

高速液体クロマトグラフィーを用いた尿蛋白分析

小児腎疾患の進行阻止に関する研究

逆流性腎症と慢性腎盂腎炎の進行阻止に関する研究

小板橋 靖, 山口義哉

私共は、最初に腎疾患患者の尿蛋白を高速液体クロマトグラフィー (HPLC)にて荷電別に分画し、次に、その各分画をSDS-PAGEにて分子量別に分画し、疾患特異パターンを求めることを目標とした。今年度は、HPLCでの分析が中心となり、尿の泳動の条件、HPLCでの疾患別泳動パターンが求められた。

尿中蛋白, 高速液体クロマトグラフィー

【はじめに】尿蛋白は糸球体障害や尿細管障害の指標の1つとして、腎疾患の診断、症状の程度および組織像などとの関係から検討されてきている。私共は、尿蛋白を高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC)を用いて分析し、クロマトグラム上の尿蛋白分画パターンから、各疾患別あるいは障害部位別の特異パターン化を試みた。さらに、クロマトグラム上の主なピークの構成蛋白を明らかにするために、各フラクションを、SDS-PAGE後Western blotting法にて分析する。

【対象と方法】(1)高速液体クロマトグラフィー (HPLC)の機種は、TRI-ROTAR-IV型を用いて、ディテクターはUV-IDEC-100-IV型紫外可視分光検出器を用いて、280nmで測定した。カラムはWaters社製イオン交換カラム $7.5 \times 7.5 \text{ cm}$ を使用した。

(2)対象は各種腎炎、ネフローゼ、各種原因による尿細管障害および起立性蛋白尿で、新鮮尿を遠心後、上清を -70°C に凍結保存した。解凍後、遠心式の限外濾過ユニット(ミリポア社製)を用いて脱塩し、サンプルとした。標準物質として、アルブミン、トランスフェリン、グロブリン β_2 -MGをそれぞれ純粋な単品

としてHPLCで分析し、その泳動位置を確認した。また、コントロールとして、50~100倍稀釈正常血清が使用された。

(3)クロマトグラム上の主なピークの構成蛋白を明らかにするために、Phast System (Pharmacia)を使用し、Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)後Western blotting法にて分析した。

【結果】(1)稀釈血清の泳動パターン

図1は50倍血清(感度(レンジ)0.0025, アプライ量 100 μl)の泳動パターンを示す。標準物質の泳動位置より、泳動開始15分~20分の間に出現するピークはアルブミン、10分から15分の間に出現するピークはトランスフェリン、10分前後に出現するピークは α -グロブリンであることが推測される。しかし、各ピークの分画・同定はなされていない。そこで、以下、Albはアルブミン近傍のピークを意味し、Trはトランスフェリン近傍のピーク、 α -glは α -グロブリン近傍のピークを意味する。一見して、この蛋白分画パターンはTiseliusの血清蛋白分画パターンに近似している。ともに蛋白の荷電状態により分画しているの、当然の結果と言える。コンピューター処理にて、これら

聖マリアンナ医科大学小児科

Yasushi Koitabashi, Yoshiya Yamaguchi

Department of Pediatrics, St. Marianna University

3つのピークの%フラクションを求めると、Alb: 47%, Tr: 9.1%, r-g1: 12.7%である。

(2) 正常者尿の泳動パターン

図2は正常者の尿蛋白分画パターンを示す。血清の場合と同様に感度 $r: 0.0025$ で、アプライ量は $200\mu\text{l}$ である。一見して目立つのは、泳動開始後5分前後に出る大きなピークである。15分から20分の間に出るピークはAlbと思われる。

図2で、Trと説明されているが、血清で示されるトランスフェリンより少し早い時期に出現している。また、r-g1のピークは確認できない。Albと思われるピークの%フラクションは19.4%で、別な正常者の尿蛋白分画パターンもほぼ同様であった。

(3) 真性ネフローゼ尿の泳動パターン

図3は真性ネフローゼのネフローゼ期の尿蛋白分画パターンを示す。感度 r は 0.01 、アプライ量は $100\mu\text{l}$ である。腎病理組織学的に minimal change が確認されている。Albの%フラクションは76.1%、Trは9.5%、r-g1は0.1%とAlbとTrと思われるピークが目立つ。また、AlbとTrの間にもピークが存在する。泳動開始5分前後のピークは、正常者尿(図2)に比較して小さいが、感度を $\frac{1}{2}$ に落しているので絶対量としての多寡は論じられない。

図4は同一症例のステロイド投与中の寛解期の尿蛋白分画パターンである。感度 r は 0.0025 、

アプライ量は $100\mu\text{l}$ である。Albのピークは認められず、Trと思われるピークがかわらうじて認められ、泳動開始5分のピークが目立つ。

(4) その他の泳動パターン

図5はAlport症候群ネフローゼ期の尿蛋白分画パターンを示す。感度 r は 0.0025 、アプライ量は $100\mu\text{l}$ である。Albの%フラクションは56.2%、Trは11.9%、r-g1は6.5%を示す。

図6は逆流性腎症の尿蛋白分画パターンを示す。両側 $\frac{4}{5}$ ~ $\frac{5}{5}$ のVURを示し、 β_2 -MGが $8000\mu\text{g}/\text{ml}$ と高値を示す症例である。

感度 r は 0.0025 、アプライ量は $200\mu\text{l}$ である。Albの%フラクションは22.5%、Trは1.3%で、AlbとTrが目立ち、さらに泳動開始5分のピークが目立つ。

【考案】(1)種々の検討より、サンプルの蛋白濃度は $1\sim 2\text{mg}/\text{ml}$ に調整し、HPLCへの注入サンプル量は $100\mu\text{l}$ とし、感度 r は 0.0025 が適当であると思われた。また、分析時間は30分が適当と思われた。

(2)上記の条件でスタンダードサンプルを分析すると、スタート後15~20分間にアルブミンのピークが、トランスフェリンは10~15分間に、 γ -グロブリンは10分前後にそれぞれピークが認められた。

(3)尿中蛋白のクロマトグラフのパターンは開始5分以内に1つの大きなピークが、いずれの腎疾患においても認められるが、50倍稀釈血清には認められず、現在なお検討中である。

表 1.

Sample	% fraction		
	Alb	Tr	r-g1
Serum	47.0	9.1	12.7
urine			
normal A	19.4	5.2	?
normal B	12.9	?	?
pure nephrosis A	76.1	9.5	0.1
pure nephrosis B	69.1	15.2	1.7
Alport (nephrotic)	56.2	11.9	6.5
CGN (non-nephrotic)	69.9	?	?
reflux nephropathy	22.5	1.3	?

図 1. 健常者血清 50 倍稀釈

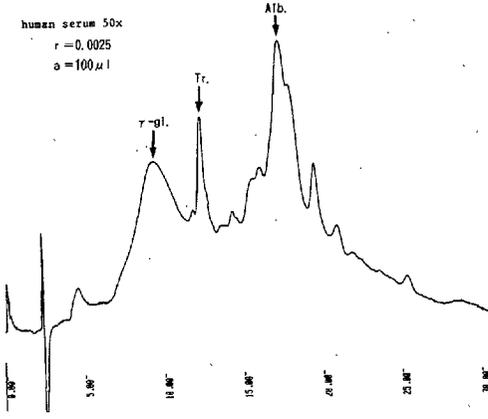


図 4. 直性ネフローゼ(図3と同一)寛解期尿

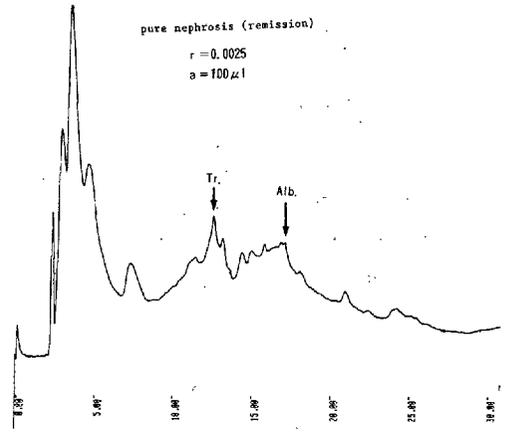


図 2. 健常者尿

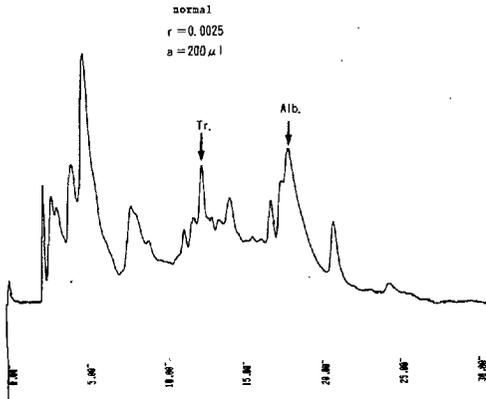


図 5. Alprot, ネフローゼ期尿

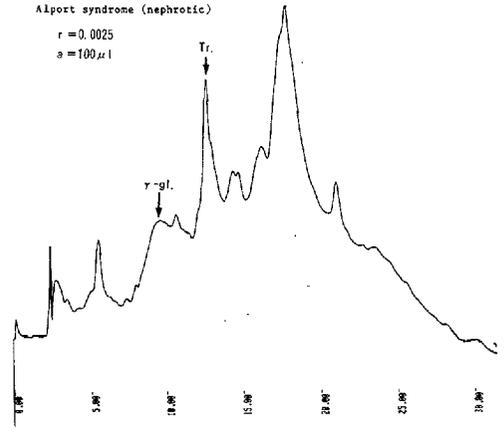


図 3. 直性ネフローゼ(MCNS), ネフローゼ期尿

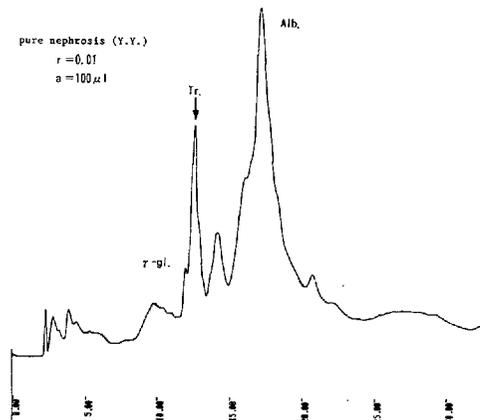
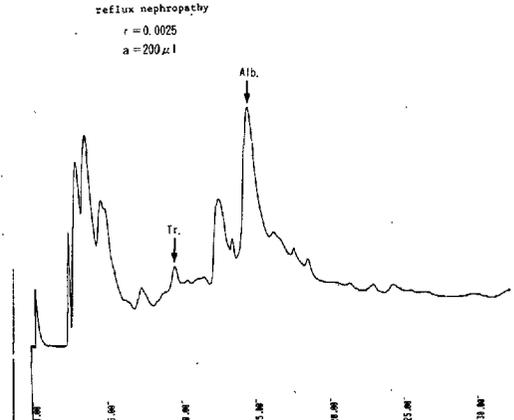


図 6. 両側逆流性腎症尿



(4) 表1に示すように、Alb, Tr, γ -glの各%フラクションで分析する限りにおいても、ある程度の疾患特異性が認められる。今後、クロマトグラム上の各ピークの構成蛋白をSDS-PAGEで分子量別に分析することにより、さらに、疾患特異性のパターンが得られるのではな

いかと思われる。つまり、HPLCは蛋白を荷電状態により分画しているので、蛋白分子の重合、他の蛋白との結合により荷電状態が変化し、本来の泳動場所とは異った位置に泳動されてくる可能性がある。これらは次年度の検討項目としたい。

Abstract

Urinary Protein Analysis by high Performance Liquid Chromatography

Urinary protein has been suspected as an indicator of glomerular and tubular injury in renal diseases. We analyzed urinary protein in renal diseases, using high performance liquid chromatography (HPLC). We searched for a urinary-protein-fraction pattern on chromatogram specific for each renal disease in order to determine if the pattern plays a part in locating the site of injury.

- (1) HPLC was done under following conditions: the protein concentration of samples; 1~2.0 mg/ml, the applied volume; 100 μ l, the sensitivity(range); 0.0025, and the analysis time; 30 min.
- (2) From analysis of standard samples, albumin peak appeared during 15 to 20 min, transferrin appeared during 10 to 15 min and γ -globulin appeared approximately 10 min after the beginning of chromatography.
- (3) A big peak appeared within 5 min in urine sample of every renal disease although such peak didn't appear in samples of serum diluted 50 times.
- (4) From the analysis of the chromatogram pattern in urinary protein, 3 categories seem to emerge: glomerular, tubular and mixed type.

文 献

- (1) Hamilton R. J. and Sewell P. A: Introduction to high performance liquid chromatography, Chapman & Hall, London, 1977.



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



私共は、最初に腎疾患患者の尿蛋白を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて荷電別に分画し、次に、その各分画を SDS-PAGE にて分子量別に分画し、疾患特異パターンを求めることを目標とした。今年度は、HPLC での分析が中心となり、尿の泳動の条件、HPLC での疾患別泳動パターンが求められた。