

(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2014-210761
(P2014-210761A)

(43) 公開日 平成26年11月13日(2014.11.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18 ZNA	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4B064
GO1N 33/533 (2006.01)	GO1N 33/533	4H045
GO1N 33/534 (2006.01)	GO1N 33/534	
GO1N 33/535 (2006.01)	GO1N 33/535	

審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-163755 (P2013-163755)	(71) 出願人	592055956 株式会社シバヤギ 群馬県渋川市石原1062-1
(22) 出願日	平成25年8月7日(2013.8.7)	(72) 発明者	小島 正章 群馬県渋川市石原1062-1株式会社シバヤギ内
(31) 優先権主張番号	特願2013-79431 (P2013-79431)	(72) 発明者	蜂巢 達之 群馬県渋川市石原1062-1株式会社シバヤギ内
(32) 優先日	平成25年4月5日(2013.4.5)	Fターム(参考)	4B063 QA01 QQ03 QQ79 QR03 QR48 QS02 QS03 QS16 QX01 QX02 QX07 QX10 4B064 AG27 CA10 CA20 CA21 CA34 CA40 CB11 CC24 DA13 4H045 AA11 AA30 AA40 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA72 FA74
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体ならびにそれを用いた免疫学的測定方法、および免疫学的測定用キット

(57) 【要約】

【課題】 抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体（抗イヌNT-proANP抗体）、この抗体を用いたイヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（イヌNT-proANP）を測定する免疫学的測定方法、および伴侶動物の心疾患または心臓に寄生する感染症の検出方法を提供すること。

【解決手段】 この発明の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体は、ヒトNT-proANPのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列部位、例えば、イヌNT-proANPの31～67番のアミノ酸配列の1部もしくは全部を認識する抗イヌNT-proANP(31～67)抗体またはイヌNT-proANPの68～98番のアミノ酸配列の1部もしくは全部を認識する抗イヌNT-proANP(68～98)抗体からなる。この発明のイヌNT-proANPの免疫学的測定方法は、この抗体の1種または2種を用いたサンドイッチ測定法に基づく方法である。また、本発明は、犬などの伴侶動物の心疾患、例えば僧帽弁閉鎖不全症、心不全、またはイヌフィラリア症などの心臓に寄生する感染症を検出することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（イヌNT - proANP）のヒトNT - proANPのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列部位を認識することを特徴とする抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体（抗イヌNT - proANP抗体）。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体であって、イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（イヌNT - proANP、アミノ酸98残基）の31～67番のアミノ酸配列の1部もしくは全部を認識する抗イヌNT - proANP（31～67）抗体またはイヌNT - proANPの68～98番のアミノ酸配列の1部もしくは全部を認識する抗イヌNT - proANP（68～98）抗体からなる抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体であって、前記抗イヌNT - proANP（31～67）抗体が、イヌNT - proANPアミノ酸配列の32～40番（配列番号2：AESPQALSE）を認識すること、および前記抗イヌNT - proANP（68～98）抗体が、イヌNT - proANPアミノ酸配列の74～82番（配列番号3：RSPWDSDDR）を認識することを特徴とする抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体であって、前記抗イヌNT - proANP（31～67）抗体を産生するハイブリドーマ株のクローン番号が2E3（受託番号NITE P - 1318）であること、および前記抗イヌNT - proANP（68～98）抗体を産生するハイブリドーマ株のクローン番号が3D2（受託番号NITE P - 1319）であることを特徴とする抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体。

20

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体であって、前記抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であることを特徴とする抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体。

30

【請求項 6】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体であって、前記抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体（抗イヌNT - proANP抗体）を用いてイヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（イヌNT - proANP）を測定することを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の免疫学的測定方法であって、イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチドを含む検体を前記抗イヌNT - proANP抗体（第1の抗体）と接触させる工程、および前記抗イヌNT - proANP抗体（第1の抗体）と異なる前記イヌN末端プロ心房性利尿ペプチドを認識した標識抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体（第2の抗体）に結合させて、前記イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチドを測定することを特徴とする免疫学的測定方法。

40

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の免疫学的測定方法であって、前記第1の抗体が前記抗イヌNT - proANP（31～67）抗体または前記抗イヌNT - proANP（68～98）抗体であること、および前記第2の抗体が前記抗イヌNT - proANP（31～67）

50

抗体または前記抗イヌNT - proANP (68 ~ 98) 抗体であること、ただし前記第1の抗体は前記第2の抗体と同じであっても、異なってもよいことを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項10】

請求項7ないし9のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法であって、前記第1の抗体が前記抗イヌNT - proANP (31 ~ 67) 抗体であり、前記第2の抗体が前記抗イヌNT - proANP (68 ~ 98) 抗体であることを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項11】

請求項7ないし10のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法であって、前記第1の抗体および前記第2の抗体はいずれもモノクローナル抗体であることを特徴とする免疫学的測定方法。

10

【請求項12】

請求項7ないし11のいずれか1項に記載する免疫学的測定方法であって、前記検体が、体液、血液、血清またはEDTAもしくはアプロチニンを含有していてもよい血漿からなる検体であることを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項13】

請求項12に記載する免疫学的測定方法であって、前記検体が、血漿（ヘパリン・EDTA・クエン酸）にアプロチニンを含む検体であることを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項14】

請求項7ないし13のいずれか1項に記載する免疫学的測定方法であって、前記免疫学的測定方法が、酵素測定法、蛍光測定法、化学発光法、放射能測定法、ラテックス法および散乱光法から選ばれるサンドイッチ測定法であることを特徴とする免疫学的測定方法。

20

【請求項15】

請求項7ないし14のいずれか1項に記載するイヌ検体免疫学的測定方法であって、前記アビジンに標識する物質が、酵素物質、蛍光物質、化学物質、生物発光物質またはラジオアイソトープであることを特徴とするイヌ検体免疫学的測定方法。

【請求項16】

請求項1ないし6のいずれか1項に記載の抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体および請求項7ないし15のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法を用いてイヌ心疾患またはイヌ心臓に寄生する感染症を検出する検出方法。

30

【請求項17】

請求項16に記載の検出方法であって、前記イヌ心疾患が僧帽弁閉鎖不全症もしくは心不全症であること、および前記感染症がイヌフィラリア症であることを特徴とする検査方法。

【請求項18】

少なくとも、支持体と、第1の抗体（イヌNT - proANP (31 ~ 67) 抗体 (2E3) ）と、第2の抗体（イヌNT - proANP (68 ~ 98) 抗体 (3D2) ）と、標識化物質と、からなることを特徴とする免疫学的測定用キット。

【請求項19】

請求項18に記載する免疫学的測定用キットであって、前記支持体が、96ウエルマイクロプレートまたはイムノクロマトグラフィーストリップであり、前記標識化物質が酵素または金属コロイドであることを特徴とする免疫学的測定用キット。

40

【請求項20】

請求項18または19に記載する免疫学的測定用キットであって、前記免疫学的測定用キットが、96ウエルマイクロプレートと、ビオチンと、アビジンと西洋わさび由来パーオキシダーゼ複合物と、色原性基質と、反応停止液と、からなることを特徴とする免疫学的測定用キット。

【請求項21】

請求項18または19に記載する免疫学的測定用キットであって、前記支持体がイムノクロマトグラフィーストリップからなり、該イムノクロマトグラフィーストリップのコンジ

50

ュゲートパッドには、金属コロイドで標識された標識化第1の抗体（イヌNT - pro ANP (31 ~ 67) 抗体 (2E3)）または標識化第2の抗体（イヌNT - pro ANP (68 ~ 98) 抗体 (3D2)）が含まれ、またテストラインには、コンジュゲートパッドに含まれた抗体とは異なる抗体、つまり第1の抗体または第2の抗体が固定化されていることを特徴とする免疫学的測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体（抗イヌNT - pro ANP 抗体）およびそれを用いた免疫学的測定方法に関するものである。さらに詳細には、この発明は、イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（イヌNT - pro ANP）のヒトN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（ヒトNT - pro ANP）のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を認識する抗体ならびにその抗体を用いたイヌNT - pro ANPを測定する免疫学的測定方法、およびその測定方法を用いたイヌ等の伴侶動物の心疾患ならびにフィラリア症を検査する検査方法、および免疫学的測定用キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、犬、猫等の伴侶動物においても、人間同様、食習慣や環境などの変化により生活習慣病が増加するにたがって心疾患も増加している。さらに、犬、猫等の伴侶動物の飼育環境が改善されたことにより、高齢まで生きる動物が増加するにつれて、心臓の疾患も急増しているのが実情である。人の心疾患と同様に、伴侶動物の心疾患についても、症状の早期発見と、症状に合った適切な治療が必要である。

【0003】

伴侶動物の心疾患も、病気の程度や種類などに応じてその治療法を決めるために、その心疾患の症状を精密に検査・診断する必要がある。しかし、伴侶動物血液についての検査は、ヒト血液についての臨床検査に対して使用されている試薬や手法を実質的にそのまま使用されているのが現状である。したがって、伴侶動物に適した伴侶動物専用の検査・診断法の開発が要望されている。

【0004】

心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）は、ヒトに対して、強力な利尿・ナトリウム利尿作用、血管拡張作用を有することから、高血圧症、浮腫性疾患、腎不全、心不全などの種々のヒト疾患への臨床応用が期待され、うっ血性心不全患者に対して心機能改善効果を奏することが報告された（非特許文献1）。また、ANPは、急性心不全症に対する第一選択薬としてすでに広く臨床応用されている（急性心不全治療ガイドライン2006年改訂版）。さらに、最近、ANPは、急性腎不全、心筋梗塞（再灌障害）についての臨床研究についての報告がなされている（非特許文献2、3）。

【0005】

ANPは、126個のアミノ酸からなるプロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（pro ANP）として心房筋細胞で生合成され、主として心房内顆粒に蓄積され、心房圧刺激に応じて、pro ANPのアミノ酸配列1 ~ 98（NT - pro ANP）とpro ANPのアミノ酸配列99 ~ 126（ANP）に分解されて血液中に分泌される。血中のANP濃度は、心不全や慢性腎不全のマーカーとして免疫学的測定法による診断にすでに応用されているが、NT - pro ANPは、一方では、例えば敗血症に対する有用なマーカーであると報告されているが（非特許文献4）、他方では、心不全にとってはリスクファクターとなるとも報告されている（非特許文献5）。また、うっ血性心不全症のイヌにおいても、ANPが増加すると報告されている（非特許文献6）。

【0006】

また、ヒトNT - pro ANP（1 ~ 98）はさらに血液循環中に3つのNT - pro A

NP (1 ~ 3 0)、NT - pro ANP (3 1 ~ 6 7) および NT - pro ANP (7 9 ~ 9 8) に分解され、これらはそれぞれ多くの疾患において血中で濃度が上昇し、それらの疾患の重要なマーカーであることも示されている (例えば、非特許文献 7 参照)。

【 0 0 0 7 】

一方、pro ANP 測定方法自体も公知である。特許文献 1 には、- ANP (pro ANP) の 1 ~ 2 5 番のアミノ酸配列からなる部分を認識するモノクローナル抗体を用いた - ANP (pro ANP) の免疫学的測定法が開示されている。

【 0 0 0 8 】

NT - pro ANP の異なる部位を認識する 2 種類のモノクローナル抗体を用いて、ヒト NT - pro ANP を測定するためのサンドイッチ免疫学的測定方法が報告されている (非特許文献 8、特許文献 2、3)。

10

【 0 0 0 9 】

非特許文献 8 には、NT - pro ANP の 1 ~ 3 0 番目のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体と NT - pro ANP の 7 9 ~ 9 8 番目のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体等を用いて、サンドイッチ法によりヒト NT - pro ANP を免疫学的に測定する方法が開示されている。

【 0 0 1 0 】

特許文献 2 には、試料と、NT - pro ANP の特定部位を認識する第 1 の抗体と、該 NT - pro ANP の特定部位とは異なる NT - pro ANP 部位を認識する標識した第 2 の抗体とをインキュベートする工程、および生成した抗原抗体複合体を検出する工程を包含するヒト NT - pro ANP を測定する方法が記載されている。好ましい実施態様によれば、上記第 1 または第 2 の抗体は、NT - pro ANP の 4 3 ~ 6 6 番のアミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

20

【 0 0 1 1 】

特許文献 3 には、NT - pro ANP の 1 ~ 3 0 番のアミノ酸配列を認識する第 1 モノクローナル抗体および NT - pro ANP の 6 5 ~ 8 4 番のアミノ酸配列を認識する標識第 2 モノクローナル抗体を用いたヒト NT - pro ANP の免疫学的測定法が開示されている。

【 0 0 1 2 】

特許文献 4 には、NT - pro ANP の中間領域 (NT - pro ANP のアミノ酸配列 5 3 ~ 8 3 番に広がる領域) の部分的な配列に特異的に結合する 2 つの抗体を用いた、心臓病および敗血症の診断における、部分的な NT - pro ANP を同定するための改善されたサンドイッチイムノアッセイが開示されている。

30

【 0 0 1 3 】

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は、イヌ等の動物に対しても、心不全の診断に有用であり、かつ、イヌの心不全を予知する強力なツールとなる可能性が示されたと記載されている (非特許文献 9)。この文献には、ある研究では、イヌ NT - pro ANP は前臨床の心臓疾患のマーカーとして有用であると評価されているが、その評価はまだ異論があると報告されている。また、この文献での評価にしても、ヒト NT - pro ANP の 1 ~ 9 8 番のアミノ酸配列に対する抗体を用いる市販されているキットを用いて行われたものであって、イヌ NT - pro ANP に特異的な抗体を用いた評価ではない。

40

【 0 0 1 4 】

また、非特許文献 1 0 には、ヒト NT - pro ANP のアミノ酸残基 8 0 ~ 9 6 の抗血清を用いた R I A キットを使用して、心不全のイヌに対する NT - pro ANP の測定結果が開示されている。さらに、非特許文献 1 1 には、同様に、ヒト NT - pro ANP のアミノ酸残基 7 9 ~ 9 8 に対する抗体を使用した NT - pro ANP のイヌ僧帽弁閉鎖不全症に対する R I A の測定結果を開示している。

【 0 0 1 5 】

しかし、これらはいずれもヒト NT - pro ANP (1 ~ 9 8) に対する抗体を用いた測定系であり、イヌ NT - pro ANP に特異的な抗体を用いた測定系ではないので、イヌ

50

などの伴侶動物に対する正確な結果とは言えない。そこで、イヌなどの伴侶動物の NT - pro ANP の特異的な抗体を用いた測定系の開発が要望されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】特許第2561513号公報

【特許文献2】特開平8-226919号公報

【特許文献3】特開2005-114480号公報

【特許文献4】公表2006-523298号公報

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Saito, Y., et al., Circulation 1987; 76: 1362-74

【非特許文献2】Kitakaze, M., et al., Lancet 2007; 370: 1483-93

【非特許文献3】Kasama, S., et al., Eur. Heart J. 2008; 29: 1485-94

【非特許文献4】Hoffmann, U., et al., Clin Lab. 2005; 51 (7- 8):373-9

【非特許文献5】Berger R, et al., European Journal of Clinical Investigation, 2005, 35 (1), 24-31

【非特許文献6】Asano, K., et al., Journal of Veterinary Medical Science, 1999, 61, 523-529

【非特許文献7】Daggubati et al., Cardiovascular Research (1997), 246-255

【非特許文献8】Upsala Journal of Medical Science 102, 99 -108 (1997)

【非特許文献9】Tarnow, I., et al., The Veterinary Journal 180 (2009) 195-201

【非特許文献10】Prosek, R., et al., J. Vet. Intern. Med. 2007; 21: 238-242

【非特許文献11】Haggstrom, J., et al., Journal of Veterinary Cardiology, Vol. 2, No. 1, May 2000, 7-16

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

そこで、かかる要望を達成すべく鋭意検討した結果、本発明者らは、抗イヌ NT - pro ANP 特異抗体を作製するために、イヌ NT - pro ANP のアミノ酸配列のヒト NT - pro ANP のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列部分を認識できる抗体を作製することに成功し、かつ、この抗体を用いたイヌ NT - pro ANP の免疫学的測定方法を完成した。

【0019】

したがって、この発明の主な目的は、イヌ NT - pro ANP のヒト NT - pro ANP のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列部位を認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体からなる抗イヌ NT - pro ANP 抗体を提供することである。

【0020】

この発明の好ましい態様は、イヌ NT - pro ANP のアミノ酸配列のヒト NT - pro ANP のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列部分、例えば、イヌ NT - pro ANP のアミノ酸配列31~67番およびイヌ NT - pro ANP のアミノ酸配列68~98番の1部または全部をそれぞれ認識できる2種類の抗体を提供することである。

【0021】

この発明の別の好ましい態様は、上記抗イヌ NT - pro ANP 抗体を産生するハイブリドーマ株を提供することである。

【0022】

この発明の別の目的は、上記抗イヌ NT - pro ANP 抗体を用いて、イヌなどの伴侶動物の NT - pro ANP を測定する免疫学的測定方法を提供することである。

【0023】

この発明の好ましい態様は、イヌ NT - pro ANP のアミノ酸配列のヒト NT - pro

10

20

30

40

50

ANPのアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列部分、例えば、イヌNT - proANPのアミノ酸配列31～67番およびイヌNT - proANPのアミノ酸配列68～98番の1部または全部をそれぞれ認識できる2種類の抗体を用いたイヌNT - proANPを測定する免疫学的測定方法を提供することである。

【0024】

この発明の好ましい態様は、免疫学的測定方法が、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、凝集法、発光免疫測定法など、より好ましくは、ELISA法、イムノクロマトグラフィー法などの免疫学的測定方法を提供することである。

【0025】

この発明の更に別の目的は、免疫学的測定方法を実施するための免疫学的測定用キットを提供することである。また、この発明の好ましい態様は、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、凝集法、発光免疫測定法など、より好ましくは、ELISA法、イムノクロマトグラフィー法などの免疫測定法を実施するための免疫学的測定用キットを提供することである。

10

【0026】

この発明のさらに別の目的は、上記抗イヌNT - proANP抗体および上記免疫学的測定方法を用いてイヌNT - proANPを測定してイヌなどの伴侶動物の僧帽弁閉鎖不全症や心不全症などの心疾患を検出する心疾患検出方法を提供することである。

【0027】

この発明のさらに別の目的は、上記抗イヌNT - proANP抗体および上記免疫学的測定方法を用いてイヌNT - proANPを測定して、フィラリア症などの心臓に寄生する感染症、特にイヌフィラリア症などの伴侶動物感染症を検出する感染症検出方法を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0028】

上記目的を達成するために、この発明は、その主な態様として、イヌNT - proANPのヒトNT - proANPのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列部位を認識する抗体からなる抗イヌNT - proANP抗体を提供する。

【0029】

この発明は、その好ましい態様として、イヌNT - proANPの31～67番のアミノ酸配列の1部もしくは全部を認識する抗イヌNT - proANP(31～67)抗体および/またはイヌNT - proANPの68～98番のアミノ酸配列の1部もしくは全部を認識する抗イヌNT - proANP(68～98)抗体からなる抗イヌNT - proANP抗体を提供する。

30

【0030】

この発明は、その好ましい態様として、抗イヌNT - proANP(31～67)抗体がイヌNT - proANPのアミノ酸配列32～40番を認識する抗体、または抗イヌNT - proANP(68～98)抗体がイヌNT - proANPのアミノ酸配列74～82番を認識する抗体を提供する。

【0031】

この発明のさらに好ましい態様は、抗イヌNT - proANP(31～67)抗体がイヌNT - proANPのアミノ酸配列32～40番を認識するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、または抗イヌNT - proANP(68～98)抗体がイヌNT - proANPのアミノ酸配列74～82番を認識するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を提供する。

40

【0032】

この発明は、そのさらに好ましい態様として、イヌNT - proANPのアミノ酸配列32～40番を認識するモノクローナル抗体がクローン番号2E3(受託番号NITE P - 1318)、またイヌNT - proANPのアミノ酸配列74～82番を認識するモノクローナル抗体がクローン番号3D2(受託番号NITE P - 1319)であることを

50

提供する。

【0033】

この発明の別の態様は、上記抗イヌNT-proANP抗体を用いて、イヌなどの伴侶動物のイヌNT-proANPを測定する免疫学的測定方法を提供する。

【0034】

この発明は、その好ましい態様として、上記抗イヌNT-proANP抗体が、イヌNT-proANPのアミノ酸配列31~67番およびイヌNT-proANPのアミノ酸配列68~98番の1部もしくは全部をそれぞれ認識することからなる免疫学的測定方法を提供する。

【0035】

この発明は、その好ましい態様として、上記免疫学的測定方法が、放射能測定法、酵素測定法、発光測定法、凝集法などであることを特徴としている。また、この発明は、その好ましい態様として、免疫学的測定方法が、イムノクロマトグラフィー法、放射免疫測定法、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法などの酵素免疫測定法、ラテックス凝集法などの凝集法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法などの発光免疫測定法などであることを特徴としている。

【0036】

この発明は、さらに別の態様として、この発明の免疫学的測定方法を実施するための免疫学的測定用キットを提供する。また、この発明は、その好ましい態様として、イムノクロマトグラフィー法、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、凝集法、発光免疫測定法など、より好ましくは、イムノクロマトグラフィー法、ELISA法などの免疫測定法を実施するための免疫学的測定用キットを提供する。

【0037】

この発明は、その別の態様として、上記抗イヌNT-proANP抗体および上記免疫学的測定方法を用いてイヌNT-proANPを測定することにより、イヌなどの伴侶動物の心疾患、例えば僧帽弁閉鎖不全症、心不全症などの心疾患を検出する伴侶動物の心疾患検出方法を提供する。

【0038】

この発明のさらに別の態様は、上記抗イヌNT-proANP抗体および上記免疫学的測定方法を用いてイヌNT-proANPを測定することにより、イヌなどの伴侶動物のフィラリア症などの心臓に寄生する感染症を検出する動物の感染症検出方法を提供する。

【発明の効果】

【0039】

上述したように、この発明は、イヌNT-proANPのヒトNT-proANPのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列部位を認識する抗体、好ましくは、イヌNT-proANPのアミノ酸配列の異なる部位(31~67番と68~98番)を認識する各抗体、ならびにそれらの抗体を用いたイヌNT-proANPを測定する免疫学的測定方法、およびその測定方法を用いたイヌ等の伴侶動物の心疾患やフィラリア症等の心臓に寄生する感染症などを検査する検査方法に関するものである。したがって、この発明に係る免疫学的測定方法では、イヌNT-proANPを特異的に測定することが可能であることから、従来のような抗ヒトNT-proANP抗体ではなく、抗イヌNT-proANP特異抗体とイヌNT-proANP標準品を用いてイヌなどの伴侶動物の心疾患や感染症などを特異的にかつ迅速に検出できるという効果を奏する。

【0040】

また、この発明において、免疫測定法として、特にイムノクロマトグラフィー法を用いた場合、その操作が極めて簡便で、比較的短時間で判定ができ、測定に特に高価な装置も必要とせず、現場に持ち運びができるなど、臨床に応用出来ることが大いに期待される。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】イヌNT-proANP標準曲線の例を示す図であって、標準曲線の測定範囲(

10

20

30

40

50

12.5 ~ 400 pg/ml)を示している。

【図2】検体希釈率の相関試験を示す図であって、イヌ心疾患に診断された53頭（ビーグル/キャバリア/チワワ/スピッツ/ゴールデンレトリバー/雑種）から血漿検体（EDTA-アプロチニン）で採血した検体を2.5倍希釈と5倍希釈した相関試験の結果を示している。

【図3】この発明に係るイムノクロマトグラフィー法に基づく免疫学的測定用キットの平面図を示す。

【図4】この発明に係るイムノクロマトグラフィー法に基づく免疫学的測定用キットの断面図を示す。

【図5】この発明に係るイムノクロマトグラフィー法に基づく免疫学的測定用キットを用いた測定結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0042】

この発明は、イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（イヌNT-proANP）を認識可能な抗イヌN末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド抗体（抗イヌNT-proANP抗体）ならびにその抗イヌNT-proANP抗体を用いたイヌNT-proANPを測定する免疫学的測定方法、およびその測定方法を用いたイヌ等の伴侶動物の心疾患やフィラリア症などの感染症を検査する検査方法に関するものである。

【0043】

この発明に係る抗イヌNT-proANP抗体は、イヌNT-proANPのヒトNT-proANPのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列部位を認識する抗体であって、例えば、イヌNT-proANP31~67番のアミノ酸配列の一部もしくは全部を認識する抗体（以下、「抗イヌNT-proANP（31~67）抗体」ともいう）およびイヌNT-proANP68~98番のアミノ酸配列の一部もしくは全部を認識する抗体（以下、「抗イヌNT-proANP（68~98）抗体」ともいう）である。

【0044】

具体的には、この発明に係る抗イヌNT-proANP（31~67）抗体は、イヌNT-proANP31~67番のアミノ酸配列の一部、例えばイヌNT-proANPのアミノ酸配列32~40番（配列番号2：AESPLQALSE）を認識するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり、かかるモノクローナル抗体が好ましい。この抗イヌNT-proANP（31~67）モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株は、2012年5月9日付けで、特許微生物寄託センターに受託番号NITE P-1318として寄託されている。

【0045】

また、この発明に係る抗イヌNT-proANP（68~98）抗体は、イヌNT-proANP68~98番のアミノ酸配列の一部、例えばイヌNT-proANPのアミノ酸配列74~82番（配列番号3：RSPWDSDDR）を認識するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり、かかるモノクローナル抗体が好ましい。この抗イヌNT-proANP（68~98）モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株は、2012年5月9日付けで、特許微生物寄託センターに受託番号NITE P-1319として寄託されている。

【0046】

この発明に係るイヌNT-proANPを認識する抗体はいずれも、当該技術分野では慣用されている公知の一般的手法によって調製することができる。

【0047】

この発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えばイヌNT-proANPのアミノ酸配列の特定部分のペプチドもしくはその誘導体、かかる特定部分ペプチドを有する合成ペプチドなどを使用することができる。ペプチドもしくはその誘導体は、例えばマウス、ラットなどの動物の組織もしくは細胞から慣用の方法により調製することができる。合成ペプチドは、ペプチドシンセサイザー等を使用して公知の方法で化学的に合成

10

20

30

40

50

、あるいは上記ペプチドやその誘導体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても調製することができる。

【0048】

上記のようにして得られた抗原は、可溶化したものを直接免疫することができるが、適当な担体に結合させた複合体として免疫することもできる。担体としては天然高分子担体や合成高分子担体が使用でき、天然高分子担体としては、例えばウシなどの哺乳動物の血清アルブミン、チログロブリン、ヘモグロビン、ヘモシアニンなどを使用、また合成高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類などの重合体もしくは共重合体などのラテックス等を使用することができる。抗原を担体に結合するには、種々の縮合体を用いるのがよい。縮合体としては、例えば、ジアゾニウム化合物、ジアルデヒド化合物、ジマレイミド化合物、マレイミド活性エステル化合物、カルボジイミド化合物などを用いるのがよい。

10

【0049】

上記のようにして得られた抗原を免疫用の免疫原として、マウス、ラット、ウサギなどの動物に対して、例えば腹腔内、静脈、皮下などに投与して抗体を作製することができる。免疫原は抗体産生能を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントなどの適切なアジュバントに乳濁し、得られた乳濁液を動物に投与して免疫してもよい。免疫は、通常2～6週毎に1回、計2～10回程度追加免疫を行うのがよい。

【0050】

この発明の抗体を作製するに際しては、抗原を免疫したマウスなどの動物から抗体価が認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓を採集し、含まれる抗体産生細胞（脾臓細胞）を、哺乳類由来、好ましくはマウス由来のミエローマ細胞と融合することにより、この発明の抗体を産生するハイブリドーマ株を調製することができる。脾臓細胞とミエローマ細胞との融合は、当該技術分野において常用されている方法に従ってポリエチレングリコールなどの融合促進剤を用いて行うことができる。融合により得られたハイブリドーマ株は、スクリーニングやクローニングなどにより所望のハイブリドーマ株を選択することができる。また得られた抗体は、例えば、免疫グロブリンの分離精製法、例えば、塩析法、アフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換カラム法、ゲルろ過法などにより分離精製することができる。

20

【0051】

この発明の抗体は、上記のハイブリドーマ株をマウスなどの動物の腹腔内などに投与し、その腹水などの体液から採集することによって作製することができる。得られた抗体は、当該技術分野において公知の方法により容易に精製することができる。

30

【0052】

この発明でいう免疫学的測定方法とは、強い親和性と良好な特異性を持つ抗体を結合試薬として利用した測定方法である。

この発明に係る免疫学的測定方法としては、例えば、イムノクロマトグラフィー法、放射免疫測定法、ELISA（Enzyme-linked immunosorbent assay）法などの酵素免疫測定法、ラテックス凝集法などの凝集法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法などの発光免疫測定法などが挙げられる。これら免疫学的測定方法のうち、この発明においては、この発明に係る抗体を使用することができる限りでは、特に限定されるものではないが、ELISA法やイムノクロマトグラフィー法などの免疫測定方法が好ましい。そこで、本発明においては、免疫学的測定法として、ELISA法ならびにイムノクロマトグラフィー法を例に挙げて説明するが、これらの免疫測定方法に限定されるものではないことは言うまでもない。

40

【0053】

この発明に係る免疫学的測定方法としては、例えば、直接法、間接法、競合法、非競合法、サンドイッチ法などの多くの変法が含まれるが、サンドイッチ法が好ましい。これらの免疫学的測定方法は、いずれも当該技術分野で慣用されている測定原理に従って行うことができる。

50

【 0 0 5 4 】

この発明の免疫学的測定法は、一般的には、抗体（一次抗体）を、96ウェルプレート、ポリスチレンビーズ等のビーズ、チューブ、ニトロセルロース等のメンブレンなどの支持体に固定し、抗原を含む血液、血清などの試料と共にインキュベートする工程、さらに酵素標識した別の抗体（二次抗体）を加えてインキュベートして酵素標識抗体抗原複合体（コンジュゲート）を生成する工程、および酵素標識抗体抗原複合体を検出して目的とする抗原を測定する工程から構成されている。これらの工程は、使用する抗体以外は、いずれも当該技術分野で慣用されている手法によって実施することができ、かつ、使用する試薬等もいずれも当該技術分野で慣用されている試薬等を使用することができる。

【 0 0 5 5 】

この発明の免疫学的測定方法において、上記第1の抗体としては、イヌNT - pro ANP 31 ~ 67番のアミノ酸配列を認識する抗イヌNT - pro ANP (31 ~ 67)抗体(2E3)並びに、イヌNT - pro ANP 68 ~ 98番目のアミノ酸配列を認識する抗イヌNT - pro ANP (68 ~ 98)抗体(3D2)のいずれも使用することができる。また、上記抗イヌNT - pro ANP (31 ~ 67)抗体も、上記抗イヌNT - pro ANP (68 ~ 98)抗体もいずれも、酵素物質、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、着色粒子などにより標識して第2の抗体として使用することができる。さらに、抗体と標識物との結合には、ビオチン - アビジン系の化合物を用いることもできる。

【 0 0 5 6 】

この発明において標識に使用できる酵素としては、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、 α -ガラクトシダーゼ(α -GAL)、アルカリホスファターゼ(ALP)などが挙げられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレセイン、フルオレサミン、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが挙げられ、発光物質としては、例えば、ルシフェリン、ルミノール、ルミノール誘導体などが挙げられる。また放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが挙げられる。さらに、着色粒子としては、例えば、ポリスチレン、スチレン - ブタジエン共重合体等の有機高分子のラテックス着色粒子、金コロイド、銀コロイドなどの金属コロイドや金属硫化物等の金属粒子などが挙げられる。

【 0 0 5 7 】

さらに具体的に、免疫学的測定方法のうち、代表的な酵素免疫測定法の1態様として、ELISA法を例に挙げて簡単に説明する。ただし、この発明は、下記態様に一切限定されるものではなく、下記の例はELISA法を具体的に説明するための1例示である。

【 0 0 5 8 】

ELISA法では、通常96ウエルマイクロプレートのウエルの表面に、抗体をコーティングまたは固相化し、この抗体を一次抗体（つまり、キャプチャー抗体）として、測定対象物質である抗原を捉まえるために利用します。このウエルに、測定対象物質としての抗原を含む溶液（標準液、または検体、測定試料）を添加し、一次抗体に抗原を結合させる。次に、抗原のキャプチャー抗体が認識するエピトープとは異なるエピトープを認識する抗体（酵素標識二次抗体という）を予め酵素で化学的に標識し、一次抗体抗原複合体に添加することにより、酵素標識二次抗体は、キャプチャー抗体と結合した抗原を認識し結合させる。その後、酵素に対する色原性基質溶液を添加して、酵素反応により基質が色素に変化させた後、反応停止液を添加して、酵素反応を停止させる。酵素反応停止後、この色素の呈色を比色法で測定することによってキャプチャー抗体に結合した抗原を色素としてその吸光度を測定して、その吸光度から測定試料中の抗原量を算出することができる。ELISA法は、詳述したように、抗体 - 抗原 - 抗体の形、すなわちサンドイッチの形で測定するのが好ましい。

【 0 0 5 9 】

上記態様において、酵素標識二次抗体としては、例えば、ビオチン標識二次抗体などを使用するのがよい。ただし、このように抗体に酵素を標識すると、抗体の結合能に立体障害などが生じる可能性があり、1分子の抗体に多くの酵素を結合するのが困難になることも

10

20

30

40

50

ある。かかる困難を克服するために、卵白中に含まれるアビジンに酵素を結合させたアビジン - 酵素複合物を、抗原と結合したビオチン標識二次抗体と反応させるのがよい。また、アビジン - 酵素複合物としては、例えば、アビジン - ペルオキシダーゼ複合物を使用するのがよく、ペルオキシダーゼとしては、例えば、西洋わさび由来のペルオキシダーゼ (HRP) を用いるのがよい。かかるアビジン - ペルオキシダーゼ複合物などのアビジン - 酵素複合物の酵素に対する色原性基質としては、例えば、TMB (3,3',5,5' - テトラメチルベンジジン) などが挙げられる。さらに、反応停止液としては、硫酸などの酸を使用するのがよい。

【0060】

次に、免疫学的測定方法のうち、別の代表的な免疫測定法であるイムノクロマトグラフィー法について、図3および図4を参照して簡単に説明する。図3は、この発明に係るイムノクロマトグラフィー法に基づく免疫学的測定用に使用する1実施態様であるイムノクロマトグラフィー用ストリップの平面図である。図4はその断面図である。

10

【0061】

図3および図4に示すように、イムノクロマトグラフィー用ストリップ(A)は、一般的には、展開方向の上流側には、表層にサンプルパッド(10)と、サンプルパッド(10)の下部にコンジュゲートパッド(20)とが配置され、コンジュゲートパッド(20)の下部に、メンブレン(30)が、メンブレン(30)の下流側上部に設けた吸収パッド(40)の下部に至るまで下流側に延伸して配置されている。さらに、メンブレン(30)の下部にストリップ(A)の全長を支持するパッキングシート(50)が配置された構成になっている。

20

【0062】

サンプルパッド(10)は、測定対象の試料を滴加する部分であって、例えば、セルロース繊維、ガラス繊維、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロンなどの均一の特性を有する材質であって、試料を毛細管作用で展開できる材質のもので作製したものがよい。測定対象の試料としては、例えば、血液、血清、血漿、尿等の動物の体液や排泄物を使用することができる。

【0063】

コンジュゲートパッド(20)は、標識化抗体を保持するパッドであり、例えば、セルロース繊維、ガラス繊維、不織布などの材質で作製することができる。コンジュゲートパッド(20)は、上記材質の繊維などに一定量の標識化抗体溶液を滴下又は浸し、乾燥して作製することができる。コンジュゲートパッド(20)では、サンプルパッド(10)から毛細管現象で移動してきた試料に含まれる測定対象物質(抗原)が、標識化抗体との抗原抗体反応などにより、標識化抗体 - 抗原コンジュゲートの形で捕捉され認識される。

30

【0064】

コンジュゲートパッド(20)において、標識化抗体を作成するための標識化物質としては、免疫凝集反応に用いられる着色粒子などが好ましく、例えば、金コロイド、銀コロイドなどの金属コロイドならびにその複合コロイドが好ましい。かかる金属コロイドの平均粒径は、約1~500nm、好ましくは約1~50nmが好ましい。着色粒子による抗体の標識化反応は、当該技術分野で慣用されている方法に従って行うことができる。

40

【0065】

メンブレン(30)は、クロマトグラフ担体としての役割を果たすことから、材質としては多孔性担体が好ましく、例えば、ニトロセルロース膜、セルロース膜、アセチルセルロース膜、ナイロン膜、ガラス繊維、不織布などの材質でシート状に作製するのが好ましい。ただし、メンブレン(30)の素材は、サンプルパッド(10)で滴加した測定対象の試料が、コンジュゲートパッド(20)を経由して毛細管現象で展開移動できる材質であれば、特に限定することなしに用いることができる。

【0066】

メンブレン(30)には、展開方向の下流側に検査対象物質の有無(陽性または陰性)を判定するゾーンとしてテストライン(32)が設けられ、コンジュゲートパッド(20)

50

に保持された標識化抗体とは異なる抗体が固定化されていて、その標識化抗体を捕捉できるように構成されている。テストライン(32)に固定化される抗体は、コンジュゲートパッド(20)に保持された標識化抗体が第1の抗体であれば、第2の抗体が固定化され、逆に、コンジュゲートパッド(20)に保持された標識化抗体が第2の抗体であれば、第1の抗体が固定化される。

【0067】

メンブレン(30)のテストライン(32)では、固定化された抗体が、コンジュゲートパッド(20)で捕捉された標識化抗体-抗原複合体と抗原抗体反応により、標識化抗体-抗原-抗体複合体(サンドイッチの形)で捕捉され認識される。この結果、測定試料中に測定対象物質が含まれていると、標識化抗体-抗原-抗体複合体の形で捕捉され認識されることになり、その標識化抗体の標識化物質である着色粒子によって可視化できるようになっている。このように金属コロイドを用いることにより、測定対象の試料中に含まる抗原の有無を可視化できることで簡便な測定を可能になり、現場での測定に極めて有用である。

10

【0068】

また、メンブレン(30)には、コントロールライン(34)を、テストライン(32)の下流側に配設することができる。コントロールライン(34)には、標識抗体に対する抗体が固定化されていて、標識抗体が抗原抗体反応で捕捉され可視化される。テストライン(32)が陰性でも、コントロールライン(34)だけが着色粒子によって可視化されることになる。

20

【0069】

吸収パッド(40)は、添加された試料がクロマトグラフィーにより移動して吸収されるパッドであり、材質としては、ろ紙などの吸収性能が高い材料で作製するのがよい。また、パッキングシート(50)は、サンプルパッド(10)の下端から吸収パッド(40)までの下端まで延伸してストリップ(A)の全長を支持するように配置されていて、その材質は特に限定されるものではない。

【0070】

次に、イムノクロマトグラフィーストリップ(A)を用いた測定方法を簡単に説明する。サンプルパッド(10)に滴下された測定対象物質を含む試料は、展開移動してコンジュゲートパッド(20)に移動し、そこに風乾されている標識化抗体と抗原抗体反応により複合体を形成する。試料を含む複合体は、メンブレン(30)をさらに展開移動して、テストライン(32)に至り、テストライン(32)に固定化されている固相化抗体と抗原抗体反応により結合して、標識化抗体-抗原-抗体複合体(サンドイッチの形)で捕捉され、金属コロイドなどの標識化物質によって可視化され認識される。したがって、測定試料中に測定物質が含まれている場合には、陽性の判定が下されることになる。反対に、テストライン(32)が陰性であれば、コントロールライン(34)だけが着色粒子によって可視化されることになる。試料はさらに展開移動して吸収パッド(40)で吸収される。

30

【0071】

この発明に係る免疫学的測定用キットは、少なくとも、96ウエルマイクロプレートやイムノクロマトグラフィー用ストリップなどの支持体と、第1の抗体(抗イヌNT-proANP(31~67)抗体(2E3))と、第2の抗体(抗イヌNT-proANP(68~98)抗体(3D2))と、酵素や金属コロイドなどの標識化物質と、から構成するのがよい。

40

【0072】

この発明の免疫学的測定用キットをELISA法キットとして使用する場合は、支持体として96ウエルマイクロプレート、標識化物質としてHRPなどを使用する他、ビオチンと、アビジンとHRP等の酵素複合物と、TMB等の色原性基質と、硫酸等の酸などの反応停止液と、から構成するのがよい。

【0073】

50

この発明の免疫学的測定用キットをイムノクロマトグラフィー法として使用する場合は、支持体としてイムノクロマトグラフィー用ストリップを用いるのがよい。イムノクロマトグラフィー用ストリップは、そのコンジュゲートパッドには、金属コロイドなどの標識化物質で標識された標識化抗体、例えば、標識化第1の抗体（抗イヌNT-proANP（31～67）抗体（2E3））または標識化第2の抗体（抗イヌNT-proANP（68～98）抗体（3D2））が風乾され、またそのメンブレンのテストラインには、コンジュゲートパッドに風乾された抗体とは異なる抗体、つまり第1の抗体または第2の抗体が固定化されているのが好ましい。また、このイムノクロマトグラフィー法には、イムノクロマトグラフィー用ストリップの他に、試料を展開する展開液も備えられているのが、現場での使用に際して便利である。

10

【0074】

以下、この発明を実施例により詳細に説明するが、下記実施例はこの発明を限定する意図で記載されるものではなく、この発明をより具体的に説明するために例示として記載されるものである。したがって、下記実施例により包含される態様は、この発明の範囲に包含されるものである。

【実施例1】

【0075】

[免疫原の作製]

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を作製するために、まず、免疫原を次のようにして作製した。

20

抗原としてイヌNT-proANPアミノ酸配列32～40番のN末端側にシステインを加えた合成ペプチド1（CAESPQALSE）とイヌNT-proANPアミノ酸配列74～82番のC末端側にシステインを加えた合成ペプチド2（RSPWDSSDR）を合成して作製した。次いで、得られた各合成ペプチドをキャリアー蛋白質（KLH：keyhole limpet hemocyanin）にImjectマレイミド活性化KLHキット（Pierce Cat#77606）を用いて結合した。つまり、Imjectマレイミド活性化mcKLH試薬に精製水を加え10mg/mlとして、マレイミド活性化mcKLH6mg/mlに、キットの緩衝液で3.0mlに溶解した合成ペプチド3.0mgを加えて、25℃で2時間反応させた後、生理食塩水に対して4℃で2晩透析し、各7mgの合成ペプチド-KLH複合体を得、これを免疫原とした。

30

【0076】

なお、イヌNT-proANPの全アミノ酸配列（98アミノ酸）は下記の通りである。

[配列番号1]

NPVYGSVSNA DLLDFKNLLD RLEDKMPLED EAESPQALSE QNAEAGAALS PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG ALGRSPWDSS DRSALLKSKL RALLAAPR

分子量はアミノ酸組成より10468。

【0077】

また、イヌNT-proANP測定系の標準品であるイヌNT-proANP合成ペプチド（98アミノ酸）は下記の通りである。

NPVYGSVSNA DLLDFKNLLD RLEDKMPLED EAESPQALSE QNAEAGAALS PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG ALGRSPWDSS DRSALLKSKL RALLAAPR

40

【0078】

参考までに、ヒトNT-proANPアミノ酸配列32～40番はVVPPQVLSEであり、またヒトNT-proANPアミノ酸配列74～82番はRGPWDSSDRである。

【0079】

上記のようにして作成した2種類の免疫原を同様な方法で免疫した。BALB/cマウス（日本エスエルシー株式会社製）に、免疫原として1匹あたり100μgの上記合成ペプチド-KLH複合体を腹腔内投与して免疫した。初回免疫後、追加免疫を2週間隔で3回行った。初回および2回目の免疫では、フロイント完全アジュバントと共に投与した。

50

【0080】

[モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株の作製]

2種類のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株は同様な方法で作製した。つまり、免疫したマウスから最終免疫後3日目に摘出した脾臓細胞(1.1×10⁸個)と、マウスミエローマ細胞(P3-X63-Ag8.653;DSファーマバイオメディカル(株)製)2.1×10⁷個)を、50%のポリエチレングリコール4000(Merck社製)を用いて融合した。融合により得られたハイブリドーマ株を、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地で選択した。細胞融合後10日目に特異抗体産生ハイブリドーマ株のスクリーニングを行った。スクリーニングはELISA法で行った。

【0081】

ELISA法は次のようにして行った。96ウエルプレート(Nunc社製)の各ウェルに、10μg/mlの合成ペプチド1(CAES PQALSE)または合成ペプチド2(RSPWDS SDR C)を含むPBS(0.15MのNaClを含むリン酸緩衝液(pH7.4))100μl加えて、4℃で1晩固定した。次に、このウェルを25%のブロックエース(DSファーマバイオメディカル(株)製)を含む溶液で1回洗浄した後、この溶液を200μl添加してブロッキングを行った。その後、各ウェルを0.05%のTween20を含むPBSで3回洗浄した後、ハイブリドーマ株の培養上清を100μl加えて室温で2時間反応させ、ウェルを3回洗浄した。続いて、1μg/mlのHRP標識抗マウスIgGを含むPBSを100μl加え、室温で2時間反応させた。このウェルを3回洗浄後、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)(Dako社製)を100μl加えて室温で20分間の酵素反応を行い、1M硫酸溶液を100μl加えて反応を停止した。その後、各ウェルについて、プレートリーダー(Tecan社製)で主波長450nm、副波長620nmの吸光度を測定した。

【0082】

さらに、特異抗体の産生が陽性を示したウェル中のハイブリドーマ株を、限界希釈法により3回クローニングして、上記合成ペプチド1および合成ペプチド2をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株1および2を得た。この得られたハイブリドーマ株1および2の培養上清を、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(Mouse monoclonal antibody isotyping Test kit, Serotec社)を用いて、ハイブリドーマ株1および2が産生する抗体のサブクラスをそれぞれ決定した。その結果、新たに得られたモノクローナル抗体は次の通りであった。

ハイブリドーマ株1のクローン番号:2E3、アイソタイプ:IgG1()

ハイブリドーマ株2のクローン番号:3D2、アイソタイプ:IgG1()

【0083】

これらのモノクローナル抗体2E3と3D2の、各ペプチドとの反応性を上記ELISA法により確認した結果、モノクローナル抗体2E3は合成ペプチド1と反応するが、合成ペプチド2とは反応しないことが、また逆に、モノクローナル抗体3D2は合成ペプチド2と反応するが、合成ペプチド1とは反応しないことが確認された。このように、2E3抗体は合成ペプチド1を認識し、3D2抗体は合成ペプチド2に含まれる部分を認識することより、2つの抗体が両ペプチドを含む物質(イヌNT-proANP)の異なる部分を認識していることが確認された。

【0084】

モノクローナル抗体1を産生するハイブリドーマ株(クローン番号:2E3)は、2012年5月9日付けで、特許微生物寄託センターに受託番号NITE P-1318として寄託されている。また、モノクローナル抗体2を産生するハイブリドーマ株(クローン番号:3D2)は、2012年5月9日付けで、特許微生物寄託センターに受託番号NITE P-1319として寄託されている。

【実施例2】

【0085】

[免疫学的測定手順]

10

20

30

40

50

96 ウエルプレートの各ウエルに抗イヌNT-proANP(31~67)抗体(クローン番号:2E3)を常法に従って固相化した後、洗浄液300 μ l/ウエルで3回洗浄した。次に、希釈検体(血漿10 μ lを5倍希釈した検体)または標準溶液(安定剤を含むイヌNT-proANP合成ペプチド)を50 μ l/ウエル添加した後、プレートを室温、800rpmで10秒間3回攪拌し、2時間静置し、洗浄液300 μ l/ウエルで3回洗浄した。洗浄後、各ウエルに、ビオチン標識抗イヌNT-proANP(68~98)抗体(クローン番号:3D2)を50 μ l/ウエルずつ添加し、室温、800rpmで10秒間3回攪拌し、2時間静置した。静置後、洗浄液300 μ l/ウエルで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を50 μ l/ウエル添加し、室温、800rpmで10秒間3回攪拌し、30分間静置した。静置後、TMB(3、

10

【実施例3】

【0086】

実施例2に記載した免疫学的測定手順に従って、健常犬および僧帽弁閉鎖不全症犬から採取した検体についてイヌNT-proANPを測定した結果を表1および表2にそれぞれ示す。本実施例では、ブリーダー2施設の9~12ヶ月齢のビーグル犬からEDTA-2Na(最終濃度1.0~1.5mg/ml)とアプロチニン(最終濃度100~500KIU/ml、KIU:Kallikrein Inhibitor unit)を用いた採血条件で採血した検体を健常犬の検体として用いた。また、本実施例では、獣医病院Aで僧帽弁閉鎖不全症犬(MR)に診断された4~13歳の犬種(キャバリア、チワワ、シーズ、スピッツ、ビーグル、ヨーキー)からEDTA-2Na(最終濃度1.0~1.5mg/ml)とアプロチニン(最終濃度100~500KIU/ml)を用いた採血条件で採血した検体を僧帽弁閉鎖不全症犬(MR)の検体として用いた。

20

【0087】

【表 1】

健常犬	イヌNT-proANP測定値 (pg/ml)
1	55.5
2	73.2
3	46.6
4	43.6
5	95.5
6	66.8
7	50.3
8	55.3
9	87
10	107
11	127
12	33.4
13	83.7
平均	71.14615
SD	27.60865
SE	7.657262

10

20

【0088】

30

【表 2】

MR	イヌNT-proANP測定値 (pg/ml)
MR 1	447
MR 2	575
MR 3	531
MR 4	370
MR 5	565
MR 6	588
MR 7	793
MR 8	468
MR 9	544
MR 10	698
MR 11	391
MR 12	497
MR 13	459
MR 14	614
MR 15	719
MR 16	556
平均	551
SD	116.1685
SE	29.04213

10

20

30

【0089】

上記測定結果から、僧帽弁閉鎖不全症犬 (MR) のイヌNT-proANP値は、t検定により $p < 0.01$ で健常犬NT-proANP値と有意である。

【実施例4】

【0090】

実施例2に記載した免疫学的測定手順に従って、獣医病院Aでフィラリア症犬から採取した検体についてイヌNT-proANPを測定した結果を表3に示す。本実施例では、獣医病院Aでフィラリア症に診断された8~14歳の犬種 (スピッツ、ラブラドル、雑種、ゴールドンレトリバー) から実施例3の採血条件で採血した検体をフィラリア症犬 (HWD) の検体として用いた。

40

【0091】

【表 3】

HWD	イヌNT-proANP測定値 (pg/ml)
HWD 1	1190
HWD 2	745
HWD 3	421
HWD 4	657
HWD 5	617
HWD 6	637
平均	711
SD	257.6528
SE	105

10

20

【0092】

上記測定結果から、フィラリア症犬（HWD）のイヌNT-proANP値は、t検定により $p < 0.01$ で健常犬NT-proANP値と有意である。この測定結果は、フィラリア症などの心臓に寄生する感染症自体の罹患の可否の診断にも有用であることを示している。

【実施例 5】

【0093】

International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC 1992) によ

るイヌ心疾患の程度の分類法により獣医病院BでISACHC分類 1b、2に診断された心疾患犬から実施例3と同様の採取条件で採血した検体を実施例2に記載した免疫学的測定手順に従ってイヌNT-proANPを測定した結果を表4に示す。

30

【0094】

【表 4】

ISACHC分類	イヌNT-proANP測定値 (pg/ml)
ISACHC 1b	165
ISACHC 1b	234
ISACHC 1b	307
ISACHC 2	561
ISACHC 2	376
ISACHC 2	824
ISACHC 2	342
ISACHC 2	390
ISACHC 2	514
ISACHC 2	698
ISACHC 2	687
平均	463.45
SD	210.01
SE	63.32

10

20

【0095】

(測定結果)

表2で示した僧帽弁閉鎖不全症犬(MR)のイヌNT-proANP値と、表3で示したフィラリア症犬(HWD)のイヌNT-proANP値を合わせた心疾患犬測定結果の合計の平均値は595 pg/ml、SD値は175 pg/ml、SE値は37 pg/mlであった。

30

さらに、表2で示した僧帽弁閉鎖不全症犬(MR)、表3で示したフィラリア症犬(HWD)および表4で示した心疾患クラス別(ISACHC分類1b、2)測定結果を合わせた全心疾患検体測定結果の合計の平均値は551 pg/ml、SD値は195 pg/ml、SE値は34 pg/mlであった。

この結果から、健常犬のイヌNT-proANP測定値の2SD値(55.2 pg/ml) + 平均値(71.1 pg/ml)を健常犬範囲(126.3 pg/ml)とすると、この発明に係るイヌNT-proANPの免疫学的測定方法は、イヌの健康診断(僧房弁閉鎖不全症ならびに心臓に寄生する感染症)として有用である。

40

【実施例6】

【0096】

本実施例では、市販品[ヒトNT-proANP(1-98)ELISA KIT、商品名「proANP(1-98)」BIO MEDICA製]を用いて、イヌの検体を調べた結果を示す。

実施例3に記載した採血条件に従って、健常犬および心疾患犬から採取した検体について実施例2に記載した免疫学的測定手順に従って測定した結果と市販品による測定した結果を表5にそれぞれ示す。

【0097】

【表5】

	検体の凍結融解数	測定方法					
		イヌ NT-proANP ELISA KIT (本発明)			ヒト proANP (1-98) (BIO MEDICA 社製)		
		平均 (pg/ml)	SD (pg/ml)	CV (%)	平均 (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
健全犬	1回	77.6	13.6	17.6	N.D		
	2回	77.5	13.2	17.1	N.D		
心疾患犬	1回	208.7	206.0	98.7	N.D* (11/12)		
	2回	198.3	204.0	102.9	N.D* (11/12)		

10

20

【0098】

表中、N.Dは、検出限界以下(6.59 ng/ml以下 = 0.63 nmol/L以下)を意味する。

*は、12検体中1検体測定を意味する。なお、凍結融解1回時は1.01 nmol/L、凍結融解2回時は0.971 nmol/Lであった。

【0099】

本実施例では、ブリーダー1施設の9~12ヶ月齢雄のビーグル犬から採血した検体を健全犬の検体として、また、獣医病院Aで心疾患(僧房弁閉鎖不全症:11個体、僧房弁閉鎖不全症以外の心疾患:1個体)と診断された7~15歳の犬種(ミニチュアダックスフント、雑種、ヨーキー、シーズー、キャバリア、ヨークシャーテリア、マルチーズ、ウエルシュコーギー、スピッツ)から採血した検体を心疾患犬の検体として用いた。

30

【0100】

本実施例では、イヌ NT-proANP ELISA KIT(本発明)については、実施例2の免疫学的測定方法に従って測定した。測定範囲は、12.5~400 pg/ml = 1.19~38.2 pmol/Lであった。

一方、市販品の測定範囲は、0.63~10 nmol/L = 6.59~104.7 ng/mlであった(イヌ NT-proANPの分子量は10467で計算)。また、抗体としては羊由来ポリクローナル抗体、標準品としてはヒト proANP(1-98)=ヒト NT-proANP(1-98)合成ペプチドを使用して、ポリクローナル抗体とポリクローナル抗体のサンドイッチ法により測定した。なお、特異性は、ヒト proANP(1~30) < 1%、ヒト proANP(31~67) < 1%、ヒト proANP(79~98) < 1%、ANP < 1%であった。また、ヒト検体の中央値は1.45 nmol/L(血漿参考値)であった。

40

【0101】

それぞれの検体は、前処理(保管条件による確認試験)を行った。凍結融解1回目は、入手した状態で-35℃に保管し、測定時に融解した。凍結融解2回目は、輸送条件による

50

凍結融解並びに再検査時の測定値による影響確認試験として行った。検体入手（-35凍結）室温融解（22.8）30分間 4 18時間保管 凍結（-35）融解測定。

【0102】

（測定結果）

この発明に係るイヌNT-proANP ELISA KITで測定した結果は、測定範囲が、12.5~400 pg/ml = 1.19~38.2 pmol/Lであった。

これに対して、市販品で測定した結果では、1検体のみ測定範囲に入り、定量値を得たが、その他の全ての検体は、検量線範囲外（低値）であった。キット標準品には、ヒトproANP（1-98）（ヒトNT-proANP（1-98））合成品が添付されており、その測定範囲は、0.63~10 nmol/L（ヒト血漿参考値：NT-proANPの中央値は1.45 nmol/L）であり、測定範囲（重量換算）は6.59~104.7 ng/mlであった。

市販品の測定範囲は、本発明のイヌNT-proANP ELISA KITの測定範囲よりも約260~520倍高濃度の測定範囲となっている。

【0103】

上記の試験結果から、本発明のイヌNT-proANP ELISA KITでの、イヌ検体を凍結融解2回までは再現性がある結果が得られた。文献（Inge T. The Veterinary Journal 180, 195-201, 2009）によれば、市販品のBio Medica社製によるコントロール犬測定平均値は246 pmol/L（2570 pg/ml）を示している。つまり、現在市販されているBio Medica社製の測定範囲（0.63~10 nmol/L）（ヒト検体中央値は1.45 nmol/L）では、健常イヌ検体は検出限界以下となる。上述の測定結果でも、同様に、健常イヌ検体は検出限界以下となっている。また、この発明のイヌNT-proANP ELISAにより健常犬検体（EDTA・アプロチニン含有）を測定した平均値（71 pg/ml）よりも約36倍の高濃度を示した。これらのことは、市販品のヒトproANP（1-98）を認識する羊由来ポリクローナル抗体がイヌNT-proANPに対する特異性・反応性に適合していないことが考えられる。そこで、イヌNT-proANP特異抗体と標準品によるイヌNT-proANP専用測定系が必要であることが示されている。

【実施例7】

【0104】

本実施例は、イムノクロマトグラフィー法による免疫学的測定方法に関するものである。

[材料の調製]

（金コロイド懸濁液）

金コロイド懸濁液は、金コロイド（株式会社ワインレッドケミカル）を10 mMトリス緩衝液（和光純薬工業社製、pH 8.6）で2倍に希釈して調製した。

（抗体溶液）

抗体溶液は、抗イヌNT-proANP（68~98）抗体（3D2）を、10 mMトリス緩衝液（pH 8.6）で0.2 mg/mlの濃度に調製して作製した。

（1% BSA-PEG混合液）

1% BSA-PEG混合液は、BSA 1 gを10 mMトリス緩衝液（pH 8.6）で溶解後、100 mlにメスアップして、1% BSA-10 mMトリス緩衝液（pH 8.6）を作製し、得られた1% BSA-10 mMトリス緩衝液（pH 8.6、4.5 ml）に1% PEG溶液（PEG 4000、和光純薬工業社製）0.5 mlを混和して作製した。

（標識金コロイド保存液）

5% D(+)トレハロース二水和物（和光純薬工業社製）5 gを精製水で溶解後、100 mlにメスアップして、5% D(+)トレハロース二水和物溶液を作製した。得られたトレハロース二水和物溶液にBSA 1 gを溶解後、100 mlにメスアップして、1% BSA-5% D(+)トレハロース二水和物溶液として作製して、標識金コロイド保存液とした。

10

20

30

40

50

(検体泳動用緩衝液)

カゼインナトリウム(和光純薬工業社製) 2.5 gを10 mMトリス 緩衝液(pH 8.6)で溶解後、100 mlにメスアップして、2.5%カゼインナトリウム - 10 mMトリス 緩衝液(pH 8.6)作製して、検体泳動用緩衝液とした。

【0105】

[標識反応]

上記で調製した金コロイド懸濁液100 µlと抗体(クローン#3D2)溶液100 µlを混合し、0.5 mlシリコナイズチューブに入れボルテックスミキサーで混合し、15分間静置した。この懸濁液に1%BSA-PEG混合液200 µlを加え、ボルテックスミキサーで混合し、15分間静置した。続いて、この懸濁液を4、8000 gで3分間遠心分離操作をした後、上清を取り除いた。さらに、この溶液に1%BSA-PEG混合液200 µlを加え、ボルテックスミキサーで分散し、15分間静置した後、4、8000 gで3分間遠心分離操作をして、上清を取り除いた。このように調製した溶液に標識金コロイド保存液100 µlを添加して分散した。なお、金コロイドおよび、他の試薬ならびに溶液は2~8 で保存した。

10

【0106】

[イムノクロマトグラフィーストリップの材料の調製]

(コンジュゲートパット)

コンジュゲートパットは、グラスファイバー(ミリポア社製、Glass Fiber Conjugate Pad)を用いて、その先端部に金コロイド標識抗体溶液50 µlを塗布した後、室温で乾燥して作製した。

20

(抗体固相化メンブレン)

抗体固相化メンブレンの材料としては、メンブレン(ミリポア社製、Hi Flow Plus HFB09004)を使用した。

(IgG希釈液)

カゼイン10 mgを10 mMリン酸緩衝液(和光純薬工業社製、pH 7.4)5 mlと混和して作製した。

(抗体固相化抗体)

抗イヌNT-proANP(31~67)抗体(2E3)をIgG希釈液100 µg/mlで希釈して調製した。

30

(ブロッキング液)

カゼイン 0.5 gを20 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で溶解後、100 mlにメスアップして、0.5%カゼイン・20 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)を作製してブロッキング液とした。

(スクロース液)

スクロース(和光純薬工業社製)3 gを0.3%コール酸溶液(和光純薬工業社製)で溶解後、100 mlにメスアップして、3%スクロース・0.3%コール酸溶液を作製してスクロース液とした。

(その他材料)

サンプルパットとしてはCellulose Fiber Sample Pad(ミリポア社製)、吸収パットとしてはAbsobet Pad(ミリポア社製)、パッキングシートとしてはニッポンエンジニアリング(株)の製品を使用した。

40

【0107】

[イムノクロマトグラフィーストリップの作製方法]

本実施例で使用したイムノクロマトグラフィーストリップは、上記で調製したイムノクロマトグラフィーストリップの材料を用いて作製した。まず、コンジュゲートパッド(20)に金コロイド標識抗イヌNT-proANP(68~98)抗体(3D2)50 µlを先端に塗布し、室温で乾燥させた。次に、メンブレン上のテストラインの位置に、固相化抗体として、抗イヌNT-proANP(31~67)抗体(2E3)(100 µg/ml)(6 µl)を1 mm幅で塗布後、室温で60分間乾燥した。次に、メンブレンをプロ

50

ツキング液に浸し、20分間穏やかに振とうした後、精製水に浸して5分間穏やかに振とうした(2回)。続いて、メンブレンをスクロース液に浸して10分間穏やかに振とう後、メンブレン表面の余分な水分を吸い取り、室温で乾燥することによって、イムノクロマトグラフィーメンブレン(30)を作製した。このイムノクロマトグラフィーメンブレンを用いて、図3および図4に示す模式図のようにイムノクロマトグラフィーストリップ(A)を作製した。

【0108】

[測定方法]

上記イムノクロマトグラフィーストリップ(A)のサンプルパット(10)にイヌNT-proANP(0.5 μ g/0.5ml、検体泳動用緩衝液)を添加した。これにより、コンジュゲートパッド(20)に風乾された金コロイド標識抗イヌNT-proANP(68~98)抗体(3D2)を、サンプルパット(10)から展開してきた検体泳動用緩衝液中のイヌNT-proANPと抗原抗体反応により結合させた。さらに、検体泳動用緩衝液は、イムノクロマトグラフィーメンブレン(30)中を展開してテストライン(32)に到達すると、そのテストラインに固定化された抗イヌNT-proANP(31~67)抗体(2E3)を、イヌNT-proANP-金コロイド標識抗イヌNT-proANP抗体複合体と抗原抗体反応により結合させたところ、テストラインにバンドが形成したのを確認した。

10

【0109】

[測定結果]

上記簡易テストの結果は、図5に示すように、イムノクロマトグラフィーストリップのテストラインにイヌNT-proANPのバンドを確認した。

20

【産業上の利用可能性】

【0110】

この発明に係る抗イヌNT-proANP抗体ならびにこの抗体を使用したイヌNT-proANPの免疫学的測定方法は、例えば、犬や猫などの伴侶動物の僧帽弁閉鎖不全症、心不全等の心疾患、ならびにフィラリア症等の感染症の検査法として有用である。

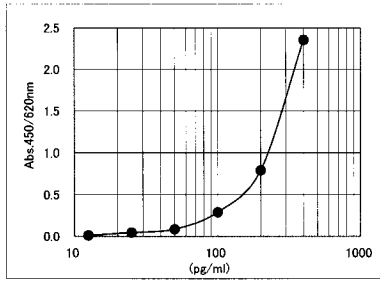
【符号の説明】

【0111】

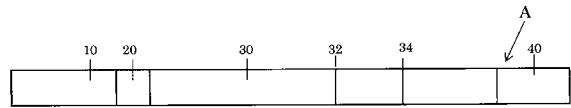
A イムノクロマトグラフィーストリップ
 10 サンプルパット
 20 コンジュゲートパッド
 30 イムノクロマトグラフィーメンブレン
 32 テストライン
 34 コントロールライン
 40 吸収パッド

30

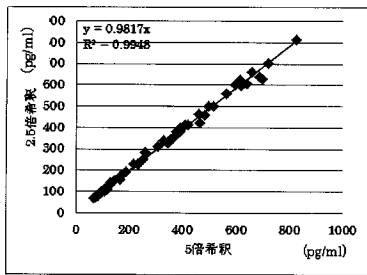
【 図 1 】



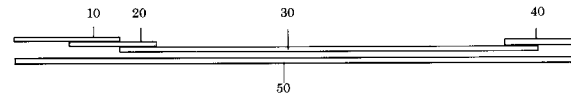
【 図 3 】



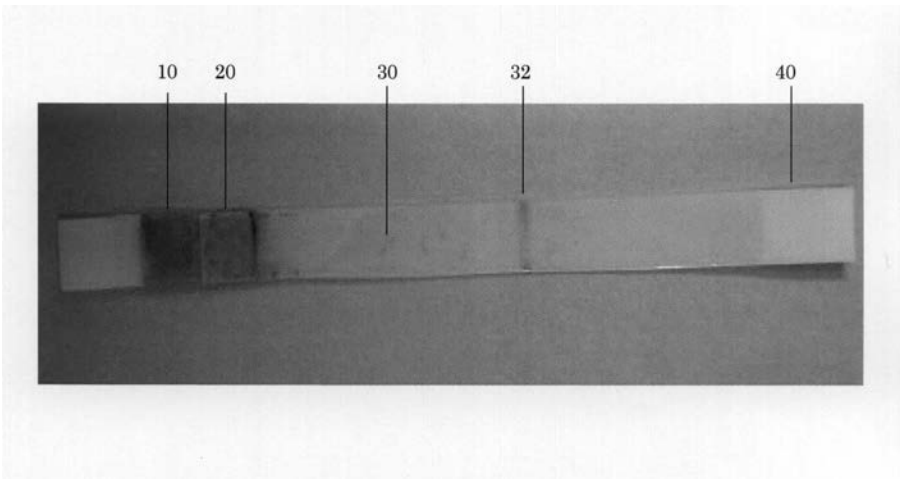
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

[2014210761000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 33/532 (2006.01)
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/532
G 0 1 N 33/53
C 1 2 Q 1/28
C 1 2 P 21/08

テーマコード(参考)

B
U

专利名称(译)	抗犬N末端房性心房利钠肽抗体，使用其的免疫学测定方法和免疫测定试剂盒		
公开(公告)号	JP2014210761A	公开(公告)日	2014-11-13
申请号	JP2013163755	申请日	2013-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	SHIBAYAGI		
申请(专利权)人(译)	株式会社シバヤギ		
[标]发明人	小島正章 蜂巢達之		
发明人	小島 正章 蜂巢 達之		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N33/532 C12Q1/28 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K16/26 G01N33/58 G01N2333/58 G01N2800/32		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N33/532.B G01N33/53.U C12Q1/28 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR03 4B063/QR48 4B063/QS02 4B063/QS03 4B063/QS16 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX07 4B063/QX10 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CA21 4B064/CA34 4B064/CA40 4B064/CB11 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2013079431 2013-04-05 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

根据本发明的抗犬N末端前心房利钠肽抗体(抗犬NT-proANP抗体)包含识别氨基酸序列31至67的部分或全部的抗犬NT-proANP的犬NT-proANP和抗犬NT-proANP的氨基酸序列68至98的部分或全部部分。抗犬科动物NT-proANP抗体可用于免疫学地测定涉及心脏疾病和犬等伴侣动物感染的犬NT-proANP,例如心力衰竭,二尖瓣关闭不全和丝虫病。使用免疫色谱法例如免疫层析条的免疫色谱测定对于测量犬NT-proANP是非常方便和简单的并且被用作手提和简单的装置。

健常犬	イヌNT-proANP測定値 (pg/ml)
1	55.5
2	73.2
3	46.6
4	43.6
5	95.5
6	66.8
7	50.3
8	55.3
9	87
10	107
11	127
12	33.4
13	83.7
平均	71.14615
SD	27.60865
SE	7.657262