

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を応用した ネコ尿中タンパク質と慢性腎不全の病態解析

前田 浩人¹, 堀江 和香¹, 渡辺 俊文², 坂口 和子³, 鈴木 潤³

¹前田獣医科医院, ²麻布大学附属動物病院, ³麻布大学生命・環境科学部

【はじめに】

ネコの腎障害を診療する場合、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、病態を把握する事が重要である。すでにネコ慢性腎不全に対し早期診断の1方法として尿中微量アルブミン測定の有用性について報告したが、尿中へのアルブミン排泄量の増加が見られない症例においても糸球体病変を示すものもみられることから、病變を的確に診断するためのさらなるマーカーが必要とされる。今回、ネコ慢性腎不全 (CRF) に対するさらなる早期診断マーカーの有用性について検討することを目的に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を応用し、尿中アルブミン以外のタンパク質、尿中トランスフェリンおよび尿中コーキシンに注目して検討を行った。

【実験材料ならびに方法】

カテーテル採尿した正常および CRF ネコ原尿を遠心分離し、上清 5 μ L をレミー緩衝液にて等量希釈、SDS 平衡化した後 6% ポリアクリルアミドゲル支持体に試料 10 μ L を添加して電気泳動を行い、CBB 染色後脱色し尿タンパク質像を観察検討した。目的タンパク質は質量分析計 (nanoESI-LC/MS/MS) により同定解析を行った。

【結果および考察】

目的タンパク質は、質量分析より得られた MS/MS スペクトルのデータベース検索よりトランスフェリンならびにコーキシンと同定された。つぎに、SDS-

PAGE にて得られた尿中トランスフェリン、尿中コーキシンのバンドの濃さの度合いを 5 段階の評価基準を作成した。また、出現頻度は 5 段階の土以上をタンパクの出現陽性とした。尿中トランスフェリンおよび尿中アルブミンの出現頻度について比較した結果、尿中トランスフェリンにおいては慢性腎不全病期の進行に伴い尿中アルブミン同様高い出現頻度を示した。なお、尿中トランスフェリンは、アルブミンより荷電量が少ないために、荷電バリアーを通過して、より軽度な糸球体障害でも尿中に漏出したものと考えられる。また、尿中コーキシンの出現頻度について検討した結果、正常ネコ尿においてメスに比較してオスで多量のコーキシンバンドが観察され、CRF ネコ尿においてオス、メスとも慢性腎不全病期 I 期から IV 期に病期が進行するに伴いバンドの出現頻度の低下が認められた。コーキシンはイオウを含むアミノ酸から構成され、尿細管の細胞で合成され尿中に排泄される酵素であることを宮崎らが報告したが、慢性腎不全を罹患したネコにおいては尿細管病變の進行に伴い、コーキシンの排泄量が著しく減少することが明らかになった。

以上のことから、ネコ慢性腎不全の早期診断マーカーとしての尿中微量アルブミンに加え、尿中トランスフェリンおよび尿中コーキシン分析は初期段階での腎機能障害を診断するためのマーカーとして有用であることが示唆された。