

〈特集：尿蛋白・アルブミンの解析とその進歩〉

## 電気泳動法による診断に有用な尿蛋白解析と 尿プロテオーム解析

芝 紀代子

### Disease diagnosis with electrophoretic analysis of urinary protein and comprehensive urinary proteome research

Kiyoko Shiba

**Summary** The importance of urine has tended to be underestimated given its image of an unnecessary waste of biological fluid. Recently, large-scale projects have been established to analyze urinary proteins, more than 1500 of which have been identified as candidate biomarkers. Urinary proteins are routinely analyzed using electrophoresis. Even one-dimensional electrophoresis is considered a useful tool for the diagnosis of diseased conditions. This section describes a successful diagnostic application using urinary protein profiles analyzed by cellulose acetate membrane electrophoresis and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In the context of the standardization for a urinary proteome, the sampling and storage of urine are also shown. Finally, we discuss current examples of urinary biomarker research in renal diseases.

**Key words:** Urinary protein, Cellulose acetate membrane electrophoresis,  
Two-dimensional electrophoresis, Urinary proteome analysis

#### I. はじめに

尿は排泄物というイメージから、尿検査を軽視していた傾向があったが、時代は大きく変わってきた。尿蛋白を網羅的に解析し有用な情報を得る試みが、組織された世界的なプロジェクトによってすでにスタートした。尿には約1500種以上の蛋白が同定されており、その中からバイオマーカーの発見が期待されている。日常の

臨床検査で用いられている電気泳動法によって解析された結果が疾病に役立つということを実証した長年の努力が、尿プロテオーム解析へとつながったと思われる。尿蛋白の解析はホットな話題である。本稿では日常検査で主に使われる電気泳動法による尿蛋白質解析について記述し、次いで尿プロテオーム解析についても記述する。

文京学院大学保健医療技術学部臨床検査学科  
113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

Health Science Technology Department of Clinical  
Laboratory Medicine, Bunkyo Gakuin University,  
2-4-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

1. セルロースアセテート膜電気泳動法による尿蛋白の解析

1) セルロースアセテート膜に適した尿蛋白染色法の開発

日常の臨床検査法として使う支持体は圧倒的にセルロースアセテート膜である。尿蛋白に応用した場合、従来血清蛋白に使われているボンソン-3Rでは50倍近く尿を濃縮しないと検出できない。高感度蛋白染色法である銀染色はすでに市販されており、ポリアクリルアミドゲルやアガロースを支持体としたときには使用可能であ

るが、セルロースアセテート膜上の蛋白を染色することは出来ない。そこで芝らはコロイド銀を用いるセルロースアセテート膜に適した銀染色法の開発を行った<sup>1)</sup>。セルロースアセテート膜電気泳動法でも銀染色を組み合わせることにより、多彩な尿蛋白分画を見出すことが出来、種々疾患の解析が出来るようになった(図1)。

2) 健常人の尿中蛋白分画

異常な蛋白分画を見出すにはまず健常人の尿蛋白分画を明確にすることである。Machiiらは銀染色法を用いることにより全く濃縮しなくて

表1 健常人の尿蛋白分画

性別	n	アルブミン (%)	グロブリン (%)				A/G比
			$\alpha$ 1-G	$\alpha$ 2-G	$\beta$ -G	$\gamma$ -G	
男性	30	27.09±9.45	4.95±4.19	15.00±6.06	19.37±5.20	33.69±7.72	0.39±0.19
女性	30	29.67±7.39	3.66±4.15	13.82±6.27	19.52±8.70	33.33±8.86	0.44±0.15
合計	60	28.37±8.51	4.30±4.19	14.41±6.14	19.45±7.10	33.46±8.24	0.41±0.17
P		ns	ns	ns	ns	ns	ns

(文献2)より引用)

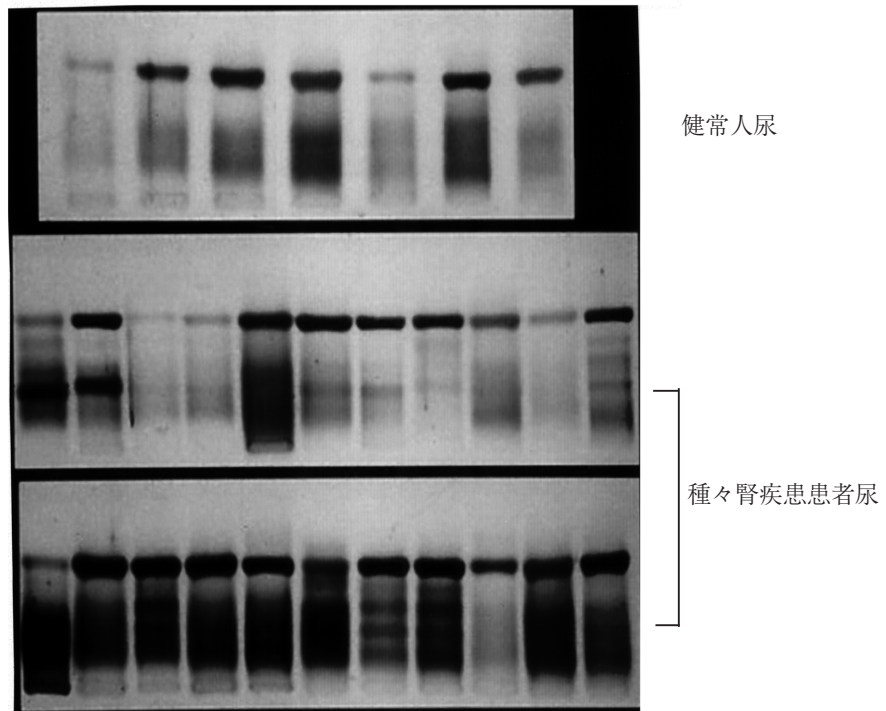
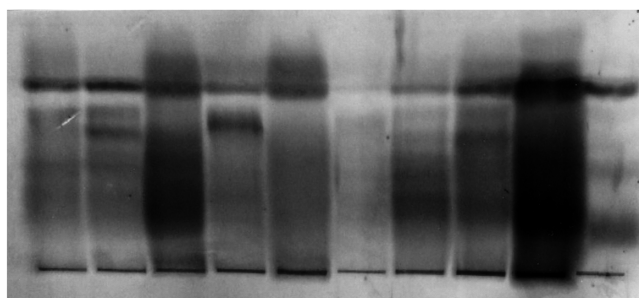
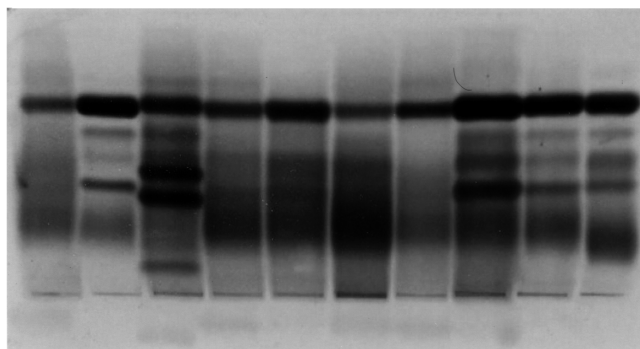


図1 セルロースアセテート膜電気泳動法による健常人と種々腎疾患患者の尿蛋白分画



(尿蛋白試験紙で (-) と判定した外来患者尿)



(尿蛋白試験紙で (±) と判定した外来患者尿)

図2 セルロースアセテート膜電気泳動法による外来患者の尿蛋白分画 (文献3)より引用)

も、健常人の尿蛋白を明確に分画出来、かつ、各蛋白分画パーセントを報告している (表1)。 $\gamma$ -グロブリン分画が高いのは、Tamm Horsfall Protein (THP) がその部位に存在するためであることも明らかとした<sup>2)</sup>。

### 3) 種々疾患患者の尿蛋白分画

金森らは外来に受診した患者尿のうち、尿蛋白試験紙法で、(-)、(±) とほぼ正常を示した症例について尿蛋白分析を行ったところ、健常人に比して多種多様な尿蛋白分画を示す事を明らかとした (図2)。この結果から尿蛋白試験紙で (-)、(±) と判定した尿でも、糸球体性、尿細管性のパターンを示すこともわかり、かなり初期の段階で腎障害のスクリーニングに有用な手段になることを示唆している<sup>3)</sup>。本法が今日注目されている慢性腎臓病患者を早期に発見する有力な手段となることが期待される。

Hiratsukaらは糖尿病患者の腎症の早期発見の

手段としてこの本法を用いた結果、糸球体性あるいは尿細管性の障害かを判別する手段ともなりえる可能性を示唆した<sup>4)</sup>。また、MachiiらはIgA腎症未治療患者に特異的に見出された幅広いアルブミンバンドについて検索した結果、アルブミン分画の幅伸張は尿中アルブミン濃度に依存せず、その原因はアルブミンにTHPが結合していることを明らかとした<sup>5)</sup>。

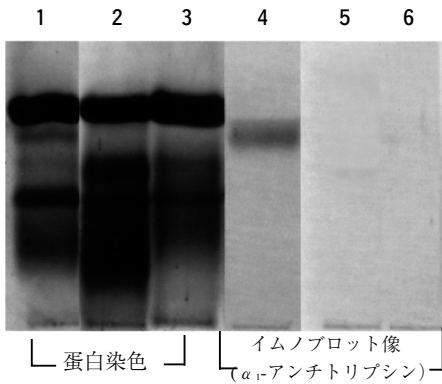
Kubotaらは尿細管間質性腎炎患者尿を分析し、免疫固定法により特異蛋白を同定したところ、14個の蛋白 (プレアルブミン、アルブミン、 $\alpha_1$ -ミクログロブリン、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、ハプトグロビン、レチノール結合蛋白、トランスフェリン、 $\beta_2$ -ミクログロブリン、IgA、IgG、シスタチンC、リゾチーム) が同定され、今まで捉えることが出来なかった、シスタチンC、リゾチームも捉えることが出来たと報告している<sup>6)</sup>。

腎疾患病態分類への利用をSakatsumeらが<sup>7)</sup>行っ

ている<sup>7)</sup>。その報告によると、腎生検で診断された糸球体障害、尿細管障害、その2つの混合型障害の3群について、尿蛋白分画との比較を行った。糸球体障害、尿細管障害では、それぞれ感度、特異度が100%、85.7%そして、100%、94.9%と良好な結果が得られたが、糸球体性と尿細管性との混合型障害では57.9%、100%と、感度がやや悪かった。その原因は、糸球体性に尿細管障害が51%以上加わるとあると尿細管障害パターンとなることがわかった。混合型をのぞき、尿蛋白分画を実施することにより、腎生検を行わなくとも腎障害を知る有用な手段となり得るとしている。

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacryl Amide Gel Electrophoresis SDS-PAGE)

SDS-PAGEでは蛋白の分子サイズが推定でき、またブロッティング後の抗原抗体反応により特異的な蛋白を検出できる。Machiiらはセルロースアセテート膜電気泳動法で、坑好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連腎炎患者尿に $\alpha_1$ -グロブリン分画の欠失や減少が高頻度に見られたことから、SDS-PAGEにより、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンの分子サイズを調べた。その結果 $\alpha_1$ -グロブリン分画の欠失や減少例では、健常人で見られる57 kDa、

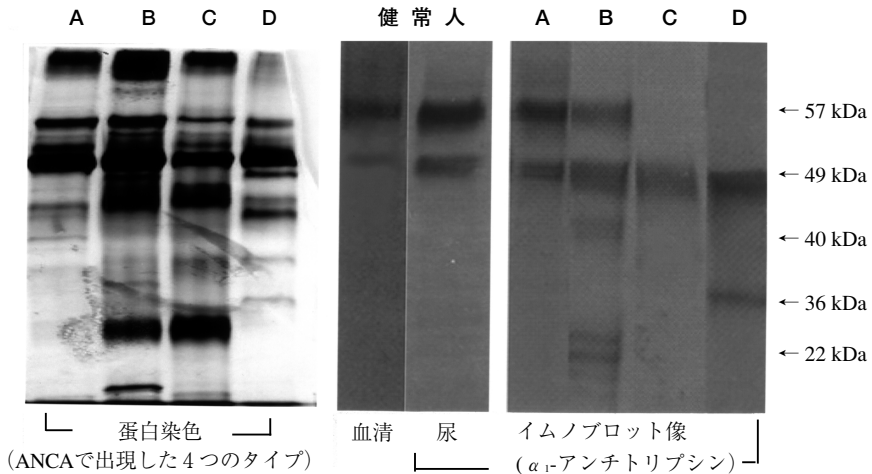


- 1 IgA腎症
- 2 ANCA関連腎炎
- 3 膜性増殖性糸球体腎炎

1、2、3、の検体についてのイムノプロット像は、4、5、6、に相当する。

2のANCA関連腎炎では $\alpha_1$ -アンチトリプシン位にある $\alpha_1$ -アンチトリプシンが欠損している。

(セルロースアセテート膜電気泳動による尿蛋白分画)



(SDS-PAGE電気泳動による尿蛋白分画)

図3 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連腎炎患者尿の蛋白解析 (文献8)より引用)

49 kDaのほか、40 kDa、36 kDa、22 kDaと分るサイズが小さいものが出現する症例が多いことを報告している（図3）。 $\alpha_1$ -アンチトリプシンの異常は炎症性細胞浸潤が強い疾患で高率に見出されるところから、 $\alpha_1$ -グロブリン分画異常が腎局所の炎症を反映する可能性を示唆していると推測している<sup>9)</sup>。2型糖尿病患者尿を分析した金森らは、網膜症を合併している患者には150 kDaのほか50 kDaにRBP4のバンドが出現するとしている<sup>9)</sup>。分子サイズが小さい50 kDaのRBP4が網膜症を早期に発見するマーカーとなることが期待される。

デント病は1964年英国のDentらが、初めて軽度のクル病、高カルシウム血症、低分子蛋白尿、尿管障害、低身長を認める症例を報告したことから、発見者の名前をとって名付けられた<sup>10)</sup>。デント病は小児期から近位尿管機能障害を呈し、加齢とともに遠位尿管障害が加わり、次いで腎機能低下をきたす疾患でX染色体性の遺伝疾患である。日本ではsuzukiら<sup>11)</sup>によって特発性尿管蛋白尿として日本固有の疾患としたが、のちに、五十嵐ら<sup>12)</sup>によってデント病と同じクロライドチャンネル5蛋白異常であることが明らかにされた。その暫定的診断基準の主要項目の一つに尿中 $\beta_2$ -ミクログロブリンや $\alpha_1$ -ミクログロブリンなどの低分子蛋白が異常に高値であることがあげられている<sup>13)</sup>。尿中低分子蛋白の確認はセルロースアセテート膜電気泳動あるいはSDS-PAGEを行うこととし、セルロースアセテート膜電気泳動法では $\alpha_1$ + $\alpha_2$ -グロブリン値が25%以上、そして、SDS-PAGEによる分子量4万以下の尿蛋白が40%以上という項目が含まれている<sup>14)</sup>。

腎結石症は最も一般的な泌尿器障害である。生涯に尿結石にかかる人は10%以内であるが、10年間の再発率は74%と高率である。横溝らは尿路結石患者と健常人尿蛋白をSDS-PAGEで分析した結果、健常人に比べ、THPが尿結石患者では少ないが、アルブミンバンドは濃染されていることを報告している<sup>15)</sup>。アルブミンに関してはAtmani FとKhan S.Rは腎結石形成にアルブミンが重要な役割を演じていると報告している<sup>16)</sup>。Wai-Hoeraらは腎結石症のスクリーニングのためにSDS-PAGEをベースとしてTHP定量法を報告している<sup>17)</sup>。

### 3. 2次元電気泳動法

2段階の電気泳動により蛋白質を2次元に分離する方法である。一次元目は等電点電気泳動により蛋白の等電点で分け、2次元目はSDS-PAGEにより蛋白の分子サイズで分ける。一次元、2次元ともに分離能が非常に高いので、数千個のスポットに分離することができる。プロテオーム解析において、2次元電気泳動手法は中心的な役割を担っている。

2次元電気泳動後のゲルは銀染色や蛍光染色でスポットを検出するか、またはプロット後の抗原抗体反応により特異的蛋白を検出する。プロテオーム解析のための2次元電気泳動標準操作法は戸田によって詳細に記載されているので、そちらを参照してほしい<sup>18)</sup>。

### 4. 尿蛋白プロテオミクス<sup>19)</sup>

プロテオーム (proteome) という言葉は蛋白質 (protein) と全体 (-ome) を意味する言葉から作られた造語である。また、プロテオミクスとはプロテオームを解析するための網羅的な蛋白質同定技術を指していたが、現在では大規模蛋白質解析による総合的な蛋白質科学全体を指すようになってきた。

#### 1) プロテオミクスの原理

蛋白の分離→分離した蛋白をトリプシンなどでペプチドに分解→質量分析装置による解析→検索エンジンによる深索→パスウェイ解析

##### ① 蛋白の分離法

主な技術は2次元ゲル電気泳動法と液体クロマトグラフィーである。

##### ② 質量分析装置 (Mass Spectrometer, MS)

ペプチドの分子量やアミノ酸配列を決定することが出来る。

##### ③ 検索エンジン

ヒトに約23,000個の遺伝子が存在しており、その遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を推定することが可能である。推定するアミノ酸配列情報と合致する蛋白質を検索エンジンを用いて深索し、蛋白質を同定する。

##### ④ パスウェイ解析

蛋白が網羅的に同定され、その構造、特性、機能、存在部位を確認したら、次に必要となるのは蛋白質同士の相互関係である。蛋白質同士

の相互関係を結び合ったデータベースがパスウェイ解析としてすでに構築されている。パスウェイ解析で主に使われるのは京都大学が提供しているKEGGである。

2) 尿プロテオミクスガイドライン<sup>20,21)</sup>

国際ヒトプロテオーム機構の公認プロジェクトのひとつにHKUPP (Human Kidney and Urine Proteome Project) があり、そこで尿プロテオーム解析の標準化を試み、ガイドラインの策定が試みられている。尿を材料とした場合、採尿時期、採尿方法、保存法、尿蛋白質調製法など、プロテオーム解析に影響する因子が多く、尿プロテオーム解析のデータを共有する観点からも標準化は必要である。尿採集方法と保存法の標準法のプロトコルを(表2)に示す。日本でも2008年に日本腎臓病学会に尿中バイオマーカーパネル小委員会が設けられ、2009年から全国多施設で同じ規格で尿を採取、保存し、さらに研究者に提供する尿バンクがスタートした。日本からの腎臓病患者の早期診断や予後の予測に有用なバイオマーカーの提唱が期待される<sup>22)</sup>。

3) 糖尿病腎症のバイオマーカー

Raoらは糖尿病腎症の尿中バイオマーカーとして、7種の蛋白質 ( $\alpha_{1B}$ -グリコプロテイン、

亜鉛- $\alpha_2$ -グリコプロテイン、 $\alpha_2$ -HS-グリコプロテイン、ビタミンD-結合蛋白、カルグラヌリンB、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン、ヘモペキシン)を見出している<sup>23)</sup>。プロテオミクスの原理を用いて、Jiang Hらは糖尿病腎症のバイオマーカーとして、尿中のE-カドフェリンを報告している。腎症が進行するほど高値となり、微量アルブミン尿の糖尿病患者で5.2倍もコントロールに比べ高値になる。また、E-カドフェリンの80 kDaのsE-カドフェリンは糖尿病で感度78.8%、特異度80%であるところから、糖尿病の可能性のある臨床診断値になると報告している<sup>25)</sup>。

2010年にはAmeurらが糖尿病腎症のバイオマーカーを見つけるためのプロテオミクスのアプローチについての総説を出しているが、検査材料として、尿がかなり取り上げられている<sup>24)</sup>。尿結石のバイオマーカーについても行われている。

2010年に、Wai-HoeらはSDS-PAGEとLC/MS/MSにより健常人と腎患者から32種類の蛋白を同定している。ウロモジュリン (THPのこと)は初発患者のみにおいて、非常に低値なので、信頼できるバイオマーカーとしている(図4)。また、いくつかの免疫グロブリンが腎結石の可能性を示唆するバイオマーカーにあるとしている<sup>26)</sup>。

表2 尿プロテオーム解析のための尿採取と保存のための標準的プロトコル (可溶性の尿蛋白分析) (文献21)より引用)

		実的な推奨法
1*	採取時間	随時尿または早朝第2尿の中間尿を集める。
2*	保存法	室温保存、採尿後4時間以内に凍結する場合は保存剤は不必要、
	採尿後	4時間以上経て凍結する場合は10 mM NaNa <sub>2</sub> (0.2 Mホウ酸)を加える。
3*	プロテアーゼインヒビター	正常尿には不必要 (蛋白尿には必要)
4*	前処理・保存法	細胞と残渣を除くために1000gで10分遠心、10 ml (50 mlあるいは1.5 ml) に分注して-20℃あるいは-80℃で保存
5*	凍結・融解	凍結・融解はしない。融解するときは37℃の温浴で行う。

正常尿 (大人)  
尿試験紙で蛋白質が陰性 (<15 mg/dl)、蛋白質/クレアチニン比 (<0.2 g/g)、  
24時間尿蛋白質 (<0.2 mg/day)

《注釈》

- 1\* 早朝第2尿と滅菌尿カップでの採取が望ましい。
- 2\* 4℃保存が望ましいが、必須ではない。
- 3\* プロテアーゼインヒビターは蛋白尿には必要かもしれないが、正常尿サンプルではエキソソーム分析以外には不必要。
- 4\* 遠心分離は不溶性物質 (細胞、円柱) から離される蛋白質を最小限にするために必要。
- 5\* 融解したのちの凝集の安定化をはかるために、1 Mトリス緩衝液 (pH 8.0) でpHを8.0に調整する。凍結・融解の回数は記録する。凍結・融解の回数が同じサンプルがプロテオミクスの比較のために使用されなければならない。

ネフローゼ症候群を伴う糸球体性疾患患者尿においてアルブミンと $\alpha_1$ -アンチトリプシンのフラグメントが出現していることをCandianoらは報告している<sup>27)</sup>。これらのフラグメント化は蛋白尿の思もよらない構造的および機能的な様相を表しており、病態における重要な役割を演じているかもしれないとしている。

## II. 終わりに

非侵襲的で多量に採取できる尿がプロテオーム解析の最適な検査材料として注目されてきた。また、そのデータが世界で共有できるということで、世界的なプロジェクトが立ち上がった

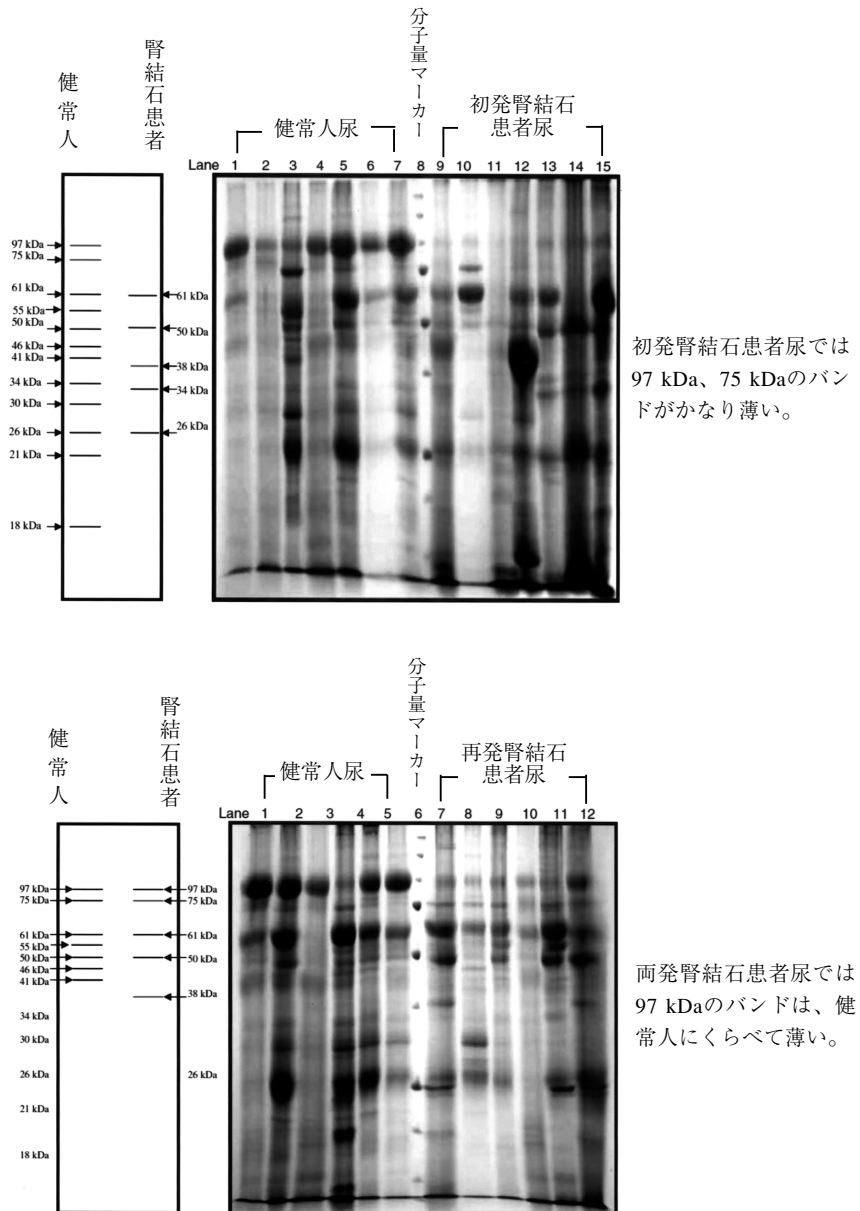


図4 健康人の腎結石患者のSDS-PAGEによる尿蛋白プロフィール (文献26)より引用)

ことはうれしい限りである。プロテオーム解析を今すぐ日常検査の業務に取り入れるのは難しいけれども、尿プロテオーム解析に使われる尿の処理法などの基本的なところを十分念頭に入れておけば、日常業務でしばしば発見される珍しい症例について、2次元電気泳動を行えば特異蛋白の検索が出来、バイオマーカーの発見へとつながりやすい。日々の検査データは常に目を光らせていることが大きな成果を挙げる一助になることは間違いない。

文 献

- 1) Hiratsuka N, Shiba K, Shinomura K, and Hosaki S: Rapid and sensitive colloidal silver staining on cellulose acetate membrane for analysis of urinary proteins. *J Clin Lab Anal*, 10: 403-406, 1996.
- 2) Machii R, Kubota R, Hiratsuka N, Sugimoto K, Masudo R, Kurihara Y, Kobayashi S, Shiba K: Urinary protein fraction in healthy subjects using cellulose acetate membrane electrophoresis followed by colloidal silver staining. *J Clin Lab Anal*, 18: 231-236, 2004.
- 3) 金森きよ子: 高感度銀染色法を用いた尿たんぱく分画の検討. *医学検査*, 54: 248-252, 2005.
- 4) Hiratsuka N, Shiba K, Shinomura K, Hosaki S, Nishida K, Kobayashi S: Electrophoretic patterns of urinary proteins of diabetics in the pre, early and overt nephropathy stages. *Biol Pharm Bull*, 20: 651-655, 1997.
- 5) Machii R, Matsuda K, Hiratsuka N, Sugimoto K, Hotta O, Itoh Y, Yoshida H, Shiba K: Analysis of an expanded width of albumin fraction by cellulose acetate membrane electrophoresis in IgA nephropathy urine before treatment. *J Clin Lab Anal*, 17: 37-43, 2003.
- 6) Kubota R, Machii R, Hiratsuka N, Hotta O, Itoh Y, Kobayashi S, Shiba K: Cellulose acetate membrane electrophoresis in the analysis of urinary proteins in patients with tubulointerstitial nephritis. *J Clin Lab Anal*, 17: 44-51, 2003.
- 7) Sakatsume M, Kubota R, Ogawa A, Narita I, Matsuda T, Shiba K, Gejyo F: Rapid and sensitive electrophoresis of urinary protein clearly reveals the pathophysiological feature of renal diseases. *Nephrology*, 12: 191-196, 2007.
- 8) Machii R, Sakatsume M, Kubota R, Kobayashi S, Gejyo F, Shiba K: Examination of the molecular diversity of  $\alpha_1$  antitrypsin in urine: Deficit of an  $\alpha_1$  globulin fraction on cellulose acetate membrane electrophoresis. *J Clin Lab Anal*, 19: 16-21, 2005.
- 9) Kanamori K, Kameko M, Kitamura H, Nishimaki J, Shiba K, Sato K: The usefulness of electrophoretic analysis of urinary retinol-binding protein and retinal-binding protein 4 in type 2 diabetes mellitus patients. *J electrophoresis*, 53: 7-12, 2009.
- 10) Dent CE, Friedman M: Hypercalcuric rickets associated with renal tubular damage. *Arch Dis Childh*, 39: 240-249, 1964.
- 11) Suzuki Y, Okada T, Konishi T, Higuchi A, Shima S: The low molecular weight of protein components in children urine. *Acta Paed Jap*, 22: 1-5, 1980.
- 12) Igarashi T, Hayakawa H, Shiraga H, Kawato H, Yan K, Kawaguchi H, Yamanaka T, Tsuchida S, Akagi K: Hypercalciuria and nephrocalcinosis in patients with idiopathic low-molecular-weight proteinuria in japan ; is the disease identical to Dent's disease in United Kingdom?. *Nephron*, 69: 242-247, 1995.
- 13) 五十嵐 隆: VII 各論 尿細管疾患, 69. *Dent病 腎と透析*, 臨時増刊号, 311-313, 2006.
- 14) 松山 健, 清水マリ子, 五月女友美子, 田中百合子, 西尾利之, 稲富 淳, 関根孝司, 五十嵐 隆, Thakker RV: 典型的なDent病の臨床像を呈しながらLowe症候群の責任遺伝子OCRL1の異常が判明した兄弟例. *小児科臨床*, 61: 1047-1050, 2008.
- 15) 横溝佳代, 中山亜紀, 外園栄作, ニノ宮明子, 三宅瑠璃子, 平塚信夫, 奥山光彦, 加藤祐司, 小林静子, 伊藤喜久, 芝 紀代子: 尿路結石患者の結石抽出液と尿のタンパク成分の分析. *臨床病理*, 53: 1109-1115, 2005.
- 16) Atmani F, Khan SR: Quantification of proteins extracted from calcium oxalate and calcium phosphate crystals induced in vitro in the urine of healthy controls and stone-forming patients. *Urol Int*, 68: 54-56, 2002.
- 17) Wai-Hoe Lau, Wing-Seng Leong, Ismail Zhari, Lay-Harn Gam: SDS-PAGE-based quantitative assay for screening of kidney stone disease. *Biological Prodedures Online*, 11(1): 145-160, 2009.
- 18) [http://www.proteome.jp/2D/j\\_2DE method.ht.ml](http://www.proteome.jp/2D/j_2DE method.ht.ml)
- 19) 山本 格: 尿を対象としたプロテオミクスの最前線. *検査と技術*, 36: 701-706, 2008.
- 20) <http://jglobal.jst.go.jp/public/20090442/200902291758395541>
- 21) <http://www.hkupp.org/Urine%20colletiiion%20Documents.htm>
- 22) 山本 格: 特集: プロテオミクス, 腎臓病学におけるプロテオミクス. *日腎会誌*, 52: 457-460, 2010.
- 23) Rao PV, Girishes G, Lu X, Dakshinamurthy KV, Standley M, Roberis C. Patiee P, Nagalla S, Neelima G: Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 30: 629-637, 2007.



- 24) Jiang H, Guan G, Zhang R, Liu G, Cheng J, Hou X, Cui Y: Identification of urine soluble E-cadherin as a novel biomarker for diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev*, 25: 232-241, 2009.
- 25) Ameer RB, Molina L, Bolvin C., Kifagi C, Jarraya F, Ayadi H, Molina F, Granier C: Proteomic approaches for discovering biomarkers of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 14: 1-10, 2010.
- 26) Wai-Hoe Lau, Wing-Seng Leong, Ismail Zhari, Lay-Harn Gam: Proteomics and detection of uromodulin in first-time renal calculi patients and recurrent renal calculi patients. *Appl Biochem Biotechnol*, DOI 10.1007/s12010-008-8503-x]
- 27) Candiano G, Musante L, Bruschi M, Petretto A, Santucci L, Boccio PD, Pavone B, Perfumo F, Urbani A, Scolari F, Ghiggeri GM: Repetitive fragmentation products of albumin and  $\alpha_1$ -antitrypsin in glomerular disease associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 17: 3139-3148, 2006.