

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-179873

(P2018-179873A)

(43) 公開日 平成30年11月15日(2018.11.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 H
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532	B
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	C
	GO 1 N 33/543	5 4 5 B
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)		

(21) 出願番号 特願2017-82836 (P2017-82836)
 (22) 出願日 平成29年4月19日 (2017. 4. 19)

(71) 出願人 504145320
 国立大学法人福井大学
 福井県福井市文京3丁目9番1号
 (71) 出願人 517139820
 特定非営利活動法人日本バイオストレス研
 究振興アライアンス
 京都府京都市左京区聖護院川原町1-6
 (74) 代理人 100104318
 弁理士 深井 敏和
 (74) 代理人 100182796
 弁理士 津島 洋介
 (74) 代理人 100181308
 弁理士 早稲田 茂之

最終頁に続く

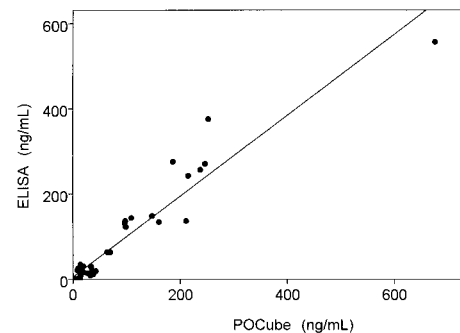
(54) 【発明の名称】 尿中の急性腎障害マーカーの測定方法

(57) 【要約】

【課題】急性腎障害の診断を迅速に、しかも安定かつ正確に行うことができる尿中の急性腎障害マーカーの測定方法を提供することである。

【解決手段】尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを測定する方法であって、尿検体を動物血清入り緩衝液で希釈し、尿検体のpHを6～9の範囲内に維持する前処理工程と、前処理した前記尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを、化学発光酵素免疫測定法(CLEIA法)を利用して測定する工程と、を含む。

【選択図】図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを測定する方法であって、
尿検体を緩衝液で希釈し、尿検体の pH を 6 ～ 9 の範囲内に維持する前処理工程と、
前処理した前記尿検体に含まれる前記急性腎障害マーカーを、免疫学的反応を利用して測定する工程と、
を含むことを特徴とする、尿中の急性腎障害マーカーの測定方法。

【請求項 2】

前記急性腎障害マーカーの測定が、検出系に化学発光反応を用いる方法である、請求項 1 に記載の測定方法。

10

【請求項 3】

前記急性腎障害マーカーの測定が、化学発光酵素免疫測定法である、請求項 1 または 2 に記載の測定方法。

【請求項 4】

尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを測定する方法であって、以下の (イ) および (ロ) の工程を含むことを特徴とする、尿中の急性腎障害マーカーの測定方法。

(イ) 尿検体を緩衝液で希釈し、尿検体の pH を 6 ～ 9 の範囲内に維持する前処理工程。

(ロ) 以下の (A) に記載された (a) から (e) の工程、または、(B) に記載された (a) から (d) の工程を含む、前処理した前記尿検体に含まれる前記急性腎障害マーカーを測定する工程。

20

(A)

(a) 前記 (イ) 工程で前処理された尿検体と、この尿検体に含まれる前記急性腎障害マーカー (抗原) に特異的に結合し且つリガンドが結合された第一の抗体を含む溶液とを接触させて、前記抗原と第一の抗体との複合体を形成する工程。

(b) 前記複合体を含む溶液を、前記リガンドの補捉剤が結合された多孔性フィルタの表面に滴下して、前記複合体のリガンド部分を前記リガンド補捉剤に結合させる工程。

(c) 前記多孔性フィルタの表面に、前記抗原に特異的に結合する、酵素で標識された第二の抗体の溶液を滴下して、第二の抗体を、リガンド補捉剤とリガンド部分とを介して多孔性フィルタに結合している第一の抗体と抗原との複合体に結合させる工程。

(d) 多孔性フィルタを洗浄し、多孔性フィルタに結合していない試薬を除去する工程。

30

(e) 多孔性フィルタに結合した前記酵素の活性を、発光基質を用いて測定する工程。

(B)

(a) 前記 (イ) 工程で前処理された尿検体と、この尿検体に含まれる前記急性腎障害マーカー (抗原) に特異的に結合し且つリガンドが結合された第一の抗体と、前記 TRX 抗原に特異的に結合する第一の抗体とは別の抗体であって、第一の抗体と同じもしくは異なる部分で抗原に結合する、酵素で標識された第二の抗体とを接触させて、第一の抗体と第二の抗体と抗原との複合体を溶液中にて形成する工程。

(b) 前記複合体を含む溶液を、前記リガンドの補捉剤が結合された多孔性フィルタの表面に滴下して、前記複合体のリガンド部分を前記リガンド補捉剤に結合させる工程。

(c) 多孔性フィルタを洗浄し、多孔性フィルタに結合していない試薬を除去する工程。

40

(d) 多孔性フィルタに結合した酵素の活性を、発光基質を用いて測定する工程。

【請求項 5】

前記急性腎障害マーカーが、TRX (チオレドキン)、NGAL (好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン) または KIM-1 (Kidney injury molecule 1) である請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 6】

尿検体が酸性である場合に、この尿検体を pH 6 ～ 9 の範囲内に調整し、緩衝液で希釈する請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 7】

前記緩衝液が、動物血清入り緩衝液である請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の測定方法。

50

【請求項 8】

請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の、尿中の急性腎障害マーカーを測定する方法に用いるためのキットであって、少なくとも

- (i) 前処理用の緩衝液、
 - (ii) 前記尿検体に含まれる急性腎障害マーカー（抗原）に特異的に結合する第一の抗体、
 - (iii) 前記尿検体に含まれる急性腎障害マーカー（抗原）に特異的に結合する第二の抗体、
 - (iv) 未結合の検体・抗体を除去するための洗浄液、および
 - (v) 多孔性フィルタに結合した酵素の活性を測定するための発光基質
- を含むことを特徴とするキット。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、急性腎障害の迅速な診断を行うことができる、尿中の急性腎障害マーカーの C L E I A 法等による迅速測定方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

急性腎障害は、死亡率が 50 % を上回る予後不良な疾患である。従来から、急性腎障害の診断は、酵素法による血清クレアチニンの測定と尿量とによって行われている。しかし、血清クレアチニンは、腎不全が完成して 2 ～ 3 日後に変化が現われる遅い指標であるため、急性腎障害の治療開始が手遅れとなることが予後改善の障壁となっている。

20

【0003】

血清クレアチニンに代わるマーカーとして、発症後 2 時間で上昇する N G A L（好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン）や K I M - 1（Kidney injury molecule 1）が提唱されている。

しかし、尿中 N G A L では、化学発光免疫測定法（C L I A 法）（chemiluminescent immunoassay）により診断に 35 分、尿中 K I M - 1 では E L I S A 法（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay 法）により診断に 6 時間を要する。そのため、急性腎障害の予後改善のために、より迅速な診断法の開発が求められている。

30

【0004】

本発明者は、先に、尿中のチオレドキン（T R X）が急性腎障害で特異的に高値を示し、急性腎障害の発症後約 2 時間という非常に早期に尿中で検出されることを発見した。尿中のチオレドキンによる急性腎障害の診断能力は、特定のカットオフ値にて A U C 0.94、感度 0.88、特異度 0.88 であった。（非特許文献 1）。さらに、本発明者は、化学発光酵素免疫測定法（Chemiluminescent Enzyme Immunoassay 法、以下、C L E I A 法と略称することがある）を用いた診断システムを開発した（非特許文献 2）。この方法では合成 T R X や血液検体のような pH や塩濃度が一定或いは振れ幅が狭い場合のみ測定が可能であったが、急性腎障害を診断するためには様々な疾患背景を持つ振れ幅の大きい臨床尿検体に幅広く対応することが要望されている。

40

また、尿に含まれるチオレドキン以外の他の急性腎障害マーカー、例えば N G A L（好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン）および K I M - 1（Kidney injury molecule 1）などについても、同様に迅速で正確な安定した測定法が要望されている。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0005】**

【非特許文献 1】Kasuno et al., Am J Physiol Renal Physiol. 307; F1342-1351, 2014

【非特許文献 2】科学技術費助成事業研究成果報告書、研究代表者：糟野健司、基盤研究(C)、「レドックス生体応答反応を利用した新規のベッドサイド迅速酸化ストレス診断法の開発」、平成 27 年 6 月 16 日

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、急性腎障害の診断を迅速に、しかも安定かつ正確に行うことができる尿中の急性腎障害マーカーの測定方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の構成からなる。

(1) 尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを測定する方法であって、
尿検体を緩衝液で希釈し、尿検体のpHを6～9の範囲内に維持する前処理工程と、
前処理した前記尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを、免疫学的反応を利用して測定する工程と、

を含むことを特徴とする、尿中の急性腎障害マーカーの測定方法。

(2) 前記急性腎障害マーカーの測定が、検出系に化学発光反応を用いる方法である、(1)に記載の測定方法。

(3) 前記急性腎障害マーカーの測定が、化学発光酵素免疫測定法である、(1)または(2)に記載の測定方法。

(4) 尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを測定する方法であって、以下の(イ)および(ロ)の工程を含むことを特徴とする、尿中のチオレドキン測定方法。

(イ) 尿検体を緩衝液で希釈し、尿検体のpHを6～9の範囲内に維持する前処理工程。

(ロ) 以下の(A)に記載された(a)から(e)の工程、または、(B)に記載された(a)から(d)の工程を含む、前処理した前記尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを測定する工程。

(A)

(a) 前記(イ)工程で前処理された尿検体と、この尿検体に含まれる急性腎障害マーカー(抗原)に特異的に結合し且つリガンドが結合された第一の抗体を含む溶液とを接触させて、前記抗原と第一の抗体との複合体を形成する工程。

(b) 前記複合体を含む溶液を、前記リガンドの補捉剤が結合された多孔性フィルタの表面に滴下して、前記複合体のリガンド部分を前記リガンド補捉剤に結合させる工程。

(c) 前記多孔性フィルタの表面に、前記抗原に特異的に結合する、酵素で標識された第二の抗体の溶液を滴下して、第二の抗体を、リガンド補捉剤とリガンド部分とを介して多孔性フィルタに結合している第一の抗体とTRX抗原との複合体に結合させる工程。

(d) 多孔性フィルタを洗浄し、多孔性フィルタに結合していない試薬を除去する工程。

(e) 多孔性フィルタに結合した前記酵素の活性を、発光基質を用いて測定する工程。

(B)

(a) 前記(イ)工程で前処理された尿検体と、この尿検体に含まれる急性腎障害マーカー(抗原)に特異的に結合し且つリガンドが結合された第一の抗体と、前記TRX抗原に特異的に結合する第一の抗体とは別の抗体であって、第一の抗体と同じもしくは異なる部分で抗原に結合する、酵素で標識された第二の抗体とを接触させて、第一の抗体と第二の抗体と抗原との複合体を溶液中にて形成する工程。

(b) 前記複合体を含む溶液を、前記リガンドの補捉剤が結合された多孔性フィルタの表面に滴下して、前記複合体のリガンド部分を前記リガンド補捉剤に結合させる工程。

(c) 多孔性フィルタを洗浄し、多孔性フィルタに結合していない試薬を除去する工程。

(d) 多孔性フィルタに結合した酵素の活性を、発光基質を用いて測定する工程。

(5) 前記急性腎障害マーカーが、TRX(チオレドキン)、NGAL(好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン)またはKIM-1(Kidney injury molecule 1)である(1)～

(4)のいずれかに記載の測定方法。

(6) 尿検体が酸性である場合に、この尿検体をpH6～9の範囲内に調整し、緩衝液で希釈する(1)～(5)のいずれかに記載の測定方法。

10

20

30

40

50

(7) 前記緩衝液が、動物血清入り緩衝液である (1) ~ (6) のいずれかに記載の測定方法。

(8) 上記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の、尿中の急性腎障害マーカーを測定する方法に用いるためのキットであって、少なくとも

(i) 前処理用の緩衝液、

(ii) 前記尿検体に含まれる急性腎障害マーカー (抗原) に特異的に結合する第一の抗体、

(iii) 前記尿検体に含まれる急性腎障害マーカー (抗原) に特異的に結合する第二の抗体、

(iv) 未結合の検体・抗体を除去するための洗浄液、および

(v) 多孔性フィルタに結合した酵素の活性を測定するための発光基質を含むことを特徴とするキット。

【発明の効果】

【 0 0 0 8 】

本発明によれば、尿検体に含まれる急性腎障害マーカーを、免疫学的反応を利用して測定するにあたり、尿検体を緩衝液で希釈し、尿検体の pH を 6 ~ 9 の範囲内に維持する前処理を行うので、尿検体を安定化することができ、pH や塩濃度の変動に影響されことなく正確で迅速な測定が可能になる。これにより、急性腎障害の早期診断が可能となり、急性腎障害の予後改善を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1】前処理していない急性腎障害患者の尿検体を用いて、化学発光酵素免疫測定法 (C L E I A 法) を用いてチオレドキンの測定を行い、従来の E L I S A 法と比較した試験例 1 のグラフである。

【図 2】尿検体の至適 pH 条件を検討した試験例 2 のグラフである。

【図 3】前処理した尿検体のチオレドキンの測定値について、C L E I A 法と E L I S A 法との関連性を示す試験例 3 のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

急性腎障害マーカーとしてチオレドキン (T R X) を例に挙げて、本発明の急性腎障害マーカーの測定方法を以下説明する。

本発明に係る尿中のチオレドキン測定方法は、(I) 尿検体を緩衝液で希釈し、尿検体の pH を 6 ~ 9 の範囲内に維持する前処理工程と、(II) 前処理した前記尿検体に含まれるチオレドキンを測定する工程と、を含む。チオレドキンの測定は、免疫学的反応を利用して行い、特に検出系に化学発光反応を用いる方法、例えば化学発光酵素免疫測定法 (C L E I A 法) が好適に利用される。

【 0 0 1 1 】

尿検体は、患者から採取したものをそのまま前処理工程に供してもよく、あるいは水等の溶媒で希釈した後、前処理工程に供してもよい。希釈液としては、後述する緩衝液を使用するのが好ましい。

【 0 0 1 2 】

前処理工程は、pH 調整と、緩衝液の添加とを含む。尿検体は pH が 6 ~ 9、好ましくは 6 . 5 ~ 8 の範囲内にあるのが好ましい。尿は血液に比べて生理的に pH 変動が大きく、pH が 6 未満の酸性尿である場合には、測定値が有意に低下して、正確な測定ができないおそれがある。その場合には、アルカリ剤で pH を上記範囲に調整する必要がある。pH を前記範囲まで戻すことで、正確な測定が可能になる。一方、ヒトでは尿が pH 9 を超えることは通常ない。

使用可能なアルカリ剤としては、例えば水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液、グリシン - N a O H 緩衝液、トリシン - N a O H 緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液などが使用可

10

20

30

40

50

能である。

なお、尿検体のpHが上記範囲内にある場合や、上記範囲内にあると推測される場合等には、pH補正を行うことなく、緩衝液で希釈するだけでもよい。

【0013】

尿検体は、血液検体に比べて塩濃度にばらつきが大きく、そのため抗原抗体反応に至適な塩濃度から外れることがある。そのため、所定の緩衝液を加えることにより、安定した測定値が得られるようになる。緩衝液としては、例えば動物血清入りの緩衝液が挙げられる。動物血清入りとするのは、抗原抗体反応を安定化させ正確な抗原定量性を担保し、様々な疾患背景を持つ臨床尿検体に幅広く対応するためである。

動物血清入りの緩衝液としては、具体的には、例えば東洋紡（株）製のピオキューブFluAB検体前処理液などが挙げられる。

【0014】

緩衝液は、尿検体を希釈するのに十分な量であるのがよく、尿検体の5～10倍量であるのが好ましい。これにより、安定した測定値が得られる。

pH調整が必要な場合、pH調整と緩衝液の希釈との順序は特に限定されるものではないが、尿検体をpH調整後、緩衝液で希釈するのが好ましい。pH調整を行わない場合には、東洋紡（株）製のピオキューブFluAB検体前処理液などの動物血清入りのリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、またはトリス塩酸緩衝液で希釈するだけでもよい。

【0015】

このようにして前処理した尿検体に含まれるチオレドキンを、免疫学的反応を利用して測定する。免疫学的反応としては、特に検出系に化学発光反応を用いる化学発光酵素免疫測定法（CLEIA法）であるのが急性腎障害を迅速に診断するうえで好ましい。この測定法は、特開2001-235471号公報などで公知である。

【0016】

以下、前処理した前記尿検体に含まれるチオレドキンを測定する方法を説明する。この方法は、以下の（A）に記載された（a）から（e）の工程、または、（B）に記載された（a）から（d）の工程を含む。

（A）

（a）前処理した尿検体と、この尿検体に含まれるチオレドキン（TRX抗原）に特異的に結合し且つリガンドが結合された第一の抗体を含む溶液とを接触させて、前記TRX抗原と第一の抗体との複合体を形成する工程（第一免疫反応）。

（b）前記複合体を含む溶液を、前記リガンドの補捉剤が結合された多孔性フィルタの表面に滴下して、前記複合体のリガンド部分を前記リガンド補捉剤に結合させる工程。

（c）前記多孔性フィルタの表面に、前記TRX抗原に特異的に結合する、酵素で標識された第二の抗体の溶液を滴下して、第二の抗体を、リガンド補捉剤とリガンド部分とを介して多孔性フィルタに結合している第一の抗体とTRX抗原との複合体に結合させる工程（第二免疫反応）。

（d）多孔性フィルタを洗浄し、多孔性フィルタに結合していない試薬を除去する工程。

（e）多孔性フィルタに結合した前記酵素の活性を、発光基質を用いて測定する工程。

（B）

（a）前処理した尿検体と、この尿検体に含まれるチオレドキン（TRX抗原）に特異的に結合し且つリガンドが結合された第一の抗体と、前記TRX抗原に特異的に結合する第一の抗体とは別の抗体であって、第一の抗体と同じもしくは異なる部分でTRX抗原に結合する、酵素で標識された第二の抗体とを接触させて、第一の抗体と第二の抗体とTRX抗原との複合体を溶液中にて形成する工程。

（b）前記複合体を含む溶液を、前記リガンドの補捉剤が結合された多孔性フィルタの表面に滴下して、前記複合体のリガンド部分を前記リガンド補捉剤に結合させる工程。

（c）多孔性フィルタを洗浄し、多孔性フィルタに結合していない試薬を除去する工程。

（d）多孔性フィルタに結合した酵素の活性を、発光基質を用いて測定する工程。

【0017】

10

20

30

40

50

第一の抗体としては、例えばビオチン標識抗体などが挙げられる。多孔性フィルタとしては、例えばガラス繊維フィルタなどが挙げられる。第二の抗体としては例えば酵素標識抗体などが挙げられ、発光基質としては例えば酵素基質が挙げられる。

C L E I A 法に使用可能な測定装置としては、例えば東洋紡（株）製の小型化学発光免疫自動分析装置POCube(登録商標)等が挙げられる。

【0018】

本発明に係る尿検体中のチオレドキンの測定方法に用いるためのキットは、目的とするチオレドキン成分を測定するために必要な試薬構成を含むものである。具体的には、本発明のキットは、少なくとも、(i) 前処理用の緩衝液、(ii) 前記尿検体に含まれるチオレドキン(T R X 抗原)に特異的に結合する第一の抗体、(iii) 前記尿検体に含まれるチオレドキン(T R X 抗原)に特異的に結合する第二の抗体、(iv) 未結合の検体・抗体を除去するための洗浄液、および(v) 多孔性フィルタに結合した酵素の活性を測定するための発光基質を含む。

【0019】

なお、以上の説明では、急性腎障害の代表的なマーカーであるチオレドキンの測定方法を説明したが、尿検体に含まれるN G A L (好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン)やK I M - 1 (Kidney injury molecule 1)といった他のマーカーについても、尿検体を上記と同様に前処理し、C L E I A 法を用いて測定することができる。この場合も、急性腎障害の迅速な診断が可能となる。

【実施例】

【0020】

以下、試験例を挙げて本発明の急性腎障害マーカーの測定方法を詳細に説明するが、本発明は以下の試験例のみに限定されるものではない。

【0021】

試験例 1

前処理工程なしで、急性腎障害患者 6 人の尿検体について、C L E I A 法を用いてチオレドキンの測定を行い、測定結果を従来の E L I S A 法と比較した。

< C L E I A 法 >

(実験 1) 第 1 抗体 (ビオチン標識抗体) の調製

T R X 1 1 抗体 (M B L (医学生物学研究所) 社) 1 m g と、ビオチンアミドカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを 2 5 で 4 時間反応させ、A m i c o n U l t r a - 4 (ミリポア社製)を用いて分画し、第 1 抗体液を調製した。

(実験 2) 第 2 抗体 (A L P 標識抗体) の調製

T R X 2 1 抗体 (M B L (医学生物学研究所) 社) 0 . 1 m g を A l k a l i n e P h o s p h a t a s e L a b e l i n g K i t - S H (同人化学社製)を用いて、第 2 抗体液を調製した。

(実験 3) チオレドキン抗原測定

急性腎障害患者より採取した尿検体液 7 5 μ L に第 1 抗体液 2 0 μ L を添加し、混合後、4 0 でインキュベーションした (第一免疫反応)。1 0 秒後に、検体・第 1 抗体液混合液 7 0 μ L をあらかじめ 5 0 μ L の蒸留水を添加した P O C u b e (東洋紡績 (株) 製) 専用反応容器 (第 1 抗体に結合したリガンドを特異的に認識するリガンド捕捉剤が結合された多孔性フィルタを含む容器) に添加し、さらに、第 2 抗体液を 2 0 μ L 添加し、4 0 でインキュベーションした。1 5 0 秒後に、0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 を含む蒸留水を 8 0 μ L ずつ 2 回添加し、さらに発色基質として L u m i g e n (登録商標) A P S - 5 (L u m i g e n 社製) 3 0 μ L を添加し、発光強度を測定した。そして、事前に作成した発光強度とチオレドキン量との関係を示す検量線から、尿検体中のチオレドキン量を測定した。なお、チオレドキン抗原測定に要した時間は約 6 分間であった。

< E L I S A 法 >

上記と同じ急性腎障害患者の尿検体について、従来の E L I S A 法にてチオレドキン量を測定した。

10

20

30

40

50

< E L I S A 法と C L E I A 法との対比 >

図 1 に C L E I A 法と E L I S A 法との各測定結果を示す。同図に示すように、E L I S A 法では、尿中チオレドキンが 2 0 0 n g / m L 以上であった尿検体が、C L E I A 法で測定すると、0 . 0 2 ~ 5 0 . 0 n g / m L であった。従って、そのままでは C L E I A 法で尿中チオレドキンを正確に測定できないことがわかる。

【 0 0 2 2 】

試験例 2

(至適 p H 条件の検討)

以下の尿検体について、前記した C L E I A 法にて尿中チオレドキン (T R X) を測定した。

10

- ・ p H 8 の尿検体 1
- ・ p H 8 の尿検体 1 を p H 4 に調整した尿検体 2
- ・ p H 4 の尿検体 2 を p H 8 に戻した尿検体 3

p H 調整には、酸として H C l 水溶液を使用し、アルカリとして N a O H 水溶液を使用した。

試験結果を図 2 に示す。同図に示すように、p H 4 の尿検体 2 では、前記した C L E I A 法で測定した尿中チオレドキンは、測定感度以下まで低下していた。これに対して、p H を 8 まで戻すことにより (「 p H 4 - 8 」 として表示) 、正確な測定が可能になることがわかる。

20

【 0 0 2 3 】

試験例 3

(p H 補正 + 緩衝液で希釈)

急性腎障害患者から採取した尿検体の p H を 6 ~ 9 の範囲内に調整し、ついで、動物血清入り緩衝液 (東洋紡 (株) 製のピオキューブ F l u A B 検体前処理液) にて 2 、 4 、 8 、 1 6 、 3 2 倍に希釈した。このようにして前処理した尿検体中のチオレドキンを、試験例 1 と同様にして C L E I A 法にて測定した。

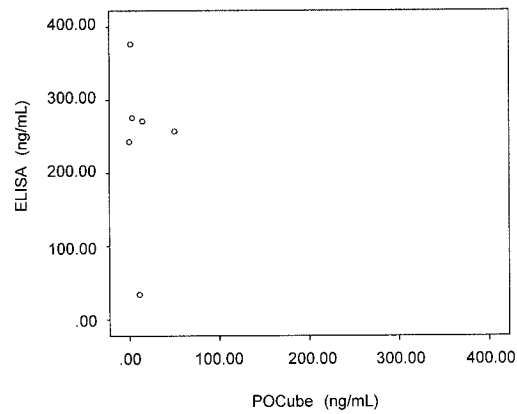
一方、上記の前処理をしていない同じ尿検体について、従来の E L I S A 法にて、E L I S A 法所定の専用希釈液で 4 0 倍に希釈した後、チオレドキンを測定し、東洋紡 (株) 製のピオキューブ F l u A B 検体前処理液で 8 倍希釈した尿検体を C L E I A 法で測定した結果と比較した。その結果を図 3 に示す。同図において、グラフ内の黒点は、試験に供した各急性腎障害患者の尿検体を示している。

30

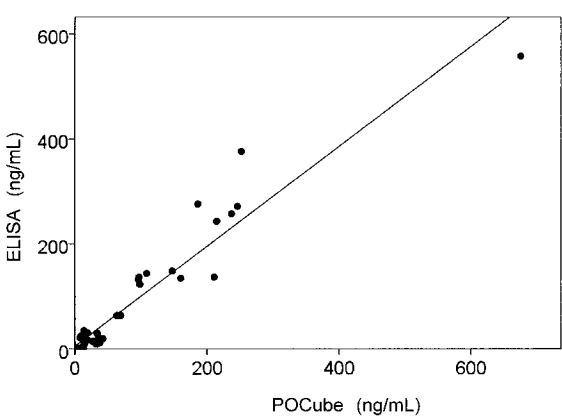
図 3 に示すように、p H 補正し緩衝液で希釈した尿検体を使用して、C L E I A 法にて測定した尿中チオレドキンの測定値は、E L I S A 法による測定値と良好な直線関係を有していることがわかる。

これにより、臨床尿検体の尿中チオレドキンを 6 分程度の短時間にしかも正確に且つ安定的に測定できることから、急性腎障害の迅速な診断が可能になる。

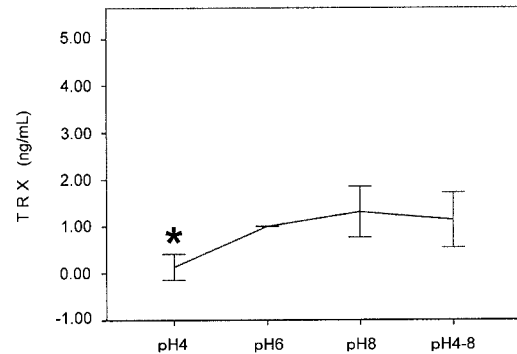
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 糟野 健司
福井県吉田郡永平寺町松岡下合月2 3号3番地 国立大学法人福井大学内
- (72)発明者 横井 靖二
福井県吉田郡永平寺町松岡下合月2 3号3番地 国立大学法人福井大学内
- (72)発明者 岩野 正之
福井県吉田郡永平寺町松岡下合月2 3号3番地 国立大学法人福井大学内
- (72)発明者 淀井 淳司
京都府京都市左京区聖護院川原町1 - 6 特定非営利活動法人日本バイオストレス研究振興アライ
アンス内

专利名称(译)	测定尿急性肾损伤标志物的方法		
公开(公告)号	JP2018179873A	公开(公告)日	2018-11-15
申请号	JP2017082836	申请日	2017-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人福井大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人福井大学		
[标]发明人	糟野健司 横井靖二 岩野正之 淀井淳司		
发明人	糟野 健司 横井 靖二 岩野 正之 淀井 淳司		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/536		
FI分类号	G01N33/543.545.H G01N33/53.D G01N33/532.B G01N33/536.C G01N33/543.545.B		
代理人(译)	对马洋介 早稻田重幸		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

问题得到解决：提供一种测量尿液中急性肾功能衰竭标志物的方法，能够快速，稳定，准确地诊断急性肾功能衰竭。一种测量尿样中所含急性肾衰竭标记物的方法，包括步骤：用含有动物血清的缓冲溶液稀释尿样，使尿样的pH保持在6-9的范围内；尿液标本中含有的急性肾功能衰竭标志物已经过预处理，并通过化学发光酶免疫测定法（CLEIA法）测定。

