

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5625155号
(P5625155)

(45) 発行日 平成26年11月19日(2014.11.19)

(24) 登録日 平成26年10月10日(2014.10.10)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/564	(2006.01)	GO 1 N 33/564	Z	
GO 1 N 33/573	(2006.01)	GO 1 N 33/564	A	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/573	A	
C 1 2 Q 1/44	(2006.01)	GO 1 N 33/53	K	
		C 1 2 Q 1/44		

請求項の数 12 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2010-172068 (P2010-172068)	(73) 特許権者	504137912
(22) 出願日	平成22年7月30日(2010.7.30)		国立大学法人 東京大学
(65) 公開番号	特開2012-32278 (P2012-32278A)		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(43) 公開日	平成24年2月16日(2012.2.16)	(73) 特許権者	000003300
審査請求日	平成25年7月17日(2013.7.17)		東ソー株式会社
			山口県周南市開成町4560番地
		(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1測定による全身性エリテマトーデスの検査方法および検査薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定することによる全身性エリテマトーデスの検査方法。

【請求項2】

ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定し、その値が健常者測定値から算出したカットオフ値に対し高値を示した場合に全身性エリテマトーデスを罹患することを特徴とする、請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】

ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定し、全身性エリテマトーデス罹患患者の疾患活動期を判断することを特徴とする、請求項1に記載の検査方法。

【請求項4】

少なくとも一つの既存の全身性エリテマトーデス検査方法と請求項1から3のいずれかに記載の検査方法とを組み合わせた全身性エリテマトーデスの検査方法。

【請求項5】

既存の全身性エリテマトーデス検査方法が顔面紅斑、円板状皮疹、光線過敏症、口腔内潰瘍、関節炎、漿膜炎、及び腎病変からなる身体的病変検査のうち少なくとも1つである請求項4に記載の検査方法。

【請求項6】

既存の全身性エリテマトーデス検査方法が痙攣発作及び精神障害からなる神経学的病変

10

20

検査のうちの少なくとも1つである請求項4に記載の検査方法。

【請求項7】

既存の全身性エリテマトーデス検査方法が溶血性貧血検査、白血球検査、リンパ球検査及び血小板検査からなる血液学的検査のうちの少なくとも1つである請求項4に記載の検査方法。

【請求項8】

既存の全身性エリテマトーデス検査方法が抗2本鎖DNA抗体検査、抗Sm抗体検査、抗リン脂質抗体検査、及び抗核抗体検査からなる免疫学的検査のうちの少なくとも1つである請求項4に記載の検査方法。

【請求項9】

ヒト検体が、全血、血球、血清もしくは血漿のいずれかのヒト血液成分またはヒト細胞もしくはヒト組織の抽出液である請求項1から8のいずれかに記載の検査方法。

【請求項10】

ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1の測定が抗体を用いた免疫化学的方法により行なわれる請求項1から9のいずれかに記載の検査方法。

【請求項11】

全身性エリテマトーデスの治療効果を検査する請求項1から10のいずれかに記載の検査方法。

【請求項12】

抗ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1抗体を含有し、免疫化学的方法により、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定する、全身性エリテマトーデスを検査するための検査薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はヒト検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1濃度の測定による全身性エリテマトーデスの検査方法および検査薬に関する。

【背景技術】

【0002】

全身性エリテマトーデス（全身性紅斑性狼瘡）（以下、SLE）は、全身の臓器に原因不明の炎症が起こる自己免疫疾患の一種であり、膠原病の1つとして分類されている。

【0003】

SLEは、以下の：

- (1) 顔面紅斑、
 - (2) 円板状皮疹、
 - (3) 光線過敏症、
 - (4) 口腔内潰瘍、
 - (5) 関節炎（2関節以上で非破壊性）、
 - (6) 漿膜炎（胸膜炎または心膜炎）、
 - (7) 腎病変（0.5g/日以上持続的蛋白尿か細胞性円柱の出現）、
 - (8) 神経学的病変（痙攣発作あるいは精神障害）、
 - (9) 血液学的異常（溶血性貧血、白血球減少、リンパ球減少または血小板減少）、
 - (10) 免疫学的異常（抗2本鎖DNA抗体陽性、抗Sm抗体陽性又は抗リン脂質抗体陽性、抗カルジオリピン抗体陽性、ループスアンチコアグラント、梅毒反応偽陽性）、
 - (11) 抗核抗体陽性、
- の11項目のうち4項目以上を満たす場合に、SLEと診断される。

【0004】

SLEの病態を把握するため、従来から疾患活動性の指標であるBILAGやSLEDAIが用いられている。BILAGは一般全身症状、粘膜皮膚症状、神経系症状、筋骨格系症状、心血管系および呼吸器系症状、血管炎、腎症などのそれぞれ細分化された症状、

10

20

30

40

50

並びに血液検査の結果をスコアリングし、B I L A G総スコアで病態を診断する方法である。例えば一般全身性症状としては、発熱、体重減少、リンパ節腫脹/脾腫、リンパ節腫脹、易疲労/全身倦怠/脱力、食欲低下/嘔気/嘔吐などに細分化され、それら各診断を総合し病態をカテゴリー分類する(非特許文献1および2)。S L E D A Iも同様に、痙攣、精神症状、器質的脳障害、視力障害、脳神経障害、ループス頭痛、脳血管障害、血管炎、関節炎、筋炎、尿円柱、血尿、蛋白尿、膿尿、新たな皮疹、脱毛、粘膜潰瘍、胸膜炎、心膜炎、低補体血症、抗DNA抗体上昇、発熱、血小板減少、白血球減少、の診断項目に加重をかけスコアリングし病態把握を行う(非特許文献3)。

【0005】

以上に示すように、従来S L Eの病態把握は非常に多くの診断項目が必要であり、かつ定性的な診断項目も多く含まれるため、S L Eの病態を把握できる簡便なマーカーが期待されていた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2008-203041号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Q. J. Med., 69, 927-937, 1988

【非特許文献2】Ann. Rheum. Dis., 555, 756-760, 1996

20

【非特許文献3】Arthritis Rheum., 35(6), 630-640, 1992

【非特許文献4】J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

前述したように、全身性エリテマトーデス(S L E)患者においてはその発症する病態は多様であり、従来の病態把握方法では定性的な診断基準を含んでいることから、更なる独立した診断マーカーが必要とされていた。そこで、本願発明の課題はS L Eの病態を反映する新たなマーカーを提供し、それをを用いたS L Eの検査方法および検査薬を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

前記課題を鑑み発明者が鋭意検討した結果、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1(以下、P S - P L A 1)の生体内濃度が全身性エリテマトーデス(以下、S L E)患者において濃度の上昇が認められることから、P S - P L A 1濃度がS L Eの病態把握に有効であることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0010】

詳しくは、本願は下記の発明を包含する：

(1) ヒト検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定することによる全身性エリテマトーデスの検査方法。

40

(2) ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定し、その値が健常者測定値から算出したカットオフ値に対し高値を示した場合に全身性エリテマトーデスを罹患する、とすることを特徴とする、(1)に記載の検査方法。

(3) ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定し、全身性エリテマトーデス罹患患者の疾患活動期を判断することを特徴とする、(1)に記載の検査方法。

(4) 上記測定が、ヒト検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1の濃度又は活性を測定することによる(1)から(3)のいずれかに記載の検査方法。

(5) 少なくとも一つの既存の全身性エリテマトーデス検査方法と(1)から(4)のいずれかに記載の検査方法とを組み合わせた全身性エリテマトーデスの検査方法。

50

(6) 既存の全身性エリテマトーデス検査方法が顔面紅斑、円板状皮疹、光線過敏症、口腔内潰瘍、関節炎、漿膜炎、腎病変などの身体的病変検査である(5)に記載の検査方法。

(7) 既存の全身性エリテマトーデス検査方法が痙攣発作、精神障害などの神経学的病変検査である(5)に記載の検査方法。

(8) 既存の全身性エリテマトーデス検査方法が溶血性貧血検査、白血球検査、リンパ球検査、血小板検査などの血液学的検査である(5)に記載の検査方法。

(9) 既存の全身性エリテマトーデス検査方法が抗2本鎖DNA抗体検査、抗Sm抗体検査、抗リン脂質抗体検査、抗核抗体検査などの免疫学的検査である(5)に記載の検査方法。

(10) ヒト検体が、全血、血球、血清もしくは血漿などのヒト血液成分またはヒト細胞もしくはヒト組織の抽出液である(1)から(9)のいずれかに記載の検査方法。

(11) ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1の測定が抗体を用いた免疫化学的方法により行なわれる(1)から(10)のいずれかに記載の検査方法。

(12) 全身性エリテマトーデスの治療効果を検査する(1)から(11)のいずれかに記載の検査方法。

(13) (1)から(12)のいずれかに記載の検査方法を利用した全身性エリテマトーデスの検査薬。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、ヒト検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1(PS-PLA1)を測定することにより全身性エリテマトーデス(SLE)の検査およびSLE検査の補助を可能とし、さらにSLEの病態把握をすることが可能である。PS-PLA1を測定する際、特許文献1に記載の方法を原理とする免疫学的定量試薬を用いて測定を実施することにより、短時間でPS-PLA1を定量可能である。そのため、本発明により、小規模医療施設においても簡便かつ低コストでSLE検査が可能な検査薬を提供することが可能である。

【0012】

また、少なくとも一つの既存のSLE検査(例えば、身体的病変検査、神経学的病変検査、血液学的検査、免疫学的検査)とPS-PLA1測定とを組み合わせることにより、既存のSLE検査およびPS-PLA1を単独マーカーとしたSLE検査と比較し、より高い診断精度でSLE検査やその治療効果を判定することが可能となる。

既存のSLE検査は全て自己免疫疾患による免疫応答の結果発症する自己抗体、またはそれを原因とする全身症状である。一方、PS-PLA1は脂質代謝酵素であり既存のSLE検査項目とは異なる機序により濃度変動が誘導されることより、単独での検査のみならず既存SLE検査との組み合わせることによる検査の意義は大きい。

SLE患者はその疾患活動期を長期間にわたり定期的にモニター検査することが必要であるが、BILAGやSLEDAIなどの指標は複数検査項目の診断の総合点として疾患活動期を判定すること、その個々の診断項目には定性的な判定項目も含まれるため専門医が必要であり、診断の施設間差は否定できない。一方、PS-PLA1は単一の非侵襲的定量的検査項目であるため、疾患活動期の診断が容易であり施設間差を考慮する必要はない利点がある。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】 健常者および全身性エリテマトーデス(SLE)患者血清中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1(PS-PLA1)濃度分布を示す。

【図2】 健常者およびSLE患者血清中のPS-PLA1測定値を用いた診断効率指標であるROC曲線を示す。

【図3】 健常者、SLE患者、関節リウマチ(RA)患者および全身性硬化症(SSc)患者血清中のPS-PLA1濃度分布を示す。

10

20

30

40

50

【図4】発熱、関節痛、皮膚症状、漿膜炎、腎症、中枢神経ループスの有無によりグループ分けした際のPS-PLA1濃度分布を示す。

【図5】PS-PLA1濃度とリンパ球数、白血球数、CRP値、GOT値、C1q結合性免疫複合体値の相関性を示す。

【図6】SLE患者血清中のPS-PLA1濃度とBILAGの相関性(A)、ならびにSLEDAIとの相関性(B)を示す。

【図7】治療前後におけるSLE患者血清中のPS-PLA1濃度変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

PS-PLA1は1997年に同定されたリパーゼファミリーに属する酵素であり(非特許文献4)、極性頭部にセリン残基を有したセリンリン脂質であるホスファチジルセリンやリゾホスファチジルセリンを特異的基質としてsn-1位のアシル基を加水分解する酵素である。本酵素は活性化血小板やマクロファージより主に産生される事が知られているが、その機能は未だ明らかになっていない。しかし、本酵素の活性から予測される機能として生体内からのホスファチジルセリンの消去、2-アシル-1-リゾホスファチジルセリンの産生により何らかの生体機能の調節に関与していることが予想される。ホスファチジルセリンは血液凝固の際、血小板細胞表面に露出することにより血液凝固の場を提供していることが知られており、ホスファチジルセリンを加水分解し消去することにより血液凝固の阻害制御を行なっていることや、アポトーシス細胞表面にもホスファチジルセリンが露出することから死細胞処理の制御に関与していることも示唆される。また、リゾホスファチジルセリン産生活性から想定される機能として、肥満細胞活性化による炎症反応への関与、神経細胞活性化への関与などが示唆されている。

【0015】

PS-PLA1はこれまで定量測定系がなかったため、PS-PLA1と様々な疾病との関連の解析はなされていなかったが、2006年、発明者によりPS-PLA1の定量測定方法が確立された(特許文献1)。特許文献1に記載の定量測定方法は血清などのヒト検体中のPS-PLA1濃度を前処理を必要とすることなく簡便、短時間、かつ信頼性高く定量可能な測定方法である。そこで特許文献1に記載の測定方法を用いて鋭意検討を重ねた結果、血液中のPS-PLA1濃度がSLE患者にて高値を示すこと、さらにSLEの病態に比例して上昇することを見出した。また、PS-PLA2は単独マーカーとして従来のSLE病態把握法であるBILAG(非特許文献1および2)やSLEDAI(非特許文献3)と正の相関性を示すことが見いだされた。以上より、PS-PLA1がSLEの病態を反映するマーカーとなりうることを見いだされた。

【0016】

なお、PS-PLA1の血液中での濃度上昇の機序は明らかでないが、少なくとも炎症性疾患に起因した病態や自己免疫疾患に起因した病態とは異なる機序でPS-PLA1の濃度上昇が認められていることが予想される。

【0017】

本発明に係る検査方法は、ヒト検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1を測定し、その値が健常者測定値からなる正常値範囲より算出したカットオフ値以上の値を示した場合に全身性エリテマトーデスを罹患する、とする。また、全身性エリテマトーデス罹患者の疾患活動期をモニターするのもにも使用でき、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1濃度が正常値範囲に低下した場合、非活動期と判断する。健常者血清としては医師によりエリテマトーデス、並びにエリテマトーデスに関与する病態、例えば顔面紅斑、円板状皮疹、光線過敏症、口腔内潰瘍、関節炎、漿膜炎、腎病変などを患っていないと診断された者(以下、単に「健常者」と称す)の血清を使用した。このような正常値範囲は、当業者であれば健常者及びエリテマトーデス患者におけるホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1の濃度の分布を参照して任意に決定することができる。正常範囲の決定法は、例えば(健常者血清中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ

10

20

30

40

50

A 1 濃度測定値の中央値 + 3 × 標準偏差) を上限カットオフ値に設定することや、健常者測定値の 95 パーセントイル値上限をカットオフ値に設定することや、健常者測定値並びに全身性エリテマトーデス罹患患者群を用いた R O C 曲線を用いた統計的解析によりカットオフ値の設定が可能である。

【 0 0 1 8 】

P S - P L A 1 は既存 S L E 診断マーカーとは独立した機序により変動する因子である。そのため、P S - P L A 1 を単独マーカーとして S L E を検査してもよいし、既存の S L E 検査方法や検査基準とを組み合わせる S L E を検査してもよい。特に後者の検査方法はさらに高精度に S L E の検査および病態把握が可能であるため好ましい。既存の S L E 検査方法としては、

(A) 顔面紅斑、円板状皮疹、光線過敏症、口腔内潰瘍、関節炎、漿膜炎、腎病変などの身体的病変検査、

(B) 痙攣発作、精神障害などの神経学的病変検査、

(C) 溶血性貧血検査、白血球検査、リンパ球検査、血小板検査などの血液学的検査、

(D) 抗 2 本鎖 D N A 抗体検査、抗 S m 抗体検査、抗リン脂質抗体検査、抗核抗体検査などの免疫学的検査、

が例示でき、これらの検査の中から少なくとも一つを選択すればよい。

【 0 0 1 9 】

本発明に開示するホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 測定方法は、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1、抗体との複合体を検出可能な方法であれば検出方法を選ばない。好ましくはイムノアッセイで汎用されている標識抗原と検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 の抗ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 抗体に対する競合を利用した競合法、あるいはホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 上の異なるエピトープを認識する 2 種の抗体を用い、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 との 3 者の複合体を形成させるサンドイッチ法が簡便かつ汎用しやすい。抗体を担体に結合させる場合、担体としてはイムノプレート、ラテックス粒子、磁性微粒子、ニトロセルロース膜、P V D F 膜などイムノアッセイで使用されるものであれば特に担体を選ばない。担体を用いる場合、担体に固定化した抗体により捕捉したホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 の酵素活性を検出する方法、抗体を固定化したチップに検体を接触させてホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 結合依存的なシグナルを検出する表面プラズモン共鳴などの方法、あるいは抗体を固定化したチップに検体を接触させてホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 結合させた後、抗原抗体結合を乖離させる溶媒にて抗原を遊離させ、遊離した抗原をマススペクトロメーターなどで定量する方法等でホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 の測定が可能である。また、蛍光標識した抗体がホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 と結合することによる蛍光偏光を検出するようなホモジニアス測定方法においてもホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 の定量は可能である。これら試薬、装置は十分技術確立されている。

【 0 0 2 0 】

前記の測定方法において特異性、感度、汎用性など点からエピトープの異なる 2 抗体サンドイッチ免疫測定方法が優れている。本測定系構築が可能な抗ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 モノクローナル抗体の組み合わせの選択は、精製した抗体群とその標識抗体群を用い、組換えヒトホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 をサンプルとしてサンドイッチ測定系が構築可能であるかの検証にて行なう。具体的には、精製した未標識の抗ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 モノクローナル抗体をイムノプレートに結合させ、ウシ血清アルブミンなどを含む緩衝液でイムノプレート表面のプロッキング処理を行う。続いて、組換えホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 を含む緩衝液をイムノプレートに添加し、固相抗体に捕捉させる。未反応物質を除去するため P B S などの緩衝液でイムノプレートを洗浄後、標識を施したホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 に対する抗体を反応させ 2 種類の抗体でのホスファチジルセ

10

20

30

40

50

リン特異的ホスホリパーゼ A 1 のサンドイッチ複合体を形成させる。未反応物質を除去するため P B S などの緩衝液でイムノプレートを洗浄後、抗体標識に酵素標識を行った場合は基質の添加を行い、ビオチン標識などさらに反応が必要な場合は酵素標識ストレプトアビジンなどを反応させる。最終的にホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 を介して固相表面に結合した酵素を発色、蛍光、化学発光基質等を用い組換えホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 の検出を行なう。以上の実験を組換えホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 を含まない緩衝液で同様に行いバックグラウンド値として用いる。組換えホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 を用いた測定値がバックグラウンド低値でありかつ測定値に対し有意に高い組み合わせをホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 免疫測定系候補とする。

10

【 0 0 2 1 】

前記の通り選択したホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 の 2 抗体サンドイッチ免疫測定系候補の信頼性を検証するため組換えホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 およびヒト血清の希釈系列サンプルを準備し、希釈倍率依存的に反応性が認められるか検証を行い測定法として選択する。特許文献 1 に記載の手法により得られた 2 抗体サンドイッチ測定系を用いることにより未知検体の濃度定量が可能である。すなわち、最終的に基質から得られる発色、蛍光、化学発光シグナルの強度はホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 を介して固相に結合した酵素量に依存すること、すなわちホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 量に依存することから、既知濃度のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 を用いた標準曲線から未知濃度の検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 濃度が定量可能である。

20

【 0 0 2 2 】

選択した 2 種の抗体組み合わせを用い、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 測定試薬の調製を行う。2 ステップサンドイッチ測定試薬の場合、2 種の抗体の一方をイムノプレート、磁性粒子など B / F 分離可能な担体に結合させる。結合方法は、疎水結合を利用した物理的結合、2 物質間を架橋可能なリンカー試薬などを用いた化学的結合いずれでもかまわない。非特異的結合を避けるため担体表面を牛血清アルブミン、スキムミルクあるいは市販のイムノアッセイ用ブロッキング剤などでブロッキング処理を行ない 1 次試薬とする。2 次試薬として標識を施したもう一方の抗体を含む溶液を準備する。抗体標識はペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素、蛍光物質、化学発光物質、ラジオアイソトープなどの検出可能な物質、ビオチン、アビジンなどの特異的結合パートナーが存在する物質などでの標識が好ましい。また、2 次試薬溶液は抗原抗体反応が良好に行える緩衝液、例えばリン酸緩衝液、Tris - HCl 緩衝液などが基本となる中性付近の緩衝液が好ましい。実検体の測定は、1 次試薬と実検体を一定時間、一定温度のもと接触させる。反応条件は 4 から 40 の温度で 5 分から 3 時間の反応が好ましい。未反応物質を B / F 分離により除去し、続いて 2 次試薬と一定時間、一定温度のもと接触させサンドイッチ複合体を形成させる。反応条件に関しては 4 から 40 の温度で 5 分から 3 時間の反応が好ましい。未反応物質を B / F 分離により除去し、標識抗体の標識物質を定量し、既知濃度ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 を標準とし作成した検量線により、実検体中のホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A 1 濃度を定量する。1 ステップサンドイッチ測定試薬の場合、2 ステップサンドイッチ測定試薬と同様、担体に抗体を結合させブロッキング処理を行ったものを準備する。本抗体固相化担体に標識抗体を含む緩衝液を添加し試薬とする。必要に応じ、試薬を凍結乾燥品とすることも可能である。1 ステップ試薬では抗原 - 抗体の使用量バランスにより抗原あるいは抗体の過不足が生じ測定系構築が困難であることが多い。本発明では E L I S A 法の場合、担体に結合させる抗体量を 96 穴イムノプレート 1 ウェルあたり 5 から 500 ng、好ましくは 50 ng、標識抗体 1 から 100 ng、好ましくは 50 ng を使用することにより良好な結果が得られる。測定に用いるヒト検体は、血清、血漿、尿、精漿、脳脊髄液などがあるが、用いる検体の希釈倍率は無希釈から 100 希釈での使用が好ましく、特に血清、血漿においては 40 倍希釈検体を 50 μ L を用いることにより良好な結果が得られる。

30

40

50

【実施例】

【0023】

以下に本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、これら実施例は本発明の一例を示すものであり、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、実施例で使用した血清検体の採取および測定は東京大学医学部附属病院および東京医科大学病院で実施し、研究倫理について東京大学大学院医学研究科倫理委員会および東京医科大学病院での承認のもと実施した。また、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1 (PS-PLA1) 濃度の測定は、特許文献1の方法に基づき、自動免疫測定装置AIAシリーズ(東ソー社製)を用い実施した。

【0024】

実施例1：健常者検体中のPS-PLA1測定

患者検体測定に先立ち、コントロール群として健常者血清中のPS-PLA1濃度を測定した。血液は採血7日前より投薬のない健常な成人ボランティアからインフォームドコンセントを得た後、肘前中静脈より採取し、室温15分放置後、 $1500 \times g$ にて5分間遠心分離することにより血清を取得し測定を実施した。健常者190名(男性113名、女性77名)の血清中のPS-PLA1濃度測定値は $33.2 \pm 14.5 \mu g/L$ (算術平均値 \pm 標準偏差)であり、中央値 $29.8 \mu g/L$ 、95パーセンタイルからなる参考基準範囲は $16.1 \mu g/L$ から $67.4 \mu g/L$ であった。本測定値から正常値を算出した場合、(中央値 $+3 \times$ 標準偏差)では $73.1 \mu g/L$ 、健常者測定値の95パーセンタイル値上限では $67.4 \mu g/L$ である。

【0025】

実施例2：全身性エリテマトーデス(SLE)患者検体中のPS-PLA1測定

男性SLE患者9名、女性SLE患者17名、計26名のSLE患者について血清中のPS-PLA1濃度を測定した。26名のPS-PLA1濃度測定値は $99.8 \pm 71.1 \mu g/L$ (算術平均値 \pm 標準偏差)であり、Mann-Whitneyの有意差検定において健常者測定値に対して有意差 $p < 0.0001$ を示した(図1)。また診断率をROC曲線による統計学的方法にて評価した結果、ROC曲線のAUC値(area under curve)値は0.868であり、その際の感度は80.8%、特異度は76.8%と非常に良好な診断効率を示した(図2)。

【0026】

実施例3：関節リウマチ、全身性硬化症患者検体中のPS-PLA1測定

SLEおよび他の膠原病である関節リウマチ(RA)40例と全身性硬化症(SSc)7例について血清中のPS-PLA1濃度を測定した。RAおよびSScのPS-PLA1測定値はそれぞれ $38.1 \pm 16.5 \mu g/L$ 、 $40.0 \pm 27.6 \mu g/L$ (算術平均値 \pm 標準偏差)であり、Mann-Whitneyの有意差検定において健常者測定値と有意差は認められずPS-PLA1濃度測定によりSLEとRA、SScとの判別が可能である結果であった(図3)。

【0027】

実施例4：PS-PLA1測定値とSLE疾患マーカーとの相関性

SLE患者血清中のPS-PLA1濃度と発熱、関節痛、皮膚症状、漿膜炎、腎症、中枢神経ループスの有無との関係を解析した。その結果、PS-PLA1濃度はこれら因子の有無で分類した際の各グループ間に有意差は認められず、これら因子に依存しないことが明らかとなった(図4)。また、PS-PLA1濃度とリンパ球数、白血球数、CRP値、GOT値、C1q結合性免疫複合体値との間にも相関性は認められなかった(図5)。以上の結果より、PS-PLA1濃度は既存のSLE診断マーカーとは独立した因子であることが明らかとなった。

【0028】

実施例5：PS-PLA1測定値とBILAGおよびSLEDAIの相関性

SLE患者血清中のPS-PLA1濃度と各患者のBILAGおよびSLEDAI値との相関性を検証した。PS-PLA1濃度とBILAGの相関係数は $r = 0.463$ (図

10

20

30

40

50

6 A)、SLEDAIとの相関係数は $r = 0.556$ (図6B)であり、PS-PLA1を測定することによりSLEの病態把握、またはその補助因子となりうることを示している。

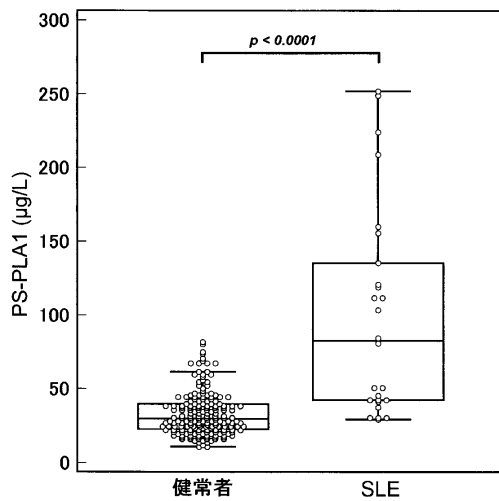
【0029】

実施例6：治療によるSLE患者血清中のPS-PLA1濃度変化

治療前後におけるSLE患者血清中のPS-PLA1濃度変化を検証した。その結果、ほとんどのSLE患者において治療により血清中のPS-PLA1濃度が減少していた(図7)。前記結果は、SLE患者血清中のPS-PLA1濃度変化をモニターすることで、SLE病態および治療効果の把握が可能であることを示している。

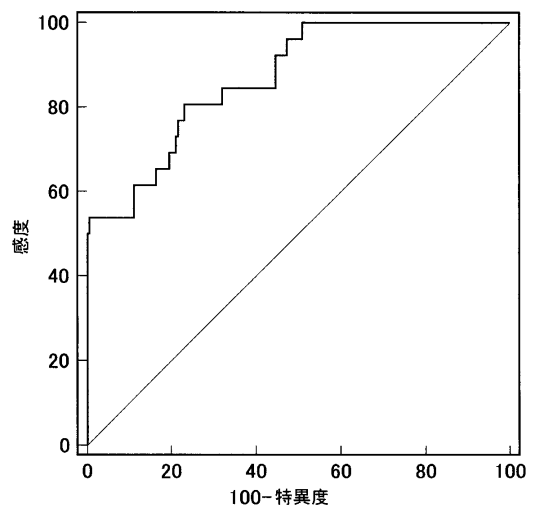
【図1】

図1



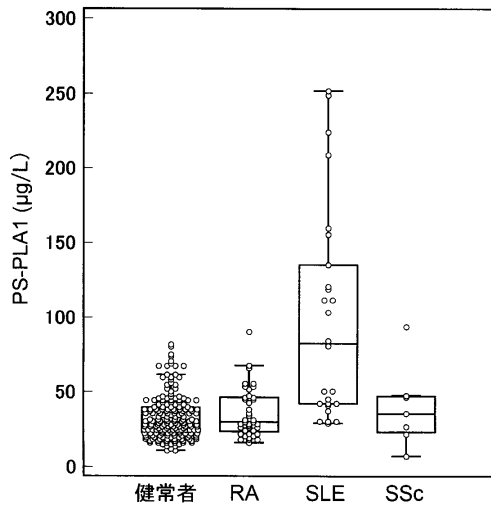
【図2】

図2



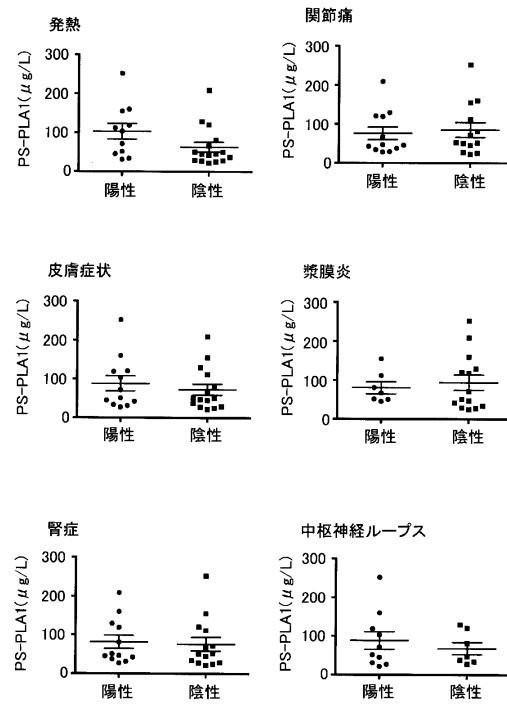
【 図 3 】

図 3



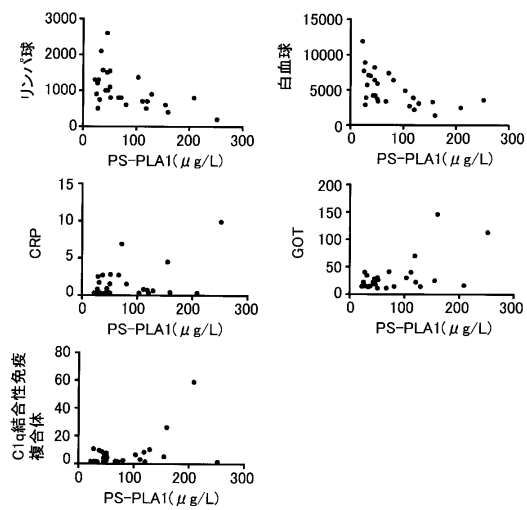
【 図 4 】

図 4



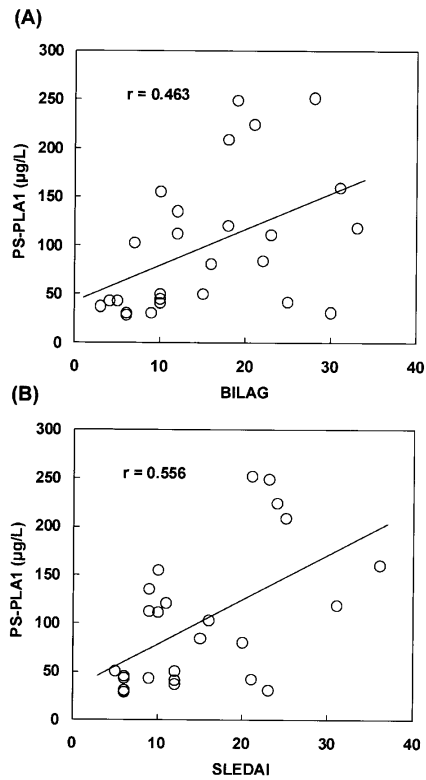
【 図 5 】

図 5



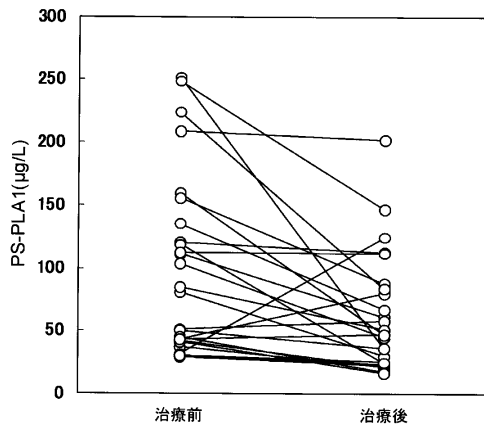
【 図 6 】

図 6



【 図 7 】

図7



フロントページの続き

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100166165
弁理士 津田 英直
- (72)発明者 矢富 裕
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 中村 和宏
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 沢田 哲治
東京都新宿区西新宿六丁目7番1号 東京医科大学病院内
- (72)発明者 青木 淳賢
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3 国立大学法人東北大学内
- (72)発明者 五十嵐 浩二
神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式会社 東京研究センター内

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2008-203041(JP,A)
国際公開第2010/002895(WO,A1)
特表2011-526916(JP,A)
特開2001-289855(JP,A)
特表2006-524342(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	磷脂酰丝氨酸特异性磷脂酶A1测定和试验药物检测系统性红斑狼疮的方法		
公开(公告)号	JP5625155B2	公开(公告)日	2014-11-19
申请号	JP2010172068	申请日	2010-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学 东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	东京大学 Tosoh公司		
当前申请(专利权)人(译)	东京大学 Tosoh公司		
[标]发明人	矢富裕 中村和宏 沢田哲治 青木淳賢 五十嵐浩二		
发明人	矢富裕 中村和宏 沢田哲治 青木淳賢 五十嵐浩二		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/573 G01N33/53 C12Q1/44		
FI分类号	G01N33/564.Z G01N33/564.A G01N33/573.A G01N33/53.K C12Q1/44		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ32 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎		
其他公开文献	JP2012032278A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种反映系统性红斑狼疮 (SLE) 病理状态的新标记物，并提供一种使用它的SLE的测试方法和测试剂。 解决方案：选择人类样品中的磷脂酰丝氨酸特异性磷脂酶A1 (PS-PLA1) 作为反映SLE病理状况的新标记物。由于PS-PLA1已经建立了一种简单，短期，可靠的定量测量方法，因此可以简单，便宜，定量地在小型医疗机构进行SLE检查，并且设备之间没有差异可以。 [选图]图1

图 1

