

〈特集：尿蛋白・アルブミンの解析とその進歩〉

尿中アルブミン分子多様性の解析

中山 亜紀

Microheterogeneity of urinary albumin

Aki Nakayama

Summary To date, various forms of urinary albumin resulting from post-translational modifications such as fragments, decreased immuno-reactivity, intermolecular links between disulfide bonds, and oxidation have been reported. This variety of urinary albumin has raised the question of which one should we analyze in the clinical laboratory. In this review, we provide an overview of recently-developed analytical methods of urinary albumin and its excretion mechanism.

Key words: Urinary albumin, HPLC, SDS polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot

I. はじめに

尿中アルブミンは免疫比濁法をはじめとする免疫学的測定法により日常的検査項目として定量されており、微量アルブミン尿（30-300 mg/g クレアチニン）は糖尿病や各種腎疾患の早期発見・治療評価などの指標とされている。近年では心血管障害の予知因子としても認識されるようになり、さらに広く臨床診断補助に用いられるようになってきた。一方、抗体との反応性が低下した尿中アルブミンの存在が報告されるに及んで、尿中アルブミンの質的な変化が問題にされてきた。そこで、本稿では尿中アルブミン分子の多様な変化と、それにとまう定量法の見直し、さらに尿中アルブミン分子研究における新たな知見について概説する。

II. 抗体反応性の異なるアルブミンの出現

健常人の尿中に存在するアルブミンはモノマーである66 kDaのアルブミンはごくわずかで、尿細管で代謝を受けて、約10 kDa以下となったアルブミンペプチドが大半である。アルブミン排泄率（AER）が増加する糖尿病患者（図1、AER: 78.5-1457 μ g/min）においては腎機能低下に伴うアルブミンペプチド排泄量の減少と、モノマーアルブミン排泄の増加が認められる¹⁾。アルブミンペプチドは免疫学的測定法や尿試験紙で使用されるタンパク誤差法では検出されない。それだけではなく、モノマーのアルブミンでも免疫学的測定法で検出されないアルブミンが存在することを報告したのはComperらのグループである。Comperらはゲル濾過カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー法（HPLC）によ

り尿タンパク質を質量により分離して66 kDa分画の面積値からアルブミンを定量する方法と、従来のラジオイムノアッセイによる尿中アルブミン定量値を比較した。その結果、HPLC法によるアルブミン定量値が乖離したことから、66 kDa分画には免疫学的測定法では検出されない偽アルブミン ‘ghost albumin’ の存在を示唆したのである^{2,3)}。さらに、彼らは微量アルブミン尿を呈する糖尿病患者尿をHPLC法で分離し、66 kDa分画を抗ヒトアルブミン抗体のアフィニティーカラムに通したフロースルー中にアルブミン分子が存在する事を質量分析法により確認した⁴⁾。彼らは抗体との反応性が低下したアルブミンの存在をimmunochemically nonreactive albumin

(抗体非反応性アルブミン) と呼んだ²⁻⁴⁾。

これらの結果に基づき、2004年に米国AusAm社はゲル濾過HPLC法による尿中アルブミン定量キットAccumin™を発売した。図2にAccumin™法による糖尿病患者尿の測定プロファイルを示す。66 kDaのアルブミンモノマーを示すピークは溶出約5分のところに認められ、このピークは10-320 mg/Lのアルブミン標準液の面積値より定量される。

我々はComperらの報告を追試した。Accumin™を用いて糖尿病患者尿を分離し、得られた66 kDaのピークを分取した後、市販の抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降成分 (ppt) と抗体との未反応画分

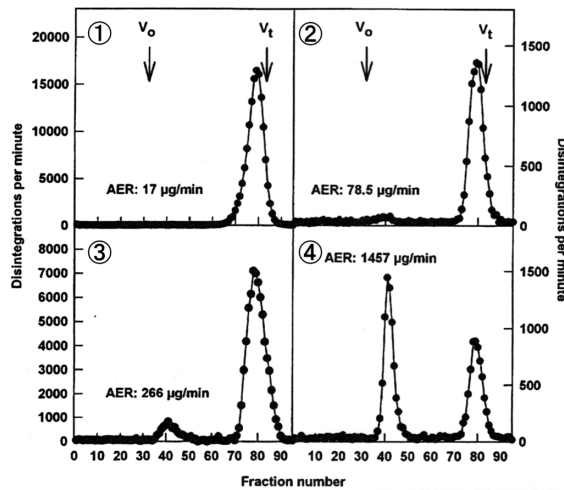


図1 トリチウム標識ヒト血清アルブミンを静注し、排泄された尿をゲル濾過HPLC法で分離してRI活性を測定した結果
 健常人では低質量のアルブミンペプチド (Vt) が主体であるが (①)、アルブミン排泄率 (AER) の悪化に応じてアルブミンモノマー排泄量 (Vo) が増加している (②、③、④) (文献1)より

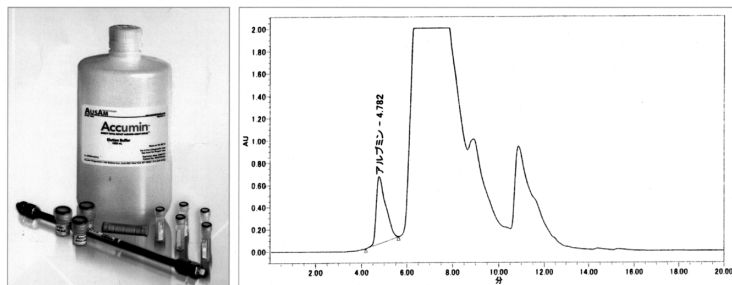


図2 米国AusAM社より発売されたAccumin™ (左) と実際のプロファイル (右)

(sup) を還元SDS PAGEで解析した後のタンパク銀染色と、免疫沈降に使用した抗体のウエスタンブロット像を図3に示した。沈降成分 (ppt) に認められる66 kDaタンパク質 (1レーン) は用いたアルブミン抗体とも反応した (3レーン) が、抗体との未反応画分 (2レーン) は銀染色されたが抗体では検出されなかった(4レーン)。質量分析法により未反応画分 (sup) の66 kDaにアルブミンが存在したことを確認したにもかかわらず、抗体と反応しなかったのは、未反応画分 (sup) に存在したアルブミンは抗原過剰で反応しなかったのではなく、用いた抗体との反応性が著しく低下していたことがわかった^{5,6)}。免疫沈降に使用した抗体のエピトープ解析を行った結果、認識部位がアルブミン124から298番目のアミノ酸の範囲 (20.2 kDa) であり、この部位が何らかの傷害を受けているために抗体反応性が低下しているためであった。

Ⅲ. 免疫学的測定法の代替法の確立と新たな問題点

66 kDaのアルブミンでも抗体反応性に相違があることがわかってきたが、66 kDa分画を尿中アルブミンとして定量するAccumin™法が、従来

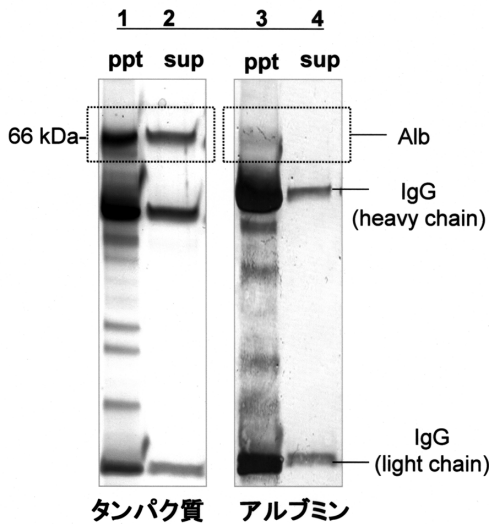


図3 Accumin™の66 kDa分画の免疫沈降成分 (ppt) 未反応画 (sup) の電気泳動結果。未反応画分には抗体反応性を示さない尿中アルブミンが存在していた。(文献6より)

の免疫学的測定法よりも微量アルブミン尿を早期に判断することができるとして臨床的有用性が明らかにされてきた⁷⁾。しかし、66 kDaのアルブミン分画にはアルブミンの他にタンパク質が混入しているという新たな問題が出てきた。腎障害の進行とともに血液からのタンパク質漏出量が増加するため、アルブミンの質量に比較的近いトランスフェリンなどが混入している場合がある⁸⁾。分子サイズによる分離法ではアルブミンのみを定量している確証が得られないので、分子サイズで分けるチップ電気泳動法も⁹⁾同様の問題により広く臨床応用はされていない。

さらに、高速液体クロマトグラフィー・質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた尿中アルブミン定量法も報告されている^{10,11)}。この分析法はアルブミン独自のペプチドを定量するため、他のタンパク質由来のペプチドと誤認される可能性は低く、感度・特異度ともに優れている。しかし、IV章で詳細を述べるが、尿中にはモノマーだけでなく重合体、フラグメントなど様々な修飾を受けた状態のアルブミンが排泄されているため、尿中アルブミンに起きている構造変化は考慮されないことが問題である。

この様に免疫学的測定法の代替法としての尿中アルブミン定量法の報告が複数あるにもかかわらず、決定的な方法が未だ確立されていない。尿中アルブミン分子における様々な修飾が次々に明らかにされてきたことが問題を複雑化しているのである。

Ⅳ. 尿中アルブミン分子多様性

我々は電気泳動法を用いて各種腎疾患患者尿を解析し、これまでに様々なアルブミン分子を見出してきた。例として非還元SDS-PAGE法と抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法の結果を図4に示した。健常人尿において、ウエスタンブロットで検出されたアルブミンは66 kDaのモノマーのみであったが、IgA腎症などの腎疾患患者尿においては約55-172 kDaの間に13本のアルブミンバンドが出現した。微量アルブミン (図4中の①) やマクロアルブミン尿 (図4中の②) を呈する循環器疾患患者尿において検出されたのはモノマーとダイマーのアルブミンだけであり、同程度

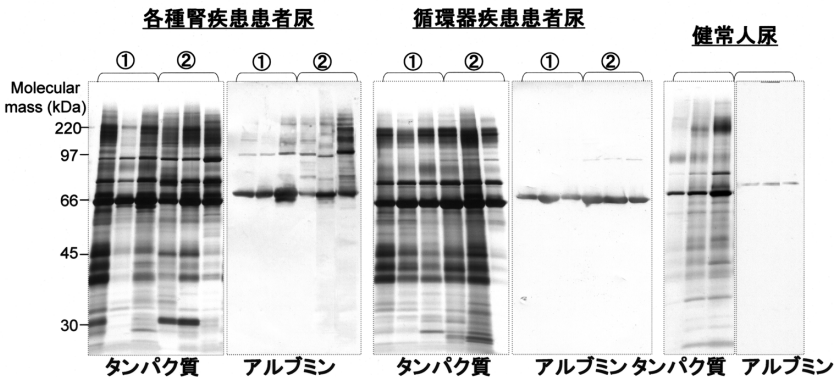


図4 各種腎疾患患者、循環器疾患患者、健常人の尿中タンパク質・アルブミン出現パターン
微量アルブミン尿 (①) とマクロアルブミン尿 (②) を呈する患者で比較したところ、循環器疾患患者よりも各種腎疾患患者尿の方で多様なアルブミンバンドが認められた。(文献12)より)

のアルブミン尿であれば腎疾患患者におけるアルブミン出現パターンの方が多様性を示した¹²⁾。また、大半の腎疾患患者の血中アルブミンはモノマーしか検出されないことから、尿中アルブミンに対する様々な修飾は腎臓における病態変化の結果を反映していると推測した。

各種腎疾患患者で検出された低質量側のアルブミンについて、疾患特異的なアルブミンフラグメントは存在しなかったが、65、63、59、55 kDaの4つのいずれかであったため、出現パターンに規則性があると考えられる。我々が構築した対角線二次元電気泳動法により分析した結果、モノマーよりも高質量側のアルブミンの大半がジスルフィド結合を介したアルブミン重合体、またはアルブミンと他のタンパク質の重合体であった。

各種腎疾患患者において認められる重合体やフラグメントなどの様々な尿中アルブミン分子が腎障害の病態変化を反映するとなれば、モノマーアルブミン分子とは別に定量化することでより詳細な診断補助情報を臨床に提供する事ができると考えている。アルブミン定量法としてモノマーのみを定量するのか、あるいは種々のアルブミンを含めて定量するのか、今後重要な問題となろう。

V. 尿中アルブミンの酸化状態

アルブミンはN末端から34番目に反応性に富

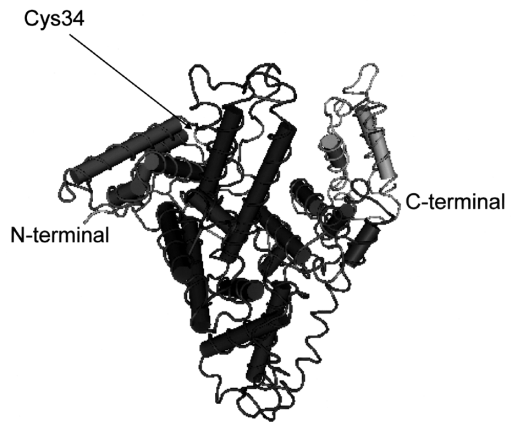


図5 ヒトアルブミンの立体構造

む遊離のSH基 (Cys34) を有し (図5)、健常人血清中では約70%のアルブミンがこのSH基が保持された還元型アルブミンの形をとっている。一方、この部位がシステインやグルタチオンなどの物質とジスルフィド結合を形成した状態を酸化型アルブミンと呼び、健常人血中アルブミンの約30%を占めている。酸化型アルブミンの中には還元反応で還元型アルブミンに戻らず不可逆的な酸化型アルブミンも存在する。これらの血中アルブミンはイオン交換カラムを用いたHPLC法により分離・定量することが可能であり、糖尿病や腎疾患、肝疾患などの患者血清中ではこの酸化型アルブミンの割合が増加するこ

とが報告されている¹³⁻¹⁶⁾。

我々は、これまで検討されていなかった尿中アルブミンの酸化状態を把握するため、遊離SH基検出試薬であるMalimide-PEG2-biotin (MPB)を用いた検出を試みた¹⁷⁾。この方法は、尿検体にMPB試薬を添加し、反応させた後にSDS PAGE法で分離後にウエスタンブロットで検出する方法である。健常人尿ではCys34の保持を示唆するアルブミンバンドが検出されたが、IgA腎症や膜性腎症の患者尿ではアルブミンのCys34の有意な低下が示唆された。さらに、同一患者の尿と血清のアルブミンと尿中アルブミンのCys34を比較した結果、尿検体の方が酸化傷害を強く受けていた。酸化傷害はアルブミン構造の多様化の原因とも成り得るため、相互の関連性について、さらに解析する必要がある。

VI. 尿中アルブミン排泄機序メカニズム

近年、尿細管上皮細胞におけるアルブミンの代謝様式から、腎臓におけるアルブミン排泄機序の新しい解釈がなされようとしている。Russoらはin-vivo imaging法を用い、麻酔下のラット腎を外科的に露出させ、two-photon microscopyを用いて静注した蛍光標識アルブミンの腎における代謝を観察した。その結果、健常ラットと糖尿病ラットにおいて腎糸球体を通過する標識ア

ルブミン強度に有意な差はなく、健常ラットでも一定以上のアルブミンが濾過されていた。有意差を認めたのは尿細管におけるアルブミンの再吸収量であり、糖尿病ラットでは健常ラットの45%しか再吸収されていなかった¹⁸⁾。

アルブミンの排泄機序は図6の上段に示すように、①健常人では糸球体を通過するアルブミン量はわずかで、ほとんどが尿細管で再吸収される、②腎機能低下に伴い糸球体におけるアルブミン濾過量が増加し、同時に尿細管機能も低下するために、再吸収されないアルブミンが尿中に排泄される、と説明されてきた。しかし、最近の研究結果から尿中アルブミン排泄メカニズムは図6下段のように考えられつつある¹⁹⁾。つまり、①健常人においてもアルブミン尿を呈する腎疾患患者であっても一定量のモノマーアルブミンが糸球体を通過している、②尿細管機能が正常である健常人ではそのほとんどが再吸収され、一部がペプチドとして分泌されている、③腎疾患患者においては尿細管機能も低下するためモノマーアルブミンの再吸収量が減り、さらに、アルブミン代謝能低下によりアルブミンペプチド分泌量が減少する。アルブミン尿と言えばこれまで糸球体障害と関連付けられてきたが、尿細管におけるアルブミン吸収・代謝について、今後さらに注目されるであろう。

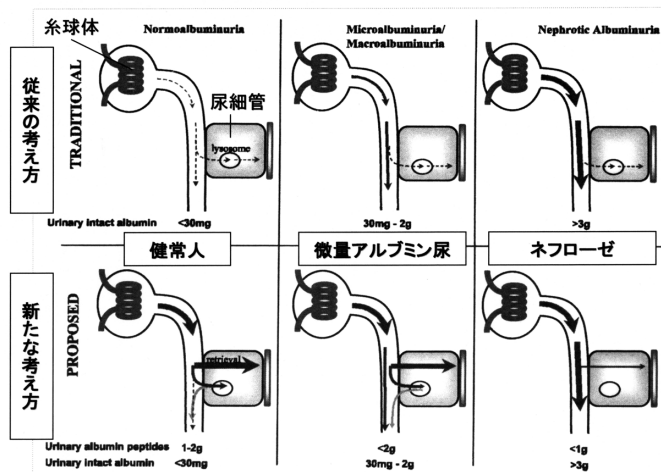


図6 尿中アルブミン排泄機序の変化
上段は従来の考え方、下段は新たな考え方を示す。(文献19)より)

Ⅶ. おわりに

尿中アルブミンは汎用性の高い臨床検査項目である。現在免疫学的測定法で測定されているが、抗体非反応性アルブミン・酸化型アルブミン・質量の異なるアルブミンの存在が明らかとなり、また、これらの存在が臨床的意義と強く結びつくことを考えれば、尿中アルブミンの定量基準をどうするのが大きな問題となろう。その対策のためにはアルブミンの質的な差異について注目しておきたい。

引用文献

- 1) Oscika TM, Houlihan CA, Chan JG, Jermus G, Comper WD: Albuminuria in patients with type 1 diabetes is directly linked to changes in the lysosome-mediated degradation of albumin during renal passage. *Diabetes*, 49: 1597-1584, 2000.
- 2) Comper WD, Osicka TM, Jerums G: High prevalence of immuno-unreactive intact albumin in urine of diabetic patients. *Am J Kidney Dis*, 41: 336-342, 2003.
- 3) Greive KA, Eppel GA, Reeve S, Smith AI, Jerums G, Comper WD: Immuno-unreactive albumin excretion increases in streptozotocin diabetic rats. *Am J Kidney Dis*, 38: 144-152, 2001.
- 4) Osicka TM, Comper WD: Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. *Clin Chem*, 50: 2286-2291, 2004.
- 5) Nakayama A, Ida T, Hatano Y, Oohara K, Yoshida H, Baba T, Sakamoto H, Shiba K: Presence of immunounreactive albumin in the urine of diabetic patients. *J Clin Lab Anal*, 20: 29-36, 2006.
- 6) Nakayama A, Nishimaki J, Kawara T, Kasama T, Baba T, Yoshida H, Isobe M, Shiba K, Sato K: Reduced immunoreactivity of urinary albumin in patients with cardiovascular diseases: Analysis of immunochemically nonreactive albumin. *J Electrophoresis*, 52: 57-63, 2008.
- 7) Comper WD, Osicka TM, Clark M, MacIsaac RJ, Jerums G: Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. *Kidney Int*, 65: 1850-1855, 2004.
- 8) Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin GL: Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. *Clin Chem*, 52: 389-397, 2006.
- 9) Chan OT, Herold DA: Chip electrophoresis as a method for quantifying total microalbuminuria. *Clin Chem*, 52: 2141-2146, 2006.
- 10) Shaikh A, Seegmiller JC, Borland TM, Burns BE, Ladwig PM, Singh RJ, Kumar R, Larson TS, Lieske JC: Comparison between immunoturbidimetry, size-exclusion chromatography, and LC-MS to quantify urinary albumin. *Clin Chem*, 54: 1504-1510, 2008.
- 11) Seegmiller JC, Sviridov D, Larson TS, Borland TM, Hortin GL, Lieske JC: Comparison of urinary albumin quantification by immunoturbidimetry, competitive immunoassay, and protein-cleavage liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 55: 1991-1914, 2008
- 12) Nakayama A, Sakatsume M, Kasama T, Kawara T, Gejyo F, Isobe M, Sato K, Shiba K: Molecular heterogeneity of urinary albumin in glomerulonephritis: comparison of cardiovascular disease with albuminuria. *Clin Chim Acta*, 402: 94-101, 2009.
- 13) Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M: The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun*, 334: 1322-1328, 2005.
- 14) Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S: Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int*, 66: 1988-1993, 2004.
- 15) Soejima A, Matsuzawa N, Hayashi T, Kimura R, Ootsuka T, Fukuoka K, Yamada A, Nagasawa T, Era S. Alteration of redox state of human serum albumin before and after hemodialysis. *Blood Purif*, 22: 525-529, 2004.
- 16) Oetl K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankuti C, Hallström S, Lackner C, Stauber RE: Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta*, 1782: 469-473, 2008.
- 17) Bruschi M, Musante L, Candiano G, Santucci L, Zennaro C, Carraro M, Del Boccio P, Gusmano R, Perfumo F, Urbani A, Ghiggeri GM: Transitions of serum albumin in patients with glomerulosclerosis 'in vivo' characterization by electrophoretic titration curves. *Electrophoresis*, 27: 2960-2969, 2006.
- 18) Russo LM, Sandoval RM, Campos SB, Molitoris BA, Comper WD, Brown D: Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 20: 489-494, 2009.
- 19) Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM: Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295: 1589-1600, 2008.