

(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2018-165694

(P2018-165694A)

(43) 公開日 平成30年10月25日(2018.10.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 L	
CO 7 K 16/42 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
	CO 7 K 16/42	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2017-63667 (P2017-63667)	(71) 出願人 304036754 国立大学法人山形大学 山形県山形市小白川町1丁目4-12
(22) 出願日 平成29年3月28日(2017.3.28)	(71) 出願人 302072136 株式会社キューメイ研究所 大分県大分市大字古国府字永畑549番3
(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構難治性疾患実用化研究事業「後天性凝固異常症のP. O. C. テストによる迅速診断システムの開発」委託研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願	(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔
	(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 節
	(74) 代理人 100111741 弁理士 田中 夏夫
	(72) 発明者 一瀬 白帝 山形県山形市飯田西2-2-2 国立大学 法人山形大学医学部内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗第XIII/13因子Aサブユニットに対するIgM又はIgA型抗体検出法

(57) 【要約】

【課題】血液中の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)に対するIgM又はIgA抗体を検出する方法及び該検出に用いるキットの提供。

【解決手段】血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)に対する遊離のIgM又はIgA抗体を検出する方法であって、第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIg抗体を接触させ、支持体上で第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)-第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)に対するIgM又はIgA抗体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することを含む方法、並びに該方法に用いるキット。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対する遊離のIgM又はIgA型抗体を検出する方法であって、第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIg抗体を接触させ、支持体上で第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) - 第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することを含む方法。

【請求項 2】

第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対する遊離のIgM又はIgA抗体がIgM又はIgA型自己抗体である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体を検出する方法であって、抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIg抗体を接触させ、支持体上で抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体-第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体の複合体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することを含む方法。

【請求項 4】

第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体がIgM又はIgA型自己抗体である、請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 5】

ウエスタンブロット法、ELISA法及びイムノクロマト法からなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

自己免疫性出血病XIII/13 (AH13) の検出のための補助的データを取得するための方法である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIg抗体を含み、支持体上で第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) - 第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対する遊離のIgM又はIgA型抗体を検出するためのキット。

30

【請求項 8】

抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIg抗体を含み、支持体上で抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体-第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体の複合体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体を検出するためのキット。

40

【請求項 9】

ウエスタンブロット法用キット、ELISA法用キット及びイムノクロマト法用キットからなる群から選択される、請求項 7 又は 8 に記載のキット。

【請求項 10】

自己免疫性出血病XIII/13 (AH13) の検出のための補助的データを取得するためのキットである、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対するIgM又はIgA型抗体検出法に関する。

【背景技術】

【0002】

凝固第XIII/13因子（FXIII/13）の著明な低下が原因である自己免疫性出血病XIII/13（AH13；厚生労働省指定難病288）は、早期診断、早期治療が必要な重篤な出血性疾患であり、多彩な原因によって発症することが知られている（非特許文献1～3を参照）。凝固第XIII/13因子（FXIII/13）はAサブユニットとBサブユニットを有し、いずれのサブユニットに対する抗体の出現に基づく自己免疫性出血病XIII/13（AH13）は、治療に免疫抑制療法が必要なため、迅速な抗体の検出が不可欠である。これまで、信頼できる抗第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13）自己抗体の検出法がなかったため、再現性の高い検出法の確立が望まれていた。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Ichinose A, et al.; Haemophilia. 2015 Sep;21(5):653-8.

【非特許文献2】Souri M, et al.; J Thromb Haemost. 2015 May;13(5):802-14.

20

【非特許文献3】Wada H, et al.; Thromb Haemost. 2013 Apr;109(4):661-8.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、血液中の第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対するIgM又はIgA型抗体を検出する方法及び該検出に用いるキットの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、自己の第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する抗体の出現に基づく自己免疫性出血病XIII/13(AH13)を正確に診断すべく、第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する自己抗体の検出法について鋭意検討を行った。

30

【0006】

本発明者らは、第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する自己抗体のクラスを確認したところ、IgM又はIgA型自己抗体が存在することを見出した。そこで、IgM又はIgA型自己抗体を検出すべく、自己抗体を認識するための抗体として抗ヒトIg抗体を用いることとした。さらに、第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する自己抗体が遊離の抗体の状態、又は第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）と複合体を形成した状態で血液中に存在することに鑑み、第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）を支持体に固相化して血中の第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する遊離の自己抗体を捕捉して測定するサンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定法、及び抗第XIII/13因子Aサブユニット抗体を支持体に固相化し第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）と複合体を形成した状態で血液中に存在する第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する自己抗体を捕捉するサンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定法を開発し、血液中の第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する自己抗体を高感度でかつ特異的に検出し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

40

【0007】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）に対する遊離のIgM又はIgA型抗体を検出する方法であって、第XIII/13因子Aサブユニット（FXIII/13-A）を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIg抗体を接触させ、支持体上で第XIII/13因子A

50

サブユニット (FXIII/13-A) - 第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することを含む方法。

[2] 第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対する遊離のIgM又はIgA抗体がIgM又はIgA型自己抗体である、[1]の方法。

[3] 血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体を検出する方法であって、抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIg抗体を接触させ、支持体上で抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体-第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体の複合体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することを含む方法。

[4] 第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体がIgM又はIgA型自己抗体である、[3]の方法。

[5] ウェスタンブロット法、ELISA法及びイムノクロマト法からなる群から選択される、[1]~[4]のいずれかの方法。

[6] 自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の検出のための補助的データを取得するための方法である、[1]~[5]のいずれかの方法。

[7] 第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIg抗体を含み、支持体上で第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) - 第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対する遊離のIgM又はIgA型抗体を検出するためのキット。

[8] 抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIg抗体を含み、支持体上で抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体-第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体の複合体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIg抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体を検出するためのキット。

[9] ウェスタンブロット法用キット、ELISA法用キット及びイムノクロマト法用キットからなる群から選択される、[7]又は[8]のキット。

[10] 自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の検出のための補助的データを取得するためのキットである、[7]~[9]のいずれかのキット。

【発明の効果】

【0008】

本発明の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) を固相化した支持体又は抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIg抗体を用いた、サンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定法により、血液中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体を高感度でかつ特異的に検出することができる。被験体の血液中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対する自己抗体又は同種抗体を検出することにより、IgM又はIgA型抗体を有する自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の検出、遺伝性第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 欠乏症症例における「抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 同種抗体」の検出を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】金コロイド結合抗ヒトIg(G+M+A)抗体の濃度検討の結果を示す図である。Aは、各

10

20

30

40

50

条件におけるICT(イムノクロマト法)の結果を示し、Bは、各条件におけるテストライン及びコントロールラインの強度比較の結果を示す。1-4: 陰性コントロール-1, 直接法; 5-8: 陽性コントロール-1, 混合法; 1, 2, 5, 6: B社; 3, 4, 7, 8: S社; 1, 3, 5, 7: 抑制剤入り希釈バッファーで5倍希釈; 2, 4, 6, 8: 感度調製用バッファーで2倍希釈後、抑制剤入り希釈バッファーで5倍希釈して用いた。

【図2】金コロイド結合抗ヒトIgG抗体と金コロイド結合抗ヒトIg(G+M+A)抗体の比較の結果を示す図である。A~Cは、各種金コロイド結合抗ヒトIg抗体を用いたICTの結果を示し、D~Fは、各種金コロイド結合抗ヒトIg抗体を用いたICTのテストライン及びコントロールラインの強度を示す。用いた検出抗体はB社金コロイド抗ヒトIg(G+M+A)抗体(A, D), S社金コロイド抗ヒトIg(G+M+A)抗体(B, E), 金コロイド抗ヒトIgG抗体(C, F)であった。1: 陰性コントロール-1, 直接法; 2: 患者-1, 直接法; 3: 患者-1, 混合法; 4: 陽性コントロール-2, 混合法; 5: 陽性コントロール-1, 混合法。カットオフ値は点線で示す。

【図3】AH13症例のイムノクロマト法(ICT)による判定の結果を示す図である。AはB社金コロイド結合抗ヒトIg(G+M+A)抗体を用いたICTの結果を示し、Cはテストライン及びコントロールラインの強度を示し、Bは金コロイド結合抗ヒトIgG抗体を用いたICTの結果を示し、Dはテストライン及びコントロールラインの強度を示す。1: 陰性コントロール-1, 直接法; 2: 陰性コントロール-2, 直接法; 3: 患者-2, 直接法; 4: 患者-2, 混合法; 5: 陽性コントロール-2, 混合法。カットオフ値は点線で示す。

【図4】非AH13症例検体のICTによる判定の結果を示す図である。AはB社金コロイド結合抗ヒトIg(G+M+A)抗体を用いたICTの結果を示し、Cはテストライン及びコントロールラインの強度を示し、Bは金コロイド結合抗ヒトIgG抗体を用いたICTの結果を示し、Dはテストライン及びコントロールラインの強度を示す。1: 陰性コントロール-1, 直接法; 2: 陰性コントロール-3, 直接法; 3: 患者-3, 直接法; 4: 患者-3, 混合法; 5: 陽性コントロール-2, 混合法。カットオフ値は点線で示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

本発明は、血液中の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-Aタンパク質)に対するIgM又はIgA型自己抗体を、サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法により測定する方法である。ここで本発明のサンドイッチ法を測定原理とした免疫学的測定法とは、抗体である標的物質を該標的物質に結合する抗原又は抗体を用いて挟み込むように捕捉して、標的物質を測定する方法をいい、単にサンドイッチ法ともいう。サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法においては、標的物質に結合し標的物質を捕捉し得る抗体又は抗原を結合させた固相を用いる。サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法としては、例えばイムノクロマト法、酵素免疫測定吸着法(ELISA法)、ウエスタンブロット法等が挙げられる。

【0012】

なお、本発明において、「測定」という場合、定量、半定量、検出のいずれも含む。

本発明の測定対象となる第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-Aタンパク質)に対する抗体としては、IgM又はIgA型の自己抗体、すなわち、自己の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-Aタンパク質)に対するIgM又はIgA型の抗体だけでなく、自己の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-Aタンパク質)に対するIgG型の抗体等他のクラスの抗体がある。また、同種抗体、すなわち、非自己の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-Aタンパク質)、例えば血漿由来FXIII/13濃縮剤中の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-Aタンパク質)に対する抗体も包含される。従来の方法では、標識抗体として抗IgG抗体が用いられており、IgG型の抗体のみが検出でき、IgM又はIgA型の抗体は検出できなかった。本発明の方法では、標識抗体として抗Ig抗体を用いるため、IgG型の抗体だけでなく、IgM又はIgA型の抗体も測定することができる。

【0013】

血液中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体は遊離の抗体として存在するか、あるいは第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した状態で存在する。血液中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) の量が多い場合、第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) とIgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) の複合体 (第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) -IgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) の複合体) が形成されやすくなる。従って、本発明の方法においては、遊離の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体又は第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) とIgM又はIgA抗体の複合体を検出する。

【0014】

第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対する遊離のIgM又はIgA抗体をサンドイッチ法により測定する場合、第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIg抗体を接触させる。接触方法は、支持体上に第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) -第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体が形成されうる方法であれば特に制限はないが、好ましくは以下のように処理する。

【0015】

すなわち、固相に第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) を結合させ、該固相に第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体を含む試料を添加する。第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型の抗体は固相に結合した第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に結合し捕捉される。次いで、IgM又はIgA型自己抗体 (又は同種抗体) に対する抗体であって標識した抗ヒトIg抗体を添加し、IgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) に結合させる。この結果、固相上に第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) -第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA型抗体-前記IgM又はIgA型抗体に対する抗体であって標識した抗体の複合体が形成され、標識した抗体から発するシグナルを測定することにより、試料中の第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体を測定することができる。この方法を「抗原塗布法」という。

【0016】

ここで、抗ヒトIg抗体は、IgG型抗体、IgA型抗体、及びIgM型抗体に結合し、IgM型抗体を検出すると共に、IgG型抗体及びIgA型抗体も検出することができる。すなわち、本発明のIgM型自己抗体を検出する方法は、IgM型抗体を検出すると共にIgG型抗体及びIgA型抗体を検出することができる。従って、抗ヒトIg抗体を「抗ヒトIg(G+M+A)」と表す場合もある。

【0017】

第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した状態で存在するIgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) をサンドイッチ法で測定する場合、抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIg抗体を接触させる。接触方法は、支持体上に抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体-第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) と第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) に対するIgM又はIgA抗体の複合体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体が形成されうる方法であれば特に制限はないが、好ましくは以下のように処理する。

【0018】

すなわち、固相に抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体を結合させ、該固相に第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) とIgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) の複合体を含む試料を添加する。第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) とIgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) の複合体は固相に結合した抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体に第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 部分が結合し捕捉される。次いで、IgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) に対する抗体であって標識した抗体を添加し、IgM又はIgA型の自己抗体 (又は同種抗体) に結合させる。この結果、固相上に抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 抗体-第XIII/13因子Aサブユニ

10

20

30

40

50

ット (FXIII/13-A) と IgM 又は IgA 型の自己抗体 (又は同種抗体) の複合体 - 前記 IgM 又は IgA 型の抗体に対する抗体であって標識した抗体の複合体が形成され、標識した抗体から発するシグナルを測定することにより、試料中の第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) と複合体を形成した第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) に対する IgM 又は IgA 型の抗体を測定することができる。この方法を「抗体塗布法」という。

【0019】

サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法において、第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) 又は抗第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化する固相としては、抗体や抗原を公知技術により固定可能なものは全て用いることができ、例えば、毛細管作用を有する多孔性薄膜 (メンブレン)、マイクロタイタープレート、粒子状物質、試験管、樹脂平板など公知のものを任意に選択できる。イムノクロマト法やウエスタンブロット法においてはメンブレンを、ELISA 法においてはマイクロタイタープレートを用いればよい。

10

【0020】

第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) 又は抗第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) 抗体の固相への結合は、吸着を利用してよいし、アミノ基、カルボキシル基等の官能基を利用して共有結合により結合させてもよい。

【0021】

固相化する抗第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) 抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体を用いる。抗体は公知の方法で製造することができる。また、市販の抗体を用いてもよい。

20

【0022】

標識して用いる第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) に対する抗体に対する抗体としては、抗ヒト Ig 抗体を用いればよい。抗ヒト Ig 抗体は、ヒト IgM 型抗体、ヒト IgG 型抗体及びヒト IgA 型抗体に結合する。抗第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) 抗体及び第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) に対する抗体に対する抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体を用いる。抗体は公知の方法で製造することができる。また、市販の抗体を用いてもよい。

【0023】

固相化又は標識して用いる抗体は、Fab や F(ab')₂ のような免疫グロブリン断片、あるいは、組換え体として発現された scFv、dsFv、diabody、minibody 等の組換え抗体であってもよい。本発明において、「抗体」という語は、これらの断片も含む。これらの断片は公知の方法で調製することができる。

30

【0024】

標識抗体を標識する物質としては、アルカリホスファターゼ (ALP) や西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 等の酵素、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、着色ポリスチレン粒子等の有色粒子や金コロイド等のコロイド粒子などを用いることができる。抗体の標識は公知の方法で行うことができる。

【0025】

用いる試料としては、被験体の全血、血清、血漿等が挙げられる。本発明において、血液中の第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) に対する抗体を検出するという場合、試料として全血、血清、血漿のいずれを用いる方法も含む。

40

【0026】

例えば、ELISA 法は以下の工程で行う。

第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) を固相化したポリスチレン等でできたマイクロタイタープレートに試料を添加し、抗原・抗体反応をさせ、さらに酵素標識した抗ヒト Ig 抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して試料中の第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) に対する遊離の IgM 又は IgA 型の抗体を検出することができる。あるいは、抗第 XIII/13 因子 A サブユニット (FXIII/13-A) 抗体を固相化したポリスチレン等でできたマイクロタイタープレートに試料を添加

50

し、抗原・抗体反応をさせ、さらに酵素標識した抗ヒトIg抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して試料中の第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)と複合体を形成したIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)を検出することができる。また、酵素で標識した抗ヒトIg抗体の代わりに蛍光標識した抗ヒトIg抗体を用いて、抗原・抗体反応をさせた後に蛍光を測定してもよい。

【0027】

ELISA法において、添加する試料の量は数十 μ L~数百 μ Lである。試料は数倍から十数倍に希釈して用いてもよい。

【0028】

抗原抗体反応は4 ~45、好ましくは20 ~40、さらに好ましくは25 ~38で行うことができ、また、反応時間は、10分~18時間、より好ましくは10分~1時間、さらに好ましくは30分~1時間程度である。

【0029】

また、イムノクロマト法は以下の工程で行う。

第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)に対する遊離のIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)を測定する場合、該自己抗体(又は同種抗体)を捕捉する第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)が固相化された検出領域を有する固相支持体(メンブレン)、着色ポリスチレン粒子や金コロイド等の標識物質で標識した展開移動可能な標識抗ヒトIg抗体を有する標識物質領域、試料を添加するサンプルパッド、展開された試料液を吸収する吸収帯、これら部材を1つに貼り合わせるためのバックグシートからなるイムノクロマト法用免疫測定デバイスを用いて行えばよい。該方法においては、第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)を固相化した固相支持体に毛管現象を利用して、着色ポリスチレン粒子や金コロイド等の適当な標識物質で標識した抗ヒトIg抗体と第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)に対する遊離のIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)の複合体をメンブレン上に展開移動させる。この結果、固相化した第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)-第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)に対する遊離のIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)-標識した抗ヒトIg抗体の複合体が固相支持体上に形成され、該複合体から発する標識物質のシグナル(金コロイドの場合は、被検出物質と結合し得る物質を固定化した固相支持体部分が赤くなる)を検出することにより、遊離のIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)を検出することができる。該免疫測定方法は、5~35、好ましくは室温で行うことができ、試料を添加後数分で判定することができる。

【0030】

第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)と複合体を形成したIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)を検出する場合、固相支持体上に抗第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)抗体を固相化すればよい。固相化する抗体は1種類でよいが、好ましくは複数種類を用いる。固相支持体上には、固相化した抗第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)抗体-第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)とIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)の複合体-標識した抗ヒトIg抗体の複合体が形成される。

【0031】

イムノクロマト法において、添加する試料の量は数十 μ L~数百 μ Lである。試料は数倍から十数倍に希釈して用いてもよい。

【0032】

イムノクロマト法は、4 ~45、好ましくは20 ~40、さらに好ましくは25 ~38で行うことができ、試料添加から判定までの時間は、数分から十数分程度である。

【0033】

イムノクロマト法で用いる固相支持体の材料は毛管現象により試料が吸収され展開流動し得るものであれば限定されない。例えば、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、ポリスチレン等の天然、合成ポリマー、又はこれらの混合物を用いることができる。固相支持体は好ましくは短冊状のストリップの形状を有する。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明のサンドイッチ法の測定原理を利用した免疫学的測定法により第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)に対する遊離のIgM又はIgA型の自己抗体(又は同種抗体)を測定するときに固相化に用いる第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)は、交叉反応が起こらない精製度の高いものを利用することが好ましく、特に組換え第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)を用いることが好ましい。また、第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)の断片タンパク質を用いてもよい。

【0035】

また、測定の際に測定系に増感剤を添加してもよい。増感剤としては、ポリエチレングリコールやポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、ポリアミノ酸、アミノメタンスルホン酸誘導体等が挙げられる。

10

【0036】

本発明の方法により、自己免疫性出血病XIII/13タイプA(AH13-A)疑い症例の血液において「抗第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)IgM又はIgA型自己抗体」を確実に検出することができる。本発明は、自己免疫性出血病XIII/13(AH13)のポイント・オブ・ケア・テスト(臨床現場迅速試験)のために有用である。また、測定原理が共通であることから、遺伝性第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)欠乏症症例における「抗第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)同種抗体」の検出にも有用である。

【0037】

すなわち、本発明は、自己免疫性出血病XIII/13(AH13)の検出方法、あるいは自己免疫性出血病XIII/13(AH13)の診断を行うための補助的データの取得方法を含む。さらに、本発明は、遺伝性第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)欠乏症症例における「抗第XIII/13因子Aサブユニット(FXIII/13-A)IgM又はIgA型同種抗体」を検出する方法を含む。

20

【実施例】

【0038】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0039】

抗ヒトIg(G+M+A)抗体を用いたイムノクロマト法(ICT)の開発

材料と方法

30

検体

陰性コントロール-1(コアグトロ-ルN)(標準血漿)はシスメックス株式会社より購入した。

【0040】

陰性コントロール-2、-3、陽性コントロール-1、-2の血漿検体の使用には山形大学の倫理委員会の承認を得ており、各主治医が症例あるいはその家族から文書による同意を得た。

【0041】

金コロイド結合抗ヒトIg抗体

2種類の市販の抗ヒトIg(G+M+A)抗体(ベチルラボラトリーズ: B社; A80-152A、およびSouthernBiotech社: S社; 2010-01)を常法に従い、金コロイドに感作させた。抗ヒトIgG抗体(コスモ・バイオ社製)も同様に金コロイドに感作させた。金コロイド結合抗ヒトIg(G+M+A)抗体は感度調製用バッファー(Tris, BSA, NaClバッファー)で2倍希釈したもの、あるいは原液を抑制剤入り希釈洗浄バッファー(抗ヒトIgM抗体を含むTrisバッファー)で5倍希釈して用いた。

40

【0042】

ICT(イムノクロマト法)

ストリップにはコントロールラインにヒトIgG、テストラインに抗第XIII因子Aサブユニット(FXIII-A)抗体を塗布したニトロセルロース膜を用いた。混合法は検体と陰性コントロール-1を等量混合し、37℃で5分反応後使用した。直接法は検体を、混合法は前述の反

50

応液をプロモフェノールブルー/抑制剤入り希釈洗浄バッファーで10倍希釈し、37℃で5分展開した。すなわち、直接法では血漿検体をそのまま使い、混合法では第XIII/13因子Aサブユニットを含む陰性コントロール-1と混合した。抑制剤入り希釈洗浄バッファーで10分洗浄した後、調製した金コロイド結合抗ヒトIg抗体を10分展開し、テストラインの強度を目視、あるいは自動読み取り装置(FactScan; 株式会社デンケン)を用いて測定した。陽性コントロール-2の値を1.0として算出した値をもとに、プロトタイプで測定した健常対照18例の平均+2SDをカットオフ値に設定した。

【0043】

結果

金コロイド結合抗ヒトIg (G+M+A) 抗体の濃度検討

調製した金コロイド結合抗ヒトIg(G+M+A)抗体をICTで用いるために希釈検討を行った。感度調製用バッファーで2倍希釈したものは希釈していないものに比べ、B社製、S社製いずれもコントロールライン、テストラインともに1/2に減少していたことから直線性が保たれていることが判明した(図1)。したがって、以下の実験は感度調製用バッファーで希釈しないで実施した。

【0044】

金コロイド結合抗ヒトIgG抗体と金コロイド結合抗ヒトIg (G+M+A) 抗体の比較

AH13症例である患者-1についてB社製、およびS社製の抗ヒトIg (G+M+A) 抗体を用いてICTを実施した(図2)。B社製(図2A, D)、およびS社製(図2B, E)の抗ヒトIg (G+M+A) 抗体を用いた場合、いずれも直接法、混合法で陽性判定だった。特にB社製の抗体を用いた方が直接法で顕著にラインが出現していたので以下の実験にはB社製を用いた。一方、金コロイド結合抗ヒトIgG抗体では直接法、混合法、いずれも陰性判定だった(図2C, F)。この症例では抗体のサブクラスがIgGよりもIgMが主要だったため、金コロイド結合抗ヒトIgG抗体を用いた場合は陰性判定になったと考えられる。

【0045】

AH13症例検体のICTによる判定

AH13症例である患者-2の判定をB社製抗ヒトIg (G+M+A) 抗体、および抗ヒトIgG抗体を用いて実施したところ、いずれも直接法、混合法ともに陽性判定となった(図3)。

【0046】

非AH13症例検体のICTによる判定

非AH13症例である患者-3の判定をB社製抗ヒトIg (G+M+A) 抗体、および抗ヒトIgG抗体を用いて実施したところ、いずれも直接法、混合法ともに陰性判定となった(図4)。

【0047】

自己免疫性出血病XIII/13 タイプA (AH13-A) は第XIII/13因子欠乏症様の病態を呈する比較的稀な出血性後天性凝固異常症である。その内、抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 自己抗体が原因である自己免疫性出血病XIII/13 タイプA (AH13-A) は、本出願人らの調査により我が国で65例が確認されているが、抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 自己抗体を検出する測定法が市販されていないため、より多数の症例が見逃されていると推定される。そこで、(1) ウエスタンブロット法で抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 自己抗体を検出するための抗体、抗原を選別し、(2) ELISA法により抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 自己抗体測定系を構築し、(3) 抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 自己抗体検出イムノクロマト法を開発した。

【産業上の利用可能性】

【0048】

本発明の方法により、自己免疫性出血病XIII/13 タイプA(AH13-A) 疑い症例の血液において「抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) IgM又はIgA型自己抗体」を確実に検出することができる。また、遺伝性第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) 欠乏症例における「抗第XIII/13因子Aサブユニット (FXIII/13-A) IgM又はIgA型同種抗体」の検出を行うこともできる。

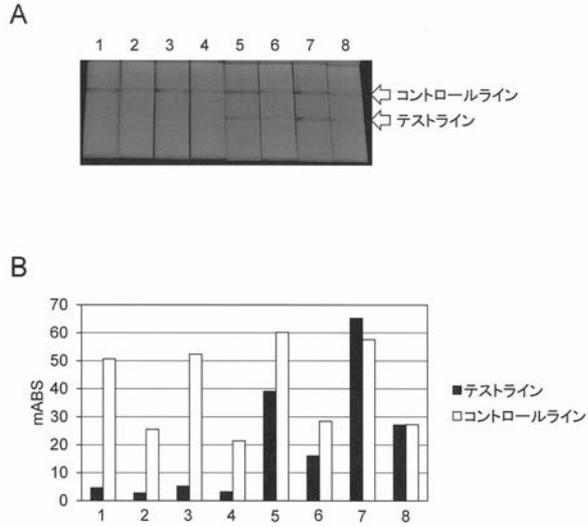
10

20

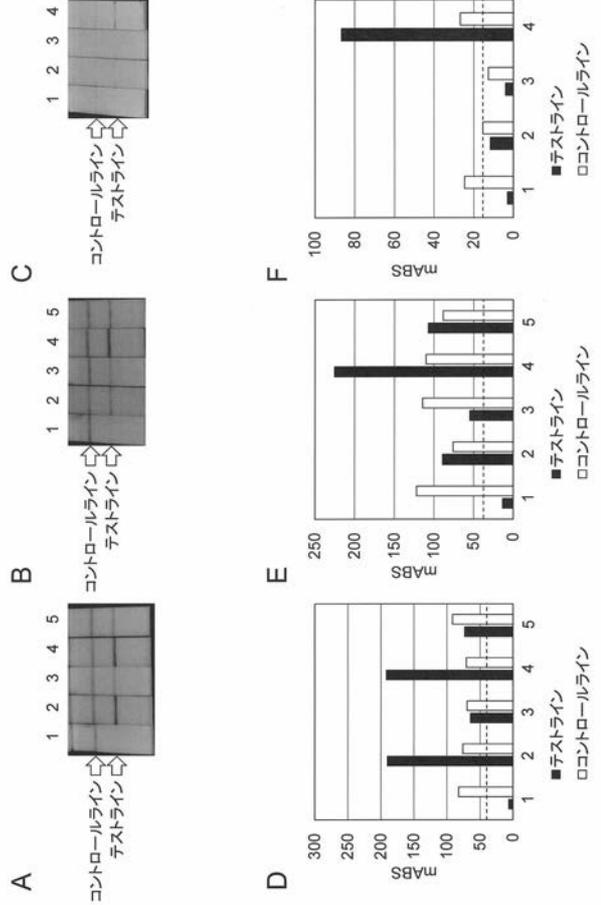
30

40

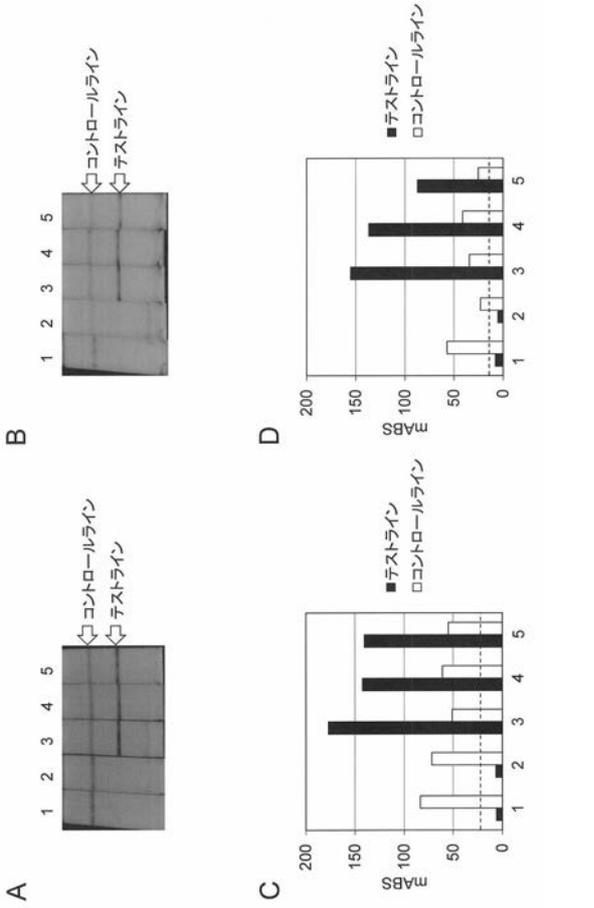
【 図 1 】



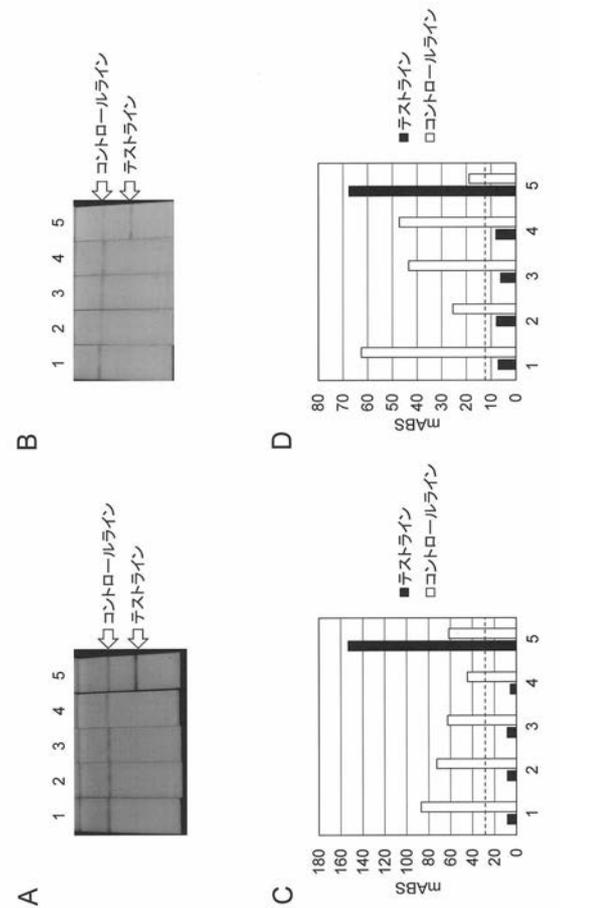
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 尾崎 司

山形県山形市飯田西 2 - 2 - 2 国立大学法人山形大学医学部内

(72)発明者 曲 泰男

大分県大分市大字古国府字永畑 5 4 9 番 3 株式会社キューメイ研究所内

(72)発明者 杉山 大輔

大分県大分市大字古国府字永畑 5 4 9 番 3 株式会社キューメイ研究所内

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	针对因子XIII / 13因子A亚基的IgM或IgA型抗体的检测方法		
公开(公告)号	JP2018165694A	公开(公告)日	2018-10-25
申请号	JP2017063667	申请日	2017-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人山形大学 キューメイ研究所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人山形大学 株式会社キューメイ研究所		
[标]发明人	一瀬白帝 尾崎司 曲泰男 杉山大輔		
发明人	一瀬白帝 尾崎司 曲泰男 杉山大輔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K16/42		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.L G01N33/543.501.A C07K16/42		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 要解决的问题：提供检测血液中因子XIII / 13因子A亚基 (FXIII / 13-A) 的IgM或IgA抗体的方法和用于检测的试剂盒。本发明涉及的血液样品 (FXIII / 13-A) 在检测到自由IgM或IgA抗体的XIII / 13因子A亚基的方法，所述XIII / 13因子A亚基 (FXIII / 13 -A) 固定在支持物上，使样品和标记的抗人Ig抗体相互接触，然后使因子XIII / 13因子A亚基 (FXIII / 13-A) - 因子XIII / 13因子A亚一种方法，包括形成IgM或IgA抗体标记的抗人Ig抗体与单位 (FXIII / 13-A) 的复合物并检测来自标记的抗人Ig抗体的信号，以及用于该方法的试剂盒。

(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2018-165694 (P2018-165694A)
	(43) 公開日	平成30年10月25日 (2018. 10. 25)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	N 4H045
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/53	L
CO7K 16/42 (2006.01)	GO1N 33/543	5O1A
	CO7K 16/42	
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 12 頁)		
(21) 出願番号	特願2017-63667 (P2017-63667)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成29年3月28日 (2017. 3. 28)	304036754 国立大学法人山形大学 山形県山形市小白川町1丁目4-1 2
(出願人による申告) 平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構難治性疾患実用化研究事業「後天性凝固異常症のP. O. C. テストによる迅速診断システムの開発」委託研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(71) 出願人
		302072136 株式会社キューメイ研究所 大分県大分市大字古国府字永畑549番3
		(74) 代理人
		100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人
		100118773 弁理士 藤田 郎
		(74) 代理人
		100111741 弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者
		一瀬白帝 山形県山形市飯田西2-2-2 国立大学 法人山形大学医学部内
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 抗第XIII / 13因子Aサブユニットに対するIgM又はIgA型抗体検出法		