunoblot を行い (図 5-A)、各濃度と発色強度の間に  $Y=610.96X$  の有意な相関を認める直線が得られた (図 5-B)。

2) 得られた標準直線から、尿中 PGDS の定量を行った。一日尿量から一日総 PGDS 量に換算した。単なる腎機能障害による PGDS の増加を除外するために、尿中総蛋白量で除した値で表わし (表 2)、疾患別の比較検討に用いた。

3) 20歳から40歳の7名 (男性2名、女性5名) の健康人について同様な方法で immunoblot を行ったが、いずれも PGDS は検出できなかった。

#### 4) 各疾患別検討

(1) 脳出血、クモ膜下出血、脳梗塞、急性心筋梗塞、癌性胸・腹膜炎、消化管出血、急性腹膜炎、急性膀胱炎、糖尿病、慢性腎不全での比較検討を行った (表 2)。脳出血、癌性胸・腹膜炎、消化管出血、急性腹膜炎において高値を示した (表 2)。

(2) 脳出血、2例について経時的变化を調べたところ、発症後約2~3病日目でピークに達し、その後は約5~7病日目まで徐々に低下する傾向にあった (図 6-A・B)。外傷性クモ膜下出血、1例についての検討では高値でしかも、長期間持続する傾向にあった (図 6-C)。脳梗塞、1例については脳出血・クモ膜下出血のような、尿中 PGDS の排泄の増加や経時的な変化は認められなかった (図 6-D)。

(3) 急性心筋梗塞、1例についての検討では発症後、約3病日目までは経時的に増加傾向にあり、第4・5病日目から徐々に減少する傾向にあった (図 6-E)。

#### 5) 腎尿細管機能の検討

各疾患の尿中  $\beta_2$ -microglobulin (BMG) 値と尿中 PGDS 値との相関性を調べ、図 7 に示す結果を得た。このグラフから尿細管機能と尿中 PGDS 値の間には相関性は認められなかった。

## 考 察

1. PGDS は分子量約30,000の低分子蛋白質であるので、糸球体を通り尿細管で再吸収されると推

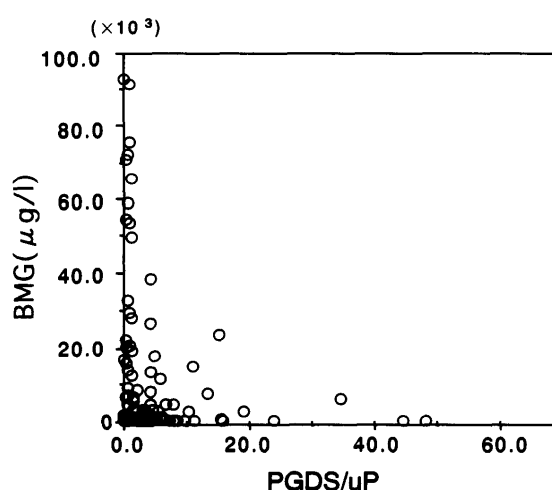


図 7 PGDS と  $\beta_2$ -microglobulin との比較。  
X 軸; PGDS/uP, Y 軸;  $\beta_2$ -microglobulin  
で表わした単回帰分析 (n=170)。

察される。すなわち、PGDS の尿中排泄は単なる尿細管機能の低下を反映している可能性がある。しかし、尿細管機能低下の指標である  $\beta_2$ -microglobulin 排泄量とは全く相関がみられなかった。(図 7) また表 2 で示した PGDS/uP は尿中総蛋白質のうち PGDS が占める割合を表すが、高値を示す例ではこの蛋白質の排泄が特異的に増加していることを示唆している。これらの疾患においては尿細管の機能は正常に近く蛋白質の尿中排泄は overflow proteinuria の状態にあると考えられる。従って、尿中 PGDS の排泄の主な原因は尿細管の機能低下ではなく、各種臓器から血中への漏出が主な原因であると推定できる。

2. 心筋の PGDS mRNA がかなり認められるので (図 4: レーン 1) 急性心筋梗塞患者に認められる PGDS は心筋壊死により逸脱し、尿中排泄されたと考えられる。さらに N 末端アミノ酸配列とリシルエンドペプチダーゼ処理による断片のアミノ酸配列の一致の証明から PGDS は構造的に、部分断裂されずに一次構造を保ったまま糸球体から、濾過されることが考えられる。PGDS の尿中排泄は血中 CPK とは一日遅れて同様な推移を示している (図 6-E)。従って、尿中の PGDS を測定することで、臨床診断・経過観察の評価として有用になるかもしれないが<sup>30</sup>、今後の症例についての検討が必要である。脳梗塞の場合には lactate dehydrogenase (LDH) は壊死に陥った神経細胞からの逸脱により増加すると報告されているが<sup>31,32</sup>、尿中 PGDS は増加していない。

3. 脳出血の場合、脳内で形成された血腫が神経細胞への圧迫、壊死を起し PGDS の逸脱から尿中

への排泄が生じたと考えられる。さらに、脳出血の約80%は脳室穿破をおこなっているとの報告から、脳周辺の膜組織を破壊することによりPGDSの逸脱が生じると考える。クモ膜下出血の場合もクモ膜の破壊からクモ膜下腔へのPGDSの逸脱が生じ、さらにクモ膜下出血では、髄液中の炎症細胞などによりクモ膜下腔の線維化・癭痕化を助長し、脳脊髄液の循環不全からPGDSの尿中排泄が脳内出血に比べ長期に及んだと考えられる<sup>33</sup>。

4. PGは全身の臓器で産生されているため、その生理機能は多彩である。血管平滑筋、子宮筋、気管支平滑筋などの作用、血小板凝集能に対する作用、胃液分泌に対する作用、腎尿管に対する作用などがある<sup>34</sup>。PGは局所ホルモンとして作用しているとみなされている。しかし、その産生と代謝は極めて速く、かつ組織によって産生されるPGも異なっているため、末梢静脈血中のPGレベルの評価は困難である。mRNAレベルでのPGDSは心臓・肝臓・腎臓・脳での存在を確認した。これら、各臓器での疾患に対し、さらに詳細な検討を行うことで、尿中PGDS排泄量の臨床的意義が導きだされると思われる。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました篠原兵庫教授に深く感謝致します。また、直接のご指導、ご助言いただいた、山本和彦先生、吉田浩二先生、松浦欽司先生、ならびに本研究にご協力いただいた教室の諸先生がたに心から深く感謝いたします。

#### 文 献

- Salier JP, Rouet P, Raguenez G, Daveau M (1996) The inter- $\alpha$ -inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J* 315: 1-9
- Yamamoto T, Yamamoto K, Sinohara H (1996) Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor and its related proteins in Syrian hamster urine and plasma. *J Biochem* 120: 145-152
- Nagata A, Suzuki Y, Igarashi M, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O (1991) Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4020-4024
- Clausen J (1961) Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 107: 170-172
- Urade Y, Fujimoto N, Hayaishi O (1985) Purification and Characterization of rat brain prostaglandin D synthase. *J Biol Chem* 260: 12410-12415
- Hazelhof C, Nugteren DH (1979) Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide d-isomerase, a cytoplasmic, glutathione-requiring enzyme. *Biochim Biophys Acta* 572: 43-51
- Urade Y, Fujimoto N, Kaneko T, Konishi A, Mizuno N, Hayaishi O (1987) Postnatal changes in the localization of prostaglandin D synthase from neurons to oligodendrocytes in the rat brain. *J Biol Chem* 262: 15132-15136
- Ueno R, Ishikawa Y, Nakayama T, Hayaishi O (1982) Prostaglandin D<sub>2</sub> induces sleep when microinjected into the preoptic area of conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 576-582
- Ueno R, Honda K, Inoue S, Hayaishi O (1983) Prostaglandin D<sub>2</sub>, a cerebral sleep-inducing substance in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1735-1737
- Hayaishi O (1988) Sleep-wake regulation by Prostaglandin D<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 263: 14593-14596
- Melegos DN, Diamandis EP, Oda H, Urade Y, Hayaishi O (1996) Immunofluorometric assay of prostaglandin D synthase in human tissue extracts and fluids. *Clin Chem* 42: 1984-1991
- White DM, Mikol DD, Espinosa R, Weimer B, Beau MM, Stefansson K (1992) Structure and chromosomal localization of the human gene for a brain form of prostaglandin D<sub>2</sub> synthase. *J Biol Chem* 267: 23202-23208
- Olsson JE, Nord L (1973) Immunochemical and immunofluorescence studies of beta-trace protein in different species and organs, with special reference to the central nervous system. *J Neurochem* 21: 625-633
- Flower DR (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318: 1-14
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- 副島正美, 正木武治 (1984) リシルエンドペプチダーゼ, 蛋白質核酸酵素 29: 1532-1537
- 林 伸彦 (1990) ウイルスの生検ならびに病理標本を使用する際の検出. *実験医学* 8: 1063-1071
- Lynas C, Cook SD, Laycock KA, Bradfield JW, Maitland NJ (1989) Detection of latent virus mRNA in tissues using the polymerase chain reaction. *J Pathol* 157: 285-289
- Maruyama I, Rakow TL, Maruyama H (1995) cRACE: a simple method for identification of the 5' end of mRNAs. *Nucleic Acids Res* 23: 3796-3797
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8998-9002
- Alvert J, Fenyo EM (1990) Simple, sensitive, and specific detection of human Immunodeficiency virus type1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* 28: 1560-1564
- Hashimoto T, Gotoh T, Tsujimura A, Kuriyama K, Matsuda S (1993) Construction and characterization of new host-vector systems for the enforcement-cloning method. *Gene* 137: 211-216



23. Kramer W, Friz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. *Methods Enzymol* 154 : 350-367
24. Maina CV, Riggs PD, Granda AG, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, Guan C (1988) An *Escherichia coli* vector to express and purify foreigners by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74 : 365-373
25. Nagai K, Thogersen HC (1987) Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 153 : 461-481
26. Guan C, Li P, Riggs PD, Inoue H (1988) Vectors that facilitate expression and purification of foreign peptide in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67 : 21-30
27. Quinlan RA, Moir RD, Stewart M (1989) Expression in *Escherichia coli* of fragments of glial fibrillary acidic protein : characterization, assembly properties and paracrystal formation. *J Cell Sci* 93 : 71-83
28. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 4350-4354
29. 西道隆臣, 豊島 聰. 日本生化学会編. 新化学実験講座 1 タンパク質 I. 分離・精製・性質 : 403-406
30. Siminiak T, Ozawa T (1993) Minireview neutrophil mediated myocardial injury. *J Biochem* 25 : 147-156
31. Lobner D, Choi DW (1994) Dipyridamole increases oxygen-glucose deprivation-induced injury in cortical cell culture. *Stroke* 25 : 2085-2090
32. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF (1994) Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke* 25 : 1481-1488
33. Kitazawa K, Tada T (1994) Elevation of transforming growth factor- $\beta$ 1 level in cerebrospinal fluid of patients with communicating hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 25 : 1400-1404
34. Giles H, Leff P (1988) The biology and pharmacology of PGD<sub>2</sub>. *Prostaglandins* 35 : 277-300