

# 等電点電気泳動法による特発性ネフローゼ症候群の血清・尿中アルブミンの荷電状態の分析

## 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

特発性ネフローゼ症候群 (INS) のネフローゼ期と寛解期の血清および尿中のアルブミンの荷電状態を、等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF) を用いて検討した。その結果、アルブミンの等電点 pH 4.7 の位置に一致して b<sub>2</sub> バンド (メインバンド) がすべての検体に共通して認められた。他に、b<sub>2</sub> バンドより less anionic charge の b<sub>1</sub> バンドがネフローゼ期の尿のみに認められた。これは、ネフローゼ期の血清において惹起されたものが尿中に漏出してきたものと推測された。

等電点電気泳動法, 特発性ネフローゼ症候群 (INS), less anionic albumin

### 【はじめに】

特発性ネフローゼ症候群 (INS) は、2つの特徴を有する。①糸球体基底膜の蛋白に対する選択性が高く、主にアルブミンが尿中に漏出すること。②その糸球体病変は微小変化であること。最近、INS の病因論として、リンパ球の機能障害が問題になっている。つまり INS のネフローゼ期のリンパ球培養上清には、血管透過性因子 (VPF, lymphokines の一種と考えられる) 活性が高く存在し、この培養上清をラットの腎動脈に動注することにより、蛋白尿が誘発され、糸球体基底膜の polyanion coating が消失ないし、減弱することが報告されている。また、アルブミンの等電点 (isoelectric point, pI) は pH 4.7 で pH 7.4 の血液中にはアルブミンは他の蛋白に比較して強く陰性に荷電している。そのため、アルブミンは polyanion で覆われている正常糸球体基底膜を通過しにくいと考えられている。しかし、INS においては、高い VPF 活性が、糸球体基底膜の polyanion coating の減弱ないし消失を誘発し、アルブミンの選択的尿中への漏出を惹起すると、従来説明されてきている。

一方、最近、INS や糖尿病における血清および尿中のアルブミンの荷電状態の変化が報告さ

れ、アルブミンが特異的に尿中に漏出する原因として、このアルブミン自体の荷電の変化が注目されてきている。私共は、INS においては、高い VPF 活性により、糸球体基底膜の荷電が変化するのみならず、アルブミン自体もその荷電状態が変化し、その相互の荷電の変化の結果としてアルブミン尿が惹起されるとの仮説を立て、その仮説を証明する一歩として、本研究では、INS の血清・尿中アルブミンの荷電状態を等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF) にて分析し、その変化の動態の把握を試みた<sup>2)</sup>。

### 【対象および方法】

#### 1. 対象

対象は INS 10 症例で、ネフローゼ期あるいは寛解期を対象とした。なお、コントロール群は正常者 5 名とした。被検体は各病期の尿、および血液で、尿はスポット尿で 1500 回転、5 分間遠心分離した上清をそれぞれ被検体とし、測定時まで -80℃ に保存した。

#### 2. 方法

##### 1) アルブミン濃度の測定

被検体のアルブミン濃度は、Behring Nephrometer Analyzer (ヘキスト社製) を用いて免疫学的に測定し、微量アルブミンの測定は、Laurell 法 (抗ヒトアルブミン家兔血清, ヘキス

聖マリアンナ医科大学小児科

Yasushi Koitabashi, Yoshiya Yamaguchi

Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine

ト社製)で測定した。なお、標準アルブミン液にはN-Protein-Standard Serum(ヘキスト社製)を使用した。

## 2) 等電点電気泳動(IEF)による分析

被検体の尿のアルブミン濃度の調製には、低濃度の場合、遠心式限外濾過フィルター(セントリカットミニ, クラボウ社製)を用いて濃縮し、高濃度の場合には生理的食塩液を用いた。IEFには電気泳動装置としてLKB 2117 Multiphor II, パワーサプライにLKB 2297 Macrodrive 5をそれぞれ使用した。泳動ゲルは、pH range 4.0~6.5のポリアクリルアミドゲル(LKB Ampholine, Pharmacia社製)を使用した。泳動条件は、陽極側の電解質液に0.1mol/l グルタミン酸加0.5mol/l リン酸溶液、陰極側の電解質液に0.1mol/l  $\beta$ -アラニン溶液を用いた。被検体10 $\mu$ lをゲルにアプライし、2000V, 25Wで2時間30分泳動(10 $^{\circ}$ C)した。転写条件は、泳動後のゲルにトランスフェーメンブレン(Immobilon PVDF, ミリポア社製)を重ねて40 $^{\circ}$ C 15分とした。染色条件は、転写後のトランスフェーメンブレンを5%脱脂乳でブロッキングした後、一次抗体(抗ヒトアルブミン家兎血清, ヘキスト社製)、二次抗体(ビオチン化抗ラビットIgG ヒツジ抗体, ベクター社製)と反応させABC-PAPキット(ベクスターステイン, ベクスター社製)の測定法<sup>9)</sup>を用いた。

## 【結果】

### 1. アルブミン濃度の設定

INSネフローゼ期の尿(アルブミン1.5g/dl)を10倍、50倍に希釈し、各希釈系列におけるIEF像を図1に示した。原尿は全体的に染色され、各バンドは不明瞭であった。10倍希釈では、アルブミンのpI, pH 4.7のメインバンド $b_2$ と、 $b_2$ バンドよりmore anionic chargeのアルブミンバンド $b_3$ 、 $b_2$ バンドよりless anionic chargeのアルブミンバンド $b_1$ の3バンドが確認された。50倍希釈では、 $b_2$ 、 $b_3$ バンドのみ確認され、 $b_1$ バンドは確認できず、 $b_3$ バンドの染

色性は著しく低下していた。

以上の結果より、今回施行時の被検体のアルブミン濃度は、10倍希釈検体(b)に相当するアルブミン濃度1.5mg/mlで行った。

### 2. 尿中アルブミンの検討

図2にINSネフローゼ期および寛解期における尿のIEF像を示した。正常者5名の尿はすべて同一の泳動像で、うち3検体(a, b, c)を図2に示したがpI 4.7の $b_2$ バンド、 $b_2$ バンドよりmore anionic chargeのアルブミンバンド $b_3$ が確認され、さらに $b_3$ バンドよりmore anionic chargeのアルブミンバンド $b_4$ も確認された。

INSのネフローゼ期10症例の検討では、 $b_2$ 、 $b_3$ バンドは全例に認められたが、 $b_2$ バンドよりless anionic chargeのアルブミンバンド $b_1$ バンドはd, e, f, g, hの5検体のみ認められた。残りの5検体はすべて $b_2$ 、 $b_3$ バンドのみが認められた。この5検体のうち2検体(i, j)のみ図2に示した。INS寛解期ではk, l, m, n, oの5検体とも $b_1$ バンドは確認できず、 $b_4$ バンドは全検体に確認された。

### 3. 血清アルブミンの検討

INSのネフローゼ期5症例(c, dのみ呈示)および寛解期5症例(e, fのみ呈示)の血清IEF像の検討では、図3に示すように全例ともに $b_2$ 、 $b_3$ バンドのみ確認され、正常者血清5検体(a, bのみ呈示)と明らかな差は認められなかった。

## 【考案】

INSネフローゼ期の尿では $b_2$ 、 $b_3$ バンド以外にless anionic chargeの $b_1$ バンドが存在するが、寛解期の尿では $b_1$ バンドは存在せず、 $b_2$ 、 $b_3$ バンドのみであった。しかし、INSネフローゼ期の血清では $b_1$ バンドは確認されなかったが、Ghiggeri<sup>1)</sup>は約半数の症例にpI 4.7よりless anionic chargeのアルブミンを確認している。これは、今回の $b_1$ バンドに相当するものと思われた。今回、血清で $b_1$ バンドが確認できなかった原因として、less anio-

nic charge のアルブミンは、 $b_2$ 、 $b_3$  バンドのアルブミンに比して polyanion で覆われている基底膜を通過しやすいと考えられ、尿中に漏出して血中からは大部分消失し、その結果をみている可能性が示唆された。したがって、ネフローゼ発症の早期に検査すれば残存バンドを確認できた可能性も考えられた。また、アルブミン濃度  $1.5 \text{ mg/ml}$  の条件は、尿中アルブミンは  $b_1$  バンドを確認するのに適した濃度であって、血清中  $b_1$  バンドの観察にはさらに高いアルブミン濃度が必要であったと思われる。つまり、ネフローゼ期の血清においては、less anionic charge の  $b_1$  バンドが正常者血清に比して増加するとしても、その全アルブミン量に占める割合が、尿中におけるそれより低い可能性が示唆される。

一方、正常者尿では more anionic charge の  $b_4$  バンドが確認されたが、INS ネフローゼ期の尿では  $b_4$  バンドは 1 検体も確認されなかった。しかし、INS 寛解期には 5 検体中 2 検体に  $b_4$  バンドが確認された。従来、ネフローゼ期では、血管透過性因子が糸球体基底膜の charge barrier を形成している polyanion coating の減弱を引き起こすと報告されている。そこで、ネフローゼ期においてはこの血管透過性因子が血清中のアルブミンに直接作用し、アルブミンの荷

電状態を変化させ、とくに more anionic charge のアルブミンは less anionic charge のアルブミンへと変化し、尿中に漏出し  $b_1$  バンドを形成した可能性が示唆された。一方、 $b_4$  バンドは血清中では減少するためネフローゼ期の尿中には確認できないと考えられた。

今回、筆者は INS におけるアルブミン尿の成因として、アルブミンの荷電の変化について検討してきた。INS では糸球体基底膜の polyanion coating の減弱ないし消失が証明されていることを考えると、一方のみにアルブミン尿の成因を求めるのは不可能であり、両者が互いに関係しあってアルブミン尿が惹起されると考えられた。【文献】

1. Ghiggeri, G. M., Candiano, G., Ginevri, F., Oleggini, R., Perfumo, F., Queirolo, C. and Gusmano, R.: Characterization of cationic albumin in minimal change nephropathy. *Kidney Int.*, 32: 547 - 553, 1987.
2. 山口義哉: 特発性ネフローゼ症候群の血清尿中アルブミンの等電点、電気泳動法による分析  
聖マリアンナ医科大学雑誌  
18: 812 - 817, 1990.

#### Abstract

#### Analysis of the Albumin Charge of Idiopathic Nephrotic Syndrome by Isoelectric Focusing

The state of the electrical charge of serum and urinary albumin was studied in both the nephrotic and remission stage of idiopathic nephrotic syndrome (INS), using isoelectric focusing (IEF).

1) Both the  $b_2$  band (a main albumin band appearing at the site of isoelectric point 4.7), and the  $b_3$  band (a more anionic band than  $b_2$  band) were detected in all samples of urine and serum in INS patients in the nephrotic or remission stage and in healthy adult volunteer controls.

2) The  $b_1$  band (a less anionic band than  $b_2$  band) was detected only in urine of INS patients in the nephrotic stage.

3) The  $b_4$  band (a more anionic band than  $b_3$  band) was detected in all urine samples of healthy adult volunteer controls and in some urine samples of INS patients in the remission stage.

From these results, it was suggested that in the nephrotic stage of INS a less anionic albumin ( $b_1$  band) in serum leaks into urine as a result of changes in the electric charge of serum albumin although it has been reported that albuminuria was induced by the change of glomerular polyanion coating.

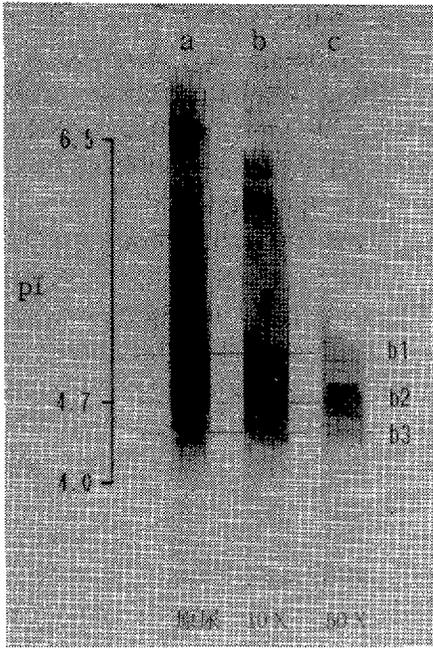


図1. INSネフローゼ期尿を, 原尿, 生理的食塩液で10倍, 50倍希釈したそれぞれの検体における IEF 像を示す。

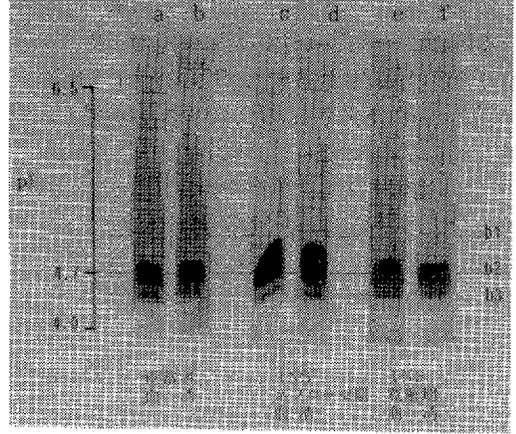


図3. 正常者, INSネフローゼ期および寛解期における血清の IEF 像を示す。

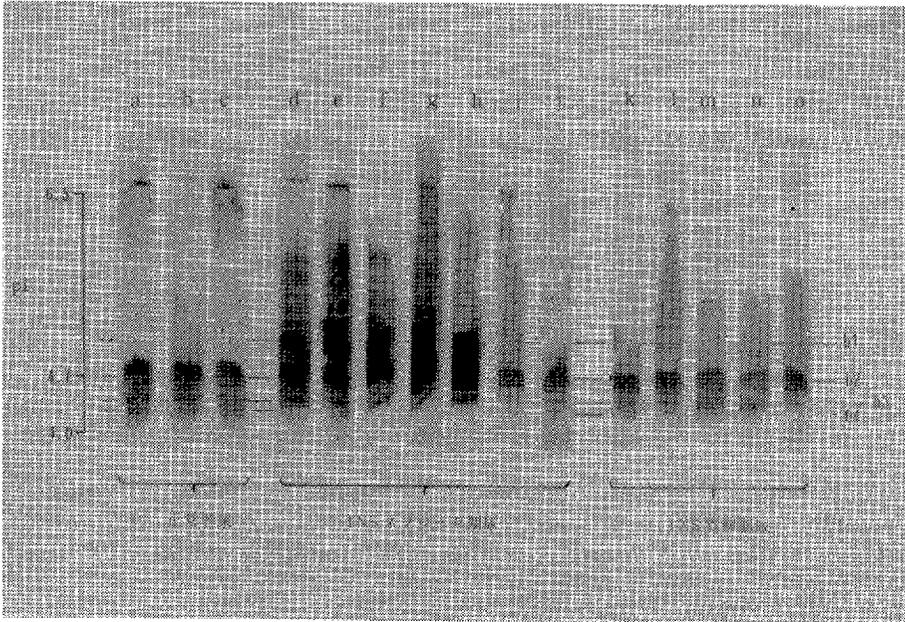


図2. 正常者, INSネフローゼ期および寛解期における尿の IEF 像を示す。



## 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



特発性ネフローゼ症候群(INS)のネフローゼ期と寛解期の血清および尿中のアルブミンの荷電状態を、等電点電気泳動(isoelectric focusing, IEF)を用いて検討した。その結果、アルブミンの等電点pH4.7の位置に一致してb2バンド(メインバンド)がすべての検体に共通して認められた。他に、b2バンドより less anionic charge のb1バンドがネフローゼ期の尿のみに認められた。これは、ネフローゼ期の血清において惹起されたものが尿中に漏出してきたものと推測された。