福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI REPOSITORY

Analytical and clinical validation of rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for urinary thioredoxin, an oxidative stress-dependent early biomarker of acute kidney injury

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2020-09-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横井, 靖二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/00028494

別紙様式第４号（第３条，第５条関係）

学 位 論 文 の 要 旨

※ 整理番号		ふりがな 氏　　名	よこい　せいじ 横井　靖二
学位論文題目	Analytical and Clinical validation of rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for urinary thioredoxin, an oxidative stress-dependent early biomarker of acute kidney injury(急性腎障害の酸化ストレス依存性早期バイオマーカーである尿中チオレドキシンに関する迅速化学発光酵素免疫測定法の分析的および臨床的検証)		

【研究の目的】

酸化ストレスは腎障害の主要なメディエーターであり、酸化ストレスを標的とした腎臓病治療が始まろうとしている。しかし腎臓病に関連する酸化ストレスを定量する臨床検査は存在しない。急性腎障害（AKI）は従来の急性腎不全よりも早期の腎機能障害を含み、早期発見と早期治療介入が臨床的に提唱されていることから、迅速な測定系が求められている。尿中チオレドキシン（TXN）は酸化ストレスに関連する AKI バイオマーカーであり、AKI 発症 6 時間以内に特異的に増加し、早期 AKI バイオマーカーNGAL と同じ時間経過でピークに達する。化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）は、従来の酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）よりも測定が迅速である利点がある。今回われわれは、CLEIA 法による尿中 TXN の小型迅速測定装置を用いた測定系を開発し、分析的および臨床的に検証を行った。

【方法】

TXN の定量性を確認するために、既知の濃度のリコンビナント TXN タンパク溶解液を希釈して標準サンプルを作成し CLEIA 法で測定して標準曲線を作成した。未知の検体の TXN 濃度はこの標準曲線を基に計算した。

共存する妨害物質の影響を評価するために、5 つの干渉物質（リウマチ因子、溶血ヘモグロビン、乳び、遊離ビリルビン、および結合ビリルビン）を希釈して調製した。リコンビナント TXN タンパク溶解液は、低濃度（3～5 ng/ml）と高濃度（15～25 ng/ml）の 2 つの濃度で調製した。次に、リコンビナント TXN タンパク溶解液と干渉物質溶液を 9：1 の比率で混合し、CLEIA 法で尿中 TXN 濃度を測定し、検出限界および定量限界を調べた。

尿中 TXN の測定に対する pH の影響を検討するために、HCL と NaOH で尿サンプルの pH を 4～10 の範囲に滴定し、尿中 TXN を測定した。pH 調整緩衝液でリコンビナント TXN タンパク溶解液を希釈し、2 つの濃度（1.0 または 10 ng/ml）に調整して、同時再現性実験用のサンプルを準備し、10 回連続して測定した。以下の尿サンプルは pH 調整緩衝液で希釈して測定を行った。日差再現性の検討のため、尿中 TXN が低、中、および高濃度の AKI 患者サンプルを用いて、5 日間連続で尿中 TXN を測定した。尿中 TXN が他臓器の酸化ストレスの影響を受けるかどうかを調べるために、17 人の健常人、34 人の AKI 患者および 16 人の腎臓以外の酸化ストレス関連疾患患者の尿中 TXN 濃度を CLEIA 法および ELISA 法で測定し、ROC 曲線を作成した。腎機能による影響を調べるために 34 人の AKI 患者と同じ腎機能ステージの慢性腎臓病（CKD）患者 45 人の尿中 TXN 濃度を測定した。

【結果】

CLEIA 法での標準曲線は、良好なシグモイド用量反応曲線を示した。CLEIA 法の精

度を評価するため、再現性（分析内再現性）、分析間再現性、直線性、干渉に対する交差反応性についてテストしたところ、測定値の変動は、いずれも許容範囲内であった。共存物質の影響は、溶血ヘモグロビンで異常高値を示したが、リウマチ因子、乳び、遊離ビリルビン、結合ビリルビンの影響は認めなかった。尿中 TXN の検出限界（LOD）は 0.22 ng/ml、定量限界（LOQ）は 0.5 ng/ml であった。

CLEIA を使用して、pH 8.0、6.0、または 4.0 に滴定した尿サンプルの TXN 濃度を測定したところ、pH 4.0 で有意に低値を示したが、pH 8.0 に戻すことで pH 調整前の尿中 TXN 測定値に戻った。尿中 TXN は健常者よりも AKI 患者の方が有意に高く、カットオフ値 15.6 ng/mL での感度 0.85、特異度 0.94 であった。腎臓以外の酸化ストレス疾患である脳梗塞、心筋梗塞あるいは低酸素血症を呈した患者では尿中 TXN の増加はなかった。CKD 患者の尿中 TXN と比較し、AKI 患者の尿中 TXN 値は有意に上昇していた ($p<0.05$)。従来の測定法である ELISA 法で 4 時間以上かかっていた測定が CLEIA 法では 6 分で完了した。

【考察】

酸化ストレスを介した AKI の早期診断を可能にする CLEIA を使用して、酸化ストレス依存性の早期バイオマーカー尿中 TXN を測定するための迅速なシステムを開発した。溶血ヘモグロビンのみが測定値に影響を与えることが明らかになった。西洋ワサビペルオキシダーゼを CLEIA の検出に使用したため、ヘモグロビンによるペルオキシダーゼ反応で吸収される波長と同様の波長の光の吸収が原因と考えられた。その他の分析的評価では、良好な同時再現性と日差再現性が示された。酸性尿<pH 6.0 の条件では CLEIA システムを用いた TXN 値は低値を示し、pH 調整緩衝液での希釈が重要であることが判明した。希釈の直線性を評価すると、原点を通る直線が得られ、測定の上限である 50 ng/ml を超えるサンプルでも、pH 調整緩衝希釈によって正確に測定できた。

【結論】

尿検体を pH 調整後に測定することで、正確かつ再現性をもって尿中 TXN 濃度を測定できた。4 時間以上を要した ELISA 法に比べ、CLEIA 法では 6 分という迅速測定が可能となった。AKI に関連する酸化ストレスを迅速に定量できる臨床検査法を確立した。

備考　1　※印の欄は、記入しないこと。

2　学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000 字程度にまとめタイプ等で印字すること。

3　図表は、挿入しないこと。