

研究成果報告書

研究分担者：山田 俊一 (自治医科大学医学部 准教授)

平成20年4月より同大学教授に就任

交付決定額

(単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
尿中蛋白不均一性の機序の解明と			1,300
病態解析への展開応用			1,480
合計	2,300		

18590519

平成18年度～平成19年度 科学研究費補助金

基盤研究 (C) 研究成果報告書

平成20年5月

研究代表者 伊藤 喜久

旭川医科大学医学部教授

研究組織

研究代表者 : 伊藤喜久 (旭川医科大学医学部 教授)
研究分担者 : 山田俊幸 (自治医科大学医学部 准教授*)

*平成20年4月より同大学教授に昇任

交付決定額

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	1,300	0	1,300
平成19年度	1,100	330	1,430
総計	2,300	330	2,730

研究発表

(1) 論文・総説

- ・ Kiyoshi Ichihara, Kensuke Saito, Yoshihisa Itoh. Sources of variation and reference intervals for serum cystatin C in a healthy Japanese adult population. Clin Chem Lab Med. 45(9) ; 1232-36, 2007.
- ・ Kotani K, Kawabata I, Mu H, Kurozawa Y, Itoh Y. Urinary protein 1/ Clara cell 16 concentration and lung functions in male subjects with pneumoconiosis. Ann Clin Biochem. 44(6) ; 560-2, 2007.
- ・ 伊藤喜久、細萱茂実、岸浩司、鈴木紘子. 尿中アルブミン免疫学的測定法の標準化 臨床化学. 37(1) ; 6-14, 2008.
- ・ 伊藤喜久、松井英夫、矢澤郁己、伊瀬恵子. 尿検査:新しい方法論、病態解析からのアプローチ 日本臨床検査自動化学会雑誌. 33(2) ; 136-40, 2008.
- ・ Akiko Gtoh, Kazuo Uchida, Yasuyuki Hamano, Shinichi Mashiba, Isao Kawabata and Yoshihisa Itoh. Evaluation of adsorption of urine cystatin C to the polymer materials on the microplate by an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *preparation.*

(2) 学会発表

- ・ Yoshihisa Itoh. Urine Alpha-1-microglobulin immunoassay standardization in Japan. ASCPaLM 2006-The 9th International Congress of the Asia Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine. 2006年10月11-12日. Kobe (Japan).

- ・伊藤喜久. 尿中蛋白安定性と検査測定. 第1回病態解析セミナー. 2006年10月29日. 熊本.
- ・Yoshihisa Itoh, Koji Kishi. The Japanese Initiative for Standardization - Preparation of Working Reference Material for Urine Albumin and Total Protein -. NKDEP / IFCC joint conference to Address Standardization of Urine Albumin / Creatinine. 27-28 March, 2007. Measurement and Reporting. 2007年3月27-28日. Washington D.C. (USA)
- ・岸浩司, 伊藤喜久. 尿アルブミン免疫学的常用標準物質の最終ロットの作製. 第26回日本臨床化学会夏季セミナー. 2007年7月. 志摩
- ・後藤明子, 濱野康之, 内田壱夫, 伊藤喜久. 尿シスタチンC測定標準化に向けての基本検討. 第26回日本臨床化学会夏季セミナー. 2007年7月. 志摩.
- ・伊藤喜久. 尿成分の保存安定性 -尿沈渣成分, 尿蛋白を中心に-. 日本臨床検査自動化学会第39回大会. 2007年9月26-28日. パシフィコ横浜 (横浜市)
- ・Yoshihisa Itoh. Monomeric human albumin as a key reference material for standardization of total protein and albumin measurement in various body fluids. 11th Asian Pacific Congress of Clinical Biochemistry. 2007年10月14-19日. Beijing (China)

研究概要

1. 尿中蛋白分解の機序 (日本臨床検査自動化学会雑誌. 33(2), 136-40, 2008.)

尿中 $\beta 2$ -マイクログロブリン ($\beta 2-m$) は酸性尿で分解されやすく、この機序の一つとして、尿中に混在する酸性プロテアーゼの作用による。酸性化尿に精製 $\beta 2-m$ を添加し室温で放置し、SDS-PAGE電気泳動法により分離、蛋白陽性バンドを切り取り、切断部位 (cleavage site) のN末端の構造を検索した結果少なくとも cathepsin D であることが確認された。問題はその分解初期において、アミノ酸 10 残基の分解産物が出現するが、これを切断する酵素は同定されなかった。ヒト酸性プロテアーゼで尿の pH レンジで作用する、さらには切断部位などから文献的に絞り込むと同時に、これを裏付ける実験を行った。

IgG の尿中分解の検討はこの問題に一定の解決を与えた。尿中免疫電気泳動法ではしばしば β から fast γ 位に抗 γ 抗体にのみ反応し、抗L鎖抗体に反応しない沈降線が観察される。これは γ 鎖、あるいはFc γ であり、Western blots の解析でも確認されている。Fc γ はもともと血清中存在し腎からろ過され移行したものと、血清由来の IgG が尿中において分解されて出現する2つの由来がある。後者においては、Western blots の結果から少なくともヒンジ領域における分解が起きており、これはまさにペプシンによる

natural experiment の関与が示唆された。Proenzyme である pepsinogen I は分子量 42,000 であり胃主細胞で産生され、低分子蛋白として血清から尿中に移行する。ここで、pH 5.0 の条件で pepsin となり、IgG に作用し Fc γ が出現する。

これを裏付けるようにペプシンの β 2-m 一次構造上の切断部位は、77 番目 Glu と 78 番目 Tyr の間に存在し 79 番目の Ala により切断能が促進される構造 (⁷⁷Glu-Tyr-Ala) を有することが新たに示された。

Gastricin も pepsinogen I と同様胃で産生され尿中に移行する。切断部位は cathepsin D、pepsin A の切断部位より一残基 C 末端を切断する。さらに Gastricin は精漿中に豊富に存在しており、尿に混在作用する。すなわち β 2-m については、pepsinogen I、cathepsin D に Gastricin も加わりアミノ酸残基 62-64 番目、63-6 番目、67-69 番目が集中的に消化作用を受けることが示された。Gastricin は精漿中にも存在し、男性においては精子が混在する尿においては、分解作用に加わる可能性がある。

尿中出现する蛋白、ペプチド成分について TOF-MASS 分析を分子量 1,000 - 10,000 の範囲で実施したが、サンプル前処理の問題もあり多くのピークが認められ、消化作用に特異的なピークの同定は困難であった。

今後の課題は、尿中で測定されている C ペプチド、プロテイン 1 などの成分について同様の実験を実施し、切断部位の解析から作用酵素の同定を進めてゆきたい。特に胃切除後の患者尿を対象として、胃由来の酸性プロテアーゼの除外効果の影響が鍵となる。

2. ヒト α 1-マイクログロブリン尿中不安定性、不均一性 (論文発表準備中)

α 1-マイクログロブリン (α 1-m) は分子量 30,000、糖含量 20% の糖タンパク質である。 β 2-m と比べ、尿中ではきわめて安定性が高いことから、尿細管障害マーカーとして臨床応用されている。尿中 α 1-m の測定は免疫学的測定法による。しかし尿中測定値がしばしばバラツキを示すことが指摘されており、この原因の追究を進めた。

現在まで測定のための国際標準品はなく、世界で最初に測定法を開発した著者らの尿中から高度に精製した α 1-m を日本の国内標準品として定め (物性、表示値を定義)、測定の標準化を行って一定の成果を得ている。しかし新たな測定システムの開発において測定値のバラツキが再び生じたことから、精製品、尿 (ランダム、無記名、プール化) を、測定システムを有し参加を希望する企業に配布して、ISO Guide 35 に従い比較検討を行った。測定システム自体の精度は良好であった。精製品を倍々希釈すると、直線の傾きは異なるが、全て原点を通過したことから、バラツキの原因は系統誤差による。従って直線の傾きの逆数から、補正係数を求め、それぞれの検量物質の表示値を補正し、尿サンプルを測定したところ、測定値の一致を見た。検量物質の表示値の調整で、問題解決した。

しかし、細かな点では検量物質が多量体、あるいは分解産物を有するなど極めて不均

一性が高いことも微妙に測定値のズレを生じることが新たに示された。Western blots では2量体が認められることから、これらの検量物質で測定されると、サンプル測定値は低値となる。これは構造的にシステインが3個であり容易に2量体を形成しやすいことによる。さらに本来の分子量 30,000 のメインバンドの下の 27,000 にも強いバンドが認められた。このバンドはしばしば尿からの精製課程で認められるもので、これらを取り除いていない状態では、軽度測定値は上昇する。精製過程で分解した $\alpha 1-m$ が混在したものを検量物質として利用していた。このような不均一性の中で、1社が単一バンドを示したが、精製品を凍結乾燥処理したものであった。以上より、検量物質も精製 $\alpha 1-m$ を用い、液状仕上げを避け、凍結乾燥品とすべきである。

この他、細菌尿に混在すると一部は変性が認められる。どのような機序によるものか不明であるが、少なくとも乳酸菌の混在は尿の酸性化をもたらし、生命由来の、あるいは細菌由来の酸性プロテアーゼの活性化を導き分解が進むことが疑われた。

尿中の $\alpha 1-m$ 自体にも不均一性がある。また測定システムにも同様なバラツク要因が数多く存在するにもかかわらず、表示値の補正である程度標準化が実現していることは、検量物質、尿中 $\alpha 1-m$ いずれも、分子量 30,000 の成分が主体と成って抗体に反応しており、標準化の実現は予想外に容易であった。真の標準化には国際標準品の作製が待たれる。

3. 尿シスタチン C の容器への非特異的吸着 (論文投稿中)

尿シスタチン C 測定法の標準化に向けての基本検討のとして、容器素材への非特異吸着量について検討した。方法は高分子素材：素材表面の疎水性の度合いが異なる 3 種類のポリスチレン製マイクロプレート (96 穴、平底タイプ) を用いた。素材表面の疎水性の程度に応じて、高吸着タイプの MaxiSorp (Nunc, Denmark)、低吸着タイプの PolySorp (Nunc, Denmark)、超親水性処理表面により蛋白無吸着タイプと称する Proteosave SS (Sumitomo Bakelite Co., Ltd, Japan) の 3 種類を用いた。吸着蛋白量の測定は Antigen Capture ELISA により、キャリアプレートは ELISA による微量蛋白検出系を用いた、新しい測定システムを考案した。

3 種類のプレートへのシスタチン C の吸着量を尿検体との反応時間別に見ると、MaxiSorp では 10 分後： $0.27 \pm 0.15 \mu\text{g/l}$ (平均値 \pm 標準偏差)、一日後： 0.63 ± 0.42 、3 日後： 0.45 ± 0.30 、5 日後： 0.57 ± 0.44 であり、PolySorp ではそれぞれ順に 0.15 ± 0.05 、 0.31 ± 0.13 、 0.24 ± 0.10 、 0.27 ± 0.13 であり、ProteosaveSS ではそれぞれ 0.02 ± 0.02 、 0.07 ± 0.04 、 0.05 ± 0.03 、 0.03 ± 0.03 の吸着が認められ、素材表面の疎水性の度合いに依存して多かった。

尿 pH と各種高分子素材へのシスタチン C 吸着量との関係性では、対象の尿検体を尿 pH で 3 群に分割 (pH 5-6 : n = 43, pH 5-7.5 : n = 34, pH 8-9 : n = 15) し、各プレートへの 5 日目のシスタチン C の吸着量を比較した。いずれの素材においても、pH が高

値になるほど吸着量が増加した。

吸着量と尿中総蛋白量および尿シスタチンC濃度との関係性ではいずれにおいても相関性は認められなかった。

さらに各種高分子素材への尿シスタチンC吸着率と尿シスタチンC濃度との関連性を検索した。各プレートにおける、個々検体のシスタチンC吸着量と尿中シスタチンC濃度から算出した吸着率と尿中シスタチンC濃度との関係は、いずれの素材においても尿中シスタチンC濃度が低いほど吸着率は大きであった。一方、各素材への吸着率は最大で MaxiSorp が 6%、PolySorp 3%、ProteosaveSS 1% であった。また、尿中シスタチンCの基準値上限値 (100 $\mu\text{g/l}$) での吸着率は、それぞれ 1%、0.5%、0.5% 以下であった。以上から、疾患時の尿シスタチンC濃度からみて、一般的に容器に用いられている高分子素材への尿シスタチンCの吸着量は無視できる程度と考えられるが、より確実な吸着防止策としては、成分によっては親水性表面処理を施した容器の利用が推奨できると結論した。

4. 血清シスタチンCの基準値設定 (Clin Chem Lab Med. 45(9), 1232-36, 2007.)

血清シスタチンCはGFRの血清マーカーとして有用である。健常者に十分なN数を得て年齢、性などのパラメータを得て判断基準となる基準範囲を定めることは困難と成ってきている。そこで、潜在基準法により統計学的に健常者を選別して設定した。この結果年齢に依存性に増加があり、僅かであるが性差があることが初めて示された。尿における基準値設定は、感染対策の (VRE、MDRP など) 関連から、24時間蓄尿は縮小傾向にあり。細菌増殖を抑えた条件で検査するためには、安定性を低温で維持しながら、採取から短時間で尿検査測定を実施する必要がある。これからの尿成分測定は日内変動の確かめながら、Crによる補正測定の流れにあり、今後潜在基準値法による設定が主流を占めると思われる。

今後検査前検査の条件を定めながら、この新しい設定法に従って尿蛋白個別成分の基準値を設定する必要がある。

5. 尿中シスタチンCの不安定性

シスタチンCは酸性尿中で不安定である。酸性化尿、室温条件ではpH 5.0で比較的軽度にもた、pH 4.0 (通常の状態ではありえないが) 以下では、急速に抗原性を失う。 $\beta 2-m$ を分解する酸性プロテアーゼ群の切断部位は一次構造上6箇所確認されている。また、ペプシン、cathepsin DではpHの低下にともない conformational な変化をきたすことが知られる。実験的に酸性化する際、濃塩酸などで調整すると、滴定の際の局所のpH変化の影響効果を指摘する考えもある。精製シスタチンCを酸性溶液中に放置すると、免疫反応性の低下が認められるのに対し、色素法による蛋白量は変化がないことが示されており、単に酸性状態での抗原性の低下かあるいは抗体結合性の低下か、

今後、フラグメントの出現の有無、抗体反応性などの視点から、評価検討を進めたい。

6. Immunounreactive albumin の検討 (臨床化学 37 (2), 6-14, 2008.)

Comper WD らは尿中には抗アルブミン抗体と反応しない Immunounreactive albumin が糖尿病早期腎症で出現することを HPLC 法 (Accumin Direct Total Albumin Assay™) で見出し、新しい視点から尿中アルブミン測定の臨床的有用性を説いた。そこで著者らは不特定、匿名化、ランダム化した日常尿について、この事実の有無の確認から始めた。抗アルブミン抗体結合 affinity chromatography 法で結合、非結合分画に分離し、それぞれについて抗原抗体反応に基づく比濁法 (TIA) と、上記 HPLC 法とを比較検討した。同時に尿細管障害マーカーの $\alpha 1$ -マイクログロブリン ($\alpha 1$ -m) を測定した。

HPLC 法は Waters HPLC システムによる。サンプル量は $25 \mu\text{l}$ 、UV 検出器で 487nm 、 25°C 、0-12 分間は流速 0.5 ml/min の条件下で行った。著者らが作製した単量体精製ヒトアルブミン (HSA) をコントロールとすると、再現性良く 3.98 分に最大ピークを得た。日常尿サンプルもほぼ同一の時間にピークを得たことから分画成分は主にアルブミンから構成することが確認した。単量体精製ヒトアルブミンは尿アルブミンの測定標準化を目的に、国内標準品として作製されたものである。今後は HPLC 法の標準品としても利用が可能であることが示された。

糖尿病に限らず、非糖尿病疾患においても彼らの唱える Immunounreactive albumin は出現することを見出した。一般的に、高度タンパク尿、高度アルブミン尿では認められず、TIA 法と HPLC 法とのアルブミン濃度比 (%; $\text{Alb (TIA) / Alb (HPLC)} \times 100$) が低い、すなわち Immunounreactive albumin と考えられるものは、 $\alpha 1$ -m/Alb 濃度比が 35% 以上の尿細管障害、急性腎不全、健常者などに認め、糖尿病腎症に特異的な所見ではない。言い換えれば、Immunounreactive albumin は尿細管障害のマーカーとしての意味も有し、Comper が報告するところの尿細管細胞内にいったん取り込まれ放出された、あるいは、放出された後に尿中に存在する酵素群により、抗原決定基を修飾された可能性が疑われた。

抗アルブミン抗体固定化ゲルを通過した分画について HPLC 法で測定した値は、HPLC 法の尿 Alb の測定値 - Alb (TIA) の値にほぼ一致しており、immunounreactive をとらえていることが予想される。この構成成分はなにか、今後の検討が必要となる。この場合体固定化ゲルを通過した分画からの同定と、アルブミンに作用する酵素を同定した後の再現性実験が課題となる。

7. 尿沈査中に存在する蛋白成分

尿中に存在する沈査成分、とりわけ腎実質の異常を反映して出現する円柱中にも蛋白が豊富に存在することが疑われる。そこで、間接酵素免疫染色法により、円柱中に存

在する成分の局在の有無を検索した。この結果、アルブミン、THP はじめ尿中に存在するほとんどの成分の局在を認めた。この中でアミロイドβ蛋白の抗原性が初めて検出され、高い頻度で顆粒円柱に認められた。そこで、顆粒円柱が豊富に存在する沈査成分を収集し凍結融解法で破碎して上清を Western blots を実施したが陰性であった。顆粒円柱に存在する成分に抗原決定基が保持されているとして、はたして完全構造か否か不明である（山田実験）。多種類の抗体と反応確認し、抗原決定基に関連した成分の同定を MASS も含めて検討したい。

8. 尿中プロテイン1 測定の意義 (Anal Clin Biochem 2007; 44:560-562)

プロテイン1 (P1) は、肺クララ細胞 (CC16, CC10) とも呼ばれ、炎症抑制機能を有する分子量 16 kDa の低分子蛋白である。主に肺 non-ciliated cell から産生され、腎で異化分解され、尿中には血清濃度の 1/10 程度されない。塵肺症に見られる拘束性肺障害では、ある程度肺機能の低下に相関して尿中排泄量が減少する。本研究では尿中 P1 測定により肺機能低下の評価が可能であることが示された。この場合に尿中における安定性が鍵となる。これまでの検討結果では極めて安定で、上記の酸性プロテアーゼの一次構造上の切断部位は1箇所しかないことがこれを裏付けているように思われる (未発表データ)。