

Human Urine Analysis Using Proteomics and Metabolomics

Tamaki JIKYO

*Department of Molecular Biosciences, Institute of Preventive and Medicinal Dietetics,
Nakamura Gakuen University*

Abstract

Metabolic phenotypes are the products of interactions among a variety of factors-dietary, other lifestyle/environmental, gut microbial and genetic. We focus on the description of the state of the art proteomic/metabolomic platforms using human urine established. In this review the current situation of clinical proteomics and metabolomics needed to discover new human urine analysis is presented. The data in the current literature indicate that although a thorough investigation of the entire urinary analysis is still a distant goal, technical applications are already available. In the future, metabolic phenotyping applied to urine analytical data offers the potential to develop an area of aetiopathogenetic knowledge.

プロテオミクスおよびメタボロミクスによるヒト尿解析

治京 玉記

中村学園大学・薬膳科学研究所・分子栄養学部門

キーワード

尿解析, プロテオーム解析, メタボローム解析

(2009年3月31日受理)

緒言

生体では、誕生から死にいたるまで絶え間なく尿が生産され、健康人では1日に約1.5リットルの尿を排泄しており人生80年の間に尿の平均量は約35トンといわれている。尿成分は、約98%が水分、約2%が尿素、その他、タンパク質、糖、赤血球およびヘモグロビン、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲン、亜硝酸塩、ポルフィリン体、バニリルマンデル酸等の有機成分、食塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、塩素、総硫酸、エーテル硫酸、リン、鉄等の無機成分から構成されている。これらの組成は、血清成分に比べ著しく変動しやすく、尿成分の定性・定量解析することで腎疾患、肝疾患、糖尿病、先天性代謝異常、退行性疾患、感染症、代謝異常、栄養障害の診断および治療モニタリングがなされており、さらに新たな疾患関連物質のバイオマーカー探索が期待されている。

本稿では、尿についての一般的所見、検査方法・疾患から最先端技術をもちいたヒト尿プロテオーム解析・メタボローム解析について概説する。

腎臓の機能^{1,2}

生体では、誕生から死に至るまで絶え間なく尿が作られており、誕生前の胎児にもすでに尿の生成がみられ、胎児では、尿は羊水中に排泄されている。尿は左右1対の腎臓のネフロンで生成され、血中の不要物質（老廃物）や有害物質の除去、血液浸透圧の調整、細胞体外量の調節、血液pHの調節、血漿組成の調節などを行い、身体内部環境の恒常性を維持している。

腎臓は、握りこぶし大で、そら豆の様な形をして背骨の両側にあり、右腎は肝臓に押されるかたちで、左腎より少し低い位置にある（図1）。

腎実質は腎皮質と腎髄質から構成されて、腎髄質は、円錐状をしており腎錐体と呼ばれ、その先端には腎乳頭

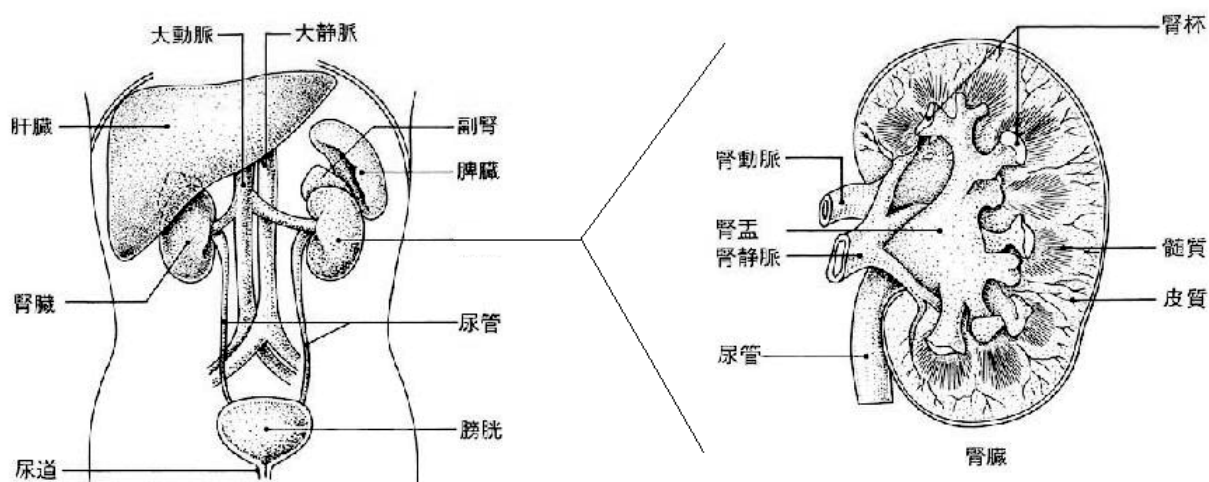


図1. 腎臓の位置と断面図

となり突起している。生成された尿は腎乳頭から小腎杯、大腎杯、さらに腎盂、そして尿管へと流れていく。この1つの腎錐体とその周囲の皮質を合わせた腎臓の肉眼的単位を腎葉という。マウスやラットなどは単葉腎であるが、ヒトの腎臓は、10数個の腎葉が集まった多葉腎で、より尿の生産能力が高くなっている。左右の腎臓には、血液から尿を濾過する腎小体がおおよそ100万個ずつあり、腎小体には、糸球体と呼ばれる毛細血管の糸玉のような塊と、それを包み込むボーマンのうから出来ている。腎小体とそれに続く枝分かれのない尿細管である集合管に集まり、尿細管は、曲がりくねった近位尿細管、髄質の中をU字型に1往復するヘレンループ、曲がりくねる遠位尿細管となり集合管に注がれる。腎臓内の動脈は、腎葉の間、皮質と髄質の間を通り、枝分かれして糸球体へと向かう輸入細動脈と糸球体から出る輸出細動脈からなる(図2)。

糸球体には、高い圧の血液が流れ込み、血管腔からボーマン嚢へ水、電解質、ブドウ糖などが濾過され、この血液の濾過は、内皮細胞の孔、基底膜、足細胞の隙間の3層を介して行われる。この3層は陰性に荷電しており、血管腔側から濾過される物質はサイズによる選別が行われる。濾過される分子サイズを決定するのは基底膜のゲル構造の分子篩の目の大きさにより、その限界は分子量にして約70,000である。この小孔の大きさは直径40Åと想定されているが、その他に直径25Åの小孔も存在している。さらに、荷電による選別も働き、陰性に荷電したアルブミンのようなタンパク質は、サイズが小さくても濾過されない。このようにして、腎小体では、1日に約170Lもの原尿が産生され、続く尿細管から集合管では、必要な水分や栄養素、電解質などを再吸収して、原尿の約1%に当たる1日1.5~2Lの尿が作られる。

再吸収には尿細管各部位に細胞が大きな役割を果たし

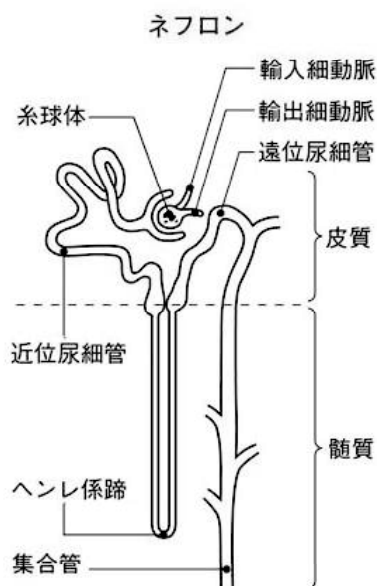


図2. 腎臓を構成する単位

ており、近位尿細管細胞の管腔側には、微絨毛が集まり刷子縁を作り、間質側や側面には側底嵌合があり、それぞれの細胞の表面積を広くしている。その広がった細胞膜上には、管腔側と間質側で異なる物質輸送タンパク質が存在している。管腔側にあるブドウ糖やアミノ酸とNa⁺の共輸送体の働きによって、ブドウ糖やアミノ酸などの栄養素はNa⁺とともに細胞内へと運ばれ間質側にあるNa⁺-K⁺ポンプ、ブドウ糖輸送体の働きによって、Na⁺やブドウ糖は間質側に輸送される。近位尿細管は、NaClの輸送能力が大きく、水に対する透過率が高くなっており、管腔側から間質側へNaClが移動し、管腔と間質の浸透圧が近づくように水も間質側に移動する。このようにして、近位尿細管では、原尿から多量の水分や塩分、

そして殆ど全てのブドウ糖やアミノ酸が回収される。

続くヘレンループから集合管までの部分で尿を濃縮する働きをしている。髄質中には Na^+ と尿素が蓄積され、腎錐体の先端へ行くほど浸透圧が高くなっており、この Na^+ と尿素による浸透圧が原動力となって、尿の濃縮が行われる。また、髄質ではヘレンループの下行脚と上行脚、血管の下行部と上行部が平行して逆向きに走り、対向流系を形成している。ヘレンループの細かい下行脚と上行脚は、細胞の性質が異なっており、髄質中の浸透圧勾配に従い、細かい下行脚では水が管腔側から間質側に移動し、また尿素チャネルを介して管腔内に尿素が吸収される。細い上行脚では、 NaCl の浸透性が高いため間質側に NaCl が移動し、遠位尿細管と続く遠位曲尿細管では、 NaCl が能動的に再吸収される。また、管腔側にある K^+ チャネルによって K^+ が管腔側に戻される。しかし、水と尿素の浸透性は低いいため尿は薄められ集合管に入り皮質と髄質を通過して腎杯に向かい、髄質の浸透圧が高いため、水分が管腔側から間質側に移動し、最終的に尿が濃縮される。また、尿素も間質側に移動して髄質の浸透圧の形成を行う。

また、集合管での尿の濃縮は、抗利尿ホルモン (antidiuretic hormon: ADH) により行われる。ADH は、集合管の水の浸透性を高め、水の再吸収と、さらに尿素の再吸収に作用する。ADH の分泌量が変化することで、体内の水分量の調節に働いており、水分を過剰に摂取した場合には、ADH が分泌されず、水の再吸収量が減少し、水分を多く含んだ薄い尿が生成される。それに対して、体内に水分が不足している場合には、ADH が分泌され、水分の再吸収が活発になり、濃い尿が生成される。ADH を分泌する下垂体の異常による ADH の合成・分泌低下、集合管の ADH 受容体の欠乏により ADH 作用障害が起これば、集合管での水分再吸収能が低下し、尿崩症からの多尿症状が見られ、脱水症状となる。逆に、肺の小細胞ガンなどの異所性 ADH 産生や、視床下部の腫瘍による ADH の過剰産生などによって、集合管での水分の再吸収能が高まると尿量が減少し、低ナトリウム血症、低浸透圧血症が現れ、脱力感や意識混濁が起こる。

また、遠位尿細管は、糸球体の血管極に接着しており、尿細管細胞の一部が小型の緻密斑と呼ばれる部位により尿量の増加を感知し糸球体濾過量を調節している。尿量が増加すると、輸入細動脈の平滑筋細胞を収縮させ、糸球体濾過量を減少させている。また、この部位は、血圧の調節にも関与している。輸入細動脈の平滑筋の一部は、顆粒細胞になっており輸入細動脈圧低下を感知し、レニンを分泌する。レニンは、血中のアンジオテンシノーゲンに分解されアンジオテンシン I となり、変換酵素によりアンジオテンシン II が生成する。アンジオテンシン II

は、全身の細動脈を収縮し血圧を上昇させる。その結果、糸球体の血圧も上昇し、糸球体濾過流量が維持されている。また、アンジオテンシン II は副腎皮質に作用しアルドステロンの分泌を促進する。アルドステロンは、集合管の Na^+ 再吸収を促進し体液量を増加させ、その結果、血圧が上昇する。

腎臓は、体液の pH の調節にも働いている。pH の調整は、肺と腎臓で行われており、肺では、 CO_2 を排出し、腎臓では、尿中へ H^+ を排出し、 HCO_3^- の再吸収を行い pH の調整を行っている。pH の調整は、近位細管細胞と集合管の間在細胞で、近位細管細胞内に拡散してきた CO_2 は、炭酸脱水酵素の働きで水と反応して H_2CO_3 となり、さらに H^+ と HCO_3^- となり、 HCO_3^- は間質側に輸送され再吸収される。 H^+ は、管腔側へ分泌され、尿中の HCO_3^- と反応して H_2CO_3 となり再吸収される。集合管の間在細胞でも炭酸脱水酵素の働きで H^+ と HCO_3^- が生成され、 H^+ は能動的に管腔側に分泌される。分泌された H^+ は、 NH_3 や HPO_4^{2-} と反応し NH_4^+ や H^3PO_4^- となり尿に溶解し体外に排出され、新しく生成した HCO_3^- も再吸収される。この結果、血液中の pH は約 7.4 に保たれており、血中の pH が酸性側に傾くとアシドーシス、アルカリ性側に傾くとアルカローシスとなる。腎不全により H^+ の排出が低下し、代謝性アシドーシスが起こることがあるが、肺からの CO_2 排泄増加によって代償されるため、重篤になることは希である。代謝性アルカローシスは、原発性アルドステロン症によるアルドステロンの過剰分泌や利尿剤の使用によって H^+ が過剰に排出され発症するが、これも肺からの CO_2 排出低下により代償される。

さらに、腎臓は、赤血球産生の促進にも関与している。血漿酸素分圧低下の刺激によって、尿細管間質にある特殊な繊維芽細胞からエリスロポエチンが分泌され、骨髄の赤血球系の造血細胞に働き赤血球の産生を促進する。腎不全などによってエリスロポエチンの分泌の低下は、赤血球産生が低下し腎性貧血を引き起こす。

腎臓は尿産生によって、水分や Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 、 Ca^{2+} などの電解質を調整し、さらに老廃物の排泄、血圧、pH の調整から赤血球産生の促進など代謝・内分泌の働きにも関与している。

腎機能検査法¹⁻³

腎臓が生体にとって果たしている役割を定量的に測定することを腎機能検査法と呼ぶ事が出来る。しかし、前項で述べた腎臓の働きそのものを測定することは不可能である。そこで、血流量 (クリアランス法)、排泄機能、水電解質調整機能、糸球体のタンパク質漏出の特性、形

態学的検査などが主流となり、直接的あるいは間接的に腎臓の働きの能力を推定することが出来る。

まず血流量測定として、生体の臓器のすべては血流によって栄養を供給され、臓器の仕事量が変化すると血流量も変化する場合が多い。また何らかの原因で臓器血流量が減少すると臓器機能も低下するのが普通である。そのため臓器血流の測定には機能検査の第一歩である。血流計の原理は、①一定時間に流れる血流量そのものを測定する方法、②回転血流計、③圧差法、④動圧法、⑤熱拡散法、⑥電磁法、⑦超音波法など直接測定のほか、⑧Fick法、⑨標識物質希釈法などの間接測定法がある。それぞれの装置について詳しい説明は省略するが、①～⑤は血管を切断するなど外科的侵襲が大きく、生理実験で動物を対象に精密な測定を行う際にのみ応用可能であり、臨床的には用いられない。また、⑥は血管の内部に手を加える事ははいが、血管を露出させねばならないので、①～⑤の方法より特に利点があるとはいえない。⑦～⑨はそのような欠点がないために精度などの点でいくつかの不利益があるにもかかわらず、臨床的に利用されている方法である。腎臓については臓器の部位が後腹膜腔の深部であるため、普通の生理学的方法是きわめて使いにくく、色素希釈法やFick法でも動静脈カテーテルの特殊な技術を応用しなければ適用できない。ところが、腎臓は尿が作られるという特徴があるためにクリアランス法を応用すれば容易に血流量の推定が可能になる。

クリアランス (Clearance) とは、クリアーにする清浄化するという字義が含まれている。具体的に、血液が1回腎を流れ過ぎる間に、ある物質がどの程度取り除かれているか定量的に表す数値である。腎静脈血漿中のある物質の濃度が腎動脈血漿中のそれより低い値を示すことは当然であるが、これは腎動脈血漿中と等しい濃度の血漿と全くその物質を含まない血漿とを混和したものと考えることができる。つまり、血漿は腎臓を通過することによって、後者に相当する血漿が完全に清浄化されたといつてよい。そこで、この血漿量によって物質に対する腎臓の除去能力を定量的に表すことができる。この値は先のFick法によって腎動静脈血中の濃度差から求めることが可能であるが、腎臓の場合はここで血漿から抜き取られた物質は原則として尿に排泄される。したがって、尿中排泄量を腎臓に流入する以前の血漿濃度で除すと、見かけ上清浄化された血漿量が求められる。

また、腎臓の機能の1つに代謝終末産物および外因性の異物の排泄がある。これを利用して外因性の標準物質を负荷した際の排泄能をもって、腎機能の尺度とする考えがある。腎から排泄される異物は多種多様であるが、この理屈からいうと、どの物質に対しても腎機能を推定することができる。しかし、現実には測定しやすく被験

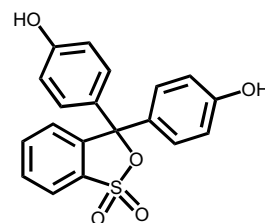


図3. PSPの構造

者に苦痛を与えない、体内で代謝を受けずに腎のみの影響を知る事が出来る、負荷量が少ない、急速に排泄され検査に時間がかからない等の条件からPSP (Phenolsulfophthalein) が用いられている (図3)。

PSP試験は、1912年に筋注法が考案されたが、1933年には現在標準化している静注法が開発され、初期負荷量は6mgとされており、これを1回注射の形で急速に静脈内に投与し、以後15分、30分、60分、120分ごとに完全排尿した試料についてPSP量を測定する。測定にはPSPがpH指示薬であることを利用し、アルカリを加え発色させ比色定量する。

ところで、尿中排泄量から腎臓の機能をうかがおうとする試みは、内因性の窒素化合物については成り立たない。これは尿中の窒素化合物の排泄は、腎機能に関係なくほぼ一定だからである。もちろん腎障害が極端に進行した場合や、無尿に陥った場合はこのかぎりではないが、PSP試験のようにわずかの腎機能の変化を反映することは期待できない。その理由は尿中に排泄されるべき窒素化合物の量はその人の代謝要求によって決まり、疾病の有無にはあまり関係しないこと、したがって体内で作られた窒素代謝終産物は全てが尿中に排泄される訳ではない等の理由である。

腎臓のホメオスタシス維持機構の目標の1つは体液の水・電解質調節である。したがって、腎臓機能障害の程度を、調節を受ける側から推定する事が理論上可能である。測定項目としては、体液浸透圧、ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオン、その他のイオン (カルシウム、マグネシウム、有機酸など)、pHが挙げられる。

糸球体の役割は限外濾過であるが、腎障害に際してはしばしば異常がみられ、その表れ方としてタンパク尿がある。健康人の尿には、タンパク質は出現しないとされているが、厳密に測定すると1日尿タンパク質排泄量は100~150mgが排泄されている。その由来は、糸球体で濾過された少量の血漿タンパク質のうち、尿細管で再吸収されなかった僅かな量のタンパク質に尿細管から分泌されるタム・フォルスフェームムコタンパクが加わったものである。糸球体の限外濾過特性が、分子量で

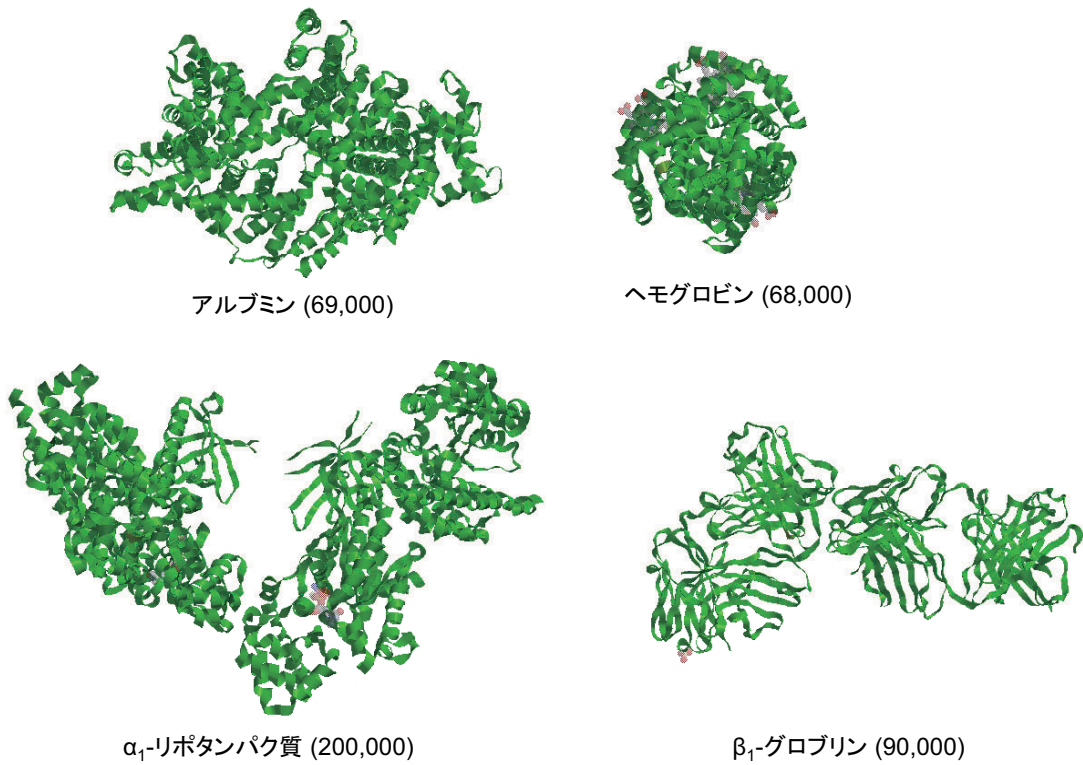


図4. ヒト血漿タンパク質の分子構造

約70,000以上の物質を通さないという性質があり、アルブミンの分子量は約68,000であり多少の漏れ出る可能性があるが、アルブミンは1日約40gが糸球体から漏れ出るが、尿細管で再吸収される。ヘモグロビンの分子量は約68,000であり、血管内で溶血が起こると糸球体を通して血色素尿が認められる。ヘモグロビンは通常尿細管に出現することが無いため再吸収機構は存在していない。より分子量の大きな血漿タンパク質、各種グロブリン、リポタンパクなどは通常糸球体で限外濾過されることはない。しかし、腎臓の障害によって糸球体が破壊されると、程度に応じて様々な血漿タンパク質が尿中に出現する(図4)。

形態学的検査としては、腎盂造影法とラジオレノグラム・レノシンチグラムがある。腎盂造影法は、腎臓から選択的に排泄される造影剤を用いて、腎全体の大きさと腎盂、尿路系の形態を知るもので、経時的に観察することで、各部位の機能を大まかに知る事が出来る。ラジオレノグラム・レノシンチグラム検査方法は、核医学の一部であり、ラジオレノグラムが排泄性の ^{131}I -hippuranの様な物質を用いて放射活性の経時変化を追うのに対して、レノシンチグラムは、 ^{203}Hg -chlomerodrinのように腎臓に長時間停滞する物質に標識して、腎臓の形状を捉えようとしている(図5)。

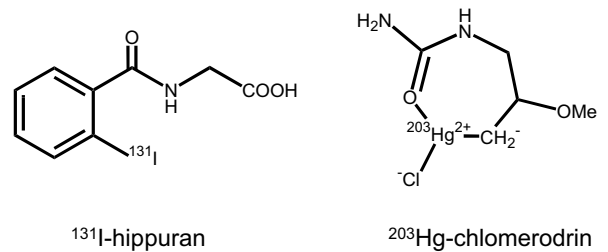


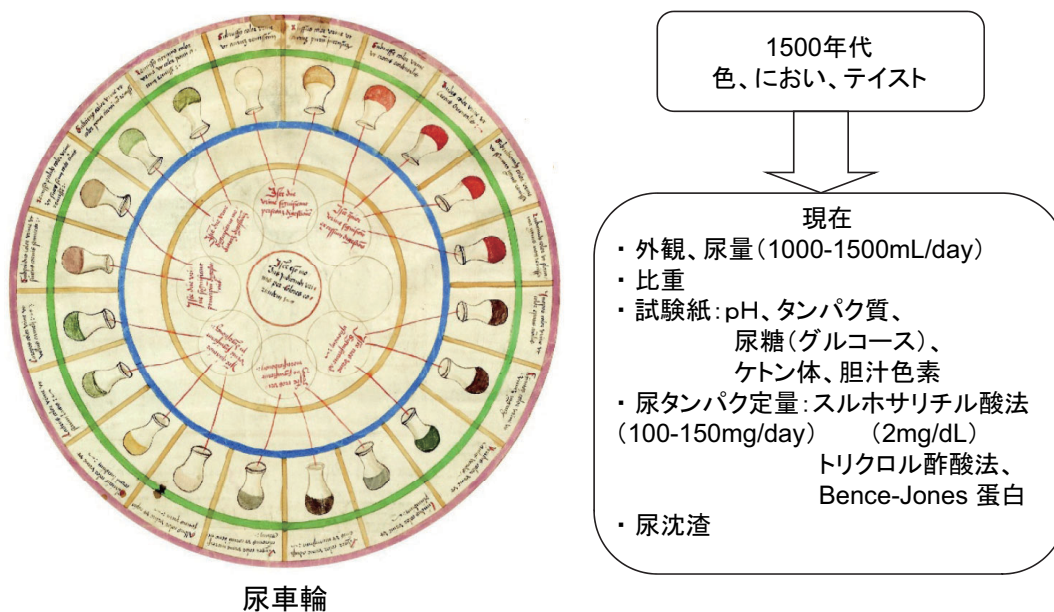
図5. ^{131}I -hippuran と ^{203}Hg -chlomerodrin の構造

一般尿検査と疾患^{4, 5}

尿は血液や臓器とは異なり非侵襲的に得られ、古くから代謝の鏡をいわれており、紀元前400年代の「ヒポクラテスの箴言」にも残されているように歴史的も最も古い臨床検査である。中世西洋では、尿車輪を用いてその人の病状からときには運命まで占った(図6)。

尿には、種々の代謝産物、有機・無機物質あるいは異常物質などが排泄される。尿成分は、表1に示すように化学成分、少量の有形成分とからなるが、その組成は血清成分に比べ著しく変動しやすい(表1)。

これら尿成分の有無・増減を検査することは、腎・尿路系疾患はもとより、全身性疾患の診断、治療、予後、



尿車輪

図6. 尿車輪と現在の尿検査法

表1. 尿成分 (成人男子)

検査項目		正常値	単位
一般性質	尿量	600~1,600	ml/day
	比重	1.006~1.022	
	pH	4.8~7.5(6.3)	
	滴定酸度	20~50	mEq/day
	氷点降下度	0.9~2.3	°C
	浸透圧	50~1,300	mOsm/kg
	水分	90~95	%
有機成分	固形成分	30~70	g
	総窒素	10~5	g/day
	尿素	10~30	g/day
	尿酸	0.4~1.2	g/day
	アンモニア	0.3~1.2	g/day
	クレアチン	10~50	mg/day
	クレアチニン	1.0~1.5	g/day
	アミノ酸	0.2~0.7	g/day
	馬尿酸	0.2~0.6	g/day
	インシカン	5~20	mg/day
	アセトン	10~20	mg/day
	ワロビリノゲン	0.5~2.0	mg/day
	タンパク質	100~150	mg/day
グルコース	40~85	mg/day	
無機成分	食塩	10~15	g/day
	ナトリウム	4~6	g/day
	カリウム	0.8~1.6	g/day
	カルシウム	0.1~0.3	g/day
	マグネシウム	0.1~0.2	g/day
	塩素	10~15	g/day
	総硫酸	1.5~3.0	g/day
	エーテル硫酸	0.1~0.3	g/day
	リン	0.5~2.0	g/day
鉄	0.1~0.2	mg/day	

予防の判定に役立つ。さらに尿は採取が容易で、患者・被験者に苦痛を与えない。また検査方法も現在ではほとんどが、試験紙法によるため簡易・迅速化されていること、そのため繰り返し検査が可能であるなど利点がある。これらの理由により尿解析は、日常臨床、集検、入社検診、生命保険加入時診査、患者のセルフヘルスチェックなど多方面で実地されている。

一般的な尿解析方法としては、尿量、外観、pH、比重、タンパク質、赤血球（尿沈渣・尿潜血）、尿糖（グルコース）、ケトン体、胆汁色素、尿沈渣がある（図6）。

健常成人では、1日600~1,600 mLの尿を排泄する。500 mL以下を乏尿、2,000 mL以上を多尿といい、乏尿をきたす疾患としては、腎炎、急性腎不全、多尿期、急性尿細管壊死、ショック、心不全、脱水症状（激しい下痢、激しい嘔吐）、尿路閉塞がある。多尿をきたす疾患としては、真性尿崩症、糖尿病、腎性尿崩症、急性腎不全、多尿期、心因性多飲症が挙げられる。

尿色調は正常尿では、ウロクロームという色素により淡黄褐色（麦わら色）をしていが、異常着色尿では種々の色調を示す（表2）。

混濁をきたす原因は細菌、白血球の増加（膿尿）、血尿、脂肪球の増加、塩類の増加がある。また、正常尿は揮発性酸による特有の芳香香がある。アンモニア臭は細菌尿にみられ、細菌の尿素分解による。不快臭は尿路感染症や腐敗尿により、アセトン臭は重症糖尿病例、飢餓状態でみられる。特殊な例として、先天性アミノ酸代謝異常症のカエデシロップ尿症でのカエデシロップ様の芳香臭、フェニルケトン尿症のネズミ尿臭がある。

表2. 尿色調

色調	原因
水様～淡黄	希薄尿
乳白	脂肪尿、乳び尿、リン酸塩、膿尿、細菌尿
鮮黄	リボフラビン、ビタミンB複合体、キナクリン
橙	濃縮尿、ウロビリノ尿(大量)、ビリルビン尿(軽度)、フェナゾピリジン、センナ、サントニンなど
茶～黄褐	ビリルビン尿(大量)、センナ、ダイオウなど
赤～赤褐	血尿、ヘモグロビン尿、ミオグロビン尿、ホルフィリン尿、PSP、センナ、ダイオウ、アロエなど アンチビリリン、アミドビリリン、サルファ剤など
暗褐～黒	メトヘモグロビン、血尿、ヘモグロビン尿、ミオグロビン尿、メフニン尿、アルカトニン尿、レボドーパ、キニーネ、センナ、フェノール類など
緑～青	インジカン尿、ビリルビン尿、細菌尿(緑膿菌感染)、インドシアニングリーン、インジゴカルミン、エバンスブルー、メチレンブルー、アミトリプチリンなど
緑褐～赤褐	ペルドグロビン、血尿(嚥状)

表3. 尿 pH の変動と病態

持続性酸性尿	糖尿病性アシドーシス、脱水症(激しい下痢、肌痙、発熱など)、呼吸性アシドーシス、(肺炎腫、気管支炎など)、フェルリケチン尿症、アルカトニン尿症
持続性アルカリ尿	尿路感染症(プロテウスなど)、呼吸性アルカローシス(過呼吸、心不全時)、代謝性アルカローシス(アルカリ過剰摂取、激しい嘔吐による胃酸損失)、腎不全、アルドステロン症、副腎皮質ホルモン剤やウィアゾリド系降圧利尿剤服用時
治療目的での尿酸性化	結石治療(リン酸Mg、炭酸Ca、リン酸アンモニウムMg、結石)、尿路感染症治療(尿素分解菌)、浮腫治療(水銀系利尿薬投与)
治療目的でのアルカリ化	結石治療(シュウ酸、シスチン、尿酸による結石)、尿路感染症の化学療法時(サルファ剤)

健常人では、普通の食事を摂取している場合の尿 pH は、4.6~7.8で、平均6.3と弱酸性である。一方、血液は pH7.4と固定されている。したがって、血液成分が腎臓で濾過されて尿に出てくるまでには、pH7.4→6.0へと変化しなければならず、生体内には多量(1mEq/kg)の酸が産生されており、前項で述べたように腎尿細管がH⁺を排泄し、血液のpHの恒常性を維持している。一般にタンパク質摂取(肉食)の多いときには尿pHは低く、植物性食品の多いときには高い傾向を示す。なお、尿を放置すると細菌の有する尿酸分解酵素の働きで尿素が分解してアンモニアを生じ、アルカリ性に傾くので新鮮尿で検査する必要がある。測定方法は、試験紙を用いており、試験紙部分はメチルレッド(pH領域:4.6~6.2)、プロモチモールブルー(pH領域:6.2~7.8)、の複合指示薬からなり、pH5~9まで大まかな尿pHの測定が可能である。持続性の酸性尿、アルカリ性尿は病的と考えられ、また治療を目的とした薬剤、食事などにより尿pHを変化させる場合がある(表3)。

尿の比重は尿に含まれる溶質の質量を表している、臨床的には腎臓の濃縮力が正常か異常か、脱水状態か、水分過剰摂取か、異常物質の排泄がないかを知る簡単な検査である。生体では、血液の浸透圧を正常に維持するため、腎臓は希釈尿を作ったり、濃縮尿を作ることで調節をはかっており、その働きは主に腎髄質のヘレン系および遠位尿細管で行われ、そこには抗利尿ホルモン(ADH)が関与している。健常人尿に含まれる有形成分のうち主成分は食塩(10~15g/day)、尿素(15~30g/day)

であり、尿比重はこの2成分により支配されている。試験方法としては、屈折型比重計が頻用されているが、試験紙法も用いられている。試験紙法は、多項目試験紙に組み込まれているため、ほかの検査項目と同時に測定することが出来る。尿の比重は主として尿に含まれる食塩(Na⁺とCl⁻)の濃度に比例するので、尿中のNa⁺を化学的に測定し呈色反応から間接的に比重を知る事が出来る。試験紙部分には、高分子電解質が含まれており、この-COOH基のHは、尿中陽イオンと容易に置換されて遊離し、これが試験紙中のpH指示薬(BTB)と反応し、呈色する。なお、尿素は、食塩に次ぐ尿比重を決定する成分であるが、イオン化しないため測定することが出来ない(図7)。

尿比重の正常値は通常1.015~1.025で、尿量により変化する。低比重尿で尿量が多ければ尿崩症、高比重で尿量が多ければ糖尿病の可能性が疑われる。また、1.010前後の低比重を持続するものを等張尿といい、腎臓が尿の濃縮も希釈も出来なくなった証拠であり、腎不全の重要な指標となる。

健常人でも少量のタンパク質が尿中に排泄されているが、通常のタンパク質定性検査法では検出することが出来ない。尿中のタンパク質の2/3は血漿タンパク質に由来し分子量が比較的小さく(70,000以下)、絶対量の多いアルブミンが出現しやすい。その他α-糖タンパク質、トランスフェリンが少量排泄されており、残りの1/3は尿細管に由来し、その大部分はウロムコイドと呼ばれる糖タンパク質で、その代表が尿円柱の基質ともなるタム・フォルスファームムコタンパクである。尿タンパク質が排泄される機序は、糸球体基底膜のふるいの目とタンパク質分子の大きさとの関係と、タンパク質および基底膜の荷電状態が関与している。

尿タンパク質の測定には、煮沸法、試験紙法、スルホサリチル酸法が多用されているが、試験紙法が簡易でよく用いられ、スルホサリチル酸法を併用することで、より低濃度の尿タンパク質が検出することが出来る(表4)。

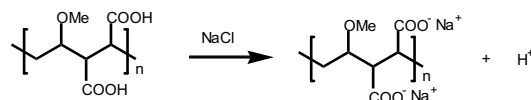


図7. 高分子電解質の構造と反応

表4. 各種尿タンパク質の検出方法

	試験紙法	スルホサリチル酸法	煮沸法
原理	pH指示薬のタンパク誤差	顔によるタンパク質の変性混濁	熱によるタンパク質凝固
感度	10~20mg/dL	5mg/dL以上	20mg/dL以上
特異性	アルブミン	アルブミン、グロブリン	アルブミン、グロブリン
偽陰性	pH8以上のアルカリ尿、ポリビニルピロリドン、キニーネ、逆相石鹸の混入	X線造影剤、チキストラン、ベニシリン系薬剤、ムチン、トルブタマイドの混入	塩類の混入
偽陰性	pH8以下の酸性尿	pH8以上のアルカリ尿	pH8以上のアルカリ尿

試験紙法は、1957年に Free らによって開発された方法で、反応の原理は1910年、Soerensenによって発見された pH 指示薬のタンパク質誤差である。これは、pH 指示薬による溶液の pH 測定に際し、溶液にタンパク質が存在すると真の pH の値を示さない現象を利用したものである。試験紙には指示薬としてテトラブロムフェノール青 (TBPB)、緩衝液としてクエン酸とクエン酸ナトリウムが含まれている。反応部位の被検尿はこの緩衝液により pH3に維持されるが、タンパク質を含むと TBPB の変色点 pH3~4が pH2~3に変わって青色を呈し、この色調からタンパク量がわかる (表5)。

スルホサリチル酸法は、3%酢酸数滴を加えてタンパク質の等電点付近に近づけた尿に強酸であるスルホサリチル酸を加え、凝固の度合いを見る方法で、現在の試験法の中では測定感度が最も高く、本法で陰性なら尿タンパク陰性と判断されている。本法は膀胱や生殖器由来のムチン、酢酸体、アルブミンにも反応する。また Bence-Jones タンパク質にも反応するため、本法で尿タンパク質陰性の尿は、Bence-Jones タンパク質 (-) と判断することが出来る。ただし、酸可溶性タンパク質 (ウロムコイド) には反応しにくい。Bence-Jones タンパク質は、分子量45,000の病的タンパク質で、免疫グロブリン軽鎖の二量体よりなり、分子量が小さいため容易に尿中に排泄される。Bence-Jones タンパク質は、多発性骨髄腫や原発性マクログロブリン血症の約半数の例で陽性を示し、さらに、アミロイドーシス、悪性リンパ腫、慢性リンパ性白血病にでもまれに認められている。

煮沸法は、もっとも古典的な方法であり、感度は鈍いがタンパク質に対する特性は最も高い、本法操作時にリン酸塩や炭酸塩が析出し混濁することがあるが、これは酢酸を添加すると消失する。加熱の途中 (60℃付近) で凝固混濁し、さらに煮沸することで混濁が消える場合、Bence-Jones タンパクの存在が疑われる。

尿タンパク検査で陽性を示した場合、しばしば定量測定が行われる。尿タンパク質の定量法には、スルホサリチル酸光電光度法およびその改良法の Meulemans 法や、ビウレット法、トリクロロ酢酸法、色素結合法など多数あるが、これらのうちスルホサリチル酸光電光度法が多用されている。どの定量法も再現性は血液化学検査に比べ著しく悪く、例えば、100mg/dl のタンパク尿をスルホサリチル酸光電光度法で測定した場合、ある施設では 50mg/dl、別の施設では150mg/dl と出てしまう。標準物質は、ウシアルブミンが用いられている。その他、色素法として Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB-G250) 定量法があるが、スルホサリチル酸光電光度法と比較した場合、CBB-G250法の方が約2倍の高値を示す。これは、スルホサリチル酸光電光度法では検出されない酸可

溶性タンパク質も測定されるからである。

タンパク尿をきたす疾患として、糸球体基底膜透過性が亢進して血漿タンパク質が大量に濾過され、尿細管の再吸収能を上回るため尿タンパク質が出現する糸球体疾患 (糸球体腎炎など)、尿細管疾患 (重金属、薬剤による腎障害、急性腎不全、慢性腎不全、ファンコーニ症候群など) では糸球体で基底膜より濾過された微量のタンパク質が尿細管障害のため再吸収されず尿中に出現する。この場合は、主として分子量4万以下の低分子タンパク質が出現する。腎前性タンパク尿は、糸球体基底膜の透過性や尿細管の再吸収能に異常はないが、血中に異常に増加したタンパク質が糸球体濾過中に漏出し、さらに尿細管での再吸収能を上回るため出現する。これは、オーバーフロー型タンパク尿と呼ばれ、Bence-Jones タンパク尿、ヘモグロビン尿などがこれにあたる。腎因性タンパク尿は、糸球体基底膜の透過性や尿細管の再吸収能に異常が認められないが、腎由来のタンパク質が尿中に直接排泄される場合である。この様に、種々の疾患の異常で尿タンパク質が検出されるので、特にスクリーニング的な診断価値が高い (表6)。

多くの腎・尿路系疾患では初期のころから血尿が見られるのでスクリーニング検査として尿中赤血球の観察は重要である。赤血球の測定には、尿沈渣鏡検による赤血球数計測と試験紙法による赤血球由来のヘモグロビンをみる潜血反応の2法がある。尿沈渣とは、尿を遠心分離して得られる沈殿成分のことで、これを鏡検すると、血球、上皮細胞、円柱、結晶、細菌など多数の成分が認められ、腎・尿路系疾患の診断には不可欠な検査である。通常は無染色標本で観察するが、厳密に行う場合には染色を施して観察される。一般に強拡大1視野あたり3個

表5. 尿タンパク質試験紙の反応

	pH2	pH3	pH4
クエン酸緩衝液 TBPB タンパク質(-)	黄色	黄色	青色
クエン酸緩衝液 TBPB タンパク質(+)	黄色	青色	青色

表6. タンパク尿と疾患

疾患	タンパク質
正常	タム・フォルスファームムコタンパク、アルブミン(微量)、尿細管タンパク質(微量)
糸球体性タンパク尿	アルブミン、グロブリン、トランスフェリン、尿細管タンパク質(微量)
尿細管性タンパク尿	β_2 -ミクログロブリン、レチノール結合タンパク質、リゾチーム
腎前性タンパク尿	Bence-Jonesタンパク、ヘモグロビン、ミオグロビン、アミラーゼ
腎因性タンパク尿	タム・フォルスファームムコタンパク、糸球体基底膜のタンパク質、尿細管細胞のタンパク質、分泌型IgA、ウロキナーゼ

以上の赤血球が確認された場合、有意の血尿と判断される。尿潜血反応は、ヘモグロビンの有するペルオキシダーゼ様作用を応用したもので、試験紙に含まれる過酸化物をヘモグロビンのペルオキシダーゼで分解し、生じた酸素によって試験紙に含まれている色原体（無色）を酸化型色原体（発色）とする方法である。用いられる色原体は大部分が α -トリジンでもとともは無色だが、試験紙部分をあらかじめ黄染してあり、酸化型になることで黄+青→緑の色調を呈色する。試験紙には、溶血促進剤が含まれており、赤血球が試験紙と接触すると溶血してヘモグロビンが露呈し反応が進行する。

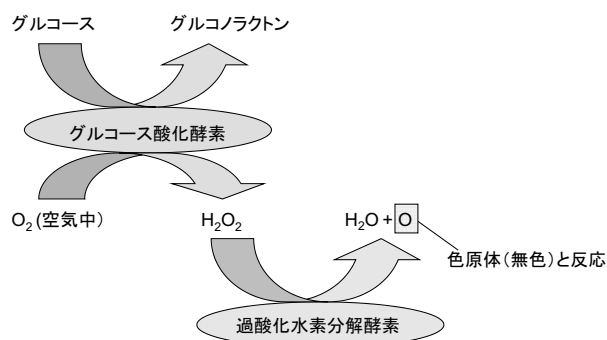


図 8. 試験紙法による尿糖測定原理

血尿をきたす疾患として、一般に内科的血尿（ネフロンの変）では持続的かつ顕微鏡的血尿を呈し、尿はコーヒー様褐色調を帯び、赤血球は変形し、赤血球円柱も同時に認められることが多く、糸球体腎炎、腎盂腎炎、水腎症、全体性疾患（高血圧、心疾患、膠原病、糖尿病、出血性素因）が挙げられる。一方、泌尿器科的血尿（腎杯以降の尿路疾患や腎外傷など）では間欠的な肉眼的血尿を呈することが多く、また色調も鮮赤色で凝血塊を伴うこともあり、赤血球の変形は少なく形はそろっており、腎腫瘍、嚢胞腎、腎結核、腎外傷、腎梗塞、腎結石、尿管炎、尿管結石、尿管腫瘍、膀胱腫瘍、異物、憩室、膀胱結石、膀胱炎、前立腺炎、前立腺肥大症、前立腺腫瘍、尿道炎、尿道腫瘍、尿道結石、隣接臓器からの混入（骨盤膿瘍、子宮癌、卵管炎、精囊炎、膣炎、膣腫瘍）が挙げられる。

血中の糖は、糸球体基底膜で血中と同濃度で濾過されるが、近位尿細管でほとんど完全に再吸収される。尿糖には、グルコース尿、ガラクトース尿、果糖尿、ペントース尿、乳糖などがあるが、一般に尿糖といえばグルコース尿を指す。腎でのグルコース排泄閾値は170mg/dl前後で、血糖値がこれを超えると尿中に排泄され、健康人の1日の尿中グルコース排泄は約200mg程度であり通常の定性検査では検出されることはない。現在多用されている尿糖の定性および定量検査法は、還元法、縮合法、カラメル法、酵素法（グルコース酸化酵素法、ヘキソキナーゼ法、グルコース脱水素酵素法）が挙げられる。中でも、定性・定量法ともグルコースの特異性の高い試験紙法による酵素法が用いられている。試験紙法は、1956年に Comer や Free らによって開発されたもので、還元法のように尿を煮沸したり、アルカリを加えたりなどの操作がいらず、尿に試験紙を浸すだけで即座に結果を得ることが出来る。試験紙には、グルコース酸化酵素と過酸化水素分解酵素とが含まれており、色原体（無色）を酸化型色原体（発色）とする方法である。尿糖をきたす疾患は、糖尿病である（図8）。

ケトン体（アセト酢酸、アセトン）、 β -ヒドロキシ酪

酸は、肝臓において脂肪酸より生成され、血中に放出されると肝以外の組織で酸化され、CO₂と水になる。さらに、アセトンは呼気中に排出され、血中には殆ど存在しない。健康者では、血中にはアセト酢酸25~30%、 β -ヒドロキシ酪酸65~75%の割合で存在し、両者を合計しても、アセトン量にして0.2~2mg/dlであり、尿中排泄もアセトン量にして1日40~50mg程度しかない。ケトン体は正常中間代謝産物であるが、脂質の代謝が亢進し、糖質の代謝が低下すると尿中に大量に出現する。ケトン体の測定方法は、試験紙法、Rothera-吉川法などがあるが、いずれもニトロプルシド反応による。すなわち、アルカリ溶液中でニトロプルシドナトリウムがケトン体によって紅紫色に変化することで確認している。試験紙法は、アセト酢酸にもっとも敏感（5~10mg/dl）に反応し、ついでアセトン（50mg/dl）に反応するが、 β -ヒドロキシ酪酸には反応しない。ケトン体をきたす疾患として、糖質の補給が不十分なときに、脂質代謝が進み、脂質酸化過程で体内で CoA が β -ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸へと分解されていく。これらケトン体は腎閾値を越えると尿中に排出され、アセト酢酸になり、自然に脱炭酸してアセトンを形成する。糖脂質代謝に変調がある場合にケトン体産生が高まり、尿中に排泄される。ケトン体のうち増加するのはアセト酢酸と β -ヒドロキシ酪酸の両者であり、内科領域（糖尿病、糖尿病ケトアシドーシス）、産婦人科領域（妊娠悪阻、妊娠中毒症）、小児領域（自家中毒、周期性嘔吐症、消化不良症）、外科領域（麻酔後）その他（飢餓、発熱、栄養不良、脱水症、激しい嘔吐、重症肝障害）の疾患を引き起こす。糖尿病性昏睡と同様の糖代謝異常の1つである乳酸性アシドーシスでは、ケトン体のうち β -ヒドロキシ酪酸のみ増加するため試験紙法では陽性とはならないことがあるので注意が必要である。

赤血球は120日の寿命をもって破壊され、血中に遊出したヘムは脾臓などの細網内皮系に取りこまれて間接型ビリルビンが生成される。間接型ビリルビンは、血漿タ

ンパク質と結合して肝臓に運ばれ、グルクロン酸抱合を受け水溶性の直接型ビリルビンへと変化する。この直接型ビリルビンは胆汁の成分として胆道を経て腸管に排出され、下部結腸で腸内細菌の働きで還元されウロビリノーゲンに、さらに酸化されてウロビリリンとなる。こうしてできたウロビリリンの大部分は、糞便中に排泄されるが、一部は腸管から再吸収され、門脈をへて肝臓に運ばれ、肝細胞で酸化され直接型ビリルビンとなり再び胆汁中に排泄される。しかし、ウロビリノーゲンの一部はビリルビンにならずにそのまま大循環系→腎臓を経て尿中に排泄される。したかつて、健康人の尿中には微量のウロビリノーゲンが検出される。一方、ビリルビンは、腎臓での排泄閾値が血中ビリルビン濃度として2~4mg/dlであり、正常血中総ビリルビン濃度は1.4mg/dl以下であるため健康人尿からビリルビンは検出されない。尿中に検出されるビリルビンの大部分は直接型ビリルビンであり、尿中ビリルビン陽性は血中ビリルビン増加を意味する。

尿中のビリルビンおよびウロビリノーゲンの測定は、肝臓、胆道、溶血性疾患の病態把握に有効であり、目で見て明らかな黄疸症状が出る前の潜伏性黄疸、また多くの肝臓機能検査が異常を示す前に尿検査結果が陽性を示す場合があるためスクリーニング検査として価値が高い。尿ビリルビン測定法は、定性検査が主流であり尿ビリルビンは放置すると光分解、酸化しやすいので新鮮尿を用いる。Harrison法、Gmelin法など尿ビリルビンを酸化させて緑色に呈色させる方法が用いられてきたが、ジアゾ反応による試験紙法が頻用されている。ジアゾ法には錠剤法もあり、感度は錠剤法の方が良い。ウロビリノーゲンの試験紙法には、アルデヒド法とジアゾ法が用いられている。

尿ビリルビンをきたす疾患として、胆管系の閉塞（胆石症、胆管炎、胆道腫瘍）、肝障害により肝細胞から毛細胆管への排泄困難（ウイルス性肝炎、肝硬変症、薬物性肝障害）などがあり、尿ウロビリノーゲンをきたす疾患として、先天性・後天性溶血性貧血、肝炎、肝硬変症が挙げられる。

尿沈渣とは、尿中赤血球で述べたように、尿を遠心・濃縮することによって得られる尿の沈殿成分のことで、各種の尿中有形成分（血球、上皮細胞、円柱、結晶、その他）から成る。これを顕微鏡で観察すれば、腎臓・尿路系疾患の診断に不可欠な多くの情報を得ることが出来る。特に腎疾患においては、診断、活動性、経過、予後を推測することが可能で、腎生検に匹敵する効果もたらすこともある。

このように、尿解析は臨床現場で最も広く使われる臨床検査の1つとなっている。しかしながら、近年、尿解

析をより詳しく泌尿生殖器疾患の病体メカニズムの複雑さを探究するための腎臓学、さらに非泌尿生殖器疾患から代謝表現型バイオマーカー発見に至るまで広範囲フィールドでの応用が求められてきている。そこで、新たな尿解析技術としてヒト尿プロテオミクス解析およびメタボロミクス解析が臨床応用に最も適していると考えられ出現した。

ヒト尿プロテオーム解析およびメタボロミクス解析

遺伝子産物であるタンパク質は最終的な生体機能を担っており、疾患に対して直接的な関連付けが可能である。また生体内には核酸やタンパク質のほかに、糖、有機酸、アミノ酸など多くの低分子化合物が存在し、これらの物質の多くは酵素などの代謝活動によって作り出された代謝物質である。現在では、生体の機能から解析されてきたタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）および代謝産物の網羅的解析（メタボロミクス）にシフトしており、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析では、いままでの手法では発見できない疾患関連タンパク質・因子を発見できる可能性が高いと考えられている。技術面では、田中耕一⁶、J.B.Fenn⁷らが開発したMALDI(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)法、ESI(Electrospray ionization)法などのソフトイオン化法により質量分析装置に画期的な技術革新をもたらし、従来では検出不可能であったタンパク質、ペプチドの解析が可能となり、プロテオーム解析およびメタボローム解析が急速に進展している。MALDI-MS、ESI-MSによりタンパク質などの生体高分子解析が可能になり、プロテオミクス研究に質量分析装置は必須の分析手段となっている。また、ESIによって液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)、キャピラリー電気泳動/質量分析(CE/MS)が実用化され、生体試料に含まれる微量の代謝産物を誘導化せずにそのまま分離・同定・定量することが可能になった。ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)をはじめ、LC/MS、CE/MSの実用化により、メタボロミクス研究にも質量分析装置は必須な分析手段となっている。

血清に比べ著しく変動しやすい尿試料を用いたプロテオーム解析研究およびメタボローム解析研究では、腎・尿路系疾患だけでなく全身性疾患の診断、治療、予後、予防の判定、さらに新たな創薬ターゲット、バイオマーカー探索において重要な役割が期待されている。

尿解析について、米国化学会の情報部門であるCAS(Chemical Abstracts Service)が提供する情報検索サービスとMEDLINを情報源として検索を行った結果、尿解析では60,116件の論文が検索され、そのうちヒトを対象とした論文は32,828件、さらに、プロテオーム解析

は144件、メタボローム解析は、74件が検索された。プロテオーム解析としては1996年以降、メタボローム解析としては2003年以降研究が進められている(図9)。

2008年には腎臓と尿プロテオームプロジェクト(The Human Kidney and Urine Proteome Project; HKUPP)から尿プロテオーム解析標準化のためのガイドライン⁸として、採尿法(早朝第二尿の中間)、防腐剤の必要性(必要、室温、8時間以内、4℃、16時間以内)、タンパク質分解酵素の必要性(必要なし)、前処理と保存法(30分以内に低速遠心、細胞成分、円柱除去後、凍結保存)、質的差異(性差、年齢、人種、運動負荷、食事など)、標準的プラットフォーム(今後の課題)、MSデータベース化(今後の課題)などの提案がなされている。また、幾つかの尿プロテオーム解析のための尿試料調整法⁹⁻¹²も報告されている。

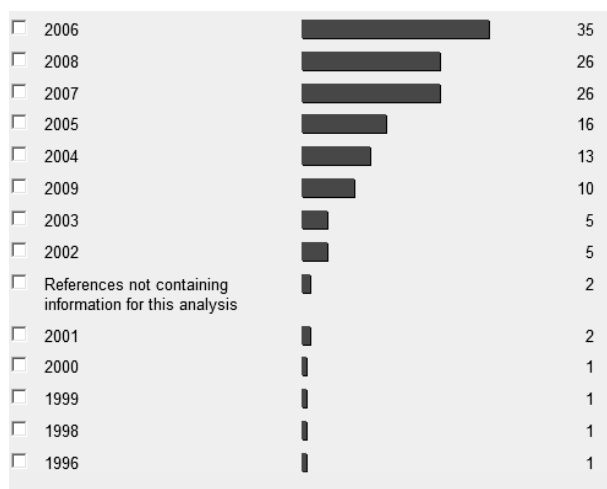
プロテオーム解析を用いた研究として癌研究とその他の疾患に大別して述べる。まず、膀胱癌に対して、健常人(5人)と膀胱癌患者(4人)の尿微小粒子の比較から特異的な8タンパク質を見出し¹³、膀胱癌患者(40人)、健常人(32人)、良性前立腺肥大症(7人)の比較からマトリックスメタルタンパク質分解酵素-2(matrix metalloproteinase-2; MMP-2)、-9(MMP-9)、フィブロネクチンが二次元電気泳動で識別され¹⁴、尿中の核マトリックスタンパク(nuclear matrix protein; NMP22)を用いた腫瘍マーカーのテスト¹⁵、2D-DIGE(two-dimensional gel-based proteomic approach)¹⁶あるいはSDS-PAGEとMALDI-TOF MS¹⁷を用いた腫瘍マーカー探索、膀胱移行上皮癌患者、他の泌尿生殖器病患者と健常人の94試料についてSELDI-TOF(surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight)MSを用いた集合的解析¹⁸、膀胱移行上皮癌の予後診断¹⁹、ヒ素汚染された飲料水摂取とHBD-1(human beta-defensin-1)ペプチドの減少と膀胱癌の関係²⁰など報告がなされている。

前立腺癌では、407人分の患者サンプルを用いたMALDI-TOF/MS解析²¹、尿バイオマーカーのためのプロテオーム戦略と可能性²²、組織学的に前立腺癌が確認された患者(6人)と良性前立腺の増生を有する比較人(6人)のMALDI-TOF/MS解析によるバイオマーカー探索²³などが報告されており、さらに、子宮頸管癌患者、妊婦および非妊婦を対象とした血清および尿解析のLS/MSの時間配列アルゴリズム解析²⁴、膵臓癌に対して、健常人(15人)癌患者(24人)慢性膵炎(11人)を対象とした研究では慢性膵炎で特異的な尿バイオマーカーの可能性が見出され²⁵、肺癌について、健常人と肺癌患者とを二次元電気泳動を用いた比較²⁶、上皮性卵巣癌では、血漿、尿試料から80タンパク質のバイオマーカーの最終候補²⁷が報告されている。

また、癌以外の疾患として、腎疾患に対するバイオマーカー探索²⁸⁻³⁰、腎機能の異なったレベルの患者に対して、MALDI-TOF/MSおよびSELDI-TOF/MSを用いた網羅的バイオマーカー探索の研究³¹、プロテオームプロファイルに対する尿pHの効果³²、136疾患から1,028血漿タンパク質と127疾患から577尿タンパク質との分子バイオマーカーネットワークモデルの提唱³³、糖尿病と2つの合併症(冠動脈疾患と糖尿病性腎症)のために尿のバイオマーカー探索³⁴、尿試料を用いたLC/MS/MSのペプチド保持時間データベースの検討³⁵、腎臓移植時の慢性同種移植機能障害のためにバイオマーカー探索^{36,37}、冠動脈疾患の症状を訴えている患者(67人)の尿CE/MSパターン解析³⁸、慢性腎臓病でのバイオマーカー評価のための定量的尿プロテオーム分析³⁹、腎臓移植の後の尿プロテオーム解析⁴⁰、臨床現場での尿プロテオーム解析^{40,41}、SELDI-TOF/MSを用いたループス腎炎のバイオマーカー探索⁴²、糖尿病性腎症のバイオマーカー探索⁴³、新生児での尿のポリペプチドの分析からの尿管腎盂移行部接合(unilateral ureteropelvic junction; UPJ)障害のバイオマーカー探索⁴⁴、アンギオテンシン変換酵素阻害薬(angiotensin converting enzyme inhibitors; ACEi)に対するIgA腎症(IgAN)疾患に対するバイオマーカー探索⁴⁵など多岐にわたって報告がなされている。

次に、尿メタボローム解析については、尿中メタボロームの相対濃度のパターンと、被験者の血圧との関連が統計的解析によりバイオマーカー候補の代謝物質が複数発見され⁴⁶、また、血漿と尿試料を用いたフラビンのCE/MS分析⁴⁷、GC/MSを用いた先天性代謝異常の突然変異へのアプローチ⁴⁸⁻⁵⁰、頭蓋変形新生児のGC/MSを用いた尿のステロイドのプロファイリング⁵¹、HILIC/LC/MS(Hydrophilic interaction chromatography)、RP/UPLC/MS(reversed-phase ultra performance liquid chromatography)、GC/TOF/MS(gas chromatography time-of-flight mass spectrometry)を用いた腎細胞癌の検出(RCC)適合性ためのバイオマーカー探索⁵²、新生児(24,000人)による大規模な網羅的解析からのβ-ureidopropionase欠陥の5つのケースが示され⁵³、LC/FTICR/MS(liquid chromatography/Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry)による尿サンプル(少なくとも672の代謝産物)の定量的なプロファイリング⁵⁴、¹H-NMR(¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis)を用いた傷害によって引き起こされた新陳代謝のプロファイルからの腎毒性バイオマーカー探索⁵⁵、¹H-NMRとMSを用いた食事摂取量の多様性が及ぼすヒト尿メタボローム解析プロファイルの変動⁵⁶、尿と血漿での生化学的な測定と¹H-NMRベースのメタボロミクスからの間欠性跛行症患者での局所貧血-

ヒト尿プロテオーム解析



ヒト尿メタボローム解析

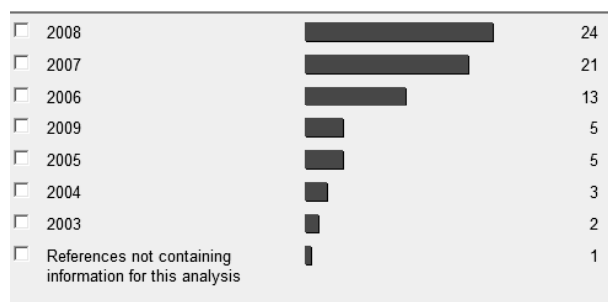


図9. プロテオーム解析とメタボローム解析の論文

再灌流の新陳代謝の効果とビタミンCとEの効果⁵⁷, GC, HPLC, CE の役割と超臨界流体クロマトグラフィーでのメタボローム解析⁵⁸, 腎臓移植モニタリングのためのプロテオミクスとゲノム技術への補完としてのメタボロミクス解析⁵⁹, LC/MS を用いた健康人 (48人) と移行上皮癌患者 (41人) との比較からの膀胱癌バイオマーカー探索⁶⁰, UPLC/TOF/MS を用いた尿サンプルの新陳代謝のプロファイリング分析⁶¹, LC/MS データ分析としての視覚化と統計上ツール⁶², LTQ-FTMS (linear ion trap Fourier transform mass spectrometer) を用いた胆汁酸の定量的なプロファイリング⁶³, MALDI-FTMS を用いた腎臓の同種移植片拒絶反応の予測⁶⁴, NMR を用いたブドウ/ワイン抽出物消費の尿代謝性プロファイルについての栄養学的介入研究⁶⁴, 新たなメタボロミクスデータ解析法⁶⁵, 女性癌疾病のバイオマーカー研究では, 乳癌では, 周知の 5-hydroxymethyl-2-deoxyuridine と 8-hydroxy-2-deoxyguanosine が確認され, 卵巣癌に対して 1-methyladenosine, 3-methyluridine と 4-androstene-3,17-dione が確認され⁶⁶, NMR を用いた小児脂肪便症⁶⁷, 製薬の研究開発でのメタボロミクス解析⁶⁸, 前立腺癌と転移性病⁶⁹, 代謝産物フィンガープリンティングによる食事の特徴⁷⁰など多岐にわたって報告がなされている。

将来への展望

以上, 尿解析の一般的所見として, 腎臓の機能, 腎機能検査法, 一般尿検査と疾患からヒト尿プロテオーム解析およびメタボローム解析について述べた。

尿は血液や臓器とは異なり非侵襲的に得られ, 古くか

ら代謝の鏡をいわれており, 一般検査, 個別検査に用いられ, 試験紙法による簡易・迅速化により臨床検査検体の中でも尿の使用率が最も高い。

ヒト尿は, 有機酸, アミノ酸, プリン, ピリミジン, 糖, 糖アルコール, ペプチド, タンパク質など多種カテゴリーの物質を含有し, 代謝異常を包括的に診断する情報を提供している。しかし, 尿成分は生理的変動幅が大きいこと, 測定値に一定幅がないこと, 多くの夾雑物が含まれる等の問題点に加え尿成分の定性・定量性が弱く, それらに対する問題解決が望まれている。

そこで, 質量分析装置等の技術革新から始まった網羅的なタンパク質および代謝物の定量・定性解析に注目が集まっており, 尿プロテオーム解析, 尿メタボローム解析の必要性が高まっている。しかしながら, オーム科学であるプロテオーム解析, メタボローム解析は, 計り知れない情報を与える有用技術として期待される半面, 各種測定機器類から測定手法さらにはデータ解析法とその技術内容が分かりにくく, 多くの情報を統括し, 診断に活かすことはなされていない。

今後は, 従来の尿検査に加え網羅的プロテオーム, メタボローム解析を用いた新領域の統合により, 泌尿器系疾患のための尿解析から内臓等の疾患の診断に使える尿解析へと更なる期待を寄せる事が出来る (図10)。

最後に我々は, HPLC を用い, 年齢・性差別のヒト尿試料は化学成分を分離後, 全成分の定量的分離パターン解析を行い, 日内変動, 食生活習慣と生体応答の変動との関係を検討する基礎データを蓄積する予定である (図11)。

プロテオミクスおよびメタボロミクスによるヒト尿解析

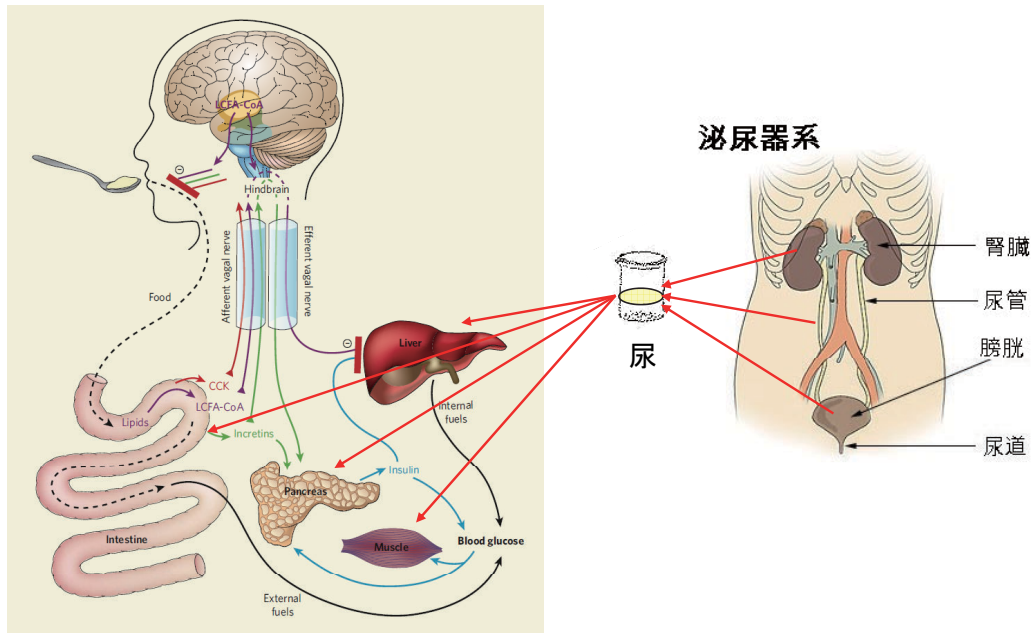


図10. ヒト尿解析の展望

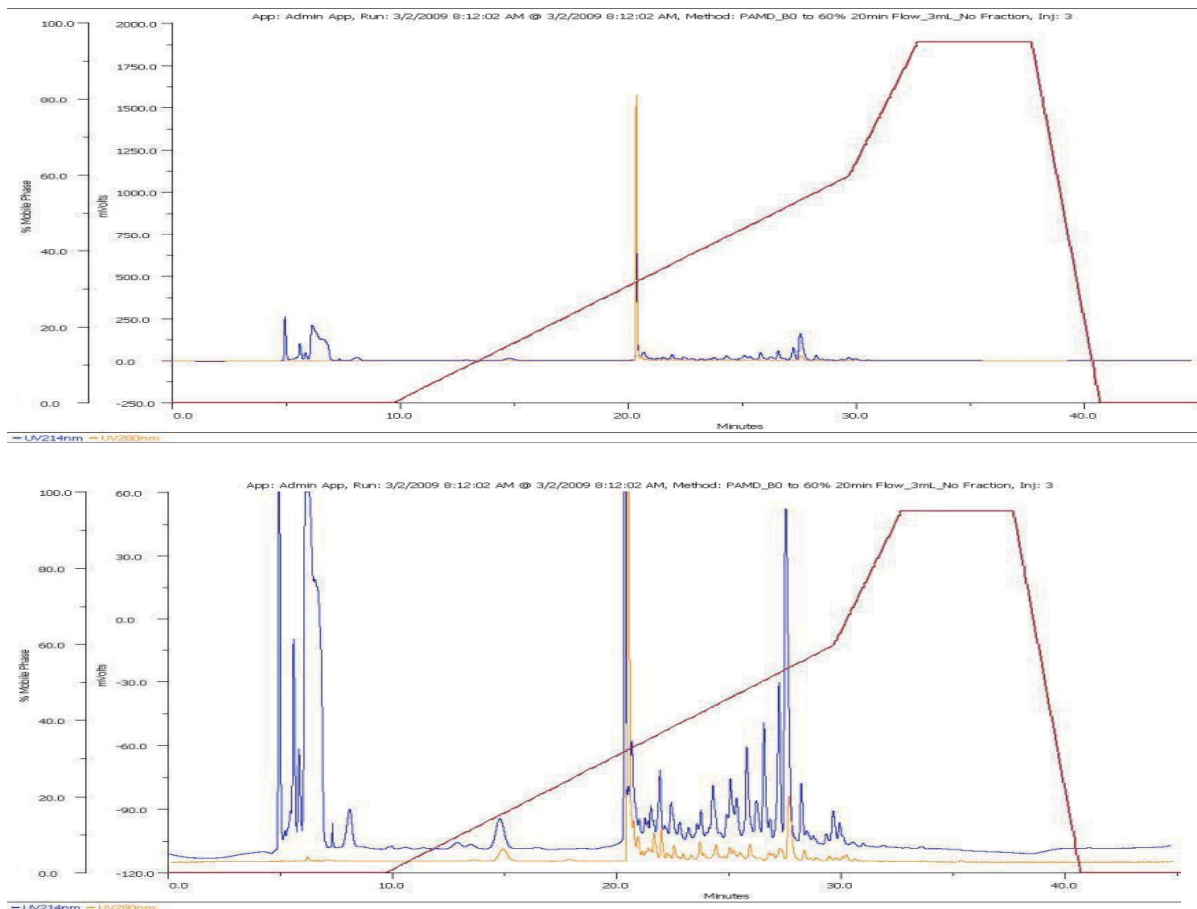


図11. ダイレクト HPLC 解析

参考文献

1. Kawasaki, H. 人体の構造と機能. (2000).
2. Kawasaki, H. 病態学. (2000).
3. Hishii, A. 標準腎臓病学. (2002).
4. Ito, K. 症例から学ぶ尿検査の見方・考え方. (1985).
5. Miyai, K. NEW 臨床検査診断学. (1992).
6. Tanaka, K., Ido Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida T. Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer IV - Generation of Quasi-Molecular Ions from High Mass Organic Compound. 35-kai Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai, Yoshishu 23, 22-23 (1987).
7. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71 (1989).
8. Yamamoto, T., Langham, R. G., Ronco, P., Knepper, M. A. & Thongboonkerd, V. Towards standard protocols and guidelines for urine proteomics: a report on the Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) symposium and workshop, 6 October 2007, Seoul, Korea and 1 November 2007, San Francisco, CA, USA. *Proteomics* 8, 2156-9 (2008).
9. Pieper, R. Preparation of urine samples for proteomic analysis. *Methods Mol Biol* 425, 89-99 (2008).
10. Zerefos, P. G. & Vlahou, A. Urine sample preparation and protein profiling by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 428, 141-57 (2008).
11. Thongboonkerd, V. & Saetun, P. Bacterial overgrowth affects urinary proteome analysis: recommendation for centrifugation, temperature, duration, and the use of preservatives during sample collection. *J Proteome Res* 6, 4173-81 (2007).
12. Thongboonkerd, V. Practical points in urinary proteomics. *J Proteome Res* 6, 3881-90 (2007).
13. Smalley, D. M., Sheman, N. E., Nelson, K. & Theodorescu, D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res* 7, 2088-96 (2008).
14. Saito, M. et al. Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers. *Eur Urol* 48, 865-71 (2005).
15. Grossman, H. B. et al. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *Jama* 293, 810-6 (2005).
16. Orenes-Pinero, E. et al. Searching urinary tumor markers for bladder cancer using a two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) approach. *J Proteome Res* 6, 4440-8 (2007).
17. Lin, C. Y. et al. Searching cell-secreted proteomes for potential urinary bladder tumor markers. *Proteomics* 6, 4381-9 (2006).
18. Vlahou, A. et al. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 158, 1491-502 (2001).
19. Wu, T. F., Ku, W. L. & Tsay, Y. G. Proteome-based diagnostics and prognosis of bladder transitional cell carcinoma. *Expert Rev Proteomics* 4, 639-47 (2007).
20. Hegedus, C. M. et al. Decreased urinary beta-defensin-1 expression as a biomarker of response to arsenic. *Toxicol Sci* 106, 74-82 (2008).
21. M'Koma, A. E. et al. Detection of pre-neoplastic and neoplastic prostate disease by MALDI profiling of urine. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 829-34 (2007).
22. Downes, M. R. et al. Application of proteomic strategies to the identification of urinary biomarkers for prostate cancer: a review. *Biomarkers* 11, 406-16 (2006).
23. Rehman, I. et al. Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study. *Urology* 64, 1238-43 (2004).
24. Cairns, D. A. et al. Integrated multi-level quality control for proteomic profiling studies using mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 9, 519 (2008).
25. Kojima, K. et al. Applying proteomic-based biomarker tools for the accurate diagnosis of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 12, 1683-90 (2008).
26. Tantipaiboonwong, P., Sinchaikul, S., Sriyam, S., Phutrakul, S. & Chen, S. T. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. *Proteomics* 5, 1140-9 (2005).
27. Gortzak-Uzan, L. et al. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res* 7, 339-51 (2008).
28. Niwa, T. Biomarker discovery for kidney diseases by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 870, 148-53 (2008).
29. Miyamoto, M. et al. In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 6, 3680-90 (2007).
30. Theodorescu, D. & Mischak, H. Mass spectrometry based proteomics in urine biomarker discovery. *World J Urol* 25, 435-43 (2007).
31. Christin, C. et al. Optimized time alignment algorithm for LC-MS data: correlation optimized warping using component detection algorithm-selected mass chromatograms. *Anal Chem* 80, 7012-21 (2008).
32. Thongboonkerd, V., Mungdee, S. & Chiangjong, W. Should urine pH be adjusted prior to gel-based proteome analysis? *J Proteome Res* (2009).
33. Dudley, J. T. & Butte, A. J. Identification of discriminating biomarkers for human disease using integrative network biology. *Pac Symp Biocomput*, 27-38 (2009).
34. Snell-Bergeon, J. K. et al. Evaluation of urinary biomarkers for coronary artery disease, diabetes, and diabetic kidney disease. *Diabetes Technol Ther* 11, 1-9 (2009).
35. Sun, W. et al. Improving peptide identification using an empirical peptide retention time database. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23, 109-18 (2009).

36. Quintana, L. F. et al. Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 20, 428-35 (2009).
37. Wang, J. N., Zhou, Y., Zhu, T. Y., Wang, X. & Guo, Y. L. Prediction of acute cellular renal allograft rejection by urinary metabolomics using MALDI-FTMS. *J Proteome Res* 7, 3597-601 (2008).
38. von Zur Muhlen, C. et al. Evaluation of urine proteome pattern analysis for its potential to reflect coronary artery atherosclerosis in symptomatic patients. *J Proteome Res* 8, 335-45 (2009).
39. Jantos-Siwy, J. et al. Quantitative urinary proteome analysis for biomarker evaluation in chronic kidney disease. *J Proteome Res* 8, 268-81 (2009).
40. Akkina, S. K., Zhang, Y., Nelsestuen, G. L., Oetting, W. S. & Ibrahim, H. N. Temporal stability of the urinary proteome after kidney transplant: more sensitive than protein composition? *J Proteome Res* 8, 94-103 (2009).
41. Thongboonkerd, V. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. *Mol Biosyst* 4, 810-5 (2008).
42. Zhang, X. et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int* 74, 799-807 (2008).
43. Rossing, K. et al. Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J Am Soc Nephrol* 19, 1283-90 (2008).
44. Decramer, S. et al. Identification of urinary biomarkers by proteomics in newborns: use in obstructive nephropathy. *Contrib Nephrol* 160, 127-41 (2008).
45. Rocchetti, M. T. et al. Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. *Proteomics* 8, 206-16 (2008).
46. Holmes, E. et al. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* 453, 396-400 (2008).
47. Britz-McKibbin, P. et al. Picomolar analysis of flavins in biological samples by dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Biochem* 313, 89-96 (2003).
48. Kuhara, T. Gas chromatographic-mass spectrometric urinary metabolome analysis to study mutations of inborn errors of metabolism. *Mass Spectrom Rev* 24, 814-27 (2005).
49. Kuhara, T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 855, 42-50 (2007).
50. Song, Y. Z. et al. Selective screening for inborn errors of metabolism and secondary methylmalonic aciduria in pregnancy at high risk district of neural tube defects: a human metabolome study by GC-MS in China. *Clin Biochem* 41, 616-20 (2008).
51. Wudy, S. A., Hartmann, M. F., Draper, N., Stewart, P. M. & Arlt, W. A male twin infant with skull deformity and elevated neonatal 17-hydroxyprogesterone: a prismatic case of P450 oxidoreductase deficiency. *Endocr Res* 30, 957-64 (2004).
52. Kind, T., Tolstikov, V., Fiehn, O. & Weiss, R. H. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Anal Biochem* 363, 185-95 (2007).
53. Kuhara, T., Ohse, M., Inoue, Y. & Shinka, T. Five cases of beta-ureidopropionase deficiency detected by GC/MS analysis of urine metabolome. *J Mass Spectrom* 44, 214-21 (2009).
54. Guo, K. & Li, L. Differential (12)C-/(13)C-Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome. *Anal Chem* (2009).
55. Portilla, D., Schnackenberg, L. & Beger, R. D. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury. *Semin Nephrol* 27, 609-20 (2007).
56. Walsh, M. C. et al. Influence of acute phytochemical intake on human urinary metabolomic profiles. *Am J Clin Nutr* 86, 1687-93 (2007).
57. Coolen, S. A. et al. Measurement of ischaemia-reperfusion in patients with intermittent claudication using NMR-based metabolomics. *NMR Biomed* 21, 686-95 (2008).
58. Issaq, H. J., Abbott, E. & Veenstra, T. D. Utility of separation science in metabolomic studies. *J Sep Sci* 31, 1936-47 (2008).
59. Wishart, D. S. Metabolomics: a complementary tool in renal transplantation. *Contrib Nephrol* 160, 76-87 (2008).
60. Issaq, H. J. et al. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Urol* 179, 2422-6 (2008).
61. Guy, P. A., Tavazzi, I., Bruce, S. J., Ramadan, Z. & Kochhar, S. Global metabolic profiling analysis on human urine by UPLC-TOFMS: issues and method validation in nutritional metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 871, 253-60 (2008).
62. Burton, L. et al. Instrumental and experimental effects in LC-MS-based metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 871, 227-35 (2008).
63. Bobeldijk, I. et al. Quantitative profiling of bile acids in biofluids and tissues based on accurate mass high resolution LC-FT-MS: compound class targeting in a metabolomics workflow. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 871, 306-13 (2008).
64. van Velzen, E. J. et al. Multilevel data analysis of a crossover designed human nutritional intervention study. *J Proteome Res* 7, 4483-91 (2008).
65. Mahadevan, S., Shah, S. L., Marrie, T. J. & Slupsky, C. M. Analysis of metabolomic data using support vector machines. *Anal Chem* 80, 7562-70 (2008).
66. Woo, H. M. et al. Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women's cancers. *Clin Chim Acta* 400, 63-9 (2009).
67. Bertini, I. et al. The metabolomic signature of celiac disease. *J Proteome Res* 8, 170-7 (2009).
68. Xu, E. Y., Schaefer, W. H. & Xu, Q. Metabolomics in pharmaceutical research and development: metabolites, mechanisms and pathways. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12, 40-52 (2009).

69. Sreekumar, A. et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457, 910-4 (2009).
70. Fave, G., Beckmann, M. E., Draper, J. H. & Mathers, J. C.

Measurement of dietary exposure: a challenging problem which may be overcome thanks to metabolomics? *Genes Nutr* (2009).