

(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2002 - 168865

(P2002 - 168865A)

(43)公開日 平成14年6月14日(2002.6.14)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	N 4 H 0 4 5
33/543	501	33/543	501 A
33/566		33/566	
// C 0 7 K 14/42		C 0 7 K 14/42	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 数)

(21)出願番号 特願2000 - 366080(P2000 - 366080)

(22)出願日 平成12年11月30日(2000.11.30)

(71)出願人 000006127

森永乳業株式会社

東京都港区芝5丁目33番1号

(72)発明者 早澤 宏紀

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社生物科学研究所内

(72)発明者 原田 義次

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社生物科学研究所内

(74)代理人 100064908

弁理士 志賀 正武 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 全身性エリテマトーデスの診断用試薬、診断用キット及び全身性エリテマトーデス由来の免疫グロブリンGの存在確認方法

(57)【要約】

【課題】 全身性エリテマトーデス ( S L E ) の診断を簡単かつ高精度で行うことができる診断用試薬、診断用キットの提供及び S L E に由来する I g G を検出する方法の提供。

【解決手段】 ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンを有効成分として含有する全身性エリテマトーデス診断用試薬；かかる診断用試薬と、不溶化担体と、該担体に固定化されて免疫グロブリンGを捕捉する捕捉物質とを含むことを特徴とする全身性エリテマトーデス診断用キット；並びに検体に含有される I g G と、かかるレクチンとを反応させ、前記 I g G に結合した前記レクチンを検出することを特徴とする S L E 由来の I g G の存在確認方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ファセオルス・ヴルガリス (Phaseolus vulgaris) 由来のレクチンを有効成分として含有する全身性エリテマトーデス診断用試薬。

【請求項2】 ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンが、ファセオルス・ヴルガリス・エリスロアグルチニン (Phaseolus vulgaris erythroagglutinin) 又は PHA - E 4 である請求項1に記載の全身性エリテマトーデス診断用試薬。

【請求項3】 ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンが、標識化されたものである請求項1又は2の全身性エリテマトーデス診断用試薬。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載の診断用試薬と、不溶化担体と、該不溶化担体に固定化されて免疫グロブリンGを捕捉する捕捉物質とを含むことを特徴とする全身性エリテマトーデス診断用キット。

【請求項5】 更に、標識化レクチンを検出する検出物質を更に含む請求項4に記載の全身性エリテマトーデス診断用キット。

【請求項6】 検体に含有される免疫グロブリンGと、請求項1～3のいずれか1項に記載のレクチンとを反応させ、前記免疫グロブリンGに結合した前記レクチンを検出することを特徴とする全身性エリテマトーデス由来の免疫グロブリンGの存在確認方法。

【請求項7】 検体に含有される免疫グロブリンGを、不溶化担体に固定化された免疫グロブリンG捕捉物質を用いて固定化し、該固定化免疫グロブリンGを請求項3に記載の標識化レクチンと反応させ、結合した前記標識化レクチンの標識に起因したシグナルを検出することを特徴とする全身性エリテマトーデス由来の免疫グロブリンGの存在確認方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫グロブリンG (以下、I g G と記載する。) の糖鎖を利用して全身性エリテマトーデスを診断するための診断用試薬、診断用キット及び全身性エリテマトーデスに由来する I g G の

## シェーグレン症候群

(Sjögren syndrome : 以下、S j S と略記する。)

【0006】、ウェゲナー肉芽腫症、過敏性血管炎、ベーチェット病、血栓性血小板減少性紫斑病等は、その病態や病像が膠原病に類似することから膠原病周辺疾患、又は膠原病近縁疾患と呼ばれている。

【0007】これら膠原病の診断薬及び診断方法については、本発明者等が、レクチンの一種である Datura stramonium (和名：洋種チョウセンアサガオ) 由来のレクチン (以下、「DSA」と略記する。) に対して、健常

存在確認方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、I g G の糖鎖をファセオルス・ヴルガリス (Phaseolus vulgaris (和名：インゲンマメ)) 由来のレクチンを用いて糖鎖工学的に測定する全身性エリテマトーデス診断用試薬、診断用キット及び全身性エリテマトーデスに由来する I g G の存在確認方法に関するものである。本明細書において百分率は、特に断りのない限り重量による表示である。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】(1)

全身性エリテマトーデス

全身性エリテマトーデスは、膠原病と呼ばれる疾患群の一つであるが、この疾患群は1942年にクレンペラー (Klemperer) により提唱された臨床形態学的概念であり、結合組織の系統的疾患であって、全身の膠原繊維にフィブリノイド変性という共通の病変が見られる疾患群の総称である。

【0003】特に全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : 以下、「SLE」と略記する。)

、強皮症 (progressive systemic sclerosis : 以下、「PSS」と略記する。)、皮膚筋炎 (dermatomyositis : 以下、「DM」と略記する。)、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis : 以下、「RA」と略記する。)、リウマチ熱 (rheumatic fever : 以下、「RF」と略記する。)、結節性多発(性)動脈炎 (polyarteritis nodosa : 以下、「PN」と略記する。) の6疾患が古典的膠原病と呼ばれている。この中で、SLE、PSS、RAは、高-グロブリン血症、抗核抗体等の各種自己抗体が検出され、免疫異常を伴って発症する共通点があり、相互に重複して発症することも希ではない。このように重複現象が認められる疾患には、混合性結合組織病 (mixed connective tissue disease : 以下、「MCTD」と略記する。)、及び重複症候群 (overlap syndrome) がある。

【0004】また、

【0005】

【外1】

人由来の I g G は反応性が高いが、膠原病患者の I g G は反応性が低いという性質に基づいて、I g G の測定を指標に膠原病の検出薬及び検出方法に関して特許出願した (特開2000-283983号公報。以下、「従来技術1」と記載する。)。しかし、従来技術1では、個々の膠原病の I g G を識別するまでには及ばず、特定の膠原病、特に SLE に対して、その I g G の検出薬及び検出方法の技術改良が必要であった。



同時に検出し、その量を比較する方法も開発された(特許第2701908号公報。以下、「従来技術3」と記載する。)。従来技術3には、血液試料からI g G画分を公知の方法により分離し、分離したI g Gを加熱、化学的な還元、又は尿素のいずれかにより変性させ、これを固相に吸着させ、糖鎖末端のガラクトースをAbrus precatorius(和名:トウアズキ)由来のレクチン又はRCA120を用いて測定し、N-アセチルグルコサミンをBandeirea simplicifolia、Datura stramonium(和名:洋種チョウセンアサガオ)又はLycopersicon esculentum(和名:トマト)由来のレクチンを用いて測定する方法が開示されているが、操作が煩雑であり、かつ測定に要する時間が長いという欠点があった。

【0015】その後、土屋らが、血清中のI g Gの糖鎖末端のN-アセチルグルコサミンのみを検出することを目的とした方法[ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、第151巻、第1137頁、1993年](以下、「従来技術4」と記載する。)を発表した。従来技術4には、血清中のI g Gをトラップする物質としてプロテインGを使用し、酵素免疫定量法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)用のプレートにプロテインGを吸着させ、このプロテインGと検体中のI g Gとを反応させた後、Psathyrella velutina(和名:ムジナタケ)由来のレクチンを使用して、結合したI g Gの糖鎖末端を検出する方法が開示されている。

【0016】更に、この方法を改良した方法として、I g Gをレクチンでトラップし、これを抗ヒトI g Gで検出するサンドイッチ法が開示されている(特開平10-123132号公報。以下、「従来技術5」と記載する。)。従来技術5には、主にPsathyrella velutina由来のレクチンを使用しているが、その他にもTriticum vulgare(和名:コムギ胚)、Datura stramonium、Lycopersicon esculentum、Solanum tuberosum(和名:ジャガイモ)、Laburnum alpinum、Oryza sativa(和名:イネ)、Phytolacca americana(和名:アメリカヤマゴボウ)又はUlex europaeus II(和名:ヨーロッパハリエンジダ)由来のレクチンが使用可能であるとして例示されている。

【0017】前記従来技術4及び5では、レクチンは、いずれも末端ガラクトース残基が欠損した場合に露出されるN-アセチルグルコサミンを検出する目的で使用されているので、RCA120を用いてガラクトースを検出していた場合とは異なり、健常人では反応性が低下し、RA患者では反応性が高く測定される特徴を持っていた。

【0018】このように、個々の膠原病の診断法についての知見は少なく、唯一RAについて、従来技術2~5に記載された方法が知られているが、該方法は、操作が煩雑であり、コストもかかるという点で実用的でないのが実状である。

【0019】したがって、本発明は、膠原病の中でも、特にSLEの診断を簡単かつ高精度で行うことができる診断用試薬を提供することを目的とする。本発明はまた、かかるSLE診断用のキットを提供することを目的とする。本発明はさらに、SLEに由来するI g Gの存在を確認する方法を提供することを目的とする。

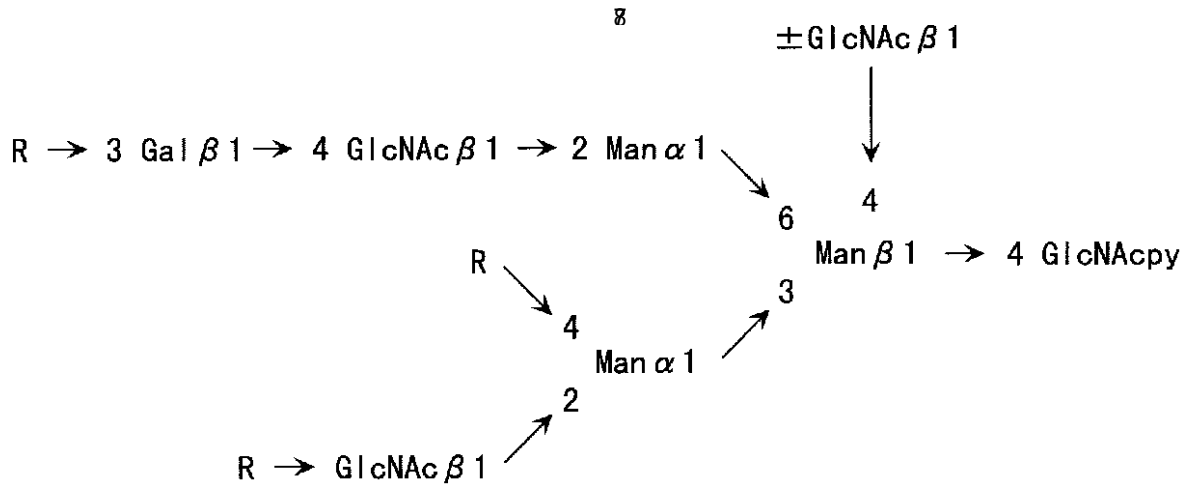
【0020】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、化1に示したヒトI g GのFcフラグメントの糖鎖構造と非常によく似た糖鎖と反応し、かつヒトI g Gと反応することが知られているファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンに着目した。

【0021】すなわち、ファセオルス・ヴルガリス(Phaseolus vulgaris(一般名:Red kidney bean、和名:インゲンマメ))由来のレクチンは、通常いわゆるマンノース結合型やフコース結合型といった分類に属さないその他のレクチンとして知られており、また、中でもファセオルス・ヴルガリス・エリスロアグルチニン(Phaseolus vulgaris erythroagglutinin)又はPHA-E4(以下、これらを総称して「PHA-E」と記載する)は、赤血球凝集活性が強いことが知られている(「続生化学実験講座4:複合糖質研究法I」、第37頁、日本生化学学会編、東京化学同人、1985年)。その後の研究により、PHA-Eは、糖鎖のbisecting GlcNAcと非常によく反応することが判明した{「カーボハイドレート・リサーチ(Carbohydrate Research)、第149巻、第65頁、1986年}(以下、「従来技術6」と記載する。)、[アクタ・メド・オカヤマ(Acta Med Okayama)、第52巻、第311頁、1998年](以下、「従来技術7」と記載する)}。ここでPHA-Eをクロマトグラフィー用担体に結合させ、これを用いて糖鎖の結合性を測定すること(「細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ:グライコバイオロジー実験プロトコル-糖蛋白質・糖脂質・プロテオグリカン」、谷口直之監修、第20頁、秀潤社、1996年)により判明したPHA-E反応性糖鎖の骨格は以下の化2に示すとおりである。

【0022】

【化2】



【0023】[本化学式中Rは水素又は糖を示し、またpyはピラノースを示す。]この構造は、化1に示したヒトIgGのFcフラグメントの糖鎖構造と非常によく似てはいるものの、微妙に異なる構造である。しかし、従来技術7においては、PHA-EはヒトIgGと反応することが示されている。

【0024】本発明者等は、糖鎖の構造について鋭意研究を重ねた結果、市販の健常人IgGを、通常行われている方法(「続生化学実験講座5:免疫生化学研究法」、日本生化学学会編、第94頁、東京化学同人、1986年)にて消化を行い、この消化物とPHA-Eとの反応性を確認したところ、本レクチンはF(ab')<sub>2</sub>部分とも反応することが確認された。その結果、本発明におけるPHA-Eにより検出されるSLE患者のIgGの糖鎖構造の差異は、RAの場合のように、これまでに糖鎖異常として知られたガラクトースの欠損によるものではないことが明らかとなった。そこで、かかるPHA-Eを用いれば、SLEを簡単に、かつ高精度で診断できることを見出し、本発明を完成させた。

【0025】前記課題を解決する本発明の第一の発明(以下、「第一発明」と記載する。)は、ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンを有効成分として含有するSLE診断用試薬である。そして、ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンがPHA-Eであること及び標識化されたものであることを望ましい態様としている。また、前記課題を解決する本発明の第二の発明(以下、「第二発明」と記載する。)は、上記診断用試薬と、不溶化担体と、該不溶化担体に固定化されてIgGを捕捉する捕捉物質とを含むSLE診断用キットである。そして、更に、標識化レクチンを検出する検出物質を含むSLE診断用キットを望ましい態様としている。前記課題を解決する本発明の第三の発明(以下、「第三発明」と記載する。)は、検体に含有されるIgGと、上記レクチンとを反応させ、前記IgGに結合した前記レクチンを検出することを特徴とするSLE由来のIgGの存在確認方法である。第三発明はまた、検体に含有されるIgGを、不溶化担体に固定化されたIgG捕捉物質を用

いて固定化し、該固定化IgGを上記標識化レクチンと反応させ、結合した前記標識化レクチンの標識に起因したシグナルを検出することを特徴とするSLE由来のIgGの存在確認方法である。

【0026】

【発明の実施の形態】PHA-Eが、ヒトIgGの糖鎖構造と類似する糖鎖構造と反応し、かつヒトIgGと反応することは知られていた。しかしながら、かかるPHA-Eは、健常人や他の膠原病由来のIgGとは反応するが、SLE由来のIgGとは反応せず、したがって、PHA-Eを用いてSLEを容易に診断できることは全く知られていなかった。次に本発明について詳細に説明するが、最初に第一発明について説明する。本発明の診断用試薬は、SLE由来のIgGを測定することにより、SLEに罹患しているか否かを診断するものであり、ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンを有効成分とするものである。ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンとしては、PHA-Eが望ましい。PHA-Eを用いることにより、より容易にかつ高精度でSLEの診断をすることができる。かかるレクチンは、市販品を用いることができる。

【0027】かかるレクチンは、西洋わさびペルオキシダーゼ(以下、HRPと略記する。)等の酵素、ビオチン、蛍光色素、金コロイド、ラテックス粒子等で標識されたものが望ましい。標識することにより、より容易にかつ高精度でSLEの診断をすることができる。標識レクチンは市販品を使用することが可能であるが、公知の方法(例えば、石川栄治著、「超高感度酵素免疫測定法」、第1177頁、学会出版センター、1993年等)を用いて標識を行なうこともできる。

【0028】本発明の第二発明に用いる不溶化担体は、IgGを、捕捉物質を介して固定化するためのものである。不溶化担体としては、ポリスチレン、ガラス等を用いたマイクロプレート、ビーズ、チューブ等を例示することができる。また、セルロースやその他の材質からなるメンブレン等も利用可能である。

【0029】検体中のIgGを不溶化担体(固相)に固

定化させるための、I g Gを捕捉する物質（捕捉物質）としては、プロテインA、プロテインG等を例示することができる。また、他の動物種に免疫することにより得られる抗ヒトI g G抗体についても、糖鎖を除去し、後に用いるレクチンとの反応を惹起しないよう処理すれば利用が可能である。この他にも後記するPHA-Eとの反応を妨げることなくI g Gを特異的に捕捉できるものであれば利用することができる。これらI g Gの捕捉物質等は、市販品を用いることが可能であり、不溶化担体に化学的又は物理的に固定化することができる。固定化の方法に特に制限はない。

【0030】このうち、レクチンは、検出の容易性の観点から、標識化されていることが好ましい。標識手段としては、上記したものが挙げられる。本発明の第二発明は、標識化レクチンを検出する検出物質を更に含むことが好ましい。検出物質は、標識手段に応じて適宜公知の物質を選択することができる。例えば、標識がHRPである場合には、HRPに対する基質である2, 2'-アジノジ-(3-4エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)（以下、ABTSと略記する。）、ピオチンで標識を行った場合は、HRP等の酵素を標識したアビジン又はストレプトアビジン等が挙げられる。

【0031】本発明の第二発明は、前記ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチン、特に標識化レクチンを含む診断用試薬と、不溶化担体と、該不溶化担体に固定化されてI g Gを捕捉する捕捉物質と、好ましくは標識化レクチンを検出する検出物質と、を含むSLE診断用キットである。尚、I g Gを測定する検体は、SLE患者由来の血液、血清、血漿、及び尿、並びにI g Gを産出する細胞の培養上清等が望ましい。

【0032】次に、第三発明について説明する。第三発明のSLE由来のI g Gの存在確認に使用する検体としては、SLE患者由来の血液、血清、血漿、及び尿、並びにI g Gを産出する細胞の培養上清等、I g Gを含有する液体試料であれば、いずれであってもよい。これらの検体を凍結乾燥した粉体試料であっても、濃度が判明していれば、生理的食塩水等に再溶解し、液状化することにより測定が可能である。例えば血液そのものを使用する等の場合には、固形成分の混在する試料については、事前に遠心分離、膜等による分離を行い、赤血球等の固形成分を除去することが好ましい。

【0033】前記I g G捕捉物質（例えば、プロテインG等）とレクチンとを用いた検体中のI g Gの測定は、例えば次の通り行うことができる。即ち、不溶化担体にI g G捕捉物質、例えばプロテインG等を固定化し、この捕捉物質に検体（又は必要に応じて希釈した検体）を反応させ、捕捉物質と結合したI g G（B：結合型）を、結合しない遊離のI g G（F：遊離型）から分離（B/F分離）し、次いでレクチン、好ましくは標識したレクチンを反応させる。これを再度B/F分離し、レ

クチンを検出する。このとき、レクチンが標識化されていれば、標識のシグナルを適宜な手段により検出することができ、検出が容易である。

【0034】標識に起因したシグナルは、前記の通り吸光度法（比色法）、蛍光法、発光法、直接肉眼による観察等により検出することが出来る。例えば吸光度法による場合には、シグナルの経時的変化を測定する方法及び一定時間後のシグナルを測定する方法がある。更に具体的には、この標識に起因したシグナルを検出するには、例えば標識がHRPである場合には、HRPに対する基質である2, 2'-アジノジ-(3-4エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)（以下、ABTSと略記する。）等を一定時間反応させ、その反応を2%シュウ酸等を用いて停止させ、吸光値を測定する等の方法がある。ABTS等は市販のキットを使用することが可能である。またピオチンで標識を行った場合は、HRP等の酵素を標識したアビジン又はストレプトアビジンを更に反応させ、アビジン又はストレプトアビジンにより標識された酵素を、前記ABTS等の基質を用いて検出する。また、シグナルが蛍光色素である場合には、蛍光色素を認識できる市販の機器を用いて検出を行うことが出来る。また、シグナルが金コロイド又はラテックスの場合は、濁度を市販の粒度分布計等の機器を用いて測定することも可能であり、肉眼で観察することによっても検出が可能である。SLE由来のI g Gは、PHA-Eとは反応しないから、標識化レクチンの標識に起因したシグナルは、小さくなる。

【0035】第三発明の存在確認方法により、実際に健康人17名、膠原病の患者（SLE9名、PSS6名、SjS5名、MCTD6名、及びRA11名）から血液を採取し、赤血球等の固形成分を自然凝固させ、遠心分離して除去し、血清画分の測定を行った結果、実施例2に示す通り、健康人及びSLE以外の膠原病患者血清中のI g Gはレクチンとの反応性が高く、SLE患者血清中のI g Gはレクチンとの反応性が低いことが判明した。

【0036】

【実施例】次に実施例を示して本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0037】実施例1

次の方法により本発明の全身性エリテマトーデス検出薬を調製した。

(1) 判定用プレートの調製

ダルベッコリン酸緩衝液（以下、PBSと略記する。）に1μg/mlの濃度で溶解した組換えプロテインG（和光純薬工業社製）を、固相支持体であるプラスチック性96穴プレート（ヌンク社製）に100μl/ウェルの割合で注入し、37℃で2時間放置して、96穴プレートに組換えプロテインGを固定した後、界面活性剤を含有するPBSでプレートを洗浄した。次いで、PB

Sに1%の濃度で溶解した牛血清アルブミン(シグマ社製。以下、BSAと略記する。)を100 $\mu$ l/ウェルの割合で注入し、37 $^{\circ}$ Cで2時間放置してブロッキングを行い、判定用プレートを調製した。

【0038】(2) ビオチン化PHA-E溶液の調製  
市販のビオチン化PHA-E(ホーネン社製)をPBSにより1,000倍に希釈して、ビオチン化PHA-E溶液を調製した。

(3) HRPストレプトアビジン溶液の調製  
市販のHRPストレプトアビジン(ベクター社製)をPBSにより1,000倍に希釈してHRPストレプトアビジン溶液を調製した。

(4) HRPに対する基質溶液の調製  
市販のABTS基質キット(ケーピーエル社製)を用いて使用直前に調製した。

(5) 反応停止液の調製  
シュウ酸(ナカライテスク社製)を脱イオン水に溶解し、2%溶液を調製した。以上の各工程により、SLE診断用試薬を調製した。

#### 【0039】試験例1

この試験は、実施例1のSLE診断用試薬を用いて、膠原病患者のIgGとレクチンとの反応性を調べるために行った。

##### (1) 試料の調製

健康人17名、SLE患者9名、PSS患者6名、SjS患者5名、MCTD患者6名及びRA患者11名から採取した血液を、プラスチック製の遠沈管内で固形成分を自然凝固させ、遠心分離装置(トミー精工社製。RB-18IV型)により3,000回転で30分遠心して固形分と上清を分離し、上清のみを採取して血清試料とした。

##### 【0040】(2) 試験方法

a) 実施例1で調製した判定用プレートに、PBSにより適宜希釈した血清試料及びコントロールの市販健康人血清を100 $\mu$ l/ウェルの割合で注入し、37 $^{\circ}$ Cで2時間放置した。

b) 界面活性剤を含有するPBSでプレートを洗浄し、実施例1で調製したビオチン化PHA-E溶液を100 $\mu$ l/ウェルの割合で注入し、37 $^{\circ}$ Cで1時間放置した。

c) 界面活性剤を含むPBSでプレートを洗浄し、実施例1で調製したHRPストレプトアビジン溶液を100 $\mu$ l/ウェルの割合で注入し、室温で30分間放置した。

d) 界面活性剤を含むPBSでプレートを洗浄し、実施例1で調製したHRPに対する基質溶液を、100 $\mu$ l/ウェルの割合で注入し、室温で30分間放置した。

e) 実施例1で調製した反応停止液により反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(バイオラッド社製。Model3550)により415nmの吸収を測定した。

#### 【0041】(3) 試験結果

膠原病患者のIgGとレクチンとの反応性の結果を図1に示す。図1の横軸は健康人及び各種疾患患者から採取した血清試料の種類を示し、縦軸は各血清試料の吸光値をコントロールの血清の吸光値で割った値(value)を示す。図1から明らかな通り、健康人及びその他の膠原病患者と比較して特にSLE疾患患者で吸光値が低いことが判明した。この結果から、本発明の試薬を使用してSLE疾患患者のIgGの存在確認が可能であり、SLE疾患の診断が可能である事が明らかになった。

#### 【0042】実施例2

次の方法により本発明のSLE診断用試薬を調製した。

##### (1) PHA-E金コロイドの調製

20mlのメスシリンダー(岩城ガラス社製)に、20mlの金コロイド粒子懸濁液と88 $\mu$ gPHA-E(ホーネン社製)を添加し、伸張性フィルム(富士フィルム社製)によりメスシリンダーを密封して十分に攪拌した後、室温で10分間静置した。その後、10%濃度に調製したBSA(シグマ社製)2mlを前記溶液に添加して、伸張性フィルム(富士フィルム社製)により密封し、十分攪拌した後に室温で10分間静置した。この溶液をプラスチック製の遠沈管に入れ、超遠心分離装置(日立製作所製70P-72型)により12,000回転で1時間遠心して沈殿を回収した。

##### 【0043】(2) プロテインGメンブレンの調製

PBSにより1mg/mlとなるように調製した組み換えプロテインG(和光純薬工業社製)を1.5 $\mu$ lずつメンブレン(ミリポア社製)にプロットし、このメンブレンを温風乾燥機(アドバンテック社製。FC-410型)により十分に乾燥させた後、PBSに1%の濃度で溶解したBSAに浸漬した。さらに、再びメンブレンを温風乾燥機により十分に乾燥させ、1.4cm $\times$ 1.4cmの大きさに切断した。

##### 【0044】(3) 反応カセットの組立て

プラスチック製の受け板に吸収剤となる脱脂綿を敷き、その上から1.4cm $\times$ 1.4cmにカットした濾紙(アドバンテック社製)を載置した。この濾紙の上に、さらに(2)で調製したプロテインGメンブレンを載置し、メンブレン部分が外部に露出されるように丸い穴をあけたプラスチック製の蓋で被蓋した。以上の各工程により、本発明の全身性エリテマトーデス検出薬を調製した。

#### 【0045】試験例2

この試験は、実施例2の診断用試薬を用いて、膠原病患者のIgGとレクチンとの反応性を調べるために行った。

##### (1) 試料の調製

血清試料の調製は、試験例1の試料の調製方法に基づいて行った。

(2) 試験方法

実施例2で調製した反応力セットのメンブレン部分に、PBSで希釈した前記血清試料200μlを滴下した。検体が確実に吸収されたことを確認し、実施例2で調製したPHA-E金コロイド溶液20μlを滴下した。金コロイドの溶液が確実に吸収されたことを確認し、界面活性剤を含有するPBS溶液200μlを用いてメンブレン表面を洗浄した。次いで、メンブレン表面を肉眼で観察した。

【0046】(3) 試験結果

試験結果を表1に示す。表1から明らかとなり、健康人の血清を検体とした場合は、そのIgGはPHA-Eと反応するため、全ての試料に金コロイド標識PHA-Eによるスポットが観察されたが、SLE患者の血清を検体とした場合は、IgGはPHA-Eと反応しないので、金コロイド標識PHA-Eによるスポットは観察されなかった。また、このほかの膠原病である、RA患者、PSS患者及びSjS患者の血清を検体とした場合は、健康人の場合と同じくスポットを観察した。MCTD患者については、2例に金コロイド標識PHA-Eによるスポットを観察しなかったが、残りの試料では、スポットが観察された。従って、この結果から明らかとなり、本発明の診断用試薬は、SLE疾患患者のIgGの存在確認に使用することができ、これによりSLE疾患の診断ができることが判明した。

【0047】

【表1】

試料	陽性	陰性
健康人	17	0
SLE	0	9
PSS	6	0
SjS	5	0
MCTD	4	2
RA	11	0
合計	43	11

【0048】実施例3

SLEの検出を以下のとおり実施した。

(1) 試料の調製

健康人及びSLE患者から採取した血液を、プラスチック製の遠沈管内で固形成分を自然凝固させ、遠心分離装置(トミー精工社製。RB-18IV型)により3,000回転で30分遠心して固形分と上清を分離し、上清のみを採取して血清試料とした。

(2) IgGの測定方法。

a) 実施例1で調製した判定用プレートに、PBSにより適宜希釈した血清試料及びコントロールの市販健康人血清を100μl/ウェルの割合で注入し、37℃で2

時間放置した。

b) 界面活性剤を含有するPBSでプレートを洗浄し、実施例1で調製したビオチン化PHA-E4溶液を100μl/ウェルの割合で注入し、37℃で1時間放置した。

c) 界面活性剤を含むPBSでプレートを洗浄し、実施例1で調製したHRPストレプトアビジン溶液を100μl/ウェルの割合で注入し、室温で30分間放置した。

10 d) 界面活性剤を含むPBSでプレートを洗浄し、実施例1で調製したHRPに対する基質溶液を、100μl/ウェルの割合で注入し、室温で30分間放置した。

e) 実施例1で調製した反応停止液により反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(パイオラッド社製。Model3550)により415nmの吸収を測定した。

【0049】実施例4

SLE検出を以下のとおり実施した。

(1) 試料の調製

健康人及びSLE患者から採取した血液を、プラスチック製の遠沈管内で固形成分を自然凝固させ、遠心分離装置(トミー精工社製。RB-18IV型)により3,000回転で30分遠心して固形分と上清を分離し、上清のみを採取して血清試料とした。

(2) IgGの測定方法。

実施例2で調製した反応力セットのメンブレン部分に、PBSで希釈した前記血清試料200μlを滴下した。検体が確実に吸収されたことを確認し、実施例2で調製したPHA-E金コロイド溶液20μlを滴下した。金コロイドの溶液が確実に吸収されたことを確認し、界面活性剤を含有するPBS溶液200μlを用いてメンブレン表面を洗浄した。次いで、メンブレン表面を肉眼で観察した。

【0050】

【発明の効果】以上、詳細に説明したとおり、本発明はファセオルス・ヴルガリス由来のレクチンを有効成分として含有するSLE診断用試薬、SLE診断用キット及びSLE由来のIgGの存在確認方法であり、本発明により奏せられる効果は次のとおりである。

(1) ファセオルス・ヴルガリス由来のレクチン、特にPHA-Eを用いることにより、簡単、迅速かつ高精度でSLEを診断することができる。

(2) 本発明の診断用試薬、診断用キットを用いることにより、検体中のIgGを簡単、迅速かつ高精度で検出することができ、その結果、精度の高いSLEの診断が可能である。

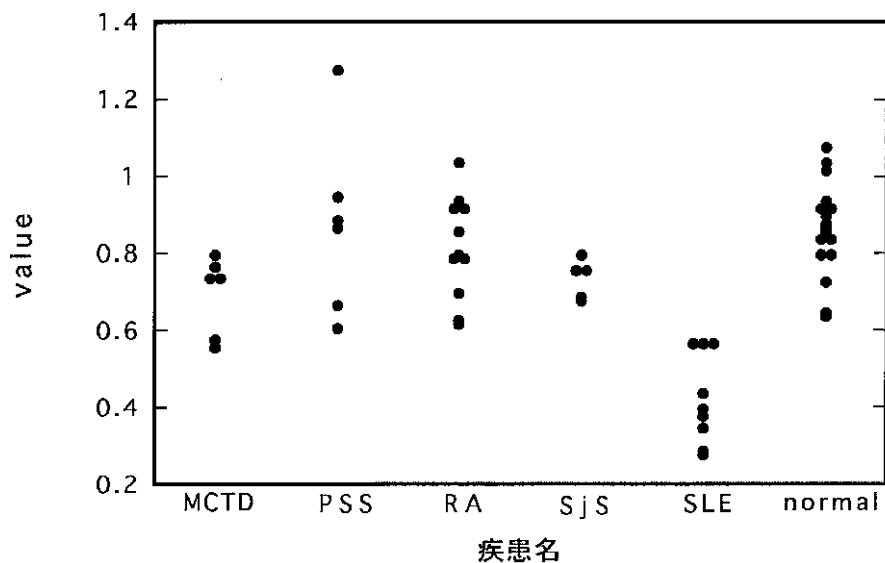
(3) 本発明の診断用試薬又は診断用キットを用いることにより、特別な検査機器を用いることなく、容易にSLEの診断を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

50 【図1】 健康人及び各種疾患患者から採取した試料の

吸光値をコントロール血清の吸光値で除した値を示すグ\* \*ラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 箸本 弘一  
 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永  
 乳業株式会社生物科学研究所内

(72)発明者 素本 友紀  
 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永  
 乳業株式会社生物科学研究所内  
 Fターム(参考) 4H045 AA30 BA10 CA33 DA80 EA50  
 EA54 FA74

专利名称(译)	用于系统性红斑狼疮的诊断试剂，诊断试剂盒和用于确认来自系统性红斑狼疮的免疫球蛋白G的存在的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002168865A</a>	公开(公告)日	2002-06-14
申请号	JP2000366080	申请日	2000-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	森永乳业株式会社		
申请(专利权)人(译)	森永乳业株式会社		
[标]发明人	早澤宏紀 原田義次 箸本弘一 素本友紀		
发明人	早澤 宏紀 原田 義次 箸本 弘一 素本 友紀		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/42 G01N33/543 G01N33/566		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.501.A G01N33/566 C07K14/42		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA33 4H045/DA80 4H045/EA50 4H045/EA54 4H045/FA74		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种诊断试剂，诊断试剂盒和检测源自SLE的IgG的方法，从而可以简单，高精度地诊断系统性红斑狼疮（SLE）。一种系统性红斑狼疮诊断试剂，包含源自菜豆的乳素作为活性成分；此类诊断试剂，不溶性载体和固定在载体上并捕获免疫球蛋白G的捕获物质。系统性红斑狼疮诊断试剂盒，其特征在于包括：以及存在SLE衍生的IgG，其特征在于使样本中包含的IgG与这种凝集素反应，并检测与该IgG结合的凝集素如何检查。