

モノクローナル抗体を用いたヒト尿中N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ(NAG)アイソザイムBの高感度酵素標識免疫測定法の開発とその応用に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森田, 敦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16307

氏名	森田 敦
生年月日	
本籍	三重県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第201号
学位授与の日付	平成11年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	モノクローナル抗体を用いたヒト尿中 <i>N</i> -アセチル- β -D-グルコサミナーゼ (NAG) アイソザイム B の高感度酵素標識免疫測定法の開発とその応用に関する研究
論文審査委員(主査)	二階堂 修(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	島田 和武(研究科・教授) 宮本 謙一(医病院・教授) 鈴木 永雄(研究科・教授) 松永 司(薬学部・助教授)

学位論文要旨

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG, or β -hexosaminidase) is widely used urinary enzyme for the assessment of renal tubular damage resulting from various renal diseases. NAG is found in human urine as two isozymes A and B, which account for 80-90% and 10-20% of total NAG, respectively. There are many reports describing possible clinical significance of the analysis of NAG-B, and could be a more sensitive marker than the total enzymatic activity of NAG. The measurement of NAG-B has been performed some methods, but these are time consuming, not precise, and not easily adapted to routine clinical work. Therefore, rapid and highly sensitive methods are needed.

In this study, at first we have developed a new enzyme immunoassay (ELISA) for quantifying NAG-B in human urine using monoclonal antibodies and purified NAG-B isolated from human placenta as a standard. The ELISA was selective for NAG-B, and performed high sensitivity (0.5 ng/ml) and good reproducibility. Resulting from the determination using this ELISA, most of the urine from patients with renal diseases, especially pyelonephritis, showed significant increases in both values and percentages of NAG-B. The urine of patients with pyelonephritis often has alkaline pH. Then, we investigated the stability of NAG isozymes in various pH, we found that the enzymatic activity of NAG-A was reduced in alkaline condition (> pH 7), but both enzymatic and immunological activities of NAG-B did not change. Accordingly, our results suggested that for alkaline urine, NAG-B proved to be a more suitable marker of renal damage to avoid misinterpretation of total NAG enzymatic activity as clinical test.

【序論】

N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ (NAG、別名ヘキソサミニダーゼ) はリソソーム中に含まれる分子量約 12 万の糖質分解酵素である。NAG は生体組織に広く分布し、腎臓、特に近位尿細管で高い活性が認められているが、各種腎障害患者においては尿中に高い活性が検出される。現在汎用されている尿中 NAG 酵素活性測定法 (1) は、簡便で感度が高く、再現性も良いため、腎移植後の拒絶反応、薬剤性腎障害、急性腎不全の診断や経過観察における指標の一つとして用いられている。

一方、NAG にはいくつかのアイソザイムの存在が知られている。尿中 NAG では健常人の場合、アイソザイム A (NAG-A) が 80~90%、アイソザイム B (NAG-B) が 10~20%を占め、それ以外にもアイソザイム I (NAG-I) が存在する。これらのタンパクのサブユニット構造は NAG-A が $\alpha\beta$ 、NAG-B および NAG-I が $\beta\beta$ であり、等電点、基質特異性、熱安定性などの生化学的性質がそれぞれ異なる。

以前より、これらのアイソザイムの臨床的意義に興味を持たれており、特にアミノグリコシド系抗生物質による腎尿細管障害 (2)、腎盂腎炎 (上部尿路感染) (3)、腎移植 (4) などの患者尿では NAG アイソザイム中、NAG-B および NAG-I の割合が増大すると報告されている。従って、これらのアイソザイムを特異的に測定することができれば、その酵素活性を指標とした全 NAG を測定するよりも鋭敏に、腎障害の診断が可能になるものと思われる。現在まで、NAG アイソザイムの分離、分析にはイオン交換クロマトグラフィー法 (5)、電気泳動法 (6)、熱処理法 (7) などが用いられているが、いずれの方法も感度が低い、操作が煩雑、精度が低いなどの欠点があるため、多数の臨床検体を測定するルーチン検査には適当でなかった。そこで著者はまず、NAG-B に反応するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いて、診断を目的とした臨床検査にも十分適用し得る NAG-B の高感度酵素標識免疫測定法 (ELISA 法) を確立した。さらに、本法を用いて腎障害の診断における、尿中 NAG-B 測定の臨床的有用性について検討を行った。

【方法】

ヒト胎盤由来の部分精製 NAG-B でマウスを免疫し、常法に従って細胞融合を行い、特異抗体産生ハイブリドーマを樹立した。得られた数種のモノクローナル抗体について組み合わせを検討し、サンドイッチ免疫測定法を構築した。最終的には Fig.1 に示すように、抗 NAG モノクローナル抗体を固相したマイクロプレートと、ヒンジ法によりペルオキシダーゼ標識した抗体を用いた高感度 ELISA 法として確立し、これを用いて種々の臨床検体の測定を行った。なお、

標準抗原にはヒト胎盤より抗体カラムを用いて均一まで精製した NAG-B を使用した。全 NAG に占める NAG-B の割合は、ELISA 法で測定した NAG-B の濃度を、精製 NAG-B の比活性 (164 U/mg) で酵素活性値に換算し、算出した。

また、尿中における NAG アイソザイムの安定性を調べるため、内在性の NAG をモノクローナル抗体アフィニティカラムを用いて除いた尿を作製し、これに精製 NAG-A または NAG-B を加え、それぞれの活性を NAG-A については酵素活性測定法、NAG-B については酵素活性測定法および ELISA 法で測定した。

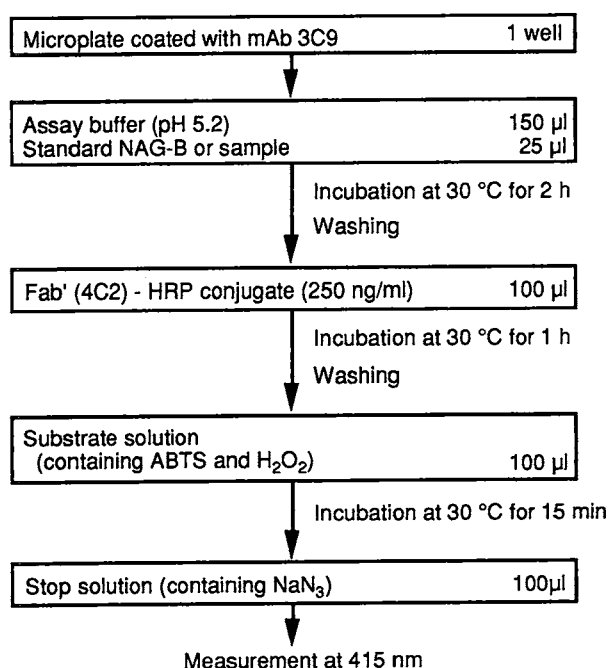


Fig.1 Procedure of sandwich ELISA for NAG-B

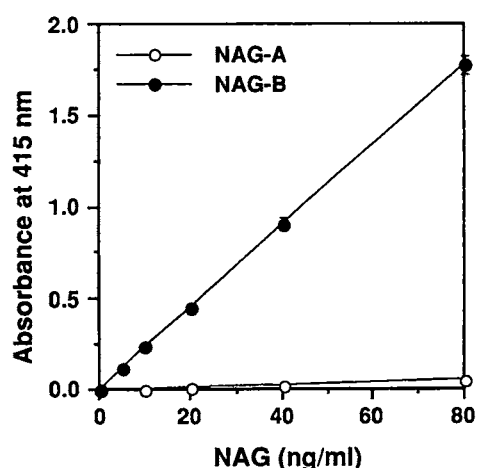


Fig.2 Standard curve for ELISA

【結果および考察】

得られた 6 種類のモノクローナル抗体はすべて NAG-B のほか、NAG-A とも反応性を示した。しかし反応するときの条件を酸性にすることで、これらの抗体は NAG-B に対する NAG-A の交差反応性が低下することが明らかとなった。これはすべての抗体の反応性に認められたことから、酸性環境下での NAG-A の構造的変化が原因であると考えられた。この性質を利用して、NAG-B を選択的に測定できるサンドイッチアッセイの構築を目的に検討した結果、固相抗体 3C9、標識抗体 4C2 が最も適した抗体の組み合わせであることがわかった。精度、感度に優れた免疫測定法とするためにさらに検討を行った結果、第一反応の pH を 5.2 に設定することで、NAG-A との交差反応性を 3%以下に抑えた高感度 ELISA 法を確立することができた (Fig.2)。本 ELISA 法による測定範囲は 0.5~80 ng/ml であり、濃度の異なる 3 種類の尿検体を測定したときの同時再

現性 (n = 8) および測定間再現性 (n = 14) は、いずれも CV 10%以下であった。添加回収試験における回収率は 91 から 114%と良好であり、尿中夾雑物の影響は認めなかった。また尿検体の希釈試験の結果は、いずれも原点を通る直線を得た。尿中の NAG アイソザイムをイオン交換クロマトグラフィー法により分離し、各画分を本 ELISA 法と酵素活性測定法で測定したところ、ELISA 法の測定値は NAG-B および NAG-I の量を反映していることが確認された。クロマトグラフィー法 (x) と ELISA 法 (y) との相関を調べた結果 (n = 20)、相関式は $y = 1.12x + 0.59$ U/l、相関係数は $r = 0.949$ と良好であった。ここで確立した ELISA 法は、従来法 (クロマトグラフィー法や電気泳動法など) に比較して操作が簡便であり、また少量の検体で直接測定でき、測定精度も非常に優れていることから、多数の検体の測定を目的としたルーチン検査にも十分適用できる方法であった (8)。

本 ELISA 法で健常人随時尿 176 例を測定したところ、その NAG-B 値は 3.3 ± 2.6 ng/ml、クレアチニン補正值で $3.3 \pm 2.1 \mu\text{g/gCr}$ であった (9)。また健常人の全 NAG に対する、NAG-B の占める割合は $17.5 \pm 6.4\%$ であり、クロマトグラフィー法の報告とほぼ一致していた。本法を用いて種々の腎疾患患者尿を測定した結果、NAG 酵素活性値とは高い相関性を示したが、尿中アルブミン、 α_1 -ミクログロブリン、 β_2 -ミクログロブリン等の腎疾患マーカーとは相関関係を示さなかった。また本法を用いて健常人および種々の腎疾患患者尿について NAG-B を測定した結果、健常人群 ($3.3 \pm 2.1 \mu\text{g/gCr}$) に比較して、ネフローゼ ($13.5 \pm 11.9 \mu\text{g/gCr}$)、糖尿病性腎症 ($8.2 \pm 6.1 \mu\text{g/gCr}$)、腎盂腎炎 ($61.5 \pm 90.2 \mu\text{g/gCr}$)、および組織学的に診断されたメサンギウム増殖性糸球体腎炎 ($10.6 \pm 10.1 \mu\text{g/gCr}$)、糸球体硝子化を伴う腎炎 ($13.0 \pm 10.7 \mu\text{g/gCr}$)、腎尿細管障害性腎炎 ($18.5 \pm 26.6 \mu\text{g/gCr}$) はいずれも有意に高値の NAG-B 値を示した。全 NAG に占める NAG-B の割合を見ると、腎障害患者尿では $25.0 \pm 12.3\%$ と、健常人群 ($17.5 \pm 6.4\%$) に比較して有意に上昇しており、さらに NAG 酵素活性 (U/l) で陰性と判定された検体 161 例のうちの 16 例が NAG-B 値 (ng/ml) で陽性となることから、NAG-B 値は NAG 酵素活性値よりも鋭敏な腎障害マーカーになり得ることを示唆する結果となった。

一方、特に腎盂腎炎では、NAG-B の割合は $35.6 \pm 13.8\%$ と、健常人に比較して著しく増加していた。一般に腎盂腎炎では、感染した細菌が産生する尿素分解酵素 (ウレアーゼ) の影響のために、アルカリ尿になるケースが多いことが知られている。ここで調べた 14 例の尿検体も、その 6 例 (43%) が pH 7.0 以上のアルカリ尿であり、アルカリ尿中でのアイソザイムの安定性に違いがあることが可能性として考えられた。そこで、内在性の NAG を除いた、種々の pH

の尿に添加した NAG アイソザイムの安定性について、NAG-A は酵素活性、NAG-B は酵素活性および免疫活性により調べた。その結果、37℃の条件で 4 時間インキュベーションを行った場合、pH 5~7 では NAG-A、NAG-B とも 80% 以上の活性を示したが、NAG-A の酵素活性は pH 7 以上で著しく低下し、pH 8 での残存酵素活性は 25%にまで低下していた。これに対して NAG-B の酵素活性および免疫活性は 80%以上保持されていた。また 4℃の条件では、1 週間保存した場合、pH 8 ではそれぞれの測定値にほとんど変化はなかったが、pH 9 の環境では NAG-A の酵素活性のみ約 40%、1 ヶ月保存では 85%もの低下が認められた。

以前より、アルカリ尿では総 NAG の酵素活性は低値を示すことが知られていたが、上記の結果は、これが NAG-A の酵素活性の低下によることを強く示唆する結果であった。実際、広範囲の pH (pH 5~9) に分布する細菌尿 211 例を対象として、総 NAG に占める NAG-B の割合を調べた結果、pH の高い尿ほど、見かけの NAG-B の割合が有意に高くなる傾向があった。従って、アルカリ尿検体は、体内（尿路中）で、または冷蔵保存中に NAG-A の酵素活性が低下するために、見かけ上 NAG-B の割合が増加することが強く示唆された。このことより、アルカリ尿を伴う傾向のある疾患、例えば腎盂腎炎や、尿路感染症治療のための抗生物質投与による腎毒性などにおいて尿細管障害を診断する場合には、全 NAG の酵素活性を測定する方法よりも、安定な NAG-B を測定する本 ELISA 法の方が、より信頼できる診断法であると考えられた。

実際の臨床診断を目的とした測定において、これを確認するため、腎盂腎炎と診断された患者尿で、pH 7 以上を示した 6 例について NAG 酵素活性値と ELISA 法による NAG-B 測定値を比較した。その結果、健常人測定値の平均+2SD を診断基準値とした場合に、その陽性率は、NAG 酵素活性値では 33% (2/6) に対し、NAG-B 値では 83% (5/6) となり、本 ELISA 法の診断における的確性を証明する結果を得た (10)。

【結論】

ヒト NAG に対するモノクローナル抗体を作製し、尿中 NAG-B を測定する新しいサンドイッチ ELISA 法を確立した。本 ELISA 法は、従来の NAG アイソザイム分析法に比べ、濃縮および透析の操作を必要とせず、約 4 時間の操作で尿中 NAG-B を直接定量することを可能にした。また、本法はアイソザイム選択性、再現性および精度に優れ、マイクロプレート法による簡便な操作で行うため、臨床診断を目的としたルーチン検査にも十分適応し得る方法であった。

本法を用いて、健常人および腎疾患患者の尿、約 400 例を用いて測定を行っ

たところ、NAG-B 値は、NAG 酵素活性値よりも鋭敏な腎障害マーカーになり得ることを示唆する結果を得た。また、pH 7 以上のアルカリ尿では NAG-A の酵素活性が不安定であるのに対し、NAG-B の酵素活性および免疫活性は安定であることを新たに見い出した。従って尿細管障害で特にアルカリ尿を示す傾向のある疾患の診断や、ウレアーゼ産生細菌に感染した尿検体を測定する場合には、本 ELISA 法は従来の NAG 酵素活性測定法よりの的確な腎障害を判定する上で、有用な手段となることが期待される。

【文献】

- 1) Noto, A., *et al.*, *Clin. Chem.*, 29, 1713, 1983.
- 2) Gibey, R., *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 137, 1, 1984.
- 3) Vigono, A., *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 130, 297, 1983.
- 4) Yuen, C-T., *Clin. Chim. Acta*, 164, 339, 1987.
- 5) Ellis, B. G., *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 64, 195, 1975.
- 6) Pitkanen, E., *et al.*, *Enzyme*, 28, 14, 1982.
- 7) Oberketter, L. V., *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 94, 281, 1979.
- 8) Numata, Y., *et al.*, *Clin. Chem.*, 43, 569, 1997.
- 9) Itoh, Y., *et al.*, *Kidney Int.*, 46, S-38, 1994.
- 10) Morita, A., *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 278, 35, 1998.

学位論文審査結果の要旨

本論文は、腎障害の臨床検査における鋭敏な指標として期待されてきたヒト尿中N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ(NAG)アイソザイムBの、簡便な免疫測定法を確立し、それを用いて腎障害の臨床診断へ新たな知見を加えることを目的として検討を行った結果を述べたものである。

- 1) ヒトNAGに対するモノクローナル抗体を作製し、新たなヒト尿中NAGアイソザイムB(NAG-B)を簡便且つ精度高く定量できる高感度酵素標識免疫測定法(ELISA法)を確立した。本法は従来の分析法では不可能であった多数のヒト尿臨床検体の正確な測定を可能にし、臨床検査にも十分適用でき得ることが示された。
- 2) 本ELISA法を用いて健常人及び腎疾患患者の尿検体を測定した結果、NAG-Bは腎障害の臨床診断マーカーとして現在汎用されている尿中NAG酵素活性測定法よりも鋭敏な腎障害マーカーであることを示唆する結果を得た。
- 3) 腎疾患別の解析により、腎盂腎炎患者尿において尿中全NAGに対するNAG-Bの占める割合が顕著に大きくなっていることを手掛かりに、NAGアイソザイムのpHによる安定性の違いを明らかにし、アルカリ尿中のNAG-B検出の臨床的有用性に関する新しい知見を得た。

本研究では、腎障害鑑別診断におけるNAG-Bの有用性について明らかにするとともに、その簡便かつ高感度な臨床検査法を確立した。また、NAGアイソザイムAのアルカリ尿中における不安定性を明らかにし、現在汎用されているNAG酵素活性による診断方法の重大な問題点を指摘した。さらにその解決策としてNAG-Bの測定が適当であることを実証したことは、臨床検査による腎障害鑑別診断の精度を高める上で極めて重要な意味を持つと評価する。

本研究の成果は、簡便な検査で、より正確な診断が求められる臨床検査薬(体外診断用医薬品)の進展に大きく貢献するものと期待されることから、本論文は博士(薬学)論文に値するものと判定した。