



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102047115 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 200980120024. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 05. 29

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

2008-144883 2008. 06. 02 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/059873 2009. 05. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/147999 JA 2009. 12. 10

(71) 申请人 卫材 R&D 管理有限公司

地址 日本东京都

(72) 发明人 小原隆 沟口贞明 堀田修

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限

公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 4 页

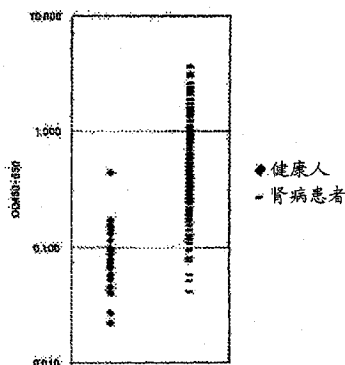
(54) 发明名称

IgA 肾病的检查方法和检查试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种肾病的检查方法,该方法包括:复合体检测工序,从来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体。本发明的肾病的检查方法优选进一步包括:判断工序,基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量相对于所述试样中的尿蛋白质量的比率,判断所述肾病是否为 IgA 肾病。本发明的肾病的检查方法的检测灵敏度和特异性良好,能够简便且安全地判断肾病(优选为 IgA 肾病)。

尿中IgA-6C4识别抗原复合体测定ELISA



1. 一种 IgA 肾病的检查方法,其包括:
复合体检测工序,从来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体。
2. 如权利要求 1 所述的检查方法,其中,所述复合体检测工序包括:使所述试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。
3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的检查方法,其中,其进一步包括如下工序:
获得所述复合体检测工序中检测的复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量的比率。
4. 如权利要求 3 所述的检查方法,其中,其进一步包括:
判断工序,基于所述比率来判断是否为 IgA 肾病。
5. 一种肾病的检查方法,其包括:
复合体检测工序,从来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体。
6. 如权利要求 5 所述的检查方法,其中,所述复合体检测工序包括:使所述试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。
7. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的检查方法,其中,其进一步包括如下工序:基于所述复合体的检测量来判断是否为肾病。
8. 一种 IgA 肾病的检查方法,其包括以下工序:
复合体检测工序,从来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体;
第 1 判断工序,基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量、或所述试样中的尿蛋白质量来判断是否为肾病;
第 2 判断工序,基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量相对于所述试样中的尿蛋白质量的比率来判断所述肾病是否为 IgA 肾病。
9. 如权利要求 1~权利要求 8 中任一项所述的检查方法,其中,所述复合体检测工序为使用针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体的免疫化学方法。
10. 如权利要求 9 所述的检查方法,其中,所述免疫化学方法为夹层法。
11. 一种来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的检测方法,其包括如下工序:使来自待测者的尿的试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。
12. 如权利要求 11 所述的检测方法,其中,利用所述针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体,通过免疫化学方法检测所述复合体。
13. 如权利要求 12 所述的检测方法,其中,所述免疫化学方法为夹层法。
14. 如权利要求 11~权利要求 13 中任一项所述的检测方法,其中,所述待测者为正在发作肾病的人、疑似正在发作肾病的人、或有可能发作肾病的人。
15. 如权利要求 14 所述的检测方法,其中,所述肾病为 IgA 肾病。
16. 一种肾病的检查试剂盒,其至少包含针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体。
17. 如权利要求 16 所述的检查试剂盒,其中,所述肾病为 IgA 肾病。

IgA 肾病的检查方法和检查试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及 IgA 肾病的检查方法和检查试剂盒。

背景技术

[0002] IgA 肾病是 1968 年由 Berger 等人描述的疾病,是在除糖尿病性肾病以外的慢性肾小球肾炎中频率最高的肾病(例如,参照非专利文献 1)。IgA 肾病是长期预后不良的疾病,据推测,需要透析治疗的晚期肾衰竭患者中的约 25% 的起因疾病为 IgA 肾病。以往,即使存在延缓 IgA 肾病的发展的治疗法,也不存在可治愈的治疗法。然而,近年来堀田等人确立了一种若早期开始治疗则可获得完全缓解的治疗法。

[0003] 另一方面,根据“厚生省特定疾病进行性肾功能衰竭研究班和日本肾脏学会的共同委员会(Joint Committee of the Specified Progressive Diseases Investigative Research Division for Progressive Renal Diseases of the Ministry of Health and Welfare and the Japanese Society of Nephrology)”,IgA 肾病的诊断方法以尿检查(持续性显微镜的血尿、持续性或间歇性蛋白尿、肉眼的血尿)、血液检查(血清 IgA 值为 350mg/dl 以上)为辅助性诊断基准,确诊的唯一方法是通过肾活检证明 IgA 在肾小球系膜区的沉积。然而,肾活检需要住院一周左右,而且是出血较多的危险的检查方法,因而受诊率未必能称得上高。现状是需要一种能够通过简便且安全的方法诊断早期的 IgA 肾病的检查方法。

[0004] 另外,作为 IgA 肾病的诊断方法,已知有使用 IgA- 纤连蛋白复合体的方法等(例如,参照日本特开 2000-241431 号公报、日本专利 2592121 号公报、Cederholm et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85 :4865-8, 1988),但目前为止还没有已实用化的方法。

发明内容

[0005] 本发明的课题在于,提供一种检测灵敏度和特异性良好、能够简便且安全地判断 IgA 肾病的 IgA 肾病的检查方法以及检查试剂盒。

[0006] 本发明人制作了与来自人肾小球系膜细胞的抗原特异的抗体,并使用该抗体测定了人尿中的来自人肾小球系膜细胞的抗原和 IgA 的复合体的检测量,结果发现与健康人或除 IgA 肾病以外的肾病患者相比,在 IgA 肾病患者中所述复合体以更高的浓度存在。

[0007] 即,用于解决上述课题的具体方案如下所述。

[0008] 本发明的第 1 方案为一种 IgA 肾病的检查方法,其包括从来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的复合体检测工序。所述复合体检测工序优选包括:使所述试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触。另外,优选进一步包括如下工序:获得所述复合体检测工序中检测出的所述复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量的比率的工序,更优选进一步包括基于所述比率来判断是否为 IgA 肾病的判断工序。

[0009] 本发明的第 2 方案为一种肾病的检查方法,其包括从来自待测者的尿的试样中检

测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的复合体检测工序。所述复合体检测工序优选包括：使所述试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触，更优选进一步包括基于所述复合体的检测量来判断是否为肾病的工序。

[0010] 本发明的第 3 方案为一种 IgA 肾病的检查方法，其包括以下工序：复合体检测工序，从来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体；第 1 判断工序，基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量、或所述试样中的尿蛋白质量来判断是否为肾病；第 2 判断工序，基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量相对于所述尿试样中的尿蛋白质量的比率来判断所述肾病是否为 IgA 肾病。

[0011] 本发明的检查方法中的所述复合体检测工序优选为使用针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体的免疫化学方法，更优选为夹层法。

[0012] 本发明的第 4 方案为一种来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的检测方法，其包括使来自待测者的尿的试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触的工序。优选的是，利用所述针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体，通过免疫化学方法检测所述复合体，更优选通过夹层法检测。

[0013] 另外所述待测者优选为正在发作肾病的人、疑似正在发作肾病的人、或有可能发作肾病的人，所述肾病更优选为 IgA 肾病。

[0014] 本发明的第 5 方案为一种肾病的检查试剂盒，其至少包含针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体。所述肾病优选为 IgA 肾病。

[0015] 根据本发明，能够提供一种检测灵敏度和特异性良好、能够简便且安全地判断 IgA 肾病的 IgA 肾病的检查方法以及检查试剂盒。

附图说明

[0016] 图 1 为通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-6C4 识别抗原复合体的测定值的分布图。

[0017] 图 2 为表示针对通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-6C4 识别抗原复合体的测定值的 ROC 分析的结果的图。

[0018] 图 3 为将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-6C4 识别抗原复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的分布图。

[0019] 图 4 为表示针对将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-6C4 识别抗原复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的 ROC 分析的结果的图。

[0020] 图 5 为通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-4H3 识别抗原复合体的测定值的分布图。

[0021] 图 6 为表示针对通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-4H3 识别抗原复合体的测定值的 ROC 分析的结果的图。

[0022] 图 7 为将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-4H3 识别抗原复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的分布图。

[0023] 图 8 为表示针对将通过 ELISA 法检测的尿中的 IgA-4H3 识别抗原复合体的测定值修正为单位尿蛋白浓度的值的 ROC 分析的结果的图。

具体实施方式

[0024] 以下，详细说明本发明的实施方式，但这些说明并不限定本发明的范围。

[0025] 本发明的肾病的检查方法包括从来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的复合体检测工序。通过从来自尿的试样中检测所述复合体,能够以良好的检测灵敏度和良好的特异性检测待测者的肾病。另外,所述肾病包括 IgA 肾病和除 IgA 肾病以外的肾病。

[0026] 本发明中,所述试样可以是来自待测者采集的尿本身,也可以是对采集的尿进行了通常所进行的稀释、浓缩等处理后的试样。本发明中,优选为利用常规方法将由人采集的尿稀释而得的尿试样。

[0027] 此外,所述来自待测者的尿的试样也可以是使所述尿试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体、或针对人 IgA 的抗体接触而得的试样。

[0028] 另外,本发明中的来自人肾小球系膜细胞的抗原是在人肾小球系膜培养细胞、由人肾分离的肾小球系膜细胞和由这些细胞提取的细胞提取物中存在的抗原,只要是能够与 IgA 形成复合体、且存在于具有肾病的待测者的尿中的抗原,则没有特别限定。其中,从肾病和 IgA 肾病的检测特异性的观点出发,优选为能够与除人肾小球系膜细胞以外的来自构成肾小球的细胞的抗原区别的抗原,更优选为能够与人近曲小管上皮细胞来源的抗原区别的抗原。

[0029] 另外,所述细胞提取物只要是从人肾小球系膜培养细胞、或由人肾分离的肾小球系膜细胞提取的细胞提取物,则没有特别限定,从肾病和 IgA 肾病的检测特异性的观点出发,优选为细胞的骨架成分提取物。

[0030] 所述细胞提取物可以利用通常的方法制备。例如,可列举出使用 ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit(Calbiochem 社制造)的方法等。

[0031] 对所述复合体的检测方法没有特别限定,可以应用通常使用的蛋白质的检测方法,但优选为能够对所检测的复合体定量或半定量的方法。

[0032] 本发明中对复合体的检测中使用的装置没有特别限定,可以根据复合体的检测方法适当选择。具体而言,例如可列举出 HPLC 仪、质谱仪(mass spectrometry)、电泳仪(毛细管电泳装置等)、全自动或半自动酶免疫测定仪、比色皿清洗器(cell washer)、全自动或半自动化学发光免疫测定仪、发光测定装置、全自动或半自动电化学发光免疫测定仪、光学测定装置、酶标仪(Plate Reader)、CCD 照相机、全自动或半自动荧光免疫测定仪、荧光测定装置、全自动或半自动放射免疫测定仪、液体闪烁计数器、库尔特计数器(Coulter Counter)、表面等离子体测定装置、印迹装置、光密度计等。

[0033] 本发明中,从检测灵敏度、特异性和简便性的观点出发,优选为使用针对所述复合体而结合的抗体的免疫化学方法。本说明书中“针对复合体的抗体”是指“识别复合体的抗体”、“与复合体结合的抗体”等抗体中以通常所使用的意义而使用的抗体。即,所述“针对复合体的抗体”与由来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 构成的复合体的至少一部分结合,形成新的复合体。以下,关于“针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体”、“针对人 IgA 的抗体”等也是同样的。

[0034] 作为本发明中的免疫化学方法,可以没有特别限定地使用通常进行的方法。具体而言,例如可列举出酶联免疫吸附测定法(ELISA)、化学发光免疫测定法、电化学发光免疫测定法、吸光度测定、荧光抗体法、放射免疫测定法(RIA)、表面等离子体共振、蛋白印迹法、斑点印迹(dot blot)法等。本发明中,从检测灵敏度、特异性和简便性的观点出发,优选使

用酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。

[0035] 作为本发明中的免疫化学方法,从特异性和简便性的观点出发,优选为使用识别所述复合体中的来自人肾小球系膜细胞的抗原并与之结合的抗体、和识别所述复合体中的 IgA 并与之结合的抗体的夹层法。

[0036] 所述夹层法例如可以如下进行。将与所述复合体结合的抗体(一次抗体)固定至盘(plate)等载体上。通常,为了堵塞盘等的非特异性结合部位,利用酪蛋白等蛋白质或表面活性剂进行封闭操作。接着,添加来自尿的试样或待测试样并进行孵育。将盘等清洗后,添加作为与所述复合体结合的抗体的、经标记的二次抗体,孵育后,清洗盘等,并检测标记,利用上述方法能够进行所述夹层法。

[0037] 本发明中,从检测灵敏度和特异性的观点出发,作为所述一次抗体和所述二次抗体,优选使用选自与所述复合体结合的抗体中的 2 种抗体,更优选使用针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体作为所述一次抗体和所述二次抗体中的一种抗体,使用针对人 IgA 的抗体作为另一种抗体,进一步优选使用针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体作为所述一次抗体,使用针对人 IgA 的抗体作为所述二次抗体。

[0038] 本发明中,与所述复合体结合的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,但从肾病的检测特异性的观点出发,优选为单克隆抗体。

[0039] 与所述复合体结合的抗体可以利用通常进行的方法制备。

[0040] 针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的多克隆抗体可以利用通常的制作方法获得,例如可以如下获得。对兔、山羊等动物用人肾小球系膜培养细胞、由人肾分离的肾小球系膜细胞、或其提取物进行免疫,获得血清。可以通过利用例如硫酸铵沉淀、蛋白 A、蛋白 G 柱、DEAE 离子交换色谱法、偶联了人肾小球系膜细胞的提取物的亲和柱等对其进行纯化来制备。

[0041] 本发明中,优选对来自人肾小球系膜细胞的抗原特异性更高的抗体,其是利用通常进行的方法(例如吸收操作等)除去了与除来自人肾小球系膜细胞的抗原以外的抗原结合的抗体后的抗体。

[0042] 另外,若为例如针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的单克隆抗体时,对小鼠等小动物用人肾小球系膜培养细胞、由人肾分离的肾小球系膜细胞、或其提取物进行免疫,从该小鼠中取出脾脏,将其研碎分离细胞,利用聚乙二醇等试剂与小鼠骨髓瘤细胞融合,从由此形成的融合细胞(杂交瘤)中选择产生与来自人肾小球系膜细胞的抗原结合的抗体的克隆。接着,将所选择的杂交瘤移植至小鼠腹腔内,从该小鼠中回收腹水。可以通过利用例如硫酸铵沉淀、蛋白 A、蛋白 G 柱、DEAE 离子交换色谱法、偶联了人肾小球系膜细胞的提取物的亲和柱等对所得到的单克隆抗体进行纯化来制备。

[0043] 在产生与所述来自人肾小球系膜细胞的抗原结合的单克隆抗体的克隆的选择中,优选选择与来自人肾小球系膜细胞的抗原反应性高的克隆。另外,除此之外,优选排除产生还与除来自人肾小球系膜细胞的抗原以外的抗原结合的抗体的克隆。作为所述除来自人肾小球系膜细胞的抗原以外的抗原,例如,可列举出除人肾小球系膜细胞以外的细胞的抗原(其是混入尿中的可能性高的细胞),优选为来自人近曲小管上皮细胞的抗原。

[0044] 作为本发明的针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体,从肾病和 IgA 肾病的检测特异性的观点出发,优选为与来自人肾小球系膜细胞的抗原结合、且不与来自除人肾小

球系膜细胞以外的细胞的抗原（其是混入尿中的可能性高的细胞）结合的抗体，更优选为与来自人肾小球系膜细胞的抗原结合、且不与来自人近曲小管上皮细胞的抗原结合的抗体。

[0045] 另外，针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体可以是如上述那样得到的来自小鼠等小动物的抗体、嵌合抗体、人源化抗体、和全人抗体等中任一种。

[0046] 作为针对人 IgA 的抗体，只要是能够与所述复合体中的 IgA 结合的抗体则没有特别限定，可以是识别人 IgA 的 H 链、J 链、分泌片 (secretory component) 等中任一种的抗体。

[0047] 另外，针对人 IgA 的抗体可以是多克隆抗体，也可以是单克隆抗体，但从复合体的检测特异性的观点出发，优选为针对人 IgA 的单克隆抗体。

[0048] 所述针对人 IgA 的单克隆抗体可以使用人 IgA 作为抗原，与上述针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体同样地进行制备。另外，作为针对人 IgA 的抗体，还可以使用市售的抗人 IgA 抗体。

[0049] 另外，针对人 IgA 的抗体也可以是如上述那样得到的来自小鼠等小动物的抗体、嵌合抗体、人源化抗体、和全人抗体等中任一种。

[0050] 对所述标记没有特别限定，可以使用公知的标记。例如，可列举出酶、化学发光物质、电化学发光物质、放射性物质等。

[0051] 本发明中，从检测灵敏度和简便性的观点出发，优选使用酶作为所述标记。

[0052] 作为所述酶，只要是能够利用物理方法、化学方法定量的酶则没有特别限定。例如，可列举出碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶 (HRP)、荧光素酶 (luciferase) 等酶。

[0053] 另外，标记的检测方法只要是能够将标记定量或半定量的检测方法则没有特别限定，可以根据标记适当选择。例如，可列举出吸光度、发光强度、荧光强度、辐射计数等。

[0054] 可以通过对标记定量或半定量，来对所述复合体定量或半定量。

[0055] 在通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 利用吸光度检测标记从而进行本发明的复合体检测工序的情况下，作为本发明优选使用的检测所述复合体的测定装置，可列举出以下吸光度测定装置：该吸光度测定装置能够测定与复合体结合的标记所产生的的色素的吸光度，该吸光度测定装置具备：放置含有由标记产生的色素的试样的试样放置部；对所述试样照射光的光照射部；接受来自所述试样的反射光和透射光的至少任一种，并测定所接受的光量的光量测定部。

[0056] 本发明中，利用所述光照射部，对与样本（来自待测者的尿的试样）中所含的来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体结合的标记所产生的色素照射光，并利用光量测定部对所述色素的吸光度进行定量化，从而能够测定样本中的来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的存在量。

[0057] 另外，还可以不测定吸光度，而通过检测来自样本的发光来进行所述标记的检测。该情况下，可以不使用所述吸光度测定装置，而使用例如以下举出的测定装置，该测定装置能够测定由与复合体结合的标记自身或由反应液中的标记的底物发出的光，该测定装置具备：放置含有标记的试样的试样放置部；接受来自所述试样的发光，并测定所接受的光量的光量测定部。

[0058] 本发明中，利用所述光量测定部，对由含有与样本（来自待测者的尿的试样）中所含的来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体结合的标记的试样所发出的光进行

定量化,能够测定样本中来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的存在量。

[0059] 本发明的肾病的检查方法优选包括判断工序,即,基于所述来自尿的试样中所含的所述复合体的检测量来判断肾病。作为本发明中的所述复合体的检测量,只要是所述来自尿的试样中所含的所述复合体的浓度或与其对应的定量值或半定量值,则可以没有特别限定地使用。例如,可列举出直接测定所述复合体的检测量的测定值、介由标记的检测而间接测定所述复合体的检测量的测定值等。

[0060] 另外,本发明的肾病的检查方法中,在检查 IgA 肾病的情况下,用于判断为 IgA 肾病中的复合体的检测量优选为复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的总尿蛋白质量的比率。所述比率既可以是将复合体的检测量的测定值除以来自待测者的尿的试样中的总尿蛋白质量的测定值所得到的值,也可以是以相对于总尿蛋白质量的相对值的形式所得到的复合体的检测量。通过基于该比率进行判断,能够以更高的灵敏度和特异性判断为 IgA 肾病。

[0061] 另外,测定总尿蛋白质量的来自待测者的尿的试样既可以是来自相同的待测者得到的试样,也可以是与用于所述复合体的检测的来自尿的试样不同的试样。

[0062] 本发明的肾病的检查方法中的判断工序优选包括以下工序:对由来自待测者的尿的试样检测出的来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的检测量、和作为对照的由来自正常人的尿的试样检测出的所述复合体的检测量进行比较的工序;将所述来自待测者的尿的试样中的所述复合体的检测量大于作为对照的来自正常人的尿的试样中的所述复合体的检测量的情况与肾病关联的工序。

[0063] 此处作为对照的正常人是指,预先明确没有发作肾病的个体。另外,检测量大是指,与为了区别正常人和肾病患者而设定的正常检测量(分界值,cut-off value)相比,来自待测者的所述复合体的检测量更大。

[0064] 所述分界值例如可以通过将来自肾病患者的尿的试样组中的所述复合体的检测量、与作为对照的来自正常体组的尿的试样组中的所述复合体的检测量付之于 ROC 分析等来进行设定。ROC 分析是能够评价例如疾病的检查方法的检测能力、诊断能力的分析方法,是例如日本临床检查自动化学会会志“临床检查的诊断有用性评价手册”Ver. 1.3(2004.9.1)、Vol. 29 Suppl. 1(通卷第 154 号)(2004 年 9 月 1 日发行)中记载的分析方法。

[0065] 另外,分界值例如还可以在正常人的检测水平的平均值上加上 2 倍或 3 倍的标准偏差而得的形式来确定,此外,可以适当确定为均衡地满足灵敏度(检测率)和特异性(假阳性率低的程度)的值。

[0066] 作为本发明中的肾病,例如,可列举出 IgA 肾病(IgAN)、膜性肾病(MN)、狼疮性肾炎(SLE)、局灶性肾小球硬化症(FGS)、微小病变性肾病综合征(MCNS)、糖尿病性肾病(DMN)、淀粉样变性、遗传性肾病(Alport)、燃尽性 IgA 肾病(IgA 肾病的自然缓解状态)、膜性增生性肾小球肾炎(MPGN)、与抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关的肾炎、薄基底膜肾病(TBMD)、肾硬化症等。

[0067] 本发明的肾病的检查方法可以通过检测尿中的所述复合体来检测以 IgA 肾病为首的各种肾病。

[0068] 本发明的 IgA 肾病的检查方法的特征在于包括以下工序:从来自待测者的尿的试

样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的复合体检测工序;基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量、或来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量来判断肾病的第 1 判断工序;基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量相对于来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量的比率将所述肾病判断为 IgA 肾病的第 2 判断工序。

[0069] 通过基于所述复合体的检测量相对于来自尿的试样中的总蛋白质量的比率来判断 IgA 肾病,能够高灵敏度且高特异性地判断 IgA 肾病,即使在通过治疗介入而得到完全缓解的初期阶段,也能够简便且安全地判断 IgA 肾病。

[0070] 本发明中的复合体检测工序与所述肾病的检查方法中的复合体检测工序相同。

[0071] 另外,尿蛋白质量的检测方法只要能够测定来自尿的试样中的总蛋白质量则没有特别限定,可以应用通常进行的对来自尿的试样的蛋白质进行检测的方法。例如,可以应用金井光正等人著的“临床检查法概要改订版第 32 版”、173 ~ 174 页、2005 年中记载的方法。

[0072] 本发明中的第 1 判断工序中,基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量来判断肾病的工序与所述肾病的检查方法中的判断工序相同。

[0073] 另外,基于所述来自尿的试样中的尿蛋白质量来判断肾病的工序优选包括以下工序:将来自待测者的尿的试样中的尿蛋白质量大于为了区别正常人和肾病患者而设定的正常检测量(分界值)的情况与肾病关联。

[0074] 此处,尿蛋白质量的正常检测量可以利用通常的方法设定。

[0075] 本发明中的第 2 判断工序优选包括以下工序:对来自待测者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率(复合体/总蛋白质)、和作为对照的来自除 IgA 肾病以外的肾患者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率进行比较的工序;将所述来自待测者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率大于作为对照的来自除 IgA 肾病以外的肾患者的尿的试样中的所述复合体的检测量相对于所述试样中的总蛋白质量的比率的情况与 IgA 肾病关联的工序。

[0076] 此处,比率大是指,与为了区别 IgA 肾病和除 IgA 肾病以外的肾病而设定的分界值相比,来自待测者的所述复合体的检测量比率更大。

[0077] 所述分界值可以与上述肾病的检查方法中的分界值同样设定,但从检测特异性的观点出发,优选基于 ROC 分析的结果设定分界值。

[0078] 本发明的 IgA 肾病的检查方法中测定尿中的所述复合体的检测量和总蛋白质量,能够基于所述复合体的检测量相对于所述总蛋白质量的比率检测 IgA 肾病,因此是简便且安全的 IgA 肾病的检查方法。

[0079] 本发明的来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体的检测方法包括使来自待测者的尿的试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触的工序。由此能够以高灵敏度且高特异性检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合体。

[0080] 本发明的复合体的检测方法中,在所述肾病的检查方法的复合体检测工序中说明的事项也能同样地适用。

[0081] 另外,所述待测者优选为正在发作肾病的人、疑似正在发作肾病的人、或有可能发

作肾病的人。此处所述的有可能发作肾病的人是指,并非正在发作肾病的人或疑似正在发作肾病的人中任一种的所有的人。另外所述肾病更优选为 IgA 肾病。

[0082] 本发明的肾病的检查试剂盒的特征在于,其含有至少 1 种针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和至少 1 种针对人 IgA 的抗体。通过使用所述针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体来检测来自尿的试样中的来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合物,能够以良好的检测灵敏度和特异性判断肾病。

[0083] 本发明的肾病的检查试剂盒中除了所述抗体以外,优选进一步包括操作说明书,该操作说明书中记载了如下步骤:使来自待测者的尿的试样与针对来自人肾小球系膜细胞的抗原的抗体和针对人 IgA 的抗体接触,检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人 IgA 的复合物,将其检测量与肾病关联。

[0084] 另外,本发明的肾病的检查试剂盒可以更优选作为 IgA 肾病的检查用试剂盒使用。

[0085] 日本国申请号第 2008-144883 号的全部公开内容作为参考引入到本说明书中。

[0086] 关于本说明书中记载的全部文献、专利申请和技术标准,与具体且分别记载了将各文献、专利申请和技术标准作为参考而引入的情况同样程度地作为参考引入到本说明书中。

[0087] 实施例

[0088] 以下,通过实施例来具体说明本发明,但本发明不限于这些实施例。另外,如果没有特别说明,则“%”为质量基准。

[0089] [实施例 1]

[0090] <人肾小球系膜细胞抗原识别单克隆抗体的取得>

[0091] 培养正常人肾小球系膜细胞(Cryo NHMC: Cambrex 社),将该细胞或其细胞骨架成分提取级分作为免疫原对 BALB/c 小鼠(雌性)进行免疫。确认对于免疫原的抗体效价上升,然后将其脾细胞与 P3U-1 细胞进行细胞融合,从而制作杂交瘤。杂交瘤的第一次筛选通过将 2 种免疫抗原(正常人肾小球系膜细胞或其细胞骨架成分提取级分)固定于微量板的杯中的 EIA 法进行,选择对于两者或任一者的抗原显示出高显色值的杂交瘤。另外,细胞骨架成分提取级分使用 ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit(Calbiochem 社制造)制备。

[0092] 将所选择的杂交瘤用有限稀释法制成单克隆后,使用它们,为了选择与人肾小球系膜细胞特异的杂交瘤而进行第二次筛选。杂交瘤的第二次筛选中,使用后述的 ELISA 法,选择对于在固相使用了正常人肾小球系膜细胞或其细胞骨架成分提取级分的情况反应、对于在固相为用于对照而培养的正常人近曲小管上皮细胞(Cryo RPTEC: Cambrex 社)或其细胞骨架成分提取级分的情况不反应的克隆。

[0093] ELISA 法如下进行。分别将 4000 细胞/200 μ l 的正常人肾小球系膜细胞和正常人近曲小管上皮细胞注入 PolySorp 杯(NUNC 社制造)中,在 37 $^{\circ}$ C 培养一晚。将杯用 PBS(pH7.2)清洗 5 次后,以 100 μ l/孔注入 0.05%戊二醛溶液,在室温反应 30 分钟。将杯用清洗液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20)清洗 5 次后,以 150 μ l/孔注入封闭液(10%正常兔血清(Pel-Freeze)、50mM Tris/HCl(pH7.5)、0.15M NaCl、10mM-EDTA-2Na、0.01% Tween20、0.1% Na₂S₂O₃)后,在室温封闭 2 小时或在 4 $^{\circ}$ C 封闭 1 天以上

(以下,称为“抗体筛选用杯”)。

[0094] 另一方面,将正常人肾小球系膜细胞和正常人近曲小管上皮细胞的骨架成分提取级分用 50mM Tris/HCl (pH7.5)、0.15M NaCl 分别稀释至 10 μ g/ml 浓度后,以 50 μ l/孔注入 PolySorp 杯 (NUNC 社制造) 中。将杯放入湿润盒中,在 4 $^{\circ}$ C 包被一晚。包被以后的操作与前述的抗体筛选用杯同样进行。

[0095] 将 4 种抗体筛选用杯分别用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次,以 50 μ l/孔注入杂交瘤培养上清,在室温反应 1 小时。用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次后,以 50 μ l/孔注入通过用经 0.2M Na₂HPO₄/0.1M 柠檬酸缓冲化 (pH5.4) 的 25% 正常兔血清 (Pel-Freeze) 稀释的 2 种标记抗体 (HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG (Zymed 社制造:1000 倍稀释)、HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG1 (Zymed 社制造:4000 倍稀释)),在室温反应 1 小时。用清洗液清洗 3 次后,以 100 μ l/孔注入 ELISA 用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 液体底物系统 (SIGMA 社制造),在室温反应 30 分钟。以 100 μ l/孔注入 0.5M H₂SO₄ 停止反应后,测定 OD (450-650nm)。本测定结果中,尤其是在 HRP-Anti-Mouse IgG1 的情况下,选择对于正常人肾小球系膜细胞和其细胞骨架成分提取级分的两者或其中任一者显示出高显色值、且对于正常人近曲小管上皮细胞和其细胞骨架成分提取级分的任一者均显示出低显色值的克隆。

[0096] < 单克隆抗体的反应特性的确认 >

[0097] 培养上述取得的杂交瘤,将其细胞移植至小鼠腹腔,通过 PROSEP-A (MILLIPORE 社制造) 从所得的腹水中纯化 IgG。关于纯化单克隆抗体的特异性,利用与上述筛选中所用的 ELISA 法相同的方法确认特异性。

[0098] 5 种纯化单克隆抗体 (4H3-1D12-1D2、4H3-2E7-1D2、6C4-6A8-1B4、14E11-2G7-1B2、11A11-2F9-1G3),均对于在固相为正常人肾小球系膜细胞或细胞骨架成分提取级分的情况显示出高显色值,对于在固相为对照用的正常人近曲小管上皮细胞 (Cryo RPTEC :Cambrex 社) 或其细胞骨架成分提取级分的情况仅显示出低显色值。

[0099] 接着,对正常人肾小球系膜细胞的骨架成分提取级分实施 SDS-PAGE,印迹于硝化纤维素滤膜 (Schleicher&Schuell 社制造,BA85) 上。将滤膜浸渍于封闭液 (50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、5% 脱脂乳、0.01% Tween20、0.1% NaN₃) 中,在 4 $^{\circ}$ C 振荡一晚后,更换封闭液,加入所取得的单克隆抗体各克隆的培养上清,在室温振荡 2 小时,用清洗液清洗 3 次。以 1/1000 浓度在清洗液中加入作为二次抗体的 HRP 标记抗小鼠 IgG (Zymed Laboratories, Inc. 社制造),在室温振荡 1 小时,用清洗液清洗 3 次后,加入显色液 (8.3mM Tris-HCl (pH6.5)、125mM NaCl、0.05% 4-氯-1-萘酚、0.01% H₂O₂) 使其显色。

[0100] 上述蛋白印迹法分析实验的结果显示,克隆 4H3 和 6C4 与人肾小球系膜细胞的骨架成分提取级分的不同分子量的成分反应。认为克隆 4H3 和 6C4 识别人肾小球系膜细胞的不同抗原。

[0101] < 肾病的检测 >

[0102] ~ 基于 ELISA 法的 IgA-6C4 识别抗原复合体的检测 ~

[0103] 将 6C4-6A8-1B4 抗体 (以下,称为“6C4”) 用 PROSEP-A (MILLIPORE 社制造) 纯化后,进一步用 50mM Tris/HCl (pH7.5)、0.15M NaCl 透析,将纯化的纯化抗体用 50mM Tris/HCl (pH7.5)、0.15M NaCl 稀释至 5 μ g/ml ~ 10 μ g/ml 浓度后,以 50 μ l/孔注入 PolySorp

杯 (NUNC 社制造) 中。将杯放入湿润盒中,在 4℃ 包被一晚。包被后,用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次,以 150 μ l/ 孔注入封闭液 (50% N102 (日本油脂社制造)、25mM Tris/HCl (pH7.5)、75mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药社制造)) 后,在室温封闭 2 小时或在 4℃ 封闭 1 天以上 (以下,称为“6C4 包被杯”)。

[0104] 将 6C4 包被杯用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次,以 50 μ l/ 孔注入经样本稀释液 (50% N102 (日本油脂社制造)、50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药社制造)) 稀释了 50 倍的尿样本,在室温反应 1 小时。用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次后,以 50 μ l/ 孔注入用 Can Get Signal2 (TOYOB0 社制造) 稀释了 3000 倍的 HRP-GOAT Anti-Human IgA (Zymed 社制造),在室温反应 1 小时。用清洗液清洗 3 次后,以 100 μ l/ 孔注入 ELISA 用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 液体底物系统 (SIGMA 社制造),在室温反应 30 分钟。以 100 μ l/ 孔注入 0.5M H₂SO₄ 停止反应后,测定 OD (450-650nm)。对于包括 95 例 IgA 肾病患者在内的 146 例肾病患者和 28 例健康人 (正常人) 进行测定的结果示于图 1。

[0105] 图 1 中,通过对减去了空白的值进行比较,得到能够显著区别包括 95 例 IgA 肾病患者在内的 146 例肾病患者和 28 例健康人 (正常人) 的结果。

[0106] 另外,针对 146 例肾病患者和 28 例健康人进行了 ROC 分析,结果得到图 2 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 0.155。由该分界值求出的 146 例肾病患者和 28 例健康人的阳性率的结果示于表 1。如表 1 所示,在 146 例肾病患者中阳性为 132 例 (90.4%),在 28 例健康人中阳性为 2 例 (7.1%),能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 90.4%,特异度 (特异性) 为 92.9%,诊断效率为 90.8%。

[0107] [表 1]

[0108]

	肾病患者	健康人
样本数	146	28
阳性数	132	2
阳性率	90.4%	7.1%

[0109] < IgA 肾病的检测 >

[0110] 接着,对于复合体检测量显示出上述分界值以上的显色值的样本,通过邻苯三酚红法定量尿中的蛋白浓度。将上述检测的 IgA-6C4 识别抗原复合体的检测量 (图 1 所示的值) 除以尿中的蛋白浓度,算出尿中单位蛋白量的复合体检测量,结果示于图 3。由图 3 可知,能够显著区别 83 例 IgA 肾病患者和 48 例除 IgA 肾病以外的肾病患者。

[0111] 另外,对于 83 例 IgA 肾病患者和 48 例除 IgA 肾病以外的肾病患者进行 ROC 分析,结果得到图 4 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 4509。将由该分界值求出的 83 例 IgA 肾病患者和 48 例除 IgA 肾病以外的肾患者的阳性率的结果示于表 2。由表 2 可知,在 83 例 IgA 肾病患者中阳性为 61 例 (73.5%),在 48 例除 IgA 肾病以外的肾病患者中

阳性为 10 例 (20.8%), 能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 73.5%, 特异度为 79.2%, 诊断效率为 75.6%。

[0112] [表 2]

[0113]

	IgA 肾病	除 IgA 肾病以外的肾病
样本数	83	48
阳性数	61	10
阳性率	73.5%	20.8%

[0114] [实施例 2]

[0115] < 肾病的检测 >

[0116] ~ 基于 ELISA 法的 IgA-4H3 识别抗原复合体的检测 ~

[0117] 将 4H3-1D12-1D2 抗体 (以下, 称为“4H3”) 用 PROSEP-A (MILLIPORE 社制造) 纯化后, 用 50mM Tris/HCl (pH7.5)、0.15M NaCl 透析, 将所得纯化抗体用 50mM Tris/HCl (pH7.5)、0.15M NaCl 稀释至 5 μg/ml ~ 10 μg/ml 浓度后, 以 50 μl/孔注入 PolySorp 杯 (NUNC 社制造) 中。将杯放入湿润盒中, 在 4℃ 包被一晚。包被后, 用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次, 以 150 μl/孔注入封闭液 (50% N102 (日本油脂社制造)、25mM Tris/HCl (pH7.5)、75mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药社制造)) 后, 在室温封闭 2 小时或在 4℃ 封闭 1 天以上 (以下, 称为“4H3 包被杯”)。

[0118] 将 4H3 包被杯用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次, 以 50 μl/孔注入经样本稀释液 (50% N102 (日本油脂社制造)、50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、2% Block Ace (大日本住友制药社制造)) 稀释了 50 倍的尿样本, 在室温反应 1 小时。用清洗液 (50mM Tris/HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.01% Tween20) 清洗 3 次后, 以 50 μl/孔注入用 Can Get Signal2 (TOYOCO 社制造) 稀释了 3000 倍的 HRP-GOAT Anti-Human IgA (Zymed 社制造), 在室温反应 1 小时。用清洗液清洗 3 次后, 以 100 μl/孔注入 ELISA 用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 液体底物系统 (SIGMA 社制造), 在室温反应 30 分钟。以 100 μl/孔注入 0.5M H₂SO₄ 停止反应后, 测定 OD (450-650nm)。对于包括 95 例 IgA 肾病患者在内的 149 例肾病患者和 28 例健康人进行测定的结果示于图 5。

[0119] 图 5 中, 通过对减去了空白的值进行比较, 得到能够显著区别包括 95 例 IgA 肾病患者在内的 149 例肾病患者和 28 例健康人的结果。

[0120] 另外, 针对 149 例肾病患者和 28 例健康人进行了 ROC 分析, 结果得到图 6 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 0.192。由该分界值求出的 149 例肾病患者和 28 例健康人的阳性率的结果示于表 3。由表 3 可知, 在 149 例肾病患者中阳性为 147 例 (98.7%), 在 28 例健康人中阳性为 1 例 (3.6%), 能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 98.7%, 特异度为 96.4%, 诊断效率为 98.3%。

[0121] [表 3]

[0122]

	肾病患者	健康人
样本数	149	28
阳性数	147	1
阳性率	98.7%	3.6%

[0123] <IgA 肾病的检测>

[0124] 接着,对于显示出分界值以上的显色值的样本,通过邻苯三酚红法定量尿中的蛋白浓度。将上述检测的 IgA-4H3 识别抗原复合体的检测量(图 5 所示的值)除以尿中蛋白浓度,算出尿中单位蛋白量的复合体检测量,结果示于图 7。由图 7 可知,能够显著区别 92 例 IgA 肾病患者和 54 例除 IgA 肾病以外的肾病患者。

[0125] 另外,对于 92 例 IgA 肾病患者和 54 例除 IgA 肾病以外的肾病患者进行 ROC 分析,结果得到图 8 所示的 ROC 曲线。由 ROC 曲线求得的分界值为 15.07。将由该分界值求出的 92 例 IgA 肾病患者和 54 例除 IgA 肾病以外的肾病患者的阳性率的结果示于表 4。由表 4 可知,在 92 例 IgA 肾病患者中阳性为 71 例(77.2%),在 48 例除 IgA 肾病以外的肾病患者中阳性为 14 例(25.9%),能够显著地区别两者。此时的灵敏度为 77.2%,特异度为 74.1%,诊断效率为 76.0%。

[0126] [表 4]

[0127]

	IgA 肾病	除 IgA 肾病以外的肾病
样本数	92	54
阳性数	71	14
阳性率	77.2%	25.9%

[0128] 由上述内容可知,通过检测尿中存在的人 IgA 和来自人肾小球系膜细胞的抗原的复合体,能够识别健康人和肾病患者。

[0129] 另外可知,通过测定尿中存在的人 IgA 和来自人肾小球系膜细胞的抗原的复合体的单位尿蛋白浓度的检测量,能够识别 IgA 肾病和除此之外的肾病。

尿中IgA-6C4识别抗原复合物测定ELISA

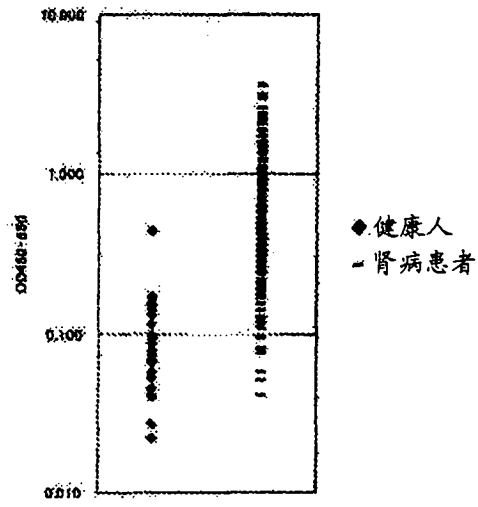


图 1

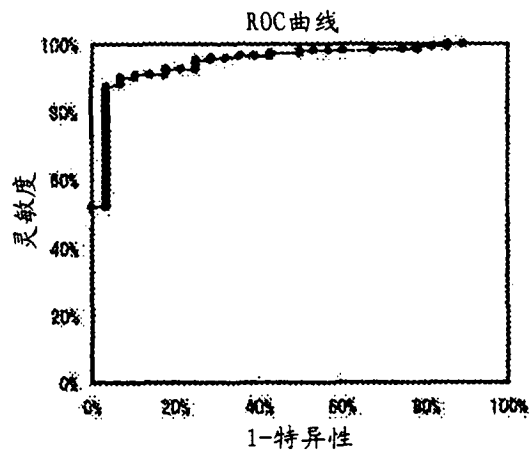


图 2

尿中IgA-6C4识别抗原复合物测定ELISA
(蛋白质浓度修正)

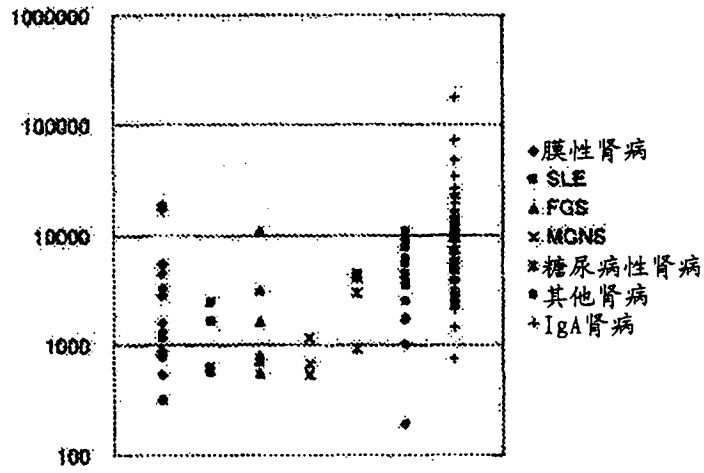


图 3

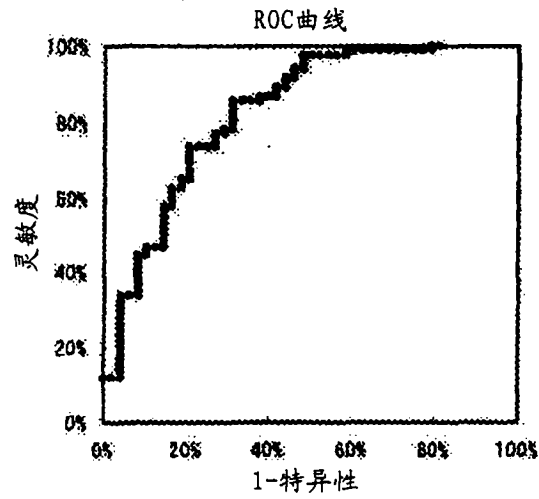


图 4

尿中IgA-4H3识别抗原复合物测定ELISA

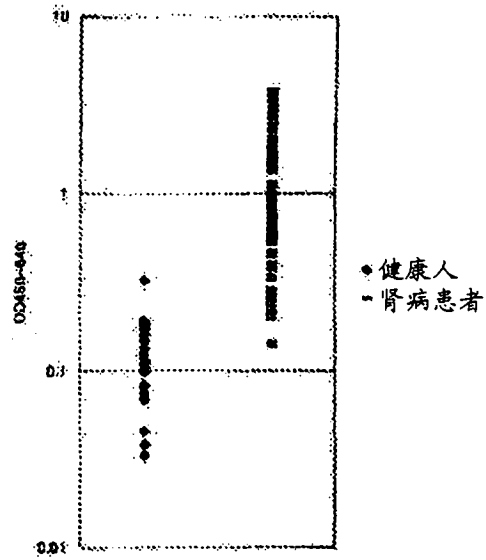


图 5

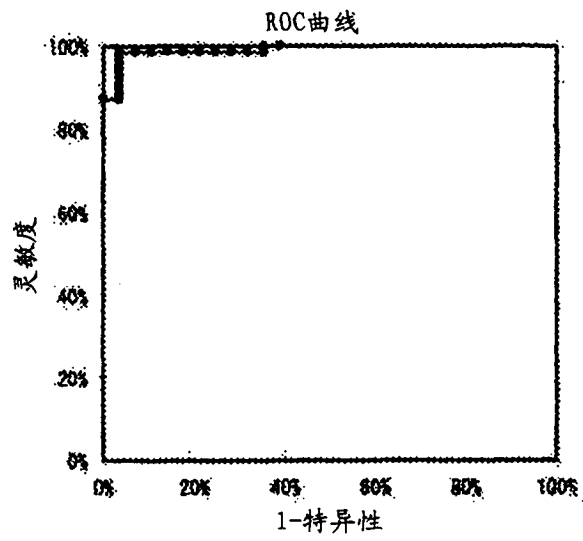


图 6

尿中IgA-4H3识别抗原复合物测定ELISA(蛋白质浓度修正)

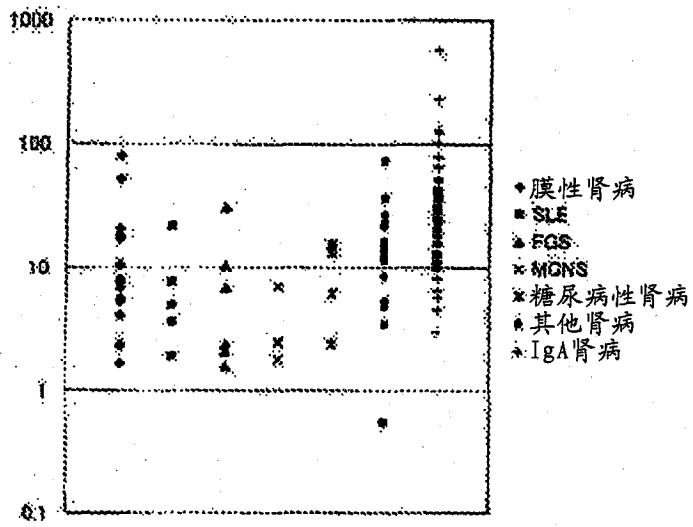


图 7

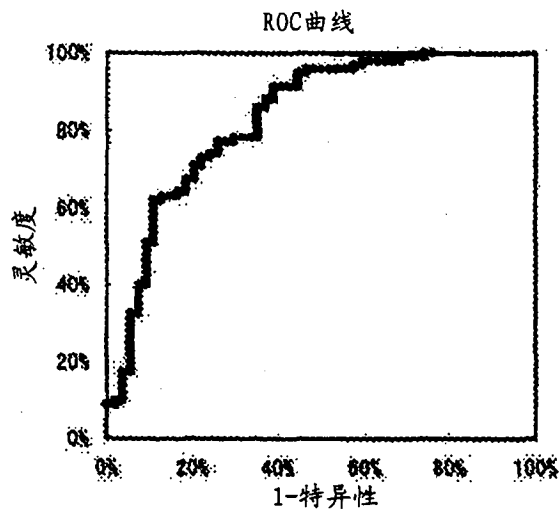


图 8

专利名称(译)	IgA肾病的检查方法和检查试剂盒		
公开(公告)号	CN102047115A	公开(公告)日	2011-05-04
申请号	CN200980120024.8	申请日	2009-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材R&D管理有限公司		
[标]发明人	小原隆 沟口贞明 堀田修		
发明人	小原隆 沟口贞明 堀田修		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N2800/347		
优先权	2008144883 2008-06-02 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种肾病的检查方法，该方法包括：复合体检测工序，来自待测者的尿的试样中检测来自人肾小球系膜细胞的抗原和人IgA的复合体。本发明的肾病的检查方法优选进一步包括：判断工序，基于所述复合体检测工序中检测的所述复合体的检测量相对于所述试样中的尿蛋白质量的比率，判断所述肾病是否为IgA肾病。本发明的肾病的检查方法的检测灵敏度和特异性良好，能够简便且安全地判断肾病(优选为IgA肾病)。

尿中IgA-6C4识别抗原复合体测定ELISA

