

羊水と羊水細胞の生理学的研究

大阪大学医学部

倉 智 敬 一

尾 崎 公 巳

は じ め に

著者らは過去2年間羊水の生理, 特に羊水液成分のOriginについて検討を重ねて来た。

羊水中の蛋白質については albumin, prealbumin の様な比較的 low molecular weight のものが多く存在し, 分子量 17 万以下の蛋白質が殆んどで, 半透膜的な透過機構の介在が考えられた。しかし低分子量の haptoglobin などの動態に関する成績は生物学的な選択機構の存在をも強く示唆するものであった。最近, 蛋白質の電気泳動の際に SDS を用いる新しい方法 (SDS polyacrylamide sucrose gradient electrophoresis) が開発されたので, 本年度はこの方法を用いて羊水, 母児血清の蛋白バンドの比較を試みた。

一方, Genetic Marker を持つ蛋白質としては LDH について検討し, 羊水中の LDH は胎児臓器組織の pattern に強く影響されている成績を S. 49 年度の報告書で発表したが, 本年度は同様の genetic marker をもつ酵素として pseudocholesterase と β -glucuronidase を選び, 母, 児いずれを main origin にしているかの検討を行った。

また, 胎児に高濃度に存在する α -fetoprotein と, 新生児期, 幼児期に高濃度であると云われている Aldolase について母, 児血清と羊水中の活性を比較検討した。

A SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析

実 験 方 法

母, 児血及び羊水を採取後, 遠心してその上清を採取し, 1% 2-merca-

ptoethanol(V/V), 4 M urea, 1% SDS(W/V) を含む 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 に試料の蛋白量が 2 mg/ml になる様に混合し, 45°C で 60 分間 incubate した。一方, polyacrylamide sucrose gradient gel は表 1 に示す組成の A 液と B 液を用いて作成した(表 1)。ゲル作成及び泳動にはスラブ電気泳動装置(ミツミ科学産業)を使用した。泳動の方法は, 作成した試料 10 μ l を用いて, 4°C 下, 40 mA constant current で 5 時間程度泳動してから gel を取り出し, 0.1% Coomassie blue, 50% trichloroacetic acid の染色液にて 10 時間染色後, 7% acetic acid で脱色し, 乾燥した。

実験成績と考案

母, 児血清, 羊水共に多くのバンドがみられたが, 蛋白質の固定は尚かなり困難であった。しかし Albumin より分子量の小さい領域だけを比較してみても, 母血清に明らかに存在するバンドが羊水中に認められないことがあり, また, 児血清に明らかに存在するバンドでも, 羊水中には見出せないものも存在する。また逆に羊水中に明らかに存在するバンドが, 母児いずれの血清にも認められない場合があった(泳動図略)。

このことから Albumin より低分子量の蛋白質でも, 母, 児血清と羊水間を自由に移動出来ないことが再確認されたわけで, 生物学的な撰択機構の存在を考えざるを得ない。また一方, 母児いずれの血清にも存在しないバンドが羊水中に見出されたことは, 羊水中蛋白質の移動経路として, 母児血清を介さない直接の経路, 例えば羊水中の剝脱細胞からの遊出などを考えざるを得ない。

B pseudocholineesterase

母児間で genetic marker に差のある酵素として choline esterase を取りあげた。choline esterase は成人と胎児とで電気泳動度に差のあることを荻田らが報告している。従って, 羊水中の isozyme がいずれの型を示すかによって, その Origin を決定することが出来る非常に便利な酵素である。

実 験 方 法

(1) コリンエステラーゼ活性の定量方法

試料の母体血、胎児臍帯血及び羊水を800g 5分間遠心分離後、その上清を -20°C に保存したもの、及び fresh sample を使用した。

pH. 7.4 $1/15$ M phosphate buffer に基質として、benzoyl choline を 5×10^{-5} M の濃度に溶解し、母体血清、胎児血清は基質溶液との最終濃度がそれぞれ20.0分の1、羊水の場合は20分の1の濃度になる様に加えた。 26°C の一定条件下でOD 240 μ における5分間でのODの変動" ΔE "を spectrophotometer により求めた。

(2) zymogram の作成

thin layer polyacrylamide gel electrophoresis の方法にて、 4°C 下にて4時間泳動後、1% α -ナフチルアセテートアセトン溶液1ml、PH 6.8 phosphate buffer 100ml Fast violet B salt 0.3gを含む反応液で1時間 incubate した後、乾燥フィルムを作成した。

実 験 成 績 と 考 案

母体血の pseudocholine esterase 活性は図1ノ3に示したごとく、妊娠初期では非妊女性の値に比べて、かなり高値を示す症例がみられ、妊娠期の進行と共に低下し、termにおいては非妊婦人に比べてやゝ低値を示している。

胎児血清においては図3に示す如く、母体血清とは対称的に妊娠期の進行と共に、活性値の上昇傾向がみられた。一方、羊水では一定の変動傾向は認められず、妊娠中期では38例中7例に、末期では23例中8例に全く活性が認められなかった(図2ノ3)。これら3者の関係を図4に示した。

zymogram による検討によると、 C_4 分画の泳動度は、胎児血清では母体血清に比べて低く、新生児血清では胎児血清と同程度であり、4~5才児になれば母体血清と同程度の泳動度を示した。

羊水中の pseudocholine esterase の C_4 バンドは、妊娠中期では28例中14例が成人型、13例が胎児型、妊娠10ヶ月症例では46例中17例が成人型、16例が胎児型、不明が13例であった。この様に妊娠中期、末期症例とも成人型、胎児型、相半ばした。このことより、羊水中の pseudocho-

line esteraseは胎児情報を持つ場合と、母体情報を持つ場合があり、同じ酵素でありながらそのmain originが異なる場合のあることは、羊水液成分を用いる出生前診断に、大きな問題点を投げかけるものと思われる。

C β -glucuronidase

ムコ多糖類の分解に関与する β -glucuronidaseの単独欠損症が、Slyらにより報告されている。

著者らは、羊水及び母体血清での β -glucuronidaseのzymogramを検討した。

実 験 方 法

既報の如き、ポリアクリルアミド薄層ゲルを用いて、試料10 μ lを添加し、ゲル幅1cm当り0.5mAの電流を加え、約2時間電気泳動を行った。尚、electrode bufferとしては、0.2M acetate bufferを用いた。

泳動後のゲル板を基質緩衝液としては表2A液を用いて、37 $^{\circ}$ Cの条件下で一夜incubateの後、染色液としてはB液を用いて5~6時間染色した。

実 験 成 績 と 考 案

母体血清と胎児血清のmain bandを比較すると、母体のisozymeは移動度が有意に高く、明らかに区別出来た。羊水は胎児のものと同じの移動度を示した。

このことから、血清中 β -glucuronidaseは胎児型と成人型に分けられ、しかも羊水中のものは胎児型であるため、羊水液成分の該酵素活性値は、胎児から産生される β -glucuronidase量を反影するものと云える。

D Aldolase

肝疾患、心筋硬塞、進行性筋ジストロフィなどでは血清中のAldolase活性は上昇するが、正常人では6 miu/ml、または20 Bruns単位/ml以下の値である。これに対して幼児では成人の約2倍、新生児では成人の約5倍であるといわれている。著者らは胎児期での活性値と羊水中での活性値、妊婦血清中

での活性値を知るために以下の検討を加えた。

実 験 方 法

母児血清、または羊水上清 0.2 ml を終濃度 0.056 M collidine buffer (pH 7.4), 0.0003 M monoiodoacetate, 0.003M FDP の混合液 2.5 ml に加え、更に 0.020 M NADH 0.05 ml, 酵素液として 2 mg GDH/TIM / 1ml を 0.01 ml を添加した。5 分間室温で放置した後、光路 1 cm のキューベットに被検溶液をうつし、別に作成した control (試料 0.2 ml + 生食水 2.5 ml) を対照として被検液の 340 m μ における吸光度 E_1 を分光光度計で測定した。再びキューベットの溶液を試験管に入れ、37 °C の恒温槽で 20 分間 incubate し、再び 340 m μ での吸光度 E_2 を求めた。 $E_1 - E_2 = \Delta E$ を求め、 $\Delta E \times 74.7$ での数を Bruns 単位とした。

実 験 成 績 と 考 案

母体血清での活性値は殆んど 10 Bruns 単位以下であった (図 4)。胎児血清では殆んどが 10 ~ 25 Bruns 単位の値を示し、明らかに母体血清値より高値を示した (図 5)。一方羊水では 5 Bruns 単位以下のことが多かった (図 6)。

このことから、羊水中 Aldolase の origin について言及することは出来ないが、胎児期では幼児期などと同様、高い値を示すことが明らかとなった。

同時に zymogram による検討を行ったが、母体血清、胎児血清、羊水の zymogram に変化はなく、この方法で羊水中 Aldolase の origin を検討することは不可能であった。

E α -fetoprotein

胎児性蛋白質 α -fetoprotein は明らかに胎児 origin であり、直接胎児から羊水への移行したものと一旦母体に移行して、再び羊水中に出現したもの、羊水から胎児に再移行した後に再び羊水へ移行したもの、それらのすべてが羊水中濃度に反影されている。

実 験 方 法

α フェトリヤキットを用いて radioimmunoassay により測定した。

実 験 成 績 と 考 案

胎児血では $100 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ の間で変動し、最も高濃度で、母体血は最も低濃度で数百 ng の order であり、羊水はその中間であった。 α fetoprotein の様な、胎児源の蛋白質も明らかに羊水中に移行し、迅速な羊水代謝にもかかわらず、かなりの高濃度に存在することが明らかになった(図略)。

結 論

- 1) SDS を用いる電気泳動によると、Albumin より低分子量の蛋白質でも、母体血清または胎児血清から羊水中への移動の認められないものがあり、生物学的な撰択機構の存在が考えられる。
- 2) 母、児血清には存在しない蛋白バンドが羊水中に見出されたことは、母児血清を介さない直接の移行経路の存在が考えられる。
- 3) 羊水中の pseudocholine esterase は、妊娠中期、末期とも成人型と胎児型が相半ばした。同じ酵素でありながら、その main origin が異なる場合のあることは、羊水液成分を用いる出生前診断に大きな問題点をなげかける。
- 4) 胎児血清と成人血清では β glucuronidase の zymogram に差があり、羊水中の酵素は胎児型を示し、胎児情報を反影していた。
- 5) Aldoease は母体血清より胎児血清の方が高値を示し、羊水は母体血清より尚低値であった。
- 6) α fetoprotein は胎児血 $>$ 羊水 $>$ 母体血であった。

表1. SDSポリアクリルアミドゲル作成液

	A液(5%)	B液(20%)
L*	7.5 ml	7.5 ml
N**	5 ml	20 ml
30% Sucrose	1 ml	2.5 ml
H ₂ O	16.5 ml	0 ml
TEMED	0.015ml	0.015 ml
10% APS	0.1 ml	0.044 ml

* L : 1.5 M Tris Hcl buffer (pH8.8), 0.4 % SDS

** N : 30 % acrylamide-Bis solution

表2. β glucuronidase 発色法

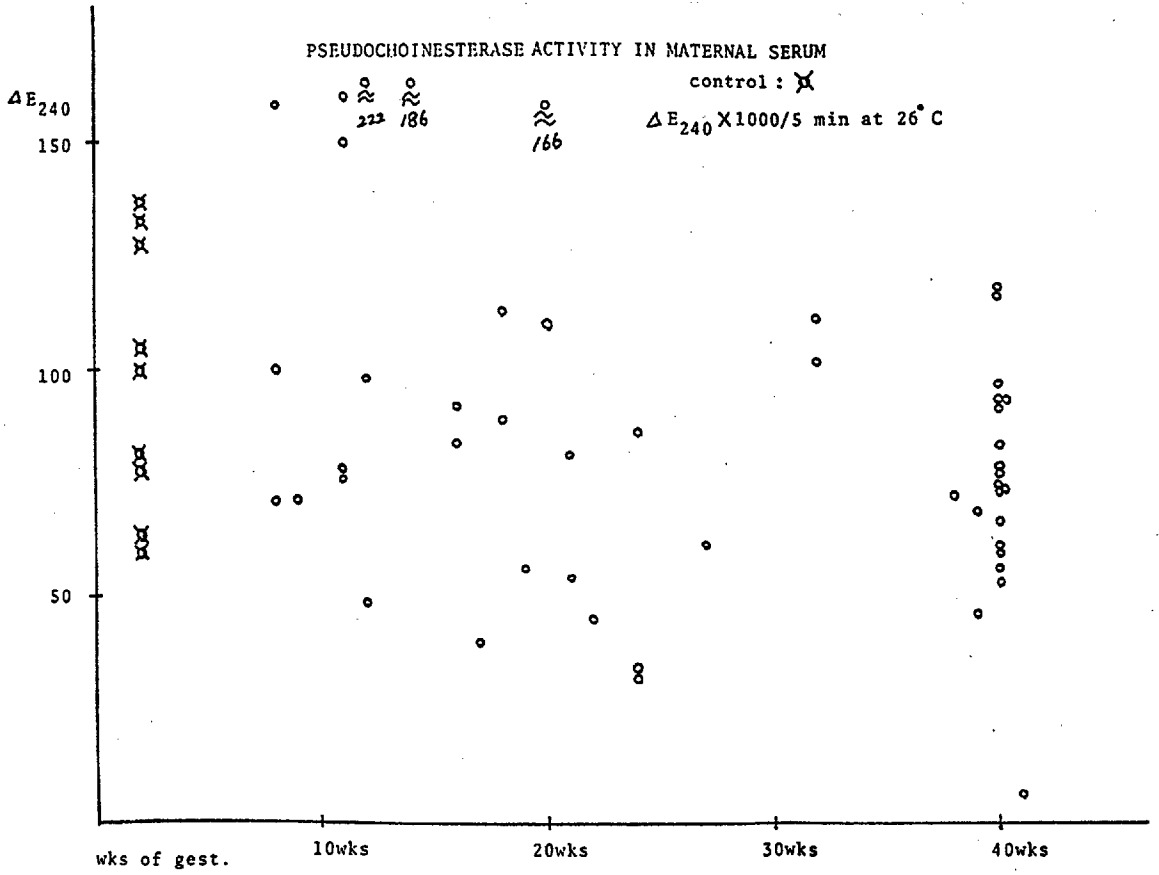
A液

- 1) 6-bromo-2-naphthyl β -D-glucuronide 30mg
- 2) absolute ethanol 10ml
- 3) phosphate-citrate buffer (pH4.95) 20ml
- 4) H₂O 70ml

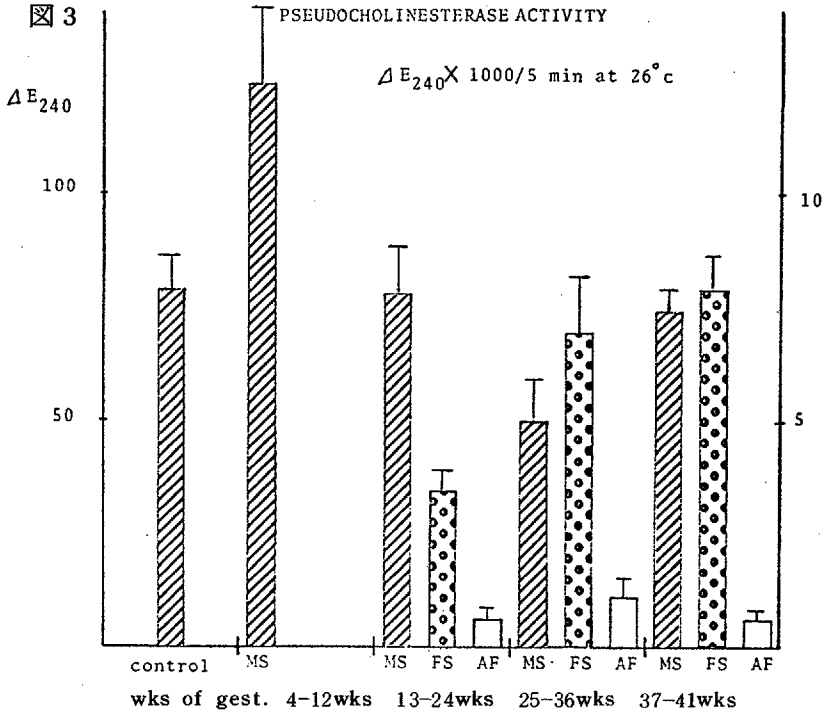
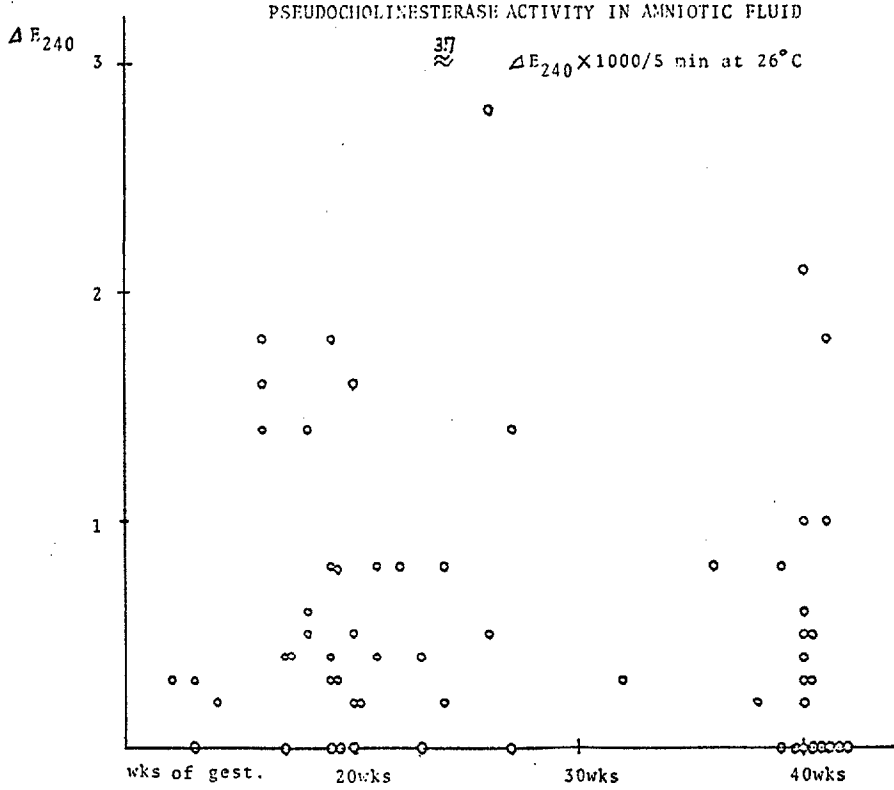
B液

- 1) Fast Blue B 100mg
- 2) 0.02M phosphate buffer, pH7.5 100ml

☒ 1

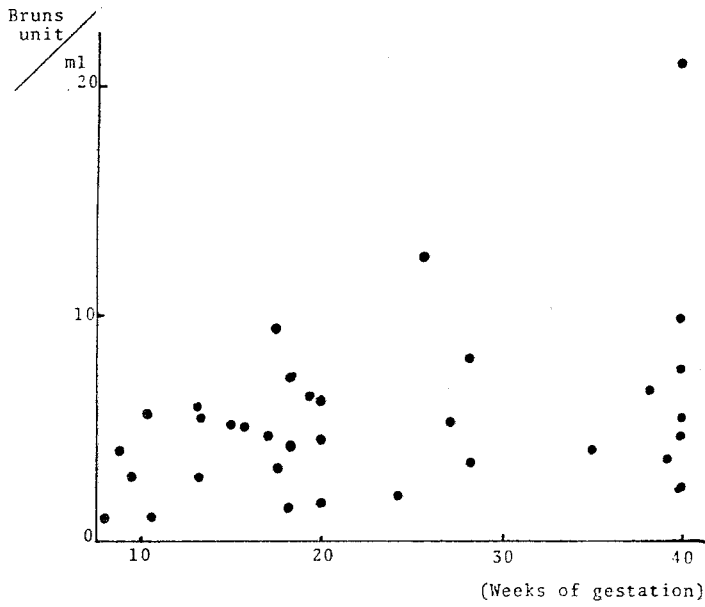


☒ 2



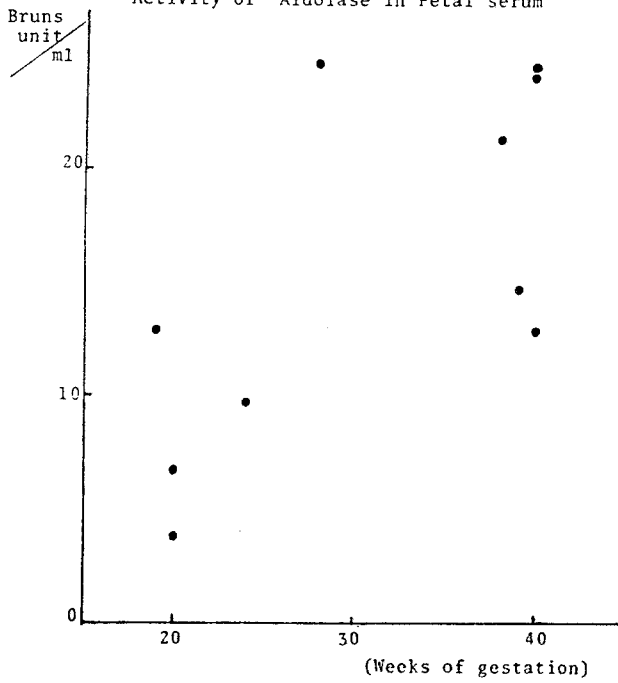
⊗ 4

Activity of Aldolase in Maternal serum

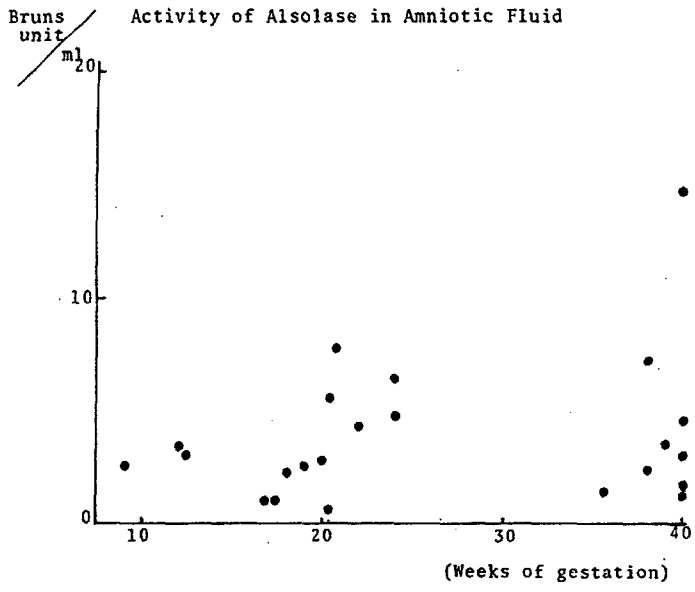


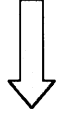
⊗ 5

Activity of Aldolase in Fetal serum

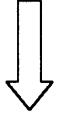


☒ 6





検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



はじめに

著者らは過去 2 年間羊水の生理,特に羊水液成分の Origin について検討を重ねて来た。

羊水中の蛋白質については albumin,prealbumin の様な比較的低分子のものが多く存在し,分子量 17 万以下の蛋白質が殆んどで,半透膜的な透過機構の介在が考えられた。しかし低分子量の haptoglobin などの動態に関する成績は生物学的な選択機構の存在をも強く示唆するものであった。最近,蛋白質の電気泳動の際に SDS を用いる新しい方法(SDS polyacrylamide sucrose gradient electrophoresis)が開発されたので,本年度はこの方法を用いて羊水,母児血清の蛋白バンドの比較を試みた。