

## 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, 吉川知伸, 斎藤有希恵, 藤井洋輔, 八代将登  
津下 充, 野坂宜之, 鷲尾洋介, 吉本順子, 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-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、急性腎障害発症予測、慢性腎障害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 $\mu$ Lを15分で解析できる小型スライド)の基礎的および臨床的有用性を検討した。

今回の検討で得られた成果を以下に列挙する。(1)L-FABP(迅速計測)は20 ng/mL(または100 ng/mg Cr)前後で陽性を呈する(この値は急性腎障害発症予測のカットオフ値である)。(2)L-FABP(迅速計測)の半定量値とELISA値は有意に正相関する。(3)容態の安定した慢性腎疾患の児において、L-FABP(ELISA)は20 ng/mLを超えない。(4)急性脳症を呈した患者で入院時にL-FABP(迅速計測)が陰性の症例は急性腎障害を呈さない。

**結論:** 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 $\mu$ 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、容態の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 m<sup>2</sup>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。<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>

インフルエンザ脳症患者を対象にして、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。

Matsuiら(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となる。この値は L-FABP (迅速) の (1+) 以上に相当する。今回、Matsui らの結果を AKI 発症の予測基準として採用した。

### (倫理面への配慮)

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

### <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) であった。尿中 8-OHdG は 5.7 ~ 643 ng/mg Cr、NAG は 1.4 ~ 30.2 U/L、B2M は 84 ~ 107,000  $\mu$ g/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。

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。

### <研究3>

1 例目は 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。オセルタミビル、マンニトール、メチルプレドニゾン、グロブリン、エダラボンが使用された。

入院当日の L-FABP (迅速) は (-)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ng/mL であった。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。

2 例目は 1 歳の男性である。インフルエンザ A の患者で、発熱、痙攣重積、呼吸不全を呈した。ペラミビル、マンニトール、メチルプレドニゾン、

グロブリン エダラボンが使用された。

入院当日の L-FABP (迅速) は (-)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ng/mL であった。患者の血清 Cr は入院当日が 0.24 mg/dL、翌日が 0.15 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 により Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury 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、Cystatin C、Interleukin 18、Kidney injury molecule-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。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。

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、生体応答の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。

今回の検討で得られた成果を以下に列挙する。(1) L-FABP (迅速計測) は 20 ng/mL (または 100 ng/mg Cr) 前後で陽性を呈する (この値は急性腎障害発症予測のカットオフ値である)。(2) L-FABP (迅速計測) の半定量値と ELISA 値は有意に正相関する。(3) 容態の安定した慢性腎疾患の児において L-FABP (ELISA) は 20 ng/mL を超えない。(4) 急性脳症を呈した患者で入院時に L-FABP (迅速計測) が陰性の症例は急性腎障害を呈さない。

## E. 結論

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。今後は、急性脳症にこだわらず多くの最重症例での検討が必要であると考えられた (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)の協力のもとに行われた)。

## F. 研究発表

### <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) 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 transcarbamylase deficiency. **Mol Genet Metab** 109 (3): 251-254, 2013.
- (5) **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.
- (6) 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.
- (7) **Tsukahara H**. Oxidative stress biomarkers: Current status and future perspective(分担). In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and

Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 87-113.

(8) Yashiro M, **Tsukahara H**, Morishima T. Thioredoxin therapy: Challenges in translational research(分担).

In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 233-252.

(9) **Tsukahara H**, Yashiro M, Nagaoka Y, Morishima T. Infectious and inflammatory disorders(分担).

In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 371-386.

(10) Nagasaka H, **Tsukahara H**, Miida T. Oxidative stress in inherited metabolic diseases(分担).

In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 387-404.

### <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).

#### (4)塚原宏一.

一酸化窒素(NO)と腎疾患. 第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会, 秋田, 2014 年(6 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