

(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2006-38536

(P2006-38536A)

(43) 公開日 平成18年2月9日(2006.2.9)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/53

(2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

D

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2004-216510 (P2004-216510)	(71) 出願人	000118497
(22) 出願日	平成16年7月23日 (2004.7.23)		伊藤ハム株式会社
			兵庫県神戸市灘区備後町3丁目2番1号
		(71) 出願人	503096591
			学校法人酪農学園
			北海道江別市文京台緑町582番地
		(71) 出願人	304027419
			堂浦 克美
			宮城県仙台市太白区三神峯1丁目3-4-501
		(74) 代理人	110000051
			特許業務法人共生国際特許事務所
		(72) 発明者	横 田 博
			北海道江別市文京台緑町582番地 酪農学園大学獣医学部獣医生化学教室内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体外診断キット及び体外診断方法

(57) 【要約】

【課題】哺乳動物における生体由来材料のうち血液、尿、脳脊髄液、或いは末梢組織などのように比較的容易に採取可能な材料を用いることができ、クロイツフェルト・ヤコブ病、牛海綿状脳症、スクレイピー、鹿慢性消耗性疾患、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー (Gerstmann - Straussler - Scheinker) 症候群、致死性家族性不眠症等のプリオン病を含む退行性神経変性疾患の発症早期における段階から検出可能な体外診断キット及び体外診断方法を提供する。

【解決手段】抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を備える。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を備えた哺乳動物におけるプリオン病の体外診断キット。

【請求項 2】

前記生体由来成分が血液中に含まれる成分であることを特徴とする請求項 1 に記載の体外診断キット。

【請求項 3】

前記プリオン病の 1 次スクリーニングに用いられるものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の体外診断キット。

10

【請求項 4】

前記プリオン病が、クロイツフェルト・ヤコブ病 (C J D)、牛海綿状脳症 (B S E)、スクレイピー、鹿慢性消耗性疾患 (C W D)、伝達性ミンク脳症 (T M E)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー (G e r s t m a n n - S t r a u s s l e r - S c h e i n k e r) 症候群、致死性家族性不眠症から 1 以上選ばれたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の体外診断キット。

【請求項 5】

前記哺乳動物が、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、シカ、オオジカ、ミンク、ブタ、サル、マウス、ラット、ハムスター、ネコから選ばれたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の体外診断キット。

20

【請求項 6】

前記プリオン病が、反芻類哺乳動物におけるプリオン病であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の体外診断キット。

【請求項 7】

前記検出材が生体由来成分の染色標識剤、又は発色標識剤、又は化学発光標識剤、又は生物発光標識剤、又は蛍光標識剤を含んで成ることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の体外診断キット。

【請求項 8】

前記検出材が、前記抗 F a s 抗体に結合可能なアミノ酸配列を有する蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成ることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の体外診断キット。

30

【請求項 9】

前記検出材が、クローニングした哺乳動物 F a s 遺伝子から得られた哺乳動物 F a s 蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成ることを特徴とする請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の体外診断キット。

【請求項 10】

抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を用いる哺乳動物におけるプリオン病の体外診断方法。

【請求項 11】

前記生体由来成分が血液中に含まれる成分であることを特徴とする請求項 10 に記載の体外診断方法。

40

【請求項 12】

前記プリオン病の 1 次スクリーニングに用いることを特徴とする請求項 10 又は 11 に記載の体外診断方法。

【請求項 13】

前記プリオン病が、クロイツフェルト・ヤコブ病 (C J D)、牛海綿状脳症 (B S E)、スクレイピー、鹿慢性消耗性疾患 (C W D)、伝達性ミンク脳症 (T M E)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー (G e r s t m a n n - S t r a u s s l e r - S c h e i n k e r) 症候群、致死性家族性不眠症から 1 以上選ばれたものであることを特徴とする請求項 10 乃至 12 のいずれかに記載の体外診断方法。

50

【請求項 14】

前記哺乳動物が、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、シカ、オオジカ、ミンク、ブタ、サル、マウス、ラット、ハムスター、ネコから選ばれたものであることを特徴とする請求項 10 乃至 13 のいずれかに記載の体外診断方法。

【請求項 15】

前記プリオン病が、反芻類哺乳動物におけるプリオン病であることを特徴とする請求項 10 乃至 14 のいずれかに記載の体外診断方法。

【請求項 16】

前記検出材が生体由来成分の染色標識剤、又は発色標識剤、又は化学発光標識剤、又は生物発光標識剤、又は蛍光標識剤を含んで成ることを特徴とする請求項 10 乃至 15 のいずれかに記載の体外診断方法。 10

【請求項 17】

前記検出材が、前記抗 Fas 抗体に結合可能なアミノ酸配列を有する蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成ることを特徴とする請求項 10 乃至 16 のいずれかに記載の体外診断方法。

【請求項 18】

前記検出材が、クローニングした哺乳動物 Fas 遺伝子から得られた哺乳動物 Fas 蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成ることを特徴とする請求項 10 乃至 17 のいずれかに記載の体外診断方法。

【発明の詳細な説明】 20

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物におけるプリオン病の体外診断キット及び体外診断方法に係り、特に、哺乳動物の生体材料のうち血液、尿、脳脊髄液、或いは末梢組織などのように比較的容易に採取可能な材料を用いることができ、プリオン病の発症早期における段階から検出可能な体外診断キット及び体外診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

哺乳動物のプリオン病には、ヒトにおける代表的疾患としてクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の外、遺伝性プリオン病であるゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群（Gerstmann-Strausler-Scheinker Syndrome: GSS）や、致死性家族性不眠症、クールー（Kuru）などがある。CJD は、病因が不明の散发性 CJD、遺伝性の家族性 CJD、ウシ海綿状脳症（BSE）からの経口感染による変異型 CJD〔例えば、非特許文献 1 参照〕、ヒト下垂体の抽出製剤やヒト由来硬膜、角膜等を介する感染による医原性 CJD などに区分されるが、異常型プリオン蛋白（PrP^{Sc}）が中枢神経系に蓄積する点では共通している。一方、変異型 CJD では、扁桃などのリンパ組織にも PrP^{Sc} が認められている〔例えば、非特許文献 2 参照〕。BSE は、ヒツジやヤギのスクレイピー臓器などにより汚染した配合飼料からの感染によるものとされており、スクレイピーと同様に中枢神経系などに変性を認め PrP^{Sc} が沈着するが、リンパ組織に PrP^{Sc} の沈着が認められない点でスクレイピーとは異なっている〔例えば、非特許文献 3 参照〕。 30 40

【0003】

このような、哺乳動物におけるプリオン病の診断方法として、ヒトのプリオン病では、変異型 CJD の場合、扁桃などのリンパ組織生検材料について免疫組織化学的な検査が提案されている〔例えば、非特許文献 2 参照〕。散发性 CJD では、脳脊髄液に、14-3-3 蛋白質が特異的に増加すること〔例えば、非特許文献 4 参照〕、また、神経細胞特異的エノラーゼ（Neuron-Specific Enolase）などが補助的診断マーカーとして知られている。

【0004】

BSE については、これまで組織病理学的、臨床学的、疫学的方法を用いて検出が行わ 50

れており、脳幹（延髄）組織を採取し、正常プリオン蛋白（PrP^C）ではプロテイナーゼK（PK）により完全に分解されるが、PrP^{Sc}の凝集体ではPKで分解した後に残る「PrP²⁷⁻³⁰」と呼ばれるフラグメントをプリオン蛋白質（PrP^C、PrP^{Sc}）特異抗体と反応させることにより異常プリオンを検出する検査キットが市販されている〔例えば、非特許文献5参照〕。また、例えば、組織の病理学的変化について、検体の赤外線スペクトルを参考データベースと比較し、分類することを特徴とする診断方法〔例えば、特許文献1参照〕、一価抗体との反応を利用する異常プリオン蛋白定量方法〔例えば、特許文献2参照〕、BSEの発症前又は発症後の血液から濃縮した標的白血球細胞における、プリオン蛋白質、インターフェロン、ラミニン受容体又はラミニン前駆体などのマーカー蛋白質の発現を免疫試験などにより決定し、対照と比較する方法〔例えば、特許文献3参照〕などが提案されている。 10

【0005】

上述のような哺乳動物プリオン病、すなわちスクレイピー、BSE、CJD、CWD、MTEなどは、神経変性疾患における伝染性海綿状脳症（TSEs: Transmissible Spongiform Encephalopathies）とも呼ばれる。87Vスクレイピーの脳内接種によって感染させたスクレイピーマウスの実験において、異常プリオン蛋白の蓄積に先立ち、アポトーシスに関与しCD95又はAPO-1とも呼ばれるFasや、カスパーゼ3（Caspase 3）の早期誘導が認められたことが報告されている〔例えば、非特許文献6参照〕。また、散発性CJD及びオリブ・橋・小脳萎縮症の患者小脳について免疫組織化学的方法により、Fas、Fasリガンド（FasL）、ERK、MEK、Bcl-2、Bax、N-myc、c-myc、プロカスパーゼ-2、カスパーゼ-3の発現を調べた結果、これら蛋白質の過剰発現が、神経変性における細胞死の経路でアポトーシスとは別の機能を持つ可能性が示唆されている〔例えば、非特許文献7参照〕外、TSE以外の退行性（進行性）神経変性疾患についてもアポトーシスに関連する多くの研究がなされている。 20

【0006】

なお、主要なアポトーシス誘導因子となるFasは、ヒト線維芽細胞（FS-7）でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体が細胞を殺すことから、このマウスモノクローナル抗体に対する抗原として発見され〔例えば、非特許文献8参照〕、そのcDNAクローニングからアミノ酸配列が確認されており、細胞膜貫通部分を有し細胞表層に存在するTNFレセプターファミリーに属する細胞膜貫通部分を含むI型膜蛋白質であることが明らかとなっている〔例えば、非特許文献9、非特許文献10、特許文献4参照〕。また、マウスFas遺伝子や、ウシFas遺伝子もクローニングされている〔例えば、非特許文献11、非特許文献12参照〕。 30

【0007】

【特許文献1】特表2003-500648号公報

【特許文献2】特開2003-121448号公報

【特許文献3】特表2002-543389号公報

【特許文献4】米国特許第5874546号明細書

【非特許文献1】Will, R. G. et al; Lancet Vol. 347, p 921-925 (1996) 40

【非特許文献2】Hill, A. F. et al; Lancet Vol. 349, p 99-100 (1997)

【非特許文献3】O'Rourke, K. I. et al; J. Clin. Microbiol. Vol. 38, pp 3254-3259 (2000)

【非特許文献4】Hsieh, G. et al; N. Eng. J. Med. Vol. 335, pp 924-930 (1996)

【非特許文献5】能田健、永井英貴、平沢緑著、獣医畜産新報、56巻、9号、719~725頁、2003年

【非特許文献6】Elizabeth Jamieson et al; Neuroch 50

emistry Vol. 12、No. 16、pp 3567 - 3572 (2001)

【非特許文献7】Puig, B. et al; Acta Neuropathol. Vol. 102、pp 207 - 215 (2001)

【非特許文献8】Yonehara, S. et al; J. Exp. Med. Vol. 169、pp 1747 - 1756 (1989)

【非特許文献9】Ito, N. et al; Cell Vol. 66、pp 233 - 243 (1991)

【非特許文献10】Nagata, S. et al; Cell Vol. 88、pp 355 - 365 (1997)

【非特許文献11】Watanabe - Fukunaga R. et al; J. Immunol. Vol. 148、pp 1274 - 1279 (1992) 10

【非特許文献12】Yoo, J. et al; DNA Cell Biol. Vol. 15 (3)、pp 227 - 234 (1996)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

変異型CJDでは、非特許文献2に示されているように扁桃などのリンパ組織を採取し、PrPScを検出することで生前診断も可能ではあるが、侵襲性が高く実用的とはいえず、また、散発性CJDでは、非特許文献4の14-3-3蛋白質をマーカーとする診断法は感度は高いものの、他のヒトプリオン病の場合と同様、脳のMRI検査などと共に補助的な脳脊髄液検査の一つとして適用されるに留まり、最終的には脳生検あるいは剖検時脳病理検査による確定診断が行われている。スクレイピーにおいても変異型CJDの診断の場合と同様、非特許文献3に示されるようにリンパ組織に分布するPrPScを検出し生前診断を行うこともできるが、実用的ではないという問題があった。BSEについては、非特許文献5、特許文献1、特許文献2などを含む殆どの検査法は、PrPScが中枢神経系に沈着し、血液や末梢リンパ組織には実質的に分布しないことから、生前診断としての実施は困難であった。また、特許文献3などのように血液を材料として発症前後における診断を行う方法もあるが、標的血球細胞の濃縮などの工程が必要となり操作が繁雑であること、その他、尿中のPrPScを検出する方法等においても十分な感度が得にくいことなどから、大規模な簡易スクリーニングに適用できるプリオン病、特にBSEの診断方法、診断キットが望まれている。 20 30

【0009】

本発明は、上記のような状況に鑑みてなされたものであり、哺乳動物の生体材料のうち血液、尿、脳脊髄液、或いは末梢組織などのように比較的容易に採取可能な材料を用いることができ、プリオン病の発症早期における段階から検出可能な体外診断キット及び体外診断方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記目的を達成するため、本発明による哺乳動物におけるプリオン病の体外診断キットは、抗Fas抗体を含む生体由来成分の検出材を備えたことを特徴とする。このような体外診断キットにおいて、生体由来成分が血液中に含まれる成分であることが好ましく、また、プリオン病の1次スクリーニングに用いられるものであることが良く、さらに、哺乳動物が、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、シカ、オオジカ、ミンク、ブタ、サル、マウス、ラット、ハムスター、ネコから選ばれたものであっても良く、さらにまた、プリオン病が、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、牛海綿状脳症(BSE)、スクレイピー、鹿慢性消耗性疾患(CWD)、伝達性ミンク脳症(TME)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー(Gerstmann - Straussler - Scheinker)症候群、致死性家族性不眠症から1以上選ばれたものであることが好適である。そして、プリオン病が、反芻類哺乳動物におけるプリオン病であることが好ましく、また、検出材が生体由来成分の染色標識剤、又は発色標識剤、又は化学発光標識剤、又は生物発光標識剤 40 50

、又は蛍光標識剤を含んで成ることができ、さらに、検出材が、前記抗 F a s 抗体に結合可能なアミノ酸配列を有する蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成ることが好ましく、さらにまた、検出材が、クローニングした哺乳動物 F a s 遺伝子から得られた哺乳動物 F a s 蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成ることができる。

【 0 0 1 1 】

また、上記目的を達成するため、本発明による哺乳動物におけるプリオン病の体外診断方法は、抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を用いることを特徴とする。この哺乳動物におけるプリオン病の体外診断方法において、生体由来成分が血液中に含まれる成分であることが良く、また、プリオン病の 1 次スクリーニングに用いることが好適であり、さらに、哺乳動物が、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、シカ、オオジカ、ミンク、ブタ、サル、マウス、ラット、ハムスター、ネコから選ばれたものであることが良く、さらにまた、プリオン病が、クロイツフェルト・ヤコブ病 (C J D)、牛海綿状脳症 (B S E)、スクレイピー、鹿慢性消耗性疾患 (C W D)、伝達性ミンク脳症 (T M E)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー (G e r s t m a n n - S t r a u s s l e r - S c h e i n k e r) 症候群、致死性家族性不眠症から 1 以上選ばれたものであることが好ましい。そして、プリオン病が、反芻類哺乳動物におけるプリオン病であることが良く、また、検出材が生体由来成分の染色標識剤、又は発色標識剤、又は化学発光標識剤、又は生物発光標識剤、又は蛍光標識剤を含んで成ることができ、さらに、検出材が、前記抗 F a s 抗体に結合可能なアミノ酸配列を有する蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成ることが好ましく、さらにまた、検出材が、クローニングした哺乳動物 F a s 遺伝子から得られた哺乳動物 F a s 蛋白質又はその部分ペプチドを含んで成っても良い。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明の哺乳動物におけるプリオン病の体外診断キット及び体外診断方法によれば、プリオン病の発症早期に哺乳動物の生体中、特に血液、尿、脳脊髄液や末梢組織などに現れる抗 F a s 抗体を検出可能な検出材を備え、また、このような検出材を用いるため、プリオン病発症早期における生前診断が可能である。また、容易に診断対象の生体由来材料が採取でき、血清、血漿、尿、脳脊髄液などを検体として簡便に抗 F a s 抗体の検出が可能であることから、プリオン病の大規模スクリーニングにも適用できる。

【 0 0 1 3 】

また、本発明は、哺乳動物プリオン病の発症に伴い抗 F a s 抗体を含む生体由来成分が血液中などに出現、増加することを、P r P S c を脳内接種したマウスを用いた実験によって確認したことに起因するもので、その作用機序は不明ではあるが、プリオン病はアポトーシスが関与する神経変性疾患であることから、本発明の体外診断キット及び体外診断方法は、退行性神経変性疾患のスクリーニングにも用いることができる。さらに、各プリオン病を含む神経変性疾患に特異的な診断マーカーと組み合わせることにより、各神経変性疾患毎の生前診断を行うこともできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 4 】

以下、本発明の哺乳動物におけるプリオン病の体外診断キット及び体外診断方法を実施するための最良の形態について、図面を参照して詳細に説明する。

【 0 0 1 5 】

〔第 1 の実施形態〕

第 1 の実施形態による哺乳動物プリオン病の体外診断キット及び体外診断方法は、抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を備え、また、抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を用いるものである。生体由来成分は、血液、尿、脳脊髄液や末梢組織など哺乳動物診断対象個体からの生体由来材料検体に含まれる成分であり容易に採取可能である。血液は血清又は血漿検体とすることができる。本実施形態では、抗 F a s 抗体を含む生体由来成分について、公知の分離材、分離装置などを用いた分離方法により抗 F a s 抗体と他の生体由来成分が分離した状態とすることができ、この場合における検出材としては、抗

F a s 抗体を含む生体由来成分を検出可能であれば、染色標識剤、発色標識剤（酵素標識剤と基質剤を組み合わせたものを含む）、化学発光標識剤、生物発光標識剤、蛍光標識剤など如何なる検出材も使用できる。また、これらの標識剤の2種以上を組み合わせた検出材としても良い。

【0016】

さらに、検出材に加えて分離材及び／又は分離装置を組み合わせた体外診断キットとすることもできる。ここで、分離材及び／又は分離装置による抗F a s抗体と他の生体由来成分の分離方法としては、如何なる公知の分離方法も使用可能である。例えば、寒天、アガロース、デンプン、ポリアクリルアミドゲル（PAGE）、ドデシル硫酸ナトリウム添加ポリアクリルアミドゲル（SDS-PAGE）などのスラブゲル電気泳動、ディスク電気泳動、キャピラリー電気泳動、等速電気泳動、等電点電気泳動（IEF）、濾紙電気泳動やセルロースアセテート膜電気泳動、ゲルビーズ電気泳動、免疫電気泳動、また、これらゲル担体（分離剤）についてゲル密度勾配やpH勾配等を持たせたグラジエントゲルなどによる電気泳動法、さらに、これらのうち2種以上の電気泳動法の組み合わせや、2次元電気泳動法など公知の各種電気泳動法を適用することができる。このような電気泳動による分離法、分離材、分離装置を用いる際の各種詳細条件は、〔Laemmli, U. K. et al; Nature London Vol. 227、p680（1970）〕、〔Davis, B. et al; Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 121、p404（1964）〕、〔奥山典生ら；蛋白質 核酸 酵素別冊「等電点電気泳動と等速電気泳動」 共立出版（1978）〕、〔Kohn, J. et al; Clin. Chim. Acta. Vol. 2、p297（1957）〕、〔Shapiro, A. L. et al; Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 28、p815（1967）〕、〔Weber, K. et al; J. Biol. Chem. Vol. 244、p4406（1969）〕、〔真鍋ら；「免疫実験操作法」日本免疫学会出版 Vol. 12、p3807（1983）〕、〔O'Farrell, P. H. et al; J. Biol. Chem. Vol. 250、p4007（1975）〕、〔Manabe, T. et al; J. Biochem. Vol. 85、p649（1979）〕、〔日本生化学会編、「基礎生化学実験法；第3巻、タンパク質I」、東京化学同人（2001）〕などに準じて実施することができる。

【0017】

電気泳動法の外、超遠心分離法、異方性濾過膜やホロファイバーを用いる限外濾過法、高性能液体クロマトグラフ法（HPLC）を含む各種クロマトグラフ法〔イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過とも呼ばれるサイズ排除（Size Exclusion: SE）クロマトグラフィー、疎水性（Hydrophobic: HIC）クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング（等電点クロマトグラフィー）、アフィニティークロマトグラフィー、逆相（Reversed Phase: RP）クロマトグラフィー等〕も使用することが可能である。このようなクロマトグラフなどの分離法、分離材、分離装置を用いる際の各種詳細条件は、〔日本生化学会編、「生化学実験講座1；タンパク質の化学」、東京化学同人（1976）〕、〔日本生化学会編、「生化学実験講座5；酵素研究法」、東京化学同人（1975）〕、〔日本生化学会編、「続生化学実験講座2；タンパク質の化学」、東京化学同人（1987）〕、〔日本生化学会編、「新生化学実験講座1；タンパク質I」、東京化学同人（1990）〕、〔日本生化学会編、「基礎生化学実験法；第3巻、タンパク質I」、東京化学同人（2001）〕などに準じて実施することができる。

【0018】

このような分離法のうち、例えば、分子量と等電点、分子量と特定物質への親和性又は吸着性又は疎水性、等電点と特定物質への親和性又は吸着性など2種類の異なる分離原理に基づく分離方法の組み合わせ（SDS-PAGE又はSE-HPLCと等電点電気泳動又はクロマトフォーカシング、SDS-PAGE又はSE-HPLCとアフィニティークロマトグラフィー又は吸着クロマトグラフィー又はHI又はRT-HPLC、pHグラジエ

ト (I E F) ・ S D S - P A G E 2 次元電気泳動法など) が好ましく、分離後の検出操作性、感度、陰性対照との比較が肉眼で可能な点などでは、p H グラジエント (I E F) ・ S D S - P A G E 2 次元電気泳動法がより好ましく、本実施形態ではこのような 2 次元電気泳動法を採用した。泳動後の検出は、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、ポリビニリデンジフルオライド (P V D F) 膜などの転写膜へ転写した後であっても良く、転写せずゲル上で直接検出しても良い。

【 0 0 1 9 】

また、本実施形態における検出材としては、その検出感度は $\text{ng} \sim \mu\text{g}$ 程度のレベルであり他の標識剤に比較すると低い、広く一般に使用され簡便に染色可能である点で染色標識材を使用する。また、染色標識剤としては、ペプチド、糖蛋白を含む蛋白質などの生体由来成分を染色できるものであれば如何なる染色標識剤も使用可能であり、例えば、公知の各種クマシーブリリアントブルー (C B B : C B B - G 2 5 0、C B B - R 1 5 0、C B B - R 2 5 0、C B B - R 3 5 0 等)、アンモニア性硝酸銀等の水溶性銀化合物や銀コロイド、金コロイド、エチジウムブロマイド (E T B r)、アシッドブルー、アミドブラック B、エリオクロムブラック T などが好適に使用でき、それぞれ適宜適切な公知の緩衝液や有機溶媒混合水溶液などに溶解して用いれば良い。なお、このような染色標識剤による染色条件等については、例えば [W i l s o n , C . M . e t a l ; A n a l . B i o c h e m . V o l . 9 6、p 2 3 6 (1 9 7 9)]、[O a k l e y , B . R . e t a l ; A n a l . B i o c h e m . V o l . 1 0 5、p 3 6 1 (1 9 8 0)]、[M o e r e m a n s , M . e t a l ; J . I m m u n o l . M e t h o d s、V o l . 7 4、p 3 5 3 (1 9 8 4)] などに準じて実施することができる。

10

20

【 0 0 2 0 】

このような染色標識剤以外の検出材を用いる場合、発色標識剤としては、発色基質剤又は酵素 (標識) 剤が、ペプチド、糖蛋白を含む蛋白質などの生体由来成分に結合、又は物理的に付着又は吸着し、このような状態で発色させることにより検出可能とするものであれば如何なる発色標識剤であっても良い。また、酵素 (標識) 剤、発色基質剤、発色補助剤、発色増強剤、p H 緩衝剤などを組み合わせたものを含むことができる。発色基質剤としては、酵素剤や発色補助剤により発色するものであれば如何なる発色基質剤も使用可能であり、例えば、o - フェニレンジアミン、5 - アミノサリチル酸、p - ニトロフェノールリン酸、フェノールリン酸、フェノール、4 - アミノアンチピリン、o - ジアニシジン、o - ニトロフェノール - β - D - ガラクシド、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (T M B) などを挙げることができる。酵素 (標識) 剤としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β - D - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼなどを挙げることができる。それぞれ適切な発色基質剤と酵素剤を組み合わせれば良く、例えば、ペルオキシダーゼと o - フェニレンジアミン、ペルオキシダーゼと 5 - アミノサリチル酸、ペルオキシダーゼと T M B、アルカリフォスファターゼと p - ニトロフェノールリン酸、アルカリフォスファターゼとフェノールリン酸、アルカリフォスファターゼとフェノール及び 4 - アミノアンチピリン、 β - D - ガラクトシダーゼと o - ニトロフェノール - β - D - ガラクシド、などを挙げることができ、これらに過酸化水素などの酸化剤や各反応の至適 p H とする p H 緩衝剤を加えても良い。さらに、ビオチンとアビジンを組み合わせた発色標識剤も使用できる。このような発色標識剤を用いる際の各詳細な条件は、[日本生化学会編、「生化学実験講座 5 ; 酵素研究法」、東京化学同人 (1 9 7 5)]、[石川英治ら、「酵素免疫測定法」医学書院 (1 9 8 7)]、[日本生化学会編、「新生化学実験講座 1 ; タンパク質 V」、東京化学同人 (1 9 9 1)]、[日本生化学会編、「新生化学実験講座 1 2 ; 分子免疫学 I I I」、東京化学同人 (1 9 9 2)] などに準じて実施することができる。

30

40

【 0 0 2 1 】

化学発光標識剤としては、化学発光化剤又は酵素 (標識) 剤がペプチド、糖蛋白を含む蛋白質などの生体由来成分に結合、又は物理的に付着又は吸着し、このような状態で酸化

50

反応などにより化学発光化剤自体が励起され化学発光することにより検出可能とするものであれば如何なる化学発光標識剤であっても良い。また、化学発光化剤に加えて酵素（標識）剤と基質剤、化学発光増強剤、pH緩衝剤などを組み合わせたものを含むことができる。化学発光化剤としては、例えば、2, 4, 5トリフェニルイミダゾール、3-メチルインドール、テトラキスエチレン等の他、ベンゾペリレン-1, 2-ジカルボン酸ヒドラジドやイソルミノールのN-アルキル誘導体のようなルミノール誘導体、アクリジニウム塩やルシゲニンのようなアクリジン系化合物、3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-ホスホリルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタンのようなアダマンチル-1, 2-ジオキセタン誘導体などを用いることができる。このような、化学発光化剤と組み合わせることのできる酵素（標識）剤、基質剤、化学発光増強剤としては、例えば、（ミクロ）ペルオキシダーゼやN-アセチルグルコサミダーゼ、アルカリフォスファターゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼのような酵素剤、過酸化水素、過マンガン酸塩、次亜塩素酸のような酸化剤や、鉄、コバルト、銅、マンガンのような金属の化学発光増強剤などを挙げることができ、適宜選定すれば良い。

10

20

30

40

50

【0022】

生物発光標識剤としては、生物発光基質剤又は酵素（標識）剤がペプチド、糖蛋白を含む蛋白質などの生体由来成分に結合、又は物理的に付着又は吸着し、このような状態で生物発光させることにより検出可能とするものであれば如何なる生物発光標識剤であっても良い。また、生物発光基質又は酵素（標識）剤の外に、他の酵素剤、反応補助剤、pH緩衝剤などを組み合わせたものを含むことができる。生物発光基質剤としては、例えば、ホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェリン、ウミホタル（*Cypridina*）ルシフェリン、ウミシイタケ（*Renilla reniformis*）ルシフェリン、発光ミミズ（*Diplocardia*）ルシフェリン、ラチア（*Latia neritoides*）ルシフェリン、ホタルイカ（*Watasenia*）ルシフェリンやバクテリアルシフェリン（還元型フラビンモノヌクレオチド）のような発光生物由来のルシフェリンの外、オワンクラゲ由来のエクオリンなどを用いることができる。

【0023】

なお、酵素（標識）剤、反応補助剤としては、それぞれ対応する生物由来のルシフェラーゼ、AMP（アデノシン-1-リン酸）、ATP（アデノシン-3リン酸）、マグネシウム塩やカルシウム塩のような金属塩、脂肪族アルデヒドなどを挙げる事ができ、適宜適切な組み合わせとなるように選定すれば良い。上述の化学発光標識剤や生物発光標識剤を用いる際の各詳細な条件は、〔Vandyke, K. et al; 「Bioluminescence And Chemiluminescence」 Vol. I, II, CRC Press Florida (1985)〕、〔今井一洋編、「生物発光と化学発光」広川書店(1989)〕、〔後藤俊夫著、「生物発光」共立出版(1975)〕、〔稲場文男ら、「最新ルミネッセンスの測定と応用」NTS出版(1990)〕、〔Hasting, J. W. et al; Annu. Rev. Microbiol. Vol. 31, p549 (1977)〕、〔Shimomura, O. et al; Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 227, p680 (1970)〕、〔Schroeder, H. R. et al; Methods in Enzymol. Vol. 57, p424 (1978)〕、〔Nakano, M. et al; Anal. Biochem. Vol. 159, p363 (1986)〕、〔Voyta, J. C. et al; Clin. Chem. Vol. 34, p680 (1988)〕、〔Bronstein, I. et al; J. Biolumin. Chemilumin. Vol. 4, p99 (1989)〕などに準じて実施することができる。

【0024】

蛍光標識剤としては、蛍光基質剤又は酵素（標識）剤がペプチド、糖蛋白を含む蛋白質などの生体由来成分に結合、又は物理的に付着又は吸着し、このような状態で蛍光を発せさせることにより検出可能とするものであれば如何なる蛍光標識剤であっても良い。また、蛍光基質剤又は酵素（標識）剤の外に、他の酵素剤、反応補助剤、pH緩衝剤などを組

み合わせたものを含むことができる。蛍光基質剤としては、例えば、フルオレセイン、アクリジン、キノリン、クマリン、レゾルフィンなどの芳香族複素環化合物や、ナフタレン、アントラセン、ペリレン、ピレンなどの多環芳香族化合物の外、アントラニル酸、ニトロベンゾフラン、スチルベンなどの発蛍光団となる化合物、また、これら発蛍光団化合物の各種誘導体化合物を挙げることができ、いずれの蛍光基質剤も適用可能である。発色基質剤と酵素（標識）剤との組み合わせとしては、例えば、アルカリフォスファターゼと4-メチルウンベリフェリルリン酸、 β -Dガラクトシダーゼと4-メチルウンベリフェリル- β -Dガラクトシド、ペルオキシダーゼとp-ヒドロキシフェニル酢酸又はp-ヒドロキシフェニルプロピオン酸又はフルオレセインイソチオシアネート又はチラミンなども適用できる。さらに、必要に応じて反応補助剤としての過酸化水素のような酸化剤や補酵素を含む酵素剤、また、各反応の至適pHに調整するpH緩衝剤を加えても良い。このような蛍光標識剤を検出材に用いる際の各詳細な条件は、〔日本生化学会編、「生化学実験講座5；酵素研究法」、東京化学同人（1975）〕、〔石川英治ら、「酵素免疫測定法」医学書院（1987）〕、〔日本生化学会編、「新生化学実験講座1；タンパク質V」、東京化学同人（1991）〕、〔Frei, R. W. et al; 「Chemical Derivatization In Analytical Chemistry」 Vol. I, II, CRC Press（1981, 82）〕などに準じて実施することができる。

【0025】

検出材の検出対象となる生体成分に含まれる抗Fas抗体は、細胞膜貫通部分を含むI型膜蛋白質Fas、分泌型Fas、細胞膜外部分Fas、細胞膜内部分Fas、及びこれらの部分フラグメントFas（ペプチド）などの外、Fasリガンド結合体Fas等、いずれに対する抗体であっても良く、本実施形態において検出材は、いずれかの抗Fas抗体に特異的な検出材、また、いずれの抗Fas抗体であっても広範に検出できるユニバーサルな検出材とすることができる。上記いずれかの抗Fas抗体に特異的な検出材としては、それぞれ抗Fas抗体に対応する上記各Fas蛋白質を好適に使用することができ、また、これら各蛋白質を上述の各標識剤で標識しても良い。なお、これら各Fas蛋白質は、由来する動物種によってそれぞれ分子量などが異なり、例えば、細胞膜貫通部分を含むI型膜蛋白質Fasのアミノ酸配列における相同性は、ヒトとマウスでは50%、ヒトとウシでは57%であることが知られており（特許文献4、並びに非特許文献8乃至12参照）、以下に、ヒトFas（配列1）及びウシFas（配列2）についてのアミノ酸配列を示す。

【0026】

配列1（ヒトFas）：MLGIWTL LPLVLT S V A R L S S K S V N A Q V T
D I N S K G L E L R K T V T T V E T Q N L E G L H H D G Q F C H K P C P P G E R
K A R D C T V N G D E P D C V P C Q E G K E Y T D K A H F S S K C R R C R L C D
E G H G L E V E I N C T R T Q N T K C R C K P N F F C N S T V C E H C D P C T K
C E H G I I K E C T L T S N T K C K E E G S R S N L G W L C L L L L P I P L I V
W V K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G S H E S P T L N P E T V A I N L S D V D
L S K Y I T T I A G V M T L S Q V K G F V R K N G V N E A K I D E I K N D N V Q
D T A E Q K V Q L L R N W H Q L H G K K E A Y D T L I K D L K K A N L C T L A E
K I Q T I I L K D I T S D S E N S N F R N E I Q S L V（特許文献4、非特許文献8
参照；335アミノ酸）

【0027】

配列2（ウシFas）：M S G I W V H L S L I F I S V S G P L S K G E N A H M A
G I N S E G L K L N I T E A N S C Q E G L Y R E H Q F C C Q P C P P G K R K N G
D C K R D G D T P E C V L C S E G N E Y T D K S H H S D K C I R C S I C D E E H
G L E V E Q N C T R T R N T K C R C K S N F F C N S S P C E H C N P C T T C E H
G I I E K C T P T S N T K C K G S R S H A N S L W A L L I L L I P I V L I I Y K
V V K S R E R N K K N D Y C N S A A S N D E G R Q L N L T D V D L G K Y I P S I

A E Q M R I T E V K E F V R K N G M E E A K I D D I M H D N V H E T A E Q K V Q
L L R N W Y Q S H G K K N A Y C T L T K S L P K A L A E K I C D I V M K D I T N
E R E N A N L Q N E N E N L V (非特許文献 1 2 参照 ; 3 2 3 アミノ酸)

【 0 0 2 8 】

また、分泌型ヒト F a s、細胞膜外部分ヒト F a s (可溶性 F a s)、及び細胞膜内部分ヒト F a s についてのアミノ酸配列は、それぞれ、配列 1 における第 1 番 ~ 第 1 6 番のアミノ酸配列に相当するシグナル配列領域と第 1 7 4 番 ~ 第 1 9 0 番のアミノ酸配列に相当する膜貫通領域を除く配列 3、配列 1 における第 1 7 番 ~ 第 1 7 3 番のアミノ酸配列に相当する配列 4、及び配列 1 における第 1 9 1 番 ~ 第 3 3 5 番のアミノ酸配列に相当する配列 5 であることが報告されている〔小林清一ら ; 日本臨床 V o l . 5 4 (7) 10、p p 1 7 4 1 - 1 7 4 6 (1 9 9 6) 〕。

【 0 0 2 9 】

配列 3 (分泌型ヒト F a s) : R L S S K S V N A Q V T D I N S K G L E L R K T V
T T V E T Q N L E G L H H D G Q F C H K P C P P G E R K A R D C T V N G D E P D
C V P C Q E G K E Y T D K A H F S S K C R R C R L C D E G H G L E V E I N C T R
T Q N T K C R C K P N F F C N S T V C E H C D P C T K C E H G I I K E C T L T S
N T K C K E E G S R S N K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G S H E S P T L N P E
T V A I N L S D V D L S K Y I T T I A G V M T L S Q V K G F V R K N G V N E A K
I D E I K N D N V Q D T A E Q K V Q L L R N W H Q L H G K K E A Y D T L I K D L
K K A N L C T L A E K I Q T I I L K D I T S D S E N S N F R N E I Q S L V 20

【 0 0 3 0 】

配列 4 (細胞膜外部分ヒト F a s) : R L S S K S V N A Q V T D I N S K G L E L R
K T V T T V E T Q N L E G L H H D G Q F C H K P C P P G E R K A R D C T V N G D
E P D C V P C Q E G K E Y T D K A H F S S K C R R C R L C D E G H G L E V E I N
C T R T Q N T K C R C K P N F F C N S T V C E H C D P C T K C E H G I I K E C T
L T S N T K C K E E G S R S N

【 0 0 3 1 】

配列 5 (細胞膜内部分ヒト F a s) : K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G S H E S
P T L N P E T V A I N L S D V D L S K Y I T T I A G V M T L S Q V K G F V R K N
G V N E A K I D E I K N D N V Q D T A E Q K V Q L L R N W H Q L H G K K E A Y D 30
T L I K D L K K A N L C T L A E K I Q T I I L K D I T S D S E N S N F R N E I Q
S L V

【 0 0 3 2 】

〔 第 2 の実施形態 〕

第 2 の実施形態による哺乳動物プリオン病の体外診断キット及び体外診断方法は、第 1 の実施形態と同様に抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を備え、また、抗 F a s 抗体を含む生体由来成分の検出材を用いるものである。主として、酵素免疫測定法に適用する検出材を用いる点で第 1 の実施形態と異なる。生体由来成分は、血液、尿や末梢組織など哺乳動物診断対象個体からの生体由来材料検体に含まれる成分であり容易に採取可能であり、血液は血清又は血漿検体とすることができる。本第 2 の実施形態において、抗 F a s 抗体を含む生体由来成分について、第 1 の実施形態の場合と同様の分離材、分離装置などを用いた分離方法により抗 F a s 抗体と他の生体由来成分が分離した状態とすることもできるが、予め分離する必要はなく、酵素免疫測定法によって直接抗 F a s 抗体を特異的に検出可能である。 40

【 0 0 3 3 】

酵素免疫測定法 (E I A : E L I S A 含む) は、競合法と非競合法に大別され、それぞれ、抗原・抗体反応結合体 (B : B o u n d F o r m) と非結合未反応体 (F : F r e e F o r m) とを B F 分離するヘテロジニアス法 (不均一法 : 分離法) と、B F 分離しないホモジニアス法 (均一法 : 非分離法) に区分される。ヘテロジニアス法においては、抗原・抗体反応を液相で行う液相法、固相と液相間にて行う固相法がある。血清又は血漿 50

を生体由来材料検体とし、抗 F a s 抗体を直接測定する場合においては、ホモジニアス法を用いることは実質的に困難であり、第 1 の実施形態の場合と同様の分離材、分離装置などを用いた分離方法により、予め抗 F a s 抗体と他の生体由来成分（特に非特異的免疫グロブリン）を分離した抗 F a s 抗体を含む画分を検体として用いることが望ましい。なお、競合法及び非競合法のいずれも適用可能であり限定されないが、検出感度が優れる点では、競合法より非競合法を適用することが好ましく、同様に、液相法より固相法を適用することが好ましい。本第 2 の実施形態においては、ヘテロジニアス - 固相法を採用することとした。固相としては、チューブ、マイクロプレート、ビーズ、ストリップ、マイクロチップなど如何なる形態のものであっても良く、また、その材質についても、ポリスチレン、ガラス、ラテックス、セルロース、セファロース、濾紙など酵素免疫測定用の抗原又は抗体が物理吸着、共有結合などによって不溶化され担持可能であれば、如何なる材質の固相も適用でき、磁性体粒子であっても良い。

10

【 0 0 3 4 】

本第 2 の実施形態における酵素免疫測定用の抗原、すなわち、検出材の検出対象となる生体成分に含まれる抗 F a s 抗体に結合可能な抗原としては、診断対象がヒトの場合では、第 1 の実施形態において説明した、細胞膜貫通部分を含む I 型膜蛋白質ヒト F a s（アミノ酸配列 1）、分泌型ヒト F a s（アミノ酸配列 3）、細胞膜内部分ヒト F a s（アミノ酸配列 4）、細胞膜外部分ヒト F a s（アミノ酸配列 5）、及びこれらの部分フラグメント F a s（ペプチド）などの外、ヒト F a s リガンド結合体ヒト F a s 等を用いることができる。なお、これらのヒト F a s 及び F a s 関連タンパク質は、特許文献 1、非特許文献 8、〔国際特許公開 W O 9 5 - 1 3 2 9 3 のパンフレット〕、〔 S a m b r o o k , e t a l ; 「 M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n n u a l 2 n d E d i t i o n 」 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y（ 1 9 8 9 ） 〕などに準じて調製することができる。なお、抗ヒト F a s 抗体のアミノ酸配列についても明らかになっており〔特開平 1 1 - 1 7 1 9 0 0 号公報〕、抗 F a s 抗体の F a b 部における可変領域に結合可能なアミノ酸配列を有する蛋白質又はその部分ペプチドとして上記の部分フラグメント F a s（ペプチド）を設計することもでき、ペプチドについては、公知の合成法、合成装置を用いて調製しても良い。また、F a s 抗体 F c 部の診断対象哺乳動物についての固定特異配列と結合可能なアミノ酸配列を有する蛋白質又はその部分ペプチドを含む抗原との組み合わせも可能である。

20

30

【 0 0 3 5 】

また、診断対象の哺乳動物がウシの場合についても、第 1 の実施形態において説明したような細胞膜貫通部分を含むウシ F a s 蛋白質（アミノ酸配列 2）を、酵素免疫測定用の抗原として適用することが可能であり、例えば、非特許文献 1 2、〔 S a m b r o o k , e t a l ; 「 M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n n u a l 2 n d E d i t i o n 」 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y（ 1 9 8 9 ） 〕などに準じて調製することができる。また、本第 2 の実施形態においては、マウス F a s のクローニング、ウシ F a s のクローニングとして後述する方法によって得られるマウス F a s 蛋白質、ウシ F a s 蛋白質を酵素免疫測定用の抗原として使用することができる。ヒト、ウシ、マウス以外の哺乳動物を診断対象とする場合においても、同様にして各哺乳動物 F a s 蛋白質を調製し、酵素免疫測定用の抗原として使用することができる。また、各哺乳動物における分泌型 F a s、細胞膜内部分 F a s、細胞膜外部分 F a s、及びこれらの部分フラグメント F a s（ペプチド）などについても、上述したそれぞれヒトの分泌型 F a s、細胞膜内部分 F a s、細胞膜外部分 F a s、及びこれらの部分フラグメント F a s（ペプチド）の場合と同様にして調製し、酵素免疫測定用の抗原として適用可能である。

40

【 0 0 3 6 】

本第 2 の実施形態における、検出材の一部として含むことができる酵素免疫測定用の抗体としては、上述した各診断対象哺乳動物の抗原（細胞膜貫通部分を含む F a s、分泌型 F a s、細胞膜内部分 F a s、細胞膜外部分 F a s、及びこれらの部分フラグメント F a

50

s、Fasリガンド結合体Fas等)を用い、ウサギ、ヤギなどの免疫用動物に感作、免疫して得られる抗血清から精製したポリクローナル抗体、又は、免疫動物の脾臓など抗体産生細胞とミエロマを細胞融合し、HAT培養液などで選択培養して得られるハイブリドーマからクローニングされた所望の抗体を産生するハイブリドーマクローンをを用いて調製したモノクローナル抗体や、Fasモノクローナル抗体遺伝子を大腸菌、酵母などに導入し産生されたモノクローナル抗体など、如何なる公知の抗体作製法により作製された各種抗体であっても適用できる。このような抗体の作製条件は、例えば、〔非特許文献8~12〕、〔特開平11-171900号公報〕、〔Harlow, H. et al; 「Antibodies, A Laboratory Manual」 Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕、〔日本生化学会編、
10
「新生化学実験講座1; タンパク質IV」、東京化学同人(1992)〕、〔黒木登志夫ら、「実験医学別冊 細胞工学ハンドブック」、羊土社(1992)〕などに準じて作製することができる。

【0037】

本第2の実施形態では、検出材の一部として含むことができる酵素(標識)剤、発色基質剤等としては、第1の実施形態の発色標識剤に示した酵素(標識)剤、発色基質剤の外、発色補助剤、pH緩衝剤なども用いることができる。酵素(標識)剤又は発色基質剤については、上述した酵素免疫測定用の抗原又は抗体に標識することができ、その標識方法としては、例えば、過ヨウ素酸法、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法など公知の如何なる標識方法によっても標識することが可能である。このような、標識方法の詳細条件については、〔石川英治ら、「酵素免疫測定法」医学書院(1987)〕、〔Avrameas, S. et al「Development of Immunology」Elsevier Vol. 18、(1983)〕、〔Butt, W. R. et al「Practical Immunoassay」Marcel Dekker(1984)〕などに準じて行うことができる。
20

【0038】

本第2の実施形態の体外診断キットにおいては、上述の検出材以外に別途、抗Fas抗体標準品として、上述した酵素免疫測定用の抗体から適宜選定した抗Fas抗体を備えることができ、これにより検量線を作成することにより生体由来材料検体中の抗Fas抗体を定量又は半定量することが可能となる。このような抗Fas抗体標準品は、診断対象哺乳動物のFas抗体とすることが望ましい。以上、本第2の実施形態における体外診断キット及び体外診断方法として、酵素免疫測定法による例について説明したが、上述のような酵素(標識)剤、発色基質剤に加えて、又は替えて、第1の実施形態における化学発光標識剤、生物発光標識剤、蛍光標識剤を用いることにより、それぞれ、化学発光(酵素)免疫測定法、生物発光(酵素)免疫測定法、蛍光(酵素)免疫測定法による体外診断キット及び体外診断方法とすることができる。また、酵素(標識)剤、発色基質剤に替えて、
30
¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどの放射性同位元素標識剤を用いることにより、ラジオイムノアッセイ法による体外診断キット及び体外診断方法とすることも可能である。

【実施例】

【0039】

以下、本発明の哺乳動物におけるプリオン病の体外診断キット及び体外診断方法について、試験例、実施例を示して具体的に説明するが、これによって本発明を限定するものではない。
40

【0040】

〔試験例1〕：(プリオン病発症哺乳動物の生体由来材料の採取)

〔T1-A〕：(PrPSc感染マウス作出)

マウス型プリオン蛋白を欠きハムスター型プリオン蛋白を発現するTg7マウス(〔Priola, S. A. et al; Science Vol. 287, p1503 (2000)〕等に作出方法が記載されている：雄n=30、雌n=30)を用い、ハムスタースクレイピー(PrPSc)263Kを各マウスの脳内に注入することにより、P
50

r P S c 感染マウスを作出した。予備飼育及び P r P S c 注入後の飼育条件は、S P F (s p e c i f i c p a t h o g e n f r e e) 環境下とし、生後 8 週齢にて注射感染させた。また、P r P S c の注入条件は、263K 罹患末期 T g 7 マウス脳より生理食塩水を用いて調製した 1 % 脳乳剤、20 μ l、注射部位右頭頂部脳内とした。また、対照 (N e g a t i v e C o n t r o l) として、P r P S c に替えて、正常な T g 7 マウスの 1 % 脳乳剤を生理食塩水で作成し、この 20 μ L を P r P S c 感染マウスの場合と同様に T g 7 マウス脳内に注射した。

【0041】

[T 1 - B] : (血液採取)

各 P r P S c 感染マウス、対照マウスにつき、注射後 35 日目、55 日目 (感染マウスでは死亡直前) において、それぞれ深麻酔下のもとに心臓から約 200 μ L 採血し、遠心分離により血球を除去し、生体由来材料として各血漿検体を得た。

10

[T 1 - C] : (脳病理解析)

各 P r P S c 感染マウスは、注射後 1 週間毎に安楽死させ、直ちに解剖して脳組織の病理検査を行った。その結果、注射後 (感染後) 35 日目頃より脳内に異常プリオン蛋白の沈着が観察されることを確認した。

【0042】

[実施例 1] : (ポリアクリルアミドゲル 2 次元電気泳動)

試験例 1 (T 1 - B) で得られた生体由来材料としての各血漿検体につき、それぞれ蒸留水で 10 倍希釈して液体窒素で凍結し、-30 の冷凍庫にて保存した各血漿希釈凍結液を、用時、再融解し、各試料血漿希釈液又は対照血漿希釈液として用いた。本実施例では、第 1 の実施形態における 2 次元電気泳動法：第 1 次元目に p H グラジエント (勾配) ポリアクリルアミドゲルを用いた I E F、第 2 次元目に S D S - P A G E) により、各血漿検体中の生体由来成分を分離し、染色標識剤として C B B - R 250 を含む検出材を用いて検出した。詳細な実施条件は以下に示すとおりとした。

20

【0043】

[E 1 - A] : (第 1 次元目 I E F 用ゲルの調製)

第 1 次元目 I E F 用ゲルとして、用時、膨潤化液にて膨潤させる乾燥タイプ、ストリップ状 (細長板状) の固定化 p H グラジエント (I P G : I m m o b i l i z e d p H G r a d i e n t) ゲル、ここでは、p H 3 ~ 10 の p H 勾配レンジ、長さ 11 c m の I P G ストリップ (I m m o b i l i n e ^{T M} D r y S t r i p s p H 3 - 10 , 11 c m ; A m e r s h a m B i o s c i e n c e s 社製) を用いた。総液量 200 μ L になるように、各試料血漿希釈液又は対照血漿希釈液 20 μ L に、それぞれ膨潤用溶液 [1 . 5 M T r i s - H C l (p H 8 . 8 ; 関東化学社製)、8 M 尿素 (U r e a ; 関東化学社製)、2 % C H A P S (C y c l o h e x y l a m i n o p r o p a n e s u l f o n i c a c i d ; 和光純薬社製)、B P B (微量、B r o m o p h e n o l B l u e ; 関東化学社製)、D T T (D i t h i o t h r e i t o l、半井薬品社製) 7 m g / 2 . 5 m l、0 . 5 % I P G バッファー (I P G B u f f e r p H 3 - 10 ; A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製)] 180 μ l を混合し、室温で 30 分間反応させた後、各膨潤化液とした。各膨潤用トレーにそれぞれ膨潤化液を添加し、第 1 次元目 I E F 用ゲル (I P G ストリップ) 面を液面に着くように置いた。ゲルの乾燥を防ぐためシリコンオイル (K F 96 L - 1 . 5 C S ; 信越化学工業株式会社製) で覆い、約 18 時間膨潤した。

30

40

【0044】

[E 1 - B] : (第 1 次元目電気泳動)

恒温循環装置 (M u l t i p h o r I I、P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を予め 20 に設定しておき、泳動中のゲル表面への U r e a の結晶生成を未然に防ぐため、[E 1 - A] において膨潤させた各 I P G ストリップ表面に再蒸留水をかけて洗った後、恒温循環装置に I P G ストリップをセットし、300 V で 1 分間、1000 V で 1 時間 30 分間、さらに 3000 V で 2 時間 35 分間通電し電気泳動を行った。この第 1 次

50

元目電気泳動済のIPGストリップは、引続き第2次元目電気泳動(SDS-PAGE)を実施しない場合には、-30にて保存した。

【0045】

[E1-C]: (第2次元目電気泳動)

予め恒温循環装置(Multiphor III; Pharmacia Biotech社製)を15に設定し、第2次元目電気泳動に必要な試薬をゲルに導入するために、ゲルの平衡化を行った。SDS平衡化用バッファー[50mM 1.5M Tris-HCl (pH 8.8; 関東化学社製)、30%グリセロール(Glycerol; キシダ化学社製)、2% SDS (Amersham Biosciences社製)、6M 尿素(Urea; 関東化学社製)、BPB(微量、Bromophenol Blue; 関東化学社製)] 10mLにつき、100mgのDTTを加えた第1平衡化溶液に、[E1-B]により得た第1次元目電気泳動済のIPGストリップを入れ、30分間振盪した。さらに、SDS平衡化用バッファー10mLにつき、ヨードアセトアミド250mgを加えた第2平衡化溶液にIPGストリップを移し、30分間振盪した。その後、IPGストリップを湿らせたろ紙の上に置き、余分な平衡化溶液を除いた。予め、恒温循環装置(Multiphor III; Pharmacia Biotech社製)を15に設定し、第2次元目(グラジエントSDS-PAGE)用ゲル(Excel GelTM SDS Gradient 8-18; Amersham Biosciences社製)を恒温循環装置にセットし、この第2次元目用ゲル表面に、平衡化したIPGストリップのゲル面が直接接触するようにのせ、20mAで30~35分間電気泳動した後、IPGストリップを取り除き、50mAで1時間通電し、電気泳動した。これをCBB-R250(ナカライテスク株式会社製)染色液(0.1% CBB-R250、50%メタノール、10%酢酸)を用いて染色した後、脱色液(10%メタノール、7%酢酸)で脱色した。また、検出した各スポットの分子量は、フォスフォリラーゼb(97kDa)、アルブミン(66kDa)、卵白アルブミン(45kDa)、カルボニックアンハイドラーゼ(30kDa)、トリプシンインヒビター(20.1kDa)、α-ラクトアルブミン(14.4kDa)を含む分子量マーカー(Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis; Amersham Biosciences社製)を使用して測定した。

【0046】

[E1-D]: (特異蛋白質の分取・トリプシン消化)

試験例1におけるPrPSc感染マウス(脳内注射後40日目)、対照マウス(脳内注射後40日目)から得られた各血漿検体について、[E1-A]~[E1-C]によりポリアクリルアミドゲル2次元電気泳動を行った場合のエレクトロフォレトグラムを図1に示した。また、図1において、PrPSc感染マウスに特異的なスポットのうち、矢印を付した3個のスポット(pI中性側からSpot 1~Spot 3: 分子量約30kDa、pI約5~6)付近を部分拡大し、図2に示した。なお、図示を省略するが、Spot 1~Spot 3の各特異スポットの量(染色濃度、大きさ)は、脳内注射後35日目のPrPSc感染マウスにおける血漿検体に比してそれぞれ微増することが確認された。この3個の特異スポット部分のゲルをカッター(剃刀)で個別に切り出し分取した。切り出した各特異スポットゲルをそれぞれさらに細断粉碎した後、各特異スポットゲル毎に200μLの50%アセトニトリル水溶液で15分間、続いて同量のアセトニトリル(100%)で15分間洗い、一旦完全に乾燥させた。次に、乾燥させた各特異スポットゲル毎に、2.5ng/μLのトリプシン(シークエンスグレード修飾トリプシン; プロメガ社製)と5mM塩化カルシウムを含んだ50mM炭酸水素アンモニウム緩衝液に20分間浸して、膨潤させ、ゲルに浸潤しないで余った液を取り除き、50mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を加え、37、15時間反応させ、ゲル内トリプシン消化を行った。各上清液を質量分析:(nano)ESI(Electrospray Ionization)-MS/MSに供した。

【0047】

10

20

30

40

50

[E 1 - E] : (特異蛋白質の E S I - M S / M S 試験、解析)

[E 1 - D] において得られた各上清液につき、マイクロピペットチップの先端部に逆相担体が担持されたインチップカラム (Zip Tip c₁₈ ; ミリポア社製) に吸着させ、60%アセトニトリル / 0.1%ギ酸溶液で溶出して、各上清液の塩を除去した。Qフィルター - 飛行時間型 M S / M S 質量分析計 (Q - T O F U l t i m a G l o b a l ; マイクロマス社製) を用いて、質量分析を行い、結果の解析は N C B I n r データベース (The N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n) から、マスコットサーチプログラム (M A S C O T ; マトリックスサイエンス社) を使って検索・解析した (ジーンワールド株式会社委託)。この解析結果から、各特異スポット ; S p o t 1 ~ S p o t 3 に相当する特異蛋白質は、図 3 に示す抗 F a s 抗体の F a b 部分のアミノ酸配列に一致するペプチドフラグメントを有し、抗 F a s 抗体を含むことが確認された。従って、第 1 の実施形態による体外診断キット及び体外診断方法では、例えば、所定量の抗 F a s 抗体 (各対象哺乳動物に対する F a s 抗体標準品等) について、各血漿検体の場合と同様に試験を実施し、この抗 F a s 抗体や対照 (N e g a t i v e C o n t r o l) の試験結果 (分子量、p I、保持時間、測定量 (濃度) など) との比較から、各血漿検体に含まれる抗 F a s 抗体を定性的乃至定量的に検出することによって、質量分析を行うことなくプリオン病の生前診断が可能である。

【 0 0 4 8 】

[実施例 2] : (E L I S A)

本実施例は、第 2 の実施形態における酵素免疫測定法のうち、ヘテロジニアス - 固相法 (E L I S A) による哺乳動物プリオン病の体外診断キット及び体外診断方法の例であり、固相にマイクロプレート (E L I S A 用 9 6 ウェルマイクロプレート ; D i s p o s a b l e S t e r i l e E L I S A P l a t e 2 5 8 0 1、コーニング社製)、検出材として、酵素免疫測定用の抗原にヒト F a s 蛋白質 (遺伝子組換え可溶性ヒト F a s 蛋白質 ; R e c o m b i n a n t S o l u b l e H u m a n F a s、B D B i o s c i e n c e s 社製)、発色標識剤として、酵素標識剤にペルオキシダーゼ (西洋わさびペルオキシダーゼ : H R P) を適用して標識したヤギ抗マウス I g G 抗体 (H R P 標識ヤギ抗マウス I g G 抗体 ; P I E R C E 社製)、及び発色 (基質) 剤として、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (3, 3', 5, 5' - T e t r a m e t h y l - b e n z i d i n e (T M B) L i q u i d S u b s t r a t e S y s t e m f o r E L I S A ; S I G M A 社製) を含む測定系構成とした。また、検量線作成用の抗 F a s 抗体標準品として、マウス抗ヒト F a s 抗体 (精製マウス抗ヒト F a s 蛋白質抗体 ; P u r i f i e d M o u s e A n t i - h u m a n F a s (C D 9 5) M o n o c l o n a l A n t i b o d y、B D B i o s c i e n c e s 社製) を用い、試験例 1 (T 1 - B) で得られた生体由来材料としての各血漿検体につき、正常マウス血漿をブランクとして抗 F a s 抗体濃度 (検出量) を測定した。詳細な実施条件は以下に示すとおりとした。

【 0 0 4 9 】

[E 2 - A] : (固相化マイクロプレート調製)

酵素免疫測定用のヒト F a s 抗原を P B S (P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e) にて 1 0 0 n g / m L に希釈し、マイクロプレートの各ウェル (w e l l) に 1 0 0 μ L ずつ分注し、4 で終夜インキュベートして固相化した。プレートのブロッキングはブロッキング液 (ブロックエース ; 大日本製薬社製) を使用して室温で 1 時間 3 0 分インキュベートすることにより行い、プレートの洗浄には、P B S にポリソルベート 2 0 (T w e e n 2 0 ; 和光純薬社製) を 0.05% (V / V) 添加したプレート洗浄液 A を用いた。

【 0 0 5 0 】

[E 2 - B] : (検量線作成及び抗 F a s 抗体濃度測定)

抗 F a s 抗体標準品を正常マウス血漿希釈液 (正常マウス血漿を P B S で 4 0 0 倍に希釈) で 1 0 n g / m L、1 n g / m L、0.1 n g / m L、0.05 n g / m L に希釈し

、それぞれ検量線作成用の抗 F a s 抗体標準液とした。試験例 1 (T 1 - B) で得られた生体由来材料としての各 P r P S c 感染マウス、対照マウスについての各血漿検体を P B S で 4 0 0 倍に希釈し、それぞれ、各 P r P S c 感染マウス血漿希釈試料液、各対照マウス血漿希釈試料液とした。ブランクについても同様に P B S で 4 0 0 倍に希釈し、ブランク液とした。各抗 F a s 抗体標準液、各 P r P S c 感染マウス血漿希釈試料液、各対照マウス血漿希釈試料液、及びブランク液につき、[E 2 - A] により調製した固相化マイクロプレートに 1 0 0 μ L / w e l l ずつ分注し (3 重測定 : 各標準液、各試料液及びブランク液毎に 3 ウェルずつ使用) 、 3 7 で 1 時間インキュベートした後、プレート洗浄液 B (0 . 5 % T w e e n 2 0 添加 P B S) にて洗浄した。続いて、酵素標識剤についてブロッキング液の 1 0 倍希釈液で 1 0 0 0 0 倍に希釈した酵素標識剤希釈液を各ウェルに 1 0 0 μ L / w e l l ずつ分注し、 4 で 1 時間インキュベートした後、プレート洗浄液 A にて洗浄した。次に、発色剤を各ウェルに 1 0 0 μ L / w e l l ずつ分注し、遮光して室温で 3 0 分間インキュベートした後、各ウェルに 0 . 5 M 硫酸を 1 0 0 μ L / w e l l ずつ分注し、攪拌してから 4 5 0 n m における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【 0 0 5 1 】

試験例 1 における、脳内注射後 3 5 日目 (3 5 - 1 3) 及び感染末期 (T - 1 、 T - 5 : 死亡直前のマウス 2 匹) の P r P S c 感染マウス、並びに対照マウス (C - 2 、 C - 7 : 脳内注射後 5 5 日目マウス 2 匹) から得られた各血漿検体について、[E 2 - A] 、 [E 2 - B] により抗 F a s 抗体濃度を測定した場合の結果を表 1 に示した。また、検量線は図 4 に示したとおりである。本実施例の結果 (表 1) から、脳内注射後 3 5 日目の P r P S c 感染マウスの血漿検体中の抗 F a s 抗体検出量は、対照マウス血漿検体中検出量の約 5 倍であり、感染末期マウス血漿検体では約 2 5 倍となり、抗 F a s 抗体が増加していることが確認された。したがって、第 2 の実施形態における体外診断キット及び体外診断方法により、哺乳動物プリオン病の生前診断が可能である。

【 0 0 5 2 】

【表 1】

		吸光度測定値(450nm)			平均値	吸光度差	検出量 ng/ mL
標準品 ng/ mL	10	1.566	1.578	1.542	1.562	1.277	-
	1	0.435	0.448	0.433	0.439	0.154	-
	0.1	0.297	0.295	0.302	0.298	0.013	-
	0.05	0.229	0.227	0.227	0.228	-0.057	-
ブランク		0.280	0.291	0.284	0.285	-	-
対照マウス(C-2)		0.307	0.304	0.303	0.305	0.020	0.143
対照マウス(C-7)		0.293	0.341	0.274	0.303	0.018	0.128
PrPSc感染マウス(T-1)		0.714	0.764	0.778	0.752	0.467	3.435
PrPSc感染マウス(T-5)		0.460	0.463	0.454	0.459	0.174	1.275
PrPSc感染マウス(35-13)		0.360	0.392	0.387	0.380	0.095	0.692

【産業上の利用可能性】

【 0 0 5 3 】

本発明の体外診断キット及び体外診断方法は、哺乳動物プリオン病以外に、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、パーキンソン病、レヴィー (l e w y) 小体型痴呆症、多系統萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症

、家族性筋萎縮性側索硬化症、エフ・ティ・ディ・ピー - 17 (F T D P - 17)、進行性核上皮性麻痺、皮質基底核変性症、ピック (P i c k) 病、家族性痴呆症などの退行性神経変性疾患のスクリーニングにも適用可能である。また、各プリオン病を含む神経変性疾患に特異的な診断マーカーと組み合わせることにより、各神経変性疾患毎の生前診断を行うこともできる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 4 】

【図 1】試験例 1 における P r P S c 感染マウス及び対照 (N e g a t i v e C o n t r o l) マウスから得られた各血漿検体について、実施例 1 による 2 次元電気泳動を行った場合のエレクトロフォレトグラムを示す図面代用写真である。

10

【図 2】図 1 における P r P S c 感染マウスに特異的なスポットのうち、矢印を付した 3 個のスポット (S p o t 1 ~ S p o t 3) 付近を部分拡大した図面代用写真である。

【図 3】図 1 及び図 2 における 3 個の特異スポットについての各トリプシン消化物に含まれ、抗 F a s 抗体のアミノ酸配列に一致するペプチドフラグメントのアミノ酸配列を示す図である。

【図 4】実施例 2 の酵素免疫測定系 (E L I S A) における抗 F a s 抗体の検量線を示す図である。

【 図 3 】

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSV DYGDSYMNWY QKPGQPPKL LIYAASNLES 60

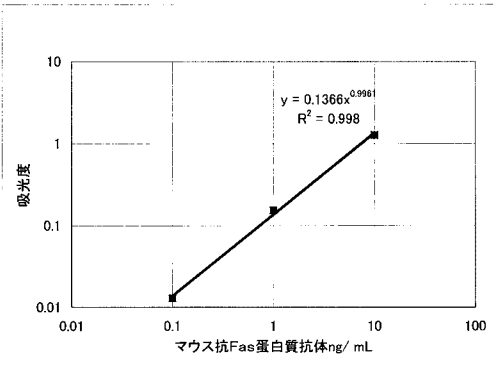
GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQSQSNEDPR TFGGCKLEI KRADAAPTYS 120

IFPPSSEQLT SGGASVVCFL NNFYPKDINV KWKIDGSRQ NGVLNSWTDQ DSKDSTYSMS 180

STLTLTCKDEY ERHNSYTCEA THKTSTSPIV KSFNRNEC 218

Spot1: — Spot2: Spot3: - - - - -

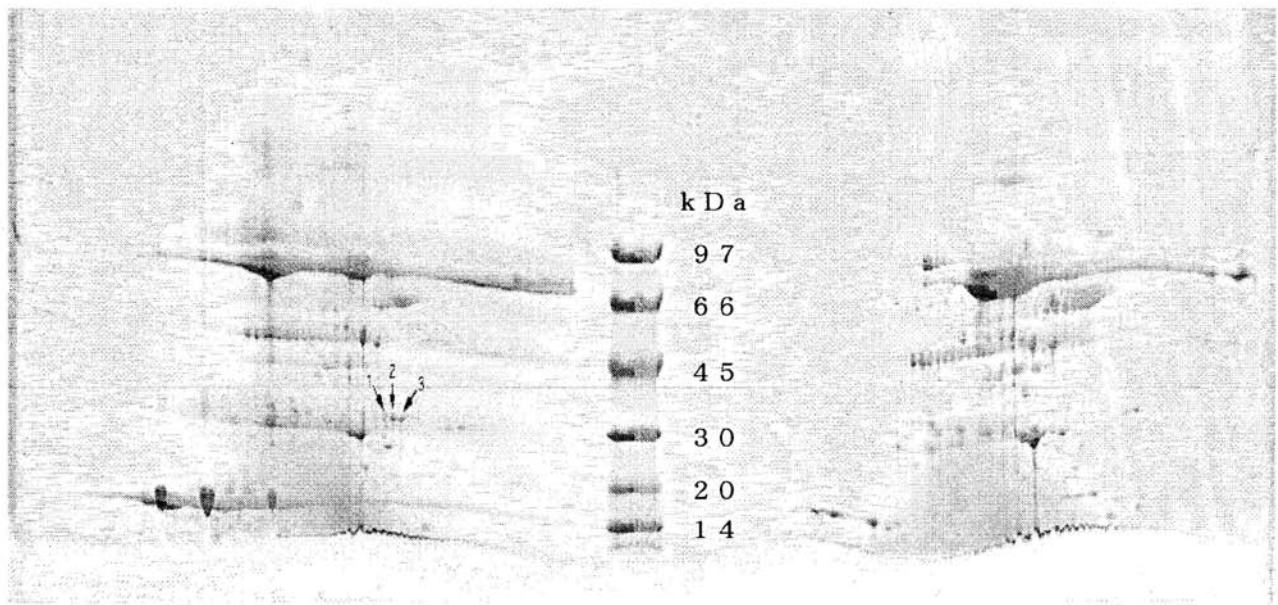
【 図 4 】



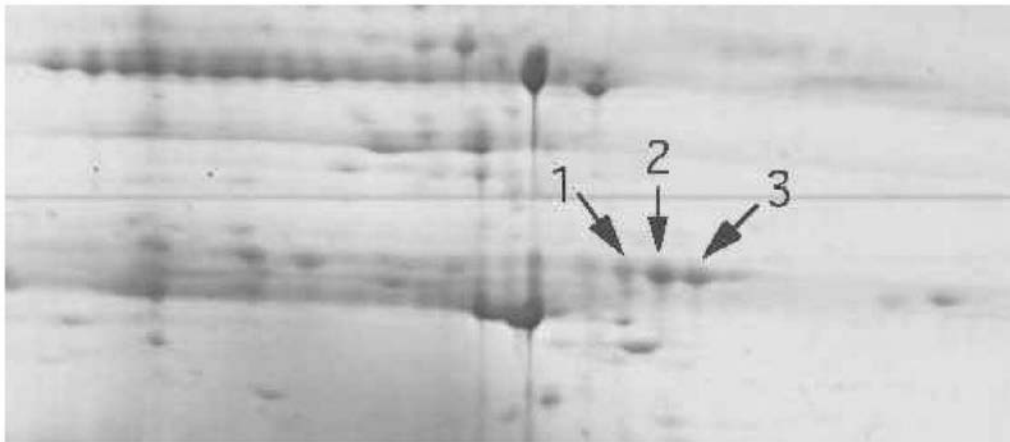
【図 1】

PrP^{Sc}感染マウス

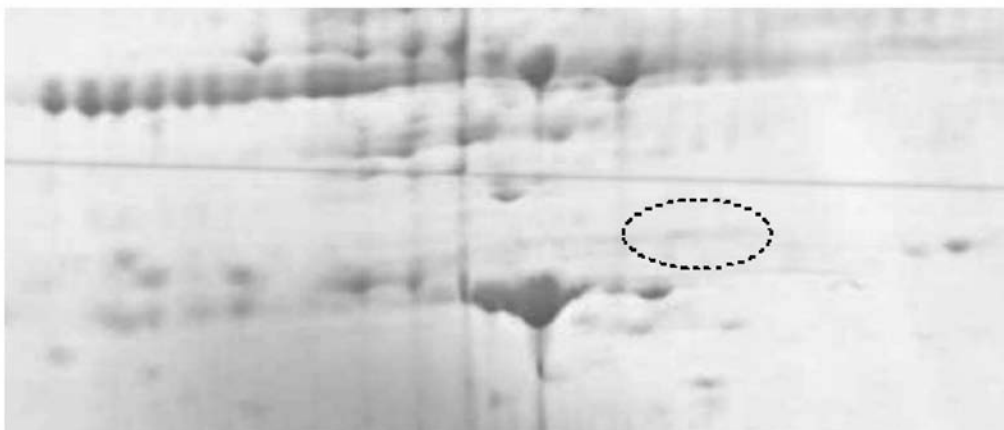
対照 (Negative Control) マウス



【図 2】

PrP^{Sc}感染マウス

対照 (Control) マウス



フロントページの続き

(72)発明者 堂 浦 克 美
宮城県仙台市太白区三神峯1丁目3-4-501

专利名称(译)	体外诊断试剂盒和体外诊断方法		
公开(公告)号	JP2006038536A	公开(公告)日	2006-02-09
申请号	JP2004216510	申请日	2004-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	Doura克己		
申请(专利权)人(译)	ITOHAM食品公司 学校法人酪农学園 Doura克己		
[标]发明人	横田博 堂浦克美		
发明人	横 田 博 堂 浦 克 美		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.D		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种体外诊断试剂盒，该试剂盒能够使用相对容易收集血液，尿液，脑脊髓液，外周组织等的材料，从哺乳动物的生物体中获取能够检测Creutzfeldt Jakob的材料。疾病，牛海绵状脑病，痉挛，鹿慢性疲惫病，Gerstmann-Straussler-Scheinker综合征和逆行性神经退行性疾病，包括朊病毒性疾病，如致死性家族性非洲性贫血等，从其危机早期阶段开始，并提供体外诊断方法。解决方案：哺乳动物的朊病毒病的体外诊断试剂盒配备含有源自活体的抗Fas抗体的成分的检测材料。之

【表1】

		吸光度測定値(450nm)				平均値	吸光度差	検出量 ng/ mL
標準品	10	1.566	1.578	1.542	1.562	1.277	-	-
	1	0.435	0.448	0.433	0.439	0.154	-	-
	0.1	0.297	0.295	0.302	0.298	0.013	-	-
	0.05	0.229	0.227	0.227	0.228	-0.057	-	-
ブランク		0.280	0.291	0.284	0.285	-	-	-
対照マウス(C-2)		0.307	0.304	0.303	0.305	0.020	0.143	
対照マウス(C-7)		0.293	0.341	0.274	0.303	0.018	0.128	
PrPSc感染マウス(T-1)		0.714	0.764	0.778	0.752	0.467	3.435	
PrPSc感染マウス(T-5)		0.460	0.463	0.454	0.459	0.174	1.275	
PrPSc感染マウス(35-13)		0.360	0.392	0.387	0.380	0.095	0.692	