

原 著

ラジオイムノアッセイによる尿中微量アルブミンの測定
—基礎的検討と早期腎変化の指標としての意義—

東京女子医科大学 ラジオアッセイ科 (科長: 出村博教授)

ノムラ タケノリ オダギリレイコ アカシ ヒロコ
野村 武則・小田桐玲子・明石 弘子
デムラ レイコ デムラ ヒロシ
出村 黎子・出村 博

(受付 昭和60年9月6日)

Radioimmunoassay for Urinary Albumin

Takenori NOMURA, Reiko ODAGIRI, M.D., Hiroko AKASHI,
Reiko DEMURA, M.D., and Hiroshi DEMURA, M.D.Radioassay Center (Director: Prof. Hiroshi DEMURA)
Tokyo Women's Medical College

The radioimmunoassay for urinary albumin with double antibody method was developed in order to detect minute amount of albumin associated with early change of kidneys. The sensitivity of the assay was 0.04 mg/liter and ranged up to 20 mg/liter. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 3.2 to 5.6% and 9.8 to 22.7%, respectively. The crossreactivity with human γ -globulin was 0.4%.

Daily excretion of urinary albumin was 5.7 ± 2.6 mg ($M \pm S.D.$, $n=22$) in normal subjects. Albumin index divided by urinary creatinine was 4.8 ± 2.6 mg/g. creat. ($M \pm S.D.$) in normal subjects. No diurnal rhythm was shown among spot urines obtained every 3 hour. Albumin index in 2 groups of the patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, one without proteinuria and the other with sporadic proteinuria by paper Urolabstiks III, significantly increased compared with normal subjects and significantly higher in the latter group. It is suggested that albumin index using spot urines are useful for the early detection of nephropathy in diabetics.

緒 言

尿蛋白の測定法は定性的には試験紙法, 定量的には比濁法や比色法が日常繁用されており, その測定感度はいずれも10mg/dl前後である¹⁾. しかし蛋白尿が検出される頃には, すでに明らかな腎変化を来している例も多い. このため腎疾患の早期発見の試みとして尿中微量蛋白であるアルブミン (以下 Alb)²⁾³⁾や β_2 -マイクログロブリン (以下 β_2 MG)⁴⁾, α_1 -マイクログロブリン (以下 α_1 MG)⁵⁾, さらに尿細管由来酵素のN-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG)⁶⁾などの測定が行なわれている.

今回われわれはラジオイムノアッセイ (RIA)に

よる Alb 微量測定法 (以下 HUA-RIA) を確立したので, その基礎的検討と若干の臨床応用について報告する.

方 法

1. 基礎的検討

標準液は MILES 社の Crystallized Human Albumin (Fraction V, Lot No. 37, 以下 HSA) を0.05%BSA添加0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) に溶解し濃度を0.04~20mg/lに調整し用いた. 第一抗体は MILES 社の Rabbit anti Human Albumin (Lot No. R806)を用いた. HSA のヨード化はクロラミンT法によった. BoundとFreeの分離は栄研化学社の正常家兔血清および第二抗

体（抗ウサギ山羊血清 Lot No. 46001）による二抗体法にて行なった。

これらを用いて抗体力価，反応時間，標準曲線，再現性，回収率，希釈試験および交差率について検討した。また測定検体は原尿を5M NaOH および2N HCl にて pH 6.8~7.5 に調整したものを-20℃に保存し，測定時に溶解して用いた。

2. 臨床応用

過去に腎，肝疾患および高血圧症などの病歴がなく，試験紙法（[®]ウロラプスティックスIII）にて蛋白および潜血反応陰性の健常者22例（男性19例，女性3例，平均年齢29歳）の尿について，本法を用い Alb を，Folin-Wu 法で尿中クレアチニン（以下 Cr）を同時に測定した。Alb を Cr で除し Alb Index を求め日内変動を観察した。採尿は飲酒，過度の運動を禁止した日常生活下にて，起床時（6~9時），10時，13時，16時，19時，22時，就寝時（23~3時）の7時点で採尿を行なったほか24時間尿を蓄尿した。

また本院外来通院中のII型糖尿病患者のうち，採尿時試験紙法尿蛋白陰性で明らかな腎，肝，高血圧疾患が無い111例について，過去6カ月間（5~6回）の尿蛋白が常に試験紙法陰性であった症例83例（男性38例，女性45例，平均年齢54歳）を P（-）群とし，1回以上の検査で疑陽性以上を示

した間欠性蛋白尿28例（男性16例，女性12例，平均年齢57歳）を P（±）群として随時尿中の Alb Index を求め，健常者群と比較した。

結 果

I. 基礎的検討

1. 抗体力価

MILES 社の抗体を Tris-Hcl 緩衝液にて希釈した結果を図1に示した。測定に用いた抗体希釈倍数は原尿を直接測定可能な 4×10^3 倍とした。

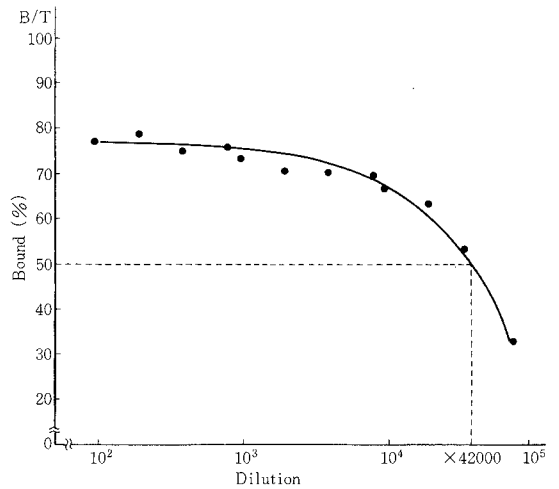


図1 抗体希釈曲線

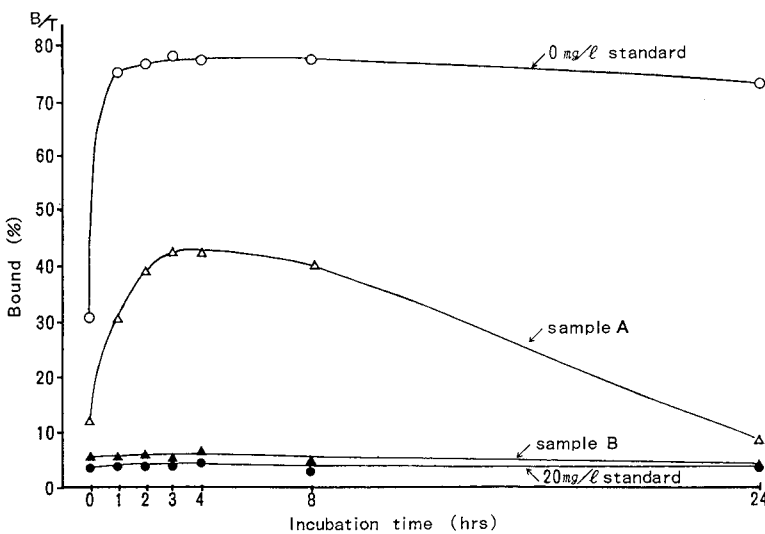


図2 1st incubation time (room temperature)

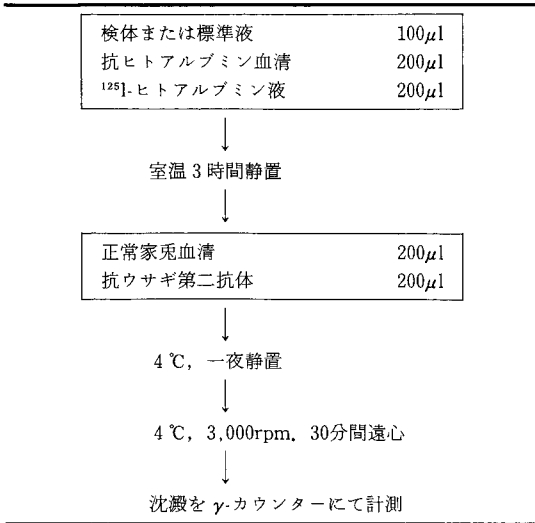


図3 HUA-RIA 操作法

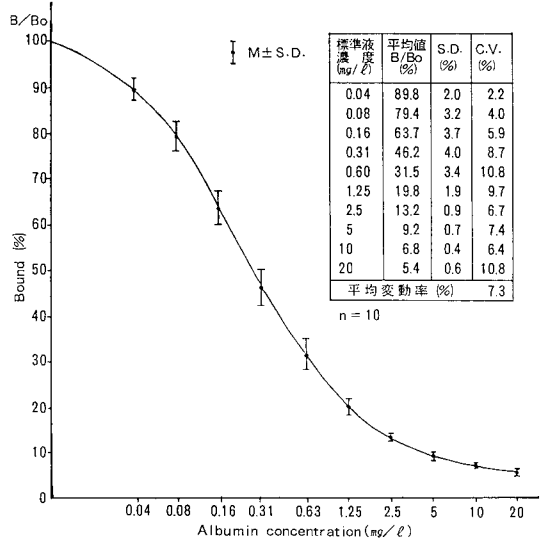


図4 標準曲線

2. 反応時間

室温にて第一反応を検討した結果、標準液では1時間、尿検体では3時間後にそれぞれプラトーに達した。この結果より第一反応時間を室温3時間とした(図2)。また第二反応は栄研化学社の使用説明書に従い、正常家兎血清および第二抗体を添加後、4℃にて一夜反応させた。

これらの結果より図3に示す方法を Human Urinary Albumin RIA (HUA-RIA) とし、以後の検討を行なった。

3. 標準曲線

0.04~20mg/l まで調整した標準液を10回測定した平均変動率は7.3%であった(図4)。

4. 再現性および回収試験

尿検体 A, B を用いたアッセイ内変動係数はそれぞれ3.2, 5.6%で、アッセイ間変動係数は22.7, 9.8%であった。また平均回収率は106.0±5.5%であった(表1)。

5. 希釈試験

Tris-Hcl 緩衝液を用い尿検体を希釈した結果、良好な直線性を示した。また血漿を10⁴倍に希釈した検体を用いて同様に希釈を行なった結果も良好な直線性を認めた(図5)。なお10⁴倍希釈時の血漿の Alb 濃度は本法で4.3mg/l であり、電気泳動法による値 (5.1g/dl) に比し若干低目であった。

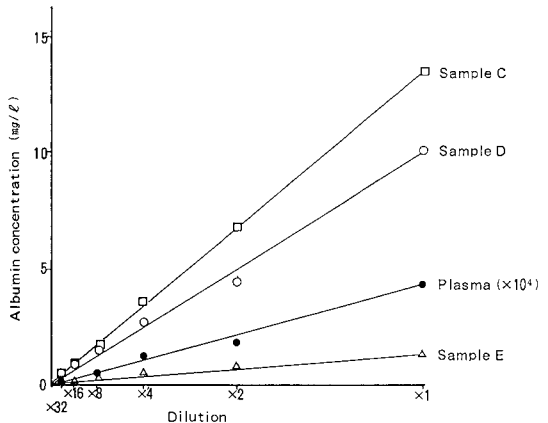


図5 希釈試験

6. 交差率

卵白アルブミン (OVA), 牛血清アルブミン (BSA) との交差は認めなかったが、ヒト γ -グロブリンとは0.4%の交差率であった(図6)。

II. 臨床応用

1. 健常者 (図7)

図の上段に示した各時間の平均 Alb 濃度は起床時、7.3±5.9, 10時: 6.8±4.9, 13時: 5.4±2.9, 16時: 6.9±4.2, 19時: 6.6±4.5, 22時: 6.6±4.0, 就寝時: 9.2±7.6 (mg/l) で13時に比べ就寝時で有意 (p<0.05) に高かった。また随時尿の平

表1 再現性および回収率

	Reproducibility				Recovery test			
	Intra assay		Inter assay		Added	Measured	Expected	Recovery
	A(mg/l)	B(mg/l)	A(mg/l)	B(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(%)
1	0.38	10.8	0.58	9.8	0	0.96	—	—
2	0.38	9.7	0.68	10.4	0.31	1.42	1.27	111.8
3	0.38	9.5	0.38	9.8	0.63	1.68	1.59	105.7
4	0.41	9.6	0.46	8.2	1.25	2.49	2.21	112.7
5	0.41	9.8	0.68	8.1	2.5	3.40	3.46	98.3
6	0.39	9.3	0.62	10.9	5	6.13	5.96	102.9
7	0.39	10.3	0.66	8.5	10	11.43	10.96	104.3
8	0.41	10.3	0.56	9.5	Mean recovery (M±S.D.)			106.0±5.5
9	0.40	10.3	0.39	9.7				
10	0.40	9.0	0.40	9.7				
M (mg/l)	0.40	9.9	0.54	9.5				
S.D. (mg/l)	0.01	0.6	0.12	0.9				
C.V. (%)	3.2	5.6	22.7	9.8				

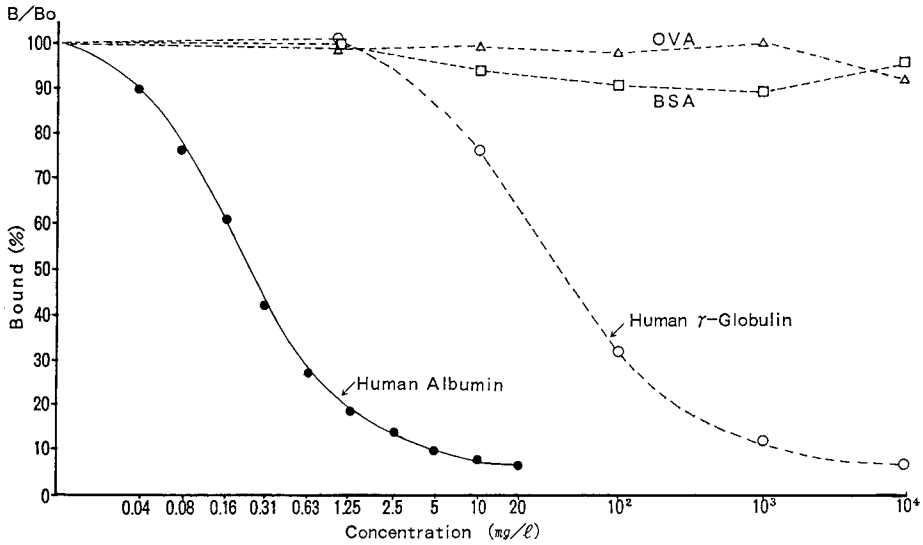


図6 交差試験

均 Alb 濃度は $6.9 \pm 5.1 \text{ mg/l}$ であった。一方、図の
 下段に示した平均 Alb Index は起床時： 4.1 ± 2.1 ，
 10時： 5.0 ± 2.8 ，13時： 4.6 ± 2.2 ，16時：
 5.0 ± 2.4 ，19時： 5.0 ± 2.7 ，22時： 5.0 ± 2.7 ，就寝
 時： $5.6 \pm 3.9 \text{ (mg/g} \cdot \text{cr)}$ と各時点間に有意差を
 認めず，平均値は $4.8 \pm 2.6 \text{ mg/g} \cdot \text{cr}$ であった。さら
 に図の右に示すように同一健常者の蓄尿中の
 Alb 量は $5.7 \pm 2.6 \text{ mg/day}$ であった。また蓄尿の
 Alb Index は $4.6 \pm 2.4 \text{ mg/g} \cdot \text{cr/day}$ であり各時
 点の Alb Index と差を認めなかった。

2. II 型糖尿病

健常者群 (C) と尿蛋白陰性群：P (-)，およ
 び間欠性蛋白尿群：P (±) を Alb 濃度および
 Alb Index で比較した結果，P (-)，P (±) 群の
 Alb 濃度はそれぞれ 8.5 ± 7.8 ， $14.7 \pm 9.9 \text{ (mg/}$
 l) で C 群に比べ P (-) 群では差を認めず，P (±)
 群では有意 ($p < 0.001$) な高値を示した。また Alb
 Index で示すと P (-)，P (±) 群でそれぞれ
 10.8 ± 9.5 ， $18.0 \pm 18.9 \text{ mg/g} \cdot \text{cr}$ であり，C 群より
 ともに高値 ($p < 0.001$) であった。

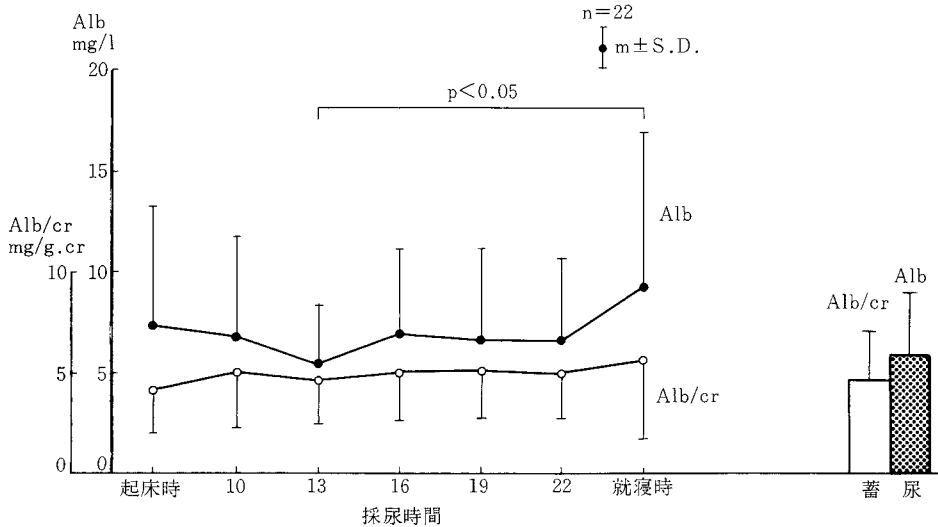


図7 健常者尿中アルブミン日内変動

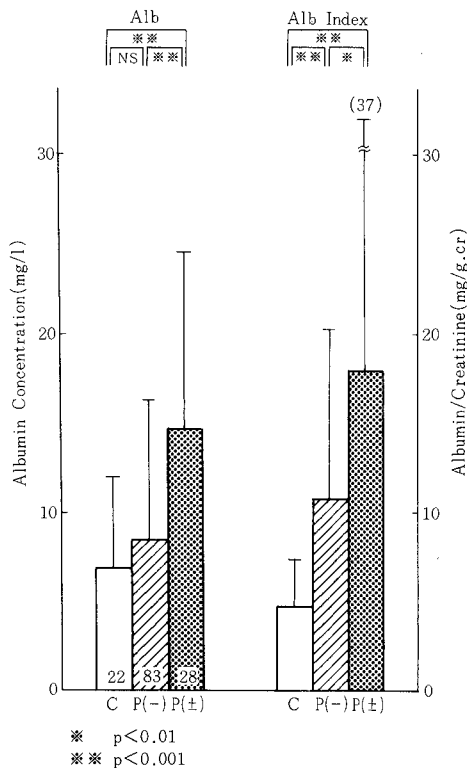


図8 健常者およびII型糖尿病における随時尿中アルブミン

考 察

現在広く行なわれている尿中蛋白測定感度は

10mg/dl 前後であり、また標準物質による違いや検体の A/G 比の差も測定値に影響を与える¹⁾。今回われわれが確立した HUA-RIA は測定感度 0.04mg/l で再現性はアッセイ内平均 4.4%、アッセイ間平均 16.3% とほぼ良好であった。また回収率は 106% で希釈試験は尿サンプルおよび血漿ともに良好な結果であった。さらに交差試験では OVA, BSA とは交差を認めず、ヒト γ -グロブリンのみと 0.4% の交差を示した。

健常者の尿 Alb 量は Miles ら²⁾によると 8.6~12.6mg/day に分布し、梶沼ら³⁾は随時尿で 3.2 ± 2.7 mg/l、1 日量は 3.5 ± 3.5 mg/day と報告している。今回の HUA-RIA では起床時から就寝時までの随時尿 Alb 濃度は平均 6.9 ± 5.1 mg/l で 1 日量は 5.7 ± 2.6 mg/day であった。しかし随時尿 Alb 濃度は健常者で多少の日内変動を認め、また糸球体濾過率の影響も考慮する必要がある。一方、随時尿 Alb 濃度を Cr で除した Alb Index で表わすと日内変動および蓄尿との差も認められず、その平均値は 4.8 ± 2.6 mg/g.cr であった。日常の診療においては完全蓄尿は困難な場合が多く、随時尿による測定が簡便である。その意味で腎変化が初期のうちなら Cr で除し Index で算出する方法⁶⁾や GFR を求めて 1 分間当りの Alb 排泄量で表わす方法⁷⁾も臨床的に有用と思われる。

今回検討したII型糖尿病の随時尿中Alb濃度は健常者群とP(-)群との間に差を認めなかった。しかしAlb Indexで比較すると健常者群よりII型糖尿病のP(-)群、P(±)群ともに高値($p < 0.001$)を示した。糖尿病では従来の測定法で尿蛋白が出現する頃には腎生検でII~III度(Gellman基準⁸⁾)のびまん性病変を示す例が多く認められる⁹⁾。したがってHUA-RIAを用いた尿中Alb測定は糖尿病性腎症の早期発見の有効な指標となる可能性が示唆された。今後、糖尿病のコントロール状態との関係や他の α_1 MG、 β_2 MG、NAGなどとの関連を含めて検討することによりその臨床的有用性が更に明らかになるものと思われる。

結 論

今回われわれが確立した微量Alb測定のためのHUA-RIAは、測定感度 0.04mg/l で再現性、回収率、希釈試験は良好な結果であり、ヒト γ -グロブリンとは 0.4% の交差率であった。

健常者の尿中Alb Indexは平均 $4.8 \pm 2.6\text{mg/g}\cdot\text{cr}$ で日内変動を認めず、随時尿による検索の有用性が示唆された。また1日Alb排泄量は $5.7 \pm 2.6\text{mg}$ であった。

II型糖尿病のP(-)、P(±)群ではともに健常者に比べAlb Indexが有意に上昇しており、さらにP(-)群よりもP(±)群で有意な高値を示し

た。このことより尿中Albの測定は糖尿病性腎症の早期発見の指標として有用な可能性が示唆された。

文 献

- 1) 林 康之: 蛋白尿と尿沈渣検査法, 臨床病理 49(増刊) 15~22 (1982)
- 2) Miles, D.W., et al.: Radioimmunoassay for urinary albumin using a single antibody. Scand J Clin Lab Invest 26 5~11 (1970)
- 3) 梶沼 宏: 尿中微量たん白定量による糖尿病性腎症初期病変の検討, 代謝異常治療研究基金研究業績集 9 94~100 (1982)
- 4) Viberti, G.C., et al.: Effect of control of blood glucose on urinary excretion of albumin and β_2 -microglobulin in insulin-dependent diabetes. N Engl J Med 300 638~641 (1979)
- 5) 河合 忠・金 衛仁: β_2 -マイクログロブリンと α_1 -マイクログロブリン, 臨床検査Mook 12 105~112 (1982)
- 6) 木村敬子・小田桐玲子・ほか: 投稿中
- 7) Wiseman, M., et al.: Glycaemia, arterial pressure and micro-albuminuria in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 26 401~405 (1984)
- 8) Gellman, D.D., et al.: Diabetic nephropathy: A clinical and pathologic study based on renal biopsies. Medicine 38 321~367 (1959)
- 9) 武内重五郎・中本 安: 糖尿病合併症の早期診断と対策, 一腎症一, 糖尿病学の進歩 16 154~161 (1982)