

尿中 ATP 濃度測定による腎障害の評価—基礎的検討

上原由紀 矢内 充 熊坂一成

Evaluation of renal damage using urinary ATP analysis

Yuki UEHARA, Mitsuru YANAI, and Kazunari KUMASAKA

Department of Laboratory Medicine, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

It is reported that urinary ATP concentration analysis is useful for determining urinary tract infection and renal damage caused by drugs. By means of the firefly luciferin-luciferase method, we determined the reference value of urinary free ATP and evaluated the effects of urine sediments and conditions of storage. The reference value was established as $1.77 \times 10^{-10} \sim 7.70 \times 10^{-9} \text{M}$ using urine samples obtained from 63 outpatients who seemed to have no renal disease. There was no significant difference in ATP concentration between 33 males and 30 females. No significant changes were observed in 11 healthy volunteers during a 1-year period. Within-run reproducibility of ATP was satisfying (8.28% and 11.4% of coefficient value in low and high concentration samples, respectively). ATP concentration was significantly decreased after centrifugation ($p < 0.05$) and after filtration ($p < 0.01$). The amounts of the red blood cells (RBC) and white blood cells (WBC) in samples whose ATP concentration was decreased after centrifugation or filtration were significantly higher than those in samples whose concentration did not decrease ($p < 0.05$). Urine containing many RBCs and/or WBCs might show an artificially higher ATP concentration if no preparations has been performed. There were significant positive correlations between the ATP concentrations before and after refrigeration, but no correlations before and after freezing.

It is concluded that the reference value of urinary free ATP concentration was $1.77 \times 10^{-10} \sim 7.70 \times 10^{-9} \text{M}$ and that care is required in the estimation of urinary ATP concentrations in samples containing many sediments, especially with WBC and RBC.

Jpn J Nephrol 2004 ; 46 : 693-699.

Key words : urinary ATP, firefly luciferin-luciferase method, reference value, urine sediment

背 景

Adenosine triphosphate (ATP) は主に細胞内のミトコンドリアにおいて解糖系と TCA 回路から産生され、生体におけるエネルギー供給物質として重要である。特に電解質やその他の物質の生体内濃度調節について重要な役割を果たす尿細管細胞では、物質の能動輸送に関与している。ATP の測定法としては様々なものがあるが、近年は ATP、酸素、マグネシウムの存在下において、蛍の尾部に存在するルシフェリンがルシフェラーゼという酵素によって発光する反応を利用する発光分析法が広く用いられるようになってきた。

これまで、ルシフェリン-ルシフェラーゼ法を用いた尿中 ATP 濃度測定は尿路感染症の診断法として 1970~1980 年代に多数報告されている^{1,2)}。また、腎臓内に存在する ATP 量については各種基質と単離ネフロン各分節内 ATP 含量との関連や細胞内 ATP 含量と薬剤性腎障害の関連などについて検討されており³⁾、薬剤性腎障害の結果腎臓内 ATP 濃度は著明に減少し、それにより腎障害を評価することが可能であると考えられている。しかし、患者の腎臓内 ATP 濃度そのものを測定するのは現実には困難であるため、尿中遊離 ATP 測定の有用性が腎疾患患者の尿を用いて検討され始めた。現在までに抗腫瘍剤による腎障害⁴⁾や仮死新生児の尿細管障害の指標としての有用性⁵⁾が報告

されている。

しかし、尿中遊離 ATP の測定においては、尿中阻害物質の影響で偽高値・偽低値が生じやすいこと⁹⁾や、間質性膀胱炎患者において膀胱上皮から ATP 遊離の増加が認められる⁷⁾など、沈渣成分の影響を示唆する報告もあり、尿中遊離 ATP 濃度は検体の状態により左右されと考えられる。

そこで、今回われわれは、尿中遊離 ATP 測定を腎障害の指標として用いる際の基準値の設定を行い、さらに測定上・保存上の問題点について検討を行った。

対象および方法

1. 基準値の設定

A. 対象

日本大学医学部附属板橋病院の外来を受診し、血液生化学検査において尿素窒素、クレアチニン値が基準範囲内を示し、また随時尿一般検査(定性および沈渣)に異常を認めない、同意の得られた患者 63 名(男性 33 名、女性 30 名、年齢 57.1 ± 14.5 歳)を対象とした。なお、尿沈渣の分析は日本臨床検査標準協議会の指針⁸⁾に従って行った。

B. ATP 測定法

測定試薬は、発光試薬としてルシフェール 250(キッコマン(株)、千葉)を、検量線作成にはルシフェール ATP 標準試薬(キッコマン(株)、千葉)を用いた。標準試薬および尿検体の希釈には pH 7.5 の 10 mM-PBS(日本凍結乾燥研究所(株)、東京)を用いた。

検体の随時尿は採取後室温で保存し、4 時間以内に遊離 ATP を測定した。測定は、まず 10 mM-PBS で 11 倍に希釈した検体尿 200 μ l とルシフェール 100 μ l とを専用試験管ルミチューブ(キッコマン(株)、千葉)内で混和し、20 秒以内に発光測定器ルミテスター C-100[®](キッコマン(株)、千葉)に投入して発光量の測定を行った。発光量は ATP 標準試薬を用いて作成した検量線を用いて ATP 濃度に換算し、希釈倍率を乗じて希釈前の尿中 ATP 濃度を求めた。検量線作成は標準試薬の使用説明書に従って行った。

C. 基準値の設定

測定した尿中 ATP 濃度を用い、パラメトリック法により基準値の設定を行った。

2. 測定上の問題点の検討

A. 対象

日本大学医学部附属板橋病院の外来を受診し、随時尿一

般検査(定性および沈渣)の依頼があり、同意の得られた患者 32 名(男性 12 名、女性 20 名、年齢 61.0 ± 15.3 歳)を対象とした。

B. 測定法

測定は 1-B. と同様に行った。

C. 同時再現性の検討

対象のうち、尿中 ATP 濃度低値例・高値例各 1 名について、それぞれ 10 回連続測定を行って同時再現性を調べた。

D. 年間変動の検討

対象のうち、血液生化学検査において尿素窒素、クレアチニン値が基準範囲内であり、随時尿定性および沈渣に異常を示さず、かつ尿中 ATP 濃度が基準範囲内にあった患者 11 名において、1 年後に尿中 ATP 濃度を再測定して年間変動を調べた。検定には paired-t 検定を用いた。

E. 沈渣の影響の検討

対象の尿中 ATP 濃度を測定後、さらに検体を 500 G で 5 分間遠心した上清を用いて再測定を行い、遠心前の結果と比較した。また、これらの検体を孔径 0.10 μ m のフィルター(Millex-VV[®], Durapore; Millipore Co. Massachusetts, USA)にて濾過し、再測定を行い遠心前の結果と比較した。処理前後の比較には paired-t 検定を用い、また、尿沈渣量との関連については、尿沈渣量を層別化し Mann-Whitney の U 検定を用いて検討した。

F. 保存の影響の検討

対象のうち、12 名分の検体を 4°C で冷蔵保存し、約 24 時間後に再度 ATP 濃度を測定して冷蔵前後の相関をみた。また、20 名分の検体を -80°C で凍結保存し、3 カ月後に室温で融解して再度 ATP 濃度を測定し、凍結前後の相関をみた。

結 果

1. 基準値の設定

尿中 ATP 濃度は自然対数をとることで正規分布化が可能であった。男女間に有意差は認められなかった。尿中 ATP 濃度の基準値は対数表示の $\text{mean} \pm 2 \text{SD}$ をとり、 $1.77 \times 10^{-10} \sim 7.70 \times 10^{-9} \text{M}$ となった (Fig. 1)。

2. 測定上の問題点の検討

A. 同時再現性および年間変動

低・高値検体の変動係数は、それぞれ 8.28%, 11.4% と良好であった (Table)。また、腎機能の安定している患者では 1 年間で有意な変動は認められなかった (N. S., Fig. 2)。

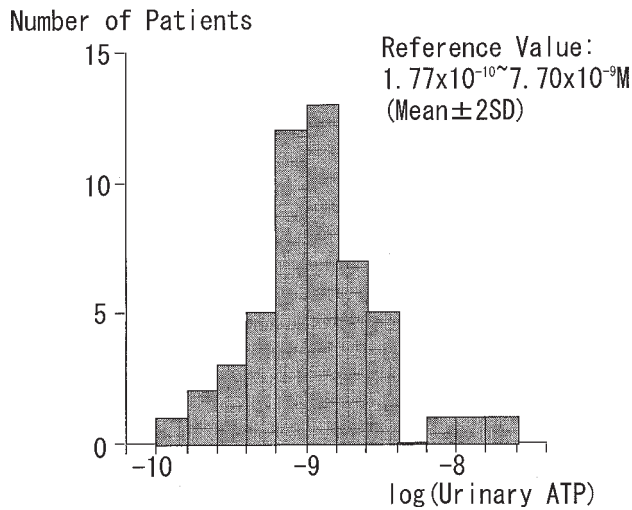


Fig. 1. Distribution of urinary ATP concentration in 63 patients

Reference value should be $1.77 \times 10^{-10} \sim 7.70 \times 10^{-9} \text{ M}$ (mean $\pm$ 2SD).

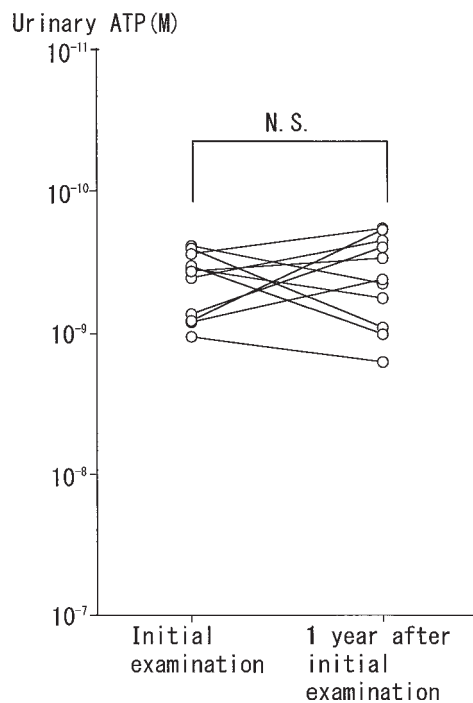


Fig. 2. Changes in urinary ATP concentration during a 1-year period

No significant changes were observed.

B. 沈渣の影響

遠心後、上清検体の尿中 ATP 値は未処理検体に比較し有意に低値を示した ($p < 0.05$, Fig. 3)。また、フィルター濾過後検体の尿中 ATP 値も、未処理検体に比較し有意に低値を示した ($p < 0.01$, Fig. 4)。いずれの処理においても、

Table. Within-run reproducibility

	Urinary ATP (M)	
	Sample 1	Sample 2
1	5.22×10^{-9}	3.07×10^{-8}
2	4.27×10^{-9}	2.52×10^{-8}
3	4.50×10^{-9}	3.21×10^{-8}
4	4.90×10^{-9}	3.45×10^{-8}
5	4.03×10^{-9}	3.44×10^{-8}
6	4.43×10^{-9}	2.78×10^{-8}
7	4.50×10^{-9}	2.81×10^{-8}
8	4.33×10^{-9}	2.67×10^{-8}
9	4.06×10^{-9}	3.11×10^{-8}
10	4.24×10^{-9}	2.65×10^{-8}
Mean	4.44×10^{-9}	2.94×10^{-8}
SD	0.37×10^{-9}	0.33×10^{-8}
CV (%)	8.28	11.4

Within-run reproducibility of ATP was 8.28% in a low-concentration sample, and was 11.4% in a high-concentration sample. SD is standard deviation, and CV is coefficient of variation.

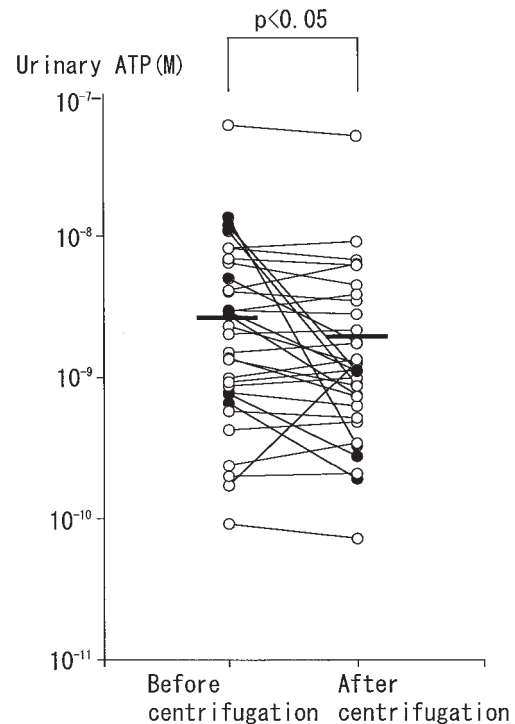


Fig. 3. Changes in urinary ATP concentration before and after centrifugation

ATP concentration was significantly decreased after centrifugation ($p < 0.05$). Closed circles indicate the samples whose log(ATP concentration) decreased over 0.4, and the bar on each line is the mean ATP concentration.

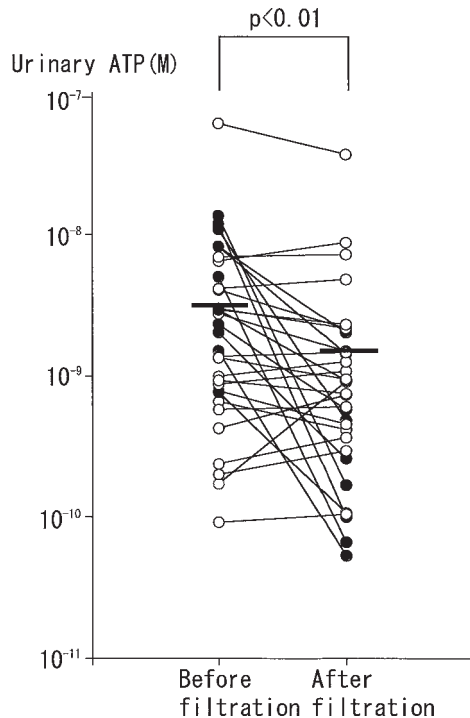


Fig. 4. Changes in urinary ATP concentration before and after filtration

ATP concentration was significantly decreased after filtration ($p < 0.01$). Closed circles indicate the samples whose log (ATP) decreased over 0.4, and the bar on each line indicates the mean ATP concentration.

log(尿中 ATP 値)が 0.4 以上低下した群では、それ以外の群と比較して沈渣の白血球数および赤血球数が有意に多かった ($p < 0.05$, Fig. 5, 6)。細菌数やほかの沈渣成分については有意な差は認められなかった。

C. 保存の影響

未処理検体、遠心後上清検体、フィルター濾過後検体の冷蔵前後における測定値の回帰式および相関係数は、それぞれ $y = 0.61x - 4.12$; $r = 0.62$ ($p < 0.05$), $y = 1.12x + 0.51$; $r = 0.96$ ($p < 0.01$), $y = 1.10x + 0.50$; $r = 0.99$ ($p < 0.01$) であり、いずれも有意な正の一次相関を示した (Fig. 7)。しかし、未処理検体では測定値の変化がより顕著であった。また、未処理検体、遠心後上清検体、フィルター濾過後検体の凍結前後における測定値の相関係数は、それぞれ 0.09 (N. S.), 0.09 (N. S.), 0.01 (N. S.) であり (Fig. 8), いずれの処理においても有意な相関は認められなかった。

考 察

これまでルシフェリン-ルシフェラーゼ法による尿中 ATP 濃度測定は、尿路感染症の診断法として 1970 年代より多数報告されている^{1,2)}。また食品衛生の分野でも、ルシフェリン-ルシフェラーゼ法による ATP 測定が細菌の有無の検索に利用されている⁹⁾。尿路感染症の診断は、尿中に存在する体細胞由来 ATP と遊離 ATP を消去したうえで、細菌内の ATP を抽出して ATP 量の測定を行うも

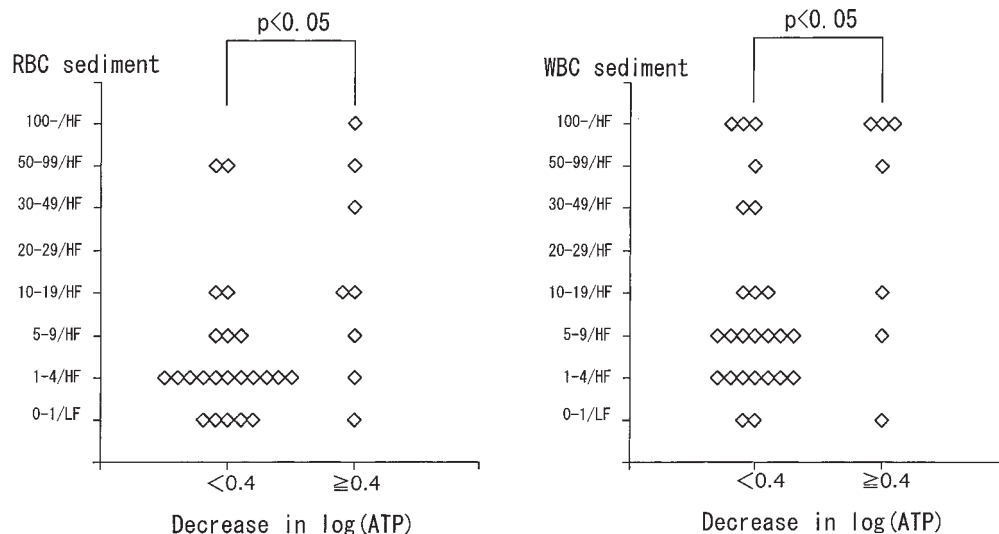


Fig. 5. Comparison of the amounts of RBC and WBC in urine sediments between the group whose log(ATP) decreased over 0.4 and the group whose concentration did not decrease after centrifugation

The amounts of RBC and WBC in urine samples whose ATP concentration decreased were significantly more than those in the samples whose concentration did not decrease ($p < 0.05$).

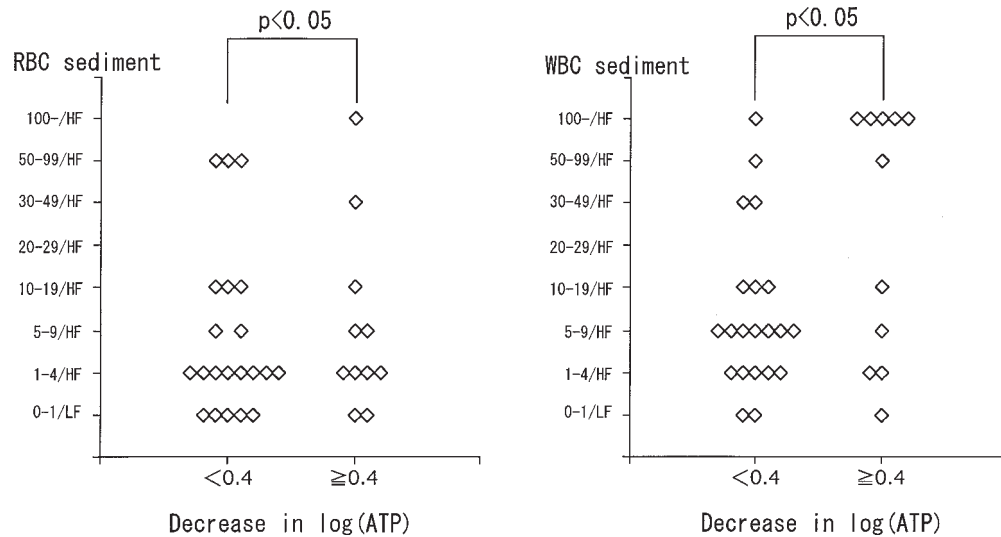


Fig. 6. Comparison of the amounts of RBC and WBC in urine sediments between the group whose log(ATP) decreased over 0.4 and the group whose concentration did not decrease after filtration

The amounts of RBC and WBC in urine samples whose ATP concentration decreased were significantly higher than those in the samples whose concentration did not decrease ($p < 0.05$).

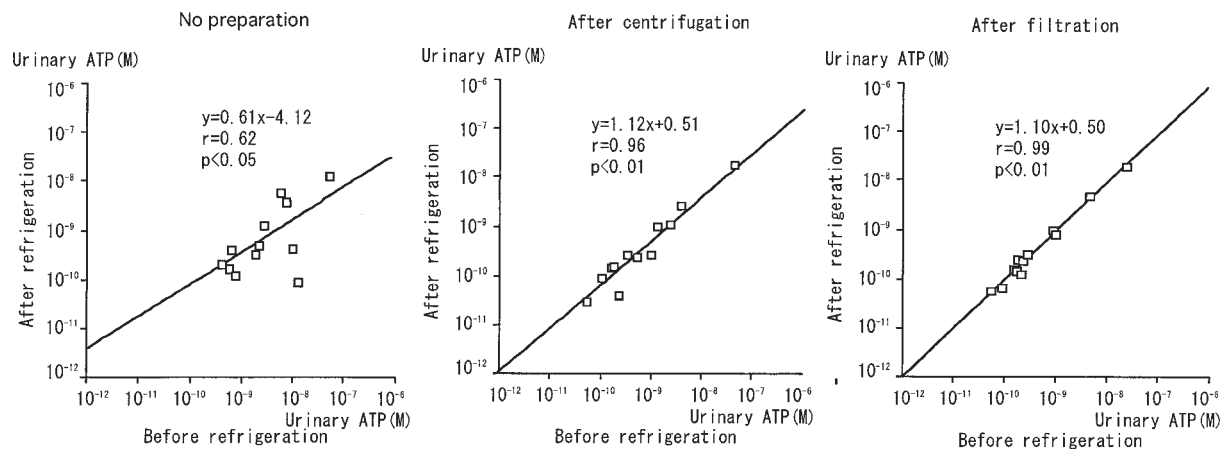


Fig. 7. Correlation of ATP concentration between samples before and after refrigeration

There were significant positive correlations between the samples before and after refrigeration, but the coefficient of correlation of ATP concentration in samples without preparation were less than in samples with preparations.

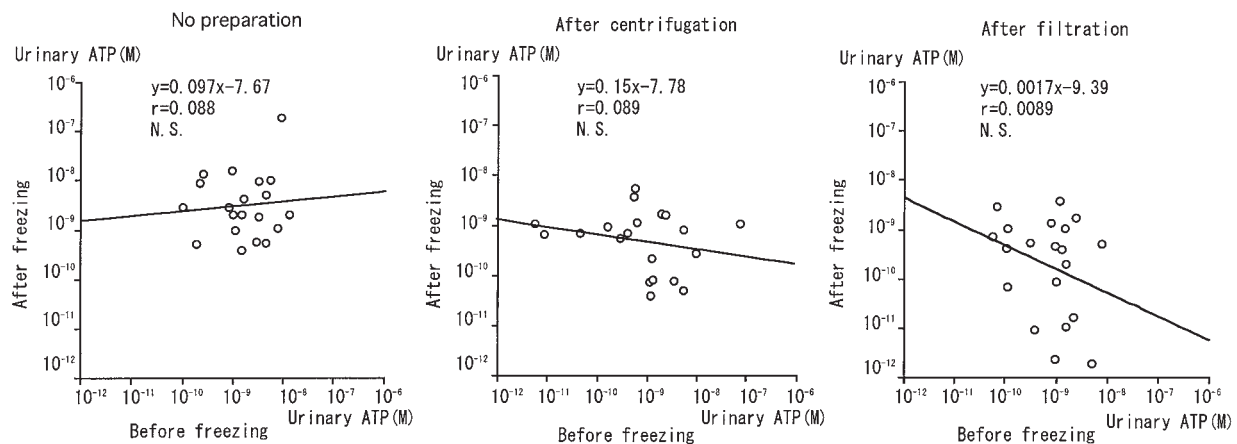


Fig. 8. Correlation of ATP concentration between samples before and after freezing

There were no correlations of ATP concentration between samples before and after freezing.

ので、この ATP 量は細菌量を反映するため、細菌同定はできないものの、培養の結果を待たずに尿路感染症の診断が可能であるとされた。しかし、1970 年代当時は蛍の尾部から直接ルシフェラーゼを抽出していたため試薬が高価であり、検査法として普及しなかった。しかし、尿路感染症の診断では消去されていた遊離 ATP 濃度が逆に腎障害の指標として着目されるようになった。ルシフェリン-ルシフェラーゼ法を用いた場合、検査手技は検体と PBS と試薬を混合して測定するだけであり、簡便で同時再現性が良いこと、また、発光量測定に要する時間が正味 10 秒と短いことなどが利点である。近年ではルシフェラーゼの遺伝子がクローニングされて安価なルシフェラーゼが販売されるようになり、実用性も高まったと言える。

Jung らによるネフロン構成細胞内の ATP 局在と産生についての報告では、特に尿細管から集合管にかけての細胞で ATP 産生が盛んであることや、塩化水銀の投与でこれらの細胞の ATP 含量が低下することが明らかになっている³⁾。尿中遊離 ATP 濃度に関しては、中島らが、前立腺癌に対してシスプラチンの投与を行った患者の尿において、尿の ATP 分解活性が上昇し ATP 濃度は低下していること、および尿中 NAG や尿中 β_2 microglobulin といった従来の尿細管障害の項目と逆相関して変動することを報告している⁴⁾。また、仮死新生児においては、尿中 NAG に変動を認めなくても尿中 ATP 濃度と ATP 分解活性の上昇が認められるという報告もある⁵⁾。よって、尿中遊離 ATP は簡便な尿細管障害の新たな指標として期待されるようになった。われわれも、糖尿病性腎症の腎症前期から早期腎症へと移行する時期に尿中 ATP 濃度の上昇を認めることを報告してきた¹⁰⁾。一方、尿では阻害物質の影響が加わる場合には偽高値・偽低値が生じやすく、日常検査としては利用できないという報告⁶⁾や、間質性膀胱炎患者では膀胱上皮からの ATP 遊離が増加した結果尿中 ATP 濃度が増加するという⁷⁾、尿沈渣成分が測定値に影響を与える可能性を示唆する報告もある。測定の至適温度や pH、阻害物質の影響については Leach によって検討されており¹¹⁾、今回のごとく尿を pH 7.5 の PBS で希釈し室温で測定を行えば大きな問題はないと考えられる。しかし尿沈渣の影響に関しては、遠心分離やフィルター濾過によって ATP 濃度が低下する検体が存在することから、無視できないと考えられる。遠心分離やフィルター濾過によって ATP 濃度が低下する検体では尿沈渣中の白血球と赤血球が有意に多かったが、他の沈渣成分には有意な差は認められなかった。このような検体では測定過程で白血球や赤血

球に含まれる ATP が遊離している可能性があるため、尿沈渣中に白血球や赤血球が多く含まれる検体では尿中 ATP 濃度の結果の解釈に注意が必要であると考えられた。

臨床検査室では、検体の冷蔵・冷凍保存が可能か否かは重要な問題である。冷蔵保存については、遠心分離やフィルター濾過後の検体では冷蔵前後で良好な相関を示したことから、やはり沈渣が測定に影響を及ぼすと考えられ、尿沈渣が多く含まれる検体の冷蔵保存は避けるべきであると思われた。また、凍結保存についてはすでに中島らが -20°C で凍結保存した検体を用いて基準値の設定を行っている⁴⁾が、今回われわれが検討した新鮮尿における基準値はより低値となった。また、沈渣の除去後に凍結保存しても凍結前との相関が不良であったため、検査として実用するには冷凍は避けるべきであると考えられた。

尿中遊離 ATP 濃度はいまだ臨床的意義が確立していないが、今後各種の腎疾患において検討を行い、その有用性について検証する必要がある。

結 論

生物発光を用いた尿中 ATP 濃度測定は短時間で施行でき再現性も良いという点で、新しい腎障害のマーカーとして簡便な検査となりうる。しかし、尿沈渣、特に白血球・赤血球の存在によって偽高値を示す可能性があり、これらの沈渣を多く含む検体では結果の解釈に注意が必要と考えられた。また、未処理検体の冷蔵保存や冷凍保存は避け、検体採取後なるべく早期に沈渣を除去して測定すべきであると考えられた。

文 献

1. Ruokonen A, Koskinen M, Leinonen M, Tiikikainen A, Vihko R. Screening of bacteria in urine using luciferin-luciferase assay of microbial ATP: a comparative study. *Ann Clin Biochem* 1982; 19: 416-420.
2. Thore A, Ansehn, Lundin A, Bergman S. Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenocine triphosphate. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 1-8.
3. Jung KY, Uchida S, Endou H. Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content: I. Substrate specificities in the maintenance of ATP content in isolated rat nephron segments. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 100: 369-382.
4. 中島基雄, 江藤由紀, 矢内 充, 川村理佐子, 金子一成, 青柳一正, 小磯健吉. 新しい腎障害の尿中マーカー, ATP-抗癌剤投与患者, 糖尿病患者, 新生児での検討. *臨床病理* 2002; 50: 513-518.

5. 川島理佐子, 土屋久美, 大友義之, 金子一成, 山城雄一郎. 新生児における尿中 ATP の意義. 発達腎研究会誌 2002 ; 10 : 18-20.
6. Cohn RB, Charache P, Chappelle EW. Limits of applicability of the firefly luminescence ATP assay for the detection of bacteria in clinical specimens. *Am J Clin Pathol* 1975 ; 63 : 493-501.
7. Sun Y, Keay S, De Deyne PG, Chai TC. Augumented stretch activated adenosine triphosphate release from bladder uroepithelial cells in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2001 ; 166 : 1951-1956.
8. (社)日本臨床衛生検査技師会(編). 尿沈渣検査法 2000. 日本臨床衛生検査技師会, 2000.
9. 本間 茂. HACCP における ATP ふきとり検査の役割. 月刊 HACCP 1999 ; 5 : 56-62.
10. 江藤由紀, 矢内 充, 荻原典和, 中島基雄, 熊坂一成. 糖尿病患者における尿中微量 ATP 濃度測定の意義(第 2 報). 臨床病理 2002 ; 50(補冊) : 231.
11. Leach FR. ATP determination with firefly luciferase. *J Appl Biochem* 1981 ; 3 : 473-517.