

①

尿中レチノール結合蛋白排泄量による早期産児
尿細管機能評価に関する研究

今村博明

第 1 編 - 正常新生児尿中レチノール結合蛋白排泄
動態の検討 : E L I S A 法による測定の試み

概要 本研究は尿中低分子蛋白であるレチノール結合蛋白 (RBP) を ELISA 法にて測定し、新生児期尿細管機能の評価における RBP の有用性を明らかにすることを目的とした。合併症のない成熟新生児 62 名を対象とし、日齢 1、3、7 および 30 に採尿を行い、尿中 RBP、尿中 $\beta 2$ ミクログロブリン、尿中 $\alpha 1$ ミクログロブリンを測定した。各々の項目につき時間体重当たりの排泄量を算出した。尿中 RBP 排泄量は、日齢 1 は低値であったが日齢 3 で有意に増加し日齢 7 には減少した。日齢 30 は日齢 7 とほぼ同値であった。尿中 $\beta 2$ ミクログロブリン排泄量、尿中 $\alpha 1$ ミクログロブリン排泄量も同様の傾向が認められたが、日齢間に有意差は認められなかった。尿中 RBP と尿中 $\beta 2$ ミクログロブリンおよび尿中 RBP と尿中 $\alpha 1$ ミクログロブリンの排泄量において有意に相関を認めた。尿中 RBP 排泄量は新生児期における尿細管機能の評価する指標として有用であると思われる。

緒言

新生児期の腎機能は不安定であり、各種病態下で容易に腎不全に陥りやすい。そのため新生児期には腎機能の正確な評価が一層重要性を増してくる。現在、新生児腎機能の評価法として体液中の各種物質の測定が一般的であるが、血中物質の測定は頻回の血液採取が患児に負担を与えること、測定値に影響を与える因子が多いことなどより評価には限界がある。尿は、腎機能を反映する多くの物質を含んでおり、患児に負担を与えずかつ連続的に採取できることなどより、新生児腎機能検査の検体に好んで用いられる。尿中に含まれる各種物質のうち、分子量4万ダルトン以下の低分子蛋白は糸球体を容易に通過するが、近位尿細管において約99%が再吸収・異化され¹⁾、正常成人尿中では極少量しか検出されない。しかし近位尿細管の機能異常により尿中排泄量が著増することから、この尿中排泄量の変化は近位尿細管機能を反映するものとされている²⁾。新生児では糸球体機能に比べ尿細管機能の発達が遅れており、新生児期腎機能の評価のためには尿細管機能の把握が重要となる。したがって発達途上の新生児で、尿中低分子蛋白の排泄量を経時的に測定することは、新生児尿細管機能の変化を把握するのに非常に有用と思われる。従来は、同様の目的で β 2ミク

ログロブリン（以下 $\beta 2M G$ ）を測定した報告^{3）-14）}が多いが、 $\beta 2M G$ は尿中安定性が悪く^{15）}、産生部位が多岐にわたるため腎前性の変動因子が多いという欠点が指摘されている。本研究で取り上げたレチノール結合蛋白（以下 $R B P$ ）は尿中安定性があり^{16）17）}、産生部位も肝に限局されているため腎前性の変動因子が少なく、腎尿細管機能のより優れた指標として最近注目されている^{18）}。成人領域ではいろいろ検討されている^{19）-25）}が新生児期の報告は1編のみである^{26）}。本研究では正常新生児の尿中 $R B P$ 排泄量を酵素免疫測定法（以下 $E L I S A$ 法）にて経時的に測定し、新生児腎尿細管機能の日齢による変化を検討した。また $R B P$ とこれまで報告のある低分子蛋白の $\beta 2M G$ および $\alpha 1$ ミクログロブリン（以下 $\alpha 1M G$ ）を同検体で測定し、有用性を比較検討した。

対象および方法

対象（表1）：1987年2月から7月に経膈分娩により出生した在胎37週から42週、出生体重2615gから4042gの合併症のない新生児62名を対象とした。在胎週数は最終月経より算定した。出生体重は仁志田らの胎児発育曲線の $mean \pm 1.5SD$ 内で、全例A F Dであった。在胎週数および出生体重については日齢間の有意差は認めなかった。全例母

乳栄養を原則としており、生後8時間から12時間の間に哺乳を開始し、以後3時間毎に行った。

尿検体採取方法：排尿時刻を確認したのち採尿バックを貼付し、自然排尿により得られた尿の一部を検体とし、尿量および採尿までの時間を記録した。尿量測定に際しては、あらかじめ重量測定したおむつを使用し、排尿後のおむつ重量との差引によりおむつの中へのもれを算出し、それを採尿量に加算して尿量とした。検体は測定まで -20°C にて保存した。採尿は日齢1、3、7および日齢25～37（以下日齢30と略す）に行った。

測定項目および方法（図1）：尿中RBP濃度は、Toppingら²⁷⁾の方法に準じたELISA法で測定した。抗ヒトRBP抗体を用いたサンドイッチ法で、炭酸バッファーで希釈した抗ヒトRBP抗体（Rabbit immunoglobulins to human RBP, DAKO Immunoglobulins, Copenhagen, Denmark）を固相とし、燐酸バッファーで希釈した検体を加え反応させ、その後燐酸バッファーで希釈した標識抗体（Peroxidase-conjugated rabbit immunoglobulins to human RBP, DAKO Immunoglobulins, Copenhagen, Denmark）を加えた。o-phenylenediamine（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA）にて発色させ、490nmの吸光度にて測定した。標準曲線の作成には、ヒト尿中RBP（Hoechst）を使用した。尿中RBP濃度の測定範囲は $1\mu\text{g}/\text{ml} \sim 500\mu\text{g}/\text{ml}$ で、同時再現性は良好であった。

尿中 β_2 M G 濃度および α_1 M G 濃度は E L I S A 法 (Imzyne β_2 - M ,Imzyne α_1 - M , FUJIREBIO INC., Tokyo, Japan) にて測定した。

共同著者の嶋尾が以前報告²⁸⁾したように、尿中濃度による比較は尿量の影響が無視できないこと、クレアチニン補正值での比較は、新生児では尿細管よりクレアチニンが分泌されていること、糸球体濾過量の変化も加わることなどより不適切であり、また体表面積による補正は、新生児特に早期産児においては体表面積の算出は不正確であると考えられる。そのため各々の尿中濃度と尿量を乗じて得られた値を、日齢 1、3、7 は出生体重 (kg)、日齢 30 は採尿時体重 (kg) で除した、時間体重当たりの排泄量で比較検討した。

なお統計学的検討は Wilcoxon の検定を用いた。

結果 (表 2)

尿中 R B P 排泄量は、日齢 1 では $1.5 \pm 0.7 \mu\text{g/hr/kg}$ 、日齢 3 では $4.3 \pm 2.7 \mu\text{g/hr/kg}$ と増加し、日齢 7 では $1.1 \pm 0.5 \mu\text{g/hr/kg}$ と減少し、日齢 30 では $1.2 \pm 0.8 \mu\text{g/hr/kg}$ と日齢 7 とほぼ同値であった。統計学的検討では日齢 3 が他の日齢に比し、有意に高値を示した。尿中 β_2 M G 排泄量は、日齢 1 では $2.1 \pm 1.7 \mu\text{g/hr/kg}$ 、日齢 3 で $3.7 \pm 2.3 \mu\text{g/hr/kg}$ と増加し、日齢 7 で $2.9 \pm 1.6 \mu\text{g/hr/kg}$ 、日齢 30 では $2.0 \pm 0.8 \mu\text{g/hr/kg}$ と減少した。尿中 α_1 M G 排泄量は、日齢 1 では $12.5 \pm 6.4 \mu\text{g/hr/kg}$ 、

日齡 3 で $22.2 \pm 15.0 \mu\text{g/hr/kg}$ と増加し、日齡 7 で $16.1 \pm 6.0 \mu\text{g/hr/kg}$ 、日齡 30 で $10.9 \pm 6.7 \mu\text{g/hr/kg}$ と減少した。尿中 $\beta_2\text{MG}$ 排泄量、尿中 $\alpha_1\text{MG}$ 排泄量ともに日齡間に有意差は認められなかった。

RBP と $\beta_2\text{MG}$ および RBP と $\alpha_1\text{MG}$ の排泄量につき、それぞれの相関について検討した。RBP 排泄量と $\beta_2\text{MG}$ 排泄量の間には $r = 0.67$, $p < 0.01$ (図 2) と有意の相関を認めた。RBP 排泄量と $\alpha_1\text{MG}$ 排泄量の間にも $r = 0.78$, $p < 0.01$ (図 3) と有意の相関を認めた。また、 $\beta_2\text{MG}$ と $\alpha_1\text{MG}$ の間にも有意の相関 ($r = 0.68$, $p < 0.01$) が認められた。

考案

各種病態下の新生児を管理する上で、治療上必要な輸液量、電解質組成、投与薬用量の決定などを行わなければならないが、そのためには腎機能の評価が重要となる。成人では腎機能の評価には、主に血中 BUN、Cr 量の測定やクレアチニークリアランスの測定などが用いられているが、新生児では、頻回の血液採取は患児に負担がかかること、尿細管での再吸収、排泄などの動態が成人とは異なることなどより評価には限界がある。一方、尿は腎機能を反映する多くの物質を含んでおり、新生児であっても患児に負担を与えず容易に反復し

て採取できることより、新生児の腎機能の評価に有用な検体と思われる。著者らは、従来より新生児腎機能の評価のため尿中低分子蛋白に注目し、この排泄量の測定による腎機能評価の可能性につき検討してきた。尿中低分子蛋白の定義は Manuel らの報告²⁹⁾に基づいて、分子量4万以下とした。糸球体基底膜を通過した低分子蛋白は近位尿細管上皮細胞の微絨毛に付着し、細胞に貪食されるように細胞内に入り小胞を形成し、更にライソゾームに結合し消化されアミノ酸となり細胞外に出て循環系に戻るとされている¹⁾。このため正常成人では低分子蛋白は99%以上が尿細管で再吸収異化され尿中には極少量しか検出されない³⁰⁾。したがって尿中に排泄される低分子蛋白は尿細管の再吸収機能あるいは低分子蛋白の処理能を表していると考えられる。正常正期産の新生児では、低分子蛋白の尿中排泄量は尿細管における再吸収機能を反映しているとの報告³¹⁾があり、また、新生児での gentamicin 使用時の尿細管障害の指標として、血清クレアチニン、クレアチニンクレアランス、Fractional Sodium Excretion(FE_{Na})などより優れているとの報告も認められる³²⁾。

β₂M G は代表的な尿中低分子蛋白であり、従来より新生児の尿細管機能評価の目的で数多く測定、報告されており、日常検査としても広く測定され

ている。しかし、最近 $\beta 2 M G$ は尿中安定性が悪く、 pH と温度に影響を受け、 $pH 6$ 以下では $37^{\circ}C$ 2 時間で分解変性するとする報告¹⁵⁾ や、膀胱内で既に分解し始めているとする報告¹⁶⁾、 $\beta 2 M G$ は、 $H L A$ の small component として多くの有核細胞表面に存在し、細胞崩壊などに伴って血中に遊離するとされ³⁾、³⁾、産生部位が多いため腎前性の変動因子が大きいなどの問題点が次々に指摘され、新生児の尿細管機能評価に必ずしも適切ではないと考えられる。このため著者らは $\beta 2 M G$ に代わる物質として同じ尿中低分子蛋白である $R B P$ に注目した。 $R B P$ は、分子量 21,000 の低分子蛋白で、prealbumin と結合してレチノール輸送を行っており、prealbumin と結合していない遊離 $R B P$ (総 $R B P$ の数%) が尿中に排泄されるが³³⁾、尿中安定性がよく、 $p H 5.0$ までは室温に関係なくほとんど分解されず^{16) 17)}、産生部位も肝に限局しており³³⁾ 腎前性の変動もほとんど無いなどの特徴を持つ。しかし、新生児期尿中 $R B P$ 排泄量に関する検討は 1 編しかなく、尿細管機能評価の基礎となる正常児での排泄量も報告がない。本研究では正常新生児の尿中 $R B P$ 排泄量を $E L I S A$ 法にて経時的に測定し、新生児腎尿細管機能の評価のより優れた指標となり得るかを検討目的とした。その結果、今回行った $E L I S A$ 法は測定が比較的容易で、測定感度が良

好であり、その測定値は新生児における尿細管機能の発達の指標に充分なりうると考えられた。 $\beta 2$ M G 排泄量との比較検討では、両者間に有意の相関関係が認められたが、日齢による変化の検討において、R B P 排泄量が日齢 1 に比較して日齢 3 での増加が統計学上有意に認められたのに対して、 $\beta 2$ M G では有意差が認められなかった。日齢 3 で尿中排泄量が増加するのは、尿細管は胎生期にはほとんど機能しておらず、出生直後では尿細管機能の発達が糸球体機能のそれよりも遅れるため^{3,4)}、腎血流量が増加、糸球体濾過率 (G F R) の上昇で濾液中の R B P 濃度が増加するにもかかわらず、尿細管の再吸収能が追いつかないためと考えられる。

今回、R B P とともに尿中安定性がよく、産生部位も肝に限局している $\alpha 1$ M G についても同時に検討した。尿中 $\alpha 1$ M G 排泄量は R B P 排泄量との間に高い相関関係が認められ、 $\alpha 1$ M G も新生児尿細管機能の評価の指標となり得ると考えられたが、 $\alpha 1$ M G は糖鎖を約 20% 含み、糖鎖のない $\beta 2$ M G や R B P との間に糸球体および尿細管での処理能に差があり、R B P や $\beta 2$ M G に比べ尿細管機能の指標としての特異性が低いといわれている^{3,5),3,6)}。また成人での $\alpha 1$ M G 尿細管再吸収率は 96.2 ~ 97.5% とされ^{3,2)}、 $\beta 2$ M G ・ R B P の尿細管再吸収率

(99%以上)に比べ低いなどの問題点もあり、発達途上の新生児尿細管機能の評価に用いるには注意が必要と思われた。以上のことより新生児期尿細管機能の評価の指標として尿中RBP排泄量の測定は極めて有用と考えられる。

今回、正常成熟新生児の尿中RBP排泄量を測定したが、本研究の結果は今後の成熟新生児尿細管機能の評価における基礎値となりうるものと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました岡田敏夫教授、ならびに検体の採取に御協力をいたたきました産婦人科及び関連病院の諸先生方、また富山医科薬科大学NICU看護婦諸姉に深謝いたします。

表1 Subjects

Age in days	1	3	7	30
No. of cases (M:F)	16 (12:4)	14 (9:5)	16 (10:6)	16 (10:6)
Gestational age (wks) (range)	39.5±1.3 (37-42)	39.6±1.4 (37-41)	39.5±1.1 (37-42)	39.4±1.2 (37-42)
Birth weight (g) (range)	3069±237 (2615-3873)	3367±262 (2900-3850)	3254±278 (2830-3870)	3238±389 (2588-4042)
Body weight at sampling(g) (range)				4642±454 (3826-5640)

Add 100 μ l of anti-human RBP(rabbit)
in sodium carbonate buffer

↓ incubate overnight at 4 °C

Add 100 μ l of blocking solution

↓ incubate for 60 min. at room temperature

Add 100 μ l of sample in diluting buffer

↓ incubate for 120 min. at room temperature

Add 100 μ l of Peroxidase-conjugated

rabbit IgG to human RBP

↓ incubate for 60 min. at room temperature

Development with o-phenylenediamine-H₂O₂ solution

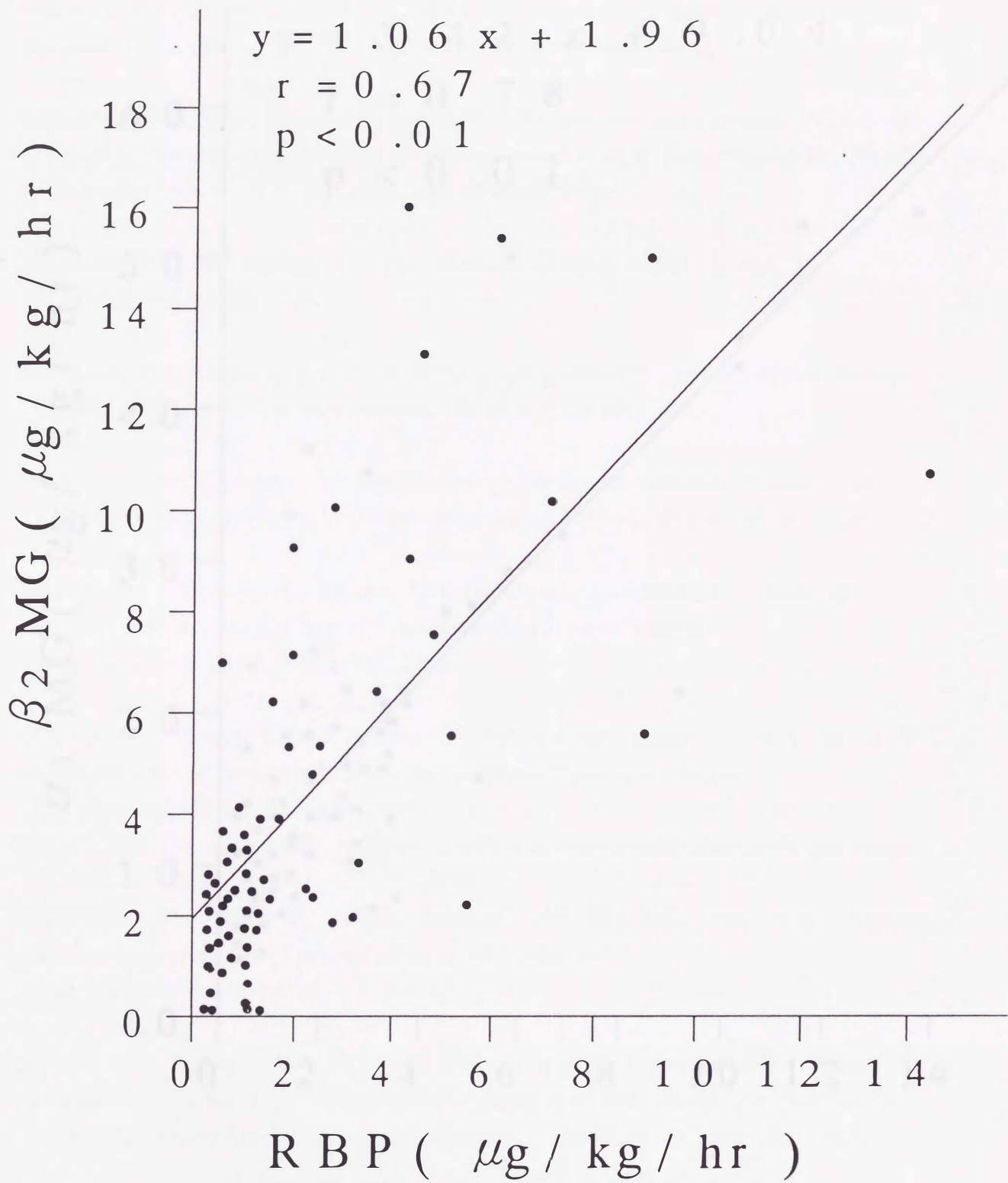
↓

Measure the absorbance at 490 nm

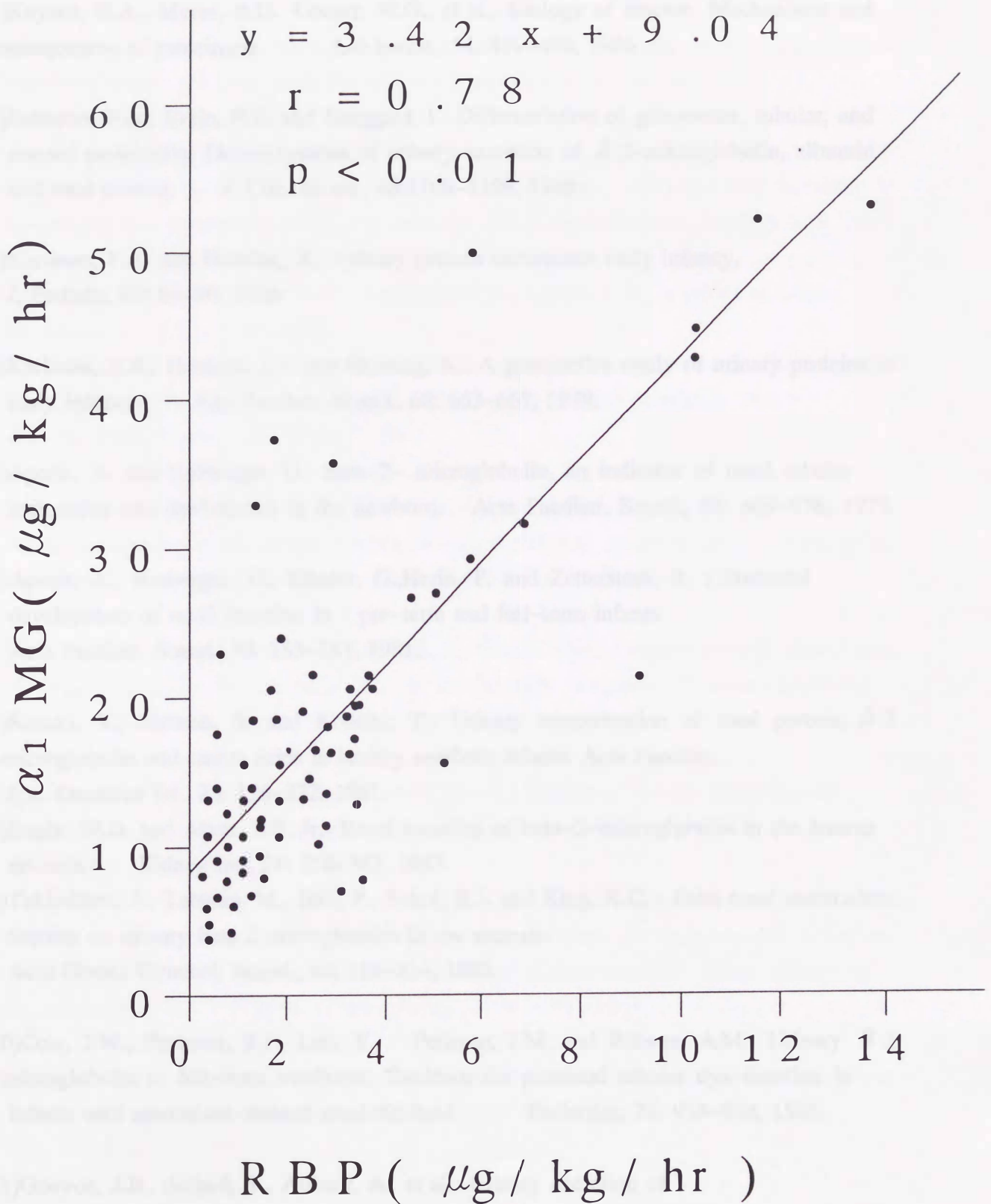
☒ 1 ELISA technic for Urinary RBP

表2 Urinary excretion of Retinol-Binding Protein,
 β 2-microglobulin and α 1-microglobulin in term infants

Age in days		1	3	7	30
Retinol-binding protein (μ g/hr/kg)	Mean	1.5	4.3	1.1	1.2
	SD	0.7	2.7	0.5	0.8
β 2-microglobulin (μ g/hr/kg)	Mean	2.1	3.7	2.9	2.0
	SD	1.7	2.3	1.6	0.8
α 1-microglobulin (μ g/hr/kg)	Mean	12.5	22.2	16.1	10.9
	SD	6.4	15.0	6.0	6.7



2 Relationship between RBP and β₂ MG



3 Relationship between RBP and α_1 MG

- 1) Kaysen, G.A., Myers, B.D., Couser, W.G., et al.: Biology of disease. Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab. Invest.*, 54: 479-498, 1986
- 2) Peterson, P.A., Evrin, P.E. and Berggard, I.: Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: Determinations of urinary excretion of β 2-microglobulin, albumin and total protein. *J. Clin. Invest.*, 48:1189-1198, 1969.
- 3) Karlsson, F.A. and Hellsing, K.: Urinary protein excretion in early infancy. *J. Pediatr.*, 89: 89-90, 1976.
- 4) Karlsson, F.A., Hardrell, L.I. and Hellsing, K.: A prospective study of urinary proteins in early infancy. *Acta Paediatr. Scand.*, 68: 663-667, 1979.
- 5) Aperia, A. and Broberger, U.: Beta-2- microglobulin, an indicator of renal tubular maturation and dysfunction in the newborn. *Acta Paediatr. Scand.*, 68: 669-676, 1979.
- 6) Aperia, A., Broberger, U., Elinder, G., Herin, P. and Zetterstrom, R. : Postnatal development of renal function in pre-term and full-term infants. *Acta Paediatr. Scand.*, 70: 183-187, 1981.
- 7) Suzuki, Y., Shima, S. and Konishi, T.: Urinary concentration of total protein, β 2-microglobulin and amino acids in healthy newborn infants. *Acta Paediatr. Jpn. Overseas Ed.*, 23: 326-332, 1981.
- 8) Engle, W.D. and Arant, B.S. Jr.: Renal handling of beta-2-microglobulin in the human neonate. *Kidney Int.*, 24: 358-363, 1983.
- 9) Takeddine, F., Tabbara, M., Hall, P., Sokol, R.J. and King, K.C. : Fetal renal maturation: Studies on urinary beta 2 microglobulin in the neonate. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 62: 311-314, 1983.
- 10) Cole, J.W., Portman, R.J., Lim, Y., Perlman, J.M. and Robson, A.M.: Urinary β 2-microglobulin in full-term newborns: Evidence for proximal tubular dysfunction in infants with meconium-stained amniotic fluid. *Pediatrics*, 76: 958-964, 1985.
- 11) Gouyon, J.B., Aujard, Y., Abisror, A., et al.: Urinary excretion of N-Acetyl-Glucosaminidase and beta-2-microglobulin as early markers of gentamicin nephro-toxicity in neonates. *Dev. Pharmacol. Ther.*, 10: 145-152, 1987.
- 12) Tack, E.D., Perlman, J.M., Robson, A.M.: Renal injury in sick newborn infants: A prospective evaluation using urinary β 2-microglobulin concentrations. *Pediatrics*, 81: 432-440, 1988.

- 13) Fernandez, F., Barrio, V., Guzman, J., et al.: Beta-2-microglobulin in the assessment of renal function in full term newborns following perinatal asphyxia. *J. Perinat. Med.*, 17: 453-459, 1989.
- 14) Zanardo, V., Riolo, R.D., Faggian, D., et al.: Urinary beta-2-microglobulin excretion in prematures with respiratory distress syndrome. *Child Nephrol. Urol.*, 10: 135-138, 1990.
- 15) Davey, P.G. and Gosling, P.: β 2-microglobulin instability in pathological urine. *Clin. Chem.*, 28: 1330-1333, 1982.
- 16) Donaldson, M.D.C., Chambers, R.E., Woolridge, M.W. and Whicher, J.T.: Stability of alpha1-microglobulin, beta2-microglobulin and retinol binding protein in urine. *Clinica Chimica Acta*, 179: 73-78, 1989.
- 17) Blumsohn, A., Morris, B.W., Griffiths, H. and Ramsey, C.F.: Stability of beta2-microglobulin and retinol binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine. *Clinica Chimica Acta*, 195: 133-138, 1990.
- 18) Bernard, A.M., Moreau, D. and Lauwerys, R.: Comparison of retinol binding protein and β 2-microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria. *Clinica Chimica Acta*, 126: 1-7, 1982.
- 19) Ormos, G., Cseh, J., Groszmann, M and Timar, M.: Urinary β 2-microglobulin and retinol binding protein: Individual fluctuations in cadmium-exposed workers. *Toxicology Letters*, 27: 59-64, 1985.
- 20) Holm, J., Hemmingsen, L., Nielsen, N.V. and Thorsen M.: Increased urinary excretion of the retinol-binding protein in insulin-dependent diabetes mellitus in the absence of microalbuminuria. *Clinica Chimica Acta*, 170: 345-350, 1987.
- 21) Bernard, A.M., Vyskocil, A.A., Mahieu, P. and Lauwerys, R.R. : Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin. Chem.*, 33: 775-779, 1987.
- 22) Bernard, A.M., Vyskocil, A.A., Mahieu, P. and Lauwerys, R.R.: Effect of renal insufficiency on the concentration of free retinol-binding protein in urine and serum. *Clinica Chimica Acta*, 171: 85-94, 1988.
- 23) Holm, J., Hemmingsen, L., Nielsen, N.V.: Relationship between the urinary excretion of albumin and retinol-binding protein in insulin-dependent diabetics. *Clinica Chimica*

Acta,177: 101-106, 1988.

- 24)Rowe, D.J.F., Szydlo, R., Wright, J. and Ayatse, J.: Correlation between the excretion of albumin, retinol binding protein, n-acetyl B-D-glucosaminidase and 'Urine Protein 1' in insulin-requiring diabetes mellitus. *Ann. Clin. Biochem.*,25: supplement 63-64,1988.
- 25)Ellekilde, G., Eyben, F.E., Holm, J. and Hemmingsen L.: Above-normal urinary excretion of retinol-binding protein analbumin in albustix-negative hypertensive patients. *Clin. Chem.*,37: 1446-1447, 1991.
- 26)D.S.Roberts, G.B.Haycock, R.n.Dalton,C.Turner, P.Tomlinson, L.Stimmler, J.W. Scopes: Prediction of acute renal failure after birth asphyxia. *Arch. Dis. Child.*,65:1021-1028,1990
- 27)Topping, M.D., Forster, H.W., Bernard,A.M., et al.: Measurement of urinary retinol-binding protein by enzyme-linked immunosorbent assay, and its application to detectionof tubular proteinuria. *Clin. Chem.*, 32: 1863-1866,1986.
- 28) 嶋尾 智, 鈴木好文, 今村博明・他: 尿中低分子蛋白質の排泄動態からみた新生児期尿細管機能の発達に関する研究: 第一編, 成熟新生児における日齢変化について. *新生児誌* ,26:389-394, 1990.
- 29)Manuel, Y., Colle, A., Leclercq, M., et al.: Low molecular weight proteinuria. *Contr. Nephrol.*, 1: 156-162, 1975.
- 30)Bernard, A., Amor, A.O., Viau, C., et al.: The renal uptake of proteins: A nonselective process in conscious rats. *Kidney Int.*, 34: 175-185,1988.
- 31)van Oort, A., Monnens, P. and van Munster, P.: Beta-2- microglobulin clearance, an indicator of renal tubular maturation. *Int. J. Pediatr. Nephrol.*, 1: 80-84,1980.
- 32)Assadi, F.K. and Chow-Tung, E.: Renalhandling of beta-2-microglobulin in neonates treated with gentamicin. *Nephron*, 49: 114-118,1988.
- 33) 金井正光, 勝山 努, 須原 聡: レチノール結合蛋白質. *臨床検査* , 32: 875-885, 1988.
- 34)Potter,E.L., et al.: Chapter 22. Kidneys,ureters,urinary bladder and urethra. In *Pathology of the Fetus and Infant*. 3rd ed.,Year Book Medical Publishers, Chicago,1975.

35)Cooper,E.H., Forbes,M.A., Crockson,R.A. and MacLennan,I.C.M.: Proximal renal tubular function in myelomatosis : Observations in the fourth medical research council trial. J. Clin. Pathol.,37:852-858,1984.

36)Paul A. Tomlinson : Low molecular weight proteins in children with renal disease. Pediatr. Nephrol.,6:565-571,1992

第2編 — 早期産児尿中レチノール結合蛋白排泄動態の検討：在胎週数および日齢による変化について

概要 早期産児の尿中レチノール結合蛋白排泄量を測定し、在胎週数および生後日齢による変化を検討した。対象は在胎週数により、I群：28週～30週の20名；II群：31週～33週の22名；III群：34週～36週の10名に分け、日齢1、3、7に採尿した。尿中レチノール結合蛋白排泄量は在胎週数の小さい群ほど高値を示した。日齢による変化は各群とも同様な動きを示し、尿中レチノール結合蛋白排泄量は日齢3で増加し日齢7で減少した。以上より尿中レチノール結合蛋白排泄量は早期産児の尿細管機能の発達の指標として有用と考えられた。

緒言

周産期医学の発展により、従来救命し得なかった在胎期間の短い未熟児の治療が可能となり、治療上必要な各種事項の決定に未熟児の腎機能の評価が重要となってきた。

尿細管は胎生期にはほとんど機能しておらず、出生後急速に発達するといわれ、また、数々の物質の転送に多くのエネルギーを必要とするため、虚血や低酸素血症により障害を受けやすいともいわれる。したがって新生児特に虚血や低酸素状態に陥りやすい早期産児の尿細管機能を把握することは、その管理や治療に必要不可欠と思われる。

著者らは、従来より未熟児腎機能、特に尿細管機能の評価のため尿中の低分子蛋白に注目し、この排泄量の測定を行ってきたが、第1編¹⁾において β_2 ミクログロブリン（以下 β_2 M Gと略す）と尿中安定性が優れているレチノール結合蛋白（以下R B Pと略す）排泄量を正常満期産新生児で測定し、R B Pが β_2 M Gに比較し腎尿細管機能の指標としてより優れたものであることを報告した。

本研究では、この結果に基づき早期産児での尿中R B P排泄量を測定し、在胎週数および日齢による変化につき正常児での結果と比較し、未熟児尿細管機能の成熟度の指標となりうるかを検討した。

対象および方法

対象：1986年4月より1990年3月までに富山医科大学小児科NICUに入院した在胎37週未満の早期産児52名を対象とした。対象児は全例高ビリルビン血症以外には呼吸窮迫症候群、仮死、動脈管開存症などの呼吸循環系機能に直接影響を及ぼすような合併症は認めていない。また抗生剤、強心利尿剤などの腎機能に影響を及ぼすような薬剤の使用も行っていない。出生体重は956g～2550gで仁志田らによる胎児発育曲線の $\text{mean} \pm 1.5\text{SD}$ 内のもののみを対象とした。在胎週数は最終月経より算出したが、最終月経不明例はDubowitzら²⁾の方法を採用した。

在胎週数により以下の3群に分けて検討した。

I群が在胎週数28週～30週の20例、II群が在胎週数31週～33週の22例、III群が在胎週数34週～36週の10例(表1)。各群とも日齢1、3、7に採尿を行い、日齢による変化を比較した。

尿検体採取方法：採尿バッグにて採尿し、得られた尿を冷所にて一日蓄尿を行った。その一部を検体とし、測定まで -20°C にて保存した。採尿は日齢1、3、7に行った。

測定項目および方法：尿中RBP濃度は、Toppingら³⁾の方法に準じたELISA法で測定した。抗

ヒト R B P 抗体を用いたサンドイッチ法で、標準曲線の作成には、ヒト尿中 R B P (Hoechst) を使用した。以上の測定より得られた尿中濃度と時間尿量を乗じて得られた値を出生体重 (kg) で除し、時間体重当たり排泄量とした。

なお統計学的検討には一元配置分散分析法を用いた。

結果

各群の尿中 R B P 排泄量の日齢による変化を表に示す (表 2)。

日齢 1 の尿中 R B P 排泄量は、I 群 : 97.2 ± 13.3 (mean \pm SE) μ g/kg/hr、II 群 : $45.7 \pm 11.0 \mu$ g/kg/hr、III 群 : $12.9 \pm 3.1 \mu$ g/kg/hr で、在胎週数の小さい群ほど高値となる傾向を示し、I 群は II 群・III 群に対して 1% の危険率で有意に高値を示した。

日齢 3 の尿中 R B P 排泄量は、I 群 : $144.9 \pm 17.9 \mu$ g/kg/hr、II 群 : $99.8 \pm 18.4 \mu$ g/kg/hr、III 群 : $34.0 \pm 8.2 \mu$ g/kg/hr で、在胎週数の小さい群ほど高値となる傾向を示し、I 群は III 群に対して 1% の危険率で、II 群は III 群に対して 5% の危険率で有意に高値を示した。

日齢 7 の尿中 R B P 排泄量は、I 群 : $107.7 \pm 14.3 \mu$ g/kg/hr、II 群 : $68.7 \pm 17.0 \mu$ g/kg/hr、III 群 : $15.7 \pm 5.6 \mu$ g/kg/hr で、在胎週数の小さい群ほど高値となる傾向を示し、I 群は III 群に対して 1% の危険率で有意

に高値を示した。

尿中RBP排泄量の日齢による変化は、各群とも日齢3に増加し日齢7に低下した。またI群、II群においては、日齢3のRBP排泄量が日齢1に比べて5%の危険率で有意に上昇した。

図1に第1編の成熟新生児のデータも含めて示す。全群とも各日齢において成熟新生児との間に1%の危険率で有意差が認められた。

考案

周産期医学の発展にともない、従来救命し得なかった在胎期間の短い早期産児の治療が可能となったが、これに伴い、治療上必要な輸液量の決定、電解質管理、投与薬用量の決定などに早期産児の腎機能の評価が重要となってきた。しかし、未熟であるがための各種因子が影響しており、腎機能検査特に腎尿細管機能の成熟度を正しく評価することは難しい。特に早期産児では、血中物質の測定は採血による侵襲が強いことや、ホルモンなどの影響を受けやすいことなど不利な点が多い。一方、採尿はほとんど侵襲はなく、早期産児においても比較的容易であるため、尿中物質の測定は、早期産児の腎機能の発達評価をみるのに適していると考えられる。尿中低分子蛋白は特別な病態でない限り、尿中排泄量だけで尿細管機能の評価ができるため早期産児には適していると言われている。

る。

著者らは、従来より早期産児の腎機能、特に尿細管機能の評価のため尿中の低分子蛋白に注目し、この排泄量の測定による尿細管機能評価の可能性につき検討してきた。従来より尿中低分子蛋白として $\beta_2\text{MG}$ を測定している報告が多い^{4) - 16)}が、尿中安定性が悪いという問題が指摘されている。著者らは第1編において尿中安定性が優れ、腎前性因子の影響を受けにくいという特徴を持つ尿中低分子蛋白のRBP排泄量を正常満期産新生児で測定し、 $\beta_2\text{MG}$ に比較し腎尿細管機能の指標としてより優れたものであることを報告した。

今回の検討では、在胎28～30週の未熟なI群で尿中RBP排泄量が高値を示し、在胎週数が進むにつれて尿中排泄量が減少した。これは在胎週数とともに尿細管機能が発達していることを示す。これまでの新生児期尿細管機能の発達に関する報告では、 FE_{Na} は在胎34週以降には差がなくなり¹⁷⁾、 $\text{FE}_{\beta_2\text{MG}}$ は在胎36週以降平衡になる¹⁸⁾とされている。しかし今回の結果では、図1に示すように成熟新生児と全群の間に各日齢において成熟新生児との間に1%の危険率で有意差が認められたことは、尿細管の再吸収能の完成は在胎36週以降であると考えられた。また、在胎週数が少ないほど尿中RBP排泄量が増加していることは、

この排泄量は未熟児尿細管機能の評価の優れた指標と思われた。生後日齢による変化では、日齢3で尿中排泄量が増加するが、これは尿細管は胎生期にはほとんど機能しておらず、出生直後では尿細管機能の発達が糸球体機能のそれよりも遅れるため¹⁹⁾、つまり腎血流量が増加、糸球体濾過率(GFR)の上昇で濾液中のRBP濃度が増加するにもかかわらず、尿細管の再吸収能が追いつかないためと考えられる。生後日齢とともに尿細管機能が発達するため、日齢7では排泄量が減少するものと考えられる。

尿中低分子蛋白による尿細管機能の発達に関する研究では、共同著者の嶋尾が $\beta 2$ MG、 $\alpha 1$ ミクログロブリンについて同様の報告を行っている²⁰⁾。 $\beta 2$ MGについて症例を増やし再検討したが、在胎週数とともに排泄量の減少は認められるものの、各群間の統計学的有意差は認められなかった。 $\beta 2$ MGは尿中での安定性が悪いため、測定までに分解されている可能性があり、新生児期の尿細管機能発達の評価には $\beta 2$ MGよりRBPの方が有用と考えられる。

血中RBP濃度は、肝細胞の障害、低蛋白血症、低栄養などで低値となる。したがって肝細胞でのRBP産生能の未熟性を考慮すると、在胎週数が少ないほど血中RBP濃度は低値である可能性が

ある。しかし、それにもかかわらず未熟なほど尿中排泄量が有意に高値をしめしたことは、尿中排泄量の測定のみで尿細管機能の評価が十分可能であり、早期産児では有用な検査と考えられる。

現在まで早期産児における尿中RBP排泄量の報告はなく、今回の測定結果は、早期産児における各種病態下の腎機能の評価の基礎値となりうると考えられる。

尿中RBP排泄量 (mg/24hr)		
年齢	正常	異常
1	0.1-0.2	0.3-0.5
2	0.2-0.3	0.4-0.6
3	0.3-0.4	0.5-0.7

表1 Subjects

group	No. of cases (M/F)	Gestational age (weeks)	Birth weight (g)
I	20 (13/7)	28~30	1325±234
II	22 (12/10)	31~33	1752±277
III	10 (6/4)	34~36	2092±213

表2 Urinary excretion of Retinol-binding protein ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$)

group	age in days		
	1	3	7
I	97.2±13.3	144.9±17.9	107.7±14.3
II	45.7±11.0	99.8±18.4	68.7±17.0
III	12.9±3.1	34.0±8.2	15.7±5.6

* $p < 0.05$ ** $P < 0.01$ (mean±SE)

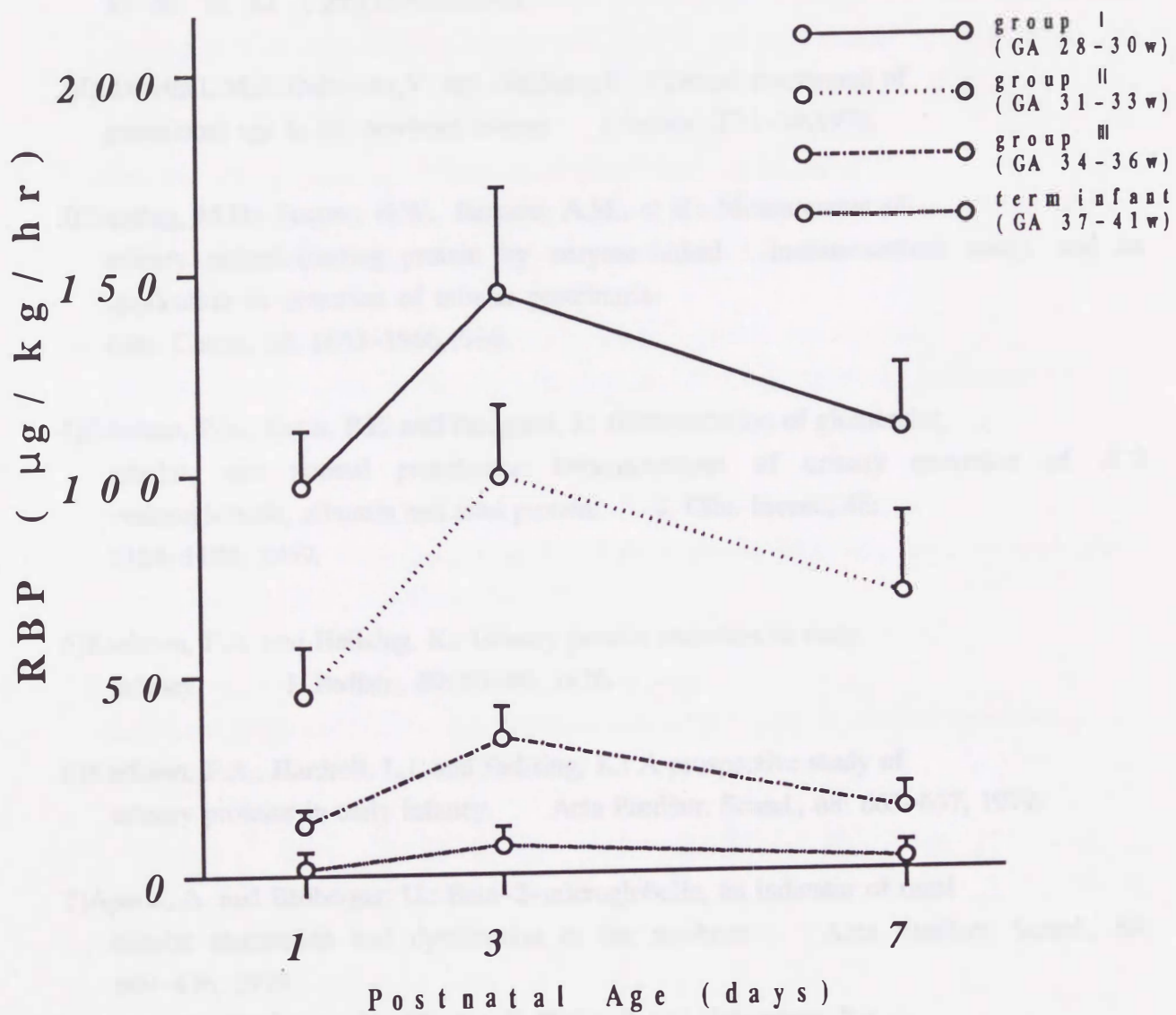
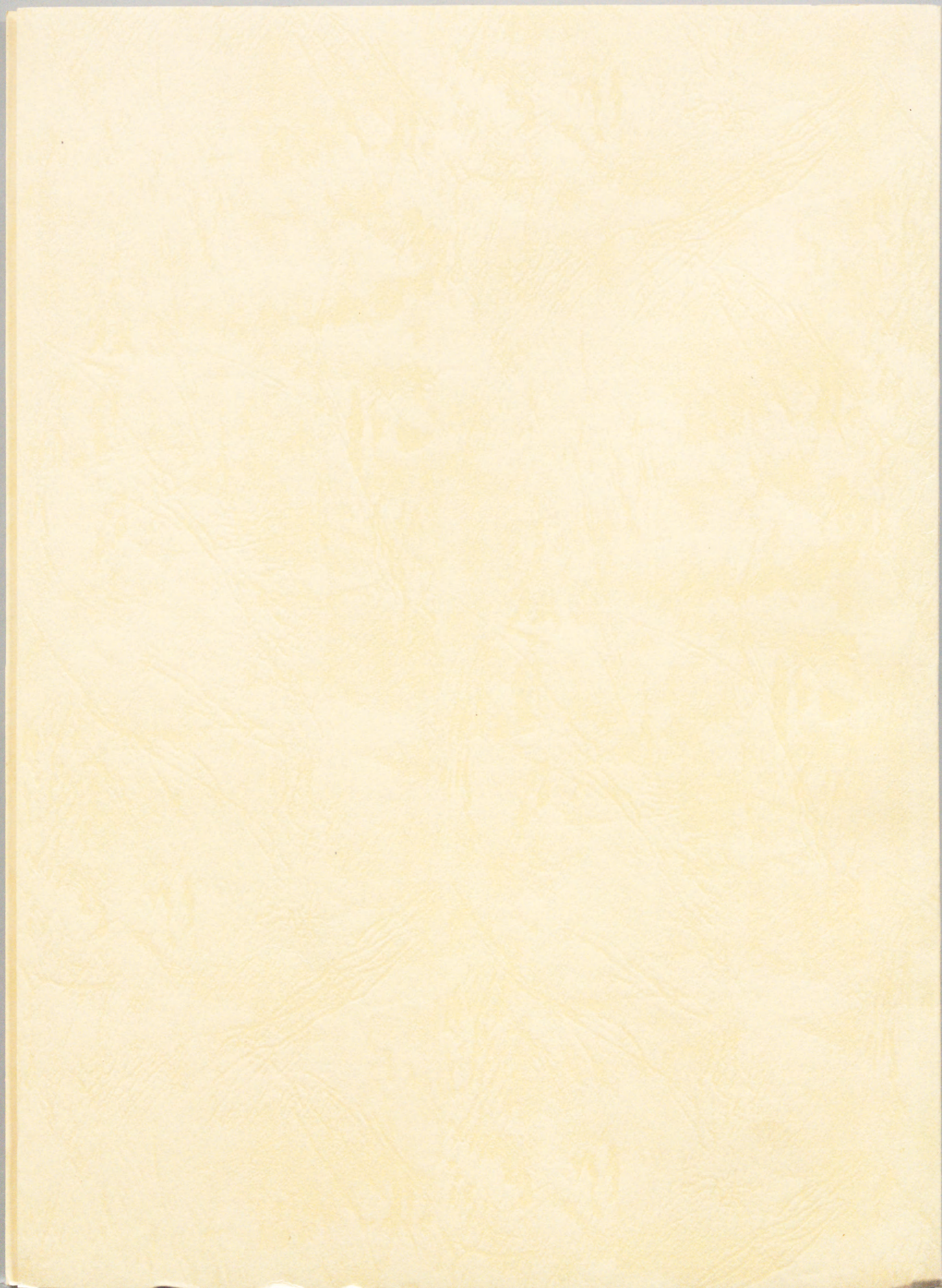


図 1 Urinary excretion of RBP

- 1) 今村博明, 嶋尾 智, 丸山明夫, 二谷 武 :
尿中低分子蛋白定量による新生児期尿細管機能
評価に関する研究. 第1編 - 正常新生児尿中レ
チノール結合蛋白排泄動態の検討 : E L I S A
法による測定の試み.
新生児誌 , 29:111-116,1993
- 2) Dubowitz, L.M.S., Dubowitz, V. and Goldberg, C.: Clinical assessment of
gestational age in the newborn infants. J. Pediatr., 77:1-10, 1970.
- 3) Topping, M.D., Forster, H.W., Bernard, A.M., et al.: Measurement of
urinary retinol-binding protein by enzyme-linked immunosorbent assay, and its
application to detection of tubular proteinuria.
Clin. Chem., 32: 1863-1866, 1986.
- 4) Peterson, P.A., Evrin, P.E. and Berggard, I.: Differentiation of glomerular,
tubular, and normal proteinuria: Determinations of urinary excretion of $\beta 2$
-microglobulin, albumin and total protein. J. Clin. Invest., 48:
1189-1198, 1969.
- 5) Karlsson, F.A. and Hellsing, K.: Urinary protein excretion in early
infancy. J. Pediatr., 89: 89-90, 1976.
- 6) Karlsson, F.A., Hardrell, L.I. and Hellsing, K.: A prospective study of
urinary proteins in early infancy. Acta Paediatr. Scand., 68: 663-667, 1979.
- 7) Aperia, A. and Broberger, U.: Beta-2-microglobulin, an indicator of renal
tubular maturation and dysfunction in the newborn. Acta Paediatr. Scand., 68:
669-676, 1979.
- 8) Aperia, A., Broberger, U., Elinder, G., Herin, P. and Zetterstrom, R.:
Postnatal development of renal function in pre-term and full-term infants. Acta
Paediatr. Scand., 70: 183-187, 1981.
- 9) Suzuki, Y., Shimao, S. and Konishi, T.: Urinary concentration of total
protein, $\beta 2$ -microglobulin and amino acids in healthy newborn infants. Acta
Paediatr. Jpn. Overseas Ed., 23: 326-332, 1981.
- 10) Engle, W.D. and Arant, B.S. Jr.: Renal handling of
beta-2-microglobulin in the human neonate. Kidney Int., 24: 358-363, 1983.

- 11) Takieddine, F., Tabbara, M., Hall, P., Sokol, R.J. and King, K.C.: Fetal renal maturation: Studies on urinary beta 2-microglobulin in the neonate. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 62: 311-314, 1983.
- 12) Cole, J.W., Portman, R.J., Lim, Y., Perlman, J.M. and Robson, A.M.: Urinary β 2-microglobulin in full-term newborns: Evidence for proximal tubular dysfunction in infants with meconium-stained amniotic fluid. *Pediatrics*, 76: 958-964, 1985.
- 13) Gouyon, J.B., Aujard, Y., Abisror, A., et al.: Urinary excretion of N-Acetyl-Glucosaminidase and beta-2-microglobulin as early markers of gentamicin nephrotoxicity in neonates. *Dev. Pharmacol. Ther.*, 10: 145-152, 1987.
- 14) Tack, E.D., Perlman, J.M., Robson, A.M.: Renal injury in sick newborn infants: A prospective evaluation using urinary β 2-microglobulin concentrations. *Pediatrics*, 81: 432-440, 1988.
- 15) Fernandez, F., Barrio, V., Guzman, J., et al.: Beta-2-microglobulin in the assessment of renal function in full term newborns following perinatal asphyxia. *J. Perinat. Med.*, 17: 453-459, 1989.
- 16) Zanardo, V., Riolo, R.D., Faggian, D., et al.: Urinary beta-2-microglobulin excretion in prematures with respiratory distress syndrome. *Child Nephrol. Urol.*, 10: 135-138, 1990.
- 17) 名古 靖, 本間 哲夫, 寺尾 宏一郎, 富沢 滋 : 新生児期における F E N a の在胎週数別経時的変化の検討. *新生児誌*, 22:751-758,1986.
- 18) Assadi, F.K., John, E.G., Justice, P. and Fornell, L.: Beta 2-microglobulin clearance in neonates: Index of tubular maturation. *Kidney Int.*, 28:153-157, 1985.
- 19) Potter, E.L., et al.: Chapter 22. Kidneys, ureters, urinary bladder and urethra. In *Pathology of the Fetus and Infant*. 3rd ed., Year Book Medical Publishers, Chicago, 1975.
- 20) 嶋尾 智, 鈴木 好文, 今村 博明・他 : 尿中低分子蛋白質の排泄動態からみた新生児期尿細管機能の発達に関する研究 : 第 2 編, 早期産児における

る 在胎週数および日齢によ る変化について.
新生児誌, 26: 395-401, 1990.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

