

〈原著〉

96穴プレートを用いた簡便な 尿中Tamm-Horsfall Protein (THP) の測定法の検討

外園 栄作¹⁾、保坂 洗喜¹⁾、秋本 卓²⁾、川満 紀子²⁾、酒本 美由紀²⁾、
堀田 多恵子²⁾、康 東天^{2),3)}、栢森 裕三¹⁾

A simple method to measure Tamm-Horsfall protein in the urine with 96 well micro-plate

Eisaku Hokazono¹⁾, Kouki Hosaka¹⁾, Masaru Akimoto²⁾, Noriko Kawamitsu²⁾,
Miyuki Sakemoto²⁾, Taeko Hotta²⁾, Dongchon Kang^{2),3)} and Yuzo Kayamori¹⁾

Summary Tamm-Horsfall protein (THP) is primarily synthesized in the thick ascending limb of the loop of Henle and is the most abundant protein in human urine. THP is excreted at an average rate of 50–100 mg/day. Deviations from this level of urinary excretion is an indicator of various clinical conditions and diseases. THP is generally measured by an ELISA-based method, which suffers from limitations including inaccuracy due to protein aggregation and high reagent costs. Herein, a simple method to measure THP using cost-effective reagents and a 96-well micro-plate was developed. The average within-run CVs were 4.5–9.6 % (n = 10). The correlation between the values obtained using the newly developed method (y) and conventional HPLC methods (x) was: $y = 1.057x - 5.702$ (r = 0.978, n = 35). Thus, this novel method will be useful for further studies to clarify the clinical significance of THP.

Key words: Tamm-Horsfall protein (THP), salting out method, 96-well micro-plate method

¹⁾九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野
〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1-1

²⁾九州大学病院検査部
〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1-1

³⁾九州大学大学院医学研究院臨床検査学分野
〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1-1

連絡先：外園栄作
九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野
Tel & Fax : +81-92-642-6737
E-mail : e_hoka@med.kyushu-u.ac.jp

¹⁾Department of Health Sciences, Faculty of Medical
Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582 Japan

²⁾Department of Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582 Japan

³⁾Department of Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine, Kyushu University Graduate School of
Medical Sciences, Fukuoka, Japan
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582 Japan

受付日：2019年8月2日
採択日：2019年9月6日

I. 緒言

日本における慢性腎臓病 (CKD) の患者数は、1,300万人にもものぼると推定¹⁾され、現在の患者数も微増傾向であると予想されている。CKDは早期発見により進行予防および治療が可能であり、そのためにも早期腎症発見のためのスクリーニング検査が非常に重要である。スクリーニング検査における尿蛋白検査は、主に尿中アルブミンを対象としており、尿細管障害由来の蛋白の検出は難しい。CKDの病態ステージの分類基準の1つに、糸球体濾過量 (GFR) が用いられている¹⁾。このGFRの測定にはイヌリンクリアランスを用いた方法が国際的な標準とされているが、実測そのものが高価・煩雑であるため住民検診レベルでは測定が困難である。そのため、我が国では年齢、性別および血中クレアチニン値から算出される推定糸球体濾過量 (eGFR) が主に用いられる。しかし、個々の体格差や筋肉量の影響を受けるため正確に算出することが困難な場合やクレアチニンの一部が尿細管から再吸収されることからGFRを過大評価しているとする報告²⁾もある。的確にCKDの病態を把握するためにも、年齢や個体差により影響を受けない新たな腎機能評価マーカーの検索が早期に求められている。

このような現状の中、eGFRが低下した患者において、数ヶ月以内に尿中に多数の異常円柱が出現するという報告³⁾がある。異常円柱の出現は、尿細管腔内において尿の長時間の停滞・再流を意味し、その種類および出現数を観察することで腎機能低下の程度を把握できる。よって出現する尿中円柱を観察することで早期に腎機能障害を見出す事が可能であるが、全ての尿検体を鏡検し観察することは現実的に困難である。しかしながら、尿円柱の出現を簡便かつ迅速にとらえる事が可能となれば、早期腎症が疑われる患者をより早い段階でスクリーニングし、さらなる検査・病態把握・治療へと導くことが可能ではないかと考えた。そこで我々は、円柱の主な基質成分であるTamm-Horsfall protein (THP) に注目した。

現在、尿中THPは、主にEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) などの免疫学的測定法で測定されているが、この方法は操作が

煩雑であり、測定に長時間を要する。加えて抗体などを用いるために測定試薬が非常に高価である等の問題を有している。さらに免疫学的測定法では、THPの重合・凝集の性質により抗原抗体反応が阻害され、THP濃度を正確に測定することは難しい。そこで当研究室の秋本は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた測定法を開発・報告⁴⁾した。この方法は、THP凝集の影響を受けにくく、安価な測定法であるが、前処理の操作に加え1検体あたりの測定時間が一時間弱かかることから多検体を短時間に処理することが難しい。そこで今回、安価な試薬である硫酸アンモニウム、塩化ナトリウムを用いて尿サンプルを前処理し、THPのみを分離後、96穴プレートを用いて定量するという安価で簡便なTHP測定法の確立を試みたので報告する。

II. 材料と方法

1. 試薬・材料

1) 塩析分離プレート測定法

硫酸アンモニウム、Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (EDTA・2Na)、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は富士フィルム和光純薬 (株) より、塩化ナトリウムはナカライテスク (株) より購入した。

2) HPLC法

アセトニトリル (>98%, 高速液体クロマトグラフィー用) は関東化学 (株) より、ギ酸 (99%, 高速液体クロマトグラフィー用) は富士フィルム和光純薬 (株) より購入した。

3) 標準物質

THP標準物質は健常人のプール尿からFrancaら⁵⁾による珪藻土を用いた精製法を改良し、あらかじめ蓄尿時に0.58 mol/Lの塩化ナトリウムを添加した方法により精製した。精製したTHP溶液は、精製水に対して1晩透析を行い、脱塩した後にエバポレーターにて乾燥を行い、-80℃で保存した。珪藻土はナカライテスク (株) より購入した。

精製したTHPの純度の確認のため電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel

Electrophoresis ; SDS-PAGE) を行った。泳動する検体とサンプルバッファー (0.125 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% グリセロール、0.01% プロモフェノールブルー、10% β -メルカプトエタノール) を等量混合し、100℃で5分間還元処理した後、還元処理された検体量に対して10% (v/v) となるように1 mol/Lのヨードアセトアミドを加えた。市販の12.5%ポリアクリルアミドゲル (アトー (株)) を用いて各レーンに検体を10 μ L、分子量マーカーを5 μ Lアプライし、Laemmli⁶⁾の方法に準じ、15 mAで30分、その後30 mAで90分間電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、銀染色キットIIワコー (富士フィルム和光純薬 (株)) を用いて添付文書に従い染色を行い、THPの単一バンドを確認した。

4) 各種蛋白の影響試験

THP以外の蛋白の影響を確認するために使用したアルブミンはAlbumin from human serum、 γ グロブリンは γ -Globulins from human blood、 α 、 β -グロブリンはGlobulins Cohn fraction IVであり、いずれもシグマアルドリッチより入手した。

5) 分析検体

関連試験に用いた尿検体は、九州大学病院検査部にて保管された外来・入院患者尿 (14検体) および健康者ボランティア尿 (21検体) を用いた。本研究は九州大学倫理審査委員会の承認を得て行った (許可番号: 28-479)。

2. 測定機器

1) 塩析分離-プレート測定法

EnSightマルチモードプレートリーダー (パーキンエルマー (株)) を用いた。96穴プレートは、蛍光測定用黒色プレートH (住友ベークライト (株)) を用いた。

2) HPLC法

日立高速液体クロマトグラムLachrom Elite (日立ハイテクノロジーズ (株)) システムのL-2130形ポンプ、L-2200形オートサンブラ、L-2300形カラムオープン、L-2480形蛍光検出器を用いた。分離カラムにはCOSMOSIL 5C18-MS-IIカラム (4.6 I.D. \times 250 mm、ナカライテスク (株)) を使用した。

3) 標準物質の精製

・THPの精製

高速遠心機は、高機能高速冷却遠心機Avanti HP-26 XP (BECKMAN COULTER (株)) を用いた。エバポレーターは、Centrifugal Evaporator CVE-2000型 (東京理化工業 (株)) を用いた。

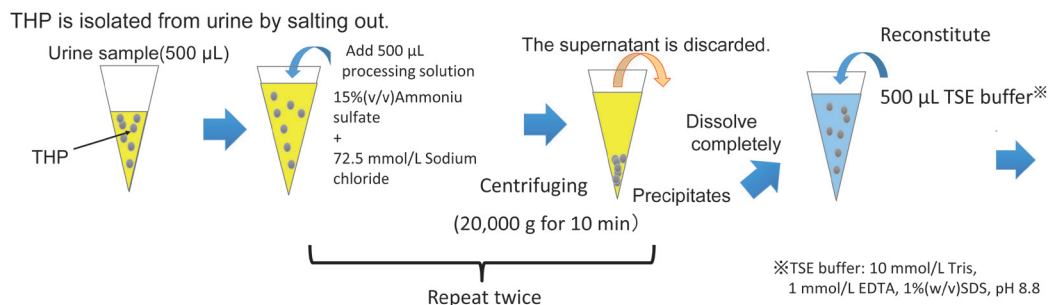
・電気泳動

泳動用ゲルは、e-PAGELミニゲルサイズ既製ゲル12.5% (アトー (株)) を用いた。

3. 分析条件

1) 塩析分離-プレート測定法

サンプルに対し、前処理試薬 (終濃度15% (v/v) 飽和硫酸アンモニウム、72.5 mmol/L塩化ナトリウム) をサンプルと等量加えた後、



➡ Measurement with a spectrofluorometer
at Ex/Em = 280/325 nm

Measuring equipment: EnSight multimode Plate Reader
(Perkin Elmer Co., Ltd.)

Fig. 1 Principles of the separation and the measurement method for THP

室温で10分間振盪した。20,000 gで10分遠心した。上清を捨て、沈殿物にサンプル量と等量の精製水を加えた。沈殿となったTHPを完全に溶解させた後、再び前処理試薬を加え、同様の操作を繰り返した。最後に沈殿となったTHPをTSE緩衝液(10 mmol/L Tris、1 mmol/L EDTA、1% (w/v) SDS、pH 8.8)にて溶解させ、96穴プレートを用いて、Ex/Em = 280/325 nmにて検出した (Fig. 1)。標準液には10、20、40 mg/L 精製THP溶液を用いた。これら3濃度のTHP溶液をサンプルと同様の前処理を行った後、蛍光強度を測定し、3点の回帰直線を求め、これを検量線とした。

2) HPLC法

サンプルの前処理および分析までの作業工程は秋本⁴⁾の方法に従った。手順を要約すると、サンプル800 μLに対し0.58 mol/L塩化ナトリウム溶液を200 μLを加え攪拌後20,000 gで10分間遠心した。上清950 μLを捨て、沈殿物に750 μLの精製水を加え完全に溶解させ測定試料とした。溶離液には、溶離液A：精製水 + 0.12% (v/v) ギ酸、溶離液B：アセトニトリル + 0.12% (v/v) ギ酸を用いた。溶離液のグラジエント条件はTable 1に示すとおりである。検出波長はEx/Em = 280/325 nm、流速は1.0 mL/min、カラム温度は25℃、サンプル注入量は10 μL、カラムはCOSMOSIL 5C18-MS-IIを用いた。標準液として90 mg/L 精製THP溶液を段階希釈し、サンプルと同様の前処理を行った後、各濃度における蛍光強度ピーク面積をもとに検量線を作成し、サンプルの濃度算出に用いた。

Table 1 Optimal stepwise HPLC elution protocol.

Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	65	35
6.5	65	35
7.2	30	70
20.0	30	70
20.1	65	35
30.0	65	35

Eluent A : purified water + 0.12% (v/v) formic acid
 Eluent B : acetonitrile + 0.12% (v/v) formic acid

4. 基本性能試験の検討方法

1) 同時再現性、日差再現性

同時再現性は、低濃度、中濃度である2種類の尿検体を10重測定し評価した。日差再現性は、低濃度、中濃度、高濃度の3種類の尿検体を3重測定し、これを5日間測定し評価した。

2) 直線性

200 mg/L THP溶液を10段階希釈し、それぞれ3重測定を行い評価した。

3) 添加回収試験

健常人プール尿9容に200、400 mg/L THP溶液および精製水1容を添加した。これら3種類の尿検体のTHP濃度を2重測定し、プール尿への添加量に対する回収率を評価した。

4) 検出限界

10 mg/L THP溶液を10段階希釈し、それぞれ5重測定を行った。検出限界は、± 2SD法により評価した。

5) THP以外の蛋白の影響

100 mg/L THP溶液と精製水、100 mg/L γ-グロブリン、100 mg/L α,β-グロブリン、100 mg/L アルブミン溶液をそれぞれ1:1で混合させ、50 mg/L THP + 精製水、50 mg/L THP + 50 mg/L γ-グロブリン溶液、50 mg/L THP + 50 mg/L α,β-グロブリン溶液、50 mg/L THP + 50 mg/L アルブミン溶液の4種類のタンパク混合溶液を作成した。これら4種類の蛋白混合溶液のTHP濃度を測定し、THP以外の蛋白の測定への影響を確認した。

6) HPLC法との相関試験

塩析分離-プレート測定法とHPLC法との相関を確認した。検体には健常人尿 (n = 21)、異常円柱を含む患者尿 (n = 14) を用い、両測定法のTHP濃度よりピアソンの相関係数を算出した。

Ⅲ. 結果

基礎的性能評価

1) 再現性

同時再現性と日差再現性の結果をTable 2に示した。同時再現性試験では低濃度域の尿検体において、変動係数が11.5%とばらつきが大きかったが、中濃度域では、良好な再現性を示した。

また、日差再現性は、低濃度域の尿検体では、変動係数が9.6%とばらつきが大きかったが、中濃度域、高濃度域では、良好な再現性を示した。

2) 直線性

Fig. 2に示したように0-200 mg/Lの良好な直線性が得られた。

3) 添加回収試験

添加回収試験の結果をTable 3に示した。回収率は、99.7-101.7%と良好な回収率を示した。

5) 検出限界

± 2SD法による検出限界は3 mg/Lであった。

6) THP以外の蛋白の影響

アルブミン、αβグロブリンの誤差率(影響率)は、それぞれ-1.5%、1.6%であったが、γグロブリンでは10.4%の正誤差を示した (Table 4)。

7) HPLC法との相関

塩析分離-プレート測定法とHPLC法による相関をFig. 3に示した。相関係数は0.978と非常に強い正の相関が確認された。

Table 2 Within- and between-run reproducibility of present method.

THP water solution levels	Within-run (n = 10)		Between-run (n = 5)		
	Low level	Middle level	Low level	Middle level	High level
Mean (mg/L)	4.1	40.4	10.2	47.6	114.5
SD (mg/L)	0.5	0.1	1.0	2.2	6.1
CV (%)	11.5	2.3	9.6	4.6	5.4

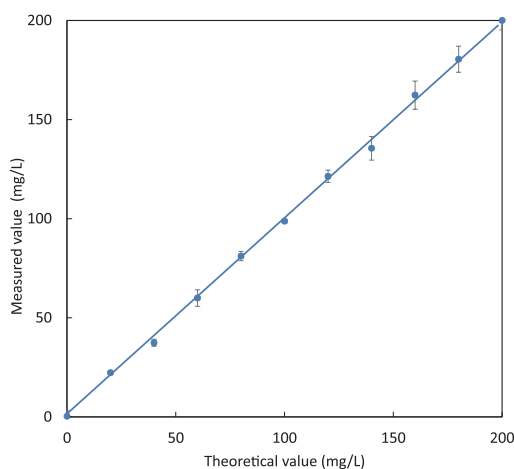


Fig. 2 Linearity of the detection for THP

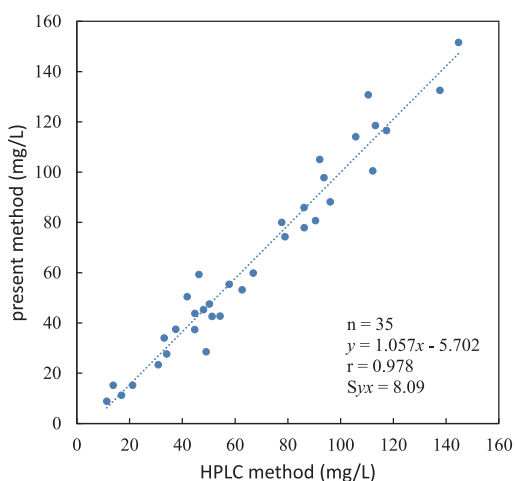


Fig. 3 Correlation between the present method (y) and HPLC method (x) in urine samples.

Table 3 Recovery test

Added THP value (mg)	0	20	40
Measurement value (mg/L)※	11.6	32.0	51.5
Recovery rate (%)※	—	101.7	99.7

※Mean of duplicate measurements

Table 4 Interference of Albumin, α, β-Globulin and γ-Globulin

Added each protein	THP			
	+ purified water	+ Albumin	+ α,β-Globulin	+ γ-Globulin
Measured value(mg/L)※	49.4	48.6	50.2	54.5
Relative error (%)※	—	-1.5	1.6	10.4

※Mean of duplicate measurements

Ⅳ. 考察

現在、スクリーニング検査として用いられる尿定性試験紙法における蛋白検査では、主に尿中のアルブミンを検出する目的で使用されており、THPをはじめとする様々な疾患により出現するその他の蛋白（リゾチーム、 β_2 ミクログロブリン（ β_2 -MG）、 α_1 ミクログロブリン（ α_1 -MG）など）をとらえることは難しい。つまり、尿定性試験紙で行うスクリーニング検査は、尿中への過剰なアルブミン排泄を伴う病態、すなわち糸球体性腎症をターゲットとしており、尿細管障害由来の疾患は検査から漏れ、見逃される可能性があるともいえる。また腎・尿細管の病態および障害の程度によって尿中に異常円柱が出現することが知られている⁷⁾。しかし、これら円柱出現の有無やその他尿細胞成分の精査をおこなう尿沈渣の鏡検は、尿定性試験紙法で陰性である検体に対しては、一般的に実施されないことが多い。アルブミン以外の蛋白の排泄は、尿蛋白試験紙法では検出されないため、仮に尿中に異常円柱が出現していても鏡検されずに見逃されている検体が存在する可能性も考えられる。そこで我々は円柱の出現を推測するマーカーとして、円柱の基質成分であるTHPに着目した。

THPとは1950年にウイルスの血球凝集反応を抑制する尿中蛋白として初めて報告⁸⁾された尿中成分であり、遠位尿管のヘンレループ上行脚の上皮細胞で産生される⁹⁾。尿中蛋白成分の約50%を占めており、性状に関しては、単分子量が85~100 kDaであり、そのうち約30%が糖質で構成される糖蛋白である¹⁰⁾。また尿中のTHP濃度の上昇、塩濃度の上昇、尿の酸性化などの因子により容易に重合・凝集する性質があり、尿中で巨大分子を形成する場合もあるとされている。免疫学的測定法（EIA）を用いたTHP一日排泄量としての報告は、Reinhartら¹¹⁾は16.6-98.5 mg、Bachmanら¹²⁾は30-60 mg、西牧ら¹³⁾は12-36 mgと報告者により違いが見られる。先に述べたTHPの性質が、このような報告の差異を生じているとも考えられる。

今回我々は、塩析の原理を利用し、尿サンプルからTHPを抽出分離後、96穴プレートを用いて定量するという安価で簡便な新たなTHP測定

法の確立を目指し検討をした。

今回の前処理に用いた塩析とは、蛋白溶液に高濃度の塩を加えると、蛋白の溶解度が低下し、析出する現象である。THPは非常に疎水性の強い蛋白であり、塩濃度の増加により凝集し、沈殿する¹⁴⁾。秋本ら⁴⁾のHPLC法における前処理条件では、0.58 mol/Lの塩化ナトリウムのみを用いて、THPの塩析を行っていた。しかし、この方法では、低濃度のTHPを十分に回収できないという問題があった。塩析の強さは塩の種類により変化することから、低濃度のTHPを十分に回収するために、用いる塩の種類を従来の塩化ナトリウムに加えて硫酸アンモニウム（硫安）を用いて前処理を行った。硫安は、蛋白が変性しにくい、また試薬が安価であるなどの理由から塩析の際に用いられる一般的な塩の一つである。塩析の強さを示すホフマイスター系列¹⁵⁾に示されるように硫安は、従来法の塩化ナトリウムよりも塩析効果の高い塩である。塩析の効果を高めるためには、塩濃度を増加させる必要があるが、硫安により蛋白を分画する際には、適切な硫安濃度の選択が重要である。THPは、その疎水性の強さから高塩濃度により、容易に凝集・重合する性質を持つ。今回の前処理では、15%飽和硫安を加えた前処理液にて洗浄操作を2回繰り返すことによりTHPを他の尿蛋白より分離している。今回の前処理液においては、グロブリンやアルブミンが沈殿してこない硫安濃度でもTHPは容易に沈殿し分離されたと考えられる。高濃度の塩により蛋白の溶解度が低下する一方、一定濃度の塩が存在すると蛋白の溶解度が増加する。この現象は塩溶として知られている。この塩溶には、生理的イオン強度である0.1-0.2 mol/Lのナトリウム塩もしくはカリウム塩溶液が用いられる事が多い¹⁶⁾。よって従来用いていた塩化ナトリウムの濃度を変更し、塩溶のために72.5 mmol/Lの塩化ナトリウムを加えることとした。ホフマイスター系列¹⁵⁾に示すように塩化ナトリウムは硫安に比べ、塩溶効果が期待できる塩である。このようなことから低濃度の塩化ナトリウムを添加することは、THP以外の蛋白成分の凝集を防ぎ、その他蛋白の溶解度を上げるために重要であったと考えられる。

今回の前処理法では、硫安に加えて72.5

mmol/Lの塩化ナトリウムを添加することにより、THP以外の蛋白の沈殿率を減少させることができた（データは示していない）。しかし、THP以外の尿中蛋白の影響試験において、アルブミンおよび α 、 β -グロブリンの本法への影響はほぼ見られなかったが、 γ -グロブリンで10%程度の正誤差となった。本法において、抽出操作は2回の洗浄操作を繰り返すが、1回目の洗浄後の抽出液をもちいて電気泳動にてTHPの単離状況を確認した際には、THPよりも高分子側にバンドを検出していた。そのため本法では2回の洗浄操作を行うことでTHPを単離させている。単離後の抽出液における泳動では先の高分子のバンドは消失し、100 kDa近傍でブロード状のTHPのバンドを確認している（データは示していない）。町井ら¹⁷⁾は、銀染色を用いたセルロースアセテート膜による健常者尿中蛋白分画解析において、THPが、塩の存在する条件下で γ -グロブリン（特にIgG L鎖：分子量25 kDa）と結合しやすく、また脱塩処理によりその結合が解けやすくなる性質について言及している。本法の前処理液には高濃度の塩が含まれていることから、町井らの報告と今回の結果を踏まえると、抽出の際にTHPと共に γ -グロブリンの一部が巻き込まれて沈殿していた可能性が考えられた。そのため、糸球体基底膜のサイズバリアが傷害され高分子蛋白（IgGなどの γ -グロブリン）が尿中に排泄されるような病態においては正誤差となる可能性がある。

一方、HPLC法との相関試験では相関係数 $r = 0.978$ と強い相関を示したが、THPの抽出操作時に、抽出液中に γ -グロブリンが混入したと仮定した場合、HPLC法との相関試験において、正誤差として観察されるはずである。今回の結果では、線形関係式の上側のみならず下側へも外れる検体が散見されたことから、共沈した γ -グロブリンだけの問題ではなく、他の要因も含まれていると考えられた。今回、相関試験に用いた尿検体は、性別、年齢、定性試験の結果やTHP以外の各種蛋白含有状況などの情報がなく、限られた検体であったため、今回の測定値の違いが個々の検体性状に由来するのか、前処理法を含めた分析法の違いによるものか、現時点では原因の特定には至らなかった。尿中に出現する蛋白は、病態のみならず個々人の生

理的条件においても多彩な様相を呈する¹⁸⁾。今後このことを踏まえながら、抽出条件のさらなる改良と、様々な臨床検体を用いた詳細な検証が必要であると考えられる。

THPの分離条件を決定した後に、本法の尿中THP測定における基礎的性能評価を行った。同時再現性、日差再現性については低濃度域において、変動係数が10%以上とばらつきが大きい結果であった。また、本法の直線性は0-200 mg/Lであった。報告者により健常者基準範囲が様々であるが、これらの報告を総合的に考慮しても本法の定量直線性は、十分であると考えられる。また、検出限界はELISAなどの免疫学的測定法では、約1 μ g/L程度、秋本らが開発したHPLC法⁴⁾では、0.35 mg/Lである。免疫学的測定法では、通常1000倍程度の尿の希釈が必要であるため尿検体測定における検出限界は1 mg/L程度であると推測される。本法の検出限界値3 mg/Lは、他法と比較すると多少劣るが、最終溶解液の量の調節により、濃縮することが可能であるため他法と大きな差はないと考えられる。

V . 結 語

CKDの早期発見や種々の腎障害の状態を反映する尿中円柱の出現を見逃さないためにTHPを測定することは重要であると考えられる。本研究では、スクリーニング検査に適する安価で簡便なTHP測定法について検討をした。塩析分離-96穴プレート測定法は、①HPLC法と強い正の相関を示していること、②再現性、直線性など基礎的な定量特性を有していること、③従来の方法と比べ、尿中THPを簡便に測定が可能であることから、早期腎症が疑われる患者をより早い段階で簡便にスクリーニングする方法として有用であると言える。今後は、 γ -グロブリンなど多彩な蛋白を含有する尿検体を用いて、本法の正確性についての検証を引き続き行うと共に、尿細管障害の指標となるN-acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG)、 β_2 -MG、 α_1 -MGや早期腎障害マーカーであるシスタチンC、および近年その臨床的有用性が報告されているLiver type fatty acid binding protein (L-FABP)などとの関連性を検討し、各種腎障害における

THPの臨床的意義についても検討を行いたい。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反：なし

文献

- 1) 日本腎臓学会編：CKD診療ガイドライン2012, 1. CKDの定義 診断 重症度分類, 1-9, 東京医学社, 東京, 2012.
- 2) Levey AS : Measurement of renal function in chronic renal disease. *Kidney Int*, 38: 167-184, 1990.
- 3) 溝口義浩, 津波勇二, 藤永雄介, 外園栄作 : 蛋白陰性尿中における硝子円柱出現様式と尿中Tamm-Horsfall ムコ蛋白 (THP) 量の関連性および慢性腎臓病 (CKD) 心血管疾患 (CVD) における早期マーカーとしての尿中THP測定法の有用性の検討～第1報～, 福岡県医学検査学会 抄録, 2013.
- 4) Akimoto M, Hokazono E, Ota E, Tateishi T, Kayamori Y : Highly sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatography assay for the detection of Tamm-Horsfall protein in human urine. *Ann Clin Biochem*, 53: 75-84, 2016.
- 5) Serafini-Cessi F, Bellabarba G, Malagolini N, Dall'Olio F : Rapid isolation of Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) from human urine. *J Immunol Methods*, 129: 185-189, 1989.
- 6) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- 7) 日本臨床検査技師会 尿沈渣特集号編集委員会編 : 尿沈渣検査法指針提案の目指すもの, 医学検査, 66: 1-8, 2017.
- 8) Tamm I, Horsfall FL : Characterisation and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Soc Exp Biol Med*, 74: 108-114, 1950.
- 9) Bachmann S, Metzger R, Bunnemann B : Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle' s loop in rat kidney. *Histochemistry*, 94: 517-523, 1990.
- 10) Williams J, Marshall RD, Van Halbeek H, Vliegenterhart JFG : Structural analysis of the carbohydrate moieties of human Tamm-Horsfall glycoprotein. *Carbohydr Res*, 134: 141, 1984.
- 11) Reinhart HH, Obedeau N, Walz D, Sobel JD : A new ELISA method for the rapid quantification of Tamm-Horsfall protein in urine. *Am J Clin Pathol*, 92(2): 199-205, 1989.
- 12) Bachmann S, Mutig K, Bates J et al. : Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288: 559-567, 2005.
- 13) 西牧淳一, 増田 勝, 加藤伸一他 : Enzyme-linked immunosorbent assayによる尿中Tamm-Horsfall Protein測定法の構築と健常人の基準範囲の設定. *臨床病理*, 56(10): 862-867, 2008.
- 14) Stevenson FK, Cleave AJ, Kent PW : The effect of ions on the viscometric and ultracentrifugal behavior of Tamm-Horsfall glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 236: 59-66, 1971.
- 15) W.Kunz, J.Henle, B.W.Ninham : Zur Lehre von der Wirkung der Salze (about the science of the effect of salts) Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9: 19-37, 2004.
- 16) 永田恭介 : 目的別で選べるタンパク質発現プロトコール. 16-25, 羊土社, 東京, 2010.
- 17) Machii R, Kubota R, Hiratsuka N, Sugimoto K, Masudo R, Kurihara Y, Kobayashi S and 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.
- 18) 芝 紀代子 : 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. *生物試料分析*, 34(2): 111-119, 2011.