

Highly sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatography assay for the detection of Tamm-Horsfall protein in human urine

秋本, 卓

<https://hdl.handle.net/2324/1654744>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（保健学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）



氏名：秋本 卓

論文名: Highly sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatography assay for the detection of Tamm-Horsfall protein in human urine

(逆相クロマトグラフィーによるヒト尿中 Tamm-Horsfall 蛋白の高感度測定法開発)

区分：甲

論文内容の要旨

ウロモジュリンとしても知られている Tamm-Horsfall Protein (THP) は、1895 年に初めてムコプロテインとして Morner により報告され、1950 年に Tamm と Horsfall によって特徴付けられた。このグリコプロテインはヘンレ係蹄上行脚の上皮細胞で限局的に生合成され、健常人の尿中に最も多く含まれるタンパク質である。尿中への排泄量は塩分摂取量や尿量にもよるが、一日平均およそ 50-100 mg ほど排泄されるといわれている。腎臓での THP の役割としては、腎結石や尿円柱形成、尿の濃度決定への関与、尿路感染症からの保護などが知られている。最近の研究では、UMOD 遺伝子の変異により髓質性囊胞腎や家族性高尿酸血症をきたすことが報告された。しかし、THP の生体中での機能・役割についてはまだ完全に解明されておらず、THP の糖鎖がその機能の大部分を担っていると推測されている。

THP は腎のネフロンの一部で限局的に産生されることから、その尿中への排泄量は腎の、特に尿細管の機能を反映していると考えられる。現在 THP は主に ELISA 法で測定されているが、ELISA 法での測定値が低値になることが過去に報告された。THP はナトリウムイオンやカルシウムイオン、アルブミンなどの存在下で容易に凝集するため、尿中では凝集して存在している。この凝集した THP が ELISA での抗原抗体反応において立体障害を起こしている可能性がある。また、UMOD 遺伝子の変異により THP の三次元構造が変化することも知られており、この場合には ELISA 法で測定できるのか疑問である。

本研究では、逆相クロマトグラフィーを用いて尿中の THP の分析法を開発した。本法では測定原理上、直接尿サンプルを HPLC カラムに注入することができない。また、個々の尿に含まれる塩類やタンパク質などの構成成分の種類や濃度は一様ではなく、その影響も様々である。そのため、尿中の THP を単離する前処理を施した。この前処理は塩析に基づいており、塩化ナトリウムの存在下で THP が凝集する性質を利用した。前処理操作によって約 9% の THP は未回収であり、添加した高濃度の塩化ナトリウムが HPLC 測定系へ与える影響を補正する必要があった。一方で、尿中の塩類が測定系へ与える影響を回避することができた。また SDS-PAGE により、アルブミンや γ -グロブリン、トランスフェリンなどの尿中タンパクも塩析により THP と共に沈殿することがわかった。THP はこれらの尿中タンパクよりも等電点が酸性側に存在する。そのため、移動相にギ酸を加えて酸性に保つことで THP の固定相への分配を強くさせた。THP の極性に基づいた HPLC 分離条件の最適化は、THP とその他の尿中

タンパクとの良好な分離を可能にした。しかし、より正確に尿中 THP 濃度を測定するには、前処理の改良、あるいは前処理を必要としない測定手法を考える必要がある。

最適化した HPLC 分析条件のもとでバリデーションを行ったところ、検出限界 ($S/N = 3$) は $0.35 \mu\text{g/mL}$ 、定量限界 ($S/N = 10$) は $1.2 \mu\text{g/mL}$ であった。また、 $90 \mu\text{g/mL}$ までの直線性を有し、高い再現性を備えていた(日内再現性 ($n = 10$) <2.77%、日差再現性 ($n = 6$) <5.35%)。THP の回収率は 100.0-104.2% であり、尿マトリックスの影響を十分に回避できていると考えられた。

尿中の THP やその他の尿タンパクの濃度は、24 時間尿量や水分摂取量、脱水状態によって影響を受ける。したがって、これらの影響を排除するため尿中のクレアチニン濃度を補正係数として、THP 濃度と比較させて表現した。その結果、腎疾患の既往歴がない健常人尿中の THP 濃度は、 $31.6 \pm 18.8 \text{ mg/g}$ クレアチニン ($n = 25$) であった。また、市販の ELISA 測定 kit を用いて本法との相関関係を調べたところ、本法と ELISA 法との間には強い相関関係が認められた ($r = 0.906$)。しかし、他の論文でも指摘されているように、我々の検討でも ELISA 法での測定値は本法よりも低値になる傾向がみられた。

尿中の塩類や酸性尿による THP の凝集や尿マトリックスは、ELISA 法の抗原認識を阻害・干渉する可能性がある。そのため、ELISA 法ではこの影響を回避するためにサンプルを数百倍から数千倍に希釈する必要があるが、この極端に高い希釈倍数が ELISA 法での偽低値の測定結果につながっているのかもしれない。一方、HPLC 法ではサンプルを希釈する必要がないため、ELISA 法では見落としてしまう可能性のある低濃度域の THP も検出することが可能である。HPLC による分析の利点は、一度に多成分の分析が可能であり、また、質的にも量的にも分析が可能であるという点にある。さらに、ELISA で要求される抗血清のような特別な試薬の必要もなく、費用効果的である。我々が得た健常人の尿中 THP 濃度は、すでに報告のあるゲル濾過を原理とする HPLC での報告値 ($31 \text{ mg/g} \cdot \text{クレアチニン}$ 、 $n = 42$) と非常に近いものとなった。すなわち、本法は尿中 THP 測定において信頼できるものであり、また現存する HPLC 分析法よりも、より高感度かつ高精度な THP 分析を可能にする。THP の生体内での役割についてはまだ解明されていないことも多く、正確に THP の排泄量を知る手段としてその解明の一助となることに期待する。