

糖尿病性腎症における運動負荷時の 尿中シアル酸含有糖蛋白分子量パターン

奈良県立医科大学第1内科学教室

西浦公章, 土肥和紘, 金内雅夫
中島靖夫, 山野繁, 石川兵衛

奈良県立医科大学公衆衛生学教室

土肥祥子, 杉本和夫, 森山忠重

SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF URINARY GLYCOPROTEINS AFTER EXERCISE IN PATIENTS WITH DIABETIC NEPHROPATHY

KIMIYAKI NISHIURA, KAZUHIRO DOHI, MASAO KANAUCHI,
YASUO NAKAJIMA, SHIGERU YAMANO and HYOE ISHIKAWA

First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

YOSHIKO DOHI, KAZUO SUGIMOTO and TADASHIGE MORIYAMA

Department of Public Health, Nara Medical University

Received March 18, 1991

Summary: Urinary glycoprotein patterns after exercise were studied by electrophoresis in patients with diabetes mellitus for early diagnosis of diabetic nephropathy.

The subjects were 21 patients with non-insulin dependent diabetes mellitus and 5 healthy volunteers. For each subject, voiding urine collection was done at rest and after a 20-minute exercise (300 Kpm/min). Urine samples were freeze-dried and subjected to electrophoresis (7.5% SDS-PAGE), followed by staining with PAS (sensitive to carbohydrate) and CBB (sensitive to protein) for assay with a chromatoscanner. Urine samples were additionally assayed for albumin, sialic acid and acid-soluble protein.

As for advanced diabetic nephropathy, many glycoproteins appeared in the urine at rest. The molecular weights (MW) of the major glycoproteins detected in the urine at rest were 53,000 and 33,000. In healthy controls, urine collected after exercise contained no glycoproteins. However, in patients with incipient diabetic nephropathy, the MW 53,000 and 33,000 glycoproteins were present. Moreover, the levels of these two glycoproteins were higher than that of the urine at rest. In addition, postexercise urine from diabetics showed significantly elevated levels of sialic acid and acid-soluble protein.

These results indicate that analysis of glycoprotein patterns in the urine at rest and after exercise is useful for the diagnosis of early diabetic nephropathy.

Index Terms

diabetic nephropathy, exercise test, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, urinary glyco-protein

緒 言

糖尿病性腎症の早期診断は容易でなく、ことに尿蛋白陰性期での確認は腎生検所見に頼らざるを得ない¹⁾。一方、最近では、尿中微量アルブミン測定法が導入されており、腎症早期診断の道が開かれたといえよう。Mogensen, et al.²⁾は、糖尿病罹患歴と尿中アルブミン濃度の関係を検討し、尿中アルブミン濃度が罹病期間とともに増加することを報告した。また彼ら²⁾は、安静時から尿中アルブミン濃度に高値を示す患者の中には運動負荷後に一層のアルブミン濃度上昇を示す症例が存在しており、これらの症例が腎症進展例であったという。したがって彼ら²⁾は、運動負荷前後における尿中アルブミン濃度測定が糖尿病性腎症の進展度判定に有用であると結論づけた。

一方、すでに著者ら³⁾⁴⁾は、糖尿病患者の腎生検所見と尿中シアル酸(SA)値を対比し、尿中結合型シアル酸(b-SA)値が糖尿病性腎症の進展とともに有意に増加すること、さらに尿中b-SAの主成分が低分子SA含有糖蛋白であることを明らかにしている。また著者ら⁵⁾は、尿中酸可溶性蛋白(ASP)値と腎生検所見とを対比し、糖尿病性腎症の進展とともに尿中ASP値が増加することも報告した。今回、著者らは、糖尿病患者に運動負荷試験を実施して負荷前後における尿中SA含有糖蛋白パターンの変化を腎生検所見と対比し、併せて尿中アルブミン濃度、尿中b-SA値および尿中ASP値の運動負荷による変動についても検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

対象は21例の糖尿病患者であり、性別は男性11例、女性10例、年齢は33~71(平均52)歳であった。腎生検施行例は、15例であり、Gellman, et al.⁶⁾の基準に従うと、0度5例、I度5例、II度5例に分類された。対照は25~34(平均30)歳の健常男性5例である。

2. 方法

(1) 検体

検体には運動負荷前および負荷後尿を用いた。

1) 負荷前尿：早朝尿を15ml採取し、負荷前尿とした。

2) 負荷後尿：Fig.1に示すように後述の運動負荷直

前に排尿させておき、負荷終了直後に尿を15ml採取し、負荷後尿とした。なお、尿量を維持するために負荷前の40分間に200mlを3回、計600mlを飲水させた。

(2) 運動負荷

運動負荷はトレッドミルを用い、負荷強度を300 Kpm/分(4.5 METS)、負荷時間を20分間に設定した。

(3) 測定項目

1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動：15mlの負荷前尿および負荷後尿を5mM NH₄HCO₃溶液で48時間透析し、分子量1,000以下の低分子を除去後、検体を凍結・乾燥した。その後、0.2mlの5mM NH₄HCO₃液に溶解し、メルカプトエタノールで還元後に1% SDSと8M尿素中で65℃、30分間反応させて尿蛋白を変性させた。そして検体の全量をSDS-ポリアクリルアミドスラブゲルに添加して電気泳動(7.5%ゲル)した。泳動後のスラブゲルをシアル酸と高感度に反応するperiodic acid-Schiff試薬(PAS)および蛋白質と特異的に反応するCoomassie brilliant blue(CBB)で染色して二波長クロマトスキャナー(島津製作所製)を用いてdensitogramを描き、尿中糖蛋白の分子量および濃度分布を測定した。なお、分子量マーカーには分子量24,800から74,400のcross-linked cytochrome c(オリエンタル酵母製)を用いた。

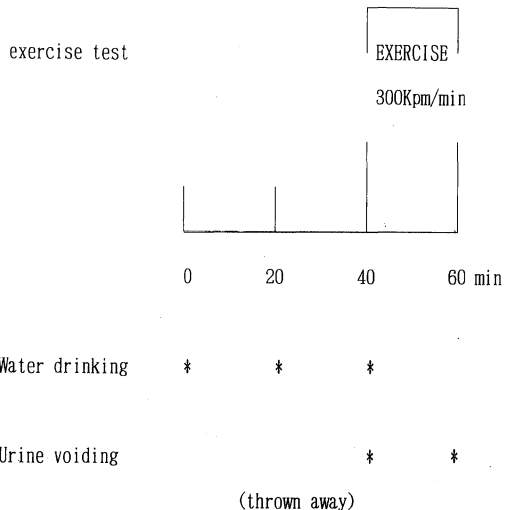


Fig. 1. Experimental setup of the exercise test.

2) その他の測定項目：尿中 ASP は色素結合法，尿中 b-SA は既報³⁾の方法により測定した。なお，各測定値は尿中クレアチニン濃度で除した値で表わした。

(4) 推計学的処理

推計学的処理は Student の *t* 検定によった。また表中の数値は平均値±標準誤差を示す。

成 績

1. 運動負荷前後尿の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(1) 運動負荷前後尿の PAS および CBB 染色像

運動負荷前後尿の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は腎生検施行例の 15 例に限って実施した。健康対照群の負荷前尿には，トランスフェリンに相当する分子量 90,000 の位置に太いバンドが認められた。一方，負荷後尿では，これらのバンドは検出されなかった (Fig 2)。

びまん性病変 0 度群における負荷前および負荷後尿は健康対照群と同様の所見を示した。

びまん性病変 I 度群における負荷前尿は分子量 90,000 の位置以外に分子量 53,000, 33,000 の位置にバンドが出現したが，分子量 90,000 以外のバンドは運動負荷後に消失した。

しかし，びまん性病変 II 度群では負荷前尿のバンド数はびまん性病変 I 度群と同様であったが，これらのバンドは負荷後にびまん性病変 I 度群と異なり濃染された。今回の検討からは，びまん性病変の進展とともに分子量 53,000 と 33,000 の糖蛋白の出現することが判明したといえる。

(2) 運動負荷前後尿における PAS 染色の densitogram

つぎに分子量 53,000 と 33,000 の両糖蛋白出現の詳細を，運動負荷前後尿の PAS 染色による densitogram か

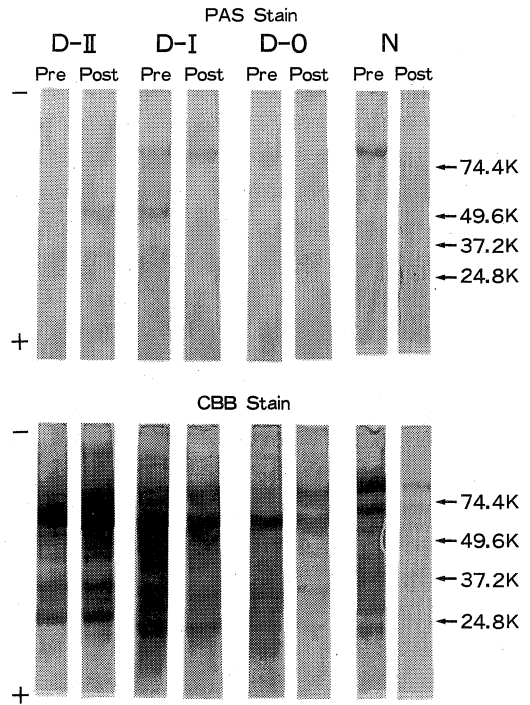


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic profiles of urinary glycoproteins before and after exercise.

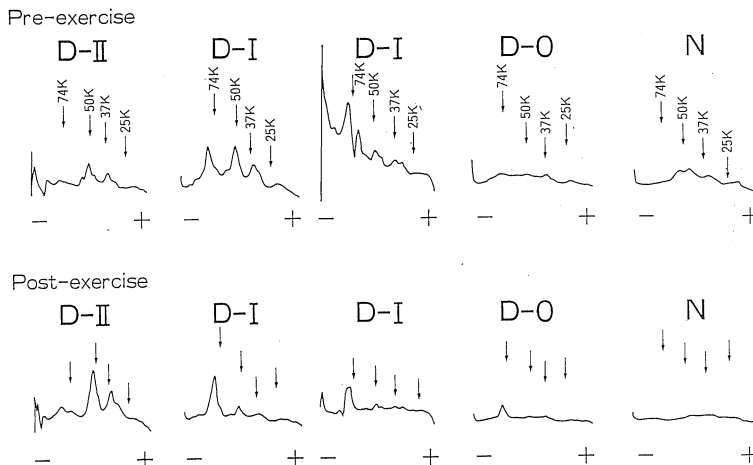


Fig. 3. Densitogram of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of urinary glycoproteins.

ら検討した。健常対照群およびびまん性病変0度群では、負荷前尿に分子量90,000の糖蛋白以外に53,000と33,000の糖蛋白の微小ピークが認められたが、負荷後にはいずれも検出されなくなった (Fig 3)。

びまん性病変I度群においても負荷前尿には分子量90,000, 53,000および33,000の位置にピークが認められた。負荷後尿では、分子量90,000の糖蛋白は消失しなかった。しかし、分子量53,000と33,000の糖蛋白については、びまん性病変0度群と同様に両ピークが消失する症例と両糖蛋白のピーク面積が減少するにとどまるパターンの症例とが混在していた。

びまん性病変II度群では、運動負荷前尿には常に分子量90,000, 53,000および33,000の位置にピークが出現しており、これらピークは負荷後に増高した。

2. 運動負荷前後尿のアルブミン濃度および糖蛋白値
この検討については腎生検施行例の一部と未施行例を加えた10例について実施した。運動負荷前尿について健常対照群と糖尿病群のアルブミン濃度および糖蛋白値を比較したが、両群間には有意の差がなかった。

次に運動負荷前後における変動についても検討したが、両群ともに運動負荷後も負荷前に比して尿中アルブミン濃度、尿中ASP値および尿中b-SA値に有意の変動を示さなかった。

一方、負荷後尿については、糖尿病群の尿中アルブミン濃度、尿中ASP値および尿中b-SA値は健常対照群に比して有意に増加していた (Table)。

考 察

糖尿病性腎症の早期診断法には、従来では腎生検以外に尿蛋白量¹⁾、クレアチニンクリアランス¹⁾、尿中各種酵素活性⁷⁾、尿中アルブミン濃度²⁾、尿中ASP値⁸⁾、尿中SA値⁹⁾、尿中β₂ミクログロブリン値⁹⁾や尿中α₁ミクログロブリン値⁹⁾などが用いられてきた。さらには電気泳動、

高速蛋白液体クロマトグラフィー⁹⁾ や western blotting¹⁰⁾ などの手段を駆使した尿蛋白分析についても検討されている。すでに著者ら⁴⁾は、腎生検所見と電気泳動法による尿中糖蛋白の分子量パターンを対比し、糖尿病性腎症の進展とともに低分子SA含有糖蛋白が増加することを報告している。Mogensen, et al.²⁾は、運動負荷後尿のアルブミン濃度測定が初期腎症 (incipient nephropathy) の診断に有用と報告している。今回著者らは、糖尿病性腎症患者の腎生検所見と運動負荷による尿中糖蛋白分子量パターンの変化との関係、さらに尿中アルブミン濃度、尿中ASP値および尿中b-SA値の運動負荷による変動を検討した。

1. 運動負荷前後尿の電気泳動像

(1) 運動負荷前尿

びまん性病変0度群における糖蛋白分子量パターンは健常対照群と同一であったが、びまん性病変I度群およびII度群では健常対照群および0度群にはごく微量しか認められない53,000および33,000の分子量に相当する糖蛋白が有意に認められた。すでに著者ら⁴⁾は、糖尿病性腎症患者の尿中糖蛋白泳動パターンと腎生検所見を対比しており、SA含有糖蛋白量が腎症の進展とともに増加し、その主な分子量が53,000, 33,000および20,000であることを報告している。今回の検討では、早期腎症に限って検討を加えたために、びまん性病変III度以上の進行例に認められる分子量20,000の糖蛋白は確認されなかった。

(2) 運動負荷後尿

びまん性病変0度群における負荷後尿の糖蛋白分子量パターンは健常対照群とほぼ同一の所見を示しており、分子量53,000と33,000に相当する糖蛋白はまったく認められなかった。びまん性病変I度群では、負荷前尿中に出現した両糖蛋白が負荷後にピーク面積の減少を示すかあるいは消失していたが、びまん性病変II度群では、

Table Urinary excretion of albumin and glycoproteins before and after exercise

Group	n	Pre-exercise			Postexercise		
		albumin (mg/g·cr)	acid soluble protein (mg/g·cr)	bound sialic acid (mg/g·cr)	albumin (mg/g·cr)	acid soluble protein (mg/g·cr)	bound sialic acid (mg/g·cr)
Normal subjects	5	44.2 ±26.7	105.6 ±18.1	105.3 ±5.3	27.3 ±8.8 *	93.6 ±14.2 *	99.7 ±15.6 *
Diabetic patients	10	157.8 ±79.6	165.3 ±48.6	142.7 ±25.8	777.1 ±585.5	176.7 ±21.5	177.7 ±26.2

** : p<0.01 * : p<0.05

これらの糖蛋白のピーク面積はむしろ増加していた。

運動負荷前後尿の糖蛋白分析した今回の成績は、びまん性病変が 0 度から I 度に進展すると分子量 53,000 と 33,000 の糖蛋白が安静時に有意に出現、I 度から II 度に進展した場合は運動時に増加することを明らかにしているといえる。

びまん性病変 II 度は I 度に比して糸球体基底膜の肥厚とメサンギウム増生が進行しているものと定義される⁶⁾。しかし、びまん性病変 II 度の症例の大半において尿蛋白は試験紙法で検出されず、腎機能も正常域にある⁷⁾。つまり、びまん性病変 II 度症例は糖尿病性腎症が顕性化する一歩手前とみなされよう。一方、Mogensen et al.²⁾は、10 年前後の糖尿病歴を有し、蛋白尿が陰性で腎機能も正常にあるが、安静時に 15 μ g/分以上の尿中アルブミン排泄を示す時期を初期腎症と呼んでいる。したがって、腎生検所見のびまん性病変 II 度は Mogensen et al.²⁾ のいう初期腎症に相当すると考えられる。

(3) 尿中糖蛋白の排泄機序

びまん性病変 II 度は循環系異常の出現する時期にも相当する。Mogensen et al.²⁾ は初期腎症では運動負荷後の収縮期血圧上昇と尿中アルブミン排泄増加が認められると述べている。すでに著者ら¹¹⁾は、びまん性病変 I 度および II 度の糖尿病患者に今回の研究と同一強度の 300 Kpm/分の運動を負荷し、収縮期血圧が健常対照に比して有意に上昇することを明らかにしている。したがって、びまん性病変 I 度および II 度は高血圧準備状態に移行しており、運動負荷がかかる患者の収縮期血圧を上昇させると結論づけられよう。

一方、Zatz et al.¹²⁾ は、糖尿病ラットにアンジオテンシン変換酵素阻害薬を投与した場合の腎糸球体内血圧の変動を検討しており、糖尿病ラットで有意に上昇する糸球体内血圧がアンジオテンシン変換酵素阻害薬投与によって改善することを指摘し、糖尿病における糸球体内高血圧の存在を示唆した。さらに Romanelli et al.¹³⁾ は、アンジオテンシン変換酵素阻害薬カプトプリルの投与が初期糖尿病性腎症患者の運動誘発尿中アルブミン排泄を減少させることを報告した。これらの知見を勘案すると、びまん性病変 II 度以上の糖尿病性腎症においては、糸球体内高血圧状態に運動負荷による血圧上昇が加わるために尿中糖蛋白の排泄が増加するものと推測される。びまん性病変 II 度では運動負荷後尿において分子量 53,000 と 33,000 の糖蛋白排泄増加が認められた今回の成績はこの推論を裏付けたといえよう。

一方、分子量 90,000 の糖蛋白が健常対照、びまん性病変 0 度において運動負荷後に消失した機序として、運動

時における一過性の糸球体濾過量低下¹⁴⁾が考えられる。

2. 運動負荷前後尿のアルブミン濃度および糖蛋白値
糖尿病患者における負荷後の尿中アルブミン濃度、尿中 ASP 値および尿中 b-SA 値は健常対照に比して有意に高値を示した。田中ら¹⁵⁾は糖尿病患者の運動負荷後に尿中 ASP 値が増加すると述べている。また Vittinghus & Mogensen¹⁶⁾ は運動負荷前後の尿中アルブミン濃度を測定し、長期罹患糖尿病患者では負荷後に尿中アルブミン濃度が増加したと述べている。これらの成績はいずれも今回の著者の成績と相反するものではなく、尿中 ASP 値と尿中アルブミン濃度は糖尿病性腎症の進展を示す重要な指標と考えられる。前述したようにすでに著者らはびまん性病変の進展とともに尿中排泄増加を示す SA の主体が低分子含有糖蛋白であることを明らかにしている。今回の糖蛋白電気泳動法についての成績と併せて考えると、尿中 b-SA 値は測定手法が簡便で定量性に優れているために糖尿病性腎症の早期診断において糖蛋白電気泳動法の代用となり得ることが示唆されたといえよう。

結 語

糖尿病患者における運動負荷前後尿の糖蛋白排泄パターンを検討し、以下の結論を得た。

- (1) 糖尿病性腎症の進展とともに尿中に出現する糖蛋白のバンド数が増加するが、その主要な糖蛋白の分子量は 53,000 と 33,000 であった。
- (2) この 53,000 と 33,000 の糖蛋白の尿中排泄量はびまん性病変 II 度の病変では運動負荷前に比して負荷後に増加した。
- (3) 運動負荷後尿は健常対照に比してアルブミン排泄量、結合型シアル酸および酸可溶性蛋白排泄量に有意の増加を示した。

本論文の要旨は第 28 回日本糖尿病学会総会 (1986 年、京都) において発表した。

文 献

- 1) 武内重五郎, 高桜英輔: 糖尿病性腎症. 臨床腎臓セミナー [4] 全身疾患に伴う腎病変 (武内重五郎編). 南江堂, 東京, p 21, 1979.
- 2) Mogensen, C. C., Christensen, C. K., Nielsen, H. B. and Vittinghus, E.: Early changes in kidney function, blood pressure and the stages of diabetic nephropathy. *in* Prevention and treatment of diabetic nephropathy (Keen, H. and Legrain, M., eds.). Mtp Press Limited, Boston, p 57, 1983.

- 3) 西浦公章, 土肥和紘, 藤本 隆, 竹中義正, 藤本順一郎, 藤井謙裕, 花谷正和, 石川兵衛, 金内雅夫, 澤井冬樹, 濱口尚重, 土肥祥子, 森山忠重: 糖尿病患者における尿中シアル酸および NAG 活性. 最新醫學 40: 1265, 1985.
- 4) 西浦公章, 土肥和紘, 金内雅夫, 山野 繁, 中島靖夫, 竹中義正, 澤井冬樹, 濱口尚重, 石川兵衛, 杉本和夫, 土肥祥子, 森山忠重: 糖尿病性腎症における尿中シアル酸含有糖蛋白分子量排泄パターン. 腎と透析 24: 287, 1988.
- 5) 金内雅夫, 澤井冬樹, 平山俊英, 湯村文敏, 濱口尚重, 西浦公章, 土肥和紘, 石川兵衛: 糖尿病性腎症における尿中酸可溶性蛋白の臨床的意義. 日腎誌. 28: 1329, 1985.
- 6) Gellman, D. D., Pirani, C. L., Soothill, J. F., Muehrcke, R. C. and Kark, R. M.: Diabetic nephropathy: A chemical and pathologic study based on renal biopsies. Medicine 38: 312, 1959.
- 7) 金内雅夫, 土肥和紘, 西浦公章, 竹中義正, 中島靖夫, 石井健司, 川野貴弘, 石川兵衛: 糖尿病性腎症における尿中酵素測定の意義. 奈医誌. 40: 719, 1989.
- 8) 木村敬子, 小田桐玲子, 笠原 督, 平田幸正, 野村武則, 明石弘子: 尿蛋白陰性の IDDM における尿中 NAG の臨床的意義— β 2MG, α 1MG, albumin との対比. 糖尿病 28: 246, 1985.
- 9) Cooper, E. H., Turner, R., Johns, E. A., Lindblom, H. and Britton, V. J.: Applications of fast protein liquid chromatography in the separation of plasma proteins in urine and cerebrospinal fluid. Clin. Chem. 29: 1635, 1983.
- 10) 田村了悟: Western blotting 法を応用した小児の各種腎疾患尿中蛋白成分に関する研究. 日腎誌. 29: 595, 1987.
- 11) 石川兵衛, 金内雅夫, 西浦公章, 竹中義正, 中島靖夫, 山野 繁, 浦上正弘, 澤井冬樹, 濱口尚重, 籠島忠, 土肥和紘, 土肥祥子, 森山忠重: 糖尿病性腎症の運動耐容能—トレッドミル運動負荷時における循環機能と尿蛋白排泄動態. 厚生省特定疾患進行性腎障害調査研究班 昭和 61 年度研究業績集. p 110, 1987.
- 12) Zatz, R., Dunn, B., Meyer, T. W., Anderson, S., Rennke, H. G. and Brenner, B. M.: Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular hypertension. J. Clin. Invest. 77: 1925, 1986.
- 13) Romanelli, G., Giustina, A., Bossoni, S., Caldonna, A., Cimino, A., Cravarezza, P. and Giustina, G.: Short-term administration of captopril and nifedipine and exercise induced albuminuria in normotensive diabetic patients with early-stage nephropathy. Diabetes 39: 1333, 1990.
- 14) Poortmans, J. R.: Exercise and renal function. Sports Med. 1: 125, 1984.
- 15) 田中 彰, 福田正博, 島 健二, 熊原雄一: 酸可溶性蛋白. 日本臨牀 44: 215, 1986.
- 16) Vittinghus, E. and Mogensen, C. E.: Albumin excretion and renal haemodynamic response to physical exercise in normal and diabetic man. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 41: 627, 1981.