(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5557834号
(P5557834)
(45)発行日　平成26年7月23日(2014.7.23)　(24)登録日　平成26年6月13日(2014.6.13)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 D

請求項の数 11　(全 17 頁)

(21)出願番号　特願2011-503872(P2011-503872)
(86)(22)出願日　平成22年3月12日(2010.3.12)
(86)国際出願番号　PCT/JP2010/054184
(87)国際公開番号　WO2010/104168
(87)国際公開日　平成22年9月16日(2010.9.16)
審査請求日　平成25年3月1日(2013.3.1)
(31)優先権主張番号　特願2009-60966(P2009-60966)
(32)優先日　平成21年3月13日(2009.3.13)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　899000079
学校法人慶應義塾
東京都港区三田２丁目１５番４５号
(73)特許権者　000175892
エーディア株式会社
東京都千代田区岩本町１－１０－６
(74)代理人　100147935
弁理士　石原　進介
(74)代理人　100080230
弁理士　石原　詔二
(72)発明者　坂元　亨宇
東京都新宿区信濃町３５番地　慶應義塾大学医学部内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血中のＣＡＰ２の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中ＣＡＰ２測定用検出キット

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗ＣＡＰ２抗体を用いた免疫測定法により血中のＣＡＰ２を測定することを特徴とする血中のＣＡＰ２の測定方法。
【請求項２】
前記免疫測定方法が抗体サンドイッチ法であることを特徴とする請求項１記載の測定方法。
【請求項３】
前記免疫測定方法が、第１の抗ＣＡＰ２抗体及び第２の抗ＣＡＰ２抗体を用いた抗体サンドイッチ法であることを特徴とする請求項２記載の測定方法。
【請求項４】
前記免疫測定方法が、前記抗ＣＡＰ２抗体及び抗アクチン抗体を用いた抗体サンドイッチ法であることを特徴とする請求項２記載の測定方法。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか１項に記載の方法を用いて血中のＣＡＰ２の量を検出することにより肝臓疾患を検出することを特徴とする肝臓疾患の検出方法。
【請求項６】
前記肝臓疾患が肝がんであることを特徴とする請求項５記載の検出方法。
【請求項７】
前記肝臓疾患がＮＡＳＨであることを特徴とする請求項５記載の検出方法。

【請求項８】
血中のＣＡＰ２を測定することにより肝臓疾患を検出するための血中ＣＡＰ２測定用検出キットであって、
抗ＣＡＰ２抗体を含むことを特徴とする血中ＣＡＰ２測定用検出キット。
【請求項９】
抗アクチン抗体をさらに含むことを特徴とする請求項８記載の検出キット。
【請求項１０】
前記肝臓疾患が肝がんであることを特徴とする請求項８又は９記載の検出キット。
【請求項１１】
前記肝臓疾患がＮＡＳＨであることを特徴とする請求項８又は９記載の検出キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、血中のＣＡＰ２（Cyclase-Associated Protein 2）の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中ＣＡＰ２測定用検出キットに関し、特に、血中のＣＡＰ２を測定することにより肝臓疾患を診断する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
肝臓疾患とは、肝臓の働きが何らかの原因により阻害され正常に働かなくなる疾患で、肝炎ウイルスへの感染によるＢ型肝炎、Ｃ型肝炎、アルコールの過剰摂取によるアルコール性肝疾患、脂肪分の過剰摂取による脂肪肝など様々な原因が考えられる。肝臓は症状を自覚しづらく、症状が出てきたときには既に病気が進行している場合が多い。
肝臓疾患の最たるものといえる肝がんは、肝臓に発生した悪性腫瘍の総称で、その９０％程度を原発性肝がんである肝細胞がん（ＨＣＣ）が占めている。ほとんどがＢ型・Ｃ型肝炎ウイルスに感染しており、肝炎ウイルイスに感染すると、発症により慢性肝炎（ＣＨ）になり、肝硬変へと移行、その後肝がんを発症する危険が高くなっている。
【０００３】
肝がんの治療法として、外科的治療（部分肝切除・肝移植）と内科的治療（肝動脈塞栓等）があるが、肝硬変等が進行していると、切除できる範囲が狭くなる。一般的には、早期治療では外科的治療が選択される。
肝がんは初期の段階では症状が出づらく、自覚しにくいことから、知らない間にかなり進行していることがあり、がんの中でも上位の死亡率を占めている。そのため、早期治療により、生存率が高まる傾向にあり、早期発見、適切な治療を行うことが重要となるため、精度よく早期に診断する方法の確立が望まれていた。
【０００４】
肝がんの診断には、腹部超音波検査、ＣＴスキャン、ＭＲＩ検査などの画像診断、腫瘍マーカー等により行われている。画像診断は、診断信頼性の技量による差が出やすいこと、検査時間が長い、コストが高いという問題がある。
【０００５】
さらに感度、特異性、早期診断性に優れたマーカーを得るべく、早期肝がんと背景肝との比較・網羅的遺伝子発現解析を行い、ＣＡＰ２（Cyclase-Associated Protein 2）のがん部での高発現を見出した。この分子はこれまでがんとの関連を報告されていないが、その構造から発がん初期に重要な働きをしている可能性が示唆されている。本発明者らは、ＣＡＰ２蛋白に特異的に反応するポリクローナル抗体を作成し免疫組織学的に検討したところ、ＣＡＰ２は肝がんの発がん早期から発現の亢進が見られ、多段階発がんの進行に比例しその発現が亢進すること、非がん肝細胞での発現はほとんど認められないことを発見した（非特許文献１）。
【０００６】
また、ウイルス感染や、過剰なアルコール摂取などの明らかな肝臓疾患の原因がなく、肝臓に脂肪がたまっている脂肪肝は良性と考えられ、放置されてきた。しかし、近年その

ような脂肪肝（非アルコール性脂肪性肝疾患）の一部に肝硬変や肝がんに移行するタイプのものがあることが明らかとなり、非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis：ＮＡＳＨ）と呼ばれている。これまで原因不明と思われた肝硬変患者では、ＮＡＳＨの進行したものが多く含まれていると考えられており、ＮＡＳＨから肝硬変へ進行、肝細胞癌へと進行する場合も有り、肝細胞癌の原因疾患としてＮＡＳＨは重要なものと考えられている。ＮＡＳＨには、自覚症状がないことが多く、ＮＡＳＨの診断に有用な血液マーカーの確立が望まれている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Clin Cancer Res 2006, 12(18) September 15, 2006:5363-5368

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

免疫反応を利用した従来のＣＡＰ２の検出方法は、免疫組織学的に検討したもののみであり、ＣＡＰ２を定量することはできなかった。また、細胞を取る検査は被験者への負担が大きく、簡便に検出可能な方法が望まれていた。

本発明は、患者に負担をかけることなく、肝臓疾患を検出することが可能な血中のＣＡＰ２の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中ＣＡＰ２測定用検出キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明者らは、鋭意検討を行い、血液（血漿や血清）中にＣＡＰ２及びＣＡＰ２複合体が免疫測定法により検出できる程度の濃度で含まれることを見出した。さらに、健常者とＣＨ、ＨＣＣ、ＮＡＳＨの血清中のＣＡＰ２を測定した結果、測定値に有意に差があり、血液中のＣＡＰ２及びＣＡＰ２複合体の濃度を免疫測定法により測定することにより、肝臓疾患の検出が可能であることを見出し、本発明を完成した。

【００１０】

すなわち、本発明の血中のＣＡＰ２の測定方法は、抗ＣＡＰ２抗体を用いた免疫測定法により血中のＣＡＰ２を測定することを特徴とする。

前記免疫測定方法が抗体サンドイッチ法であることが好ましく、第１の抗ＣＡＰ２抗体及び第２の抗ＣＡＰ２抗体を用いた抗体サンドイッチ法や、抗ＣＡＰ２抗体及び抗アクチン抗体を用いた抗体サンドイッチ法がより好適である。

【００１１】

本発明の肝臓疾患の検出方法は、本発明の血中のＣＡＰ２の測定方法を用いて血中のＣＡＰ２の量を検出することにより肝臓疾患を検出することを特徴とする。

本発明の検出方法により、肝がん又はＮＡＳＨ等の肝臓疾患を検出することができる。

【００１２】

本発明の血中ＣＡＰ２測定用検出キットは、血中のＣＡＰ２を測定することにより肝臓疾患を検出するための血中ＣＡＰ２測定用検出キットであって、抗ＣＡＰ２抗体を含むことを特徴とする。

本発明の検出キットは、抗アクチン抗体をさらに含むことが好適である。

本発明の検出キットにより、肝がん又はＮＡＳＨ等の肝臓疾患を検出することができる。

【発明の効果】

【００１３】

本発明によれば、患者に負担をかけることなく、肝臓疾患を検出することが可能な血中のＣＡＰ２の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中ＣＡＰ２測定用検出キットを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【００１４】
【図１】ＣＡＰ２構造を示す模式図である。
【図２】実施例１の標準品ＣＡＰ２の結果及びＣＡＰ２検量線を示すグラフである。
【図３】実施例１の結果を示すグラフである。
【図４】実施例２の結果を示すグラフである。
【図５】実施例３の結果を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
以下に本発明の実施の形態を添付図面に基づいて説明するが、図示例は例示的に示されるもので、本発明の技術思想から逸脱しない限り種々の変形が可能なことはいうまでもない。
【００１６】
本発明の血中のＣＡＰ２の測定方法は、抗ＣＡＰ２抗体を用いた免疫測定法により血中のＣＡＰ２を測定するものであり、具体的には、抗ＣＡＰ２抗体を用いた免疫測定法により、血漿又は血清中のＣＡＰ２抗原又はＣＡＰ２を含む抗原複合体を測定する。
【００１７】
図１は、ＣＡＰ２構造を示す模式図である。ＣＡＰとは出芽酵母のアデニル酸シクラーゼ結合タンパク質として同定されたものである。ＣＡＰ及びＣＡＰ２は、ドメイン構造解析の結果から、Ｎ末端領域がアデニル酸シクラーゼに結合するドメイン１０、Ｃ末端側がアクチン１８と相互作用を行うドメイン１４、中央にポリプロリン領域１２を持つことがわかっており、塩基配列は、公知となっている（Journal of Cell Science 107, 1671-1678(1994)）。ＣＡＰ及びＣＡＰ２は、Ｃ末端側にアクチン１８と相互作用を行うドメイン１４が存在することから、アクチン複合体として存在する場合があることも確認されている。図１は、アクチン１８が結合したＣＡＰ２複合体１０の例を示した。
【００１８】
本発明の方法では、血漿又は血清中のＣＡＰ２を測定するが、検出するＣＡＰ２は、特に限定されず、全長ＣＡＰ２でも、ＣＡＰ２断片、アクチンが結合したＣＡＰ２複合体でもよい。
【００１９】
本発明に用いられる抗ＣＡＰ２抗体は、前述した検出するＣＡＰ２に特異的に結合するものであればよく、その由来、種類及び形状は特に制限されない。該抗ＣＡＰ２抗体の調製方法は特に制限はなく、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。特に哺乳動物由来の抗体が好ましく、ハイブリドーマに産生されるもの及び遺伝子工学的手法により、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものも含む。
【００２０】
本発明に用いられる抗ＣＡＰ２ポリクローナル抗体の調製方法は特に制限はなく、常法により調製することができる。例えば、ＣＡＰ２抗原ペプチドを調整し、哺乳動物に免疫する。免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、マウス、ラット、ウサギ等が好適である。該ＣＡＰ２抗原ペプチドを免疫した哺乳動物から抗血清を得、該抗血清から抗ＣＡＰ２抗体を精製することにより、抗ＣＡＰ２ポリクローナル抗体を得ることができる。抗体の精製に用いる緩衝液は特に限定されないが、例えば、下記合成例１で用いた緩衝液が好ましい。
【００２１】
本発明に用いられる抗ＣＡＰ２ポリクローナル抗体の調製方法は特に制限はなく、常法により調製することができる。例えば、後述する合成例２に示すように、ＣＡＰ２抗原ペプチドを哺乳動物に免疫し、抗ＣＡＰ２モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。こうして得られたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、培養で継代することもできるし、液体窒素中で長期保存することも可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得する場合は、細胞をシャーレにて通常の通り培養し、その培

養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳類に投与して増殖させ、その腹水より得る方法などが採用される。また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組み換え技術を用いて産生させた組み換え型を用いることができる。産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し、均一に精製することができる。

【００２２】

本発明におけるＣＡＰ２の検出方法は、抗ＣＡＰ２抗体を用いた免疫測定法であれば特に限定されず、サンドイッチ法、競合法、凝集法等いずれも採用できる。測定原理としてはエンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイなどを挙げることができる。電気化学発光法を利用したサンドイッチ法が好ましいがこれに限定されるものではない。

【００２３】

本発明方法の好適な例として、サンドイッチ法を用いた本発明方法の第１の態様を以下に説明する。第１の抗ＣＡＰ２抗体を支持体に固相化し、血液検体と反応させる（第１反応）。該第１反応後、洗浄し、標識物質で標識した第２の抗ＣＡＰ２抗体を反応させる（第２反応）。該第２反応後、さらに洗浄し、標識抗体量を検出することにより、血液検体中のＣＡＰ２を検出することができる。前記第１反応及び第２反応の反応溶液は免疫測定法で用いられる公知の緩衝液を広く使用可能である。

【００２４】

前記支持体としては特に制限はないが、ガラス、プラスティック（例えば、ポリスチレン、ポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレンなど）、金属などが挙げられる。支持体の形状は、カップ型、平板、粒子など、特に限定されないが、好ましくはマグネティックマイクロビーズ（磁気ビーズ）である。

【００２５】

前記標識物質としては、公知の標識物質を使用でき、特に制限はないが、例えば、蛍光物質、酵素、色素、発光物質等が挙げられ、ルテニウム錯体が好ましい。

【００２６】

前記第１の抗ＣＡＰ２抗体及び第２の抗ＣＡＰ２抗体はそれぞれモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれも選択可能であり、その組み合わせも特に制限はないが、第１及び第２の抗ＣＡＰ２抗体の一方又は両方にモノクローナル抗体を用いることが好適である。

【００２７】

なお、上記第１の態様では、第１抗体及び第２抗体ともに抗ＣＡＰ２抗体を用いた例を示したが、第１の抗ＣＡＰ２抗体及び第２の抗ＣＡＰ２抗体のいずれかを抗アクチン抗体に変更し、抗ＣＡＰ２抗体と抗アクチン抗体を用いたサンドイッチ法により血液検体中のＣＡＰ２を検出してもよい。

【００２８】

本発明の肝臓疾患の検出方法は、該本発明の測定方法を用いて血中のＣＡＰ２の量を検出することにより、肝臓疾患を検出するものである。本発明方法により、肝細胞がん（ＨＣＣ）及び非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）等の肝臓疾患を検出することができる。

【００２９】

本発明の血中ＣＡＰ２測定用検出キットは、血中のＣＡＰ２を測定することにより肝臓疾患を検出するための血中ＣＡＰ２測定用検出キットであって、ＣＡＰ２またはＣＡＰ２アクチン複合体を認識する抗体（抗ＣＡＰ２抗体）を必須の構成成分とする検出キットである。前記検出用キットが、支持体に固相化した第１の抗ＣＡＰ２抗体と、標識物質で標識した第２の抗ＣＡＰ２抗体を含むことが好適である。また、前記検出用キットが抗ＣＡＰ２抗体と抗アクチン抗体を含み、該抗ＣＡＰ２抗体及び抗アクチン抗体の一方が支持体に固相化されてなり、他方が標識物質で標識されてなることが好適である。

【実施例】

【００３０】

以下に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は例示的に示されるもので限定的に解釈されるべきでないことはいうまでもない。

【００３１】

（合成例１）

１）抗ＣＡＰ２ポリクローナル抗体の作成

免疫複合体の作成：

ＣＡＰ２より免疫原としての可能性、他のタンパクの相同性を考慮し、次の３つのエピトープの合成ペプチド（４６０－４７５ペプチド、４４０－４５３ペプチド及び３９７－４１０ペプチド）を作成した。各合成ペプチドは、ヒトＣＡＰ２由来のアミノ酸配列（４６０－４７５位、４４０－４５３位及び３９７－４１０位）に、コンジュゲート作成のため、Ｎ末端にシステインをつけ、下記アミノ酸配列を有する合成ペプチドとした。

４６０－４７５ペプチド：CKTAWDGSKLITEPAEI（配列番号１）

４４０－４５３ペプチド：CMNILIPQDGDYREF（配列番号２）

３９７－４１０ペプチド：CSQDIQIQVMGRVPT（配列番号３）

【００３２】

上記ペプチドを０．１Ｍ　ＥＤＴＡを含むリン酸緩衝液およびMaleimide Activated KLHと２時間混合し、Ｇ－２５ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて、各ペプチドを結合した３種のＫＬＨ結合ペプチド複合体（４６０－４７５ペプチドのＫＬＨ複合体、４４０－４５３ペプチドのＫＬＨ複合体及び３９７－４１０ペプチドのＫＬＨ複合体）を作成し、免疫原とした。

【００３３】

ウサギへの免疫：

前記作成した４６０－４７５ペプチドのＫＬＨ複合体をウサギに、初回２００μｇ、２回目以降は１００μｇを免疫し、抗血清を得た。４４０－４５３ペプチドのＫＬＨ複合体および３９７－４１０ペプチドのＫＬＨ複合体も同様に、免疫し、抗血清を得た。

【００３４】

抗体精製のためのカラム作成：

Epoxy-activated Sepharose 4B（ＧＥヘルスケア　バイオサイエンス社製）２．５ｇをＤ．Ｗ．で膨潤し、Ｇ３ガラスフィルターで洗浄した。０．１Ｍホウ酸バッファー（ｐＨ９．５）に４６０－４７５ペプチドを４ｍｇ／３ｍＬに溶解した溶液を調製した。この溶液を洗浄したゲルに加え、１６時間２５℃攪拌した。その後、ペプチド溶液を取り除き、１Ｍエタノールアミン（ｐＨ８．０）３ｍＬを加え、４時間攪拌した。次にエタノールアミン溶液を取り除き、０．５Ｍ　ＮａＣｌを含む０．１Ｍ酢酸バッファー（ｐＨ４．０）および０．５Ｍ　ＮａＣｌを含む０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ８．０）を交互に３回洗浄し、ペプチド結合ゲルを作成した。

４４０－４５３ペプチドあるいは３９７－４１０ペプチドも同様にして、ペプチド結合ゲルを作成した。

前記作成したペプチド結合ゲルをそれぞれ直径１．２ｍｍのカラムに充填して、抗体精製に用いた。

【００３５】

ポリクローナル抗体精製：

４６０－４７５ペプチドを免疫した抗血清と平衡化バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．０））を２．５ｍＬずつ混合し、０．２２μｍフィルターでろ過した。４６０－４７５ペプチドのペプチド結合ゲルを充填したカラムを２０ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．０）２０ｍＬを用いて平衡化した後、先に調整した抗血清とバッファーの等量混合液をカラムに加え、０．５Ｍ　ＮａＣｌを含む平衡化バッファーを加え、Ａｂｓ２８０ｎｍの吸光度が０．０５以下になるまで流した。抗体の溶出には０．５Ｍ　ＮａＣｌを含む０．１ＭグリシンＨＣｌ（ｐＨ２．５）で結合した抗体を溶出した。上記方法により、抗ＣＡＰ２（４６０－４７５ペプチド）ポリクローナル抗体を得た。

４４０－４５３ペプチドの抗血清も同様に、４４０－４５３ペプチドのペプチド結合ゲ

ルを用いて精製し、抗ＣＡＰ２（４４０－４５３ペプチド）ポリクローナル抗体を得た。また、３９７－４１０ペプチドの抗血清も同様に、３９７－４１０ペプチドのペプチド結合ゲルを用いて精製し、抗ＣＡＰ２（３９７－４１０ペプチド）ポリクローナル抗体を得た。

【００３６】

２）ポリクローナル抗体のクロスリアクションの分析

前記作成した３種のポリクローナル抗体に対し、ペプチドに対する抗体の特異性について分析を行った。ＣＡＰ２合成ペプチド結合磁気ビーズに、前記得られたポリクローナル抗体を結合させ、ルテニウム錯体標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を電気化学発光にて検出した。ＣＡＰ２合成ペプチド結合磁気ビーズ及びルテニウム錯体標識抗ウサギイムノグロブリン抗体は下記方法により調製した。

【００３７】

ＣＡＰ２合成ペプチド結合磁気ビーズの調製方法

１００ｎｇ／ｍＬの４６０－４７５、４４０－４５３および３９７－４１０それぞれのＣＡＰ２合成ペプチド１ｍＬを、３０ｍｇ／ｍＬの磁気ビーズ（DYNAL Biotech社製、DYNABEADS M-450 Epoxy）１ｍＬと混合した。混合液を２５℃、１６時間攪拌し、磁気ビーズと合成ペプチドを結合させた。その後、この磁気ビーズ溶液より溶液のみを抜き取ることで、溶液中に残存していたビーズ未結合の遊離合成ペプチドを除去した。次にブロッキング剤として１ｍＬの５０％リン脂質ポリマー試薬（日本油脂社製、Ｎ１０１）をペプチド結合磁気ビーズに加え、２５℃、３時間攪拌した。その後、１０％リン脂質ポリマー試薬（日本油脂社製、Ｎ１０１）、前述の３ｍＬのリン脂質ポリマー試薬で磁気ビーズを洗浄（１ｍＬリン脂質ポリマー／３回洗浄）し、使用時まで４℃で保存した。

【００３８】

ルテニウム錯体標識抗ウサギイムノグロブリン抗体の調製方法

抗ウサギイムノグロブリン抗体（DAKO社製、Anti-Rabbit Immunoglobulins Cat. No. Z0196）を１５０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．８）で１ｍｇ／ｍＬ抗体濃度に希釈した。１ｍｇ／ｍＬ抗体０．５ｍＬに１０ｍｇ／ｍＬのルテニウム錯体（IGEN社製、ORIGEN TAG-NHS ESTER）を１７．６μＬ加え、２５℃、３０分間攪拌した。その後、２ｍｏｌ／Ｌグリシンを３０μＬ添加し、２５℃、１０分間攪拌した。

次に、直径１ｃｍ、高さ３０ｃｍのガラス管に充填したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（ＧＥヘルスケア　バイオサイエンス社製、Sephadex G-25）にルテニウム錯体標識抗体液をアプライし、未標識のルテニウム錯体とルテニウム錯体標識抗体を単離精製した。溶出は１０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）にて行った。

【００３９】

前記合成した抗ＣＡＰ２ポリクローナル抗体の特異性に関する、前記ＣＡＰ２合成ペプチド結合磁気ビーズ及びルテニウム錯体標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を用いた分析方法の詳細は下記の通りである。

５００μＬ容ポリプロピレンカップ（以下、反応カップ）に１００μＬの反応用溶液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ，１％ＢＳＡ，０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，０．０１％（Ｗ／Ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０，５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ２Ｎａ，ｐＨ７．８］（以下、クロスリアクション測定反応用溶液と称する）を入れた物を５つ用意した。第１及び第２の反応カップに対照としてＤ．Ｗ．を１０μＬ添加し、第３の反応カップに、反応用溶液で１００ｎｇ／ｍＬに調製した前記抗ＣＡＰ２（４６０－４７５ペプチド）ポリクローナル抗体を１０μＬ添加し、第４の反応カップに、反応用溶液で１００ｎｇ／ｍＬに調製した前記抗ＣＡＰ２（４４０－４５３ペプチド）ポリクローナル抗体を１０μＬ添加し、第５の反応カップに、反応用溶液で１００ｎｇ／ｍＬに調製した前記抗ＣＡＰ２（３９７－４１０ペプチド）ポリクローナル抗体を１０μＬ添加した。

【００４０】

そこにクロスリアクション測定反応用溶液で０．５ｍｇ／ｍＬ濃度に希釈した４６０－４７５ペプチド結合磁気ビーズを２５μＬずつ添加し、３０℃で９分間反応させた（第一

反応）。

その後、磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、洗浄液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ，０．０１％（Ｗ／Ｖ）ｔｗｅｅｎ２０，０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．５］３５０μＬで２回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した（ＢＦ分離）。

【００４１】

次にクロスリアクション測定反応用溶液で０．２μｇ／ｍＬ濃度に希釈したルテニウム錯体標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を１００μＬ加えて３０℃で９分間反応させた（第二反応）。反応後の磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、洗浄液３５０μＬで２回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した（ＢＦ分離）。

【００４２】

その後、反応カップに３００μＬのトリプロピルアミンを入れ、磁気ビーズと混合した。この状態で電気エネルギーを与えることでルテニウム錯体が発光し、その発光強度を検出機で検出した。なお、上記の反応カップへの磁気ビーズ添加測定操作以降は、ルテニウム錯体発光自動測定機であるピコルミ８２２０（三光純薬（株）製）上で行った。

４６０－４７５ペプチド結合磁気ビーズを４４０－４５３ペプチド結合磁気ビーズ又は３９７－４１０ペプチド結合磁気ビーズに変えた以外は同一操作を行い、発光強度を測定した。発光強度の結果を表１に示した。

【００４３】

【表１】

(ECL Counts)

	CAP2 合成ペプチド結合磁気ビーズ中の各ペプチド		
	460-475 ペプチド	440-453 ペプチド	397-410 ペプチド
対照	77.3	92.4	80.1
対照	76.7	84.3	76.2
抗 CAP2(460-475)ポリクローナル抗体	12288.6	89.7	67.8
抗 CAP2(440-453)ポリクローナル抗体	71.3	89541.8	65.5
抗 CAP2(397-410)ポリクローナル抗体	83.4	2757.4	24728.5

【００４４】

表１に示した如く、４６０－４７５ペプチドに対する抗体である抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体は、４６０－４７５ペプチドとのみ反応し、また、４４０－４５３ペプチドに対する抗体である抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体は、４４０－４５３ペプチドとのみ反応しており、抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体及び抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体は、クロスリアクションを起こさない特異的な抗体であることがわかった。

【００４５】

（合成例２）

１）抗ＣＡＰ２モノクローナル抗体の作成

合成例１と同様に作成したＫＬＨ結合ペプチド複合体（４６０－４７５ペプチドのＫＬＨ複合体）１ｍｇ／ｍＬを７～８週齢のマウスＢＡＬＢ／ｃのフットパットに免疫した。細胞融合はリンパ細胞とミエローマを５：１に混合し、ＰＥＧ法を用い、培地（ＰＲＭＩ１６４０＋１０％ＦＢＳ）にリンパ細胞数約０．５～１．０×10^5cells／ウエルに播種した。４６０－４７５ペプチドを１μｇ／ｍＬになるようにＰＢＳにて調製した溶液にて固相化を行い、ＨＡＴ培地による選択培養で増殖したハイブリドーマの培養上清をＥＬＩＳＡによりスクリーニングを行った。２次抗体として抗マウスＩｇＧ　ＰＯＤ標識抗体（Jackson社製、Cat. No. 315-035-003）を用いた。クローニングは、スクリーニングで

得られた陽性ウエルを限界希釈法によって行い、ＥＬＩＳＡによるスクリーニングを行った。得られたハイブリドーマの培地から（ＰＲＭＩ１６４０＋１０％ＦＢＳ）培地に馴らし培養を行った。

【００４６】

モノクローナル抗体の腹水による産生：

前記ハイブリドーマをＲＰＭＩ１６４０＋１０％ＦＢＳで培養し、適切な量に達した後、ＲＰＭＩ１６４０で洗浄し、１．０×１０^{7}cells／ｍＬにＲＰＭＩ１６４０にて調製し、ＢＡＬＢ／ｃマウスに０．２ｍＬ／匹の量をマウス腹腔内に投与した。マウス腹水の貯留状態を確認し、注射針を用いて腹水を採取した。

【００４７】

産生された抗体の精製：

プロテインＡカラムを用いたAffi-Gel protein A MAPS II Kit（BIO-RAD社製 Cat. No. 153-6159）にて前記採取した腹水から抗体を精製した。すなわち、前記腹水２ｍＬと結合バッファー２ｍＬを混合した溶液を、ゲル２ｍＬをつめたカラムに吸着させ、結合バッファー２３ｍＬで洗浄したあと、溶出バッファー５ｍＬにて溶出し、８種類のモノクローナル抗体（１Ｂ７Ｇ９，１Ｃ７Ａ９，１Ｈ１Ｂ１１，３Ｄ５Ｂ４，５Ｆ４Ｅ２，７Ｂ５Ｆ１１，７Ｃ４Ｅ１１，７Ｆ２Ｇ２）を得た。得られた８種のモノクローナル抗体に対し、今後の検討に用いるために下記評価を行った。

【００４８】

２）モノクローナル抗体の評価

前記取得したモノクローナル抗体が、合成例１で合成した抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体とエピトープが同一であることを確認するために電気化学発光法を用いて分析を行った。

【００４９】

精製した各種モノクローナル抗体をルテニウム標識した。得られた８種類の抗体のうち、モノクローナル抗体（１Ｂ７Ｇ９）の標識を例に示す。他のモノクローナル抗体も同様な方法を用いてルテニウム標識した。

１Ｂ７Ｇ９抗体を１５０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．８）で１ｍｇ／ｍＬ抗体濃度に希釈した。１ｍｇ／ｍＬ抗体０．５ｍＬに１０ｍｇ／ｍＬのルテニウム錯体（IGEN社製、ORIGEN TAG-NHS ESTER）を１７．６μＬ加え、２５℃、３０分間攪拌した。その後、２ｍｏｌ／Ｌグリシンを３０μＬ添加し、２５℃、１０分間攪拌した。

次に、直径１ｃｍ、高さ３０ｃｍのガラス管に充填したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（ＧＥヘルスケア　バイオサイエンス社製、Sephadex G-25）に前記ルテニウム錯体標識抗体液をアプライし、未標識のルテニウム錯体とルテニウム錯体標識抗体を単離精製した。溶出は１０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）にて行った。

【００５０】

１００μＬの反応用溶液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ，０．２５％Ｎ１０１，０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，０．０１％（Ｗ／Ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０，５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ２Ｎａ，ｐＨ７．８］（以下、エピトープ測定反応用溶液と称する）を入れた反応カップを３つ用意し、その各反応カップに、反応用溶液で各濃度（０、０．５又は５μｇ／ｍＬ）に調製した合成例１で合成した抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体をそれぞれ１０μＬずつ添加した。そこに合成例１と同様に調製した４６０－４７５ペプチド結合磁気ビーズ（エピトープ測定反応用溶液で０．５ｍｇ／ｍＬ濃度に希釈）を２５μＬずつ添加し、すぐに前記調製したルテニウム標識したモノクローナル抗体（１Ｂ７Ｇ９）（１μｇ／ｍＬ）５０μＬを加え、３０℃で９分間反応させ、競合反応させた。

【００５１】

その後、磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、洗浄液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ，０．０１％（Ｗ／Ｖ）ｔｗｅｅｎ２０，０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．５］３５０μＬで２回磁気ビーズを洗浄し、反

応カップに３００μＬのトリプロピルアミンを入れ、磁気ビーズと混合した。この状態で電気エネルギーを与えることでルテニウム錯体が発光し、その発光強度を検出機で検出した。なお、上記の反応カップへの磁気ビーズ添加測定操作以降は、ルテニウム錯体発光自動測定機であるピコルミ８２２０（三光純薬（株）製）上で行った。

ルテニウム標識モノクローナル抗体（１Ｂ７Ｇ９）を他の７種のモノクローナル抗体に変えた以外は同一操作をそれぞれ行い、抗体のエピトープ分析の結果を得た。発光強度の結果を表２に示した。また、ポリクローナル抗体を含まない対照に対する阻害率をあわせて表２に示した。

【００５２】

【表２】

	ルテニウム標識した各モノクローナル抗体							
	1B7G9		1C7A9		1H1B11		3D5B4	
ポリクローナル抗体濃度(μg/mL)	蛍光強度	阻害(%)	蛍光強度	阻害(%)	蛍光強度	阻害(%)	蛍光強度	阻害(%)
0(対照)	45293.8	-	5556.3	-	46335.7	-	4150.0	-
0.5	2249.0	95	318.4	94	782.6	98	385.1	91
5	1461.1	97	250.1	95	82.7	100	103.4	98

	ルテニウム標識した各モノクローナル抗体							
	5F4E2		7B5F11		7C4E11		7F2G2	
ポリクローナル抗体濃度(μg/mL)	蛍光強度	阻害(%)	蛍光強度	阻害(%)	蛍光強度	阻害(%)	蛍光強度	阻害(%)
0(対照)	15247.7	-	4663.5	-	4315.4	-	4142.2	-
0.5	405.0	97	453.1	90	257.0	94	833.4	80
5	148.5	99	134.4	97	157.0	96	103.4	98

【００５３】

表２に示した如く、８種のモノクローナル抗体はいずれも抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体により阻害されており、モノクローナル抗体のエピトープが４６０－４７５部分であることが分かった。

【００５４】

（合成例３）ルテニウム標識抗アクチンモノクローナル抗体の調製

抗アクチン抗体として、シグマ社のモノクローナル抗体を含む腹水（Clone AC-40 Cat. No. A4700）より、プロテインＡカラムにて精製したものを用いた。該精製はAffi-Gel protein A MAPS II Kit（BIO-RAD社製、Cat. No. 153-6159）を用いて行った。結合バッファーであらかじめ平衡化したアフィゲルプロテインＡに、腹水０．４ｍＬと結合バッファー０．４ｍＬを混合した溶液を、ゲル２ｍＬをつめたカラムに吸着させ、結合バッファー２３ｍＬで洗浄したあと、溶出バッファー５ｍＬにて溶出し、抗体液を得た。

【００５５】

精製した抗アクチン抗体を１５０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．８）で１ｍｇ／ｍＬ抗体濃度に希釈した。１．４ｍｇ／ｍＬ抗体０．３ｍＬに１０ｍｇ／ｍＬのルテニウム錯体（IGEN社製、ORIGEN TAG-NHS ESTER）を５．７μＬ加え、２５℃、３０分間攪拌した。その後、２ｍｏｌ／Ｌグリシンを３０μＬ添加し、２５℃、１０分間攪拌した。

【００５６】

次に、直径１ｃｍ、高さ３０ｃｍのガラス管に充填したゲルろ過カラムクロマトグラフ

ィー（ＧＥヘルスケア　バイオサイエンス社製、Sephadex G-25）にルテニウム錯体標識抗体液をアプライし、未標識のルテニウム錯体とルテニウム錯体標識抗体を単離精製し、ルテニウム標識抗アクチンモノクローナル抗体を調製した。溶出は１０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）にて行った。

【００５７】

（実験例１）

第１抗体として合成例２で合成した８種の抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）モノクローナル抗体のいずれかを用い、第２抗体として合成例１で合成した抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ法により、合成ペプチド及びＣＡＰ２の存在がウエスタンブロットで明らかになっているAlexander細胞の免疫測定を行った。

【００５８】

抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）モノクローナル抗体結合磁気ビーズの調製：

合成例２で合成したモノクローナル抗体（１Ｂ７Ｇ９）を下記方法により磁気ビーズに固相し、１Ｂ７Ｇ９抗体結合磁気ビーズを調製した。他の７種のモノクローナル抗体も同様な方法を用いてそれぞれ磁気ビーズに固相した。

モノクローナル抗体（１Ｂ７Ｇ９）を１５０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．８）で０．３６ｍｇ／ｍＬ抗体濃度に希釈し、この抗体０．５ｍＬを、３０ｍｇ／ｍＬの磁気ビーズ（DYNAL社製、DYNABEADS M-450 Epoxy）０．５ｍＬと混合した。混合液を２５℃、１６時間攪拌し、磁気ビーズと抗体を結合させた。その後、この磁気ビーズ溶液より溶液のみを抜き取ることで、溶液中に残存していた磁気ビーズ未結合の遊離抗体を除去した。次に１ｍＬのブロッキング試薬（５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ，０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，５０％Ｎ１０１、０．５Ｍ　グリシン，０．１％アジ化ナトリウム，ｐＨ８．０）を前記抗体結合磁気ビーズに加え、４℃、２０時間攪拌した。その後、保存試薬（５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ，０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，２０％Ｎ１０１、０．５Ｍ　グリシン，０．１％アジ化ナトリウム，ｐＨ８．０）５ｍＬで磁気ビーズを洗浄（１ｍＬ２０％Ｎ１０１／５回洗浄）した。洗浄後の１Ｂ７Ｇ９抗体結合磁気ビーズは前述の保存試薬０．５ｍＬと混合し、使用時まで４℃で保存した。

【００５９】

ルテニウム錯体標識抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体の調製：

合成例１で合成した抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体をルテニウム錯体で標識し、ルテニウム錯体標識抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体を調製した。抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体のルテニウム錯体標識は、合成例２のモノクローナル抗体のルテニウム標識と同様の方法により行った。

【００６０】

Alexander細胞（５×１０^{5}個／dish）を１０ｃｍ　ｄｉｓｈで１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ（sigma社製）にて培養し、２４時間後に細胞接着を確認した後、無血清培地（Gibco社製、OPTI-MEM）に３回洗浄した。７日間培養した後、培地で洗浄した後に細胞を集めた。その後、細胞をＭ－ＰＥＲ（PIERCE社）２ｍＬを用いて溶解し、１２０００ｇ２０分の遠心後、上清を採取し、Alexander細胞Lysisとした。

【００６１】

サンドイッチ測定系に用いるペプチドは、合成例１で用いた２種類の合成ペプチド［４６０－４７５ペプチド（配列番号１）及び４４０－４５３ペプチド（配列番号２）］を結合して用いた。該２種のペプチドをＰＥＧ（polyethylene glycol）を用いて下記方法により連結した。０．１５Ｍ　リン酸バッファー（ｐＨ７．８）４５０μＬに４４０－４５３ペプチドを１．２ｍｇ溶解し、４４０－４５３ペプチドの２０倍量のＰＥＧ（PIERCE社製、NHS-PEO$_{8}$-Maleimide Crosslinkers）を混合し、６０分反応させた後、ゲルろ過クロマトグラフィー（Bio-Rad社製、Ｐ－４）にて分離した。分離した溶液に、還元処理をした４６０－４７５ペプチド２．４ｍｇを溶解した１ｍＭ　ＥＤＴＡを含む０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．０）２００μＬを加え、２５℃２時間反応させ、ゲルろ過クロマトグラフィー（Bio-Rad社、Ｐ－４）にて分離し、４４０－４５３ペプチド－ＰＥＧ－４６

０－４７５ペプチド結合体を作成した。なお、本実験では、結合する物質としてＰＥＧを用いたが、ＳＰＤＰなどの低分子の物質及びＫＬＨやＢＳＡなど高分子の物質を用いてもよい。

【００６２】

１００μＬの反応用溶液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ Ｈｅｐｅｓ－ＮａＯＨ，０．１％Ｎ１０１，５０ｍｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌ，０．０５％（Ｗ／Ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０，０．００５％ＣＴＡＢ，１ｍｍｏｌ／Ｌ ＥＤＴＡ４Ｎａ，０．２％マウスＩｇＧ，ｐＨ７．８］（以下、サンドイッチ測定反応用溶液と称する）を入れた４個の反応カップを用意し、その第１及び第２の反応カップに対照としてＤ．Ｗ．を１０μＬ、第３の反応カップに反応用溶液で１μｇ／ｍＬに調製した前記４４０－４５３ペプチド－ＰＥＧ－４６０－４７５ペプチド結合体を１０μＬ、及び第４の反応カップに前記Alexander細胞Lysisを５μＬ、それぞれ混合した。

【００６３】

そこに第１抗体として、サンドイッチ測定反応用溶液で０．５ｍｇ／ｍＬ濃度に希釈した１Ｂ７Ｇ９抗体結合磁気ビーズを２５μＬずつ添加し、３０℃で９分間反応させた（第一反応）。

その後、磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、洗浄液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ ＨＣｌ，０．０１％（Ｗ／Ｖ）ｔｗｅｅｎ２０，０．１５ｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌ，ｐＨ７．５］３５０μＬで２回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した（ＢＦ分離）。

【００６４】

前記ＢＦ分離後の反応カップに、第２抗体として、サンドイッチ測定反応用溶液で０．５μｇ／ｍＬ濃度に希釈したルテニウム錯体標識抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体を１００μＬ加えて３０℃で９分間反応させた（第二反応）。反応後の磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、洗浄液３５０μＬで２回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した（ＢＦ分離）。

【００６５】

その後、反応カップに３００μＬのトリプロピルアミンを入れ、磁気ビーズと混合した。この状態で電気エネルギーを与えることでルテニウム錯体が発光し、その発光強度を検出機で検出した。なお、上記の反応カップへの磁気ビーズ添加測定操作以降は、ルテニウム錯体発光自動測定機であるピコルミ８２２０（三光純薬社製）上で行った。

１Ｂ７Ｇ９抗体結合磁気ビーズを前記合成した他の７種のモノクローナル抗体が結合した磁気ビーズに変更した以外は同様の操作を行い、発光強度を測定した。発光強度の結果を表３に示す。

【００６６】

【表３】

(ECL Counts)

	抗体結合磁気ビーズ中の各モノクローナル抗体							
	1B7G9	1C7A9	1H1B11	3D5B4	5F4E2	7B5F11	7C4E11	7F2G2
対照	142.8	133.3	98.2	107.8	178.3	124.0	113.4	151.0
対照	132.8	137.7	94.9	107.1	176.8	133.2	119.9	158.8
ペプチド結合体	109488.6	12418.6	88798.2	13179.9	31381.2	14408.7	10155.1	10697.1
Alexander 細胞 Lysis	3383.0	1530.7	417.8	1028.6	819.7	1810.0	1186.6	2053.7

【００６７】

表３に示した如く、すべてのモノクローナル抗体は、エピトープが明らかな合成ペプチドと反応し、さらに、ＣＡＰ２の存在がウエスタンブロットで明らかになっているAlexan

der細胞との反応性も認められた。総合的に判断した結果、１Ｂ７Ｇ９抗体を以下の実施例１～３で用いた。

【００６８】

（実施例１）

第１抗体として、実験例１で用いた抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）モノクローナル抗体（１Ｂ７Ｇ９抗体）を磁気ビーズに結合させた１Ｂ７Ｇ９結合磁気ビーズを用い、第２抗体として、合成例１で合成した抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体をルテニウム錯体で標識したルテニウム錯体標識抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体を用いて、下記サンドイッチ法により血液中のＣＡＰ２を測定した。抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体のルテニウム錯体標識は、合成例２のモノクローナル抗体のルテニウム標識と同様の方法により行った。

【００６９】

標準品ＣＡＰ２として、Alexander細胞から調製した各濃度のＣＡＰ２を用いた。Alexander細胞の標準品調整は下記方法により行った。

Alexander細胞（５×１０^{5}個／dish）を１０ｃｍ　ｄｉｓｈで１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ（sigma社製）にて培養し、２４時間後に細胞接着を確認した後、無血清培地（Gibco社製、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ）に３回洗浄した。７日間培養した後、培地で洗浄した後に細胞を集め、１０^{7}個に調製した。その後、細胞をＭ－ＰＥＲ（PIRCE社）２．５ｍＬを用いて溶解し、１２０００ｇ、２０分の遠心後、上清を採取し、その上清をＣＡＰ２　１０００Ｕ／ｍＬとした。さらに、Ｍ－ＰＥＲにて１０倍希釈系列を作成し、それぞれ０（Ｍ－ＰＥＲ）、１、１０、１００、１０００Ｕ／ｍＬに調製し、標準品ＣＡＰ２とした。

【００７０】

反応カップに１００μＬの反応用溶液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｈｅｐｅｓ－ＮａＯＨ，０．１％Ｎ１０１，２５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，０．０５％（Ｗ／Ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０，０．００５％ＣＴＡＢ，１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ４Ｎａ，０．２％マウスＩｇＧ，ｐＨ７．８］（以下、サンドイッチ測定反応用溶液と称する）を添加し、その各反応カップに、標準品ＣＡＰ２（ＣＡＰ２濃度：０（Ｍ－ＰＥＲ）、１、１０、１００又は１０００Ｕ／ｍＬ）、健常人から採取した血清１０検体、ウイルス性慢性肝炎患者（ＣＨ）から採取した血清９検体、ウイルス性肝がん患者（ＨＣＣ）より採取した血清５検体、ＮＡＳＨ患者より採取した血清１１検体を１０μＬずつ混合した。

【００７１】

そこにサンドイッチ測定反応用溶液で１ｍｇ／ｍＬ濃度に希釈した１Ｂ７Ｇ９抗体結合磁気ビーズを２５μＬずつ添加し、３０℃で９分間反応させた（第一反応）。

その後、磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、洗浄液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ，０．０１％（Ｗ／Ｖ）ｔｗｅｅｎ２０，０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．５］３５０μＬで２回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した（ＢＦ分離）。

【００７２】

次に１００μＬのルテニウム用希釈溶液［５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｈｅｐｅｓ－ＮａＯＨ，０．１％Ｎ１０１，５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ，０．０５％（Ｗ／Ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０，０．００５％ＣＴＡＢ，１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ４Ｎａ，０．２％マウスＩｇＧ，ｐＨ７．８］で５μｇ／ｍＬ濃度に希釈したルテニウム標識抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体を１００μＬ加えて３０℃で９分間反応させた（第二反応）。

反応後の磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、洗浄液３５０μＬで２回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した（ＢＦ分離）。

【００７３】

その後、反応カップに３００μＬのトリプロピルアミンを入れ、磁気ビーズと混合した。この状態で電気エネルギーを与えることでルテニウム錯体が発光し、その発光強度を検出機で検出した。なお、上記の反応カップへの磁気ビーズ添加測定操作以降は、ルテニウ

ム錯体発光自動測定機であるピコルミ８２２０（三光純薬社製）上で行った。

【００７４】

図２は、標準品ＣＡＰ２の発光強度の結果をＣＡＰ２濃度に対してプロットしたものである。図２に示した如く、ＣＡＰ２検量線として使用可能な直線が得られた。該ＣＡＰ２検量線を用いて、各血清検体中のＣＡＰ２の量を算出した。各血清検体のＣＡＰ２量の結果を図３に示した。また、カットオフ値を４０Ｕ／ｍＬとしたＣＡＰ２陽性率を表４に示した。

【００７５】

【表４】

	陽性率
健常人	10% (1/10)
CH	11% (1/9)
HCC	60% (3/5)
NASH	45% (5/11)

【００７６】

（実施例２）

第２抗体として、ルテニウム標識抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体の代わりに、実験例１で用いたルテニウム錯体標識抗ＣＡＰ２（４４０－４５３）ポリクローナル抗体を用いた以外は実施例１と同様の操作を行い、血液中のＣＡＰ２を測定した。

実施例１と同じ血清検体（健常人から採取した血清１０検体、ウイルス性慢性肝炎患者（ＣＨ）から採取した血清９検体、ウイルス性肝がん患者（ＨＣＣ）より採取した血清５検体、ＮＡＳＨ患者より採取した血清１１検体）及び標準品ＣＡＰ２の発光強度を測定した後、該標準品ＣＡＰ２の測定結果をプロットして得た直線をＣＡＰ２検量線として用い、各血清検体中のＣＡＰ２の量を算出した。各血清検体のＣＡＰ２量の結果を図４に示した。また、カットオフ値を５５Ｕ／ｍＬとしたＣＡＰ２陽性率を表５に示した。

【００７７】

【表５】

	陽性率
健常人	10% (1/10)
CH	11% (1/9)
HCC	60% (3/5)
NASH	55% (6/11)

【００７８】

（実施例３）

第２抗体として、ルテニウム標識抗ＣＡＰ２（４６０－４７５）ポリクローナル抗体の代わりに、合成例３で合成したルテニウム標識抗アクチンモノクローナル抗体を用いた以外は実施例１と同様の操作を行い、血液中のＣＡＰ２を測定した。

実施例１と同じ血清検体（健常人から採取した血清１０検体、ウイルス性慢性肝炎患者（ＣＨ）から採取した血清９検体、ウイルス性肝がん患者（ＨＣＣ）より採取した血清５検体、ＮＡＳＨ患者より採取した血清１１検体）及び標準品ＣＡＰ２の発光強度を測定した後、該標準品ＣＡＰ２の測定結果をプロットして得た直線をＣＡＰ２検量線として用い、各血清検体中のＣＡＰ２の量を算出した。各血清検体のＣＡＰ２量の結果を図５に示した。また、カットオフ値を１００Ｕ／ｍＬとしたＣＡＰ２陽性率を表６に示した。

【００７９】

【表６】

	陽性率
健常人	10% (1/10)
CH	11% (1/9)
HCC	60% (3/5)
NASH	45% (5/11)

【００８０】

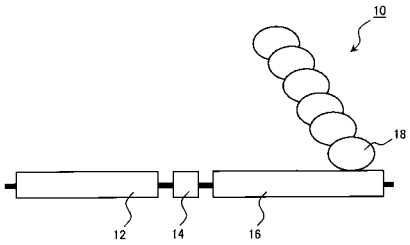
表４～６及び図３～５に示した如く、血中のＣＡＰ２量は、ＨＣＣ、ＮＡＳＨ患者は、健常人と比較して明らかに陽性率が高く、本発明により従来法よりも簡便にＣＡＰ２を測定することができ、肝臓疾患の検出に使用し得ることを確認した。また、本発明の方法により、測定されるＣＡＰ２の濃度は、肝臓疾患の状態を表す可能性が示唆された。

【符号の説明】

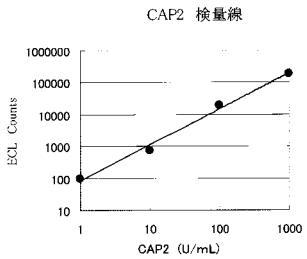
【００８１】

１０：ＣＡＰ２複合体、１２：アデニル酸シクラーゼに結合するドメイン、１４：ポリプロリン領域、１６：アクチンと相互作用を行うドメイン、１８：アクチン。

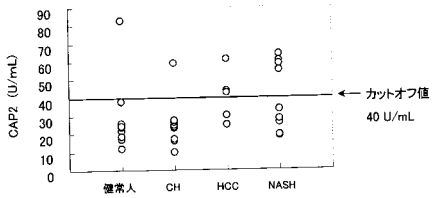
【図１】



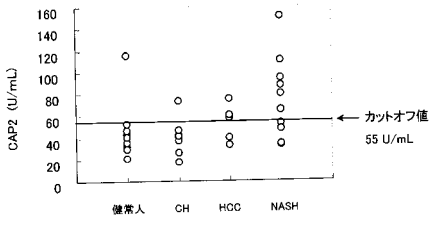
【図２】



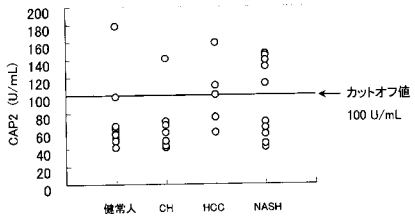
【図３】



【図４】



【図５】



【配列表】
0005557834000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　森　泰昌
東京都新宿区信濃町３５番地　慶應義塾大学医学部内
(72)発明者　浅井　智英
茨城県稲敷郡阿見町吉原３２６２－１２　エーディア株式会社内

審査官　長谷　潮

(56)参考文献　M. Sakamoto, Early HCC: diagnosis and molecular markers, J. Gastroenterology, ２００９年　2月２６日, Vol. 44, Suppl. 19, pp. 108-111
M. Sakamoto et al., Candidate Molecular Markers for Histological Diagnosis of Early Hepatocellular Carcinoma, Intervirology, ２００８年, Vol. 51, Suppl. 1, pp. 42-45
V. Peche et al., CAP2, cyclase-associated protein 2, is a dual compartment protein., Cell. Mol. Life Sci., ２００７年, pp. 2702-2715
G. Beale et al., AFP, PIVKAII, GP3, SCCA-1 and follisatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease, BMC Cancer, ２００８年　7月１８日, Vol.8: 200, ＵＲＬ, http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/200/

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／５３
Ｇ０１Ｎ　３３／５７４
Ｇ０１Ｎ　３３／６８
Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｉｒｅｃｔ

专利名称(译)	测量血液中CAP2的方法，肝脏疾病的检测方法和血液CAP2测定用检测试剂盒		
公开(公告)号	JP5557834B2	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	JP2011503872	申请日	2010-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾 エーディア株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾 エーディア株式会社		
[标]发明人	坂元亨宇 森泰昌 浅井智英		
发明人	坂元 亨宇 森 泰昌 浅井 智英		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/57438 G01N2800/085		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	石原伸介		
审查员(译)	潮长谷		
优先权	2009060966 2009-03-13 JP		
其他公开文献	JPWO2010104168A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种测量血液中CAP2的方法，一种检测肝脏疾病的方法，以及一种用于测量血液中CAP2的检测试剂盒，其可以检测肝脏疾病而不给患者带来负担。使用抗CAP2抗体通过免疫测定法测量血液中的CAP2。免疫测定方法优选为抗体夹心法。通过使用本发明的血液中CAP2的测定方法检测血液中的CAP2的量，可以检测肝脏疾病。用于测量本发明的血液CAP2的检测试剂盒包含抗CAP2抗体。

(ECL Counts)

	CAP2合成ペプチド結合磁気ビーズ中の各ペプチド		
	460-475ペプチド	440-453ペプチド	397-410ペプチド
対照	77.3	92.4	80.1
対照	76.7	84.3	76.2
抗CAP2(460-475)ポリクローナル抗体	12288.6	89.7	67.8
抗CAP2(440-453)ポリクローナル抗体	71.3	89541.8	65.5
抗CAP2(397-410)ポリクローナル抗体	83.4	2757.4	24728.5