

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790780

研究課題名（和文） 薬剤性急性腎障害モデルでのバイオマーカーの検討

研究課題名（英文） Evaluation of biomarkers in drug-induced acute kidney injury model

研究代表者

根岸 康介（NEGISHI KOSUKE）

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：40572219

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヨード造影剤・VCM・GM3 種類の薬剤性腎障害モデルを作成し、尿 L 型脂肪酸結合蛋白（L-FABP）の急性腎障害（AKI）バイオマーカーとしての有用性について検討した。ゲンタマイシン-AKI モデル・バンコマイシン-AKI についてはさらなる検討が必要であるが、ヨード造影剤（RC）-AKI モデルについては尿 L-FABP 増加の用量依存性が確認され、また尿細管周囲毛細血管（PTC）の灌流低下が L-FABP 誘導および尿中排出亢進の要因の一つであることが示された。そして、投与後早期から鋭敏に反応するバイオマーカーとしての有用性も確認された。今後、薬剤性腎障害のバイオマーカー研究によってさらなる診断精度の向上が望まれる。

研究成果の概要（英文）：I evaluated the utility of urine L-FABP for Acute kidney injury (AKI) biomarker in animal drug-induced renal injury models induced by radio-contrast (RC), gentamicin and vancomycin. In RC-induced AKI model, L-FABP was shed into the urine in a dose-dependent manner, and was demonstrated that hypoperfusion of peri-tubular capillary was one of the key factors to induce its renal expression and the elevation of its urinary shedding. Furthermore, it was confirmed that L-FABP was a useful biomarker that responded to RC sensitively. However, additional biomarker studies are needed for gentamicin and vancomycin-induced AKI. In future, it is expected that further biomarker studies would improve diagnostic accuracy of drug-induced renal injury.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 2010年 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011年 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：(1) 急性腎障害 (2) 薬剤性腎障害 (3) バイオマーカー (4) 脂肪酸結合蛋白

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (Acute Kidney Injury, AKI) の予後については血液透析が開始されて 30 年以上経過した今日においても不良であり、近年の ICU 症例を対象とした大規模な報告においても院内死亡率 60.3 % とされており (*JAMA* 294:813-818, 2005)、この中では 19 % が薬剤性 AKI と診断されている。さらには最近 20 年間で院内発症の薬剤性腎障害発症頻度の増加も指摘されているが (*Am J Kidney Dis.* 39:930-936, 2002)、この報告では 4000 例を超える連続入院症例について院内発症 AKI を後ろ向きに解析しており、AKI 症例のうち薬剤性は腎虚血性 (39 %) に次いで 27 % を占めていた。そのうち、ヨード造影剤によるものが薬剤性の中で 41 % を占めており最多であり、続いてアミノグリコシド系抗菌薬が 17 % であることが分かっている。

ヒトにおいて肝臓、小腸、腎近位尿細管に発現する L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) は、ミトコンドリアやペルオキシゾームへの脂肪酸キャリアー蛋白として機能し、細胞内のエネルギー代謝を担っているが、近年報告されてきた新たな尿細管障害マーカーの一つとして、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1), IL-18 とともに注目を集めている (*Toxicology* 245:182-193, 2008)。

2. 研究の目的

3 種類の薬剤性急性腎障害モデルにおいて新規尿バイオマーカーを経時的に測定し、組織学的な腎障害の早期診断および重症度予測に対する有用性を各バイオマーカーについて検討するとともに、複数の尿バイオマーカー測定値を組み合わせたパネル化による評価方法の有用性について統計解析手法を適用して検討することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、薬剤性 AKI の原因として高頻度と考えられるヨード造影剤、ゲンタマイシン、バンコマイシンの 3 剤について、ヒト L-FABP 変異型マウスに投与した際の AKI バイオマーカーとして尿中 L-FABP, NAG を測定するとともに、組織学的重症度の予測精度についても同時に評価する。また、過去に行った検討 (*Nephron Exp Nephrol.* 108(1):e19-e26, 2008) と同様に、Intravital CCD camera による腎皮質尿細管周囲毛細血管の血流速度と尿中 L-FABP との関連性についても検討する。

A-1. ヨード造影剤 AKI モデル (RC-AKI) -1

ヒト L-FABP 変異型マウス (雄) に対して RC-AKI におけるヨード造影剤の用量依存性を評価するため、腎摘を行わず自由摂食下にヨード造影剤 (イオヘキソール) を 3~6 g/kg I 腹腔内投与し、経時的に採尿、採血を行った。投与 24 時間後に屠殺し腎組織を評価した。腎組織は 10%ホルマリン固定ののち、PAS 染色を行った。血液は遠心後、尿素窒素 (BUN) 測定を行った。尿は遠心後にクレアチニン、NAG、ELISA による L-FABP (CMIC) を測定した。

A-2. ヨード造影剤 AKI モデル (RC-AKI) -2

ヒト L-FABP 変異型マウス (雄) に対して片腎摘後 6 日間経過ののち、24 時間の飲水制限を行い、インドメタシン (I)、L-NAME (L)、ヨード換算 3-g/kg の非イオン性造影剤 (R) を腹腔内投与する ILR 群、R のかわりに生理食塩水 (S) を投与する ILS 群、全て生理食塩水を投与する SSS 群を作成した。経時的に採血・蓄尿し血液、尿検体を測定時まで冷凍

保存した。投与 12 時間後、麻酔下に腎直上の背部を切開し、腎を露出させて Intravital CCD camera による腎皮質尿細管周囲毛細血管の血流速度を計測した (*Nephron Exp Nephrol.* 108(1):e19-e26. 2008)。投与 48 時間後に屠殺し腎組織を得た。

B VCM-AKI モデル

ヒト L-FABP 変異型マウス (雄) に対して片腎摘 (UNx) もしくは Sham 手術の 7 日後から、VCM 0.4 g/kg を 24 時間ごとで 7 日間にわたって腹腔内投与し、15 日後に屠殺した。一部のマウスは 4 日後、8 日後に屠殺した。経時的に採血、採尿して BUN・尿 NAG・尿 L-FABP を測定し比較した。

C ゲンタマイシン GM-AKI モデル

ヒト L-FABP 変異型マウス (雄) に対して GM 40 mg/kg または 80 mg/kg を 24 時間ごとに腹腔内投与し、48 時間後に屠殺した。VCM 投与前より 12 時間ごとに採血、採尿して BUN・尿 NAG・尿 L-FABP を測定し比較した。

統計解析については、JMP 8.0 を使用した。結果はすべて平均値±標準誤差で記載した。2 群間の比較は Student t 検定、多群間での比較は Tukey-Kramer 検定により解析した。p < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

A-1. RC-AKI モデル-1

RC-AKI での造影剤の用量依存性を評価したところ、尿素窒素 (BUN) は 2 時間後に対照の生食群を除く造影剤投与群ではいずれも上昇したが、6 g/kg 群のみが経時的に増加した (図 1)。尿 L-FABP は 2 時間後に対照の生食 (NS) 群を除く造影剤投与群でいずれも有意に上昇した (図 2)。

腎組織 PAS 染色では 5.5 g/kg, 6 g/kg 群において尿細管上皮細胞の空胞変性を認めた。また、空胞変性は投与量依存的に増加し、6

g/kg 群では特に顕著であった。

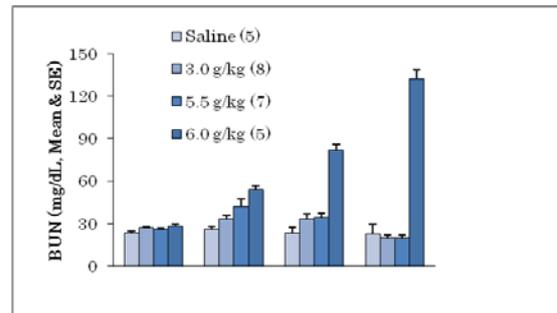


図 1 RC-AKI モデル 1 での BUN (左より 0, 2, 8, 24 h)

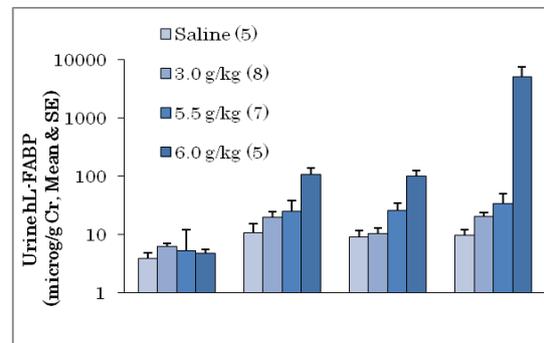


図 2 RC-AKI モデル 1 での尿 L-FABP (左より 0, 2, 8, 24 h)

以上、RC-AKI モデルでの用量依存性を評価した結果、高用量群において用量依存的に尿細管上皮細胞の空胞変性を認めた。また、尿 L-FABP は 2 時間後から用量依存的に増加しており、早期から用量依存的に尿細管障害を検出する有用なバイオマーカーであることが示された。

A-2. RC-AKI モデル-2

NS のみを投与した SSS 群 (対照群) に対して、ILS 群では有意な BUN 増加は見られなかったが、ILR 群では 12 時間後に著明な増加を示した (図 3)。

尿 NAG は ILR 群のみ有意な増加を示したが、12 時間後では明らかな増加は見られず、24 時間後であった。

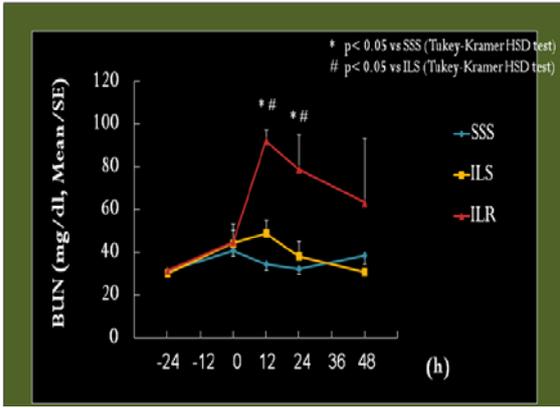


図3 RC-AKI モデル 2 での BUN

尿 L-FABP は飲水制限の影響のためか、SSS 群の 12 時間後においても上昇していたが、ILS 群で 74 倍、ILR 群では 3000 倍まで著増しており、24 時間後も有意であった (図 4)。

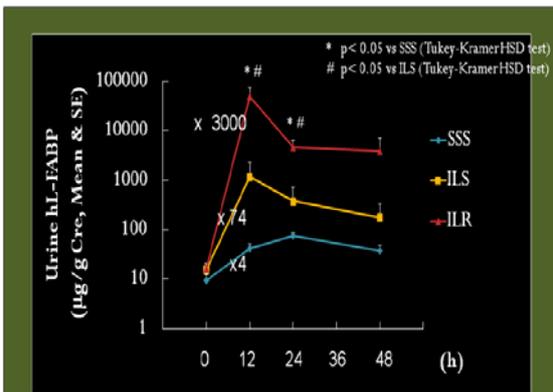


図4 RC-AKI モデル 2 での尿 L-FABP

腎組織 PAS 染色において、飲水制限の影響のためか、SSS 群においても尿細管上皮の脱落がわずかに見られたが、ILS 群ではより多く認められた。ILR 群ではより顕著であり、空胞変性も有意に増加していた。

48 時間後の腎組織における空胞変性を検出する 12 時間後の各バイオマーカーの予測精度を ROC 解析によって比較したところ、RC-AKI モデルにおいては 12 時間後の BUN が ROC 曲線下面積 (ROC-AUC) 1.00 と最も高い診断精度であったが、L-FABP についても 0.92 と高く、尿細管障害のバイオマーカーとして有

用なことが示唆された (表 1)。

| AUC-ROC, Area under the ROC curve | | | | |
|-----------------------------------|------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 h | 12 h | 24 h | 48 h |
| UFR | 0.52 | 0.71 | 0.73 | 0.55 |
| BUN | 0.40 | 1.00 | 0.92 | 0.64 |
| uNAG | 0.67 | 0.68 | 0.87 | 0.93 |
| Log uL-FABP | 0.62 | 0.92 | 0.95 | 0.78 |

表 1 48 時間後の腎組織空胞変性を検出する各バイオマーカーの予測精度比較 (ROC 曲線下面積)

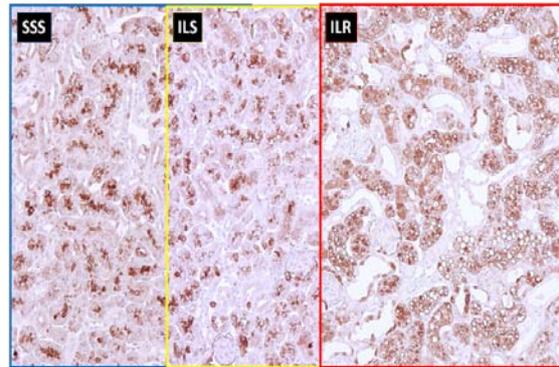


図5 腎組織 L-FABP 免疫染色

図 5 に示す通り、ILR 群において L-FABP 発現が尿細管上皮細胞において亢進していた。ILR 群では PTC での有意な流速低下を認めた。飲水制限なしの SSS 群と比較すると、ILS 群、ILR 群で血管径の有意な縮小を認めた。そして、PTC 流速と Log 尿 L-FABP については有意な逆相関を認めたことから、PTC の灌流低下を反映して尿 L-FABP が増加することが確認された (図 6)。

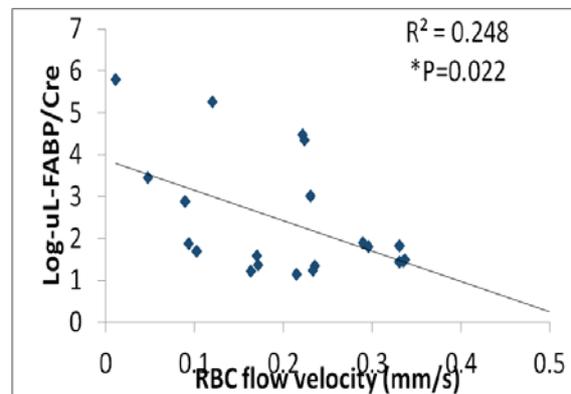


図6 PTC 流速と Log 尿 L-FABP との相関

RC-AKI モデル 2 において、脱水などの前処置で BUN が上昇しやすい状態において、尿 L-FABP は造影剤投与 12 時間後に 3000 倍以上の有意な増加を示した。腎組織所見では造影剤によって尿細管上皮細胞の空胞変性が惹起された。また、投与 12 時間後において ILS 群、ILR 群では SSS 群に比べて有意に PTC 流速が低下し、血管径も縮小していた。そして尿 L-FABP は PTC 流速低下と有意な逆相関を認めたことから、腎 PTC の灌流低下を感知することで組織学的な尿細管障害を早期に検出する機能的なバイオマーカーであることが示唆された。

B VCM-AKI モデル

BUN は UNx の有無で有意差は認めなかったが、尿 NAG は 14 日後に UNx 無し群で有意に高値であった。尿 L-FABP は UNx 無し群の 8 日後以降では UNx 有り群に比べて高値傾向であり、投与前に比べて有意に上昇していた。組織学的な尿細管障害を PAS 染色、Masson 染色で評価したところ、経時的に間質線維化が進行していた。

また、著明な間質細胞浸潤とともに尿細管上皮細胞の脱落や Cast 形成が認められたが、2 群間で組織障害度に明らかな相違は認めなかった。

C ゲンタマイシン GM-AKI モデル

GM 40 mg/kg または 80 mg/kg を 24 時間ごとに腹腔内投与し経時的に採血、採尿を行った。48 時間後の腎組織では明らかな尿細管上皮細胞の脱落や Cast 形成などは認めなかった。

BUN は増加傾向を示したが、有意ではなかった。尿 NAG は 12 時間後、36 時間後に上昇し、尿細管毒性を反映しているものと考えられた。尿 L-FABP は 12 時間後に 40 mg/kg 群で増加したが、その後は低下していた。一方、80 mg/kg 群では用量依存的な増加は示さな

った。

本研究では、ヨード造影剤・VCM・GM 3 種類の薬剤性腎障害モデルを作成し、AKI バイオマーカーとしての有用性について検討した。GM-AKI モデルにおいては尿 NAG が鋭敏な反応を示していたが、AKI 動物モデルの検討としてさらなる検討が必要である。VCM-AKI については組織学的な尿細管障害の程度に比較して尿 L-FABP 上昇レベルが比較的軽度であったことから、尿中に排出された L-FABP が何らかの修飾を受けているか、測定系に投与薬剤が干渉している可能性も考えられる。

RC-AKI モデルについては用量依存性が確認され、また PTC の灌流低下が L-FABP 誘導および尿中排出亢進の要因の一つであることが示された。そして、投与後早期から鋭敏に反応するバイオマーカーとしての有用性も確認された。

今後、薬剤性腎障害のバイオマーカーとして複数のマーカーの組み合わせによる診断や、より感度・特異度の高いマーカーの開発によって腎障害の早期診断・重症度予測だけでなく創薬分野での腎毒性評価などにも活用できると考えられる。さらには薬剤特異的に腎障害を検出できるようなマーカーを開発・研究していくことで、腎毒性物質が推定できるようになれば日常臨床にも極めて有用であろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 片桐大輔, 土井研人, 根岸康介, 他, 2 つの尿バイオマーカーの組み合わせが成人心臓手術後急性腎障害を予測する, 胸部外科年報(Ann Thorac Surg), 査読有, 93:577-83, 2012

DOI: 10.1016/j.athoracsur.2011.10.048

2. 土井研人, 根岸康介, 他, 混合集中治療室における新規急性腎障害バイオマーカーの検討, 救急医学(Crit Care Med), 査読有, 39: 2464-9, 2011

DOI: 10.1097/CCM.0b013e318225761a

3. 土井研人, 根岸康介, 他, 急性腎障害における Endotoxin activity assay (EAA) および血漿 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) を用いたエンドトキシシヨックの検出, 日本急性血液浄化学会雑誌, 査読有, 2:92-96, 2011

<http://jsbpcc.umin.jp/>

4. 根岸康介, 薬剤に起因する急性腎障害, 腎と透析, 査読無, 70:367 - 72, 2011

<http://www.tokyo-igakusha.co.jp/>

5. 土井研人, 根岸康介, 野入英世, 急性腎障害 (特集 腎臓学 この一年の進歩), 日本腎臓学会誌, 査読無, 53: 18-24, 2011

<http://www.jsn.or.jp/journal/>

6. 土井研人, 根岸康介, 他, 敗血症に伴う新規急性腎障害バイオマーカーとしての尿脂肪酸結合蛋白, 救急医学(Crit Care Med), 査読有, 39:2037-42, 2010

DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181eedac0

[学会発表] (計5件)

1. 根岸康介, 他, マウス造影剤誘発 AKI モデルでの腎皮膜下皮質の傍尿細管灌流低下は尿 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) と逆相関する, 米国腎臓学会総会, 2011 年 11 月 12 日ペンシルバニア会議センター, 米国

2. 根岸康介, 他, マウス造影剤誘発 AKI モデルでの尿 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) と腎微小循環, 日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 17 日, パシフィコ横浜

3. 根岸康介, 他, マウス造影剤腎障害における尿 L-FABP と腎皮質傍尿細管血流速度の測定, 国際腎臓学会, 2011 年 4 月 10 日, カナ

ダ, バンクーバー国際会議場

4. 根岸康介, 他, マウス造影剤 AKI での尿 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) と腎微小循環のモニタリング, 米国腎臓学会総会, 2010 年 11 月 19 日コロラド会議センター, 米国

5. 根岸康介, 他, マウス造影剤 AKI での尿 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) による尿細管障害のモニタリング, 日本腎臓学会学術総会, 2010 年 06 月 16 日, 神戸国際会議場

[図書] (計2件)

1. 野入英世, 花房規男, 根岸康介, 他, 医歯薬出版, CRRT ポケットマニュアル, 2011 年, 240 頁

2. 野入英世, 花房規男, 根岸康介, 他, 医歯薬出版, アフェレシス療法ポケットマニュアル, 2010 年, 286 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 康介 (NEGISHI KOSUKE)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号: 40572219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし