

尿中酵素 Glycyl-prolyl dipeptidyl aminopeptidase の 泌尿器科領域における測定意義

県立がんセンター新潟病院泌尿器科（部長：坂田安之輔）

北村 康男, 渡辺 学, 小松原秀一, 坂田安之輔

CLINICAL EVALUATION OF URINARY GLYCYL-PROLYL DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE IN PATIENTS WITH UROLOGICAL DISEASE

Yasuo Kitamura, Manabu Watanabe, Shuichi Komatsubara
and Yasunosuke Sakata

From the Department of Urology, Niigata Cancer Center Hospital

Urinary glycyl-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (GP-DAP) activity was measured in 18 healthy adults and 252 patients with urological diseases. The GP-DAP activity was significantly higher in patients with prostatic cancer, bladder cancer or renal cancer and also in patients with acute prostatitis or pyelonephritis than in healthy adults. GP-DAP activity was also studied during anticancerous chemotherapy and proved to be a sensitive parameter for renal damage as are urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase, alanine aminopeptidase, β_2 -microglobulin, α_1 -microglobulin, and albumin. The analysis of tissue activities suggested that GP-DAP was located not only in the renal parenchyma but also in the prostate and seminal vesicles.

(Acta Urol. Jpn. 36 : 1391-1396, 1990)

Key words: Glycyl-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, Alanine amino peptidase, Urological disease

緒 言

尿中には血液、腎、尿路、生殖器等から由来する多種類の酵素が存在する。今回ここで報告する glycyl-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (以下 GP-DAP) は水解酵素に属するジペプチジルアミノペプチダーゼ (以下 DAP) と言われる酵素の一つである¹⁾。DAP はアミノ末端のペプチドに作用し、ジペプチドに遊離する酵素、またはアミノ酸配列の条件によってジペプチドを順次遊離する酵素と言われる。Table 1 のように基質特異性により DAP は4種類に分類され、GP-DAP は DAP IV と呼ばれているもので、ペプチドのN末端のグリシロプロリル基を水解する酵素である。この酵素は種々の生体内組織細胞に分布するが、腎においては、近位尿細管の刷子縁に多く存在することが知られている。

著者らは今回この GP-DAP の尿中活性を測定し、泌尿器科領域におけるその臨床的意義に検討を加えたので報告する。

対象および方法

対象は25歳から35歳の男子9名女子9名の計18例 (平均28.2歳) の健康成人と、1988年3月から1989年5月までにがんセンター新潟病院に入院した泌尿器科疾患患者252名とした。年齢分布は13歳から86歳で60～80歳台が半数以上を占め平均年齢は58.9歳であった。性別では男性が約70%であった。入院患者に対しては、入院時および抗癌剤投与時において、N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), alanine aminopeptidase (AAP), β_2 -microglobulin (β_2 M), α_1 -microglobulin (α_1 M), 微量 albumin 濃度と共に GP-DAP の1日排泄量、濃度、クレアチニン濃度で割った index を測定し検討した。また同じ尿を用いて24時間内因性クレアチニンクリアランス (Ccr) を測定した。Ccr の入院患者の平均は 63.3 $\pm$ 23.6 ml/min であった。また別に外来患者においては初診時の尿を用いて GP-DAP の index を測定した。

GP-DAP の測定方法は富士レビオ社製 Gly-L-pro-3,5-dibromo-4-hydroxyaniline を基質として用い、

Table 1. Four types of dipeptidyl aminopeptidase

	I	II	III	IV: GP-DAP
基質特異性	Ser-Tyr [†]	Lys-Ala [‡]	Arg-Arg [‡]	Gly-Pro [‡]
最適 pH	4.0	5.5	約8.7	約8.7
組織分布	下垂体前葉 肝, 脾	下垂体前葉 甲状腺, 脾	下垂体前葉	腎, 肝, 唾液腺 結合組織, 血清
細胞分布	リソゾーム	リソゾーム	細胞質	ミクロソーム 細胞膜

この酵素を反応させグリシルプロリンとジブロムアミノフェノールを生成する。さらにジブロムアミノフェノールを酸化酵素であるビリルビンオキシダーゼによりカップラーの2,5-キシレールと酸化縮合反応させインドフェノール誘導体の発色化合物に変化させる。この物質を波長 600 nm で比色定量し GP-DAP 活性を求めた。

NAG は NAG テスト (塩野義製薬) を用い、AAP は L-alanine-P nitroanilide を基質にした富士レビオ社製キットを用いた。β₂-M はファルマシア β₂-microglobulin (第一 RI 社製) を、α₁-M は α₁-M (富士レビオ社製) を用い、微量 albumin はミクロアルブミン中外 (日本 OPC 社) を用いて測定した。クレアチニンはサンテスト CRE-N (三光純薬) を用いた。

結 果

1. 健常成人における尿中 GP-DAP

GP-DAP の 1 日排泄量は 12.0±3.7 U/day、濃度は 13.5±5.1 U/L、index は 9.4±2.1 U/g.cre であった。1 日排泄量、濃度、index の間にはそれぞれ有意の相関を認めた。

2. GP-DAP と他の尿中酵素・蛋白との相関

Table 2 に入院患者 252 名について測定した GP-DAP 濃度と尿中酵素・低分子蛋白の濃度および Ccr、血清クレアチニンとの相関を示してあるが、NAG、AAP とはよい相関を認め、とりわけ AAP とはその相関はきわめて高かった。1 日排泄量、index で見ても同様な成績であった。Ccr、血清クレアチニンに関しては GP-DAP 1 日排泄量、GP-DAP 濃度および GP-DAP index との間にはいずれも相関を認めなかった。また年齢、性別による影響も認めなかった。

3. 健常成人と泌尿器科疾患症例の比較

健常成人と泌尿器科疾患症例における 1 日排泄量を Fig. 1 に示した。泌尿器科疾患症例においては健常成人に比べ高値を示すことが多かった。とりわけ腎細胞癌 (30.9±34.6)、前立腺癌 (32.6±25.6)、膀胱癌

Table 2. GP-DAP 濃度とほかの尿中酵素・低分子蛋白濃度および腎機能指標との相関

	相関係数
NAG	R=0.800
AAP	R=0.876
β ₂ -M	R=0.292
α ₁ -M	R=0.567
Albumin	R=0.090
Ccr	R=0.050
sCre	R=0.171

(n=252)

(21.0±14.5) などの悪性腫瘍症例、腎盂腎炎 (87.2±118.6)、前立腺炎 (39.5±17.9) などの急性炎症症例において高い値を示した。症例数が少ないが急性膀胱炎症例では初診時の尿を用いての index は上昇を認めなかった。

水腎症症例は先天性、尿管炎、後腹膜膿瘍など様々な原因を含み水腎症の程度も異なっていたが、GP-DAP 1 日排泄量は高値であったが健常者と比較し有意な値ではなかった。尿路結石症例は全例が後に手術が施行された症例で、水腎症の程度は様々であったが、GP-DAP 排泄量は有意に高値であった。なお結石の位置による尿中 GP-DAP 排泄量の差異は認めなかった。

4. 腎細胞癌症例における酵素活性について

腎細胞癌症例においては GP-DAP 排泄量は健常成人に比べ有意の高い値を認めていたが、健常者の 2 倍以上を異常値と見なした場合の陽性率は約 30% であった。

Stage, T, grade, 浸潤増殖様式別にみた GP-DAP 1 日排泄量を Fig. 2 に示した。stage 別にみた場合には stage が高くなるほど高値を示し stage I と III, VI との間には有意差を認めた。T 分類からみたときは腫瘍が進展するにしたがい高い値を認め、とりわけ T2 と T3 との差は有意であった。grade 別では grade I と 3, 2 と 3 の間には有意差を認めた。浸潤増殖様式別では INF-α と INF-β の間には有意の差が認め

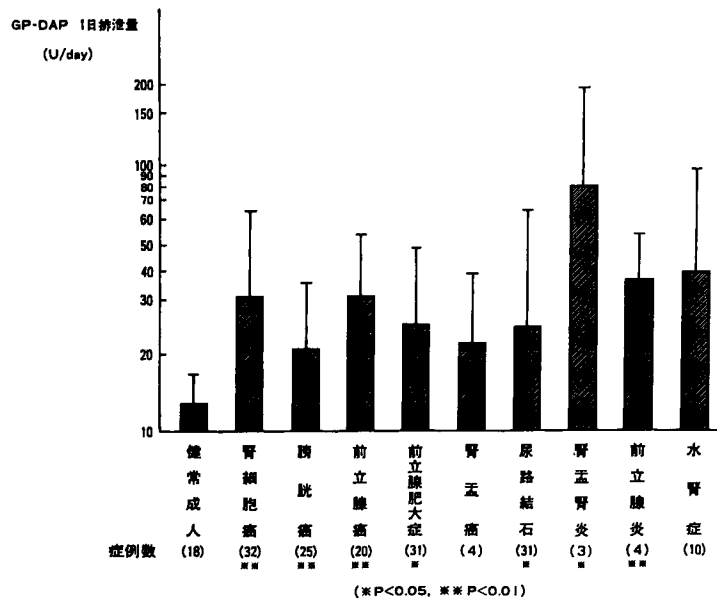


Fig. 1. Urinary GP-DAP excretion in urological disease patients (*P<0.05, **P<0.01)

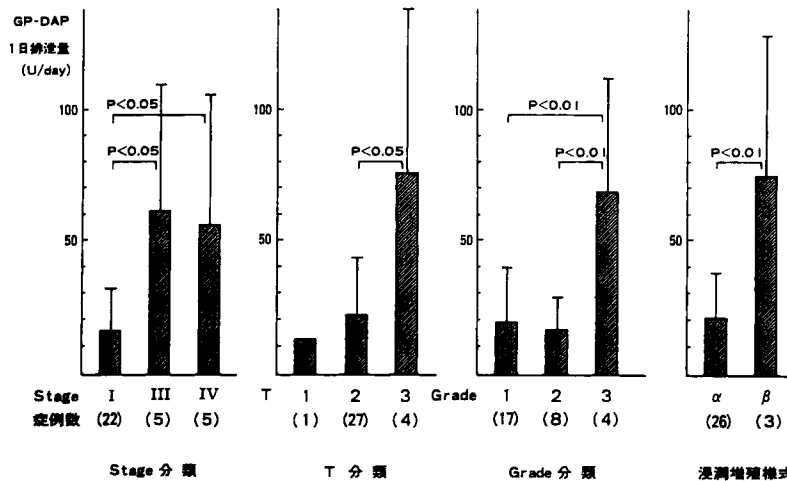


Fig. 2. Urinary GP-DAP in renal cell carcinoma patients

られた。

5. 抗癌剤投与時における変動

浸潤性腎盂膀胱癌症例に対する MP 療法 (CDDP, MTX) と, stage D2 の前立腺癌に対する VIP (VCR, IFO, PFP) 療法の時の尿中酵素・低分子蛋白濃度の変動を測定しその代表例を Fig. 3 に示した。MP 療法症例は66歳の女性で腎盂尿管全摘術後に補助化学療法として施行された症例で化学療法施行前の Ccr は 30.0 ml/min で施行10日後のそれは 41.2 ml/

min であった。VIP 療法例は T4N2M1 の71歳で化学療法施行前の Ccr は 83.3 ml/min で, 施行20日後は 100.7 ml/min であった。GP-DAP は抗癌剤投与の2~3日後においては著明に高値を示し, 他の酵素, 低分子蛋白と共に尿細管障害の良いパラメーターになりうると思われた。特に MP 療法においてはほかのパラメーターに比べ GP-DAP は大きな変動を示した。

6. 組織中の GP-DAP 活性について (Table 3)

腎, 前立腺の悪性腫瘍, 急性炎症においては高値を

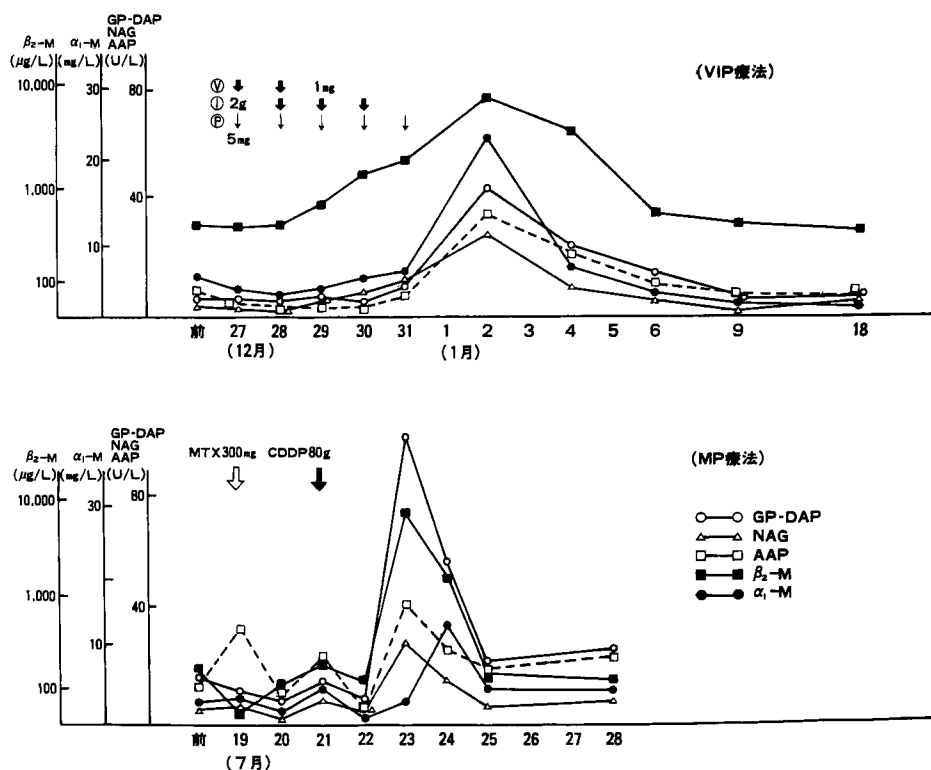


Fig. 3. 癌化学療法施行時の尿中酵素・低分子蛋白の変動

Table 3. GP-DAP activities in the tissue of kidney, prostate and seminal vesicle

(1) 腎 臓			
	正常腎組織 (U/g wet tissue)	癌組織 (U/g wet tissue)	尿中1日排泄量 (U/day)
Case 1	19.9	3.9	34.8
Case 2	27.6	1.4	37.4
(2) 前立腺・精囊腺			
	前立腺 (U/g wet tissue)	精囊腺 (U/g wet tissue)	尿中 Index (U/g·cre)
Case 1	7.4	2.3	18.4
Case 2	1.6	1.0	36.8

認めることが多かったため腎、前立腺、精囊腺においてその組織活性を調べた。GP-DAP 1日排泄量の高値を認めた2例の腎細胞癌症例において、腎細胞癌の組織濃度を正常腎組織と比較検討したが、癌組織の部分には正常部分の5~20分の1しか認められなかった。前立腺・精囊腺の組織濃度は膀胱癌症例で膀胱全摘術施行の際に得られた標本よりその組織濃度を測定した。腎組織に比べ低値であったが、その存在は示唆された。組織中の GP-DAP 濃度の測定は Hama らの方法²³⁾ により行った。

7. 著しい高値を認めた症例

GP-DAP の1日排泄量、濃度、index のいずれかが100以上の症例を Table 4 に示した。進行性の腎腫瘍（腎細胞癌および腎 MFH）症例が4例、前立腺癌症例が2例、発熱を伴う急性腎盂腎炎4例、急性前立腺炎症例が1例であった。腎盂癌1例、軽度の水腎症症例が1例であった。

考 察

Glycyl-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (GP-DAP) は1966年アメリカ国立予防衛生研究所で Hopsu-Havu と Glenn³⁾ によってブタ腎臓とラット肝臓において発見された酵素で、1970年代になってから永津、Kenny、Barth ら⁴⁻⁶⁾ によって均一に精製された酵素についての性質が詳細に報告されている。これらによれば本酵素は、腎、肝、唾液腺、各種結合組織、血清、尿などの生体内各所にその存在が認められている。血清の本酵素活性に関しては、肝細胞癌や膠原病において高度に上昇することが報告されている。腎臓に関しては Kenny ら⁵⁾ は豚腎やラット腎の近位尿細管の刷子縁に局在することを認め、松村²⁷⁾ は免疫組織

Table 4. Cases of markedly increased urinary GP-DAP (MFH: malignant fibrous histiocytoma)

No.	Age	Sex	Disease	GP-DAP/D (U/day)	GP-DAP (U/L)	Index (U/g·cre)
1	70	M	急性前立腺炎	131.4	87.6	72.4
2	47	F	腎結石, 腎盂腎炎	221.0	221.0	187.8
3	42	M	水腎症, 腎盂腎炎	197.6	52.0	124.7
4	68	F	尿管結石, 腎盂腎炎	224.2	118.0	374.6
5	62	F	腎尿管結石, 腎盂腎炎	50.9	21.1	132.5
6	76	F	尿管炎による水腎症	113.8	45.7	217.6
7	74	M	前立腺癌 T3N3M1 水腎症	97.7	59.2	144.0
8	66	M	前立腺癌 T4N1M0	95.5	112.3	63.4
9	62	M	腎細胞癌 pT3pN2M1 V2	141.8	157.6	140.5
10	60	F	腎細胞癌 pT2pV1pN2M0	63.7	49.0	106.5
11	52	M	腎細胞癌 T3N0M1	141.3	141.3	129.8
12	71	M	腎腫瘍 (MFH) pT3NxM1		477.0	289.1
13	76	F	腎盂癌 pT3pN0M0pL1pV1	46.8	49.8	119.1

学的に尿細管ばかりでなく糸球体にも一部存在することを報告している。泌尿器, 生殖系においてその組織学的存在は腎臓においてしか証明されていないが, われわれの組織活性測定からでは精囊腺・前立腺にも活性は低かったが, その存在は示唆された。

また GP-DAP の分子量は血清のものは44万前後, 尿中のものは20万と50万と言われ, 正常者尿中では50万の分子量のものの割合が高いことが報告されている。腎疾患患者尿中には20万のものが多く排泄するといわれる。今回われわれの測定したものはこの両者の合計をしたものであった。

現在まで尿中 GP-DAP に関する報告はきわめて少なく小児腎疾患に対する松山⁷⁾, 宮田ら⁸⁾の報告を見るだけで, 泌尿器科領域に関する報告はわれわれの報告が初めてである。今回のわれわれの尿中 GP-DAP 測定の目的は, NAG, AAP, β_2 -M, α_1 -M などと共に腎疾患とりわけ腎尿細管障害への総合的なビジョンの確立, 腎細胞癌などの泌尿器科疾患におけるマーカーとしての可能性の探求, 上部尿路感染症と下部尿路感染症の鑑別の3つを柱としてこの研究のスタートとした。

腎尿細管障害に関しては, 松村⁹⁾, 宮田⁸⁾らは特発性ネフローゼ症候群の初発および再発時や, Fanconi 症候群などに高値を認めたと報告しているが, われわれは確実に尿細管障害を起こすと言われている抗癌剤投与時の変動を2症例において詳細に観察した。GP-DAP はほかの4つのパラメーターとはほぼ同様の変動を認めた。MTX と CDDP の併用療法においては, ほかのパラメーターに比較して著しい変動を示し鋭敏なパラメーターである期待がもたれた。さらに症例を増やし検討の予定である。

泌尿器科疾患におけるマーカーとしての可能性は Fig. 1 に示されている様に健常成人に比べ有意に高い値を示したが, 疾患特異性は少なかった。腎細胞癌に関してはすでにほかの尿中マーカーとの関連で報告⁹⁾しているが, 進行性の場合には高い陽性率を認めるも, 早期発見のマーカーとしての可能性は期待するほど高いものではなかった。しかし stage III, VI, T 分類の T3, grade 分類の grade 3 などの進行性の腎細胞癌症例においては高い値を認め進行性腎細胞癌のマーカーとしての価値はあるように思われた。

つぎに上部尿路の急性感染症と下部尿路感染症の鑑別には有効と思われた。急性膀胱炎症例の外來初診時の尿の GP-DAP の index は健常成人の濃度の領域にあり, 急性腎盂腎炎の濃度は著明に高い値であることが多く尿路感染の部位診断には有意義と思われた。また急性前立腺炎においても高い値になり, 下部尿路感染症が前立腺にも及んだ状態を示唆していた。

以上のように尿中 GP-DAP は, 近位尿細管障害のマーカーと言われる尿中 NAG や尿中 β_2 -M と近似の成績であったが, NAG は近位尿細管の細胞内顆粒 (ライソゾーム) に存在するのに対して, GP-DAP は AAP と同様に近位尿細管の刷子縁に存在するので¹⁰⁾, 腎尿細管障害においては, 比較的早期に反応が出てくることが期待されるが, さらなる検討が必要と思われた。

本論文の一部は第54回日本泌尿器科学会東部総会, 第271回日本泌尿器科学会新潟地方会にて発表した。

文 献

- 1) 原田 実: ジペプチジルペプチダーゼ, 蛋白質,

- 核酸, 酵素 27: 237-253, 1982
- 2) Hama T, Okada M, Kojima K, Kato T, Matsuyama M and Nagatu R: Purification of dipeptidyl-aminopeptidase IV from human kidney by anti dipeptidyl-aminopeptidase IV affinity chromatography. *Mol Cell Biochem* 43: 35-42, 1982
 - 3) Hopsu-Havu VK and Glenner GG: A new dipeptide naphthylamidase hydrolysing glycyl-prolyl-amidase in human submaxillar gland. *Biochem Biophys Acta* 258: 591-598, 1966
 - 4) 永津俊治, 加藤 武, 小島幸一, 永津郁子, 榑原俊平: X-プロリルジペプチジル-アミノペプチダーゼの生理 病理化学. 蛋白質, 核酸, 酵素 25: 500-512, 1980
 - 5) Kenny AJ, Boot AJ, George SJ, Ingram J, Kershaw D, Wood EJ and Young AR: Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border peptidase. *Biochim J* 155: 169-179, 1976
 - 6) Barth A, Schulz H, Neubert K: Untersuchungen zur Reinigung und Charakterisierung der Dipeptidylaminopeptidase IV. *Acta Biol Med Germ* 32: 157-174, 1974
 - 7) 松村千春: 尿 Dipeptidyl aminopeptidase IV (DAP IV) に関する研究. 日小会誌 89: 1912-1919, 1985
 - 8) 宮田 廣, 木下智弘, 金崎光治, 道旗 敏, 野上登志子, 牧 淳: 各種腎疾患における Glycyl-prolyl Dipeptidyl-Aminopeptidase の意義. 医学と薬学 21: 1141-1152, 1989
 - 9) 北村康男, 渡辺 学, 小松原秀一, 坂田安之輔: 腎細胞癌症例における尿中 Glycylprolyl Dipeptidyl aminopeptidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, Alanine aminopeptidase および低分子蛋白排泄量の検討. 泌尿紀要 36: 535-540, 1990
 - 10) 遠藤 仁: ネフロン内酵素の分布と尿中酵素測定の意義. *Modern Urinalysis* 3: 20-23, 1987

(Received on June 25, 1990)

(Accepted on August 24, 1990)