

## 猫の腎臓はシスタチンCで見える！ — 猫の慢性腎疾患における血漿シスタチンCの有用性 —

星 史雄<sup>1)</sup>  
Fumio HOSHI

協賛：ニプロ株式会社

慢性腎疾患 (Chronic Kidney Disease: CKD) は、猫の疾病と死亡の原因としてよくみられる重要な疾患である。CKDの顕著な特徴は、機能的ネフロン数が慢性的に減少し、糸球体濾過量 (GFR) が正常な排泄機能を維持できなくなることにある。GFRが低下してくると、やがて、血漿尿素窒素 (BUN) 濃度および血漿クレアチニン (Cre) 濃度が増加し、高窒素血症をもたらす。この時期になって初めてCKDが臨床的に明らかになる。しかし、この時点では既にネフロンが少なくとも70%は失われている。したがって、GFRの低下をより早期に検出する臨床的に簡便に測定できる検査が必要と考えられている。臨床医学では、この血漿Cre濃度の弱点を補う目的で血漿Cystatin C (CysC) 濃度が測定されるようになって来ている。

### シスタチンC

CysCは分子量13.4kDa、等電点9.3の低分子蛋白で約120個のアミノ酸から成り、cysteine proteinase inhibitorのシスタチン・スーパーファミリーのファミリー2に属する蛋白質である。1961年に正常な脳脊髄液や腎不全患者の尿から初めて分離された。CysCは炎症や創傷の際、組織の破壊に伴って血液や体液中に遊離されるcysteine proteinaseを阻害し、酵素による組織の障害を抑制する物質である。

CysCをコードする遺伝子はハウスキーピングタイプであるため、細胞内外の環境変化を受けず全身の有核細胞から一定の割合で産生、分泌され、筋肉量や性差、年齢による影響が少ない。また、CysCは、一定の割合で産生され、分子量が小さく、生理的な条件下では陽性にチャージされているため、腎

糸球体基底膜を容易に通過し、その99%以上が近位尿細管で再吸収され、細胞内リソゾームでアミノ酸まで分解されたため、正常ではほとんど尿中に排出されない。さらに、CysCは腎前性の影響を受けず、その血中濃度は、糸球体濾過値に依存しており、血清Cre濃度と比較して、腎障害の早期から変化が認められるため、早期腎障害診断のバイオマーカーとして注目されている。

### 血清シスタチンC濃度と糸球体濾過量

臨床医学では、1985年に Simonsenらによって初めて血清CysC濃度と糸球体濾過量との関連性が報告された。 $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -m)などの低分子量の蛋白は、糸球体で濾過された後、尿細管で再吸収され分解されるか、尿中に排泄される。このため低分子蛋白の血液中濃度は糸球体濾過量を表す指標となり、尿中濃度は尿細管機能の指標となる。CysCは、 $\beta_2$ -mとほぼ同等の分子量であるため、その血液中濃度は糸球体濾過量との関連性が検討された。Simonsenらは腎障害患者を対象に、血液中CysC、 $\beta_2$ -m、Cre、およびretinol binding protein (RBP) 濃度を測定し、<sup>51</sup>Cr-EDTA法により測定した糸球体濾過量と比較した。それぞれの蛋白の糸球体濾過量との相関係数は、それぞれCysCで0.75、 $\beta_2$ -mで0.70、Creで0.73、およびRBPで0.39であり、CysCが最も良好であった。

### 急性腎不全と血清シスタチンC濃度

Herget-Rosenthalらは、急性腎不全を発症した患者を対象として、血清CysC濃度の有用性を検討した結果、急性腎不全を発症した患者の血清CysC濃度は、血清Cre濃度よりも早く増加が認められ、

<sup>1)</sup> 北里大学獣医学部小動物第2内科：〒034-8628 青森県十和田市東二十三番町35-1

特に前値の50%以上増加した期間は、Creと比較して1.5日早かった。

### 年齢における血清シスタチン濃度の変動

Fliserらは、老人における血清CysC濃度の有用性を検討した。平均年齢25歳の人、平均年齢67歳の人でイヌリン・クリアランスによる糸球体濾過量の指標として、血清Cre濃度および血清CysC濃度の測定を行った。糸球体濾過量は25歳で119ml/min/1.73m<sup>2</sup>、67歳は104ml/min/1.73m<sup>2</sup>であり、67歳で有意に低値であった。しかし、血清Cre濃度は両群間で差を認めなかった(25歳0.93±0.11mg/dlに対して、67歳0.93±0.10mg/dl)。一方、血清CysC濃度は、25歳が0.69±0.08mg/lであったのに比べて、67歳で0.84±0.10mg/lと有意に高値であった。

### 臨床獣医学領域でのシスタチンC

このように、血液中CysC濃度は、臨床医学分野において多方面から研究され、種々の変動要因が明らかになって来ているが、その主体は糸球体濾過量を示すマーカーとして臨床応用されていることに変わりはない。一方、臨床獣医学領域でも、2002年Almyらは、イヌにおいて抗ヒトCysC抗体を用いて血漿CysC濃度が測定することに成功し、血漿Cre濃度が増加してくる以前に糸球体濾過量の低下が検出できることを報告している。その後も、イヌの血漿CysC濃度は、健常犬に比べ腎疾患罹患犬で高い値を示したとの報告など、イヌの血漿CysC濃度の測定の報告はいくつか散見される。しかし、抗ヒトCysC抗体で、ネコ血漿CysC濃度の測定は試みられているが、測定できるとしている報告は一つもない。

### ネコのシスタチンC

もし、ネコのCysC (FeCysC) の血液および尿中濃度の簡便な測定が可能となれば、現在用いられているBUNやCreなどの指標に比べ、より早期に腎機能障害を診断でき、より早く治療を開始できることになると考えられる。そこで我々は、ネコの血漿中CysC測定をより簡便に行えるようにするためにサンドイッチ法によるEIA (Enzyme Immuno Assay) キットを開発し、臨床的意義を問うことを目的として検討を始めた。しかし、FeCysCに関しては、蛋白質はおろか、遺伝子の情報すらみあたらない。

### ネコシスタチンCの実験モデルでの臨床的意義検討

診断的意義を検討するため、実験的にネコにゲンタマイシン (GM) を投与し、腎傷害ネコを作成し、血漿ならびに尿中CysCを測定した。臨床的に健康な成ネコ (年齢8~12歳) にGMを15mg/kg、bidの投与量で20日間筋肉内投与した群 (GM群) と生理食塩水を等量筋肉内投与し対照群 (Cont群) との成績を比較した。分析項目は、クレアチニン・クリアランス (Ccr)、血漿クレアチニン濃度 (Cre)、血漿CysC濃度 (PCysC)、尿蛋白クレアチニン比 (UPC)、尿中微量アルブミンクレアチニン比 (APC) とした。この測定値の絶対値に関しては、最終的なキット使用による測定と測定方法も異なるため、参考値として考えて、その変化のみをみて頂きたい。

GM群の内因性Ccrの変動から試験期間を経るにつれて腎機能が低下していることがわかる。また、試験期間を通してCont群のCreおよびPCysCに大きな変化は認められなかった。一方GM群のCreは投与前値に比べ投与11日目に117.7%、20日目に215.5%に上昇したのに対し、PCysCは投与5日目には169.5%、20日目には355.5%まで上昇した。したがってPCysCはCreに比べより早期に大きい幅で変動することが明らかになった。

UPCもAPCも初期に一過性増加をみた後、後半で徐々に上昇する傾向があり、UPCでは後期のみ有意な変動が認められた。

### ネコシスタチンCの測定キットの作成

上記の結果から、ネコのPCysCは糸球体濾過量、CysC-indexは尿細管組織傷害時および尿細管機能障害時の早期マーカーとして臨床的に使用可能であることが示唆された。そこで、我々は、このCysC測定をより簡便な方法で臨床的に利用可能な測定法とするため、ニプロ株式会社と共同して、キットの開発を行った。使用するモノクローナル抗体は、そのままし、2次抗体を酵素切断し、Fab'まで分解し、マレミド法を用いてHorseradish peroxidase (HRP) を直接標識することにより、反応ステップを減らし、約48時間必要であった反応時間を約2時間半程度まで短縮することに成功した。

### ネコシスタチンCの測定キットによる精度検定

この試作キットを用いて同時再現性試験、添加回収試験、希釈直線性試験を行った。同時再現性試験

では、濃度の高低に関わらず、変動係数が5%以下となり優秀な成績であった。添加回収試験では、低濃度でも高濃度でも0.001~1mg/lの添加濃度の範囲で概ね良好な回収率を認めた。また、血漿検体の希釈直線性についても良好な結果となった。

#### ネコシスタチンCの測定キットによる正常参照値設定と臨床的意義の検討

そこで、臨床症状および腎臓のスクリーニング検査で異常がない健常群（健常ネコ108匹）を用いてCysCの正常参照値を決定した。その結果、血漿CysC濃度（PCysC）は $3.36 \pm 1.85$ mg/lとなった。

臨床例において、血漿Cre濃度によりIRISのCKD stage criteriaに従って分類した慢性腎疾患ネコ58頭（Stage1：11頭、Stage2：32頭、Stage3：15頭）を用いて、測定キットにより、血漿CysC濃度の測定を行った。

血漿CysC濃度の分布は、CKD群の平均値が、健常群に比べて有意に高値を示し、各stage間も有意な変動を認めた。血漿Cre濃度もまた、健常群に比べてCKD群で有意に高値を示した。このことにより、臨床的にも実験例でみられたような、同等の変化が認められた。これらの結果より、血漿CysC濃度は、CKDの診断に有用であることがわかった。