

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) による腎尿路系疾患のスクリーニングの試み

幼児検尿システムの確立とその意義について

村上 俊雄* 川上 初美*

要約：幼児検尿スクリーニングの主要対象疾患は、慢性糸球体腎炎ではなく、1) 水腎症や膀胱尿管逆流現象の尿路奇形、2) 腎低形成や異形成、そして3) 慢性腎不全(原因の如何を問わない)である。1)のうち、既に腎機能低下のある場合や2)3)においては、 β_2 -ミクログロブリン等の低分子量蛋白の尿中排泄が増加している。micro-albuminuriaについては、あまり研究されていない。我々はenzyme linked immunosorbent assay (ELISA) によってスクリーニングできるか否かを検討した。尿 β_2 -ミクログロブリンは10~5,000 $\mu\text{g}/\ell$ で、アルブミンは10~2,000 $\mu\text{g}/\ell$ で良好な標準曲線を得ることができ、スクリーニングに十分利用できることが分かった。また超音波によるスクリーニングはELISAによるスクリーニングを補完するものとする。

見出し語：腎尿路系疾患、スクリーニング、ELISA、 β_2 -ミクログロブリン、アルブミン、超音波

はじめに：幼児検尿スクリーニングの主要対象疾患は、所謂慢性糸球体腎炎ではなく、水腎症や膀胱尿管逆流現象等の尿路奇形、腎低形成や異形成、そして慢性腎不全(原因の如何を問わない)である。これらの疾患の特徴は、蛋白尿は陰性か陽性であっても軽度であるという点である。従って、学校検尿で採用されている試験紙法を幼児検尿に採用しても前述した疾患の発見率は低いものとなる。慢性腎不全はそれ以上の進行を是非とも阻止せねばならないが、このような病態下では β_2 -ミクログロブリン等の低分子量蛋白の尿中排泄が増加している。また、最近micro-albuminuriaの検出が糖尿病性腎症の早期診断に利用されているが、前述した疾患における尿中アルブミンについては、あまり研究されていない。

我々は、通常の試験紙法では正常と判定さ

れる群の中から異常者を発見するために、尿中低分子量蛋白(β_2 -ミクログロブリンとレチノール結合蛋白)とアルブミンについてenzyme linked immunosorbent assay (ELISA)を用いてスクリーニングすることを考えた。

研究方法：抗血清 ウサギ抗ヒト β_2 -ミクログロブリン、ウサギ抗ヒトレチノール結合蛋白、ウサギ抗ヒトアルブミン抗血清およびHRPを標識したそれぞれの抗血清はDAKO社より購入した。

マイクロプレート Nunc社より96穴のNunc-Immuno Module Maxisorp F8を購入した。

発色剤：Boehringer Mannheim社よりABTS[®]を購入した。

標準抗原 標準曲線作成のためのアルブミ

* 山口大学医学部小児科 (Dep. of Pediatrics, Yamaguchi University School of Medicine)

ンはヒト血清より Cohnらの方法によって得たものを使用した。 β_2 -ミクログロブリンはRIAにより測定された濃度既知の尿細管性蛋白尿症患者の尿を用いた。レチノール結合蛋白は尿細管性蛋白尿症患者の尿から分離・精製した。まず濃縮した尿をSephadex G-75でゲル濾過し、次いでDEAE celluloseを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。得られたレチノール結合蛋白はアガロース・ゲル電気泳動(図1), SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動およびイムノブロットィング(図2)によって確認した。

標準曲線の作成 上記3種の一次抗血清を50mM炭酸/重炭酸緩衝液, pH 9.6で500倍に希釈し、マイクロプレートの各穴に150 μ lずつ加え、室温で2時間吸着させた。生理食塩水(以下、生食)250 μ lで2回洗浄後、各濃度(10~10,000 μ g/l)の標準抗原溶液5 μ lをマイクロプレートの穴に2穴ずつ入れ(二重測定)、さらに1.0%のTween 20を含む5mM磷酸緩衝液, pH 7.5(測定用緩衝液)を100 μ lずつ各穴に入れ、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた(一次反応)。生食250 μ lで2回洗浄後、測定用緩衝液で500倍に希釈したHRP標識抗血清を120 μ lずつ各穴に入れ、室温で一晩反応させた(二次反応)。生食250 μ lで3回洗浄した後、基質呈色液(0.07% ABTS[®]と0.008%過酸化水素水を含む0.1Mクエン酸緩衝液, pH 4.0)150 μ lを各穴に加え、30分間反応させた。0.5% NaN₃を含む1.0Mクエン酸緩衝液, pH 2.8を100 μ l加えて反応を停止させ、UBE Handy Reader(宇部興産 Ⅲ)を用いて415nmの吸光度を測定した。

結果: β_2 -ミクログロブリンとアルブミンについては、それぞれ図3と図4に示す標準曲線を得ることができた。しかし、レチノール結合蛋白については、スクリーニングに使えるような標準曲線を得ることはできなかった。図3に矢印で示しているのは、反復性尿路感

染症の3歳男児の尿である。本患児は両側性の膀胱尿管逆流現象があり、血清クレアチニン値は0.8 mg/dlで上昇していた。

考察: 我々の教室の内田正志が行った外見上正常な新生児の腹部超音波スクリーニング(pro prospective study)の成績をここに紹介する。対象は1987年5月~1988年5月までに出生した外見上正常な新生児469名(男236名, 女233名)である。在胎は36~42週で、出生時体重は2,430~4,550gである。生後6日目に背臥位で側腹部から観察し、腎中心部エコーの離開が3mm以上のものを腎盂拡大とした。生後6日目では469名中127名が腎盂拡大と判定され、そのうち100名については経過観察をすることができた。1か月時には36名, 3か月時には23名, 6か月時にはさらに15名において腎盂拡大は消失し、残ったのは26名だった。この26名はいずれも5mm以上だった。12名に排泄性腎盂造影を行ったが、10例は腎盂尿管移行部狭窄, 1例は尿管膀胱移行部狭窄, 1例は膀胱尿管逆流現象だった。腎盂尿管移行部狭窄の1例と後者の2例は手術を受けた。このように0.7%の児が手術を必要とする尿路系疾患を有していた。我々は日常の診療で、手術を必要とする水腎症や膀胱尿管逆流現象の患児でも尿 β_2 -ミクログロブリン値が正常の例が相当数あることをよく知っている。従って、超音波によるスクリーニングと尿 β_2 -ミクログロブリンのELISAによるスクリーニングとの関係は図5のようになると考えている。双方に異常が認められたものの多くは、早急の外科的処置を要するだろう。

今後の研究の方向としては、同じ対象を使って上記の作業仮説を実際に証明していくことである。そうして、はじめて検査の感度、特異性、有病率、陽性結果の予測値、効率を検討することが可能になり、経済的な面からも幼児検尿スクリーニングのやり方を検討することができるものと考えられる。

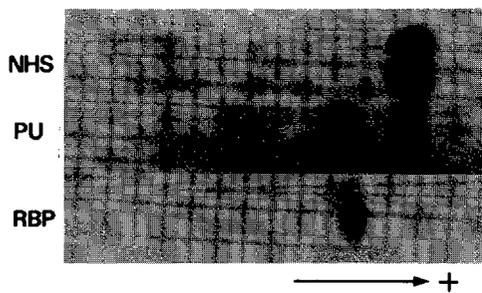


図1 アガロース・ゲル電気泳動. NHS, 正常血清. PU, 患者尿蛋白. RBP, レチノール結合蛋白.

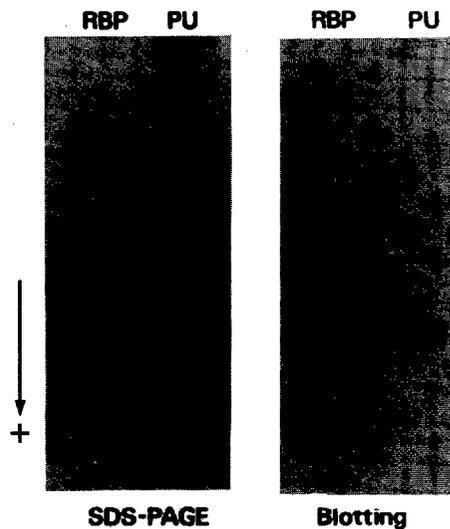


図2 SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(左)とイムノブロッティング(右). RBP, レチノール結合蛋白. PU. 患者尿蛋白.

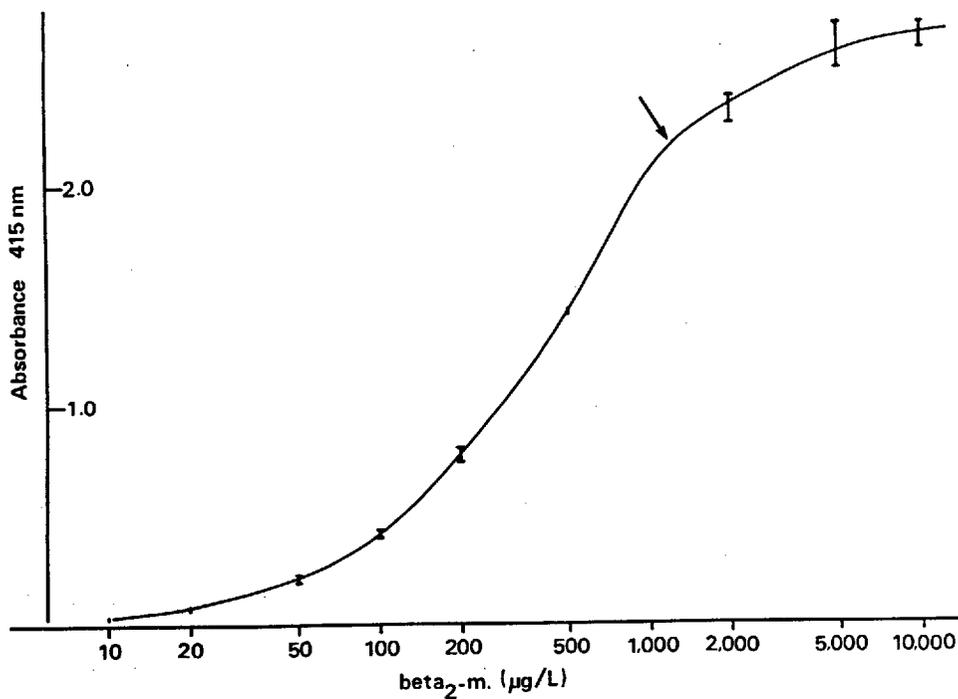


図3 β_2 -ミクログロブリンの標準曲線.

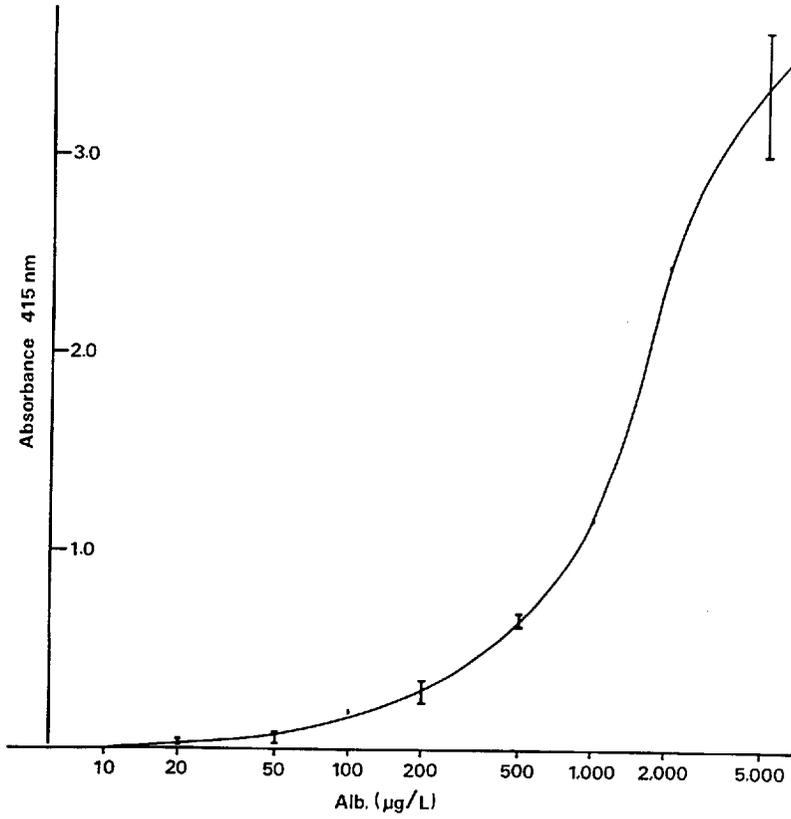


図4 アルブミンの標準曲線.

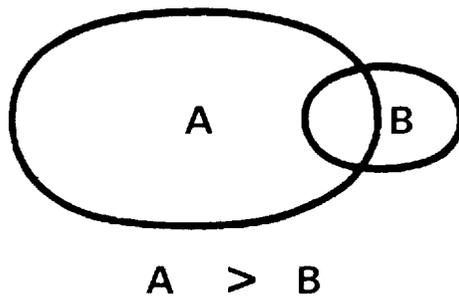
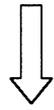


図5 超音波によるスクリーニングと尿 β_2 -ミクログロブリンのELISAによるスクリーニングとの関係。A, 超音波で発見されるもの。B, β_2 -ミクログロブリンで発見されるもの。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約: 幼児検尿スクリーニングの主要対象疾患は、慢性糸球体腎炎ではなく、1) 水腎症や膀胱尿管逆流現象の尿路奇形、2) 腎低形成や異形成、そして 3) 慢性腎不全(原因の如何を問わない)である。1)のうち、既に腎機能低下のある場合や 2)3)においては、 2 -マイクログロブリン等の低分子量蛋白の尿中排泄が増加している。micro-albuminuria については、あまり研究されていない。我々は enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)によってスクリーニングできるか否かを検討した。尿 2 -マイクログロブリンは $10 \sim 5,000 \mu\text{g/l}$ で、アルブミンは $10 \sim 2,000 \mu\text{g/l}$ で良好な標準曲線を得ることができ、スクリーニングに十分利用できることが分かった。また超音波によるスクリーニングは ELISA によるスクリーニングを補完するものとする。