

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 177125

(P2003 - 177125A)

(43)公開日 平成15年6月27日(2003.6.27)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	T 2 G 0 4 5
33/493		33/493	A
33/53		33/53	D
33/70		33/70	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 13数)

(21)出願番号 特願2002 - 169528(P2002 - 169528)

(22)出願日 平成14年6月11日(2002.6.11)

(31)優先権主張番号 特願2001 - 306445(P2001 - 306445)

(32)優先日 平成13年10月2日(2001.10.2)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000141875
株式会社いかがく
京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地

(72)発明者 内田 壱夫
京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地
株式会社いかがく内

(74)代理人 100085316
弁理士 福島 三雄 (外2名)

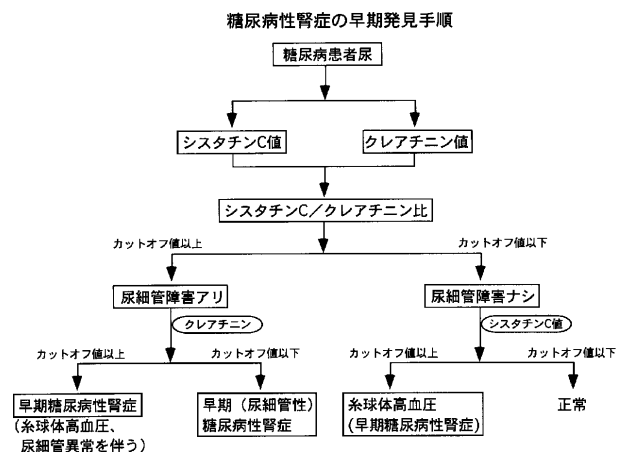
Fターム(参考) 2G045 AA16 AA25 CB03 DA30 DA36
DA42 DA77 FB01 FB03 FB15
JA01

(54)【発明の名称】 腎疾患の診断用キット

(57)【要約】

【課題】 糸球体高血圧と尿細管間質障害のどちらが先行しても、糖尿病性腎症を早期に診断するための診断用キット、および糸球体病変に続発する尿細管間質障害や原発性尿細管間質障害の有無を早期に診断するための診断用キットを提供する。

【解決手段】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度(UCCR)を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、上記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 尿中に排泄されたシスタチンC濃度、及び/又は、内因性もしくは外因性クリアランス物質濃度を測定することにより、腎疾患を診断するようにしたことを特徴とする診断キット。

【請求項2】 シスタチンC濃度測定値そのもの、もしくはシスタチンC濃度とクリアランス物質濃度との比を算出し、これらを用いて腎疾患を診断するようにした請求項1に記載の診断キット。

【請求項3】 測定対象となる前記クリアランス物質は、クレアチニン、イヌリン、もしくはチオ硫酸ナトリウムの何れか一以上である請求項1又は2に記載の診断キット。

【請求項4】 前記クリアランス物質は、クレアチニンである請求項1又は2に記載の診断キット。

【請求項5】 シスタチンC濃度の測定には酵素免疫法やラテックス凝集反応、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用い、クリアランス物質濃度測定には、化学法若しくは酵素法を用いることを特徴とする請求項1から請求項4の何れかに記載の腎疾患を診断する診断用

キット。
【請求項6】 少なくとも抗ヒトシスタチンC抗体および、化学法もしくは酵素法によるクレアチニン濃度測定用の試薬を備え、尿中シスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定して、腎疾患を診断することを特徴とする診断用キット。

【請求項7】 多数例の健常者随時尿を用いて尿中シスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定し、これらの測定値から算出したシスタチンC濃度のカットオフ値、およびシスタチンC濃度とクレアチニン濃度比のカットオフ値を用いることを特徴とする腎疾患を診断する診断用キット。

【請求項8】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度(UCCR)を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、

前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用

キット。
【請求項9】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度(UCCR)を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、

次いで前記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるシスタチンC濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められなかった前記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために

*用いられる診断用キットであって、前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【請求項10】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度(UCCR)を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、

次いで前記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められた前記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、

前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、腎疾患の診断用キットに関し、特に糖尿病患者における尿中のシスタチンCおよびクレアチニンを測定対象として、該項目を複合測定することにより、糸球体病変(糸球体高血圧状態)と尿細管間質障害の有無を確実に診断するためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】腎疾患は、病変部位の主座により糸球体性と間質尿細管性に分類される。従来、各種の糸球体性病変は持続性蛋白尿(試験紙法で陽性あるいは500mg/日以上)の蛋白尿が持続)が出現した時点で診断されていた。

【0003】近年、尿中に微量に排泄される種々の蛋白の測定が可能となり、特に尿中アルブミンやトランスフェリン非排泄量の増加、すなわち微量アルブミンやトランスフェリン尿が持続性蛋白尿に先行することが明らかとなった。そこで、微量アルブミンやトランスフェリン尿の出現をもって腎症を診断することが一般化している。また、最近では、例えば糖尿病性腎症の病期分類として、第1期(腎症前期)、第2期(早期腎症)、第3期(顕性腎症期)、第4期(腎不全期)、第5期(透析療法期)が一般的となり、この分類に従えば微量アルブミンやトランスフェリン尿を呈する時期は早期腎症期に分類される。

【0004】しかし、病理学的には、この早期腎症期には既に軽度から中等度のびらん性病変が存在し、結節性病変の存在も知られている。従って、必ずしも初期腎症とは限らず、あくまで現在の臨床検査で診断可能な時期と解されている。このため、微量アルブミンやトランスフェリン尿より早期(第1期のステージ)に生ずる異常を検出し得る検査法の開発が期待されている。

【0005】そこで、本発明者は、糖尿病性腎症をはじめ他の糸球体腎炎において、糸球体に白血球（特に好中球や単球/マクロファージ）が浸潤することが蛋白尿発現の出発点になることを発見し、糸球体に好中球が浸潤したことを察知する方法として、尿中ラクトフェリンとミエロペルオキシダーゼを測定する技術を既に出願している（特開平9-72906号公報）。さらなる研究の結果、本発明者は、糸球体への好中球の浸潤を検知することが糸球体腎炎の早期診断に有用であることも見出して、既に出願している（特開平9-274036号公報）。

【0006】この方法は尿中のラクトフェリンとミエロペルオキシダーゼを同時に測定し、その差（Lf-MPO）を糸球体由来ラクトフェリンとして求め、これを腎症の早期診断指標とする方法であるが、この方法の問題点として、2成分を同時に測定する必要があることに加え、特に尿中のラクトフェリン値が、腎症以外の要因によって影響を受けることが挙げられる。即ち、男子では精漿中にラクトフェリンが高濃度存在することから、生殖年齢層（小学5年生以上）では、尿中に精液が混入した場合に偽陽性を呈することが明らかとなった。

【0007】そこで、本発明者は、糸球体に炎症細胞（好中球、単球/マクロファージ）が浸潤したことの察知、および腎症の早期診断に有用な方法としての尿中ラクトフェリンとミエロペルオキシダーゼを測定することと同様な意味を持つ関連事象を見出し、尿中シスタチンC濃度を測定する方法を開発し、出願している（特開平11-64333号公報）。その後の研究によれば、糸球体に好中球やマクロファージなどが浸潤する現象の上流に腎機能障害進展の重要な要因として、糸球体高血圧があることが分かった。

【0008】続いて糸球体血圧について説明する。糸球体の最も重要な機能は濾過機能であり、1分間に約100ml、1日では約14Lの血液が濾過されている。この糸球体濾過には圧力が必要であり、糸球体毛細管には約50mmHgの静水圧が作用している。この糸球体内圧を糸球体血圧と称し、その上昇を糸球体高血圧と呼んでいる。糸球体血圧は、全身血圧ならびに輸入細動脈抵抗と輸出細動脈抵抗の比で調節されており、この構造により他の毛細血管に比べ高い圧が保たれ、糸球体における血液の大量の濾過を可能にしている。糸球体高血圧は、糸球体濾過量（GFR）の上昇、即ち、腎機能の亢進状態を示すものである。

【0009】次に、糸球体高血圧の原因について説明する。糖尿病では腎の最も初期の変化として、GFRの上昇（糸球体過剰濾過）が認められ、その一因が糸球体高血圧であるとされている。糖尿病においては輸入細動脈の拡張が糸球体高血圧の主因子で、その拡張因子としては、同血管を構成する平滑筋細胞自体の収縮障害や血管拡張物質の増加などが考えられている。血管拡張物質の候補として、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、

一酸化窒素（NO）、血管拡張性プロスタグランジンなどが挙げられている。糸球体高血圧は他に糸球体腎炎などにおいても、糸球体の一部分の病変の進行に伴って残存糸球体の内圧が上昇する場合にも認められる。

【0010】次に、糸球体高血圧と腎障害の関係について説明する。持続する糸球体血圧の上昇は、糸球体内皮細胞障害を惹起し、血小板・マクロファージの浸潤をきたす。浸潤したこれらの細胞から種々の増殖因子が放出され、これらの増殖因子はメサンギウム細胞に作用して細胞外基質の増加をもたらす、糸球体硬化へと進展する。これは糸球体高血圧仮説と呼ばれ（Hostetter THら、AM J Med 72: 375-380, 1982）、糸球体高血圧が進行性の糸球体硬化症や腎不全への進展の危険因子であることを示している。そこで、糸球体高血圧に対する対策としては、全身血圧とともに糸球体血圧も低下させる必要があり、そのためには輸入細動脈とともに輸出細動脈をも拡張するような降圧薬（アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン2受容体拮抗薬、長時間作用型のCa拮抗薬）が有効とされている。

【0011】次に、糸球体血圧の測定法について説明する。実験動物では糸球体血圧をmicropuncture法で測定することが可能である。ヒトではこの方法が用いられないため、糸球体血圧を直接測定できない。しかし、Kimuraらによって、圧利尿曲線、血清蛋白濃度、腎クリアランス試験（GFR、RPFの測定）などを組み合わせて、糸球体血圧、輸入・輸出細動脈血管抵抗を計算する方法が考案された（Kimura, G.らCirculation Reserch 69: 421-428, 1991）。

【0012】前述の背景から、糖尿病性腎症をはじめとする腎疾患の早期診断や、降圧薬投与時の薬効をモニターする方法として、糸球体血圧の測定は重要であると考えられる。しかし、現在、臨床検査法として糸球体血圧の概算を知るには、内因性クレアチンクリアランスでGFRを求めるか、あるいはアルブミンを主とする微量蛋白の尿中への排泄量から推測する方法によっている。しかし、本発明者は、シスタチンC（分子量13,359kDa、等電点9.3を示す低分子蛋白で、血中濃度は約700μg/Lである。このうち99%近くが糸球体で濾過され、そのほとんどが尿細管で再吸収される。）の尿中排泄動態が、糸球体からは自由に濾過され、尿細管で再吸収されずに尿中へ排泄されるクレアチニンと良好な関係性を示すことを発見し、シスタチンCの尿中濃度は検出可能量であることを確かめ、腎症、腎炎の早期診断法として既に出願した（特開平11-64333号公報）。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、腎疾患のうち1つの主要病変部位としての尿細管・間質の病変を早期にかつ確実に診断する方法の確立が重要であることが最近分かってきた。糖尿病における尿細管異常の存在についてはAlmani-Ebsteinの報告以来知られている。

その後、インスリンの尿細管再吸収機構に対する作用 (Saudek, C.D.ら. Diabetes 23:240-246, 19749, DeFronzo, R.A.ら. J.Clin. Invest 55: 845-854, 1975) や糖尿病における尿細管基底膜の化学分析 (佐藤徳太郎、糖尿病 8: 303, 1975) の研究の進行とともに尿細管に対する関心が高まってきた。また、糖尿病における尿細管機能異常の原因としては、尿細管上皮細胞レベルでの代謝異常あるいは血管障害などが考えられている。

【0014】従来から、尿細管障害時にみられる尿細管性蛋白尿の指標として、2-マイクログロブリン、リゾチーム、Free right chain, Retinol binding protein, 1-マイクログロブリンが用いられてきた。また、尿中には種々の酵素が存在し、一部の酵素は尿細管に由来する。そのため、尿細管障害でこれらの尿中酵素活性は増加し、尿細管障害の指標になっている。尿細管由来の酵素は二つに大別される。第一は、近位尿細管上皮細胞や糸球体上皮細胞のlysosome中に存在する酵素で、N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) である。第二は、近位尿細管の刷篩縁に存在する酵素で、alkaline phosphatase (ALP)、alanine aminopeptidase (AAP) 等である (海津嘉蔵, 日本医事新報 NO, 3537, 139, 1992)。その後、糖尿病患者群における尿細管異常に関して、尿蛋白陰性患者でも尿中酵素活性の上昇が認められ (海津嘉蔵, 日本医事新報 NO, 3537, 139, 1992)、また、尿中低分子蛋白である2-マイクログロブリンの尿中への排泄増加例も認められている (吉川隆一, 他. 糖尿病 22:621-629, 1979)。この様に糖尿病患者において糸球体障害の有無とは関係なく尿細管機能異常が存在することが分かってきた。

【0015】したがって、糖尿病性腎症の早期診断には糸球体病変 (最初の徴候である糸球体高血圧状態) を検知するとともに尿細管障害の有無も合わせて調べる必要がでてきた。その一方で、糖尿病性腎症を含めた全ての腎疾患において、尿細管間質病変は進行性腎疾患に認められる共通の変化であり、尿細管間質病変の程度は糸球体病変の程度よりも腎機能によく相関することも分かってきた。即ち、原発性の間質性腎炎だけではなく糸球体疾患や血管障害においても糸球体透過性の亢進や虚血から尿細管障害をきたし、障害を受けた尿細管上皮細胞から産生される因子により間質に炎症細胞浸潤、間質線維化や尿細管萎縮といった尿細管間質病変が形成されることが分かってきた (山崎康司, 医学のあゆみ 190: 62-67, 1999)。糸球体病変に伴う尿細管間質障害の原因として、臨床的に特に重要な因子として尿蛋白が挙げられている。尿蛋白は、蛋白尿を伴う尿細管間質障害の原因として、腎不全進行のmediatorとなることが分かってきた。その他の尿細管間質障害を進展させる要因として、感染症、免疫学的因子、薬剤、重金属、尿路閉塞、逆流、虚血などが関与することが分かってきた (遠藤守人ほか, Mebio 18: 55-60, 2001)。

【0016】現在、尿細管機能を評価する検査法としては、上述の尿中低分子蛋白や尿中の尿細管由来酵素の測定が日常多用されている。しかし、これらの検査法の疾患検出感度は十分でなく、糖尿病性腎症の早期診断においては、他に血糖値やHbA1cや、尿中アルブミンを同時に測定し、かつ経過を注意深く観察する必要性が認められている (木村敬子 ほか, 糖尿病 29: 995-1000, 1986)。一方、糸球体病変に伴う尿細管間質障害の早期診断においても、上述の尿中低分子蛋白、尿中酵素の測定による検査法の評価は切れ味が良いとは言えない。

【0017】本発明はこれらの問題点に着目してなされたものであって、従来の方法に代わる新規な検査法によって腎疾患の確実な診断用キットを提供すること、とりわけ、糸球体高血圧と尿細管間質障害のどちらが先行しても、糖尿病性腎症を早期に診断するための診断用キット、および糸球体病変に続発する尿細管間質障害や原発性尿細管間質障害を早期に診断するための診断用キットを提供することを目的とする。

【0018】【課題を解決するための手段】本発明の診断用キットは、尿中に排泄されたシスタチンC濃度、及び/又は、内因性もしくは外因性クリアランス物質濃度を測定することにより、腎疾患を診断するようにしたことを特徴とする。すなわち、本発明によれば、尿中に排泄されたシスタチンC濃度、及び/又は、内因性もしくは外因性クリアランス物質濃度を測定することにより、腎疾患の有無をスクリーニングできる。更に好ましくは、尿中に排泄されたシスタチンC濃度、及び内因性もしくは外因性クリアランス物質濃度を測定することにより、腎疾患の有無をスクリーニングできる。また、本発明の診断用キットは、シスタチンC濃度測定値そのもの、もしくはシスタチンC濃度とクリアランス物質濃度との比を算出し、これらを用いて腎疾患をスクリーニングするようにしたことを特徴とする。

【0019】また、測定対象となる上記クリアランス物質は、クレアチニン、イヌリン、もしくはチオ硫酸ナトリウムの何れか一以上であることが好ましく、クレアチニンであることが更に好ましい。また、上記のシスタチンC濃度の測定には酵素免疫法やラテックス凝集反応、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用い、クリアランス物質濃度測定には、化学法若しくは酵素法を用いることが好ましい。

【0020】また、本発明の診断用キットは、少なくとも抗ヒトシスタチンC抗体および、化学法もしくは酵素法によるクレアチニン濃度測定用の試薬を備え、尿中シスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定して、腎疾患を診断することを特徴とするものである。また、本発明の診断用キットは、多数例の健常者随時尿を用いて尿中シスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定し、これらの測定値から算出したシスタチンC濃度の力

ットオフ値、およびシスタチンC濃度とクレアチニン濃度比のカットオフ値を用いることを特徴とする。

【0021】また、本発明の診断用キットは、多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度(UCCR)を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、上記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備えることを特徴とする。

【0022】また、本発明の診断用キットは、多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度(UCCR)を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、次いで上記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるシスタチンC濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められなかった上記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、上記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備えることを特徴とする。

【0023】また、本発明の診断用キットは、多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度(UCCR)を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、次いで上記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められた前記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、上記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備えることを特徴とする。

【0024】本発明は、本発明者がシスタチンCの尿中への排泄動態を注意深く観察した結果、尿蛋白の陰性、陽性にかかわらず、尿中シスタチンC濃度がクリアランス物質であるクレアチニンと良好な相関性を保持して尿中に排泄される事実を発見したことに基づいて完成されたものである。

【0025】次に、この新規発見現象と腎疾患の診断法との関連性について説明する。シスタチンCは分子量約13,000の低分子蛋白であり、等電点が9.3と尿中に存在する蛋白のうち最強陽性荷電を呈する蛋白である。また、シスタチンCをコードする遺伝子およびそのプロモーターなどはhousekeeping型であり、細胞内外での環境変化に影響を受けずに、常に一定の割合で全身の有核細胞から産生分泌されている。したがって、乳幼児から成人まで、血清中濃度が腎前性の影響を受けずに一定であること、血清中で他の成分との複合体形成がなく遊離型

であること、などGFRのマーカーとしての物性に適している。

【0026】本発明は、この塩基性低分子蛋白であるシスタチンCと尿細管で非吸収である内因性のGFRのマーカーであるクレアチニンが、尿細管間質機能が正常である状態下では、尿蛋白の存在、非存在にかかわらず、良好な相関性を保って排泄される事実の発見に着目してなされた。図1は、尿中蛋白陰性者および陽性者群における尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度の相関性を示したものである。強塩基性低分子蛋白であるシスタチンCが尿中蛋白の存在、非存在にかかわらず、尿細管で非吸収のクレアチニンと良好な相関性を保持して排泄されるのは、シスタチンCが強塩基性であるが由に近位尿細管での蛋白再吸収機構、即ちエンドサイトーシス-リソソームの酸化-蛋白分解システムに最優先で処理されるためであると考えている。したがって、シスタチンCは、現在尿細管機能の評価法として測定されている1-マイクログロブリンや、2-マイクログロブリンと比べて尿細管性蛋白尿の発現を最も鋭敏に反映できる物性を有している。

【0027】以上のことから、尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度から腎疾患を診断する方法について説明する。まず、多数例の健常者(尿蛋白陰性、尿路感染症を認めない)の随時尿中のシスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定し、各検体のシスタチンC濃度/クレアチニン濃度比(以下、必要に応じて「シスタチンC/クレアチニン比」または「UCCR」という)を求め、次いでこのデータを用いて健常者尿におけるシスタチンC/クレアチニン比のカットオフ値を求める。このシスタチンC/クレアチニン比は、糖尿病患者について尿細管障害の有無を診断するための指標である。さらに健常者尿中のシスタチンC濃度とクレアチニン濃度についてもそれぞれカットオフ値を算出する。このシスタチンC値は、尿細管障害の認められない糖尿病患者について、糸球体高血圧の有無を診断するための指標である。また、クレアチニン値は、尿細管障害が認められる糖尿病患者について、糸球体高血圧を診断するための指標である。上記のいずれの指標についても、被検者から得られた指標値が、多数例の健常者から求められたカットオフ値以上の値を示すときは、その指標が示す症状を呈するものと診断される。

【0028】本発明では、この三つのカットオフ値を適宜組み合わせる腎疾患の診断を行なう。図2は、糖尿病性腎症の早期診断手順を示したものである。まず、ある糖尿病患者の尿中のシスタチンC濃度とクレアチニン濃度を測定し、シスタチンC/クレアチニン比を算出する。シスタチンC/クレアチニン比がカットオフ値以上の値を示すとき、尿細管異常を有するものと診断される。次に、このこの尿細管異常が認められた糖尿病患者について、クレアチニン値がカットオフ値以上の値を示

すとき、尿細管異常に加えて糸球体高血圧も呈するものと診断される。一方、クレアチニン値がカットオフ値以下の値を示すときは、糸球体高血圧を呈さず、尿細管異常を有する糖尿病性腎症と診断される。続いて、シスタチンC /クレアチニン比がカットオフ値以下の値を示す、尿細管異常が認められなかった糖尿病患者について、シスタチンC値がカットオフ値以上の値を示すとき、糸球体高血圧を呈する糖尿病性腎症と診断される。一方、シスタチンC値がカットオフ値以下の値を示すときは、腎症を伴わないものと診断される。以上のごとく、尿中のシスタチンCとクレアチニンを測定することにより、糖尿病患者について、腎疾患の糸球体性および尿細管性障害の診断ができる。

【0029】

【発明の実施の形態】(A) ELISAによる尿中シスタチンCの測定

尿中シスタチンC値の測定は、96wellのマイクロプレート(Nunc-Immuno Plate:Poly Sorp)を用いたEnzyme linked-immunosorbent assay (ELISA)で行った。固相に用いたウサギポリクローナル抗ヒトシスタチンC抗体(DAKO)はpH8.4、0.05mol/lのトリス塩酸緩衝液を用いて5μg/mlの濃度に希釈し、100μlずつマイクロプレートの各wellに分注して4で24時間反応させて吸着させた。測定時には脱イオン水で余剰の抗体を洗浄し、ブロッキング剤として、各wellに100μlの1%Bovine serum albumin (BSA) (Bayer)、および0.3mol/lリン酸水素二ナトリウムを含むTris緩衝液(0.1mol/l、pH8.0)を分注した(1well当たり1.05μgの抗ヒトシスタチンC抗体を含む)。

【0030】次いで、50μlの尿試料を加えて混和し、37で1時間反応させた後、Tween20を0.05%含む脱イオン水で3回洗浄した。その後、アルカリホスファターゼ標識抗ヒトシスタチンC抗体溶液(1%BSAを含むトリス緩衝液)を各wellに100μlずつ加えて混和した後、37で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄した。

【0031】さらに、Kind-King法の基質緩衝液(ミズホメディー)100μlを各wellに加え、37で30分間反応させた。

【0032】次いで、100μlの呈色液(ミズホメディー)を各wellに加えて呈色させた後、マイクロプレート用比色計(三光純薬)を用いて510/630nmの波長で比色し、同時に測定したシスタチンC標準液(Human Recombinant Cystatin C Calibrator, DAKO)の検量線から尿中のシスタチンC濃度を算出した。

【0033】(B) Jaffe法による尿中クレアチニンの測定

尿中クレアチニンは、クレアチニンがアルカリ溶液中でピクリン酸と反応して橙赤色の縮合物を生じさせるJaffe反応を利用して測定した。脱イオン水で21倍希釈し

た尿50μlに200μlの除蛋白試薬(タングステン酸ナトリウムリン酸を含有)を加えて攪拌し、室温で10分間放置し、遠沈後(2,500r.p.m, 10分間)上清を分離した。この上清100μlに2.2mmol/lピクリン酸試液を50μl、0.75N水酸化ナトリウム溶液を50μl加え、25で20分間放置後、マイクロプレート用比色計(三光純薬)を用いて510nmの波長で比色し、同時に測定したクレアチニン標準液の検量線から尿中のクレアチニン濃度を算出した。

【0034】(C) 健常者によるシスタチンC濃度およびシスタチンC /クレアチニン比のカットオフ値の設定例

図3Aに550例の健常者尿を用いた尿中シスタチンC濃度のカットオフ値設定例を示す。また、図3Bに尿中シスタチンC /クレアチニン比のカットオフ値算出例を示す。

【0035】(D) 蛋白尿、尿路感染症のケースにおけるシスタチンC /クレアチニン比の変化

尿細管間質病変の形成に積極的に関与している尿蛋白、感染(尿路感染症での実際例を示す)因子によるシスタチンC /クレアチニン比の変化を図4に示す。いずれの因子も尿細管間質障害に関与し、病変の進展とともにシスタチンC /クレアチニン比はコントロール群(健常者)に比べて相対的に高値を示した。図5に持続性蛋白尿を呈するネフローゼ患者および尿細管間質炎患者におけるシスタチンC /クレアチニン比の推移の実際例を示す。

【0036】(E) 尿路感染症に伴う尿細管間質病変の検出感度比較

尿細管間質病変を検知するマーカーとして従来から多用されている2-マイクログロブリン、 β -GTPと本発明者らが発見したシスタチンCについて、尿路感染症に伴う尿細管間質病変の検出感度を比較した結果、図6に示したように、シスタチンCが2-マイクログロブリン、 β -GTPに比べ疾患検出感度に優れていることが確認された。

【0037】(F) 健常者(尿中蛋白、白血球、細菌はそれぞれ正常)によるシスタチンC濃度、クレアチニン濃度、シスタチンC /クレアチニン比のカットオフ値の設定例

図7は、糸球体機能、尿細管機能が正常とみなされた健常者尿335例を用いてシスタチンC濃度、クレアチニン濃度、シスタチンC /クレアチニン比(UCCR)のカットオフ値算出例を示したものである。図7Aは、健常者群の尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度の関係を示したものである。図7Bは、健常者群の尿中シスタチンC /クレアチニン比の分布とカットオフ値を示したものである。図7Bによれば、カットオフ値は0.70と算出される。また、図7Cは、健常者群の尿中シスタチンC濃度の分布とカットオフ値を示したものであり、図7

Cによれば、カットオフ値は100.5と算出される。図7Dは、健常者群の尿中クレアチニン濃度の分布とカットオフ値を示したものであり、図7Dによれば、カットオフ値は194.3と算出される。

【0038】(G)糖尿病患者を対象とした糖尿病性腎症の早期診断例

糖尿病と診断された患者尿296例を用いて、糖尿病性腎症の早期発見の実施例を示す。

糖尿病患者尿296例について尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度を測定した。

各人のシスタチンC/クレアチニン比(UCCR)を算出した。

図2の糖尿病性腎症の早期発見手順に従って診断を行なった。

まず、先の健常者群で求めたシスタチンC/クレアチニン比(UCCR)のカットオフ値(0.70)を基準値として、糖尿病患者の個人のUCCR値によって、尿細管間質障害の有無を判定した。図8Aの如く、184例はUCCR値が0.70以下であり、尿細管間質障害はないと判定された。次に、この184例を対象として、糸球体高血圧の所見があるか否かを、健常者群から求めたシスタチンC濃度のカットオフ値(100.5)を基準値として判定した。図9Aから184例中3例が糸球体高血と判定された。181例は未だに腎症を発症していないと判定された。

続いて、尿細管間質障害ありと判定された112例(図8B)について、糸球体高血圧を呈するか否かの判定を行なった。この判定は、図7Dの健常者群から求めたクレアチニン濃度のカットオフ値(194.3)を基準値として行なった。この結果、図9Bのごとく112例中8例が糸球体高血圧を併発していると判定された。

以上の判定結果をまとめると、糖尿病性腎症の早期発見手順に従えば、糖尿病患者296例中、181例が腎症に至っておらず、3例が糸球体高血圧状態に該当し、104例が尿細管間質障害に該当し、8例が糸球体高血圧と尿細管間質障害を併発していると判定された。

【0039】(E)膿尿を呈する糖尿病患者を対象とした、糖尿病性腎症の早期診断における従来法(2-マイクログロブリン測定法)の問題点

尿路感染症を合併した100症例の糖尿病患者尿を用いて、尿シスタチンC/クレアチニン比と、従来から利用されている2-マイクログロブリン法による早期腎症診断の有用性を比較した。図10に示したように、シスタチンC/クレアチニン比では100症例中36症例(36.0%)に異常を認めしたが、2-マイクログロブリン法では0%と異常者が検出されなかった。また、図11は、同じ症例の尿シスタチンC/クレアチニン比と2-マイクログロブリン/クレアチニン比の分布比較データを示したものである。この比較データから、従来法の2-マイクログロブリンは、尿路感染症患者尿中の主*

*に白血球由来のプロテアーゼで分解されるため、腎障害を検知できないことが分かった。

【0040】(F)糸球体病変に続発する尿細管間質障害の診断実施例

尿蛋白が尿細管間質障害のリスクファクターであることが明らかにされているので、蛋白尿を呈する患者尿217例(蛋白濃度:96.6mg/dl±64.2mg/dl、平均値±標準偏差)を対象に、尿シスタチンC/クレアチニン比のカットオフ値(0.70)以上群と以下群について、尿シスタチンCと尿クレアチニンの相関性を調べた。図12に示したように、カットオフ値以下群の回帰式は健常者群による回帰式に近似したが、カットオフ値以上群では、シスタチンCのみが高値に変化し、回帰式が健常者群のそれと比べて大きく変化した。健常者尿のUCCRと、UCCR>0.70の蛋白尿群との比較は図13のごとくであった。このように、糸球体病変に続発する尿細管間質障害の診断手順を図14に示した。

【0041】

【発明の効果】上記に詳述したように、本発明の腎疾患の診断用キットによれば、特に糖尿病患者における尿中のシスタチンCおよびクレアチニンを測定対象として、該項目を複合測定することにより、糸球体病変と尿細管間質障害の有無を早期に診断することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】蛋白陰性及び陽性群における尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度の相関性を示す図面である。

【図2】糖尿病性腎症の早期発見手順を図示したものである。

【図3】尿中シスタチンC濃度のカットオフ値算出例と、尿中シスタチンC/クレアチニン比のカットオフ値算出例を示す図面である。

【図4】蛋白尿陽性患者及び尿路感染症患者尿におけるシスタチンC/クレアチニン比の実例を示す図面である。

【図5】ネフローゼ症候群、尿細管間質炎患者のシスタチンC/クレアチニン比測定の実例を示す図面である。

【図6】尿路感染症に伴う尿細管間質病変の検出感度比較を示す図面である。

【図7】健常者尿を用いてシスタチンC濃度、クレアチニン濃度、シスタチンC/クレアチニン比(UCCR)のカットオフ値算出例を示したものである。

【図8】UCCRのカットオフ値(0.7)以上群と以下群に分けて、糖尿病患者のシスタチンC濃度とクレアチニン濃度の相関性を示す図面である。

【図9】UCCRのカットオフ値(0.7)以上群と以下群に分けて、糖尿病患者の糸球体性高血圧の有無を診断する図面である。

【図10】尿路感染症を合併した糖尿病患者について、本願発明の方法と従来法の有用性を比較した図面であ

る。

【図11】 尿路感染症を合併した糖尿病患者について、本願発明の方法と従来法の有用性を比較した図面である。

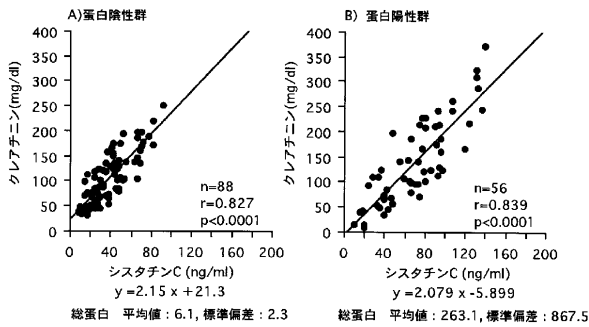
【図12】 蛋白尿を呈する患者における、シスタチンC*

*とクレアチニンの尿中動態を示す図面である。

【図13】 蛋白尿陽性患者群と健常者群（コントロール）についてUCCR値を比較した図面である。

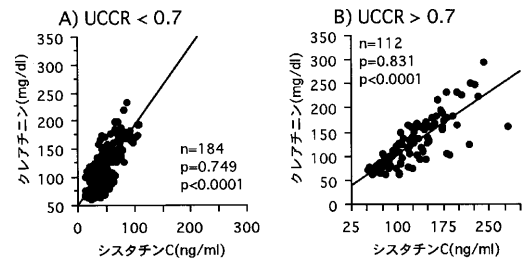
【図14】 糸球体病変に続発する尿管間質障害の診断手順を示す図面である。

【図1】



蛋白陰性および陽性群における尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度の相関性

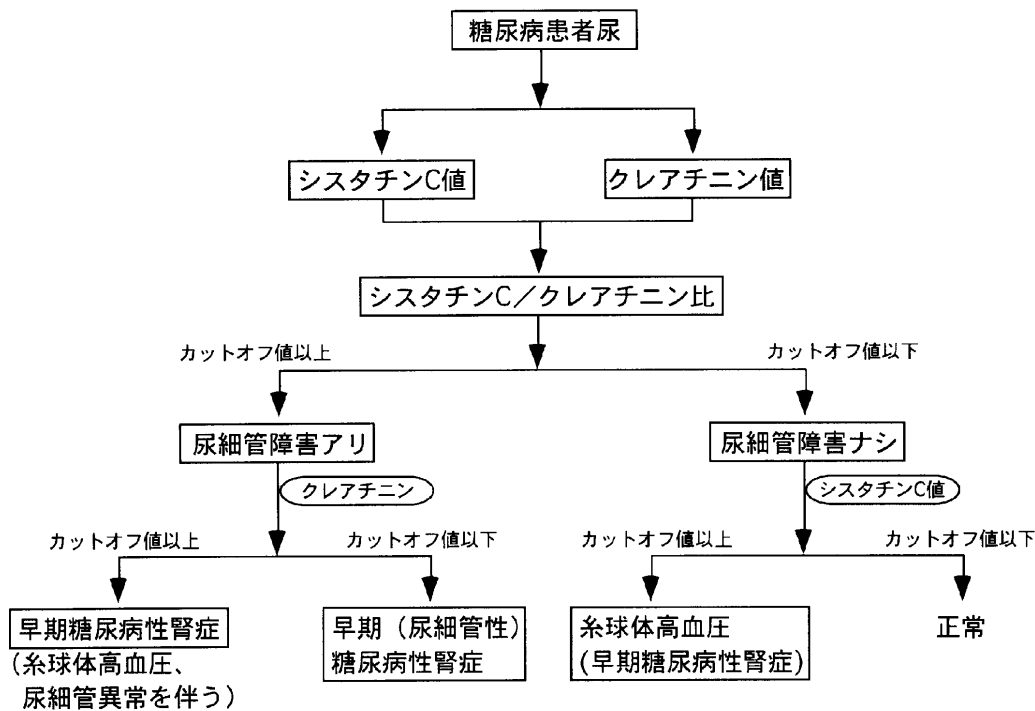
【図8】



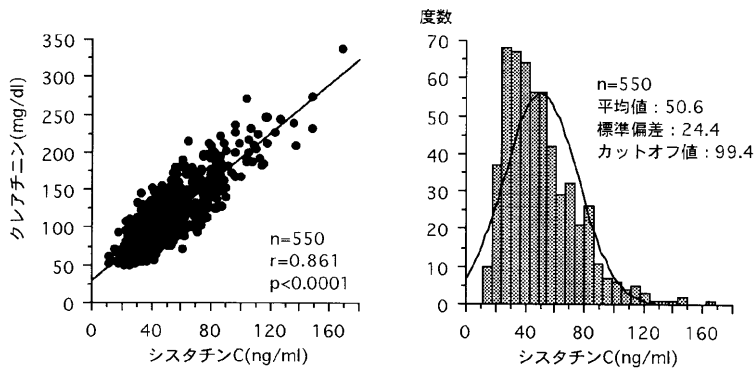
糖尿病性腎症の早期発見手順による実施例その1 (尿管間質障害状態の判定)

【図2】

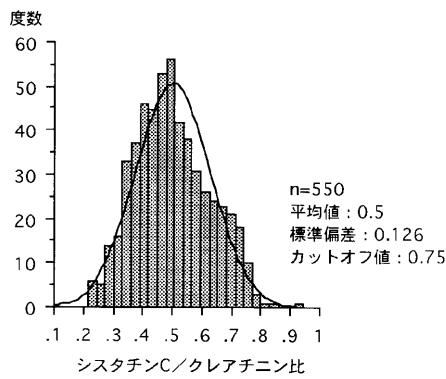
糖尿病性腎症の早期発見手順



【図3】

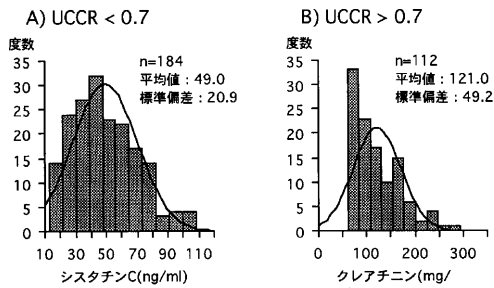


A 健康診断受診者群(n=550)における尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度の相関性および尿中シスタチンC濃度のカットオフ値算出例



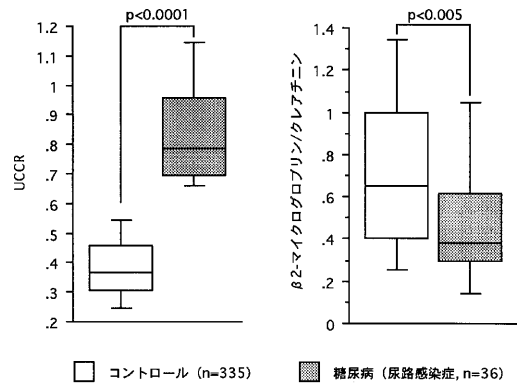
B 健康診断受診者群(n=550)における尿中シスタチンC濃度とクレアチニン濃度比のカットオフ値算出例

【図9】



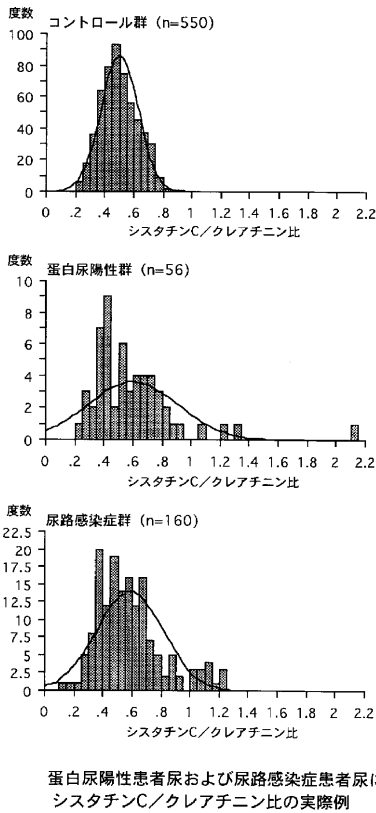
糖尿病性腎症の早期発見手順による実施例その2 (糸球体高血圧状態の判定)

【図11】

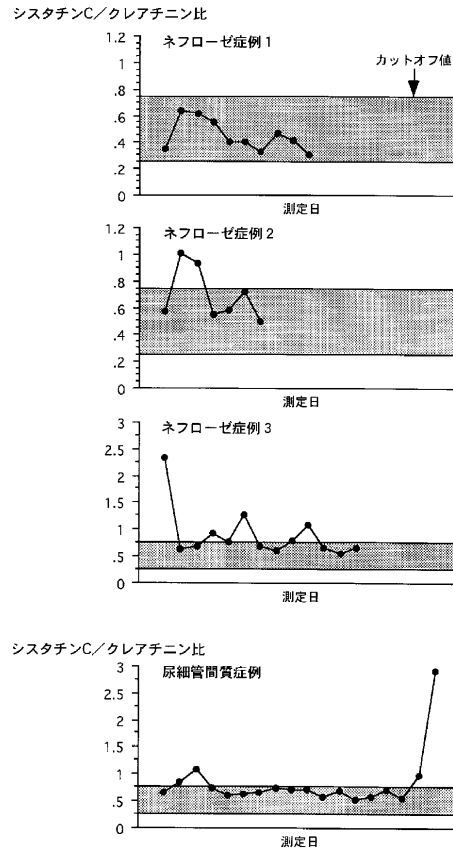


尿シスタチンC/クレアチニン比 (UCCR) からみたβ2-マイクログロブリン/クレアチニン比の評価

【図4】

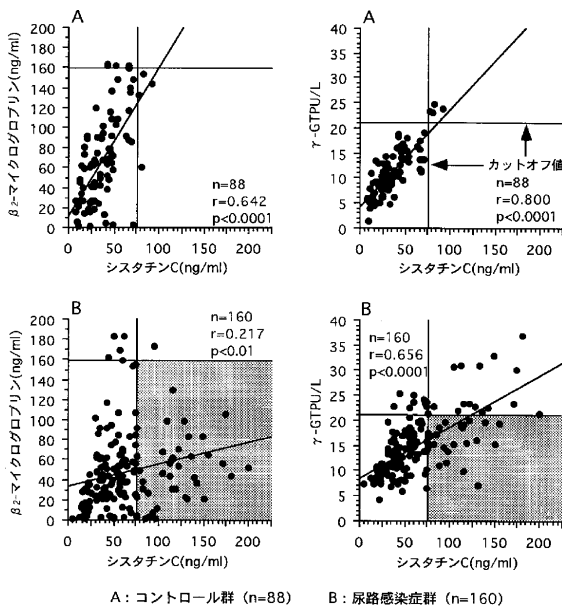


【図5】



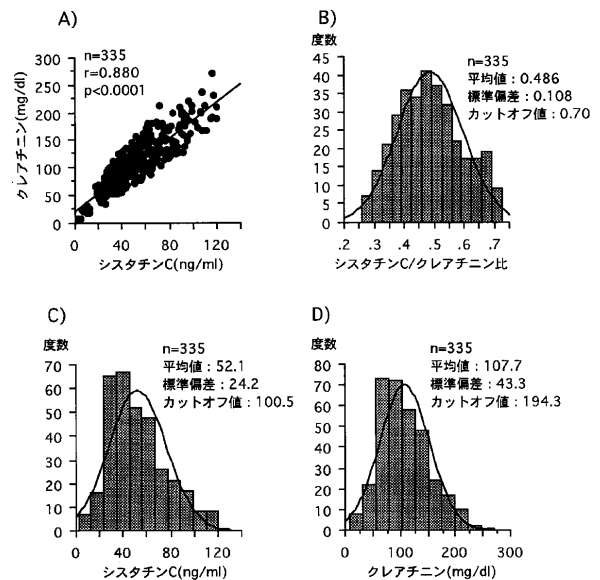
ネフローゼ症候群、尿細管間質炎患者のシスタチンC/クレアチニン比測定の実際例

【図6】



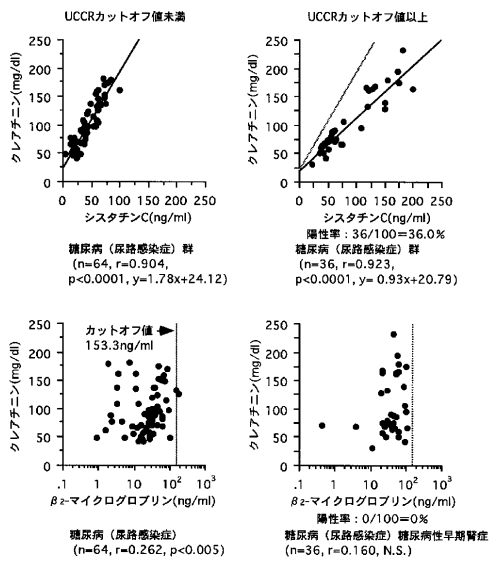
尿路感染症に伴う尿細管間質病変の検出感度比較

【図7】



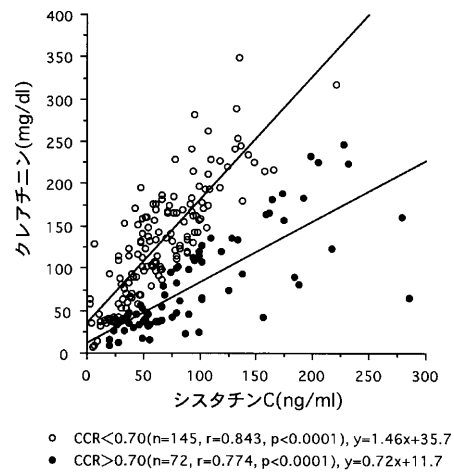
健康者 (n=335) によるシスタチンC濃度、クレアチニン濃度、シスタチンC/クレアチニン濃度比のそれぞれのカットオフ値設定例

【図10】



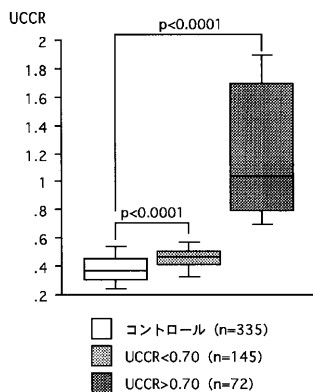
糖尿病(尿路感染症)群におけるクレアチニンとシスタチンC、β2-マイクログロブリンの尿中動態、および、UCCRとβ2-マイクログロブリン法の比較

【図12】



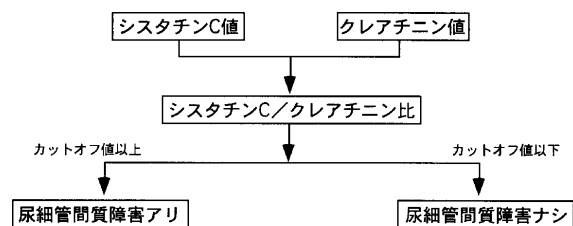
蛋白尿群におけるシスタチンCとクレアチニンの尿中動態

【図13】



コントロール群および蛋白尿陽性患者尿のUCCR値の比較

【図14】



糸球体病変に続発する尿細管間質障害の診断手順

【手続補正書】

【提出日】平成14年9月20日(2002.9.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】尿中に排泄されたシスタチンC濃度、及び内因性もしくは外因性クリアランス物質濃度を測定することにより、シスタチンC濃度とクリアランス物質濃度との比を算出し、これらを用いて腎疾患を診断するよ

うにした診断キット。

【請求項2】測定対象となる前記クリアランス物質は、クレアチニン、イヌリン、もしくはチオ硫酸ナトリウムの何れか一以上である請求項1に記載の診断キット。

【請求項3】前記クリアランス物質は、クレアチニンである請求項1に記載の診断キット。

【請求項4】シスタチンC濃度の測定には酵素免疫法やラテックス凝集反応、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用い、クリアランス物質濃度測定には、化学法若しくは酵素法を用いることを特徴とする請求項1から請求項3の何れかに記載の腎疾患を診断する診断用キ

ット。

【請求項5】 少なくとも抗ヒトシスタチンC抗体および、化学法もしくは酵素法によるクレアチニン濃度測定用の試薬を備え、尿中シスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定して、腎疾患を診断することを特徴とする診断用キット。

【請求項6】 多数例の健常者随時尿を用いて尿中シスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定し、これらの測定値から算出したシスタチンC濃度のカットオフ値、およびシスタチンC濃度とクレアチニン濃度比のカットオフ値を用いることを特徴とする腎疾患を診断する診断用キット。

【請求項7】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度（UCCR）を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【請求項8】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度（UCCR）を測定し、これらの測定値から算出されるカッ

*トオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、

次いで前記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるシスタチンC濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められなかった前記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【請求項9】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度（UCCR）を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、

次いで前記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められた前記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【手続補正書】

【提出日】平成14年12月4日（2002.12.4）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 尿中に排泄されたシスタチンC濃度、及び内因性クリアランス物質であるクレアチニン濃度を測定することにより、シスタチンC濃度とクレアチニン濃度との比を算出し、これらを用いることを特徴とする腎疾患の検査方法。

【請求項2】 シスタチンC濃度の測定には酵素免疫法やラテックス凝集反応、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用い、クレアチニン濃度の測定には、化学法若しくは酵素法を用いることを特徴とする請求項1に記載の腎疾患の検査方法。

【請求項3】 少なくとも抗ヒトシスタチンC抗体および、化学法もしくは酵素法によるクレアチニン濃度測定用の試薬を備え、尿中シスタチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定して、腎疾患を診断することを特徴とする診断用キット。

【請求項4】 多数例の健常者随時尿を用いて尿中シス

タチンC濃度およびクレアチニン濃度を測定し、これらの測定値から算出したシスタチンC濃度のカットオフ値、およびシスタチンC濃度とクレアチニン濃度比のカットオフ値を用いることを特徴とする腎疾患の検査方法。

【請求項5】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度（UCCR）を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【請求項6】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度（UCCR）を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、

次いで前記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるシスタチンC濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められなかった前記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するた

めの抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【請求項7】 多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度に対するシスタチンC濃度（UCCR）を測定し、これらの測定値から算出されるカットオフ値を基準として、糖尿病患者における尿細管障害の有無を診断し、

次いで前記多数の健常者を対象として、尿中へ排泄されるクレアチニン濃度の測定値から算出されるカットオフ値を基準として、尿細管障害が認められた前記糖尿病患者における糸球体高血圧の有無を診断するために用いられる診断用キットであって、

前記シスタチンC濃度を免疫学的方法により測定するための抗ヒトシスタチンC抗体を少なくとも備える診断用キット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明は、尿中に排泄されたシスタチンC濃度、及び内因性クリアランス物質で

あるクレアチニン濃度を測定することにより、腎疾患を検査することを特徴とする。すなわち、本発明によれば、尿中に排泄されたシスタチンC濃度とクレアチニン濃度を測定することにより、腎疾患の有無をスクリーニングできる。また、本発明は、シスタチンC濃度測定値そのもの、もしくはシスタチンC濃度とクレアチニン濃度との比を算出し、これらを用いて腎疾患を検査することを特徴とする。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】

【課題を解決するための手段】また、測定対象となる上記クリアランス物質は、クレアチニン、イヌリン、もしくはチオ硫酸ナトリウムの何れか一以上であることが好ましく、クレアチニンであることが更に好ましい。また、上記のシスタチンC濃度の測定には酵素免疫法やラテックス凝集反応、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用い、クレアチニン濃度の測定には、化学法若しくは酵素法を用いることが好ましい。

专利名称(译)	肾脏疾病诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP2003177125A	公开(公告)日	2003-06-27
申请号	JP2002169528	申请日	2002-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	IKAGAKU		
申请(专利权)人(译)	株式会社いかがく		
[标]发明人	内田 壹夫		
发明人	内田 壹夫		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/493 G01N33/53 G01N33/70		
FI分类号	G01N33/50.T G01N33/493.A G01N33/53.D G01N33/70		
F-TERM分类号	2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/CB03 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/DA42 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB15 2G045/JA01		
优先权	2001306445 2001-10-02 JP		
其他公开文献	JP3398372B1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供诊断试剂盒，以早期诊断糖尿病肾病，而不论肾小球性高血压或肾小管间质性疾病是否先发，肾小管间质性疾病或继发于肾小球病变的原尿。提供一种诊断试剂盒，用于早期诊断是否存在肾小管间质性疾病。 解决方案：在许多健康受试者中测量了尿中排出的肌酐浓度对胱抑素C浓度（UCCR）的影响，从这些测量值计算出的临界值可用作测量糖尿病患者尿液的参考。用于诊断是否存在肾小管疾病的诊断试剂盒，其至少包括用于通过免疫学方法测量胱抑素C浓度的抗人胱抑素C抗体。

