

# 急性腎障害における新規バイオマーカー開発

土井研人

東京大学医学部附属病院集中治療部

key words : バイオマーカー, 急性腎障害, 早期診断, ROC 解析, パネル化

## 要 旨

これまで急性腎不全 (ARF) と呼ばれていた病態を急性腎障害 (AKI) として新たに認識することは、特に集中治療領域における急激な腎障害の進行を早期に検出し治療介入を試みることを意識している。そのためには、血清クレアチニンや尿量といった数十年来用いられてきた指標よりも、鋭敏かつ正確に腎障害を検出するバイオマーカーが必要であり、尿中L型脂肪酸結合蛋白などの新規バイオマーカーの開発が進められている。

## 1 急性腎障害という新しい概念

慢性腎不全 (chronic renal failure; CRF) が慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) と呼び換えられ、新たな診断基準・重症度分類が提唱されて10年以上経過した<sup>1)</sup>。軽微な腎機能障害であってもCKDが心血管イベントの強いリスクファクターであること、また糸球体濾過 (glomerular filtration rate; GFR) の低下に伴って段階的に心血管イベント発症のリスクが増加することが明らかとなり、CKDを単に慢性の経過で腎機能が低下した病態として捉えるのではなく、心血管イベントを発症する高リスク群として認識し、早期からの介入が生命予後の改善に重要と考えられるようになった。

CKD キャンペーンから数年遅れることとなるが、同様の現象が急性の腎障害においても生じている。す

なわち、急性腎不全 (acute renal failure; ARF) に対する国際的統一診断基準であるRIFLE (Risk-Injury-Failure-Loss-End-stage) criteriaがAcute Dialysis Quality Initiative (ADQI) groupにより提唱されるとともに<sup>2)</sup>、高齢者などリスクの高い症例に対して行われる侵襲度の高い医療行為 (心臓外科手術など) の合併症として生じる急激な腎機能低下、あるいはICUにおいて高頻度に生じる敗血症性多臓器不全の一分症として生じる急性の腎障害を、急性腎障害 (acute kidney injury; AKI) という新しい疾患概念として認識す

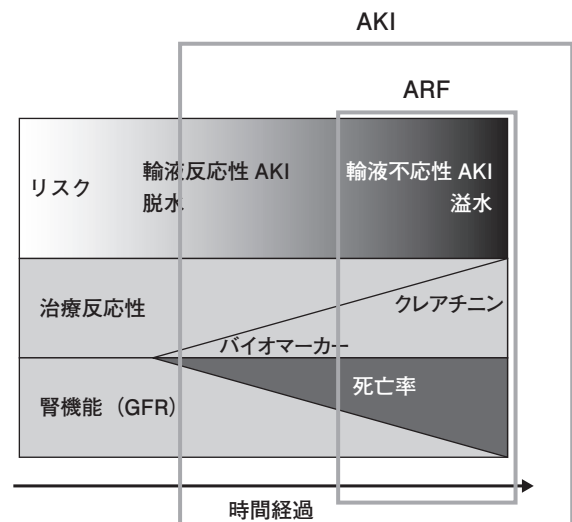


図1 急性腎障害 AKI という新たな概念

AKIは腎機能低下の程度が軽度であり、治療に対する反応性がある程度保たれている早期の腎障害も含めた概念であり、血清クレアチニンの上昇に先行して反応するバイオマーカーを用いた早期診断が試みられている。

ることが提唱された。CKDと同様に、たとえ軽微な血清クレアチニン（sCre）の上昇であってもAKIが死亡やICU滞在期間の延長に対する強いリスクファクターであること<sup>3)</sup>、AKIの重症度により段階的に死亡率が増加することが明らかとなり<sup>4)</sup>、早期にAKIを検出して適切なタイミングで治療介入を行うことが生命予後の改善に重要と考えられるようになった。

AKIがARFと異なる点は、老廃物や過剰な体液が体内に蓄積して尿毒症状態に陥る腎機能不全よりも先行した、まだ治療に対する反応が期待できる早期の段階を含むことである（図1）。AKIを早期に検出するために、数十年来にわたり腎機能指標として用いられてきたsCreあるいは尿量よりも鋭敏に腎組織障害を反映する新規AKIバイオマーカーの開発が盛んに行われるようになった。

## 2 バイオマーカーとは

バイオマーカーとは、測定可能な生物学的パラメーターを意味し、血液や尿などの生体試料中に含まれる物質だけでなく、心電図、血圧、画像、遺伝子多型（single nucleotide polymorphism; SNP）なども広義には含まれる。新規バイオマーカーが満たすべき条件として、表1に示すような項目が提唱されている<sup>5)</sup>。近年臨床応用されたバイオマーカーの例としては、前立腺特異抗原（PSA）、トロップTテスト、インフルエンザ抗原迅速検査などがあげられる。

新規バイオマーカーの評価としては、ROC（receiver operating characteristics）解析が用いられることが多い。ROC解析では判断基準（カットオフ値）を変えながら、真陽性率と偽陽性率を計算してプロットすることでROC曲線を作成する。理想的な検査では真陽性率=1、偽陽性率=0となるため、ROC曲線がグラフの左上隅に近づくほど診断精度が高いことを意味する。また、異なる検査を比較する場合には、ROC曲線下の面積（area under the curve of ROC; AUC-ROC）

表1 バイオマーカーが満たすべき条件

1. 正常状態および病的状態の区別ができる。
2. 早期に障害を検出する。
3. 障害の程度を反映する。
4. 治療に対する効果判定に用いることができる。
5. 非侵襲的かつ簡便、安価に測定できる。
6. 測定物質が安定である。

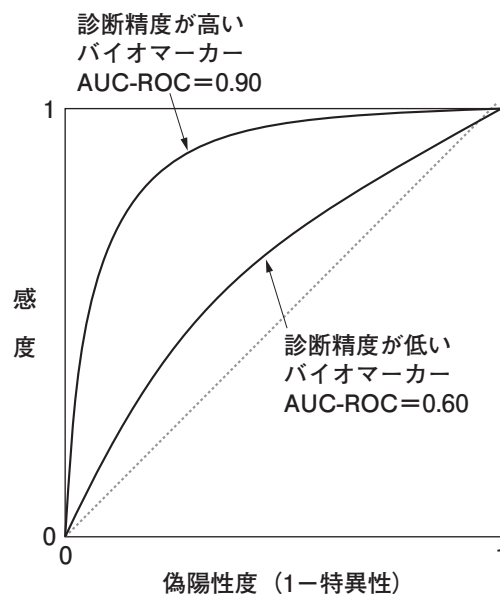


図2 ROC曲線

診断精度はAUC-ROC（area under the curve of ROC）により判断される。AUC-ROC=1であれば感度・特異度ともに100%の完全なバイオマーカーであり、AUC-ROC=0.5であればその診断精度は全くの偶然と同一となる（点線）。

にて診断精度を評価することになる（図2）。

## 3 新規AKIバイオマーカーによる早期診断

従来より広く知られていた事実ではあるが、sCreが腎臓の障害を正確かつ鋭敏に反映しているわけではない。体外に排泄されるべき老廃物の一つであるクレアチニンの血中濃度が上昇するには、ある程度のGFR低下が一定の時間持続することが必要であり、sCreの変化はGFRの低下よりも24~48時間の遅れをもって変化することは知られていた（図3）。特に集中治療領域において高頻度に生じるAKIにおいては、急

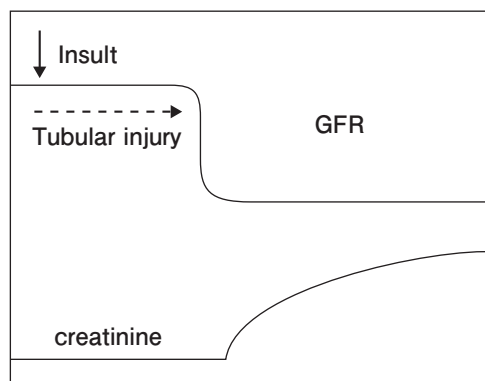


図3 GFRと血清クレアチニン値の変化

ほとんどのAKIにおいては、尿細管上皮細胞障害が先行・持続したのちにGFRが急激に低下し、その数日後より血清クレアチニン値が緩徐な上昇を示す。

表2 AKI バイオマーカー

	発現	検体	特徴	メカニズム	測定方法
NGAL	遠位尿細管 好中球	尿 血液	シデロフォア（鉄キレート物質）と結合	障害時に腎（近位尿細管）での発現亢進	ELISA Triage（迅速測定）
KIM-1	近位尿細管 T細胞	尿	膜結合糖蛋白質，ホスファチジルセリン受容体	細胞外ドメインが切断され尿中へ排泄	ELISA Luminex（マイクロビーズ）
L-FABP	近位尿細管 肝臓	尿	遊離脂肪酸細胞内輸送 過酸化脂質の処理	低酸素・酸化ストレスにより近位尿細管に誘導	ELISA
IL-18	近位尿細管 マクロファージ	尿	炎症性サイトカイン	腎障害時には近位尿細管で誘導される	ELISA
IL-6	マクロファージ リンパ球	血液	炎症性サイトカイン	多臓器不全に合併したAKIにおいて上昇	ELISA Luminex（マイクロビーズ）
シスタチンC	全有核細胞	尿 血液	システインプロテアーゼインヒビター	尿では尿細管障害，血液ではGFR低下を反映	比濁法 ELISA
NAG	近位尿細管 冊子縁	尿	冊子縁に存在する加水分解酵素	尿細管障害により尿中に逸脱	比色酵素法

性尿細管壊死（acute tubular necrosis; ATN）という言葉に代表されるように、障害部位はおもに尿細管上皮細胞であると考えられている。AKIにおいては、

- ① 虚血あるいは腎毒性物質により尿細管上皮細胞が障害される。
- ② 尿細管上皮細胞のネクロシス・アポトーシスが生じる。
- ③ 尿細管腔の閉塞や back leak 現象，tubuloglomerular feedback (TGF) 異常などを来す。
- ④ 最終的に GFR が低下し、さらにその 24~48 時間後に sCr が上昇するに至る。

腎組織の障害を sCr 上昇よりも先行して検出することを目的とした場合、どのような物質に着目すべきであろうか？ 先に述べた通り、AKI における腎障害の病態の主たる部位であり、最初に障害をうけると想定されているのは尿細管上皮細胞である。虚血および腎毒性物質により尿細管上皮細胞の壊死あるいは sub-lethal cell injury が生じ、障害された上皮細胞に由来する物質が尿中および血中に検出されうることから、これらの物質が AKI バイオマーカーの候補として検討されるに至った（表2）。

#### 4 尿 L 型脂肪酸結合タンパク

新規 AKI バイオマーカーの具体例として L 型脂肪酸結合タンパク（L-type fatty acid-binding protein; L-FABP）について述べる。L-FABP は近位尿細管に定常的に発現しており、遊離脂肪酸と結合しミトコンドリ

アやペルオキシソームといった細胞内小器官に輸送するキャリアー蛋白であり、同時に PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma$  といった転写因子とともに複数の遺伝子に対して発現調節を行うことが知られている。さらに L-FABP 遺伝子のプロモーター領域には hypoxia responsive element (HRE) が存在しており、低酸素刺激により転写活性が上昇することも確認されている<sup>6)</sup>。AKI においては、腎における虚血・低酸素に対して即座に反応して大量に尿中へ分泌されるのが特徴である。

これまで行われた臨床研究では、小児人工心肺心臓手術の術後 AKI において、術後 4 時間での尿 L-FABP の AKI 診断予測は、ROC-AUC 0.81、感度 71.4%、特異度 68.4%（カットオフ値 486 ng/mgCr）と良好な結果が報告されている<sup>7)</sup>。一方、成人心臓手術コホートにおいては、Matsui らが ROC-AUC 0.80 以上の AKI 診断予測精度を報告しているが<sup>8)</sup>、我々の検討では術後 4 時間での尿 L-FABP の AKI 診断予測は、ROC-AUC 0.72、感度 92.9%、特異度 44.9%（カットオフ値 33.4 ng/ml）という結果であった<sup>9)</sup>。

この数年で認識されつつある問題点は、小児心臓手術後 AKI コホートのような患者背景にバラツキが少なく、腎障害の発症が明確に把握できる場合には新規 AKI バイオマーカーの精度は高いものの、成人心臓手術後 AKI や ICU 発症 AKI、敗血症性 AKI といった不均一な患者背景と複雑な AKI の病態が組み合わせるにつれ、その精度は低下することが避けられないということである。その解決策として、複数のバイオマー

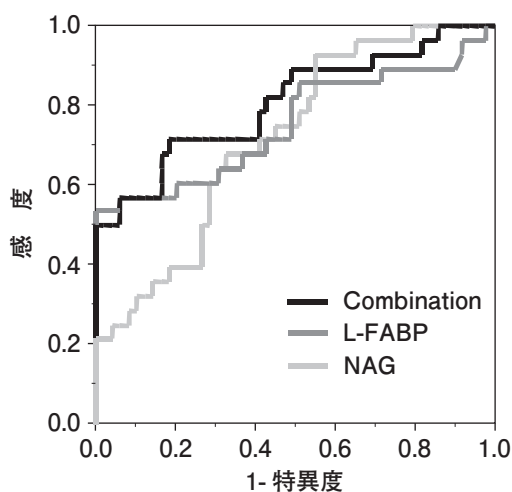


図4 心臓手術後AKIにおける尿L-FABPとNAGの組み合わせ  
成人心臓手術後4時間での尿L-FABPおよびNAGによるAKI診断。両バイオマーカーを組み合わせることでROC-AUCの上昇が認められた (AUC-ROC Combination 0.81, L-FABP 0.69, NAG 0.74)。

カーを組み合わせる (パネル化) ことが提唱されているが、我々の検討においても、尿L-FABPが比較的高い感度を示す一方で、尿NAGが高い特異度をもってAKI診断性能を示したことから、これら二つのバイオマーカーを組み合わせると診断性能の改善が得られた (図4)。

尿L-FABPはGFR低下に先行して生じる尿細管上皮細胞の障害を検出することが可能であり、いわゆる腎前性と腎性が混在して判断が困難な病態において、尿細管上皮の器質的障害を検出するのに有用と予想された。動物実験においては脱水による腎前性AKIモデルを作成して検討を加えたところ、PAS染色などによる病理学的な検索においては病変を認めなかったものの、pimonidasoleを用いた低酸素検出アッセイにより主に近位尿細管上皮細胞が低酸素状態を呈していることが確認され、尿L-FABPの有意な上昇が認められた (図5)。特記すべきは虚血再灌流障害による腎性AKIでは、尿L-FABP濃度が1,000倍以上に上昇するのに対して、腎前性AKIでは10倍程度の上昇にとどまることであり、尿L-FABPにより虚血性腎障害が鋭敏に検出できるのみならず、その上昇程度により腎性AKIと腎前性AKIの鑑別が可能である可能性が示された<sup>10)</sup>。臨床検体を用いた検討でも、東京大学ICUコホートにおける腎前性AKI (48時間以内に血清クレアチニン値の回復+FENa<1.0%) においては、軽度ではあるが統計学的に有意なAKIバイオマーカー上

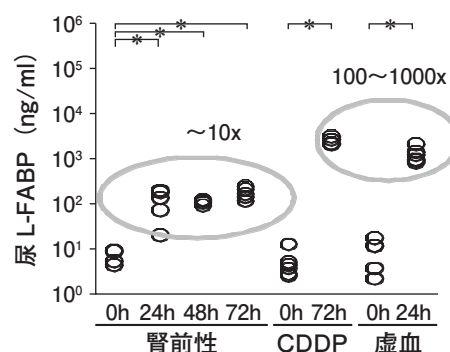


図5 腎前性AKIと腎性AKIにおける尿L-FABP

腎前性AKI (脱水) においては尿L-FABPの上昇は10倍程度にとどまるが、薬剤性 (シスプラチン) あるいは虚血性障害による腎性AKIにおいては100~1000倍にまで上昇する。CDDP; シスプラチン腎症

昇 (L-FABP, NGAL, IL-18, NAG, albumin) を示すことを確認している。

## 5 バイオマーカーの評価における注意点

バイオマーカーの診断性能を評価するに際しては、そのマーカーの障害を検出する能力に加えて、罹患率と確定診断を下すに当たって用いられるゴールドスタンダードの感度・特異度が影響する。もしsCreが尿細管上皮細胞障害を主体とするAKI (罹患率10%) の診断に対して、感度80%、特異度90%の診断能を有すると仮定し、sCreをゴールドスタンダードとして新規バイオマーカーの性能評価を行った場合、たとえ新規バイオマーカーの感度・特異度が100%であっても、sCreと異なる挙動をとることから、感度47%の診断能と判断されることになる<sup>11)</sup>。

実際、AKI診断の精度を検証するにおいて、血清クレアチニンをゴールドスタンダードとして用いることについては疑問が呈されている。血中のクレアチニン濃度は、腎臓からの排泄以外の要素も関与しており、体内のクレアチニン量は、栄養状態、全身の筋肉量に依存し、低栄養状態あるいは体格が非常に小さい症例では、GFRの低下が存在していても血清クレアチニン濃度が基準値内にとどまっていることはよく知られている。さらに、敗血症性ショックのようなmetabolismが低下しているような病態ではクレアチニン産生が低下しており、見かけ上の血清クレアチニン濃度が低下するだけでなく、むしろ敗血症に対する治療により、逆説的に血清クレアチニン濃度が上昇してしまう現象も敗血症動物モデルにて認められている<sup>12)</sup>。

このような状況において、2010年、NIDDK/NIHにより開催されたワークショップ“Clinical Trials in Acute Kidney Injury; Current Opportunities and Barriers”では、major adverse kidney event (MAKE) と呼ばれる複合アウトカム（死亡、腎死＝透析依存、ICU長期滞在）をゴールドスタンダードにしたAKIバイオマーカーの評価が必要であるとの主張がされた。

## 6 バイオマーカーの臨床応用に向けた課題

好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NGAL) や、L-FABPといった新規AKIバイオマーカーがAKI早期診断に堪えうるという評価は主に観察研究によって得られてきた<sup>13,14)</sup>。しかし、新規バイオマーカーの測定結果に基づいた治療戦略の有用性を介入研究にて証明した報告は未だ存在しない。

そのためには、新規AKIバイオマーカーが早期にレスポンスした症例において、血清クレアチニンがその後上昇することがある程度の高い確率で担保される必要がある。先に述べたように、AKI診断のゴールドスタンダードとされる血清クレアチニンが真の急性腎障害を正確に反映していないことが指摘されており、血清クレアチニンをゴールドスタンダードにしている限りにおいては、新規バイオマーカーによる早期診断の有用性が完全には証明できないというジレンマも認識する必要がある。このような状況において、バイオマーカー測定に基づく治療介入（例：バイオマーカー測定値による透析開始の判断）をAKI領域において進めていくには、新たな臨床研究のさらなる積み重ねが必要である。

## 文 献

- 1) National Kidney Foundation : K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease : evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*, 39(2 Suppl 1); S1-266, 2002.
- 2) Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al.; Acute Dialysis Quali-

- ty Initiative workgroup : 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.
- 3) Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. : Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol*, 16; 3365-3370, 2005.
- 4) Hoste EA, Clermont G, Kersten A, et al. : RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care*, 10; R73, 2006.
- 5) Hewitt SM, Dear J, Star RA : Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol*, 15; 1677-1689, 2004.
- 6) Noiri E, Doi K, Negishi K, et al. : Urinary fatty acid-binding protein 1 : an early predictive biomarker of kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296; F669-679, 2009.
- 7) Portilla D, Dent C, Sugaya T, et al. : Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*, 73; 465-472, 2008.
- 8) Matsui K, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, et al. : Usefulness of urinary biomarkers in early detection of acute kidney injury after cardiac surgery in adults. *Circ J*, 76; 213-220, 2012.
- 9) Katagiri D, Doi K, Honda K, et al. : Combination of two urinary biomarkers predicts acute kidney injury after adult cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*, 93; 577-583, 2012.
- 10) Doi K, Katagiri D, Negishi K, et al. : Mild elevation of urinary biomarkers in prerenal acute kidney injury. *Kidney Int*, 82; 1114-1120, 2012.
- 11) Waikar SS, Betensky RA, Emerson SC, et al. : Imperfect gold standards for kidney injury biomarker evaluation. *J Am Soc Nephrol*, 23; 13-21, 2012.
- 12) Doi K, Yuen PS, Eisner C, et al. : Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. *J Am Soc Nephrol*, 20; 1217-1221, 2009.
- 13) Susantitaphong P, Siribamrungwong M, Doi K, et al. : Performance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in acute kidney injury : a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 61; 430-439, 2013.
- 14) Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al.; NGAL Meta-analysis Investigator Group : Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury : a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 54; 1012-1024, 2009.