

糖尿病性腎症における尿中レクチン結合性低分子糖蛋白分画

奈良県立医科大学第1内科学教室

森本真弓, 金内雅夫, 中島靖夫
西浦公章, 土肥和紘, 石川兵衛

奈良県立医科大学公衆衛生学教室

土肥祥子, 森山忠重

ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF URINARY GLYCOPROTEIN FOR DIABETIC NEPHROPATHY USING PEROXIDASE-LECTINS

MAYUMI MORIMOTO, MASAO KANAUCHI, YASUO NAKASHIMA, KIMIYUKI NISHIURA,
KAZUHIRO DOHI and HYOE ISHIKAWA

The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

YOSHIKO DOHI and TADASHIGE MORIYAMA

Department of Public Health, Nara Medical University

Received November 27, 1992

Summary: To evaluate the severity of diabetic renal involvement, we performed electrophoretic analysis of urinary glycoprotein for 16 patients with diabetic nephropathy using peroxidase-lectins. After being subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, urinary glycoprotein was transferred to the nitrocellulose membrane, which then was stained with peroxidase labeled-lectin (*Triticum vulgare*; WGA), and was analyzed densitometrically. Electrophoretic analysis of urinary glycoprotein revealed the presence of lectin-reactive glycoproteins with the molecular weights of 22 kD, 32 kD, 38 kD and 48 kD respectively. Among these, the amount of the 22 kD-mol. wt. glycoprotein increased significantly as the renal histopathological changes developed, whereas that of 32 kD decreased. These results suggest that semiquantitative analysis of low molecular weight urinary glycoprotein stained with lectin is useful for the non-invasive evaluation of the severity of diabetic nephropathy.

Index Terms

electrophoretic analysis, diabetic nephropathy, lectin, urinary glycoprotein

はじめに

糖尿病性腎症の初期形態学的変化は、蛋白尿の出現に先行するとされており、尿蛋白陰性期から糸球体基底膜の肥厚やメサンギウム領域の拡大として観察される¹⁾²⁾。現在、糖尿病性腎症の早期診断法として尿中排泄物質に

関する検討がすすめられているが、アルブミン³⁾、ムコ蛋白⁴⁾、トランスフェリン⁵⁾、 α_1 ミクログロブリン(α_1 MG)⁶⁾、 β_2 ミクログロブリン(β_2 MG)⁷⁾、NAG活性⁸⁾などは糸球体病変の進行程度を正確に識別するまでに至っていない。

著者ら⁹⁾¹⁰⁾は、糖尿病患者の腎生検所見と尿中シアル酸

値を対比し、結合型シアル酸値が糸球体びまん性病変の進展とともに増加すること、また尿中結合型シアル酸の主成分が分子量 60 kD 以下の低分子糖蛋白であることを報告した。さらに、尿中低分子糖蛋白を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で展開後、植物レクチンで染色した場合、糖尿病性腎症の進展とともにレクチン染色バンドが濃染されることを明らかにした¹¹⁾。今回は、レクチン染色電気泳動法で得られた低分子糖蛋白分画比を組織学的重症度と対比し、糖尿病性腎症の早期診断における本法の有用性について検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は腎生検を施行した糖尿病患者 16 例(男性 10 例, 女性 6 例)であり、その年齢は 42~70(平均 55)歳である。なお対照には 27~69(平均 52)歳の健康成人 5 例(男性 3 例, 女性 2 例)を選んだ。

2. 方法

(1) 採尿

24 時間常温蓄尿の一部を冷凍庫内(-20℃)に保存し、本研究に供した。

(2) レクチン染色電気泳動

被検尿の一部を 1,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 30 ml を透析チューブ Spectra/Por 6(SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES 社)を用いて 5 mM の重炭酸アンモニウムに対して 4℃, 48 時間透析し、分子量 1 kD 以下の低分子成分および塩を除去した。ついで試料を凍結乾燥してから 5 mM の重炭酸アンモニウム 1.2 ml に溶解した。これを 1% 2-メルカプトエタノール, 1% SDS 含有 8 M 尿素中で 60℃, 30 分間還元して糖蛋白質を変性させ、泳動用試料とした。泳動用試料の支持体に 4~14% 濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用い、泳動用緩衝液に 0.1% SDS 含有 0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.2)を用いた。泳動用試料 10 μ l をスラブゲルに添加し、室温で 55 mV, 12 時間泳動した。つぎに Towbin ら¹²⁾の方法に準じて、4℃で 35 V, 2 時間通電してからスラブゲル上の糖蛋白質をニトロセルロース(NC)膜(Advantec 社製)に転写した。その後、ペルオキシダーゼ標識小麦胚芽レクチン(Triticum vulgare; WGA, 豊年製油社製)を NC 膜に添加し、室温で 30 分間反応させた。ペルオキシダーゼ反応の基質には 4-クロロ-1-ナフトール含有メタノールを用い、室温で 5 分間染色した。なお、分子量マーカーには Prestained SDS-PAGE Standard (Bio-Rad 社)を用いた。

(3) 低分子糖蛋白分画の計量

NC 膜上の泳動像を写真撮影し、この泳動写真を 2 波長クロマトスキャナー(島津製作所)で走査して densitogram を描いた。WGA 染色電気泳動分析の densitogram は、分子量 60 kD 以下の低分子領域で 4 分画に展開される。その各分画を裁断し、重量比を百分率で求めた。

(4) その他の測定項目

尿中のアルブミンは RIA 法, 酸可溶性蛋白(acid soluble protein; ASP)は色素結合法, α_1 MG と β_2 MG は EIA 法で測定した。

(5) 腎生検組織の分類

糸球体びまん性病変の程度は Gellman の基準¹³⁾にしたがって分類した。

3. 推計学的処理

各群の測定値は平均±標準偏差で表した。平均値の群間比較には Student's t 検定を用い、危険率 5% 以下の場合を有意とした。

成 績

1. レクチン染色電気泳動像

健常対照および糖尿病症例の尿中糖蛋白を WGA 染色した電気泳動像を Fig. 1 に示す。WGA 染色バンドは、健常対照では分子量 90 kD の位置にのみ検出されたが、糖尿病性腎症では分子量 130 kD, 90 kD, 66 kD, 48 kD, 38 kD, 32 kD および 22 kD の位置に検出された。染色バンドは糖尿病性腎症のびまん性病変が進展するとともに濃染された。

2. 尿中低分子糖蛋白分画比

Densitogram では、分子量 22 kD のピーク高はびまん性病変の進展とともに増高する傾向を示したが、その他のピーク高は腎組織病変の程度によって明らかな増減を示さなかった(Fig. 2)。つぎに分子量 60 kD 以下の低分子領域にある 4 分画(分子量 48 kD, 38 kD, 32 kD および 22 kD)について分画比を求め、びまん性病変の程度と対比した。分子量 48 kD および 38 kD の分画比はびまん性病変の各群間で有意の差を示さなかったが、分子量 22 kD の分画比は D₀群に比して D₁群と D_{II}群で有意に高値を示し、分子量 32 kD の分画比は D₀群に比して D₁群と D_{II}群で有意に低値を示した(Table 1)。

3. 尿中微量蛋白排泄量

アルブミン, ASP, α_1 MG および β_2 MG の尿中排泄量はびまん性病変の各群間に差を示さなかった(Table 2)。

考 察

1. レクチン染色電気泳動

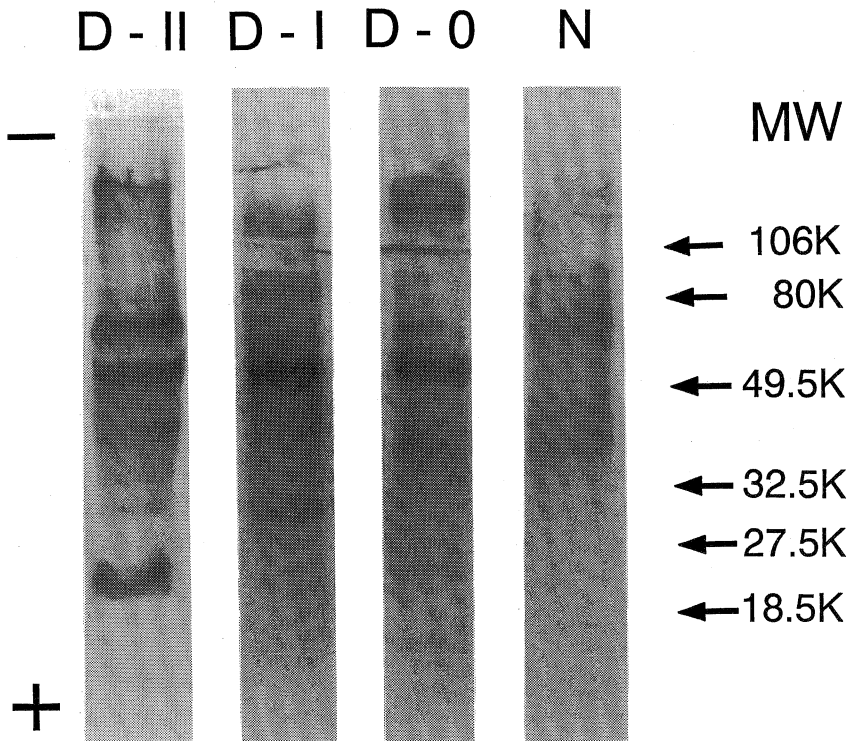


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic profiles of urinary glycoproteins on HRP-WGA staining.

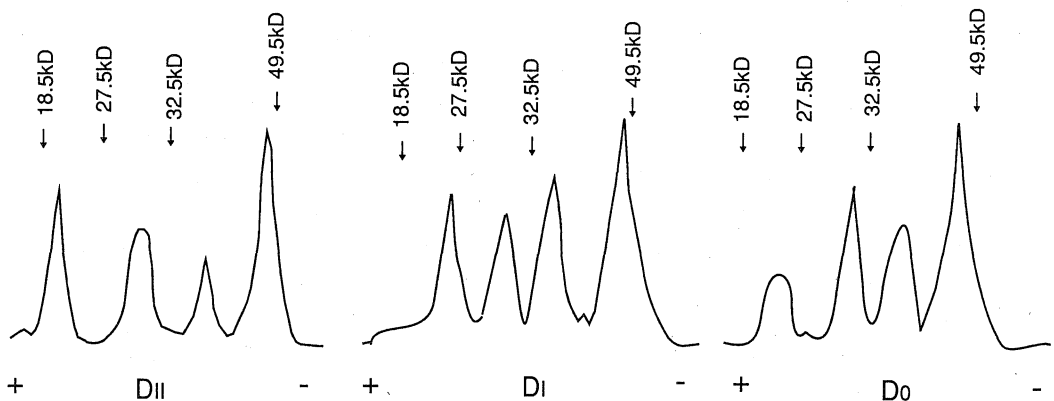


Fig. 2. Densitograms of SDS-PAGE for urinary glycoproteins on HRP-WGA staining.

SDS-PAGE は、蛋白質の分別に優れており、尿中排泄物質の分子量分布に対する検討に最適の電気泳動法と考えられている¹⁴⁾。現在まで、SDS-PAGE 後の染色法には、被検試料が蛋白質の場合には Coomassie brilliant blue(CBB)染色や銀染色が、糖蛋白に対しては Periodic acid-Shiff (PAS)染色や Alcian blue 染色が用いられてきた¹⁵⁾。著者ら¹⁰⁾はすでに糖尿病性腎症では低分子領域

の糖蛋白が尿中に増加することを見出しているが、糖鎖構造を特異的に認識できる植物レクチンに着目し、微量の尿中糖蛋白を高感度に検出する手段としてレクチン染色電気泳動分析法¹¹⁾も確立している。既報¹¹⁾では、WGA のほかにアカインゲンマメレクチン(PHA-E₄)、ドリコスマメレクチン(DBA)およびレンズマメレクチン(LCA)の4種を用いて検討した。糖尿病患者の尿中糖

Table 1. Urinary glycoprotein fraction in groups of stage for glomerular diffuse lesions

Group	22kD (%)	32kD (%)	38kD (%)	48kD (%)
D ₀ (n=6)	6.3±1.8	26.5±1.5	19.5±4.5	48.5±3.5
D ₁ (n=6)	17.0±6.5	14.3±2.6	22.8±4.8	47.5±3.5
D ₁₁ (n=4)	28.0±7.0	16.0±5.0	13.5±2.5	46.0±1.4

Table 2. Excretion of urinary microproteins in groups of stage for glomerular diffuse lesions

Group	albumin (mg/day)	ASP (mg/day)	α ₁ MG (mg/day)	β ₂ MG (μg/day)
D ₀ (n=6)	10.3±8.0	120±45	3.2±2.4	50±29
D ₁ (n=6)	29.9±36.5	122±83	4.3±2.6	81±94
D ₁₁ (n=4)	37.9±37.3	165±88	8.0±4.7	284±374

蛋白は、WGA に最も強い染色性を示し、ついで PHA-E₄ に濃く染色された。しかし、LCA に対する染色性は弱く、DBA ではバンドが観察されなかった。WGA 染色の densitogram では、分子量 48 kD, 38 kD および 20 kD 近傍を含めて数種のピークがびまん性病変の進展とともに増高した。しかし前報¹¹⁾は、尿中低分子糖蛋白のレクチン染色電気泳動分析が糖尿病性腎症の進行程度の評価に有効な指標となる可能性を示したにとどまり、びまん性病変の重症度診断が可能か否かの具体的な臨床応用については今後の課題として残されていた。そこで今回の研究では、レクチン染色電気泳動後の densitogram から分子量 60 kD 以下の低分子領域にみられた 4 ピーク面積を計量し、これを尿中低分子糖蛋白分画比として評価することにした。なお、WGA は GlcNAcβ₂糖鎖と特異的結合性を有するが、この糖鎖構造はシアル酸の重要な構成要素でもある¹⁶⁾。WGA 染色を選択した理由は、その染色性が既報でのレクチン 4 種のなかでは最も高かったことにもよるが、糖尿病性腎症の早期診断指標として従来から著者らが検討を重ねてきた尿中シアル酸測定⁹⁾および尿中シアル酸含有糖蛋白分子量パターン¹⁰⁾¹⁷⁾に関する一連の研究実績と軌を一にするからでもある。

2. 糖尿病性腎症の早期診断指標としての意義

糖尿病性腎症の早期診断指標：従来から尿中微量蛋白であるアルブミン¹⁸⁾、トランスフェリン⁵⁾、ASP⁴⁾、α₁

MG⁶⁾、β₂MG⁷⁾や、尿中酵素の NAG 活性⁸⁾などが糖尿病性腎症の早期診断指標として用いられてきた。なかでも尿中アルブミンの測定は、腎症進展を予知する指標として広く認識されており、最近では一般臨床検査として応用されている。

Mogensen¹⁹⁾の病期分類によると、微量アルブミン尿の検出される時期は臨床的初期腎症に相当するとされているが、病理学的な初期病変に一致するかについては裏付けられたわけではない。著者ら³⁾の検討では、微量アルブミン尿を呈する時期の腎生検所見は、びまん性病変の軽微なものから Gellman 分類の D₁₁~D₁₁₁程度に進行したものを含んでいた。著者らは加えて、びまん性病変の重症度判別診断が尿中アルブミンの単独測定では困難であり、これに ASP、β₂MG、NAG 活性を加えた複合診断でも 60% の判別率にとどまることを明らかにした。

アルギニン負荷試験：D₁₁以上の糸球体病変を有する症例はしばしば尿細管障害を併発するので、尿中 β₂MG や NAG 活性の測定が有用となる場合が少なくない。それに対して D₀群と D₁群の識別は、これまで不可能に近い状況にあった。しかし最近、著者ら²⁰⁾はアルギニン負荷後の尿中アルブミン排泄量を求めることにより解決の糸口を見いだした。その成績では、尿中アルブミン排泄異常の陽性率は、アルギニン負荷前では D₀群と D₁群の間に差を示さなかったが、アルギニン負荷後では両群間に有意差が認められた。ただし、本負荷試験はアルギニン溶液を 1 時間かけて静脈内投与する必要があるため、臨床検査法として複雑な点に難点があるといえる。

尿蛋白電気泳動分析：一方、尿蛋白電気泳動分析は、患者に対する負担が採尿に限られるので、臨床検査法としての有益性が高いものと思われる。Virella ら²¹⁾は、罹病期間 10 年未満の若年型糖尿病で低分子蛋白分画の排泄増加を認めたことから、尿細管障害が糸球体障害に先行するのではないかと述べている。大滝ら²²⁾は、1 日尿蛋白排泄量が 0.3 g 以下の糖尿病患者を対象として尿中低分子蛋白を SDS-PAGE 法で分析しており、分子量 42 kD, 32 kD, 21 kD および 15 kD の 4 本のバンドが確認されたという。しかもその泳動像は Fanconi 症候群やカドミウム中毒症などに類似していた。猪股ら²³⁾も、尿蛋白組成を SDS-PAGE 法で検討しているが、罹病期間が 1 年以内の症例ではアルブミン単独か低分子蛋白のバンドのいずれかを呈したのに対し、罹病期間が 5 年以上のものは高分子蛋白のバンドを呈したことから、糖尿病の尿蛋白排泄パターンが腎障害の進行とともに低分子蛋白優位から高分子蛋白優位に移行すると考えた。これらの成績は、糖尿病性腎症の早期から尿細管障害が出現してい

ることを示唆している。一方, Terabayashi²⁴⁾は糸球体硬化症の進展に平行して低分子蛋白分画の排泄が増加することを報告しており, 石井ら²⁵⁾も尿蛋白陰性の糖尿病患者を対象として SDS-PAGE 法で微量蛋白尿の分画を検討しているが, 低分子蛋白の排泄が罹病期間 20 年以上の蛋白尿陰性例で増加することを認めている。さらに Suenaga²⁶⁾は, 分子量 43 kD と 14 kD の低分子蛋白排泄率が, 健常群に比して罹病期間 10 年以上の群で有意に低かったと述べている。これらの成績は, 尿細管障害が糖尿病性腎症の進行期に出現するというものであり, 前3者とは相反した見解を示したことになる。いずれにせよ, 従来の成績は, 糖尿病性腎症の進展過程において低分子蛋白排泄が増加する時期のあることを示唆したものといえよう。しかし, 低分子蛋白の性状の詳細やその由来についてはいまだ不明な点が多い。今回の成績では, 分子量 22 kD の WGA 染色性糖蛋白分画比が糸球体びまん性病変の D₀群に比して D_I群と D_{II}群で有意に増加することが明らかになった。

尿中 α_1 MG(分子量 31 kD)・ β_2 MG(分子量 11 kD)排泄量: これらは, 血清由来の低分子蛋白であるが, 間質性腎炎や重金属中毒では尿中排泄増加を示すことから尿細管機能障害の指標になるとされている。今回の検討では, α_1 MG と β_2 MG の尿中排泄量は, D₀群, D_I群および D_{II}群ともに正常範囲にあり, しかも 3 群間に差を示さなかった。その成績は, 今回の対象症例が尿細管機能障害を合併していないことを支持するものである。

尿中低分子糖蛋白排泄量: D_I群と D_{II}群で 22 kD の糖蛋白が増加を示した機序は, 尿細管機能障害に起因していないものと思われる。糖尿病性腎症の病理学的特徴の 1 つに基底膜肥厚とメサンギウム拡大が挙げられる。これらの病変では, コラーゲン蛋白, 非コラーゲン糖蛋白やシアル酸などの化学組成に量的あるいは質的な異常がみられるという²⁷⁾。糸球体に存在する非コラーゲン糖蛋白はフィブロネクチン, ラミニン, エンタクチン, ニドゲンなどが知られているが²⁸⁾, 他の糖蛋白成分は未同定のまま残されている。またシアル酸は, 係蹄上皮細胞や基底膜に分布し, 糖蛋白結合型シアル酸として存在している²⁹⁾。糸球体びまん性病変の初期変化を意味する D_I群ですでに, 22 kD 糖蛋白の排泄増加が認められたことから, その由来は糸球体自体と考えると矛盾がない。つまり, 22 kD 糖蛋白は, 糸球体びまん性病変の初期形態学的変化を直接的に反映する尿中指標として臨床応用が可能なものと考えられた。

ま と め

微量アルブミン尿を呈した糖尿病患者 14 例の尿中低分子糖蛋白分画比を小麦胚芽レクチン染色電気泳動法により定量し, 腎生検所見(Gellman 分類の D₀~D_{II}群)と対比して以下の結論を得た。

(1) 分子量 22 kD の糖蛋白分画比は, D₀群に比して D_I群と D_{II}群で高かった。

(2) 分子量 32 kD の糖蛋白分画比は, D₀群に比して D_I群と D_{II}群で低かった。

(3) 分子量 38 kD と 48 kD の糖蛋白分画比は, いずれも D₀~D_{II}の 3 群間に差を示さなかった。

(4) 既存の尿中微量蛋白排泄量(アルブミン, 酸可溶性蛋白, α_1 ミクログロブリンおよび β_2 ミクログロブリン)は, いずれも D₀~D_{II}の 3 群間に差を示さなかった。

以上の成績は, 尿中低分子糖蛋白分画比の測定が糖尿病性腎症の初期病変の判別に有用であることを示唆している。

本論文の要旨は第 28 回日本糖尿病学会近畿地方会(1991 年 11 月, 和歌山)において発表した。

文 献

- 1) 中本 安: 糖尿病性腎症とその進展. 腎と透析 18: 41, 1985.
- 2) Mauer, S. M., Steffes, M. W. and Ellis, E. N.: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. J. Clin. Invest. 74: 1143, 1984.
- 3) 金内雅夫, 西浦公章, 竹中義正, 中島健夫, 石井健司, 川野貴弘, 土肥和紘, 石川兵衛: 糖尿病性腎症における尿中アルブミン測定の意義. 奈医誌. 39: 551, 1988.
- 4) 金内雅夫, 澤井冬樹, 平山俊英, 湯村文敏, 濱口尚重, 西浦公章, 土肥和紘, 石川兵衛: 糖尿病性腎症における尿中酸可溶性蛋白の臨床的意義. 日腎誌. 28: 1329, 1986.
- 5) 三崎盛治, 田中剛夫, 熊沢正継, 白山 究, 嶋 照夫, 鈴木司郎, 岡崎 通: 糖尿病における RIA 法による尿中 transferrin 測定の臨床的意義. 医学のあゆみ 132: 204, 1985.
- 6) 河合 忠, 伊藤喜久: α_1 -microglobulin の測定とその意義. 腎と透析 24: 225, 1988.
- 7) 吉川隆一, 大森成二, 羽田勝計, 繁田幸男, 村田貞夫, 笹井智令: 糖尿病患者の尿中 β_2 -microglobulin 値について. 糖尿病 22: 621, 1979.

- 8) 金内雅夫, 土肥和紘, 西浦公章, 竹中義正, 中島靖夫, 石井健司, 川野貴弘, 石川兵衛: 糖尿病性腎症における尿中酵素測定の意義. 奈医誌. 40 : 719, 1989.
- 9) Takenaka, Y., Kanauchi, K., Dohi, Y., Dohi, K. and Ishikawa, H. : Diagnostic significance of urinary sialic acid in diabetic nephropathy. Jpn. J. Nephrol. 34 : 85, 1992.
- 10) 西浦公章, 土肥和紘, 金内雅夫, 山野 繁, 中島靖夫, 竹中義正, 澤井冬樹, 濱口尚重, 石川兵衛, 杉本和夫, 土肥祥子, 森山忠重: 糖尿病性腎症における尿中シアル酸含有糖蛋白分子量排泄パターン. 腎と透析 24 : 287, 1988.
- 11) 中島靖夫, 土肥和紘, 土肥祥子, 西浦公章, 金内雅夫, 石井健司, 川野貴弘, 竹中義正, 杉本和夫, 森山忠重, 石川兵衛: 糖尿病性腎症における尿中糖蛋白のレクチン染色電気泳動分析. 日腎誌. 31 : 1133, 1989.
- 12) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 : 4350, 1979.
- 13) Gellman, D. D., Pirani, C. L., Soothill, J. F., Muehrcke, R. C. and Kark, R. M. : Diabetic nephropathy, A chemical and pathologic study based on renal biopsies. Medicine 38 : 312, 1959.
- 14) Mulli, J. C., Balant, L., Giromini, M. and Fabre, J. : Analysis of proteinuria in health and disease using Sodium dodecyl sulphate acrylamid gel electrophoresis. Europ. J. Clin. Invest. 4 : 253, 1974.
- 15) 井上 勤: 色素によるタンパク質染色法. 電気泳動実験法(電気泳動学会編). 文光堂, 東京, p523, 1989.
- 16) 辻 勤, 大沢利昭: レクチンとその糖結合特異性. 蛋白質, 核酸, 酵素 28 : 118, 1983.
- 17) 西浦公章, 土肥和紘, 金内雅夫, 中島靖夫, 山野繁, 石川兵衛, 土肥祥子, 杉本和夫, 森山忠重: 糖尿病性腎症における運動負荷時の尿中シアル酸含有糖蛋白分子量パターン. 奈医誌. 42 : 124, 1991.
- 18) Mogensen, C. E. : Urinary albumin excretion in diabetes. Lancet ii : 601, 1971.
- 19) Mogensen, C. E., Christengen, K. and Vittinghus, E. : The stage in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. Diabetes 32(Suppl. 2) : 64, 1983.
- 20) 金内雅夫, 土肥和紘, 西浦公章, 中島靖夫, 石井健司, 川野貴弘, 石原京子, 石川兵衛: 糖尿病性腎症の早期診断に対するアルギニン負荷試験の有用性. 奈医誌. 42 : 221, 1991.
- 21) Virella, M. F., Virella, G., Rosebrock, G., Sagel, J., Gonzalez, J. and Colwell, J. : Early diagnosis of renal malfunction in diabetics. Diabetologia 16 : 165, 1979.
- 22) 大滝幸哉, 中川英彦, 前田昌子, 栗林忠信, 俵 哲, 荒木淑郎: 糖尿病患者の尿中低分子量蛋白と腎尿管機能障害. 糖尿病 23 : 587, 1980.
- 23) 猪股茂樹, 伊藤万寿雄, 大沢佳之, 井上正則: 糖尿病における尿蛋白分析の臨床的意義. 糖尿病 27 : 591, 1984.
- 24) Terabayashi, M. : Urinary protein analysis of diabetic patients ; Appearance of low molecular weight protein component in the true protein emia. Acta Med. Biol. 26 : 123, 1979.
- 25) 石井久美子, 小山哲夫, 小林正貴, 板倉光夫, 川井紘一, 山下亀次郎, 成田光陽: 糖尿病患者における微量蛋白尿の検討. 日腎誌. 31 : 815, 1989.
- 26) Suenaga, K. : Analysis of urinary protein in diabetics ; its clinical impopathy. Jpn. J. Nephrol. 33 : 43, 1991.
- 27) Spiro, R. G. : Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. Diabetologia 12 : 1, 1976.
- 28) Timple, R. : Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane. Kidney Int. 30 : 293, 1986.
- 29) Blan, E. B. and Haas, J. E. : Glomerular sialic acid and protenuria in human renal disease. Lab. Invest. 28 : 477, 1973.