〔シンポジウム：尿蛋白一病態解析へのアプローチ〕

尿蛋白臨床研究・検査

—— その過去, 現在, 未来 ——

伊藤 喜久

SUMMARY

Most urine specimens are easily obtained and examined by simple available tests. Urine protein research and tests have been, therefore, main interests in urinalysis. Past, present and future prospects of clinical research and tests on urine protein are reviewed here in relevance with laboratory medicine.

Key words: urine, protein, protein 1, history, electrophoresis.

はじめに

臨床検査は医師のオーダーで始まり、医師への結果報告までのいくつものステップから構成されている。このいずれの過程にも密接に関連して、日常の検査の向上をめざすのが臨床研究である。一方、基礎研究は、生物としてのヒトの本質を科学的に明らかにするものである。尿蛋白において中心となる課題は尿に出現する蛋白の構造、物性、機能に関わる問題、腎を中心に組織の構造機能の解析から尿蛋白の腎における handling, 病因・病態解析、およびこれを正しく評価するための方法論の開発、評価法の研究に大別され、基礎、臨床研究の有機的な結びつきの中で相乗的に尿蛋白の研究の発展が導かれてきた。

ここでは著者の専門である尿蛋白の病態解析の視点から、歴史的な背景も踏まえて現在までの尿蛋白の研究、検査の現状について概説し、近未来を鳥瞰する。

尿蛋白研究、検査の歴史

尿蛋白の研究、検査は歴史的に蛋白尿を対象に進展してきた。その起源はヒポクラテスの時代までさかの

ぼることができる。泡立つ尿（高度な蛋白尿）は予後不良の証であった。17世紀、オランダの Dekker は尿に酢酸添加、煮沸により尿中蛋白を初めて科学的に証明している。現代でも十分通用する尿総蛋白測定法が300年前に確立されたのは、驚異としかいいようがない。血清蛋白の進歩に添うようにして、尿蛋白の研究、検査が飛躍的に進展が導かれたのは、今世紀初頭からである。とりわけ、第二次世界大戦後、方法論の開発とこれに伴う新しい蛋白成分の登場、臨床的意義の確立の有機的なサイクルの上に、分子生物学の登場により病因の追求が進められ現在に至っている。転換点となった方法論は、電気泳動法、カラムクロマトグラフィー法、radial immunodiffusion, radioimmunoassay, enzymeimmunoassay などの抗原抗体反応に基づく測定法、モノクローナル抗体作製、PCR 法などの遺伝子操作法などがあげられる (Table 1)。

尿検査における歴史的な決定打は、尿試験紙法の開発である。一枚の試験紙からきわめて多くの情報が得られるため、病態解析能力は飛躍的に深化された。また、Berggård らによるカドミウム中毒患者尿からの β_2 -microglobulin の単離精製は、その後の種々の臨床

Clinical research and tests on urinary protein: Its past, present and future.

Yoshihisa Itoh; 自治医科大学臨床病理学教室

Correspondence address: Yoshihisa Itoh, Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School, 3311-1, Minami-kawachi-machi, Tochigi 329-04, Japan.

第47回日本電気泳動学会春季大会・シンポジウム

Table 1. Selected methodology contributing to the development of research and test for proteinuria.

Total serum protein		
Modified Kjeldahl method	Van Slyke	1920
Biuret method	Kingsley	1939
Refractometry	Reiss	1902
Precipitation		
Sodium sulfate	Howe	1921
Electrophoresis		
Free boundary EP	Tiselius	1937
Dipstick test	Free	1956
Radioimmunoassay	Berson, Yallow	1959
Genetic engineering		
Monoclonal antibody	Köhler, Milstein	1975
PCR method	Saiki	1989

的有用性の高い尿蛋白の登場に先鞭を付ける火付け役となり¹⁾, さらに Mogensen は尿中アルブミン精密測定により, インシュリン依存性糖尿病における腎症の早期発見, 治療法が確立され²⁾, ここから蛋白成分の個別定量の臨床意義の追求が現在まで脈々と続けられている。

尿蛋白臨床研究の現状—著者らの研究も踏まえて

尿蛋白の研究は尿蛋白の性状に関するものと, 蛋白尿の生成の機序に関するものに大別される。尿は蛋白精製, 単離の貴重な宝庫であり, 先に述べた Berggård らの研究手法は現在でも尿蛋白研究の原点である。構造特性を反映して, 中心となるのは分子量がアルブミン未満の低分子蛋白であり erythropoietin, retinol binding protein (RBP), α_1 -microglobulin (α_1 -m), HCG などの単離精製が進められ, 構造, 物性, 機能が解明され, 特異抗体を作製, 種々の測定法の開発を経て, 臨床研究が広範に展開されてきた。

時代の変遷に伴い多くの成分が精製単離され, より微量な成分の尿からの精製がめざされた。しかし, 技術的にも困難をきわめ, 例えば著者らが 1989 年から始めた Protein 1 (P1) の精製は 2 年以上も要し, 単一クローン抗体を作製した後, affinity chromatography を駆使するなど尿からの収集率を高めるなどの努力にもかかわらず, きわめて微量な精製品しか得られず, きわめて厳しい状況であった³⁾。そこで一次構造の決定の後, recombinant P1 を作製, native との構造, 機能などに差異がないことを確かめた後, 以後の研究はすべてこれに置き換えた⁴⁾。現在においても, 尿中には未同定の成分が数多く残されている。このうち, 低分子, 非糖蛋白質で, 微量に体液中に存在する

成分については, recombinant 蛋白の作製を研究のステップに組み入れることは, 今や不可避となりつつある。

このように尿を精製ソースとする研究に陰りが生まれてきたとき, これと入れ替わるようにして近年急速に登場したのが, 遺伝子操作により登場した無数の新しい成分である。基礎研究の成果により, 構造, 機能, 測定システムなどがほとんど解明, 確立され, 腎における生理, 病態生理の解析に導入されてきている。

蛋白尿の生成の機序に関する中心課題は, 糸球体壁における蛋白透過性の問題である。免疫学的機序によるものと, 糖尿病など非免疫学的機序によるものがあり, size barrier, charge barrier とこれに作用する液性因子, 透過因子, 系統的な代謝因子, また分子構築の異常などの視点から追求が進められている^{5,6)}。尿細管における蛋白の handling では Megalin⁷⁾, peptide transporter などの蛋白, ペプチドの吸収に関わる因子の発見, Cl channel 異常による低分子蛋白尿の発症が突き止められるなど⁸⁾, 病因の解明を追い風に尿蛋白研究は腎のネフロンの微少環境に関わる因子の研究が興隆をきわめている。

尿蛋白検査の現状—問題と解決への努力

尿蛋白検査は, 患者から尿を採取, 試験紙検査, 尿沈渣検査等でスクリーニングを行い, 必要に応じてさらに総蛋白量, 電気泳動法, 個々の成分の定量などの定性, 定量を施行して, 最終的に臨床像も加味して病態解析が行われる (Table 2)。

尿のサンプリング, 保存安定性は検査前検査における重要な課題である。 α_1 -m など一部を除いて⁹⁾, 尿中蛋白のほとんどは, 酸性, 室温の条件で抗原性を失う。これは複数の酸性プロテアーゼの作用によるものとして, 詳しい作用機序はまったく不明であり, したがって防止策も満足いく結果は得られていない。少なくとも新鮮尿を直ちに検査すること, -80°C 保存の励行が望まれる。採取時における contamination は歴史的にもよく知られているが, 予想もしないデータのばらつきの際, 念頭に置く必要がある。成分によるが, 精漿の影響により尿中蛋白濃度が変動することが示されており¹⁰⁾, 尿中安定性も考慮すると, 採取条件は早朝第一尿を避け日中の活動時に十分な尿量で排尿した中間尿が至適と考えられる。非特異的な吸着ができるだけ少ない採取容器などの検査材料の開発も持続的に検討されている。尿蛋白は混在する細胞成分, 塩

Table 2. Laboratory tests for proteinuria.

	Indication
Routine	
Dipstick test	Evaluating glomerular function by measuring albumin
Total protein value	Evaluating relatively advanced renal dysfunction
Sediments	Screening renal and genitourinary abnormalities
Subroutine	
Qualitative test	Detection of monoclonal protein by electrophoresis (EP) Detection of specified protein pre-renally elevated by simple tests (manual latex agglutination test, paper chromatographic test, etc) Classification of proteinuria by EP or column chromatography
Quantitative	Evaluating pathogenesis, glomerulotubular dysfunction, and prognosis by measuring key urinary proteins.
Others	Precise investigation by employing all possible methodologies

類に非特異的吸着を起こしやすいとされ、混和遠心後の上清をサンプルとして用いている。しかし、個別成分別に、温度、pHなども含めて至適採取条件の設定は十分検討がなされていない。

試験紙検査における尿蛋白検査は、BPB との反応特性からアルブミンを検査対象としており、基本的には糸球体機能を評価するものである。簡易検査において、同時に非アルブミン成分（グロブリン）を含めた総量、あるいは個別成分の検出が可能になると、尿細管障害などがスクリーニングされ、蛋白尿の局在診断、病因診断解析も夢ではない。この開発はもっとも力を注がなければならない分野である¹¹⁾。

1980年代後半からは種々の電気泳動学的解析（セルロースアセテート膜電気泳動、SDS-PAGE、Western blots、Capillary EP）、陰イオン交換クロマトグラフィーによる解析法、自動免疫測定法の登場により、複数の成分を同時に定性分析が可能となり、蛋白尿が腎前性、腎性、腎後性と明確な病型分類が確立された。これらは現在においても広く利用され、検出感度、特異性の視点から改良、改善が図られ、より簡便な検査法の確立が目指されている。研究利用としての意義は高いが、検査としては限界があり、Capillary EPなどの分析技術、高感度の染色法の開発などにより¹²⁾、どこまで既存の検査法を乗り越え新しい病型分類を確立できるか今後の進展を期待したい。

定性検査の成果を、さらに具体化したのが尿中蛋白プロファイルであり、機能、病因、局在に関連した複数の成分の同時測定により、詳細な病態解析が可能な時代を迎えている¹³⁾。Keyとなるマーカーは、albumin、IgG（糸球体）、 α_1 -m、RBP（いずれも尿細管）、ト

ランスフェリン（糸球体、尿細管）、 α_2 -マクログロブリン（出血）、 κ 、 λ 鎖（Bence Jones 蛋白）であり、欧州の一部では日常検査として、急速に利用が進められている。これに呼応して尿蛋白測定のための標準化をめざし、IFCC（国際臨床化学連合）により尿蛋白測定の国際的標準品の作製が進められており、1999年に完成予定である。本標準品が世界各地により施設間のバラツキが縮小され、尿蛋白個別成分の測定がさらに促進され、臨床的意義の拡大も期待される。尿蛋白が測定対象となるためには、高い臨床的意義、尿中安定性、および比較的高濃度に存在するなどの条件が必要となる。この条件に照らし合わせて、既存のマーカーとの比較対照から、より高感度、特異的に病態を把握するマーカーの取捨、選択の中で淘汰されていくものと思われる。

尿蛋白の日内・季節変動、運動負荷、気候の影響など生理的な変動の解析は、高い独自性を占める領域である。基礎的であり、即実利的な両面を持ち合わせ、新しい分析法の開発と研究の進歩の降り注ぐ中で、研究課題は無限に近い。時として大きな impact のある仕事が誕生するのは実はこの領域である。

腎疾患の病態解析は病理組織像を golden standard として発展してきた。近年、*in situ* hybridization、RT-PCR 法による RNA の定量など分子生物学的な手法により、サイトカイン、成長促進因子など新しい成分が次々と登場し、いきなり腎臓研究領域にもたらされ、ここでの組織局在、病態関連機能が明らかにされ、病因の詳細な解析を可能にした。Interleukin 8 は局所の上皮細胞、血管内皮、浸潤好中球など生体反応を反映上昇し、尿路感染症、炎症の有力なマーカー

に踊り出た¹⁴⁾。この一方で古典的な手法も健在である。これまで同様、組織、体液などから独立して精製された成分が、尿においても新しい意義が模索され成果をあげている。血清の腫瘍マーカーとして登場した basic fetoprotein は膀胱癌の診断、フォローの尿マーカーとして利用が始められている。

尿蛋白の研究、検査は、今後も臨床像と病理組織所見との対応を機軸に、病態の活動性、進行度、予後の推定など、測定の新しい意義を求めて進展し、この成果の上に、すべての尿検査の再構築の主流を形成するものと思われる。尿蛋白を通して全身の生理、病的状態をどこまで把握でき、どこまで血清検査に迫れるか、この命題の下で、尿蛋白の研究、検査は地味であるが着実に未来に向かって歩みを続けている。

文 献

- 1) Berggård I, Bearn AG. Isolation and properties of β_2 -globulin occurring in human biological fluids. *J Biol Chem* 1968; 243: 4095-103.
- 2) Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987; 31: 673-89.
- 3) Okutani R, Itoh Y, Hirata H, Kasahara T, Mukaida N, Kawai T. Simple and high-yield purification of urine protein 1 using immunoaffinity chromatography. *J Chromatogr* 1992; 577: 25-35.
- 4) Okutani R, Itoh Y, Yamada T, Yamaguchi T, Singh G, Yagisawa H, Kawai T. Preparation and characterization of human recombinant protein 1/Clara cell Mr 10000 protein. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 691-6.
- 5) Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, Kihara T. Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial injuries in glomerulonephritis. *Nephron* 1995; 99: 397-403.
- 6) Savin VJ. Mechanisms of proteinuria in non-inflammatory glomerular diseases. *Am J Kid-*

- ney Dis 1993; 21: 347-62.
- 7) Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 1996; 271: F900-7.
- 8) Lloyd SE, Pearce SHS, Fisher SE. A common molecular basis for three inherited stone diseases. *Nature* 1996; 379: 445-9.
- 9) Itoh Y, Kawai T. Human α_1 -microglobulin: Its measurement and clinical application. *J Clin Lab Anal* 1990; 4: 376-84.
- 10) Itoh Y, Numata Y, Morita A, Asano Y, Kawai T. Varied value of urinary NAG isozyme B in males of reproductive age. *Kidney Int* 1994; 47: S38-S42.
- 11) Shiba K, Kanamori K, Sugiura K. Screening urine protein abnormalities by a novel test paper. *Clin Chim Acta* 1995; 240: 83-8.
- 12) Hiratsuka N, Shiba K, Shinomura K, Hosaki S. Rapidly and highly sensitive colloidal silver staining on cellulose acetate membrane for analysis of urinary proteins. *J Clin Lab Anal* 1996; 10: 403-6.
- 13) Guder W, Hoffman W. Differentiation of proteinuria by single protein analysis in urine. *Clin Biochem* 1993; 26: 277-82.
- 14) Ko YC, Mukaida N, Ishiyama S, Kasahara T, Kawai T. Elevated interleukin 8 in the urine of patients with urinary tract infection. *Infect Immun* 1993; 61: 1307-14.

要 旨

尿は非侵襲的な検査対象として注目され、とりわけ尿蛋白の検査は歴史的にも尿研究、検査の中心に位置し発展を遂げてきた。臨床検査の視点から尿蛋白の臨床研究、検査に焦点をあてて、その歴史、現状、近未来の問題点などについて、著者らの研究も交えて概説した。