

〈原著〉

IgA腎症の早期発見を目的とした尿蛋白電気泳動による解析

西澤 美穂子¹⁾、久保田 亮²⁾、五十嵐 徹³⁾、酒井 伸枝²⁾

Electrophoretic analysis of urinary protein for early detection of IgA nephropathy

Mihoko Nishizawa¹⁾, Ryo Kubota²⁾, Toru Igarashi³⁾ and Nobue Sakai²⁾

Summary Early stage of kidney disease and mild kidney injury may go undetected in urinary protein test papers with a negative or (±) result. We analyzed urinary proteins in tests with negative or (±) results on urinary protein test paper using cellulose acetate electrophoresis (CAE) and urinary protein analysis software. The result of this assay enabled classification of urinary protein patterns into glomerular, tubular, and mixed.

Next, we aimed to detect specific urinary proteins in the case of negative or (±) results on urinary protein test papers for the early detection of IgA nephropathy (IgAN) using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting (WB). There was a significant difference between the percentage of high molecular weight (>66 kDa) albumin fractions in patients with IgAN and individuals with healthy kidneys.

Analysis of urinary proteins using CAE may be useful for early detection of damage to kidneys. Moreover, analysis of the high molecular weight albumin fraction (%) using SDS-PAGE and WB may be useful for early detection of IgAN.

Key words: cellulose acetate electrophoresis, urinary protein analysis software, SDS-PAGE, IgA nephropathy, urinary albumin

¹⁾ 新渡戸文化短期大学臨床検査学科

東京都中野区中野3-43-16

²⁾ 埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科

埼玉県越谷市三野宮820

³⁾ 日本医科大学付属病院小児科

東京都文京区千駄木1-1-5

連絡先：久保田 亮

埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科

〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820

Tel : 048-973-4799 Fax : 048-973-4799

Email : kubota-ryo@spu.ac.jp

¹⁾ Department of Clinical Laboratory Sciences, Nitobe Bunka College

3-43-16, Nakano, Nakano-ku, Tokyo, 164-0001, Japan

²⁾ Department of Health Sciences, Saitama Prefectural University

820 Sannomiya, Koshigaya-shi, Saitama, 343-8540, Japan

³⁾ Department of Pediatrics, Nippon Medical School Hospital

1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8603, Japan

受付日：2018年2月16日

採択日：2018年4月23日

I. 緒言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) は2002年に米国腎臓財団から発表された疾患の概念¹⁾であり、腎臓の機能が徐々に低下していく様々な腎臓病の総称である。慢性的に腎障害をきたす代表的な疾患には、糖尿病性腎症、IgA腎症、腎硬化症などがあり、これらは末期腎不全にまで進行する疾患である。初期の段階のCKDでは、自覚症状を伴わない場合が多いため、早期発見や早期治療により効果的に進行の防止を図ることができるといわれている。また、CKDの重症度は、腎機能、尿蛋白 (アルブミン尿) による分類で評価されており、初期の段階で的確に腎疾患を発見するには尿蛋白 (アルブミン) の検査が重要である²⁾。

腎疾患の検査法には、スクリーニング検査では尿蛋白試験紙法が行われ、確定診断には、血液検査、尿蛋白定量検査、画像診断、腎生検などが行われることが一般的である³⁾。検査法の中には患者の負担が大きいものもあり、とくに腎生検は出血などの合併症が起りやすく、入院や長時間の床上安静を必要とするなど、患者にとって侵襲の大きい検査法である。スクリーニング検査の試験紙法は、簡単に迅速に多くの検体から異常をふるい分けられることが可能であるため、早期に腎疾患を発見することに有用である。しかし、試験紙法は多種類存在する尿蛋白の中でもアルブミンを特異的に検出するため、アルブミン以外の蛋白を排出している腎障害を見逃している可能性が考えられる^{4,5)}。また、早期の腎疾患では蛋白の排出が微量であるため、尿蛋白試験紙法では陰性 (-) あるいは疑陽性 (±) という結果となり、検出には限界がある⁶⁾。

CKDの代表的な疾患であるIgA腎症は、何らかの原因により腎臓の糸球体にIgAが沈着することにより腎障害を生じる疾患である。IgA腎症は最も高頻度な糸球体腎炎で、わが国に高率に認められ、末期腎不全から透析療法に導入される代表的な原因疾患としてあげられている。

IgA腎症の発見の動機は、学校検診や職場検診における検尿で尿潜血・尿蛋白陽性と偶然に発見され、無症候性血尿・蛋白尿と臨床診断されるものが大多数を占める。この検尿異常の発

見を契機に腎生検がなされることから、IgA腎症診断のためには検尿は必須である。現在の一般的な尿検査において、IgA腎症に特異的な所見はなく、確立したIgA腎症の尿バイオマーカーもないといわれている。IgA腎症は腎生検によってのみ診断されるが、一般に蛋白尿の増加が腎予後と関連するため、近年では、尿蛋白定性検査で (2+) 程度の持続、1日尿蛋白量が0.3 ~ 0.5g以上の場合に腎生検を施行することが望ましいとされている。しかし、検診の検尿での尿異常出現から腎生検までの期間が長くなると、罹病期間に応じて尿蛋白量や血圧が上昇し、さらに糸球体・間質病変が悪化することが報告されている。また、軽度のIgA腎症では自然寛解することがあり蛋白尿が陰性となることがあるといわれている⁷⁾。よって、尿蛋白の定性・定量検査では、疾患の発見また診断の確定が遅れる可能性がある。

本研究では、尿蛋白試験紙法から得られた結果が (-) あるいは (±) であった検体について、セルロースアセテート膜電気泳動後に銀染色法を行い、得られた尿蛋白分画パターン之差異から腎障害との関連性について解析する。またCKDのうち、最も高頻度な糸球体腎炎とされるIgA腎症の患者の尿蛋白の中で、尿中に最も多く排出される蛋白質であるアルブミンについてSDS-PAGE法を用いて解析することで、IgA腎症患者の簡便かつ早期発見ができるマーカーをみつけることを目的とする。

II. 対象

日本医科大学付属病院小児科腎臓外来を受診して尿検査を受けた患者のうち、患者および(または)保護者(代諾者)による文書同意を得られた患者のうち尿蛋白試験紙法で陰性 (-) または疑陽性 (±) であった40名(男性17名、女性22名、不明1名、平均年齢13.1歳)の随時尿を用いた。患者の性別は不問で治療内容や基礎疾患は問わないが、医師が試験参加に不適切と判断した患者は除外した。検体は対象者が受診時に持参した早朝尿あるいは来院時尿の余剰検体で、これらの検体は測定まで-80℃で保存した。本研究は日本医科大学付属病院倫理委員会の承認を得たのち、埼玉県立大学倫理委員会(受

付番号27509号)の承認を得て実施した。

Ⅲ. 方法

1) 尿蛋白スクリーニング検査

対象者から尿蛋白試験紙法で(-)または(±)である患者を抽出するために、尿試験紙ウロペーパーⅢ‘栄研’(栄研化学(株))を用いて尿蛋白の定性検査を行った。

2) セルロースアセテート膜(セア膜)電気泳動法

スクリーニング検査で(-)あるいは(±)である尿蛋白についてセア膜電気泳動法を行った。セア膜(ADVANTEC SELECA-VSP,(株)常光)に、アプリケーション10((株)常光)を用いて尿を塗布した。泳動バッファーにはペロナール緩衝液(pH 8.6, イオン強度0.06)((株)常光)を用いた。泳動条件は、膜幅1 cmあたり0.6 mAの定電流で40分間泳動した。蛋白分画マーカーには標準血清(分画トロール,(株)常光)を生理食塩水で400倍希釈したものを用いた。泳動後、高感度銀染色液キット((株)常光)を用いて銀染色で検出した。

3) 腎障害部位の分類

セア膜電気泳動法で分離した尿蛋白分画パターンの差異から腎障害と尿蛋白の種類との関連を解析するため、尿蛋白質病態解析ソフト^{8,9)}((株)常光)を用いて、尿蛋白分画パターンを糸球体障害型、尿細管障害型、混合型、その他の4つの障害型に分類した。

4) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)

Laemmli法¹⁰⁾に基づき、ゲルは濃度12.5%均一ゲルで自製したものを用いた。試料は、濃度調整した尿検体と、0.25 M トリス塩酸(pH 6.8) - 5.2% SDS - 50% グリセロール - 0.2% BPB溶液を5:2の割合で混和したものを用いた。なお尿検体の蛋白濃度調整は尿中総蛋白量(TP)が10 mg/dlとなるように生理食塩水で希釈または検体量を調整した。TPの測定は、マイクロTPテストワコー(和光純薬工業(株))を用いて手法^{11,12)}で行った。

泳動条件は、ゲル1枚につき20 mAの定電流で通電し蛋白を分離した。泳動終了後の蛋白染色は、銀染色Ⅱキットワコー(和光純薬工業(株))を用いて銀染色を行った。分子量マーカーにはAmersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare)を用いた。

5) ウェスタンブロッティング法によるアルブミンの検出

SDS-PAGEで分子量の違いにより分離したゲル中の蛋白からアルブミンを検出するため、1cm²あたり2.0 mAの定電流で60分間通電しポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜(クリアブロット・Pプラス膜,アトー(株))に転写した。転写後の膜上のアルブミンの検出には、EzBlock Chemi(アトー(株))でブロッキングした後、1次抗体としてPolyclonal Rabbit Anti-Human Albumin(Dako)を4000倍希釈したものを用いて60分間反応させ、洗浄後、2次抗体としてPolyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP(Dako)を2000倍希釈したものを用いて60分間反応させた。抗体の希釈には0.05% Tween20-リン酸緩衝液(pH 7.4)を用いた。発色は0.02% 3, 3'-ジアミノベンチジン-4塩酸塩(DAB)、0.02% H₂O₂を含んだ0.05% Tween20-リン酸緩衝液を用いてアルブミンバンドを検出した。ウェスタンブロッティング用の分子量マーカーには、Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope(BIO-RAD)を用いた。

6) デンシトメトリーによるアルブミンの分子多様性

自然乾燥させたウェスタンブロッティング後のPVDF膜をイメージスキャナー(GT-S640, EPSON)で取り込み、ImageJ(NIH)を用いてデンシトメトリーを行った。バンドの濃淡から割合を測定できるデンシトメトリーを行うことにより、ウェスタンブロッティング法で検出したバンドから各分子量のアルブミンの割合(分画(%))を求めた。

Ⅳ. 結果

1) 尿蛋白試験紙法

対象患者40例のうち、尿蛋白試験紙法によるスクリーニング検査で(-)を示した検体は12例、(±)を示した検体は28例であった。

2) セア膜電気泳動法による泳動パターンの検出

対象の尿検体40例について、セア膜電気泳動法を行い蛋白分離後に銀染色で蛋白染色を行ったところ、アルブミン分画だけでなく、標準血清と同様のパターンである α_1 -グロブリン(α_1 -G)分画、 α_2 -グロブリン(α_2 -G)分画、 β -グロブリン(β -G)分画、 γ -グロブリン(γ -G)分画が検出された。また、標準血清とは異なったslow α_2 -G分画、slow β -G分画などのグロブリン分画にも濃度の淡いバンドがみられ、様々な泳動パターンが検出された (Fig. 1)。

3) 尿蛋白質病態解析ソフトを用いた腎障害部位の分類

セア膜電気泳動法から得られた40例の多様な

泳動パターンについて、尿蛋白質病態解析ソフトで腎障害部位の分類を行ったところ、糸球体障害型が9例 (22.5%)、尿管障害型が8例 (20.0%)、混合型が1例 (2.5%)、その他が22例 (55.0%)であった (Table 1)。糸球体障害型にはIgA腎症、ネフローゼ症候群などの臨床診断がなされていた。また尿管障害型には尿管間質性腎炎やぶどう膜炎など、混合型にはネフローゼ症候群、その他には腎障害がみられない患者や紫斑病性腎炎、ネフローゼ症候群などの臨床診断がなされていた。またその他には尿蛋白試験紙結果が(-)、(±)ということもあり、診断がまだ確定していない検体もあった。

4) SDS-PAGEによる尿蛋白分画

IgA腎症に特異的に排出される尿蛋白を解析するため、尿蛋白質病態解析ソフトにより糸球体障害型と分類された9例のうちIgA腎症と診断されている患者6例と、対照群として医師に

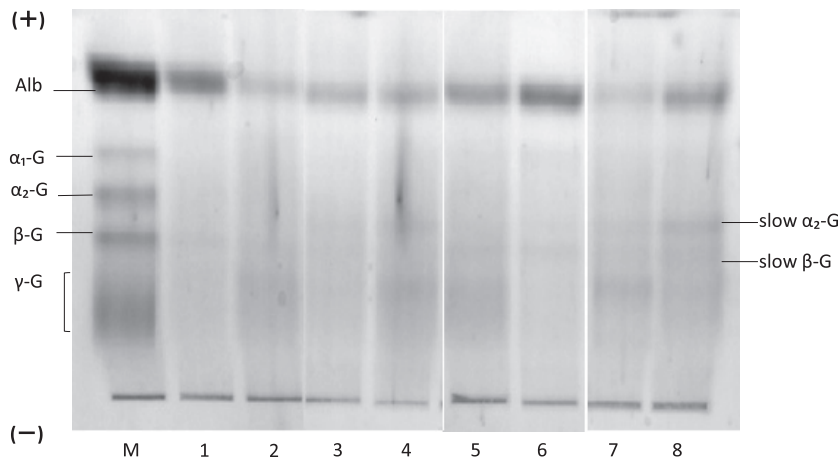


Fig. 1 Urinary protein fraction of patients with negative or (±) result of urinary protein test paper using cellulose acetate membrane electrophoresis
 M: standard serum (Protein fraction marker)
 No. 1-4: Negative result of urinary protein test paper
 No. 5-8: (±) result of urinary protein test paper

Table 1 The type of kidney injury in patients with a negative or (±) result on urinary protein test paper

n=40				
	Glomerular pattern	Tubular pattern	Mixed pattern	Other patterns
n	9 (22.5%)	8 (20.0%)	1 (2.5%)	22 (55.0%)

より腎障害がないと判断され、その他に分類された患者5例の計11例について、TP濃度を均一にしてSDS-PAGEを行った。その結果、IgA腎症患者と腎障害がない患者に共通して66 kDaのバンドが濃染され、ほかに分子量の違いによる多数のバンドが検出された。IgA腎症患者と腎障害がない患者の尿蛋白分画を比較したとこ

ろ、IgA腎症患者の尿では66kDaの分画が濃く、さらに66kDaより高分子分画ではバンドが濃染された (Fig. 2)。

- 5) ウェスタンブロッティング法によるアルブミンの分子多様性
 ウェスタンブロッティング法からIgA腎症患者

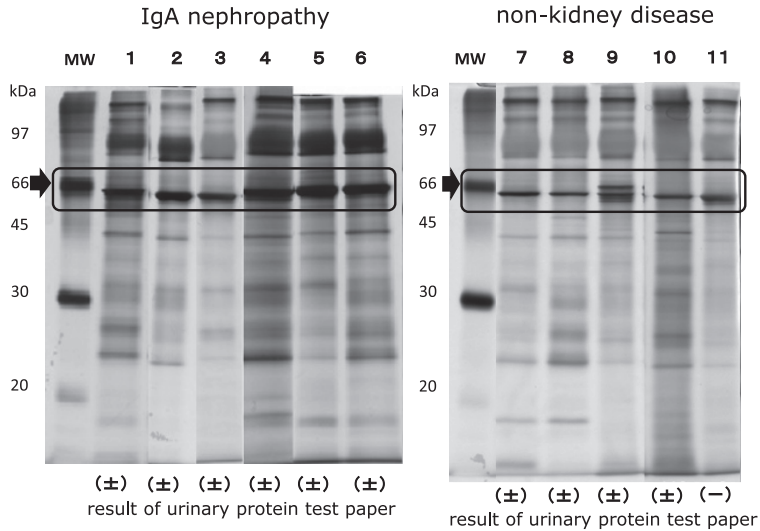


Fig. 2 Urinary protein fraction using SDS-PAGE in result of urinary protein test paper
 MW : Molecular weight marker

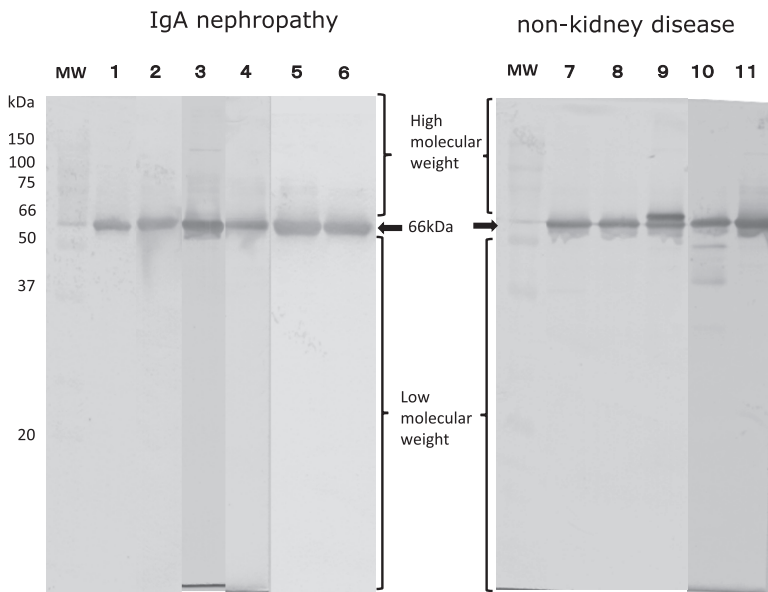


Fig. 3 Detection of urinary albumin using western blotting method
 MW : Molecular weight marker

者および腎障害がない患者のアルブミンを検出した結果、主たるバンドである66 kDaのバンドが検出された。また、66 kDaより高分子分画および低分子分画にバンドが検出される検体があった (Fig. 3)。そこで、ウェスタンブロッティング法で得られたアルブミンの3つの分画について、ImageJ (NIH) を用いてデンシトメトリーを行った。IgA腎症患者と腎障害がない患者のデンシトメトリー像を比較した代表例をFig. 4に示す。さらに、デンシトメトリーから得られたアルブミンの分画 (%) をまとめた結果、IgA腎症患者と腎障害がない患者を比較すると、IgA腎症患者では主バンド66 kDaのアルブ

ミンは80.4±10.0%、高分子分画のアルブミンが14.2±3.9%、低分子分画のアルブミンが5.5±9.4%であった。一方、腎障害がない患者では、66 kDaのアルブミンが88.3±12.9%、高分子分画のアルブミンが4.4±3.5%、低分子分画のアルブミンが7.3±13.5%であった。この結果についてIBM SPSS Statistics 21 (IBM) を用いてMann-WhitneyのU検定を行ったところ、IgA腎症患者は、腎障害がない患者に比べて高分子分画のアルブミンの出現が有意に高値であった ($P<0.01$)。66 kDaの主バンドと低分子分画のアルブミンでは、有意な差はみられなかった (Table 2)。

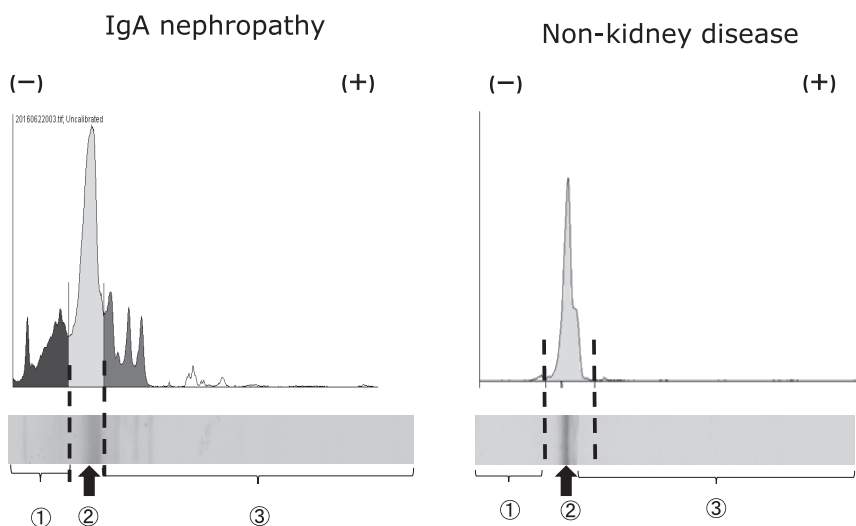


Fig. 4 Analysis of the molecular diversity of albumin

- ① : Higher molecular weight albumin than 66 kDa
- ② : Albumin of 66 kDa
- ③ : Lower molecular weight albumin than 66 kDa

Table 2 Comparison of urinary albumin fraction (%)

	High molecular weight albumin	66 kDa albumin	Low molecular weight albumin
IgA nephropathy (n=6)	* 14.2±3.9	80.4±10.0	5.5±9.4
non-kidney disease (n=5)	4.4±3.5	88.3±12.9	7.3±13.5

V. 考察

健康診断や学校検尿で尿蛋白試験紙法の結果が(−)の場合、さらなる検査は行われ¹³⁾ない。しかし、尿蛋白試験紙は検出の特性としてアルブミンに特異的に反応し、グロブリンの種類¹⁴⁾の蛋白には反応しないため、尿中アルブミン濃度が低くグロブリンの蛋白であるベンスジョーンズ蛋白(BJP)が排出されている場合や尿細管障害により β_2 -ミクログロブリン、 α_1 -ミクログロブリンなどが排出されている場合は、尿蛋白試験紙の結果は(−)になる可能性が高いと言われている^{4,5)}。そこで、本研究では尿蛋白試験紙結果が(−)や(±)の患者において、アルブミン以外にどのような尿蛋白が存在しているかを確認するため、蛋白の種類を1回の検査で分離できる電気泳動法を用いた。なかでもセア膜電気泳動法は臨床検査の分野で行われている蛋白の種類¹⁵⁾の検出方法であるが、主には、血清蛋白分画を行うための検査方法である。そのため検出感度が低く、血清よりもかなり蛋白濃度が低い尿の蛋白分画はそのままでは検出が難しいと報告されている¹⁴⁾。また、尿を濃縮し、尿蛋白濃度を増大させセア膜電気泳動を行っている報告¹⁵⁾もあるが、濃縮作業の時間や手間がかかり、また蛋白が変性するという問題点があった。先行の論文では、尿のような蛋白濃度の低い試料でもセア膜電気泳動法により、高感度な染色液である銀染色液を用いることで健常者尿や様々な疾患尿に応用してきた¹⁶⁻²⁰⁾。本研究では、尿蛋白試験紙結果が(−)や(±)の患者においてもこの銀染色液を用いることで、セア膜電気泳動法により様々な尿蛋白分画を検出することができた。

しかし、セア膜電気泳動法の泳動像のみでは腎疾患や腎障害を予測するのは非常に困難であった。そこで、我々が以前開発した尿蛋白質病態解析ソフトを用いることで、セア膜電気泳動法の泳動像から糸球体障害型、尿細管障害型、混合型、その他の4つの障害型に分類することを可能とした。その結果、本研究では、尿蛋白質病態解析ソフトの解析から、尿蛋白試験紙結果が(−)や(±)であるにもかかわらず、40例の検体を糸球体障害型9例、尿細管障害型8例、混合型1例、その他22例に分類できた。糸球体

障害型に分類された検体は、臨床診断がされているIgA腎症やネフローゼ症候群の患者であったため、障害型と一致していたと考える。尿細管障害型に分類された検体中には、尿細管間質性腎炎やぶどう膜炎、尿中 β_2 -ミクログロブリンが上昇している患者の検体があり、この結果もグロブリン分画の増加が判明した症例と一致していた。3つの障害型に分類できなかった検体は、腎障害がない例や尿蛋白分画のピークが検出されなかった例であり、腎臓にほとんど障害部位がみられないと考えられる。

我々は、尿蛋白質病態解析ソフトを用いて、予後が良好とされている起立性蛋白尿の解析をした結果、糸球体障害型や尿細管障害型と判定された^{21,22)}。つまり障害型の分類だけでは詳細な腎疾患は判断できないと考えられる。そこで、糸球体障害型と判定された検体の中で、IgA腎症患者の尿中の蛋白についてSDS-PAGEを用いて解析を試みた。IgA腎症患者の尿では、分子量の違いによる様々な蛋白バンドが検出され、IgA腎症患者の尿中には多くの蛋白が存在していることが分かった。本研究では尿中に最も多く排出される蛋白であるアルブミンに着目した。健常者の尿に排出されているアルブミンはSDS-PAGEから66 kDaであると報告²³⁾されているが、今回IgA腎症の検体および、腎障害がない検体においても66 kDaのアルブミンが尿中に排出されていることが共通して確認できた。さらに、IgA腎症患者のアルブミン分画について検討したところ、腎障害がない患者にはほとんどみられない66 kDaより高分子分画のアルブミンが検出された。これは、IgA腎症による腎障害が起こったことによりアルブミンが重合した結果、高分子分画に検出されるのではないかと考えられる。このことについては、IgA腎症患者と心血管疾患患者の尿中アルブミンの分子多様性について報告されている研究の中で、IgA腎症ではアルブミンの分子がいくつか重合したタイプのダイマー、トリマー、テトラマーといった高分子になることが報告²⁴⁾されていることから推定できる。しかし、その報告で用いられている対象の検体は、高齢者も含む40～70歳代の尿であることから、IgA腎症以外にも高血圧や糖尿病などの疾患を併発していたり、内服治療中の患者も含まれている

ため、IgA腎症による腎障害のみの影響でアルブミンが高分子化されているかどうかは不明な点がある。本研究では、加齢や生活習慣病、内服など、結果への影響を否定しえない因子を除外できる小児科受診患者を対象としたことにより、IgA腎症患者において尿中アルブミンが高分子化することを見出すことができた。このことは新たな知見であると考える。

VI. 結 論

尿蛋白試験紙結果が(－)や(±)の患者、尿蛋白濃度が低く診断が未確定な患者においてもセア膜電気泳動法と尿蛋白質病態解析ソフトを用いることにより腎障害型を分類できることは、腎疾患の早期発見、早期治療を可能とし、現在増加の一途をたどる透析患者数を減らすことに寄与できるのではないかと考える。

また、尿蛋白試験紙結果が(－)や(±)のIgA腎症患者の尿中に高分子分画のアルブミンが検出されたことから、尿中の高分子分画のアルブミンを検出することがIgA腎症の早期発見・早期治療につながるのではないかと考える。

参 考 文 献

- 1) 日本腎臓学会編: CKD診療ガイド2012, 1-7, 東京医学社, 東京, 2012.
- 2) 日本腎臓学会編: 生活習慣病からの新規透析導入患者の減少に向けた提言～CKD(慢性腎臓病)の発症予防・早期発見・重症化予防～. 東京医学社, 3-17, 東京, 2016.
- 3) 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編: 臨床検査のガイドラインJSLM2015, 157-162, 日本臨床検査医学会, 東京, 2015.
- 4) 日本腎臓学会編: 今井宣子, 伊藤機一: 尿蛋白定性法. 腎機能(GFR)・尿蛋白測定の手引, 29-39, 東京医学社, 東京, 2009.
- 5) Puglia M, Newman DJ, Lott JA, D'Mello L, Clark L, Profitt JA, Cast T: Detection of low-molecular-weight proteins in urine by dipsticks. Clin Chim Acta, 326: 177-183, 2002.
- 6) JCCLS尿検査標準化委員会, 尿試験紙検討委員会: 「尿試験紙検査法」JCCLS提案指針(追補版)尿蛋白, 尿ブドウ糖, 尿潜血試験部分表示の統一化. 日本臨床検査標準協議会会誌, 19: 53-65, 2004.
- 7) 日本腎臓学会編: エビデンスに基づくIgA腎症診療ガイドライン2014, 1-74, 東京医学社, 東京, 2015.
- 8) Sakatsume M, Kubota R, Ogawa A, Narita I, Matsuda T, Shiba K, Gejyo F: Rapid and sensitive electrophoresis of urinary protein clearly reveals the pathophysiological feature of renal diseases. Nephrology (Carlton), 12: 191-196, 2007.
- 9) Kubota R, Ishii M, Kameko M, Kitamura H, Sakatsume M, Sato K, Shiba K: A semiautomatic analyzer for urinary protein assay and a software program for classifying renal injury using cellulose acetate electrophoresis. J Electrophoresis, 54: 13-18, 2010.
- 10) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. Nature, 227: 680-685, 1970.
- 11) Fujita Y, Mori I, Kitano S: Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. BUNSEKI KAGAKU, 32: E379-E386, 1983.
- 12) Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Oh-sawa S, Makino K, Tokuda K: Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. Clin Chem, 32: 1551-1554, 1986.
- 13) 日本学校保健会: 学校検尿のすべて 平成23年度改訂, 日本学校保健会, 東京, 2011.
- 14) 芝紀代子, 長裕子: Acid violet 17によるセルロースアセテート膜電気泳動後の高感度蛋白染色法. 生物物理化学, 31: 19-26, 1987.
- 15) Hiratsuka N, Shiba K, Shinomura K, Hosaki S, Cho H, Nagasaki A, Kobayashi S: Urinary protein fractions in healthy subjects using cellulose acetate membrane electrophoresis followed by staining with acid violet 17. Biol Pharm Bull, 17: 1355-1357, 1994.
- 16) Matsuda K, Hiratsuka N, Koyama T, Kurihara Y, Hotta O, Itoh Y, Shiba K: Sensitive method for detection and semiquantification of Bence Jones protein by cellulose acetate membrane electrophoresis using colloidal silver staining. Clin Chem, 47: 763-766, 2001.
- 17) Kubota R, Machii R, Hiratsuka N, Hotta O, Itoh Y, Kobayashi S, Shiba K: Cellulose acetate membrane electrophoresis in the analysis of urinary proteins in patients with tubulointerstitial nephritis. J Clin Lab Anal, 17: 44-51, 2003.
- 18) Sawada K, Matsuyama T, Sekine T, Shiba K, Sato K: Electrophoretic analysis of various urinary proteins in Japanese patients with Dent disease. J Electrophoresis, 54: 19-25, 2010.
- 19) Machii R, Kubota R, Hiratsuka N, Sugimoto K, Masudo R, Kurihara Y, Kobayashi S, Shiba K: Urinary protein fraction in healthy subjects using cellulose acetate membrane electrophoresis followed by colloidal

- silver staining. *J Clin Lab Anal*, 18: 231-236, 2004.
- 20) Hiratsuka N, Shiba K, Shinomura K, Hosaki S, Nishida K, Kobayashi S: Electrophoretic patterns of urinary proteins of diabetics in the pre, early and overt nephropathy stages. *Biol Pharm Bull*, 20: 651-655, 1997.
- 21) Kubota R, Kanamori K, Ohira K, Horiguchi M, Igarashi T, Sakai N, Shiba K: Variation in urinary protein components in individuals with orthostatic proteinuria as detected by lordotic load testing. *Int J Anal BioSci*, 3: 10-16, 2015.
- 22) 久保田亮, 飯島史朗, 芝紀代子: 臨床検査における電気泳動法の今後～尿蛋白電気泳動解析から尿蛋白病態解析へ～. *電気泳動*, 60: 23-26, 2016.
- 23) 芝紀代子, 久保田亮, 中山亜紀: 尿蛋白の病態解析, *機器試薬*, 36: 289-296, 2013.
- 24) Nakayama A, Sakatsume M, Kasama T, Kawara T, Gejyo F, Isobe M, Sato K, Shiba K: Molecular heterogeneity of urinary albumin in glomerulonephritis: comparison of cardiovascular disease with albuminuria. *Clin Chim Acta*, 402: 94-101, 2009.