

論文内容の要旨

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, 石川 健, 小西 雄, 高田 彰, 外館玄一郎,
松本 敦, 葛西健郎, 石澤毅士, 千田勝一)
(岩手医学雑誌 巻, 号, 平成 25 年 月掲載 (予定))

I. 研究目的

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (以下 NGAL) 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, この遺伝子は腎を含む多臓器に発現している. 腎では急性腎障害時に NGAL が尿細管で高発現し, 腎保護に働くと推測されている. この際, 尿中 NGAL (以下 uNGAL) は早期に増加するため, 急性腎障害の予測に有用なことが示され, 最近, 極低出生体重児の基準値も報告された. 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. しかし, 極低出生体重児で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. 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が, 便混入の可能性があり, 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. 研究対象ならび方法

本研究は本学倫理委員会の承認ののち, 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. 便, 白血球の混入の影響

コントロール尿は在胎 26~31 週の早産男児 9 人から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®, Siemens Japan, 東京) と尿化学分析装置 (クリニテック・ステータス®, バイエルメディカル, 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. 便は在胎 30~35 週の早産児 8 人から採取し, 便 10 g を生理食塩液 10 ml に懸濁後, コントロール尿と便懸濁液を 1:0, 1:1, 1:9, 1:99 の比率で混合して 4 種類の濃度の便混入尿を作成した. 上部尿路感染症の小児 7 人から尿をカテーテルで採取し, この尿沈渣とコントロール尿を混合して, 白血球反応が尿化学分析装置の判定により 1+, 2+, 3+ となるように白血球混入尿を作成した.

上記のコントロール尿, 便混入尿, 白血球混入尿をそれぞれ遠心分離し, その上清の uNGAL を測定した. この測定には NGAL 測定用試薬 (The NGAL test, BioPorto 社, Gentofte, Denmark) を使用し, 自動生化学分析装置 (Biomajesty JCA BM-2250, 日本電子, 東京) で行った.

2. 綿球の影響

便混入尿と白血球混入尿の半量を試験管に移し、残りの半量は試験管上部に詰めた綿球にしみ込ませた。これらの試験管を遠心分離して上清の uNGAL を測定した。

3. 統計解析

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。有意水準は $p < 0.05$ とし、測定値は中央値（四分位範囲）で示した。

III. 研究結果

1. コントロール尿の uNGAL は 18.2 ng/ml (12.7~18.6, $n=9$) であり、この値は在胎 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 より低かった。
2. 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。
3. 白血球反応が 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 ($p < 0.01$)。
4. 便混入尿において、uNGAL は綿球使用が綿球非使用よりも 1 : 1 希釈で有意に低かった。
白血球混入尿において、uNGAL は綿球使用が綿球非使用よりも 1+ と 2+ で有意に低かった。

IV. 結 語

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結果、新生児の採尿にはバッグを使用し、便混入を避けて、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。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 中村 元行（内科学講座：心血管・腎・内分泌内科分野）

副査 講師 石川 健（小児科学講座）

副査 講師 佐々木美香（小児科学講座）

急性腎障害時に neutrophil gelatinase-associated lipocalin（以下 NGAL）が尿細管で高発現し、腎保護に働くと推測されている。この際、尿中 NGAL（以下 uNGAL）は早期に増加するため、急性腎障害の予測に有用なことが示されている。しかし、新生児特有の採尿法である採尿バッグや綿球採尿が uNGAL 測定値へどのように影響するか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、人工的に便混入尿、白血球混入尿を作成し、それぞれ綿球使用時、非使用時の uNGAL を測定した。この結果、便混入は uNGAL 値に有意な影響を与えなかった。一方、白血球混入尿では、白血球反応の強さに比例して uNGAL 値に有意な上昇が見られた。綿球採尿の影響では、便混入、白血球混入とも uNGAL 値は綿球非使用時よりも有意に低値を示すか低下傾向があったが、綿球有り無しに関わらず uNGAL 値は白血球反応の強さに比例して有意に上昇した。

以上のように本論文は、新生児の uNGAL 測定に際し、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。その結果、白血球混入や綿球採尿が uNGAL 値に大きな影響を与えることを明らかにして今後の臨床研究の基となる研究であり、学位に値する。

試験・試問の結果の要旨

尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin の測定意義や実験方法および関連事項について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考ええる。

参考論文

- 1) 極低出生体重児の3歳時の予後と神経学的障害の危険因子解析（白澤聡子，他7名と共著）
岩手医学雑誌 64巻, 5号 (2012)
- 2) 溶血性尿毒症症候群における urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin の測定（石川 健，他8名と共著）
日本小児腎臓病学会雑誌 26巻, 1号 (2013)