

# 尿中微量アルブミンの測定とその意義について

Urinary Albumin - Dissociation between TIA method and HPLC method, and its fragmentation-

東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 先端分析検査学 助教 栗原 由利子

YURIKO KURIHARA (Assistant Professor)

Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Health Care Sciences,  
Analytical Laboratory Chemistry

## 1. はじめに

尿中微量アルブミンは、糖尿病性腎症の早期発見マーカーとして頻用され、その測定は免疫比濁法(TIA法)、ラテックス凝集免疫測定法、免疫比ろろ法などによるものが一般的である。これらの方法は、いずれも特異的抗ヒトアルブミン抗体を用いた抗原抗体反応による方法である。2004年にComperらは、ゲルろ過法を測定原理とするHigh performance liquid chromatography法(HPLC法)による測定系を構築し、そのアルブミン分画中にアルブミン単量体の分子量としては完全な形を取っているが、既存のアルブミン抗体と反応しない免疫非反応性アルブミンの存在を示し、その免疫非反応性アルブミンが糖尿病患者では健常人に比べて多く含まれると報告した<sup>1)</sup>。HPLC法による尿中微量アルブミン測定をすれば、より早期に糖尿病性腎症を発見でき、フォローアップできるとの報告がなされ<sup>2)</sup>、尿中アルブミンの測定法に一石を投じる形となった。

## 2. 尿中微量アルブミンとは

腎臓には、ネフロンと呼ばれる尿を産生する機能構成単位があり、腎臓1つに約100万個のネフロンが存在している。さらにネフロンは糸球体と尿細管から構成され、糸球体は篩のような網目状構造を持ち、血液中の血球や分子量の大きい蛋白を除く成分がろ過され、尿の元となる原尿が産生される。尿細管では水分や $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ など分子量の小さい成分に必要な成分が再吸収され尿となる(図1)。健常人においても、一日当たり30mg/day未満のアルブミンが尿中に排泄されているが、糸球体上皮

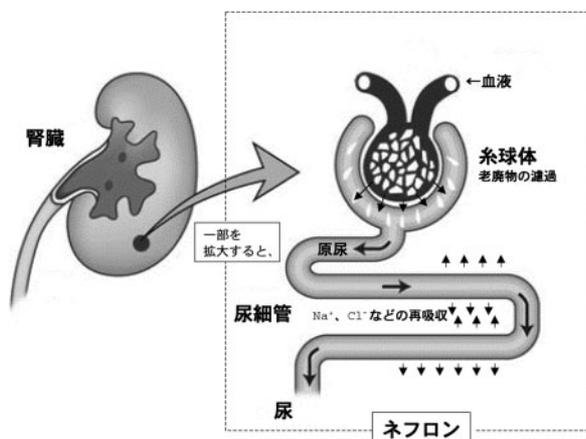


図1 腎臓の構造

細胞のスリット膜の構造が明らかになり、糸球体のろ過サイズバリアが損傷されると尿中に蛋白(アルブミン)がさらに漏れ出す<sup>3)</sup>。糖尿病性腎症の早期においてはその排泄量が微増し、いわゆる微量アルブミン尿と言われる状態になる。微量アルブミン尿は、約30~300mg/dayの状態にあり尿試験紙では検出困難とされ、免疫比濁法や比ろろ法などの高感度検出法によって測定する。この時期(早期)に腎症の治療を始めれば、顕性腎症や腎不全への進行を遅らせることができるため、早期腎症の発見・経過観察マーカーとして尿中微量アルブミン測定が行われている。

## 3. 尿中微量アルブミン測定法

尿中微量アルブミンの測定には定性法と定量法があり、定性法ではイムノクロマト法やラテックス凝集阻止反応を原理とした測定キットなどが販売されており、その感度は20~

30mg/Lである。尿試験紙に準ずる方法のものが多くが感度がやや低いいため、現在あまり使用されていない。

定量法は、抗原抗体反応を用いた免疫比濁法や免疫比ろろ法を原理とする測定キットが13社から販売され、汎用自動分析機での測定が可能なることから測定法として主流を占めている。これらの方法の感度は5~10mg/Lであり、測定値が数値化されているため経過観察にも使いやすい。

HPLC法による尿中微量アルブミン測定キットは、Ausum社からAccuminとして販売されており、ゲルろ過を用いた分子サイズによる分離を原理としている。HPLC法は抗体に反応しないアルブミンの測定もできるため、尿中アルブミンの測定をより正確に行えるとの報告がなされた<sup>1)</sup>。そのためより早期に腎症に進行する前に微量アルブミン尿を検出できる新しい測定法として注目された。免疫非反応性アルブミンは、市販されている抗体と反応せず、しかも分子量6.6万のインタクトアルブミン(完全型アルブミン)と同じ分子量をもつものであるとされている。また健常人における免疫非反応性アルブミンは尿中に排泄されている量のほぼ2倍の量があると報告された<sup>1)</sup>。

しかし、HPLC法による尿中微量アルブミンの測定は、その分離特性から他の蛋白の混入が避けられず、尿中微量アルブミン濃度の過剰評価が示唆されている<sup>4)</sup>。

#### 4. 免疫比濁法とHPLC法による尿中微量アルブミン測定

現在、検査室で利用されている免疫比濁法による尿中微量アルブミン測定値とHPLC法による測定値について相関を調べた(図2)。健常人尿においてはそれぞれの方法での結果が乖離した例はほとんどなかったが、糖尿病患者において結果に乖離の見られた検体がいくつか存在した。HPLC法で比濁法の測定値よりも2倍以上高かった検

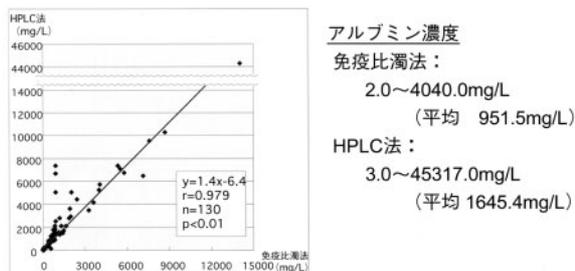


図2 免疫比濁法とHPLC法との相関  
健常人および糖尿病患者(糖尿病性腎症患者を含む)130例の尿中アルブミン濃度を免疫比濁法とHPLC法で測定した。

体は130例中23例(17.7%)であり、HPLC法での値が小さかったものは2例見られた。また腎症病期の判定を両方法でおこなったところ、130例中117例は一致したが、13例でHPLC法と免疫比濁法での判定は乖離し、そのうち11例がHPLC法のほうが病期の進行したステージを示した検体であった(表1)。これら乖離検体のほとんどは糖尿病患者尿であり、血糖コントロール不良である場合が多かった。

表1 免疫比濁法とHPLC法によるアルブミン尿の判定の比較

	HPLC法		
	正常 (<30mg/L)	微量アルブミン (30~300mg/L)	マクロアルブミン (300mg/L<)
免疫比濁法 正常 (<30mg/L)	6(4.6%)	4(3.1%)	0
免疫比濁法 微量アルブミン (30~300mg/L)	1(0.8%)	23(17.7%)	7(5.4%)
免疫比濁法 マクロアルブミン (300mg/L<)	0	1(0.8%)	88(67.7%)

#### 5. 尿中アルブミンの構造と抗体反応性について

健常人尿および糖尿病患者尿を収集し、Native-PAGE、SDS-PAGE(電気泳動法)を行い銀染色により蛋白染色し、市販抗体を用いてウエスタンブロット(電気泳動後の蛋白をメンブレンに転写する分析法)による抗体反応性を検討した。健常人尿において、尿中の蛋白は80~15kDa(キロダルトン)に幅広く見られ、主バンドの66kDaはアルブミン(分子量6.6万)であることが分かった。ウエスタンブロットでは66kDaのバンドのほか、45kDaや27kDaにも反応が現れ、尿中アルブミンのフラグメント化が疑われた。しかし、それより小さいバンドは他の蛋白の抗体とも反応しなかった(データ未開示)。尿のpHの状態や、腎基底膜や尿中のさまざまな蛋白分解酵素により、蛋白が分解されフラグメント化されたと考えられる。また糖尿病患者では健常人尿よりも蛋白排泄量が多いことから、トランスフェリン、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンなどのアルブミン以外の蛋白の混入が見られた。

糖尿病患者尿で免疫比濁法とHPLC法とで結果に乖離が見られた検体について、その抗体反応性を見るため、HPLC法でのアルブミン分画を分取しSDS-PAGEとウエスタンブロットによる抗体反応性を検討した。その結果、66、60kDaの位置にバンドが見られ、検体によっては、45、35、28kDaなどの位置にもバンドがいくつか見られた。非還元状態より還元状態において、これらの小さな分子量のバンドが検出され、アルブミンのフラグメント化が考えられた。ウ

エスタンブロットの結果も還元状態では反応しないバンドが出現した(図3)。

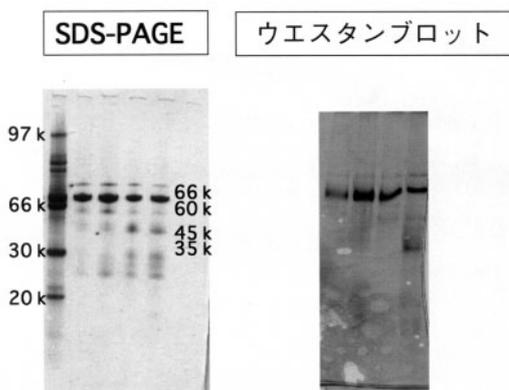


図3 乖離検体のSDS-PAGE、ウエスタンブロット(還元状態) 免疫比濁法とHPLC法での測定結果が乖離した検体について、SDS-PAGE及び抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体にてウエスタンブロットを行った。

## 6. Cathepsin Dによる尿中アルブミンのフラグメント化

尿中アルブミンのフラグメント化が疑われたことから、どの程度までフラグメント化された尿中アルブミンとアルブミン抗体とが反応するか調べるため、尿中に存在する蛋白分解酵素の一つであるCathepsin Dによるアルブミンのフラグメント化実験を行った。Cathepsin Dによる反応時間を0~60分とし、SDS-PAGEによるアルブミンのバンドの確認によりフラグメント化を観察したところ、66kDaのバンドは徐々に消失したが、低分子化したアルブミンのバンドが認められた(図4)。同時に、免疫比濁法によるアルブミン濃度測定を行った(図4下表)。その結果、73mg/Lから51mg/Lと約30%の減少が見られた。HPLC法と免疫比濁法での測定値に乖離が認められた検体のSDS-PAGEパターンと比較したところ、いくつかのバンドが共通していると考えられた。

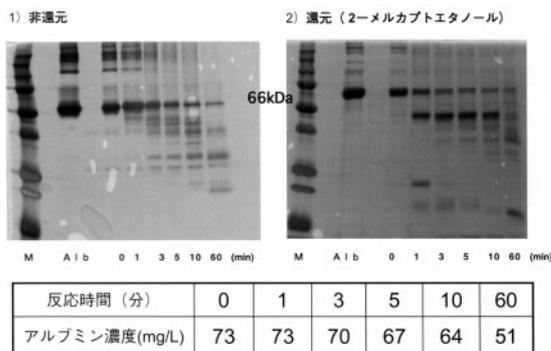


図4 Cathepsin D処理におけるSDS-PAGEによるアルブミンの分子量の変化 Cathepsin D処理の反応時間を0~60分間で、アルブミンのフラグメント化を見た結果、60分間の処理で免疫比濁法による測定値が約70%に低下した。

## 7. まとめ

### 7.1 他の蛋白の混入

尿中微量アルブミン測定はHPLC法による測定法が開発され<sup>1)</sup>、糖尿病腎症の早期発見が可能であると報告された。しかし、HPLC法は分子サイズによる分離法であるため、その分離特性からアルブミンとされる分画には約30~130kDaまでのサイズの分子が含まれる。このため、66kDa近傍の分子量を持つアルブミン以外の蛋白も含まれてくる。このことから尿中アルブミン濃度を高く測定する危険性があると考えられる<sup>4,8)</sup>。またアルブミン以外の蛋白を含む液をHPLC法で測定した結果、他の蛋白とアルブミンを分離できなかったと報告されている<sup>9)</sup>。

著者らは、予備実験としてアルブミン標準液をHPLC法と免疫比濁法にて定量測定した結果、共に同等の測定値が得られることを確認している。しかし、尿検体ではHPLC法と免疫比濁法の結果が乖離する検体が存在し、HPLC法による測定値が免疫比濁法による測定値よりも高値を示すケースがある。これら検体について他の蛋白の混入について検討したところ、トランスフェリン(分子量77kDa)や $\alpha_1$ -アンチトリプシン(分子量50kDa)が若干混入していた。

### 7.2 アルブミンのフラグメント化

著者らは、これら混入蛋白だけでなく、いずれの尿蛋白の抗体にも反応しない蛋白を含むことから、HPLC法での結果が免疫比濁法よりも高値を示した検体を用い、HPLCにてアルブミン分画を分取し、SDS-PAGEとウエスタンブロットで分析した。その結果、還元状態にするとフラグメント化(30~60kDa)が見られ、ウエスタンブロットでのアルブミン抗体反応性も変化した。

Sviridovらは、フラグメント化した尿中アルブミンは、免疫比濁法では免疫反応性が保たれているため測定できるが、HPLC法では分子量が小さくなっているため測定できず、また尿中アルブミンのフラグメント化は、尿の保存状態の違いやpH、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンの混入などによって起こると報告している<sup>10)</sup>。Candianoらは、尿中アルブミンの2次元電気泳動による分析で健康人尿ではフラグメント化が見られないが、腎疾患尿ではフラグメント化アルブミンが多数含まれており、ネフローゼ患者では特にその傾向が強いことを報告している<sup>11)</sup>。著者らは、健康人尿と糖尿病患者尿について、SDS-PAGE、ウエスタンブロットによるアルブミン

のフラグメント化を検討し、健常人よりも糖尿病患者において、より多数のフラグメント化アルブミンと思われるバンドが出現することを確認している(データ未開示)。さらに腎症の進行度とフラグメント化の関連性についても、質量分析にて解析中である。

### 7.3 フラグメント化アルブミンの解析

著者らは、尿中蛋白分解酵素の一つであるCathepsin Dによってアルブミンがフラグメント化され、ポリクローナル抗体と反応しない低分子のバンドが出現することを見出している。これらフラグメント化アルブミンは、どの程度までアルブミンとして測定するべきなのか、疑問の残るところである。還元、非還元条件によって抗体反応性の変わるものについてもアルブミンとして良いのか、一体どこまでをアルブミンとするのか、定義から改めて考える必要があるように思われる。

尿中アルブミンの構造と抗体反応性について、SDS-PAGE、ウエスタンブロットを用いた解析を試みた結果、健常人尿、微量アルブミン尿などの病態の違いによって尿中アルブミンのフラグメント化に違いが見られることが分かり、今後フラグメント化アルブミンの解析が、腎症の進行度を見極める診断マーカーとして用いられることが期待される。

- 6) Sastra SA, Osicka TM, Comper WD. The analysis and characterization of immunounreactive urinary albumin in healthy volunteers. *Clin Biochem*. **39**, 143-51, (2006).
- 7) Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of an HPLC assay for urinary albumin. *Am J Clin Pathol*. **124**, 219-25, (2005).
- 8) Contois JH, Hartigan C, Rao LV, Snyder LM, Thompson MJ. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin. *Clin Chim Acta*. **367**, 150-5, (2006).
- 9) Polkinghorne KR, Su Q, Chadban SJ, Shaw JE, Zimmet PZ, Atkins RC. Population prevalence of albuminuria in the Australian diabetes, obesity, and lifestyle (AusDiab) study: immunonephelometry compared with high-performance liquid chromatography. *Am J Kidney Dis*. **47**, 604-13, (2006).
- 10) Denis Sviridov, Steven K Drake, Glen L Hortin. Reactivity of Urinary Albumin (Microalbumin) Assays with Fragmented or Modified Albumin. *Clin Chem*. **54**, 61-68, (2008).
- 11) Candiano G, Musante L, Bruschi M, Petretto A, Santucci L, Del Boccio P, et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. **17**, 3139-48, (2006).

## 引用文献

- 1) Osicka TM, Comper WD. Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. *Clin Chem*. **50**, 2286-91, (2004).
- 2) Osicka TM, Houlihan CA, Chan JG, et al. Albuminuria in patients with type 1 diabetes is directly linked to changes in the lysosome-mediated degradation of albumin during renal passage. *Diabetes*. **49**, 1579-1584, (2000).
- 3) Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *New Eng J Med*. **354**, 1387-1401, (2006).
- 4) Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin GL. Co-elution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: implications for urine albumin analysis. *Clin Chem*. **52**, 389-97, (2006).
- 5) Brinkman JW, Bakker SJL, Gansevoort RT, Hillege HL, Kema IP, Gans ROB, et al. Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. *Kidney Int*. **66**(Suppl 92), S69-S75, (2004).