

●免疫アッセイ法を用いた腎障害バイオマーカの 生体試料中濃度測定

TN383

Quantitative Determination of Urinary Kidney Biomarker in Rat by Immunoassay

【概要】

近年、医薬品開発の前臨床試験において、腎障害を早期に検出する手法として腎障害バイオマーカが利用されています。腎臓組織と関連する主な障害バイオマーカを図1に示します。これらバイオマーカは、医薬品開発の効率化や開発失敗のリスク軽減などを目的として、FDA/EMA から具体的に有用なマーカとして7項目を提示したレポート(1)が発行されるなど、標準化に向けた動きも見られています。

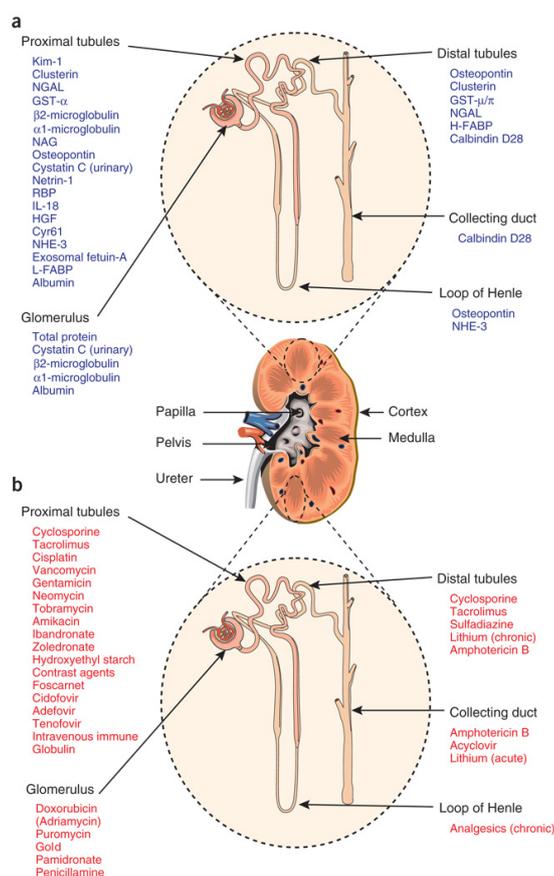


図 1 様々な腎毒性物質による部位特異的腎障害検出の有用なバイオマーカ (a)腎障害の部位特異的バイオマーカ。(b)腎臓の部位特異的毒性を誘導する薬剤。

文献「Bonventre JV, Vaidya VS, Schmoeder R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. Nat Biotechnol. 2010 ;28(5):436-40.」 Figure1.より引用

一般的にバイオマーカの濃度測定には、ELISA 法や ECL 法(2)、ビーズアレイ法 (マルチプレックスアッセイ、サスペンションアレイ) (3)(4)などの免疫アッセイ法が広く利用されています。今回は、バイオマーカの多項目同時測定に関する分析実施例をご紹介します。当社では、腎障害バイオマーカをはじめとした様々なバイオマーカの生体試料中濃度測定サービスを、各種免疫アッセイフォーマットを用い

て提供しております。

[事例]腎障害ラット尿中の各種腎障害バイオマーカーの測定

腎障害誘発薬物である Puromycin aminonucleoside (PAN) をラットに投与することで、人為的にラットに腎障害を引き起こした際の尿中バイオマーカーの測定を行いました。実験条件を表 1、定量結果を図 2 に示します。

表 1 ラット腎障害バイオマーカーの実験条件

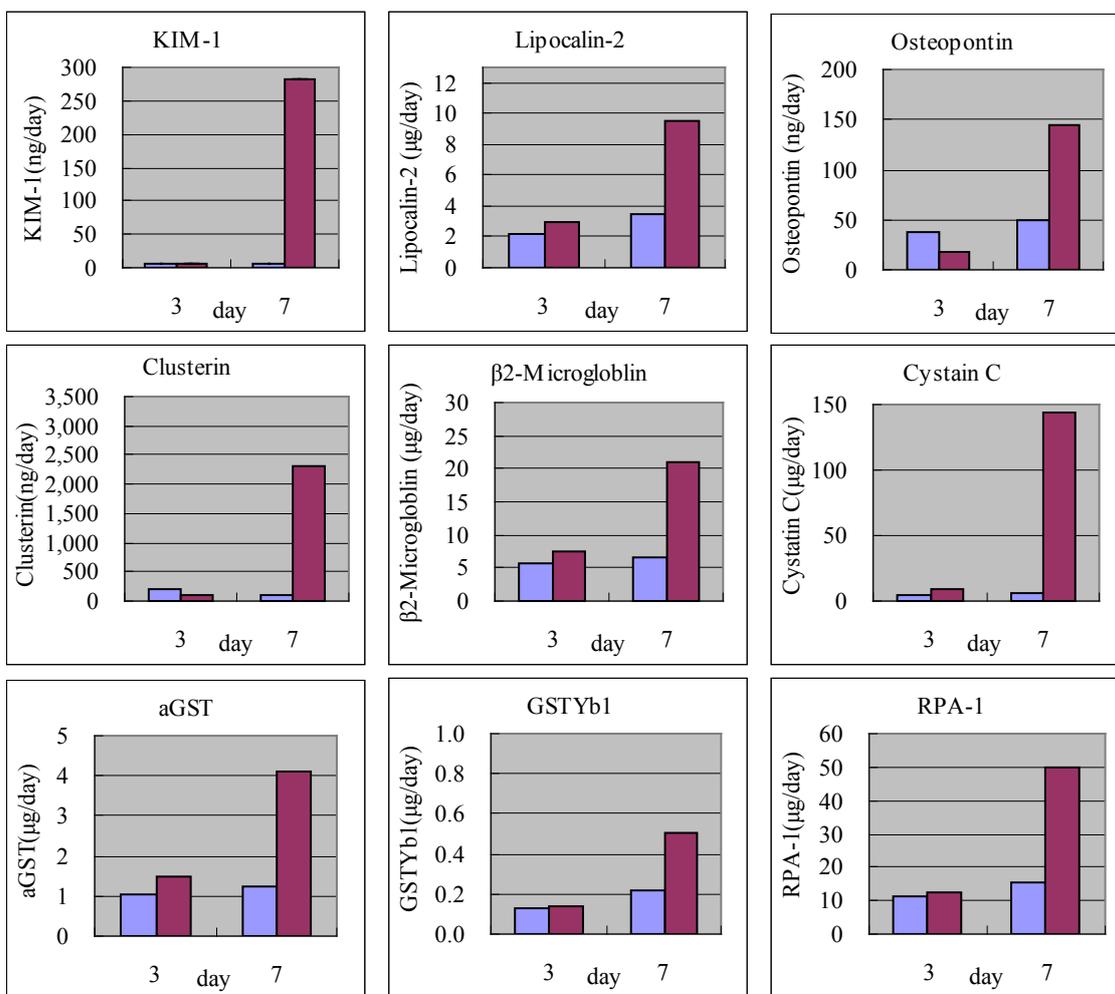
1.腎障害誘発ラット作製

投与動物	雄ラット (CrI:CD(SD))、9 週齢
群構成	PAN 投与群：投与後 3 日解剖群、投与後 7 日解剖群 PAN 非投与群：3 日解剖群、7 日解剖群 各 2 匹
被験物質	Puromycin aminonucleoside (PAN)
投与量、投与方法	PAN 投与群：PAN 100 mg/kg を単回腹腔内投与 PAN 非投与群：生理食塩水を単回腹腔内投与
検査項目	一般症状観察及び病理組織学検査
尿採取	投与後、解剖 16 時間前に絶食・給水条件下で採尿容器に蓄尿を採取

2.バイオマーカー測定

測定項目	Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) Lipocalin-2 (NGAL) Osteopontin (OPN) Clusterin(CLU) β 2-Microglobulin (B2M) Cystatin C (CysC) α GST GSTYb1 Renal Papillary Antigen 1 (RPA-1) 計 9 項目
試料形態	尿
測定方法	ELISA 法、ECL 法

尿中バイオマーカーの定量値は、尿量で補正し、採取した尿全量当たりのバイオマーカー量を、1 日当たりのバイオマーカー量として換算しました。PAN 投与群ラットの尿中バイオマーカーは、非投与群のラットに比べ、投与 7 日目で顕著な上昇が認められました。PAN は、腎臓の糸球体に障害を与える薬剤と知られていますが、腎組織の病理組織学検査の結果、糸球体だけでなく、他の部位の障害も認められました。これは、PAN の投与量が他の部位に影響を及ぼすほどの濃度であったためと推定しております。このことは、マーカー測定の結果において、糸球体障害のマーカーとして知られる B2M だけでなく、尿細管障害のマーカーである他のマーカーの上昇が認められたことから示唆されました。



(凡例 ■ : PAN 非投与群、■ : PAN 投与群)

図2 ラット尿中の各種腎障害バイオマーカー測定

[参考文献]

- (1) European Medicines Agency, Final report on the pilot joint EMEA/FDA VXDS experience on qualification of nephrotoxicity biomarkers. 2008.
- (2) Meso Scale Discovery 社ホームページ <http://www.meso-scale.com/>
- (3) BD 社 Cytometric Bead Array システム (CBA) <http://www.bdj.co.jp/reagent/articles/cba.html>
- (4) Luminex 社ホームページ (ルミネックスシステムについて) <http://www.luminexcorp.com/>

[関連技術リンク]

ECL 法を用いたバイオ医薬品の免疫原性アッセイ

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn371.pdf>

ECL イムノアッセイ法を用いたタンパク医薬品の生体試料中濃度測定

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn359.pdf>