

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

生体マーカーを用いた重症インフルエンザの病態解析と治療開発  
- 尿中バイオマーカーの迅速検査についての検討 -

研究分担者 塚原宏一

研究協力者: 林 優子、山田睦子、野坂宣之、斎藤有希恵、吉本順子

藤井洋輔、八代将登、津下 充、森島恒雄

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学)

**研究要旨**

L型脂肪酸結合蛋白(L-type fatty acid binding protein; L-FABP)は2011年に保険収載された腎臓特異的のストレスマーカーである。今回、小児患者を対象にして、新規開発された尿中L-FABP迅速キットの有用性を検討した。

対象は13名、1か月～21歳、男/女は8/5であった。危急患者は3名、その他の重症患者は7名、病的意義の乏しい「対照」は3名であった。尿中L-FABP(迅速およびELISA)、尿中8-OHdG(迅速)、尿中NAG、血清Crを計測した。

結果: L-FABP検査(迅速)については、大体20 ng/mL以上(ELISA値)で陽性所見(1+以上)を呈した。異常値を呈した患者はL-FABP(迅速)で7名(1+が4名、2+が2名、3+が1名)、L-FABP(ELISA)で8名(Cr比でも同じ8名)、8-OHdGで4名、NAGで5名、血清Crで3名であった。L-FABP(迅速)にて陽性を呈したのは腎障害を含む重症疾患の児に限られた。腎障害患者では全身レベルの酸化ストレス指標である尿中8-OHdGは顕著な増加を示さなかった。

結論: L-FABP検査(迅速)の腎障害の検出感度は良好と思われた。生体応答的機序により腎臓特異的に発現する尿中マーカーを用いて腎機能を評価することの重要性が示唆された。

**A. 研究目的**

生体マーカー計測の長所は非～低侵襲、生体応答的な病態解析、患者容態の継続評価、動物実験との双方向性、迅速診断による緊急対応などである。

L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)は2011年に保険収載された腎臓特異的のストレスマーカーである(図1)。今回、小児患者を対象にして、新規開発された尿中L-FABP迅速キットの有用性を検討した。

**B. 研究方法**

尿中L-FABPの迅速キットは50μLを15分で解析できる小型スライドである(シミック社、東京)。陽性所見の程度を目視により1+～3+で表した(標準ラインと比べて薄ければ1+、同程度であれば2+、濃ければ3+)。尿中

L-FABPはELISA(シミック社)でも計測した。全身性酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdGの迅速検査(ICR-001、テクノメディカ社、横浜)、尿中NAG、血清Crも計測した。

尿中L-FABP、8-OHdG、NAG、血清Crの基準値をそれぞれ(-)、<10 ng/mL(<10 ng/mg Cr)、<30 ng/mg Cr、<10 U/L、<1.2 mg/dLとした。

対象は13名、1か月～21歳、男/女は8/5であった。危急患者は3名(表中では星印で示した)、その他の重症患者は7名、病的意義の乏しい「対照」は3名であった(表1)。

**<倫理面への配慮>**

被験者の保護者に研究の目的と内容を詳しく説明し、同意が得られた方のみを対象にした。検体はすべて暗号で表示しなおしてから検査を開始した。データ保存についても個人が特定されないように十分に配慮した。

## C. 研究結果

結果を範囲で表す。L-FABP (迅速) は (-) ~ (3+)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ~ 1271 ng/mL (< 4.3 ~ 1686 ng/mg Cr)、8-OHdG は 5.7 ~ 108 ng/mg Cr、NAG は 1.7 ~ 30.2 U/L、血清 Cr は 0.16 ~ 2.30 mg/dL であった(表1)。

L-FABP (迅速) については、大体 20 ng/mL 以上(ELISA)で陽性所見(1+以上)を呈した。

異常値を呈した患者は L-FABP (迅速) で 7 名(1+が 4 名、2+が 2 名、3+が 1 名)、L-FABP (ELISA) で 8 名(Cr 比でも同じ 8 名)、8-OHdG で 4 名、NAG で 5 名、血清 Cr で 3 名であった。L-FABP (迅速) にて陽性を呈したのは腎障害を含む重症疾患の児に限られた。

L-FABP (迅速) で(1+)以上であった 7 名はすべて ELISA でも異常高値を示し、半定量値と ELISA 値は正相関した。その 7 名において 8-OHdG、NAG が異常高値を示したのは、それぞれ 3 名(43%)、4 名(57%)であった。

腎不全の 3 名の L-FABP (迅速、ELISA とも)は異常高値であったが、8-OHdG は高くなかった。新生児 Dent 病(疑)の乳児では L-FABP (迅速) は(1+)であったが、別に計測した健常の弟(双児)では(-)であった。

## D. 考察

米国 NIH によれば、生体マーカーは「病態生理学的な裏づけのもとに測定され、治療介入による薬理的応答を評価しうる客観的指標」と定義される。

生体マーカーは疾患の危険度の評価、早期スクリーニング、患者の層別化と予後予測、治療介入に対する反応性評価などの領域で、臨床医の大きな手助けになると期待されている。侵襲性がほとんどなく、継続的に評価できることは小児には福音である。

2012 年 3 月、腎疾患に関する国際的ガイドライン策定を目指して設立された Kidney Disease: Improving Global Outcome (通称 KDIGO) により Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury (AKI) が発表された。AKI については 5 つの生体マーカーが推奨された。Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、Cystatin C、Interleukin 18、Kidney injury molecule-1 (KIM-1)、および、L-FABP である。

我々は、とりわけ早期診断性に長けた L-FABP の尿中排泄を計測することで、小児患者の AKI を早期予測できるかどうか基礎的検討を進めている。さらに、最近開発された迅速キットを併用することで、診療の現場で重症度評価、患者層別化を行うことができるかどうか検討している。

L-FABP は脂肪酸負荷、内因性・外因性有害物負荷、酸化障害、虚血障害などによって腎近位尿細管細胞で誘導され、有害物や不要物をペロキシゾームに担送する蛋白質である。Dent 病は腎尿細管細胞ペロキシゾームの先天性機能障害を特徴とする。

ところで、L-FABP 誘導はペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor) 刺激でも起こる。そのリガンドであるフィブラート、チアゾリジン(ともに糖脂質代謝改善薬)によっても L-FABP 発現は増強する。L-FABP 誘導は、これらの薬剤の多方面作用(とくに抗酸化作用)の一翼をなすと推察される。

今回の研究では、L-FABP 検査(迅速)で(1+)以上であった(異常高値を示した)7 名はすべて、腎障害を含めた重症疾患児であった。その 7 名のうち代表的な酸化ストレスマーカーである 8-OHdG、腎近位尿細管傷害マーカーである NAG が異常高値を呈したものはそれぞれ 43%、57%にすぎなかった。L-FABP 検査(迅速)の腎障害の検出感度は良好と思われた。

慢性腎不全を含めた慢性病態では尿中 8-OHdG は顕著には増加しないことが多い。尿中 8-OHdG が全身レベルの酸化環境を反映して平均化されるのか、病的に健常細胞が少なくなった腎臓では 8-OHdG も少なくなるのか明らかでないが、生体応答的機序により腎臓特異的に発現する尿中マーカーを用いて腎機能を評価することの重要性が示唆された。

## E. 結論

L-FABP 検査(迅速)は大体 20 ng/mL 以上(ELISA 値)で陽性所見を呈した。その半定量値と ELISA 値は正相関した。個々患者で検討すると、L-FABP 計測のターゲットは(8-OHdG とは異なり)腎臓特異的と推察された。L-FABP (迅速)は緊急を要する医療現場で(不便な環境でも)応用可能と期待された。

今後、L-FABP 検査(迅速)がその後の腎機能の推移を予知するのに有用であるかどうか検証する予定である(なお、本研究は菅谷 健博士(聖マリアンナ医科大学・腎臓高血圧内科)のご協力のもとになされた)。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Kawatani M, Hiratani M, Kometani H, Nakai A, Tsukahara H, Tomoda A, Mayumi M, Ohshima Y. Focal EEG abnormalities might reflect neuropathological characteristics of pervasive developmental disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Brain**

Dev 34 (9): 723-730, 2012.

(2) Nagasaka H, Miida T, Inui A, Inoue I, Tsukahara H, Komatsu H, Hiejima E, Fujisawa T, Yorifuji T, Hirano K, Okajima H, Inomata Y. Fatty liver and anti-oxidant enzyme activities along with peroxisome proliferator-activated receptors and expressions in the liver of Wilson's disease. **Mol Genet Metab** 107 (3): 542-547, 2012.

(3) Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. **Crit Care Med** 41 (1):166-176, 2013.

(4) Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: Relation to maternal and neonatal characteristics. **J Clin Biochem Nutr** 52 (1): 27-31, 2013.

(5) Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano K, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Ohtake A, Yamato S, Miida T. Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. **Clin Chim Acta** 416: 54-59, 2013.

(6) Nagasaka H, Miida T, Yorifuji T, Hirano K, Inui A, Fujisawa T, Tsukahara H, Hayashi H, Inomata Y. Metabolic improvements in intrahepatic porto-systemic venous shunt presenting various metabolic abnormalities by 4-phenylacetate. **Clin Chim Acta** 2013 (in press).

(7) 塚原宏一. 知っておきたい内科症候群 - 急性腎炎症候群 **内科** 109 (6): 1390-1392, 2012.

(8) 塚原宏一. 酸化ストレスの生体マーカー.

**小児感染免疫** 24 (2): 181-189, 2012.

(9) 塚原宏一, 吉本順子, 宮島悠子, 横内恵子, 長岡義晴, 森島恒雄. 早産新生児の循環動態変化とそれに基づいた輸液管理. **日本小児体液研究会誌** 4: 15-23, 2012.

## 2. 学会発表

(1) 塚原宏一. DW high/ADC low の可逆性脳梁膨大部病変の発見とその後の展開 - 先行感染の病原としてのロタウイルス/インフルエンザウイルス. 第17回広島県東部小児感染・免疫研究会, 福山, 2012年(6月).

(2) 塚原宏一. 小児科領域における酸化ストレス関連疾患とその評価法. 第8回中国・四国喘息研究フォーラム, 岡山, 2012年(9月).

(3) 齊藤有希恵, 津下 充, 藤井洋輔, 長岡義晴, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄. サイトカインによる肺血管内皮細胞機能障害のメカニズム. 第44回日本小児感染症学会, 小倉, 2012年(11月).

(4) 中務陽子, 塚原宏一, 山田睦子, 藤井洋輔, 森島恒雄. Early third trimester における妊婦の血清 Thioredoxin (TRX) -1 および酸化ストレス環境の評価. 第44回日本小児感染症学会, 小倉, 2012年(11月).

(5) 中務陽子, 塚原宏一, 森島恒雄. 妊娠28週前後の妊婦における血清 thioredoxin-1 および酸化ストレス環境の評価. 第57回日本未熟児新生児学会, 熊本, 2012年(11月).

(6) 林 優子, 塚原宏一, 村岡倫子, 齊藤有希恵, 藤井洋輔, 八代将登, 鷲尾佳奈, 嶋田 明, 小田 慈, 森島恒雄. 血液・腫瘍疾患を有する小児における尿を用いた病態評価 - 酸化ストレスマーカーの計測. 第85回日本小児科学会岡山地方会, 岡山, 2012年(12月).

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし