

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/016607

発行日 令和1年5月23日 (2019.5.23)

(43) 国際公開日 平成30年1月25日 (2018.1.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/564 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/564 Z N A Z	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50 Z	
<b>GO 1 N 33/15 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

出願番号 特願2018-528879 (P2018-528879)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/026359	
(22) 国際出願日 平成29年7月20日 (2017.7.20)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-142701 (P2016-142701)	(74) 代理人 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(32) 優先日 平成28年7月20日 (2016.7.20)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 塩川 雅広 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
	(72) 発明者 児玉 裕三 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
	(72) 発明者 千葉 勉 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

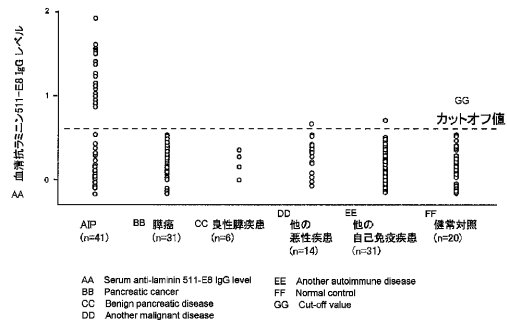
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g G 4 関連疾患の検査方法

(57) 【要約】

本発明は、I g G 4 関連疾患の病原物質を明らかにし、それを利用して、I g G 4 関連疾患の検査方法等を提供することを目的とする。

本発明は、I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び/又は、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む I g G 4 関連疾患の検査方法を提供する。本発明はまた、ラミニンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、及び、インテグリンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

I g G 4 関連疾患の検査方法であって、

I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び / 又は

I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

## 【請求項 2】

前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

10

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン - 5 1 1 と免疫学的に反応する抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

抗インテグリン抗体検出工程における前記抗体が、インテグリン 6 1 と免疫学的に反応する抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 I g G 4 関連疾患が、I g G 4 関連腎疾患であり、

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン - 5 2 1 と免疫学的に反応する抗体である、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記抗ラミニン抗体検出工程が、ラミニンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

自己免疫性膵炎の検査方法であって、

自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、ラミニン - 5 1 1 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び

自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、インテグリン 6 1 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

30

## 【請求項 7】

ラミニンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬。

## 【請求項 8】

前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

前記ラミニンが、ラミニン - 5 1 1 である、請求項 7 に記載の検査試薬。

## 【請求項 9】

前記 I g G 4 関連疾患が、I g G 4 関連腎疾患であり、

前記ラミニンが、ラミニン - 5 2 1 である、請求項 7 に記載の検査試薬。

## 【請求項 10】

前記ラミニンを、固相に固定された形態で含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の検査試薬。

40

## 【請求項 11】

インテグリンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬。

## 【請求項 12】

ラミニン - 5 1 1 とインテグリン 6 1 とを固相に固定された形態で含む、自己免疫性膵炎の検査試薬。

## 【請求項 13】

I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法であって、

I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び / 又は、

50

I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

【請求項 1 4】

I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、試験物質を作用させた動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程と、

前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程とを含む方法。

10

【請求項 1 5】

I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラミニン抗体投与工程、及び非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラミニン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、I g G 4 関連疾患の検査方法、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法、及び、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

I g G 4 関連疾患とは、血清 I g G 4 高値と I g G 4 陽性形質細胞の組織浸潤または腫瘤形成を特徴とする疾患群である。

【0003】

I g G 4 関連疾患は比較的新しい疾患概念であり、これまでのところ原因は不明である。罹患臓器としては膵臓、胆管、涙腺・唾液腺、中枢神経系、甲状腺、肺、肝臓、消化管、腎臓、前立腺、後腹膜、動脈、リンパ節、皮膚、乳腺等が知られている。病変が複数臓器におよび全身疾患としての特徴を有することが多いが、単一臓器病変の場合もある。

30

【0004】

自己免疫性膵炎 (A I P)、I g G 4 関連腎疾患、I g G 4 関連涙腺唾液腺炎等が I g G 4 関連疾患に分類される疾患として知られている。

【0005】

I g G 4 関連疾患の原因は従来知られておらず、I g G 4 関連疾患の指標となるマーカー物質も知られていない。このため従来 I g G 4 関連疾患であると診断することは容易ではなかった。例えば、A I P は膵臓での組織浸潤を特徴とするが、組織の観察像からは膵癌との判別が難しく、A I P が誤って膵癌と診断される可能性もあった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特開 2 0 0 9 - 2 9 4 0 4 0 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 8 - 2 7 5 5 2 7 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これまでに自己免疫性膵炎の検査方法として、H S P 1 0 と免疫学的に反応する抗体を検出する方法 (特許文献 1) や、アミラーゼ 2 - A と免疫学的に反応する抗体を検出する方法 (特許文献 2) が知られている。しかしながら、これらの方法は、自己免疫性膵炎

50

の検査方法として必ずしも満足できるものではない。

【 0 0 0 8 】

I g G 4 関連疾患の病原物質が特定できれば、病原物質を指標として I g G 4 関連疾患を検査すること、病原物質を用いて I g G 4 関連疾患のモデル動物を作製すること、病原物質を標的として新たな治療薬を開発すること、等が可能になる。しかし、これまでのところ I g G 4 関連疾患の病原物質は解明されていない。

【 0 0 0 9 】

I g G 4 関連疾患の病原物質を明らかにし、それを利用して、I g G 4 関連疾患の検査方法、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法として有効な手段を提供することが求められている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは驚くべきことに、I g G 4 関連疾患の病原物質が、ラミニンに対する自己抗体であること、及び、血清中における抗ラミニン抗体及び抗インテグリン抗体が I g G 4 関連疾患の指標となることを解明し、この知見に基づいて以下の発明を完成するに至った。

( 1 ) I g G 4 関連疾患の検査方法であって、

I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び / 又は

I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

( 2 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン - 5 1 1 と免疫学的に反応する抗体である、( 1 ) に記載の方法。

( 3 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

抗インテグリン抗体検出工程における前記抗体が、インテグリン 6 1 と免疫学的に反応する抗体である、( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の方法。

( 4 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、I g G 4 関連腎疾患であり、

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン - 5 2 1 と免疫学的に反応する抗体である、( 1 ) に記載の方法。

( 5 ) 前記抗ラミニン抗体検出工程が、ラミニンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、( 1 ) ~ ( 4 ) のいずれかに記載の方法。

( 6 ) 前記抗インテグリン抗体検出工程が、インテグリンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、( 1 ) ~ ( 5 ) のいずれかに記載の方法。

( 7 ) 前記検体が血液試料である、( 1 ) ~ ( 6 ) のいずれかに記載の方法。

( 7 ' ) 自己免疫性膵炎の検査方法であって、

自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、ラミニン - 5 1 1 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び

自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、インテグリン 6 1 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

( 8 ) ラミニンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬。

( 9 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

前記ラミニンが、ラミニン - 5 1 1 である、( 8 ) に記載の検査試薬。

( 1 0 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、I g G 4 関連腎疾患であり、

前記ラミニンが、ラミニン - 5 2 1 である、( 8 ) に記載の検査試薬。

( 1 1 ) 前記ラミニンを、固相に固定された形態で含む、( 8 ) ~ ( 1 0 ) のいずれかに記載の検査試薬。

10

20

30

40

50

- ( 1 2 ) インテグリンを含む、 I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬。
- ( 1 3 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、  
前記インテグリンが、インテグリン 6 1 である、( 1 2 ) に記載の検査試薬。
- ( 1 4 ) 前記インテグリンを、固相に固定された形態で含む、( 1 2 ) 又は( 1 3 ) に記載の検査試薬。
- ( 1 4 ' ) ラミニン - 5 1 1 とインテグリン 6 1 とを固相に固定された形態で含む、自己免疫性膵炎の検査試薬。
- ( 1 5 ) I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法であって、  
I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び / 又は、  
I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。 10
- ( 1 6 ) I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、  
試験物質を作用させた動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程と、  
前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程とを含む方法。
- ( 1 7 ) I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、  
試験物質を作用させた動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程と、  
前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程とを含む方法。 20
- ( 1 8 ) I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、  
非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラミニン抗体投与工程、及び  
非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラミニン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法。 30
- ( 1 9 ) I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、  
非ヒト動物に、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗インテグリン抗体投与工程、及び  
非ヒト動物を、インテグリンを抗原として免疫するインテグリン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法。
- ( 2 0 ) I g G 4 関連疾患の指標を取得する方法であって、  
検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び / 又は  
検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。 40
- ( 2 1 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、  
抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン - 5 1 1 と免疫学的に反応する抗体である、( 2 0 ) に記載の方法。
- ( 2 2 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、  
抗インテグリン抗体検出工程における前記抗体が、インテグリン 6 1 と免疫学的に反応する抗体である、( 2 0 ) 又は( 2 1 ) に記載の方法。
- ( 2 3 ) 前記 I g G 4 関連疾患が、I g G 4 関連腎疾患であり、  
抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン - 5 2 1 と免疫学的に反応する抗体である、( 2 0 ) に記載の方法。 50

- (24) 前記抗ラミニン抗体検出工程が、ラミニンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、(20)～(23)のいずれかに記載の方法。
- (25) 前記抗インテグリン抗体検出工程が、インテグリンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、(20)～(24)のいずれかに記載の方法。
- (26) 前記検体が、被検動物から分離された血液試料である、(20)～(25)のいずれかに記載の方法。
- (26') 自己免疫性膵炎の指標を取得する方法であって、  
 検体中の、ラミニン - 511 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び  
 検体中の、インテグリン 61 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。 10
- (27) IgG4 関連疾患を検査するための検査試薬の製造における、ラミニンの使用。
- (28) 前記 IgG4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、  
 前記ラミニンが、ラミニン - 511 である、(27)に記載の使用。
- (29) 前記 IgG4 関連疾患が、IgG4 関連腎疾患であり、  
 前記ラミニンが、ラミニン - 521 である、(27)に記載の使用。
- (30) 前記ラミニンが、ラミニンが固定された固相の形態である、(27)～(29)のいずれかに記載の使用。
- (31) IgG4 関連疾患を検査するための検査試薬の製造における、インテグリンの使用。 20
- (32) 前記 IgG4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、  
 前記インテグリンが、インテグリン 61 である、(31)に記載の使用。
- (33) 前記インテグリンが、インテグリンが固定された固相の形態である、(31)又は(32)に記載の使用。
- (33') 自己免疫性膵炎の検査試薬の製造における、固相に固定された形態の、ラミニン - 511 及びインテグリン 61 の使用。
- (34) IgG4 関連疾患の検査に使用するためのラミニン。
- (35) 前記 IgG4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、  
 前記ラミニンが、ラミニン - 511 である、(34)に記載のラミニン。 30
- (36) 前記 IgG4 関連疾患が、IgG4 関連腎疾患であり、  
 前記ラミニンが、ラミニン - 521 である、(34)に記載のラミニン。
- (37) 前記ラミニンが、ラミニンが固定された固相の形態である、(34)～(36)のいずれかに記載の使用。
- (38) IgG4 関連疾患を検査に使用するためのインテグリン。
- (39) 前記 IgG4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、  
 前記インテグリンが、インテグリン 61 である、(38)に記載のインテグリン。
- (40) 前記インテグリンが、インテグリンが固定された固相の形態である、(38)又は(39)に記載のインテグリン。
- (40') 自己免疫性膵炎の検査に使用するための、固相に固定された形態の、ラミニン - 511 及びインテグリン 61 の組み合わせ。 40
- (41) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、ラミニンと免疫学的に反応する抗体。
- (42) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、ラミニン。
- (43) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、インテグリンと免疫学的に反応する抗体。
- (44) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、インテグリン。
- (45) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造における、ラ 50

ミニンと免疫学的に反応する抗体の使用。

(46) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造における、ラミニンの使用。

(47) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造における、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の使用。

(48) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造における、インテグリンの使用。

【0011】

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-142701号の開示内容を包含する。

【発明の効果】

【0012】

本発明の1つ以上の実施形態によれば、IgG4 関連疾患の検査方法、IgG4 関連疾患を検査するための検査試薬、IgG4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法として有効な手段が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】図1Aは、実験1での、対照IgG投与マウス(左列)と、患者IgG投与マウス(右列)の、IgG投与から12時間後の膵臓のH&E染色(上段)と、Gr1の染色(下段)の結果を示す。観察像中のスケールバーは上段では50 $\mu$ m、下段では20 $\mu$ mを示す。

【図1B】図1Bは、実験1での、対照IgG(三角)及び患者IgG(丸)の投与量と、浮腫面積との相関関係を示す。

【図1C】図1Cは、実験1での、対照IgG投与マウス(左)と、患者IgG投与マウス(右)の、IgG投与から12時間後の膵臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、Gr1陽性細胞数を示す(\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.005$ : paired Student's testによる)。

【図2A】図2Aは、実験1での、対照IgG投与マウス(左列)と、患者IgG投与マウス(右列)の、IgG投与から12時間後の膵臓でのIgG(上段)、IgG1(中段)、IgG4(下段)の免疫組織化学的染色の結果を示す。観察像中のスケールバーは20 $\mu$ mを示す。

【図2B】図2Bは、実験1での、対照IgG投与マウスと患者IgG投与マウスの、膵臓組織の免疫蛍光染色の結果を示す。観察像中のスケールバーは20 $\mu$ mを示す。

【図3A】図3Aの上段の「対照1」は、10名の対照のうち特定の1名(対照1)から得た対照IgG1及び対照IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の膵臓のH&E染色の観察像である。観察像中のスケールバーは20 $\mu$ mを示す。図3Aの中段及び下段「患者9」は、10名のIgG4 関連疾患患者のうち特定の1名(患者9)から得た患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の膵臓の、H&E染色の観察像(中段)、及び、Gr1の免疫組織化学的染色の観察像(下段)である。観察像中のスケールバーは20 $\mu$ mを示す。

【図3B】図3Bは、対照IgG1及び対照IgG4の一方又は両方を投与したマウス(左)と、患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウス(右)の、投与から12時間後の膵臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、Gr1陽性細胞数を示す(\* $p < 0.05$ : paired Student's testによる)。

【図3C】図3Cは、10名のIgG4 関連疾患患者のうち特定の1名(患者1)から得た患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の膵臓の、ヒトIgG1又はヒトIgG4の免疫組織化学的染色の観察像である。観察像中のスケールバーは20 $\mu$ mを示す。

【図4A】図4A上段左は、AIP病変のある部位(左側)と、病変のない部位(右側)

10

20

30

40

50

との境界部分から採取した、A I P患者の膵臓組織切片をH & E染色した観察像を示す。図4 A上段右は、同様の膵臓組織切片の、I g G 4に対する免疫組織化学的染色の観察像を示す。スケールバーは200 μmを示す。図4 A下段左は、図4 A上段右の観察像のうち、病変のある腺房の部分を拡大した観察像である。図4 A下段中は、図4 A上段右の観察像のうち、病変のある小葉間隙の部分を拡大した観察像である。図4 A下段右は、図4 A上段右の観察像のうち、病変のない正常な腺房の部分を拡大した観察像である。図4 A下段の各観察像においてスケールバーは20 μmを示す。

【図4 B】図4 Bの各像は、A I P患者の膵臓での病変のある腺房を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4 Bの各像ではスケールバーは20 μmを示す。図4 B上段左は、A I P患者の膵臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたI g G 4の観察像を示す。図4 B上段中は、図4 B上段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたアミラーゼの観察像を示す。図4 B上段右は、図4 B上段左のI g G 4の観察像と、図4 B上段中のアミラーゼの観察像とを重ね合わせた像である。図4 B下段左は、A I P患者の膵臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたI g G 4の観察像を示す。図4 B下段中は、図4 B下段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンI Vの観察像を示す。図4 B下段右は、図4 B下段左のI g G 4の観察像と、図4 B下段中のコラーゲンI Vの観察像とを重ね合わせた像である。

【図4 C】図4 Cの各像は、A I P患者の膵臓での病変のある小葉間隙を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4 Cの各像ではスケールバーは20 μmを示す。図4 C左は、A I P患者の膵臓での病変のある小葉間隙の、免疫蛍光染色されたI g G 4の観察像を示す。図4 C中は、図4 C左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンI Vの観察像を示す。図4 C右は、図4 C左のI g G 4の観察像と、図4 C中のコラーゲンI Vの観察像とを重ね合わせた像である。

【図5 A】A I P患者血清及び対照血清中の抗ヒトラミン - 5 1 1 活性断片抗体の濃度を示す。

【図5 B】A I P患者血清及び対照血清中の抗ヒトコラーゲンI V抗体の濃度を示す。

【図5 C】A I P患者血清及び対照血清中の抗ヒトフィブロネクチン抗体の濃度を示す。

【図5 D】A I P患者血清及び対照血清中の抗G F P抗体の濃度を示す。

【図6】図6は、H & E染色により染色した膵臓の組織切片の観察像を示す。図6左が対照群の膵臓の観察像、図6右がラミン - 5 1 1により免疫した試験群の膵臓の観察像である。

【図7】A I P患者血清及び対照血清中の抗ヒトラミン - 5 2 1 抗体の濃度を示す。

【図8】図8左側にI g G 4関連腎疾患患者I g Gを皮下投与したマウスの腎臓の観察像を示し、図8右側に対照I g Gを皮下投与したマウスの腎臓のヒトI g G 4染色観察像を示す。上段は、腎臓全体のヒトI g G 4染色観察像を示し、下段は糸状体のヒトI g G 4染色観察像を示す。

【図9 A】実験8における、トレーニング群である10名のA I P患者及び10名の対照からの血清試料の、抗ヒトラミン - 5 1 1 - E 8 I g G抗体レベルの測定結果を示す。

【図9 B】実験8における、バリデーション群である41名のA I P患者及び102名の対照（健常者20名、A I P以外の疾患患者82名）からの血清試料の、抗ヒトラミン - 5 1 1 - E 8 I g G抗体レベルの測定結果を示す。

【図10】実験9における、26名の抗ラミン5 1 1 - E 8抗体陽性A I P患者、25名の抗ラミン5 1 1 - E 8抗体陰性A I P患者、及び、112名の対照からの血清試料での、抗インテグリン 6 1 I g G抗体レベルの測定結果を示す。

【図11】実験9における、26名の抗ラミン5 1 1 - E 8抗体陽性A I P患者、25名の抗ラミン5 1 1 - E 8抗体陰性A I P患者、及び、112名の対照からの血清試料での、抗インテグリン 3 1 I g G抗体レベルの測定結果を示す。

【図12】図12上段は、抗ラミン5 1 1 - E 8抗体陽性A I P患者の造影C Tによる膵画像である。図12下段は、抗インテグリン 6 1抗体陽性A I P患者の造影C Tに

10

20

30

40

50

よる腓画像である。各画像中の矢印は病変箇所を指す。

【図 1 3】抗ラミニン 5 1 1 - E 8 抗体陽性 A I P 患者 5 名の、ステロイド（プレドニゾン）を用いた治療の前後での、血清中の抗ラミニン 5 1 1 - E 8 抗体レベルの測定結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

< 1 . I g G 4 関連疾患 >

本発明において I g G 4 関連疾患とは、血清 I g G 4 高値と I g G 4 陽性形質細胞の組織浸潤または腫瘤形成を特徴とする疾患群であり、具体的には、自己免疫性腓炎（A I P）、I g G 4 関連腎疾患、I g G 4 関連涙腺唾液腺炎、I g G 4 関連硬化性胆管炎、I g G 4 関連眼疾患、I g G 4 関連動脈周囲炎、I g G 4 関連下垂体炎、I g G 4 関連肺疾患、I g G 4 関連後腹膜線維症が例示できる。

< 2 . I g G 4 関連疾患の検査方法 >

本発明は第一に、

I g G 4 関連疾患の検査方法であって、

I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び / 又は

I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程

を含む方法に関する。

【0015】

本発明の検査方法の 1 つ以上の実施形態は、ラミニンに対する抗体（自己抗体）が、I g G 4 関連疾患の病原物質であり、被検動物から取得した検体中の前記抗体が、I g G 4 関連疾患に罹患していることの指標となるという驚くべき知見に基づき完成された。

【0016】

また、本発明の検査方法の 1 つ以上の実施形態は、ラミニンとインテグリンとの結合が、I g G 4 関連疾患の病原物質のターゲットであり、被検動物から取得した検体中の抗ラミニン抗体及び / 又は抗インテグリン抗体が、I g G 4 関連疾患に罹患していることの指標となるという驚くべき知見に基づき完成された。

【0017】

本発明の検査方法が対象とする被検動物は特に限定されずヒトであってもよいし、他の非ヒト哺乳動物であってもよいが、好ましくはヒトである。

【0018】

本発明の検査方法に用いる検体としては、被検動物から採取される体液が挙げられる。具体的には、血清、血漿、全血等の血液試料のほか、唾液、髄液、尿などの血液以外の体液試料であってもよい。また、体液に限らず、被検動物から採取される組織、例えば、検査しようとする I g G 4 関連疾患の疾患部位（例えば腓臓、腎臓、唾液腺等）から採取される組織も、検体として用いることができる。検体は、被検動物から分離された形態で本発明の検査方法に用いる。

【0019】

ラミニンは、天然型では、鎖、鎖および鎖の 3 本のサブユニット鎖からなる巨大なヘテロ 3 量体分子である。鎖として 1 ~ 5、鎖として 1 ~ 3、鎖として 1 ~ 3 が知られており、それらの組み合わせで 1 2 種類以上のアイソフォームが存在する（表 1 参照）。本発明においてラミニンのアイソフォームは限定されない。すなわち検出しようとする抗体が免疫学的に反応するラミニンは、1 ~ 5 から選択される 1 種の鎖、1 ~ 3 から選択される 1 種の鎖、1 ~ 3 から選択される 1 種の鎖からなるものであることができ、具体的には、表 1 に記載の 1 2 種類のいずれか、或いは他のアイソフォームであることができ、好ましくは鎖が 5、鎖が 1、鎖が 1 である「ラミニン - 5 1 1」、及び、鎖が 5、鎖が 2、鎖が 1 である「ラミニン - 5 2 1」である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

【 表 1 】

α鎖	三量体組成	主な発現部位
α1	α1β1γ1(ラミニン-111) α1β2γ1(ラミニン-121)	胎児組織 (成体組織には発現していない)
α2	α2β1γ1(ラミニン-211) α2β1γ3(ラミニン-213) α2β2γ1(ラミニン-221)	筋肉、神経(シュワン細胞)
α3	α3β1γ1(ラミニン-311) α3β2γ1(ラミニン-321) α3β3γ2(ラミニン-332)	皮膚、肺
α4	α4β1γ1(ラミニン-411) α4β2γ1(ラミニン-421)	毛細血管
α5	α5β1γ1(ラミニン-511) α5β2γ1(ラミニン-521)	腎臓、肺、脾臓、血管

10

【 0 0 2 1 】

本発明において、検出しようとする抗体が免疫学的に反応するラミニンの起源は特に限定されないが、I g G 4 関連疾患は通常は自己免疫疾患であることから、被検動物と同じ種のラミニンであることが好ましく、特にヒトが好ましい。ヒト等の哺乳動物の種のラミニンの鎖、鎖、鎖をコードする遺伝子の塩基配列情報および各鎖のアミノ酸配列情報は、公知のデータベース(GenBank等)から取得することができる。表2に、ヒトを含む主な哺乳類について、ラミニンを構成する各鎖のアクセッション番号を示す。表2に示すアミノ酸配列を有するラミニンの各鎖が、更に翻訳後修飾を受けたものが、ラミニンを形成してもよい。これら以外の各種哺乳動物のラミニン構成鎖の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報も同様に公知のデータベース(GenBank等)から取得することができる。

20

【 0 0 2 2 】

30

【表 2】

	アミノ酸配列	塩基配列
ヒトラミニン α1	NP_005550	NM_005559
ヒトラミニン α2	NP_000417	NM_000426
ヒトラミニン α3	NP_000218	NM_000227
ヒトラミニン α4	NP_002281	NM_002290
ヒトラミニン α5	NP_005551	NM_005560
ヒトラミニン β1	NP_002282	NM_002291
ヒトラミニン β2	NP_002283	NM_002292
ヒトラミニン β3	NP_000219	NM_000228
ヒトラミニン γ1	NP_002284	NM_002293
ヒトラミニン γ2	NP_005553	NM_005562
ヒトラミニン γ3	NP_006050	NM_006059
マウスラミニン α5	NP_001074640	NM_001081171
マウスラミニン β1	NP_032508	NM_008482
マウスラミニン γ1	NP_034813	NM_010683
ラットラミニン α5	NP_001178538	NM_001191609
ラットラミニン β1	NP_001100191	NM_001106721
ラットラミニン γ1	NP_446418	NM_053966

10

20

30

40

50

## 【0023】

本発明においてラミニン、ラミニン - 5 1 1、ラミニン - 5 2 1 という各用語は、特に限定しない場合は、鎖、鎖及び鎖がそれぞれ全長からなる天然型の形態には限定されず、それぞれ、ラミノンの断片、ラミニン - 5 1 1 の断片、ラミニン - 5 2 1 の断片や、天然型のラミニン、天然型のラミニン - 5 1 1、天然型のラミニン - 5 2 1 と等価な形態のものを包含する。従って、検出しようとする抗体は、ラミノンの断片と免疫学的に反応するものであってもよい。ラミノンの断片としては、天然型のラミノンの 3 量体を構成する鎖、鎖、鎖のうち少なくとも 1 つが全長よりも短いものが挙げられる。ラミノンの断片は、3 量体を形成していることが好ましく、インテグリン結合活性を有していることがより好ましい。ラミノンの断片が 3 量体を形成していることは、ラミノンの断片を SDS - PAGE に供し、バンドの数を検出すること等により確認できる。ラミノンの断片がインテグリン結合活性を有していることは、ELISA 法等により確認することができる。

## 【0024】

3 量体を形成し、且つ、インテグリン結合活性を有するラミノンの断片としては、天然型のラミニンをエラスターゼ等のタンパク質分解酵素で消化して得られる断片が挙げられ、特に好ましくは E 8 フラグメントである。ラミノンの E 8 フラグメントは、鎖の C 末端断片から、C 末端の球状 (G) ドメイン 4 および 5 が除かれた断片 (鎖 E 8)、鎖の C 末端断片 (鎖 E 8) および鎖の C 末端断片 (鎖 E 8) が 3 量体を形成したフラグメントである (Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, The Journal of Biological Chemistry, 282, 11144-11154, 2007)。ラミノンの E 8 フラグメントは、全長ラミニンを膵エラスターゼにより酵素的に消化して得ることができる。市販のラミノンの E 8 フラグメントとしては、ヒトラミニン - 5 1 1 - E 8 (8 9 2 0 1 2, 株式会社ニッピ製) が例示できる。

## 【0025】

インテグリンは、天然型では、鎖及び鎖の 2 本のサブユニット鎖からなるヘテロ 2

量体分子である。鎖として 1 ~ 11、V、X、M、L、D、E、I I b、鎖として 1 ~ 8 が知られており、それらの組み合わせが異なる複数のアイソフォームが存在する。ラミニンのリガンドとなり得るインテグリンのアイソフォームとしては、インテグリン 6 1、インテグリン 3 1、インテグリン 6 4 が知られている。本発明においてインテグリンのアイソフォームは限定されないが、好ましくは鎖が 6、鎖が 1 である「インテグリン 6 1」である。

【0026】

本発明において、検出しようとする抗体が免疫学的に反応するインテグリンの起源は特に限定されないが、IgG4 関連疾患は通常は自己免疫疾患であることから、被検動物と同じ種のインテグリンであることが好ましく、特にヒトが好ましい。ヒト等の哺乳動物の種のインテグリンの鎖、鎖をコードする遺伝子の塩基配列情報および各鎖のアミノ酸配列情報は、公知のデータベース (GenBank 等) から取得することができる。表 3 に、ヒトインテグリンを構成する各鎖のアミノ酸配列及び塩基配列のアクセッション番号を示す。ヒトインテグリンの 6 鎖及び 1 鎖には、それぞれ、3つのスプライシングバリエーションが知られている。表 3 に示すアミノ酸配列を有するヒトインテグリンの鎖、鎖が、更に翻訳後修飾を受けたものが、ヒトインテグリンを形成してもよい。これら以外の各種哺乳動物のインテグリン構成鎖の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報も同様に公知のデータベース (GenBank 等) から取得することができる。

【0027】

【表 3】

		アミノ酸配列	塩基配列
ヒトインテグリン α3		NP_002195.1 (配列番号 1)	NM_002204.3
ヒトインテグリン α6	integrin alpha-6 isoform b preproprotein	NP_000201.2 (配列番号 2)	NM_000210.3
ヒトインテグリン α6	integrin alpha-6 isoform a preproprotein	NP_001073286.1	NM_001079818.2
ヒトインテグリン α6	integrin alpha-6 isoform c	NP_001303235.1	NM_001316306.1
ヒトインテグリン β1	integrin beta-1 isoform 1A precursor	NP_002202.2 (配列番号 3)	NM_002211.3
ヒトインテグリン β1	integrin beta-1 isoform 1D precursor	NP_391988.1	NM_033668.2
ヒトインテグリン β1	integrin beta-1 isoform 1A precursor	NP_596867.1	NM_133376.2

【0028】

本発明においてインテグリン、インテグリン 6 1、インテグリン 3 1 という各用語は、特に限定しない場合は、鎖及び鎖がそれぞれ全長からなる形態には限定されず、それぞれ、インテグリンの断片、インテグリン 6 1 の断片、インテグリン 3 1 の断片や、天然型のインテグリン、天然型のインテグリン 6 1、天然型のインテグリン 3 1 と等価な形態のものを包含する。従って、検出しようとする抗体は、インテグリンの断片と免疫学的に反応するものであってもよい。インテグリンの断片としては、インテグリンの 2 量体を構成する鎖、鎖のうち少なくとも 1 つが全長よりも短いものが挙げられる。インテグリンの断片は、2 量体を形成していることが好ましく、ラミニン

結合活性を有していることがより好ましい。インテグリンの断片が2量体を形成していることは、インテグリンの断片をSDS-PAGEに供し、バンドの数を検出すること等により確認できる。インテグリンの断片がラミニン結合活性を有していることは、ELISA法等により確認することができる。市販のインテグリンとしては、リコンビナントヒトインテグリン 6 1 (R&D Systems、米国ミネソタ州、製品番号7809-A6)、リコンビナントヒトインテグリン 3 1 (R&D Systems、米国ミネソタ州、製品番号2840-A3)が例示できる。

【0029】

インテグリンの断片としては、市販されているヒトインテグリン 6 1の断片である Human ITGA6 & ITGB1 (中国北京、Sino Biological、製品番号CT013-H2508H-20)が例示できる。

10

【0030】

抗ラミニン抗体検出工程は、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する工程である。抗インテグリン抗体検出工程は、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する工程である。各工程において「検出」とは、検体中に、ラミニン又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体が存在するか否かを確認することのほか、検体中における該抗体の含有量を測定すること、すなわち「定量」すること、も包含する概念である。

【0031】

抗ラミニン抗体検出工程及び抗インテグリン抗体検出工程は、検体中の前記抗体を定量的又は定性的に検出可能な方法であればよく、具体的な態様は特に限定されない。例えば、免疫学的手法を用いることができ、例えば、抗体酵素法(ELISA法)、免疫沈降法(IPP法)、免疫プロット法(IB法)、ラテックス凝集法、免疫クロマトグラフィー法、間接蛍光抗体法(IF法)、ラジオイムノアッセイ法(RIA法)などの手法を挙げることができる。多くの検体を処理し得るELISA法が特に好ましい。ELISA法では、具体的には、前記抗体の抗原である、上記で詳述したようなラミニン又はインテグリンを固相に固定し、該固相に固定した抗原に検体を接触させ、抗原と、検体中に含有される可能性のある前記抗体との免疫複合体を検出することで、前記抗体を検出することができる。ELISA法の実施に伴う非特異反応の抑制方法や、検出の際に使用し得る標識物質、測定機器などは、特に限定されない。抗原を固定するための固相としては、プレート、ビーズ、チューブなどの任意の形状の固相を用いることができる。

20

30

【0032】

抗ラミニン抗体検出工程におけるラミニンと免疫学的に反応する抗体の量、及び、抗インテグリン抗体検出工程におけるインテグリンと免疫学的に反応する抗体の量は、前記抗体と前記抗原との免疫複合体の標識の測定値として求めることができる。既知濃度の前記抗体を含む標準試料により検量線を作成し、検量線を用いて標識の測定値から前記抗体の量を算出することもできる。

【0033】

抗ラミニン抗体検出工程におけるラミニンと免疫学的に反応する抗体が存在するか否かの判定(陽性/陰性の判定)、及び、抗インテグリン抗体検出工程におけるインテグリンと免疫学的に反応する抗体が存在するか否かの判定(陽性/陰性の判定)は、それぞれ、被検動物個体(例えば、IgG4関連疾患の罹患が疑われるヒト)から得た検体中の前記抗体の測定値を、IgG4関連疾患を罹患していない動物個体(例えば健常者)から得た検体中の前記抗体の測定値と比較することによって行うことができる。ここで、IgG4関連疾患を罹患していない個体から得た検体中の前記抗体の測定値は、同時に測定して得た値であってもよいし、予め測定して得た値であってもよい。被検動物個体から得た検体中の前記抗体の測定値が、IgG4関連疾患を罹患していない動物個体から得た検体中の前記抗体の測定値よりも有意に大きい場合に、陽性と判断することができる。

40

【0034】

抗ラミニン抗体検出工程におけるラミニンと免疫学的に反応する抗体、及び、抗インテ

50

グリン抗体検出工程におけるインテグリンと免疫学的に反応する抗体のクラスは特に限定されないが、好ましくはI g G抗体である。I g G抗体のなかのサブクラスは特に限定されないが、例えばI g G 1抗体又はI g G 4抗体を検出することができる。本発明者らは、I g G 4関連疾患では、ラミニンと免疫学的に反応するI g G抗体、特にI g G 1抗体又はI g G 4抗体が病原物質であることを見出していることから、これらはI g G 4関連疾患の指標として特に有用である。

【0035】

検査するI g G 4関連疾患の種類と、ラミニンと免疫学的に反応する抗体の種類、又は、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の種類との組み合わせは特に限定されない。

【0036】

例えば、自己免疫性膵炎(AIP)の指標としては、ラミニン-511と免疫学的に反応する抗体(実験4参照)及びインテグリン 6 1と免疫学的に反応する抗体(実験9参照)が有用である。ラミニン-511と免疫学的に反応する抗体は、ラミニン-511の断片(特に、インテグリン結合活性を有する3量体断片)を抗原として用いた検出法により前記抗体を検出することが特に好ましい。インテグリン 6 1と免疫学的に反応する抗体は、インテグリン 6 1を抗原として用いた検出法により前記抗体を検出することが特に好ましい。

【0037】

一方、I g G 4関連腎疾患の指標としては、ラミニン-521と免疫学的に反応する抗体が有用である(実験6参照)。この場合、ラミニン-521を抗原として用いた検出法により前記抗体を検出することが特に好ましい。

【0038】

本発明のI g G 4関連疾患の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態により、検体中の、ラミニン、特にラミニン-511、特にラミニン-511-E8と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、I g G 4関連疾患、特に自己免疫性膵炎(AIP)に罹患していると判断することができる。ラミニン、特にラミニン-511、特にラミニン-511-E8と免疫学的に反応する抗体は、膵癌患者の検体からは検出されないことから、本発明のI g G 4関連疾患の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態は、AIPと膵癌とを判別する指標を得ることができ、特に有用である。

【0039】

また、本発明のI g G 4関連疾患の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態により、検体中の、ラミニン、特にラミニン-511、特にラミニン-511-E8と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、I g G 4関連疾患、特にAIPに、悪性腫瘍を合併するリスクが低いと判断することができる。

【0040】

本発明のI g G 4関連疾患の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態により、検体中の、インテグリン、特にインテグリン 6 1と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、I g G 4関連疾患、特にAIPに罹患していると判断することができる。

【0041】

膵癌を罹患する被験動物と、AIPを罹患する、抗インテグリン抗体陽性の被験動物とでは、膵画像が類似しており、膵画像所見のみによる区別は難しい。ところが、インテグリン、特にインテグリン 6 1と免疫学的に反応する抗体は、膵癌患者の検体からは検出されないことから、本発明のI g G 4関連疾患の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態は、AIPと膵癌とを判別する指標を得ることができるため特に有用である。

【0042】

また、本発明のI g G 4関連疾患の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実

10

20

30

40

50

施形態により、検体中に、インテグリン、特にインテグリン 6 1 と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、I g G 4 関連疾患、特に A I P に、悪性腫瘍を合併するリスクが高いと判断することができる。悪性腫瘍を合併するリスクが高いと判断された被験動物に対しては、全身における悪性腫瘍のスクリーニングを実施する必要性が高いと判断することが可能である。

【 0 0 4 3 】

本発明の I g G 4 関連疾患の検査方法は、抗ラミニン抗体検出工程と抗インテグリン抗体検出工程の少なくとも一方を含んでいればよいが、より好ましくは、抗ラミニン抗体検出工程と抗インテグリン抗体検出工程の両方を含む。抗ラミニン抗体陰性の検体であっても、抗インテグリン抗体陽性である場合があり、抗インテグリン抗体陰性の検体であっても、抗ラミニン抗体陽性である場合があるため、検体中において両方の抗体を検出することにより、I g G 4 関連疾患、特に A I P、に罹患している被験動物の検体の検出漏れの可能性を低減することができる。

10

< 3 . I g G 4 関連疾患の検査試薬 >

本発明は第二に、

ラミニンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、

インテグリンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、或いは、

ラミニン及びインテグリンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬

に関する。

【 0 0 4 4 】

ここで、I g G 4 関連疾患、ラミニン、及び、インテグリンについては、本発明の検査方法に関して既述の通りである。

20

【 0 0 4 5 】

本発明の検査試薬の、ラミニンを含む実施形態は、上記の本発明の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態に使用することができる。

【 0 0 4 6 】

本発明の検査試薬の、インテグリンを含む実施形態は、上記の本発明の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態に使用することができる。

【 0 0 4 7 】

本発明の検査試薬の 1 以上の実施形態は、免疫学的測定に必要な試薬類、例えば、緩衝液等を必要に応じて含んでよく、複数の成分からなるキットとして提供されてもよい。

30

【 0 0 4 8 】

本発明の検査試薬の、ラミニンを含む実施形態において、ラミニンの形態は特に限定されず、溶液状態であってもよいし、乾燥状態であってもよいし、固相に固定された形態であってもよい。ラミニンが乾燥状態である場合、使用前に溶液状態にするための緩衝液や溶媒を本発明の検査試薬に含めてもよい。

【 0 0 4 9 】

本発明の検査試薬の、インテグリンを含む実施形態において、インテグリンの形態は特に限定されず、溶液状態であってもよいし、乾燥状態であってもよいし、固相に固定された形態であってもよい。インテグリンが乾燥状態である場合、使用前に溶液状態にするための緩衝液や溶媒を本発明の検査試薬に含めてもよい。

40

【 0 0 5 0 】

固相に固定された形態のラミニンを含む本発明の検査試薬の実施形態は、E L I S A 法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットの形態とすることができる。固相に固定された形態のインテグリンを含む本発明の検査試薬の実施形態もまた、E L I S A 法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットの形態とすることができる。固相に固定された形態のラミニン及びインテグリンを含む本発明の検査試薬の実施形態もまた、E L I S A 法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットの形態とすることができる。各実施形態において、固相の形態としては、プレート、ビーズ、チューブなどの任意の形態であってもよい。E L I S A 法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットは、前記固相以

50

外に、ブロッキング液、洗浄液、検体希釈液、酵素標識した二次抗体、基質液等を含むことができる。

< 4 . I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法 >

本発明は第三に、

I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法であって、

I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び/又は、

I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法に関する。

10

【 0 0 5 1 】

上記の「I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法」は、「I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価するための指標を取得する方法」と表現してもよい。

【 0 0 5 2 】

本発明の検査方法に関して既述の通り、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体、及び、インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、I g G 4 関連疾患の指標として有用である。このため、I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の前記抗体は、治療が有効で治癒している場合は低下し、治療が十分に効果を発揮していない場合は治療開始前から変化しない又は上昇する。そこで、I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体、及び/又は、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出することで、治療の効果を評価することが可能となる。

20

【 0 0 5 3 】

被検動物としては、I g G 4 関連疾患の治療を受けたヒトや非ヒト動物が例示できる。

【 0 0 5 4 】

I g G 4 関連疾患の治療としては、ステロイド投与等の、I g G 4 関連疾患の治療が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

本発明の治療効果の評価方法における、検体、ラミニン、インテグリン、抗体、抗ラミニン抗体検出工程、抗インテグリン抗体検出工程などの具体的態様は、本発明の検査方法に関して説明したのと同様である。

30

【 0 0 5 6 】

本発明の治療効果の評価方法における抗ラミニン抗体検出工程及び/又は抗インテグリン抗体検出工程で得た、I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び/又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果を、例えば、前記治療を開始する前の同一動物個体から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び/又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果と比較して、前者が後者よりも小さい場合には、治療が有効であると評価することができる。一方、前者が後者と同程度或いは後者よりも大きい場合には、治療が有効でない又は十分でないとして評価することができる。この評価結果に基づいて、治療を更に継続する、治療方針を変更する、治療を中止するなどの判断が可能である。

40

【 0 0 5 7 】

また、本発明の治療効果の評価方法における抗ラミニン抗体検出工程及び/又は抗インテグリン抗体検出工程で得た、I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び/又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果を、例えば、同一動物種の健常個体から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び/又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果と比較して、前者が後者と同程度である又はより小さい場合には、治療が有効であると評価することができる。一方、前者が後者よりも大きい場合には、治療が有効でない又は十分でないとして評価することができる。この評価結果に基づいて、治療を更に継続する、治療方針を

50

変更する、治療を中止するなどの判断が可能である。

< 5 . I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法 1 >

本発明は第四に、

I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、  
試験物質を作用させた動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程と、

前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程とを含む方法に関する。

【 0 0 5 8 】

本発明の検査方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態に関して既述の通り、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体は、I g G 4 関連疾患の指標として有用である。このため、試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することが可能となる。

【 0 0 5 9 】

本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態における、検体、ラミニン、抗体、抗ラミニン抗体検出工程などの具体的態様は、本発明の検査方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態に関して説明したのと同様である。

【 0 0 6 0 】

本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態において、試験物質としては、新規医薬の候補となる可能性のある試験物質であり特に限定されない。試験物質を作用させる動物は、典型的には、I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物等の、健常個体と比較して、ラミニンと免疫学的に反応する抗体の検体中での量が大きい動物である。

【 0 0 6 1 】

本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗ラミニン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、前記試験物質を作用させる前の同一動物個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者よりも小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

【 0 0 6 2 】

また、本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗ラミニン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、同一動物種の健常個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者と同程度である又はより小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

< 6 . I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法 2 >

本発明は第五に、

I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、  
試験物質を作用させた動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程と、

前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程とを含む方法に関する。

【 0 0 6 3 】

本発明の検査方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態に関して既述の通り、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、I g G 4 関連疾患の指標として有

10

20

30

40

50

用である。このため、試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することが可能となる。

【0064】

本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態における、検体、インテグリン、抗体、抗インテグリン抗体検出工程などの具体的態様は、本発明の検査方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態に関して説明したのと同様である。

【0065】

本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態において、試験物質としては、新規医薬の候補となる可能性のある試験物質であり特に限定されない。試験物質を作用させる動物は、典型的には、I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物等の、健常個体と比較して、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の検体中での量が大きい動物である。

10

【0066】

本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗インテグリン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、前記試験物質を作用させる前の同一動物個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者よりも小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

20

【0067】

また、本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗インテグリン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、同一動物種の健常個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者と同程度である又はより小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

< 7 . I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法 1 >

本発明は第六に、

30

I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、

非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラミニン抗体投与工程、及び

非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラミニン免疫工程

のうち少なくとも一方を含む方法に関する。

【0068】

本発明の非ヒトモデル動物の作製方法の抗ラミニン抗体投与工程又はラミニン免疫工程を含む実施形態での、ラミニン、抗体等の具体的形態は、本発明の検査方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態におけるものと同様である。

【0069】

40

本明細書に記載の実験 1 及び実験 2 では、I g G 4 関連疾患患者から得た血清又は該血清から精製した抗体をマウスに投与したとき、マウスは I g G 4 関連疾患を発症することが確認されている。そして、実験 4 では、I g G 4 関連疾患患者から得た血清が、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を含むことが確認されている。このことから、非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラミニン抗体投与工程により、I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物の作製が可能であると言える。

【0070】

抗ラミニン抗体投与工程における非ヒト動物としては、例えば B A L B / c マウス、B 6 マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

【0071】

50

抗ラミニン抗体投与工程における、ラミニンと免疫学的に反応する抗体の投与経路は特に限定されないが、例えば、皮下投与、腹腔内投与、静脈投与等が例示できる。ラミニンと免疫学的に反応する抗体は、精製された抗体として非ヒト動物に投与される必要はなく、例えば、抗体を含む血清として非ヒト動物に投与されてもよい。

【0072】

抗ラミニン抗体投与工程において、ラミニンと免疫学的に反応する抗体は、投与を受ける非ヒト動物が有するラミニンと免疫学的に反応できるように選択する。例えば、ヒト由来抗ヒトラミニン抗体は、マウスが有するラミニンと免疫学的に反応することができ、マウスにおいてI g G 4 関連疾患の病変を惹起することができる。

【0073】

一方、本明細書に記載の実験5では、ヒトラミニン - 5 1 1 - E 8 フラグメントを抗原としマウスを免疫したとき、該抗原に対する抗体が形成され、該マウスはI g G 4 関連疾患を発症することが確認されている。このことから、非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラミニン免疫工程により、I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物の作製が可能であると言える。

【0074】

ラミニン免疫工程における非ヒト動物としては、例えばBALB/cマウス、B6マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

【0075】

ラミニン免疫工程における方法は特に限定されない。ラミニンを、完全フロイントアジュバント等の適当なアジュバントとともに、非ヒト動物に皮下投与、静脈内投与、或いは腹腔内投与等の経路で投与することで、非ヒト動物を免疫することができる。

【0076】

ラミニン免疫工程において、抗原として投与するラミニンは、それに対する抗体が、免疫される非ヒト動物が有するラミニンに自己免疫により免疫学的に反応できるように選択する。例えば、ヒトラミニン - 5 1 1 は、それに対するマウス抗体が、マウスが有するラミニンと自己免疫により免疫学的に反応することができ、マウスにおいてI g G 4 関連疾患の病変を惹起することができる。

< 8 . I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法 2 >

本発明は第七に、

I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、

非ヒト動物に、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗インテグリン抗体投与工程、及び

非ヒト動物を、インテグリンを抗原として免疫するインテグリン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法に関する。

【0077】

本発明の非ヒトモデル動物の作製方法の抗インテグリン抗体投与工程又はインテグリン免疫工程を含む実施形態での、インテグリン、抗体等の具体的形態は、本発明の検査方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態におけるものと同様である。

【0078】

抗インテグリン抗体投与工程における非ヒト動物としては、例えばBALB/cマウス、B6マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

【0079】

抗インテグリン抗体投与工程における、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の投与経路は特に限定されないが、例えば、皮下投与、腹腔内投与、静脈投与等が例示できる。インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、精製された抗体として非ヒト動物に投与される必要はなく、例えば、抗体を含む血清として非ヒト動物に投与されてもよい。

【0080】

抗インテグリン抗体投与工程において、インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、投与を受ける非ヒト動物が有するインテグリンと免疫学的に反応できるように選択する。例

10

20

30

40

50

えば、ヒト由来抗ヒトインテグリン抗体（特に、ヒト由来抗ヒトインテグリン 6 1 抗体）は、マウスが有するインテグリンと免疫学的に反応することができ、マウスにおいて I g G 4 関連疾患の病変を惹起することができる。

【0081】

インテグリン免疫工程における非ヒト動物としては、例えば B A L B / c マウス、B 6 マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

【0082】

インテグリン免疫工程における方法は特に限定されない。インテグリンを、完全フロイントアジュバント等の適当なアジュバントとともに、非ヒト動物に皮下投与、静脈内投与、或いは腹腔内投与等の経路で投与することで、非ヒト動物を免疫することができる。

10

【0083】

インテグリン免疫工程において、抗原として投与するインテグリンは、それに対する抗体が、免疫される非ヒト動物が有するインテグリンに自己免疫により免疫学的に反応できるように選択する。例えば、ヒトインテグリン（特にヒトインテグリン 6 1）は、それに対するマウス抗体が、マウスが有するインテグリンと自己免疫により免疫学的に反応することができ、マウスにおいて I g G 4 関連疾患の病変を惹起することができる。

【実施例】

【0084】

< 1 . 実験 1 : I g G 4 関連疾患患者の I g G のマウスへの投与 >

実験 1 では、I g G 4 関連疾患患者の血清から精製した I g G を健常マウス新生仔に投与し、投与後の脾臓への影響を観察した。その結果、I g G 4 関連疾患患者の血清から精製した I g G は、脾臓に対して病原性を示すことが明らかとなった。

20

1 . 1 . 血清

I g G 4 関連疾患と診断された 10 名の患者から血清試料を取得した。

【0085】

対照血清試料として、5 名の健常者からの血清試料と、5 名の疾患患者（3 名の膵癌患者、2 名の原発性硬化性胆管炎患者）からの血清試料を取得した。対照血清試料は、I g G 4 関連疾患患者血清試料と、年齢（± 5 歳）、性別を揃えた。

1 . 2 . ヒト I g G の調製

上記の血清試料から、A b - R a p i d P u R e E x ( P - 0 1 5 , P o r t e N o v a 製 ) を用い、製品の指示書に沿った手順により、ヒト I g G を調製した。I g G は p H 7 . 2 のリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) により透析し、A m i c o n U l t r a ( U F C 8 0 5 0 2 4 , M i l l i p o r e 製 ) を用いた限外濾過により濃縮し、使用時まで - 2 0 で保存した。精製された I g G の濃度は、H u m a n I g G E I A K i t ( M K 1 3 6 , T a k a r a 製 ) を用いて測定した。I g G 画分の純度を、H u m a n I g A E L I S A K i t ( E 8 8 - 1 0 2 , B e t h y l L a b o r a t o r i e s 製 )、H u m a n I g M E L I S A K i t ( E 8 8 - 1 0 0 , B e t h y l L a b o r a t o r i e s 製 )、H u m a n I g E E L I S A K i t ( E 8 8 - 1 0 8 , B e t h y l L a b o r a t o r i e s 製 )、及び、クーマシブリアントブルー染色をそれぞれ用いて I g A、I g M、I g E 及びタンパク質の混入を求め、確認した。

30

40

【0086】

I g G 4 関連疾患患者の血清試料から得られた I g G を「患者 I g G」とした。対照血清試料から得られた I g G を「対照 I g G」とした。

1 . 3 . 動物試験

マウスとして B A L B / c マウスの雄の新生仔を用いた。

【0087】

各血清試料から調製された I g G をマウスに皮下投与した。10 ~ 20 m g のヒト I g G をマウス体重 1 g に対して投与した。

1 . 4 . 結果と考察 1 ( 図 1 A ~ 図 1 C )

50

患者 I g G 又は対照 I g G の皮下投与から 12 時間後に、マウスの脾臓の組織切片を採取し、H & E (ヘマトキシリン & エオシン) 染色及び免疫組織化学的染色により染色し、観察した。免疫組織化学的染色では、骨髄細胞分化抗原 G r 1 に対する抗体を一次抗体として用い、G r 1 陽性細胞を染色した。

【 0 0 8 8 】

また、皮下投与から 12 時間後に、マウスの血清中のヒト I g G 濃度を測定した。

【 0 0 8 9 】

結果を図 1 A ~ 図 1 C に示す。

【 0 0 9 0 】

図 1 A は、対照 I g G 投与マウス (左列) と、患者 I g G 投与マウス (右列) の、I g G 投与から 12 時間後の脾臓の H & E 染色 (上段) と、G r 1 の染色 (下段) の結果を示す。観察像中のスケールバーは上段では 50  $\mu$ m、下段では 20  $\mu$ m を示す。

【 0 0 9 1 】

図 1 B は、対照 I g G (三角) 及び患者 I g G (丸) の投与量と、浮腫面積との相関関係を示す。図中のカットオフ値 (21.1%) は、対照 I g G 又は P B S 投与マウスでの浮腫面積の平均値に、標準偏差 (S D) の 2 倍の値を加えた値である。

【 0 0 9 2 】

図 1 C は、対照 I g G 投与マウス (左) と、患者 I g G 投与マウス (右) の、I g G 投与から 12 時間後の脾臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、G r 1 陽性細胞数を示す (\* p < 0.05、\*\* p < 0.005 : paired Student's test による)。

【 0 0 9 3 】

図 1 B に示す通り、患者 I g G 投与マウスと、対照 I g G 投与マウスとで、血清中のヒト I g G 濃度に有意な差はなかった (19.4 mg/ml と 21.4 mg/ml)。一方で、患者 I g G のマウスへの投与により脾臓が損傷し、図 1 A に示す通り、投与後 12 時間で損傷が最大となった。対照 I g G のマウスへの投与では、図 1 A に示す通り、投与後 12 時間で脾臓の損傷は生じなかった。

【 0 0 9 4 】

組織学的観察では、腺房壊死、出血及び G r 1 陽性多形核白血球の浸潤が、患者 I g G を投与したマウスの脾臓で観察された (図 1 A)。

【 0 0 9 5 】

浮腫の面積を定量したところ、患者 I g G 投与マウスでは浮腫形成が認められたが、対照 I g G 投与マウスでは浮腫形成は認められなかった (図 1 B)。

【 0 0 9 6 】

脾臓における壊死、出血、及び G r 1 陽性細胞の浸潤は、患者 I g G 投与マウスにおいて、対照 I g G 投与マウスよりも有意に大きかった (図 1 C)。

1.5. 結果と考察 2 (図 2 A 及び図 2 B)

図 2 A 及び B に結果を示す試験は、患者 I g G の病原性が、脾臓組織への直接的な結合により生じるのか否かを確認する試験である。

【 0 0 9 7 】

患者 I g G 又は対照 I g G の皮下投与から 12 時間後に、マウスの脾臓の組織切片を採取し、免疫組織化学的染色により染色し、観察した。免疫組織化学的染色では、抗ヒト I g G 抗体、抗ヒト I g G 1 抗体又は抗ヒト I g G 4 抗体を一次抗体として用い、常法により、ヒト I g G、ヒト I g G 1 又はヒト I g G 4 を染色した。

【 0 0 9 8 】

また、前記の、マウスの脾臓の組織切片を免疫蛍光染色により染色し、蛍光顕微鏡により観察した。免疫蛍光染色では、フルオロセインイソシアネートがコンジュゲートされたウサギ抗ヒト I g G 抗体、ウサギ抗アミラーゼ抗体又はウサギ抗コラーゲン I V 抗体を抗体として、常法により、ヒト I g G、アミラーゼ又はコラーゲン I V を染色した。

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

50

図 2 A は、対照 I g G 投与マウス（左列）と、患者 I g G 投与マウス（右列）の、I g G 投与から 1 2 時間後の脾臓での I g G（上段）、I g G 1（中段）、I g G 4（下段）の免疫組織化学的染色の結果を示す。観察像中のスケールバーは 2 0 μ m を示す。

【 0 1 0 0 】

図 2 B は、対照 I g G 投与マウスと患者 I g G 投与マウスの、脾臓組織の免疫蛍光染色の結果を示す。観察像中のスケールバーは 2 0 μ m を示す。

【 0 1 0 1 】

図 2 B の上段の左端は、対照 I g G 投与マウスの脾臓組織での、免疫蛍光染色されたヒト I g G の観察像を示す。ヒト I g G はマウスの脾臓では観察されなかった。

【 0 1 0 2 】

図 2 B の上段の左から 2 つ目は、患者 I g G 投与マウスの脾臓組織での、免疫蛍光染色されたヒト I g G の観察像を示す。図 2 B の上段の左から 3 つ目は、患者 I g G 投与マウスの脾臓組織での、図 2 B の上段の左から 2 つ目と同じ観察領域における、免疫蛍光染色されたアミラーゼの観察像を示す。図 2 B の上段の右端は、上記のヒト I g G の観察像と、上記のアミラーゼの観察像とを重ね合わせた像である。

【 0 1 0 3 】

図 2 B の下段の左から 1 つ目は、患者 I g G 投与マウスの脾臓組織での、免疫蛍光染色されたヒト I g G の観察像を示す。図 2 B の下段の左から 2 つ目は、患者 I g G 投与マウスの脾臓組織での、図 2 B の下段の左から 1 つ目と同じ観察領域における、免疫蛍光染色されたコラーゲン I V の観察像を示す。図 2 B の下段の右端は、上記のヒト I g G の観察像と、上記のコラーゲン I V の観察像とを重ね合わせた像である。

【 0 1 0 4 】

図 2 A に示すように、患者 I g G 投与マウスの全てにおいて、脾臓の腺房の基部及び脾臓組織の小葉間隙において I g G 及び I g G 4 が蓄積していることが観察されたが、対照 I g G 投与マウスの脾臓では I g G 及び I g G 4 は観察されなかった。また、患者 I g G 投与マウスでは 1 0 匹中 6 匹において I g G 1 が観察されたが、対照 I g G 投与マウスでは I g G 1 は観察されなかった。

【 0 1 0 5 】

図 2 B の上段に示す通り、患者 I g G 投与マウスにおいて、ヒト I g G と、脾臓の腺房で発現するアミラーゼとは共存していないことが確認された。また、図 2 B の下段に示す通り、患者 I g G 投与マウスにおいて、ヒト I g G の大部分と、基底膜又は細胞外マトリクスで発現するコラーゲン I V と共存することが確認された。

【 0 1 0 6 】

以上の結果から、患者 I g G の抗原は、基底膜又は細胞外マトリクスに含まれる成分であると推定される。

< 2 . 実験 2 : I g G 4 関連疾患の I g G 1、I g G 4 のマウスへの投与 >

実験 2 では、I g G 4 関連疾患患者の血清から I g G のサブクラス I g G 1 と I g G 4 を精製し、健常マウス新生仔に投与し、投与後の脾臓への影響を観察した。その結果、I g G 4 関連疾患患者の血清から精製した I g G 1 と I g G 4 はどちらも脾臓に対して病原性を示すこと、I g G 1 の病原性は I g G 4 の病原性よりも大きいこと、I g G 1 と I g G 4 を併用して投与すると I g G 1 の病原性は抑制されることが確認された。

2 . 1 . ヒト I g G の調製

上記 1 . 1 . 得た I g G 4 関連疾患の患者の血清試料及び対照血清試料から、I g G 1 及び I g G 4 を精製した。I g G 1 及び I g G 4 の精製は、それぞれ、Capture Select I g G 1 ( H u ) a f f i n i t y m a t r i x e s ( 1 9 1 3 0 3 0 0 5 , I n v i t r o g e n 製 )、及び、Capture Select I g G 4 ( H u ) a f f i n i t y m a t r i x e s ( 2 9 0 0 0 5 , I n v i t r o g e n 製 ) を用い、製品の指示書に沿った手順により行った。手順の概要は、ヒト血清試料を前記製品のカラムに負荷し、P B S で洗浄した。目的とするサブクラス ( I g G 1 又は I g G 4 ) の画分を 0 . 1 M グリシン ( p H 2 . 8 ) により溶出させ、1 . 5 M T r i s ( p H 7

10

20

30

40

50

． 5 ) により中和した。溶出したサブクラス ( I g G 1 又は I g G 4 ) の画分を、 P B S ( p H 7 . 2 ) により十分に洗浄しながら、 A m i c o n U l t r a ( U F C 8 0 5 0 2 4 , M i l l i p o r e 製 ) を用いた限外濾過により濃縮した。精製された I g G サブクラスの濃度を、 H u m a n I g G 1 P l a t i n u m E L I S A ( B M S 2 0 9 2 , e B i o s c i e n c e 製 ) 、 H u m a n I g G 2 P l a t i n u m E L I S A ( B M S 2 0 9 3 , e B i o s c i e n c e 製 ) 、 H u m a n I g G 3 P l a t i n u m E L I S A ( B M S 2 0 9 4 , e B i o s c i e n c e 製 ) 、 H u m a n I g G 4 P l a t i n u m E L I S A ( B M S 2 0 9 5 , e B i o s c i e n c e 製 ) を製品の指示書に従って用い、定量した。サブクラスの純度を、上記と同様の手順により I g A 、 I g M 、 I g E 、 他 の I g G サブクラス及びタンパク質の混入を求め、確認した。

10

#### 【 0 1 0 7 】

I g G 4 関連疾患の患者の血清試料から得られた I g G 1 、 I g G 4 をそれぞれ「患者 I g G 1 」、「患者 I g G 4 」とした。対照血清試料から得られた I g G 1 、 I g G 4 をそれぞれ「対照 I g G 1 」、「対照 I g G 4 」とした。

#### 2 . 2 . 動物試験

マウスとして B A L B / c マウスの雄の新生仔を用いた。

#### 【 0 1 0 8 】

各血清試料から調製された I g G 1 及び I g G 4 の一方又は両方、をマウスに皮下投与した。マウスへの投与量は、 I g G 1 のみを投与する場合は I g G 1 を 1 0 m g / マウス体重 1 g の量で投与し、 I g G 4 のみを投与する場合は I g G 4 を 1 m g / マウス体重 1 g の量で投与し、 I g G 1 と I g G 4 とを投与する場合は I g G 1 を 1 0 m g / マウス体重 1 g で投与し I g G 4 は 1 m g / マウス体重 1 g の量で投与した。

20

#### 2 . 3 . 結果と考察 ( 図 3 A ~ 図 3 C )

患者 I g G 1 及び患者 I g G 4 の一方又は両方、或いは、対照 I g G 1 及び対照 I g G 4 の一方又は両方の皮下投与から 1 2 時間後に、マウスの脾臓の組織切片を採取し、 H & E ( ヘマトキシリン & エオシン ) 染色及び免疫組織化学的染色により染色し、観察した。免疫組織化学的染色では、骨髄細胞分化抗原 G r 1 に対する抗体を一次抗体として用い、 G r 1 陽性細胞を染色した。免疫組織化学的染色ではまた、ヒト I g G 1 又はヒト I g G 4 に対する抗体を一次抗体として用い、マウス脾臓組織中のヒト I g G 1 又はヒト I g G 4 を染色した。

30

#### 【 0 1 0 9 】

結果を図 3 A ~ 図 3 C に示す。

#### 【 0 1 1 0 】

図 3 A の上段の「対照 1 」は、 1 0 名の対照のうち特定の 1 名 ( 対照 1 ) から得た対照 I g G 1 及び対照 I g G 4 の一方又は両方を投与したマウスの投与 1 2 時間後の脾臓の H & E 染色の観察像である。観察像中のスケールバーは 2 0 μ m を示す。

#### 【 0 1 1 1 】

図 3 A の中段及び下段の「患者 9 」は、 1 0 名の I g G 4 関連疾患患者のうち特定の 1 名 ( 患者 9 ) から得た患者 I g G 1 及び患者 I g G 4 の一方又は両方を投与したマウスの投与 1 2 時間後の脾臓の、 H & E 染色の観察像 ( 中段 ) 、及び、 G r 1 の免疫組織化学的染色の観察像 ( 下段 ) である。観察像中のスケールバーは 2 0 μ m を示す。

40

#### 【 0 1 1 2 】

図 3 B は、対照 I g G 1 及び対照 I g G 4 の一方又は両方を投与したマウス ( 左 ) と、患者 I g G 1 及び患者 I g G 4 の一方又は両方を投与したマウス ( 右 ) の、投与から 1 2 時間後の脾臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、 G r 1 陽性細胞数を示す ( \* p < 0 . 0 5 : p a i r e d S t u d e n t ' s t e s t による ) 。この結果、患者 I g G 1 及び患者 I g G 4 はどちらも脾臓に対して病原性を示すこと、患者 I g G 1 の病原性は患者 I g G 4 の病原性よりも大きいこと、患者 I g G 1 と患者 I g G 4 を併用して投与すると患者 I g G 1 の病原性は抑制されることが確認された。

50

## 【0113】

図3Cは、10名のIgG4関連疾患患者のうち特定の1名(患者1)から得た患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の脾臓の、ヒトIgG1又はヒトIgG4の免疫組織化学的染色の観察像である。観察像中のスケールバーは20µmを示す。患者IgG1及び患者IgG4の両方を投与したマウスでの脾臓のヒトIgG1染色強度(図3C上右)は、患者IgG1のみを投与したマウスでの脾臓のヒトIgG1染色強度(図3C上左)よりも小さいことが確認された。一方、患者IgG1及び患者IgG4の両方を投与したマウスでの脾臓のヒトIgG4染色強度(図3C下右)は、患者IgG4のみを投与したマウスでの脾臓のヒトIgG4染色強度(図3C上中)と同程度であった。

10

## 【0114】

図3A及び図3Bからわかるように、患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスでは、脾臓において、浮腫形成、腺房壊死、出血及びGr1陽性多形核白血球の浸潤が観察されたのに対して、対照IgG1及び対照IgG4の一方又は両方を投与したマウスでは脾臓に異常は見られなかった。

## 【0115】

IgG1及びIgG4はともに病原性を有し、IgG1はIgG4よりも顕著な病原性を有する。しかし、IgG1の病原性は、IgG4を同時に投与すると顕著に抑制されたことから、IgG4はIgG1の働きを阻害することが示唆される(図3B)。実際に、IgG1のみを投与したマウスでのIgG1の染色量は、IgG1とIgG4とを併用して投与した場合よりも顕著に多い(図3C)。一方、IgG4のみを投与したマウスでのIgG4の染色量は、IgG1とIgG4とを併用して投与した場合と同程度であった(図3C)。このことから、IgG1とIgG4とは脾臓組織へ競合的に結合すること、及び、IgG4の脾臓組織への結合親和性は、IgG1よりも高いことが分かる。

20

## &lt;3. 実験3: AIP患者の脾臓の観察&gt;

上記の実験1及び2から、IgG4関連疾患の患者のIgG1及びIgG4が、脾臓組織に結合して病原性を示すことが判明した。そこで実験3では、自己免疫性脾炎(AIP)患者の脾臓において、IgG4が蓄積しているかどうかを観察した。観察では、H&E染色によりヒト脾臓組織を染色し、病変がある部分と、病変のない部分を判別した、また、免疫組織化学的染色及び免疫蛍光染色によりヒト脾臓組織中のIgG4、コラーゲンIV、アミラーゼを可視化した。免疫組織化学的染色及び免疫蛍光染色の手順は実験2と同様である。

30

## 【0116】

図4A上段左は、AIP病変のある部位(左側)と、病変のない部位(右側)との境界部分から採取した、AIP患者の脾臓組織切片をH&E染色した観察像を示す。図4A上段右は、同様の脾臓組織切片の、IgG4に対する免疫組織化学的染色の観察像を示す。スケールバーは200µmを示す。

## 【0117】

図4A下段左は、図4A上段右の観察像のうち、病変のある腺房の部分を拡大した観察像である。図4A下段中は、図4A上段右の観察像のうち、病変のある小葉間隙の部分を拡大した観察像である。図4A下段右は、図4A上段右の観察像のうち、病変のない正常な腺房の部分を拡大した観察像である。図4A下段の各観察像においてスケールバーは20µmを示す。病変のある脾臓組織では、IgG4陽性形質細胞が染色されていることに加えて、腺房の基部及び小葉間隙において、IgG4が線状に染色された。一方、病変のない脾臓組織では、このような染色は見られなかった。

40

## 【0118】

図4Bの各像は、AIP患者の脾臓での病変のある腺房を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4Bの各像ではスケールバーは20µmを示す。

## 【0119】

図4B上段左は、AIP患者の脾臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたIgG

50

4の観察像を示す。図4B上段中は、図4B上段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたアミラーゼの観察像を示す。図4B上段右は、図4B上段左のIgG4の観察像と、図4B上段中のアミラーゼの観察像とを重ね合わせた像である。この結果から、IgG4はアミラーゼとは共存せず異なる部位に存在することが分かる。

【0120】

図4B下段左は、AIP患者の膵臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたIgG4の観察像を示す。図4B下段中は、図4B下段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンIVの観察像を示す。図4B下段右は、図4B下段左のIgG4の観察像と、図4B下段中のコラーゲンIVの観察像とを重ね合わせた像である。図4B下段右では、赤色のIgG4と、緑色のコラーゲンIVとが重複した部分が、黄色で示される。この結果から、IgG4はコラーゲンIVと共に腺房の基部に存在することが分かる。

10

【0121】

図4Cの各像は、AIP患者の膵臓での病変のある小葉間隙を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4Cの各像ではスケールバーは20μmを示す。

【0122】

図4C左は、AIP患者の膵臓での病変のある小葉間隙の、免疫蛍光染色されたIgG4の観察像を示す。図4C中は、図4C左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンIVの観察像を示す。図4C右は、図4C左のIgG4の観察像と、図4C中のコラーゲンIVの観察像とを重ね合わせた像である。図4C右では、赤色のIgG4と、緑色のコラーゲンIVとが重複した部分が、黄色で示される。この結果から、IgG4は、コラーゲンIVを発現する細胞外マトリクスに存在することが分かる。

20

【0123】

データは示さないが、観察した全てのAIP患者からの膵臓組織が同様の傾向を示した。

【0124】

一方、データは示さないが、健常者の膵臓及び慢性膵炎患者の膵臓ではIgG4は染色されなかった。

< 4. 実験4：AIP患者が有する抗体の、抗原の特定 >

上記実験1～3から、AIP患者では、膵臓組織での細胞外マトリクスに特異的に結合するIgG1及びIgG4が増加し、それが膵臓の病変を誘導していることが推定された。

30

【0125】

そこで本発明者らは、AIP患者の血清に含まれる抗体は、膵臓で発現している細胞外マトリクスタンパク質を抗原として認識していると推測した。本発明者らは、抗原を特定するために、文献から既知の、膵臓で発現している細胞外マトリクスタンパク質を、抗原候補として、個別に固相に固定し、AIP患者の血清中に、前記細胞外マトリクスタンパク質に結合する抗体が含まれるか否かを、ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法により確認した。ELISA法では、AIP患者の血清中に含まれ得る、固相に固定された抗原候補と結合するヒトIgGを一次抗体とし、HRP(セイヨウワサビペルオキシダーゼ)により標識されたウサギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体を二次抗体とした。

40

4.1. 抗原の候補

抗原候補として、膵臓で発現している細胞外マトリクスタンパク質として既知の以下のタンパク質を試験した。

【0126】

ヒトラニン-511-E8(892012, 株式会社ニッピ製)(ラニン-511活性断片)

ヒトコラーゲンIV(ab7536, abcam)

ヒトフィブロネクチン

GFP(緑色蛍光タンパク質)(MB-0752, VECTOR LABORATOR

50

I E S )

ヒトNotch1 ( a b 6 8 5 8 0 , a b c a m )

ヒトAnnexin A2 ( a b 9 3 0 0 5 , a b c a m )

ヒトSDF2L1 ( T P 3 1 3 1 0 2 , O r i G e n e T e c h n o l o g i e s )

ヒトBile salt - activated lipase ( a b 1 6 7 9 6 3 , a b c a m )

#### 4 . 2 . 血清試料

A I P と診断された 9 名の患者から血清試料を取得した。

【 0 1 2 7 】

対照血清試料として、5名の健常者からの血清試料と、5名の疾患患者（3名の膵癌患者、2名の原発性硬化性胆管炎患者）からの血清試料を取得した。

10

#### 4 . 3 . 手順

以下の試験では、特に明示しない場合は、E L I S A S t a r t e r A c c e s s o r y K i t ( E 1 0 1 , B e t h y l L a b o r a t o r i e s ) を用いた。

【 0 1 2 8 】

E L I S A 用コーティングバッファー ( E L I S A C o a t i n g B u f f e r ) 、E L I S A 用洗浄溶液 ( E L I S A W a s h S o l u t i o n ) 、E L I S A 用ブロッキングバッファー ( E L I S A B l o c k i n g B u f f e r ) 、コンジュゲート希釈剤 ( C o n j u g a t e D i l u e n t ) は全て前記キットの指示書に従い調製した。

20

【 0 1 2 9 】

全ての工程は室温で行った。

##### 4 . 3 . 1 . 抗原候補によるコーティング

( 1 ) 上記の抗原候補の1つを前記キットのE L I S A 用コーティングバッファーに希釈して  $2 \mu\text{g} / \text{ml}$  濃度溶液とした。この溶液を、前記キットのマイクロウェルプレートに、1つのウェルあたり  $100 \mu\text{l}$  となるように加えた。

【 0 1 3 0 】

( 2 ) 上記のマイクロウェルプレートを60分間インキュベートした。

【 0 1 3 1 】

( 3 ) インキュベート後に各ウェルから溶液を吸引除去した。

30

【 0 1 3 2 】

( 4 ) 各ウェルを前記キットのE L I S A 用洗浄溶液により洗浄した。具体的には、各ウェルに前記E L I S A 用洗浄溶液を満たし、次いで、前記E L I S A 用洗浄溶液を吸引除去する洗浄操作を3回行った。

##### 4 . 3 . 2 . ブロッキング

( 1 ) 前記キットのE L I S A 用ブロッキングバッファー  $200 \mu\text{l}$  を各ウェルに添加した。

【 0 1 3 3 】

( 2 ) 30分間インキュベートした。

【 0 1 3 4 】

( 3 ) インキュベート後、前記E L I S A 用ブロッキングバッファーを除去した後、各ウェルを3回洗浄した。

40

##### 4 . 3 . 3 . 一次抗体

( 1 ) 前記A I P 患者血清試料 (  $n = 9$  ) 又は前記対照血清試料 (  $n = 10$  ) を、前記キットのコンジュゲート希釈剤 ( C o n j u g a t e D i l u e n t ) により1 : 50の割合で希釈した。

【 0 1 3 5 】

( 2 ) 前記希釈により得られた血清 ( 一次抗体 ) 希釈液を、ブロッキング後のマイクロウェルプレートの各ウェルに  $100 \mu\text{l}$  加えた。

【 0 1 3 6 】

50

(3) 60分間インキュベートした。

【0137】

(4) インキュベート後、前記血清希釈液を除去し、各ウェルを3回洗浄した。

#### 4.3.4. HRPコンジュゲート二次抗体

(1) HRP (セイヨウワサビペルオキシダーゼ) とコンジュゲートされた二次抗体 (abc am 6759, ウサギ抗ヒトIgG H & L (HRP), ポリクロナル) を、前記キットのコンジュゲート希釈剤 (Conjugate Diluent) により1:2000の割合で希釈した。

【0138】

(2) 前記希釈により得られた二次抗体希釈液を、血清 (一次抗体) を接触させたマイクロウェルプレートの各ウェルに100 $\mu$ l加えた。

10

【0139】

(3) 60分間インキュベートした。

【0140】

(4) インキュベート後、前記二次抗体希釈液を除去し、各ウェルを5回洗浄した。

#### 4.3.5. 酵素基質反応

(1) 製造元の推奨条件に従ってTMB (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン) 溶液を調製した。

【0141】

(2) 前記TMB溶液を、二次抗体を接触させたマイクロウェルプレートの各ウェルに100 $\mu$ l加えた。

20

【0142】

(3) 5分間~30分間インキュベートし、HRPによるTMBの酸化反応を行った。

【0143】

(4) 前記酸化反応後に、0.18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 $\mu$ lを、各ウェルに加えた。

【0144】

(5) マイクロプレートリーダーを用い、450nmの波長にて、前記酸化反応の生成物による呈色を測定した。

#### 4.4. 結果と考察

結果を図5A (抗ヒトラミン - 511活性断片抗体)、図5B (抗ヒトコラーゲンIV抗体)、図5C (抗ヒトフィブネクチン抗体)、図5D (抗GF P抗体) に示す。ヒトラミン - 511活性断片を抗原とした試験では、試験するAIP患者血清試料及び対照血清試料の母数を更に増やし、図5Aに示すように、AIP患者血清試料ではn = 40、対照血清試料ではn = 40とした。同様に、ヒトコラーゲンIVを抗原とした試験では、試験するAIP患者血清試料及び対照血清試料の母数を更に増やし、図5Bに示すように、AIP患者血清試料ではn = 40、対照血清試料ではn = 40とした。

30

【0145】

図5A~図5Dにおいて縦軸は、各抗原候補に対する抗体の血清中濃度に比例する450nmでの吸光度の相対値を示す。カットオフ値は、前記対照血清試料の、各抗原候補に対する抗体の血清中濃度の平均値に、標準偏差 (SD) の2倍の値を加えた値である。抗原候補に対する抗体の血清中濃度が、前記カットオフ値よりも高い場合に、抗原候補に対する抗体に関し陽性であると判断することができる。

40

【0146】

図5Aに示すように、抗ヒトラミン - 511抗体に関して、AIP患者血清では40例中20例で陽性であったのに対し、対照血清では40例中に陽性例はなかった。このことから、抗ヒトラミン - 511抗体の血清中濃度を指標として、AIPに罹患していることを検出できることが裏付けられた。また、抗ヒトラミン - 511抗体が陽性のAIP患者血清のうち1例では、血中IgG濃度及び血中IgG4濃度については、対照血清と実質的な差が無く正常値であったことから、抗ヒトラミン - 511抗体の血清中濃度を指標としてAIPを判別する方法は、血中IgG濃度及び血中IgG4濃度を指標とす

50

る方法よりも高感度でAIPを判別することができる可能性がある。

【0147】

一方、図5B、5C及び5Dに示す結果から、抗ヒトコラーゲンIV抗体、抗ヒトフィブロネクチン抗体、及び、抗GFP抗体に関しては、AIP患者血清と対照血清とで血清中濃度に差異は認められず、AIPの判別指標として有用でないことが判明した。

【0148】

図示しないが、抗ヒトNotch1抗体、抗ヒトAnnexin A2抗体、抗ヒトSDFL1抗体、抗ヒトBile salt-activated lipase抗体に関しても、AIP患者血清と対照血清とで血清中濃度に明確な差異は認められなかった。

< 5. 実験5：ラミニン-511によるマウスの免疫 >

上記の実験4の結果は、ヒトラミニン-511に対する抗体がAIPの原因物質であると推定される。そこでこの推定を裏付けるべく、実験5では、ヒトラミニン-511によりマウスを免疫し、マウスの膵臓での病変の有無を確認した。

5. 1. 手順

8週齢の雄マウス(B6マウス、及び、BALB/cマウス)を麻酔した。PBSと完全フロイントアジュバント(CFA)(263810, Difco製)との等量混合液100µl中で乳化させた、120µgのラミニン-511-E8(ヒトラミニン-511活性断片)(892012, 株式会社ニッピ製)で、実験を開始した日(第0日)に、麻酔された前記マウスの両方の後足蹠に皮下投与により投与して免疫し、第28日及び第56日に、第0日の免疫に用いたのと同じ量の、CFA中のラミニン-511-E8によりブーストを行った。

【0149】

対照群では、同じ体積の、CFAにより乳化させた120µgのオボアルブミン(OVA)を、ラミニン-511-E8の前記乳化液に代えて用いる以外は同様の手順及びスケジュールでマウスを処理した。

【0150】

3回目の免疫から28日後に試験を終了した。試料血清は、最初の投与の前にマウスから採取した血液の血清(免疫前血清)と、屠殺後に採取した血液の血清である。試料血清は分析まで-80℃に保存した。また、3回目の免疫から28日後にマウスの膵臓の組織切片を採取し、H&E染色により染色し観察した。

【0151】

上記の操作を、ヒトラミニン-511活性断片を投与した試験群、及び、対照群のそれぞれについてn=3となるよう実施した。

5. 2. 結果と考察

H&E染色により染色した膵臓の組織切片の観察像を図6に示す。図6左が対照群の観察像、図6右がヒトラミニン-511活性断片(i511ラミニン)により免疫した試験群の観察像である。ヒトラミニン-511活性断片により免疫した試験群のマウスでは膵臓に細胞浸潤の病変が形成されたのに対して、対照群のマウスでは膵臓に異常は見られなかった。ヒトラミニン-511活性断片により免疫した試験群のマウスでも、膵臓以外の部位には異常は見られなかった。図6に示す観察像を得たマウス個体以外のマウス個体においても、同様の傾向であった。

< 6. 実験6：IgG4関連腎疾患の患者が有する抗ラミニン抗体の分析 >

実験4に記載のAIP患者からの血清試料又は対照血清試料を用い、抗原候補としてヒトラミニン-521を用いて、実験4に記載の手順により抗ヒトラミニン-521抗体の血清中濃度を求めた。

【0152】

ヒトラミニン-521としてHuman recombinant laminin 521(BLA-LN521-02, Bio Lamina)を用いた。

【0153】

結果を図7に示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 4 】

9例のAIP患者のうち、IgG4関連腎疾患を持つのは1例のみであった。この1例のIgG4関連腎疾患を持つAIP患者からの血清試料のみが、抗ヒトラミニン-521抗体を有意に高濃度で含んでいた。

## 【 0 1 5 5 】

この結果から、IgG4関連腎疾患に関しては、抗ヒトラミニン-521抗体の血清中濃度が判別の指標として有効である可能性が示唆された。

## &lt; 7 . 実験 7 : IgG4 関連腎疾患患者 IgG のマウスへの投与 &gt;

実験6において抗ヒトラミニン-521抗体陽性であることが確認されたIgG4関連腎疾患患者の血清から、実験1と同様の手順でIgGを調製した。このIgGを「IgG4関連腎疾患患者IgG」とした。

10

## 【 0 1 5 6 】

一方、実験1で調製した対照IgGを用意した。

## 【 0 1 5 7 】

また、腎疾患を有していないIgG4関連疾患患者の血清から、実験1と同様の手順でIgGを調製した。このIgGを「腎疾患のないIgG4関連疾患患者IgG」とした。

## 【 0 1 5 8 】

上記のIgG4関連腎疾患患者IgG、対照IgG、及び、腎疾患のないIgG4関連疾患患者IgGを、それぞれ、実験1と同様の手順でBALB/cマウスの雄の新生仔に皮下投与した。

20

## 【 0 1 5 9 】

投与から12時間後に、実験1と同様の手順で、マウスの腎臓を採取し免疫組織化学的染色によりヒトIgG4を染色し観察した。

## 【 0 1 6 0 】

結果を図8に示す。

## 【 0 1 6 1 】

図8左側にIgG4関連腎疾患患者IgGを皮下投与したマウスの腎臓の観察像を示し、図8右側に対照IgGを皮下投与したマウスの腎臓のヒトIgG4染色観察像を示す。上段は、腎臓全体のヒトIgG4染色観察像を示し、下段は糸状体のヒトIgG4染色観察像を示す。図示しないが、腎疾患のないIgG4関連疾患患者IgGを皮下投与した場合の腎臓の観察像は、対照IgGと同様であった。

30

## 【 0 1 6 2 】

図8の結果から、IgG4関連腎疾患患者IgGをマウスに投与した場合、腎臓の糸状体の間質にヒトIgG4が結合するのに対して、対照IgGをマウスに投与した場合にはそのような状態は生じないことが分かる。

## 【 0 1 6 3 】

一方、ラミニン2鎖の遺伝子異常によりPier son症候群が生じることが知られている。Pier son症候群は、腎不全(メザンギウム増殖性糸状球腎炎)、神経障害(筋力低下)、縮腫を含む。上記のIgG4関連腎疾患患者IgGを取得した、抗ヒトラミニン-521抗体陽性のIgG4関連腎疾患患者は、腎生検からメザンギウム増殖性糸状球腎炎であることが確認されており、筋力低下も確認されていることから、Pier son症候群と症状、病理が合致する。従って、このIgG4関連腎疾患患者は、ラミニン2鎖に対する自己抗体を有しており、それが原因でIgG4関連腎疾患の症状が現れていると推測される。

40

## &lt; 8 . 実験 8 : AIP 患者の血清中の抗ラミニン 5 1 1 - E 8 自己抗体の測定 &gt;

## 8 . 1 . 試料

IgG4-RD 2011の診断基準又はAIPの診断基準を満たす51名の治療中のAIP患者からの血清試料を取得した。25名の健常者及び86名の疾患患者(49名の、組織学的に確認された癌患者、及び、39名の、癌以外の疾患患者)から、対照の血清試料を取得した。AIP患者51名のうち10名からの血清試料と、対照者112名のう

50

ち10名からの血清試料をそれぞれトレーニング群として用い、残りをバリデーション群として用いた。全ての血清試料は-80にて保存した。

#### 8.2. ELISAの手順

抗原の候補物質であるヒトラミン511-E8として、ヒト由来リコンビナントラミン511-E8(892012, 株式会社ニッピ製)を用いた。ラミン511-E8は、ラミンの鎖、鎖及び鎖のC末端領域がヘテロ三量体を形成した活性フラグメントであり、インテグリンへの結合能力を有する。ヒトラミン511-E8に対する血清抗体を、ELISA Starter Accessory Kit(E101, Bethyl Laboratories)を該キットの指示の通り用いるELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)により定量した。定量方法の概要は以下の通りである。

10

#### 【0164】

ヒトラミン511-E8を前記キットのELISA用コーティングバッファーに希釈して2 $\mu$ g/ml濃度溶液とし、この溶液を、前記キットのマイクロタイタープレートに、1つのウェルあたり100 $\mu$ lとなるように加え、室温で1時間インキュベートしてコーティングした。0.05% Tween20含有Tris緩衝生理食塩水(洗浄液)で前記プレートを5回洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン含有Tris緩衝生理食塩水で前記プレートをコーティングし、100 $\mu$ Lの、1:20希釈血清で室温にて30分間インキュベートした。前記洗浄液で5回洗浄した後、前記プレートを、100 $\mu$ Lの、HRP(セイヨウワサビペルオキシダーゼ)とコンジュゲートされたヤギ抗ヒトIgG抗体(1:4000; ab6759, Abcam)と、室温にて1時間インキュベートした。前記洗浄液で3回洗浄した後、前記プレートをTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)により3分間インキュベートし、450nmでの吸光度を測定して結合物を定量した。ヒトラミン511-E8でコーティングしていない対照ウェルを、各血清試料についてのELISAにおけるネガティブコントロールとして用いた。各アッセイはn=3で行い、ヒトラミン511-E8でコーティングしたウェルでの吸光度の平均値から、対照ウェルでの吸光度の平均値を引いた値を、血清抗体のヒトラミン511-E8への特異的結合量、すなわち、血清中の抗ヒトラミン511-E8 IgG抗体レベルとした。

20

#### 8.3. 結果

30

トレーニング群である10名のAIP患者、及び、10名の対照(膵臓癌患者3名、原発性硬化性胆管炎患者2名、健常者5名)からの血清試料の、抗ヒトラミン511-E8 IgG抗体レベルの測定結果を図9Aに示す。カットオフ値(光学密度単位[OD])は、前記対照からの血清試料での抗ヒトラミン511-E8 IgG抗体レベルの平均値に、標準偏差(SD)の3倍の値を加えた値である。10名のAIP患者のうち6名からの血清試料が、ヒトラミン511-E8に対するIgG抗体が陽性であったのに対して、10名の対照者の全員がヒトラミン511-E8に対するIgG抗体が陰性であった。

#### 【0165】

バリデーション群の41名のAIP患者、及び、102名の対照(健常者20名、AIP以外の疾患患者82名)からの血清試料の、抗ヒトラミン511-E8 IgG抗体レベルの測定結果を図9Bに示す。カットオフ値(光学密度単位[OD])は、前記対照からの血清試料での抗ヒトラミン511-E8 IgG抗体レベルの平均値に、標準偏差(SD)の3倍の値を加えた値である。41名のAIP患者のうち20名からの血清試料が、抗ヒトラミン511-E8 IgG抗体を有していた(陽性であった)のに対して、102名の対照者のうち2名のみが、抗ヒトラミン511-E8 IgG抗体陽性であった。

40

#### 【0166】

上記のトレーニング群及びバリデーション群の測定結果をまとめると、ヒトラミン511-E8に対するIgG抗体陽性は、AIP患者血清では26/51(51.0%)

50

であったのに対して、対照血清では 2 / 1 1 2 ( 1 . 8 % ) であった ( P < 0 . 0 0 1 ) 。

【 0 1 6 7 】

5 1 名の A I P 患者の血清試料の測定結果、及び、被験者の臨床像を下記の表 4 にまとめた。

【 0 1 6 8 】

【 表 4 】

	抗ラミニン 511 抗体 陽性 AIP 患者	抗ラミニン 511 抗体 陰性 AIP 患者	P 値
症例数	26	25	
性 (男性/女性)	19/7	21/4	0.34
年齢	67	63	0.53
血清 IgG (mg/dl)	1918	1760	0.32
血清 IgG4 (mg/dl)	447	408	0.8
びまん性/限局性	22/4	16/9	0.091
頭部病変 (%)	2 (8)	18 (72)	<0.0001
悪性腫瘍 (%)	0 (0)	8 (32)	0.0017
糖尿病 (%)	11 (44)	10 (40)	0.87
低補体血症 (%)	3 (12)	5 (20)	0.41
アレルギー (%)	3 (12)	12 (48)	0.0043

10

20

30

40

50

【 0 1 6 9 】

抗ヒトラミニン - 5 1 1 - E 8 抗体陽性の A I P 患者では、陰性の A I P 患者と比較して、悪性腫瘍及びアレルギー疾患の頻度が有意に低いことが判明した。

【 0 1 7 0 】

抗ヒトラミニン - 5 1 1 - E 8 抗体陽性の A I P 患者 2 6 名の全員が悪性腫瘍を合併していなかったのに対して、陰性の A I P 患者 2 5 名中 8 名が悪性腫瘍を合併していた。

【 0 1 7 1 】

抗ヒトラミニン - 5 1 1 - E 8 抗体陽性の A I P 患者 2 6 名中 3 名のみがアレルギー疾患を合併していたのに対して、陰性の A I P 患者 2 5 名中 1 2 名がアレルギー疾患を合併していた。

【 0 1 7 2 】

また、造影 C T による膵画像の比較から、抗ヒトラミニン - 5 1 1 - E 8 抗体陽性の A I P 患者では、膵臓の頭部病変を示す患者の割合が、陰性の A I P 患者と比較して有意に低いことが判明した。

< 9 . 実験 9 : 抗ラミニン 5 1 1 - E 8 自己抗体陰性の A I P 患者における抗インテグリン自己抗体の測定 >

膵臓においてラミニン 5 1 1 は、インテグリン 6 1 又はインテグリン 3 1 と結合することが知られている。本発明者らは、A I P 患者では、インテグリン 6 1 又はインテグリン 3 1 も自己抗原となるという仮説を立てた。

9 . 1 . 試料

実験 8 と同じ、5 1 名の A I P 患者及び 1 1 2 名の対照からの血清試料を用いた。

9 . 2 . E L I S A

抗原候補物質としてインテグリン 6 1 又はインテグリン 3 1 を用いた以外は、実験 8 と同じ手順で、E L I S A により、血清試料中の抗インテグリン 6 1 抗体及び抗インテグリン 3 1 抗体を定量した。

【 0 1 7 3 】

インテグリン 6 1として、リコンビナントヒトインテグリン 6 1 ( R & D S y s t e m s、米国ミネソタ州、製品番号7809 - A6 )を用いた。

【0174】

インテグリン 3 1として、リコンビナントヒトインテグリン 3 1 ( R & D S y s t e m s、米国ミネソタ州、製品番号2840 - A3 )を用いた。

9.3. 結果

26名の抗ラミニン511 - E8抗体陽性AIP患者、25名の抗ラミニン511 - E8抗体陰性AIP患者、及び、112名の対照からの血清試料での、抗インテグリン 6 1 I g G抗体レベルの測定結果を図10に、抗インテグリン 3 1 I g G抗体レベルの測定結果を図11に、それぞれ示す。カットオフ値 ( 光学密度単位 [ O D ] ) は、前記対照からの血清試料での抗インテグリン 6 1 I g G抗体レベル又は抗インテグリン 3 1 I g G抗体レベルの平均値に、標準偏差 ( S D ) の3倍の値を加えた値である。

10

【0175】

図10に示す通り、26名の抗ラミニン511 - E8抗体陽性AIP患者、及び、112名の対照は、全員が、抗インテグリン 6 1 I g G抗体陰性であった。25名の抗ラミニン511 - E8抗体陰性AIP患者のうち4名が、抗インテグリン 6 1 I g G抗体陽性であった。

【0176】

図11に示す通り、51名のAIP患者及び112名の対照は、全て、抗インテグリン 3 1 I g G抗体陰性であった。

20

【0177】

以上の結果は、ラミニン511に加えてインテグリン 6 1が、一部のAIP患者において自己抗原であることを示す。このことは、ラミニン511とインテグリン 6 1との結合が、AIPでの自己抗体の標的であることを示唆する。

【0178】

51名のAIP患者を、26名の抗ラミニン511 - E8抗体陽性AIP患者 ( 抗インテグリン 6 1抗体は陰性 ) と、4名の抗インテグリン 6 1抗体陽性AIP患者 ( 抗ラミニン511 - E8抗体は陰性 ) と、21名の抗ラミニン511 - E8抗体陰性抗インテグリン 6 1抗体陰性AIP患者に分類し、各群のAIP患者の臨床像を下記の表5にまとめた。なお、抗ラミニン511 - E8抗体と抗インテグリン 6 1抗体が両方とも陽性の被験者はいなかった。

30

【0179】

【表 5】

	抗ラミニン 511-E8 抗体陽性 AIP 患者	抗インテグリン $\alpha 6\beta 1$ 抗体陽性 AIP 患者	両者陰性 AIP 患者
症例数	26	4	21
性 (男性/女性)	19/7	3/1	18/3
年齢	67	61	66
血清 IgG (mg/dl)	1918	1459	1919
血清 IgG4 (mg/dl)	447	297	469
びまん性/限局性	22/4	1/3	15/6
頭部病変 (%)	2 (8)	0 (0)	18 (86)
悪性腫瘍 (%)	0 (0)	2 (50)	6 (29)
糖尿病 (%)	11 (44)	0 (27)	10 (48)
低補体血症 (%)	3 (12)	0 (0)	5 (24)
アレルギー (%)	3 (12)	2 (50)	10 (48)

10

## 【 0 1 8 0 】

26名の抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者は、悪性腫瘍を合併している者が皆無であった。一方、4名の抗インテグリン61抗体陰性AIP患者のうち2名(50%)が悪性腫瘍を合併していた。また、21名の抗ラミニン511-E8抗体陰性抗インテグリン61抗体陰性AIP患者のうち6名(29%)が悪性腫瘍を合併していた。このことから、AIP患者において、血清中の抗ラミニン511-E8抗体レベル及び抗インテグリン61抗体レベルを指標として、悪性腫瘍の発症の可能性を予測することが可能である。例えば、抗インテグリン61抗体陽性のAIP患者は、悪性腫瘍を合併する可能性が高いため、全身をスクリーニングする必要性が高いと言える。

20

## &lt; 10 . 実験 10 : 膵画像の比較 &gt;

図12上段は、抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者の造影CTによる膵画像である。図12下段は、抗インテグリン61抗体陽性AIP患者の造影CTによる膵画像である。各画像中の矢印は病変箇所を指す。

30

## 【 0 1 8 1 】

図12上段に示すように、抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者の膵画像では、膵臓の体部及び尾部に病変が認められた。図12下段に示すように、抗インテグリン61抗体陽性AIP患者の膵画像では、膵臓の体部に病変が認められ、これは膵癌患者の膵画像と類似しており、抗インテグリン61抗体陰性AIP患者47例では同様の膵画像は皆無であった。

## &lt; 11 . 実験 11 : 抗ラミニン 5 1 1 - E 8 抗体力価の治療による低減 &gt;

## 11 . 1 . 手順

実験8で抗ラミニン511-E8抗体陽性であった26名のAIP患者のうち5名について、ステロイドを用いたAIP治療の前後での、血清中の抗ラミニン511-E8抗体レベルを調べた。抗体レベルの測定は実験8と同様の方法で行った。

40

## 【 0 1 8 2 】

各患者はAIPと診断された後、ステロイドの1種であるプレドニゾンの経口投与による治療を6~8カ月間にわたり受けた。

## 11 . 2 . 結果

5名の抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者の、ステロイド治療前後での、血清中の抗ラミニン511-E8抗体レベルを図13に示す。ステロイド治療により各AIP患者の血清中の抗ラミニン511-E8抗体力価はカットオフ値未満に低減された。また、図示しないが、各AIP患者の血清中の抗ラミニン511-E8抗体力価の低減に伴い

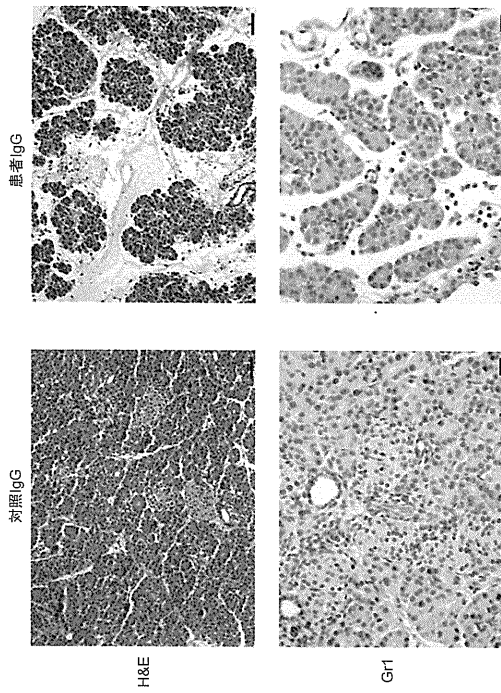
50

膝画像所見も改善した。このことは、血清中の抗ラミニン511-E8抗体は、AIP治療の効果の指標としても有用であることを裏付ける。

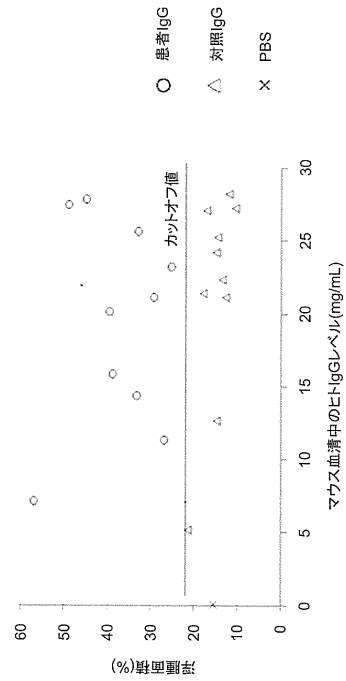
【0183】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

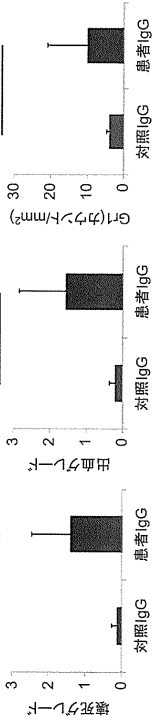
【図1A】



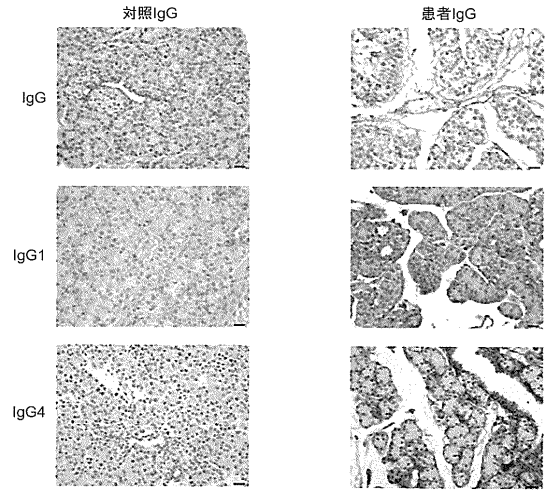
【図1B】



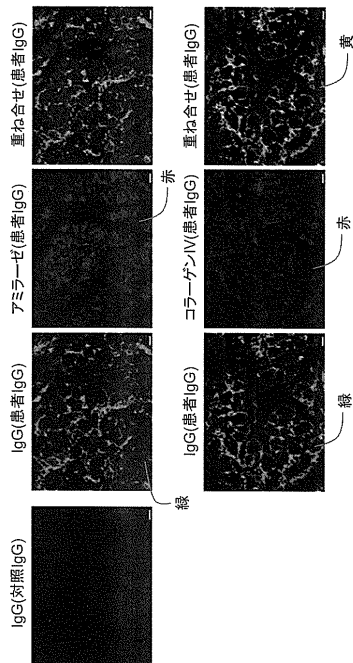
【 図 1 C 】



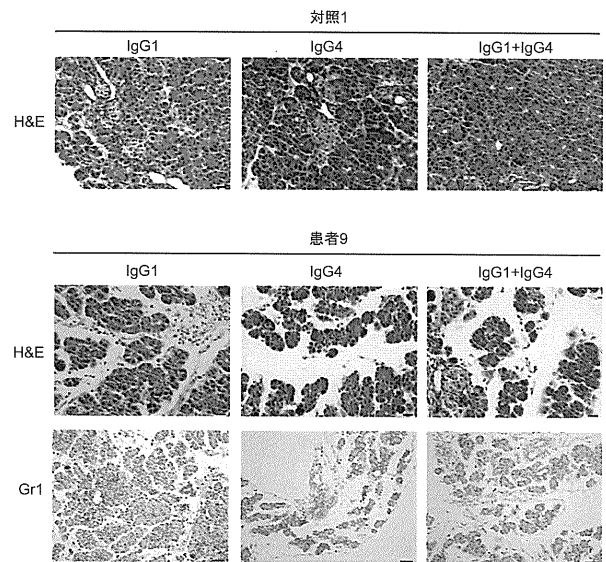
【 図 2 A 】



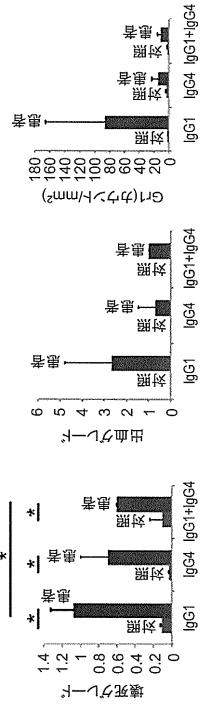
【 図 2 B 】



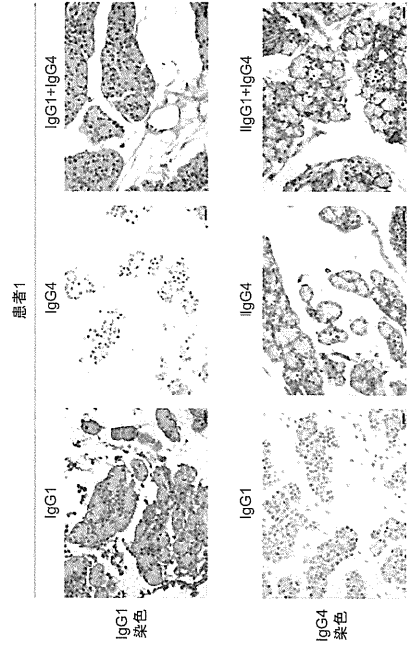
【 図 3 A 】



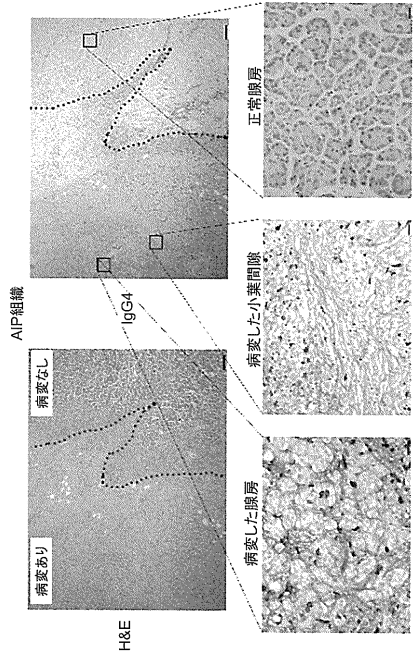
【 図 3 B 】



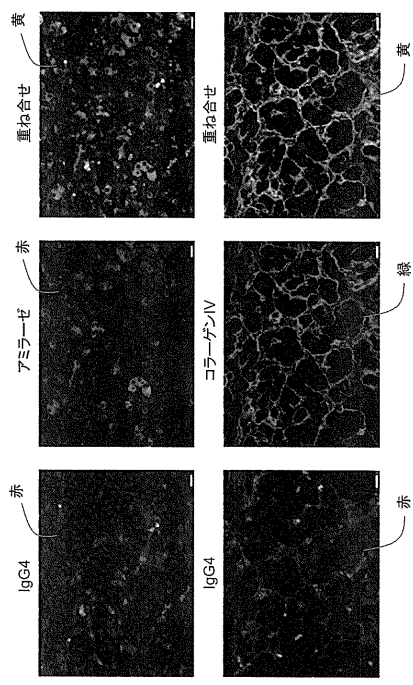
【 図 3 C 】



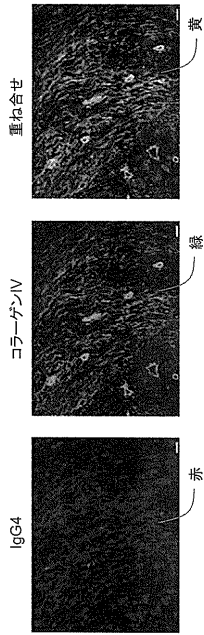
【 図 4 A 】



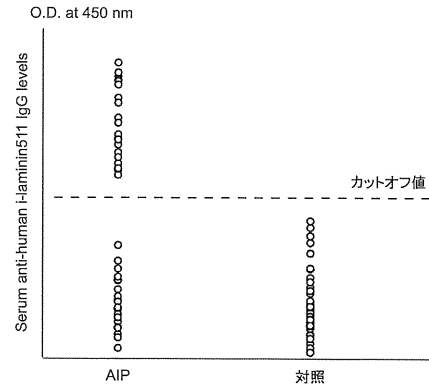
【 図 4 B 】



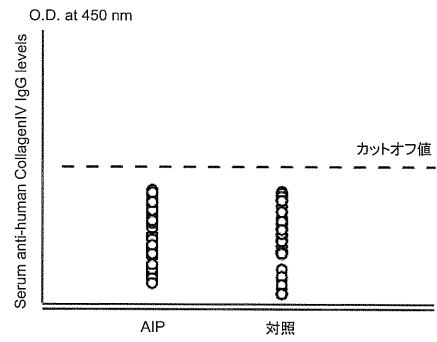
【 図 4 C 】



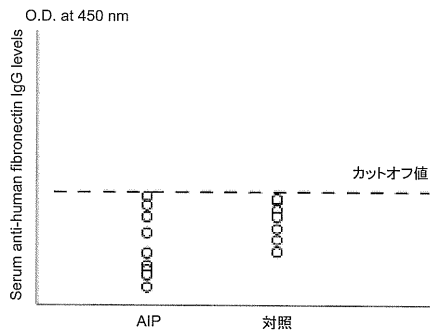
【 図 5 A 】



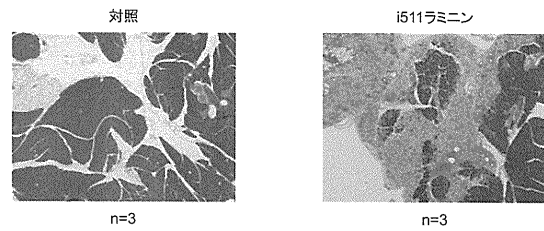
【 図 5 B 】



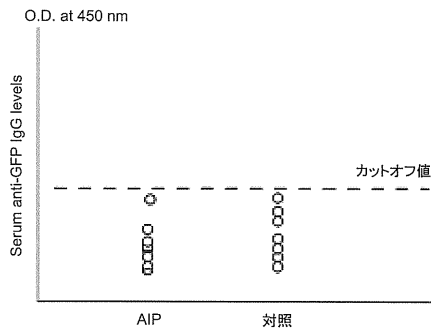
【 図 5 C 】



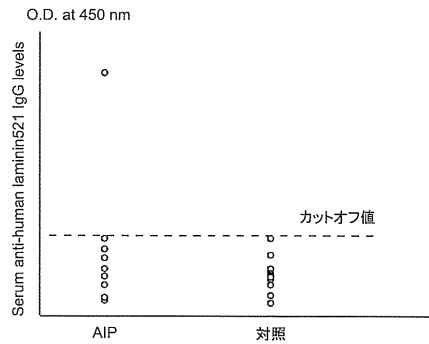
【 図 6 】



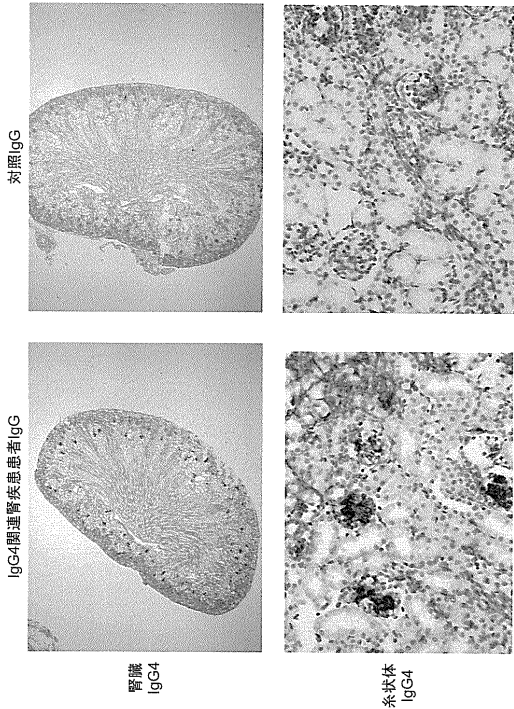
【 図 5 D 】



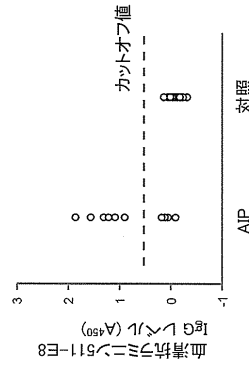
【 図 7 】



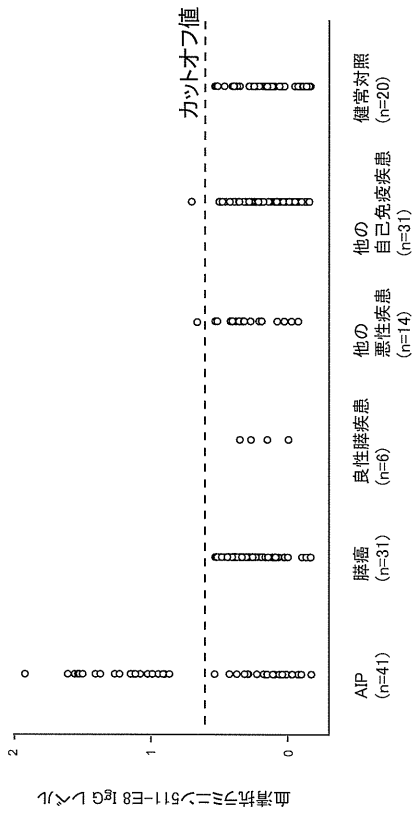
【 図 8 】



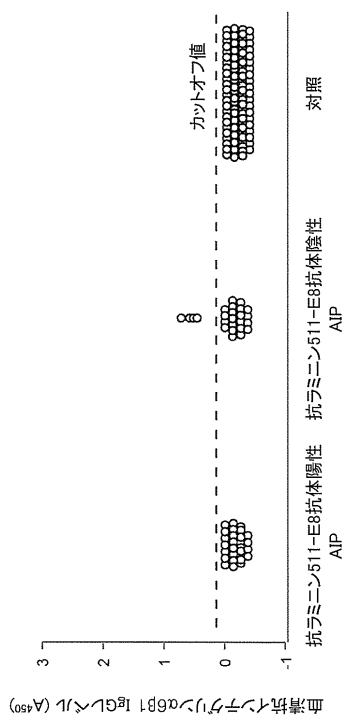
【 図 9 A 】



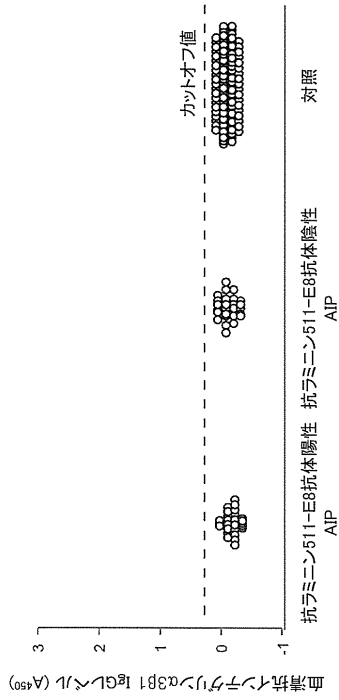
【 図 9 B 】



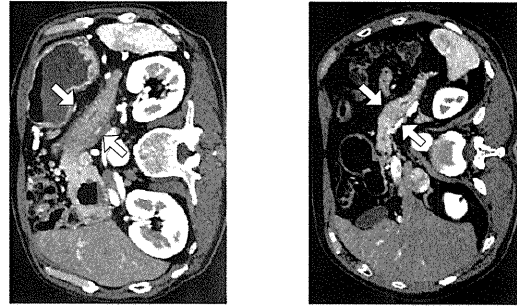
【 図 10 】



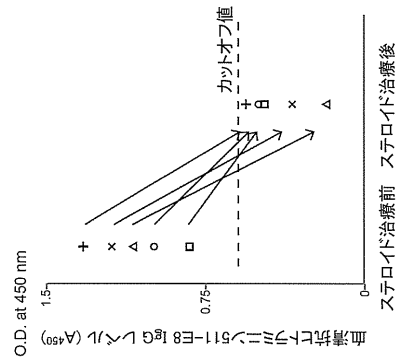
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配 列 表 】

2018016607000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2017/026359
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/53(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C07K16/18 (2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, G01N33/15, G01N33/50, C07K16/18  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2012-050369 A (Kanazawa Medical University), 15 March 2012 (15.03.2012), table 1, (1), (B) (Family: none)	11 1-10, 12-15
A	WO 2015/123565 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 20 August 2015 (20.08.2015), entire text & US 2015/0232935 A1	1-15
A	WO 2002/042769 A1 (Eiji MATSUURA), 30 May 2002 (30.05.2002), claims & JP 3989837 B2 & US 2004/0082011 A1 claims	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 August 2017 (29.08.17)		Date of mailing of the international search report 12 September 2017 (12.09.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026359

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/013508 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 29 January 2015 (29.01.2015), entire text & US 2016/0159918 A1 & EP 3024482 A2	1-15
A	JP 2002-514660 A (Genentech, Inc.), 21 May 2002 (21.05.2002), entire text & WO 1999/058573 A1 entire text & EP 1078006 A1	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease, Gut, 2016.03.10, 65(8), 1322-1332	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis, The American Journal of GASTROENTEROLOGY, 2013.04, Vol. 108, 610-617	1-15
A	Mitsuhiro KAWANO et al., "IgG4-related kidney disease. Diagnosis and treatment", Japanese journal of clinical immunology, 2015, vol.38, no.1, 8 to 16	1-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 2 6 3 5 9													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, G01N33/15, G01N33/50, C07K16/18															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
X A	JP 2012-050369 A (学校法人金沢医科大学) 2012.03.15, 表1 (1) (B) (ファミリーなし)	11 1-10, 12-15													
A	WO 2015/123565 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2015.08.20, 全文 & US 2015/0232935 A1	1-15													
A	WO 2002/042769 A1 (松浦栄次) 2002.05.30, 請求の範囲 & JP 3989837 B2 & US 2004/0082011 A1(請求の範囲)	1-15													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 29.08.2017		国際調査報告の発送日 12.09.2017													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹	2 J 3316												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 2 6 3 5 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2015/013508 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2015. 01. 29, 全文 & US 2016/0159918 A1 & EP 3024482 A2	1-15
A	JP 2002-514660 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2002. 05. 21, 全文 & WO 1999/058573 A1(全文) & EP 1078006 A1	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease, Gut, 2016. 03. 10, 65(8), 1322-1332	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis, The American Journal of GASTROENTEROLOGY, 2013. 04, Vol. 108, 610-617	1-15
A	川野充弘 ほか, IgG4 関連腎臓病 診断と治療, 日本臨床免疫学会 会誌, 2015, Vol. 38 No. 1, 8-16	1-15

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA25 AA26 AA29 AA40 BA13 BA14 BB24  
CA11 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03 CB07 CB17 CB26 DA36  
DA37 FA16 FA29 FB01 FB03 FB08 FB12 FB17 GC10 GC15  
JA01

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	IgG4相关疾病的试验方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2018016607A1</a>	公开(公告)日	2019-05-23
申请号	JP2018528879	申请日	2017-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
[标]发明人	児玉裕三 千葉勉		
发明人	塩川 雅広 児玉 裕三 千葉 勉		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	G01N33/564 A61K2039/505 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/22 C07K2317/52 G01N2333/78 G01N2500/20 G01N2800/067 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/564.ZNA.Z G01N33/53.N G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CA11 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA16 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB17 2G045/GC10 2G045/GC15 2G045/JA01		
优先权	2016142701 2016-07-20 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的目的是弄清IgG4相关疾病的病原体，并提供使用该病原体的IgG4相关疾病的检查方法。作为样品中IgG4相关疾病的指标，本发明是检测与层粘连蛋白发生免疫反应的抗体的抗层粘连蛋白抗体检测步骤，和/或检测与整联蛋白发生免疫学反应的抗体的抗抗体。提供了一种测试IgG4相关疾病的方法，其包括整联蛋白抗体检测步骤。本发明还提供了用于测试包含层粘连蛋白的IgG4相关疾病的测试试剂，以及用于测试包含整联蛋白的IgG4相关疾病的测试试剂。

