

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-320255

(P2006-320255A)

(43) 公開日 平成18年11月30日(2006.11.30)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)		C 1 2 Q	1/42	4 B O 6 3
G O 1 N 33/573 (2006.01)		G O 1 N	33/573	A
G O 1 N 33/531 (2006.01)		G O 1 N	33/531	B

審査請求 未請求 請求項の数 25 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2005-146711 (P2005-146711)	(71) 出願人	000003975 日東紡績株式会社 福島県福島市郷野目字東1番地
(22) 出願日	平成17年5月19日 (2005.5.19)	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
		(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
		(72) 発明者	笹川 久美子 福島県郡山市富久山町福原字塩島1 日東 紡績株式会社バイオケミカル研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルカリ性ホスファターゼ6の測定方法およびそれに用いるキット

(57) 【要約】

【課題】 アルカリ性ホスファターゼ6の測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 検体中のアルカリ性ホスファターゼ6を測定するに際して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ6を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ性ホスファターゼ6を測定することにより、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を受けることなく、正確に検体中のアルカリ性ホスファターゼ6を測定することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法において、
膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 を測定することを特徴とする、

検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法。

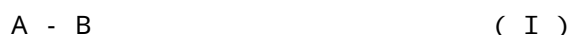
【請求項 2】

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質が、糖系非イオン性界面活性剤である請求項 1 の測定方法。

10

【請求項 3】

糖系非イオン性界面活性剤が、一般式 (I)



(式中、A は、ヒドロキシを 1 つ除いた糖残基、B は疎水性置換基を表す)

で表される請求項 2 の測定方法。

【請求項 4】

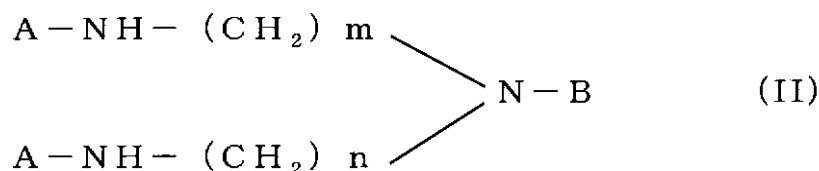
糖系非イオン性界面活性剤が、n-オクチル - D- マルトシド、n- デシル - D- マルトシド、n- ヘプチル - D- チオグルコシド、n- オクチル - D- チオグルコシド、n- オクチル - D- グルコシド、n- ドデシル - D- マルトシド、n- オクタノイル - N- メチルグルカミド、n- ノナノイル - N- メチルグルカミド、n- デカノイル - N- メチルグルカミド、スクロースモノカプレート (CAS 番号 31835-06-0) またはスクロースモノラウレート (CAS 番号 25339-99-5) である請求項 3 の測定方法。

20

【請求項 5】

糖系非イオン性界面活性剤が、一般式 (II)

【化 1】



30

(式中、2つの A はそれぞれ同じでも異なってもよいヒドロキシを 1 つ除いた糖残基、B は疎水性置換基、m、n はそれぞれ独立に 2 ~ 5 の自然数を表す)

で表される請求項 2 の測定方法。

【請求項 6】

糖系非イオン性界面活性剤が、N, N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル)コール酸アミド (CAS 番号 86303-22-2) または N, N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル)デオキシコール酸アミド (CAS 番号 86303-23-3) である請求項 5 の測定方法。

40

【請求項 7】

電気泳動法または ELISA 法により、アルカリ性ホスファターゼ 6 を測定する請求項 1 から 6 のいずれかの測定方法。

【請求項 8】

検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法であって、

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 と、アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分であるアルカリ性ホスフ

50

ァターゼ部位を認識するアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質と、アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分である免疫グロブリン部位を認識する免疫グロブリン部位認識物質とを反応させ、得られるアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質とアルカリ性ホスファターゼ 6 と免疫グロブリン部位認識物質との結合物のレベルからアルカリ性ホスファターゼ 6 を測定することを特徴とする、

アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法。

【請求項 9】

アルカリ性ホスファターゼ部位認識物質が、ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼと結合可能な物質である請求項 8 の測定方法。

【請求項 10】

ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼと結合可能な物質が、抗ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼモノクローナル抗体である請求項 9 の測定方法。

【請求項 11】

免疫グロブリン部位認識物質が、免疫グロブリンと結合可能な物質である請求項 8 から 10 のいずれかの測定方法。

【請求項 12】

免疫グロブリンと結合可能な物質が、抗ヒト免疫グロブリンモノクローナル抗体である請求項 11 の測定方法。

【請求項 13】

検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法であって、

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 とヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼに反応する抗体とを抗原抗体反応させ、次いで、得られる抗原抗体反応物と、アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分である免疫グロブリン部位を認識する免疫グロブリン部位認識物質とを反応させ、得られるヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼに反応する抗体とアルカリ性ホスファターゼ 6 と免疫グロブリン部位認識物質との結合物のレベルからアルカリ性ホスファターゼ 6 を測定することを特徴とする、

アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法。

【請求項 14】

免疫グロブリン部位認識物質が、免疫グロブリンと結合可能な物質である請求項 13 の測定方法。

【請求項 15】

免疫グロブリンと結合可能な物質が、抗ヒト免疫グロブリンモノクローナル抗体である請求項 14 の測定方法。

【請求項 16】

検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法であって、

i) 膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼをヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼに反応する抗体と抗原抗体反応させ、次いで、抗原抗体反応したヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼを、アルカリ性ホスファターゼ用酵素基質と反応させ、反応した酵素活性のレベルから、検体中のヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ活性を求め、

ii) 上記 i) とは独立に、請求項 8 から 15 のいずれかの方法により検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 のレベルを求め、

iii) 上記 i) で得られるヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ活性値と上記 ii) で得られるアルカリ性ホスファターゼ 6 のレベル値との乗法値を求め、その乗法値から検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の量を求める、

10

20

30

40

50

ことを特徴とする、

アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法。

【請求項 17】

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質が、請求項 2 から 6 のいずれかに記載の糖系非イオン性界面活性剤である請求項 1 から 16 のいずれかの測定方法。

【請求項 18】

虚血性腸疾患を診断するための請求項 1 から 17 のいずれかの測定方法。

【請求項 19】

検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 を測定するためのキットであって、

- i) 固相支持体、
- ii) アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分であるアルカリ性ホスファターゼ部位を認識するアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質、
- iii) アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分である免疫グロブリン部位を認識する、標識された免疫グロブリン部位認識物質、
- iv) 標識を検出するための成分、および
- v) 膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質を含むキット。

【請求項 20】

アルカリ性ホスファターゼ部位認識物質が、ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼと結合可能な物質である請求項 19 のキット。

【請求項 21】

ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼと結合可能な物質が、抗ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼモノクローナル抗体である請求項 20 のキット。

【請求項 22】

免疫グロブリン部位認識物質が、免疫グロブリンと結合可能な物質である請求項 19 から 21 のいずれかのキット。

【請求項 23】

免疫グロブリンと結合可能な物質が、抗ヒト免疫グロブリンモノクローナル抗体である請求項 22 のキット。

【請求項 24】

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質が、請求項 2 から 6 のいずれかに記載の糖系非イオン性界面活性剤である請求項 19 から 23 のいずれかに記載のキット。

【請求項 25】

虚血性腸疾患診断用である、請求項 19 から 24 のいずれかのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルカリ性ホスファターゼ 6 (以下、ALP6 と記載することもある) の測定方法およびそれに用いるキットに関する。更に詳細には、アルカリ性ホスファターゼ 6 を正確に測定する妨げとなる、膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解してその影響を無くしてもしくは低下させて、アルカリ性ホスファターゼ 6 を正確に測定することができる方法およびそれに用いるキットである。本発明の測定方法およびキットは、潰瘍性大腸炎などの腸疾患の臨床検査医学の分野において極めて有効となる。

【背景技術】

【0002】

アルカリ性ホスファターゼ (Alkaline Phosphatase:ALP) (EC.3.1.3.1) はリン酸モノエステルを加水分解する酵素のうちでアルカリ側に至適 pH をもち、活性中心に亜鉛イオ

10

20

30

40

50

ンを有する酵素の総称である。また生体中での機能は物質やエネルギー輸送、無機リン酸の供給、骨の石灰化に關与するものと考えられている。血清中においては主に肝型、骨型、小腸型、胎盤型や腫瘍型（Nagao 型、Reagan 型、Kasahara 型、胎児小腸型など）など臓器特異性を示すアイソザイムが存在し、これまでも肝胆道系疾患、骨疾患、腫瘍などの診断に広く用いられてきた。

しかし、血清中総 ALP 活性が広く用いられて有効である一方で、測定結果単独では疾患の特定に結びつきづらい。それには上記の血清中アイソザイムの問題がある。ALP の電気泳動をおこなうと 6、7 本のバンドが分離されるが、抗血清を用いて蛋白質としての抗原性から ALP を考察すると、臓器特異型（Tissue Specific ALP:TSALP）と臓器非特異型（Tissue-Non Specific ALP:TNSALP）の 2 種類に大きく分類される。臓器特異型（Tissue Specific ALP:TSALP）と呼ばれている胎盤型（ALP4）、小腸型（ALP5）、生殖細胞型の 3 種については、2q34-37 に存在する遺伝子によって産生されていることがわかっている。次に臓器非特異型（Tissue-Non Specific ALP:TNSALP）は肝、骨、腎、白血球に見られるタイプで同一のアミノ酸配列を有し、遺伝子 1p34-36.1 から発現することが知られている。その中でも肝型と骨型では同一遺伝子から転写調節の違いで二種類の mRNA が作られるが、酵素の成熟にしたがってまた全く同一の配列を持つようになることが知られている（非特許文献 1）。しかし、酵素に結合する糖鎖の違いから N 型糖鎖を 3 本持つ肝型（ALP2）と N 型糖鎖 2 本と O 型糖鎖 1 本をもつ骨型（ALP3）が電気泳動上で分けられると考えられる。さらに膜成分、GPI アンカーとの結合から ALP1、そして免疫グロブリンの結合から ALP6 が近接的に観察される。そしてこの全てのアイソザイム活性の総和が血清中 ALP 値として反映されるため、ALP 高値が疾患と一対一対応しにくい現状である。

【0003】

これらアイソザイムの総和としての ALP 測定では、使用される試薬の基質や緩衝液の種類、pH などにおいて活性が異なるため、近年標準化が盛んに行われるようになり、現在では国際臨床化学連合（IFCC）や日本臨床化学会（JSCC）から勧告法が提示されて総 ALP 測定値の標準化が進んでいる。しかしながら依然としてアイソザイム自体の標準検出法は未だに無い状況にある（非特許文献 2）。

アイソザイムの測定法としては、これまでに L-フェニルアラニンによる肝型、骨型（ALP2、3）の測定、L-ホモアルギニンによる胎盤型、小腸型（ALP4、5）の測定など阻害アミノ酸を利用してアイソザイムを測定する方法や（非特許文献 3）、加熱によって胎盤型（ALP4）活性だけを残し、ALP4 を特異的に測定する方法（非特許文献 4、非特許文献 5）、先に述べた肝型、骨型 ALP 糖鎖の差を利用してレクチンを利用し、肝型（ALP2）や骨型（ALP3）を測定する方法（非特許文献 6、非特許文献 7、非特許文献 8、非特許文献 9）、骨型 ALP（ALP3）に対する特異的モノクローナル抗体を使用する方法（非特許文献 10）などが開発されて、いくつかのアイソザイムは測定が可能となっている。しかし、イムノグロブリン結合型である ALP6 は臨床的にも意義が唱えられながら依然としてその絶対値を知る方法がないために電気泳動法から存在の有無を知ることで臨床診断に使用されている状況にある。

【0004】

はじめ、ALP6 は ALP 結合型イムノグロブリン（非特許文献 11）として Nagamine らによって、厚生労働省指定難治性疾患である潰瘍性大腸炎において発見された（非特許文献 12）。その後、加野らがこの ALP6 が病態を反映して増減することを報告し（非特許文献 13）、さらに 1981 年に菅野らが全国アンケートを行って病態解析をまとめた（非特許文献 14）。その結果、多くの症例が自己抗体であることがわかった。イムノグロブリンの結合するアイソザイム種については Crofton らが ALP6 のイムノグロブリン結合 ALP はそのほとんどが TNSALP であると報告している（非特許文献 15）。イムノグロブリンについても最近 Owen らがマクロ ALP に IgG の鎖が結合しているという報告をしている（非特許文献 16）。今日では一般に健常人では上記高分子複合体である ALP6 発現は低頻度であるが、他方総 ALP 活性が 1,000 単位以上にもなるような高活性の ALP

を含む血清には高頻度に ALP6 が検出されるようになること、また慢性関節リウマチや腫瘍などでも ALP6 が高値となることが知られている。このような状況において臨床的意義をより確立するために ALP6 をより正確に測定することが強く望まれている。

【0005】

【非特許文献1】Biochem Biophys Res Com 168,993-1000:1990

【非特許文献2】臨床検査 37(9), 1041-1044:1993

【非特許文献3】Histochem J. 13,941-951:1981

【非特許文献4】Prenat Diagn. 16,1051-1054:1996

【非特許文献5】Enzyme Protein. 49,313-203:1996

【非特許文献6】J Clin Pathol. 1992 45,68-71:1992

10

【非特許文献7】Clin Chem. 40,1749-1756:1994

【非特許文献8】Clin Chem. 42,1970-1974:1996

【非特許文献9】Calcif Tissue Int. 71:508-518:2002

【非特許文献10】Clin Chem 44,2139-2147:1998

【非特許文献11】Clin Chim Acta 65,39-46:1975

【非特許文献12】日消誌 73,162-168:1976

【非特許文献13】生物物理化学20,325:1977

【非特許文献14】酵素結合性免疫グロブリンの我が国での発症頻度ならびに分布に関する研究報告:1981

【非特許文献15】Clin Chim Acta 112,33-42:1981

20

【非特許文献16】Ann Clin Biochem 39,523-5:2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

臨床的意義をより確立するために ALP6 の精密測定が行われることが強く望まれた状況のなか、本発明者らは、検体として健常者血清と高 ALP 血清を用い、かつ、抗体として抗ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼモノクローナル抗体と抗ヒト IgG モノクローナル抗体を用いて、ALP6 の量を精密測定し、その結果が電気泳動法による ALP6 の判定結果とよく一致することを見出した。これに関しては、特開平 16 - 33385 号公報として既に出願公開されている。しかし、本発明者らの検討によると、この方法では、血清中に膜結合型 ALP (以下 ALP1; 膜成分、GPI アンカーと結合している) が存在する場合、ALP6 精密測定の影響となることがわかった。

30

本発明者らの研究によれば、電気泳動で ALP6 及び ALP1 が陽性となった検体中に、糖系非イオン性界面活性剤を添加し、電気泳動を行ったところ ALP1 の分解が確認されてそのバンドが消失し、かつ、ALP6 のバンドが残存していることが確認された。

また、検体として虚血性腸疾患患者血清を用い、その検体中に糖系非イオン性界面活性剤を添加し、抗体として、抗ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼモノクローナル抗体と抗ヒト IgG モノクローナル抗体との組合せを使用して ALP6 の量を精密測定したところ感度良く測定でき、虚血性腸疾患診断上、有用であることを見出した。従って、検体中に糖系非イオン性界面活性剤を添加した後に、抗体として、抗ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼモノクローナル抗体と抗ヒト免疫グロブリン抗体との組合せを使用して ALP6 の量を測定することで反応系中の他の ALP1 の影響を防ぎ精密測定することが可能となった。さらに、このような方法で ALP6 を精密測定することが、虚血性腸疾患診断により有効であることを見出した。本発明は、かかる知見により完成されたものである。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法において、

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ

50

性ホスファターゼ 6 を測定することを特徴とする、

検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法である。

【0008】

更に、本発明は、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法であって、

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 と、アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分であるアルカリ性ホスファターゼ部位を認識するアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質と、アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分である免疫グロブリン部位を認識する免疫グロブリン部位認識物質とを反応させ、得られるアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質とアルカリ性ホスファターゼ 6 と免疫グロブリン部位認識物質との結合物のレベルからアルカリ性ホスファターゼ 6 を測定することを特徴とする、

10

アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法である。

【0009】

更に、本発明は、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法であって、

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 とヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼに反応する抗体とを抗原抗体反応させ、次いで、得られる抗原抗体反応物と、アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分である免疫グロブリン部位を認識する免疫グロブリン部位認識物質とを反応させ、得られるヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼに反応する抗体とアルカリ性ホスファターゼ 6 と免疫グロブリン部位認識物質との結合物のレベルからアルカリ性ホスファターゼ 6 を測定することを特徴とする、

20

アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法である。

【0010】

更に、本発明は、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法であって、

i) 膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼをヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼに反応する抗体と抗原抗体反応させ、次いで、抗原抗体反応したヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼを、アルカリ性ホスファターゼ用酵素基質と反応させ、反応した酵素活性のレベルから、検体中のヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ活性を求め、

30

ii) 上記 i) とは独立に、上記のいずれかの方法により検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 のレベルを求め、

iii) 上記 i) で得られるヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ活性値と上記 ii) で得られるアルカリ性ホスファターゼ 6 のレベル値との乗法値を求め、その乗法値から検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 の量を求める、

40

ことを特徴とする、

アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法である。

【0011】

更に、本発明は、検体中のアルカリ性ホスファターゼ 6 を測定するためのキットであって、

i) 固相支持体、

ii) アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分であるアルカリ性ホスファターゼ部位を認識するアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質、

iii) アルカリ性ホスファターゼ 6 の構成成分である免疫グロブリン部位を認識する、標識された免疫グロブリン部位認識物質、

50

iv) 標識を検出するための成分、および

v) 膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ6を分解しない物質を含むキットである。

【発明の効果】

【0012】

本発明の測定方法により、これまで使用されてきた方法よりも更に精密に ALP6 を測定することができる。例えば、検体に、膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ6を分解しない物質である糖系非イオン性界面活性剤を添加し、ヒト血清中に存在する膜結合型 ALP の影響を除いた後に、ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ (TNSALP) 以外のアイソザイムと殆ど反応しない第一のモノクローナル抗体として、抗 TNSALP モノクローナル抗体を用い、第二のモノクローナル抗体として、ALP6 の構成成分である免疫グロブリン部位と反応する標識抗ヒト IgG モノクローナル抗体を利用することにより、またはこれら 2 種の抗体を組み合わせることで、膜結合型等の ALP の影響を殆ど受けず、ALP6 を特異的に測定することができる。

10

本発明による ALP6 の測定は虚血性腸疾患のような臨床診断薬としても利用可能であり、また自己抗体のメカニズムなど基礎医学の発展にも貢献し利用できるものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の測定方法は、膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ6を分解しない物質により、検体中に存在する膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解して、膜結合型アルカリ性ホスファターゼの影響を無くしてもしくは低下させて、検体中のアルカリ性ホスファターゼ6を測定することを特徴とするものであり、このような特徴を有する本発明の測定方法により、検体中のアルカリ性ホスファターゼを正確に測定できる。

20

本発明において、検体とは、アルカリ性ホスファターゼ6を含む可能性のある液体または混合物であれば特に限定しないが、通常、血液、血清、血漿、尿等の生体内試料が好適である。

本発明において、膜結合型アルカリ性ホスファターゼとは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (例えば、常光のアルフォーを用いる電気泳動法 (医学のあゆみ、741-42、Vol. 155、No.11・12、1990(12-22); Medical Technology (別冊電気泳動法のすべて)、101-109(1991)) で ALP1 のバンドに由来する ALP をいう。なお、ALP1 は、そのほとんどが細胞膜断片を持っているといわれている。

30

本発明において、アルカリ性ホスファターゼ6とは、免疫グロブリン結合性アルカリ性ホスファターゼのことであり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (例えば、常光のアルフォーを用いる電気泳動法) で ALP6 のバンドに由来する ALP をいう。本明細書では ALP6 とそのまま記載することもある。

【0014】

本発明において、膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ6を分解しない物質とは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (例えば、常光のアルフォーを用いる電気泳動法) で ALP1 バンドと ALP6 バンドを有する検体にその物質を添加付して該電気泳動に付したときに、ALP1 のバンドは消失するが、ALP6 のバンドは残存するようになる物質であれば、特に限定しない。

40

そのような物質として、例えば、糖系非イオン性界面活性剤を例示できる。本発明において使用できる糖系非イオン性界面活性剤は、糖部分を有する非イオン性界面活性剤であれば特に限定しないが、親水性部分として糖残基、疎水性部分として疎水性置換基を有するものが好ましい。そのような糖系非イオン性界面活性剤として、例えば、一般式 (I)

A - B (I)

(式中、A は、ヒドロキシを 1 つ除いた糖残基、B は疎水性置換基)

で表される糖系非イオン性界面活性剤が挙げられる。

50

、Tris 緩衝液、グッドバッファーなどの緩衝液に、通常 0.1 から 10 % の濃度に溶解して、その溶解液を検体に添加する。検体に添加する溶解液の量には、特に制限はないが、通常、検体に対して 10 から 20 容量%を加える。

検体に添加後に、そのまま、通常のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定に付してもよく、また、添加後に、室温で、1 時間から 24 時間の間、放置した後に、通常のアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定に付してもよい。

【0018】

アルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法としては、通常の方法をそのまま採用することができる。具体的には、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（例えば、常光のアルフォーを用いる電気泳動法（医学のあゆみ、741-42、Vol.155、No.11・12、1990(12-22)）；Medical Technology（別冊電気泳動法のすべて）、101-109(1991)）、ELISA 法（特開 2004-33385 号公報）によるアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法を例示できる。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法としては、例えば、常光のアルフォーを用いるポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法（医学のあゆみ、741-42、Vol.155、No.11・12、1990(12-22)；Medical Technology（別冊電気泳動法のすべて）、101-109(1991)）が挙げられる。このポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、7 % 程度のポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法であり、測定するに際して、血清などの検体に、糖系非イオン性界面活性剤等の膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質を添加することにより、検体中の目的とするアルカリ性ホスファターゼ 6 を、より特異的に正確に検出できる。

【0019】

ELISA 法によるアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定方法としては、例えば、ALP6 の構成成分であるアルカリ性ホスファターゼ部位を認識するアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質と、ALP6 の構成成分である免疫グロブリン部位を認識する免疫グロブリン部位認識物質とを反応させ、得られるアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質と ALP6 と免疫グロブリン部位認識物質との結合物のレベルから ALP6 を測定する方法が挙げられる。

ここでアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質とは、ALP6 中のアルカリ性ホスファターゼ部位と結合可能な物質をいう。具体的には、肝臓由来 ALP、骨由来 ALP 等のヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ（TNSALP）に結合可能な物質を例示できる。ヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ（TNSALP）は、通常、遺伝子 1P34-36.1 から発現する蛋白質を指すが、一般的には、肝型 ALP（ALP2）、骨型 ALP（ALP3）、腎臓型 ALP、白血球型 ALP を例示できる。TNSALP に結合可能な物質としては、TNSALP に対する抗体が好ましく挙げられる。抗体としては、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよい。ALP6 を正確に測定するためには、TNSALP に特異的なモノクローナル抗体であることが好ましい。具体的には、後述する参考例 1 に示すように、同じ酵素活性量の小腸型、胎盤型、肝臓型および骨型 ALP と反応させた時に、小腸型 ALP と反応する ALP 酵素活性値と胎盤型 ALP と反応する ALP 酵素活性値との和が、肝臓型 ALP と反応する ALP 酵素活性値と骨型 ALP と反応する ALP 酵素活性値との和の 1/10 以下である抗ヒト TNSALP モノクローナル抗体が好ましい。特に、骨型 ALP と反応する ALP 酵素活性値が、肝臓型 ALP と反応する ALP 酵素活性値の 0.7 以下である抗ヒト TNSALP モノクローナル抗体が更に好ましい。本発明に使用可能な抗ヒト TNSALP 抗体としては、本発明者が確立し製造法を後述する製造例 1 で示すモノクローナル抗体 3-29-3R や 2C5-32 および 1A5-7 を例示でき（特開 2004-33385 号公報）、モノクローナル抗体 3-29-3R および 2C5-32 が好ましい。また、HLMS - 1、HLMS - 2、HLMS - 3、HLMS - 4（以上、特開平 2-35098 号公報）等のモノクローナル抗体も好ましく、それらと類似している既知の抗 TNSALP モノクローナル抗体も使用可能である。

【0020】

本発明において、免疫グロブリン部位認識物質とは、ALP6 中の免疫グロブリン部位と結合可能な物質をいう。好ましくは IgG1 に結合可能な物質、具体的には、IgG1 に対する抗体である。抗体としては、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれ

れでもよいが、特に抗ヒト IgG1 モノクローナル抗体が好ましい。また、IgG1 に結合可能な物質として、プロテイン G、プロテイン A も例示できる。この場合、上記したアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質として抗体を用いるとき、あらかじめ、その抗体中の CH₂CH₃ 部位をブロックしておき、プロテイン G 等がその抗体には結合しないようにしておくことはもちろん必要である。

以上に記載した、例えば TNSALP あるいは IgG1 に対する抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、それ自体周知の方法により調製することができる。IgG1 に対する抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、市販品を利用することもできる。

【0021】

以上に説明したような抗 TNSALP モノクローナル抗体等のアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質と、抗 IgG1 モノクローナル抗体等の免疫グロブリン部位認識物質とを、検体中の ALP6 と反応させ、得られるアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質と ALP6 と免疫グロブリン部位認識物質との結合物のレベルを求めることにより、検体中の ALP6 を測定することができる。より具体的には、例えば ELISA 法により、検体中の ALP6 と抗ヒト TNSALP モノクローナル抗体とを抗原抗体反応させ、次いで、得られる抗原抗体反応物と抗 IgG1 モノクローナル抗体とを反応させ、得られる抗ヒト TNSALP モノクローナル抗体と ALP6 と抗 IgG1 モノクローナル抗体との結合物のレベルから検体中の ALP6 を測定することができる。

ELISA 法により、抗原抗体反応した結合物のレベルを求めるためには、抗 IgG1 モノクローナル抗体などの免疫グロブリン部位認識物質としては、標識された免疫グロブリン部位認識物質を用いることが好ましい。標識法としては、通常、免疫測定法で標識に使用できるものであれば、とくに限定しないが、ペルオキシダーゼ等の酵素、放射線同位元素、蛍光物質、磁性物質、コロイドなどでもよい。

【0022】

例えば、サンドイッチアッセイ ELISA 法により実施する具体例は、以下の通りである。まず一次抗体として、アルカリ性ホスファターゼ部位認識物質である抗 TNSALP モノクローナル抗体を、固相支持体、例えば、プレートに吸着させ、血清などの検体中の ALP6 のアルカリ性ホスファターゼ部位と反応させ、固相支持体を洗浄する。次いで、吸着した ALP6 の免疫グロブリン部位と、二次抗体として、免疫グロブリン部位認識物質である、例えばビオチン化した抗 IgG1 モノクローナル抗体とを反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、ペルオキシダーゼ酵素反応、次いで、発色反応を行うことにより、ALP6 を検出することができる。また、二次抗体として、直接、HRP 等のペルオキシダーゼにより酵素標識した抗 IgG1 モノクローナル抗体を用いることにより、ALPと二次抗体と反応させた後、標識酵素に対する基質、例えば、OPD (o-フェニレンジアミン)、DAB (ジアミノベンジジン)、TMB (テトラメチルベンジジン) 等と更に反応させて発色させることにより、ALP6 を検出することもできる。また、二次標識抗体に結合させる標識物質は測定方法によって酵素に限られるものではなく、放射線同位元素、蛍光物質、磁性物質、コロイドなどでもよい。

【0023】

上記以外の測定方法としては、上記した測定方法により検体中の ALP6 のレベルを求め、他方それとは独立に、検体中のヒト臓器非特異型アルカリ性ホスファターゼ (TNSALP) 活性を求め、検体中の ALP6 のレベル値と検体中のヒト TNSALP 活性値との乗法値を求め、その乗法値から検体中の ALP6 の量を求めることもできる。この乗法値を利用する方法の場合には、上記した測定方法により検体中の ALP6 のレベルを求める際に実施する、検体中の ALP6 と一次抗体であるヒト TNSALP に対する抗体との抗原抗体反応において、検体中に存在する ALP6 以外の他の ALP との競争反応の影響を考慮することができ、従って上記の乗法値は、検体中の ALP6 の実際の存在量をより反映した値となる。

この乗法値を利用する測定方法において、検体中のヒト TNSALP 活性を求めるには、検体中のヒト TNSALP をヒト TNSALP に反応する抗体と抗原抗体反応させ、次いで、抗原抗

10

20

30

40

50

体反応したヒト TNSALP を、アルカリ性ホスファターゼ用酵素基質と反応させ、反応した酵素活性のレベルから、検体中のヒト TNSALP 活性を求めることにより実施できる。アルカリ性ホスファターゼ用酵素基質としては、通常用いられる基質を用いることができる。例えば、フェニルリン酸などの発色基質を、抗原抗体反応したヒト TNSALP と酵素反応させて発色させ、吸光度を測定することにより、検体中のヒト TNSALP を求めることができる。

【0024】

本発明において、上記したように、例えば ELISA 法により検体中の ALP6 の測定を行うときは、ELISA 用のキットを用いて実施することができる。ELISA 法で本発明の測定方法を実施するときは、例えば、ALP6 を測定するためのキットであって、i) 固相支持体、ii) TNSALP に対するモノクローナル抗体等のアルカリ性ホスファターゼ部位認識物質、iii) 抗 IgG1 モノクローナル抗体等の標識された免疫グロブリン部位認識物質、iv) 標識を検出するための成分、および v) 膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質を含むキットを用いることによって、正確に効率良く ALP6 を測定することができる。

10

膜結合型アルカリ性ホスファターゼを分解するがアルカリ性ホスファターゼ 6 を分解しない物質としては、前記した各種の糖系非イオン性界面活性剤を用いることができる。これらの界面活性剤は、通常用いられる緩衝液に溶解させた形態で、キットに含ませることができる。

標識を検出するための成分とは、抗体が標識されたものを測定するための成分で、標識がビオチンの場合、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、テトラメチルベンジジンのペルオキシダーゼ酵素基質、及び過酸化水素水を含む試薬であり、標識がペルオキシダーゼの場合、OPD (o-フェニレンジアミン)、DAB (ジアミノベンジジン)、TMB (テトラメチルベンジジン) 等のペルオキシダーゼ基質を含む試薬である。このキットには、必要に応じ、洗浄剤液含んでもよい。本発明において、このキットを使用するときは、検体中の ALP6 を一次抗体に結合させた後、固相支持体に吸着しなかった成分を除去するために、洗浄液を含むことが好ましい。洗浄液としては、例えば、界面活性剤を含むトリス緩衝液を使用することができる。さらに、本発明のキットには、必要に応じ、検体希釈液を加えて含むこともできる。検体希釈液としては、例えば、トリス等緩衝液を使用できる。その緩衝液には、必要に応じて、EDTA・2Na 等のキレート剤、食塩等の無機塩を加えてもよい。

20

30

【0025】

以下、本発明を製造例、参考例、実施例、比較例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの例に何ら限定されるものではない。

実施例 1 ~ 6 および比較例 1 ~ 4

ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動によるアルカリ性ホスファターゼ 6 の測定

ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法で、ALP1 および ALP6 が陽性だったヒト血清を用い血清中に糖系非イオン性界面活性剤を添加し、それをディスク電気泳動で泳動し膜結合型 ALP (ALP1) の分解を確認した。また、ELISA 法により OD 値の変化も確認した。以下に詳述する。

40

各種の糖系非イオン性界面活性剤を用い、それぞれを 10mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) で 10 % の濃度になるように溶解した。それぞれの 10 % 界面活性剤溶液及び 10 mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) 50 μ L にヒト血清 200 μ L を加えよく攪拌し、それを検体としディスク電気泳動を行なった。ディスク電気泳動は ALP アイソザイム検出キット「アルフォー」(常光)を用いた。電気泳動の結果を表 1 と図 1 に示す。

【0026】

【表 1】

表 1

	界面活性剤	ALP1	ALP6
実施例 1	スクロースモノラウレート	×	○
実施例 2	N-ドデシル-β-D-マルトシド	×	○
実施例 3	N-オクチル-β-D-グルコシド	×	○
実施例 4	N-ヘプチル-β-D-チオグルコシド	×	○
実施例 5	N-ナノイル-N-メチルグルカミド	×	○
実施例 6	N, N-ビス (3-D-グルコンアミドプロピル) コール酸アミド	×	○
比較例 1	なし	○	○
比較例 2	コール酸ナトリウム	○	○
比較例 3	3- [(3-コールアミドプロピル) ジメチルアンモニオ] プロパンスルホン酸 (CAS 番号 75621-03-3)	○	○
比較例 4	Triton X-100 (p-t-オクチルフェノキシ) ポリエトキシエタノール	×	×

注) ○ : バンドが残存、× : バンドが消失

【 0 0 2 7 】

表 1 に示すように、糖系非イオン性界面活性剤を添加した実施例 1 ~ 6 では、ALP1 のバンドを消失させるが、ALP6 のバンドをそのまま残すことが判明した。すなわち、電気泳動法で ALP6 を測定するとき、糖系非イオン性界面活性剤を用いると正確に判別できることがわかった。一方、比較例 2 ~ 4 に示すように、その他の界面活性剤では、そのような効果を有するものはなかった。

【 0 0 2 8 】

製造例 1

ALP6 測定に用いる抗ヒト TNSALP モノクローナル抗体 3-29-3R の製造

ALP6 測定に用いる TNSALP モノクローナル抗体 3-29-3R は、特開 2 0 0 4 - 3 3 3 3 8 5 号公報に記載する方法により製造した。

(1) モノクローナル抗体作製用抗原の選択と準備

本発明者らは抗ヒト TNSALP モノクローナル抗体作成のための抗原として、TNSALP を発現していることが知られているヒト骨芽細胞株 Saos-2 由来の ALP を精製した。以下に精製法を述べる。

Saos-2 (HTB-85) は ATCC (American Type Culture Collection) より入手し、10 % 牛胎児血清 (FCS) を含む -MEM (大日本製薬) にて培養した。80 % 程度細胞がコンフルエントになったら、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) にて 3 回ディッシュを洗浄し、0.5 % アデカトール S0-135 を含む 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) を加えた。ラバーポリスマンを使用して上記細胞を回収し、氷上にて超音波ホモジナイザーにて 1 分間ホモジナイズした。その細胞破砕液を遠心分離 (22,000 rpm 30 min RT) 操作してその上清を 40 % 硫酸分画した。遠心分離 (10,000 rpm 30 min RT) を行って、その上清に硫酸を追加溶解して 60 % 硫酸となるように調整し再分画を行った。この 40-60 % 硫酸分画沈殿を 50 mM

トリス緩衝液 (pH 7.5) に再溶解して 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) に対して透析した。透析済みサンプルを DEAE カラム (アマシャムバイオサイエンス社) にアプライし、吸着したタンパク質は NaCl を含む上記トリス緩衝液の直線濃度勾配 (0-0.5 M NaCl) で溶出した。

ピークの ALP 活性は日立 7150 自動分析装置を使用して、N-アッセイ ALP - LS 試薬 (日東紡) を用いて測定した。活性のあったフラクションは限外ろ過法によって濃縮し、S-300 カラム (アマシャムバイオサイエンス) によって精製した。この活性フラクションを先の DEAE と同様に濃縮して SDS-PAGE により確認するとほぼ TNSALP がメジャーになっており、これを免疫用抗原として使用した。

【0029】

10

(2) 免疫

精製 TNSALP を 1 mg/mL となるように 50 mM トリス酸緩衝液 (pH 7.5) で希釈し、50 µg (50 µL) をとってフロインド完全アジュバンド (WAKO) 50 µL と乳化するまでよく混和した。調製した懸濁液を Balb/c 6 週齢雌マウス (日本クレアー) にジエチルエーテル麻酔下にて腹腔内投与した。2 週間後には同量の TNSALP (50 µg/mL) をフロインド不完全アジュバンド (和光純薬) と混和してフロインド完全アジュバンドの時と全く同様の操作により乳化懸濁液とし、それぞれマウスに感作した。以降 2 週間後に同様の操作を行い、4 回目には最終免疫として TNSALP 50 µg/mL を 50 mM トリス酸緩衝液 (pH 7.5) で調製しマウス尾静脈注射により投与した。

【0030】

20

(3) ハイブリドーマの確立

最終免疫より 3 日後に TNSALP により感作済みのマウスよりジエチルエーテル麻酔下に外科的摘出された脾臓を無菌的に分散し脾臓細胞を調製した。融合はケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495, 1975) に従って行われ、ポリエチレングリコール (PEG4000) (メルク社) を用いて脾細胞と骨髄腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) を融合した。その融合比率は脾臓細胞数 10×10^7 個に対して骨髄腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 2×10^7 個で、5:1 であった。融合細胞は 10% FCS (インビトロジェン) - MEM (アーバイン) HAT (コスモバイオ) 培地に分散し 96 穴マイクロタイターカルチャープレート (住友ベークライト) に分注して 37 °C、5% CO₂ 条件にて培養した。

【0031】

30

(4) スクリーニング

約 2 週間後にコロニーの生育を確認してスクリーニングを実施した。スクリーニングの実施法を以下に述べる。

スクリーニング用プレートを作製するために上記 (1) にて精製した TNSALP を 50 mM トリス酸緩衝液中に溶解し、0.5 µg/100 µL/well となるように 96 穴ウエル (ヌンク社) に分注した。プレートを 4 °C で 2 晩静置した後に 0.05% Tween 20 を含むトリス緩衝液で 3 回洗浄し、非特異的応答を抑えるために 1.5% BSA 溶液を 200 µL 分注して、更に 4 °C で 1 晩静置した。完成したプレートを 0.05% Tween20 を含むトリス緩衝液で 3 回洗浄した後に培養上清 100 µL を反応させ、更に洗浄を行った後に二次抗体である HRP 標識抗マウス IgM ノグロブリン抗体 (ザイメッド社) を加えて反応させた。洗浄後に HRP の発色基質である 3 mg/mL o-フェニレンジアミン (OPD) (ナカライテスク社) クエン酸発色溶液を 100 µL 加えて一定時間の発色後、1 N 硫酸を停止液として更に 100 µL 添加し、測定波長 492 nm にて吸光度を測定した。上記のようにして陽性になったクローンは限界希釈法によって再クローニングされ上清を再度チェックした。

40

【0032】

(5) 抗体の確認

ELISA によって精製 TNSALP との反応性を確認し、クローン 3-29-3R が TNSALP を認識したものとして選択した。得られたモノクローナル抗体のクラスは IgG1 であり、軽鎖は κ であった。

【0033】

50

(6) モノクローナル抗体の作製および精製

上記(5)で得られたハイブリドーマ 3-29-3R 細胞 1×10^7 細胞個をプリスタン(アルドリッチ社) 0.5 mL 投与後 2 週間の Balb/c マウス(日本クレーア社)、10 週齢、雌性に腹腔内投与し、約 2 週間後にマウス腹腔内に貯留した腹水をジエチルエーテル麻酔下にて外科的に採取した。スクリーニングで行った ELISA 法により、腹水をサンプルとして段階希釈して確認すると高濃度のモノクローナル抗体が含まれていた。この腹水を硫酸 40% で処理し、PBS に透析した後、プロテイン G カラム(アマシャムバイオサイエンス社)により精製して SDS-PAGE により確認した。その結果 3-29-3R は非還元では分子量約 150,000 に単一の、メルカプトエタノール還元では分子量約 50,000 のバンドと 25,000 の 2 本のバンドが確認された。精製されたモノクローナル抗体 3-29-3R はマウス 1 匹あたりそれぞれ約 10 mg 以上であって工業的利用を行うには十分量であった。

10

ハイブリドーマ 3-29-3R は、平成 15 年 4 月 16 日に工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号 FERM BP-8360 として寄託されている。

【0034】

参考例 1

抗ヒト TNSALP モノクローナル抗体の特異性検定

モノクローナル抗体 3-29-3R の特異性を調べるためにさまざまなアイソザイム(Saos-2 由来 TNSALP、肝型 ALP(常光)、骨型 ALP(常光)、小腸型 ALP(常光)、胎盤型 ALP(シグマ社))を用いて下記の実験を行った。測定方法は以下のとおりである。

固層プレート(ヌンク社)上に精製したモノクローナル抗体を $2 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ PBS/well になるように分注し、4℃ で 2 日間静置した。0.05% Tween 20 を含む 20 mM トリス緩衝液(pH 7.0)洗浄液にて 3 回洗浄した後、1.5% BSA トリス緩衝液(pH 7.0)を $200 \mu\text{L}$ 加えて 4℃ で一晩ブロッキングした。このようにして作製したプレートを先の洗浄液で 1 回洗浄して、各種アイソザイムを反応させた。アイソザイムの酵素活性は Kind-King 変法(ホルマザン法, 日東紡 N-テスト ALP K-K キット使用)試薬を用いて測定し、全て 25 IU/L にあわせてその $100 \mu\text{L}$ を抗体結合プレート上に加えた。室温で 2 時間反応させ、反応終了後、前出の洗浄液にて 3 回洗浄して Kind-King 変法(ホルマザン法)に従い酵素活性を測定した。すなわち、抗体プレートに結合した ALP に、 $100 \mu\text{L}$ の基質溶液(フェニルリン酸二ナトリウムと 4-アミノアンチピリン溶液とを含む溶液)を加えて、37℃、1 時間反応させて、抗体が捕らえた ALP 酵素と合成基質とで酵素反応させ、ついで、得られる混合物に発色試薬(メタ過ヨウ素酸ナトリウムを含む溶液)を加えて発色させ、492 nm で吸光度を測定した。なお、このとき、ALP を入れないで同様に操作して得られるブランク値を求め、各測定値からブランク値を差し引いた値が抗体に対する各 ALP の活性値となる。

20

30

その結果、抗体 3-29-3R の各種 ALP に対する活性値は、Saos-2 TNSALP では 0.033、肝臓型では 0.371、骨型では 0.184、小腸型では 0.011、胎盤型では 0 であった。

抗体 3-29-3R は、Saos-2 由来 TNSALP、肝型、骨型としか反応せず、他アイソザイムとの交差反応性を殆ど示さないことからヒト TNSALP に特異性の高いモノクローナル抗体であることがわかった。すなわち、抗体 3-29-3R は、TNSALP に特異的、例えば、小腸型 ALP 活性値と胎盤型 ALP 活性値との和が、肝臓型 ALP 活性値と骨型 ALP 活性値との和の 1/10 以下であることが判明した。

40

なお、モノクローナル抗体 3-29-3R の 25 IU/L における肝型、骨型反応比率(肝:骨反応比率)は、1:0.50 であった。

【0035】

実施例 7

本発明の ALP6 測定による虚血性腸疾患の診断

(1) 使用した検体と糖系非イオン性界面活性剤

検体としては、インフォームド・コンセントを行った健常人ボランティア検体 32 検体及び虚血性腸疾患患者検体 44 検体を用い、2% 糖系非イオン性界面活性剤を添加したものと及び無添加のものを用いた。糖系非イオン性界面活性剤としては、スクロースモノラウ

50

レートを使用した。

(2) TNSALP 値の測定

TNSALP 値は、以下のようにして求めた。上記方法によって作製、精製されたモノクローナル抗体 3-29-3R を製造例 1 と全く同様の方法で Nunc 社製プレートに 2 μg/100 μL PBS で分注、ブロッキングして抗体結合プレートを作製した。使用前にそのプレートを、0.05 % Tween 20 を含む 100 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) 200 μL で 1 回洗浄し、界面活性剤添加または無添加のヒト血清検体 10 μL と 100 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) 90 μL を加えて室温、1 時間反応させた。反応終了後、そのプレートを 0.05 % Tween 20 を含む 100 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) 200 μL で 3 回洗浄した。次いで、そのプレートに 100 μL の N テスト ALP Kind-King 試薬 (日東紡) の基質溶液、すなわち、フェニルリン酸二ナトリウムと 4-アミノアンチピリンを含む溶液) を加えて更に 37 °C、pH 10 で 1 時間、酵素反応させた。さらに、その反応液に、発色試薬 (メタ過ヨウ素酸ナトリウムを含む溶液) 100 μL を添加してその発色値を 492 nm にて比色することにより TNSALP 値を求めた。測定範囲を超える高値検体については希釈して再測定をした。

【0036】

(3) ELISA 法での ALP6 測定による虚血性腸疾患の診断

ELISA 法は、一次抗体として 3-29-3R プレートを用い、免疫グロブリン結合物質である二次抗体として、1/1600 希釈 HRP 標識抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (ザイメッド社) を用いた。まず、抗体 3-29-3R プレートを、0.05 % Tween 20 を含む洗浄液 (100 mM トリス緩衝液 (pH 7.5)) 200 μL で 1 回洗浄した。次いで、このプレートに、上記で調製した界面活性剤添加または無添加のヒト血清、各 50 μL と 100 mM Tris 緩衝液 (pH 7.5) 50 μL を加えて室温、1 時間反応させた。一次反応終了後、そのプレートを、0.05 % Tween 20 を含む 100 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) 200 μL で 3 回洗浄し、100 μL の二次標識抗体 HRP 標識抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (ザイメッド社) を加えて更に室温、1 時間反応させた。1 時間後に洗浄液で 3 回洗浄を行い、標識 HRP に対する基質溶液 (OPD 溶液) を反応させ、一定時間後に発色停止試薬 1N 硫酸 100 μL を添加して反応を停止させた。その発色値を 492 nm にて比色し ELISA 法による ALP6 値を求めた。その結果を表 2 に示す。

【0037】

【表 2】

表 2

	糖系非イオン性界面活性剤添加	界面活性剤無添加
参考基準値 (OD)	0.139 以下	0.180 以下
患者陽性率 (%)	25.0 %	18.2 %

【0038】

表 2 の結果に示されるように、糖系非イオン性界面活性剤を添加すると、患者陽性率が上昇することがわかった。

【0039】

(4) 乗法値法での ALP6 測定による虚血性腸疾患の診断

乗法値法による ALP6 値を測定は、「ELISA 法による ALP6 値」と「TNSALP 値」との乗法値を計算して求めた。

糖系非イオン性界面活性剤添加の測定系の ALP6 乗法値の健常者検体による参考基準値 (C.R.R 法により算出) と、それを基準に求めた虚血性腸疾患患者の陽性率の結果を表 3 に示す。

【0040】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

	糖系非イオン性界面活性剤添加	界面活性剤無添加
参考基準値 (AU)	1.33 以下	0.55 以下
患者陽性率 (%)	45.5 %	34.1 %

【0041】

表 3 に示されるように、乗法値法による ALP6 の参考基準値は 1.33 AU 以下となった。その結果、乗法値法による ALP6 の虚血性腸疾患患者検体の陽性率は 45.5 % となった。従来、虚血性腸疾患患者検体の陽性率が 20 % 程度であることを考えると、本発明の測定系は虚血性腸疾患診断の指標となりうることが判明した。なお、界面活性剤を添加しない ALP6 の乗法値を測定して虚血性腸疾患の陽性率を求めると 34.1 % であった。

10

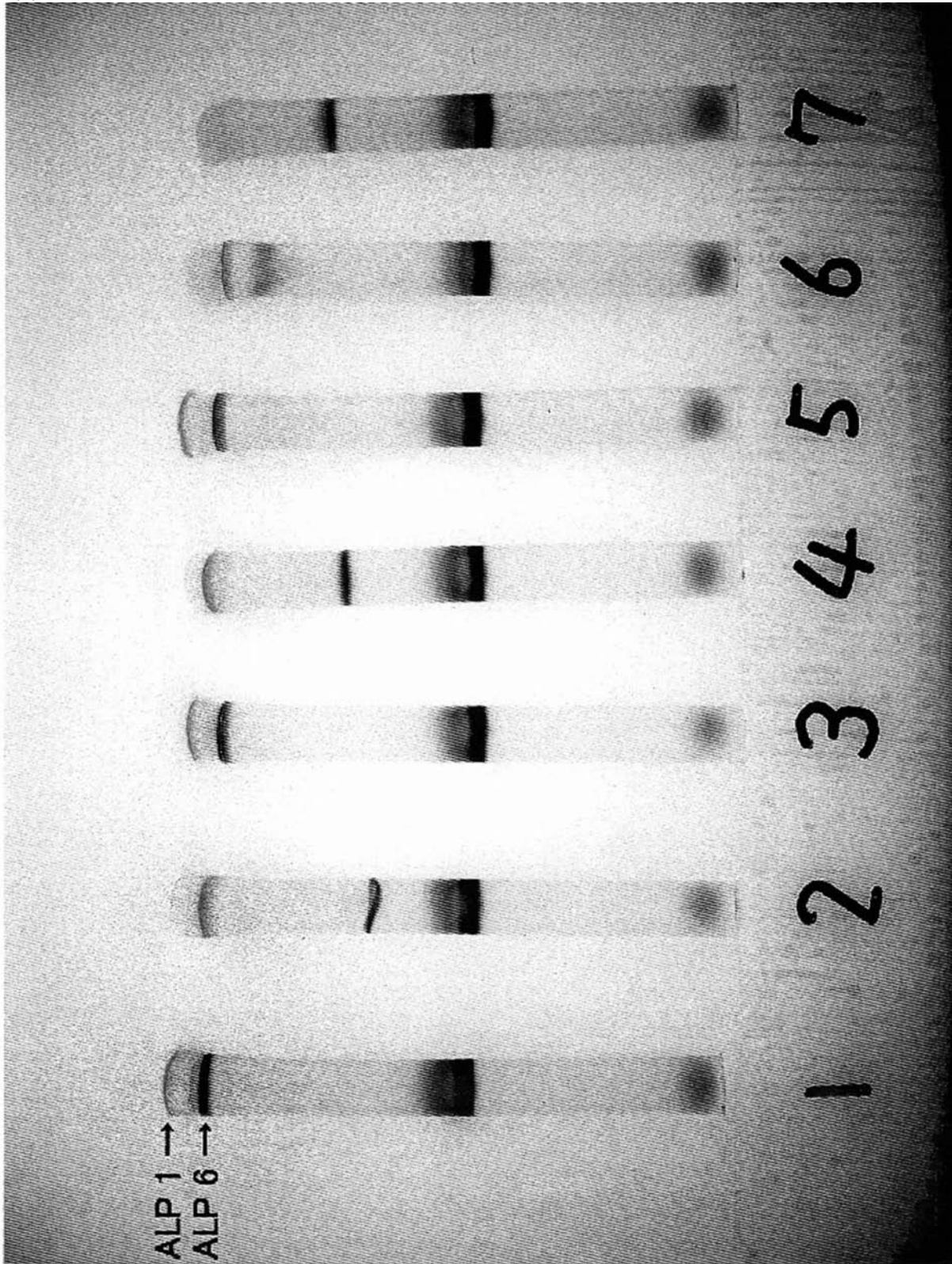
【図面の簡単な説明】

【0042】

【図 1】図 1 は、界面活性剤添加した検体を用いた電気泳動の結果である。ライン 1 は界面活性剤がない場合（比較例 1）、ライン 2 はスクロースモノラウレートを用いた場合（実施例 1）、ライン 3 はコール酸ナトリウムを用いた場合（比較例 2）、ライン 4 は n-ドデシル - D- マルトシドを用いた場合（実施例 2）、ライン 5 は 3- [(3- コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸を用いた場合（比較例 3）、ライン 6 は n- オクチル - D- グルコシドを用いた場合（実施例 3）、ライン 7 は Triton X-100 を用いた場合（比較例 4）である。

20

【 図 1 】



フロントページの続き

(72)発明者 大橋 建也

福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内

(72)発明者 三浦 俊英

福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内

(72)発明者 佐藤 豊二

新潟県新潟市川岸町 2 - 1 5 - 3 新潟県立ガンセンター新潟病院内

(72)発明者 片山 勝博

福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ33 QR48 QR51 QR52 QR66 QS33 QS36
QX01

