

(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2005-214840**(P2005-214840A)**(43) 公開日 **平成17年8月11日(2005.8.11)**(51) Int.Cl.⁷**G O 1 N 33/53****G O 1 N 33/566**

F I

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

テーマコード (参考)

D

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-23185 (P2004-23185)

(22) 出願日 平成16年1月30日 (2004.1.30)

(71) 出願人 000138277

株式会社三菱化学ヤトロン

東京都新宿区西五軒町13番1号

(74) 代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(72) 発明者 岡嶋 研二

熊本県熊本市保田窪1-2-11

(72) 発明者 中川 隆雄

東京都新宿区荒木町12-12

(72) 発明者 桜井 錠治

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

株式会社三菱化学ヤトロン内

(72) 発明者 阪口 勝亮

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

株式会社三菱化学ヤトロン内

(54) 【発明の名称】 全身性炎症反応症候群患者における臓器障害の発症又は予後の予測方法及び予測用試薬

(57) 【要約】

【課題】 S I R S 患者における臓器障害、例えば、重症呼吸不全などの発症又は予後を、迅速且つ正確に予知することのできる予測方法及び予測用試薬を提供する。

【解決手段】 前記予測方法では、可溶性 E - セレクチン (s E S) を分析する。前記予測用試薬は、可溶性 E - セレクチンに特異的に結合する抗体又はその断片を含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可溶性 E - セレクチンを分析することを特徴とする、全身性炎症反応症候群患者における臓器障害の発症又は予後を予測する方法。

【請求項 2】

可溶性 E - セレクチンの分析を免疫化学的方法により実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

可溶性 E - セレクチンに特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、全身性炎症反応症候群患者における臓器障害発症又は予後の予測用試薬。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) における臓器障害 (特に急性呼吸不全) の発症予測方法 (すなわち、発症の危険性を評価する方法) 又は前記臓器障害の予後予測方法及び前記臓器障害の発症又は予後の予測用試薬に関する。本発明においては、SIRS 患者の生体試料、例えば、血液中の可溶性 E - セレクチン (soluble E-selectin: sES) を分析することにより、臓器障害 (特に急性呼吸不全) の発症の予知、又は予後の状態を類推することができる。

【背景技術】

20

【0002】

SIRS は、特定の抗原に反応してサイトカイン量が上昇し炎症反応を起こすのでなく、具体的なターゲット無しに、生体に対する侵襲に反応して非特異的に免疫反応が活性化し、サイトカイン産生が制御不能になって重篤な多臓器不全 (multiple organ failure: MOF) を起こす疾患群である (非特許文献 1, 2)。

【0003】

SIRS の診断基準では、全身性炎症反応を反映する 4 項目 [1 . 体温 > 38 又は < 36 、 2 . 心拍数 $> 90 / \text{min}$ 、 3 . 呼吸数 $> 20 / \text{min}$ 又は $\text{PaCO}_2 : < 32 \text{ Torr}$ 、 4 . 白血球数 $> 12,000 / \text{mm}^3$ 若しくは $< 4,000 / \text{mm}^3$ 又は未熟顆粒球 $> 10\%$] のうち、2 項目以上に異常のある状態が SIRS とされる (非特許文献 3)。

30

【0004】

SIRS には、非感染性 SIRS とセプシス (Sepsis) に分類され、前者はショック、外傷、熱傷、又は急性膵炎などで起こり、後者は種々の病原菌の菌血症やその他の重症感染症で起こる。SIRS は、病原体侵入、組織損傷、又はアノキシアなどに対する生体免疫反応そのものであり、侵襲の種類にかかわらず、種々の内因性メディエーターにより惹起される非特異的全身急性炎症反応である。SIRS に合併する臓器不全は、早期には組織の虚血や炎症から発生するものもあるが、SIRS が遷延して起こる多臓器不全症候群 (Multiple organ dysfunction syndrome: MODS) には、種々のメディエーターを介する過剰の生体反応がその病態の重症化に関与しており、SIRS は予後の予測が難しい疾患群である。

40

【0005】

多臓器障害の指標としては、MODS スコアや SOFA (Sequential organ failure assessment) スコアなどの身体徴候をスコア化して判断している。MODS は、複数の重要臓器又は系の機能障害が同時に発生している状態の症候群と定義され、その診断基準としての MODS スコアは、肺 ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ 比)、腎 (クレアチニン濃度)、肝 (ビリルビン濃度)、心・循環 (Pressure adjusted heart rate: PAR)、血液 (血小板数)、及び神経系 (Glasgow coma scale) の 6 項目からなる。SOFA スコアは、肺 ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ 比)、凝固系 (血小板数)、肝 (ビリルビン濃度)、心・血管系 (血圧)、中枢神経系 (Glasgow coma scale)、及び腎 (クレアチニン濃度、尿量) の臨床現場で

50

ルーチンに、かつ反復して評価可能な6項目について、0～4点の5段階に評価するものである。

【0006】

重症呼吸不全は、「原因の如何を問わず、動脈血ガス、特に O_2 、 CO_2 分圧が異常な値を示し、そのために生体が正常な機能を営めなくなった状態」と定義されており、一般的には急性呼吸窮迫症候群(Acute respiratory distress syndrome: ARDS)と呼ばれており、 PaO_2 / FiO_2 200で人工呼吸をおこなった患者群である。

【0007】

また、細胞障害に応答して血管内皮細胞の構造や機能が変化し、動脈硬化に進展するリスク因子として喫煙、糖尿病、高血圧、高脂血症が知られており、血管内皮で産生される可溶性E-セレクトインの研究が行われている(非特許文献4)。

【0008】

【非特許文献1】ボーン・アールシー(Bone RC), 「クリティカル・ケア・メディシン(Critical Care Medicine)」, (米国), 1996年, 24巻, p.1125-1128

【非特許文献2】デイビス・エムジー(Davies MG.)ら, 「ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・サージェリー(British Journal of Surgery)」(英国), 1997年, 84巻, p.920-935

【非特許文献3】相川直樹著, 相川直樹及び青木克憲編集, 「SIRS・ショック・MODS」, (日本), 医学書院, 2001年, p.54-61

【非特許文献4】ヴィ・ロルダン(V. Roldan)ら, 「トロンボシス・アンド・ヘモスターシス(Thrombosis and Haemostasis)」, (米国), 2003年, 90巻, p.1007-1020

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、SIRS患者における臓器障害、例えば、重症呼吸不全などの発症又は予後を、迅速且つ正確に予知することのできる予測方法及び予測用試薬を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

組織が感染や損傷を受けると局所でサイトカイン(IL-1やTNF-)が放出され、血管内皮細胞は、細胞接着分子のE-セレクトインをその細胞表面に発現する。白血球は、このE-セレクトインと結合するリガンド糖鎖(シアリルLe^a糖鎖抗原)を有しており、接着して血管外の組織に遊走し、損傷した組織の破壊や異物の貪食をする。

この血管内皮細胞上に発現した成熟型E-セレクトイン(105kDa; レクチンドメイン、EGFドメイン、補体相同性ドメイン、細胞膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを持つ)は細胞膜上に存在するプロテアーゼにより切断を受け、可溶性E-セレクトイン(85kDa; レクチンドメイン、EGFドメイン、及び補体相同性ドメイン)[エヌ・ノイマン(N. Newman)ら, 「ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology)」, (米国), 1993年, 150巻, p.644-654]が生成される。

【0011】

本発明者らは、SIRS患者で非特異的な免疫反応の活性化が起き、重症呼吸不全などの臓器障害が発症するほどの著明なサイトカイン産生が亢進すれば、サイトカイン刺激を受けて血管内皮細胞膜上で発現される成熟型E-セレクトイン(105kDa)が細胞膜上で切断を受け、血液中に移行する可溶性E-セレクトイン(85kDa)が上昇するのではないかと考えた。

そして、可溶性E-セレクトインを測定するELISA法、ラテックス法、及びイムノクロマト法を確立し、血液中の可溶性E-セレクトイン量がSOFASコア、特に呼吸不全スコアの上昇と強く関連することを見出して、本発明を完成するに至った。

【0012】

10

20

30

40

50

すなわち、本発明は、可溶性 E - セレクチンを分析することを特徴とする、全身性炎症反応症候群患者における臓器障害、特に急性呼吸不全の発症又は予後を予測する方法に関する。

本発明の予測方法の好ましい態様によれば、可溶性 E - セレクチンの分析を免疫化学的方法により実施する。

また、本発明は、可溶性 E - セレクチンに特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、全身性炎症反応症候群患者における臓器障害、特に急性呼吸不全の発症又は予後の予測用試薬に関する。

【発明の効果】

【0013】

10

本発明によれば、可溶性 E - セレクチンの分析（特に測定）により、SIRSにおける重症臓器不全（特に、重篤な急性呼吸不全）の発症予測、また、予後の予測を行うことができる。このような予測が可能となることにより、SIRSにおける臓器不全患者、特に呼吸不全患者の適切な治療を行うことができる。また、可溶性 E - セレクチンの分析は、免疫化学的方法によれば、簡便で、迅速で、感度・定量性に優れた免疫化学的方法により実施することが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

[1] 本発明の予測方法

本発明の予測方法では、全身性炎症反応症候群（SIRS）患者における可溶性 E - セレクチンの濃度を定量し、健常人の可溶性 E - セレクチン濃度と比較することにより、臓器障害、特に呼吸不全の発症を予測することができ、また、SIRSの予後の状態を推定することができる。

20

【0015】

本明細書において「可溶性 E - セレクチン（sES）」とは、細胞接着分子の1つであって、血管内皮細胞表面に発現するタンパク質である成熟型 E - セレクチン（105 kDa；レクチンドメイン、EGFドメイン、補体相同性ドメイン、細胞膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインを持つ）が、細胞膜上に存在するプロテアーゼで切断されることにより生じる、レクチンドメイン、EGFドメイン、及び補体相同性ドメインからなる可溶性タンパク質（85 kDa）を意味する。

30

【0016】

可溶性 E - セレクチンの分析に用いる検体としては、可溶性 E - セレクチンが含有される可能性のある生体試料である限り、特に限定されるものではなく、例えば、生体より採取された血液、血漿、又は血清等を挙げることができる。

【0017】

後述する実施例に示すように、SIRS患者の内、入院初日の可溶性 E - セレクチン濃度が健常者よりも高値である患者では、呼吸不全に関するSOFASコアが高く（すなわち、重篤性が高い）、重篤な急性呼吸不全を発症した患者の割合も高かった。一方、SIRS患者であっても、可溶性 E - セレクチン濃度が健常者と同じ正常値範囲内にある患者では、呼吸不全に関するSOFASコアが低く（すなわち、重篤性が低い）、重症呼吸不全を発症する患者の割合は低かった。

40

【0018】

このように、本発明の予測方法では、可溶性 E - セレクチン濃度を定量し、健常者の正常値範囲よりも高値を示す場合（例えば、閾値を超える場合）には、臓器障害（特に呼吸不全）の発症の危険性が高いと判定することができる。一方、可溶性 E - セレクチン濃度が正常値範囲内である場合には、臓器障害（特に呼吸不全）の発症の危険性が低いと判定することができる。

【0019】

本発明の予測方法では、健常者とSIRS患者とから、それぞれ検体を採取し、それぞれの可溶性 E - セレクチン濃度を測定した後、測定値を比較することにより、臓器不全の

50

発症の可能性を予測することもできるが、通常は、健常者から採取した検体を用いて可溶性 E - セレクチン濃度の正常値範囲又は判定用閾値を予め決定しておくことが好ましい。正常値範囲又は判定用閾値が予め決定されている場合には、予測対象である S I R S 患者に関して可溶性 E - セレクチンの分析を行うだけで、前記 S I R S 患者における臓器不全の発症可能性を予測することができる。

【 0 0 2 0 】

前記正常値範囲又は判定用閾値は、種々条件、例えば、基礎疾患、性別、年齢などにより変化することが予想されるが、当業者であれば、被験者に対応する適当な母集団を適宜選択して、その集団から得られたデータを統計学的処理を行うことにより、正常値範囲又は判定用閾値を決定することができる。

10

例えば、実施例 5 に示すように、健常者から得られた可溶性 E - セレクチン濃度の平均値及び標準偏差 (S D) から、「平均値 + 2 × S D 」を判定用閾値として用いることができる。具体的な判定用閾値としては、例えば、30 m g / m L の値を使用することができる。

【 0 0 2 1 】

検体中の可溶性 E - セレクチンを測定する方法としては、例えば、免疫化学的方法、電気泳動による方法、又はクロマトグラフィーによる方法等を挙げることができる。

免疫化学的方法による方法としては、例えば、E L I S A 法、ラテックス法、又はイムノクロマトグラフ法で検出する方法を挙げることができる。

電気泳動による方法としては、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行って可溶性 E - セレクチンをバンドとして検出する方法、あるいは、キャピラリー電気泳動でピークとして検出する方法等を挙げることができる。

20

また、クロマトグラフィーによる方法としては、例えば、高速液体クロマトグラフィーでピークとして検出する方法等を挙げることができる。

可溶性 E - セレクチンを分析可能である限り、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【 0 0 2 2 】

可溶性 E - セレクチンを測定する方法としては、感度及び簡便性から免疫化学的方法が好ましい。ここで免疫化学的方法とは、可溶性 E - セレクチンに対する抗体を用いて、可溶性 E - セレクチンを、例えば、E L I S A 法、ラテックス法、又はイムノクロマトグラフ法で分析する方法である。免疫化学的方法としては、例えば、可溶性 E - セレクチンを標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体をコートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法、あるいは、金コロイドなどの着色粒子に結合した抗体を用いる方法等、様々な方法があるが、可溶性 E - セレクチンに対する抗体を用いた方法であれば、本発明の好ましい態様に含まれる。抗体はモノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また、抗体断片、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、又は F v を用いることもできる。

30

【 0 0 2 3 】

例えば、本発明方法で用いるマウスモノクローナル抗可溶性 E - セレクチン抗体は、それ自体公知の方法で作製することができる。すなわち、前記のモノクローナル抗可溶性 E - セレクチン抗体を分泌するハイブリドーマ (好ましくはマウスハイブリドーマ) を、培地又は哺乳動物 (特にマウス) の腹腔内で培養することによって製造することができる。前記のハイブリドーマは、一般的には可溶性 E - セレクチンで免疫したマウスの脾臓細胞とマウス骨髓腫細胞とを、K O h l e r 及び M i l l i s t e i n の細胞融合の基本方法 [ケヘラー及びミルスタイン (K O h l e r and M i l l i s t e i n) , 「ネイチャー (Nature)」, (英国) , 1975 年, 256 巻, p . 495 - 497] により製造することが可能である。

40

【 0 0 2 4 】

また標識する方法にも、例えば、放射性同位元素による標識、電気化学発光する化合物による標識、蛍光標識、酵素標識、ビオチン標識、ストレプトアビジン等、様々な方法があるが、本発明はこれらの例に限られるものではない。

50

【 0 0 2 5 】

イムノクロマトグラフィー法は、固相担体（例えば、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ガラス繊維フィルター等の素材）に結合された前記抗可溶性 E - セレクチン抗体（モノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体）及び着色粒子コンジュゲート（金などの金属コロイド、ポリスチレンなどの非金属コロイド、又はリポゾームなどをストレプトアビジン、又は抗ビオチン抗体に結合したもの）を介して、可溶性 E - セレクチンを検出する方法である。

【 0 0 2 6 】

既知量のヒト成熟型 E - セレクチンの細胞膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを欠失させたリコンビナント・E - セレクチン（86 - 90 kDa；R&D Systems, Inc.）から検量線を作成し、検体中に含まれる可溶性 E - セレクチン（s E S）量を計算することができる。

10

【 0 0 2 7 】

[2] 本発明の試薬

本発明の試薬（キット）は、抗可溶性 E - セレクチン抗体又はその断片を少なくとも含む限り、特に限定されるものではなく、異なる 2 種類以上の抗可溶性 E - セレクチンモノクローナル抗体又はその断片を含むことが好ましい。本発明の試薬は、本発明方法を実施するのに用いることができる。

【 0 0 2 8 】

本発明の試薬では、第 1 の抗可溶性 E - セレクチンモノクローナル抗体又はその断片と、この第 1 抗体の結合領域とは別の領域で可溶性 E - セレクチンと結合する抗可溶性 E - セレクチンモノクローナル抗体（すなわち、第 2 のモノクローナル抗体）又はその断片との組み合わせを用いることがより好ましい。

20

【 0 0 2 9 】

本発明の試薬は、好ましくは、可溶性 E - セレクチン（s E S）に対する抗体を構成成分とする、血液中の可溶性 E - セレクチンを免疫学的方法により定量する検査試薬である。この態様の検査試薬は、抗体として抗可溶性 E - セレクチン抗体を用いる以外は、通常の E L I S A 法、ラテックス法、及びイムノクロマトグラフ法に用いられる試薬（キット）と同様の構成でよい。その一例としてラテックス凝集法による可溶性 E - セレクチンを測定する検査試薬は、例えば、1）抗可溶性 E - セレクチン抗体をコートした抗可溶性 E - セレクチン抗体コート固相担体、2）既知濃度の可溶性 E - セレクチン標準溶液、3）希釈液、4）洗浄液を含有する試薬である。更に、E L I S A 法の酵素標識抗体であれば、5）酵素標識抗可溶性 E - セレクチン抗体、6）発色基質、7）反応停止液が含まれてもよい。

30

【 実施例 】

【 0 0 3 0 】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 3 1 】

《 実施例 1：E - セレクチンに対するモノクローナル抗体の作製 》

40

細胞膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを欠失させたリコンビナント・ヒト E - セレクチン（Cat. No. ADP1；R & D Systems, Inc.）2 mg / mL をフロイント完全アジュバンド（体積比 1：1）に十分に分散させた。なお、前記リコンビナント・ヒト E - セレクチンは、C H O 細胞により産生した分子量 86 ~ 90 kDa（S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動による。アミノ酸残基数 = 535）のタンパク質である。この分散液 100 μ L を B a l b / c マウスに一回免疫し、4 週間後から 2 週間毎に、生理食塩水で 1 mg / mL の濃度にしたリコンビナント E - セレクチン液 100 μ L により 4 回免疫した。この免疫マウスを屠殺した後、脾臓を摘出し、この脾臓より脾細胞をマウス一匹あたり 0.5×10^8 個得た。この脾細胞 1.5×10^8 個とマウスミエローマ細胞（S P 2 / o） 3.0×10^7 個とを、P E G 4000（45%）存在下で、融合させ培養した。増殖し

50

た細胞の上清を採取し、E L I S A 法 [ヒト sE-Selectin ELISA キット ; MedSystems Diagnostics GmbH (Austria)] により抗 E - セレクチン抗体の有無を調べた。前記抗体が陽性の細胞を限界希釈法によりクローニングし、抗 E - セレクチン抗体を産生している細胞 14 種 (No.1-1, No.3-1, No.5-3, No.9-2, No.10-2, No.12-1, No.13-1, No.15-1, No.16-3, No.17-3, No.19-1, No.22-2, No.24-2, No.25-2) を確立した。

単離した各モノクローナル抗体の培養上清を用いて、免疫グロブリンサブクラスをクロンタイピングシステム (Southern Biotechnology Associate Inc.) によって測定した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 3 2 】

【 表 1 】

クローンNo.	サブクラス
No. 1-1	I g G
No. 3-1	I g G1
No. 5-3	I g G1
No. 9-2	I g G1
No. 10-2	I g G
No. 12-1	I g G1
No. 13-1	I g G1
No. 15-1	I g G1
No. 16-3	I g G
No. 17-3	I g G1
No. 19-1	I g G2b
No. 22-2	I g G2b
No. 24-2	I g G2b
No. 25-2	I g G2a

10

20

【 0 0 3 3 】

ヒト E - セレクチン (1 . 0 μ g / m L) 、ヒト P - セレクチン (1 . 0 μ g / m L) 、又はヒト L - セレクチン (1 . 0 μ g / m L) をそれぞれ Ca^{++} 存在下又は Ca^{++} 非存在下の含有液、各 1 0 0 μ L ずつを 9 6 穴 E L I S A 用プレートの各ウェルに分注し、室温で 1 時間放置した。このプレートを 1 % ウシ血清アルブミン (B S A) / リン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) で 1 時間ブロッキングした。上清を除去した後、先に作製した各ハイブリドーマ培養上清希釈液 ($\times 8 0 0$) 5 0 μ L ずつを加えて室温で 2 時間放置し、0 . 2 % B S A / 0 . 2 % T w e e n 2 0 / P B S で 5 回洗浄した。次に、アルカリフォスファターゼ (A L P) 標識抗マウス I g G 1 抗体 (ヤギ) 1 0 0 μ L (1 0 0 n g / m L) を加え、室温で 2 時間放置し、再び 0 . 2 % B S A / 0 . 2 % T w e e n 2 0 / P B S で 5 回洗浄した。このプレートの各ウェルに p - ニトロフェニルリン酸を含むジエタノールアミン緩衝液 (p H 9 . 6) 5 0 μ L を添加し、室温で 3 0 分間放置した後、4 0 5 n m の吸光度を測定した。この結果を表 2 に示す。

【 0 0 3 4 】

30

40

【表 2】

クローンNo.	Ca ⁺⁺ 存在下			Ca ⁺⁺ 非存在下		
	E-セレクトチン	L-セレクトチン	P-セレクトチン	E-セレクトチン	L-セレクトチン	P-セレクトチン
No. 1-1	0.317	0.000	0.000	0.388	0.000	0.000
No. 3-1	0.382	0.000	0.000	0.379	0.000	0.000
No. 5-3	0.360	0.000	0.000	0.375	0.000	0.000
No. 9-2	0.208	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
No. 10-2	0.321	0.000	0.001	0.301	0.000	0.000
No. 12-1	0.313	0.000	0.002	0.157	0.000	0.001
No. 13-1	0.389	0.000	0.002	0.389	0.000	0.000
No. 15-1	0.187	0.000	0.002	0.148	0.000	0.000
No. 16-3	0.416	0.000	0.000	0.368	0.000	0.000
No. 17-3	0.300	0.000	0.000	0.136	0.000	0.000
No. 19-1	0.419	0.000	0.000	0.388	0.000	0.000
No. 22-2	0.418	0.000	0.000	0.388	0.000	0.000
No. 24-2	0.278	0.001	0.000	0.220	0.000	0.000
No. 25-2	0.352	0.002	0.001	0.129	0.000	0.000

10

【0035】

得られた細胞2種（No.13-1, No.17-3）を抗sE Sマウスモノクローナル抗体産生細胞（ハイブリドーマ）として、それぞれ大量に培養し、マウス腹腔中に注射した。2週間後に腹水を採取し、モノクローナル抗E-セレクトチン抗体No.13-1及びNo.17-3を得た。なお、前記ハイブリドーマ2種の選択は、以下の実施例2で説明するラテックス反応性を指標として行った。

20

【0036】

《実施例2：モノクローナル抗体結合ラテックスの調製とそのラテックスの反応性》

（1）モノクローナル抗体結合ラテックスの調製

ポリスチレンラテックス〔10%, 直径0.489μm; セラダイン社製（米国）〕0.2mLを、実施例1で作製したモノクローナル抗ヒトE-セレクトチン抗体それぞれを含む50mmol/Lトリス塩酸緩衝液（pH8.0）1.8mL（それぞれの抗体濃度0.9mg/mL）に混合し、マグネチックスターラーで攪拌した。混合液を遠心分離（20,000g×10分間）し、0.05%NaN₃を含む蒸留水で4回洗浄し、1mg/mL-BSA（ウシ血清アルブミン）を含む0.1mol/Lトリス塩酸緩衝液（pH8.0）に懸濁（1w/v%）させ、保存した。

30

【0037】

（2）モノクローナル抗体結合ラテックスの反応

各モノクローナル抗sE S抗体感作ラテックスと種々の濃度のsE Sとを混合し、凝集の有無を確認したところ、No.13-1とNo.17-3との組み合わせで良好な凝集結果が得られた。

【0038】

《実施例3：ELISA法によるsE Sの測定》

40

（1）sE S抗体感作プレートの調製

抗sE Sマウスモノクローナル抗体No.13-1を5ng/mLとなるように炭酸緩衝液に溶解し、96穴平底マイクロプレートに100μLを加え、4℃で24時間インキュベーションした。プレートの中の液をアスピレーションした後、リン酸緩衝液200μLを加え、室温で2分間インキュベーションした。この洗浄操作を3回繰り返した。次に1%BSA-リン酸緩衝液200μLを加え、37℃で2時間インキュベーションした。プレートの中の液をアスピレーションした後、0.05%Tween-20を含むリン酸緩衝液（以下、PBSTと称する）200μLを加え、室温で2分間インキュベーションした。この洗浄操作を3回繰り返し、可溶性E-セレクトチンモノクローナル抗体（A）感作プレートを調製した。

50

【 0 0 3 9 】

(2) 抗 s E S モノクローナル抗体 - H R P の調製

N a k a n e , P . K らの方法 [ピー・ケイ・ナカネ (P.K. , Nakane) ら , 「 ジャーナル・オブ・ヒストケミストリー・アンド・サイトケミストリー (Journal of Histochemistry & Cytochemistry) , (米 国) , 1 9 7 4 年 , 2 2 巻 , 1 0 8 4] により、抗可溶性 E - セレクチンマウスモノクローナル抗体 N o . 1 7 - 3 とペルオキシターゼ (H R P) とのコンジュゲートを調製した。

【 0 0 4 0 】

(3) 標準品の調製

抗原のリコンビナント・ヒト E - セレクチン (R & D Systems, Inc.) を可溶性 E - セレクチン (s E S) の標準品に用いるため、2 % B S A 、 0 . 0 1 m o l / L - E D T A 2 N a 、 0 . 1 % N a N ₃ 、 0 . 0 1 % T w e e n 2 0 、 及び 0 . 1 5 m o l / L - N a C l を含む 0 . 0 5 m o l / L トリス緩衝液 (p H 7 . 5) で、7 5 n g / m L 、 1 5 0 n g / m L 、 及び 3 0 0 n g / m L の希釈液を作製した。

【 0 0 4 1 】

(4) s E S の測定

前記調製法により得られた感作プレートに、0 . 5 % B S A を含む P B S T で 1 0 倍希釈した検体 1 0 0 μ L を加え、室温で 1 時間インキュベーションした後、P B S T による洗浄操作を 3 回行なった。0 . 5 % B S A を含む P B S T を用いて、0 . 5 μ g / m L となるよう希釈した抗 s E S 抗体 - H R P 1 0 0 μ L を加え、室温で 1 時間インキュベーションした後、P B S T による洗浄操作を 3 回行なった。0 . 0 0 0 3 % 過酸化水素を含む 0 . 4 m g / m L o - フェニレンジアミンジヒドロクロライド 1 0 0 μ L を加え、室温で 3 0 分間インキュベーションした後、2 N 硫酸 1 0 0 μ L を加え、反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 4 9 0 n m / 副波長 6 2 0 n m の O D 値を測定した。

【 0 0 4 2 】

検体の代わりに s E S の標準品を用いて前記のとおり測定して検量線を作成しておき、この検量線から検体の s E S 濃度を測定した。結果を表 3 に示す。

また、標準抗原曲線の特性各濃度の s E S 及び検体の吸光度値からブランクの吸光度値を引き、横軸に標準抗原濃度、縦軸に標準抗原の吸光度をプロットし、標準曲線を描いた (図 1) 。その標準抗原曲線を基に、検体中に含まれる s E S 量を計算することができる。

【 0 0 4 3 】

【 表 3 】

可溶性E-セレクチン (ng/mL)	O.D. 値		
	No. 1	No. 2	No. 3
0	0.006	0.010	0.008
75	0.471	0.495	0.483
150	0.886	0.905	0.896
300	1.792	1.756	1.774

【 0 0 4 4 】

《 実施例 4 : ラテックス凝集法による測定 》

(1) s E S 抗体感作ラテックス試薬 (第二試薬) の調製

抗 s E S マウスモノクローナル抗体 N o . 1 3 - 1 (3 m g) をリン酸ナトリウム緩衝液 9 . 5 m L に溶解し、0 . 3 μ m のポリスチレンラテックス (固形分 1 0 重量 % 緩衝液) 0 . 5 m L を加え、3 7 ° C で 2 時間インキュベーションした後、これに 1 % B S A - リ

10

20

30

40

50

ン酸緩衝液 2 mL を加え、37 で 90 分間インキュベーションすることによりコーティングを行なった。次に遠心分離 (15,000 rpm にて 15 分間遠心) を行ない、上清を捨て、沈澱を BSA 溶液 (20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液、0.05 mol/L 塩化ナトリウム、0.05% アジ化ナトリウム、及び 0.2% BSA) に懸濁させ、sES 抗体感作ラテックス (A) を調製した。同様に、抗 sES マウスモノクローナル抗体 No. 17-3 を用いて、sES 抗体感作ラテックス (B) を調製した。(A) 及び (B) を 1:1 で混合して、sES 抗体感作ラテックス試薬を調製した。

【0045】

(2) sES 測定用緩衝液 (第一試薬) の調製

1% BSA - リン酸 - クエン酸緩衝液 (pH 6.0) (0.1 mol/L クエン酸、0.2 mol/L リン酸 2 ナトリウム、150 mmol/L 塩化ナトリウム、0.1% アジ化ナトリウム、及び 0.14% EDTA - 2Na を含む) を調製した。

【0046】

(3) 標準品

実施例 3 で使用したリコンビナントヒト E - セレクチン (R&D Systems, Inc.) を用い、同様に 320.57 ng/mL ~ 33.4 ng/mL の希釈液を調製した。

【0047】

(4) sES の測定

自動分析装置 LPIA - S500 (三菱化学社製) を用いて行なった。前記調製法によって得られた sES 抗体感作ラテックス試薬の第一試薬及び第二試薬を用いて以下の条件で測定した。

検体量: 10 µL、第一試薬: 180 µL、第二試薬: 40 µL

測定波長: 800 nm、測光ポイント: 2 - 50 (V_{all})

【0048】

検体に第一試薬を添加して約 4.5 分間インキュベーションを行なった後、第二試薬を添加して約 1 分後から 5 分後の吸光度の差を測定し、濁度変化量 (V_{all}) とした。検体のかわりに sES の標準品を用いて前記のとおり測定して検量線を作成しておき、この検量線から検体の sES 濃度を測定した。結果を表 4 に示す。

また、標準抗原曲線の特性各濃度の sES 及び検体の吸光度変化量 (V_{all}) を求めた。横軸に標準抗原濃度、縦軸に標準抗原の吸光度をプロットし、標準曲線を描いた (図 2)。その標準抗原曲線を基に、検体中に含まれる sES 量を計算することができる。

【0049】

【表 4】

可溶性E-セレクチン (ng/mL)	吸光度変化量 (V _{all})			V _{all} 平均値
0.00	-1.29	-0.45	-0.83	-0.86
33.44	32.64	33.2	34.13	33.32
54.96	59.97	59.65	61.10	60.24
89.90	118.58	121.12	122.57	120.76
169.63	287.94	288.29	292.61	289.61
320.57	718.71	712.63	711.25	714.20

【0050】

(4) ラテックス凝集法と ELISA 法の相関

作成したラテックス法と ELISA 法で血漿検体 47 例を測定して両測定法の相関を算出した。結果を図 3 に示す。

10

20

40

50

【 0 0 5 1 】

《 実施例 5 : 健常者及び S I R S 患者血漿中の s E S の定量 》

健常者及び救命センターに搬送された入院時に採血した S I R S 患者 (基礎疾患として糖尿病性ケトアシドーシス、敗血症、重症肺炎、肺挫傷、脳挫傷、脊髄損傷、骨折等) の血漿中に存在する s E S 濃度を L P I A - S 5 0 0 で測定した。

【 0 0 5 2 】

その結果、健常者 9 5 名の血漿 s E S は $7.18 \sim 31.51 \text{ ng/mL}$ であり (図 4)、健常者の上限値 (平均 + 2 S D) 29.74 ng/mL をカットオフ値とした。

一方、S I R S 患者 3 9 例の血漿 s E S は $8.47 \sim 188.44 \text{ ng/mL}$ であった (図 5)。この 3 9 例の内、濃度正常者は 2 2 例 (5 6 . 4 %) であり (図 6)、健常者よりも s E S が高値となる患者は、3 9 例中 1 7 例 (4 3 . 6 %) であり、 $30.7 \sim 188.44 \text{ ng/mL}$ であった (図 7)。

10

【 0 0 5 3 】

《 実施例 6 : S I R S 患者の s E S 濃度と S O F A スコア 》

S I R S 患者 3 9 例の入院後 8 日間の臓器不全 S O F A スコアを V i n c e n t , J L らの報告 [ジェイ・エル・ビンセント (J . L . , Vincent) ら , 「クリティカル・ケア・メディシン (Critical Care Medicine) 」 , (米国) , 1 9 9 8 年 , 2 6 巻 , p . 1 7 9 3 - 1 8 0 0] に従って算定し、入院初日の血漿中の s E S 濃度との関連性を調べた。

表 5 に示すように、S I R S 患者で s E S が正常で重症呼吸不全を発症しなかった 2 2 例中には死亡例は無く (0 %)、また、s E S 正常者では重症呼吸不全の発症は少なく、2 2 例中 3 例 (1 3 . 6 %) であった。

20

一方、表 6 に示すように、血漿中 s E S 濃度が 29.74 ng/mL 以上の異常値を示した S I R S 患者 1 7 例で、重症呼吸不全の発症は、S O F A 3 の 1 7 例中 9 例 (5 2 . 9 %) 及び S O F A 4 の 1 7 例中 3 例 (1 7 . 6 %) を合わせた 1 2 例 (7 0 . 6 %) であった。

【 0 0 5 4 】

【表 5】

SIRS 患者	s E S ng/mL	死亡 +/-	呼吸不全発症 SOFAスコア	分類	傷 病 名
1	12.12	—	0	外傷	多発骨折、出血性ショック、肝／脾損傷、肺挫傷／血胸
2	28.90	—	3	外傷	腎損傷
3	13.93	—	3	外傷	大腿骨骨折、気脳症、肺挫傷
4	18.74	—	1	外傷	頭蓋骨開放骨折、気脳症、下腿骨骨折
5	16.94	—	3	外傷	硬膜下血腫、くも膜下出血、頭蓋骨骨折
6	23.19	—	0	内因	低血糖、低酸素脳症
7	8.68	—	0	外傷	縊首
8	15.73	—	0	外傷	脾損傷
9	19.48	—	1	外傷	腹部刺創、小腸穿孔
10	20.03	—	1	外傷	びまん性軸索損傷、くも膜下出血、前腕骨折
11	20.97	—	1	内因	脳幹部梗塞
12	22.44	—	1	外傷	脳挫傷、くも膜下出血、硬膜下血腫、多発骨折
13	21.50	—	2	外傷	電撃症
14	19.15	—	0	外傷	頬骨骨折、手関節開放骨折、脳震盪
15	22.25	—	0	外傷	脊髄損傷、腰椎圧迫骨折、下腿骨折
16	19.73	—	1	外傷	骨盤／大腿骨骨折
17	13.18	—	0	外傷	頭部／顔面挫創、顔面骨折
18	8.47	—	0	内因	出血性胃潰瘍
19	23.02	—	0	外傷	頸椎損傷
20	11.72	—	2	外傷	びまん性軸索損傷、顔面挫創、足関節骨折
21	21.25	—	0	内因	ウイルス脳炎、急性硬膜外水腫、症候性てんかん
22	28.98	—	2	外傷	右大腿切創、出血性ショック、CPA

10

20

【 0 0 5 5 】

【表 6】

SIRS 患者	s E S ng/mL	死亡 +/-	呼吸不全発症 SOFAスコア	分類	傷 病 名
23	39.04	—	4	外傷	脳挫傷、くも膜下出血、硬膜外血腫
24	52.44	—	3	内因	胃癌穿孔、Sepsis
25	173.10	—	3	内因	Septic shock、胆嚢炎、尿管結石、腎盂腎炎
26	75.90	+	4	内因	ARDS、Sepsis
27	121.04	—	4	内因	重症肺炎
28	63.41	+	3	内因	糖尿病性ケトアシドーシス、腹壁癒痕ヘルニア、小腸穿孔、汎発性腹膜炎、Sepsis
29	30.69	—	2	外傷	くも膜下出血、硬膜下血腫、頭蓋骨骨折
30	85.48	—	2	内因	甲状腺機能亢進症
31	34.22	—	3	内因	糖尿病性ケトアシドーシス
32	187.17	+	2	内因	糖尿病性ケトアシドーシス
33	44.09	—	3	内因	COPD急性増悪、肺炎、糖尿病、高血圧
34	30.75	—	3	外傷	多発骨折、肺挫傷
35	34.01	—	3	内因	COPD急性増悪、肺炎
36	66.56	+	2	内因	S状結腸憩室穿孔、汎発性腹膜炎
37	188.44	—	2	内因	肝膿瘍、多臓器不全、Septic shock
38	36.06	—	3	外因	急性薬物中毒(ラウンドアップ)
39	53.68	+	3	外傷	くも膜下出血、脳挫傷、硬膜下血腫

30

40

【 0 0 5 6 】

S I R S 患者で重篤な呼吸不全を発症し、死亡した患者 5 例はいずれも s E S が高値 (S O F A 2 : 6 6 . 5 6 n g / m L , 1 8 7 . 1 7 n g / m L ; S O F A 3 : 5 3 . 6 8

50

ng/mL, 63.41 ng/mL; SOFA 4: 75.90 ng/mL) であり、入院初日の血漿中に存在する s E S を測定することにより、SIRS 患者の予後の予測に有用であった。

なお、入院初日の s E S が高値となった SIRS 患者 17 例の基礎疾患として外傷性よりも内因性の疾患患者が多く、SOFA 3 の 9 例及び SOFA 4 の 3 例を合わせた 12 例 (70.6%) であった。

表 6 に示すとおり、s E S 濃度は SOFA 呼吸不全スコアと深く関連し、s E S 濃度が呼吸器不全発症予測の客観的な指標として有用であることが示された。

【0057】

《実施例 7: s E S のイムノクロマトグラフによる測定》

10

本実施例では、s E S 捕捉用抗体として薄片状のクロマトグラフィー基材 (ニトロセルロース膜) の片方に金コロイド標識したマウスモノクローナル抗体 No. 13-1 を塗布し、他方に第 2 の抗マウスモノクローナル抗体 No. 17-3 を固定し、s E S のイムノクロマトグラフ法を実施した。

【0058】

(1) イムノクロマトグラフ用メンブレンの作製

ナイロン 66 製メンブレン (Immunodyne ABC, 孔径 3.0 μ m; Pall Corporation 製) を 5 mm \times 20 mm のサイズに裁断した。メンブレンの上流側の一端から 8 mm の位置に可用性 E - セレクチンの検出ゾーンとしてモノクローナル抗可溶性 E - セレクチン抗体 No. 17-3 (0.5 mg/mL; 5 mmol/L ホウ酸緩衝液, pH 8.5 で希釈) を幅 1 mm の線状に塗布した。

20

【0059】

また、メンブレンの上流側の一端から 13 mm の位置に陰性コントロールゾーンとしてマウスモノクローナル IgG 溶液又はポリクローナル IgG (自社製) 溶液 (各々濃度 0.5 mg/mL; 5 mmol/L ホウ酸緩衝液, pH 8.5 で希釈) を、幅 1 mm の線状に塗布した。室温下で 1 時間、37 $^{\circ}$ C 下で 30 分間静置し、各々の抗体を固相化した。メンブレンを 0.5% BSA を含む 5 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5) に浸し、室温、相対湿度 20% 以下の条件下で 30 分間緩やかに振とうし、ブロッキングした。メンブレンの過剰のブロッキング液を除き、室温下で一夜静置して乾燥させ、イムノクロマトグラフ法用抗体固相化メンブレンとした。

30

【0060】

(2) 金コロイド標識モノクローナル抗体懸濁液の作製

マウスモノクローナル抗体 No. 13-1 (濃度 1 mg/mL) 1 mL を 2 mmol/L - Na₂B₄O₇ 緩衝液 (pH 6.5) (以下、Borax 緩衝液と称する) 3,000 mL 中で 4 $^{\circ}$ C 下で一夜透析した。モノクローナル抗体溶液は、4 $^{\circ}$ C 下、100,000 \times g で 1 時間遠心分離した後、その上清を 100,000 \times g で 1 時間遠心分離した Borax 緩衝液で 100 μ g/mL となるように希釈した。金コロイド液 (GOLD COLLOID 20 nm; British BioCell International 製) 100 mL を 0.2 mol/L - K₂CO₃ 溶液及び 0.2 mol/L - H₃PO₄ 溶液で pH 6.5 に調整した。金コロイド液 20 mL を攪拌しながら、希釈したモノクローナル抗体溶液 2 mL を徐々に滴下し、室温下で 30 分間攪拌した。更に、攪拌しながら 10% BSA 溶液 (pH 9.0; 4 $^{\circ}$ C 下、100,000 \times g で 1 時間遠心分離した上清) 2.5 mL を滴下した後、室温下で 30 分間攪拌した。10 $^{\circ}$ C 下にて 16,000 \times g で 30 分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿した金コロイド標識モノクローナル抗体を 0.5% ショ糖を含むホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) (0.45 μ m フィルター濾過) 20 mL に再懸濁させ、10 $^{\circ}$ C 下にて 16,000 \times g で 30 分間遠心分離し、上清を除去した。更に、沈殿した金コロイド標識マウスモノクローナル抗体 No. 13-1 を 0.5% ショ糖を含むホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) (0.45 μ m フィルター濾過) 20 mL に再懸濁させ、10 $^{\circ}$ C 下にて 16,000 \times g で 30 分間遠心分離し、上清を除去した。最後に、沈殿した金コロイド標識モノクローナル抗体を 0.5% ショ糖を含むホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) (0.45 μ m フィルタ

40

50

ー濾過)に再懸濁させた後、波長520nmにおける吸光度が約1.0になるように濃度調整し、表面をシリコン処理したガラス試験管に移し密栓し、4℃下に保存し、イムノクロマトグラフ法用金コロイド標識モノクローナル抗体懸濁液とした。

【0061】

金コロイド標識モノクローナル抗体懸濁液は、波長520nmにおける吸光度が3.0になるように5.0%ショ糖を含む2mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH7.3)で希釈した後、その7μLを吸収パッドアキュウィックAW14-20T4(Pall Corporation製)を5mm×5mmのサイズに裁断したものに塗布し、シリカゲルデシケーター内で室温下、一夜減圧(50mmHg)乾燥したものをイムノクロマトグラフ法用金コロイド標識抗体パッドとした。

10

【0062】

(3) イムノクロマトグラフ法用吸収パッドの作製

グラスファイバーパッド(タイプA/B; Pall Corporation製)を5mm×18mmのサイズに裁断したものをsEシムノクロマトグラフ法用試料添加パッドとした。グラスファイバーパッド(タイプA/E; Pall Corporation製)を5mm×25mmのサイズに裁断したものを、イムノクロマトグラフ法用吸収パッドとした。

【0063】

(4) イムノクロマトグラフ小片

5mm×60mmのサイズに裁断したプラスチック粘着シート(BioDot製)に、上流側より、試料添加パッド、金コロイド標識モノクローナル抗体パッド、抗体固相化メンブレン、吸収パッドの順に、各々その両端を隣接する部材と1mm重ね合わせて貼付し、可用性E-セレクトイン測定用イムノクロマトグラフ小片とした。

20

【0064】

(5) イムノクロマトグラフ法による可溶性E-セレクトインの測定

SIRS患者の血漿検体50μLと20mmol/Lリン酸塩緩衝液50μLとを混合した溶液、及び20mmol/Lリン酸塩緩衝液(ブランク試験)100μLを水平に静置したイムノクロマトグラフ小片の試料添加パッドに滴下し、室温下で10分間展開した。

メンブレンのモノクローナル抗sE抗体を固相化した部分、及び陰性コントロール抗体を固相化した部分の金コロイドの捕捉に基づく赤紫～紫色の着色の有無を目視観察し、可溶性E-セレクトイン生成物の有無を判定した。結果を表7及び表8に示す。表中、-は陰性、+は弱陽性、++は中陽性、+++は強陽性であることを示す。

30

【0065】

【表7】

可溶性E-セレクトイン (ng/mL)	イムノクロマト片		
	No. 1	No. 2	No. 3
0	—	—	—
75	+	+	+
150	++	++	++
300	+++	+++	+++

40

【0066】

【表 8】

SIRS患者 (ng/mL)	イムノクロマト片
No. 1	++
No. 2	+
No. 3	+
No. 4	+++
No. 5	+

10

【産業上の利用可能性】

【0067】

本発明の予測方法及び予測用試薬は、SIRSにおける重症臓器不全（特に重篤な急性呼吸不全）の発症予測及び／又は予後予測の用途に適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】ELISAでの標準品（可溶性E-セレクチン）の測定結果を示すグラフである。

【図2】LPIA-S500を用いた標準品（可溶性E-セレクチン）の測定結果を示すグラフである。 20

【図3】ELISAとLPIA-S500の相関を示すグラフである。

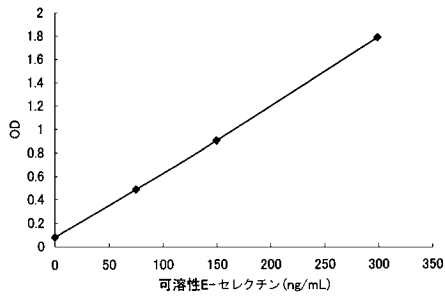
【図4】健常者血漿中の可溶性E-セレクチン測定値を示すグラフである。

【図5】SIRS全患者（n=39）における血漿中の可溶性E-セレクチン測定値を示すグラフである。記号「+」は、死亡した患者のデータであることを示す。

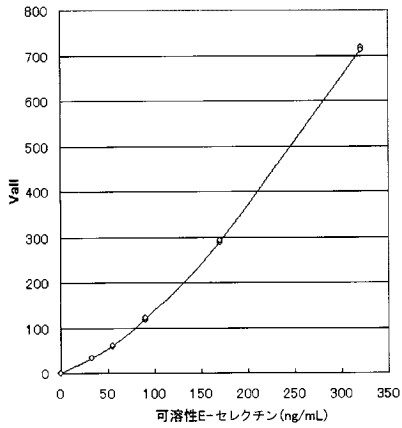
【図6】血漿中の可溶性E-セレクチンが正常範囲のSIRS患者（n=22）のデータを示すグラフである。

【図7】血漿中の可溶性E-セレクチンが異常値を示したSIRS患者（n=17）のデータを示すグラフである。記号「+」は、死亡した患者のデータであることを示す。

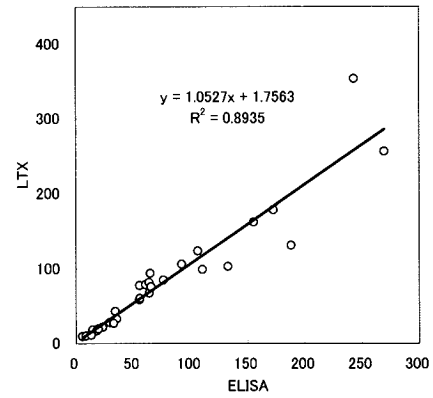
【図 1】



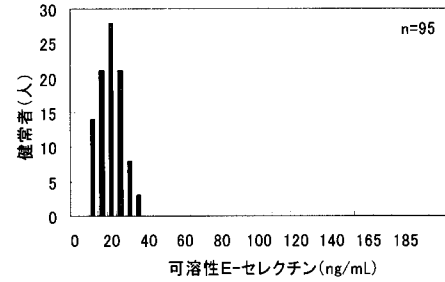
【図 2】



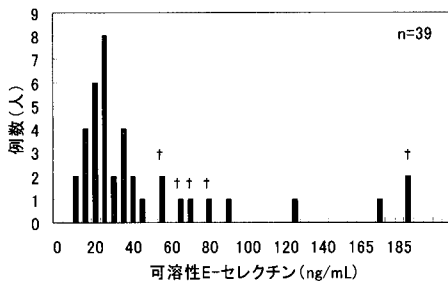
【図 3】



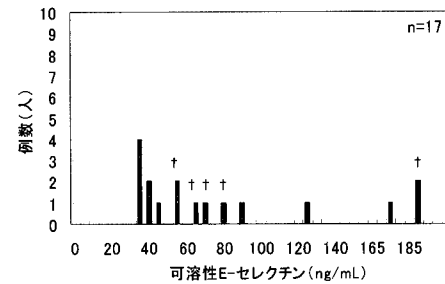
【図 4】



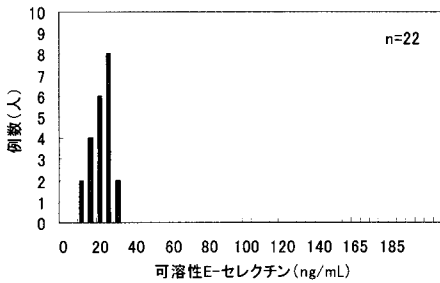
【図 5】



【図 7】



【図 6】



专利名称(译)	用于预测全身炎症反应综合征患者和预测试剂的器官损伤的发作或预后的方法		
公开(公告)号	JP2005214840A	公开(公告)日	2005-08-11
申请号	JP2004023185	申请日	2004-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	三菱化学Yatoron		
[标]发明人	岡嶋研二 中川隆雄 桜井錠治 阪口勝亮		
发明人	岡嶋 研二 中川 隆雄 桜井 錠治 阪口 勝亮		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/566		
代理人(译)	森田健一		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种评估方法和评估试剂，用于快速准确地预测器官感染的危机或预后，例如，全身炎症反应综合征（SIRS）患者的肌无力呼吸衰竭。ŽSOLUTION：分析可溶性E-选择素。评估试剂含有与可溶性E-选择蛋白或其片段特异性偶联的抗体。Ž

【表 1】

クローンNo.	サブクラス
No. 1-1	I g G
No. 3-1	I g G1
No. 5-3	I g G1
No. 9-2	I g G1
No. 10-2	I g G
No. 12-1	I g G1
No. 13-1	I g G1
No. 15-1	I g G1
No. 16-3	I g G
No. 17-3	I g G1
No. 19-1	I g G2b
No. 22-2	I g G2b
No. 24-2	I g G2b
No. 25-2	I g G2a