

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

臨床病理 (2002.06) 50巻6号:555～560.

尿中蛋白の最近の話題

—アルブミン, プロテイン1, β 2-マイクログロブリン, IV型コラーゲン—

伊藤喜久

Review

尿中蛋白の最近の話題
— アルブミン, プロテイン 1, β 2-マイクロ
グロブリン, IV 型コラーゲン —

伊藤喜久*

**Current Topics on Urinary Proteins
: Human Albumin, Protein 1, β 2-Microglobulin, and Type IV Collagen**

*Yoshihisa (Yoshi) ITOH, MD**

Current topics are presented on four urinary proteins under investigations with special emphasis on importance of preanalytical sampling and assay standardization. These comprise of albumin, protein 1 (P1), β 2-microglobulin (β 2-m), and Type IV collagen.

Microalbuminuria is an essential marker for early diabetic nephropathy. The author is trying to reduce the discrepancy of urinary albumin value with value assignment from CRM470, BCR international reference material, to calibrator in each assay system. At the same time nonspecific binding of the protein on urine containers were found, which can cause the discrepancy. Furthermore structure of albumin both in calibrator and urine is important.

Protein 1 is a low molecular weight nonglycoprotein of 14kDa isolated from pathologic urine. Marked sex-related difference was noted in urine, being higher in male than female. This is due to the contamination from prostate. Its localization was finally demonstrated with immunohistochemical staining and a RT-PCR method. With the same methods the protein is demonstrated to be synthesized in female prostate.

β 2-m is easily degraded in acid urine. Employing various immunochemical methods and analyses of its amino acid sequences, we successfully identified cathepsin D as one of acid proteases responsible for the degradation. Urinary measurement of type IV collagen is now clinically under use for an independent marker for early diabetic nephropathy. Nonspecific elevation was observed in urine with UTI, in which mechanism is should be clarified.

[Rinsho Byori 50 : 555~560, 2002]

*Department of Laboratory Medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa 078-8510

[Key Words] urine(尿), albumin(尿アルブミン), protein 1(プロテイン 1), β 2-microglobulin(β 2-マイクログロブリン), Type IV collagen (IV 型コラーゲン), preanalytical sampling and preservation (検査前検査)

尿は生理, 病的状態で, 血漿由来の蛋白質, さらに腎尿路泌尿組織由来で局所で産生される成分などが豊富に存在し, ここから新しい成分が数多く分

離同定され, 医学医療の広い領域で研究, 診療に広く利用されている。しかし, 臨床導入前に精度保証システムに沿った評価検討が必ずしも十分行われて

*旭川医科大学臨床検査医学講座(〒078-8510 旭川市緑が丘東 2-1-1)
本論文は第 48 回日本臨床検査医学会総会 教育講演 1 を Review として掲載した。

おらず、ひとたび検査として導入されると、再評価と改善の機会が失われ幾世代に渡り病態と検査値との間に大きなズレが生じているにもかかわらず、放置されている深刻な事態が少なからず存在している。地道であるが広範な標準化活動により、これらの問題を拾い上げ解決を与えて成果を挙げてきている。本稿では、著者が取り組んでいる代表的な尿蛋白成分について、特に検査前検査、測定標準化に視点を置いて、論文未発表のものも含めて研究成果をご紹介します。尿蛋白測定におけるサンプル採取、保存安定性、測定標準化など病態解析を行うために、いかにこれらの評価検討が重要か再認識していただければ幸いです。

I. CRM470による尿アルブミン測定標準化

尿中微量アルブミン測定は糖尿病性腎症の早期発見、予防、治療に最も重要な尿マーカーである。腎臓病学会、糖尿病学会の合同委員会で行った調査結果では、測定値が大きくばらつくことが明らかにされた。そこで、この原因を追究し、可及的解決を与えるため新たなプロジェクトを臨床化学会の専門委員会に立ち上げ、予備実験を経て17測定システムを対象に検索を進めた。種々の機序により測定値の乖離が起きており、その解決は予想以上に困難な状況にある。これまでの研究調査結果で明らかになったことは、一般的に放射免疫測定法は精度、正確性

に課題がある、現在臨床的に導入されているものには単点検量測定システムのものがあり正確測定がなされていない、尿サンプルの希釈直線性を欠き performance が不良なシステムなどの問題が認められた。さらには各キャリブレーターが表示値が異なるための測定結果のバラツキも疑われ、そこで、血漿蛋白標準化プロジェクト、IFCC ワーキンググループの活動経験を基礎に、CRM470(IFCC 作製血漿蛋白測定国際標準品)から各システムのキャリブレーターに値付けして、4種類の患者尿について測定し、収束の程度を評価検討したり¹²⁾。

この結果、新しく値付けされたキャリブレーター使用は、測定システム間の乖離の縮小に有用であることが示された。細かな問題としては、システムによっては正確に値付けがなされていないものがある。原因は不明であるが測定値が高めとなるシステムが2システム存在して、いずれも免疫学的挙動に問題がないことから、なんらかの系統誤差を生じている可能性が示唆された。さらに、CRM470 自体を共通キャリブレーターとして使用するとさらに乖離が縮小され(統計学的有意差はない)、改めて共通キャリブレーター、コントロール利用による標準化の有効性が確認された(Fig. 1)。

そこで、ヒト血清アルブミン(HSA)を共通キャリブレーターとして患者尿を測定し確認を試みた。希釈試験ではHSAを一部システムで、臨床上 critical

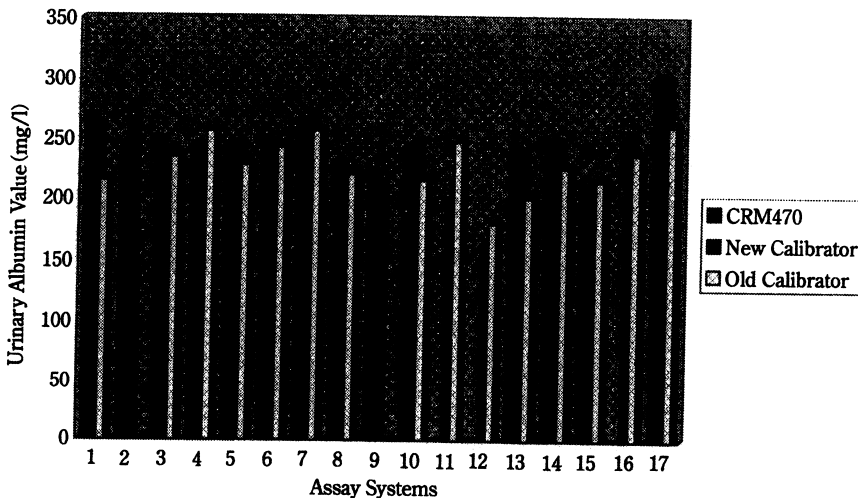


Figure 1 Urinary albumin value on CRM470, newly assigned calibrator and conventional calibrator. Use of new calibrator contributes to the reduction of the discrepancy in the value between assay systems.

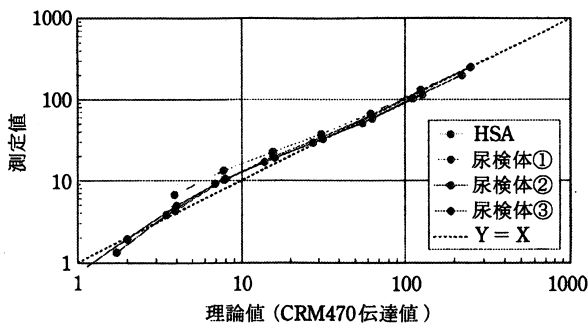


Figure 2 Dilution test of human serum albumin (HSA) and three urine. Proportionality is lost in the value below 30mg/l, which is clinically critical range.

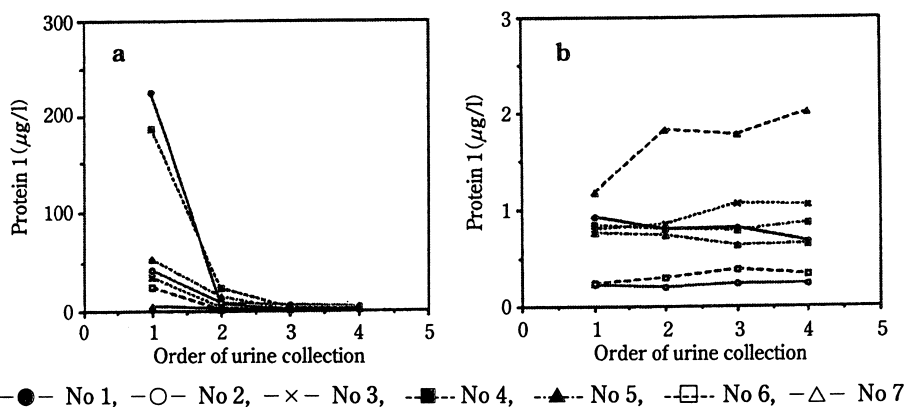


Figure 3 Protein 1 value in sequential collection from normal males (a) and females (b)⁴⁾.

な濃度範囲で直線性が失われ、やや凸上となるもの、これとは反対に下垂するものがあり (Fig. 2), この機序としてバッファーのマトリックス効果と容器への非特異的吸着の可能性が疑われ、測定システムの本来の感度限界の鑑別が難しく、今後さらに詳細に検討予定である。また HSA を検討する過程で、各社キャリブレーターについても一部 SDS で分子サイズを検討したところ、重合あるいはフラグメント化して、不均一であることが明らかとなり、検体中の不均一性も相まって、測定値のバラツキを生じている可能性も新たに示されている。このような問題があるにせよ、HSA を共通キャリブレーターとして利用すると測定システム間のバラツキはさらに縮小することが示されている。

免疫学的測定法の原点に立ち戻り、まず物性が明らかに定義づけられた二次標準品、あるいはキャリブレーターの作製が、これらの問題を解決する鍵を

握っており、新たなプロジェクトを立ち上げ準備中である。

II. 尿プロテイン 1 (P1) — 男性, 女性前立腺からの産生

著者らは尿中から不明の成分を精製し、一次構造の決定から肺クララ細胞と同一物質で、分子量 14kDa の非糖蛋白であることを明らかにした³⁾。モノクローナル抗体の作製から酵素免疫測定法を確立し、基準範囲を求めたところ尿中濃度は男性が女性に比べ圧倒的に高値となる。そこで Thompson “四分配尿”法で採取したところ、尿中 P1 の測定で初尿が高値で漸減性の変化を示すことを見出した (Fig. 3)。すなわち、生殖器から産生され尿道へ分泌局在し排尿により washout され漸減性を示したと推定した。そこで精漿 P1 を測定した結果、平均 1.3mg/l の高濃度に存在することを見出し (Table 1), 最終的

Table 1 Serum protein in seminal plasma

Proteins	n	average	range	urine value
protein 1	14	1.3 mg/l	0.2~6.6 mg/l	0.01 mg/l
albumin	18	498.8 mg/l	180~1,270 mg/l	<20 mg/l
IgG	18	56.1 mg/l	40~122 mg/l	<10 mg/l
α 1-microglobulin	18	11.0 mg/l	9~16.5 mg/l	<5 mg/l
α 2-microglobulin	18	—	<10 μ g/l	<10 μ g/l
transferrin	18	645.1 mg/l	13~132 mg/l	<1 mg/l
cystatin C	9	31.4 mg/l	2.37~6.25 mg/l	<10 μ g/l
NAG-B	10	5.8 mg/l	1.9~11.2 mg/l	<10 μ g/l
basic fetoprotein	10	114.7 μ g/l	64.2~145.2 μ g/l	<5 μ g/l
PSA (TR-FIA)	9	1.1 mg/l	0.72~8.70 mg/l	0.0005 mg/l
PAP	9	31.4 mg/l	2.4~3.7 mg/l	0.001 mg/l

High concentration of serum protein in seminal fluid may cause nonspecific elevation of urinary value when first-stream voided urine is taken as a sample.

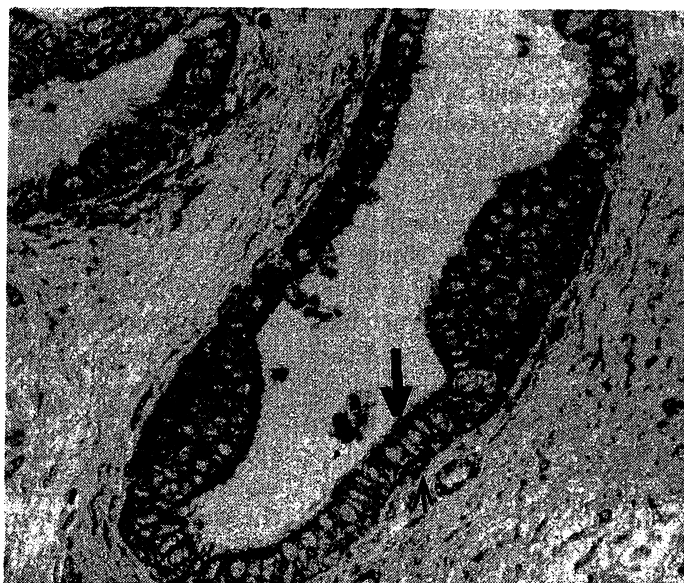


Figure 4 Localization of protein 1 in female prostate by immunohistochemical staining⁹⁾.

に免疫学的組織染色，RT-PCR法により前立腺からの産生，局在を証明した⁹⁾。

女性については，四分配尿で極めて低値で変化を示さなかったが，一例だけわずかに漸増するケースに気づいた。男性尿中 NAG-B isozyme の四分配尿測定での経験から，排尿停止し採尿する際の尿道内圧の上昇が，作用することがある。局所からの分泌の可能性を疑い，直接，免疫組織化学的検索を行い女性尿道上皮，女性前立腺における局在を証明し，この問題に解決を与えることができた (Fig. 4)⁹⁾。

P1に限らず精液中にはかなりの濃度の血清蛋白が

存在しており (Table 1)，また女性においても生殖器由来の数多くの成分の混在が問題となりうる。随時尿で尿蛋白により腎機能を評価する場合にも，局所を清拭して初尿は採取せず，十分な尿量で洗い流した後に中間尿を採ることの重要性を，本研究からも警鐘が鳴らされている。

III. 尿中 β 2-マイクログロブリンの不安定性

酸性尿中 β 2-マイクログロブリン (β 2-m) の変性の機序はこれまで不明であったが，pH，温度依存性により作用することから，混在する酵素の作用がこれまで

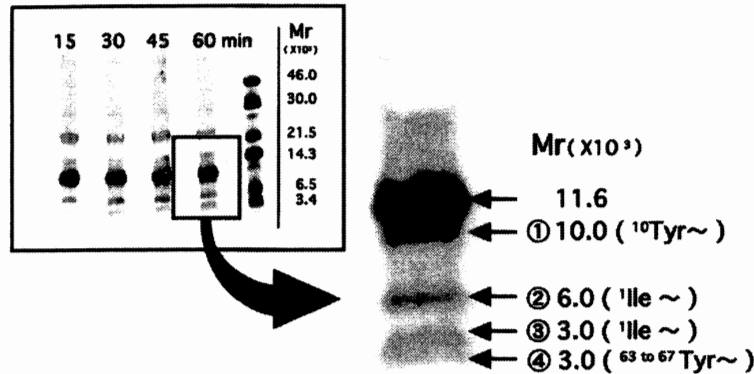


Figure 5 Degraded β_2 -microglobulin in acidified urine⁹⁾.

Degraded product with a molecular weight of 6,000 and 3,000 are the product by cathepsin D. The product with 10,000 is by digestion of an unidentified protease.

推定されていた⁹⁾。アンチプロテアーゼキットを用いて分解変性を阻止できたのがペプスタチンのみであり、この結果から、尿中分解酵素を3種に絞り込み、さらに精製 β_2 -m を酸性化尿に添加して Immunoblotting で分解産物を確認これを回収して、N 末端の一次構造を決定して切断部位を確認した。この結果、切断部位から精製カテプシン D であることが明らかとなった (Fig. 5)。最終的には、精製カテプシン D と精製 β_2 -m の混合再構成実験で酸性条件で行い証明した。カテプシン D は分子量約2~5万(重合もある)の低分子蛋白である。したがって異化は腎臓で行われ、尿中、血中動態は β_2 -m と殆ど同一であり、常に β_2 -m は、カテプシン D に曝され分解を受け、尿中 β_2 -m の変性は、いかなる条件でも不可避となる。

今後の課題として残されているのは、Immunoblotting で分解陽性バンドが尿中添加で分子量1万、6000、3000 が出現したのに対して、精製 β_2 -m とカテプシン D の直接反応実験では、後者で1万の陽性バンドが認めていない。恐らくは、精製カテプシン D 以外の酸性プロテアーゼが尿中には存在し、同時に分解作用していると推定され、現在新しい分解酵素の同定を試みている。

本邦では尿中変性による蛋白の underestimation が腎臓内科、泌尿器医師の殆どに知られておらず、 β_2 -m 測定も尿細管機能評価に用いられ続けてきた。ようやく、昨年度日本腎臓病学会腎機能/尿蛋白測定検討小委員会から、尿中安定性の高い α_1 -マイク

ログロブリンの測定が推奨されるようになった⁷⁾。今後、C ペプチド、HCG など臨床的に現在利用されている成分についても、検査前検査の立場から、適性を再検討する必要がある。

IV. 尿中 IV 型コラーゲン

腎糸球体はメサンギウム細胞などの細胞成分と、IV型コラーゲン (IV・C) などから成る細胞外基質によって構成されている。糖尿病性腎症においては糸球体基底膜肥厚、メサンギウム領域拡大、尿細管間質肥厚という特徴のある病理学的病変が認められており、これらは高血糖による IV・C の産生増加が関わっているとされる。

最近、尿中 IV・C (u IV・C) 測定の酵素免疫測定法が開発された。u IV・C は分子量が約 500kDa と高分子であることから、疾患に関連して過剰産生され、尿中に排泄されると考えられ、本症早期における腎障害の有無の判定が可能になると推論できる。事実、臨床データとして、u IV・C は本症第一期 (尿中アルブミンがまだ陰性の時期) から病期の進行とともに有意に増大する可能性も示されている。

u IV・C 測定は保険収載されて日常検査としての利用が行われている。現在測定システムも含め再検討中であるが、尿中には複数の u IV・C を分解する酵素が存在し、測定システムとの相互作用により、感染症などで測定値が一部 overestimation し病態解析に影響を与えている可能性が明らかとなっている (未発表データ)。

V. おわりに

検査前検査,あるいは検査に基づく影響因子を詳細に解析して,病態解析,診断,治療モニターリングなどにおいて臨床検査値が真に価値が発揮されるよう,尿蛋白測定を一例に,標準化活動の重要性を示した。臨床的意義があまりに強調されすぎて,その影に隠れて,解決すべき問題点が数多く陰在していることを,本稿でも再認識していただければ幸いである。

本研究の一部は科学研究費補助金基盤研究(C)(課題番号13672411),基盤研究(B)(14370791)による。

文 献

- 1) Itoh Y, Ichihara K, Kanno T, et al : Serum protein standardization project in Japan : Evaluation of an IFCC reference material (RPPHS/CRM470) and establishment of reference intervals. *J Clin Lab Analysis* 11 : 349~352, 1997
- 2) Price C, Newman D, Blirup-Jensen S, et al : First international reference preparation for individual protein in urine. *Clin Biochem* 31 : 467~474, 1998
- 3) Itoh Y, Ishii S, Okutani R, et al : Protein 1 : its purification and clinical application. *J Clin Lab Analysis* 7 : 394~400, 1993
- 4) Ishii S, et al : Sex-associated differences in protein 1 values in urine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32 : 31~36, 1994
- 5) Zaviacic M, Danihel L, Ruzicova M, et al : Immunohistochemical localization of human protein 1 in female prostate (Skene's gland) and the male prostate. *Histochem J* 29 : 219~227, 1997
- 6) Yamamoto H, Yamada T, Itoh Y : Probable involvement of cathepsin D in the degradation of β 2-microglobulin in acidic urine. *Clin Chem Lab Med* 38 : 495~499, 2000
- 7) 折田義正, 伊藤喜久, 他 : 日本腎臓学会腎機能(GFR)・尿蛋白測定委員会報告書. *日本腎臓学会誌* 43(1) : 1~19, 2001