(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3961152号
(P3961152)
(45)発行日　平成19年8月22日(2007.8.22)　(24)登録日　平成19年5月25日(2007.5.25)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/573	(2006.01)	G01N	33/573	A
C12Q 1/533	(2006.01)	C12Q	1/533	
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	T

請求項の数 8　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平11-133050
(22)出願日　平成11年5月13日(1999.5.13)
(65)公開番号　特開2000-146980(P2000-146980A)
(43)公開日　平成12年5月26日(2000.5.26)
審査請求日　平成16年1月16日(2004.1.16)
(31)優先権主張番号　特願平10-251450
(32)優先日　平成10年9月4日(1998.9.4)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

早期審査対象出願

(73)特許権者　000003274
マルハ株式会社
東京都千代田区大手町１丁目１番２号
(73)特許権者　390000745
財団法人大阪バイオサイエンス研究所
大阪府吹田市古江台６丁目２番４号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(73)特許権者　503360115
独立行政法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町４丁目１番８号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腎疾患の検出および病態管理方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンＤ合成酵素濃度を測定し、その測定値を健常者より採取した体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンＤ合成酵素濃度の測定値から設定した基準値と比較することを特徴とする、腎疾患の早期検出方法。

【請求項２】

被験者が早期腎症期以前の腎疾患患者である請求項１記載の腎疾患の早期検出方法。

【請求項３】

体液試料が尿である請求項１または２に記載の腎疾患の早期検出方法。

【請求項４】

体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンＤ合成酵素濃度の測定を、免疫学的測定法により行うことを特徴とする、請求項１～３のいずれかに記載の方法。

【請求項５】

腎疾患が糸球体病変を伴うものである、請求項１～４のいずれかに記載の方法。

【請求項６】

腎疾患が高血圧性腎障害、または脂質代謝異常性腎障害である、請求項１～４のいずれかに記載の方法。

【請求項７】

腎疾患が腎症である、請求項１～４のいずれかに記載の方法。

【請求項８】
腎疾患が糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、多発性嚢胞腎、または腎不全である、請求項１～４のいずれかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、腎疾患の検出方法、詳しくは、既存の診断法では検出できない早期の腎疾患を検出することのできる腎疾患の早期検出方法、および糸球体濾過能を簡便に評価することによる腎疾患の病態管理方法である。
【０００２】
【従来の技術】
近年、糖尿病性腎症のために透析療法に入る患者の数が年々増加している。平成８年の統計では、１年間に新たに透析導入された糖尿病性腎症患者数は9,351名で、第一位の慢性腎炎の10,995名に極めて近い数字に増加してきている（関川暁ら，第41回日本糖尿病学会学術集会）。しかし、残念なことに、糖尿病患者の透析療法は、心不全、血圧の動揺、感染症、シャントトラブルなど多くの問題があり、透析導入後の平均余命は３年程度と短いのが現状である（例えば、日本透析療法学会統計調査委員会，透析会誌，25，1095-1103，1992参照）。従って、糖尿病性腎症では早期診断による早期治療が重要であると考えられている。
【０００３】
糖尿病性腎症や糸球体腎炎をはじめとした腎糸球体に病変を起こす腎疾患の診断、病態管理において、イヌリン、クレアチニンなどを対象としたクリアランス試験は、糸球体濾過能を評価する上で有用であるとされている。しかし、クリアランス試験では蓄尿が必要となり、またイヌリン等の外因性物質の投与によるクリアランス試験では外因性物質の静脈注射が必要となるため、試験に要する時間や煩雑さの面からその適用は明らかな腎疾患患者に限られていた。従って、腎疾患が疑われる、あるいは可能性のある患者の日常的な診断法としてクリアランス試験が用いられることは少なく、持続性蛋白尿の検出や血中クレアチニン濃度の測定によって診断が行われるケースが多かった。ところが、持続性蛋白尿の出現する時期や血中クレアチニン濃度の上昇する時期には、既に非可逆性の糸球体病変が進行していることも知られている（例えば、「腎臓学」，黒川清編，249-251頁，(1995)参照）。従って、持続性タンパク尿の検出や血中クレアチニン濃度の測定は、病変の初期段階を有効に検出できる手段とはなり得ない。
【０００４】
近年、尿中に排泄される種々の蛋白質の測定が可能となり、例えば糖尿病性腎症においては尿中へのアルブミンの増加、即ち、微量アルブミン尿が持続性蛋白尿に先行することが明らかとなった。そこで現時点では、微量アルブミン尿などの出現をもって腎疾患を診断することが一般化している。
【０００５】
糖尿病性腎症およびそれ以外の腎症の病気分類としては、一般的には、第１期（腎症前期）、第２期（早期腎症期）、第３期（顕性腎症期）、第４期（腎不全期）、第５期（透析療法期）に分類される（繁田幸男ら，平成３年度糖尿病調査研究報告書，厚生省，317-320，1992）。微量アルブミン尿を呈する時期は、上記のうち第２期（早期腎症期）に該当し、病理学的にはこの時期には既に軽度から中等度のびまん性病変が存在し、結節性病変の存在も知られている。例えば糖尿病性腎症においては、腎糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム領域の拡大が特徴とされているが、臨床的に微量アルブミン尿の認められない時期より、これらの変化が既に存在することも知られている（猪股茂樹ら，糖尿病，30，429-435，1987、Bangstad，H.，J. et al.，Diabetologia，36，523-529，1993）。従って、第２期（早期腎症期）は必ずしも初期腎症とは限らず、あくまでも現在の臨床検査で診断可能な時期と解されている。これに対し、微量アルブミン尿を呈する以前の第１期（腎症前期）に生ずる異常については事実上腎生検でしか検出できないと考えられる。しか

しながら、腎生検は侵襲的であるが故、苦痛や危険性を伴い、また検査開始から結果が出るまでに多大な手間や時間がかかる。よって、このような微量アルブミン尿を呈する以前の異常を、非侵襲的に検出できる簡便な検査法の開発が望まれるところである。

【０００６】

このような状況下、尿中IV型コラーゲンが腎症前期においても増加することが報告され、糖尿病性腎症のより早期の指標となり得る可能性が示された（Hayashi, Y. et al., Diabetic Medicine, 9, 366-370, 1992、Yagame, M. et al., J. Clin. Lab. Anal., 11, 110-116, 1997）。このような尿中IV型コラーゲンの増加は、腎糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム基質の増生、拡大などの組織的変化を反映して、糸球体基底膜、糸球体上皮細胞、或いは尿細管上皮細胞においてその産生が亢進することが原因であると考えられている（磯野元秀ら，糖尿病，39，599-604，1996）。しかしながら、このような腎糸球体における組織的変化が生じてしまう以前にも、腎糸球体組織内の細胞レベルでは、糖尿病に特徴的な高血糖に対応して、代謝や形態など様々な変化が生じているものと考えられる。例えば、糖尿病ラット糸球体、高糖濃度条件下で培養した糸球体、メサンギウム細胞などでプロテインキナーゼＣ活性の亢進が報告されており、糖尿病性腎症をはじめとした糖尿病合併症における組織的変化との関連が注目されている（Craven, P., A. and DeRubertis, F., R., J. Clin. Invest., 83, 1667-1675, 1989、Williams, B. and Schrier, R., W., Diabetes, 41, 1464-1472, 1992）。従って、このような細胞レベルの質的な変化をより早期に検出できれば、組織的変化が生じてしまう以前により効果的な対処が取れるものと考えられるが、これまでのところ臨床的にそのような有用性を検討した報告はない。

【０００７】

一方、ヒトリポカリン型プロスタグランジンＤ合成酵素（以下L-PGDS）は、各種プロスタグランジン類の共通の前駆体であるPGH_2から、睡眠誘発作用をはじめとした各種生理作用を示すPGD_2への異性化を触媒する酵素である（Urade, Y., Fujimoto, N., and Hayaishi, O., J. Biol. Chem., 260, 12410-12415, 1985、Urade, Y., Watanabe, K., and Hayaishi, O., J. Lipid Mediator Cell Signaling, 12, 257-273, 1995）。近年、このL-PGDSが、ヒト脳脊髄液(CSF)中に多量に存在することが知られていたβ-トレースと同一であることが明らかにされた（Hoffmann, A., Conradt, H., S., Gross, G., Nimitz, M., Lottspeich, F., and Wurster, U., J. Neurochem., 61, 451-456, 1993、Zahn, M., Mader, M., Schmidt, B., Bollensen, E., and Felgenhauer, K., Neurosci. Let., 154, 93-95, 1993、Watanabe, K., Urade, Y., Mader, M., Murphy, C., and Hayaishi, O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 203, 1110-1116, 1994）。

【０００８】

L-PGDSがまだβ-トレースと呼ばれていた1969年に、Ericssonらは腎疾患とβ-トレース（L-PGDS）の関連性を示唆する論文を発表している（Ericsson, J., Link, H., and Zettervall, O., Neurology, 19, 606-610, 1969）。即ち、当時の測定法は技術的に未熟であったため、健常者の血中および尿中ではL-PGDSが検出できなかったが、血中クレアチニン濃度およびクレアチニンクリアランスに異常が認められる慢性腎炎をはじめとする腎疾患患者の血中および尿中ではL-PGDSが検出され、これら患者でその濃度が上昇することが示唆された。また、Felgenhauerらも、健常者では検出されない血中L-PGDSが、１例のみであるが腎不全患者において検出されたと報告している（Felgenhauer, K., Schadlich, H., J., and Nekic, M., Klin. Wochenschr., 65, 764-768, 1987）。これに対して、Whitsedらは、より高感度の測定法を開発し、健常者とタンパク尿を呈する腎疾患患者の尿中L-PGDS濃度（24時間当たりの排泄量）を比較したが、腎疾患患者が必ずしも高濃度のL-PGDSを示すとは限らないとの報告を行っている（Whitsed, H.and Penny, R., Clin. Chim. Acta, 50, 111-118, 1974）。このように、研究者によって腎疾患とL-PGDSの相関性について意見が分かれているのは、これらの報告で用いている測定法がポリクローナル抗体を用いた古典的な免疫学的方法に基づく半定量的なものであるためであると考えられる。最近、ドイツのHoffmannらは、より定量性の高い測定系を用いて、末期腎不全である透析療法期の患者の血中L-PGDS濃度が、健常者と比べ著しく上昇していること確認した（Hoffmann,

A., Nimtz, M., and Conradt, H., S., Glycobiology, 7, 499-506, 1997）。しかしながら、彼らの測定法では特異性を明らかにしたモノクローナル抗体を用いているものの、血液試料からL-PGDSを精製した後、ウエスタンブロッティングを行い、バンドの濃さを比較するという煩雑な方法であるため、小さな濃度差を正確に比較することはやはり困難であると考えられる。

【０００９】

このように、これまでに行われてきた腎疾患とL-PGDS（β-トレース）の相関性に関する検討は、何れも、クレアチニンの動態に異常を示す、タンパク尿を呈する、透析療法期である、といったように、既存の検査手段で腎疾患が明らかに進展していることを確認した患者を対象にして、L-PGDSの著しい濃度上昇を検出したに過ぎない。これに対し、腎疾患が進展する以前のL-PGDS濃度に関する検討はこれまで全くなされていなかった。

【００１０】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、これまでの腎疾患に対する種々の検査手段では検出することのできなかった早期腎症期以前に生ずる腎異常を、正確に且つ被験者の負担が少なく検出することのできる方法を提供することにある。更に、これまで時間や手間のかかるクリアランス試験によって評価していた糸球体濾過能を、簡便且つ短時間に評価することのできる方法を提供することにある。

【００１１】

【課題を解決するための手段】

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、血液、尿等の体液中L-PGDS濃度を測定し、その測定値を指標とすることより、疾患がある程度進展した早期腎症期以前の腎疾患を発見することができることを見い出し、更に、その測定値を指標にすることにより、腎疾患患者の病態管理を行えることを見い出し、本研究を完成させるに至った。

【００１２】

即ち、本発明は、被験者より採取した体液試料中のL-PGDSを測定し、その測定値を健常者より採取した体液試料中のL-PGDS濃度の測定値から設定した基準値と比較することを特徴とする、腎疾患の早期検出方法である。

本発明はまた、被験者より採取した体液試料中のヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定し、その測定値から糸球体濾過能を評価することを特徴とする、腎疾患の病態管理方法である。

以下本発明を詳細に説明する。

【００１３】

【発明の実施の形態】

本発明において、L-PGDSを測定する試料は、被験者から採取した体液であり、具体的には、血液、尿（随時尿、蓄尿等）、羊水等が挙げられる。

上記試料中のL-PGDS濃度を測定する方法としては、L-PGDS濃度を正確に反映する測定法であれば特に限定はされず、例えば免疫学的測定法、酵素活性測定法が挙げられる。しかしながら、実際の臨床現場において、簡便に且つ多量の試料を同時に測定する必要性の観点から、L-PGDSに特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いたEIA、ELISA、RIA、FIA等の免疫学的測定法によるのが好適である。

【００１４】

上記の免疫学的測定法のうち、特に、L-PGDS特異的モノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISA法が好ましく、該モノクローナル抗体としては、具体的には、ハイブリドーマ細胞株1B7（FERM BP-5709）、7F5（FERM BP-5711）、6F5（FERM BP-5710）、9A6（FERM BP-5712）、10A3（FERM BP-5713）より産生される抗体が挙げられる。

サンドイッチELISA 法による測定に際しては、既に本発明者らにより確立されている、上記モノクローナル抗体を含むL-PGDS検出キットを利用すればよい（WO97/16461）。

【００１５】

本発明においては、上記手段で測定されたL-PGDS濃度測定値を指標として腎疾患を早期に

検出し、また当該測定値から糸球体濾過能を評価することによって、腎疾患の病態を管理することができる。
本発明の方法では、上記手段で測定した被験者の体液試料中のL-PGDS濃度測定値を健常者の体液試料中のL-PGDS濃度より設定した基準値と比較することにより、腎疾患を検出する。
【００１６】
ここで「基準値」とは、陽性・陰性を判定するための値をいい、臨床現場ではカットオフ値とも呼ばれる。この基準値は、例えば「健常者の平均値」＋（α×標準偏差）により設定することができる。ここで、αは０．５，１，２，５などであり、正規分布をとる集団では２が用いられるケースが多い。
腎疾患の検出は、具体的には、まず健常者からなる集団を対象としてその体液試料中のL-PGDS濃度を測定して上記式より基準値を設定し、次に、被験者の体液試料中のL-PGDS濃度の測定値が、基準値以上の値を示した（異常値を示した）場合に陽性と判定することによって行う。
また、腎疾患の病態を管理するには、上記手段で測定した被験者の体液試料中のL-PGDS濃度測定値から糸球体濾過能を評価することによって行う。
本発明において、病態の管理とは、病状（重篤度の程度）の把握、予後の観察をいう。
【００１７】
本発明の方法により検出され、または病態の管理が行える腎疾患としては、例えば、糸球体病変を伴うもの、高血圧性腎障害、脂質代謝異常性障害などが挙げられ、具体的には腎症など、さらに具体的には、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、多発性嚢胞腎、または腎不全などが挙げられる。ここで、糖尿病性腎症には、例えば微量アルブミン尿を呈する時期以前や尿中IV型コラーゲンの増加が見られる以前の極めて初期の糖尿病性腎症も含まれる。
以下に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に何ら限定されるものではない。
【００１８】
【実施例】
〔参考例〕（健常者の血中および尿中L-PGDS濃度の測定と基準値の設定）
健常者から採取した血液（血清）および随時尿について、これら体液試料におけるL-PGDS濃度を２抗体サンドイッチELISA法により測定し、基準値の設定を行った。
【００１９】
（１）標準曲線の作成
まず、L-PGDSと結合可能な抗L-PGDSモノクローナル抗体（クローン：7F5）を50mM炭酸緩衝液（pH 9.6）に4.4μg/mlになるように希釈し、96ウエルマイクロタイタープレートに300μl/ウエルずつ加えて、4℃で一晩放置し固相化した。このプレートをリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4、以下PBS）で3回洗浄した後、0.2%カゼインを含むPBS（pH 7.4、以下ブロッキング液）を300μl/ウエル加えて30℃で90分インキュベートし、ブロッキングを行った。
次いで、ブロッキング後のプレートを0.05%Tween20を含むPBS（T-PBS）で3回洗浄した後、100μlの標準L-PGDS溶液（CSFより純化したL-PGDSをブロッキング液で段階希釈することにより調製）を各ウエルに加え、30℃で90分間インキュベートした。反応後、T-PBSで3回洗浄し、ブロッキング液で0.5μg/mlになるように希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗PGDSモノクローナル抗体（クローン：1B7）100μlを各ウエルに加え、30℃で90分間インキュベートした。T-PBSで3回洗浄した後、発色液（ABTS solution：ベーリンガーマンハイム社製）100μlを各ウエルに加え、30℃で30分間インキュベートした後、停止液（ 1.5%シュウ酸）を100μlずつウエルに加え、プレートミキサーで撹拌して反応を停止させた。市販のプレートリーダー（型番SK601 、生化学工業社製）により405nmと490nmにおける吸光度の差（A405nm-A490nm）を測定し、標準曲線を作成した。
【００２０】

上記サンドイッチELISA法に用いたモノクローナル抗体（クローン：1B7、7F5）は、マウス腹腔内にプリスタン1.0mlを注射し、その後2週間目にそれぞれの抗体産生細胞株を1×10^8個マウスの腹腔内に移植し、2週間後に腹水を採取し、得られた腹水をプロテインAアフィニティーカラムクロマトグラフィー操作にかけることにより得た（3～10mg/ml）。
尚、上記モノクローナル抗体を産生する細胞株はそれぞれ上記モノクローナル抗体名に一致し、それぞれの細胞株は、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、1B7についてはFERM BP-5709（原寄託日平成7年9月21日）、7F5についてはFERM BP-5711（原寄託日平成8年6月6日）として寄託されている。

【００２１】

（２）試料中のL-PGDS濃度の測定

血液は192例、随時尿は56例を用い、それぞれブロッキング液で適宜希釈して、上記のサンドイッチELISA法に従ってL-PGDS濃度を測定した。測定の結果、健常者によって得られた平均値±標準偏差は、血中では0.848±0.186μg/mlであった。随時尿を用いた検討では、採尿時の尿の濃さの違いによる影響を考慮して、尿中クレアチニン濃度による換算を行い、尿中L-PGDS指数（L-PGDS／g-creatinine）として表すこととした。その結果、健常者によって得られた尿中L-PGDS指数の平均値±標準偏差は、2.44±1.86mg/g-creatinineであった。このようにして得られた平均値±標準偏差から前記式に従い、平均値＋（２×標準偏差）で基準値を設定したところ、血中で1.22μg/ml、尿中で6.16mg/g-creatinineという値が得られた。

【００２２】

以下の各実施例において、体液試料（血液、尿）中のL-PGDSの測定は参考例の方法に従い、クレアチニンの測定はアルカリピクリン酸法、尿中アルブミンの測定はラテックス凝集法、尿中IV型コラーゲンの測定はサンドイッチELISA 法によって行った。また、尿試料は随時尿を用いたため、濃度差を考慮して、尿中クレアチニンによる換算を行った（尿中L-PGDS指数：L-PGDS／g-creatinine、尿中アルブミン指数：アルブミン／g-creatinine、尿中IV型コラーゲン指数：IV型コラーゲン／g-creatinine）。

【００２３】

〔実施例１〕（Ｌ－ＰＧＤＳと血中クレアチニン、尿中アルブミン、および尿中IV型コラーゲンとの相関性）

内科外来患者118名を対象として、血中L-PGDS濃度、血中クレアチニン濃度、尿中L-PGDS指数、尿中アルブミン指数をそれぞれ測定した。また、内科外来患者284名を対象として、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数を測定した。
図１～３にそれぞれ示されるように、血中L-PGDS濃度と血中クレアチニン濃度、尿中L-PGDS指数と尿中アルブミン指数、および尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数は、いずれも高い相関性を示した。従って、L-PGDSは、これまでの血中クレアチン、尿中アルブミン、尿中IV型コラーゲンに匹敵する腎疾患診断の指標となり得ることが明らかとなった。

【００２４】

〔実施例２〕（各種腎疾患患者におけるL-PGDS濃度の変化）

腎疾患患者42名（慢性腎不全：11名、糸球体腎炎：23名、多発性嚢胞腎：８名）を対象として、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数の測定を行った。同時に血液試料に関しては血中クレアチニン濃度を、尿試料に関しては尿中アルブミン指数を測定した。結果を図４に示す。
図４に示されるように、全ての腎疾患において血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数が健常者に対し有意に増加することが明らかとなった。また、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数も上昇したが、ｐ値（危険率）を比較すると、L-PGDSの方がより小さい値を示した。従って、L-PGDSは血中クレアチニン、尿中アルブミンよりも優れた腎疾患診断の指標となり得るといえる。

【００２５】

〔実施例３〕（糖尿病患者におけるL-PGDS濃度の変化）

糖尿病患者55名を対象として、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数の測定を行った。同

時に血液試料に関しては血中クレアチニン濃度を、尿試料に関しては尿中アルブミン指数を測定した。患者を糖尿病歴によって分類した（５年未満：22名、５年以上10年未満：19名、10年以上：14名）結果を図５に示す。
図５に示されるように、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数はともに病歴が長くなるに従って上昇することが判明した。また、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数も病歴が長くなるほどに上昇したが、ｐ値（危険率）を比較すると、L-PGDSの方がより小さい値を示した。糖尿病では腎症を合併しやすいことから、L-PGDSは血中クレアチニン、尿中アルブミンよりも優れた腎症移行の指標となり得るといえる。
【００２６】
〔実施例４〕（糖尿病患者における追跡調査）
実施例３において、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数とも正常値を示したが、血中L-PGDS濃度および／または尿中L-PGDS指数に異常値を示した患者６名に関して、２年間の追跡調査を行った。尚、L-PGDSの異常値は、健常者の平均値＋（２×標準偏差）（血中：1.22μg/ml、尿中：6.16mg/g-creatinine）以上、血中クレアチニン濃度の異常値は1.1mg/dl以上、尿中アルブミン指数の異常値は30mg/g-creatinine以上とした。結果を表１に示す。
【００２７】
【表１】

糖尿病患者における追跡調査

	被験者１	被験者２	被験者３	被験者４	被験者５	被験者６
〔試験開始時〕						
血中ｸﾚｱﾁﾝ 濃度(mg/dl)	0.9	1.0	0.8	0.7	0.9	0.7
尿中ｱﾙﾌﾞﾐﾝ 指数(mg/g-creatinine)	15.9	28.8	15.2	19.4	8.8	10.1
血中L-PGDS濃度（μg/ml）	1.86 *	1.69 *	1.25 *	1.06	0.70	0.94
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	13.66*	12.21*	5.79	14.94*	7.05 *	9.80 *
〔２年後〕						
血中ｸﾚｱﾁﾝ 濃度(mg/dl)	1.3 *	5.5 *	3.4 *	0.6	1.1 *	0.7
尿中ｱﾙﾌﾞﾐﾝ 指数(mg/g-creatinine)	64.9 *	373.8 *	269.0 *	29.1	103.2 *	8.8
血中L-PGDS濃度（μg/ml）	2.03 *	6.91 *	1.73 *	1.14	1.37 *	1.12
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	14.60*	17.57*	19.59*	5.10	7.75 *	6.72 *

＊異常値

【００２８】
表１に示されるように、試験開始時には６名全員が血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数とも正常値を示したが、２年後には６名中４名で血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数ともに異常値を示し、腎症を併発していることが明らかとなった。このことは、現在の臨床診断で検出不可能な極めて初期の腎症を、L-PGDS濃度測定によって検出することが可能であることを示しており、その濃度測定値が健常者の平均値＋（２×標準偏差）以上を示す者を陽性と判断することが適していることが明らかとなった。
【００２９】
〔実施例５〕（内科外来患者における追跡調査）
実施例１において、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数はともに正常値を示したが、血中L-PGDS濃度および／または尿中L-PGDS指数が異常値を示した患者８名に関して、２年間の追跡調査を行った。尚、L-PGDS濃度の異常値は健常者の平均値＋（２×標準偏差）（血中：1.22μg/ml、尿中：6.16mg/g-creatinine）以上、血中クレアチニン濃度の異常値は1.1mg/dl以上、尿中アルブミン指数の異常値は30mg/g-creatinine以上とした。結果を表２に示す。
【００３０】

【表２】

内科外来患者における追跡調査

	被験者１	被験者２	被験者３	被験者４	被験者５	被験者６	被験者７	被験者８
〔試験開始時〕								
血中ｸﾚｱﾁﾝ 濃度(mg/dl)	0.7	0.9	1.0	0.7	0.7	0.8	0.6	0.6
尿中ｱﾙﾌﾞﾐﾝ 指数(mg/g-creatinine)	9.5	10.0	22.1	12.3	5.8	20.5	15.9	8.8
血中L-PGDS濃度（μg/ml）	2.03 *	1.08 *	1.88 *	1.39 *	0.89	0.79	1.20	1.03
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	16.51*	8.87 *	15.55 *	5.44	6.74 *	11.94 *	14.58 *	7.62 *
〔２年後〕								
血中ｸﾚｱﾁﾝ 濃度(mg/dl)	1.2 *	0.8	3.2 *	2.7 *	1.2 *	1.3 *	0.9	0.7
尿中ｱﾙﾌﾞﾐﾝ 指数(mg/g-creatinine)	47.2 *	9.5	523.3 *	633.7 *	349.0 *	98.5 *	14.0	7.0
血中L-PGDS濃度（μg/ml）	1.38 *	1.16	2.08 *	3.21 *	1.61 *	1.23 *	1.07	0.93
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	7.93 *	9.27 *	16.52 *	22.74 *	9.60 *	17.77 *	13.41 *	5.72

* 異常値

【００３１】

表２に示されるように、試験開始時には８名全員が血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数ともに正常値を示していたが、２年後には８名中５名で血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数ともに異常値を示し、腎疾患を発症していることが明らかとなった。このことは、現在の臨床診断で検出不可能な極めて初期の腎疾患を、L-PGDS濃度測定によって検出することが可能であることを示しており、その濃度測定値が健常者の平均値＋（２×標準偏差）以上を示す者を陽性と判断することが適していることが明らかとなった。

【００３２】

〔実施例６〕（糸球体病変の病態管理）

糸球体腎炎患者および慢性腎不全患者11名を対象として、24時間クレアチニンクリアランスと血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数の測定を行った。尚、尿中L-PGDS指数の測定には随時尿を用いた。結果を図６に示す。

図６に示されるように、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数は、共にクレアチニンクリアランスと高い相関性を示し、L-PGDS濃度測定は糸球体濾過能の評価に有用であることが明らかとなった。L-PGDSの測定には蓄尿や外因性クリアランス物質の投与が必要でないため、本法により糸球体病変の病態管理を簡便に行うことが可能となった。

【００３３】

〔実施例７〕（糖尿病性腎症の進行とL-PGDS濃度）

糖尿病患者101名を対象として、尿中L-PGDS指数の測定を行った。同時に尿中アルブミン指数および尿中IV型コラーゲン指数も測定した。尿中アルブミン指数より糖尿病性腎症の進行程度を、正常アルブミン尿期（尿中アルブミン指数：30mg/g-creatinine未満、57名）、微量アルブミン尿期（同：30mg/g-creatinine以上300mg/g-creatinine未満、27名）、顕性タンパク尿期（同：300mg/g-creatinine以上、17名）に分類した結果を図７に示す。

【００３４】

図７に示されるように、尿中L-PGDS指数および尿中IV型コラーゲン指数は共に糖尿病性腎症の進行に伴って増加してくることが明らかとなった。従って、尿中L-PGDSは、尿中アルブミンまたは尿中IV型コラーゲンに匹敵する早期糖尿病性腎症の指標となり得るといえる。

更に、正常アルブミン尿期の糖尿病患者の尿中L-PGDS指数は健常者より有意に高かったが、尿中IV型コラーゲン指数ではこのような有意差が認められないことが判明した。このことは、尿中アルブミンや尿中IV型コラーゲンの測定では検出できない極めて初期の糖尿病性腎症が、尿中L-PGDSの測定では検出可能であることを示している。

【００３５】

〔実施例８〕（糖尿病性腎症の進行と陽性率）
実施例７で分類した各アルブミン尿期の患者における、尿中L-PGDS指数および尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を調べた。尿中L-PGDS指数の異常値は、実施例５に従い、6.16mg/g-creatinine 以上とした。また、尿中IV型コラーゲン指数の異常値は、磯野らの基準に従い、3.7μg/g-creatinine以上とした（磯野元秀ら,糖尿病，39，599-604，1996）。各々、異常値を示した場合を陽性と判定した結果を図８に示す。

【００３６】
図８に示されるように、顕性タンパク尿期の患者では、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数は共に100%陽性を示した。しかし微量アルブミン尿期の患者では、尿中L-PGDS指数の陽性率が尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を僅かに上回っていた（74.1% vs 70.4%）。更に正常アルブミン尿期の患者では、尿中L-PGDS指数の陽性率は尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を大きく上回っていた（57.9% vs 36.8%）。
更に、これら糖尿病患者101名を尿中IV型コラーゲン指数の基準値で２群に分類し、陽性群・陰性群における尿中L-PGDS指数の陽性率を検討した結果を図９に示す。

【００３７】
図９に示されるように、尿中IV型コラーゲン指数陽性症例では尿中L-PGDS指数も90%以上が陽性と判定され、両者の結果はほぼ一致した。一方、尿中IV型コラーゲン指数が陰性でも、尿中L-PGDS指数が陽性と判定された症例が40%存在していた。
以上の結果は、尿中アルブミンまたは尿中IV型コラーゲンの測定では検出できない極めて初期の糖尿病性腎症が、尿中L-PGDSの測定では検出可能であることを示している。

【００３８】
〔実施例９〕（糖尿病患者における後ろ向き調査）
実施例７の被験者の内、尿を２～３年前に採取し、-20℃にて保存していた63名を対象として、保存尿中のL-PGDS、アルブミン、IV型コラーゲン指数を測定した。尿中アルブミン指数の異常値は、日本糖尿病学会・日本腎臓学会の合同委員会の診断基準に従い、30mg/g-creatinine以上とした。また、尿中L-PGDSおよびIV型コラーゲン指数の異常値は、実施例８と同様とした。
その結果、保存検体における尿中アルブミン指数および尿中IV型コラーゲン指数とも正常値を示したが、尿中L-PGDS指数のみ陽性と判定される患者が８名存在することが明らかとなった。これら８名について、以前（２～３年前）および現在の尿中L-PGDS、アルブミン、IV型コラーゲン指数をまとめたものを表３に示す

【００３９】
【表３】

糖尿病患者における後ろ向き調査

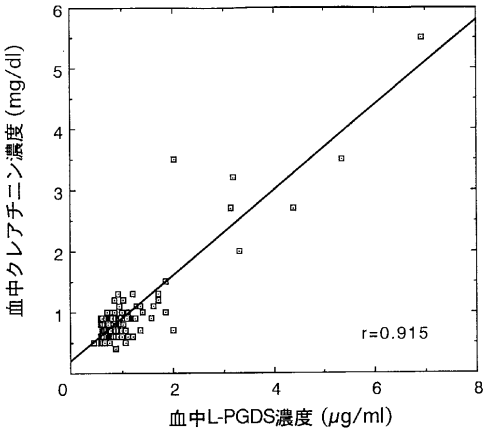
	被験者１	被験者２	被験者３	被験者４	被験者５	被験者６	被験者７	被験者８
〔以前〕								
ｱﾙﾌﾞﾐﾝ 指数(mg/g-creatinine)	9.6	10.9	2.3	18.9	6.7	0.6	8.8	5.7
ⅠV型ｺﾗｰｹﾞﾝ 指数（μg/g-creatinine)	2.6	1.5	1.2	2.2	1.1	2.7	3.0	3.5
L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	6.60 *	9.68 *	10.34 *	9.08 *	6.43 *	7.89 *	7.09 *	6.79 *
〔現在〕								
ｱﾙﾌﾞﾐﾝ 指数(mg/g-creatinine)	55.3 *	234.4 *	51.1 *	12.3	39.5 *	31.0 *	9.9	31.8 *
ⅠV型ｺﾗｰｹﾞﾝ 指数（μg/g-creatinine)	9.1 *	22.8 *	7.3 *	11.6 *	2.6	10.0 *	3.7 *	3.8 *
L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	9.41 *	16.12 *	13.44 *	8.12 *	6.28 *	16.29 *	4.93	10.21 *

* 異常値

【００４０】
以前～現在の尿中L-PGDS指数を見ると、正常値になった者は１名のみであり（被験者７）、残りの７名は依然として異常値を示していた。これら７名の内、２～３年間で更に尿中

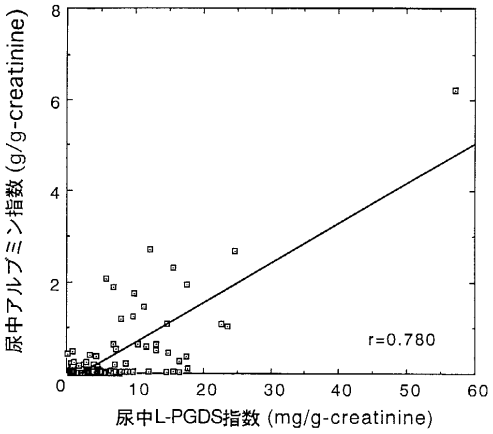
アルブミン指数のみが異常値を示すようになった者が１名（被験者５）、尿中IV型コラーゲン指数のみが異常値を示すようになった者が２名（被験者４、７）存在した。加えて、尿中アルブミン指数および尿中IV型コラーゲン指数が共に異常値を示すようになった者は５名存在した（被験者１、２、３、６、８）。
これらのことは、尿中L-PGDSの測定によって、尿中アルブミンや尿中IV型コラーゲンの測定では検出できない極めて初期の糖尿病性腎症を検出することが可能であることを示している。
【００４１】
【発明の効果】
本発明によれば、糸球体腎炎、糖尿病性腎症などの腎糸球体に病変を有する腎疾患の指標として現在用いられている血中クレアチニンや尿中アルブミンよりも顕著に腎異常を検出することのできる方法が提供される。しかも、本発明方法は、血中クレアチニン、尿中アルブミン、尿中IV型コラーゲンで異常を示さない、現在の臨床診断で検出不可能な早期腎症期以前の腎疾患をも、極めて正確に且つ被験者の負担を少なく検出できる。更に、本発明方法により、蓄尿や外因性クリアランス物質の投与を必要とせず、糸球体濾過能の評価を簡便に行うことができる。従って、本発明方法は、腎疾患の早期発見と、患者の病態管理に極めて有用である。
【図面の簡単な説明】
【図１】血中L-PGDS濃度と血中クレアチニン濃度の相関性を示す。
【図２】尿中L-PGDS指数と尿中アルブミン指数の相関性を示す。
【図３】尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数の相関性を示す。
【図４】各種腎疾患患者における血中L-PGDS濃度と血中クレアチニン濃度（A）、および尿中L-PGDS指数と尿中アルブミン指数（B）を示す。
【図５】血中L-PGDS濃度・血中クレアチニン濃度と糖尿病歴の相関性（A）、および尿中L-PGDS指数・尿中アルブミン指数と糖尿病歴の相関性（B）を示す。
【図６】血中L-PGDS濃度とクレアチニンクリアランスの相関性（A）、および尿中L-PGDS指数とクレアチニンクリアランスの相関性（B）を示す。
【図７】尿中アルブミン指数を基に分類した各アルブミン尿期における、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数の変化を示す。
【図８】尿中アルブミン指数を基に分類した各アルブミン尿期における、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を示す。
【図９】尿中IV型コラーゲン指数陽性・陰性の糖尿病患者における、尿中L-PGDS指数の陽性率を示す。

【図１】



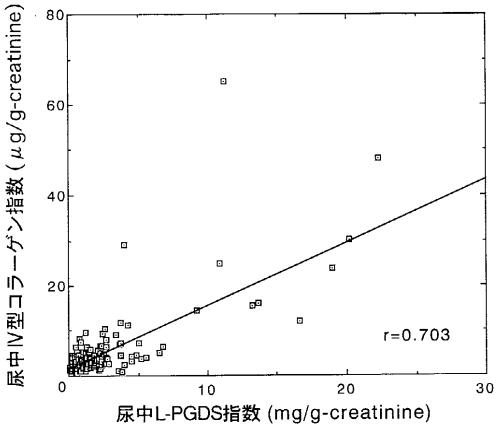
血中クレアチニンとの相関性

【図２】



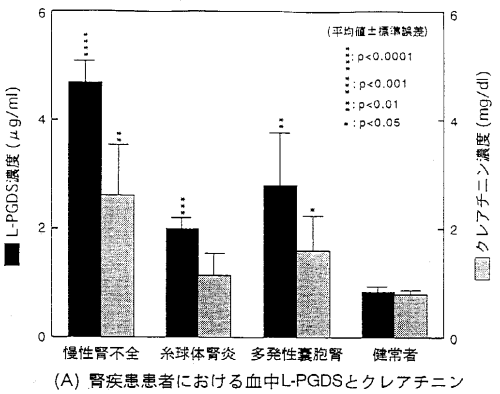
尿中アルブミンとの相関性

【図３】

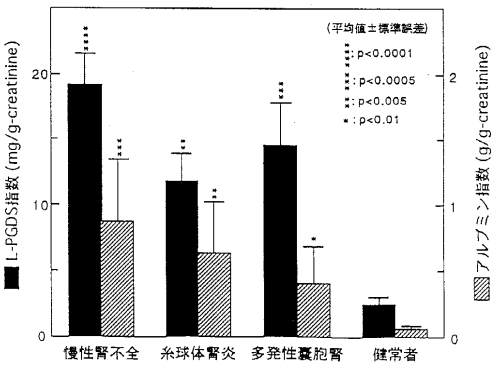


尿中Ⅳ型コラーゲン指数との相関性

【図４】

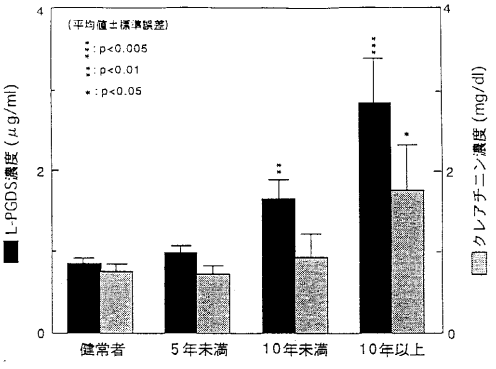


(A) 腎疾患患者における血中L-PGDSとクレアチニン

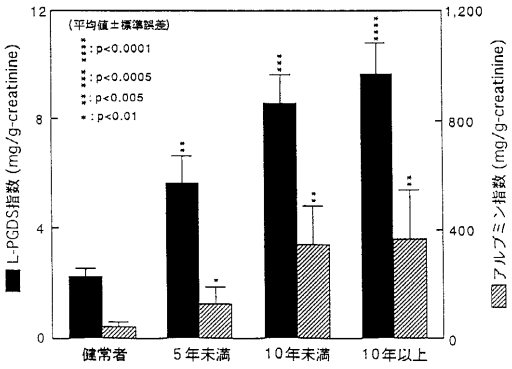


(B) 腎疾患患者における尿中L-PGDSとアルブミン

【図５】

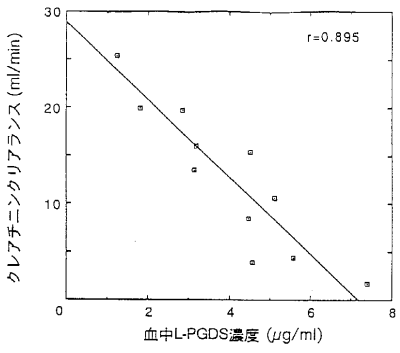


(A) 血中L-PGDS・クレアチニンと糖尿病歴の関係

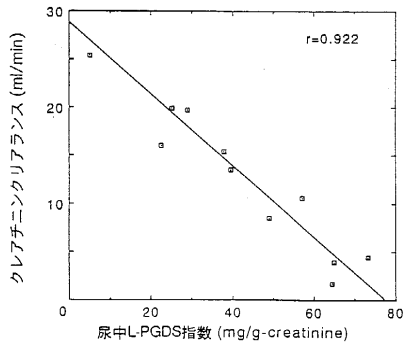


(B) 尿中L-PGDS・アルブミンと糖尿病歴の関係

【図６】

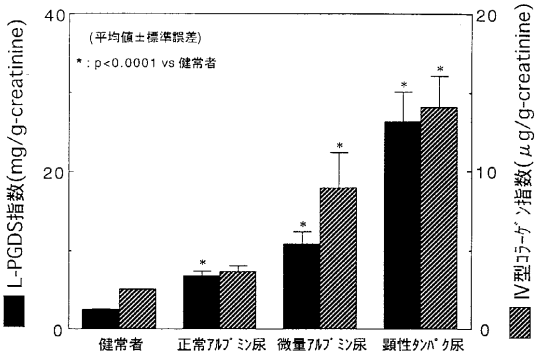


(A) 血中L-PGDSとクレアチニンクリアランスの相関性



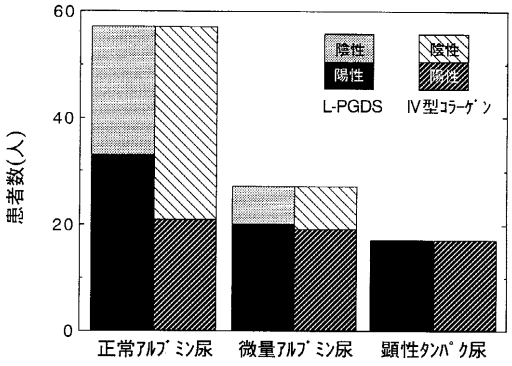
(B) 尿中L-PGDSとクレアチニンクリアランスの相関性

【図７】



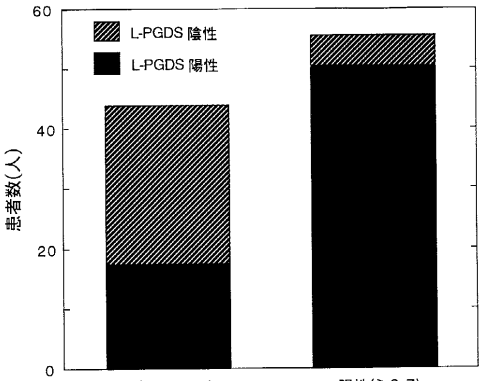
糖尿病性腎症の進行と尿中L-PGDS及び
Ⅳ型コラーゲン指数の変化

【図８】



糖尿病性腎症における尿中L-PGDS及び
Ⅳ型コラーゲン指数の陽性率

【図９】



尿中Ⅳ型コラーゲン指数とL-PGDS指数の陽性率

フロントページの続き

(74)代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72)発明者 織田 浩司
茨城県つくば市和台１６－２ マルハ株式会社 中央研究所内
(72)発明者 清木 興介
茨城県つくば市和台１６－２ マルハ株式会社 中央研究所内
(72)発明者 中島 浩
茨城県つくば市和台１６－２ マルハ株式会社 中央研究所内
(72)発明者 佐藤 信行
茨城県つくば市和台１６－２ マルハ株式会社 中央研究所内
(72)発明者 裏出 良博
京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下ル古西町４４０ 藤和シティコープ７０６
(72)発明者 平和 伸仁
神奈川県横浜市旭区本村町５６－２ イーストパレス二俣川５０４号
(72)発明者 上原 譽志夫
東京都江戸川区清新町１－１－６－１９０６

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 国際公開第９７／０１６４６１（WO, Ａ１）
Andrea Hoffmann et.al, Molecular characterization of β-trace protein in human serum and urine: a potential diagnostic for , Glycobiology, １９９７年, Vol.7, No.4, 499-506

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
G01N 33/573
C12Q 1/533
G01N 33/50