

第 68 回日本電気泳動学会シンポジウム：保存検体・保存菌株が導く臨床応用
論文種目：総合論文

ネコ腎症の診断マーカーの解析

前田浩人¹・小林加奈²・三品美夏³・渡辺俊文³・曾川一幸^{2*}

¹ 前田獣医科医院

² 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室

³ 麻布大学獣医学部付属動物病院

(受付 2018 年 9 月 14 日, 受理 2018 年 10 月 22 日)

SUMMARY

Chronic kidney disease (CKD) is a common disorder that cause of death in cats. In the classification proposed by the International Renal Interest Society (IRIS), stage I and II CKD is difficult to diagnose accurately using markers (creatinine and blood urea nitrogen). The urinary albumin levels in normal control and stage I CKD cats were 6.0 ± 4.5 and 11.2 ± 8.4 mg/dL, respectively, and the urinary transferrin levels were 0.09 ± 0.42 and 0.52 ± 0.79 mg/dL, respectively. Based on ROC curve analysis, the sensitivity and specificity of urinary albumin and urinary transferrin were higher than the plasma creatinine level. Among several candidates, we focused on carboxylesterase 5A fragment which is a 39.2 kDa protein as the most promising biomarker for CKD. To move carboxylesterase 5A fragment toward potential diagnostic use, we developed an enzyme immunoassay that enables the measurement urine carboxylesterase 5A fragment levels. The performance of the ELISA was satisfactory in terms of recovery (96.1–106.4%) and within-run (3.5–5.1%) and between-day (4.8–8.2%) reproducibility.

Key words: carboxylesterase 5A fragment, cat, urine, chronic kidney disease, transferrin

序 論

ネコの腎疾患は臨床現場において増加傾向にあり、腎機能異常を早期の段階で評価できる検査方法によりの確に診断し、病態を把握することが重要である。しかし、獣医臨床においてこの分野の研究に関する報告は少なく、臨床現場では国際腎臓病研究グループ (IRIS) 病気分類の基準に従って血漿クレアチニン、尿素窒素を基に分類しているのが現状である。血漿クレアチニンは性差、年齢、筋肉量など腎臓以外の因子が検査データに影響を与え、軽度腎機能低下では異常値を示さない、いわゆる blind area の存在が知られている。一方、尿素窒素は蛋白摂取量など変動因子が多く、腎機能に特異的ではない。

尿中タンパク質検査および尿中 albumin 検査も実施されているが、腎疾患の有無にかかわらず尿中タンパク質の陽

性を呈することがある。また、尿中 albumin 検査はヒトの尿中 albumin 測定法を用いているため相同性は認められるものの、測定感度が低く、早期の段階で腎機能異常を評価できる感度及び特異性の高い検査方法が望まれている。

我々は Micro two-dimensional polyacrylamidegel electrophoresis (M2D-PAGE) を用いたネコ慢性腎症の尿中 albumin が早期診断の検査マーカーとして有用であり、M2D-PAGE 分析により健常ネコでは尿中 albumin 値が 20 mg/dL を超える例が認められないことを少数例で確認している。非侵襲的なカテーテル採尿法により得たネコ尿 (5 μ L) を試料として健常および IRIS 分類 I 期における尿中 albumin ならび尿中 transferrin 定量の早期診断への有用性について検討した¹⁾。

近年のプロテオミクス技術の進歩に伴い、バイオマーカーを発見、同定するための様々なアプローチが発展して

Analysis of early diagnostic markers for chronic kidney disease

Hiroto Maeda¹, Kana Kobayashi², Mika Mishina³, Toshifumi Watanabe³, Kazuyuki Sogawa²

¹ Maeda Veterinary Hospital; ² Department of Biochemistry, School of Life and Environmental Science, Azabu University; and ³ Veterinary Teaching Hospital, Azabu University

* Corresponding author: Kazuyuki Sogawa; Department of Biochemistry, School of Life and Environmental Science, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5201, Japan

E-mail: sogawa@azabu-u.ac.jp

第68回日本電気泳動学会シンポジウム：保存検体・保存菌株が導く臨床応用

きている。生体試料中のペプチドやタンパク質を解析するための有力なツールである質量分析計を用いた血清・血漿プロテオーム解析により多数のマーカー候補が検出され、癌特異的な診断情報が得られる^{2,3)}。

我々は健常ネコ尿検体（尿中 Alb/Cr 比 <10 mg/g）と慢性腎障害ネコ尿検体（尿中 Alb/Cr 比 >30 mg/g）を用い、ネコ尿に含まれる N 型糖鎖タンパク質を WGA カラムにより抽出後、SDS-PAGE で新たな診断マーカーの探索を行った結果、Carboxylesterase 5A fragment を 3 種類（39.2 kDa, 50.3 kDa, 68.2 kDa）見出した⁴⁾。

尿中 transferrin, 尿中 carboxylesterase 5A fragment (39.2 kDa) について紹介する。

SDS-PAGE 電気泳動法による尿中 albumin と transferrin の早期診断マーカーとしての有用性

1. 対象

2007 年 7 月 28 日から 2008 年 7 月 10 日の間、前田獣医科医院に受診されたネコ腎症（IRIS 分類 I 期）の尿（アメリカンショートヘヤー 3 匹、チンチラ 1 匹、Mix 27 匹、合計 31 匹：雄 15 匹、雌 16 匹、年齢 3 ～ 14 歳）を用いた。健常ネコは IRIS 分類で stage I かつ 2 歳以下の尿（スコットッシュホルド 1 匹、アメリカンショートヘヤー 1 匹、Mix 90 匹、合計 92 匹：雄 42 匹、雌 50 匹、年齢 4 か月～ 2 歳）を用いた。健常ネコと IRIS 分類 I 期ネコの診断基準は、健常ネコは血清生化学検査所見等を参考にして臨床的に正常と診断される 2 歳未満とし、IRIS 分類 I 期ネコは血液生化学検査所見等にて臨床的に慢性腎不全兆候が認められる 6 歳以上とした。

2. 成績

2.1 SDS-PAGE

Transferrin 標準物質のバンドにより transferrin の分子量は 77 kDa と推定でき、尿タンパクの泳動像からも 77 kDa にバンドが観察された。同定した結果、transferrin (score: 602) であった。また、albumin 標準物質のバンドにより albumin の分子量は 67 kDa と推定でき、尿タンパクの泳動像からも 67 kDa にバンドが観察された。同定した結

果、albumin (score: 814) であった。分析条件は、支持体のポリアクリルアミドゲルの濃度 10%, 5 mA 定電流、4 時間で電気泳動することでタンパク質バンドの分離が良く、albumin および transferrin のバンドが明瞭に目視可能であり、この条件で分析を実施した (Fig. 1)。

Albumin および transferrin の標準物質を用いて検量線を作成し定量を行った。Albumin の標準物質を用いて検量線は、高濃度 (10 ～ 30 mg/dL) では、 $y=2617.4x+38868.0$, $r=0.999$ であり、中濃度 (2.5 ～ 10 mg/dL) では、 $y=4150.5x+24057.5$, $r=0.999$ であり、低濃度 (0.75 ～ 2.5 mg/dL) では、 $y=5835.5x+20313.5$, $r=0.963$ であった (Fig. 2A-C)。Transferrin の標準物質を用いて検量線は、0.75 ～ 3.0 mg/dL の領域で、 $y=6964.7x+2894.8$, $r=0.999$ であった (Fig. 3)。Albumin 値は、健常ネコ尿 (n=92) で 6.0 ± 4.5 mg/dL、IRIS 分類 I 期ネコ尿 (n=31) で 11.2 ± 8.4 mg/dL であり、transferrin 値は、健常ネコ尿で 0.09 ± 0.42 mg/dL、および IRIS 分類 I 期ネコ尿で 0.52 ± 0.79 mg/dL であり、ともに $p<0.001$ と有意な違いがみられた。健常ネコ尿 92 例においては、尿中 albumin 値が 20.0 mg/dL を越える症例が認められなかった。

2.2 病理組織学検査

健常ネコ症例および IRIS 分類 I 期症例で尿中 transferrin 値が 1.5 mg/dL 以上の症例それぞれ 1 例に対し、病理組織学検査を行った。健常ネコ症例は、糸球体において軽度のメサンギウム細胞の増生および基質の増加がみられ、軽度慢性間質性腎炎、尿細管の萎縮、間質の線維化が認められた (Fig. 4A)。IRIS 分類 I 期症例は、糸球体包の肥厚、メサンギウム領域の増大、毛細血管腔は萎縮がみられ、中程度慢性間質性腎炎、尿細管萎縮および間質の線維化が認められた (Fig. 4B)。

プロテオーム解析手法により検出した尿中 carboxylesterase 5A fragment の有用性

1. 対象

2015 年 8 月 10 日から 2016 年 3 月 31 日の間に去勢目的で前田獣医科医院に入院した雄のネコ 112 匹（健常ネコ 56 匹、微量アルブミン尿ネコ 56 匹；0 ～ 19 歳）を対象

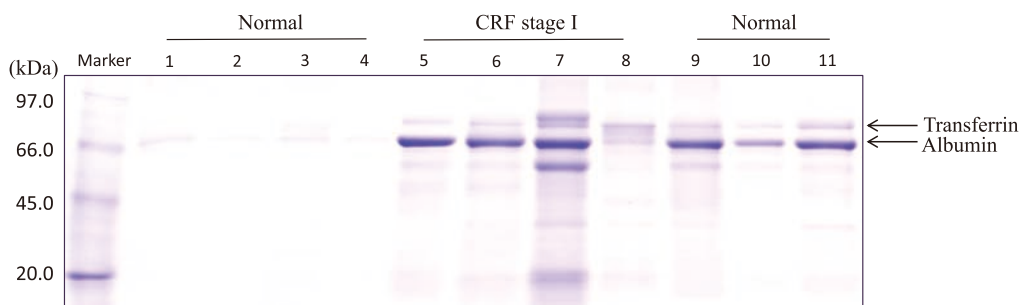


Fig. 1 SDS-PAGE profiles of urine in normal and stage I CKD cats

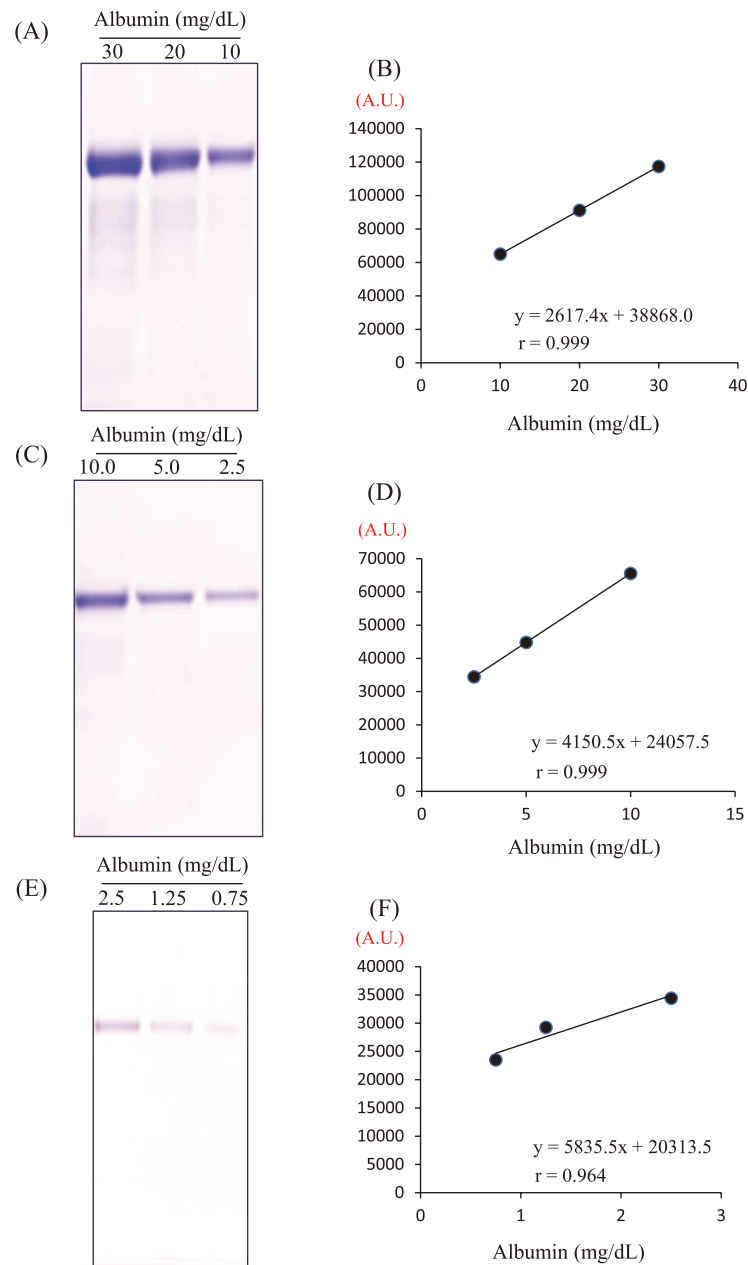


Fig. 2 Reference SDS-PAGE profiles (A, C, E) and calibration curves (B, D, F) for high (A, B), intermediate (C, D) and low (E, F) concentration ranges of albumin

とした。

尿検体は採尿後すぐに -80°C に保管し、尿 Carboxylesterase 5A fragment 測定時に解凍して使用した。

2. 成績

2.1 ELISA の基礎性能

検量線 ($y=0.0201x+0.0009$, $r^2=0.9999$) を Fig. 5 に示した。また0濃度+3SDより算出した最小検出感度は0.12 mg/dLであった。同時再現性は $n=8$ で測定を行い、日差再現性は独立した7日間にて $n=3$ で測定を行った。測定したサンプルは0.52, 4.10 mg/dLの2濃度を用いた。同時再現性および日差再現性はそれぞれ3.5~5.1%、

4.8~8.2%となった。共存物質の影響は干渉チェック・Aプラス (シスメックス株式会社) 用い、溶血ヘモグロビン (500 mg/dL), ビリルビン F (20.7 mg/dL), ビリルビン C (20.4 mg/dL), 乳び (1,400 FTU), アスコルビン酸 (50 mg/dL), RF (500 U/L) まで検討し、その結果、括弧内の濃度まで影響を認めなかった。また、添加回収試験は carboxylesterase 5A fragment 既知濃度のプール尿に大腸菌で発現した carboxylesterase 5A fragment (0.25, 1.00, 4.00 mg/dL) を添加し評価した。回収率は96.1~106.4%であった。

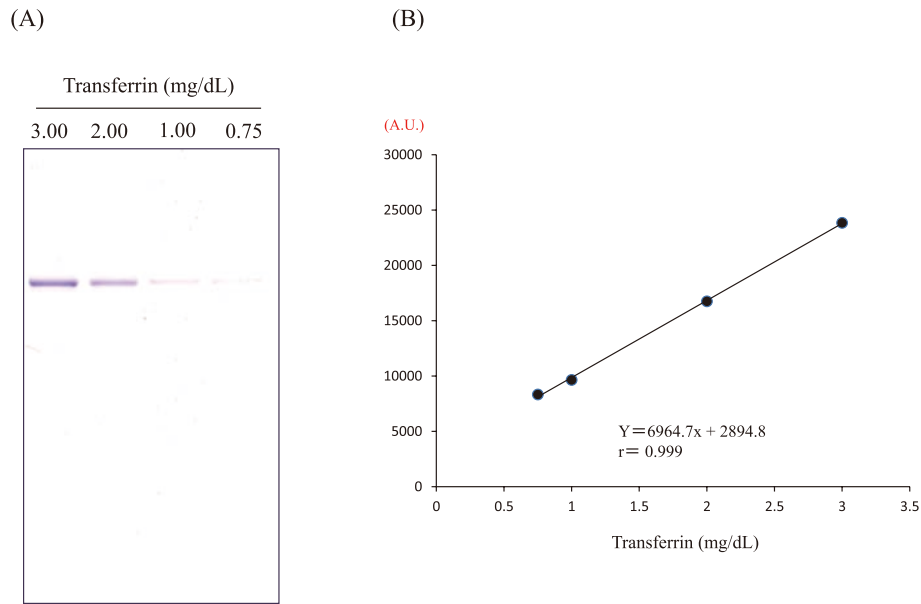


Fig. 3 Reference SDS-PAGE profile (A) and calibration curve (B) for transferrin

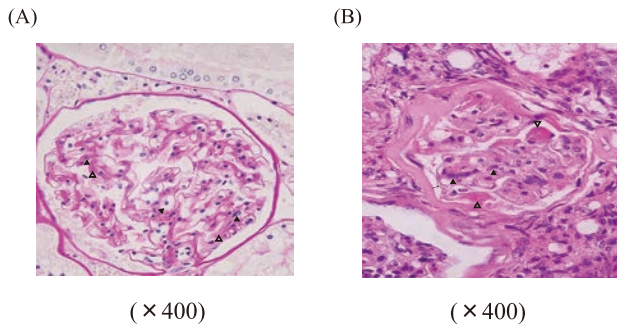


Fig. 4 PAS staining of renal tissue in urinary transferrin-positive normal and stage I CKD cats

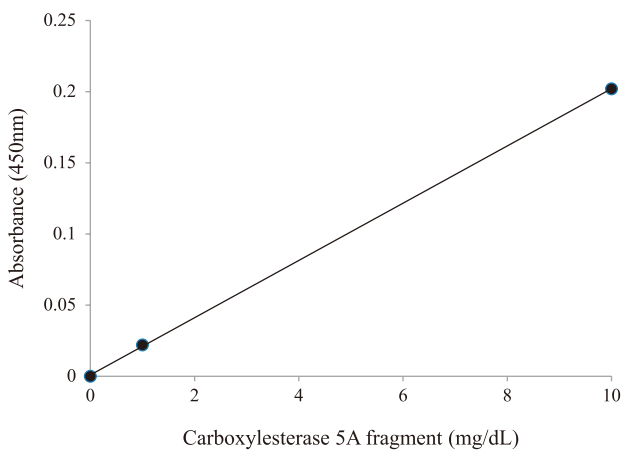


Fig. 5 Standard curves for carboxylesterase 5A fragment in the ELISA

2.2 健常ネコと IRIS 分類 I 期ネコにおける尿 carboxylesterase 5A fragment の評価

健常ネコと IRIS 分類 I 期ネコで、それぞれ 3.4 ± 0.6 mg/dL, 1.9 ± 0.5 mg/dL であり、健常ネコに対して IRIS 分類 I

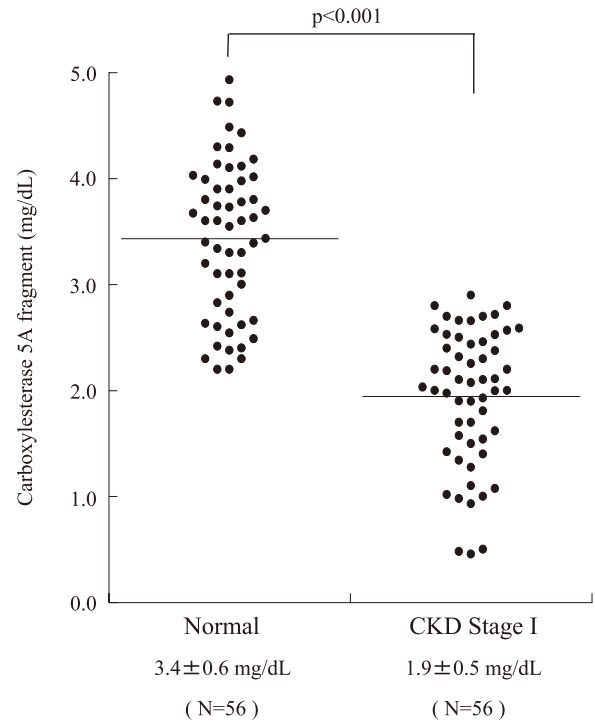


Fig. 6 Urine carboxylesterase 5A fragment levels in normal cats and CKD (stage I) cats

期ネコで $p < 0.001$ と有意な違いがみられた (Fig. 6)。また、ROC 分析により、AUC は、従来の検査法である血清 creatinine, 血清 BUN に比べ、尿 carboxylesterase 5A fragment において $p < 0.001$ と有意な違いが見られた。従来の検査法に相補的な新たな診断マーカーを見出した。

結 論

ネコの腎疾患は臨床現場において増加傾向にあるため、

腎機能異常を早期の段階で評価できる検査方法によりの確に診断し病態を把握することが重要であり、小動物臨床現場においては尿中総タンパク検査ならびに尿中 albumin 検査が実施されている。しかし、尿中総タンパク質検査ではネコ腎疾患の病態の進行状態を反映しないこともあり、健康尿でもタンパク質が高値を示す症例⁵⁻⁷⁾、腎疾患に罹患しているにもかかわらず尿中タンパク質陰性を呈する症例も多々認められることから、これらの検査結果をもとに治療方針を進めていくことは、早期診断に無理が生じるの言うまでも無い。現在、小動物臨床現場において、尿中 albumin 検査はヒトの albumin 測定法を使用しているためネコ albumin とヒト albumin において相同性は認められるものの、測定感度が低いことから早期の段階で腎機能異常を評価できる感度の高い検査法が望まれている。

尿中 transferrin, 尿中 carboxylesterase 5A fragment の有用性は示されたが症例数が少ないため、今後は症例数を増やし、臨床応用に向けて検討していく予定である。

謝 辞

本研究は「科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）」（基盤研究（C），16K08979）、「麻布大学研究推進・支援本部補助金」の助成を受けてものである。

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) Maeda H, Sogawa K, Sakaguchi K, *et al.* Urinary albumin and transferrin as early diagnostic markers of chronic kidney disease. *J Vet Med Sci.* 2015;77:937-943.
- 2) Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem.* 2006;52:1223-1237.
- 3) Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, *et al.* The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:961-967.
- 4) 前田浩人, 阿部沙織, 堀江和香ら. 猫慢性腎不全尿を用いた早期診断マーカーの探索. *北海道獣医師会雑誌.* 2015;59:397.
- 5) Miyazaki M, Kamiie K, Soeta S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel carboxylesterase like protein that is physiologically present at high concentrations in the urine of domestic cats (*Felis catus*). *Biochem J.* 2003;370:101-110.
- 6) Miyazaki M, Soeta S, Yamagishi N, *et al.* Tubulointerstitial nephritis causes decreased renal expression and urinary excretion of cauxin, a major urinary protein of the domestic cat. *Res Vet Sci.* 2007;82:76-79.
- 7) Miyazaki M, Yamashita T, Hosokawa M, *et al.* Species, sex, and age dependent urinary excretion of cauxin, a mammalian carboxylesterase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2006;145:270-277.