

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 521677

(P2003 - 521677A)

(43)公表日 平成15年7月15日 (2003.7.15)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 33/573		G 0 1 N 33/53 33/573	N A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 52数)

(21)出願番号 特願2001 - 507087(P2001 - 507087)

(86)(22)出願日 平成12年6月28日(2000.6.28)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月27日(2001.12.27)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/06025

(87)国際公開番号 W001/001133

(87)国際公開日 平成13年1月4日(2001.1.4)

(31)優先権主張番号 99111975.1

(32)優先日 平成11年6月28日(1999.6.28)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 イムンディアグノステイツク・アー・ゲ
ー
ドイツ国、デー - 64625・ベンズハイム、ピ
ーゼンシュトラッセ・4

(71)出願人 ビースラブ・アー・ベー
スウェーデン国、エス - 223 70・ルンド、
イーデオン

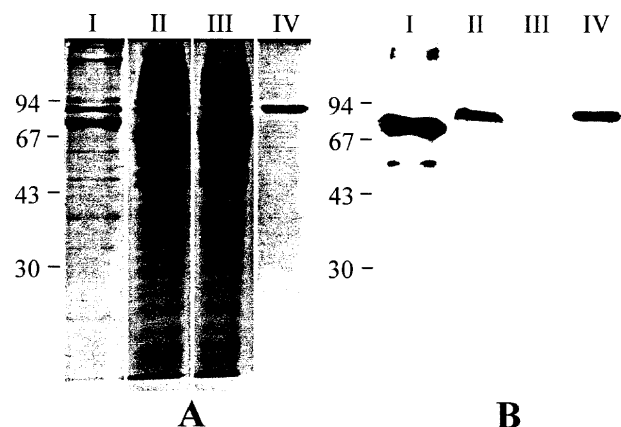
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外 5 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 グルテン過敏性腸疾患と他の自己免疫疾患の診断

(57)【要約】

サンプルを採取すること、およびヒト組織トランスグルタミナーゼ、組織特異的トランスグルタミナーゼまたはその他のトランスグルタミナーゼに対する抗体についてこのサンプルを試験することを含む、グルテン過敏性腸疾患タイプ自己免疫疾患またはグルテン過敏性腸疾患を伴う自己免疫疾患の診断のための方法。この方法により、不妊症、流産のリスク増加あるいは胎児成長低下に関連している自己免疫疾患だけではなく、とりわけ疱疹状皮膚炎すなわちデューリング病、クローン病、アジソン病、A I 溶血性貧血、A I 血小板減少紫斑病、A I 甲状腺疾患、萎縮性胃炎 - 悪性貧血、I g A 腎症あるいはI g A 糸球体腎炎、重症筋無力症、部分リポジストロフィー、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、再発性心膜炎、再燃性多発性軟骨炎、リウマチ様関節炎、サルコイドーシス、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス (S L E)、脾臓萎縮、タイプ I (インスリン依存性) 糖尿病、その他のタイプの糖尿病、潰瘍性大腸炎、脈管炎 (全身性脈管炎と皮膚血管炎の両方) など、腹腔疾患以外の自己免疫疾患を、診断し鑑別することができるが見い出された。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプルを採取するステップ、および、ヒト組織トランスグルタミナーゼと少なくとも1つの他のトランスグルタミナーゼ分子とに対する抗体について前記サンプルを試験するステップ、を含む、グルテン過敏性腸疾患タイプ自己免疫疾患またはグルテン過敏性腸疾患を伴う自己免疫疾患の診断のための方法。

【請求項2】 前記自己免疫疾患が疱疹状皮膚炎、デューリング病である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記自己免疫疾患がアジソン病、AI溶血性貧血、AI血小板減少紫斑病、AI甲状腺疾患、萎縮性胃炎 - 悪性貧血、クローン病、多発性潰瘍性大腸炎、グッドパスチャー症候群、IgA腎症あるいはIgA系球体腎炎、重症筋無力症、部分リポジストロフィー、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、進行性全身性硬化症、再発性心膜炎、再燃性多発性軟骨炎、リウマチ様関節炎、リウマチ、サルコイドーシス、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス(SLE)、脾臓萎縮、タイプI(インスリン依存性)糖尿病、その他のタイプの糖尿病、ヴェーゲナー肉芽腫症、潰瘍性大腸炎、脈管炎(全身性脈管炎と皮膚血管炎の両方)、白斑から選択される請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記自己免疫疾患が、不妊症と、流産のリスク増加と、胎児成長低下に関連している請求項1に記載の方法。

【請求項5】 トランスグルタミナーゼに対する抗体の検出ステップを含む自己免疫疾患の鑑別診断のための比較タンパク質結合測定方法であって、前記タンパク質結合測定法は抗原としての組換えヒト組織トランスグルタミナーゼを含むことを特徴とする前記測定方法。

【請求項6】 組織特異的トランスグルタミナーゼをさらに含む、請求項5に記載の比較タンパク質結合測定法。

【請求項7】 前記トランスグルタミナーゼがFXIII Aと、TGkと、TGeと、TGxと、バンド4.2から選択される請求項6に記載の比較タンパク質結合測定方法。

【請求項8】 抗原としての他のいずれかのトランスグルタミナーゼをさら

に含む、前出の請求項5または6のいずれかに記載の比較タンパク質結合測定方法。

【請求項9】 異なる種から得られるトランスグルタミナーゼを含む、請求項8に記載の比較タンパク質結合測定方法。

【請求項10】 前記トランスグルタミナーゼが組換え融合タンパク質あるいはその断片である請求項8に記載の比較タンパク質結合測定方法。

【請求項11】 前記結合測定方法がRIAと、EIA/ELISAと、LiAと、FiAとから選択される免疫測定法である前出の請求項5～10のいずれか一項に記載の比較タンパク質結合測定方法。

【請求項12】 前記結合測定方法が、IRMAと、IEMA/EUAと、ILMA（免疫発光測定法）と、IFMA（免疫蛍光測定法）とから選択されるサンドイッチ免疫測定法である前出の請求項5～11のいずれか一項に記載の比較タンパク質結合測定方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明はトランスグルタミナーゼに対する抗体の検出を含むグルテン過敏性腸疾患と他の自己免疫疾患の診断に関する。

【0002】**(背景技術)**

グルテン過敏性腸疾患(GSE)は、小児や成人の両方に生じる、自己免疫起源のよくある慢性小腸障害である。他のシリアル食品にも存在する小麦グルテンにより起こり、また維持される。グルテン過敏性腸疾患の臨床発現は典型的にはセリアック病(CD)である。しかし、人によっては、乳頭真皮の顆粒状IgA染色により特徴付けられる疱疹状皮膚炎(DH)、水疱性の自己免疫性皮膚疾患を伴う。グルテン過敏性腸疾患のこれら両方の形態とも同じ遺伝的バックグラウンドを有し、HLAクラスII抗原DQ2、DR3、およびHLA-A1、-B8、-DR3のハプロタイプと関連している。グルテンを経口摂取し、遺伝子素因が存在すると、T-細胞を介する自己免疫反応が小腸でまず発現し、リンパ性浸潤、後に縮小、その後再吸収障害につながる絨毛全体の萎縮を引き起こす(Marsh MNら、Bailliere Clin Gastr 1995. 9:273-294)。しかし、完全にグルテン抜き食事、病理学的変化がまったく消え、形態学上正常となり、また機能は回復する。

【0003】

グルテン過敏性腸疾患の診断は、空腸生検にみられる特徴的な組織学的変化(絨毛萎縮、上皮内リンパ球増加症、陰窩過形成)、その後にグルテン抜き食事後の粘膜再生と、その後のグルテン試食時の再発に基づくものである。しかし、血清学的試験は、より侵襲性が低くまた安価な代替法を提供するので、グルテン過敏性腸疾患の診断において有用であろう。血清学的試験は、筋内膜抗原、レチクリン、あるいはグリアジンに対するIgA抗体を検出する。IgAクラス筋内膜抗体(EMA)試験は、IgAクラス抗レチクリン抗体とIgAクラス抗グリアジン抗体試験に比較した場合は、その高度の感受性と特異性のため、選択され

るべき血清学的方法と考えられる。E M Aは未治療の疱疹状皮膚炎患者の60～70%でみつき、セリアック病患者ではほとんど全員で見ついている。しかし、E M A試験は、絶滅の危機に瀕している類人猿から採取した食道切片上で実施され、労力と時間を浪費し、またボーダーラインケースでは主観的なものとなる。

【0004】

組織トランスグルタミナーゼ(TGc、EC 2.3.2.13)はさらに、セリアック病の主要な、あるいは唯一の筋内膜自己抗原として同定されている(Dieterich Wら、Nature Medicine 1997, 3(7): 797-801)。セリアック病に対するELISA試験は市販されていて入手可能なモルモットTGcに基づいて生産されてきた。モルモットとヒトTGcの間でのアミノ酸配列識別は82.8%であり、この試験は、90%以上の高度感受性と特異性を示している(Ikura Kら、Biochemistry 1988; 27:2898-905; Gentile Vら、J. Biol. Chem. 1991; 266:478-83; Dieterich Wら、Gastroenterology 1988; 115:1317-21; Sulkanen Sら、Gastroenterology 1998; 115:1322-8)。

【0005】

(発明の目的)

本発明の目的は、グルテン過敏性腸疾患に対する改善された測定方法を提供し、また特に、グルテン過敏性腸疾患タイプの自己免疫疾患、グルテン過敏性腸疾患を伴う自己免疫疾患および一見非活性の潜在的なグルテン過敏性腸疾患の鑑別診断を可能にする抗体結合測定方法を提供する。

【0006】

(本発明の簡単な説明)

この目的は、グルテン過敏性腸疾患(GSE)、グルテン過敏性疾患タイプの自己免疫疾患、ならびにトランスグルタミナーゼに対するIgAおよびIgGに関連した自己免疫疾患のグループについての、組換えヒト組織トランスグルタミ

ナーゼおよび他のトランスグルタミナーゼに基づく比較タンパク質結合測定法を提供することにより、達成された。本発明の1つの好適な実施態様は、ヒト組織トランスグルタミナーゼと結合パートナーとしてのその他のトランスグルタミナーゼから成る多重タンパク質結合測定法に関する。本発明の1つのさらに好適な実施態様は、異なる組織および種から分離あるいはクローン化されたトランスグルタミナーゼから成るタンパク質結合測定法に関する。

【0007】

本発明のもう1つの態様は、ヒト組織TGcと、モルモットTGcあるいはその他のトランスグルタミナーゼタンパク質ファミリーのその他のメンバーなどのその他のトランスグルタミナーゼに基づく多重タンパク質結合測定法に関する。多重あるいは比較タンパク質結合測定法は、その診断が、抗原として少なくとも2つ、好適には、3つあるいはそれ以上の異なるトランスグルタミナーゼ分子を基礎として行われることを意味する。

【0008】

本発明および好適なその変更例は請求項1および5に開示されている。好適なその実施態様はその従属請求項に記載されている。

【0009】

本発明は、サンプルを採取するステップ、および組織トランスグルタミナーゼおよび少なくとも一つの他のトランスグルタミナーゼに対する抗体について前記サンプルを試験するステップ、を含む、グルテン過敏性腸疾患タイプの自己免疫疾患またはグルテン過敏性疾患を伴う自己免疫疾患の診断方法を提供する。好適な実施態様では、その自己免疫疾患は、疱疹状皮膚炎、デューリング病であり、あるいは、アジソン病、AI(AI-自己免疫)溶血性貧血、AI血小板減少紫斑病、AI甲状腺疾患、IDDM、脱毛症、萎縮性胃炎-悪性貧血、クローン病、副腎機能低下症、性機能低下症、脾機能低下症、クリオグロブリン血症、多発性潰瘍性大腸炎、グッドパスチャー症候群、グルテン誘発失調症、IgA腎症あるいはIgA系球体腎炎、重症筋無力症、部分リポジストロフィー、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、進行性全身性硬化症、口腔内アフタ症、再発性心膜炎、再燃性多発性軟骨炎、リウマチ様関節炎、リウマチ、サル

コイドーシス、知覚ニューロパシー、発作、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、脾臓萎縮、タイプI（インスリン依存性）糖尿病、その他のタイプの糖尿病、アミノ基転移症、ヴェーゲナー肉芽腫症、潰瘍性大腸炎、脈管炎（全身性脈管炎と皮膚血管炎の両方）、白斑から選択される自己免疫疾患である。

【0010】

本発明はまた、タンパク質結合測定法が抗原として組換えヒト組織トランスグルタミナーゼから成るトランスグルタミナーゼに対する抗体の検出ステップを含む自己免疫疾患の鑑別診断に関する比較タンパク質結合測定法を提供する。ある好適な実施態様では、その比較タンパク質結合測定法はさらに、抗原としての組織特異的トランスグルタミナーゼを含み、好適には、トランスグルタミナーゼは、FXIIIA、TGk、TGe、TGxおよびいわゆるバンド4.2から選択される。その比較タンパク質結合測定法にはまた、抗原としてのいずれかのその他のトランスグルタミナーゼ、特に、異なる種から得られるトランスグルタミナーゼが含まれる。当業者であれば、組換え融合タンパク質あるいはその断片もまた使用することができることは理解されることであろう。その比較タンパク質結合測定法は好適には、RIAと、EIA/EISAと、LiAとFiAとから選択される免疫測定法であり、またもっとも好適にはIRMA、IEMA/EUA、ILMA（免疫発光測定法）、IFMA（免疫蛍光測定法）から選択されるサンドイッチ免疫測定法である。

【0011】

驚くべきことに、ヒトTGcとモルモットTGcの間で高いアミノ酸配列の同一性が見い出されているにも拘わらず、モルモットTGc EISA法によっては認識されなかった試験を受けた患者の血清のいくつかは、モルモットの酵素には保存されていなかったヒトTGcのエピトープに対する抗体を有していることが分かった。われわれの研究は、TGcは、疱疹状皮膚炎にも罹患しているEMA陽性患者の自己抗原であることを示している。さらに、われわれは、その疾患の原因において決定的な役割をトランスグルタミナーゼが演じている自己免疫疾患のクラスがあること、そのような自己免疫疾患はさまざまなトランスグルタミナーゼのユニークなエピトープパターンにより識別することができること、を

発見した。

【0012】

グルタミン過敏性腸疾患における主要な自己抗原としてのT G cの発見では、なぜセリアック病に罹患している患者の一部分だけが疱疹状皮膚炎の症状を示すのか、また、これらの疾患における抗原レパートリーに差異があるのかどうかという疑問に答えることにはならなかった。疱疹状皮膚炎患者の皮膚中の顆粒状I g A沈殿物が皮膚中に存在する抗原に方向付けられているのかどうか、あるいは乳頭真皮に蓄積される血中免疫複合体を代表しているのかどうかは不明であった。I g A沈殿物はいままで、皮膚から抽出されたことはなく、また特徴付けもされていなかった。しかし、T G cについての免疫染色は疱疹状皮膚炎患者の皮膚中のI g A沈殿物に関する直接免疫蛍光研究により見ることができるものと同じ染色パターンを示さない。これは、蓄積されたI g A抗体が対している抗原はT G cとは異なるものなのではないかということを示唆している。われわれは現在では、これら抗体は、乳頭真皮に存在している別のトランスグルタミナーゼとの交差反応に由来するものであると考えている。こうした限られた交差反応はセリアック病に罹患している患者における皮膚発疹の適度の浸透度に対する説明としてはもっともらしいものであり得た。また、T G cはヒトの身体のほぼあらゆる組織に存在しているので、セリアック病の場合、なぜ病理学的変化と臨床上の症状が小腸だけに、および疱疹状皮膚炎の場合には罹患している皮膚だけに非常に限られた局在性を有しているのかもまた不明である。こうした問題に取り組むため、われわれは、皮膚中で発見することができる3つの他のトランスグルタミナーゼ(ヒトT G k、T G eおよびT G x)をヒト胚性腎細胞の中で発現させ、セリアック病、疱疹状皮膚炎およびその他の自己免疫疾患に罹患している患者における血中I g AおよびI g G力価を測定した。

【0013】

(図面の簡単な図面)

本発明はここで添付の図面とグラフ図に参照しながら詳細に説明される。本発明の典型的な実施例の説明からはどのような本発明に関する制限も解釈されるべきではない。

【0014】

図1は、TGcのSDS-PAGE(A)および免疫プロット(B)分析を示す。免疫プロットはTGcに対するモノクローナル抗体を使用して実施された。分子質量標準(kDa)の位置が左側に示されている。レーンI、モルモットTGc；レーンII、精製前の組換えヒトTGcを産生する細胞溶解物；レーンIII、通って流れる；レーンIV、カラムからの溶出TGc。

【0015】

図2は、ヒトTGc ELISAに関するレシーバー操作特性(ROC)曲線であり、この試験の最大効果点を示し、これに基づきカットオフレベルが選択された。

【0016】

図3は、対照(I)とセリアック病または疱疹状皮膚炎患者(II)におけるヒトTGc ELISAにおける血清抗TGc抗体濃度を示す。治療を受けたセリアック病と疱疹状皮膚炎患者が白角印により示されている。陽性(破線)の任意選択のカットオフレベルは1.8というAU値で引かれている。

【0017】

図4は、モルモットTGc ELISAに関するROC曲線であり、この試験の最大効率点を示し、これに基づいてカットオフレベルが選択された。

【0018】

図5は、対照(I)とセリアック病あるいは疱疹状皮膚炎(II)におけるモルモットTGc ELISAシステムにおける血清抗TGc抗体濃度を示す。治療を受けたセリアック病あるいは疱疹状皮膚炎患者は、白角印により示されている。陽性(破線)の任意選択カットオフレベルは1.4というAU値で引かれている。

【0019】

図6は、任意の単位(AU)で与えられたヒトTGc ELISAにおけるTGcに対するIgA抗体の血清濃度を示す。治療を受けたセリアック病あるいは疱疹状皮膚炎患者は、白角印により示されている。陽性(破線)の任意選択カットオフレベルは1.8 AUで引かれている。CD, セリアック病；DH, 疱疹

状皮膚炎；CTRL，対照血清；PV，尋常性天疱瘡、BP，水疱性類天疱瘡；CR，クローン病；CU，多発性潰瘍性大腸炎；WEG，ヴェーゲナー肉芽腫；RA，リウマチ様関節炎；SLE，全身性エリテマトーデス；PSS，進行性全身性硬化症；PA，乾癬性関節炎；HEPC，C型肝炎。

【0020】

図7は、ヒトTGcに対するIgA抗体の血清濃度を示すボックスとホイスカ図である。ボックスの下方および上方端は25%と75%パーセンタイルをそれぞれ表わしている。中央値は、ボックスの中を通過している水平線により示されている。下方および上方ホイスカは5%と95%パーセンタイルをそれぞれ表わしている。未治療患者のみが、セリアック病および疱疹状皮膚炎群に含まれている。略語については図6を参照されたい。

【0021】

図8は、ヒトとモルモットTGc ELISAとの間の抗体価の相関関係を示す。x軸上には、ヒトTGc ELISAにより測定された任意の単位で力価が与えられていて、y軸上にはモルモットTGc ELISAにより測定された値である。カットオフ値は破線で示されている。

【0022】

図9は精製後のTGeのSDS-PAGE分析値を示す。分子質量標準(kDa)は左側に示されている。

【0023】

図10はStrept IIタグに対するポリクローナルウサギ抗体を使用したヒトTGsの免疫プロット分析を示す。分子質量標準(kDa)の位置は左側に示されている。レーンI，TGc；レーンII，TGe；レーンIII，TGk；レーンIV，TGx。

【0024】

図11は、ELISAにおけるヒトTGcあるいはTGeに対するグルテン過敏性腸疾患(GSE)患者血清におけるIgAの結合を示す。0.4より下の値を示すTGcと反応している血清は、TGeとの同様の結果を出しているが、しかし、殆どどの症例では、TGcに対して上昇IgA抗体力価を有する血清はT

Geに対しては低い抗体価を示した。

【0025】

図12は、固体相ヒトTGcに対するヒトTGc（点線）あるいはTGe（実線）の増加量と共にブレインキュベーションすることによる4人のグルテン過敏性腸疾患血清におけるIgA結合の阻害を示す。TGcとTGeの両方とも、阻害効果を示したが、しかしTGcはTGeによりもさらに効果的であった。

【0026】

（詳細な発明の説明）

本発明者らは、ヒトTGcと他のトランスグルタミナーゼを、組換えDNA方法により発現させ、またIgA抗TG抗体に対する精製タンパク質に基づくさまざまなELISAを設定した。これら測定法の結果はモルモットTGcを用いたELISA試験とサル食道についてのEMA試験から得たものと比較した。

【0027】

方法と材料

SDS-PAGEと免疫ブロッティング

SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法）は、5%ポリアクリルアミド濃縮用ゲルを加えた12%ポリアクリルアミド分離ゲルを使用してLaemmliの方法（Laemmli, Nature 1970, 227:68-5）により、実施された。サンプルは2%（v/v）2-メルカプトエタノールの付加により還元された。タンパク質はクーマシーブリリアントブルーR（Serva社製）を用いた染色によるか、あるいは、Towbinと共同研究者らの方法（Towbin Hら、Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 76:4350-4）により、ニトロ-セルロース膜（Protran、Schleicher & Schuell社製）に電気泳動的に移送した後に免疫ブロッティング法によるかのいずれかの方法により検出された。タンパク質移送後、その膜はPonceau S（Serva社製）により染色され、その後75分間室温にて脱脂肪乳粉末を含有する50mMトリス、150mM NaCl, pH 7.4（TBS）でブロックされた。ブロックされた膜はその後特異的な抗体と一緒にインキュ

ベートされた。

【0028】

ヒトTGcは、室温にて1.5時間5%脱脂乳粉末と0.05%Tween^TM20(Sigma社製)を含有するTBSに1:2000で希釈されたTGcに対するマウスモノクローナル抗体(TGcに対して特異的であるが、しかしヒトおよびモルモットTGcの両方と交差反応する。ネオメーカー、AB-3、CUB7402+TG100)により、検出された。結合マウス抗体の検出のために、膜は、室温にて1時間5%脱脂乳粉末を含有するTBS/Tweenに1:2000で希釈されたマウス免疫グロブリン(Dako社製)に対する、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化ウサギ抗体とともにインキュベートされた。結合2次抗体は、性能向上させた化学発光システム(ECLキット、Amersham社製)を使用してオートラジオグラフィにより検出された。モルモットTGc(Sigma社製)は、陽性対照として各回毎に使用された。

【0029】

組換え発現させたTGsは、室温にて1時間1%脱脂乳粉末と0.05%Tween20(Sigma社製)を含有するTBSに1:5000で希釈されたStrept IIタグ(Institut für Bioanalytik社製)に対するウサギポリクローナル抗体により、検出された。結合ウサギ抗体の検出のために、膜は、室温にて1時間1%脱脂乳粉末を含有するTBS/Tweenに1:3000で希釈されたウサギ免疫グロブリン(Dako社製)に対する、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化ブタ抗体とともにインキュベートされた。結合2次抗体は、0.2mM p-クマル酸(Sigma社製)、2.65mM H₂O₂(Sigma社製)、1.25mM 3-アミノフタルヒドラジド(Fluka社製)を含有する100mMトリス/HCl, pH 8.3の中で5分間インキュベートした後、発光により検出された。C-末端Strept IIタグにより融合タンパク質として発現させたヒトTGcが、陽性対照として使用された。

【0030】

逆転写とポリメラーゼ連鎖反応

逆転写が、AMV逆転写(Oncor Appligene社製)を使用して実施され、また、Pfx Taqポリメラーゼ(Life Technologies社製)を使用したPCRが製造業者により提供されたプロトコルにしたがって実施された。

【0031】

ヒトTGcの組換え発現

pCEP4(Invitrogen社製)から産生されたエピソーム真核細胞発現ベクターpCEP-Pu/BM40P(Kohfeldt, Eら、FEBS Lett 1997; 414:557-61)はStrep IIタグ(IBA社製、ドイツ)をコードした配列および停止コドンを複数クローン化部位に導入するように修飾された。プライマー5'-GGCCGCATGGAGCCATCCACAATTCGAAAAGTAと5'-GGCCTACTTTTCGAATTGTGGATGGCTCCATGCは一緒にアニールされてSchmidt TGMら(J Mol Biol 1996; 255:753-66)により以前に説明されているように、Strep Tactin™(IBM社製、ドイツ)親和性カラムによってストレプトアビジン親和性精製に適しているカルボキシ末端Strep II融合タンパク質を産生するベクター(pCEP-Pu/BM40SP/C-Strep)をそのように構築するNot I部位の中に導入された。完全長ヒトTGc cDNA(GeneBank受託番号M55153、pSP73中でクローン化)が、5'-プライマーATTAGCTTGCCGCCACCATGGCCGAGGAGCTGGTTCおよび3'-プライマー5'-TAAGCGGCCGCGGGGCCAATGATGACATTCを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅された。その5'-プライマーは新しいHind III制限部位とKozakの翻訳開始配列を導入し、また3'-プライマーは、新しいNot I制限部位を挿入し、停止コドンを取り除いた。最終産物発現ベクターpCEP-Pu/TGc/C-Strepを得るために、Hind III/Not I制限酵素加水分解PCR産物は精製され、また、pCEP-Pu/BM40SP/C-Strepの同じ制限部位に挿入された。完全な構築物の正確な挿入と配列は、ABIプリズムピッ

グダイターミネーターサイクル配列決定簡易反応キットを使用してサイクル配列決定により検証され、またその産物をABIプリズム377自動化シーケンサー(Perkin-Elmer社製/応用バイオシステム)上で分離された。

【0032】

ヒト胚性腎細胞(293-EBNA、Invitrogen社製)がpCEP-Pu/TGc/C-Strepによりトランスフェクションされ、また、10%仔牛血清(Life Technologies社製)、1%L-グルタミン(Life Technologies社製)、200IU/mlペニシリン(Life Technologies社製)、200µg/mlストレプトマイシン(Life Technologies社製)を含むダルベッコのMEM NUT MIX F-12(Life Technologies社製)培地における細胞培養で収穫された。細胞は0.5µg/mlピューロマイシンにより選択された。その培地を取り除き、また寒冷(4)0.25 Mショ糖により洗浄した後、その細胞は寒冷0.25 Mショ糖の中で機械的に溶解された。その可溶化液は、30分間4にて27,200gで遠心分離により微粒子物質に関して清澄化され、その後に60分間4にて210,000gで上清の超遠心分離にかけられた。チーズクロスによりろ過され、またプロテイナーゼ阻害薬として1mM フッ化フェニルメタンスルホニル(PMSF、Fluka社製)を添加した後、12mlの上清が4にて無菌化されて、また、ろ過された1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む100mMトリス/HCl, pH 7.5により平衡化された3cm³容量のStrep Tactin親和性カラムに0.4ml/cm²/分の流速で通過させた。1mM PMSFを含む平衡緩衝液により延長洗浄した後、0.9ml/cm²/分の流速で、そのタンパク質は1mM PMSFと2.5mMデスチオビオチン(Sigma社製)を含む平衡緩衝液により0.4ml/cm²/分で溶出された。2ml分画が回収された。その精製は、上述のように、TGcに対するモノクローナル抗体を用いてクマシー染色SDS-PAGEとウェスタンブロットティング法により制御された。そのタンパク質濃度はSDS-PAGE法により推定され、また、ウシ血清アルブミンを標準として用いて、供給業者により提供されたプロトコルにしたが

ってビシンコニン酸 (BCA) タンパク質測定試薬 (Pierce社製) を使用して測定された。

【0033】

さまざまなトランスグルタミナーゼからのcDNAの産生

ヒトケラチノ細胞から得た全RNAがTGeとTGkプロ酵素に特異的なプライマーにより逆転写され、また、PCRがcDNAを得るために使用された。完全長ヒトTGx cDNA (GeneBank受託番号AF035960) がpSP73中でクローン化された。

【0034】

TGeの発現のための発現構築物の産生

StrepTactin™ (Institut für Bioanalytik社、ドイツ) 親和性カラム (Schmidt TGMら、J Mol Biol 1996; 255: 753-66) によりストレプトアビジン親和性精製に適しているC-末端Strep II融合タンパク質の産生を可能にするエピソーム発現構築物が構築された。そのTGeプロ酵素cDNAは、5'-プライマー5'-ATTAAGCTTGCCGCCACCATGGCTGCTCTAGGAGTCTおよび3'-プライマー5'-ATTGCGGCCGCTTCGGCTACATCGATGGACAACを用いてPCRにより増幅された。その5'-プライマーは新しいHind III制限部位とKozakの翻訳開始配列を導入し、一方、3'-プライマーは、新しいNot I制限部位を挿入し、停止コドンを取り除いた。最終産物発現ベクターpCEP-Pu/TGe/C-Strepを得るために、Hind III/Not I制限酵素加水分解PCR産物が精製され、また、pCEP4 (Invitrogen社製) から産生されるエピソーム真核細胞発現ベクターpCEP-Pu/BM40SP/C-Strepの同じ制限部位に挿入された。

【0035】

発現ベクターPcep4/n-Strepの構築

真核細胞エピソーム発現ベクターpCEP4 (Invitrogen社製) が、コザックの翻訳開始配列とStrep IIタグをコードする配列を複数クロ

ーン化部位の中に導入するために修飾された。プライマー5' - CTAGTTGCCCGCCACCATGGCTTGGAGCCATCCACAATTTCGAAAAGGと5' - CTAGCGCCTTTTCGAATTGTGGATGGCTCCAAAGCCATGGTGGCGGCAAと一緒にアニールされ、また、N - 末端Strept II融合タンパク質を産生するベクター (pCEP4/N - Strept) をそのように構築するNhe I部位の中に導入された。

【0036】

TGxの発現のための発現構築物の産生

C - 末端とN - 末端Strept II融合タンパク質の両方の産生を可能にする2つのエピソーム発現構築物が構築された。C - 末端Strept IIタグによる構築のため、TGx cDNAは、5' - プライマー5' - ATTGCGGCCCGCCATGGCCCAAGGGCTAGAAGおよび3' - プライマー5' - TAAGCGGCCGCTAATGCAAAGTCTACATAAACを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅された。その5' - プライマーは新しいHind III制限部位とKozakの翻訳開始配列を導入し、一方、3' - プライマーは、新しいNot I制限部位を挿入し、停止コドンを取り除いた。最終産物発現ベクターpCEP - Pu/TGx/C - Streptを得るために、Not I制限酵素加水分解PCR産物が精製され、また、pCEP4の同じ制限部位に挿入された。N - 末端Strept IIタグにより構築するために、TGx cDNAが、5' - プライマー5' - ATTGCTAGCCCAAGGGCTAGAAGTGGおよび3' - プライマー5' - TAAGCGGCCGCTTATAATGCAAAGTCTACATAAACを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅された。5' プライマーは新しいNhe I制限部位を導入し、また第1メチオニンを取り除き、3' - プライマーは、停止コドン直後に新しいNot I制限部位を挿入した。制限酵素Nhe IおよびNot Iにより加水分解した後、最終発現ベクターpCEP4/N - Strept/TGxを得るために、そのPCR産物は精製され、pCEP4の同じ制限部位に挿入された。

【0037】

TGkの発現のための発現構築物の構築

C-末端とN-末端Streptococcus II融合タンパク質の両方の産生を可能にする2つのエピソーム発現構築物が構築された。C-末端Streptococcus IIタグによる構築のため、TGkプロ酵素cDNAは、5'-プライマー5'-ATT AAGCTTGCCGCCACCATGATGGATGGGCCACGTTCCおよび3'-プライマー5'-ATTGCGGCCGCAGCTCCACCTCGAGATGCCATAGGを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅された。その5'-プライマーは新しいHind III制限部位とKozakの翻訳開始配列を導入し、一方、3'-プライマーは、新しいNot I制限部位を挿入し、停止コドンを取り除いた。最終産物発現ベクターpCEP-Pu/TGk/C-Streptococcus IIを得るために、Hind III/Not I制限酵素加水分解PCR産物が精製され、また、pCEP-Pu/BM40SP/C-Streptococcus IIの同じ制限部位に挿入された。N-末端Streptococcus IIタグにより構築するために、TGkプロ酵素cDNAが、5'-プライマー5'-ATTGCTAGCAGATGGGCCACGTTCCGATGおよび3'-プライマー5'-AATGGATCCTAAGCTCCACCTCGAGATGCを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅された。5'プライマーは新しいNhe I制限部位を導入し、また第1の2つのメチオニンを取り除き、3'-プライマーは停止コドン直後に新しいNot I制限部位を挿入した。制限酵素Nhe IおよびNot Iにより加水分解した後、最終発現ベクターpCEP4/N-Streptococcus II/TGkを得るために、そのPCR産物は精製され、pCEP4の同じ制限部位に挿入された。正確な挿入と完全な構築物の配列が、上述のようにサイクル配列決定により検証された。

【0038】

ヒトTGe、TGx、TGkの組換え発現

ヒト胚性腎細胞(293-EBNA、Invitrogen社製)がトランスフェクションされ、また、10%仔ウシ血清(Life Technologies社製)、1%L-グルタミン(Life Technologies社製)、200IU/mlペニシリン(Life Technologies社製)、2

00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Life Technologies 社製) を含むダルベッコの MEM NUT MIX F-12 (Life Technologies 社製) 培地における細胞培養で収穫された。pCEP-Pu 構築物によりトランスフェクションされた細胞は 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ピューロマイシンにより選択され、pCEP4 によりトランスフェクションされた細胞は 333 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (335 U/ml) ハイグロマイシン B (Calbiochem 社製) により選択された。その培地を取り除き、また寒冷 (4) 0.25 M ショ糖により洗浄した後、その細胞は寒冷 0.25 M ショ糖の中で機械的に溶解された。その可溶化液は、30 分間 4 にて 27,200 g で遠心分離により微粒子物質に関して清澄化され、その後 60 分間 4 にて 210,000 g で上清の超遠心分離にかけられた。チーズクロスによりろ過され、またプロテイナーゼ阻害薬として 1 mM フッ化フェニルメタンサルホニル (PMSF、Fluka 社製) を添加した後、12 ~ 72 ml の上清が 4 にて無菌化されてろ過された 1 mM EDTA を含む 50 mM トリス/HCl, pH 7.5 により平衡化され、また、3 cm^3 容量の Strep Tactin 親和性カラムに 0.4 ml / cm^2 / 分の流速で通した。1 mM PMSF を含む平衡緩衝液により延長洗浄した後、0.9 ml / cm^2 / 分の流速で、そのタンパク質は 1 mM PMSF と 2.5 mM デスチオビオチン (Sigma 社製) を含む平衡緩衝液により 0.4 ml / cm^2 / 分で溶出された。2 ml 分画が回収された。その精製は、上述のように、Strep タグに対するモノクローナル抗体を用いて SDS-PAGE 法と免疫プロットング法により制御された。そのタンパク質濃度は SDS-PAGE 法により推定され、また、ウシ血清アルブミンを標準として用いて、供給業者により提供されたプロトコルにしたがってピシンコニン酸 (BCA) タンパク質測定試薬 (Pierce 社製) を使用して測定された。

【0039】

トランスグルタミナーゼ活性測定法

TGc と TG e 活性は、触媒活性には重要な、いずれかの酸化スルフヒドリル基を還元するために、緩衝液が 7.5 mM ジチオトレイトールを含むという唯一の違い以外は、上述のように、37 にて 30 分間 [1,4-³H] プトレシン

(Amer sham社製)を組み込むことにより測定された。TGeは、45.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.5 U/ml) プロテイナーゼK (Sigma社製)、あるいは45.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (55.4 U/ml) トリプシン1:250 (Sigma社製)、あるいは1.18 mg/ml (1 U/ml) でディスパーゼ (Life Technologies社製) かのいずれかと一緒に37 °Cにて20分間それをブレインキュベートして、部分タンパク質加水分解により活性化させた。

【0040】

質量分光測定

線形検出用の高質量検出器を備えたBruker Reflex III装置を使用して、マトリックス補助レーザー離脱法によりTgcとTGeの質量分光測定が実施された。シナピン酸がマトリックスとして使用され、また外部校正がプロテインAの一重、二重、三重荷電分子イオンを使用して実施された。

【0041】

血清と患者

第1の研究では、患者はSemmelweis大学の内科の消化器科あるいは小児科、および皮膚 - 性病科で検査された。セリアック病の診断は空腸生検により確認され、一方、疱疹状皮膚炎は、皮膚生検により検証された。血清サンプルは、グルテン過敏性腸疾患 (33症例は疱疹状皮膚炎、また38症例はセリアック病) に罹患している71人の患者、非セリアック病性消化管疾患に罹患している26人の患者 (クローン病、食品過敏症、食品不耐性、腸管内感染、逆流性食道炎、非セリアック病性下痢、食事異常症)、および自己免疫疾患様のその他の診断を受けた27人の患者 (全身性エリテマトーデス、糖尿病タイプI)、異なる皮膚障害 (落葉状天疱瘡、魚鱗癬、蕁麻疹)、胆石症、肝脾腫大症、こびと症および健常者対照から採取された。患者群の平均年齢と性別は表1に提示する。

【0042】

【表1】

表1 患者の年齢（血液サンプル採取時の年齢）と性別

	CD	DH	GI	その他	合計
平均年齢	18.5	30.2	17.4	17.0	20.8
最低年齢	3	6	1	12	1
最高年齢	51	74	78	53	78
男性/女性	20/18	13/20	14/12	14/63	61/63

【0043】

TGc ELISA感受性についてのデータを得るために、われわれは、16人の治療患者（グルテン抜ききの食事をしている患者）から得た血清を現行の研究の中に含めた。

【0044】

自己免疫疾患に関連しているグルテン過敏性腸疾患についての補足的な研究では、血清はSemmelweis大学の内科の消化器科あるいは小児科、および皮膚-性病科、ケルン大学の医学部第I-IV内科、スウェーデンのWieslab社の自己免疫疾患研究所からその血清は得られた。血清サンプルは以下の自己免疫疾患の診断を受けた患者から採取された（括弧内は患者数）。グルテン過敏性腸疾患（141；うちグルテン抜ききの食事を実施している18人を含めた73人の疱疹状皮膚炎患者、およびグルテン抜ききの食事を実施している27人を含めた68人のセリアック病患者）、クローン病（31人）、水疱性天疱瘡（44人）、尋常性天疱瘡（57人）、多発性大腸炎（21人）、グッドパスチャー症候群（20人）、ヴェーゲナー肉芽腫症（20人）、リウマチ様関節炎（44人）、SLE（25人）、進行性全身性硬化症（7人）であった。乾癬性関節炎（5人）と肝炎C（39人）に罹っている患者から得た血清もまた、これら疾患が自己免疫成分を有する可能性があるため、研究された。

【0045】

全ての血清サンプルは測定されるまで-78で貯蔵された。対照血清（48）のうち、健常者（21人）から得たものと、はっきりと自己免疫成分を有してはいない疾患に罹患している患者（27人）から得たものとがあった。全ての血清サンプルは測定されるまで-78で貯蔵された。

【0046】

E M A 試験

血清 I g A 抗体が間接免疫蛍光法により測定された (Collin Pら、Sc and J Gastroenterol 1992 ; 27 : 367 - 71)。全ての血清サンプルはリン酸緩衝生理食塩水 (P B S , p H : 7 . 4) 中で 1 : 5 の割合で希釈された。サル (オナガザル類) の食道の反口側部分の 10 μ m クリオスタット組織片が抗原として使用された。結合 I g A が、 α -鎖特異的、蛍光イソチオシアン酸塩共役ウサギ抗ヒト I g A 抗対 (P B S 中で 1 : 40 ; D a k o 社製) により検出された。第 1 回目の研究に使用された全ての血清は I g A E M A に関しては疑いようもなく陰性あるいは陽性であった。補足的な研究では、E M A 試験はまったく実施されなかった。

【0047】

E L I S A 法

E L I S A 法は以前に説明されているカルシウム活性化試験に類似している (Dieterich Wら、Gastroenterology 1998 ; 115 : 1317 - 21 ; Sulkanen Sら、Gastroenterology 1998 ; 115 : 1322 - 8)。手短かに言うと、96 ウェルカ価プレート (Nunc MaxiSorp 社製) が 4 にて一晩中 (少なくとも 9 時間) ウェル毎に 5 mM CaCl_2 を含む、p H 7 . 5 の 50 mM トリス / H C l の 100 μ l 中でウェル毎に 1 μ g モルモット T G c (S i g m a 社製) あるいはヒト T G e あるいは T G c により塗布された。ブロッキングはまったく使用しなかった。各ステップ後、そのウェルは 10 mM E D T A および 0 . 1 % T w e e n 20 (T E T) を含む 50 mM トリス / H C l により洗浄された。血清は T E T によりさまざまな濃度に希釈され、あるいは、10 mM E D T A および 0 . 1 % T w e e n 20 (T E T) を含む 50 mM トリス / H C l 、および T G c あるいは T G e あるいは モルモット T G のさまざまな濃度の中でプレインキュベートされ、また、室温にて 1 . 5 時間プレート上でインキュベートされた。結合 I g A は、ペルオキシダーゼ共役抗ヒト I g A 抗体 (D a k o 社製) により検出され、T E T で 1 : 4000 の割合で希釈され、また室温にて 1 時間

インキュベートされた。色は、室温にて5分間、0.015% H_2O_2 を含む、pH 6.0の100mM酢酸ナトリウムに中に入れた60 μ g/ml 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン基質10 μ lにより現像された。その反応は100 μ lの20% H_2O_2 を加えることにより停止させた。吸光度は450 nmにてELISA読取り器で読み出された。

【0048】

試験で使用されたタンパク質の量と血清濃度は最適化された。全ての血清サンプルは3通りで調べられ、また陰性および陽性基準血清の3通りのものは緩衝液ブランクとともに、各プレートに含められた。抗体濃度は任意単位(AU)で表現され、すなわち、陽性基準血清のパーセンテージとして表わされた。

【0049】

カルシウム活性化の効果についてのデータを得るため、塗布緩衝液の中で $CaCl_2$ を加えずにヒトTGcにより実験的な塗布が実施された。

【0050】

阻害ELISA

TGeに対する血清IgA値は、TGcに対するそうした値に比較された。TGcに対して少々(1症例の血清)、中程度(1症例の血清)あるいは高度に(2症例の血清)上昇した血清IgA抗体力価を含むことが前に示されているセリアック病あるいは疱疹状皮膚炎に罹っている患者から得た4つの血清が研究された。ブロッキング実験は、室温にて60分間、0.1% Tween 20およびTGeあるいはTGcのいずれかの1 μ gを含む50mMトリス/HClの中で1:250~1:32000の連続希釈で血清をプレインキュベートすることにより実施された。血清希釈は、プレインキュベーションを行った場合と行わなかった場合とで、血清の抗体力価の間でもっとも大きな差が検出された血清希釈液が選択された。以下の阻害実験では、4つの血清が、室温にて60分間、TGcあるいはTGeの0~4 μ gの範囲にある連続希釈による0.1% Tween 20を含む50mMトリス/HClの中でのこの希釈率でプレインキュベートされた。

。

【0051】

統計

光学密度（またしたがってAU値で与えられた力価）は、ガウス分布を示さず、したがって、異なる患者群から得た力価の統計的説明に関しては、われわれは、その95%信頼区間（95%CI）を備えた中央値を提示する（Gardner MJとAltman DG編「信頼 - 信頼区間に関する統計と統計的ガイドライン」、ロンドン、British Medical Journal, 1989: 28 pp）および比較のため、Mann-Whitneyの非パラメトリック、不對、両側試験が使用された（Werner J. Biometrik und Medizinische Statistik, 第2版、Munche n - W i e n - B a l t i m o r e : U r b a n & S c h w a r z e n b e r g , 1 9 9 2 : 5 3 p p) 。 力 価 の 相 関 関 係 を 説 明 す る た め に 、 そ の 9 5 % C I に 関 す る S p e a r m a n の 相 関 関 係 係 数 と 正 規 分 布 で は な い 相 関 関 係 の 分 析 が 用 い ら れ た (G a r d n e r と A l t m a n , 1 9 8 9 ; W e r n e r , 1 9 9 2) 。

【0052】

カルシウム活性化および不活性化ヒトTGcELISAにおける力価の比較に関しては、ウィルコクソンの両側符号付き順位和検定が実施された（Werner, 1992）。その2つのELISAシステムの説明と比較に関しては、受信器操作特性（ROC）曲線とROC曲線下（AUC）の面積が95%CIに関して提示された。AUCの信頼区間を計算するために、もっとも頻繁に使用されている方法の他にも、最大値（1.0）に非常に近接しているAUCの信頼区間を説明するに当たってより適切であるため、ブートストラップテクニック、バイアス修正および加速（BCa）信頼区間法も適用された（DeLong ERら、Biometrics 1988; 44: 837-45; Mossamand, Med Decis Making 1995; 15: 358-66; Hellmich M Receiver operating characteristic (ROC) Kurven und Flächen darunter. [博士号論文] 1996. <http://www.medizin.uni-koeln.de/ka/jmsie/homepages/Martin.Hellmich/dr.html> (1999年6月にアクセス))。

【0053】

実施例

組換えヒトTGc

ヒトTGcをStreptIIタグが付いている融合タンパク質として、293-EbNAヒト胚性腎細胞系統の中で発現させた。そのタンパク質はStreptactinカラムに対する親和性結合により単一ステップで精製することができ、デスチオビオチンにより洗浄するに当たっては、89 kDa (図1A)

という推定分子量の単一バンドとして、クーマシー染色SDS-PAGE法により視覚化されて、そのタンパク質は溶出された。ウェスタンブロット分析では、そのバンドがモノクローナル抗TGc抗体と反応したことが示されている(図1B)。通り抜けて現れる免疫反応性がまったくなかった標識化タンパク質はほとんど全てカラムに結合していた(図1B)。13cm直径の細胞培養皿中のコンフルエント細胞単層可溶化液から得られる収率は、およそ200 µgであった。ヒトTGcの配列から算出された分子質量は77.3 kDaであり、また融合タンパク質のその算出された分子質量(10アミノ酸のカルボキシ末端タグを有するTGc)は78.4 kDaである。融合タンパク質の質量分光測定は78.3 kDaという分子質量を示した。細胞可溶化物では、発現ヒトTGcの活性が、トランスフェクションされていない293-EbNA細胞に存在するトランスグルタミナーゼのバックグラウンド活性よりも4.7倍高かった。新鮮に精製されたヒトTGcは、Sigma社から入手したモルモットTGcと同様かあるいはそれよりも高いことを示した。

【0054】

ヒトTGc ELISAの性能

ヒトTGcの最適塗布濃度がウェル毎に1 µgであった。校正のため、4人の患者から得た高度に陽性の血清を使用して、対数線形曲線が、1:250という希釈率と1:32000という希釈率の間でみられた。4つの陰性血清では低い希釈率(>1:500)で何らかのシグナルを示した。陽性血清では、1:250以下の希釈率で単一のプラトーを示した。1:125という希釈率での陽性および陰性結果の平均OD値は1:6であって、一方、より大きな希釈率では、1

：10以上であった。そのため、測定では、1：250という血清希釈率が使用された。1つの陽性および1つの陰性基準血清サンプルは試験性能を制御するために各測定法に含めた。陽性血清は、「標準」として使用され、また光学密度の結果は、標準血清のパーセンテージとして算出された任意の単位(AU)として示された。標準血清に関する変動の平均測定内および測定間係数はそれぞれ、1.3%と13.7%であった。ヒトTGcELISAに関する変動の平均測定内および測定間係数はそれぞれ3.2%(n=124)および9.2%(n=15)であった。

【0055】

治療していないグルテン過敏性腸疾患(セリアック病あるいは疱疹状皮膚炎)に罹っている患者についての中央値抗体濃度は61.4AU(n=55, 95%CI: 45.1~78.5)であって、対照については12AU(n=53, 95%CI: 10.8-13)、その差は有意であった(p<0.0001)。治療を受けた患者については、抗体濃度の中央値は48.1AU(n=16, 95%CI: 20.8~85.6)、消化管疾患の対照については、12.1AU(n=26, 95%CI: 9.8~14.7)、健常者とその他の診断を受けた対照については、12AU(n=27, 95%CI: 10.7~13.0)であった。ROC曲線下の面積は0.999(95%CI: 0.996~1.001; Bca方法による95%CI: 0.990~1.0)であった(図2)。

【0056】

18AUのカットオフ値が選択され、また、18AUに等しいかあるいは高い抗体濃度を有する血清が、ヒトTGcELISA陽性として標識化された。このカットオフ値は、98.1%(95%CI: 95.7~100%)および98.2%(95%CI: 95.9~100%)の特異性と感受性をそれぞれ付与している(治療を受けている患者は除外した)。臨床診断によるヒトTGc測定的一致率(治療を受けた患者は除いて)が106/108(98.1%)であって、1つの偽陽性と1つの偽陰性の結果が出ている(図3)。

【0057】

組換えヒトTGe

ヒトTGeはStreptIIタグをつけた融合プロ酵素として293-EBNAヒト胚性腎細胞系統の中で発現させた。そのタンパク質はStreptActin™カラムに対する親和性結合により単一ステップで精製することができた。デスチオビオチンにより溶出後は、SDS-PAGE法で単一80 kDaバンドを示し(図9)、そのバンドがStreptIIタグに対するモノクローナル抗体と反応した(図10、レーンII)。通り抜けて現れる免疫反応性がまったくなかった標識化タンパク質はほとんど全てカラムに結合していた。13cm直径の細胞培養皿中のコンフルエント細胞単層可溶化液から得られる収率は、およそ200 µgであった。ヒトTGeプロ酵素の配列から算出された分子質量は76826 Daであり、また融合タンパク質のその算出された分子質量(10アミノ酸のカルボキシ末端タグを有するTGeプロ酵素)は78011 Daである。融合タンパク質の質量分光測定は77765 Daという分子質量を示した。細胞可溶化物では、発現ヒトTGeの活性が、トランスフェクションされていない293-EBNA細胞に存在するトランスグルタミナーゼのバックグラウンド活性よりも2.5倍高かった。新鮮に精製されたヒトTGeプロ酵素は、TGc活性の1:40~1:80を示し、異なるプロテアーゼ(プロテアーゼK, トリプシンあるいはディスパーゼ)TGcと同様かあるいはそれよりも高いことを示した。

【0058】

ヒトTGe ELISAの性能

ヒトTGcに対して上昇IgA抗体値を示すグルテン過敏性腸疾患はまた、ヒトTGeに対する上昇IgA力価を示し、一方、ヒトTGcと反応しない血清はヒトTGeと反応しなかった(図11)。TGeに対する抗体力価は、TGc(図11)に関するよりも大抵の場合は低かった(図11)。

【0059】

阻害ELISA法

ヒトTGcあるいはTGeに関するグルテン過敏性腸疾患のプレインキュベーションは、ヒトTGcで塗布されたELISAプレートでのIgA抗体を阻害した(図12)。示されている結果は、セリアック病および疱疹状皮膚炎に罹って

いる患者から得た血清IgA抗体は、TGeに対する力価が低いにもかかわらず、ヒトTgcとTGEの両方と反応することを支持している。TgcとTGeの両方とも、Tgcとの血清IgA抗体の反応を阻害することができる。セリアック病と疱疹状皮膚炎に罹っている患者から得た血清抗体の少なくとも一部はその2つのトランスグルタミナーゼにより共有されているエピトープに対して方向付けられる。

【0060】

モルモットTgc ELISAの性能

モルモットTgcの最適塗布濃度は、ウェル毎に1 μ gであって、またその最適血清希釈率はヒトTgc ELISAの場合と同様に、1:250である。各測定は、同時にヒトTgc測定と並行して行われ、また、同じ血清サンプルと血清希釈が使用された。モルモットELISAに関する変動の平均測定内および測定間係数はそれぞれ、2.8% (n=124) および12.8% (n=15) であった。

【0061】

治療していないグルテン過敏性腸疾患（セリアック病あるいは疱疹状皮膚炎）に罹っている患者についての中央値抗体濃度は51.8 AU (n=55, 95%CI: 34.2~63) であって、対照については8 AU (n=53, 95%CI: 7.3-8.9)、その差は有意であった ($p < 0.0001$)。治療を受けた患者については、抗体濃度の中央値は18 AU (n=16, 95%CI: 9.2~69.9)、消化管疾患の対照については、7.5 AU (n=26, 95%CI: 6.6~9)、健常者とその他の診断を受けた対照については、8.5 AU (n=27, 95%CI: 7.2~10.3) であった。ROC曲線下の面積は0.980 (95%CI: 0.958~1.002; Bca方法による95%CI: 0.943~0.993) であった(図4)。

【0062】

14 AUのカットオフ値が選択され、また、14 AUに等しいかあるいは高い抗体濃度を有する血清が、ヒトTgc ELISA陽性として標識化された。このカットオフ値は、96.2% (95%CI: 92.8~99.6%) および9

2.7% (95%CI: 88.1~97.3%)の特異性と感受性をそれぞれ付与している(治療を受けている患者は除外した)。臨床診断によるヒトTGc測定的一致率(治療を受けた患者は除いて)が102/108(94.4%)であって、2つの偽陽性と4つの偽陰性の結果が出ている(図5)。

【0063】

カルシウム活性化の効果

32の血清サンプルが、カルシウム活性化を加えられた場合と加えられない場合のIgA抗ヒトTGc抗体に関してELISA法で試験された。総体的な抗体力価は有意な差は示さなかった($p = 0.27$)。しかし、カルシウム活性化測定で30AUよりも低い抗TGc力価を有する血清は、カルシウム活性化を行わなかった測定におけるよりも有意に低かった($n = 18, p = 0.009$)が、一方、高い方の力価は有意には異ならなかった($n = 14, p = 0.35$)。

【0064】

TGcELISAについてのEMAの比較

治療患者を除外して、1つの偽陽性結果を例外として、EMA陽性血清を有する全ての患者はグルテン過敏性腸疾患(55/56, 98.2%)に罹患していた。16のうち12人(75%)の治療を受けていたグルテン過敏性腸疾患患者は、EMAに関しては陽性であった。未治療EMA陽性症例だけを比較すると、ヒトとモルモットTGcELISAの結果は、54/56(96.4%)および51/56(91.1%)症例でEMA試験とそれぞれ一致していた。EMAによる偽陽性血清は、ヒトおよびモルモットTGcELISAの両方により陰性であった。ヒトTGcELISAに関して1つの偽陰性血清はまた、モルモットTGcELISAに関しても陰性であった。EMA陽性であるグルテン抜ききの食事が未完了である12人の患者は、また、両方のELISAシステムに関して陽性抗TGcIgA力価を有する。

【0065】

EMAに関して陰性である全ての患者は、グルテン過敏性腸疾患に罹患している治療を受けている患者か、あるいはグルテン過敏性腸疾患を有していない患者のいずれかであった。未治療EMA陰性症例だけを比較すると、ヒトとモルモット

トTGc ELISAの結果は、52/53(98.1%)および51/53(96.2%)症例でEMA試験とそれぞれ一致していた。ヒトTGc ELISAに関して1つの偽陽性血清はまた、モルモットTGc ELISAに関しても陽性であった。さらに、別の偽陽性血清が、モルモット測定により検出された。両方の偽陽性血清は、クローン病に罹っている患者から得たものであった。グルテン過敏性腸疾患の治療を受けている4人のEMA陰性患者はまた、モルモットTGc ELISAによっても陰性であったが、それらのうちの1例はヒトTGc ELISAにより陽性であった。

【0066】

ヒトおよびモルモットELISAによりEMA試験の総体的な一致率は、それぞれ120/124(96.8%)および117/124(94.4%)であった。

【0067】

モルモットTGc ELISAとのヒトTGc ELISAの比較

2つのELISAの結果は全ての試験血清の119/124(96%)で一致していた。4つの一致しなかった症例では、ヒト測定が、モルモット測定よりも感受性が高く、ヒト測定では陽性に出た。それらのうちの1つは、グルテン抜ききの食事を受けていたEMA陰性セリアック病患者であった。5番目の不一致症例では、モルモットELISAがクローン病に罹っている患者に関して偽陽性という結果を出していた。しかし、ヒトTGc ELISAでは抗体力価も高く(17.5AU)、ほとんどがカットオフ値(18AU)に届いていた。

【0068】

ヒトTGc ELISAの偽陽性陰性結果はモルモットTGc ELISAのそうしたものと一致していた。両方の測定で、1人のEMA陽性セリアック病患者の血清を認識するのに失敗し、また両方とも、クローン病を有する患者を陽性として検出していた。両方の試験とも、EMA偽陽性患者の場合、正確な、陰性結果を出していた。

【0069】

2つの測定に関する力価はよく相関しており($r_s = 0.9377$, 95% C

I : 0 . 9 1 2 1 ~ 0 . 9 5 5 9 , $p < 0 . 0 0 0 1$)、その相関関係は理論的には指数関数であったが、しかし、1 . 0 5 という指数を有する実際に線形のものであった (図 8)。ROC 曲線下の面積間の差違は 0 . 0 1 9 であった (9 5 % C I : - 0 . 0 0 2 ~ 0 . 0 4 0 ; B C a 法による 9 5 % C I : 0 . 0 0 5 ~ 0 . 0 5 6)。

【 0 0 7 0 】

組換えヒト T G e

ヒト T G e は S t r e p I I タグをつけた融合プロ酵素として 2 9 3 - E B N A ヒト胚性腎細胞系統の中で発現させた。そのタンパク質は S t r e p T a c t i n TM カラムに対する親和性結合により単一ステップで精製することができた。デスチオビオチンにより溶出後は、S D S - P A G E 法で単一 8 0 k D a バンドを示し (図 9)、そのバンドが S t r e p I I タグに対するモノクローナル抗体と反応した (図 1 0)。通り抜けて現れる免疫反応性がまったくなかった標識化タンパク質はほとんど全てカラムに結合していた。1 3 c m 直径の細胞培養皿中のコンフルエント細胞単層可溶化液から得られる収率は、およそ 2 0 0 μ g であった。ヒト T G e プロ酵素の配列から算出された分子質量は 7 6 8 2 6

D a であり、また融合タンパク質のその算出された分子質量 (1 0 アミノ酸のカルボキシ末端タグを有する T G e プロ酵素) は 7 8 0 1 1 D a である。融合タンパク質の質量分光測定は 7 7 7 6 5 D a という分子質量を示した。細胞可溶化物では、発現ヒト T G e の活性が、トランスフェクションされていない 2 9 3 - E B N A 細胞に存在するトランスグルタミナーゼのバックグラウンド活性よりも 2 . 5 倍高かった。新鮮に精製されたヒト T G e プロ酵素は、T G c 活性の 1 : 4 0 ~ 1 : 8 0 を示し、異なるプロテアーゼ (プロテアーゼ K , トリプシンあるいはディスパーゼ) T G c と同様かあるいはそれよりも高いことを示した。

【 0 0 7 1 】

実施例と結果についての考察

われわれの知識では、ヒト T G c は D A N N 組換え法による哺乳動物細胞でのものよりも前に発現することはなかった。われわれは、2 つの理由で細菌の代わりにヒト細胞を使用することを好んだ。まず、T G c の翻訳後修飾に関する証拠

がないが、われわれはこの可能性を完全には除外することができないでいる。こうした修飾は細菌では十中八九は起こらないであろう。第2に、シャペロンが正確な折りたたみを得るのに必要である場合は、それら修飾がヒト細胞に存在する可能性がさらにあると考えられる。

【0072】

モルモットTGcの分子質量は、質量分光測定により測定したときには、ヒトTGcのそれとほんの少し異なるだけである(0.1 kDa)が、しかし、モルモットTGcはヒトTGcよりもSDS-PAGE上で明らかに速く走行する。ヒト線維芽細胞から得たTGcは、われわれの融合タンパク質とほぼ同じ速度で走行し、それらの間の差違は1.2 kDaである。これらの観察結果からは、ヒトとモルモットTGcの構造間の差違は、高度なアミノ酸識別によって示唆されているものよりも、さらに甚大であることが示されている。

【0073】

Strept IIタグが付いている融合タンパク質としてのヒトTGcはクーマシー染色ゲル上に1つの単一バンドを付与する1つのステップで非常に効果的に精製することができた。タンパク質バンドは、組織トランスグルタミナーゼとして、免疫プロットにより明確に同定することができた。質量分光測定により、予想される分子サイズが与えられる。精製された組換えヒトタンパク質はトランスグルタミナーゼ活性を有する。ヒトTGcがモルモット酵素と同じ触媒活性を有しているのかどうかは分かっていない。我々の精製タンパク質はモルモット肝TGcと同量で同様あるいはより高い活性を有していた。したがって、われわれは、われわれが測定で使用しているタンパク質は、C-末端Strept IIタグを付けた精製され、活性のあるヒトTGcであると結論付ける。

【0074】

試験に使用されるモルモット肝TGc作成物には、モノクローナル抗TGc抗体により免疫反応性ではないその他のタンパク質汚染物が含まれている。しかし、その元の形態で他の原著者らにより成功裡に使用されてきたように、われわれは、それをさらに精製することはしなかった。マイクロ力価ウェルの中で見られる免疫陽性は、ある症例では、汚染物に対する反応によるものである可能性が

あることを除外できない。

【0075】

Sulkanenと共同研究者(Sulkanen Sら、Gastroenterology 1998; 115: 1322-8)は、モルモットTGcの活性に適している濃度で塗布緩衝液に付与されているカルシウムは、抗体によるTGcのさらに特異的な検出により、試験性能を改善させることを示している。原著者らは、カルシウム活性化により起こされる配座変化として、それらの観察を説明しているが、しかし、塗布後、彼らは洗浄によりカルシウムを除去し、また、その後彼らが高濃度のEDTAを使用し、そのため、抗体-抗原反応はカルシウムがない場合に起こる。したがって、配座変化は、カルシウム除去後にTGc分子を固定化することにより維持されると考えられる。塗布により非可逆性になるとは考えられない配座変化のほかに、この効果についてはもう1つ可能な説明がある。TGcはそれ自体基質として作用することができ、また、高分子量のタンパク質複合体を形成するようにそれ自体を架橋することができる(Birckbichler PJら、Biochem Biophys Res Commun 1977; 78: 1-7)。これは、活性測定で使用されているのと同様でTGcの濃度であるウェルでは起こる可能性がある。したがって、TGcモノマーだけではなく、TGc複合体が、ELISAウェルに固定されうるし、またこれは、より高いシグナルを付与する抗体結合を助力しうる。さらに、架橋TGc複合体は、TGcモノマーのそうしたものとは異なる新しい抗原エピトープを示すことができる。この仮説は、カルシウム活性化モルモットTGcと一緒にセルアック病血清がプレインキュベーションされることにより、ELISAの再活性化を効果的にブロックするという観察結果により支持されるが、しかし、不活性化モルモットTGcと同じブロッキング効果を得るためには、10倍量でのプレインキュベーションが必要となる。

【0076】

Sulkanenと共同研究者(Sulkanen Sら、Gastroenterology 1998; 115: 1322-8)は、ただ単にカルシウム活性を使用することにより、元の方法を変更しただけではなく、緩衝液を変え、

またブロッキングを省略した。彼らは、改善された測定性能を担っている成分を示すデータを提示していない。われわれは、ヒトTGcのカルシウム活性化を行う場合と行わない場合で、いくつか陽性および陰性の血清を試験したが、その試験の総合的な性能での有意な変化を見出すことはできなかった。これは、カルシウムに加えて、その他の要素がモルモットTGc測定の最適化には重要であることを示唆している。しかし、軽いウム活性化測定での30AUよりも低い抗TGc力価を有するEMA陽性血清の光学密度が有意に低いか、あるいは陰性であっても、カルシウム活性がない場合の測定では、われわれはヒトTGcについての測定でもカルシウムを使用する。

【0077】

E L I S Aに関するカットオフ値の設定は、試験のROC分析に基づくものであった。グルテン過敏性腸疾患を有するか、あるいは有しない個人の完全な分離を提供するカットオフ値はみつけることができなかったが、生検による診断と一致率は両方の試験で非常に高い。モルモットTGc E L I S Aが、疱疹状皮膚炎に覆っている未治療の2人の患者と、ヒトTGc E L I S Aにより検出することができたセリアック病に罹っている未治療の1人の患者を検出することができなかった。2つのE L I S A感受性の95%信頼区間が重複し、またしたがって、感受性の差違がさらなる研究により確認されなければならないが、しかし、その結果から、モルモットTGcでは保存されていなかったヒトTGcのエピトープに対して数例では自己抗体が方向付けられるという仮定が確認されている。はっきりとEMA陽性であるセリアック病患者から得られた1つの血清は、どちらのE L I S Aでも免疫反応性のものではなかったし、またその力価の値がそれまではカットオフ値よりも下であり、その結果はおそらく偶然ではない。TGcはグルテン過敏性腸疾患での自己抗原であるばかりでなく、何らかの稀な症例では、EMA陽性が起こっても、TGcに対する抗体はまったく存在しないことが考えられる。これら実験は、全ての患者の抗体がモルモット抗原と交差反応する可能性がないため、カルシウム活性化ヒトTGcを使用して繰り返し行われるべきであろうが、これはまた、モルモットTGcによるTGcに対するIgAクラス自己抗体の免疫吸光度によっては抗筋内膜活性を完全に排除することができない(

Lock RLら、Clin Exp Immunol 1999;116:258-62)という観察結果によっても支持されている。

【0078】

EMA試験では、1998年2月に一過性の下痢をした8歳の少女で、偽陽性の結果が生じた。繰り返し行われたEMA試験では、平滑筋細胞の細胞間空隙におけるIgA結合が示されている。空腸組織学的には、グルテン過敏性腸疾患に関しては陰性であったが、その下痢は再度起こることはなかった。血清がEMA試験により偽陽性であったという事実があったが、しかし、両方のELISAにより正確に診断され、またTGcではなく抗原によってEMA陽性が生じるという可能性もまた、際立せられることになる。

【0079】

クローン病に罹っている2人のEMA陰性患者が、モルモットTGc ELISAではカットオフ値によりも上のTGc抗体力価を有しており、それらのうち1つもまたヒトTGc ELISAでもそうだったことは興味深いことである。腹腔疾患とクローン疾患は同じ患者で起こることが記載されている(Gillbergら、Scand J Gastroenterol 1982;17:491-6)が、しかし、この組み合わせは非常に稀である。われわれの2つの症例では、関連腹腔疾患を除外することはできないが、しかし、両方の力価とも境界値に近い(ヒトTGc ELISAでは216と17.5AU、モルモットELISAでは15.9と17.8AU)、力価の上昇は活性腹腔疾患での抗体産生から得られるものよりも、クローン病でのTGcに対する低いレベルのIgA自己抗体産生から結果的に生じる可能性がある。この推論は、両方のELISAシステムで、クローン病に罹っている患者の力価の中央値は、健常者や、その他の消化管あるいは非消化管疾患に罹っている患者のそれよりも大きいという事実により支持される。しかし、現在の研究で試験された多くの患者血清の差違や数は非常に小さく、そのため、この発見の有意性を判断することはわれわれにはできない。

【0080】

完全なあるいは不完全なグルテン抜きの食事を受けている患者は、抗体力価の

広範なスペクトルを有し、また、E L I S Aのその結果は、E M A試験のそれらと良好な一致を見ている。ヒト抗原によるE L I S Aは、1つのE M A - およびモルモットE L I S A陰性セリアック病患者を陽性として認識しまうE M A試験あるいはモルモットE L I S Aよりも、この点に関しては、さらに少々感受性が高いことになる。

【0081】

その他の確立しているシステムと比較すると、ヒトT G c E L I S AはE M A試験と同様に特異的であり、また感受性があり、またモルモットT G c E L I S Aよりも優れたものであることが判明した。その結果からは、本研究での全ての試験システムの高い診断価値が示されているが、しかし、特に、ほとんど完璧な感受性と特異性を有するヒトT G c E L I S Aが高い診断価値を示し、しかもE M A試験の欠点は有していないことが示されている。したがって、われわれはヒトT G cに基づくE L I S Aは、簡易で非侵襲的なスクリーニングおよびグルテン過敏性腸疾患に対する選択すべき方法であるとわれわれは結論付ける。

【0082】

図6と7に要約してあるその結果は、グルテン過敏性腸疾患だけではなく、その他の自己免疫障害でもヒト組織トランスグルタミナーゼに対するI g Aがまた検出されることを示している。セリアック病や疱疹状皮膚炎ではない他の自己免疫疾患に罹患している患者のヒトT G s E L I S A陽性は活性グルテン過敏性腸疾患を有する患者によるものではない可能性が高い。ある症例では、力価が非常に高く、その試験は疾患との現実の関連を示していることが考えられるが、全ての自己免疫患者の1 / 4以上がグルテン過敏性腸疾患に関連した疾患を有していることは実際にはほとんどありえないことのものである。表2に示されているように、腹腔疾患は、さまざまな自己免疫障害に関連して説明されてきた。

【0083】

【表2】

表2 グルテン過敏性腸疾患との関連が報告されている自己免疫(AI)疾患の形態

アジリ病	再発性心膜炎
AI 溶血性貧血	再燃性多発性軟骨炎
AI 血小板減少紫斑病	リウマチ様関節炎
AI 甲状腺疾患	カルコチニシ
萎縮性胃炎-悪性貧血	シェーグレン症候群
IgA 腎症あるいは IgA 糸球体腎炎	SLE、脾臓萎縮
重症筋無力症	タイプ I (インスリン依存性) 糖尿病
部分肺°ジストフィー	潰瘍性大腸炎
多発性筋炎	脈管炎(全身性脈管炎と皮膚血管炎の両方)
原発性胆汁性肝硬変	白斑
原発性硬化性胆管炎	

これらの関連性の一部は証明されているが、その他の部分是不確かなものであった。

【0084】

グルテン過敏性腸疾患は、さまざまな再吸収障害の原因となる十二指腸空腸領域のT細胞を介した炎症を引き起こすことができることが知られている(総説については、Trejdosiewicz LKら、Clin Gastr 1995;9:251-72)。後者は痛みを伴う下痢、鉄欠乏貧血、低蛋白血症、骨粗鬆症、無月経、ビタミン不足症、および小児では、成長と発達遅滞という結果を生じることがある(総説については、Corazza GR, Gasbarrini G. Coeliac disease in adults. Bailliere Clin Gastr 1995;9:329-50; Littlewood JM. Coeliac disease in childhood. Bailliere Clin Gastr 1995;9:295-328)。これらの直接的な結果のほかに、その疾患の持続によりさまざまな自己免疫障害(例えば、糖尿病タイプ1)や悪性疾患(例えば、十二指腸空腸リンパ腫)が起こりやすくなる。疱疹性皮膚炎の臨床兆候や症状は、皮膚疾患のそれを主なものとする(大きな関節の伸筋側表面上に典型的には位置して横たわる紅斑を伴う多形性の痒い疱疹)、胃腸学的症状は多くの場合軽度、あるいは臨床的にはまったく無い。しかし、空腸病変を示唆する何の臨床的兆候ある

いは症状はまったく無い場合であっても、組織学的な検査により炎症性小腸病変を多く発見することができる。疱疹状皮膚炎の腸疾患は、グルテン過敏性腸疾患のこれら2つの形態の両方に同じあるいは非常に類似している病因および病理メカニズムを示唆するセリアック病におけるそれと形態学的、臨床的にまた、機能的に同一である。

【0085】

しかし、われわれの結果は、自己免疫プロセスにおけるTGcの一般的な役割と、その他のトランスグルタミナーゼを示す。他の自己免疫疾患に罹患している患者におけるTGc IgAに対して結果生じた陽性成績はグルテン過敏性腸疾患の診断の基礎としてだけ受け取るべきではない。一方、TGcに対する抗体、およびTGcなどのその他のトランスグルタミナーゼは、グルテン過敏性腸疾患タイプのその他の自己免疫疾患に罹患している患者のためのマーカーとして使用することができ、また、こうした疾患群内の患者のサブグループを定義するのに役立つことができる。

【0086】

その結果、われわれはグルテン過敏性腸疾患タイプあるいはグルテン過敏性腸疾患に関連している自己免疫疾患の診断のための新しい方法、特に、標本を採取するステップと、ヒト組織トランスグルタミナーゼあるいはその他のトランスグルタミナーゼに対する抗体のためのその標本を試験するステップとを含む方法を提供する。このように、腹腔疾患ではない自己免疫疾患は、診断し鑑別することができ、とりわけ、グルテン過敏性腸疾患タイプあるいは潜在性、非活性グルテン過敏性腸疾患の自己免疫疾患の存在が原因となっている女性の不妊症に関連している自己免疫疾患(Collinら、Gut, 1996: 39, 382-384)、流産のリスク増加(Smeckulaら、Eur. J. Gastr. & Hep. 1996; 8(1), 63-67)あるいは胎児成長低下だけでなく、疱疹状皮膚炎すなわちデューリング病、アジソン病、AI溶血性貧血、AI血小板減少紫斑病、AI甲状腺疾患、萎縮性胃炎-悪性貧血、IgA腎症あるいはIgA系球体腎炎、重症筋無力症、部分リポジストロフィー、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、再発性心膜炎、再燃性多発性軟骨炎、リ

ウマチ様関節炎、サルコイドーシス、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス（SLE）、脾臓萎縮、タイプI（インスリン依存性）糖尿病、その他のタイプの糖尿病、潰瘍性大腸炎、脈管炎（全身性脈管炎と皮膚血管炎の両方）、白斑などの自己免疫疾患を診断し鑑別することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、TGcのSDS-PAGE（A）および免疫ブロット（B）分析を示す。

【図2】

ヒトTGc ELISAに関するレシーバー操作特性（ROC）曲線である。

【図3】

対照（I）とセリアック病または疱疹状皮膚炎患者（II）におけるヒトTGc ELISAにおける血清抗TGc抗体濃度を示す。

【図4】

モルモットTGc ELISAに関するROC曲線である。

【図5】

対照（I）とセリアック病あるいは疱疹状皮膚炎（II）におけるモルモットTGc ELISAシステムにおける血清抗TGc抗体濃度を示す。

【図6】

任意の単位（AU）で与えられたヒトTGc ELISAにおけるTGcに対するIgA抗体の血清濃度を示す。

【図7】

ヒトTGcに対するIgA抗体の血清濃度を示すボックスとホイスカ図である。

【図8】

ヒトとモルモットTGc ELISAとの間の抗体価の相関関係を示す。

【図9】

精製後のTGeのSDS-PAGE分析値を示す。

【図10】

Strep II タグに対するポリクローナルウサギ抗体を使用したヒト T G s の免疫ブロット分析を示す。

【図 1 1】

E L I S A におけるヒト T G c あるいは T G e に対するグルテン過敏性腸疾患 (G S E) 患者血清における I g A の結合を示す。

【図 1 2】

固体相ヒト T G c に対するヒト T G c (点線) あるいは T G e (実線) の増加量と共についてプレインキュベーションすることによる 4 人のグルテン過敏性腸疾患血清における I g A 結合の阻害を示す。

【図 1】

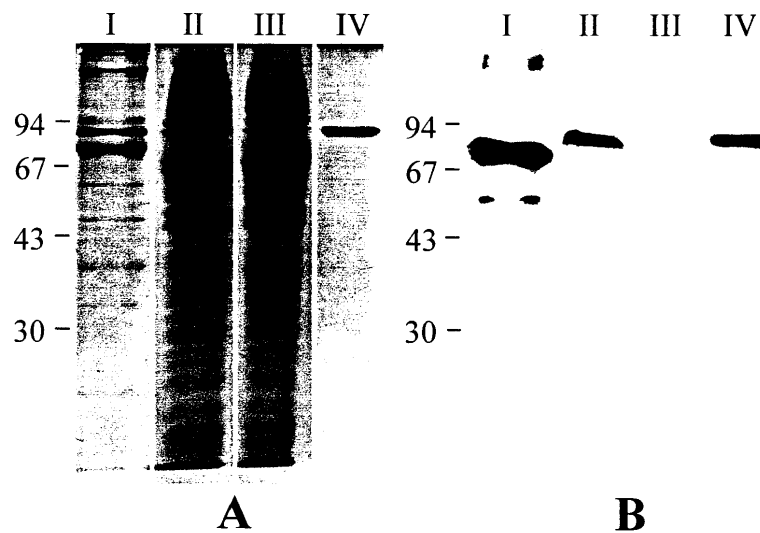


Fig. 1

【图2】

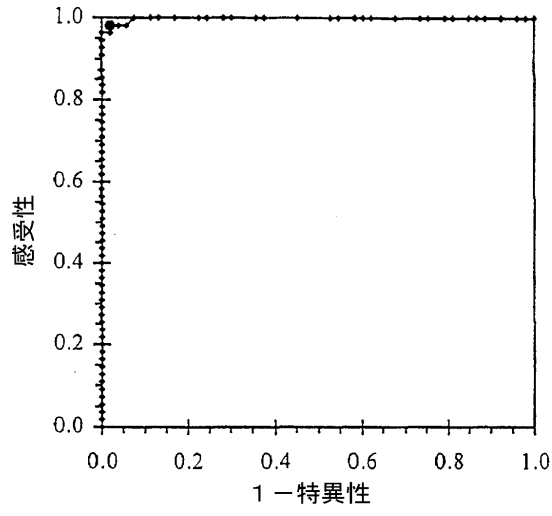


Fig. 2

【图3】

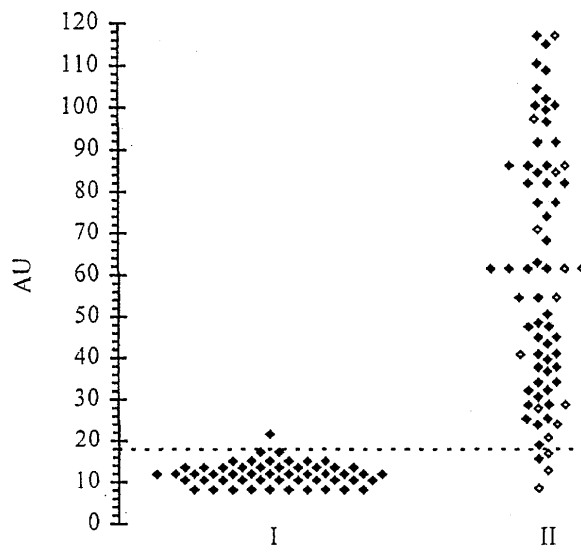


Fig. 3

【图4】

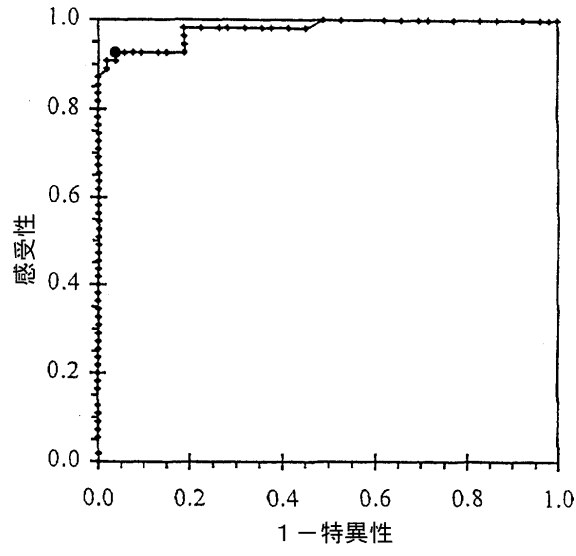


Fig. 4

【图5】

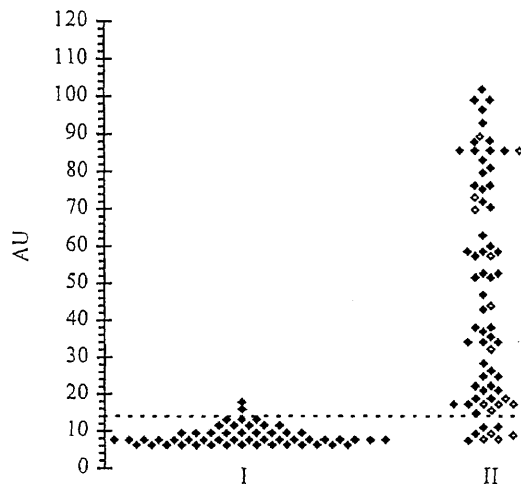


Fig. 5

【図6】

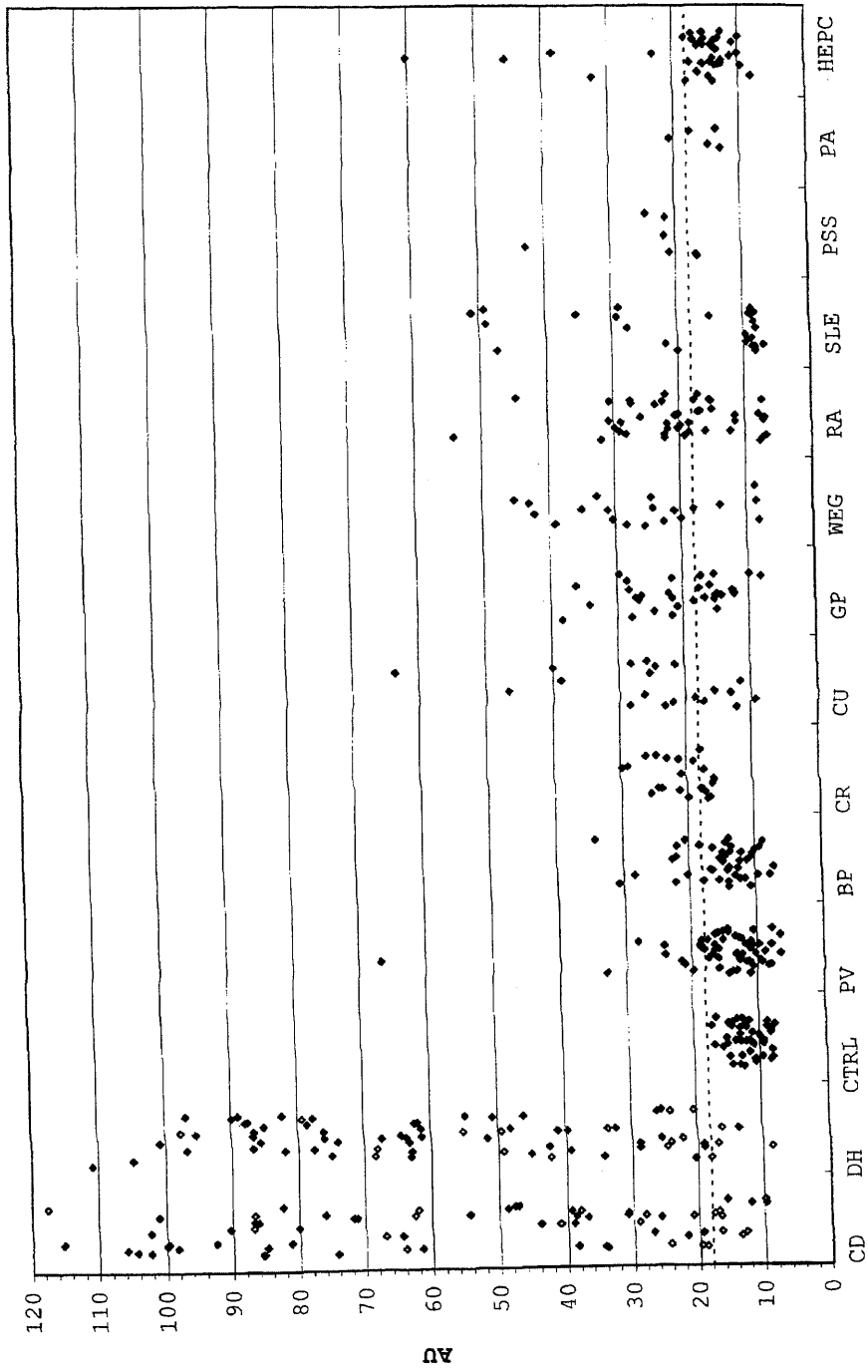
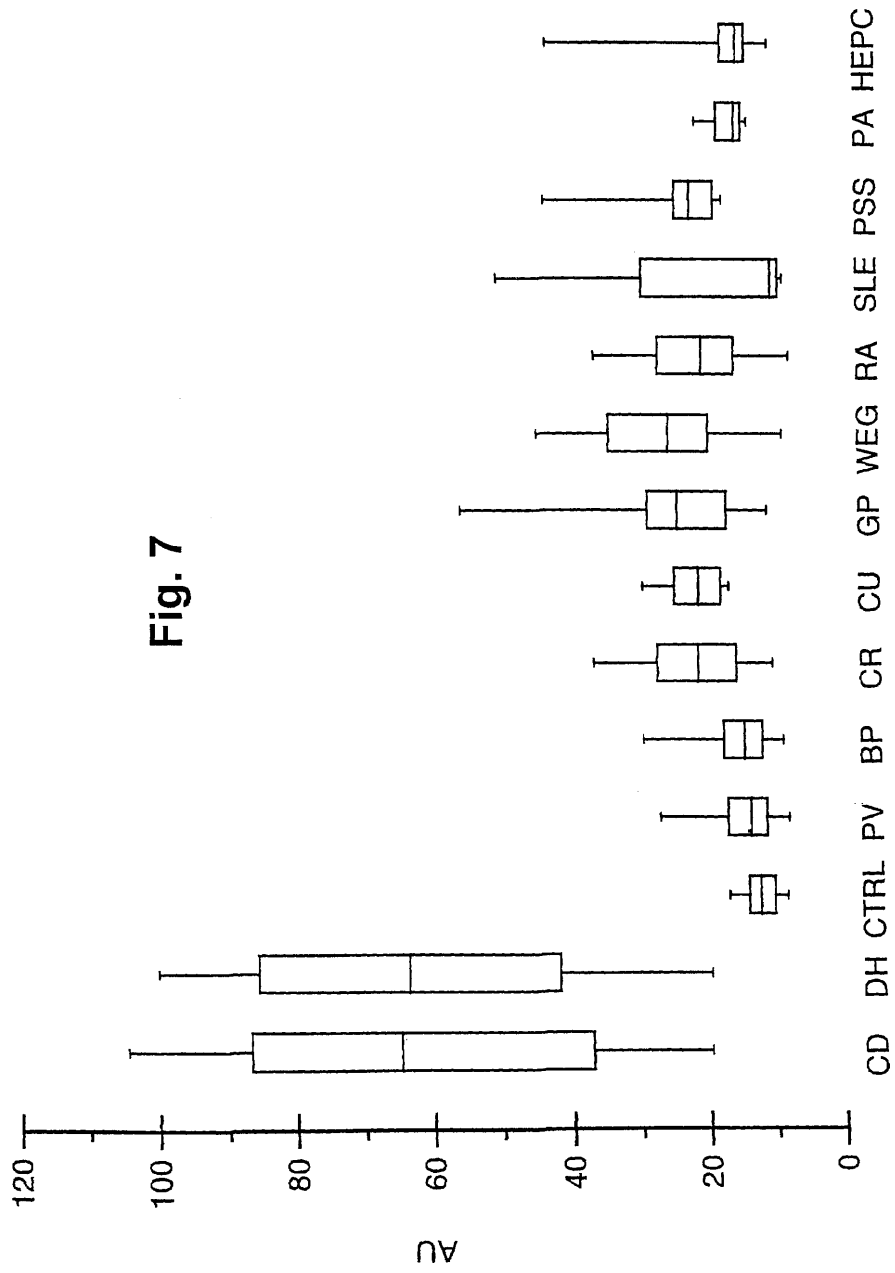


Fig. 6

【图7】



【図8】

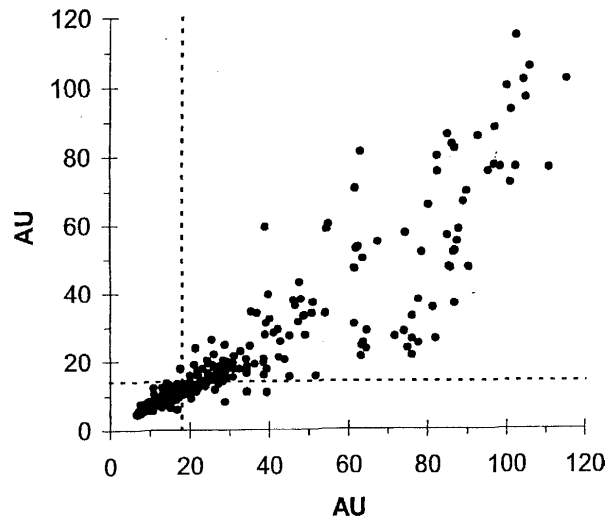


Fig. 8

【図9】

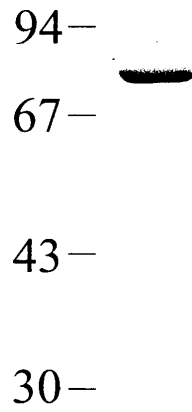


Fig. 9

【図10】

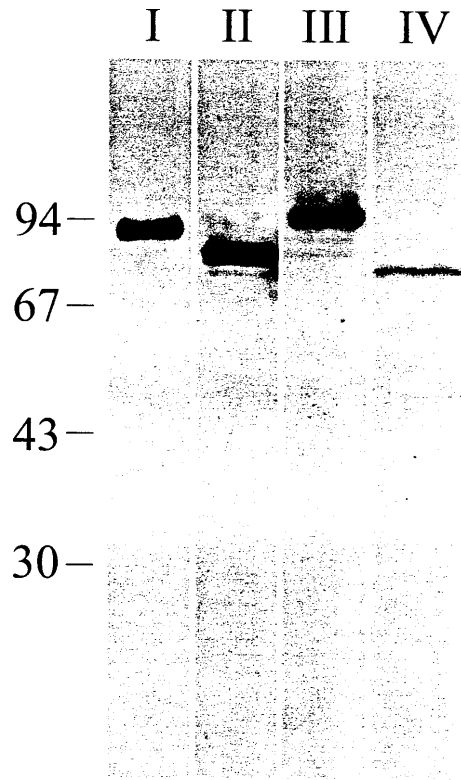
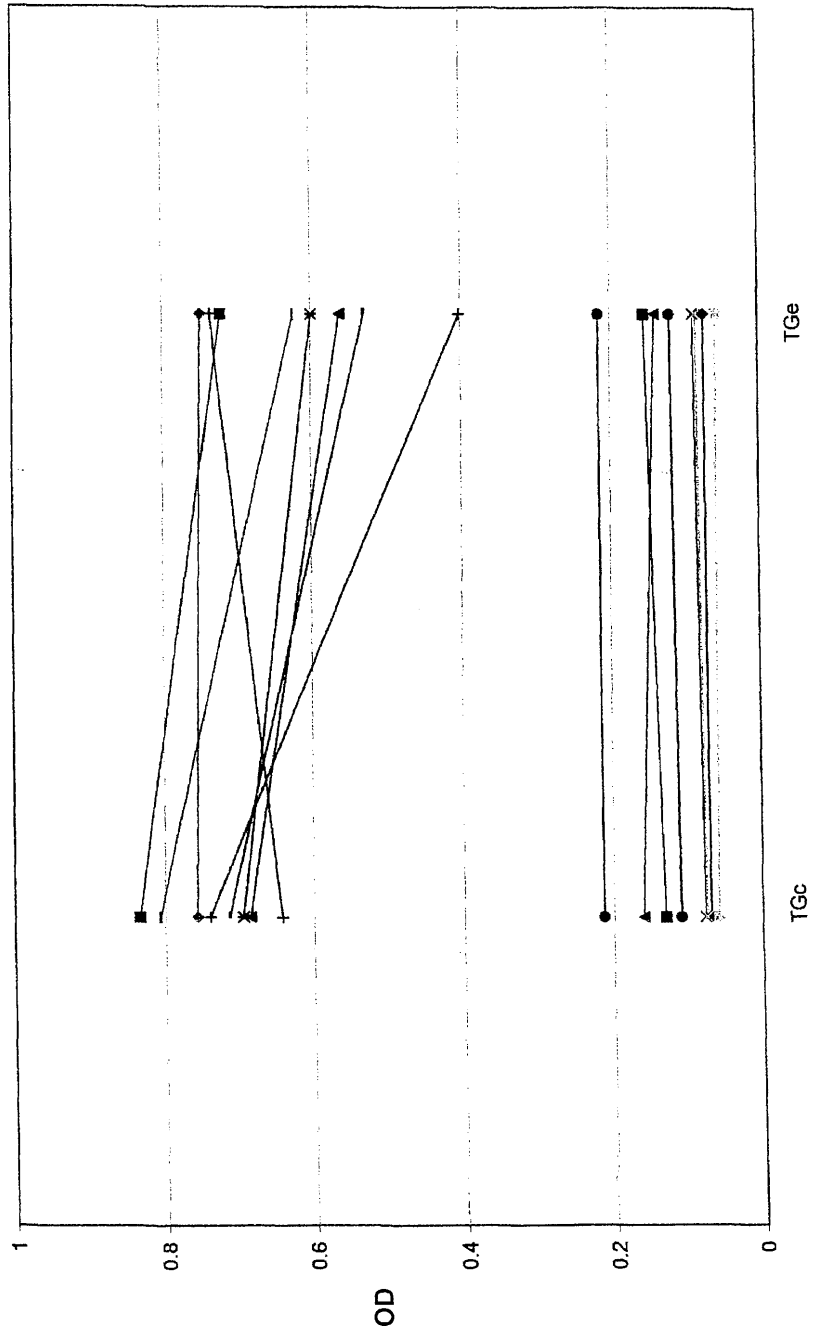


Fig. 10

【図11】

Fig. 11



【図12】

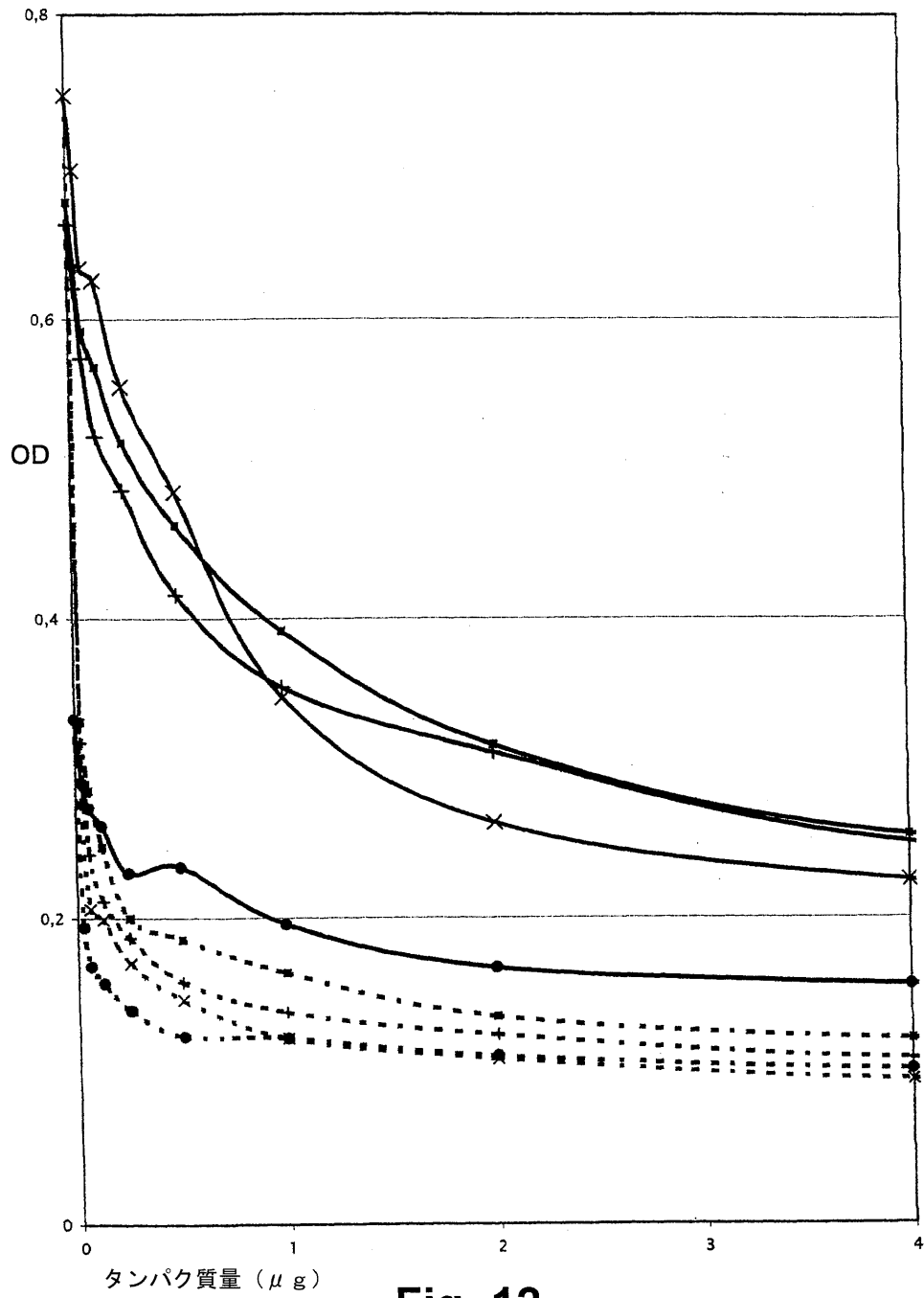


Fig. 12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern at Application No PCT/EP 00/06025
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/564		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SARDY MIKLOS ET AL: "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 45, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 2142-2149, XP002155800 ISSN: 0009-9147 the whole document --- -/-	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 3 January 2001		Date of mailing of the international search report 19/01/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern PCT/EP 00/06025	of Application No
---------------------------	-------------------

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SEISSLER J ET AL: "Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: Evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease." HORMONE AND METABOLIC RESEARCH, vol. 31, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 375-379, XP000974671 ISSN: 0018-5043 the whole document</p>	1-12
X	<p>DE 196 30 557 A (DIETERICH WALBURGA ;SCHUPPAN DETLEF PRIV DOZ DR DR (DE)) 29 January 1998 (1998-01-29) the whole document</p>	1-12
X	<p>DIETERICH WALBURGA ET AL: "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease." NATURE MEDICINE, vol. 3, no. 7, 1997, pages 797-801, XP002155802 ISSN: 1078-8956 cited in the application the whole document</p>	1-12
A	<p>US 5 726 051 A (BIRCKBICHLER PAUL J ET AL) 10 March 1998 (1998-03-10) claims</p>	1-12

1

Form PCT/ISA/E10 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

Intern. Application No.
 PCT/EP 00/06025

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19630557 A	29-01-1998	AU 718797 B	20-04-2000
		AU 4201197 A	10-02-1998
		BR 9710500 A	18-01-2000
		CN 1225723 A	11-08-1999
		CZ 9900117 A	14-07-1999
		WO 9803872 A	29-01-1998
		EP 0912898 A	06-05-1999
		ES 2131038 T	16-07-1999
		GR 99300020 T	30-06-1999
		NO 990190 A	15-03-1999
		PL 331203 A	05-07-1999
		SI 9720044 A	31-08-1999
		SK 6799 A	16-05-2000
US 5726051 A	10-03-1998	AU 5590394 A	24-05-1994
		WO 9410296 A	11-05-1994

フロントページの続き

- (71)出願人 パウルソン, マツツ
ドイツ国、デー - 50931・ケルン、ヨーゼフ・シュテルツマン - シュトラーセ・52、ユニバーシテイ・オブ・ケルン、メディカル・ファカルティ、インステイテユート・フォー・バイオケミストリー・ザ・セカンド
- (72)発明者 パウルソン, マツツ
ドイツ国、デー - 50931・ケルン、ヨーゼフ・シュテルツマン - シュトラーセ・52、ユニバーシテイ・オブ・ケルン、メディカル・ファカルティ、インステイテユート・フォー・バイオケミストリー・ザ・セカンド
- (72)発明者 シャルデイ, ミクロス
ドイツ国、デー - 50931・ケルン、ヨーゼフ・シュテルツマン - シュトラーセ・52、ユニバーシテイ・オブ・ケルン、メディカル・ファカルティ、インステイテユート・フォー・バイオケミストリー・ザ・セカンド
- (72)発明者 オーデンタール, ウーベ
ドイツ国、デー - 50931・ケルン、ヨーゼフ・シュテルツマン - シュトラーセ・52、ユニバーシテイ・オブ・ケルン、メディカル・ファカルティ、インステイテユート・フォー・バイオケミストリー・ザ・セカンド
- (72)発明者 カルパテイ, シヤロルタ
ハンガリー国、ハー - 1085・ブダペシュト、マリア・ウツツア・41、ゼンメルワイズ・ユニバーシテイ・オブ・メディスン、デパートメント・オブ・ダーマト - ベネロロギー
- (72)発明者 スミス, ニール
ドイツ国、デー - 50931・ケルン、ヨーゼフ・シュテルツマン - シュトラーセ・52、メディカル・ファカルティ、インステイテユート・フォー・バイオケミストリー・ザ・セカンド
- (72)発明者 イーシュリーマン, ダニエル
イギリス国、ウエールズ・シー・エフ・10・3・ユー・エス、カーデイフ、ミュージアムズ・アベニュー、カーデイフ・ユニバーシテイ、スクール・オブ・バイオサイエンス、コネクティブ・ティシュー・バイオロジー・ラボラトリーズ

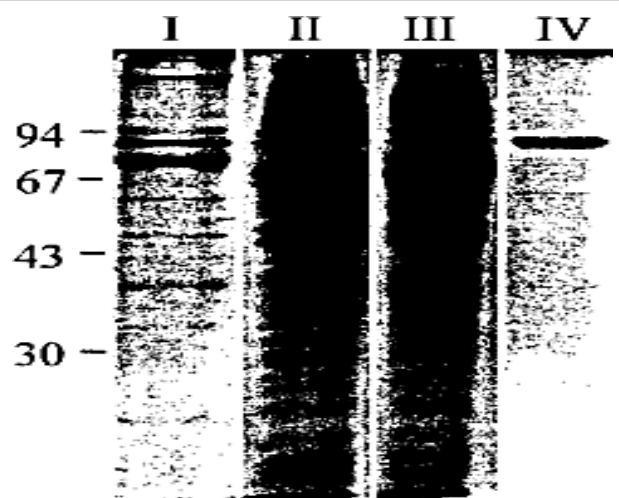
【要約の続き】

鑑別することができることが見い出された。

专利名称(译)	诊断面筋敏感性肠病和其他自身免疫性疾病		
公开(公告)号	JP2003521677A	公开(公告)日	2003-07-15
申请号	JP2001507087	申请日	2000-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	李满日UGG卢武铉国单击AG 基于阿蜂板 Paurusonmatsutsu		
申请(专利权)人(译)	李满日UGG卢武铉国的点击都游戏 Bisurabu基于 Pauruson , Matsutsu		
[标]发明人	パウルソンマツツ シヤルデイミクロス オーデンタールウーベ カルパテイシヤロルタ スミスニール イーシュリーマンダニエル		
发明人	パウルソン,マツツ シヤルデイ,ミクロス オーデンタール,ウーベ カルパテイ,シヤロルタ スミス,ニール イーシュリーマン,ダニエル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2333/9108 G01N2800/202 G01N2800/24 Y10S436/811		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/573.A		
优先权	1999111975 1999-06-28 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

面筋敏感性肠疾病类型的自身免疫性疾病或麸质敏感性肠疾病，包括采集样品并测试该样品中人体组织转谷氨酰胺酶，组织特异性转谷氨酰胺酶或其他转谷氨酰胺酶的抗体。 诊断相关的自身免疫性疾病的方法。 该方法不仅允许与不孕症相关的自身免疫性疾病，流产风险增加或胎儿生长减少，还允许疱疹性皮炎或杜林氏病，克罗恩氏病，艾迪生氏病，AI溶血性贫血，AI血小板等。 紫癜减少，AI甲状腺疾病，萎缩性胃炎-恶性贫血，IgA肾病或IgA肾小球肾炎，重症肌无力，部分脂肪营养不良，多发性肌炎，原发性胆汁性肝硬化，原发性硬化性胆管炎，复发性心包炎，复发性多软骨炎，类风湿性关节炎，结节病，干燥综合征，系统性红斑狼疮（SLE），脾萎缩，I型（胰岛素依赖型）糖尿病，其他类型的糖尿病，溃疡性大肠 已经发现，除了腹部疾病以外的自身免疫疾病，例如炎症，血管炎（全身性血管炎和皮肤血管炎）都可以被诊断和区分。



。