

小児糸球体疾患の尿蛋白分析

—SDS-PAGE を用いて—

奈良県立医科大学小児科学教室

松永健司, 平康二, 坂本伸也
河原信吾, 上辻秀和

URINARY PROTEIN ANALYSIS IN VARIOUS GLOMERULAR DISEASES IN CHILDHOOD — USING SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS —

TAKESHI MATSUNAGA, KOUJI TAIRA, SHINYA SAKAMOTO,
SHINGO KAWAHARA and HIDEKAZU KAMITSUJI

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received January 30, 1989

Summary: In 59 children with various glomerular diseases, analysis of urinary protein was performed using 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Most of the children with steroid responsive nephrotic syndrome showed urinary protein of less than 130×10^3 dalton; on the other hand, high molecular weight protein was observed in children with focal sclerosing glomerulo-nephritis. In IgA nephropathy or Henoch-Schönlein purpura nephritis, urinary excretion of high molecular weight protein was detected in children with severe proliferative lesions, such as crescents and/or sclerosis. These findings suggest that urinary protein analysis with SDS-PAGE is a reliable and rapid method for routine use in the clinical investigation of proteinuria.

Index Terms

urinary protein analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

緒 言 対 象

蛋白尿は最も重要な腎症候の一つでありその推移は腎病変の病勢を知る上で有力な指標となりうるもさらに近年、量的検討のみならず尿蛋白組成の検討が電気泳動法、高速液体クロマトグラフィーなどによりなされ病態との関連性が報告されてきた^{1)~5)}。今回我々は小児各種糸球体疾患の尿蛋白分析を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用い、腎組織像やネフローゼ症候群 (ネ症) のステロイド反応性と対比検討したので報告する。

対象は奈良医大小児科ならびにその関連病院にて診断された微小変化ネフローゼ症候群15例、巣状糸球体硬化症4例、急性糸球体腎炎2例、急速進行性糸球体腎炎1例、IgA 腎症14例、紫斑病性腎炎10例、膜性増殖性腎炎3例、膜性腎症4例、ループス腎症4例、溶血性尿毒症症候群2例、の計59例 (男児38例、女児21例) である。

方 法

1) 腎組織像の観察

経皮的腎生検により得られた腎組織片は三分しそれぞれ

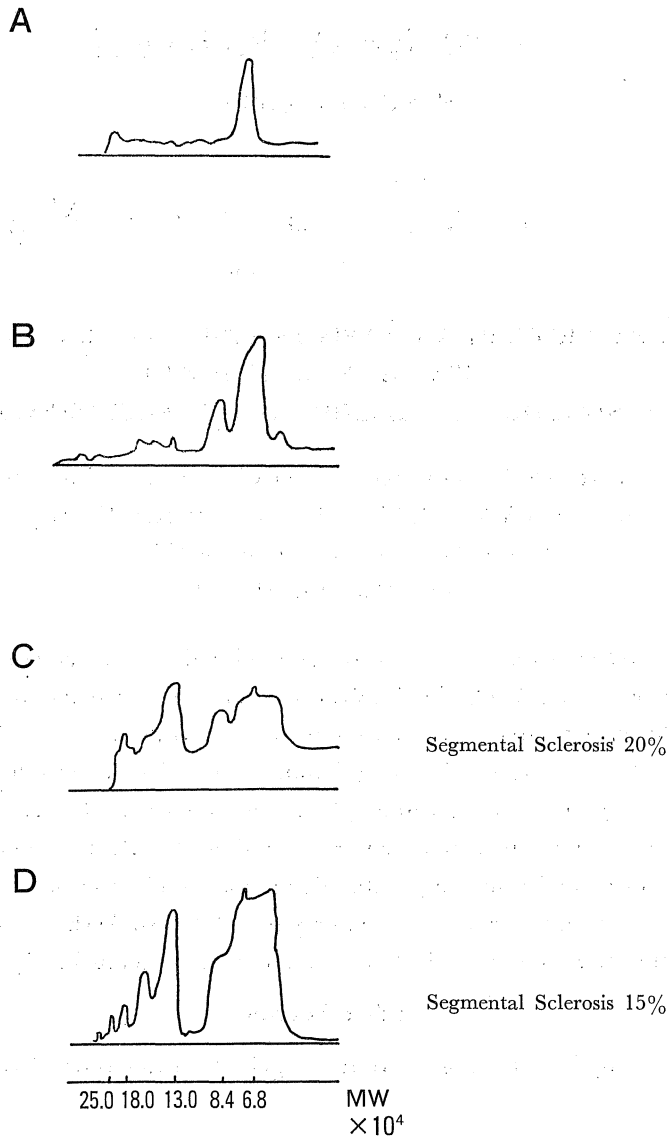


Fig. 1. Densitometric patterns of SDS-PAGE of urinary proteins.

- (A) Minimal change nephrotic syndrome (Case 1)
- (B) Minimal change nephrotic syndrome (Case 2)
- (C) Focal sclerosing glomerulo-nephritis (Case 3)
- (D) Focal sclerosing glomerulo-nephritis (Case 4)

れ光学顕微鏡，蛍光顕微鏡，電子顕微鏡学的検索に供した。光顕像は Haematoxylin eosin (H-E), Periodic acid Schiff (PAS), Silver methenamine and Masson trichrome (SM-MT) 染色にて観察した。蛍光抗体法による IgG, IgA, IgM, C3 及び Fibrinogen related antigen の沈着は FITC 標識抗ヒト IgG, IgA, IgM, C3, Fg 家兎血清を用いた直接法により観察した。

2) 尿の採取

腎生検前日の24時間尿より 30 cc 採取し検索まで -70°C に保存した。

3) 尿蛋白定量及び尿の前処理

Biuret 法により測定し泳動前に尿蛋白量が 150 mg/dl となるように濃縮または希釈した。濃縮にはポリエチレングリコール20000を用いた。

4) 7.5% SDS-PAGE による尿蛋白分析

前述のごとく前処理した尿 50 μ l と sample buffer 50 μ l を等量混合し 90 $^{\circ}$ C 5分間 incubation を行い7.5%ゲルに添加し一管当り 8mA で SDS-PAGE を行いクマシーブリリアントブルー G250 にて染色後、脱色しデンスシトメトリーを行い、ブロムフェノール青 (BPB) に対する相対移動度より尿蛋白分子量を求めた。尚、分子量マーカーとして SDS-PAGE Molecular weight standards (Bio rad) を用いた。

結 果

1) 特発性ネフローゼ症候群 (ネ症)

ネ症のうちステロイド剤 (ス剤) に反応性の微小変化群 2例 (Case 1, 2) にはアルブミン峰に一致する分子量 68000 にピークを認めるものとアルブミンとトランスフェリンに一致する分子量68000, 84000にピークを認めるものがあつた。一方ス剤に抵抗性のネ症で腎組織所見から巣状糸球体硬化症と診断した2例 (Case 3, 4) では分子量14万-30万程度の高分子蛋白の出現を認めた (Fig. 1)。

2) 急性糸球体腎炎

アルブミン峰に一致する分子量 68000 に最も大きなピークと分子量14万以上の高分子領域にも二つの band を認めた (Fig. 2)。

3) IgA 腎症, 紫斑病性腎炎

IgA 腎症14例の中で光顕像が軽度メサンギウム増殖で細胞性半月体 5%のみを有した Case 6 では尿蛋白像はアルブミンとトランスフェリンに一致したピークを認めた。一方臨床的に血尿と高度の蛋白尿を伴いメサンギウム増殖に20%の線維性半月体を有した症例 (Case 7) の尿蛋白像はアルブミンに一致する分子量のピークの他に高分子蛋白の出現を複数認めた。紫斑病性腎炎10例でも IgA 腎症と類似した所見を呈していた。光顕像が12%の半月体を有する ISKDC IIIa の Case 8 では尿蛋白像はアルブミンに一致する分子量のピークが主体であり、半月体が50%の ISKDC IVa の Case 9 では尿蛋白像で分子量14万-30万の高分子蛋白のピークを複数認めた (Fig. 3)。

4) 膜性腎症

膜性腎症で電顕所見が Stage I, II. の症例の尿蛋白像はアルブミンに一致する分子量のピークの他に分子量14万以上の高分子蛋白の出現を認めた (Fig. 2)。

5) 膜性増殖性腎炎

Type I の Case 11 ではアルブミンに一致する分子量のピークが最も大きいが高分子領域に複数の band を

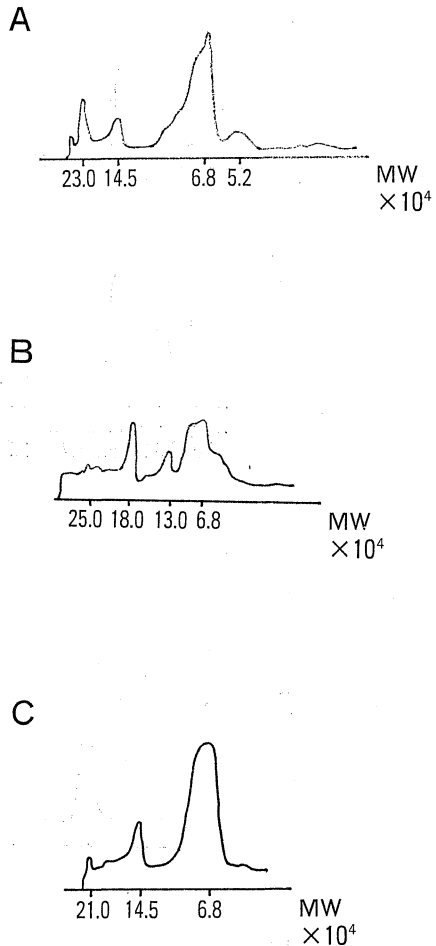


Fig. 2. Densitometric patterns of SDS-PAGE of urinary proteins.

- (A) Acute glomerulo-nephritis (Case 5)
- (B) Membranous nephropathy (Case 10)
- (C) Membranoproliferative glomerulo-nephritis (Case 11)

認めた。Type II の一例も高分子尿蛋白が出現していた (Fig. 2)。

6) その他の腎疾患

腎組織 WHO 分類の Class IV と Class V のループス腎炎ではともに分子量14万-30万の間に複数の高分子蛋白のピークを認めた。HUS の急性期の Case 14 では分子量14万-30万の高分子蛋白のピークを複数認めた。

光顕像で90%の糸球体に線維性半月体と尿細管萎縮を認めた急速進行性糸球体腎炎 Case 15 の尿蛋白像ではアルブミンに一致する分子量のピークに次いで分子量約20万の高分子蛋白のピークと他に分子量 23000-47000 の

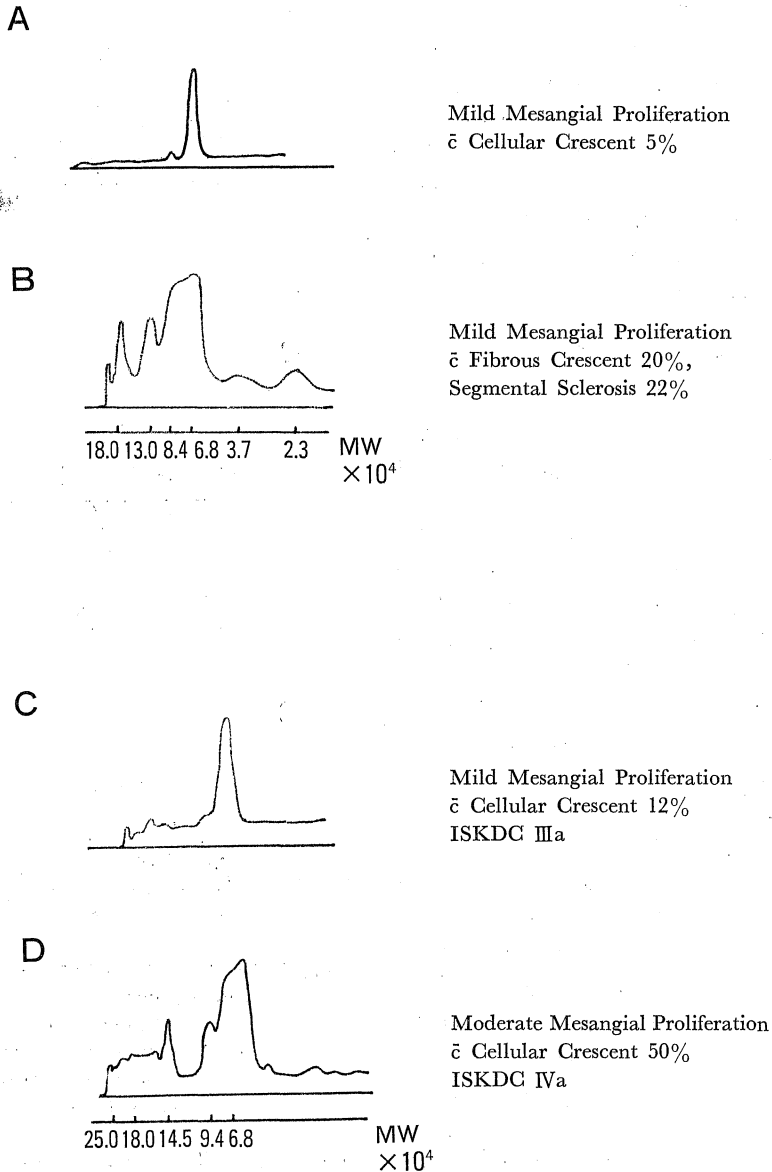


Fig. 3. Densitometric patterns of SDS-PAGE of urinary proteins.

- (A) IgA nephritis (Case 6)
- (B) IgA nephritis (Case 7)
- (C) Henoch-Schönlein nephritis (Case 8)
- (D) Henoch-Schönlein nephritis (Case 9)

低分子量蛋白の band を三本認めた (Fig. 4).

考 案

小児腎疾患の尿蛋白の分析を SDS-PAGE により検討した結果、ネ症では硬化性病変の有無により尿蛋白パターンが明らかに異なり薬剤反応性の微小変化群では分

子量 60000-130000 の蛋白が Highly selective に排泄されるが、巣状糸球体硬化症では高分子蛋白の出現を複数認めた。他方、腎炎群では増殖性病変、半月体の頻度、硬化性病変の進行に伴い高分子蛋白の出現が見られる傾向を示していた。1966年 Cameron ら⁶⁾ により IgG とトランスフェリンのクリアランス比より求めた Selec-

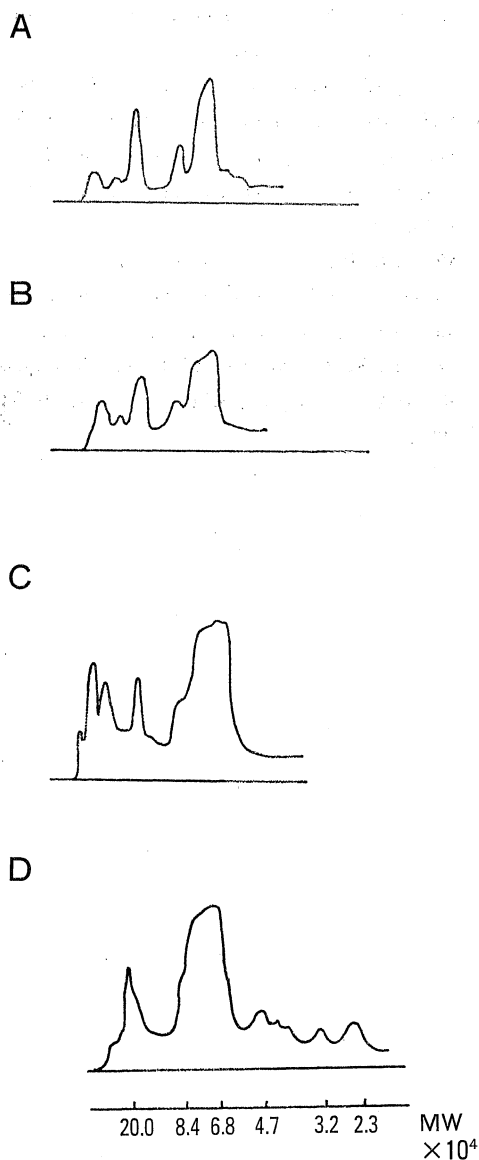


Fig. 4. Densitometric patterns of SDS-PAGE of urinary proteins.

- (A) Lupus nephritis WHO class V (Case 12)
- (B) Lupus nephritis WHO class IV (Case 13)
- (C) Hemolytic uremic syndrome (Case 14)
- (D) Rapidly progressive glomerulo-nephritis (Case 15)

tivity index はネ症の糸球体基底膜の Selectivity 判定に用いられス剤反応性を予知するのに成果を挙げた。しかし IgG, トランスフェリン量を Single radial

immunodiffusion で求める際、抗-IgG 血清は IgG の H-chain とも反応するため Whole molecule の IgG を反映しがたいとの難点もある。今回の検討では IgG/トランスフェリン値との比較はなされていないが手技においてやや煩雑であるが SDS-PAGE により得られた成績はス剤反応性或は組織像をよく反映すると思われた。

巣状糸球体硬化症での高分子蛋白尿排泄の機序としては、Charge barrier のみならず Size barrier の破綻が考えられ、その成因として Hyperfiltration⁷⁾, メサンギウム増殖、硬化性病変、上皮細胞障害⁸⁾ 等が考えられている。同様に腎炎群では半月体を高頻度に認める症例に高分子尿蛋白の排泄がみられたが、半月体は強い基底膜の断裂等の傷害からフィブリンの漏出等によりボウマン氏嚢へのマクロファージや上皮細胞の増殖を招来して形成されると考えられている⁹⁾。さらに IgA 腎症で半月体を有する症例では糸球体由来の Dymorphic pattern の肉眼的血尿がしばしば見られるとの報告もある¹⁰⁾。かかる結果から巣状糸球体硬化症のみならず半月体形成腎炎の高分子蛋白の出現は基底膜の強い傷害の結果と考えられ、腎炎群においては蛋白尿の組成に加えて血尿の程度を検討することはより明確に腎組織傷害の程度を反映すると思われた。以上各種腎疾患の尿蛋白の分析を SDS-PAGE を用いて検討し、本方法は腎組織像やネ症のス剤反応性をよく反映し極めて有効であると思われた。

結 語

各種小児糸球体疾患患児の尿蛋白分析を SDS-PAGE を用いて行い以下の結論を得た。

1. 小児ネ症の中でス剤に反応する微小変化群では、Highly selective であるのに対してス剤抵抗性の巣状糸球体硬化症では高分子尿蛋白の出現を認め、Non-selective であった。
2. 腎炎群では半月体や硬化症病変の認められる症例では高分子尿蛋白の出現が認められた。

(本論文の要旨は第40回日本小児科学会奈良地方会にて発表した。)

文 献

- 1) Boesken, W.H.: Differentiation of proteinuric diseases by disclectrophoretic molecular weight analysis of urinary protins. Clin. Nephrol. 1: 311-318, 1973.
- 2) Boesken, W.H.: Dislectrophoretic molecular

- weight analysis of urinary proteins. *Contr. Nephrol.* **1**: 143-155, 1975.
- 3) 宮田 曠: 尿蛋白分析手技に関する研究. *日腎誌.* **8**: 1079-1089, 1986.
 - 4) Lindblom, H.: Urinary protein isolation by high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* **266**: 187-196, 1983.
 - 5) Suzuki, Y.: Rapid differentiation between glomerular and tubular proteinurias by high-performance liquid chromatography. *Clin. Nephrol.* **24**: 138-141, 1985.
 - 6) Cameron, J.S.: The simple assessment of selectivity in heavy proteinuria. *Lancet* **2**: 242-247, 1966.
 - 7) Brenner, B.M.: Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease. *Kidney Int.* **7**: 647-655, 1983.
 - 8) Grishman, E.: Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: an electron microscopic study of glomerular podocytes. *Kidney Int.* **7**: 111-122, 1975.
 - 9) Vassalli, P.: The pathogenetic role of the coagulation process in glomerular diseases of immunologic origin. *Nephrology* **1**: 47-63, 1971.
 - 10) Bennett, M.W.: Macroscopic hematuria in mesangial IgA nephropathy. *Kidney Int.* **23**: 393-400, 1983.