



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102124340 A

(43) 申请公布日 2011.07.13

(21) 申请号 200980120354.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.05.29

G01N 33/53(2006.01)

(30) 优先权数据

2008-144882 2008.06.02 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.11.30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/059872 2009.05.29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/147998 JA 2009.12.10

(71) 申请人 卫材 R&D 管理有限公司

地址 日本东京都

(72) 发明人 小原隆 沟口贞明

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限

公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 7 页

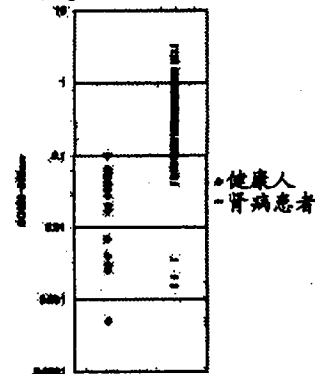
(54) 发明名称

IgA 肾病的检查方法和检查试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种肾病的检查方法,该方法包括从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的复合体检测工序。优选的是,使针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体与来自待测者的尿的试样接触,从而检测所述复合体。本发明的肾病的检查方法的检测灵敏度和特异性良好,能够简便且安全地判断肾病(优选为 IgA 肾病)。

尿中 IgA-尿调制蛋白复合体 ELISA



1. 一种 IgA 肾病的检查方法,其包括:
复合体检测工序,从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体。
2. 如权利要求 1 所述的检查方法,其中,所述复合体检测工序包括:使所述试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。
3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的检查方法,其中,其进一步包括如下工序:
获得所述复合体检测工序中检测的复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量的比率。
4. 如权利要求 3 所述的检查方法,其中,其进一步包括:
判断工序,基于所述比率来判断是否为 IgA 肾病。
5. 一种肾病的检查方法,其包括:
复合体检测工序,从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体。
6. 如权利要求 5 所述的检查方法,其中,所述复合体检测工序包括:使所述试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。
7. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的检查方法,其中,其进一步包括如下工序:基于所述复合体的检测量来判断是否为肾病。
8. 一种 IgA 肾病的检查方法,其包括以下工序:
复合体检测工序,从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体;
第 1 判断工序,基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量、或来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量来判断是否为肾病;
第 2 判断工序,基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量相对于所述试样中的尿蛋白质量的比率来判断所述肾病是否为 IgA 肾病。
9. 如权利要求 1~权利要求 8 中任一项所述的检查方法,其中,所述复合体检测工序为使用针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体的免疫化学方法。
10. 如权利要求 9 所述的检查方法,其中,所述免疫化学方法为夹层法。
11. 一种人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的检测方法,其包括如下工序:使来自待测者的尿的试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。
12. 如权利要求 11 所述的检测方法,其中,利用所述针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体,通过免疫化学方法检测所述复合体。
13. 如权利要求 12 所述的检测方法,其中,所述免疫化学方法为夹层法。
14. 如权利要求 11~权利要求 13 中任一项所述的检测方法,其中,所述待测者为正在发作肾病的人、疑似正在发作肾病的人、或有可能发作肾病的人。
15. 如权利要求 14 所述的检测方法,其中,所述肾病为 IgA 肾病。
16. 一种肾病的检查试剂盒,其至少包含针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体。
17. 如权利要求 15 所述的检查试剂盒,其中,所述肾病为 IgA 肾病。

IgA 肾病的检查方法和检查试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及 IgA 肾病的检查方法和检查试剂盒。

背景技术

[0002] IgA 肾病是 1968 年由 Berger 等人描述的疾病,是在除糖尿病性肾病以外的慢性肾小球肾炎中频率最高的肾病(例如,参照非专利文献 1)。IgA 肾病是长期预后不良的疾病,据推测,需要透析治疗的晚期肾衰竭患者中的约 25% 的起因疾病为 IgA 肾病。以往,即使存在延缓 IgA 肾病的发展的治疗方法,也不存在可治愈的治疗方法。然而,近年来堀田等人确立了一种若早期开始治疗则可获得完全缓解的治疗方法。

[0003] 另一方面,根据“厚生省特定疾病进行性肾功能衰竭研究班和日本肾脏学会的共同委员会(Joint Committee of the Specified Progressive Diseases Investigative Research Division for Progressive Renal Diseases of the Ministry of Health and Welfare and the Japanese Society of Nephrology)”,IgA 肾病的诊断方法以尿检查(持续性显微镜的血尿、持续性或间歇性蛋白尿、肉眼的血尿)、血液检查(血清 IgA 值为 350mg/dl 以上)为辅助性诊断基准,确诊的唯一方法是通过肾活检证明 IgA 在肾小球系膜区的沉积。然而,肾活检需要住院一周左右,而且是出血较多的危险的检查方法,因而受诊率未必能称得上高。现状是需要一种能够通过简便且安全的方法诊断早期的 IgA 肾病的检查方法。

[0004] 另外,作为 IgA 肾病的诊断方法,已知有使用 IgA- 纤连蛋白复合体的方法等(例如,参照日本特开 2000-241431 号公报、日本专利 2592121 号公报、Cederholm et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85 :4865-8, 1988),但目前为止还没有已实用化的方法。

发明内容

[0005] 本发明的课题在于,提供一种检测灵敏度和特异性良好、能够简便且安全地判断 IgA 肾病的 IgA 肾病的检查方法以及检查试剂盒。

[0006] 本发明人等反复深入研究,测定了人尿中的尿调制蛋白和 IgA 的复合体的检测量,结果发现与健康人或除 IgA 肾病以外的肾病患者相比,在 IgA 肾病患者中所述复合体以更高的浓度存在,从而完成了本发明。

[0007] 即,用于解决上述课题的具体方案如下所述。

[0008] 本发明的第 1 方案为一种 IgA 肾病的检查方法,其包括从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的复合体检测工序。所述复合体检测工序优选包括:使所述试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。另外,优选进一步包括如下工序:获得所述复合体检测工序中检测出的所述复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量的比率,更优选进一步包括基于所述比率来判断是否为 IgA 肾病的判断工序。

[0009] 本发明的第 2 方案为一种肾病的检查方法,其包括从来自待测者的尿的试样中检

测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的复合体检测工序。所述复合体检测工序优选包括：使所述试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。

[0010] 本发明的第 3 方案为一种 IgA 肾病的检查方法，其包括以下工序：复合体检测工序，从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体；第 1 判断工序，基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量、或所述试样中的尿蛋白质量来判断是否为肾病；第 2 判断工序，基于所述复合体检测工序中检测出的所述复合体的检测量相对于所述尿试样中的尿蛋白质量的比率来判断所述肾病是否为 IgA 肾病。

[0011] 所述复合体检测工序优选为使用针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体的免疫化学方法，更优选为夹层法。

[0012] 本发明的第 4 方案为一种人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的检测方法，其包括使来自待测者的尿的试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触的工序。优选的是，利用针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体，通过免疫化学方法检测所述复合体，所述免疫化学方法更优选为夹层法。

[0013] 另外所述待测者优选为正在发作肾病的人、疑似正在发作肾病的人、或有可能发作肾病的人，所述肾病更优选为 IgA 肾病。

[0014] 另外，本发明的第 5 方案为一种肾病的检查试剂盒，其至少包含针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体。所述肾病优选为 IgA 肾病。

[0015] 根据本发明，能够提供一种检测灵敏度和特异性良好、能够简便且安全地判断 IgA 肾病的 IgA 肾病的检查方法以及检查试剂盒。

附图说明

[0016] 图 1 为通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值的分布图。

[0017] 图 2 为表示针对通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值的 ROC 分析的结果的图。

[0018] 图 3 为将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的分布图。

[0019] 图 4 为表示针对将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的 ROC 分析的结果的图。

[0020] 图 5 为通过 ECL 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值的分布图。

[0021] 图 6 为表示针对通过 ECL 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值的 ROC 分析的结果的图。

[0022] 图 7 为将通过 ECL 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的分布图。

[0023] 图 8 为表示针对将通过 ECL 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的 ROC 分析的结果的图。

[0024] 图 9 为表示与 anti-IgA 结合珠结合的蛋白质的蛋白印迹法 (Western Blotting) 分析的结果的图。

[0025] 图 10 为通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值的分布图。

[0026] 图 11 为表示针对通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值的

ROC 分析的结果的图。

[0027] 图 12 为将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的分布图。

[0028] 图 13 为表示针对将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA- 尿调制蛋白复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的 ROC 分析的结果的图。

[0029] 图 14 为通过 ELISA 法检测的尿中的人尿调制蛋白的测定值的分布图。

[0030] 图 15 为通过 ELISA 法检测的尿中的人 IgA 的测定值的分布图。

[0031] 图 16 为表示针对通过 ELISA 法检测的尿中的人 IgA 的测定值的 ROC 分析的结果的图。

[0032] 图 17 为将通过 ELISA 法检测的尿中的人 IgA 的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的分布图。

[0033] 图 18 为表示针对将通过 ELISA 法检测的尿中的人 IgA 的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的 ROC 分析的结果的图。

具体实施方式

[0034] 以下, 详细说明本发明的实施方式, 但这些说明并不限定本发明的范围。

[0035] 本发明的肾病的检查方法包括从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的复合体检测工序。通过从所述试样中检测所述复合体, 能够以良好的检测灵敏度和良好的特异性检测待测者的肾病。另外, 所述肾病包括 IgA 肾病和除 IgA 肾病以外的肾病。

[0036] 本发明中, 来自待测者的尿的试样可以是来自待测者采集的尿本身, 也可以是对采集的尿进行了通常所进行的稀释、浓缩等处理后的试样。本发明中, 优选为利用常规方法将由人采集的尿稀释而得的尿试样。

[0037] 此外, 所述来自待测者的尿的试样也可以是使所述尿试样与针对人尿调制蛋白的抗体、或针对人 IgA 的抗体接触而得的试样。

[0038] 人尿调制蛋白 (以下, 有时简称为“尿调制蛋白”) 是肾脏来源的分子量为 85kd 的糖蛋白质。已知尿调制蛋白与 IL1、TNF 结合, 而且作为 IL1 的抑制剂发挥作用, 认为其具有抗炎症作用。此外, 已知其在妊娠过程中的尿中大量存在。

[0039] 另外, 已知尿调制蛋白的蛋白质部分与作为正常人的尿中的主要糖蛋白质的 TH 糖蛋白 (Tamm-Horsfall protein) 的蛋白质部分相同。然而, 关于尿调制蛋白与肾病的关系却一无所知。

[0040] 需要说明的是, 本发明中“人尿调制蛋白”或“尿调制蛋白”包含尿调制蛋白和 TH 糖蛋白。

[0041] 对所述复合体的检测方法没有特别限定, 可以应用通常使用的蛋白质的检测方法, 但优选为能够对所检测的复合体定量或半定量的方法。例如, 可列举出使用与所述复合体结合的抗体的方法、离子交换色谱法、质谱等。

[0042] 本发明中对复合体的检测中使用的装置没有特别限定, 可以根据复合体的检测方法适当选择。具体而言, 例如可列举出 HPLC 仪、质谱仪 (massspectrometry)、电泳仪 (毛细管电泳装置等)、全自动或半自动酶免疫测定仪、比色皿清洗器 (cell washer)、全自动或半

自动化学发光免疫测定仪、发光测定装置、全自动或半自动电化学发光免疫测定仪、光学测定装置、酶标仪 (Plate Reader)、CCD照相机、全自动或半自动荧光免疫测定仪、荧光测定装置、全自动或半自动放射免疫测定仪、液体闪烁计数器、库尔特计数器 (Coulter Counter)、表面等离子体测定装置、印迹装置、光密度计等。

[0043] 本发明中,从检测灵敏度、特异性和简便性的观点出发,优选为使用针对所述复合体的抗体的免疫化学方法。所述针对复合体的抗体只要是能免疫特异性地识别所述复合体并与之结合的抗体,则没有特别限定。例如,可列举出识别所述复合体中的尿调制蛋白与 IgA 的结合部位并与之结合的抗体、识别所述复合体中的尿调制蛋白并与之结合的抗体、和识别所述复合体中的 IgA 并与之结合的抗体等。

[0044] 另外,本说明书中“针对复合体的抗体”是指“识别复合体的抗体”、“与复合体结合的抗体”等抗体中以通常所使用的意义而使用的抗体。即,所述“针对复合体的抗体”与由人尿调制蛋白和人 IgA 构成的复合体的至少一部分结合,形成新的复合体。以下,关于“针对人尿调制蛋白的抗体”、“针对人 IgA 的抗体”等也是同样的。

[0045] 作为本发明中的免疫化学方法,可以没有特别限定地使用通常进行的方法。具体而言,例如可列举出酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、化学发光免疫测定法、电化学发光免疫测定法 (ECL)、吸光度测定、荧光抗体法、放射免疫测定法 (RIA)、表面等离子体共振、蛋白印迹法、斑点印迹 (dot blot) 法等。本发明中,从检测灵敏度、特异性和简便性的观点出发,优选使用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 或电化学发光免疫测定法 (ECL)。

[0046] 作为本发明中的免疫化学方法,从特异性和简便性的观点出发,优选为使用识别所述复合体中的尿调制蛋白并与之结合的抗体、和识别所述复合体中的 IgA 并与之结合的抗体的夹层法。

[0047] 所述夹层法例如可以如下进行。将与所述复合体结合的抗体 (一次抗体) 固定至盘 (plate) 等载体上。通常,为了堵塞盘等的非特异性结合部位,利用酪蛋白等蛋白质或表面活性剂进行封闭操作。接着,添加来自尿的试样或待测试样并进行孵育。将盘等清洗后,添加作为与所述复合体结合的抗体的、经标记的二次抗体,孵育后,清洗盘等,并检测标记,利用上述方法能够进行所述夹层法。

[0048] 本发明中,从检测灵敏度和特异性的观点出发,作为所述一次抗体和所述二次抗体,优选使用选自与所述复合体结合的抗体中的 2 种抗体,更优选使用针对尿调制蛋白的抗体作为所述一次抗体和所述二次抗体中的一种抗体,使用针对人 IgA 的抗体作为另一种抗体。

[0049] 本发明中,与所述复合体结合的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,但从肾病的检测特异性的观点出发,优选为单克隆抗体。

[0050] 与所述复合体结合的抗体可以利用通常进行的方法制备。

[0051] 针对尿调制蛋白的多克隆抗体可以利用通常的制作方法获得,例如可以如下获得。对兔、山羊等动物用尿调制蛋白进行免疫,获得血清。可以通过利用例如硫酸铵沉淀、蛋白 A、蛋白 G 柱、DEAE 离子交换色谱法、偶联了尿调制蛋白的亲合柱等对其进行纯化来制备。

[0052] 本发明中,优选对尿调制蛋白特异性更高的抗体,其是利用通常进行的方法 (例如吸收操作等) 从使用人尿调制蛋白制作的抗体中除去了与除尿调制蛋白以外的抗原结

合的抗体后的抗体。

[0053] 另外,针对尿调制蛋白的单克隆抗体可以利用通常的制作方法获得。例如,对小鼠等小动物用尿调制蛋白进行免疫。从该小鼠中取出脾脏,将其研碎分离细胞,利用聚乙二醇等试剂与小鼠骨髓瘤细胞融合。从由此形成的融合细胞(杂交瘤)中选择产生与尿调制蛋白结合的抗体的克隆。接着,将所选择的杂交瘤移植至小鼠腹腔内,从该小鼠中回收腹水。可以通过利用例如硫酸铵沉淀、蛋白 A、蛋白 G 柱、DEAE 离子交换色谱法、偶联了尿调制蛋白的亲合柱等对所得到的单克隆抗体进行纯化来制备。

[0054] 另外,作为针对尿调制蛋白的抗体,还可以使用市售的抗人 TH 糖蛋白抗体、抗人尿调制蛋白抗体等。此外,所述针对尿调制蛋白的单克隆抗体也可以是如上述那样得到的来自小鼠等小动物的抗体、嵌合抗体、人源化抗体、和全人抗体等中任一种。

[0055] 另外,作为针对人 IgA 的抗体,只要是能够与所述复合体中的 IgA 结合的抗体则没有特别限定,可以是识别人 IgA 的 H 链、J 链、分泌片(secretory component)等中任一种的抗体。

[0056] 另外,针对人 IgA 的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,但从复合体的检测特异性的观点出发,优选为针对人 IgA 的单克隆抗体。

[0057] 所述针对人 IgA 的单克隆抗体可以使用人 IgA 作为抗原,与上述针对尿调制蛋白的抗体同样地进行制备。另外,作为针对人 IgA 的抗体,还可以使用市售的抗人 IgA 抗体。此外,所述针对人 IgA 的单克隆抗体也可以是如上述那样得到的来自小鼠等小动物的抗体、嵌合抗体、人源化抗体、和全人抗体等中任一种。

[0058] 对所述标记没有特别限定,可以使用公知的标记。例如,可列举出酶、化学发光物质、电化学发光物质、放射性物质等。

[0059] 本发明中,从检测灵敏度和简便性的观点出发,优选使用酶或电化学发光物质作为所述标记。

[0060] 作为所述酶,只要是能够利用物理方法、化学法定量的酶则没有特别限定。例如,可列举出碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素酶(luciferase)等酶。

[0061] 另外,标记的检测方法只要是能够将标记定量或半定量的检测方法则没有特别限定,可以根据标记适当选择。例如,可列举出吸光度、发光强度、荧光强度、辐射计数等。

[0062] 可以通过对标记定量或半定量,来对所述复合体定量或半定量。

[0063] 在通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)利用吸光度检测标记从而进行本发明的复合体检测工序的情况下,作为本发明优选使用的测定所述复合体的检测量的测定装置,可列举出以下吸光度测定装置:该吸光度测定装置能够测定与复合体结合的标记所产生的色素的吸光度,该吸光度测定装置具备:放置含有由标记产生的色素的试样的试样放置部;对所述试样照射光的光照射部;接受来自所述试样的反射光和透射光的至少任一种,并测定所接受的光量的光量测定部。

[0064] 本发明中,利用所述光照射部,对含有通过与样本(来自待测者的尿的试样)中所含的人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体结合的标记所产生的色素的试样照射光,并利用光量测定部对所述色素的吸光度进行定量化,从而能够测定样本中人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的存在量。

[0065] 另外,还可以不测定吸光度,而通过检测来自试样的发光来进行所述标记的检测。

该情况下,可以不使用所述吸光度测定装置,而使用与后述的电化学发光免疫测定法中所用的装置相同的装置。

[0066] 在利用电化学发光免疫测定法 (ECL) 通过来自试样的发光的测定来检测标记,从而进行本发明的复合体检测工序的情况下,作为本发明优选使用的测定所述复合体的检测量的测定装置,可列举出以下测定装置:该测定装置能够测定由与复合体结合的标记自身或由反应液中的标记的底物发出的光,该测定装置具备:放置含有标记的试样的试样放置部;接受来自所述试样的发光,并测定所接受的光量的光量测定部。

[0067] 本发明中,利用所述光量测定部,对由含有与样本中所含的人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体结合的标记的试样所发出的光进行定量化,能够测定样本中人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的存在量。

[0068] 本发明的肾病的检查方法优选包括判断工序,即,基于所述来自尿的试样中所含的所述复合体的检测量来判断肾病。作为本发明中的所述复合体的检测量,只要是所述来自尿的试样中所含的所述复合体的浓度或与其对应的定量值或半定量值,则可以没有特别限定地使用。例如,可列举出直接测定所述复合体的检测量的测定值、介由标记的检测而间接测定所述复合体的检测量的测定值等。

[0069] 另外,本发明的肾病的检查方法中,在检查 IgA 肾病的情况下,用于判断为 IgA 肾病中的复合体的检测量优选为复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的总尿蛋白质量的比率。所述比率既可以是将复合体的检测量的测定值除以来自待测者的尿的试样中的总尿蛋白质量的测定值所得到的值,也可以是以相对于总尿蛋白质量的相对值的形式所得到的复合体的检测量。通过基于该比率进行判断,能够以更高的灵敏度和特异性判断 IgA 肾病。

[0070] 另外,测定总尿蛋白质量的来自待测者的尿的试样既可以从相同的待测者得到的试样,也可以是与用于所述复合体的检测的来自尿的试样不同的试样。

[0071] 本发明的肾病的检查方法中的判断工序优选包括以下工序:对由来自待测者的尿的试样检测出的尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的检测量、和作为对照的由来自正常人的尿的试样检测出的所述复合体的检测量进行比较的工序;将所述来自待测者的尿的试样中的所述复合体的检测量大于作为对照的来自正常人的尿的试样中的所述复合体的检测量的情况与肾病关联的工序。

[0072] 此处作为对照的正常人是指预先明确没有发作肾病的个体。另外,检测量大是指,与为了区别正常人和肾病患者而设定的正常检测量(分界值, cut-off value)相比,来自待测者的所述复合体的检测量更大。

[0073] 所述分界值例如可以通过将来自肾病患者的尿的试样组中的所述复合体的检测量、与作为对照的来自正常体组的尿的试样组中的所述复合体的检测量付之于 ROC 分析等来进行设定。ROC 分析是能够评价例如疾病的检查方法的检测能力、诊断能力的分析方法,是日本临床检查自动化学会会志“临床检查的诊断有用性评价手册”Ver. 1. 3(2004. 9. 1)、Vol. 29Suppl. 1(通卷第 154 号)(2004 年 9 月 1 日发行)中记载的分析方法。

[0074] 另外,分界值例如还可以在正常人的检测水平的平均值上加上 2 倍或 3 倍的标准偏差而得的值的形式来确定,此外,可以适当确定为均衡地满足灵敏度(检测率)和特异性(假阳性率低的程度)的值。

[0075] 作为本发明中的肾病,例如,可列举出 IgA 肾病 (IgAN)、膜性肾病 (MN)、狼疮性肾炎 (SLE)、局灶性肾小球硬化症 (FGS)、微小病变性肾病综合征 (MCNS)、糖尿病性肾病 (DMN)、淀粉样变性、遗传性肾病 (Alport)、燃尽性 IgA 肾病 (IgA 肾病的自然缓解状态)、膜性增生性肾小球肾炎 (MPGN)、与抗中性粒细胞胞质抗体 (ANCA) 相关的肾炎、薄基底膜肾病 (TBMD)、肾硬化症等。

[0076] 本发明的肾病的检查方法可以通过检测尿中的所述复合体来检测以 IgA 肾病为首的各种肾病。

[0077] 本发明的 IgA 肾病的检查方法的特征在于包括以下工序:从来自待测者的尿的试样中检测尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的复合体检测工序;基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量、或来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量来判断肾病的判断工序;基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量的比率将所述肾病判断为 IgA 肾病的判断工序。

[0078] 通过基于所述复合体的检测量相对于来自尿的试样中的总蛋白质量的比率来判断 IgA 肾病,能够高灵敏度且高特异性地判断 IgA 肾病,即使在通过治疗介入而得到完全缓解的初期阶段,也能够简便且安全地判断 IgA 肾病。

[0079] 本发明中的复合体检测工序与所述肾病的检查方法中的复合体检测工序相同。

[0080] 另外,尿蛋白质量的检测方法只要能够测定来自尿的试样中的总蛋白质量则没有特别限定,可以应用通常进行的对来自尿的试样的蛋白质进行检测的方法。例如,可以应用金井光正等人著的“临床检查法概要改订版第 32 版”、173 ~ 174 页、2005 年中记载的方法。

[0081] 本发明中的第 1 判断工序中,基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量来判断肾病的工序与所述肾病的检查方法中的判断工序相同。

[0082] 另外,基于所述来自尿的试样中的尿蛋白质量来判断肾病的工序优选包括以下工序:将来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量大于为了区别正常人和肾病患者而设定的正常检测量(分界值)的情况与肾病关联。

[0083] 此处,尿蛋白质量的正常检测量可以利用通常的方法设定。

[0084] 本发明中的第 2 判断工序优选包括以下工序:对来自待测者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率(复合体/总蛋白质)、和作为对照的来自除 IgA 肾病以外的肾病患者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率进行比较的工序;将所述来自待测者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率大于作为对照的来自除 IgA 肾病以外的肾病患者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率的情况与 IgA 肾病关联的工序。

[0085] 此处,比率大是指,与为了区别 IgA 肾病和除 IgA 肾病以外的肾病而设定的分界值相比,来自待测者的尿的试样中的所述复合体的检测量比率更大。

[0086] 所述分界值可以与上述肾病的检查方法中的分界值同样设定,但从检测特异性的观点出发,优选基于 ROC 分析的结果设定分界值。

[0087] 本发明的 IgA 肾病的检查方法中测定尿中的所述复合体的检测量和总蛋白质量,能够基于所述复合体的检测量相对于所述总蛋白质量的比率检测 IgA 肾病,因此是简便且安全的 IgA 肾病的检查方法。

[0088] 本发明的人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体的检测方法包括使来自待测者的尿的试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触的工序。由此能够以高灵敏度且高特异性检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体。

[0089] 本发明的复合体的检测方法中,在所述肾病的检查方法的复合体检测工序中说明的事项也能同样地适用。

[0090] 另外,所述待测者优先为正在发作肾病的人、疑似正在发作肾病的人、或有可能发作肾病的人。此处所述的有可能发作肾病的人是指,并非正在发作肾病的人或疑似正在发作肾病的人中任一种的所有的人。另外所述肾病更优选为 IgA 肾病。

[0091] 本发明的肾病的检查试剂盒的特征在于,其含有至少 1 种针对人尿调制蛋白的抗体和至少 1 种针对人 IgA 的抗体。通过使用所述针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体来检测来自尿的试样中的人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体,能够以良好的检测灵敏度和特异性判断肾病。

[0092] 本发明的肾病的检查试剂盒中除了所述抗体以外,优选进一步包括操作说明书,该操作说明书中记载了如下步骤:使来自待测者的尿的试样与针对人尿调制蛋白的抗体和针对人 IgA 的抗体接触,检测人尿调制蛋白和人 IgA 的复合体,将其检测量与肾病关联。

[0093] 本发明的肾病的检查试剂盒可以更优选作为 IgA 肾病的检查用试剂盒使用。

[0094] 日本国申请号第 2008-144882 号的全部公开内容作为参考引入到本说明书中。

[0095] 关于本说明书中记载的全部文献、专利申请和技术标准,与具体且分别记载了将各文献、专利申请和技术标准作为参考而引入的情况同样程度地作为参考引入到本说明书中。

[0096] 实施例

[0097] 以下,通过实施例来具体说明本发明,但本发明不限于于这些实施例。另外,只要没有特别说明,则“%”为质量基准。

[0098] [实施例 1]

[0099] < 肾病的检测 >

[0100] ~基于 ELISA 法的尿中 IgA- 尿调制蛋白复合体的检测~

[0101] 利用 PROSEP-A(MILLIPORE 社制造)纯化抗人 TH 糖蛋白(Tamm-Horsfall protein)抗体(Cedarlane Laboratories 社制造)后,进一步用 50mM Tris/HCl(pH7.5)、0.15M NaCl 透析,将纯化的纯化抗体用 50mM Tris/HCl(pH7.5)、0.15M NaCl 稀释至 5 μ g/ml ~ 10 μ g/ml 的浓度后,以 50 μ l/孔注入 PolySorp 杯(NUNC 社制造)中。将杯放入湿润盒中,在 4℃ 包被一晚。包被后,用清洗液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20)清洗 3 次,以 150 μ l/孔注入封闭液(50% N102(日本油脂社制造)、25mM Tris/HCl(pH7.5)、75mM NaCl、2% Block Ace(大日本住友制药社制造))后,在室温封闭 2 小时或在 4℃ 封闭 1 天以上(以下,称为“anti-Tamm-Horsfall 杯”)。

[0102] 将 anti-Tamm-Horsfall 杯用清洗液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20)清洗 3 次,以 50 μ l/孔注入经样本稀释液(50% N102(日本油脂社制造)、50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、2% Block Ace(大日本住友制药社制造))稀释了 50 倍的尿样本,在室温反应 1 小时。用清洗液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20)清洗 3 次后,以 50 μ l/孔注入用 Can Get Signal2(TOYOB0 社制造)稀释了 3000 倍的 HRP-GOATAnti-Human IgA(Zymed 社制造),在室温反应 1 小时。用清洗液清洗 3 次后,以

100 μ l/孔注入 ELISA 用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 液体底物系统 (SIGMA 社制造), 在室温反应 30 分钟。以 100 μ l/孔注入 0.5M H_2SO_4 停止反应后, 测定 OD(450-650nm)。对于包括 95 例 IgA 肾病患者在内的 147 例肾病患者和 20 例健康人 (正常人) 进行测定的结果示于图 1。

[0103] 通过对减去了空白的值进行比较, 得到能够显著区别包括 95 例 IgA 肾病患者在内的 147 例肾病患者和 20 例健康人的结果。

[0104] 另外, 针对 147 例肾病患者和 20 例健康人进行了 ROC 分析。ROC 曲线示于图 2。由 ROC 曲线求得的分界值为 0.066, 由该分界值求出的 147 例肾病患者和 20 例健康人的阳性率的结果示于表 1。如表 1 所示, 在 147 例肾病患者中阳性为 134 例 (91.2%), 在 20 例健康人中阳性为 1 例 (5%), 能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 91.2%, 特异度 (特异性) 为 95%, 诊断效率为 91.6%。

[0105] [表 1]

[0106]

	肾病患者	健康人
样本数	147	20
阳性数	134	1
阳性率	91.2%	5.0%

[0107] <IgA 肾病的检测>

[0108] 接着, 对于显示出分界值以上的显色值的样本, 通过邻苯三酚红法对尿中的尿蛋白浓度进行定量。将上述得到的复合体检测量的值除以尿蛋白浓度, 算出单位尿蛋白量的复合体检测量。结果示于图 3。通过比较单位尿蛋白量的复合体检测量, 得到能够显著区别 86 例 IgA 肾病患者和 47 例除 IgA 肾病以外的肾病患者们的结果。

[0109] 另外, 对于 86 例 IgA 肾病患者和 47 例除 IgA 肾病以外的肾病患者进行 ROC 分析, 结果得到图 4 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 6.5。将由该分界值求出的 86 例 IgA 肾病患者和 47 例除 IgA 肾病以外的肾病患者的阳性率的结果示于表 2。如表 2 所示, 在 86 例 IgA 肾病患者中阳性为 62 例 (72.1%), 在 47 例除 IgA 肾病以外的肾病患者中阳性为 13 例 (27.7%), 能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 72.1%, 特异度为 72.3%, 诊断效率为 72.2%。

[0110] [表 2]

[0111]

	IgA 肾病	除 IgA 肾病以外的肾病
样本数	86	47
阳性数	62	13
阳性率	72.1%	27.7%

[0112] [实施例 2]

[0113] < 肾病的检测 >

[0114] ~基于电化学发光 (ECL) 法的尿中 IgA- 尿调制蛋白复合体的检测~

[0115] 用磁铁捕获 30mg/ml 的 Dynabeads M-450Epoxy (Invitrogen 社制造) 1ml, 用 1ml 的 PBS-1 (10mM 磷酸钾缓冲液、150mM NaCl、pH7.8) 清洗 5 次。接着, 在用磁铁捕获的珠中加入在用上述 PBS-1 对纯化抗人 TH 糖蛋白 (Tamm-Horsfall protein) 抗体 (Cedarlane Laboratories 社制造) 进行透析后制备为 0.2mg/ml 的浓度的溶液 1ml, 在 25℃ 混合 20 小时。

[0116] 接着, 用磁铁捕获上述得到的珠, 用 1ml 的上述 PBS-1 清洗后, 加入含有 1% BSA 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)、150mM NaCl, 在室温混合 2 小时。用磁铁捕获珠, 用 1ml 的上述 PBS-1 清洗 5 次后, 悬浮于含有 0.1% BSA 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)、150mM NaCl 中 (以下, 称为“anti-Tamm-Horsfall 结合珠”)。

[0117] 将 24.3 μg 的钆络合物 (Igen 社制造) 和 1.425mg 的 GOAT Anti-Human IgA (Cappel 社制造) 在室温遮光下混合 30 分钟, 添加 25 μl 的 2M 甘氨酸 /PBS-1, 在室温遮光下混合 10 分钟后, 用 Sephadex G-25 柱凝胶过滤, 将在抗人 IgA 抗体上结合有钆络合物的级分 (以下, 称为“anti-IgA 钆标记抗体”) 蓄积起来。

[0118] 将 30mg/ml 的 anti-Tamm-Horsfall 结合珠用样本稀释液 (50% N102 (日本油脂)、50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药)) 稀释 60 倍 (0.5mg/ml)。另外, 将 anti-IgA 钆标记抗体用 Can GetSignal2 (TOYOBO 社制造) 稀释, 制备为 0.5 μg/ml 浓度。将 60 倍稀释的 anti-Tamm-Horsfall 结合珠和制备为 0.5 μg/ml 浓度的 anti-IgA 钆标记抗体分别设置于专用架上。在反应管中注入 200 μl 的样本稀释液, 接着分别添加 5 μl 样本并混合搅拌。在专用的反应管架上装入反应管, 在电化学发光法自动测定装置 (PICOLUMI 系列, 三光纯药社制造) 中设置试剂和样本, 以第一反应时间 9 分钟、第二反应时间 9 分钟的反应条件自动测定。对于包括 88 例 IgA 肾病患者在内的 128 例肾病患者和 19 例健康人进行测定的结果示于图 5。

[0119] 对从测定计算值减去空白值的值进行比较时, 得到能够显著区别包括 88 例 IgA 肾病患者在内的 128 例肾病患者和 19 例健康人的结果。

[0120] 另外, 针对包括 88 例 IgA 肾病患者在内的 128 例肾病患者和 19 例健康人进行 ROC 分析, 结果得到图 6 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 510.3。由该分界值求出的包括 88 例 IgA 肾病患者在内的 128 例肾病患者和 19 例健康人的阳性率的结果示于表 3。如表 3 所示, 在 128 例肾病患者中阳性为 109 例 (85.2%), 在 19 例健康人中阳性为 3 例 (15.8%), 能够显著地区别两者。另外此时的灵敏度为 85.2%, 特异度为 84.2%, 诊断效率为 85.0%。

[0121] [表 3]

[0122]

	肾病患者	健康人
样本数	128	19
阳性数	109	3
阳性率	85.2%	15.8%

[0123] <IgA 肾病的检测>

[0124] 接着,对于测定计算值减去空白值的值显示为分界值以上的值的样本,利用邻苯三酚红法对尿中的蛋白浓度进行定量。将上述得到的复合体检测量的值除以尿蛋白浓度,算出单位尿蛋白量的复合体检测量。结果示于图 7。由图 7 可知,能够显著区别 77 例 IgA 肾病患者和 32 例除 IgA 肾病以外的肾病患者。

[0125] 另外,针对 77 例 IgA 肾病患者和 32 例除 IgA 肾病以外的肾病患者进行 ROC 分析,结果得到图 8 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 39.525。将由该分界值求出的 77 例 IgA 肾病患者和 32 例除 IgA 肾病以外的肾病患者的阳性率的结果示于表 4。如表 4 所示,在 77 例 IgA 肾病患者中阳性为 58 例 (75.3%),在 32 例除 IgA 肾病以外的肾病患者中阳性为 9 例 (28.1%),能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 75.3%,特异度为 71.9%,诊断效率为 74.3%。

[0126] [表 4]

[0127]

	IgA 肾病	除 IgA 肾病以外的肾病
样本数	77	32
阳性数	58	9
阳性率	75.3%	28.1%

[0128] [实施例 3]

[0129] <尿中的尿调制蛋白-IgA 复合体中所含的尿调制蛋白基于蛋白印迹法的分析>

[0130] 用磁铁捕获 30mg/ml 的 Dynabeads M-450 Epoxy (Invitrogen 社制造) 1ml,用 1ml 的 PBS-1 (10mM 磷酸钾缓冲液、150mM NaCl、pH7.8) 清洗 3 次后,在用磁铁捕获的珠中加入在用上述 PBS-1 对抗人 IgA 抗体 (Cappel 社制造) 进行透析后制备为 0.2mg/ml 的浓度的溶液 1ml,在 25℃ 混合 1 昼夜。

[0131] 用磁铁捕获所得到的珠,用 1ml 的上述 PBS-1 清洗后,加入含有 1% BSA 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)、150mM NaCl,在 4℃ 混合 1 昼夜。用磁铁捕获珠,用 1ml 的上述 PBS-1 清洗 3 次后,悬浮于含有 0.1% BSA 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)、15mM NaCl 中 (以下,称为“anti-IgA 结合珠”)。

[0132] 同样地,用磁铁捕获 30mg/ml 的 Dynabeads M-450Epoxy 1ml,用 1ml 的上述 PBS-1 清洗 3 次后,在用磁铁捕获的珠中加入含有 1% BSA 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)、150mM NaCl,在 4℃ 混合 1 昼夜。用磁铁捕获所得到的珠,用 1ml 的上述 PBS-1 清洗 3 次后,

悬浮于含有 0.1% BSA 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)、150mM NaCl 中 (以下,称为“BSA 结合珠”)。

[0133] 在 45ml 的尿样品中加入 2.5ml 的 1M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5)、1.5ml 的 5M NaCl, 此外加入 0.25ml 的 anti-IgA 结合珠或 BSA 结合珠,在 4℃ 混合 1 昼夜。分别用磁铁捕获珠,用 50ml 至 1ml 的上述 PBS-1 清洗 5 次后,加入 0.5ml 的 0.1M 柠檬酸缓冲液 (pH3),在室温混合 30 分钟。用磁铁捕获珠并回收上清,用 1/10 浓度的上述 PBS-1、0.01% NaN₃ 透析后,离心浓缩为约 10 倍的浓度,制备成蛋白质溶液。

[0134] 取制备的蛋白质溶液 3 μ l 实施 SDS-PAGE,印迹于硝化纤维素滤膜 (Schleicher&Schuell、BA85) 上。将滤膜浸渍于封闭液 (50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、5% 脱脂乳、0.01% Tween20、0.1% NaN₃) 中,在 4℃ 振荡一晚后,更换封闭液。以 1/1000 浓度加入作为一次抗体的抗尿调制蛋白抗体 (抗人 TH 糖蛋白单克隆抗体 (Cedarlane Laboratories, Ltd.)),在室温振荡 2 小时,用清洗液清洗 3 次。接着以 1/1000 浓度在清洗液中加入作为二次抗体的 HRP 标记抗小鼠 IgG (Zymed Laboratories, Inc.),在室温振荡 1 小时,用清洗液清洗 3 次后,加入显色液 (8.3mM Tris-HCl (pH6.5)、125mM NaCl、0.05% 4-氯-1-萘酚,0.01% H₂O₂) 使其显色。

[0135] 将与上述得到的 anti-IgA 结合珠结合的蛋白质基于蛋白印迹法分析的结果示于图 9。另外,图 9 中,泳道 C 泳动 10 μ g 纯化尿调制蛋白,泳道 1~3 泳动 IgA 肾病患者尿的与 anti-IgA 结合珠结合的蛋白质。

[0136] 在来自 IgA 肾病患者的样本的所有例子中,确认到很强的尿调制蛋白的条带。即,确认到在从 IgA 肾病患者的尿中通过抗 IgA 抗体而免疫沉淀的抗原-IgA 复合体中,无一例外地含有尿调制蛋白。

[0137] 由以上内容示出,在 IgA 肾病患者的尿中的抗原-IgA 复合体中,含有尿调制蛋白,确认到通过利用抗尿调制蛋白抗体和抗 IgA 抗体的夹层法来诊断 IgA 肾病是妥当的。

[0138] [实施例 4]

[0139] < 肾病的检测 >

[0140] ~基于 ELISA 法的尿中 IgA-尿调制蛋白复合体的检测 2、对不同样本组的评价~

[0141] 除了使用与实施例 1 的样本组不同的样本组以外,与实施例 1 同样地利用 ELISA 法进行尿中 IgA-尿调制蛋白复合体的检测。但是,作为复合体量的测定值,不利用显色值,而利用如下制作的标准物质 (人 IgA-人尿调制蛋白复合体) 中的显色值,使用将样本中的复合体量换算为标准物质的浓度的值。

[0142] (人 IgA-人尿调制蛋白复合体的制作)

[0143] 将 100 μ l 的 2mg/ml 人 IgA (Cortex 社制造) /PBS-1 (10mM 磷酸钾缓冲液、150mM NaCl、pH7.8) 和 100 μ l 的 1mg/ml 人 TH 糖蛋白 (Cortex 社制造) /PBS-1 混合,加入 20 μ l 的戊二醛 (TAAB LABORATORIESEQUIPMENT LIMITED 社制造) 溶液 (0.5% /PBS-1),在 25℃ 混合 2 小时后,用 PBS-1 透析,以所得物质作为人 IgA-人尿调制蛋白复合体标准物质。

[0144] 针对由包括 32 例 IgA 肾病患者在内的 74 例肾病患者和 6 例健康人 (正常人) 得到的样本,测定尿中 IgA-尿调制蛋白复合体,结果示于图 10。

[0145] 通过对减去了空白的值进行比较,得到了能够显著区别包括 32 例 IgA 肾病患者在内的 74 例肾病患者和 6 例健康人的结果。

[0146] 另外,针对 74 例肾病患者和 6 例健康人进行 ROC 分析。ROC 曲线示于图 11。以特异性为 100%的方式确定的分界值为 0.064,将由该分界值求出 74 例肾病患者和 6 例健康人的阳性率的结果示于表 5。如表 5 所示,在 74 例肾病患者中阳性为 67 例 (90.5%),在 6 例健康人中阳性为 0 例 (0%),能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 90.5%,特异度为 100%,诊断效率为 91.3%。

[0147] [表 5]

[0148]

	肾病患者	健康人
样本数	74	6
阳性数	67	0
阳性率	90.5%	0.0%

[0149] <IgA 肾病的检测>

[0150] 接着,对于检测到分界值以上的复合体的样本,利用邻苯三酚红法对尿中的尿蛋白浓度进行定量。将上述得到的复合体检测量的值除以尿蛋白浓度,算出单位尿蛋白量的复合体检测量。结果示于图 12。通过比较单位尿蛋白量的复合体检测量,得到能够显著区别 31 例 IgA 肾病患者和 36 例除 IgA 肾病以外的肾病患者结果。

[0151] 另外,对 31 例 IgA 肾病患者和 36 例除 IgA 肾病以外的肾病患者进行 ROC 分析,结果得到图 13 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 0.13。将由该分界值求出的 31 例 IgA 肾病患者和 36 例除 IgA 肾病以外的肾病患者的阳性率的结果示于表 6。如表 6 所示,在 31 例 IgA 肾病患者中阳性为 24 例 (77.4%),在 36 例除 IgA 肾病以外的肾病患者中阳性为 5 例 (13.9%),能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 77.4%,特异度为 86.1%,诊断效率为 82.1%。

[0152] 尤其是在临床诊断上难以通过鉴别与 IgA 肾病区分的 8 例遗传性肾病 (Alport)、4 例 IgA 肾病的自然治愈例 (燃尽 IgA 肾病) 中,所有例子均判断为阴性,显示出在临床诊断上非常有效。

[0153] [表 6]

[0154]

	IgA 肾病	除 IgA 肾病以外的肾病
样本数	31	36
阳性数	24	5
阳性率	77.4%	13.9%

[0155] [参考例 1]

[0156] <肾病的检测>

[0157] ~基于 ELISA 法的尿中尿调制蛋白的检测~

[0158] 利用过氧化物酶标记试剂盒 -NH₂ (DOJINDO MOLECULARTECHNOLOGIES, Inc), 根据试剂盒附带的手册对抗人 TH 糖蛋白 (Tamm-Horsfall protein) 抗体 (绵羊, 多克隆, Biotrend Chemikalien GmbH 社制造) 进行过氧化物酶标记 (以下, 称为“过氧化物酶标记抗人 TH 糖蛋白抗体”)。

[0159] 将上述得到的 anti-Tamm-Horsfall 杯用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl, 0.01% Tween20) 清洗 3 次, 以 50 μ l/孔注入用样本稀释液 (50% N102 (日本油脂社制造)、50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药社制造)) 稀释了 1,000 至 10,000 倍的尿样本, 在室温反应 1 小时。用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次后, 以 50 μ l/孔注入用 Can Get Signal2 (TOYOBO 社制造) 稀释 1000 倍的过氧化物酶标记抗人 TH 糖蛋白抗体, 在室温反应 1 小时。用清洗液清洗 3 次后, 以 100 μ l/孔注入 ELISA 用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 液体底物系统 (SIGMA 社制造), 在室温反应 30 分钟。以 100 μ l/孔注入 0.5M H₂SO₄ 停止反应后, 测定 OD (450-650nm)。对于包括 32 例 IgA 肾病患者在内的 74 例肾病患者和 6 例健康人进行测定的结果示于图 14。

[0160] 对减去了空白的值进行比较, 但结果无法区别包括 32 例 IgA 肾病患者在内的 74 例肾病患者和 6 例健康人。

[0161] [参考例 2]

[0162] <肾病的检测>

[0163] ~基于 ELISA 法的尿中 IgA 的检测~

[0164] 将抗人免疫球蛋白抗体 (山羊, poly anti-Human Ig's, BIOSOURCE 社制造) 用 50mM Tris/HCl (pH7.5)、0.15M NaCl 稀释为 10 μ g/ml 的浓度后, 以 50 μ l/孔注入 PolySorp cup (NUNC 社制造)。将杯放入湿润盒中, 在 4°C 包被一晚。包被后, 用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次, 并以 150 μ l/孔注入封闭液 (50% N102 (日本油脂社制造)、25mM Tris/HCl (pH7.5)、75mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药社制造)) 后, 在室温封闭 2 小时或在 4°C 封闭 1 天以上 (以下, 称为“anti-Ig's 杯”)。

[0165] 将 anti-Ig's 杯用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次, 并以 50 μ l/孔注入用样本稀释液 (50% N102 (日本油脂社制造)、50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药社制造)) 稀释了 1,000 倍的尿样本, 在室温反应 1 小时。用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次后, 以 50 μ l/孔注入用 Can Get Signal2 (TOYOBO 社制造) 稀释了 1000 倍的 HRP 标记抗人 IgA 抗体 (Zymed 社制造), 在室温反应 1 小时。用清洗液清洗 3 次后, 以 100 μ l/孔注入 ELISA 用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 液体底物系统 (SIGMA 社制造), 在室温反应 30 分钟。以 100 μ l/孔注入 0.5M H₂SO₄ 停止反应后, 测定 OD (450-650nm)。对于包括 32 例 IgA 肾病患者在内的 74 例肾病患者和 6 例健康人进行测定的结果示于图 15。

[0166] 通过对减去了空白的值进行比较, 虽然与测定尿调制蛋白 -IgA 复合体的情况相比稍差, 但得到了能够显著区别包括 32 例 IgA 肾病患者在内的 74 例肾病患者和 6 例健康人的结果。

[0167] 另外, 针对 74 例肾病患者和 6 例健康人进行 ROC 分析。ROC 曲线示于图 16。以特异度为 100% 的方式确定的分界值为 0.418, 将由该分界值求出 74 例肾病患者和 6 例健康

人的阳性率的结果示于表 7。如表 5 所示,在 74 例肾病患者中阳性为 64 例 (86.5%),在 6 例健康人中阳性为 0 例 (0%),能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 86.5%,特异度为 100%,诊断效率为 87.5%。

[0168] [表 7]

[0169]

	肾病患者	健康人
样本数	74	6
阳性数	64	0
阳性率	86.5%	0.0%

[0170] <IgA 肾病的检测 >

[0171] 接着,对于包括 32 例 IgA 肾病患者在内的 74 例肾病患者,利用邻苯三酚红法对尿中的尿蛋白浓度进行定量。将上述得到的 IgA 检测量的值除以尿蛋白浓度,算出单位尿蛋白量的 IgA 检测量。结果示于图 17。另外,针对 32 例 IgA 肾病患者和 42 例除 IgA 肾病以外的肾病患者进行 ROC 分析,结果得到图 18 所示的 ROC 曲线。通过比较单位尿蛋白量的 IgA 检测量,难以显著区别 32 例 IgA 肾病患者和 42 例除 IgA 肾病以外的肾病患者。

[0172] 由上述内容可知,通过检测尿中存在的人 IgA 和人尿调制蛋白的复合物,能够识别健康人(正常人)和肾病患者。

[0173] 另外,通过测定尿中存在的人 IgA 和人尿调制蛋白的复合物的单位尿蛋白浓度的检测量,能够识别 IgA 肾病和除此之外的肾病。

[0174] 另一方面,在单独测定尿中存在的人尿调制蛋白的情况下,无法识别健康人(正常人)和肾病患者,在单独测定尿中存在的人 IgA 的情况下,能够识别健康人(正常人)和肾病患者,但无法通过测定单位尿蛋白浓度的检测量来识别 IgA 肾病和除此之外的肾病。

尿中IgA-尿调制蛋白复合体 ELISA

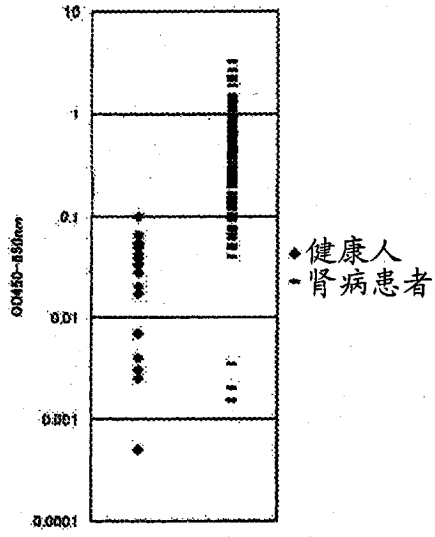


图 1

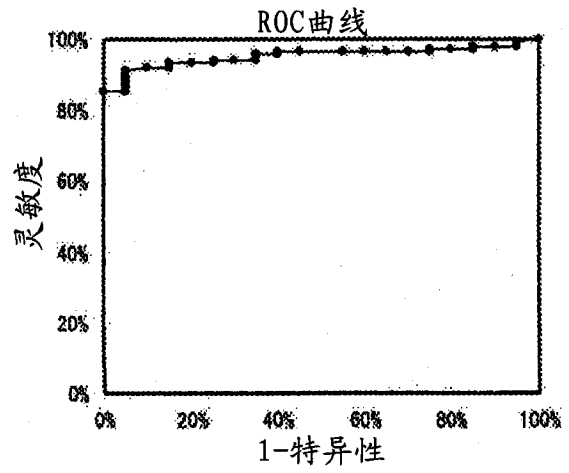


图 2

尿中IgA-尿调制蛋白复合体 ELISA
(蛋白质浓度修正)

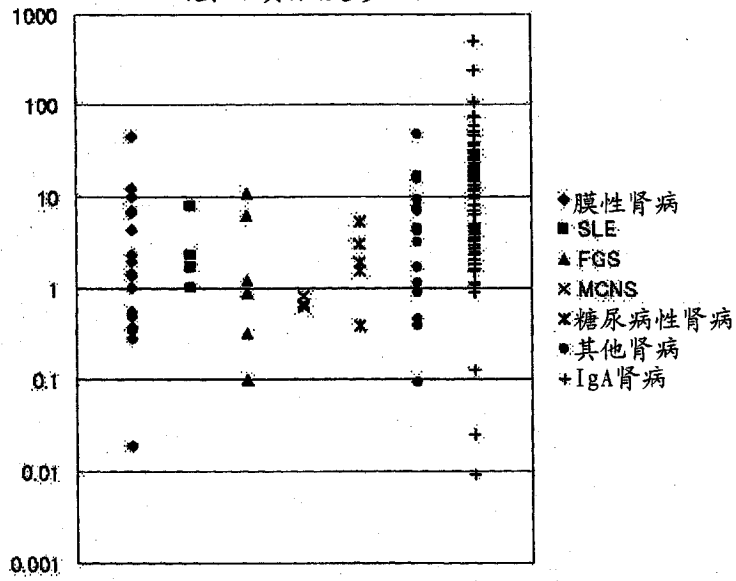


图 3

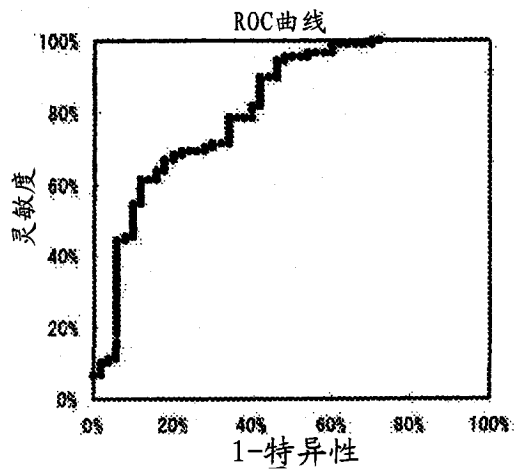


图 4

尿中IgA-尿调制蛋白复合体 ECL

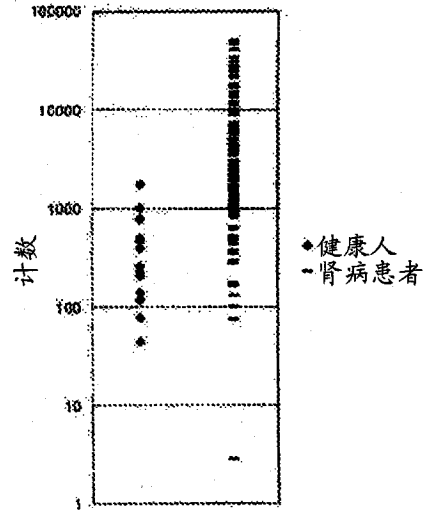


图 5

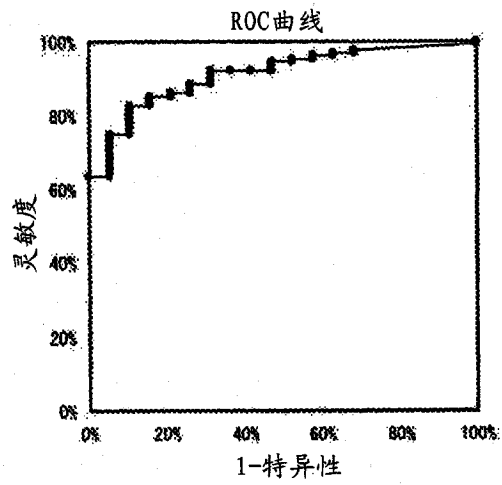


图 6

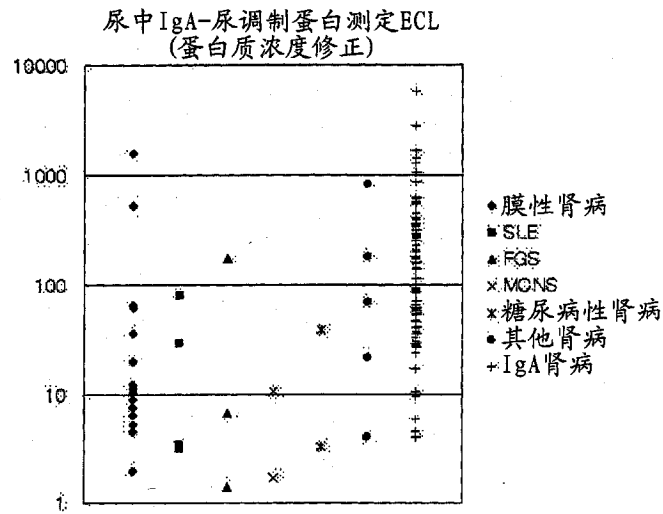


图 7

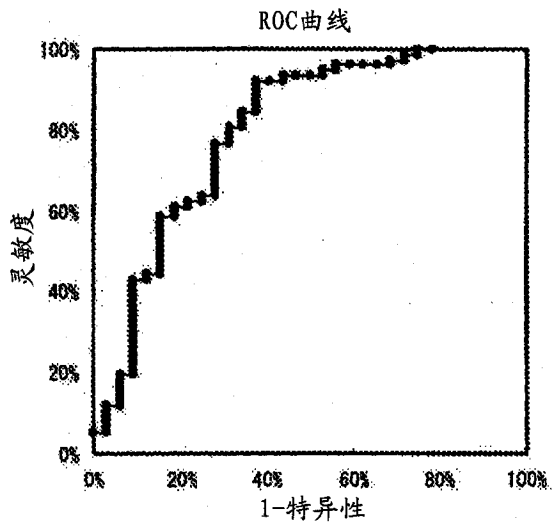


图 8

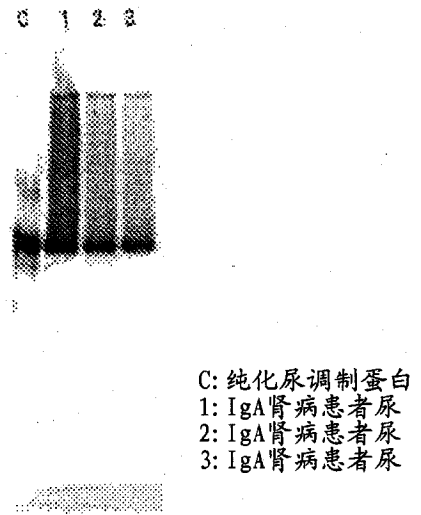


图 9

尿中IgA-尿调制蛋白复合体测定ELISA(2)

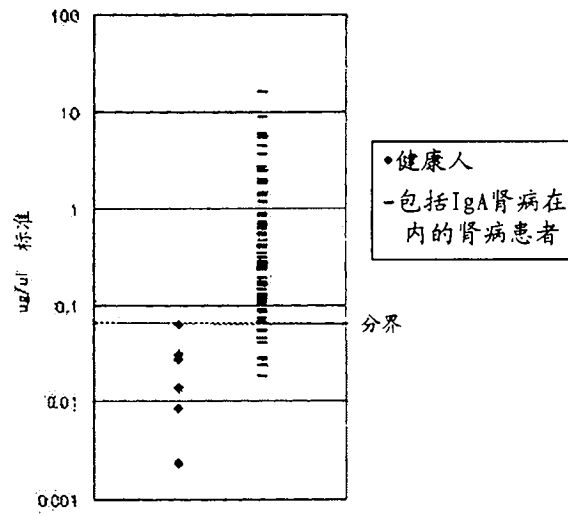


图 10

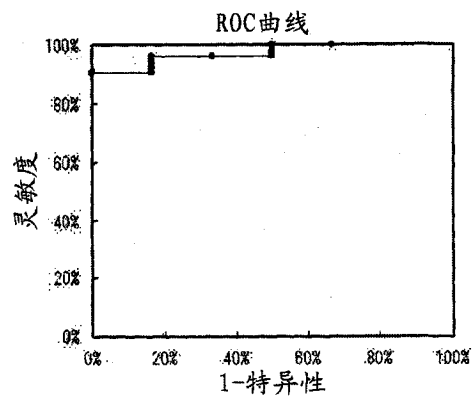


图 11

尿中IgA-尿调制蛋白复合体测定ELISA(蛋白质浓度修正)

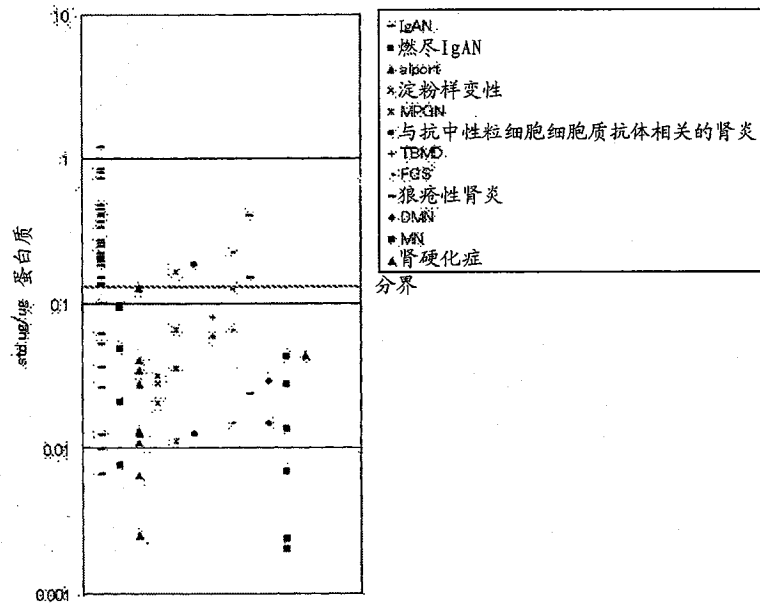


图 12

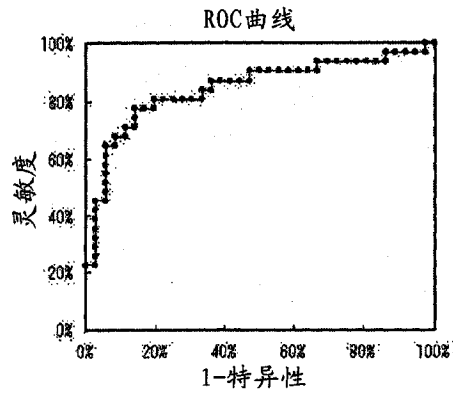


图 13

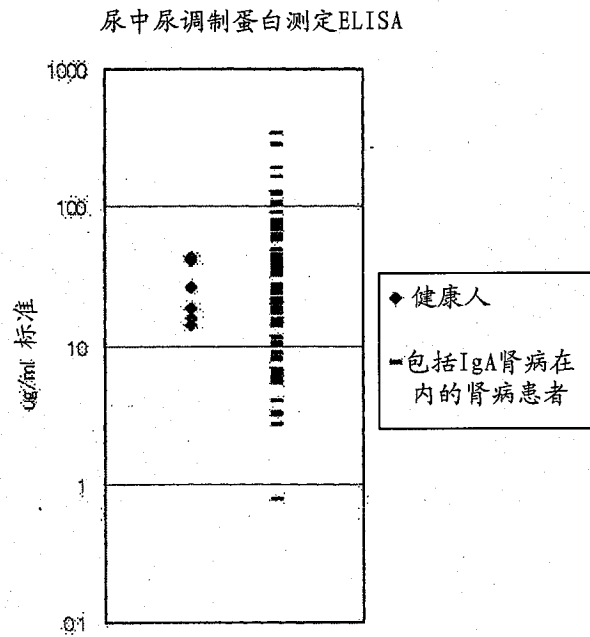


图 14

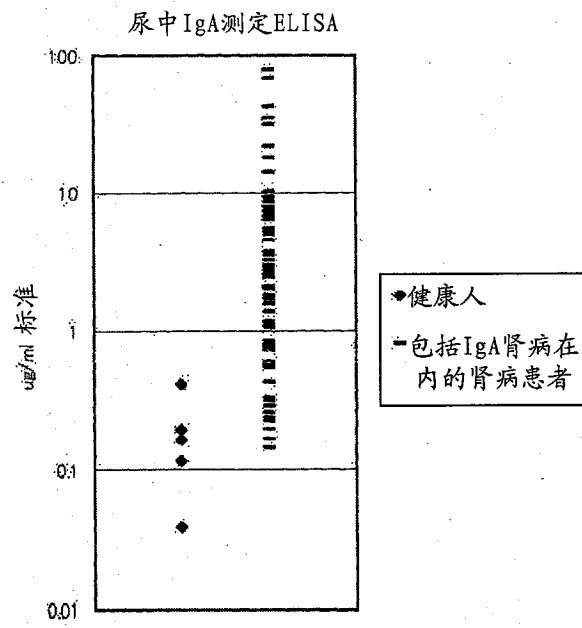


图 15

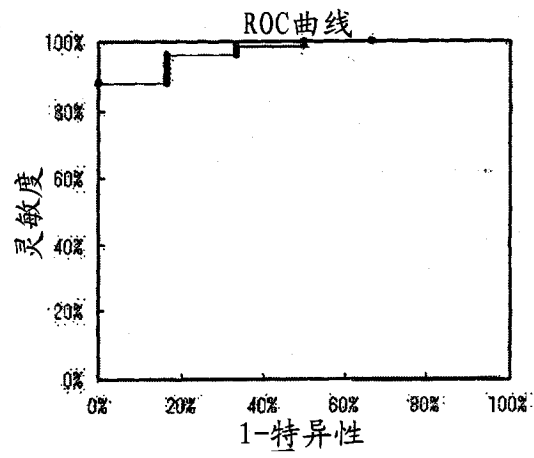


图 16

尿中IgA测定ELISA(蛋白质浓度修正)

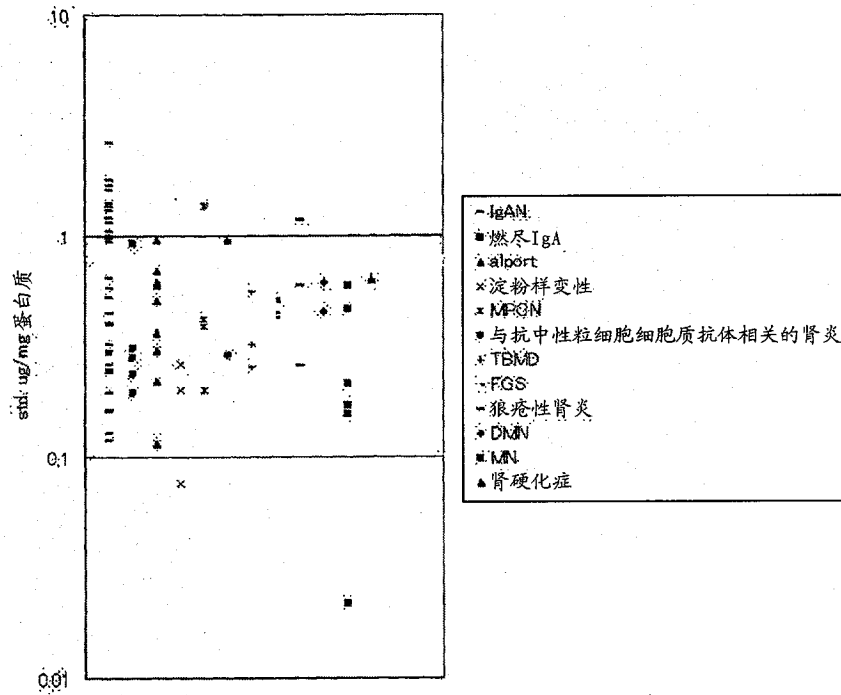


图 17

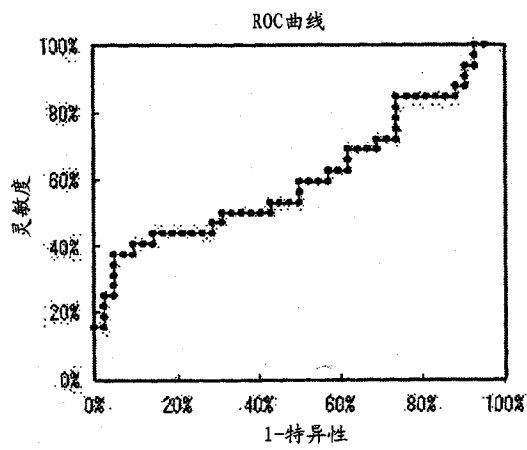


图 18

专利名称(译)	IgA肾病的检查方法和检查试剂盒		
公开(公告)号	CN102124340A	公开(公告)日	2011-07-13
申请号	CN200980120354.7	申请日	2009-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材R&D管理有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	卫材R&D管理有限公司		
[标]发明人	小原隆 沟口贞明		
发明人	小原隆 沟口贞明		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/6854 G01N2800/347		
优先权	2008144882 2008-06-02 JP		
其他公开文献	CN102124340B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种肾病的检查方法，该方法包括从来自待测者的尿的试样中检测人尿调制蛋白和人IgA的复合体的复合体检测工序。优选的是，使针对人尿调制蛋白的抗体和针对人IgA的抗体与来自待测者的尿的试样接触，从而检测所述复合体。本发明的肾病的检查方法的检测灵敏度和特异性良好，能够简便且安全地判断肾病(优选为IgA肾病)。

尿中IgA-尿调制蛋白复合体 ELISA

