

平成 21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19791105
 研究課題名（和文） 原発性高尿酸血症に対する抗SDH抗体を用いた新しい診断方法の開発
 研究課題名（英文） New method for diagnosis of Primary Hyperoxaluria used anti-SDH antibody
 研究代表者
 永田 仁夫（NAGATA MASAO）
 浜松医科大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：70397397

研究成果の概要：原発性高尿酸血症の確定診断に必要な SPT/AGT の活性はこれまで SPT 活性により測定されていたが、それに必須の酵素である GR が発売中止となり、他の測定法が必要となった。我々は SGT 活性による SPT/AGT の測定を、SDH 活性を抑えることにより可能にした。これは従来の SPT 活性や AGT 活性によく相関しており、新しい測定法として今後用いられるであろう。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2008年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,800,000 | 150,000 | 1,950,000 |

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：泌尿器科学

1. 研究開始当初の背景

原発性高尿酸血症1型（PH1）は、肝臓細胞内のペルオキシゾームに存在する serine/pyruvate:alanine/glyoxylate aminotransferase(SPT/AGT)の酵素異常によって起こり、幼い時期に全身に対する尿酸の沈着によって腎不全および不整脈となり、最後には死に至る疾患である。その診断は、生検によって採取した肝臓における SPT/AGT 活性の測定によって確定される。Christiaan S. Van Woerden らの報告によると、PH1は欧米では105から290万人に一人の罹患率で、年間に12から15万人に一人の割合で発生し、小児透析患者の2.0-2.7%の原疾患とされている。

一方、わが国における発生頻度については、われわれが過去の文献報告より集計し得た1962年から2003年間の症例数は59例であり（Takayama T., Nagata M., Ichiyama A., Ozono S., Primary hyperoxaluria type 1 in Japan, American Journal of Nephrology 25:297-302, 2005.）、わが国では40%が5歳以下で診断されているが、49%が20歳以上で診断されており、欧米に比べ高齢にて発症する症例が多いとの結果であった。さらに初発の症状が腎石灰化であった場合は100%の確率で末期腎不全へ進行している。また、全生存率は5歳で77%、10歳で71%、20歳で55%であった。なお、この集計を遂行するにあたっては、本研究申請者も共同研究者と

して参画したが、その背景は以下に示す通りである。

すなわち、SPT/AGT 活性はわれわれの教室を含めて全国的に本学において小田と市山らによって開発された酵素法を用いて測定されており、本学に全国より PH1 確定診断目的で SPT/AGT 活性の測定が依頼され、肝臓が送られてくる状態である。2005 年には本学での SPT/AGT 活性の測定により確定診断に至った症例を 2 例認めており、とくにこの解析ならびに確定診断における全過程を本申請者が担当した。

PH1 の確定診断時にはすでに末期腎不全であることが多いが、腎移植のみの治療では他疾患が原因の腎不全と比較して、移植腎の生着期間が短いとされ、移植に至らなかった場合（長期透析例）は不整脈などで死亡することが報告されている。この理由として、本疾患が肝臓内に存在する SPT/AGT 活性が低いことに起因するためであり、PH1 の治療としては早期に肝腎同時移植が行われているのが現状である。また、腎機能がある程度保持されている症例では Vit.B6 による治療が奏効するとの報告もあり、そのためにも PH1 の早期診断として SPT/AGT 活性の測定が臨床的に重要となる。

しかし、問題となっていることは現在の酵素法による測定において必須の酵素である Glyoxylate reductase (GR) が発売中止になったため、世界的に PH1 の確定診断に支障を来しており、他の方法による SPT/AGT 活性の測定法の確立が求められていることである。

以上、本申請者はこれまでの間、PH1 の研究と診療に携わってきた背景を踏まえ、この度、以下の研究を着想するに至った次第である。

2. 研究の目的

本研究において、我々は抗 serine dehydratase(SDH)抗体を用いることにより、GR を用いない SPT/AGT アッセイを開発し、これを世界中で使用可能できるようにすることにより、PH1 の診断から治療にいたる過程をスムーズに行えるようにすることを目的とする。また同時に、日本人の SPT/AGT 活性の標準値はいまだ正確に統計されていないことから、正常肝での日本人の SPT/AGT の標準値を測定する。

3. 研究の方法

従来の酵素法による肝臓の SPT/AGT 活性の測定は、SPT/AGT により L-serine と Pyruvate を基質として生じた OH-Pyruvate に NADH を加え GR にて反応させることで生じる NAD による吸光度の変化を利用して測定をおこなっている。今回我々は SPT/AGT が Serine/Glyoxylate

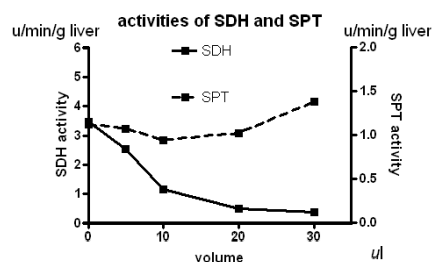
aminotransferase(SGT)活性も併せ持つことを利用し、SPT/AGT により L-serine と Glyoxylate を基質として生じた OH-Pyruvate に NADH を加え LDH にて反応させることで生じる

$\text{NAD}(\text{OH-pyruvate} + \text{NADH} \rightarrow \text{L-glycerate} + \text{NAD} + \text{H}^+)$ による吸光度の変化を利用して測定を行う。しかしその際に障害となるのが、同じ L-serine を基質とする serine dehydratase(SDH)である。SDH は L-serine を Pyruvate と NH_3 に変化させ、それにより生じた Pyruvate が LDH と反応し、NAD を発生するため、SPT/AGT の SGT 活性を利用した測定の妨げとなる。特にヒトの SPT/AGT を測定する際に対象として用いる rat においてはその活性が高く、そのため抗 SDH 抗体を用いることにより SDH の活性を無くし、SGT 活性を利用した SPT/AGT 測定を可能にする。

4. 研究成果

(1) まず Fig1 に示すとおり、rat において抗 SDH 抗体の反応量に応じて、SDH の活性を低下させることが可能であり、同時に SPT 活性には影響しないことを確認した。

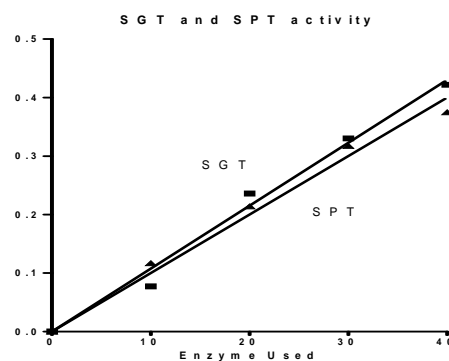
(Fig1)



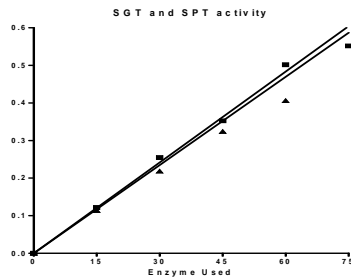
またヒトにおける SDH 活性は 0.006u/min/g liver であり rat に比べ非常に小さいため、SGT 活性を測定する際の影響は軽微であると確認した。

(3) 次に抗 SDH 抗体にて処理した rat 肝臓 (Fig2A) とヒト肝臓 (Fig2B) において、SPT 活性及び SGT 活性がほぼ同じ値になることを確認した。

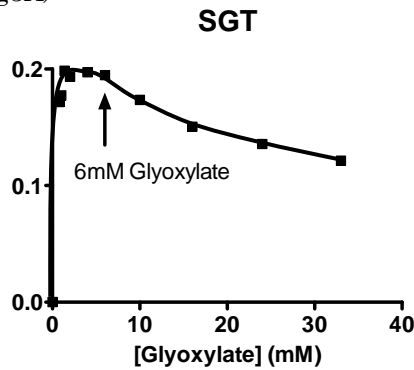
(Fig2A anti SDH antibody treated rat liver)



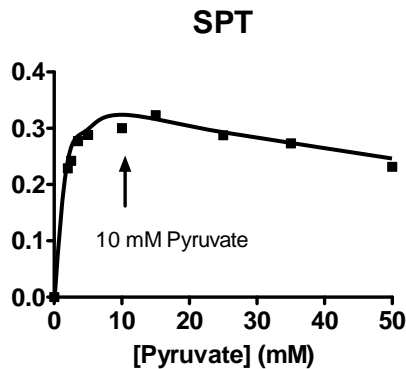
(Fig2B Human liver)



(4) さらに反応の基質となる glyoxylate および pyruvate の substrate inhibition による影響を調べることにより、SGT 活性 SPT 活性における最適量を確認し、これを測定条件に取り入れた。SGT 活性における Glyoxylate の量は 6mM(Fig3A)であり Pyruvate の量は 10mM であった。(Fig3A)



(Fig3B)

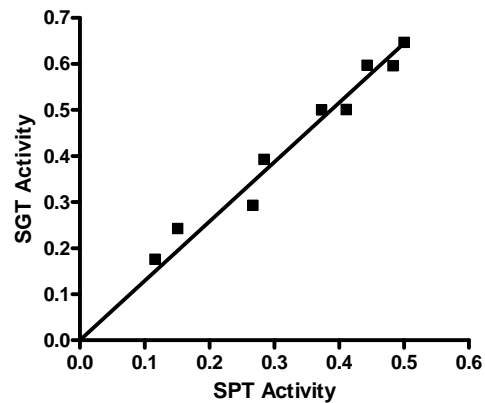


(5) 諸外国においては SPT/AGT を AGT 活性で測定する方法も報告させているが、GGT もその 66% の AGT 活性をもつため、GGT も同時に測定し補正しなければならないため、その方法はやや煩雑である。実際 GGT 活性の 66% が AGT 活性に占める割合は少ないものの、1.7% から 14% とばらつきがある (Table1)。

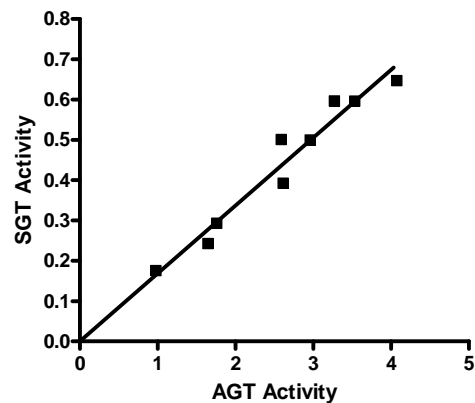
Table 1. Enzyme activities of AGT and GGT in the human liver

| | AGT activity | | GGT activity | |
|---|--------------|--------------|-------------------|--|
| | unit/g liver | unit/g liver | % of AGT activity | |
| A | 1.87 | 0.16 | 8.6 | |
| B | 3.40 | 0.20 | 5.9 | |
| C | 1.07 | 0.15 | 14.0 | |
| D | 3.64 | 0.17 | 4.7 | |
| E | 2.69 | 0.15 | 5.6 | |
| F | 4.12 | 0.07 | 1.7 | |
| G | 2.71 | 0.15 | 5.6 | |
| H | 1.71 | 0.10 | 5.8 | |
| I | 3.03 | 0.11 | 3.6 | |

(6) SPT/AGT 活性を、SGT 活性で測定する方法はこれまでの SPT 活性による測定法 (Fig4A) や AGT 活性による測定法 (Fig4B) とよく相関した。(Fig4A)



(Fig4B)



(7) 現在 SPT 活性による SPT/AGT の測定に必須の酵素である GR がコマーシャルベースでの販売が中止となっている。SPT/AGT を測定する際、AGT 活性による測定法は GGT 活性の影響により煩雑となる可能性があり、それを回避するためには、今回本研究

にて報告した、SGT 活性による測定が、好ましいと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 仁夫 (NAGATA MASAO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:70397397

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者