

(特集：検査機器・試薬・技術の新たな展開 (第26回年次学術集会より))

AKIバイオマーカー尿中NGALの開発と臨床応用

師田 かおり、澤野 薫

Development and clinical application of AKI biomarker urinary NGAL

Kaori Morota and Kaoru Sawano

Summary Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early marker of acute kidney injury (AKI) in a wide variety of setting. AKI is diagnosed with a serum creatinine test or urine output currently. More sensitive and specific biomarkers are needed for the early detection and accurate estimation of kidney injury. NGAL is one of the earliest proteins induced in the kidney after ischemic or nephrotoxic insult; studies have demonstrated elevated urine NGAL levels within two hours of insult. Early detection of NGAL may be used as an aid in the diagnosis of AKI and patient management. In addition, NGAL level may be a useful prognostic tool with regard to the prediction of renal replacement therapy initiation and in-hospital mortality.

Key words: neutrophil gelatinase-associated lipocalin, acute kidney injury, urine, ARCHITECT

I. はじめに

急性腎障害 (acute kidney injury : AKI) は急激な腎機能低下および腎組織障害を来す臨床症候群である。33カ国の97のICUへ入室した1802症例の国際的疫学研究において、2012年にKidney Disease: Improving Global Outcome (KDIGO) より提示されたAKI診断基準に基づくAKIの発症率は57.3%であった¹⁾。AKIの重症度は院内死亡ならびに退院時の腎機能悪化と関連し、腎代替療法 (renal replacement therapy : RRT) を必要とする重症AKI患者の死亡率は高い。

AKI診断は血清クレアチニンと尿量を基準とするが、早期検出ならびに正確性には問題があるとされる。血清クレアチニンが上昇する前の

“サブクリニカルAKI”²⁾ と呼ばれる時期に発現亢進するバイオマーカーの候補として、好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン (neutrophil gelatinase-associated lipocalin : NGAL) が検討されてきた²⁾⁻⁶⁾。NGALはAKI発症後数時間で血中および尿中に検出されることから早期診断に有用と考えられる。また、重症AKI患者に対するRRTの開始や院内死亡との関連が報告されていることから予後予測の指標としても期待されている。

本稿では、近年体外診断薬として承認された尿中NGAL測定試薬の開発と臨床応用の可能性について述べる。

II. NGAL とは

NGALは、2002年に未分化腎前駆細胞を上皮細胞、ネフロンへ分化誘導させるタンパクとして分離同定された⁷⁾。178個のアミノ酸から構成され、糖修飾後の分子量は約25 kDaの蛋白質である。脂溶性リガンドのキャリアタンパク群であるリポカリンスーパーファミリーに属し、8つのβシートからなる樽状構造を有する。多くが単量体であるが2量体やmatrix metalloproteinase-9などとの複合体としても存在する。鉄結合性小化合物であるシデロフォアを介して鉄と結合したNGALは、胎児の腎臓分化促進作用、障害時の腎保護作用やがんの血管新生阻害作用を示す。NGAL単体ならびにNGAL-シデロフォア複合体は鉄キレート体として大腸菌や結核菌の細胞増殖抑制や感染防御などとして働く。腎障害においては、NGALは遠位ネフロンに発現する^{3),4)}。尿中NGALには腎由来NGALと血液由来NGALが近位尿細管での再吸収不全により尿中に排出されたものを含む。

III. 尿中 NGAL 測定試薬の開発

今世紀初頭に行われたNGALの臨床的有用性に関する検討は、主にイムノブロットやELISA法が用いられた。その後、高い操作性・短い測定時間・高感度・高精度・広い定量範囲等の臨床検査におけるニーズを満足する体外診断薬が開発された。

体外診断薬の研究・開発・上市を通じた製品ライフサイクルにおける主要項目を示す(図1)。

探索検討より見いだされた新規バイオマーカーが製品化され、日常検査で使用されるまでには、原料選択・プロトタイプ構築・設計検証・設計バリデーション・製造プロセスと試験法のバリデーション・薬事申請と承認等のいくつかのステップがある。抗原抗体反応を原理とする試薬性能において最も重要な項目は、抗原および抗体の開発と選択である。化学発光免疫測定法(CLIA)を用いた尿中NGAL測定キット「アーキテクト®・U-NGAL」に使用する抗NGALマウスモノクローナル抗体は、抗原に対するアフィニティ、エピトープ、ハイブリッドクロンの細胞増殖、細胞生存率、抗体産生、調製プロセス、原料および試薬安定性の観点から最も良い組み合わせが選択された。代表的な6つの抗体について抗原に対する結合曲線解析を実施し、アフィニティを求めたところ、解離定数(K_d)は0.06 ~ 26 nMであった⁸⁾。また、標識したNGALを用いて2D NMRでエピトープ解析を行った結果、NGALの立体構造を認識することが確認された⁹⁾。

試薬分析性能の代表例として、設計検証の精度試験の結果を示す(図2)。National Committee for Clinical Laboratory Standards (現: Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) EP5-A2に従い、3ロットの試薬と3台の機器を用い、コントロールおよびレファレンスパネルを20日間に渡り1日2回3重測定を実施した再現性は一つの外れ値を除くと1.9 ~ 4.3% CVであった。

尿サンプルは、採取における侵襲性が低く、潜在的な干渉物質となり得るタンパク質が少ないことから、バイオマーカー探索を行う際のサ

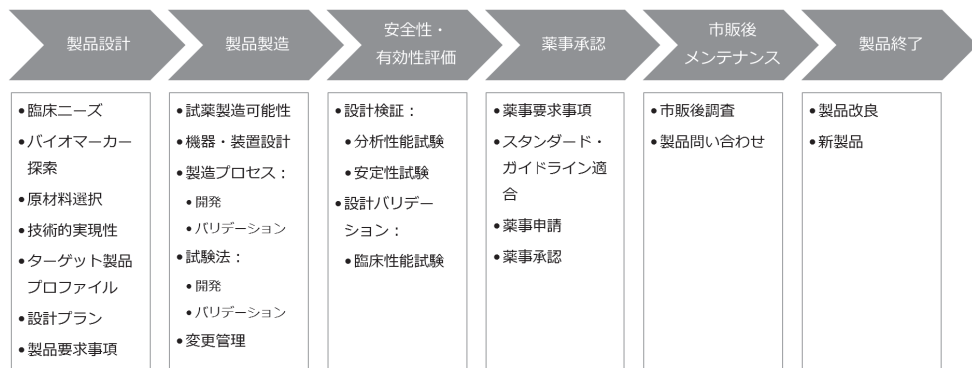


図1 体外診断薬の製品ライフサイクル

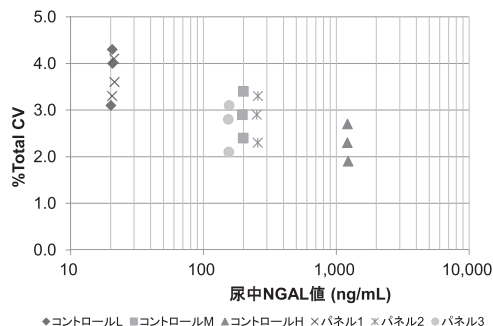


図2 コントロールおよびレファレンスパネルの再現性 (試薬添付文書引用作図)

ンプルタイプとしては理想的と考えられる。分析性能へ影響する潜在的な因子として検討されたサンプルのpHは4.5および10.0において測定値へ影響を与えず、サンプルの保存は22～30℃で24時間まで、2～8℃で7日間まで安定な結果であった。長期保存する場合、-20℃での保管は尿中NGAL濃度に関わらずランダムな値の低下が認められることから、-70℃以下で保存する必要がある。

IV. 尿中 NGAL の臨床応用

- 1) AKIの早期診断、重症度と予後予測
小児の心肺バイパス術後の尿中NGAL値の経

時変化の検討を行った結果では、AKI発症群の血清クレアチニン値は手術終了の1～2日後に上昇を示したのに対し、尿中NGAL値は術後2時間で非AKI発症群より有意な上昇を示した^{5),6)}。また、術後2～6時間の尿中NGAL値はAKI発症期間および入院期間に対する独立した因子であった。

NGAL値のAKI診断性能、重症度ならびに予後予測に関する臨床研究は広く行われており、Haaseらは8カ国19報告の2538症例のNGAL値を用いてメタ解析を行った²⁾。対象を全症例、心臓手術後、ICU入室、造影剤投与、小児、成人、血漿・血清、尿、研究用試薬、標準化臨床検査プラットフォーム（臨床検査試薬）のサブセットに分けてAKI診断性能を評価した（表1、図3）。全体では、感度76.4%、特異度85.1%、診断オッズ比18.6、AUC-ROC 0.815であった。サブセット解析では、診断オッズ比およびAUC-ROCに差異が認められた。診断オッズ比は造影剤投与の92.0が最も大きく、次いで臨床検査試薬25.5、小児25.4、尿18.6の順であった。また、AUC-ROCは小児が0.930で最も大きく、次いで造影剤投与の0.894、尿0.837、臨床検査試薬0.830であった。このメタ解析には尿検体を-20℃で長期保管した研究も含まれており、臨床検査試薬を用いて、尿のサンプリング直後に院内測定することができれば、一定の診断性能が

表1 NGAL値のAKI診断および重症度予測のメタ解析（文献2引用改変）

	感度 (%) (95%CI)	特異度 (%) (95%CI)	診断オッズ比 (95%CI)	AUC-ROC (95%CI)	I ² (%)	NGAL カットオフ値 (ng/mL) (95%CI)
AKI- 全体	76.4 (70.4-81.6)	85.1 (76.6-90.9)	18.6 (9.0-38.1)	0.815 (0.732-0.892)	43.5	190.2 (122.8-257.2)
AKI- 心臓外科	75.5 (70.2-82.4)	75.1 (65.2-86.3)	13.1 (5.7-34.8)	0.775 (0.669-0.867)	27.8	273.6 (145.0-289.2)
AKI- ICU	76.4 (59.9-87.5)	75.5 (52.2-89.7)	10.0 (3.0-33.1)	0.728 (0.615-0.834)	17.5	155.0 (150.8-169.0)
AKI- 造影剤	77.8 (62.8-88.0)	96.3 (74.4-99.6)	92.0 (10.7-794.1)	0.894 (0.826-0.950)	3.2	100.0 (80.0-100.0)
AKI- 小児	77.6 (69.7-83.9)	88.0 (75.8-94.5)	25.4 (8.9-72.2)	0.930 (0.883-0.968)	3.5	135.0 (50.0-150.0)
AKI- 成人	72.5 (62.9-80.4)	80.1 (71.2-86.2)	10.6 (4.8-23.4)	0.782 (0.689-0.872)	27.5	175.0 (150.0-271.5)
AKI- 血漿・血清	73.4 (62.3-82.2)	86.6 (72.0-94.3)	17.9 (6.0-53.7)	0.775 (0.679-0.869)	20.2	179.2 (153.9-199.3)
AKI- 尿	77.8 (70.9-83.5)	84.3 (72.8-91.3)	18.6 (7.2-48.4)	0.837 (0.762-0.906)	21.9	193.2 (123.7-405.7)
AKI- 研究用試薬	76.9 (69.4-83.1)	83.4 (72.0-90.8)	16.7 (7.1-39.7)	0.732 (0.656-0.830)	31.6	246.4 (88.5-277.2)
AKI- 標準化 プラットフォーム試薬	75.4 (63.8-84.2)	89.3 (81.9-93.9)	25.5 (8.9-72.8)	0.830 (0.741-0.918)	7.0	150.6 (145.0-155.0)
RRT開始	76.0 (65.1-84.4)	80.3 (59.5-91.9)	12.9 (4.9-33.9)	0.782 (0.648-0.917)	9.5	278.3 (141.9-381.6)
院内死亡	65.0 (51.2-80.8)	82.6 (51.8-95.5)	8.8 (1.9-40.8)	0.706 (0.530-0.747)	10.3	212.0 (121.8-506.7)

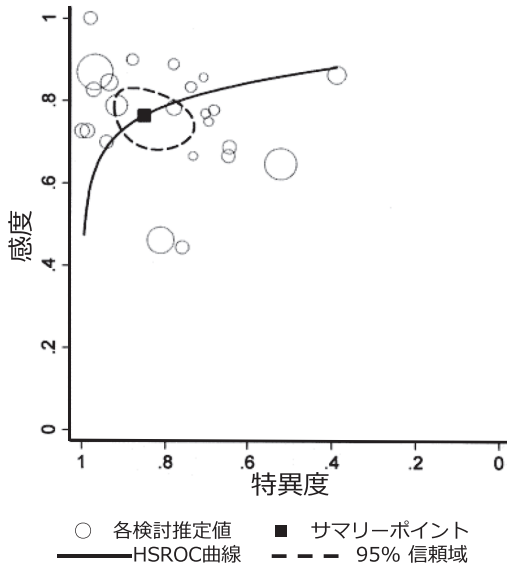


図3 NGAL値のAKI診断に対する階層サマリーROC (HSROC) 曲線解析 (文献2引用改変)

得られるものと考え。さらに、全症例のNGAL値とRRTの開始および院内死亡との関連を解析したところ、AUC-ROCはそれぞれ0.782と0.706であり、NGAL値は重症度ならびに予後を予測する指標となる可能性が示唆された。

敗血症はICUにおけるAKI発症の原因としてもっとも多く、AKI発症患者の約50%に敗血症の合併が認められる¹⁰⁾。敗血症を合併したAKI患者の予後は不良であり、尿中NGALは敗血症合併AKIにおいては著しい高値を示す¹¹⁾ことから、尿中NGAL値により患者の重症度を層別化できる可能性がある。

2) 腎前性AKIと腎性AKIの鑑別

血清クレアチニン値の上昇または尿量減少によりAKIと診断された場合、腎灌流圧低下による腎前性AKIと腎組織障害による腎性AKIの鑑別が行われ、治療方針が決められる。

腎前性AKIと腎性AKIの鑑別方法の一つとして、輸液により早期に腎機能が回復するかどうかを判断する輸液反応性の評価があるが、時間を要することや体液量過剰となる可能性があるとされる。また、尿浸透圧、尿中ナトリウム排泄率 (FENa)、尿中尿素窒素排泄率 (FEUN)、尿沈渣等の検査が実施されるが、鑑別の性能が十分高いとは言えない。尿中NGAL値は、腎前

性AKIと比較し、腎性AKIでは有意な上昇が認められる¹²⁾ことから、他の検査と尿中NGAL値を組み合わせることで、腎前性AKIと腎性AKIの鑑別性能向上が期待される。

3) 移植腎の腎機能管理

腎移植後の1週間以内に透析が必要となる臓器機能障害 (delayed graft function : DGF) や急性拒絶反応の早期検出の指標として尿中NGAL値が検討された。DGFにおいて尿中NGAL値が上昇する原因として、虚血やカルシニューリン阻害剤による腎障害等が考えられる。

Hollmenらは献腎移植を受けた176例を対象に、移植前、移植後1日、3日、7日、14日における尿中NGAL値の変化を検討した¹³⁾。176例中70例がDGFとなり、DGF群における移植後の尿中NGAL値の低下は非DGF群より有意に遅かった。移植後1日目の尿中NGAL値のDGF群に対するROC曲線解析のAUCは0.75であり、カットオフ値を560 ng/mLとした場合の感度および特異度はそれぞれ68%と73%であった。移植直後の尿中NGAL値により、移植腎機能を予測する可能性が示唆される。

4) AKI治療法選択の可能性

現在、AKIの治療は原因となる疾患・病態に対する治療を中心として、腎血流の確保、腎毒性物質の減量・中止、重症AKI症例に対するRRTが行われている。

Nisulaらは15施設のICU入室成人患者1042例を対象に、入室時、12時間後、24時間後の尿中NGAL値とRRT導入との関連の検討を行った (FINNAKI 研究)¹⁴⁾。いずれのタイムポイントにおいても、尿中NGAL値は非RRT導入群と比較しRRT導入群で有意に高値を示した。ICU入室後24時間最大尿中NGAL値を用いてRRT導入に対してROC曲線解析を行った結果、AUCは0.839であり、至適カットオフ値449 ng/mLにおける感度、特異度、陽性尤度比はそれぞれ83.1%、78.5%、3.81であった。

RRTの開始時期については過去にいくつかのランダム化比較試験が報告されているが、早期開始による生存率の改善は示されていない。Zarbockらは重症AKI患者231例に対して、RRT開始タイミングを早期群と後期群の2群に

表2 心臓手術後AKIにおけるCSA-NGALスコア

尿中NGAL値 (ng/mL)	尿中NGAL変化値 (ng/mL)	CSA-NGALスコア
<50	-	0 尿細管ダメージの可能性低い
50 - <150	-	1 尿細管ダメージの可能性あり
150 - <1000	$\Delta > 100+$ 2回目の値 ≥ 125	2 尿細管ダメージ
≥ 1000	-	3 重症尿細管ダメージ

ランダムに分け死亡率の検討を行った (ELAIN 研究)¹⁵⁾。KDIGO AKIステージ2および血漿NGAL値が150 ng/mL以上となった症例をエントリーし、早期群はステージ2の診断後8時間以内にRRTを開始し、後期群はステージ3進行後12時間以内に開始した。主要評価項目である90日死亡率は、早期開始群と後期開始群でそれぞれ39.3%と54.7%となり、早期開始群で有意に死亡率が低かった (p=0.03)。RRT施行期間 (9日 vs. 25日) ならびに入院期間 (51日 vs. 82日) についても有意な短縮が認められた。単一施設の研究ではあるが、AKI患者を対象に、KDIGOステージに加えて血漿NGAL値を指標にした介入試験のフィービリティが示され、治療法の選択や有効性を評価する臨床研究におけるエントリー基準の一つとしてAKIバイオマーカーが用いられる可能性があると考えられる。

de Geusらは成人心臓手術患者における尿中NGAL値 (ng/mL) を4レベル: <50、50 - <150、150 - <1000、 ≤ 1000 に分類したCardiac surgery associated-NGAL (CSA-NGAL)スコア (表2) を提唱し、心臓手術前後および経過観察における患者管理のアルゴリズムを示した¹⁶⁾。将来、患者の臨床症状や他の検査項目とともに、尿中NGAL値に基づき治療方法を選択する可能性が示唆されている。

V. おわりに

尿中NGAL測定 of 臨床応用により、血清クレアチニンや尿量ではとらえられなかった早期にAKIを診断し、速やかに病因の除去や介入治療を行うことが可能になると考えられる。尿中NGAL値は腎代替療法開始や死亡などの予後予測に有用である可能性が示唆されている。今後、

尿中NGAL値を指標の一つとして治療法の選択や治療薬の有効性評価の研究が進むことで、予後不良であった重症AKI患者の早期回復と死亡率改善が期待される。

参考文献

- 1) Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R et al.: Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*, 41; 1411-1423, 2015.
- 2) Haase M, Bellomo R, Devarajan P et al.: 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.
- 3) Mori K, Lee T, Rapoport D et al.: Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 115; 610-621, 2005
- 4) Paragas N, Qiu A, Zhang Q et al.: The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med*: 17: 216-223, 2011.
- 5) 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.
- 6) Bennett M, Dent C, Ma Q et al.: Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3: 665-673, 2008.
- 7) Yang J, Goetz D, Li JY et al.: An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 10: 1045-1056, 2002.
- 8) Hawksworth D, Tu Bailin, Tieman B et al.: Generation of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin monoclonal antibodies for use in ARCHITECT[®] assay. *Hybridoma*, 31: 436-442, 2012.
- 9) Olejniczak et al.: Rapid determination of antigenic epitopes in human NGAL using NMR. *Biopolymers*,

- 93; 657-667, 2010.
- 10) Uchino S, Kellum J, Bellomo R et al.: Acute renal failure in critically ill patient: a multinational, multicenter study. *JAMA*, 294; 813-818, 2005.
 - 11) Bagshaw SM, Bennett M, Haase M et al.: Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med*, 36; 452-461, 2010.
 - 12) Doi K, Katagiri D, Negishi K et al.: Mild elevation of urinary biomarkers in prerenal acute kidney injury. *Kidney Int*, 82: 1114-1120, 2012.
 - 13) Hollmen ME, Kyllönen LE, Inkinen KA et al.: Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker of graft recovery after kidney transplantation. *Kidney Int*, 79; 89-98, 2011.
 - 14) Nisula S, Yang R, Kaukonen KM et al.: The urine protein NGAL predicts renal replacement therapy, but not acute kidney injury or 90-day mortality in critically ill adult patients. *Anesth Analg*, 119: 95-102, 2014.
 - 15) Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C et al.: Effect of early vs delayed initiation of renal replacement therapy on mortality in critically ill patients with acute kidney injury: The ELAIN randomized clinical trial. *JAMA*, 315: 2190-2199, 2016.
 - 16) de Geus HR, Ronco C, Haase M, et al.: The cardiac surgery-associated neutrophil gelatinase-associated lipocalin (CSA-NGAL) score: A potential tool to monitor acute tubular damage. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 151: 1476-1481, 2016.