

氏名(本籍)	くに	か	きよし	清(茨城県)
学位の種類	博	士	(医	学)
学位記番号	博	乙	第	1,362号
学位授与年月日	平	成	10年	2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
審査研究科	医学研究科			
学位論文題目	アルブミン糖化反応を用いた糖尿病性アルブミン尿発症機序の解析			
主査	筑波大学教授	医学博士	小	山哲夫
副査	筑波大学教授	医学博士	中	井利昭
副査	筑波大学教授	理学博士	坂	内四郎
副査	筑波大学教授	医学博士	田	中直見
副査	筑波大学助教授	工学博士	石	井哲郎

論文の内容の要旨

(目的)

糖尿病性腎症はわが国において慢性透析患者原疾患の第2位(33%)を占める極めて重篤な糖尿病合併症である。糖尿病性腎症の早期発見・診断は糖尿病患者の治療上重要な問題である。現在行われている方法は尿中微量アルブミンの測定であるが、この尿中に微量アルブミンが出現する機序については、腎糸球体基底膜(GBM)の障害、特に陰性荷電障壁の障害によるGBMからのアルブミン透過性の亢進が主因と推測されているが、尿管機能障害説もあり、その明確な機序は不明である。

本研究はアルブミン(分子量:69000, PI=4.7-4.9)の非酵素的糖化(以後糖化)反応にともなう陰性荷電の増加(PI=3.0-4.2)に注目し、糖尿病性微量アルブミン尿の原因として、「GBM荷電障壁の障害」説、あるいは「尿細管の蛋白再吸収障害、特に蛋白の荷電依存性再吸収(近位尿細管では陰性荷電の弱い蛋白はより再吸収されやすい)の障害」のいずれが主因であるか、たまたまいずれがより早期に起こるかを糖化、非糖化蛋白血中濃度および尿中排泄量などを指標に解析した。

(対象と方法)

糖尿病患者(44名)、非糖尿病(28名)を蛋白尿の程度により、それぞれ3群(蛋白尿0.1g/gCr以下;正常および境界領域, 0.1-0.2g/gCr;微量蛋白尿, 0.2g/gCr以上;顕性蛋白尿)にわけて検討した。また、微量蛋白尿(0.08±0.03g/gCr)を有する糖尿病患者6名において厳密な血糖管理前後の変化を検討した。

糖化蛋白の抽出とアルブミン、トランスフェリンの測定法は糖化蛋白のケトアミンをaffinity columnで分離し、抗アルブミン抗体を用いて測定した。非糖化蛋白(画分Ⅰ)、糖化蛋白(画分Ⅱ)を緩衝液で抽出し、各画分のアルブミンを測定した。糖化、非糖化蛋白の比は次式にて計算した。糖化蛋白比= $\frac{\text{画分Ⅱ}}{\text{画分Ⅰ} + \text{画分Ⅱ}} \times 100$

また、分子量がほぼ同程度で、糖化により荷電の変化が少ないトランスフェリン(分子量75000; PI=5.2-5.3)について同様な検討を行った。蛋白量は免疫比濁法にて測定した。alcian Blue Binding Capacity(ABBC)の測定は、陽性荷電を有するAlcian Blue 8GXを用い、この物質がより陰性荷電の強い糖化アルブミンに結合しやすいという原理を用いて、アルブミンの陰性荷電状態を評価した。

(結果および考察)

I. 血中, 尿中糖化アルブミン, 総アルブミン比についての検討

1. 血清の糖化アルブミン化 (糖化アルブミン/総アルブミン) は HbA1c と強い正相関が認められた。
2. in vitro で糖化させた糖化アルブミンと ABBC 正相関が認められた。
3. 糖尿病微量アルブミン尿群では非糖尿病微量アルブミン尿群に比して, 血清の糖化アルブミン比は高値であり, 尿中の糖化アルブミン比は低値であった。
4. 血清の糖化アルブミン比を8-14%の範囲で同程度にそろえて糖尿病, 非糖尿病群の尿中の糖化アルブミン比を比較すると非糖尿病群で有意に高値であった。
5. 糖尿病微量アルブミン尿群において, 尿中の糖化アルブミン比は血清の糖化アルブミン比と強い正相関を示した。

以上の結果から, 糖尿病群においては, 血中の糖化アルブミン比が高いにもかかわらず, 何らかの理由により尿中の糖化アルブミン排泄が少ないことが判明した。そこで, 非酵素的糖化により, 糖化アルブミンの荷電がアルブミンよりさらに陰性に荷電することに注目し, ABBC で評価した陰性荷電の程度と血清, 尿中糖化アルブミン比の関連を検討した。

II. ABBC と血清, 尿中糖化アルブミンの関係

1. 尿中糖化アルブミン比および ABBC (アルブミンの糖化の指標である陰性荷電の程度) は血清糖化アルブミン比に相関した。
2. 糖尿病微量アルブミン尿群では血清糖化アルブミンが高いにもかかわらず, 尿中糖化アルブミンは低く, 血清糖化アルブミン比が高くなるにつれ, 尿/血清糖化アルブミン比は1に近くなった。
3. 3週間の厳密な血糖コントロールを行った患者では糖化アルブミン比と ABBC は低下したが, 減少していた糖化アルブミンの尿/血清比には変化がなかった。

そこで, 分子量がほぼ同程度で, 非酵素的糖化によっても荷電の変化が少ないトランスフェリンにおいて同様の検討を行った。

III. 糖化, 非糖化トランスフェリン, 尿中 β 2ミクログロブリン, NAG との関係

1. 尿中糖化トランスフェリン比と血清フルクトサミン値は正の相関を示した。
2. 尿中 β 2ミクログロブリンとトランスフェリンは糖尿病性腎症の微量蛋白尿患者において強く相関したが, 糖尿病性腎症顕性蛋白尿患者, 非糖尿病患者尿蛋白においては有意な相関は認められなかった。
3. 糖尿病微量蛋白尿群において, 糖化トランスフェリンの尿/血清比は何れの群においても有意差は認められなかった。
4. 尿中糖化アルブミン/尿中糖化トランスフェリン比は糖尿病微量蛋白尿群で最高値をとった。
5. 尿中のトランスフェリンと尿細管上皮細胞由来の尿中 NAG との間には相関が認められなかった。

以上の結果より, 糖尿病微量蛋白尿群において, 血中糖化トランスフェリンの増加にも拘わらず, 尿中糖化トランスフェリンの排泄態度は非糖尿病群に比して有意差が無く, 糖化アルブミンの尿中排泄低下は糖化によるアルブミンの荷電の低下が重要であり, これは尿細管における荷電依存性再吸収機序が糖尿病状態により, 機能的に障害されているものと推測された。

(結論)

腎尿細管において陰性荷電の弱い蛋白が再吸収されやすい (言い換えれば, 陰性荷電の強い糖化アルブミンは排泄されやすい) という, 荷電依存性の選択的尿細管再吸収の観点から糖尿病性腎症の初期に認められる微量アルブミン尿の糖化アルブミン比を検討した。その結果, 糖尿病性腎症の初期に認められる微量アルブミン尿は非糖化アルブミンの比率が多いことが明らかとなり, GBM の陰性荷電層の障害に先立ち, 尿細管での蛋白の荷電依存性再吸収障害が生ずるものと推測された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

糖尿病性腎症は本邦では慢性腎炎に次いで慢性透析患者の原疾患の第2位を占める糖尿病の重要な合併症である。その早期発見のために、微量アルブミン尿の測定が有用であるが、この微量アルブミン尿の原因が糖尿病による糸球体基底膜の硬化による陰性荷電層および濾過膜の障害が主因との説が多い。しかし、筆者らの研究に代表される様な、尿細管における蛋白の再吸収障害説も想定されつつある。本研究ではGBMの障害に先立ち、何らかの原因により、早期に尿細管における荷電依存性の蛋白再吸収に異常が生じ、アルブミンの非酵素的糖化による陰性荷電の強い糖化アルブミンの相対的な吸収の増加を来し、非糖化アルブミンの排泄増加が起こることを報告した。これは従来 of GBM 障害説に対して、新しい知見であり、糖尿病性腎症発症機序を解明するにあたり、高く評価出来る研究である。しかし、この現象が糖尿病性腎症による尿細管上皮細胞機能障害に起因するものか、あるいは蛋白の非酵素的糖化による構造上の変化による再吸収亢進に起因するものかが不明である。また筆者の指摘のごとく尿細管の機能障害が生ずるとしたら、尿細管上皮細胞の如何なる障害機序によりこの現象が生ずるかについては、さらなる検討が必要である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。