

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001 - 264335

(P2001 - 264335A)

(43)公開日 平成13年9月26日 (2001.9.26)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/576			G 0 1 N 33/576	Z
	33/53		33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 数)

(21)出願番号 特願2000 - 75391(P2000 - 75391)

(22)出願日 平成12年3月17日(2000.3.17)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年9月30日
社団法人日本肝臓学会発行の「肝臓 第40巻」に発表

(71)出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4丁目6番10号

(72)発明者 藤田 次郎

香川県高松市屋島西町981 - 1

(72)発明者 高原 二郎

香川県高松市前田車町505 - 2医大宿舍A - 1
03

(72)発明者 大舘 祐治

高知県高知市高須1678 - 7 - 806

(72)発明者 室田 将之

香川県木田郡三木町池戸1551 - 9フォーブル
S&N103

最終頁に続く

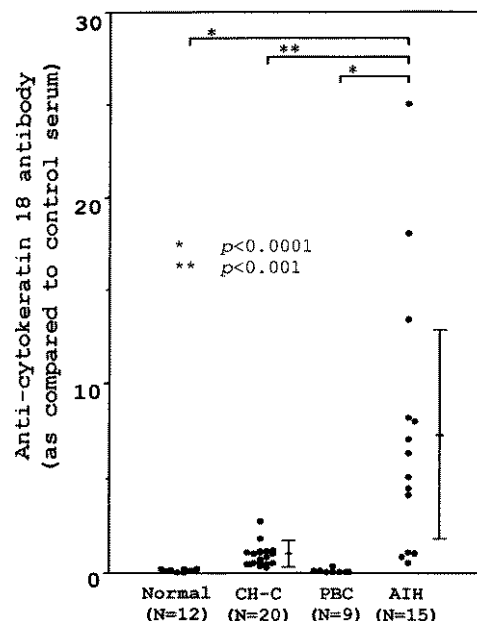
(54)【発明の名称】 抗サイトケラチン抗体の測定に基づく自己免疫性肝炎の診断薬

(57)【要約】

【課題】本発明の課題は、抗サイトケラチン抗体、及びサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定法を確立し、AIHの診断薬として応用することにある。

【解決手段】血清あるいは血漿中の抗サイトケラチン抗体を測定する測定系を確立し、抗サイトケラチン抗体がAIH患者で有意に高値を示し、更に抗体の量が治療に伴って減少することを見出した。また、サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体もAIH患者で有意に高値を示した。そして、抗サイトケラチン抗体、及びサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定が、AIHの診断及び病態の把握に有用であることを明らかにした。

AIH 患者血清中の抗サイトケラチン 18 抗体



【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒト血清あるいは血漿中の抗サイトケラチン抗体、あるいはサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体を測定することを特徴とする、自己免疫性肝炎の診断薬。

【請求項2】抗体の測定が以下の：

1. サイトケラチンを固相に結合させ、
2. 適度に希釈した血清あるいは血漿を加え、
3. 標識したヒト抗体に対する抗体を加えて、
4. サイトケラチンに結合したヒト抗体を定量する工程を含む、請求項1に記載の自己免疫性肝炎の診断薬。

【請求項3】免疫複合体の測定が以下の：

1. 抗サイトケラチン抗体を固相に結合させ、
2. 適度に希釈した血清あるいは血漿を加え、
3. 標識したヒト抗体に対する抗体を加えて、
4. サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体を定量する工程を含む、請求項1に記載の自己免疫性肝炎の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】本発明は、サイトケラチンに対する自己抗体を定量することに基づく、自己免疫性肝炎の診断薬に関する。

【0001】

【従来の技術】肝炎には、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、薬剤性肝炎、自己免疫性肝炎（以下AIHと称す）が知られている。AIH以外の各肝炎については、発症の起因物質が明らかとなっているが、AIHについてはまだ解明されていない。AIHは、女性に多い疾患であり関節痛・全身倦怠感、黄疸、悪心、食欲低下、発熱などの症状を呈す。治療は薬物療法が中心であり、免疫抑制剤・ステロイド剤などが使用されている。現在のAIHの診断は、ウイルス性肝炎の有無を確認した後、血清トランスアミナーゼ・血清グロブリン・抗核抗体、抗平滑筋抗体・抗DNA抗体等を調べ、それら結果を総合的に判断してAIHとの診断がなされる。いち早く的確に、AIHを診断する方法の開発が待たれた。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】AIHの診断法を確立するため、発明者らは、細胞骨格蛋白質の構成要素であるサイトケラチンに着目した。サイトケラチンは細胞質内線維状構造物の一つで、その中の中間径フィラメントを形成する蛋白質群に属し、上皮細胞に特異的に局在する蛋白質である。サイトケラチンは、分子量およそ40～68kDaのポリペプチドであり、20個のサブユニットに分類されている。等電点により酸性に属するType1（CK9～19）と中性～塩基性に属するType2（CK1～8）に大別され（Moll R. et al., Cell 31(1): 11-24 (1982), The catalog of human cytokeratins: pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.）、細胞破壊によって、各ポリペプチドが

血中に出現する事が明らかとなっている（Weber K. et al., EMBO J. 3(11): 2707-14 (1984), Tissue polypeptide antigen (TPA) is related to the non-epidermal keratins 8, 18 and 19 typical of simple and non-squamous epithelia: re-evaluation of a human tumor marker.）。これらポリペプチド中、現在、ポリペプチド19は肺癌の腫瘍マーカーとして市販されている（シフラ）。

【0003】発明者らは、AIH発症は何らかの原因によって肝細胞が破壊され、血中にサイトケラチンの各ポリペプチドが放出された結果、それらペプチドに対する自己抗体が体内で産生され、肝炎を起こすのではないかと考えた。本発明の課題は、血清あるいは血漿中の抗サイトケラチン抗体、及びサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定法を確立し、AIHの診断薬として応用することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、血清あるいは血漿中の抗サイトケラチン抗体、及びサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体を測定する測定系を確立し、抗サイトケラチン抗体の抗体量がAIH患者で有意に高値を示し、更に治療に伴って減少することを見出した。また、サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体もAIH患者で有意に高値を示すことも見出した。すなわち本発明は、

(1). ヒト血清あるいは血漿中の抗サイトケラチン抗体、あるいはサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体を測定することを特徴とする、自己免疫性肝炎の診断薬。

(2). 抗体の測定が以下の：

1. サイトケラチンを固相に結合させ、
2. 適度に希釈した血清あるいは血漿を加え、
3. 標識したヒト抗体に対する抗体を加えて、
4. サイトケラチンに結合したヒト抗体を定量する工程を含む、請求項1に記載の自己免疫性肝炎の診断薬。

(3). 免疫複合体の測定が以下の：

1. 抗サイトケラチン抗体を固相に結合させ、
2. 適度に希釈した血清あるいは血漿を加え、
3. 標識したヒト抗体に対する抗体を加えて、
4. サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体を定量する工程を含む、請求項1に記載の自己免疫性肝炎の診断薬、に関する。

【0005】

【発明の実施の形態】以下に、1. 抗サイトケラチン抗体の測定法、2. サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定法について、具体的に説明する。

1. 抗サイトケラチン抗体の測定は、以下のステップで行うことができる。

1). サイトケラチンフラグメントは、市販の、例えばプロゲンバイオテクニクス社より入手した標品を使用す

る。サイトケラチンフラグメントは、遺伝子組換え技術を用いサイトケラチン遺伝子を導入した細胞より精製した標品を使用しても構わないし、また抗原決定基を解析してペプチド合成により合成した標品を使用することも許される。サイトケラチンフラグメントをビーズあるいはカップ上に固相化する。固相化は、共有結合により結合させても非共有結合により結合させても構わない。また場合によっては、モノクローナルあるいはポリクローナルの抗サイトケラチン抗体等、サイトケラチンを特異的に結合する物質を固相化して、サイトケラチンを間接的に結合させることも許される。通常、ビーズあるいはカップ上の非特異的な結合部位をふさぐため、ウシ血清アルブミン (BSA) ・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤でブロッキング操作を行う。

2). 血清あるいは血漿検体を、必要であればウシ血清アルブミン (BSA) ・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈し、ビーズあるいはカップに加える。また、標準とする抗サイトケラチン抗体を同様に希釈して加え、検量線の作成に用いる。

3). ビーズあるいはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、適当な方法で標識したヒト抗体に対する抗体を、ウシ血清アルブミン (BSA) ・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈して加える。標識はヒト抗体に対する抗体を直接、酵素・放射性物質・電気発光物質等で標識しても構わないし、ヒト抗体に対する抗体に、例えばビオチン等を結合させた後、該物質と特異的に結合する標識物質、例えば標識アビジン等と結合させて、間接的に標識しても構わない。また、サイトケラチンに結合したヒト抗体を検出する方法としては、ヒト抗体に対する抗体と特異的に結合する標識二次抗体を用いることもでき、更に、ヒト抗体に特異的に結合する標識物質、例えば標識プロテインAを用いることもできる。

4). ビーズあるいはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、標識に応じた方法、放射性標識であれば放射活性を、酵素標識であれば酵素活性を測定する。また、ビオチン化標識であれば更に標識アビジンを加えて、標識に応じた方法で測定する。

5). 標準の抗サイトケラチン抗体から得られた測定値を基に検量線を作成し、血清あるいは血漿検体中に含まれる抗サイトケラチン抗体の抗体量を計算する。抗体量は、標準とした抗サイトケラチン抗体を指標として表されることが好ましいが、本発明はこれに限られない。

【0006】 2. サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定法

サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定は、以下のステップで行うことができる。

1). 抗サイトケラチン抗体をビーズあるいはカップ上に固相化する。抗サイトケラチン抗体は、ポリクローナル

抗体でもモノクローナル抗体でも許されるが、例えばケミコン社、アメリカンリサーチプロダクツ社より入手が可能である。固相化は、共有結合により結合させても非共有結合により結合させても構わない。通常、ビーズあるいはカップ上の非特異的な結合部位をふさぐため、ウシ血清アルブミン (BSA) ・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤でブロッキング操作を行う。

2). 血清あるいは血漿検体を、必要であればウシ血清アルブミン (BSA) ・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈し、ビーズあるいはカップに加える。また、標準とするサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体を同様に希釈して加え、検量線の作成に用いる。

3). ビーズあるいはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、適当な方法で標識したヒト抗体に対する抗体を、ウシ血清アルブミン (BSA) ・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈して加える。標識はヒト抗体に対する抗体を直接、酵素・放射性物質・電気発光物質等で標識しても構わないし、ヒト抗体に対する抗体に、例えばビオチン等を結合させた後、該物質と特異的に結合する標識物質、例えば標識アビジン等と結合させて、間接的に標識しても構わない。また、サイトケラチンに結合したヒト抗体を検出する方法としては、ヒト抗体に対する抗体と特異的に結合する標識二次抗体を用いることもでき、更に、ヒト抗体に特異的に結合する標識物質、例えば標識プロテインAを用いることもできる。

4). ビーズあるいはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、標識に応じた方法、放射性標識であれば放射活性を、酵素標識であれば酵素活性を測定する。また、ビオチン化標識であれば更に標識アビジンを加えて、標識に応じた方法で測定する。

5). 標準のサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体から得られた測定値を基に検量線を作成し、血清あるいは血漿検体中に含まれるサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の量を計算する。免疫複合体の量は、標準とした免疫複合体を指標として表されることが好ましいが、本発明はこれに限られない。以上のステップにより、検体中の抗サイトケラチン抗体、及びサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体を測定することができる。

【0007】

【発明の効果】 血清あるいは血漿中の抗サイトケラチン抗体、及びサイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定が可能となり、該抗体及び免疫複合体を測定することにより、AIHをいち早く的確に診断できるようになった。

【0008】

【実施例】 [実施例1] 抗サイトケラチン抗体の測定

抗サイトケラチン抗体の測定は、以下の手順で実施した。

1) . サイトケラチンフラグメント固相化カップの作製
 サイトケラチン各フラグメント 8・18・19 (プロゲンバイオテクニクス社製) を、0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で 1 µg/ml に調整し、ポリスチレンカップに 100 µl 注入し 4 16 時間反応した。その後、EIA 専用洗浄機 (ミニラボウオシャー: ライフティック社製) によって 0.15 M NaCl、0.01% Tween20 を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で 4 秒 3 回洗浄した。洗浄したカップに 0.5% ウシアルブミンを含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 を 200 µl 加え、再度 4 16 時間反応し固相化カップとした。

2) . HRP 標識抗ヒト IgG 抗体

HRP 標識 anti-human IgG (シグマ社: goat anti human IgG) を、ウサギ血清 25% を含む 0.1 M リン酸緩衝液 pH 5.4 に 1000 希釈して使用した。

3) . 標準抗体の調整

抗サイトケラチン抗体陽性の血清を、2% BSA、0.01 M EDTA、0.1% Na₂S₂O₃、0.01% Tween 20、0.15 M NaCl を含む 0.05 M トリス緩衝液 pH 7.5 で希釈し、各希釈液を作製した。

4) . 抗サイトケラチン抗体の測定

サイトケラチンペプチドを固相化したカップ中のウシアルブミン液を吸い取り、全カップに 2% BSA、0.01 M EDTA、0.1% Na₂S₂O₃、0.01% Tween 20、0.15 M NaCl を含む 0.05 M トリス緩衝液 pH 7.5 を 50 µl 注入した。そのカップに標準抗体希釈液及び検体を 50 µl 加え、室温 (20 ~ 30 °C) で 1 時間反応した。反応後、EIA 専用洗浄機を用い 0.01% Tween 20、0.0015 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル、0.005% 2 - クロロアセトアミドを含む 0.005 M トリス緩衝液 pH 7.5 で 4 秒 3 回洗浄した。洗浄後、標識抗体を 100 µl 加え室温 (20 ~ 30 °C) で 1 時間反応した。反応後、EIA 専用洗浄機を用い 0.01% Tween20、0.15 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル、0.005% 2 - クロロアセトアミドを含む 0.005 M トリス緩衝液 pH 7.5 で 4 秒 3 回洗浄した。洗浄後、1.5 mg/ml の ABTS (2,2-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 4.2 を 100 µl 加え室温 (20 ~ 30 °C) で 1 時間反応し、0.013% Na₂S₂O₃ 液を 100 µl 加え反応を停止した。発色した溶液を分光光度計 405 nm の吸光度を測定した。

5) . 検体中のサイトケラチン抗体の定量値の算出

各希釈の抗サイトケラチン標準抗体吸光度値から、ブランクの吸光度値を引き、横軸に標準抗体濃度、縦軸は標準抗体の吸光度をプロットし、標準曲線を描く。図 1 に代表的な検量線を示した。検体の吸光度値から、同様にブランクの吸光度値を引き、得られた検量線から、検体中に含まれる抗体量が、標準抗体の何倍に当たるかを計算して、抗サイトケラチン抗体の定量値とした。

【0009】 [実施例 2] サイトケラチン - 抗サイトケ

ラチン抗体免疫複合体の測定

サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定は、以下の手順で実施した。

1) . 抗サイトケラチン抗体固相化カップの作製

サイトケラチン各フラグメント (8・18) に対する抗体 (プロゲンバイオテクニクス社製) を、0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で 4 µg/ml に調整し、ポリスチレンカップに 100 µl 注入し 4 16 時間反応した。その後、EIA 専用洗浄機 (ミニラボウオシャー: ライフティック社製) によって 0.15 M NaCl、0.01% Tween20 を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で 4 秒 3 回洗浄した。洗浄したカップに 0.5% ウシアルブミンを含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 を 200 µl 加え、再度 4 16 時間反応し固相化カップとした。

2) . HRP 標識抗ヒト IgG 抗体

市販の HRP 標識 anti-human IgG (シグマ社: goat anti human IgG) を、ウサギ血清 25% を含む 0.1 M リン酸緩衝液 pH 5.4 に 1000 希釈して使用した。

3) . 標準免疫複合体の調整

サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体陽性の血清を、2% BSA、0.01 M EDTA、0.1% Na₂S₂O₃、0.01% Tween 20、0.15 M NaCl を含む 0.05 M トリス緩衝液 pH 7.5 で希釈し、各希釈液を作製した。

4) . サイトケラチン - 抗サイトケラチン抗体免疫複合体の測定

抗サイトケラチン抗体を固相化したカップ中のウシアルブミン液を吸い取り、全カップに 2% BSA、0.01 M EDTA、0.1% Na₂S₂O₃、0.01% Tween 20、0.15 M NaCl を含む 0.05 M トリス緩衝液 pH 7.5 を 50 µl 注入した。そのカップに標準免疫複合体希釈液及び検体を 50 µl 加え、室温 (20 ~ 30 °C) で 1 時間反応した。反応後、EIA 専用洗浄機を用い 0.01% Tween 20、0.0015 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル、0.005% 2 - クロロアセトアミドを含む 0.005 M トリス緩衝液 pH 7.5 で 4 秒 3 回洗浄した。洗浄後、標識抗体を 100 µl 加え室温 (20 ~ 30 °C) で 1 時間反応した。反応後、EIA 専用洗浄機を用い 0.01% Tween 20、0.15 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル、0.005% 2 - クロロアセトアミドを含む 0.005 M トリス緩衝液 pH 7.5 で 4 秒 3 回洗浄した。洗浄後、1.5 mg/ml の ABTS (2,2-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 4.2 を 100 µl 加え室温 (20 ~ 30 °C) で 1 時間反応し、0.013% Na₂S₂O₃ 液を 100 µl 加え反応を停止した。発色した溶液を分光光度計 405 nm の吸光度を測定した。

5) . 検体中の免疫複合体の定量値の算出

各希釈の標準免疫複合体吸光度値から、ブランクの吸光度値を引き、横軸に標準免疫複合体濃度、縦軸は標準免疫複合体の吸光度をプロットし、検量線を描く。代表的な検量線を図 2 に示した。検体の吸光度値から、同様にブランクの吸光度値を引き、得られた検量線から、検体

中に含まれる免疫複合体の量が、標準免疫複合体の何倍に当たるかを計算して、サイトケラチン-抗サイトケラチン抗体免疫複合体の定量値とした。

【0010】[実施例3] AIH患者血清中の抗サイトケラチン抗体及びサイトケラチン-抗サイトケラチン抗体免疫複合体の量

AIHは、HBs抗原・HCV抗体が共に陰性、抗核抗体が陽性であり、臨床的に慢性肝炎と診断された症例で、原発性胆汁性肝硬変(PBC)の診断基準を満たさず、生活歴より薬剤性及びアルコール性肝障害が除外され、更に腹部超音波検査で脂肪肝の無いことを確認した症例である。図3~5に示すように、抗原としてサイトケラチン各フラグメント(8・18・19)の何れを使った場合にも、健常人・慢性C型肝炎(CH-C)・PBC患者血清と比較して、有意に高い抗サイトケラチン抗体の抗体が、AIH患者血清で観察された。更に図6~8に示すように、各抗サイトケラチン抗体は治療に伴って減少し、抗サイトケラチン抗体の抗体量が治療効果を反映して、病態の把握に役立つことが示された。また、図9・10に示すように、サイトケラチン各フラグメント(8・18)に対する免疫複合体の量は、AIH患者血清で、健常人・CH-C*

*と比較して有意に高い免疫複合体の定量値が観察された。

【0011】

【図面の簡単な説明】

【図1】抗サイトケラチン19抗体の検量線

【図2】サイトケラチン18-抗サイトケラチン18抗体免疫複合体の検量線

【図3】AIH患者血清中の抗サイトケラチン8抗体

【図4】AIH患者血清中の抗サイトケラチン18抗体

【図5】AIH患者血清中の抗サイトケラチン19抗体

【図6】AIH患者血清中抗サイトケラチン8抗体の治療に伴う変化

【図7】AIH患者血清中抗サイトケラチン18抗体の治療に伴う変化

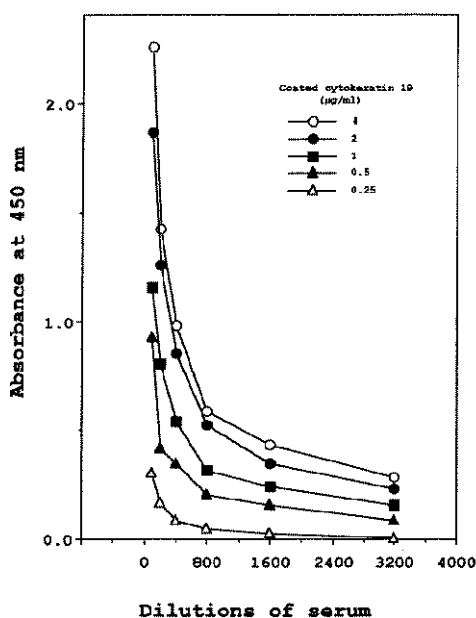
【図8】AIH患者血清中抗サイトケラチン19抗体の治療に伴う変化

【図9】AIH患者血清中のサイトケラチン8-抗サイトケラチン8抗体免疫複合体

【図10】AIH患者血清中のサイトケラチン18-抗サイトケラチン18抗体免疫複合体

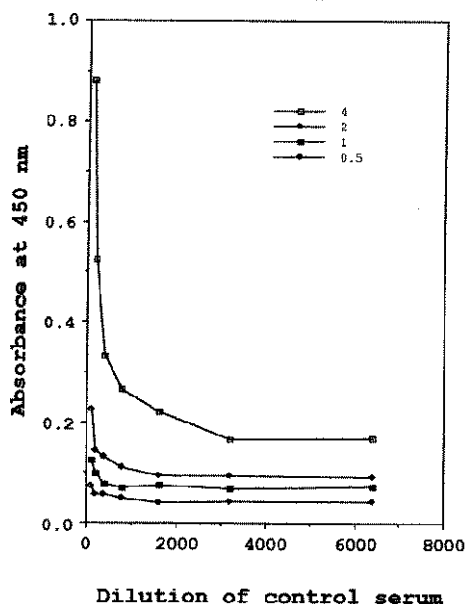
【図1】

抗サイトケラチン19抗体の検量線



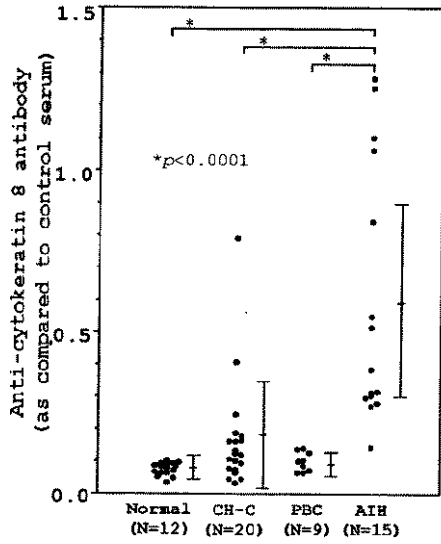
【図2】

サイトケラチン18-抗サイトケラチン18抗体免疫複合体の検量線



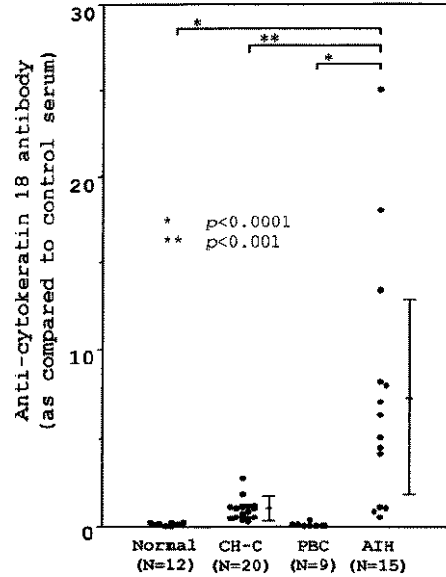
【図3】

AIH患者血清中の抗サイトケラチン8抗体



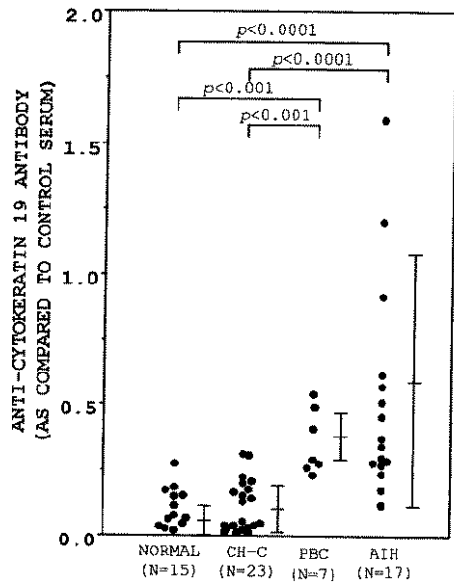
【図4】

AIH患者血清中の抗サイトケラチン18抗体



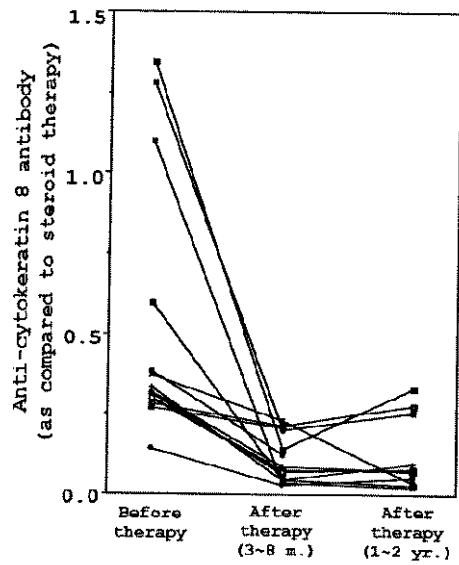
【図5】

AIH患者血清中の抗サイトケラチン19抗体



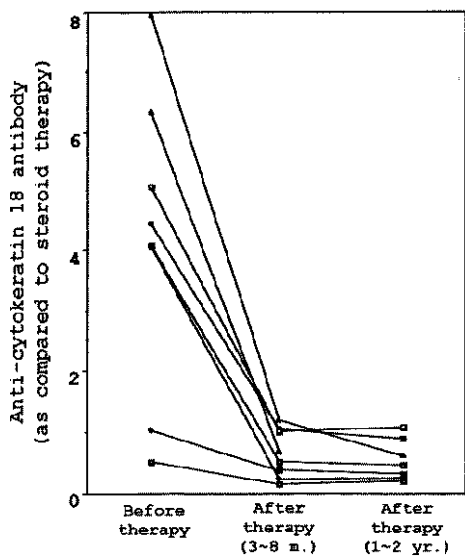
【図6】

AIH患者血清中の抗サイトケラチン8抗体の治療に伴う変化



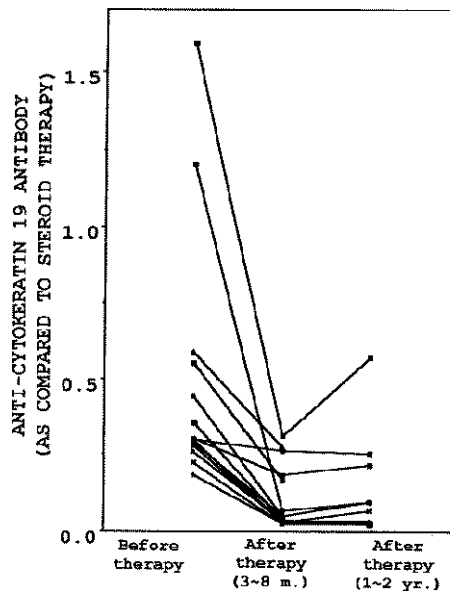
【図7】

AIH 患者血清中の抗サイトケラチン18抗体の
治療に伴う変化



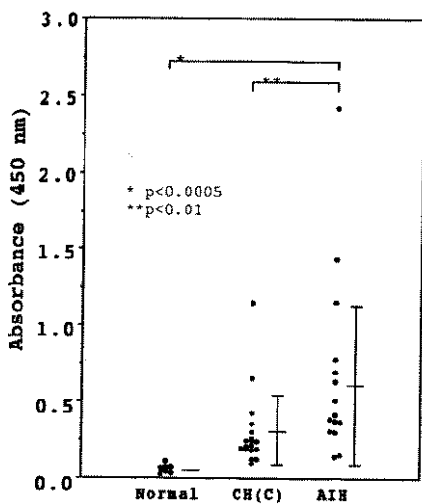
【図8】

AIH 患者血清中の抗サイトケラチン19抗体の
治療に伴う変化



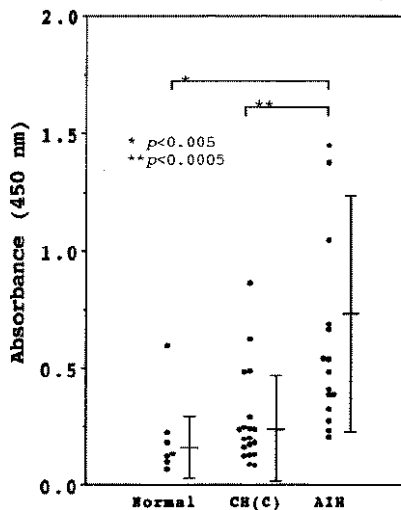
【図9】

AIH 患者血清中のサイトケラチン8-
抗サイトケラチン8抗体免疫複合体



【図10】

AIH 患者血清中のサイトケラチン18-
抗サイトケラチン18抗体免疫複合体



フロントページの続き

(72)発明者 西岡 幹夫
香川県高松市屋島西町1119 - 20

