

(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2009-294096

(P2009-294096A)

(43) 公開日 平成21年12月17日(2009.12.17)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

F1

G01N 33/53 N

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2008-148223 (P2008-148223)
 (22) 出願日 平成20年6月5日 (2008.6.5)

(71) 出願人 596165589
 学校法人 聖マリアンナ医科大学
 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
 (74) 代理人 100105050
 弁理士 鷺田 公一
 (72) 発明者 加藤 智啓
 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
 学校法人 聖マリアンナ医科大学内
 (72) 発明者 唐澤 里江
 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
 学校法人 聖マリアンナ医科大学内

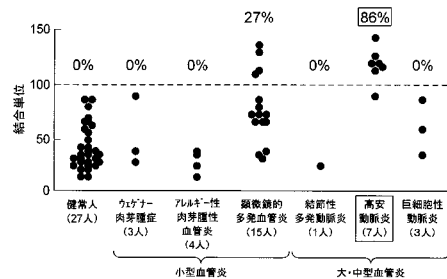
(54) 【発明の名称】 高安動脈炎の診断方法およびそれに用いられる診断キット

(57) 【要約】

【課題】血清マーカーを用いた高安動脈炎の診断方法を提供すること。

【解決手段】抗ペプチジルプロリルイソメラーゼA (PPIA) 抗体の量を指標として診断する。血清中の抗PPIA抗体の量を測定し、抗PPIA抗体の量が所定の値より多いとき、被験者は高安動脈炎を発病していると判定する。抗PPIA抗体の量を指標とすることで、高安動脈炎を迅速かつ容易に診断することができる。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者から採取された生体試料中の抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体の量を測定するステップを含む、高安動脈炎の診断方法。

【請求項 2】

前記抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体の量が所定の値より多いとき、前記被験者は高安動脈炎を発病している可能性が高いと判定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の診断方法。

【請求項 3】

前記生体試料は血清である、請求項 1 に記載の診断方法。

10

【請求項 4】

前記抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体の量は、免疫測定法により測定される、請求項 1 に記載の診断方法。

【請求項 5】

前記免疫測定法は、ウェスタンブロット法、ELISA 法、EIA 法、CLIA 法、CLEIA 法、RIA 法、ラテックス凝集法またはイムノクロマト法である、請求項 4 に記載の診断方法。

【請求項 6】

前記生体試料中の抗ペルオキシレドキシニン 2 抗体の量を測定するステップと、
前記抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体の量が所定の値より多いか、または前記抗ペルオキシレドキシニン 2 抗体の量が所定の値より多いとき、前記被験者は高安動脈炎を発病している可能性が高いと判定するステップと、
をさらに含む、請求項 1 に記載の診断方法。

20

【請求項 7】

ペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片を有する、高安動脈炎の診断キット。

【請求項 8】

ペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片が固定化されている担体と、
抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体に結合する標識抗体と、
を有する、請求項 7 に記載の診断キット。

30

【請求項 9】

抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体に結合する抗体が固定化されている担体と、
標識されたペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片と、
を有する、請求項 7 に記載の診断キット。

【請求項 10】

ペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片が固定化されている担体粒子を有する、請求項 7 に記載の診断キット。

【請求項 11】

ペルオキシレドキシニン 2 またはその断片をさらに有する、請求項 7 に記載の診断キット。

40

【請求項 12】

抗ペルオキシレドキシニン 2 抗体に結合する抗体をさらに有する、請求項 11 に記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高安動脈炎の診断方法およびそれに用いられる診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

血管炎症候群は、全身の各種血管に炎症が生じ、血液の流れが障害される病気の総称で

50

ある。血管炎症候群には多数の疾患が含まれており、各疾患は障害を受ける血管の太さにより分類されている。そのような疾患の例には、高安動脈炎（大動脈炎症候群）、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）、結節性多発動脈炎、川崎病などの大型・中型血管炎；ウェゲナー肉芽腫症、アレルギー性肉芽腫性血管炎、顕微鏡的多発血管炎などの小型血管炎；などが含まれる。血管炎の病因および病態は未解明であり、疾患特異的な治療法も開発されていない。

【0003】

大型・中型血管炎の代表的疾患である高安動脈炎は、炎症が生じた血管の部位により様々な症状が出現する。好発年齢は10～20歳代と若年者に好発するため、早期に診断を受けて治療を開始し、可能な限り虚血性の臓器障害を少なくすることが求められている。

10

【0004】

ところで、ヒトの様々な疾患について、その疾患に特異的な血清マーカー（自己抗原または自己抗体）を指標とする診断方法が普及してきている。この方法は、大掛かりな設備を必要とせず、被験者への負担も少ないため、自覚症状のない多くの被験者に対しても広範囲に実施することが可能である。血管炎症候群においても、抗好中球細胞質抗体（Anti-neutrophil cytoplasmic antibody：以下「ANCA」と略記する）が、小型血管炎（ウェゲナー肉芽腫症、アレルギー性肉芽腫性血管炎および顕微鏡的多発血管炎）に特異的なマーカーとして報告されており、小型血管炎の診断に用いられている。一方、大型・中型血管炎に特異的なマーカーは、現在までに報告されていない。

20

【0005】

大型・中型血管炎の代表的疾患である高安動脈炎の患者では、抗血管内皮細胞抗体（Anti-endothelial cell antibody：以下「ECA」と略記する）の陽性率が95%との報告がある（非特許文献1参照）。また、ECAが高安動脈炎の病態形成に関与している可能性があるとの報告もある（非特許文献2参照）。しかしながら、ECAに含まれる数多くの抗体のうち、どの抗体が高安動脈炎に特異的なマーカーとなりうるのかについては報告されていない。

【非特許文献1】Youinou P., "New target antigens for anti-endothelial cell antibodies", Immunobiology, 2005, vol. 210(10), p. 789-97.

【非特許文献2】Muller Kobold AC, et al., "In vitro up-regulation of E-selectin and induction of interleukin-6 in endothelial cells by autoantibodies in Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis", Clin. Exp. Rheumatol., 1999, vol. 17(4), p. 433-40.

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

前述の通り、高安動脈炎に特異的な血清マーカーは現在までに報告されておらず、特異的な診断方法が確立されていない。したがって、高安動脈炎の診断および治療が遅れてしまい、重度の後遺症や著しいQOLの低下をきたす症例も少なくなかった。このような状況のため、高安動脈炎の診断方法に対する社会的要求が高まってきている。

40

【0007】

本発明は、かかる点に鑑みてなされたものであり、高安動脈炎の診断方法およびそれに用いられる診断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】

【0008】

本発明者は、抗ペプチジルプロリルイソメラーゼA抗体が高安動脈炎に特異的なマーカーとなりうることを見出し、さらに検討を加えて本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明は、以下の高安動脈炎の診断方法に関する。

[1]被験者から採取された生体試料中の抗ペプチジルプロリルイソメラーゼA抗体の量を測定するステップを含む、高安動脈炎の診断方法。

50

[2] 前記抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体の量が所定の値より多いとき、前記被験者は高安動脈炎を発病している可能性が高いと判定するステップをさらに含む、[1] に記載の診断方法。

[3] 前記生体試料は血清である、[1] または [2] に記載の診断方法。

[4] 前記抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体の量は、免疫測定法により測定される、[1] ~ [3] のいずれかに記載の診断方法。

[5] 前記免疫測定法は、ウェスタンブロット法、E L I S A 法、E I A 法、C L I A 法、C L E I A 法、R I A 法、ラテックス凝集法またはイムノクロマト法である、[4] に記載の診断方法。

[6] 前記生体試料中の抗ペルオキシレドキシニン 2 抗体の量を測定するステップと、前記抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体の量が所定の値より多いか、または前記抗ペルオキシレドキシニン 2 抗体の量が所定の値より多いとき、前記被験者は高安動脈炎を発病している可能性が高いと判定するステップと、をさらに含む、[1] ~ [5] のいずれかに記載の診断方法。

10

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、以下の高安動脈炎の診断キットに関する。

[7] ペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片を有する、高安動脈炎の診断キット。

[8] ペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片が固定化されている担体と、抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体に結合する標識抗体と、を有する、[7] に記載の診断キット。

20

[9] 抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A 抗体に結合する抗体が固定化されている担体と、標識されたペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片と、を有する、[7] に記載の診断キット。

[1 0] ペプチジルプロリルイソメラーゼ A またはその断片が固定化されている担体粒子を有する、[7] に記載の診断キット。

[1 1] ペルオキシレドキシニン 2 またはその断片をさらに有する、[7] ~ [1 0] のいずれかに記載の診断キット。

[1 2] 抗ペルオキシレドキシニン 2 抗体に結合する抗体をさらに有する、[1 1] に記載の診断キット。

30

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明によれば、高安動脈炎の診断、疾患活動性の評価、治療効果の評価などを迅速かつ容易に行うことができる。したがって、本発明によれば、高安動脈炎の診断および治療を早期に行うことが可能となり、患者の Q O L を向上させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 2 】

1 . 本発明の高安動脈炎の診断方法

本発明の診断方法は、被験者から採取された生体試料中の抗ペプチジルプロリルイソメラーゼ A (peptidylprolyl isomerase A または cyclophilinA ; 以下「 P P I A 」と略記する) 抗体の量を測定するステップを含む。

40

【 0 0 1 3 】

本発明の診断方法は、自己抗体である抗 P P I A 抗体の量を指標とすることを特徴とする。「抗 P P I A 抗体」とは、ヒト P P I A に特異的に結合しうるヒト抗体を意味する。本発明者は、高安動脈炎に特異的なマーカーをプロテオミクスを用いて網羅的に探索したところ、抗 P P I A 抗体がマーカーになりうることを見出した。抗 P P I A 抗体は、抗血管内皮細胞抗体 (A E C A) の 1 つであり、高安動脈炎の患者の血清中でその量が特異的に上昇する。実施例に示されるように、抗 P P I A 抗体を測定する本発明の診断方法は、適切なカットオフ値を設定することで高感度かつ高特異度の診断方法となりうる。

【 0 0 1 4 】

50

生体試料は特に限定されないが、血液、血漿、血清、これらの希釈液などを用いることができる。生体試料が血清である場合は、生体試料の採取が容易であり、かつ生検などに比べて侵襲を伴わずに短時間で診断を行うことができる。

【0015】

生体試料中の抗 P P I A 抗体の量を測定する方法は、免疫測定法などの当業者に公知の測定法から選択することができる。免疫測定法の例には、ウェスタンブロット法、E L I S A 法、E I A 法、C L I A 法、C L E I A 法、R I A 法、ラテックス凝集法、イムノクロマト法などが含まれる。例えば、後述する本発明の診断キットを用いれば、E L I S A 法やラテックス凝集法などで抗 P P I A 抗体の量を測定することができる（実施の形態参照）。

10

【0016】

免疫測定法で用いられる抗原は、抗 P P I A 抗体が結合しうるタンパク質またはペプチドであれば特に限定されない。そのような抗原の例には、ヒト P P I A (G I 4 8 1 4 5 5 3 1)、ヒト P P I A の断片（エピトープ部分を含むペプチド）、これらと他のタンパク質（ペプチド）との融合タンパク質などが含まれる。これらの抗原は、当業者に公知の遺伝子工学技術および分子生物学的技術を用いて調製することができる。これらの抗原は、担体に固定化されていてもよいし、固定化されていなくてもよい。また、これらの抗原は、酵素、放射性同位体、蛍光色素、アビジン、ビオチンなどで標識されていてもよい。

【0017】

例えば、生体試料中の抗 P P I A 抗体の量を測定した結果、抗 P P I A 抗体の量が所定のカットオフ値よりも多いときは、当該患者は高安動脈炎を発病している可能性が高いと判定し、抗 P P I A 抗体の量が所定のカットオフ値よりも少ないときは、当該患者は高安動脈炎を発病していない可能性が高いと判定する。抗 P P I A 抗体のカットオフ値は、診断の目的に応じて、健常者から採取した生体試料中の抗 P P I A 抗体の測定値などから設定すればよい（実施例参照）。

20

【0018】

P P I A は、カルモジュリンとカルシニューリンとの複合体に結合して、カルシニューリン活性の発現を早めることが報告されている。カルシニューリンは、T 細胞活性化のシグナル伝達において重要な役割を果たしている、カルモジュリン依存性のタンパク質脱リン酸化酵素である。カルシニューリン活性が発現すると、I L - 2 遺伝子などの転写因子である N F A T が脱リン酸化されて細胞質内から核内に移行し、I L - 2 などのサイトカインが産生される。また、P P I A は、血管炎症候群を含む様々な疾患の治療に使用されている免疫抑制剤シクロスポリン（cyclosporin；以下「C y A」と略記する）の細胞内結合タンパク質でもある。C y A は P P I A と複合体を形成し、この複合体はカルシニューリンに結合する。その結果、N F A T のカルシニューリンによる脱リン酸化が阻害され、I L - 2 などのサイトカインの産生が抑制される。これらのことから、抗 P P I A 抗体がカルシニューリンの活性に何らかの影響を及ぼしている可能性、および抗 P P I A 抗体が高安動脈炎の病態形成に関与している可能性が推測されるが、詳細は不明である。

30

【0019】

本発明の診断方法は、被験者から採取された生体試料中の抗ペルオキシレドキシン 2 (peroxiredoxin 2 ; 以下「P R D X 2」と略記する) 抗体の量を測定するステップをさらに含んでいてもよい。すなわち、本発明の診断方法は、一つの生体試料について、抗 P P I A 抗体の量を測定するとともに、抗 P R D X 2 抗体の量を測定してもよい。「抗 P R D X 2 抗体」とは、ヒト P R D X 2 に特異的に結合しうるヒト抗体を意味する。抗 P R D X 2 抗体が血管炎（高安動脈炎など複数の疾患を含む）に特異的なマーカーであることは、本発明者らにより開示されている（例えば、国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 4 6 3 8 号パンフレット参照）。

40

【0020】

生体試料中の抗 P R D X 2 抗体の量を測定する方法は、免疫測定法などの当業者に公知の測定法から選択することができるがこれに限定されない。免疫測定法の例には、ウェス

50

タンブロット法、ELISA法、EIA法、CLIA法、CLEIA法、RIA法、ラテックス凝集法、イムノクロマト法などが含まれる。例えば、後述する本発明の診断キットを用いれば、ELISA法やラテックス凝集法などで抗PRDX2抗体の量を測定することができる。

【0021】

免疫測定法で用いられる抗原は、抗PRDX2抗体が結合しうるタンパク質またはペプチドであれば特に限定されない。そのような抗原の例には、ヒトPRDX2(GI33875462)、ヒトPRDX2の断片(エピトープ部分を含むペプチド)、これらと他のタンパク質(ペプチド)との融合タンパク質などが含まれる。これらの抗原は、当業者に公知の遺伝子工学技術および分子生物学的技術を用いて調製することができる。これらの抗原は、担体に固定化されていてもよいし、固定化されていなくてもよい。また、これらの抗原は、酵素、放射性同位体、蛍光色素、アビジン、ビオチンなどで標識されていてもよい。

10

【0022】

例えば、生体試料中の抗PPIA抗体および抗PRDX2抗体の量を測定した結果、抗PPIA抗体の量が所定のカットオフ値よりも多いか、または抗PRDX2抗体の量が所定のカットオフ値よりも多いときは、当該患者は高安動脈炎を発病している可能性が高いと判定する。このようにすることで、偽陰性率を低減させることができる(実施例参照)。抗PRDX2抗体のカットオフ値は、診断の目的に応じて、健常者から採取した生体試料中の抗PRDX2抗体の測定値などから設定すればよい。

20

【0023】

2. 本発明の高安動脈炎の診断キット

本発明の診断キットは、生体試料中の抗PPIA抗体の量を免疫測定法により測定するためのキットであり、本発明の診断方法に用いることができる。

【0024】

本発明の診断キットは、抗PPIA抗体に対応する抗原を有することを特徴とする。本発明の診断キットは、この抗原と抗PPIA抗体との抗原抗体反応を検出して、生体試料中の抗PPIA抗体の量を測定する。

【0025】

抗PPIA抗体に対応する抗原は、抗PPIA抗体が結合しうるタンパク質またはペプチドであれば特に限定されない。そのような抗原の例には、ヒトPPIA(GI48145531)、ヒトPPIAの断片(エピトープ部分を含むペプチド)、これらと他のタンパク質(ペプチド)との融合タンパク質などが含まれる。これらの抗原は、当業者に公知の遺伝子工学技術および分子生物学的技術を用いて調製することができる。これらの抗原は、担体に固定化されていてもよいし、固定化されていなくてもよい。抗原を担体に固定化する方法は、当業者に公知の方法から選択することができる。また、これらの抗原は、酵素、放射性同位体、蛍光色素、アビジン、ビオチンなどで標識されていてもよい。

30

【0026】

本発明の診断キットは、適用する免疫測定法に応じて、抗PPIA抗体に結合しうる抗体または前記抗原に特異的に結合しうる抗体を有していてもよい。これらの抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよい。抗体の例には、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fvフラグメントなどの抗体の一部断片も含まれる。これらの抗体は、当業者に公知の抗体作製法を用いて作製することができるし、市販のものを購入してもよい。これらの抗体は、担体に固定化されていてもよいし、固定化されていなくてもよい。抗体を担体に固定化する方法は、当業者に公知の方法から選択することができる。また、これらの抗体は、酵素、放射性同位体、蛍光色素、アビジン、ビオチンなどで標識されていてもよい。

40

【0027】

本発明の診断キットは、抗PRDX2抗体に対応する抗原をさらに有していてもよい。抗PRDX2抗体に対応する抗原は、抗PRDX2抗体が結合しうるタンパク質またはペ

50

プチドであれば特に限定されない。抗原の例には、ヒトPRDX2 (GI33875462)、ヒトPRDX2の断片(エピトープ部分を含むペプチド)、これらと他のタンパク質(ペプチド)との融合タンパク質などが含まれる。これらの抗原は、当業者に公知の遺伝子工学技術および分子生物学的技術を用いて調製することができる。これらの抗原は、担体に固定化されていてもよいし、固定化されていなくてもよい。抗原を担体に固定化する方法は、当業者に公知の方法から選択することができる。また、これらの抗原は、酵素、放射性同位体、蛍光色素、アビジン、ビオチンなどで標識されていてもよい。

【0028】

また、本発明の診断キットが抗PRDX2抗体に対応する抗原を有する場合、本発明の診断キットは、適用する免疫測定法に応じて、抗PRDX2抗体に結合しうる抗体または前記抗原に特異的に結合しうる抗体を有していてもよい。これらの抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよい。抗体の例には、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fvフラグメントなどの抗体の一部断片も含まれる。これらの抗体は、当業者に公知の抗体作製法を用いて作製することができるし、市販のものを購入してもよい。これらの抗体は、担体に固定化されていてもよいし、固定化されていなくてもよい。抗体を担体に固定化する方法は、当業者に公知の方法から選択することができる。また、これらの抗体は、酵素、放射性同位体、蛍光色素、アビジン、ビオチンなどで標識されていてもよい。

10

【0029】

このように、抗PRDX2抗体に対応する抗原を有する診断キットを用いることで、抗PPIA抗体だけでなく抗PRDX2抗体の量も測定できるようになる。この場合、抗PPIA抗体の反応場と抗PRDX2抗体の反応場とは同じであってもよいし異なってもよい。例えば、本発明の診断キットが96ウェルプレートである場合、抗PPIA抗体に対応する抗原を固定化されているウェルと抗PRDX2抗体に対応する抗原を固定化されているウェルとは同じであってもよいし異なってもよい。

20

【0030】

自己抗体を検出するための診断キットは、自己抗体の種類に応じて様々なものが市販されている。本発明の診断キットも、抗PPIA抗体に対応する抗原や、前記抗原に特異的に結合しうる抗体、抗PPIA抗体に結合しうる抗体などを用いることを除き、当業者に公知の診断キットに用いられている各要素によって構成することができる。

30

【0031】

以下、本発明の実施の形態について図面を参照して説明する。本発明はこれらの実施の形態により限定されない。

【0032】

(実施の形態1)

図1は、実施の形態1の診断方法および診断キットを説明するための模式図である。本実施の形態では、ELISA法で抗PPIA抗体の量を測定する例を示す。

【0033】

図1(A)において、診断キット100は、抗原110が固定化された担体120と、抗PPIA抗体に結合しうる標識抗体130(不図示)とを有する。

40

【0034】

抗原110は、検出対象の抗PPIA抗体140が結合しうるタンパク質またはペプチドであり、担体120に固定化されている。抗原110は、例えば、ヒトPPIAやその断片などである。担体120は、例えば、樹脂プレートやメンブレンなどである。

【0035】

標識抗体130は、検出対象の抗PPIA抗体140に結合しうる抗体であり、例えば抗ヒトIgG抗体である。標識抗体130は、HRPなどの酵素や、放射性同位体、蛍光色素などで標識されている。

【0036】

次に、この診断キットを用いた診断方法の手順を説明する。

50

【 0 0 3 7 】

まず、被験者から採取した生体試料（例えば、血清）を担体 1 2 0 上に滴下する。図 1 (B) に示されるように、生体試料に含まれる検出対象の抗 P P I A 抗体 1 4 0 は、抗原 1 1 0 に結合する。

【 0 0 3 8 】

担体 1 2 0 表面を洗浄した後、標識抗体 1 3 0 を含む溶液を担体 1 2 0 上に滴下する。図 1 (C) に示されるように、標識抗体 1 3 0 は、抗 P P I A 抗体 1 4 0 に結合する。

【 0 0 3 9 】

担体 1 2 0 表面を再度洗浄した後、標識抗体 1 3 0 のシグナルを検出して抗 P P I A 抗体 1 4 0 の量を測定する。例えば、標識抗体 1 3 0 が H R P などの酵素で標識されている場合は、酵素作用によって発色する基質を担体 1 2 0 上に滴下し、基質の分解量を光学的に測定して酵素活性を測定し、結合抗体量に換算すればよい。また、標識抗体 1 3 0 が放射性同位体で標識されている場合は、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンターなどにより測定すればよい。また、標識抗体 1 3 0 が蛍光色素で標識されている場合は、蛍光プレートリーダーなどにより測定すればよい。

10

【 0 0 4 0 】

最後に、抗 P P I A 抗体 1 4 0 の測定値と所定のカットオフ値とを比較して、被験者が高安動脈炎を発病している可能性が高いかどうかを判定する。

【 0 0 4 1 】

（実施の形態 2）

図 2 は、実施の形態 2 の診断方法および診断キットを説明するための模式図である。本実施の形態では、E L I S A 法（実施の形態 1 とは異なる）で抗 P P I A 抗体の量を測定する例を示す。

20

【 0 0 4 2 】

図 2 (A) において、診断キット 2 0 0 は、抗 P P I A 抗体に特異的に結合しうる抗体 2 1 0 が固定化された担体 2 2 0 と、標識抗原 2 3 0（不図示）とを有する。

【 0 0 4 3 】

抗体 2 1 0 は、検出対象の抗 P P I A 抗体 1 4 0 に結合しうる抗体であり、担体 2 2 0 に固定化されている。担体 2 2 0 は、例えば、樹脂プレートやメンブレンなどである。

【 0 0 4 4 】

標識抗原 2 3 0 は、検出対象の抗 P P I A 抗体 1 4 0 が結合しうるタンパク質またはペプチドである。標識抗原 2 3 0 は、H R P などの酵素や、放射性同位体、蛍光色素などで標識されている。

30

【 0 0 4 5 】

次に、この診断キットを用いた診断方法の手順を説明する。

【 0 0 4 6 】

まず、被験者から採取した生体試料を担体 2 2 0 上に滴下する。図 2 (B) に示されるように、抗体 2 1 0 は、生体試料に含まれる検出対象の抗 P P I A 抗体 1 4 0 に結合する。

【 0 0 4 7 】

担体 2 2 0 表面を洗浄した後、標識抗原 2 3 0 を含む溶液を担体 2 2 0 上に滴下する。図 2 (C) に示されるように、抗 P P I A 抗体 1 4 0 は、標識抗原 2 3 0 に結合する。

40

【 0 0 4 8 】

担体 2 2 0 表面を再度洗浄した後、実施の形態 1 と同様に標識抗原 2 3 0 のシグナルを検出して抗 P P I A 抗体 1 4 0 の量を測定する。

【 0 0 4 9 】

最後に、抗 P P I A 抗体 1 4 0 の測定値と所定のカットオフ値とを比較して、被験者が高安動脈炎を発病している可能性が高いかどうかを判定する。

【 0 0 5 0 】

（実施の形態 3）

50

図3は、実施の形態3の診断方法および診断キットを説明するための模式図である。本実施の形態では、ラテックス凝集法で抗PPIA抗体の量を測定する例を示す。

【0051】

図3(A)において、診断キット300は、抗原110が固定化された担体粒子310を有する。

【0052】

抗原110は、検出対象の抗PPIA抗体140が結合しうるタンパク質またはペプチドであり、担体粒子310に固定化されている。担体粒子310は、例えば、ラテックス粒子などである。

【0053】

次に、この診断キットを用いた診断方法の手順を説明する。

【0054】

まず、被験者から採取した生体試料（例えば、血清）と抗原110が固定化された複数の担体粒子310とを混合する。生体試料に含まれる検出対象の抗PPIA抗体140は抗原110に結合する。結果として、担体粒子310は、図3(B)に示されるように凝集する。

【0055】

免疫凝集物を形成させた後、混合液に光を照射し、散乱光または透過光を測定して、抗PPIA抗体140の量を測定する。

【0056】

最後に、抗PPIA抗体140の測定値と所定のカットオフ値とを比較して、被験者が高安動脈炎を発病している可能性が高いかどうかを判定する。

【0057】

以上のように、本発明の診断方法は、抗PPIA抗体を高安動脈炎のマーカーとすることで、高安動脈炎を迅速かつ容易に診断することができる。本発明の診断方法は、高安動脈炎であるかどうかを診断する際の補助的な血液検査として有用である。また、本発明の診断方法は、高安動脈炎の疾患活動性の評価、治療効果の確認、臨床経過のモニタリングなどにおいても適用可能である。

【0058】

従来、高安動脈炎の診断にはMRIなどの高額な画像診断装置が使用されている。本発明の診断方法は、高額な装置を必要としないため、従来の方法に比べて低費用で行うことができる。

【0059】

わが国において、川崎病をはじめとする原発性血管炎患者が約14万人、血管炎を併発しうる続発性血管炎患者が約80万人、さらに不明熱などの血管炎の有無の診断が必要とされる患者も多数いることから、本発明の診断方法は非常に有用である。

【0060】

以下、本発明を実施例を参照して詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

【実施例】

【0061】

[実施例1]

実施例1では、抗PPIA抗体を指標として高安動脈炎を診断した例を示す。

【0062】

1. A E C A 対応抗原の同定

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell ; 以下「H U V E C」と略記する) および H e L a 細胞 (対照) から抽出したタンパク質をそれぞれ2次元ゲル電気泳動法で分離した。血管炎 (高安動脈炎を含む) の患者の血清 (1次抗体) および H R P 標識抗ヒト I g G 抗体 (2次抗体) を用いたウェスタンブロット法により、H U V E C のみで認められるスポットを同定した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

再度、H U V E C から抽出したタンパク質を 2 次元ゲル電気泳動法で分離し、先に同定されたスポットに対応する箇所のゲルを切り出した。切り出したゲルに対してトリプシン処理を行い、断片化したペプチドを抽出した。このペプチドの質量を質量分析器を用いて測定し、ペプチドマスフィンガープリンティング法を用いて切り出したゲルに含まれるタンパク質を同定した。その結果、同定されたスポットに含まれるタンパク質が P P I A (G I 4 8 1 4 5 5 3 1) であることが判明した。

【 0 0 6 4 】

2 . P P I A の調製

H U V E C の c D N A を 鋳型 D N A とし、P C R 法で P P I A 遺伝子のコード領域を増幅した。p E T B l u e 2 ベクターに P P I A 遺伝子のコード領域を組み込み、発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターを大腸菌 D H 5 に導入し、大腸菌を形質転換させた。単一コロニー由来のプラスミド D N A をミニプレップ法により抽出し、塩基配列を決定して、プラスミド D N A に P P I A 遺伝子のコード領域が組み込まれていることを確認した。

10

【 0 0 6 5 】

抽出したプラスミド D N A を大腸菌 D E 3 に導入し、形質転換させた。最終濃度が 0 . 3 m M となるように I P T G (isopropyl-1-thio-β-D-galactoside) を培地中に加えて P P I A (ヒスチジntag が付加されている) の発現を誘導し、カラムを用いて P P I A を精製した。ウェスタンブロット法により、精製したタンパク質にヒスチジntag が付加されていることを確認した。また、精製したタンパク質の分子量は、P P I A と一致していた。

20

【 0 0 6 6 】

3 . E L I S A 法による診断

P P I A の 2 . 5 μ g / m L 溶液を調製した。この溶液を 9 6 ウェルプレートの各ウェルに提供して、各ウェルを P P I A でプレコートした。各ウェルに血管炎患者 (3 3 人) の血清 (1 次抗体) の 4 0 0 倍希釈液を提供し、反応させた。血管炎患者の内訳は、高安動脈炎 7 人、巨細胞性動脈炎 3 人、結節性多発動脈炎 1 人、顕微鏡的多発血管炎 1 5 人、ウェゲナー肉芽腫症 3 人、アレルギー性肉芽腫性血管炎 4 人である。洗浄後、H R P 標識抗ヒト I g G 抗体 (2 次抗体) の 4 0 0 0 倍希釈液を提供し、反応させた。洗浄後、H R P の基質を加えて発色させ、P P I A と血清に含まれる自己抗体との結合反応を検出した。対照実験として、血管炎患者の血清の代わりに健常人 (2 7 人) の血清を用いて同じ実験を行った。

30

【 0 0 6 7 】

図 4 は、疾患別の P P I A に対する自己抗体の陽性率を示すグラフである。縦軸の「結合単位」は、健常人 (2 7 人) の O D 値の平均値に標準偏差の 3 倍の値 (0 . 2 5 6) を加えた値を 1 0 0 として定義した単位である。本実施例では、結合単位が 1 0 0 以上のとき陽性と判定し、1 0 0 未満のとき陰性と判定した。

【 0 0 6 8 】

図 4 のグラフに示されるように、高安動脈炎の患者における P P I A に対する自己抗体の陽性率は 8 5 . 7 % (6 / 7) であった。一方、血管炎の患者全体における P P I A に対する自己抗体の陽性率は 3 0 . 3 % (1 0 / 3 3) であり、健常人における P P I A に対する自己抗体の陽性率は 0 % (0 / 2 7) であった。このことから、抗 P P I A 抗体は、高安動脈炎に特異性の高いマーカーであることがわかる。

40

【 0 0 6 9 】

[実施例 2]

実施例 2 では、抗 P P I A 抗体を指標として高安動脈炎を診断した例を示す。

【 0 0 7 0 】

1 . P P I A の調製

P P I A は、実施例 1 と同様の手順により調製した。

50

【 0 0 7 1 】

2 . E L I S A 法による診断

実施例 1 の手順と同様にして各ウェルを P P I A でプレコートした 9 6 ウェルプレートを作製した。各ウェルに高安動脈炎の患者 (7 人) または健常人 (2 7 人) の血清 (1 次抗体) の希釈液を提供し、反応させた。洗浄後、H R P 標識抗ヒト I g G 抗体 (2 次抗体) の希釈液を提供し、反応させた。洗浄後、H R P の基質を加えて発色させ、P P I A と血清に含まれる自己抗体との結合反応を検出した。実施例 1 と同様に、結合単位が 1 0 0 以上のとき陽性と判定し、1 0 0 未満のとき陰性と判定した。

【 0 0 7 2 】

表 1 は、高安動脈炎以外の血管炎の患者および健常人の血清についての検査結果を示す表である。

10

【表 1】

| 疾患 | 抗 P P I A 抗体陽性 | 抗 P P I A 抗体陰性 |
|------------------|----------------|----------------|
| 高安動脈炎あり | 6 | 1 |
| 高安動脈炎なし (健常人) | 0 | 2 7 |

【 0 0 7 3 】

表 1 に示されるように、本発明の診断方法の感度は 8 5 . 7 % (6 / 7) であった。また、本発明の診断方法の特異度は 1 0 0 % (2 7 / 2 7) であった。このことから、本発明の診断方法は、高感度かつ高特異度であることがわかった。

20

【 0 0 7 4 】

[実施例 3]

実施例 3 では、抗 P P I A 抗体だけでなく抗 P R D X 2 抗体も指標として高安動脈炎を診断した例を示す。

【 0 0 7 5 】

1 . P P I A および P R D X 2 の調製

P P I A は、実施例 1 と同様の手順により調製した。P R D X 2 (G I 3 3 8 7 5 4 6 2) は、国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 4 6 3 8 号パンフレットに記載の手順により調製した。

30

【 0 0 7 6 】

2 . E L I S A 法による診断

(1) 抗 P P I A 抗体を指標とする診断

実施例 1 の手順と同様にして各ウェルを P P I A でプレコートした 9 6 ウェルプレートを作製した。各ウェルに高安動脈炎の患者、高安動脈炎以外の血管炎の患者または健常人の血清 (1 次抗体) の希釈液を提供し、反応させた。洗浄後、H R P 標識抗ヒト I g G 抗体 (2 次抗体) の希釈液を提供し、反応させた。洗浄後、H R P の基質を加えて発色させ、P P I A と血清に含まれる自己抗体との結合反応を検出した。実施例 1 と同様に、結合単位が 1 0 0 以上のとき陽性と判定し、1 0 0 未満のとき陰性と判定した。

【 0 0 7 7 】

(2) 抗 P R D X 2 抗体を指標とする診断

P R D X 2 の 1 0 μ g / m L 溶液を調製した。この溶液を 9 6 ウェルプレートの各ウェルに提供して、各ウェルを P R D X 2 でプレコートした。各ウェルに高安動脈炎の患者、高安動脈炎以外の血管炎の患者または健常人の血清 (1 次抗体) の希釈液を提供し、反応させた。洗浄後、H R P 標識抗ヒト I g G 抗体 (2 次抗体) の希釈液を提供し、反応させた。洗浄後、H R P の基質を加えて発色させ、P R D X 2 と血清に含まれる自己抗体との結合反応を検出した。実施例 1 と同様に、結合単位が 1 0 0 以上のとき陽性と判定し、1 0 0 未満のとき陰性と判定した。

40

【 0 0 7 8 】

表 2 は、高安動脈炎の患者 (7 人) および高安動脈炎以外の血管炎の患者 (2 6 人) の

50

血清についての抗 P P I A 抗体の検査結果を示す表である。

【表 2】

| 疾患 | 抗 P P I A 抗体陽性 | 抗 P P I A 抗体陰性 |
|------------------------|----------------|----------------|
| 高安動脈炎あり | 6 | 1 |
| 高安動脈炎なし (他の血管炎疾患あり) | 4 | 2 2 |

【 0 0 7 9 】

表 2 に示されるように、抗 P P I A 抗体のみを指標とする診断の感度は 8 5 . 7 (6 / 7) であった。また、抗 P P I A 抗体のみを指標とする診断の特異度は 8 4 . 6 % (2 2 / 2 6) であった。

10

【 0 0 8 0 】

表 3 は、高安動脈炎の患者 (7 人) および高安動脈炎以外の血管炎の患者 (3 3 人) の血清についての抗 P R D X 2 抗体の検査結果を示す表である。

【表 3】

| 疾患 | 抗 P R D X 2 抗体陽性 | 抗 P R D X 2 抗体陰性 |
|------------------------|------------------|------------------|
| 高安動脈炎あり | 6 | 1 |
| 高安動脈炎なし (他の血管炎疾患あり) | 1 8 | 1 5 |

20

【 0 0 8 1 】

表 3 に示されるように、抗 P R D X 2 抗体のみを指標とする診断の感度は 8 5 . 7 % (6 / 7) であった。また、抗 P R D X 2 抗体のみを指標とする診断の特異度は 4 5 . 5 % (1 5 / 3 3) であった。このことから、抗 P R D X 2 抗体のみを指標とする診断は、感度は高いが特異度が低いことがわかる。

【 0 0 8 2 】

表 4 は、高安動脈炎の患者 (7 人) の血清についての抗 P P I A 抗体および抗 P R D X 2 抗体の検査結果を示す表である。

【表 4】

| 番号 | 抗 P P I A 抗体陽性 | 抗 P R D X 2 抗体陽性 |
|----|----------------|------------------|
| 1 | ○ | ○ |
| 2 | ○ | ○ |
| 3 | ○ | × |
| 4 | × | ○ |
| 5 | ○ | ○ |
| 6 | ○ | ○ |
| 7 | ○ | ○ |

30

【 0 0 8 3 】

抗 P P I A 抗体陽性または抗 P R D X 2 抗体陽性のときに、その患者は高安動脈炎を発病している可能性が高いと判定する。このようにすることで、抗 P P I A 抗体のみを指標とする診断に比べて偽陰性率を低減させることができる。実際に、本実施例では、偽陰性率を 1 4 . 3 % (1 / 7) から 0 % (0 / 7) に低減させることができた。

40

【産業上の利用可能性】

【 0 0 8 4 】

本発明の高安動脈炎の診断方法は、大掛かりな設備を必要とせず、被験者への負担も少ないため、例えば高安動脈炎の診断補助血液検査として有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 5 】

【図 1】実施の形態 1 の診断方法および診断キットを説明するための模式図

50

【図2】実施の形態2の診断方法および診断キットを説明するための模式図

【図3】実施の形態3の診断方法および診断キットを説明するための模式図

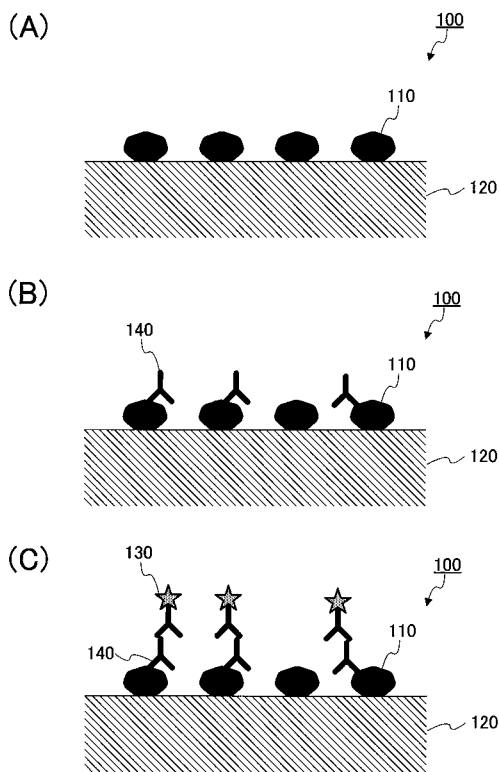
【図4】実施例1の結果を示すグラフ

【符号の説明】

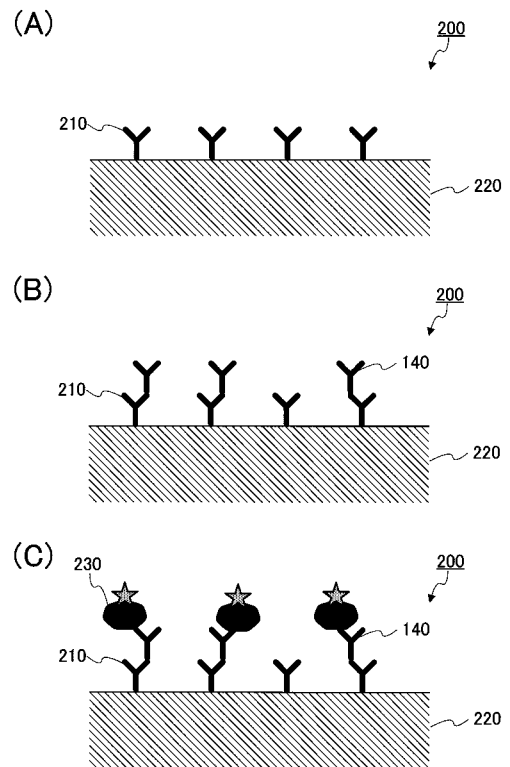
【0086】

- 100, 200, 300 診断キット
- 110 抗PPiA抗体に対応する抗原
- 120, 220 担体
- 130 抗PPiA抗体に結合しうる標識抗体
- 140 抗PPiA抗体
- 210 抗PPiA抗体に結合しうる抗体
- 230 抗PPiA抗体に対応する標識抗原
- 310 担体粒子

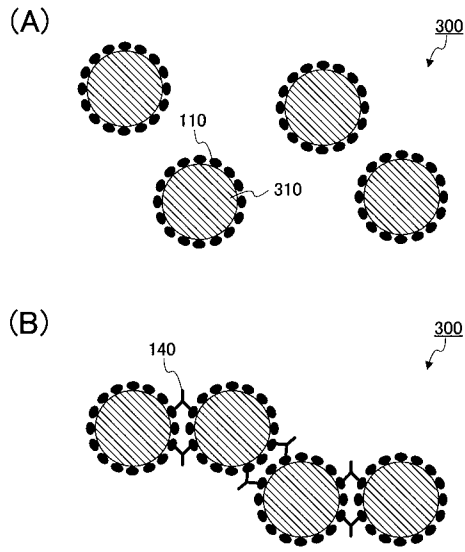
【図1】



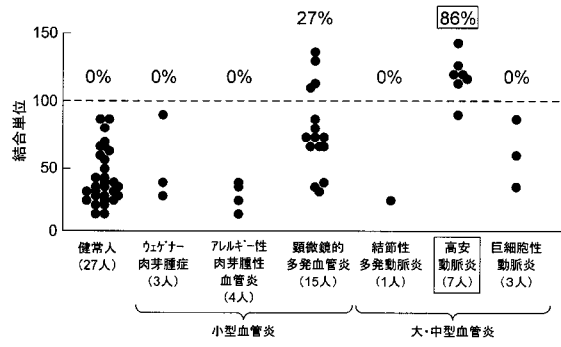
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



| | | | |
|-------------|-------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 诊断大动脉炎的方法和用于其的诊断试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | JP2009294096A | 公开(公告)日 | 2009-12-17 |
| 申请号 | JP2008148223 | 申请日 | 2008-06-05 |
| 申请(专利权)人(译) | 医学院法人圣玛丽安娜大学 | | |
| [标]发明人 | 加藤智啓 唐澤里江 | | |
| 发明人 | 加藤 智啓 唐澤 里江 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.N | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种使用血清标记物诊断Takayasu动脉炎的方法。
 解决方案：使用抗肽基脯氨酰异构酶A (PPIA) 抗体的量作为指标进行诊断。测量血清中抗-PPIA抗体的量，并且当抗-PPIA抗体的量大于预定值时，受试者判断出已发生了大动脉炎。通过使用抗PPIA抗体的量作为指标，可以快速且容易地诊断出Takayasu动脉炎。 点域4

