

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: 山田睦子, 斎藤有希恵, 藤井洋輔
八代将登, 野坂宜之, 吉本順子, 鷲尾洋介, 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

今回、新規開発された尿中 L-type fatty acid binding protein (L-FABP) 迅速計測スライド (シミック社、50 μ L を 15 分で解析できる) の基礎的および臨床的有用性を検討した。

対象は 22 例、生後 5 日 ~ 21 歳; 容態の不安定な患者は 5 例、比較的安定な患者は 11 例、病的意義の乏しい患者 (対照) は 5 例であった。スポット尿中の L-FABP を迅速スライド (陽性を 1+ ~ 3+ に分けた)、ELISA (シミック社) にて計測して両者の相関を調べた。尿中 8-OHdG の迅速計測 (ICR-001、テクノメデイカ社)、NAG、B2M、血清 Cr の計測も同時に行った。L-FABP (迅速) は (-) ~ (3+) (1+ が 6 例、2+ が 3 例、3+ が 1 例)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ~ 1,271 ng/mL (< 0.9 ~ 1,686 ng/mg Cr) であった。L-FABP (迅速) は L-FABP (ELISA) と有意に正相関した ($r = 0.74$, $p < 0.001$)。L-FABP (迅速) は ELISA での計測値 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) で (1+)、100 ng/mL で (2+) を示した。L-FABP (ELISA) は 8-OHdG、NAG、B2M、血清 Cr と有意相関を示さなかった。

追加の研究として、24 例 (生後 10 月 ~ 18 歳、男/女は 13/11) の容態安定 (外来フォロー中) の CKD 患者を対象に尿 L-FABP (ELISA) を計測したが、ネフローゼを再発した 2 例 (141、246 ng/mL)、重症心疾患の 1 例 (45 ng/mL) 以外は < 20 ng/mL であった。もし L-FABP (迅速) を施行した場合、この 3 例以外は (-) になると推定された。加えて、インフルエンザ脳症を呈した 1 例 (2 歳女性) では入院時 L-FABP (迅速) は (-)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ng/mL (< 11.8 ng/mg Cr) であったが、その後は初期予測どおりに急性腎障害を呈さなかった。

結論: L-FABP (迅速) は 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) 前後で陽性を呈した (この値は急性腎障害発症予測のカットオフ値である)。その半定量値と ELISA 値は有意に正相関した。L-FABP 迅速計測スライド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。

A. 研究目的

生体マーカー計測の長所は非 ~ 低侵襲性、生体応答的な病態解析、患者容態の迅速評価、緊急対応などである。L-type fatty acid binding protein (L-FABP) は 2011 年に保険収載された腎臓特異的酸化ストレスマーカーであり、急性腎障害 (AKI) 発症予測、慢性腎障害 (CKD) 予後予測のマーカーとして知られている。

今回、我々は新規開発された尿中 L-FABP 迅速計測スライド (シミック社、50 μ L を 15 分で解析できる小型スライド; Immunochromatography を原理にしている) の基礎的および臨床的有用性を検討した。

B. 研究方法

< 研究 1 >

対象は 22 例、生後 5 日 ~ 21 歳、男/女は 15/7 であった。容態の不安定な (入院での集中治療が必要な) 患者は 5 例 (重症心疾患、末期悪性疾患、移植後合併症、血球貪食症候群、重症新生児)、容態の比較的安定な患者は 11 例 (悪性疾患、膠原病、慢性腎障害、ネフローゼ症候群、Lowe 症候群、Dent 病など)、病的意義の乏しい患者 (対照) は 5 例であった。

スポット尿中の L-FABP を迅速計測スライド (陽性を 1+ ~ 3+ に分けた)、ELISA (シミック社) にて計測して両者の相関を調べた。全身性酸化

ストレスマーカーとして知られる尿中 8-OHdG の迅速計測(ICR-001、テクノメディカ社)、NAG、B2M、血清 Cr の計測も同時に行った。基準値は L-FABP で < 10 ng/mL (< 10 ng/mg Cr)、8-OHdG で < 25 ng/mg Cr とした。

< 研究 2 >

対象は 24 例、生後 10 月 ~ 18 歳、男/女は 13/11 の容態安定(外来フォロー中)の CKD 児であった。CKD は Stage 1 ~ Stage 2 (eGFR が 60 mL/min/1.73 m² 以上)であった。

スポット尿中の L-FABP を ELISA (シミック社) にて計測した (迅速計測スライドでの計測は行われなかった)。< 研究 1 > の結果より L-FABP (ELISA) での 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) が L-FABP (迅速) (1+) に相当することが示されたが (後述)、< 研究 2 > では基礎に CKD のあることが L-FABP (迅速) の結果に影響するのかが検討した。

< 研究 3 (前方視的検討) >

対象は 2 歳の女性である。インフルエンザ A の患者で発熱、意識障害、不随運動を呈した。脳 MRI (拡散強調画像) では両側小脳半球に高信号域 (ADC 低値) が見られた。オセルタミビル、マンニトール、メチルプレドニゾロン、グロブリン、エダラボンなどの薬物療法が施行された。

ここでは入院当日の L-FABP (迅速) および L-FABP (ELISA) とその後の血清 Cr 変化との関連を検討した。

C. 研究結果

< 研究 1 >

L-FABP (迅速) は (-) ~ (3+) (1+ が 6 例、2+ が 3 例、3+ が 1 例; 陽性を示したのは不安定な患者で 5 例 (5/5 = 100%)、比較的安定な患者で 5 例 (5/11 = 45%)、対照で 0 例 (0/11 = 0%)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ~ 1,271 ng/ml (< 0.9 ~ 1,686 ng/mg Cr)、8-OHdG は 5.7 ~ 643 ng/mg Cr、NAG は 1.4 ~ 30.2 U/L、B2M は 84 ~ 107,000 μg/L、血清 Cr は 0.16 ~ 2.30 mg/dL であった。

基準値を超えた患者は L-FABP (迅速) で 10 例 (10/22 = 45%)、L-FABP (ELISA) は 11 例 (11/22 = 50%)、8-OHdG は 10 例 (10/22 = 45%)、NAG は 8 例 (8/22 = 36%)、B2M は 10 例 (10/20 = 50%)、血清 Cr は 3 (3/22 = 14%) であった。Lowe 症候群の 2 例、Dent 病の 1 例は (容態安定群ながら) 尿 L-FABP、B2M は著明な高値を示した。

L-FABP (迅速) は L-FABP (ELISA) と有意に正相関した ($r = 0.74$, $p < 0.001$) (図 1)。L-FABP (迅速) は大体 ELISA での計測値 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) で (1+)、100 ng/mL で (2

+) を示した。なお、L-FABP (ELISA) は尿中 8-OHdG、NAG、B2M、血清 Cr と有意相関を示さなかった。

< 研究 2 >

L-FABP (ELISA) は、再発のネフローゼ患者 2 名 (ともに Stage 1) で 141、246 ng/mL と高値を呈した (寛解時はともに < 10 ng/mL であった)。重症心疾患 (Stage 2) で 45 ng/mL、シスチン尿症 (Stage 1) で 17 ng/mL であった。それら以外の 20 例は < 10 ng/mL であった (図 2)。

< 研究 3 (前方視的検討) >

患者の入院当日の L-FABP (迅速) は (-)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ng/mL (< 11.8 ng/mg Cr) であった。尿 Cr は 25.5 mg/dL、NAG 1.2 U/L、B2M 112 μg/L であった。

Matsui らの報告 (Circ J 2012) によれば、L-FABP が 100 ng/mg Cr 以上ならばその後の AKI 発症のハイリスク群になる。この値は L-FABP (迅速) の (1+) 以上に相当する。患者の血清 Cr は入院当日が 0.23 mg/dL、翌日が 0.22 mg/dL、その後も Cr は上昇せず、初期予測どおり AKI を発症しなかった。

D. 考察

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 (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が、Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、Cystatin C、Interleukin 18、Kidney injury molecule-1 (KIM-1)、および、L-FABP である。

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。加えて、L-FABP 誘導はペロキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) 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 (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) の一翼を担うと推察される。

我々は、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および臨床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検討している。

今回の研究では、容態の不安定な (入院での集中治療が必要な) 患者 (5 例) は全員 L-FABP

検査(迅速)が(1+)以上を示した。(1+)は大
体 ELISA での計測値 20 ng/mL あるいは 100
ng/mg Cr に相当し、これ以上が AKI 発症のハイ
リスク群に当たる。

一方、CKD では尿中 8-OHdG は顕著に増加
することが少なかった。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、
健常細胞が少なくなった腎臓では 8-OHdG 産生
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 L-FABP にて
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(迅速)は 20 ng/mL (あるいは 100
ng/mg Cr)前後で陽性を呈した(この値は急性
腎障害発症予測のカットオフ値である)。その半
定量値と ELISA 値は有意に正相関した。よって、
L-FABP 迅速計測スライド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
(本研究は菅谷 健教授(聖マリアンナ医科大
学・腎臓高血圧内科)の協力のもとになされた)。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 藤井洋輔, **塚原宏一**, 森島恒雄. 脳炎・脳症・髄
膜炎の病態 - 脳炎・脳症とバイオマーカー. **小児内
科** 45 (2): 187-190, 2013.

(5) Nagasaka H, Yorifuji T, Egawa H, Inui A, Fujisawa
T, Komatsu H, **Tsukahara H**, Uemoto S, Inomata Y.
Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle
in non-hyperammonemic carriers of ornithine

transcarbonylase deficiency. **Mol Genet Metab** 109
(3): 251-254, 2013.

(6) **塚原宏一**, 中務陽子, 山田睦子, 重安良恵, 吉本
順子, 喜多村哲朗, 長坂博範, 森島恒雄. Early third
trimester of the pregnant womenにおける血清中 NOx, ADMA (内因性
NO 合成酵素阻害因子)および酸化ストレスマーカー.
日本小児高血圧研究会誌 10 (1): 8-15, 2013.

(7) **Tsukahara H**, Fujii Y, Matsubara K, Yamada M,
Nagaoka Y, Saito Y, Yashiro M, Tsuge M, Goto S,
Kitamura T, Hata A, Ichiyama T, Morishima T.
Prognostic value of brain injury biomarkers in acute
encephalitis/encephalopathy. **Pediatr Int** 55 (4):
461-464, 2013.

(8) Yamashita N, **Tsukahara H**, Tsuge M, Nagaoka Y,
Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T.
Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09
infection elucidated on gene expression profiling.
Pediatr Int 55 (5): 572-577, 2013.

(9) **塚原宏一**. 気道炎症と酸化ストレス. **Respiratory
Trends** 3 (2): 14-19, 2013.

(10) Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y,
Nagaoka Y, Yashiro M, **Tsukahara H**, Morishima T.
Gene expression analysis in children with complex
seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus
gastroenteritis. **J NeuroVirol** 20 (1): 73-84, 2014.

2. 学会発表

(1) **塚原宏一**.

The Kidney in Multi-Organ Systemic Disease in
Japanese Children - 新生児 AKI の特徴・評価・管理.
第 56 回日本腎臓学会学術集会, 東京, 2013 年(5 月).

(2) **塚原宏一**.

小児 CKD とバイオマーカー: 最近の進歩 - CKD とバ
イオマーカー. 第 48 回日本小児腎臓病学会学術集会,
徳島, 2013 年(6 月).

(3) **塚原宏一**.

酸化ストレスと新生児疾患. 第 58 回日本未熟児新生
児学会・学術集会, 金沢, 2013 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