

逆相カラムを用いた HPLC 法による尿蛋白分析と 尿路感染症における臨床的意義

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

富澤 滋、新井英夫、関 裕介、丸山健一

要約：逆相カラムを用いたHPLC法による尿蛋白分析は従来のHPLC法に比べ前処理が簡単で、分離能も優れていると思われた。本法により尿路感染症について、クロマトグラム上の α_1 -acid glycoprotein(以下 α_1 -AGP)とhuman serum albumin(以下HSA)の面積比、即ち α_1 -AGP/HSA比を求めた結果、上部尿路感染症では0.052~0.475と広範な値を示し、下部尿路感染症では0.005~0.023と上部に比べて低い値を示した($P<0.01$)。尿中 α_1 -AGP/HSA比は上部と下部尿路感染症の鑑別上、有用な指標の一つになると思われた。

HPLC, IPG PACK ODS column, α_1 -AGP/HSA比, 尿路感染症

【方法及び対象】

HPLCシステムは日立製作所製、655A-11高速液体クロマトグラムを用い、カラムは多孔質ガラスの表面をODS化した日立製のIPG PACK ODSを使用した。溶離液はトリフルロ酢酸(TFA)0.1%の蒸留水とTFA0.07%のアセトニトリルを用い、検出波長はUV210 nmで行なった。また、溶離グラジエントは後者を0から40分間で30から50%まで変化させた。尿は採取後、直ちに2000回転、5分間遠心し、その上清を検体とし、注入量は10~100 μ lの範囲で行なった。

対象は上部尿路感染症と診断した、年齢1月より9歳までの男児5名、女児4名の計9名、下部尿路感染症と診断した、年齢2歳より11歳までの男児2名、女児5名の計7名である。

【結果】

(1)基礎的検討

β_2 -microglobulin(以下 β_2 -MG), Lysozyme(以下LZM), α_1 -AGP, HSAについての検量線を求めたところ、いずれの場合も相関係数は0.99以上で良好な相関関係が得られ、さらにそれぞれの標準蛋白についての再現性を検討したところCVは1.8~7.5%で満足できる結果であった。つぎに β_2 -MGとHSA

について本法とRIA法との相関をみたところ β_2 -MGでは $R=0.98$, HSAでは $R=0.99$ といずれも高い相関を認めた。図1に標準蛋白をHPLCに注入して得られたクロマトグラフを示した。左から β_2 -MG, LZM, α_1 -AGP, Transferrin, HSAが溶出している。

(2)臨床的検討

対象とした尿路感染症患児、計16名について、年齢、性別、尿培養の結果、発熱の有無、過去の尿路感染の既往回数を示した(表1)。

No.1~No.9は上部尿路感染症、No.10~16は下部尿路感染症と診断したケースである。尿培養ではE.coliがほとんどで、上部UTIに一例Citrobacterが、下部UTIに一例Proteusが検出された。VURは上部UTIで高度なケースがみられた。更に、上部UTIでは、膀胱憩室、低形性腎、UPJ狭窄、神経因性膀胱等の合併奇形がみられた。本症例は初発例が多く、UTIの頻回再発は、上部、下部UTIそれぞれ一例ずつであった。図2は代表的な上部UTIの尿蛋白分析の結果である。縦軸は紫外線吸収を示し、横軸は溶出時間を示す。矢印で示すように20.32秒に溶出されるsharpなpeakが α_1 -AGPで、29.83秒と31.56秒に溶出される二峰性の

群馬大学医学部小児科

Shegeru Tomizawa, Hideo Arai, Yuusuke Seki, Kenichi Maruyama

Dep. of pediatrics, Gunma University School of Medicine

29.83秒と31.56秒に溶出される二峰性のpeakがHSAと思われる。

図3は代表的な下部UTIの尿蛋白分析の結果である。クロマトグラム上のパターンより、尿蛋白の主体はHSAで α_1 -AGPは、ほとんど検出されていない。

次に、各症例についてクロマトグラム上の α_1 -AGPとHSAの面積比を求め、LDH-isozymeとともに上部と下部UTIで比較検討した。

表2のNo.1~No.9は上部、No.10~No.16は下部UTIのケースである。尿中LDH-isozymeパターンではこれまでに報告されているように上部のほうが、下部UTIよりもLDH_{4,5}の比率が高い傾向を示した。しかし、明かな差とは言い難く、また症例4では、LDH_{4,5}の比率が下部UTIよりも低い値を示した。一方、 α_1 -AGP/HSA比は上部UTIでは、0.052~0.475と広範な値を示し、下部UTIでは0.005~0.023と低い値を示し、また、下部UTIで上部UTIを上回る値を示したものは、みられなかった。

図4は上部UTIと下部UTIの症例の α_1 -AGP/HSA比をグラフに示したものである。下部では低い値に比較的集中し、上部UTIでは広範で、下部UTIよりも高い値を示した。統計的には $P < 0.01$ で両者間に有意差を認められた。

図5は上部UTIの一症例(9歳、女兒)について、臨床経過とESR,CRP, α_1 -AGP/HSA比の経時的変化を示したグラフである。上段は治療、体温の変化で、下段はESR,CRP, α_1 -AGP/HSA比の変化を示している。 α_1 -AGP/HSA比は入院後、一時上昇し、その後減少し、ESR,CRPの正常化よりも早期に0に近づいている。

【考察】

腎疾患における糸球体障害や尿細管障害の指標の一つとして様々な方法により尿蛋白分析がなされている。最近では簡便で迅速な尿蛋白分析の方法としてHPLC法が用いられ、現在イオン交換クロマトグラフィーが汎用されている。今回、我々は蛋白の

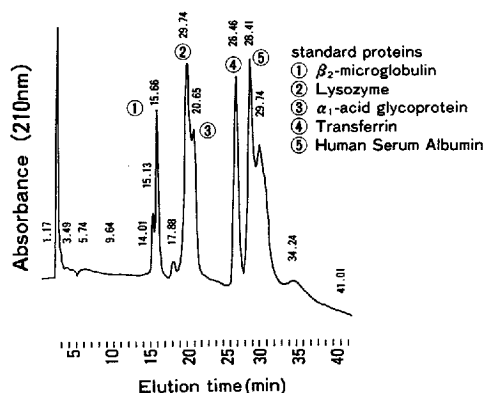
疎水性の差を利用した逆相クロマトグラフィー法により尿中低分子蛋白の分析を行ない、その基礎的な検討を行なった。その結果、尿蛋白分析については、IPG PACK ODSカラムより高い分離度が得られた。また検体の前処理は遠心するだけの簡単な操作であり、簡便性、分離能、迅速性の観点より、本法は尿蛋白分析のスクリーニング法として有用であると思われた。次に、本法により尿路感染症患児の尿蛋白分析を行ない、クロマトグラム上より α_1 -AGP/HSA比を求め上部UTIと下部UTIで比較した。その結果、上部UTIで高値を、下部UTIで低値を示し、両者間に有意差を認めた。このパラメーターは上部と下部UTIの鑑別上、従来より用いられてきたLDH-isozymeパターンよりも更に有用な指標になるのではないかと思われた。但し、治療により α_1 -AGP/HSA比は急速に低下するため、尿蛋白分析の結果を比較する際は、治療直前の尿を検体とすることが望ましいと考えられた。

文献

- 1) Turpeinen U, Koivunen E, Stenman UH. Liquid-chromatographic determination of β 2-microglobulin, α 1-acid glycoprotein and albumin in urine. Clin. Chem. 33; 1756-1760: 1987
- 2) Suzuki Y, Okada T, Hara M et al. Rapid differentiation between glomerular and tubular proteinuria by high performance liquid chromatography. Clin. Nephrol. 24; 138-141: 1985
- 3) Hideo Arai, Shigeru Tomizawa, Yuusuke Seki, Kenichi Maruyama, Takayoshi Kuroume. Usefulness of reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with a new column for analysis of urinary proteins. Nephron in press, 1991

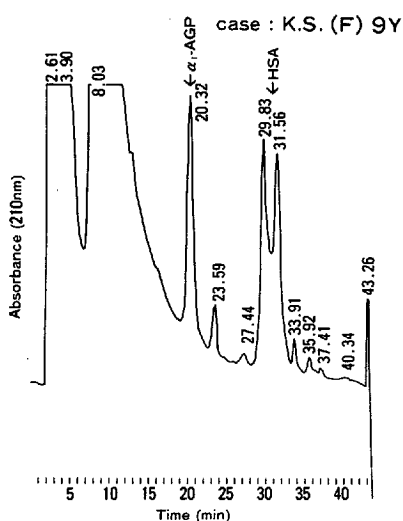
Abstract

Analysis of urinary protein by reversed-phase high performance liquid chromatography(HPLC) was investigated in urinary tract infection(UTI) of children. The ratio of urinary α_1 -acid glycoprotein(α_1 -AGP)/human serum albumin(HSA) on the chromatogram was calculated in the upper and lower UTI. In the patients with upper UTI, its ratio was higher ranging 0.052~0.475 than that of the patients with lower UTI indicating 0.005~0.023(P<0.01). These result suggest that the determination of α_1 -AGP/HSA would be a beneficial indicator to differentiate upper and lower UTI.



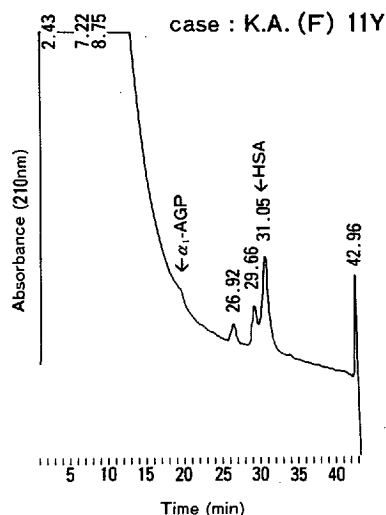
Chromatogram of standard proteins

☒ 1



Representative case of upper urinary tract infection

☒ 2



Representative case of lower urinary tract infection

表 1

Cases of Urinary Tract Infection											
No.	Name	Age	Sex	Urine culture Bacteria	Fever >38°C	CRP (mg/dl)	ESR (mm/h)	Reflex bladder	Complication	No. of Previous op.	
1.	K.T.	2M	M	E. coli	>10 ⁸	+	11.3	47	Grade II	diverticulum	0
2.	K.S.	9Y	F	E. coli	>10 ⁸	+	12.8	57	Grade II	hypoplasia	1
3.	A.K.	9Y	F	E. coli	>10 ⁸	+	2.4	78	Grade II	—	0
4.	N.S.	9Y	M	Chlostracter frandi	>10 ⁸	+	4+	18	—	neurogenic bladder	4
5.	H.K.	6Y	F	E. coli	>10 ⁸	+	11.2	50	Grade II	—	1
6.	A.S.	1Y	F	E. coli	>10 ⁸	+	6.8	46	—	—	0
7.	S.T.	8M	M	E. coli	>10 ⁸	+	14.8	88	—	UPJ stenosis	0
8.	K.Y.	6M	M	E. coli	>10 ⁸	+	4.3	42	—	—	0
9.	M.N.	1M	M	E. coli	>10 ⁸	+	3+	30	—	—	0
10.	C.K.	4Y	F	E. coli	>10 ⁸	—	1.6	11	—	—	0
11.	A.T.	4Y	F	E. coli	>10 ⁸	—	<0.2	7	—	—	0
12.	K.H.	2Y	M	Proteus	>10 ⁸	—	0.6	9	ND	—	0
13.	H.T.	5Y	M	E. coli	>10 ⁸	—	<0.2	6	—	—	0
14.	K.A.	11Y	F	E. coli	>10 ⁸	—	<0.2	5	Grade II	—	5
15.	K.M.	6Y	F	E. coli	>10 ⁸	—	1.1	13	ND	—	0
16.	A.I.	4Y	F	E. coli	10 ⁸	—	0.2	6	ND	—	0

No. 1-9 upper urinary tract infection
No. 10-16 lower urinary tract infection

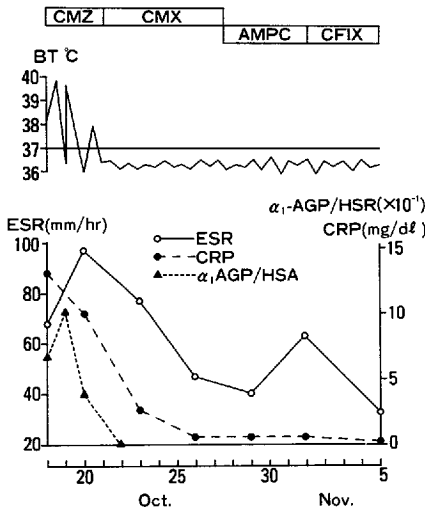
表 2

LDH isozyme pattern and α_1 -AGP/HSA ratio in the cases of urinary tract infection

No.	Name	Age	Sex	CRP (mg/dl)	ESR (mm/h)	LDH isozyme					α_1 -AGP/HSA
						I	II	III	IV	V	
1.	K.T.	2M	M	11.3	47	9	13	17	24	37	0.475
2.	K.S.	9Y	F	12.8	97	4	8	15	27	46	0.464
3.	A.K.	9Y	F	2.4	78	11	12	14	21	42	0.055
4.	N.S.	9Y	M	4+	18	18	19	18	20	25	0.052
5.	H.K.	6Y	F	11.2	50				ND		0.081
6.	A.S.	1Y	F	6.8	46				ND		0.060
7.	S.T.	8M	M	14.8	88				ND		0.443
8.	K.Y.	6M	M	4.3	42				ND		0.250
9.	M.N.	1M	M	3+	30	32	30	16	9	13	0.192
10.	C.K.	4Y	F	1.6	11	15	17	16	20	32	0.012
11.	A.T.	4Y	F	< 0.2	7	8	14	24	27	27	0.015
12.	K.H.	2Y	M	0.6	9	11	13	16	22	38	0.015
13.	H.T.	5Y	M	< 0.2	6				ND		0.005
14.	K.A.	11Y	F	< 0.2	5				ND		0.014
15.	K.M.	6Y	F	1.1	13	17	15	17	21	30	0.023
16.	A.I.	4Y	F	0.2	6	27	23	16	13	21	0.013

No. 1~9 upper urinary tract infection
No.10~16 lower urinary tract infection

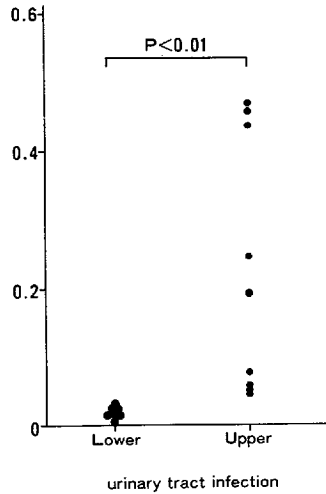
case : K.S. (F) 9Y



Changes of ESR, CRP and α_1 -AGP/HSA ratio in the case of upper urinary tract infection

图 5

α_1 -AGP/HSA ratio



α_1 -AGP/HSA ratio in the cases of upper and lower urinary tract infection

图 4



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:逆相カラムを用いたHPLC法による尿蛋白分析は従来のHPLC法に比べ前処理が簡単で、分離能も優れていると思われた。本法により尿路感染症について、クロマトグラム上の1-acid glycoprotein(以下 1-AGP)と human serum albumin(以下 HSA)の面積比、即ち1-AGP/HSA 比を求めた結果、上部尿路感染症では0.052~0.475 と広範な値を示し、下部尿路感染症では0.005~0.023 と上部に比べて低い値を示した($P<0.01$)。尿中 1-AGP/HSA 比は上部と下部尿路感染症の鑑別上、有用な指標の一つになると思われた。