

岩手医科大学  
審査学位論文  
(博士)

急性腎障害の予測バイオマーカー,  
urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin  
測定値への影響因子の検討:  
便と白血球の混入および綿球による採尿

武藤秀和<sup>1)</sup>, 石川 健<sup>1)</sup>,  
小西 雄<sup>1)</sup>, 高田 彰<sup>1)</sup> 外館玄一郎<sup>1)</sup>,  
松本 敦<sup>1)</sup>, 葛西健郎<sup>1)</sup>, 石澤毅士<sup>2)</sup>, 千田勝一<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 小児科学講座

<sup>2)</sup> 岩手医科大学医学部, 中央臨床検査部

(Received on February 18, 2013 & Accepted on February 27, 2013)

要旨

urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) は急性腎障害時に尿細管で高発現して尿中に現れる物質で, 腎保護に働くと推測されている. このため, uNGAL は急性腎障害の予測バイオマーカーとして注目されているが, この測定値への影響因子や採尿法を検討した報告はない. 本研究では新生児の採尿時に問題となる便や白血球の混入と, 綿球採尿が uNGAL 測定に与える影響を検討した. 新生児の尿 (n=9) と便 (n=8), 小児の膿尿 (n=7) を採取

し, 便混入尿と白血球混入尿を作成した. この半量は綿球を使わず, 半量は綿球にしみ込ませて, 遠心分離した上清の uNGAL を自動生化学分析装置で測定した. この結果, uNGAL は便混入尿, 白血球混入尿とも綿球非使用時に比べて綿球使用時に有意に低値であったが, 白血球混入尿では綿球の有無にかかわらず白血球反応の強さに比例して上昇した. 新生児の uNGAL 測定はバッグで採尿し, 便混入を避けて, 白血球反応が陰性であることを確認する必要がある.

**Key words :** acute kidney injury, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, contamination, urinary collection, cotton wool ball

I. 緒 言

neutrophil gelatinase-associated lipocalin (以下 NGAL と略) は活性化された好中球から分泌される分子量 25 kDa の蛋白で, この遺伝子はヒトの気管, 肺, 唾液腺, 胃, 大腸, 腎, 前立腺, 子宮などに広く発現している<sup>1)</sup>. この中で, 尿中 NGAL (以下 uNGAL と略) は急性腎障害 (acute kidney injury, 以下 AKI と略) 時に尿細管で高発現して尿中に現れる物質で, 腎保護に働くと推測されており<sup>2)</sup>, AKI の予測バイオマーカーとして注目されている<sup>3)</sup>. uNGAL は当初, 心肺短絡術が必要な先天性心疾患児に臨床応用され, 術後 AKI の早期予測に有用なことが示された<sup>4)</sup>.

その後, uNGAL は腎移植後や造影剤誘発性, および重篤な疾患に伴う AKI の予測に有用なことが確認されている<sup>3)</sup>. このため小児や成人について uNGAL の基準値が作成され, 最近では極低出生体重児 (< 1,500 g) の基準値も報告された<sup>5, 6)</sup>.

一方, 新生児の uNGAL は採尿バッグに集めて測定することが多い<sup>5, 6)</sup>. しかし, 極低出生体重児は皮膚が脆弱なため採尿バッグの貼付によって外陰部に炎症を引き起こし, 女児の場合は採尿バッグから尿が漏れやすい<sup>7)</sup>. このため, オムツの中に綿球 (cotton wool ball) を入れ, それにしみ込んだ尿の成分を分析する方法も検討されている<sup>8-10)</sup> が,

女児では便<sup>8)</sup>や外陰部炎症に起因する白血球<sup>11)</sup>の混入が問題となる。しかし, uNGAL 測定値への影響因子や採尿法について検討した報告はない。

本研究では便と白血球の混入, および綿球による採尿が uNGAL 測定に与える影響について検討した。

## II. 研究材料および方法

本研究は本学倫理委員会の承認(番号 H23 - 56)ののち, 尿と便は家族からインフォームドコンセントを得て採取した。

### 1. コントロール尿の採取

コントロール尿は当院新生児集中治療室に入院した在胎 26 ~ 31 週の早産の男児 9 人から, 状態が安定した生後 21 ~ 84 日(中央値 49 日)に採尿バッグで集めた。これらは尿試験紙(N-マルティスティックス<sup>®</sup>, Siemens Japan, 東京)で蛋白, ブドウ糖, ケトン体, 潜血, 白血球, 亜硝酸塩がすべて陰性であることを確認した。その判定は尿化学分析装置(クリニテック・ステータス<sup>®</sup>, バイエルメディカル, 東京)で行った。それぞれの尿を採取直後に次の実験に使用し, また, 一部で細胞成分を遠心分離(400 × g で 10 分間, 以下同じ)して uNGAL を測定した。

### 2. 便混入尿の作成

当院新生児集中治療室に入院した在胎 30 ~ 35 週の早産児 8 人から, グリセリン浣腸液を含まない便を生後 10 ~ 64 日(中央値 31 日)に採取した。この便 10 g を生理食塩液 10 ml に懸濁し, コントロール尿と便懸濁液(それぞれ 1 人から採取)を 1:0, 1:1, 1:9, 1:99 の比率で混合して便混入尿を作成した。この 4 種類の濃度の検体をコントロール尿と便を採取するたびに作成して, 遠心分離した上清の uNGAL を同日に測定した。

### 3. 白血球混入尿の作成

当院小児科に入院した上部尿路感染症の小児 7 人(1 歳 7 か月 ~ 11 歳 4 か月, 中央値

4 歳 8 か月)から治療前の尿をカテーテルで採取した。この診断は, 発熱と血液検査で白血球上昇, CRP 陽性, および白血球尿( $\geq 10$  個/hpf)と細菌尿( $\geq 1 \times 10^4$  CFU/ml)をすべて満たした場合とした。尿を遠心分離し, 沈渣を白血球混入尿の作成まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。白血球混入尿の作成にはコントロール尿と沈渣(それぞれ 1 人から採取)を混合し, 尿試験紙法による尿化学分析装置の判定結果から白血球反応がそれぞれ 1+, 2+, 3+ となるようにコントロール尿で調製した。これら 3 種類の反応の検体をコントロール尿の採取ごとに作成して, 遠心分離した上清の uNGAL を同日に測定した。

### 4. 綿球の影響

便混入尿と白血球混入尿の半量を 10 ml の試験管に移し, 残りの半量は 10 ml の試験管上部に綿球を詰めて, これにしみ込ませた。これらを遠心分離して, 便混入尿と白血球混入尿を作成した同日に上清の uNGAL を測定した。

### 5. uNGAL の測定

uNGAL は免疫グロブリンや血清補体価と同様に免疫比濁法で測定した。これには NGAL 測定用試薬(The NGAL test, BioPorto 社, Gentofte, Denmark)を使用し, 当院の自動生化学分析装置(Biomajesty JCA BM-2250, 日本電子, 東京)で測定した。尿は 50  $\mu\text{l}$  を用い, 測定時間は約 10 分であった。この方法と ELISA 法で測定した uNGAL の間には良好な相関関係が報告されており( $n=42$ ,  $r=0.9973$ )<sup>12)</sup>, 当院における検討でもこれを確認している( $n=75$ ,  $r=0.99$ )<sup>13)</sup>。

### 6. 統計学的解析

計量データの 3 群以上の比較は one-way repeated measures analysis of variance on ranks で, 2 群間の比較は Wilcoxon rank sum test で行った。統計解析には SigmaPlot (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA)を使用し, 有意水準を  $p<0.05$  とした。測定値は中央値(四分位範囲)で示した。

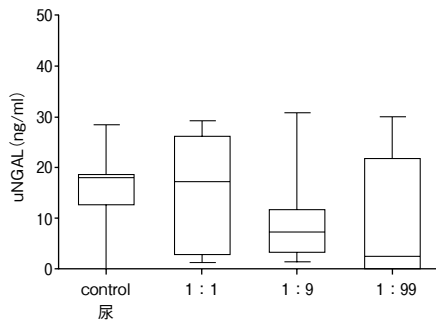


図1. コントロール尿と便混入尿の uNGAL 測定値  
uNGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin. 横軸の比率はコントロール尿と便上清との混合比を示す。

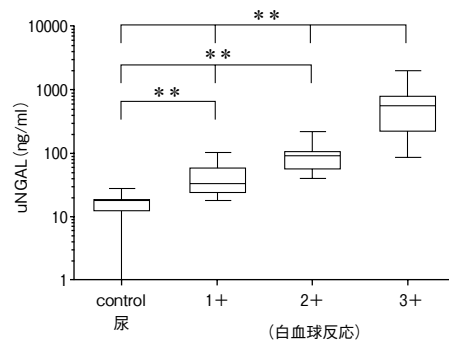


図2. コントロール尿と白血球混入尿の uNGAL 測定値  
uNGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin. 白血球反応は試験紙による尿化学分析装置の判定結果を示す. \*\*  $p < 0.01$

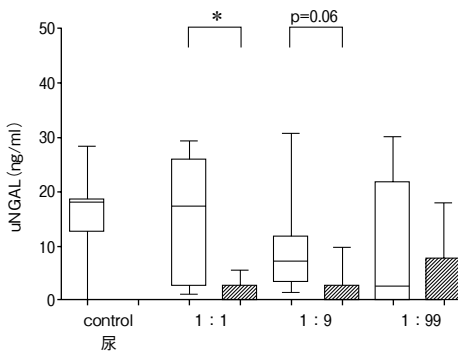


図3. 綿球の非使用時と使用時における便混入尿の uNGAL 測定値  
uNGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin. 白抜きは綿球非使用時, 斜線は綿球使用時. 綿球非使用時は図1の再掲.  
\*  $p < 0.05$

### III. 結 果

#### 1. コントロール尿の uNGAL 測定

コントロール尿の uNGAL は, 18.2 ng/ml (12.7 ~ 18.6,  $n=9$ ) であった. この値は採尿バッグで集めた在胎 26 ~ 33 週児の uNGAL 基準値の 95 パーセンタイル値である 50 ng/ml<sup>3)</sup> よりもすべてで低かった.

#### 2. 便混入尿の uNGAL 測定

便懸濁液上清の uNGAL は, 6.3 ng/ml (0 ~ 20.1,  $n=8$ ) であった. コントロール尿と便懸濁液上清を 1:1, 1:9, 1:99 の比率で

混合したときの uNGAL は, それぞれ 17.4 ng/ml (2.8 ~ 26.0), 7.4 ng/ml (3.4 ~ 11.9), 2.6 ng/ml (0 ~ 21.8) (各  $n=8$ ) であり, コントロール尿を含めた 4 群間で有意差を認めなかった ( $p=0.33$ ) (図1).

#### 3. 白血球混入尿の uNGAL 測定

白血球反応 1+, 2+, 3+ の uNGAL は, それぞれ 33.3 ng/ml (23.5 ~ 57.9), 91.6 ng/ml (55.1 ~ 105.3), 552.2 ng/ml (221.9 ~ 783.5) (各  $n=7$ ) であり, uNGAL は白血球反応の強さに比例して有意に上昇した ( $p < 0.01$ ) (図2).

#### 4. 綿球使用の有無による uNGAL 測定

便混入尿において, 綿球非使用時と綿球使用時の uNGAL は, それぞれコントロール尿と便懸濁液上清の比率が 1:1 のときに 17.4 ng/ml (2.8 ~ 26.0) vs 0 ng/ml (0 ~ 2.7) ( $p=0.02$ ), 1:9 のときに 7.4 ng/ml (3.4 ~ 11.9) vs 0.2 ng/ml (0 ~ 2.8) ( $p=0.06$ ), 1:99 のときに 2.6 ng/ml (0 ~ 21.8) vs 0.5 ng/ml (0 ~ 7.8) ( $p=0.43$ ) であり, 綿球使用時に 1:1 希釈で有意に低く, 1:9 希釈で低い傾向が認められた (図3).

白血球混入尿では綿球非使用時と綿球使用時の uNGAL は, それぞれ白血球反応 1 +

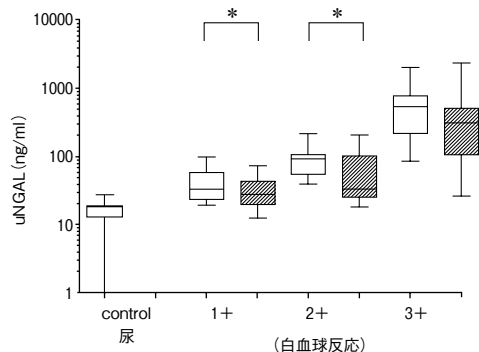


図4. 綿球の非使用時と使用時における白血球混入尿のuNGAL測定値  
uNGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin. 白抜きは綿球非使用時, 斜線は綿球使用時. 綿球非使用時は図2の再掲.  
\*  $p < 0.05$

で33.3 ng/ml (23.5 ~ 57.9) vs 27.5 ng/ml (18.8 ~ 41.6) ( $p=0.03$ ), 2+で91.6 ng/ml (55.1 ~ 105.3) vs 33.7 ng/ml (25.4 ~ 100.0) ( $p=0.03$ ), 3+で552.2 ng/ml (221.9 ~ 783.5) vs 311.5 ng/ml (107.0 ~ 501.5) ( $p=0.22$ )であり, 綿球使用時に1+と2+で有意に低かった(図4). 一方, 綿球使用時の群内比較において, uNGALは白血球反応の強さに比例して有意に上昇した.

#### IV. 考 察

本研究では新生児のuNGAL測定に際して採尿時に起こり得る便混入や白血球混入による影響と, 採尿に綿球を使用した場合の影響について検討した. この結果, 便混入はuNGALに有意な影響を与えなかったが, 便懸濁液上清のuNGALは0 ~ 20.1 ng/mlと一様でなく, 消化管に炎症がある場合はさらに高値を示す可能性がある. また, 白血球混入によりuNGALは白血球反応の強さに比例して上昇した. 採尿に綿球を使用した場合は, 便混入, 白血球混入ともuNGALは綿球非使用時よりも有意に低値を示すか, 低下傾向が認められた. これはuNGALが綿球に付着して低下した可能性が考えられた. しか

し, 綿球使用時でもuNGALは白血球反応の強さに比例して上昇した. 以上から, 新生児のuNGAL測定に際しては便混入を避け, 尿の白血球反応が陰性であることを確認する必要がある.

AKIの定義と重症度の指標には, 血清クレアチニン (serum creatinine, 以下sCrと略) が用いられている<sup>14-16)</sup>. しかし, sCrは腎機能の50%以上が失われて始めて上昇するため<sup>17)</sup>, AKIの早期予測の指標にはなりにくい. また, 新生児ではsCrの基準値が在胎期間や生後日数によって異なる<sup>18)</sup>. このため, AKIを予測できるバイオマーカーとしてNGALが測定されるようになってきた<sup>3, 19)</sup>が, この測定に影響する因子について検討した報告はない.

血清中のNGALはAKIで上昇するほか, 慢性腎疾患, 慢性高血圧, 全身性の感染や炎症でも影響を受けて上昇する<sup>20)</sup>. 一方, uNGALは腎虚血や敗血症, 腎毒性物質による障害で高値を示す<sup>2)</sup>. NGALの生理的役割は十分に解明されていないが, 損傷を受けた上皮細胞の再生やアポトーシスの軽減に働くのではないかと推測されている<sup>2)</sup>. このため消化管や腎, 皮膚に炎症があればNGALが高発現し, その混入によりuNGALが影響を受けるのは当然のことと考えられた.

新生児の尿検査には非侵襲的にバッグ<sup>5, 6)</sup>で採尿した検体を用いることが多い. 極低出生体重児のuNGALをバッグで採尿して測定した報告<sup>6)</sup>によると, uNGALは男児 ( $n=30$ ) よりも女児 ( $n=20$ ) の平均値が高く, 95%信頼区間の幅も広がったという. その理由は不明としているが, 女児の尿のwestern blotで非特異的な染色が広範囲の分子量帯に渡ってみられ, また, 明らかに混濁し, uNGALが異常に高い女児数例の尿では, 白血球由来のmyeloperoxidaseも高かったことから, 便や腔分泌液の混入を示唆している. 対照的に, 男児では尿の混濁やmyeloperoxidase反応

はみられなかったという。本研究ではこれらの混入がない男児の尿をコントロール尿としたが、本研究で用いた尿試験紙の感度は白血球 5～15 個/hpf とされており、今後、白血球混入を判定する上で myeloperoxidase の感度との比較が必要と考えられた。また、当科の浮津ら<sup>21)</sup>は好中球で産生される炎症マーカーの calprotectin が早産児の出生早期の胎便や膣分泌液で高値であることを報告しており、今後、これらを混入した検体の uNGAL も測定する必要がある。

新生児ではまた、綿球による採尿も行われている。これにより尿中のナトリウム、カリウム、窒素、クレアチニン、尿素、アミノ酸、

酸化重水素の測定値に影響はないが、リンとカルシウムは高くなるという報告がある<sup>8)</sup>。リンとカルシウムはオムツから尿によってしみ出たものと考えられている。綿球採尿による uNGAL については在胎期間と出生体重に反比例して低下するという報告<sup>22,23)</sup>はあるが、その他の影響因子について言及したものはない。本研究では、綿球使用時のコントロール尿の測定を行っていないが、女兒の綿球採尿は便や膣分泌液の混入機会が多く、特に白色の膣分泌液は綿球を見ただけでは分からないため、uNGAL の測定にはバッグ採尿が望ましいと考えられた。

## 文 献

- 1) **Soni SS, Pophale R and Ronco C:** New biomarkers for acute renal injury. *Clin Chem Lab Med* **49**, 1257-1263, 2011.
- 2) **Lisowska-Myjak B:** Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif* **29**, 357-365, 2010.
- 3) **Devarajan P:** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med* **4**, 265-280, 2010.
- 4) **Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al.:** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* **365**, 1231-1238, 2005.
- 5) **Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, et al.:** Reference range of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low-birth-weight infants: preliminary data. *Am J Perinatol* **26**, 437-440, 2009.
- 6) **Huynh TK, Bateman DA, Parravicini E, et al.:** Reference values of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low birth weight infants. *Pediatr Res* **66**, 528-532, 2009.
- 7) **Kennedy MJ, Griffin A, Su R, et al.:** Urine collected from diapers can be used for 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) in infants and young children. *Proteomics Clin Appl* **3**, 989-999, 2009.
- 8) **Roberts SB and Lucas A:** Measurement of urinary constituents and output using disposable napkins. *Arch Dis Child* **60**, 1021-1024, 1985.
- 9) **Fell JME, Thakkar H, Newman DJ, et al.:** Measurement of albumin and low molecular weight proteins in the urine of newborn infants using a cotton wool ball collection method. *Acta Paediatr* **86**, 518-522, 1997.
- 10) **Goodpaster AM, Ramadas EH and Kennedy MA:** Potential effect of diaper and cotton ball contamination on NMR- and LC/MS-based metabolomics studies of urine from newborn babies. *Anal Chem* **83**, 896-902, 2011.
- 11) **Silver H, Drever JC and Douglas DM:** Cells in the urine of newborn infants. *Arch Dis Child* **42**, 598-603, 1967.
- 12) **Christensen PH, Holm SS, Kj  ller C, et al.:** Quantitative determination of human plasma and urine Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) validation of an automated turbidimetric immunoassay. *Clin Chem Lab Med* **49**, S578, 2011.
- 13) **石澤毅士, 行森良一, 後藤健治, 他:** 尿中バイオマーカー NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) の基礎的検討. *医学検査* **61**, S187, 2012.
- 14) **Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al.:** Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* **8**, R204-212, 2004.

- 15) **Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, et al.:** Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* **71**, 1028-1035, 2007.
- 16) **Ricci Z, Cruz DN and Ronco C:** Classification and staging of acute kidney injury: beyond the RIFLE and AKIN criteria. *Nat Rev Nephrol* **7**, 201-208, 2011.
- 17) **Nguyen MT and Devarajan P:** Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* **23**, 2151-2157, 2008.
- 18) **Rudd PT, Hughes EA, Placzek MM, et al.:** Reference ranges for plasma creatinine during the first month of life. *Arch Dis Child* **58**, 212-215, 1983.
- 19) **Devarajan P:** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology* **15**, 419-428, 2010.
- 20) **Devarajan P:** Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr* **23**, 194-200, 2011.
- 21) **浮津真弓, 塩畑 健, 佐々木美香, 他:** 早産児の便中 calprotectin の経時的計測とその影響因子解析. *岩手医誌* **64**, 247-253, 2012.
- 22) **Askenazi DJ, Koralkar R, Levitan EB, et al.:** Baseline values of candidate urine acute kidney injury (AKI) biomarkers vary by gestational age in premature infants. *Pediatr Res* **70**, 302-306, 2011.
- 23) **Lavery AP, Meinen-Derr JK, Anderson E, et al.:** Urinary NGAL in premature infants. *Pediatr Res* **64**, 423-428, 2008.

Factors affecting measurements of urinary  
neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a predictive  
biomarker for acute kidney injury: contamination by  
stool and leukocytes and urine collection using cotton balls

Hidekazu MUTO<sup>1)</sup>, Ken ISHIKAWA<sup>1)</sup>, Yu KONISHI<sup>1)</sup>,  
Akira TAKADA<sup>1)</sup>, Genichiro SOTODATE<sup>1)</sup>, Atsushi MATSUMOTO<sup>1)</sup>,  
Takeo KASAI<sup>1)</sup>, Tsuyoshi KOKUSAWA<sup>2)</sup> and Shoichi CHIDA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Pediatrics, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

<sup>2)</sup> Central Clinical Laboratory, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

*(Received on February 18, 2013 & Accepted on February 27, 2013)*

---

Abstract

In acute kidney injury (AKI), urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) that appears in the urine is expressed in high concentrations in renal tubules, and might play a role in protecting kidney injury. The usefulness of uNGAL has been shown in predicting AKI, but there have been no reports evaluating the effects on uNGAL of urine contamination and urine collection. The present study investigated the effects on uNGAL measurement of urine samples contaminated by stool or leukocytes, which represent a common problem in neonates, and urine samples obtained using a cotton ball. We collected urine (n=9) and stool (n=8) samples from neonates, and pyuria samples (n=7) from children, and created urine samples contaminated by stool or leukocytes. Half of the samples were

soaked in cotton balls, while cotton balls were not used for the other half. Levels of uNGAL in supernatant obtained by centrifugation were measured using an automated biochemical analyzer. A significantly lower level was observed for samples in which cotton balls were used compared to those in which cotton balls were not used for urine samples contaminated by stool or leukocytes. In urine samples contaminated by leukocytes, levels increased in proportion to the magnitude of the leukocyte response, regardless of the use of cotton balls. These findings suggest that uNGAL measurement in neonates requires collection with a urine bag, avoidance of contamination by stool, and confirmation that leukocyte response in urine is negative.

---