

〈特集：尿蛋白・アルブミンの解析とその進歩〉

THP測定法の開発と臨床的応用

下村 弘治¹⁾、西牧 淳一²⁾、芝 紀代子¹⁾

Development of THP assay and clinical applications

Hiroji Shimomura¹⁾, Junichi Nishimaki²⁾ and Kiyoko Shiba¹⁾

Summary Tamm-Horsfall protein (uromodulin) is the most abundant glycoprotein in human urine. It is synthesized exclusively in the thick ascending limb of the loop of Henle. Its biological function remains unclear. Qualitative and quantitative analyses have generally been done using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) respectively. Our established ELISA yielded a linearity within a range of 1.25 ng/ml to 80 ng/ml and a sensitivity of 0.78 ng/ml. It has recently been demonstrated that familial juvenile hyperuricemic nephropathy and medullary cystic kidney disease are caused by THP mutations. Some researchers have developed a non-invasive quantitative assay for urinary THP as a potential biomarker for the diagnosis of a kidney stone disease. In this article, we review previous quantitative analysis of THP and their clinical relevance in THP expression and excretion.

Key words: Tamm-Horsfall protein(THP), Uromodulin(UMOD), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA), SDS-polyacrylamid gel electrophoresis(SDS-PAGE), Familial juvenile hyperuricemic nephropathy(FJHN), Medullary cystic kidney disease(MCKD2)

I. はじめに

本蛋白質は1895年にMorner¹⁾により報告された蛋白質であるが、報告されてから1世紀以上が経過した。1950年にTammとHorsfall²⁾によりTamm-Horsfall protein (THP) と命名され尿中に

最も多く排泄される糖蛋白質として生化学、生理化学、物理学的など多方面から数多くの性質が調べられているが、その生理的役割については十分解明されていなかった。1985年にはMuchmoreら³⁾は妊娠女性の尿中からin vitroで免疫抑制活性をもつ85KDaの糖蛋白質を分離しウ

¹⁾文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科
〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

²⁾富士ソフト株式会社 再生医療研究部
〒130-0022 東京都墨田区江東橋2-19-7

¹⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Bunkyo Gakuin University,

2-4-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

²⁾Research & Development Department Regenerative Medical Research Group, FUJISOFT INCORPORATED.
2-19-7 Kotobashi, Sumida-ku, Tokyo 130-0022, Japan

ロモジュリン (Uromodulin: UMOD) として報告したが、後にこの蛋白質はTHPと同一の蛋白質であることが判明した。

THPは尿をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により分離し分子量約100 Kdを中心に位置するブロードなバンドにより検出可能である。また、定量測定法にはラジオイムノアッセイやEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 手法が用いられ、測定法の報告とともに臨床的意義について研究が進められてきた。その結果、THP遺伝子の突然変異が尿中のTHP排泄量の低下などの疾患と関連のあることが解明され始めてきている。

本稿では、これまで報告されているTHP定量測定法について紹介し、それぞれの特徴を示すとともに、現時点でTHPと関連していると考えられる疾患などを紹介する。

II. THPの発現と存在形態について

THPは1950年にTammとHorsfall²⁾によりヒト尿中に大量に含まれる蛋白質でありin vitroでウイルス依存を介する赤血球凝集反応を阻害する働きをすることから、その生理化学的な性質よりもコ蛋白質と報告された。

1985年にMuchmoreとDecker³⁾はレクチン結合親和性カラムを用いて妊娠女性の尿中よりin vitroで免疫抑制作用を示す糖蛋白質を分離し、ウロモジュリンと命名した。その後、1987年にはPennica⁴⁾によりTHPとウロモジュリンは同じ糖蛋白質であることが示されたことから、THPはウロモジュリン (UMOD) とも表記されてい

る。その後、MuchmoreらによりTHPとウロモジュリンが同じ遺伝子からの産物であることが証明された。

1. THPの発現

THPは蛋白質への翻訳後、細胞膜に結合した状態で成熟する蛋白質で、前駆体は640個のアミノ酸からなる分子量85 KDaの蛋白質に約15 KDaの糖鎖が付加された糖蛋白質である。THPの遺伝子は染色体16p12.3に位置し臓器特異的に腎臓のネフロンにあるヘンレ係蹄上行脚の遠位尿細管上皮細胞でのみ発現する蛋白質である。図1に示すように分泌過程で切り離されるシグナルペプチド配列から始まり4つのEGF様の構造や卵透明体蛋白質を含む6つの構造より構成されている。前駆体蛋白質は細胞膜に結合した状態で小胞体に運ばれた後、シグナルペプチドが切断され糖鎖構造が形成される。糖鎖構造はさらにゴルジ体で修飾を受けて細胞の頂端部細胞膜に分布する事が免疫組織学的、免疫蛍光染色や免疫電子顕微鏡で観察されている。

細胞膜に結合した状態で成熟したTHPは特異的なプロテアーゼにより切断され563残基のアミノ酸と糖鎖構造を有する糖蛋白質として細胞膜の管腔側から尿中に放出される。尿中に放出されたTHPはシアル酸を多く含む糖鎖構造をもち、SDS-PAGEでは分子量100 KDaバンドを中心にブロードな泳動像が得られる。

2. 尿中での存在形態とTHP測定のための尿検体の採取と保存

THPは溶液の塩濃度により存在状態が変化する。

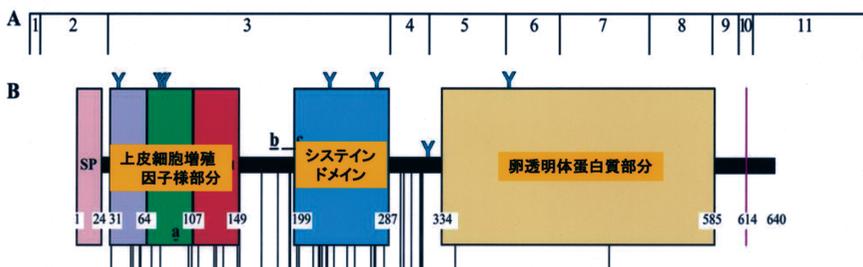


図1 THPの遺伝子構造はシグナルペプチド部分、上皮細胞増殖因子様部分、システインドメインと卵透明帯蛋白質部分から構成される³⁾

る事が報告されており、尿中の塩類濃度がうすい状態では凝集することが目視でも観察できる。Utoら⁵⁾は尿に2 M尿素を添加し遠心する事によりTHPが沈殿し上清中からの回収率が著しく低下することを報告している。また、彼らの構築した測定系では尿中の尿素濃度が0.04M以下であれば測定値に影響はしないが、THPの凝集を解離させるためにSDSを0.1%添加するとELISA反応を阻害するとしている。我々の測定でも遠心分離やフィルター濾過(0.45 μm)により測定値が大幅に低下することを確認している。

尿中のTHP濃度は報告者により大きく変動しているが、その原因の一つは採取される尿検体の時期と保管方法、保管期間によると考えられ、Utoら⁵⁾は24時間尿と早朝尿とは相関しないとしている。また、長期の冷凍保管(-30℃、-70℃)は測定値が高くなる影響を及ぼすと報告されている。

Ⅲ. ELISA測定法の構築

尿からTHPを精製する方法は、これまでいくつか報告がある。古典的にはTamm, Horsfall²⁾やMckenzieら⁶⁾は、たとえば、0.58 mol/Lの塩化ナトリウム溶液を添加するなどの塩析法により回収し、さらに、ゲルろ過法により精製している。Francaら⁷⁾は珪藻土を用いた精製方法を報告しており、珪藻土を用いる精製法は他の方法に比べて安価で精製純度も高いことからコスト的にも優れた精製法である。また、糖蛋白質であることからレクチン的一种であるコムギ胚芽凝

集素(WGA)との結合性を利用して測定系を構築している例も報告されている。

1. 尿検体の希釈

上述した様に尿中のTHPは凝集された状態で存在しているために、THP測定に際しては事前に適切な緩衝液を選択することと適切な希釈倍率を定めることが凝集を解離させる上で重要である⁸⁾。表1にはこれまで報告されているそれぞれの測定系における尿検体の希釈方法をまとめた。報告例の多くは数百倍から千倍の希釈を採用している。また、希釈液についてはどれも溶液の塩濃度を下げ中性付近のpHとする緩衝液を用いている。Fukuoka⁸⁾らやGoodall⁹⁾らの検討では凝集をほどく最適な希釈は1:10と報告されており、検体の希釈液組成はEDTAを含むトリス緩衝液(TEA) pH7.5、が推奨されている。

2. THP測定法

Goodall⁹⁾らは1980年にRIA法で測定法を報告したが、Hunt¹⁰⁾ら、Reinhart¹¹⁾ら、Uto⁵⁾ら、Lauら¹²⁾によりELISA系が報告がされてきた^{13), 14), 15)}。

表2にはこれまで報告されている代表的なELISA測定法を示した。報告されている測定範囲は1 ng/mlから1 μg/mlである。固相にモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いた抗原抗体反応によりTHP抗原を特異的に捕獲する方法の他に、Lauら¹²⁾はTHPの糖鎖と結合する性質を利用して固相にWheat germ agglutinin(WGA)レクチンを固定しWGAにより捕獲されたTHPをHRP標識二次抗体との抗原抗体複合体

表1 THP測定検体尿の希釈法について

	測定法	検体希釈法
竹立ら ¹⁴⁾ (1988)	EIA	1% BSAを含むリン酸緩衝溶液(150 mM NaClを含むPSA)で200~1000倍に希釈
Reinhartら ¹¹⁾ (1989)	ELISA	100 mM炭酸緩衝液(15 mM Sodium carbonate, 25 mM Sodium bicarbonate, 0.02% (w/v) Sodium azide)にて200倍希釈より、さらに2倍づつ希釈
Utoら ⁵⁾ (1991)	ELISA	PSA-Tween(10 mM Phosphate Buffer containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20)にて50倍に希釈
Lauら ¹²⁾ (2008)	ELISA	TEA緩衝液(0.5% Triton X 100, 20 mM EDTA, pH 7.5)にて10倍に希釈
西牧ら ¹⁶⁾ (2008)	ELISA	精製水で10倍希釈してから、さらに検体希釈液で100倍希釈
MD Bioproducts ³⁵⁾ (2008)	ELISA	キット付属 Assay Diluentにて200倍以上に希釈

表2 THP ELISA測定法の比較

	測定法	固相処理法	測定範囲	検出感度
Huntら ¹⁰⁾ (1986)	ELISA	抗THPモノクローナル抗体を 1 μ g/mlで吸着	20-90 ng/ml	2-3 ng/ml (血清試液)
竹立ら ¹⁴⁾ (1988)	EIA	—	10-500 mg/ml	—
Reinhartら ¹¹⁾ (1989)	ELISA	検体尿を希釈後、直接吸着	6.25-200 ng/ml	2-5 ng/ml
Utoら ⁵⁾ (1991)	ELISA	抗THPポリクローナル抗体を 2 μ g/mlで吸着	10-10000 ng/ml	20 ng/ml
Lauら ¹²⁾ (2008)	ELISA	Wheat germ agglutinin (WGA) を10 μ g/mlで吸着	109-945 ng/ml	—
西牧ら ¹⁶⁾ (2008)	ELISA	抗THPモノクローナル抗体を 1 μ g/mlで吸着	1.25-80 ng/ml	0.78 ng/ml
MD Bioproducts ³⁵⁾ (2008)	ELISA	抗THPポリクローナル抗体 を吸着	2.344-150 ng/ml	0.75 ng/ml

表3 THPと関連する生物活性について

	作用/疾患	作用または知見
TammとHorsfall ²⁾ (1950)	感染防御	ウイルスによる血球凝集阻害因子として働く
Cavalloneら ¹⁸⁾ (2004)	感染防御	THPの糖鎖部分が大腸菌の線毛に付着する
Duncanら ¹⁹⁾ (1960) Vylet'ら ²⁰⁾ (2006)	FJHN/MCKD	場染色体上のUMOD遺伝子の突然変異により THPの尿中への排出が低下する
Eastonら ²⁹⁾ (2000)	糖鎖構造の変化	UMODはTHPと糖鎖構造が異なる知見を報告

を形成させて酵素基質による呈色反応により測定する系を報告している。WGAはN-アセチルグルコサミンやシアル酸と特異的に結合する性質をもちTHPの糖鎖部分と結合する。このELISA測定法測定時間が5時間で測定範囲が109-945 ng/ml、精度は再現性CV 4%以下で、特異性と感度はそれぞれ80%と86%である。回収率は97.7%~101.2%である。

また、Reinhartら¹¹⁾は希釈した尿を直接固相に吸着させる手法で測定系を構築している。我々の構築した測定系はTHPの蛋白質部分を認識するモノクローナル抗体を用いて特異的に捕獲し高度にHRP標識したポリクローナル抗体を用いて検出する測定系であるが簡便な上検出感度も優れている。図2に我々のELISA測定法を示す。最近、市販されているMD Bioproducts社のELISAでは固相には抗THPポリクローナル抗体を用いて抗原抗体複合体を形成し、検出にはビオチン化抗THPポリクローナル抗体を使用しストレプトアビジン-HRPを用いて高感度測定を実現している。検出感度は0.75 ng/mlで我々の測定系と同

等な感度がある。

IV. 尿中THP分析と疾患との関係¹⁷⁾

THPの生物活性に関与すると思われる疾患との関係を表3に示した。

THPの生物学的作用としてはTammら²⁾が、in vitroでウイルスによる赤血球凝集阻害因子として抑制活性のあることが報告したのが最初である。

Cavalloneら¹⁸⁾はTHPの糖鎖部分尿路感染症の主要な原因菌である*Escherichia coli* (*E. coli*)の線毛と付着することにより感染防御の可能性を示唆した。*E. coli*が腸管から進入し腸管上皮表面にある糖蛋白質や糖脂質の糖鎖に菌体が付着しコロニー化する事が尿路感染の初期段階と推測されている。THPの持つ感染防御の仕組みとしてTHP上の1本鎖のハイマンノース型の糖鎖が*E. coli*の線毛のレクチンと結合することにより膀胱表面にあるマンノース化されている、尿路上皮細胞に組織特異的な膜蛋白質であるウ

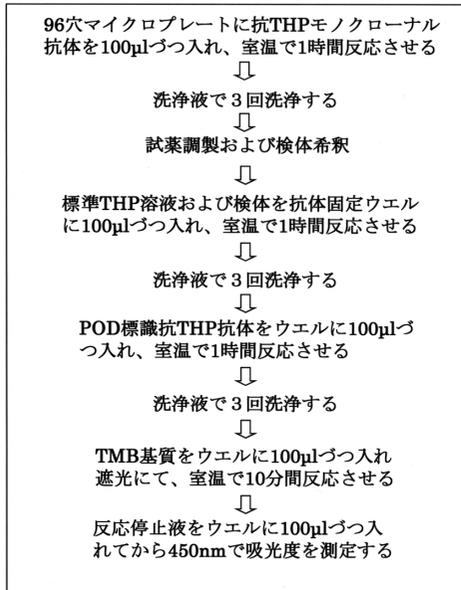


図2 西牧ら¹⁶⁾のELISA測定法

ロプラキン受容体と競合する事により感染防御の可能性を報告している。

髓質性嚢胞腎 (MCKD) と家族性若年性高尿酸血症疾患 (Familial juvenile hyperuricemic nephropathy: FJHN) は常染色体優性の腎疾患であり高尿酸性血症や痛風などの一連の兆候をあらわす症状が出てからしか確定診断がでにくい疾患である。

FJHNは1960年にDuncanら¹⁹⁾によりはじめに報告のあった希少疾患でこれまでに数例の家族でその症例が報告されている²⁰⁾。本疾患は排泄低下型の高尿酸血症、痛風、慢性腎不全を特徴とする常染色体優性の希少な疾患である。Hartら²¹⁾やTurnerら²⁴⁾はUMOD遺伝子の突然変異がMCKDおよびFJHNを引起し、痛風や尿細管間質性腎症といった臨床症状を示す^{21), 22)}と報告している。MCKD type 2とFJHN疾患患者の腎臓での変異を受けたTHPがTHPに対して免疫応答を起こした結果として尿細管障害や間質性線維症をもたらし、それは、*in vitro*の研究でTHPがリンパ球や好中球、抗原提示樹枝状細胞の活性化に関与している。THPを静脈に注射すると尿細管間質性の腎炎を起こし腎生検の結果として尿細管間質

へのTHPの付着が観察されている²⁸⁾。これまでの研究からMCKD type 2とFJHNとは同一の疾患としての可能性が高く、UMODの変異がFJHN/MCKD 2の原因であることがわかってきたが、遺伝子の変異が起これる本来のTHPの三次元構造が壊されることにより臨床的なMCKD type 2とFJHNによる腎疾患をもたらすと考えられるがその発症機序についてはいまだ不明である。

さらに、Kumar²⁸⁾はNephronophthisis (NPHP) もまたMCKD type 2やFJHNといずれも類似の臨床的、組織学的病状を示し、遺伝学的に突然変異の位置が違う例があるもののTHPをコードする遺伝子の突然変異によって引起される腎疾患として報告されている。これらの疾患では尿中THPは大幅に低下することが報告している。一方、THP遺伝子に変異を持たないFJHN患者でもTHP排泄量が低下している症例もあることからTHPのプロセッシング過程に何らかの原因があることも考えられている。

Devuystら²⁵⁾、Moら²⁶⁾はTHP遺伝子を欠損させたノックアウトマウスでは膀胱からの細菌の排除がされにくくなる結果、実験的な高シュウ酸尿症を起こさせるとカルシウム結石が生じやすい事を報告している。一方、Bachmannら²⁷⁾はUMOD欠損マウスを作成し腎機能への影響を調べた結果、THPはヘンレ係蹄でのトランスポーター機能に影響していると推測した。

THPの質的变化に関してEastonら²⁹⁾は妊娠女性の尿由来のTHP (UMOD) では質的に変化をした糖鎖構造を持つことを報告している。男性や妊娠していない女性の尿由来のTHPに比べて13倍以上も抗原誘導性のT細胞増殖の阻害因子として影響が強く、妊娠していない女性や男性由来のTHPでは末端がシアル酸またはフコースを持つcore 1 type O-glycanに対して妊娠女性由来のUMODではシアル化されたLewisxをもつ通常見られないcore 2 type O-glycan構造を示していた。UMODにおける糖鎖構造の変化は妊娠によって誘導されるステロイドホルモンとも関連が示唆され、免疫学的な反応性の変化との関連も示唆している。

岡³⁰⁾は造血管悪性腫瘍における尿酸代謝異常との関連から、尿中THP排泄量は残存ネフロン数に依存して増減する傾向がある一方、化学療法前後でも大きく変動すると報告している。

表 4 THP基準値

V. 排泄量及び尿中THP濃度

1. 基準範囲

24時間のTHP排泄量は表4に示すように平均50 mgあたりが共通した値である。また、尿中THP濃度は構築された測定系によって異なるが、共通して言える事は個人間差が大きいことである。1988年にReinhartら¹¹⁾はマイクロプレートの直接THPを固定化する測定法において5名のボランティアよりの24時間尿が16.6から98.5 mgであると報告している。Lau¹²⁾らの測定系において、健常人尿中THP濃度は男性では55-77.9 μ g/ml、女性では70.7-96 μ g/mlでやや女性の方が高値であり、排泄量 (THP/Cr) でも女性の方が男性より高値であるとしている (女性が 12.32 ± 0.86 mg/mmol、男性では 9.25 ± 1.02 mg/mmol)。我々の測定では一個人での時間当たりの尿中排泄量はほぼ一定 (0.5-2.0 mg/hr) であり、男性は女性よりもやや多くまた男女とも年齢と共に増加傾向にあることを示した。Uto⁹⁾らは年齢と共に尿中THPは減少するとする報告がある一方、我々の測定では症例数は少ないものの10歳代から50歳代の男女を世代別に尿中THPの時間尿を比較すると年齢と共にやや増加傾向を示した。我々の測定系でもこれまでの傾向と同じように個人間差は大きく健常人随時尿のTHP濃度は男性では2.1-19.3 μ g/ml、女性では12.9-45.4 μ g/mlで女性の方が高値傾向であった。これらから健常人群での基準値は測定系や採取検体の種類により異なるが尿中THP濃度は個人差の大きい測定項目である。我々の解析では個人での単位時間当たりの排泄量はほぼ一定であることを見出したことから、測定には排尿時から一定時間後の尿を採取し単位時間当たりには排出されたTHP量から1日尿としてのTHP排出量を計算できることを示した。

また、1991年にはUto⁹⁾らが26名の健常人の尿中へのTHPの排泄量は 19.2 ± 10.5 mg/gCrであることを報告し、特に、2-5歳の小児においては 26.4 ± 12.7 、6-10歳の小児においては 13.6 ± 3.2 であることを示し、若年層の小児での最大値は51.8 mg/gCr (mean+2SD) としている。本研究より初期の膀胱尿管逆流をおこす患者群では健常人小児群よりも高値を示すことが示唆された

一日排泄量としての表記

Vyetalら ³¹⁾	~ 50 mg
Reinhartら ¹¹⁾	16.6 ~ 98.5 mg
Bachmanら ²⁷⁾	30 ~ 60 mg
西牧ら ¹⁶⁾	24 ~ 36 mg (0.5 ~ 2.0 mg/hour)

尿中濃度

Lauら ¹²⁾	男性：55 ~ 77.9 μ g/ml 女性：70.7 ~ 96 μ g/ml (THP/Cr) 男性：9.25 \pm 1.02 mg/mmol 女性：12.32 \pm 0.80 mg/mmol
Uto ⁹⁾ ら	4.0 \pm 1.8 μ g/ml
西牧ら ¹⁶⁾	男性：2.1 ~ 19.3 μ g/ml 女性：12.9 ~ 45.4 μ g/ml

が検体数がまだ少ないため統計的には有意差は見られていない。

VI. THP測定と臨床的応用

腎臓結石は全人口の約20%を占める疾患であるが、最近、結石を構成する成分としてTHPが含まれているという報告から、尿中THP濃度から尿結石患者のスクリーニング診断の可能性が示唆され、健常人と尿路結石患者とを分別できるとする報告がある。

尿結石中に含まれる蛋白質成分の解析についてはその抽出方法により結石を構成するマトリクスを可溶化できる試薬により抽出される蛋白質も異なることが報告されている^{32),33)}。金子ら³⁴⁾はシュウ酸カルシウムを主成分とする尿路結石患者より得られた結石の成分分析に際し4 Mゲアニジンを含む緩衝液で抽出しSDS-PAGEと高感度な機器分析手法であるLC-MSを用いて解析をしたところ、アルブミンを主蛋白質としてウロモジュリンを含むフラグメントが検出されたことを報告した。結石成分にTHPが含まれるかどうかは先に述べたように尿中のpHとイオン強度の強弱により凝集度が異なる事がTHPの尿中形態に影響しさらに結石中に含まれる事と関連があるかもしれない。

Lauら¹²⁾は構築したELISA測定法を用いて腎結

表5 尿結石とTHP測定¹²⁾

	No. of sample	Age (Age range) (Years)	Creatinine concentration (mmol/L)	THP concentration (μ g/mL)	THP/Creat ratio (mg/mmol)
Healthy subjects	117	32 (18-86)	8.14 \pm 0.40	77.66 \pm 4.68	11.23 \pm 0.68
<i>Male</i>	41	52 (19-86)	9.15 \pm 0.74	67.05 \pm 5.97	9.25 \pm 1.02
<i>Female</i>	76	21 (18-60)	7.59 \pm 0.46	83.38 \pm 6.37	12.30 \pm 0.86*
Stone formers	58	52 (28-74)	7.94 \pm 0.54	26.03 \pm 2.21*	4.02 \pm 0.40**
<i>Male</i>	34	52 (36-74)	7.50 \pm 0.67	24.56 \pm 2.56	4.06 \pm 0.55
<i>Female</i>	24	52 (28-68)	8.57 \pm 0.88	28.10 \pm 3.96	3.95 \pm 0.58
Subgroup of stone formers					
<i>Staghorn calculi</i>	39	50 (29-67)	8.62 \pm 0.71	26.80 \pm 3.02	3.86 \pm 0.53
<i>Acute renal calculi</i>	19	55 (28-74)	6.55 \pm 0.63	24.45 \pm 2.76	4.34 \pm 0.58

石患者尿中のTHP濃度および排泄が健常者に比べて有意に低下していることを報告した。これらより、結石患者ではTHP濃度が低い傾向である。尿中THPが低いことは病理学的にも重要で、ある腎疾患においてはTHPの産生が抑制されることが示唆されている。Lauら¹²⁾の測定系を用いて測定すると尿中THP濃度と排泄量 (THP/Cre) とに相関が認められた。表5に示すように健常人尿中THP濃度および排泄量では女性の方が男性より高値であったが、結石患者群では濃度及び排泄量共に男女の性差は認められない。しかし、健常者群と結石患者群とを比較すると尿中濃度および排泄量には有意な差が認められている。健常者群と結石患者群とで測定値分布を調べると健常人では低値から高値まで個人差が広く認められるが、結石患者群では高値例は少なく男女共に健常者群に比較して低値傾向であることから、男性では37.0 μ g/ml、女性では41.2 μ g/mlをカットオフ値として定めることにより特異性80%、感度86%としている。本キットを用いて117人の健常人と58人の結石患者を評価している。尿結石患者と健常人とのカットオフ値を決めることによりスクリーニング診断法としての尿中THP濃度の測定は重要である。

今後は、結石患者群では尿中THP濃度は低下する傾向にあることは濃度が低下した結果として結石になっているのか、低下することが結石をもたらしているのかは結石成分の解析と尿中THP濃度の経時的測定による解析が望まれる。尿中THP濃度が尿結石になりやすいかどうかの予測因子として指標になるかどうかは難しい。

FJHN腎炎では、この家族の患者から得られる尿中のTHP量は幼少期から低レベルであり青年期には極端に低レベルになる事からTHP濃度の測定は有効な診断方法のひとつであろう。

Ⅶ. おわりに

THPはその発見から1世紀たつてようやく関連疾患が見出されてきた。測定法は定量、定性的にほぼ完成されているので今後は幅広い臨床検体を用いたデータの蓄積が重要であろう。さらに、臨床的意義について疾患との関連を検討する一方で、尿中のTHPの挙動はイオン強度やpHによりその存在形態を変化させるとともに免疫抑制的な作用を示す可能性もあり今後詳細な検討を進めなければならない。ウロモジュリンがTHPと同じ蛋白質でありながら糖鎖の部分で微妙な調節しているとすれば、妊娠との関係においてその生理活性の解明はたいへん重要であると思われる。また、THPは哺乳類全般に存在するといわれているところからもその分子生理学的な解析をさらに進めその生理学、臨床的にもその存在意義を明らかにすることが望まれる。

文献

- 1) Morner, KAH: Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweissfallenden substanzen des normalen Menschenharns. Skand Arch Physiol, 6: 332-337, 1895.
- 2) Tamm I, Horsfall FL Jr: Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. Proc Soc Exp Bio. Med, 74(1): 106-108, 1950

- 3) Muchmore AV, Decker JM: Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. *Science*, 229(4712): 479-481, 1985.
- 4) Pennica D, Kohr WJ, Kuang WJ, Glaister D, Aggarwal BB, Chen EY, Goeddel DV: Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Science*, 236(4797): 83-88, 1987.
- 5) Uto I, Ishimatsu T, Hirayama H, Ueda S, Tsuruta J, Kambara T: Determination of urinary Tamm-Horsfall protein by ELISA using a maleimide method for enzyme-antibody conjugation. *J Immunol Methods*, 138(1): 87-94, 1991.
- 6) McKenzie JK, et al.: The excretion rate of Tamm-Horsfall urinary mucoprotein in normal and in patients with renal disease. *Australas Ann Med*, 13: 32-39, 1964.
- 7) Serafini-Cessi F, Bellabarba G, Malagolini N, Dall'Olio F: Rapid isolation of Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) from human urine. *J Immunol Methods*, 129: 185-189, 1989.
- 8) Fukuoka S, Kobayashi K: Analysis of the C-terminal structure of urinary Tamm-Horsfall protein reveals that the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored counterpart from the kidney occurs by phenylalanine-specific proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(5): 1044-1048, 2001.
- 9) Goodall AA, Marshall RD: Effects of freezing on the estimated amounts of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine, as determined by radioimmunoassay. *Biochem J*, 189(3): 533-539, 1980.
- 10) Hunt JS, Peach RJ, Brünisholz MC, Lynn KL, McGiven AR: A sensitive and specific ELISA using a monoclonal capture antibody for detection of Tamm-Horsfall urinary glycoprotein in serum. *J Immunol Methods*, 91(1): 35-43, 1986.
- 11) Reinhart HH, Obedeau N, Walz D, Sobel JD: A new ELISA method for the rapid quantification of Tamm-Horsfall protein in urine. *Am J Clin Pathol*, 92(2): 199-205, 1989.
- 12) Wai-Hoe Lau, Wing-Seng Leong, Zhari Ismail, and Lay-Ham Gam: Qualification and application of an ELISA for the determination of Tamm-Horsfall (THP) in human urine and its use for screening of kidney Stone Disease. *Int J Biol Sci*, 4(4): 215-222, 2008.
- 13) 片山善章, 竹立精司, 入江章子, 松山辰男: 尿中Tamm-Horsfall Protein (THP). *日本臨床*, 53: 154-156, 1995.
- 14) 竹立精司, 入江章子, 田淵彰子, 谷口直行, 片山善章 他: マイクロプレートEIA法による尿中Tamm-Horsfall glycoprotein定量法の開発. *臨床病理*, 36: 1352-1355, 1988.
- 15) Kjellsson B, Söderström T, Hanson LA: An ELISA method for quantification of Tamm-Horsfall protein using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 98(1): 105-111, 1987.
- 16) 西牧淳一, 増田 勝, 加藤伸一, 中島淑恵, 金森きよ子, 下村弘治, 芝 紀代子: Enzyme-linked immunosorbent assayによる尿中Tamm-Horsfall Protein測定法の構築と健常人の基準範囲の設定. *臨床病理*, 56(10): 862-867, 2008.
- 17) Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D: Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis*, 42(4): 658-676, 2003.
- 18) Daniela Cavallone, Nadia Malagolini, Angela Monti, Xue-Ru Wu, and Franca Serafini-Cessi: Variation of High Mannose Chains of Tamm-Horsfall Glycoprotein Confers Differential Binding to Type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 279(1): 216-222, 2004.
- 19) DUNCAN H, DIXON AS: Gout, familial hypericaemia, and renal disease. *Q J Med*, 29: 127-135, 1960.
- 20) Vylet'al P, Kublova M, Kalbacova M, Hodanova K, Baresova V, Stiburkova B, et al.: Alterations of uromodulin biology: A common denominator of the genetically heterogeneous FJHN/MCKD syndrome. *Kidney Int*, 70: 1155-1169, 2006.
- 21) Lhotta K, Gehringer A, Jennings P, Lronenberg F, Brezinka C, Anderson I, Strazdins V: Familial juvenile hyperuricemic nephropathy: report on a new mutation and a pregnancy. *Clin Nephrol*, 71(1): 80-83, 2009.
- 22) Anthony J Bleyer, Karn Gupta: UMOD-Related Kidney Disease. Uromodulin Strage Disease, Uromodulin-Associated Kidney Disease. Includes: Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy, Medullary Cystic Kidney Disease 2. *Gene Reviews*. Seattle: University of Washington, Seattle, 1993.
- 23) T C Hart, M C Gorry, P S Hart, A S Woodard, Z Shihabi, J Sandhu, B Shirts, L Xu, H Zhu, M M Barnada, A J Bleyer: Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet*, 39: 882-892, 2002.
- 24) Turner JJ, Stacey JM, Harding B, Kotanko P, Lhotta K, Puig JG, Roberts I, Torres RJ, Thakker RV: UROMODULIN mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(3): 1398-1401, 2003.
- 25) Devuyst O, et al.: Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about and old molecule. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20: 1290-1294, 2005.
- 26) Mo L, et al.: Tamm-Horsfall protein is a critical renal

- defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney International*, 66(3): 1159-1166, 2004.
- 27) Sebastian Bachmann, Kerim Mutig, James Bates, Pia Welker, Beate Geist, Volkmar Gross, Friedrich C. Luft, Natalia Alenina, Michael Bader, Bernd J. Thiele, Krishna Prasad, Hajamohideen S. Raffi, and Satish Kumar: Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288: L559-567, 2005.
- 28) Satish Kumar: Mechanism of Injury in Uromodulin-Associated Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 18: 10-12, 2007.
- 29) Richard L. Easton, Manish S. Patankar, Gary F. Clark, Howard R. Morris, and Anne Dell: Pregnancy-associated Changes in the Glycosylation of Tamm-Horsfall Glycoprotein. *J Biol Chem*, 275(29): 21928-21938, 2000.
- 30) 岡 陽子: 造血器悪性腫瘍における尿酸代謝異常と尿中Tamm-Horsfall protein. *帝京医学雑誌*, 32(6): 375-384, 2009.
- 31) Petr Vyletal, Anthony J. Bleyer, Stanislav Kmoch: Uromodulin Biology and Pathophysiology-An Update. *Kidney & Blood Press Res*, 33: 456-475, 2010.
- 32) 横溝佳代, 中山亜紀, 外園栄作, ニノ宮明子, 三宅瑠璃子, 平塚信夫, 奥山光彦, 加藤裕司, 小林静子, 伊藤喜久, 芝 紀代子: 尿路結石患者の結石抽出液と尿の蛋白成分の分析. *臨床病理*, 53(12): 1109-1115, 2005.
- 33) 芝 紀代子, 川上保子, 横溝佳代, 下村弘治, 金森きよ子: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法とウエスタンブロッティングによる尿路結石中の蛋白成分分析. *生物試料分析*, 32(3): 227-233, 2009.
- 34) Kaneko K, Yamanobe and Fujimori S: Analysis of urinary calculi complicated in a hypouricemic patient with the use of a micro area X-ray diffractometer and LC-MS. *Urol. Res*, 33(6): 415-421, 2005.
- 35) MD Bioproducts, Catalog Number: M036020, Tamm-Horsfall Glycoprotein (THP) ELISA