

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/104168

発行日 平成24年9月13日 (2012.9.13)

(43) 国際公開日 平成22年9月16日 (2010.9.16)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

<p>出願番号 特願2011-503872 (P2011-503872)</p> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP2010/054184</p> <p>(22) 国際出願日 平成22年3月12日 (2010.3.12)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2009-60966 (P2009-60966)</p> <p>(32) 優先日 平成21年3月13日 (2009.3.13)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国 (JP)</p>	<p>(71) 出願人 899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目15番45号</p> <p>(71) 出願人 000175892 エーディア株式会社 東京都千代田区岩本町1-10-6</p> <p>(74) 代理人 100147935 弁理士 石原 進介</p> <p>(74) 代理人 100080230 弁理士 石原 詔二</p> <p>(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</p>
--	--

最終頁に続く

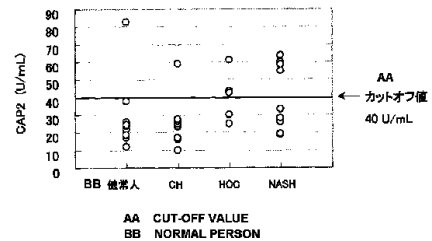
(54) 【発明の名称】 血中のCAP2の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中CAP2測定用検出キット

(57) 【要約】

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。

抗CAP2抗体を用いた免疫測定法により血中のCAP2を測定するようにした。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適である。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ができる。本発明の血中CAP2測定用検出キットは、抗CAP2抗体を含むものである。

【図3】



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗 C A P 2 抗体を用いた免疫測定法により血中の C A P 2 を測定することを特徴とする血中の C A P 2 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 C A P 2 抗体及び第 2 の抗 C A P 2 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 C A P 2 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 C A P 2 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 N A S H 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 C A P 2 を測定することにより肝臓疾患を検出するための血中 C A P 2 測定用検出キットであって、

抗 C A P 2 抗体を含むことを特徴とする血中 C A P 2 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 N A S H 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 C A P 2 (Cyclase-Associated Protein 2) の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中 C A P 2 測定用検出キットに関し、特に、血中の C A P 2 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。

10

20

30

40

50

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、早期肝がんとは背景肝との比較・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)。

10

【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。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

30

【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。

40

【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。

50

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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、プラスチック(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。

40

【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

50

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。

10

【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】

20

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。

30

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。

40

【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(pH 9.5)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

50

液を洗浄したゲルに加え、16時間25℃で攪拌した。その後、ペプチド溶液を取り除き、1 Mエタノールアミン (pH 8.0) 3 mL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、0.5 M NaClを含む0.1 M酢酸バッファー (pH 4.0) および0.5 M NaClを含む0.1 M Tris-HClバッファー (pH 8.0) 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1.2 mm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 (20 mMリン酸バッファー (pH 7.0)) を2.5 mLずつ混合し、0.22 μm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20 mMリン酸バッファー (pH 7.0) 20 mL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、0.5 M NaClを含む平衡化バッファーを加え、Abs 280 nmの吸光度が0.05以下になるまで流した。抗体の溶出には0.5 M NaClを含む0.1 MグリシンHCl (pH 2.5) 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

100 ng/mLの460-475、440-453および397-410それぞれのCAP2合成ペプチド1 mLを、30 mg/mLの磁気ビーズ (DYNAL Biotech社製、DYNABEADS M-450 Epoxy) 1 mL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。次にブロック剤として1 mL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3 mLのリン脂質ポリマー試薬で磁気ビーズを洗浄 (1 mL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150 mmol/Lリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で1 mg/mL抗体濃度に希釈した。1 mg/mL抗体0.5 mLに10 mg/mLのルテニウム錯体 (IGEN社製、ORIGEN TAG-NHS ESTER) を17.6 μL加え、25℃、30分間攪拌した。その後、2 mol/Lグリシンを30 μL添加し、25℃、10分間攪拌した。

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

10

20

30

40

50

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10 mmol/Lリン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）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。

500 µL容ポリプロピレンカップ（以下、反応カップ）に100 µLの反应用溶液[50 mmol/L Tris HCl, 1% BSA, 0.15 mol/L NaCl, 0.01% (W/V) Tween 20, 5 mmol/L EDTA 2Na, pH 7.8]（以下、クロスリアクション測定反应用溶液と称する）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10 µL添加し、第3の反応カップに、反应用溶液で100 ng/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10 µL添加し、第4の反応カップに、反应用溶液で100 ng/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10 µL添加し、第5の反応カップに、反应用溶液で100 ng/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10 µL添加した。

10

【0040】

そこにクロスリアクション測定反应用溶液で0.5 mg/mL濃度に希釈した460-475ペプチド結合磁気ビーズを25 µLずつ添加し、30 で9分間反応させた（第一反応）。

20

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[50 mmol/L Tris HCl, 0.01% (W/V) tween 20, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.5] 350 µL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应用溶液で0.2 µg/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100 µL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350 µL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）。

30

【0042】

その後、反応カップに300 µL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】

40

【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

10

【 0 0 4 4 】

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。

【 0 0 4 5 】

20

(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 K L H 結合ペプチド複合体 (460 - 475 ペプチドの K L H 複合体) 1 m g / m L を 7 ~ 8 週齢のマウス B A L B / 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マを 5 : 1 に混合し、P E G 法を用い、培地 (P R M I 1 6 4 0 + 1 0 % F B S) にリンパ細胞数約 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ cells / ウェルに播種した。460 - 475 ペプチドを $1 \mu g / m L$ になるように P B S にて調製した溶液にて固相化を行い、H A T 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 E L I S A 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 I g G P O D 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ェルを限界希釈法によって行い、E L I S A 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 (P R M I 1 6 4 0 + 1 0 % F B S) 培地に馴らし培養を行った。

30

【 0 0 4 6 】

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 R P M I 1 6 4 0 + 1 0 % F B S で培養し、適切な量に達した後、R P M I 1 6 4 0 で洗浄し、 1.0×10^7 cells / m L に R P M I 1 6 4 0 にて調製し、B A L B / c マウスに 0.2 m L / 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。

【 0 0 4 7 】

40

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 2 m L と結合バッファ 2 m L を混合した溶液を、ゲル 2 m L をつめたカラムに吸着させ、結合バッファ 23 m L で洗浄したあと、溶出バッファ 5 m L にて溶出し、8 種類のモノクローナル抗体 (1 B 7 G 9, 1 C 7 A 9, 1 H 1 B 1 1, 3 D 5 B 4, 5 F 4 E 2, 7 B 5 F 1 1, 7 C 4 E 1 1, 7 F 2 G 2) 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。

【 0 0 4 8 】

2) モノクローナル抗体の評価

50

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の反应用溶液[50mmol/L Tris HCl, 0.25% N101, 0.15mol/L NaCl, 0.01%(W/V) Tween 20, 5mmol/L EDTA 2Na, pH7.8](以下、エピトープ測定反应用溶液と称する)を入れた反応カップを3つ用意し、その各反応カップに、反应用溶液で各濃度(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(エピトープ測定反应用溶液で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) tween 20, 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】

10

20

30

【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(μ g/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

10

	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(μ g/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

20

【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 CAP 2 (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 0.4 mL と結合バッファー 0.4 mL を混合した溶液を、ゲル 2 mL をつめたカラムに吸着させ、結合バッファー 23 mL で洗浄したあと、溶出バッファー 5 mL にて溶出し、抗体液を得た。

30

【0055】

精製した抗アクチン抗体を 150 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で 1 mg/mL 抗体濃度に希釈した。1.4 mg/mL 抗体 0.3 mL に 10 mg/mL のルテニウム錯体 (IGEN 社製、ORIGEN TAG-NHS ESTER) を 5.7 μ L 加え、25、30 分間攪拌した。その後、2 mol/L グリシンを 30 μ L 添加し、25、10 分間攪拌した。

40

【0056】

次に、直径 1 cm、高さ 30 cm 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 10 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 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 CAP 2 (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 CAP 2 (440 - 45

50

3) 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。

10

20

【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(PIRCE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。

30

【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)450 μ L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-PEO₈-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)200 μ L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-460-475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。

40

【0062】

100 μ L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

50

1及び第2の反応カップに対照としてD.W.を10 μ L、第3の反応カップに反应用溶液で1 μ g/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10 μ L、及び第4の反応カップに前記Alexander細胞Lysisを5 μ L、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应用溶液で0.5mg/mL濃度に希釈した1B7G9抗体結合磁気ビーズを25 μ L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) tween 20, 0.15mol/L NaCl, pH7.5]350 μ L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应用溶液で0.5 μ g/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100 μ L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350 μ L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300 μ L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Alexander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、実施例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(5×10⁵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、10⁷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 10000U/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。

10

【0070】

反応カップに100μLの反应用溶液[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应用溶液と称する)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。

20

【0071】

そこにサンドイッチ測定反应用溶液で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)。

30

【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。

40

【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】

50

【表 4】

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

【0076】

10

(実施例 2)

第 2 抗体として、ルテニウム標識抗 C A P 2 (4 6 0 - 4 7 5) 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 C A P 2 (4 4 0 - 4 5 3) 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 C A P 2 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 1 0 検体、ウイルス慢性肝炎患者 (C H) から採取した血清 9 検体、ウイルス性肝がん患者 (H C C) より採取した血清 5 検体、N A S H 患者より採取した血清 1 1 検体) 及び標準品 C A P 2 の発光強度を測定した後、該標準品 C A P 2 の測定結果をプロットして得た直線を C A P 2 検量線として用い、各血清検体中の C A P 2 の量を算出した。各血清検体の C A P 2 量の結果を図 4 に示した。また、カットオフ値を 5 5 U / m L とした C A P 2 陽性率を表 5 に示した。

20

【0077】

【表 5】

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

30

【0078】

(実施例 3)

第 2 抗体として、ルテニウム標識抗 C A P 2 (4 6 0 - 4 7 5) 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 C A P 2 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 1 0 検体、ウイルス慢性肝炎患者 (C H) から採取した血清 9 検体、ウイルス性肝がん患者 (H C C) より採取した血清 5 検体、N A S H 患者より採取した血清 1 1 検体) 及び標準品 C A P 2 の発光強度を測定した後、該標準品 C A P 2 の測定結果をプロットして得た直線を C A P 2 検量線として用い、各血清検体中の C A P 2 の量を算出した。各血清検体の C A P 2 量の結果を図 5 に示した。また、カットオフ値を 1 0 0 U / m L とした C A P 2 陽性率を表 6 に示した。

40

【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】

10

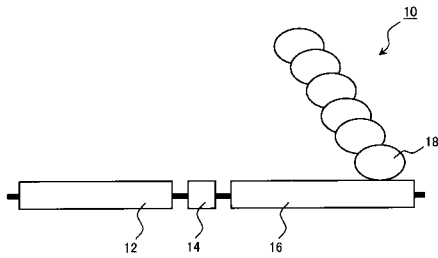
表 4 ~ 6 及び図 3 ~ 5 に示した如く、血中のCAP2量は、HCC、NASH患者は、健常人と比較して明らかに陽性率が高く、本発明により従来法よりも簡便にCAP2を測定することができ、肝臓疾患の検出に使用し得ることを確認した。また、本発明の方法により、測定されるCAP2の濃度は、肝臓疾患の状態を表す可能性が示唆された。

【符号の説明】

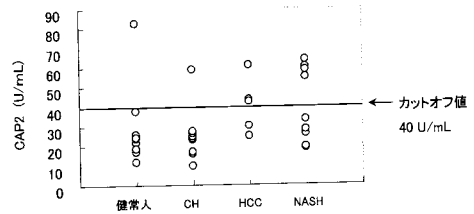
【0081】

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。

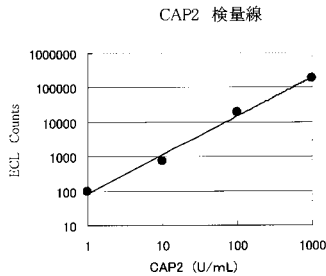
【図 1】



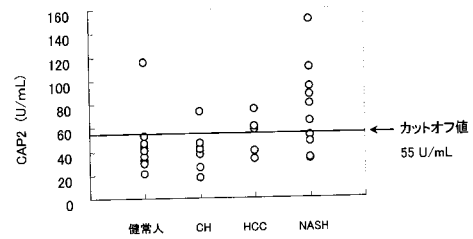
【図 3】



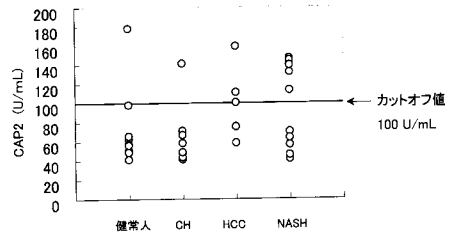
【図 2】



【図 4】



【 図 5 】



【 配列表 】

2010104168000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/054184
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/48-98		
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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	SAKAMOTO M. "Early HCC:diagnosis and molecular markers" J Gastroenterol, 2009.02, Suppl.19, p.108-111	1-3, 5, 6, 8, 10 /4, 9/7, 11
Y	PECHE V. et al "CAP2, cyclase-associated protein 2, is a dual compartmene protein" Cell.Mol.Life Sci. 2007, Vol.64, p.2702-2715	4, 9
<input 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 26 May, 2010 (26.05.10)		Date of mailing of the international search report 15 June, 2010 (15.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/054184									
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, G01N33/574(2006.01)i											
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. G01N33/48-98											
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>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010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	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010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) BIOSIS/MEDLINE (STN) JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)											
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/Y/A	SAKAMOTO M. "Early HCC:diagnosis and molecular markers" J Gastroenterol, 2009.02, Suppl.19, p.108-111	1-3, 5, 6, 8, 10 /4, 9 /7, 11									
Y	PECHE V. et al" CAP2, cyclase-associated protein 2, is a dual compartmentene protein" Cell, Mol. Life Sci. 2007, Vol. 64, p. 2702-2715	4, 9									
<input 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。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「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 「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) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 26.05.2010		国際調査報告の発送日 15.06.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 山村 祥子	2J 9217								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

フロントページの続き

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

(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

(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)	血液中cap2的测定方法，肝病的检测方法以及血液cap2的测定试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2010104168A1	公开(公告)日	2012-09-13
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 イーディア株式会社		
[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		
优先权	2009060966 2009-03-13 JP		
其他公开文献	JP5557834B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

测量血液中CAP2的方法，检测肝脏疾病的方法以及测量血液中CAP2的检测试剂盒，它们可以检测肝脏疾病而不会给患者带来负担。使用抗CAP2抗体通过免疫测定法测量血液中的CAP2。免疫测定法优选是抗体夹心法。使用本发明的血液中CAP2的测定方法，通过检测血液中CAP2的量，可以检测出肝脏疾病。本发明的用于测量血液CAP2的检测试剂盒包含抗CAP2抗体。

