

ヒト尿解析への HPLC 法の適用

治京玉記

Application of HPLC in Human Urine Analysis

Tamaki JIKYO

Abstract

Comprehensive analyses, using biological specimens, such as blood, urine and organs, are highly likely to enable researchers to acquire an understanding and manage the risks of the fluctuations of biological information. Unlike blood and organs, urine can be obtained non-invasively. Containing miscellaneous categories of substances, such as organic acids, amino acids, purines, pyrimidines, sugars, sugar alcohols, peptides and proteins, human urine specimens can provide information comprehensively for the diagnosis of metabolic abnormalities. However, urine components are problematic in that peptides and proteins are unstable, the physiological fluctuation range is large, the measured value is not constant and there are many contaminants.

This study aimed to present a new urine analysis method by performing a comprehensive pattern analysis, using high-performance liquid chromatography (HPLC) of the organic components in human urine specimens. First, it assessed the measurement conditions of the pretreatment method and those of the HPLC method to rapidly and easily measure human urine specimens. Next, comprehensive pattern analysis of human urinary organic components was performed on urine specimens from three Japanese women in their 20s to 30s, using the established measurement conditions of the pretreatment method and HPLC.

Keywords: High-performance liquid chromatography 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

Human urine analysis ヒト尿解析

Comprehensive analyses 網羅的解析

Proteomic analysis プロテオーム解析

Metabolomic analysis メタボローム解析

1. はじめに

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、健常人では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

に出す尿の平均量は約 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。しかしながら、尿成分は、ペプチド、タンパク質が不安定であること、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。

また、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¹⁾。

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。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²⁾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)、質量分析法 (Mass Spectrometry; 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³⁾⁻⁶⁾も報告されている。

尿プロテオーム解析研究としては、膀胱癌⁷⁾、前立腺癌⁷⁾⁻¹⁰⁾、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液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid Chromatography Mass Spectrometry; LC/MS) の時間配列アルゴリズム解析¹¹⁾、腎臓移植時の慢性同種移植機能障害¹²⁾、冠動脈疾患の症状を訴えている患者の尿 CE/MS (Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry) パターン解析¹³⁾、慢性腎臓病での定量的尿プロテオーム分析¹⁴⁾、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障害¹⁵⁾などのバイオマーカー探索と多岐にわたって報告されている。

尿メタボローム解析研究については、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¹⁶⁾、また、血漿と尿試料を用いたフラビンの CE/MS 分析¹⁷⁾、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¹⁸⁾、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¹⁹⁾、新生児による大規模な網羅

の解析からの β -ureidopropionase 欠陥の 5 つのケースが示され²⁰⁾、¹H-NMR (¹H-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopic analysis) 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ィールの変動²¹⁾、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-再灌流の新陳代謝の効果とビタミン C と E の効果²²⁾、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²³⁾、NMR を用いたブドウ/ワイン抽出物消費の尿代謝性プロフィールについての栄養学的介入研究²⁴⁾、代謝産物フィンガープリンティングによる食事の特徴²⁵⁾ など多岐にわたって報告がなされている。

本研究では、ヒト尿試料中の有機成分に対して、高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography; HPLC) 法による網羅的パターン解析を行うことで、新たな尿解析の手法を提示することを目的としている。まず、ヒト尿試料を迅速かつ簡易に測定するための前処理方法および HPLC 法の測定条件について検討を行った。次いで、20～30 代日本人女性 3 名に対して、確立した前処理法および HPLC 測定条件を用いてヒト尿中有機成分の網羅的パターン解

析を行った。

2. 結果

まず、ヒト尿試料測定のための試料前処理方法として、限外ろ過 (Ultrafiltration; UF) 法による尿中夾雑物の除去を行った。UF 法は、極微量の粒子や溶液中に溶解している分子を分離するための膜分離技術であり、分離の原理は、分子の形や帯電状態などの要因に影響を受けるものの、基本的には分子の大きさ (分子量) で分離される。異物が膜内部で捕捉される精密ろ過 (Microfiltration Membrane; MF) 膜とは異なり、UF 膜では、膜の孔よりも大きな分子が膜表面に保持され、ろ過操作中に濃縮される。UF 膜の特徴として、①処理する分子へのダメージが少ない、②タンパク質の変性を招くような操作 (例えば、有機溶媒による抽出など) を必要としない、③イオン強度や pH を保てる、④時間がかからず比較的安価である、⑤低温 (例えば低温室) での操作が可能である、非常に効率的で、分子の精製と濃縮とが同時に行えるなど利点が多い。今回、早朝第二中間尿試料 1mL に対して、UF 膜 100K (MicrosepTM 100K) を使い、Beckman 社超遠心機により 2,000RPM、1min、4℃ の条件で夾雑物の除去を行った。

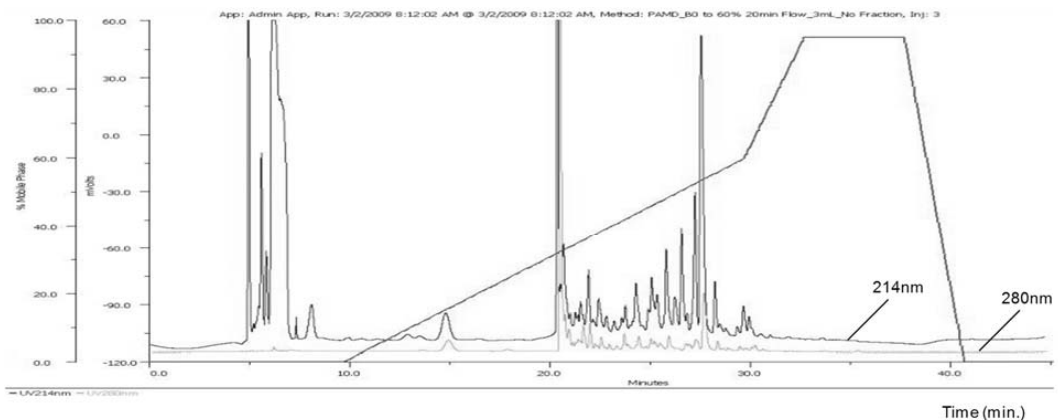


Fig. 1. 尿成分の HPLC 解析

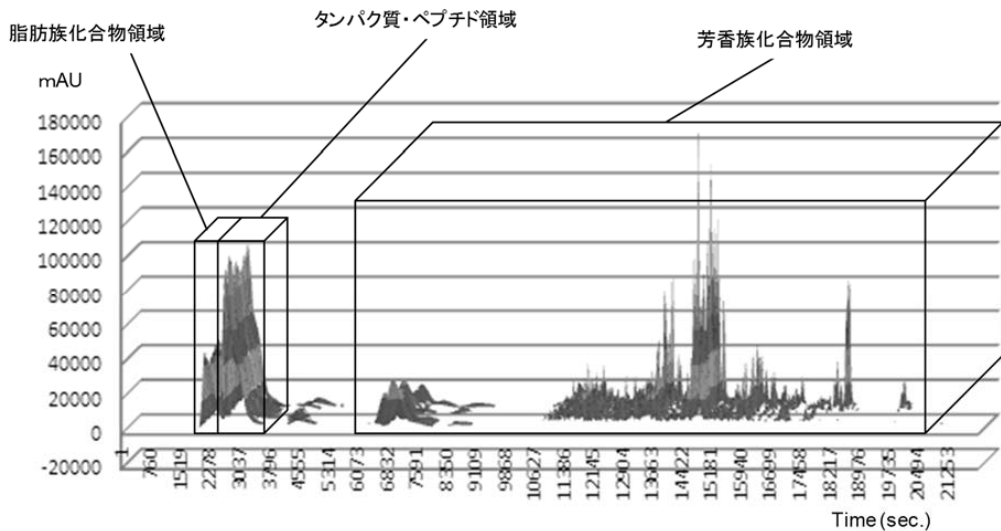


Fig.2. 尿成分の変動パターン解析

024) 実施した。

次に、尿解析の定性・定量分析として、GILSON Trilution LC システムを用いた逆相 HPLC の測定条件の検討を行った。その結果、Inertsil ODS-3 (5 μ m、4.6 × 250mm、GL Science Inc.) カラム、移動相 0% B in 10min、0-60% B in 20min (A; 5% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸、B; 95% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸) グラジエント、流速 1.0mL/min、UV (214 and 280nm) 検出、室温測定という条件設定を確立した (Fig.1)。

確立した前処理方法・測定条件を基に 20 ~ 30 代女性 3 名に対して 30 日間の変動のパターン解析を行った (Fig. 2)。紫外吸収 (UV) 法により、まず 214nm 付近の特性吸収帯を持つ脂族化合物が特定され、次いで芳香族核を有する化合物は 280nm 付近に特性吸収帯を持つことから芳香族化合物領域を特定した。さらに、1 分毎の各フラクションに対してニンヒドリン反応による 1 級アミン定性反応を行うことでタンパク質・ペプチド領域を決定した。

本研究は、中村学園大学・中村学園大学短期大学部倫理委員会の承認を得 (倫理-08-

3. まとめ

以上、HPLC 法を用いたヒト尿試料中の有機成分の定性的・定量的分離パターン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、古くから代謝の鏡といわれており、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。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。

現状のプロテオーム解析、メタボローム解析の主要基盤技術である LC/MS 法では、分離・精製時の簡便化、迅速化、低コスト化等

多くの問題点の解決が切望されていた。本研究では、HPLC 法による網羅的パターン解析が行うことで、簡便かつ迅速・低コスト化の可能性を提示することが出来た。今後は、脂族化合物領域・タンパク質・ペプチド領域の分離技術を向上させることで HPLC 法による尿解析が従来の尿検査に加え診断研究に役立つことを期待したい。

4. 参考文献

- 1) 治京玉記, 中村学園大学薬膳科学研究所研究紀要 **2**, 9-24 (2009).
- 2) Yamamoto, T. *et al. Proteomics* **8**, 2156-9 (2008).
- 3) Pieper, R. *Methods Mol Biol* **425**, 89-99 (2008).
- 4) Zerefos, P. G. *et al. Methods Mol Biol* **428**, 141-57 (2008).
- 5) Thongboonkerd, V. *et al. J Proteome Res* **6**, 4173-81 (2007).
- 6) Thongboonkerd, V. *J Proteome Res* **6**, 3881-90 (2007).
- 7) Smalley, D. M. *et al. J Proteome Res* **7**, 2088-96 (2008).
- 8) M' Koma, A. E. *et al. Biochem Biophys Res Commun* **353**, 829-34 (2007).
- 9) Downes, M. R. *et al. Biomarkers* **11**, 406-16 (2006).
- 10) Rehman, I. *et al. Urology* **64**, 1238-43 (2004).
- 11) Cairns, D. A. *et al. BMC Bioinformatics* **9**, 519 (2008).
- 12) Quintana, L. F. *et al. J Am Soc Nephrol* **20**, 428-35 (2009).
- 13) von Zur Muhlen, C. *et al. J Proteome Res* **8**, 335-45 (2009).
- 14) Jantos-Siwy, J. *et al. J Proteome Res* **8**, 268-81 (2009).
- 15) Decramer, S. *et al. Contrib Nephrol* **160**, 127-41 (2008).
- 16) Holmes, E. *et al. Nature* **453**, 396-400 (2008).
- 17) Britz-McKibbin, P. *et al. Anal Biochem* **313**, 89-96 (2003).
- 18) Kuhara, T. *Mass Spectrom Rev* **24**, 814-27 (2005).
- 19) Wudy, S. A. *et al. Endocr Res* **30**, 957-64 (2004).
- 20) Kuhara, T. *et al. J Mass Spectrom* **44**, 214-21 (2009).
- 21) Walsh, M. C. *et al. Am J Clin Nutr* **86**, 1687-93 (2007).
- 22) Coolen, S. A. *et al. NMR Biomed* **21**, 686-95 (2008).
- 23) Wishart, D. S. *Contrib Nephrol* **160**, 76-87 (2008).
- 24) van Velzen, E. J. *et al. J Proteome Res* **7**, 4483-91 (2008).
- 25) Fave, G. *et al. Genes Nutr* **4**, 135-141 (2009).