●原 著●

先天性腎尿路異常症患者における酸化ストレス環境の評価 —当院の年齢別基準値に基づいて—

塚原 宏一^{*1}・平岡 政弘^{*1}・森 夕起子^{*1}・巨田 尚子^{*1}・徳力 周子^{*1}
川谷 正男^{*1}・長坂 博範^{*2}・川上 寿子^{*3}・関根 恭一^{*3}・眞弓 光文^{*1}

(受付日：平成19年8月7日 採用日：平成19年8月30日)

要 旨

先天性腎尿路異常症患者においては、機能的ネフロンが減少して腎機能低下が進行する危険性が少ない。われわれは、先天性腎尿路異常症を有する小児患者を対象に、腎臓局所において酸化ストレスが亢進しているかどうか特異的マーカーを用いて調べた。対象は小児患者46名（男32名，女14名；1.2～16.0歳）で，原発性膀胱尿管逆流症（以下，VUR）患者20名とVURを呈さない（以下，Non-VUR）患者26名に分けて評価した。特異的酸化ストレス・マーカーとして，尿中8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)，acrolein-lysine, nitrite/nitrate濃度を計測した。健常者100名（男50名，女50名；1.5～21.0歳）から得られた年齢別基準値に基づいて，患者群での計測値をSDスコアで表した。25名（VUR群で12名，Non-VUR群で13名）では，血清中nitrite/nitrate濃度も計測した。尿中酸化ストレス・マーカーについて

は，VUR患者と健常者との間に差は見られなかった。Non-VUR患者の場合，特に多嚢胞性異形成腎，無形成腎，低形成腎の患者で，健常者と比べてacrolein-lysineが異常高値を呈する患者が目立った（8-OHdGではそのような傾向はなかった）。このような患者では，腎臓局所での脂質・蛋白質酸化が亢進していることが示唆された。nitrite/nitrateの生成・排泄については，患者群で明らかな異常は見られなかった。今回の研究で得られた結果は，先天性腎尿路異常症における慢性腎障害の進展機序を解明し，その対策を立てるための手がかりになると考えられた。

序 言

慢性腎障害においては，腎機能がいったん低下すると原疾患の種類にかかわらず腎機能低下は進行性になり，最終的に腎不全に至ることがある。その組織学的特徴は糸球体硬化と間質線維化であるが，その進展には糸球体高血圧とそれにより尿細管・間質に負荷される蛋白尿が寄与する。このカスケードの中では，腎臓局所での血管作動物質や炎症関連物質の産生・分泌の亢進が重要な働きを示す。その場合，腎臓局所での酸化ストレスも亢進していると推定される。

先天性腎尿路異常症は小児において決して稀な疾患ではない¹⁾。先天性腎尿路異常症患者においては，機能的ネフロンが減少して進行性腎障害を呈する危険性が少ない。IgA腎症に代表される慢性糸球体腎炎に対して有効な薬物療法が開発されている現状を考えると，将来的には，慢性腎障害に占める先天性腎尿路異常症の頻度

^{*1}福井大学医学部小児科

(〒910-1193 福井県吉田郡永平寺松岡町)

^{*2}千葉県こども病院小児科

^{*3}三菱化学メディエンス研究開発部

Evaluation of oxidative stress status in patients with congenital kidney and urinary tract anomalies by using reference values obtained in our institution

Hirokazu Tsukahara^{*1}, Masahiro Hiraoka^{*1}, Yukiko Mori^{*1}, Naoko Ohta^{*1}, Shuko Tokuriki^{*1}, Masao Kawatani^{*1}, Hironori Nagasaka^{*2}, Hisako Kawakami^{*3}, Kyouchi Sekine^{*3}, Mitsufumi Mayumi^{*1}

^{*1}Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

^{*2}Department of Pediatrics, Chiba Children's Hospital

^{*3}Department of Research and Development, Mitsubishi Chemical Medience Corporation

Key words：先天性腎尿路異常症

酸化ストレス

—酸化窒素

特異的尿マーカー

表1 VUR児における尿中酸化ストレス・マーカー（1回目）

・対象：総計20名（男/女=17名/3名） 年齢=1.6～16.0歳（平均8.9歳） 片側/両側=9名/11名（3～5度/2～5度） 小腎症=10名（男/女=10名/0名）
・生体マーカー：各年齢群におけるSDスコア 8-OHdG：-1.88～+2.32（平均-0.21） Acrolein-lysine：-1.43～+3.47（平均+0.57） Nitrite/nitrate：-1.50～+2.43（平均-0.51）
・生体マーカー：SDスコアが2+以上 8-OHdG：1/20（5%）-男（両側） Acrolein-lysine：2/20（10%）-ともに男（両側） Nitrite/nitrate：1/20（5%）-男（両側）

表2 VUR児における尿中酸化ストレス・マーカー（2回目）

・対象：総計6名（男/女=6名/0名） 年齢=6.8～17.0歳（平均12.2歳） 片側/両側=2名/4名（3～4度/2～5度） 小腎症=4名（男/女=4名/0名）
・生体マーカー：各年齢群におけるSDスコア 8-OHdG：-1.80～-0.15（平均-0.94） Acrolein-lysine：-1.02～+2.02（平均+0.44） Nitrite/nitrate：-1.24～-0.21（平均-0.87）
・生体マーカー：SDスコアが2+以上 8-OHdG：0/6（0%） Acrolein-lysine：1/6（17%）-男（片側） Nitrite/nitrate：0/6（0%）

は増加すると思われる²⁾。今回われわれは、先天性腎尿路異常症を有する小児患者を対象に、腎臓局所において酸化ストレスが亢進しているかどうか特異的尿マーカーを用いて調べた。

対象・方法

今回の対象は当院小児科外来を定期受診し、それまで1年以上にわたり尿路感染症を呈していなかった先天性腎尿路異常症患者46名（男32名，女14名；1.2～16.0歳）である。原発性膀胱尿管逆流症（vesicoureteral reflux, 以下，VUR）患者20名（男17名，女3名；1.6～16.0歳，平均8.9歳；片側/両側=9名/11名；VUR gradingは2～5度）とVURを呈さない（以下，Non-VUR）先天性腎尿路異常症患者26名（男15名，女11名；1.2～15.3歳，平均7.3歳）の2群に分けて評価した。

VUR群のうち男児10名が小腎症（すべて片側性）を呈していた（超音波にて腎臓の長軸径を計測し，健常児を対象に得られた基準値³⁾よりも短い場合に小腎症と判定した）。Non-VUR群の内訳は，多嚢胞性異形成腎10名，無形成腎6名，腎盂尿管移行部（pyeloureteral junction stenosis, PUJ）狭窄5名，低形成腎3名，巨大尿管1名（以上，すべて片側性），多発性嚢胞腎（常染色体優性）1名であった。患者群で高血圧，蛋白尿，低身長は見られず，薬剤使用中のものはなかった。1名のVURの16歳，男児（血清Cr値は1.17mg/dl）を除いたすべての患者で，血清Cr値は年齢別基準値の範囲内にあった。本研究の内容は福井大学医学部の倫理委員会で承認されており，酸化ストレス・マーカーの計測は患者家族の同意を得た後に実施された。

VUR群の6名（男6名；6.8～17.0歳，平均12.2歳；片側/両側=2名/4名；VUR gradingは2～5度），Non-VUR群の16名（男9名，女7名；2.6～12.2歳，平均8.2

歳；内訳は，多嚢胞性異形成腎8名，無形成腎3名，PUJ狭窄3名，低形成腎1名，巨大尿管1名）については，約1年後に2回目の計測を行った。

先天性腎尿路異常症患者46名から早朝尿を採取して，酸化ストレス・マーカーである8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（以下，8-OHdG；ELISA法にて計測），acrolein-lysine（ELISA法にて計測），一酸化窒素（NO）代謝物（以下，nitrite/nitrate）（比色定量法にて計測）の濃度を計測した⁴⁾。結果はすべてCr比で表示した。

われわれは最近，健常者100名（男50名，女50名；1.5～21.0歳）から早朝尿を採取して前述の酸化ストレス・マーカーを計測し，それらの年齢別基準値を設定した⁵⁾。その結果によると，健常者では酸化ストレス・マーカーに男女間で有意な差は見られなかった。それらは若年者ほど高い値を示したが，年齢が長じるにつれて低下し，10～12歳で一定レベルに達する傾向を示した。年齢別（I群：1～6歳，33名；II群：6～11歳，34名；III群：11～16歳，20名；IV群：16～21歳，13名）の基準値（平均/SD）は，8-OHdG（ng/mg Cr）-I群：18.0/4.2；II群：12.7/4.0；III群：9.3/3.0；IV群：8.8/3.4，acrolein-lysine（nmol/mg Cr）-I群：218/70；II群：153/43；III群：148/71；IV群：107/33，nitrite/nitrate（ μ mol/mg Cr）-I群：3.46/1.98；II群：2.39/1.15；III群：1.82/0.93；IV群：1.78/0.68である。これらの基準値に基づいて，各患者での計測値をSDスコアで表し，SDスコアの範囲/平均/異常高値（+2.0以上）の患者数（頻度）を計算した。また，VUR群とNon-VUR群での1回目の計測値と，年齢を一致させた健常者群〔前述のI群，II群，III群（1～16歳）あわせて87名〕の計測値との間に統計的に有意な差があるかどうか，unpaired t-testを用いて検定した。p<0.05で有意と判定した。

表3 Non-VUR 児における尿中酸化ストレス・マーカー(1回目)

・対象：総計26名(男/女=15名/11名)
年齢=1.2~15.3歳(平均7.3歳)
多嚢胞性異形成腎：10名；無形成腎：6名；PUJ狭窄：5名；低形成腎：3名；巨大尿管：1名；多発性嚢胞腎：1名
・生体マーカー：各年齢群におけるSDスコア
8-OHdG：-2.69~+3.06(平均-0.16)
Acrolein-lysine：-0.75~+7.58(平均+2.26)
Nitrite/nitrate：-1.42~+1.86(平均-0.37)
・生体マーカー：SDスコアが2+以上
8-OHdG：3/26(12%) -男/女=3名/0名
Acrolein-lysine：15/26(58%) -男/女=9名/6名
Nitrite/nitrate：0/26(0%)

表4 Non-VUR 児における尿中酸化ストレス・マーカー(2回目)

・対象：総計16名(男/女=9名/7名)
年齢=2.6~12.2歳(平均8.2歳)
多嚢胞性異形成腎：8名；無形成腎：3名；PUJ狭窄：3名；低形成腎：1名；巨大尿管：1名
・生体マーカー：各年齢群におけるSDスコア
8-OHdG：-1.75~+1.85(平均-0.41)
Acrolein-lysine：-1.87~+5.00(平均+1.38)
Nitrite/nitrate：-1.49~+5.49(平均-0.35)
・生体マーカー：SDスコアが2+以上
8-OHdG：0/16(0%)
Acrolein-lysine：7/16(44%) -男/女=5名/2名
Nitrite/nitrate：1/16(6%) -男/女=1名/0名

VUR 群の12名(男10名, 女2名; 2.5~17.0歳, 平均9.4歳; 片側/両側=4名/8名; VUR gradingは2~5度), Non-VUR 群の13名(男7名, 女6名; 2.6~15.3歳, 平均8.6歳; 内訳は多嚢胞性異形成腎6名, 無形成腎4名, PUJ狭窄1名, 巨大尿管1名, 多発性嚢胞腎1名)については, 尿中nitrite/nitrateとともに血清中nitrite/nitrate(比色定量法)を計測して, nitrite/nitrate排泄率(Fractional excretion of nitrite/nitrate, 以下, FE-nitrite/nitrate)を計算した。結果は範囲/平均で表した。

成 績

20名のVUR患者における酸化ストレス・マーカー計測の結果〔SDスコアの範囲/平均/異常高値の患者数(頻度)〕を表1に示す。尿中8-OHdG, acrolein-lysine, nitrite/nitrateのSDスコアの平均は-0.21, +0.57, -0.51, それぞれのマーカーの異常高値の頻度は1/20(5%), 2/20(10%), 1/20(5%)であった。unpaired t-test

図1 Non-VUR 患者における尿中 acrolein-lysine 濃度の実測値(健常者群の実測値と対比させて示す)

+：健常者100名(男50名, 女50名; 年齢は1.5歳~21.0歳); ●：多嚢胞性異形成腎; ▲：無形成腎; ■：低形成腎; ○：PUJ狭窄; △：巨大尿管; □：多発性嚢胞腎。経時的に評価された症例において尿中 acrolein-lysine 濃度の変動は激しいが, 多嚢胞性異形成腎, 無形成腎, 低形成腎の患者で異常高値を呈する傾向があるように見える。

を用いた検定では, すべてのマーカーにおいて健常者群との間に有意差は認められなかった。尿中 acrolein-lysine が異常高値を呈した2名はともに男児であった。VUR gradingは10歳の患者で左5度/右3度, 11歳の患者で左3度/右3度であり, 後者の児では右腎が小さかった。このうち6名のVUR患者において経時的な評価がなされたが, 2回目の計測でもVUR患者では酸化ストレス・マーカーは高値を示さなかった(表2)。

26名のNon-VUR患者における酸化ストレス・マーカー計測の結果(SDスコアの範囲/平均/異常高値の患者数(頻度))を表3に示す。尿中8-OHdG, acrolein-lysine, nitrite/nitrateのSDスコアの平均は-0.19, +2.78, -0.37, それぞれのマーカーの異常高値の頻度は3/26(12%), 15/26(58%), 0/26(0%)であり, acrolein-lysineにおいて異常高値を呈する患者が目立った。unpaired t-testを用いた検定では, acrolein-lysineにおいてのみ健常者群との間に有意差が認められた〔Non-VUR群, 健常者群の範囲/平均/SDはそれぞれ121~520/307/114, 62~428/177/68(nmol/mg Cr)であり, $p<0.001$ の有意差があった〕。異常高値を呈した患者の内訳は, 多嚢胞性異形成腎4名, 無形成腎4名, PUJ狭窄3名, 低形成腎2名, 巨大尿管1名, 多発性嚢胞腎

表5 VUR 児における Nitrite/nitrate 値

・対象：総計12名（男/女=10名/2名）
年齢=2.5～17.0歳（平均9.4歳）
片側/両側=4名/8名（3～5度/2～5度）
小腎症=6名（男/女=6名/0名）
・生体マーカー：
血清 Nitrite/nitrate：20.2～67.4μM（平均35.6μM）
FE-Nitrite/nitrate：11.3～54.4%（平均28.6%）

1名であった。このうち16名の Non-VUR 患者において経時的な評価がなされたが、2回目の計測でも尿中 acrolein-lysine が異常高値を示すものが7名（44%）と高頻度に見られた（表4）。その内訳は、多嚢胞性異形成腎3名、無形成腎3名、PUJ 狭窄1名であった。Non-VUR 患者における尿中 acrolein-lysine の実測値を健常者群の実測値と対比させて図1に示す。

12名の VUR 患者、13名の Non-VUR 患者における血清 nitrite/nitrate, FE-nitrite/nitrate をそれぞれ表5, 6に示す。血清 nitrite/nitrate, FE-nitrite/nitrate の平均値はそれぞれ20～30μM 台、20%台であり、一般に報告されている基準値⁶⁾⁷⁾と同じレベルであった。

考 察

酸化ストレスが生体機能を修飾・傷害し、疾病形成に関与することを *in vivo* で解析するためには、生体の酸化・還元環境を適切に評価できるマーカーを計測する必要がある。活性酸素・フリーラジカルは寿命が短く生体試料中で直接に検出することが困難なため、最近では、生体内の構成物が酸化された結果生じる安定生成物を計測する方法がよく用いられる。その代表としては、核酸酸化物の8-OHdG、脂質・蛋白質酸化物の acrolein-lysine、糖質酸化物の pentosidine がある⁴⁾。また、NO が関与する酸化ストレスを評価する目的で nitrite/nitrate を計測する方法がよく用いられる⁸⁾。

われわれは、酸化ストレス・マーカーの尿中排泄の年齢別基準値がそれまでなかったことから、8-OHdG, acrolein-lysine, nitrite/nitrate などの基準値を設定した⁵⁾。年齢別基準値を知っておれば、それらを用いて各種疾患・病態における酸化ストレス環境や NO 環境を評価できる。腎臓疾患の中では糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、腎不全を対象にした臨床研究の報告はあるが⁴⁾、先天性腎尿路異常症を対象にした報告はこれまでなかった。今回の研究対象として尿路感染症を合併していない患者を選択したのは、感染症に伴う炎症反応による影響を排除し、腎尿路異常症そのものによる腎臓局所での酸

表6 Non-VUR 児における Nitrite/nitrate 値

・対象：総計13名（男/女=7名/6名）
年齢=2.6～15.3歳（平均8.6歳）
多嚢胞性異形成腎：6名；無形成腎：4名；PUJ 狭窄：1名；巨大尿管：1名；多発性嚢胞腎：1名
・生体マーカー：
血清 Nitrite/nitrate：18.0～49.9μM（平均28.4μM）
FE-Nitrite/nitrate：10.1～48.7%（平均24.4%）

化ストレスを特異的に評価するためであった。

先天性腎尿路異常症のうち原発性膀胱尿管逆流症とは別種の異常症（今回の研究での Non-VUR）を有する患者においては、尿中 acrolein-lysine が異常高値を示すものが1回目の計測で26名のうち15名（58%）と高頻度に見られ、SD スコアの平均は+2.26と高値を示した。Non-VUR 群での計測値は年齢を一致させた基準値と比較しても有意に高かった。8-OHdG が異常高値を示すものは1回目の計測では3名（12%）、SD スコアの平均は-0.16であり、健常者群とは差はなかった。このうち16名の Non-VUR 患者において2回目の評価がなされたが、尿中 acrolein-lysine が異常高値を示すものは7名（44%）とやはり高頻度に見られた。以上の結果より、Non-VUR、特に多嚢胞性異形成腎、無形成腎、低形成腎の腎臓局所では脂質・蛋白質酸化が亢進していることが示唆された。

適度の NO 産生は活性酸素 (O_2^- , H_2O_2 など) を消去することで抗酸化作用を発揮する。NO 欠乏状態だけでなく NO 過剰状態もまた生体の酸化・還元環境を破綻させる⁹⁾。今回の研究では Non-VUR 患者において nitrite/nitrate が異常高値を示すものは1回目の計測ではなく、2回目の計測がなされた16名の中では1名（6%）にとどまった。1回目の計測での SD スコアの平均は-0.37であり、健常者群とは差がなかった。nitrite/nitrate については尿中濃度以外に血清中濃度、FE-nitrite/nitrate も計測されたが、nitrite/nitrate の生成・排泄に明らかな異常はなかった。腎臓局所では NO 産生は低下も亢進もしていないと考えられた。

一方、VUR 患者については成績で示したように、1回目、2回目ともに8-OHdG, acrolein-lysine, nitrite/nitrate の排泄が健常者群と比べて高値を示すことはなかった。血清中濃度、FE-nitrite/nitrate も計測されたが、nitrite/nitrate の生成・排泄に明らかな異常はなかった。

結 論

Non-VUR, 特に多嚢胞性異形成腎, 無形成腎, 低形成腎の腎臓局所では脂質・蛋白質酸化が亢進していることが示唆された。今回の研究で得られた結果は, 先天性腎尿路異常症における慢性腎障害の進展機序を解明する手がかりになると思われた。酸化ストレスの亢進がこの先天性疾患群での進行性腎障害の共通経路の1つであるならば, ACE 阻害剤, アンギオテンシン受容体阻害剤などの抗酸化剤が腎障害の抑止に効果的に働く可能性が期待される。

文 献

- 1) 平岡政弘: 小児尿路感染症の外来診療マスターブック. 医学書院, 東京, 日本, 2003.
- 2) 塚原宏一: 慢性腎臓病-CKD キャンペーンをめぐる話題. 国内外のCKDに対するエビデンス: 小児CKD. 内科 100: 79-83, 2007.
- 3) Han B, Babcock D: Sonographic measurements and appearance of normal kidneys in children. Am J Roentgenol 145: 611-619, 1985.
- 4) Tsukahara H: Biomarkers for oxidative stress: Clinical application in pediatric medicine. Curr Med Chem 14: 339-351, 2007.
- 5) Tamura S, Tsukahara H, Ueno M, Maeda M, Kawakami H, Sekine K, Mayumi M: Evaluation of a urinary multi-parameter biomarker set for oxidative stress in children, adolescents and young adults. Free Radic Res 40: 1198-1205, 2006.
- 6) Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK: Nitrite and nitrate analyses: A clinical biochemistry perspective. Clin Biochem 3: 195-220, 1998.
- 7) Tsukahara H, Sekine K, Miura M, Todoroki Y, Ohshima Y, Hiraoka M, Hosokawa K, Kotsuji F, Mayumi M: Vasoactive and natriuretic mediators in umbilical cord blood: A report of our observation and review of the literature. Early HumDev 69: 57-64, 2002.
- 8) 塚原宏一, 堀 親秀, 畑 郁江, 土田晋也, 平岡政弘, 津村久美, 菊池 清, 眞弓光文: 尿中一酸化窒素代謝物 (NO_x⁻) 定量による小児の一酸化窒素 (NO) 産生の評価: 基礎データとその応用. 日本小児腎臓病学会雑誌 11: 79-83, 1998.
- 9) 塚原宏一: 一酸化窒素 (NO) と腎臓: 個人的考察. 日本小児腎臓病学会雑誌 19: 96-103, 2006.

Evaluation of oxidative stress status in patients with congenital kidney and urinary tract anomalies by using reference values obtained in our institution

*¹Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

*²Department of Pediatrics, Chiba Children's Hospital

*³Department of Research and Development, Mitsubishi Chemical Medience Corporation

Hirokazu Tsukahara*¹, Masahiro Hiraoka*¹, Yukiko Mori*¹, Naoko Ohta*¹, Shuko Tokuriki*¹, Masao Kawatani*¹, Hironori Nagasaka*², Hisako Kawakami*³, Kyouichi Sekine*³, Mitsufumi Mayumi*¹

Congenital renal and urinary tract anomalies are a major cause of renal impairment in children and young adults. Reactive oxygen species and nitric oxide are important mediators of tissue injury and inflammation. The aim of this study was to examine the oxidative stress status in children with congenital renal and urinary tract anomalies to further understand the pathogenesis of the renal impairment. Early-morning void urine samples were obtained from 46 children aged 1-16 years (32 males and 14 females) with congenital renal and urinary tract anomalies (20 with VUR and 26 with non-VUR (10 with MCDK, 6 with renal aplasia, 5 with UPJ stenosis, 3 with renal hypoplasia, 1 with megaureter, 1 with PKD)). The concentrations of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), acrolein-lysine and nitrite/nitrate relative to creatinine were determined according to the procedures described recently (Tsukahara H. Curr Med Chem 14: 339-351, 2007). Using the reference values reported by us (Tamura S, et al. Free Radic Res 40: 1198-1205, 2006), age-specific SD scores were calculated for each subject. The mean SD scores of 8-OHdG, acrolein-lysine and nitrite/nitrate were -0.21, +0.57 and -0.51 in the VUR group and -0.16, +2.26 and -0.37 in the non-VUR group, respectively. The number of patients having SD scores more than +2.0 was 1 for 8-OHdG, 2 for acrolein-lysine and 1 for nitrite/nitrate in the VUR group. The number of patients having SD scores more than 2.0 was 3 for 8-OHdG, 15 for acrolein-lysine (4 with MCDK, 4 with renal aplasia, 3 with UPJ stenosis, 2 with renal hypoplasia, 1 with megaureter, 1 with PKD) and 0 for nitrite/nitrate. Serum nitrite/nitrate concentrations were not increased in either group. Twenty-two children (6 with VUR and 16 with non-VUR; 15 males and 7 females) were studied sequentially, and the similar results were obtained. Among renal and urinary tract anomalies, renal aplasia/dysplasia/hypoplasia is likely to be associated with the state of increased oxidative stress (especially lipid and protein peroxidation), which can contribute to the progression of renal impairment.

Key words: Congenital kidney and urinary tract anomalies, Oxidative stress, Nitric oxide, Specific urinary biomarkers