(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5133066号
(P5133066)
(45)発行日　平成25年1月30日(2013.1.30)　(24)登録日　平成24年11月16日(2012.11.16)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 ZNAD
G01N 33/543 (2006.01)　G01N 33/543 575

請求項の数 16　(全 19 頁)

(21)出願番号　特願2007-552570 (P2007-552570)
(86)(22)出願日　平成18年1月25日 (2006.1.25)
(65)公表番号　特表2008-528984 (P2008-528984A)
(43)公表日　平成20年7月31日 (2008.7.31)
(86)国際出願番号　PCT/EP2006/000659
(87)国際公開番号　WO2006/079528
(87)国際公開日　平成18年8月3日 (2006.8.3)
審査請求日　平成21年1月7日 (2009.1.7)
(31)優先権主張番号　102005003687.2
(32)優先日　平成17年1月26日 (2005.1.26)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者　506352201
スフィンゴテック・ゲーエムベーハー
ドイツ・１６５５６・ボルグスドルフ・トゥルペンヴェーク・６
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100089037
弁理士　渡邊　隆
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(72)発明者　アンドレア・エルンスト
ドイツ・１６７６１・ヘンニヒスドルフ・ファルケンゼール・シュトラーセ・４
最終頁に続く

(54)【発明の名称】循環液へのニューロテンシンの放出を測定するためのイムノアッセイ

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳類の循環液へのニューロテンシンの放出を測定するための免疫検出アッセイ方法であって、哺乳類のプロニューロテンシンの部分の免疫反応性（PNT免疫反応性）をテスト哺乳類の全血サンプルまたは血清サンプルまたは血漿サンプルにおいて測定し、前記免疫反応性が、ニューロテンシンまたはニューロメジン免疫反応性ではなく、
完全なヒトのプレプロニューロテンシンのアミノ酸24から140の領域（配列番号6）中の、ヒトのプレプロニューロテンシン（配列番号1）のペプチド配列に対する免疫反応性である、PNT免疫反応性を決定する、
方法。
【請求項２】
完全なヒトのプレプロニューロテンシンのアミノ酸24から140の領域（配列番号6）の部分配列に特異的に結合する少なくとも二種の抗体を用いて、血清サンプルまたは血漿サンプルにおいて、前記のPNT免疫反応性を測定する、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
完全なヒトのプレプロニューロテンシンのアミノ酸24から140の領域（配列番号6）の異なる部分配列に特異的に結合する2つの異なる抗体を使用したサンドイッチアッセイにおいて、血清サンプルまたは血漿サンプルにおける前記のPNT免疫反応性を測定する、請求項2に記載の方法。
【請求項４】

前記の測定を、完全なヒトのプレプロニューロテンシン（配列番号1）のアミノ酸配列67から85（配列番号4）およびアミノ酸配列121から140（配列番号5）に特異的に結合する2つの抗体を用いたサンドイッチアッセイとして実施する、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５】

前記の抗体が、特異的なモノクローナルおよび/またはアフィニティ精製したポリクローナル抗体である、請求項2から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

前記の抗体の一方が、ヒトのプレプロニューロテンシン（配列番号1）のアミノ酸67から85（配列番号4）を含む合成ペプチド配列を含む抗原を用いた動物の免疫化によって得られ、前記の抗体の他方が、対応するアミノ酸121から140（配列番号5）を含む合成ペプチド配列を含む抗原を用いた免疫化によって得られる、請求項2から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

前記の抗体の一方が、固相に結合した形態で使用され、前記の抗体の他方が標識され、または選択的に標識可能である、請求項3から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

放射性同位体、または化学発光、生物発光、蛍光もしくは酵素標識を用いた標識を、前記抗体を標識するために使用する、請求項7に記載の方法。

【請求項９】

第一の前記抗体および第二の前記抗体の両方を液体の反応混合液中に分散させて使用し、

蛍光または化学発光の消光または増幅に基づく標識システムの一部である第1の標識コンポーネントが第一の前記抗体に結合し、

この標識システムの第2の標識コンポーネントが第二の前記抗体に結合し、検出すべきプロニューロテンシンに対する第一の前記抗体および第二の前記抗体の両方の抗体の結合後に、測定溶液において得られた第一の前記抗体、第二の前記抗体、および、プロニューロテンシンのＮ末端部分からなるサンドイッチ複合体の検出を可能とする測定可能なシグナルが生じる、

請求項3から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０】

前記の標識システムが、蛍光または化学発光色素と組み合わせた希土類クリプテートまたはキレートを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項１１】

イムノクロマトグラフィー測定装置の使用によるポイント-オブ-ケア方法として実施し、直接視覚的に検出可能なラベルを、標識のためのラベルとして使用する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】

患者の栄養状態および/または消化機能をモニターするために実施する、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】

前記の患者が、人工的に栄養が与えられている患者である、請求項12に記載の方法。

【請求項１４】

パーキンソン病、セリアック病、慢性炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）、腸癌または膵臓癌、膵炎、甲状腺疾患、嚢胞性線維症および肝炎から選択される疾患に罹患した患者のサンプルを使用した、検出またはモニターリングと関連して、前記の測定を実施する、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

-固相に固定化した形態の、ヒトのプロニューロテンシンの部分配列に対して特異的な第一抗体を含む第1の免疫試薬、

-可溶化し、標識化した形態の、ヒトのプロニューロテンシンのもう一つの部分配列に対して特異的な第二抗体を含む第2の免疫試薬、および
-特異的な第一および第二抗体についての結合部位を有する、規定量のペプチド調製物を含む標準キャリブレーション溶液
を少なくとも含む、請求項3から10および12から14のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。
【請求項１６】
前記の固相が、テストチューブの壁であり、第二抗体が、化学発光標識によって標識されている、請求項15に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般的な診断に適した、循環液へのペプチドニューロテンシンの放出を測定することを意図した方法に関する。
【０００２】
最初に、単純化の理由で、「診断」または「一般的な診断」のような用語は、本願明細書においては、概して、狭い意味での診断目的だけでなく、他の目的のために（例えば、診断目的の試験の開始前の、もしくは治療の開始前のテスト被検体の代謝状態の測定するため、または、病気もしくは治療手段の経過をモニターするための等の、比較的に長い期間にわたって患者をモニターして観察するため）、生体分子の測定を含むことを企図する全体的な意味において使用するということを注意すべきである。研究目的で、例えば、ニューロテンシン受容体アゴニストなどの医薬の開発または栄養のための製品の開発と相まった研究目的での測定は、また、論じられるより具体的な関係のために具体的な場合を除外することを除き、用語「診断」に含まれる。
【０００３】
本出願における発明のより具体的な言及が具体的には人の医薬に関するものであったとしても、獣医の薬または動物育種の分野での適用も、また、原則的には含まれることも事実である。それゆえ、大部分の言及の、本発明の非-ヒトの哺乳類への適用は、過剰な説明の必要なく当業者には明白である。ヒトの医薬についてより詳細に開示された方法の、獣医の薬への類似の適用が、例えば、対応するペプチド配列が多くの他の動物で知られていることから、追随する。獣医への適用に加えて、例えば、市販の動物の飼料状態および飼料利用をモニターすることとしての、哺乳類育種に関する適用も、考えられる。
【背景技術】
【０００４】
ニューロテンシンは、ヒトを含む様々な哺乳類の様々な組織および循環液に存在するトリデカペプチドであり、その一次構造は、全ての哺乳類で同一であると考えられている。ニューロテンシンは、配列表において配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する。
【０００５】
大部分の生物学的に活性なペプチドのように（5：カッコ内の数字の形態の参考文献は、添付の参考文献のリストに関する）、ニューロテンシンは、酵素によるプロセシングによって、プレプロニューロテンシン（シグナル配列を有する）またはプロニューロテンシン（PNT：シグナル配列を有さない）と称される前駆体分子から形成される。ニューロテンシン（NT）に加えて、哺乳類のプレプロニューロテンシン/プロニューロテンシンは、更なる生物学的に活性なペプチド、ヘキサペプチドニューロメジンN（NMN：配列番号3）を含む。ニューロテンシン前駆体ペプチドは、とりわけ、イヌ、ウシおよびげっ歯類の組織から単離され、最終的にはヒトの組織からも単離された。成熟ペプチドNTおよびNMNは、異なる哺乳類で同一のアミノ酸配列を有するのに対して、異なる哺乳類種の前駆体分子、すなわち、プレプロニューロテンシンまたはプロニューロテンシンは、アミノ酸の数が異なる。それ故、ラットまたはウシのプレプロニューロテンシンは、例えば、169のアミノ酸しか有さないのに対して、ヒトのプレプロニューロテンシンは、170のアミノ酸を有

する（17）。

【０００６】

ヒトのプレプロニューロテンシンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、ちょうどイヌ（9）、ラット（17）およびウシ（17；後記の米国特許の図2における異なるプレプロニューロテンシン配列の比較も参照）のプレプロニューロテンシンのように、ここ数年で知られるようになった（配列番号1；米国特許第6,274,720号参照）。プレプロニューロテンシン（配列番号1）のアミノ酸1から23は、いわゆるシグナル配列を表す。

【０００７】

プロニューロテンシンの発現は、最初に中枢神経系（CNS）、特定の腸内分泌細胞、いわゆる末端小腸におけるN細胞、および腸管を貫通する神経線維で生じる（13）。しかしながら、PNTおよびNTは、また、副腎組織および心臓組織でも検出された（24；23）。

【０００８】

プロニューロテンシンから形成された生物学的に活性なニューロテンシン（NT）は、様々な哺乳類組織で検出され、多くの異なる機能と関連して論じられてきた。それ故、ニューロテンシンは、脳における神経伝達物質として主要な働きをし、鎮痛作用および体温調節作用を有する（6；8）。更にその上、NTは、神経伝達物質アセチルコリンおよびグルタミン酸の放出を調節し（19；18）、下垂体ホルモンの分泌を刺激し（29）、そして、ドーパミン神経伝達に影響を及ぼし（18）、このことにより、パーキンソン病との関連性が示唆されている（28）。

【０００９】

消化管におけるニューロテンシンの分泌は、食物摂取によって刺激される（15）。食事後きわめて短い間に、顕著なNTの増加見られ、この増加は、何時間にわたって続く（14）。タンパク質およびグルコースと比較して、脂肪の摂取が、NT産生にもっとも強い影響をもたらすことを示すことができた（27）。ニューロテンシンは、明らかに、ある種の「満足因子」を表す、なぜならば、NTの分泌によって、食欲が抑制され、それゆえ、食物摂取が減少するからである（34）。脂肪過多の（太りすぎの）患者においては、NTの血漿濃度が、通常の体重のヒトと比較して減少しており、このことが、恐らく、増大した食欲および増大した食物摂取の原因である（35；4）。興味深いことに、喫煙者も、非喫煙者よりも、食事摂取後にNT濃度顕著に増大することが示された（26）。このことは、変化したニューロテンシン分泌が、増大した食欲の原因である可能性があり、そして、喫煙を止めた後に喫煙者だったヒトの頻度高く観察される体重増加の原因である可能性があることを指摘している。

【００１０】

消化管においては、ニューロテンシンは、インスリンおよびグルカゴンなどの膵臓ホルモンの分泌を刺激し、胃酸の分泌を阻害し、そして、大腸の運動性を刺激する（33）。NTは、膵臓、大腸および小腸組織などの消化管の増殖を促進し（12；36；10）、このことにより、NTが、これらの組織における腫瘍の形成に関与しているという仮説が引き起こしている。

【００１１】

同じ前駆体ペプチドから形成される第二のペプチドであるニューロメジンN（配列番号3）は、あまり良くは特徴づけされていない。恐らくは、ニューロメジンNは、ニューロテンシンと類似の作用を有している、なぜならば、これら2つは、アミノ酸配列において類似性を有しており、そして、同じ受容体に結合するからである（33）。

【００１２】

分子量によって画分を分離するためのHPLC手法と組み合わせた、NTまたはNMNの遊離のC末端に特異的であり、それ故、このような暴露したCOOH末端を有さずタンパク質的にプロセッシングを受けていないプロニューロテンシン形態を認識しない抗体を用いたラジオイムノアッセイを使用して、異なる組織抽出物を研究することによって、NTおよびNMNに加えて、不完全に切断された、いわゆるラージNTおよび/またはNMNペプチドも、組織依存的な方法で、PNTのプロセッシングにおいて形成されうることが見出された（7；13；25）。

【００１３】
多くの研究が、様々な病気におけるニューロテンシンの形成または発生に関するものであり、これらの研究は、最初に、組織サンプルおよび組織抽出物を用いて実施されている。患者の血液サンプルにおけるニューロテンシンの測定に基づく研究に関しては、例えば、パーキンソン病の患者の血漿におけるニューロテンシンの濃度が、増加することが見出されていることに注意すべきである（30）。穀物グルテンに非耐性であるセリアック病の患者においては、絶食状態のコントロールのヒトと比較して、増加したニューロテンシンの濃度の増加が、血漿中で検出された（2）。膵炎の患者におけるニューロテンシンの血漿濃度は、健康なコントロールのヒトと比較して、食事後に増加する（22）。甲状腺疾患の場合は、顕著に低いニューロテンシンの濃度が、中枢の（または二次的な）甲状腺機能低下の患者の血漿において見出された（31）。二次的な甲状腺機能低下は、甲状腺ホルモンの分泌を制御する下垂体の領域の障害によって引き起こされる。一方、顕著により高いニューロテンシン濃度（31）が、コントロールと比較して、末端の（または一次的な）甲状腺機能低下または甲状腺機能亢進の患者の血液で見いだされた。一次的な甲状腺機能低下は、甲状腺そのものの機能障害によって引き起こされる。嚢胞性線維症の患者は、健康なコントロールのヒトよりも、食事摂取前および食事摂取の両方で、血漿中でニューロテンシンの濃度が高い（16；1；21）。

【００１４】
血液中でのニューロテンシンの濃度は、常に、ラジオイムノアッセイタイプのアッセイを使用して測定されてきた。このアッセイにおいては、ニューロテンシンまたは遊離のニューロテンシンの特定の部分配列（例えばニューロテンシンの遊離のC末端）を特異的に結合する1つの抗体の結合部位についての、サンプル中の測定すべきニューロテンシンと添加した標識ニューロテンシンまたはニューロテンシンフラグメントとの競合を測定している。NMN濃度の測定は、類似の方法で実施されていた。

【００１５】
特定の病気の場合におけるニューロテンシンの発生についての前記の類似の結果により、食物摂取の機能としてニューロテンシンの形成を刺激する実証された可能性についての前記の類似の結果により、そしてまた、特定の病理状態で顕著に異なることが証明した前記の類似の結果により、血液サンプル中のニューロテンシンの測定は、基本的に前途有望であり臨床的に用途の広い診断ツールとなる。それ故、例えば、患者の通常の研究において、臨床ケアの間のモニターリングのために、食物を利用する能力のモニターリングのために、腸の機能のモニターリングのために、または、治療の成功をモニターリングするための治療を伴う測定だけでなく、前記した科学文献の考察に起因する他の状況において、このような測定を使用することは可能であると思われる。

【特許文献１】米国特許第6,274,720号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１６】
しかしながら、血液サンプルにおけるニューロテンシンの測定は、現在のところ、通常の医療診断には採用されていない。この第一の理由が、ex vivo血液サンプルにおける周囲温度でのニューロテンシン濃度の安定性が、通常の測定にとっては極めて低いことである（20）（3から4時間しか半減期を有しない）。このことが、（サンプリング、血漿の回収、対応する研究試験の実施までに研究室への運送という）存在する研究室の複雑な実行性とともに、今までのところ、通常の診断における、ニューロテンシンの使用を妨げている。第二の理由は、in vivo血液で、2から6分のみという短い半減期であることが知られているからである。このことは、ニューロテンシン受容体への結合および/またはニューロテンシンの分解が迅速で効率的であることが原因であり（3）、そして、潜在的に見積もりが困難である時間依存的に、測定を困難なものとする。血液サンプルにおける瞬間的に測定可能なNTの濃度は、測定時間までの、刺激（例えば食物の供給）の結果としての、全体的なNTの生合成および循環液へのNTの放出の測定ではなく、むしろ、受容体への結合

および分解によるNT除去がその生合成および循環液への放出についての情報を大いに薄めてしまう、ランダムな暫定的な状態を表す。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

本願の目的は、テスト哺乳類（特にヒト患者）サンプルにおけるニューロテンシン放出を測定できることを提供することである。この測定は、通常の使用に適し、医療的診断に関するニューロテンシン放出の測定についての前記で概要した有効性を利用することが可能となり、そして、医学/臨床の決められた方法としての実施が可能となる。

【００１８】

この目的は、ニューロテンシンの哺乳類循環液への放出を測定する免疫診断的なアッセイ方法によって達成される。この方法は、請求項1に記載の最も一般的な形態においては、哺乳類のプロニューロテンシンのN-末端部分の免疫反応性（PNT免疫反応性）を、テスト哺乳類の血清サンプルまたは血漿サンプルにおいて選択的に測定することを特徴とする。前記免疫反応性は、ニューロテンシンまたはニューロメジンNの免疫反応性ではない。

【００１９】

このような方法の有利な進歩は、本明細書の好ましい実施態様の言及とともに、請求項2から16によって再構築される。

【００２０】

本発明の目的は、更に、請求項1に記載のこのような方法の好ましい実施態様のためのキットによって、請求項17および18に記載されているように達成される。

【００２１】

以下に、本発明に基づく新規な発見、および誘導される発明の応用を、具体的な試験結果および図を参照に、より詳細に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２２】

「哺乳類のプロニューロテンシンのN-末端部分の免疫反応性」とは、それぞれの哺乳類プレプロニューロテンシンの部位24のアミノ酸から（シグナルペプチド後が部位1となる）、それぞれの哺乳類プレプロニューロテンシンのニューロメジンNの最初のアミノ酸（Lys）の3つ前のアミノ酸までのアミノ酸領域に位置する免疫反応性を意味する。全ての既知の場合において、対象とする領域は、少なくともアミノ酸24から139または140のそれぞれ、すなわち、配列番号6のヒトペプチドで示す配列を少なくとも含む。

【００２３】

血液サンプルまたは血清サンプルまたは血漿サンプルにおける、ヒトのプロニューロテンシンのN-末端部分（特に、NMNもNTも含まず、フリーのNMNまたはNTの形成をもたらすタンパク質プロセシングにおいて除去され、その後、不用品の一種となる部分）にアサイメントされた免疫反応性の測定において、NTの発生が生じた場合に文献データに対応する再現性ある結果が、得ることができるかという問題点を調べるために、PNTのこのN-末端に特異的なサンドイッチアッセイ（実施例において、より詳細に開示する）を開発した。このアッセイは、ヒトのプレプロニューロテンシンのアミノ酸67から85およびアミノ酸121から140の両方を含むヒトPNTのN-末端ペプチドのみを、特異的に認識する。

【００２４】

このアッセイを使用したヒトの血液サンプルの測定（以下により詳細に記す）により、発生および動態によるNTの形成/放出を反映するPNT免疫反応性が測定されたことが示された。

【００２５】

比較的に長い期間、室温で保存した血液サンプルに由来する血清サンプルおよび血漿サンプルの繰り返した測定の場合、更にその上、血漿ex vivoでのPNT免疫反応性の安定性が、驚くほどに高いことが見出された。免疫反応性の認識可能なロスは、7日後でさえ検出されなかったので、室温での半減期は、7日よりもはるかに長く、それゆえ、成熟ニューロテンシンのex vivo安定性（cf. 3）、および、大きくて不完全にプロセシングを受けた

プロニューロテンシンペプチドの1つのex vivo安定性を超えるものである。
【００２６】
安定性測定の結果を図1に示す。
【００２７】
それ故、血液サンプルにおけるプロニューロテンシンまたはPNR断片の測定は、完全に、日常的な使用に適合し、日常的な医療診断に利用可能な血液におけるNT/NMN/PNT放出速度を求めるのに適する。
【００２８】
使用したアッセイの調製、測定におけるその使用、および得られた測定結果を、実験セクションおよび実施例および関連する説明において、より詳細に開示する。
【実施例】
【００２９】
（実験セクション：N-末端プロニューロテンシン配列にアサイメントされた免疫反応性の測定）
＜１．抗体の調製＞
＜１．１．免疫原＞
人のプレプロニューロテンシン（配列番号1）の2つの異なるペプチド部分配列、すなわちPNT3（配列番号4）およびPNT4（配列番号5）を選択し、Jerini(Berlin, Germany)によって合成ペプチドとして合成した。加えて、それぞれのペプチドを、アミノ-末端システイン残基（Cys0）を用いて提供した。
【００３０】
＜１．２．抗体回収＞
免疫化目的のために、N-末端システイン残基を補ったペプチドPNT3（配列番号4）およびPNT4（配列番号5）を、Limulus polyphemusに由来するヘモシアニンとコンジュゲートさせ、ウサギを免疫化するための標準方法に従って使用し、PNTペプチドコンジュゲートに対する抗血清を得た。
【００３１】
＜１．３．抗体の精製＞
ウサギ抗血清のポリクローナル抗体を、リガンド特異的アフィニティ精製によって精製した。この目的のために、Cys(0)-ペプチドPNT3（配列番号4）およびPNT4（配列番号5）を、Pierce(Boston, USA)によって供給されたSulfoLinkゲルへと結合した。結合は、製造者の方法に従って、以下のように実施した：
ポリカーボネートカラム（15mm×80mm）を、5mlのアフィニティマトリクスで満たした。カラムをPBS（136mM NaCl、1.5mM KH_2PO_4、20.4mM Na_2HPO_4・$2H_20$、2.7mM KCl、pH7.12）を用いて平衡化した後、5mgのそれぞれの前記ペプチドを秤量して、PBSで溶かしてクローズトカラムに加え、ゲル物質を緩やかに攪拌することによって均一にした。室温での15分間のインキュベーションおよびゲル物質の堆積後、カラムを5回3mlのPBSを用いて洗浄した。フリーの結合部位を飽和させるために、5mlの50mM L-システイン溶液を、それぞれの場合に、カラムに加え、均一になった後、ゲル物質を再度15分間室温でインキュベートした。ゲル物質が堆積後、それぞれのカラムを、5mlの1M NaCl溶液で6回洗浄し、その後、PBSを用いて洗浄した。
【００３２】
ゲル物質を、25mlのそれぞれのウサギ抗血清プールと混合し、緩やかに攪拌することによって室温で一晩インキュベートした。血清-ゲル混合物を、ポリカーボネートカラムに加え、余分な血清を除去した。その後、カラムを250mlのPBSを用いて洗浄し、非結合の血清タンパク質を除去した。結合抗体の脱離は、50mMクエン酸(pH2.2)を用いたカラムの溶出によって実施した。溶出液を1mlのフラクションに回収した。各フラクションのタンパク質濃度を、Perbio(Bonn, Germany)のBCA-タンパク質アッセイキットを使用して求め、>1mg/mlのタンパク質含量を有するフラクションをまとめた。アフィニティ精製した抗体を、PBSを用いた透析により再緩衝化し、タンパク質含量を再度測定した。その後、4℃で保

存した。
【００３３】
＜２．アッセイ調製＞
＜２．１．固相＞
ペプチドPNT3に対するアフィニティ精製したポリクローナルウサギ抗体を、ポリスチロールチューブ（Startube、12mm×75mm、Greiner、Germany）に固定した。この目的のために、抗体溶液を、PBSを用いてタンパク質濃度が6.7μg/mlになるように希釈し、各チューブ当り300μlをピペッティングした（チューブ当り2μgの抗体に対応）。これらを室温で24時間インキュベートし、その後、それぞれを4mlのPBSで3回洗浄した。更なる使用まで、チューブを4℃で保存した。
【００３４】
＜２．２．標識した抗体＞
PNT4に対するアフィニティ精製したポリクローナルウサギ抗体（PBS中で1mg/ml）を、アクリジニウムエステル-N-ヒドロキシ-スクシンイミド(アセトニトリル中で1mg/ml、InVent、Hennigsdorf、Germany)を用いて、発光標識した。標識のために、200μlの抗体を、4μlのアクリジニウムエステルと混合し、20分間インキュベートし、フリーのアクリジニウムエステル結合を、40μlの50mMグリシン溶液を加えることによって飽和させた。標識したバッチを、BioSil 400-ゲルろ過カラム（BioRad、Munich、Germany）を用いたHPLCによって、フリーのアクリジニウムエステルと分離した。PBSを、溶媒として使用した。
【００３５】
＜３．PNT測定の実施＞
＜３．１．測定条件＞
試験する50μlの血漿サンプルおよび150μlのアッセイバッファー（PBSバッファー、10mM EDTA）を、抗体-コーティングチューブ（２．１．）にピペッティングし、16時間室温でインキュベートした。その後、チューブを、1mlのPBSを用いて5回洗浄した。20ngの標識抗体（２．１．）（100μlのPBSバッファー、10mM EDTA）を、その後、各チューブに加えた。チューブを2時間室温でインキュベートし、非結合のトレーサー抗体を、1mlのPBSを用いて5回洗浄することによって除去した。
【００３６】
チューブに結合した標識抗体を、市販のルミノメーター（Berthold LB 952T/16）での発光測定を使用して定量した。
【００３７】
＜３．２．キャリブレーション＞
測定するサンプルにおけるプロニューロテンシンの濃度または免疫反応性を測定することができるために、明らかに健康なヒトの50のEDTA血漿を、PNTについてスクリーニングし、最も高いPNT免疫反応性を有する血漿をプールした。この血漿プールから、ウマ血清（Sigma、Germany）を用いて、多くの希釈サンプルを産生した。仮の濃度100ユニット/mlを、最も高いスタンダードとした（希釈を行わなかったEDTA血漿）。図2は、PNT標準曲線を示す。プロニューロテンシンアッセイの分析的な検出感度は、約1U/mlである。
【００３８】
＜４．測定の結果＞
＜４．１．明らかに健康なヒトの血漿におけるプロニューロテンシン免疫反応性＞
明らかに健康なコントロールのヒトは、血液中に、高いPNT測定値を有している。その度数分布を図4に示す。その中央値は、35.1U/mlと測定された。
【００３９】
＜４．２．食物摂取の間および食物摂取の後での、健康なテスト被検体の循環液におけるPNT免疫反応性の測定＞
ニューロテンシンの形成または放出は、食物摂取によって刺激されることが知られている（15；14）。血液中のPNT濃度も食物摂取によって影響を受けるか、そして、PNT免疫反応性の変化の動態が前記のNT濃度と並行して進むかどうかを求めるために、以下の試験を

実施した：6人のテスト被検体（3人は男性のヒトで3人は女性のヒト）を14時間断食させた。その後、テスト被検体が、一定量の液体または食物を特定の時間に摂取し、そして、血液サンプルを特定の時間に採取した。試験の経過を、表1に要約する。

【００４０】

【表１】

表１：食物刺激テストの経過

サンプリングポイント	栄養状態
1	14 時間の断食後
2	15 時間の断食後
3	液体（11 の水）摂取後 5 分
4	液体摂取後 15 分
5	液体摂取後 45 分
6	液体摂取後 1 時間 15 分
7	液体摂取後 1 時間 45 分
8	液体摂取後 3 時間
9	食物摂取後 5 分 （約 250kcal のサラダおよび約 100kcal のピザ）
10	食物摂取後 15 分
11	食物摂取後 30 分
12	食物摂取後 1 時間
13	食物摂取後 2 時間
14	食物摂取後 3 時間
15	食物摂取後 4 時間

【００４１】

PNTの分泌は、液体の摂取によっては刺激されないことが見出された。食物摂取の直前、すなわち、最も長い断食事間の後で、PNT濃度が最も低くなった。この値を、各個人のテスト被検体について100％と定義し、各テスト被検体の全ての他の測定は、この値に基づくものとした。6人のテスト被検体の測定したPNT免疫反応性の割合の変化を平均化し、図3に図示する（$p<0.05$）。食事後直後に、血液中のPNT濃度は顕著に増加した。食事の摂取後3時間および4時間という最後の2つのサンプリングでは、最も高い値を有した。全体としては、PNT濃度は、食事後、4.5から8倍増加した。

【００４２】

前記したアッセイで測定することができ、使用した2つの抗体についての結合部位を有

する1つまたは複数のN-末端プロニューロテンシン断片と連帯した免疫反応性が、成熟ペプチドNTについて記載されているように、食物摂取の刺激が原因となって増加した。

【００４３】

それゆえ、PNT免疫反応性の測定は、患者/テストを受けるヒトの代謝状態を評価するために、成熟ニューロテンシンの代わりに使用することができる。一定量の栄養を投与することによって、PNT放出の個々の刺激性は、食物摂取後の特定時間での測定値と、基礎値との間の差異Δ（例えば、$PNT_{食物摂取後3時間}$および$PNT_{断食}$）として、またはこのような値の比率もしくは係数として測定することができる。表2は、実施例による対応する評価を示す。

【００４４】

【表２】

表２：食物刺激前後でのPNT免疫反応性（U/ml）および絶対差および係数

	テスト被検体1	テスト被検体2	テスト被検体3	テスト被検体4	テスト被検体5	テスト被検体6
$PNT_{基礎}$	10.5	2.3	4.8	5.0	5.7	5.8
$PNT_{5分}$	32.3	10.7	9.6	23.0	27.1	15.5
$PNT_{5時間}$	42.4	18.4	20.0	22.7	41.5	40.6
Δ $PNT_{5分}$ マイナス $PNT_{基礎}$	21.8	8.45	4.8	18.0	21.4	9.7
Δ $PNT_{3時間}$ マイナス $PNT_{基礎}$	31.9	16.1	15.2	17.7	35.8	34.8
$PNT_{5分}/PNT_{基礎}$	3.1	4.7	2	4.6	4.8	2.7
$PNT_{3時間}/PNT_{基礎}$	4.0	8	4.2	4.5	7.3	7

表中における、記号の意味を以下に示す。

$PNT_{基礎}$：18時間の断食後のPNT免疫反応性（基礎値）

$PNT_{5分}$：食物摂取後5分でのPNT免疫反応性

$PNT_{3時間}$：食物摂取後3時間でのPNT免疫反応性

【００４５】

＜４．３．人工的に栄養を与えた患者の循環液中のPNT濃度の測定＞

既に示したように、健康なヒトの血液中のPNT濃度は、食物摂取によって刺激を受けることができる。非経口的手段（静脈カテーテルによる）で人工的に栄養を与えられ、一般的に集中治療を受ける（例えば、現存する敗血症または多発外傷）患者の血漿におけるPNT免疫反応性の対応する測定においては、通常に栄養を摂取するコントロールよりも顕著に低いPNTを有することが見出された。このような測定においては、相対的なPNT免疫反応性の中央値は2.7U/mlであり、係数が13より低いことが見出された（図4参照）。

【００４６】

＜４．４．炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）の患者の循環液におけるPNT免疫反応性の測定＞

クローン病または潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の患者のサンプルの測定においては、ここでも、測定可能なPNT免疫反応性の中央値である10U/mlは、コントロールのヒトの値よりも低いことが見出された（図5）。しかしながら、患者の中の個体によっては、実

質的により高い測定値を示した（100U/mlより高い値）。

【００４７】

＜４．５．A型またはC型肝炎の患者の循環液におけるPNT免疫反応性の測定＞

一方、A型またはC型肝炎の患者のサンプルの測定においては、循環液に、健康なコントロールと比較して、112U/mlというより高いPNT濃度が見出された（図5）。

【００４８】

＜５．ヒト血清中の免疫反応性プロニューロテンシンの単離および特徴＞

＜５．１．アフィニティカラムの調製＞

PNT3ペプチド（配列番号4；1.1.参照）に対する5mgの精製したウサギポリクローナルを、製造者の方法に従って、2mlのCarboLinkゲル（Pierce、Boston, USA）に結合し、ポリカーボネートカラム（15mm×80mm）に移した。その後、ゲルを、20mlのPBSで洗浄した。

【００４９】

＜５．２．免疫反応性PNTのアフィニティ精製＞

32U/mlの相対濃度を有する10の個体血清100mlを含む混合した血清サンプルを、Na EDTA（最終濃度10mM）と混合し、その後、0.2μmフィルターでろ過した。調製した混合血清サンプルを4℃、流速2ml/minで、六回連続して、アフィニティカラムにアプライした。その後、カラムを50mlのPBSで洗浄し、結合した免疫反応性PNTを、50mMのグリシン/HCl溶液（pH2.0）で溶出させた。カラム溶出液を、280nmの吸光度で連続してモニターし、グリシン/HCl溶液によって溶出したタンパク質フラクション（最終容量3ml）を、さらにHPLC手法によって分析した。

【００５０】

＜５．３．逆相HPLC分析＞

アフィニティ精製によって得られた物質を、Waters(Eschborn, Germany)のC_{18}カラムμBondapak 0.4×30mmを用いた逆相HPLCによって精製した。流速は、1ml/minとした。使用した移動相および溶出条件を、以下の表3に示す。

【００５１】

【表３】

表３：プロニューロテンシン-IR の RP-HPLC の溶出条件

移動相 A: 5% アセトニトリル 20 mM 酢酸アンモニウム		
移動相 B: 90% アセトニトリル 20 mM 酢酸アンモニウム		
グラジエント	0.0 分 2.5 分 5.0 分 55.0 分 60.0 分	100% A / 0% B 100% A / 0% B 89% A / 11% B 30% A / 70% B 0% A / 100% B

【００５２】

カラム溶出液を、連続して215nmの吸光度で測定し、0.5mlのフラクションに回収した。前記のセクション２．および３．で記載したPNTアッセイを用いて、PNT免疫反応性を検出することができたフラクションを求めた。主な免疫反応性は、フラクション67に溶出され

たことが見出された。

【００５３】

ポジティブなPNT免疫反応性を有するフラクション67を、窒素ガスを用いた処理によって乾燥させた。その後、質量分析によって、サンプルを分析した。

【００５４】

＜５．４．質量分析＞

ペプチドを、プロテアーゼGlu-Cまたはトリプシンによって分解し、得られたフラグメントを、SMART HPLCによってそれ自身知られた方法で得て、その後、質量分析によって詳細に調べた。

【００５５】

質量分析においては、完全に、既知のプレプロニューロテンシン1－170（配列番号1）のアミノ酸24－140の配列と完全に一致した配列（配列番号6）が求まった。それ故、117個のアミノ酸を含み、プレプロニューロテンシン24-140として分解されるプロニューロテンシンペプチドが、ヒトの血液中で循環していることが示された。前記の方法によって免疫反応性として求めた物質が、C末端成熟ペプチドであるニューロメジンNおよびニューロテンシンを含むことは全く指摘されなかった。

【００５６】

[参考文献]

1. ALLEN J. M., PENKETH A. R., ADRIAN T. E., LEE Y. C., SARSON D. L., HODSON M. E., BATTEN J. C., BLOOM S. R. (1983). Adult cystic fibrosis: postprandial response of gut regulatory peptides. Gastroenterology 85: 1379-1383

2. BARDELLA M. T., FRAQUELLI M., PERACCHI M., CESANA B. M., BIANCHI P. A., CONTE D. (2000). Gastric emptying and plasma neurotensin levels in untreated celiac patients. Scandinavian Journal of Gastroenterology 35:269-73

3. BARELLI H., FOX-THRELKELD J. E., DIVE V., DANIEL E. E., VINCENT J. P., CHECLER F. (1994). Role of endopeptidase 3.4.24.16 in the catabolism of neurotensin, in vivo, in vascularly perfused dog ileum. British Journal of Pharmacology 112: 127 + 132

4. BECK B. (2000). Neuropeptides and obesity. Nutrition 16: 916-923

5. BEINFELD M. C. (1998). Prohormone and proneuropeptide processing. Recent progress and future challenges. Endocrine 8:1-5

6. BISSETTE G., NEMEROFF C. B., LOOSEN P. T., PRANGE A. J. JR., LIPTON M. A. (1976). Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. Nature 262:607-9

7. CARRAWAY R. E., MITRA S. P., SPAULDING G. (1992). Posttranslational processing of the neurotensin/neuromedin-N precursor. Annals of the New York Academy of Sciences 668:1-16

8. CLINESCHMIDT B. V., MARTIN G. E., VEBER D. F. (1982). Antinocisponsive effects of neurotensin and neurotensin-related peptides. Annals of N Y Acadademy Sciences 400:283-306

9. DOBNER P. R., BARBER D. L., VILLA-KOMAROFF L., MCKIERNAN C. (1987). Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. PNAS USA 84: 3516-3520

10. EVERS B. M., IZUKURA M., CHUNG D. H., PAREKH D., YOSHINAGA K., GREELEY G. H. JR., UCHIDA T., TOWNSEND C. M. JR., THOMPSON J. C. (1992). Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. Gastroenterology 103:86-91

11. FERRARO L., TANGANELLI S., O´CONNER W. T., BIANCHI C., UNGERSTEDT U., FUXE K. (1995). Neurotensin increases endogenous glutamate release in the neostriatum of the awake rat. Synapse 20: 362-364

12. FEURLE G. E., MULLER B., RIX E. (1987). Neurotensin induces hyperplasia of the pancreas and growth of the gastric antrum in rats. Gut 28 Suppl:19-23

13. FRIRY C., FELICIANGELI S., RICHARD F., KITABGI P., ROVERE C. (2002). Production of recombinant large proneurotensin/neuromedin N-derived peptides and characterization of their binding and biological activity. Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 1161-1168

14. GULLO L., PEZZILLI R., TOMASSETTI P., DE GIORGIO R. (1998). Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged study. Gastroenterological and Clinical Biology 22: 25-28

15. HAMMER R. A., CARRAWAY R. E., LEEMAN S. E. (1982). Elevation of plasma neurotensinlike immunoreactivity after a meal. Journal of Clinical Investigation 70: 74-81

16. HERZIG K. H., DOMAGK J., NUSTEDE R., STERN M., BEWIG B., CICHY W. K., FOLSCH U. R. (1997). Plasma concentrations of cholecystokinin and neurotensin in patients with cystic fibrosis. Scandinavian Journal of Gastroenterology 32: 315-319

17. KISLAUSKIS E., BULLOCK B., MCNEIL S., DOBNER P. R. (1988). The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. Journal Biological Chemistry 263: 4963-4968

18. KITABGI P. (1989). Neurotensin modulates dopamine transmission at several levels along brain dopaminergic pathways. Neurochemistry International 14: 111-119

19. LAPCHAK P., ARAUJO D. M., QUIRION R., BEAUDET A. (1990). Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release for rat cerebral cortex: effect of quinolinic acid lesions of the basal forebrain. Journal of Neurochemistry 55: 1397-1403

20. LEE Y. C., UTTENTHAL L. O., SMITH H. A., BLOOM S. R. (1986). In vitro degradation of neurotensin in human plasma. Peptides 7: 383-387

21. MURPHY M. S., BRUNETTO A. L., PEARSON A. D., GHATEI M. A., NELSON R., EASTHAM E. J., BLOOM S. R., GREEN A. A. (1992). Gut hormones and gastrointestinal motility in children with cystic fibrosis. Digestive Diseases and Sciences 37: 187-192

22. NUSTEDE R., KOHLER H., FOLSCH U. R., SCHAFMAYER A. (1991). Plasma concentrations of neurotensin and CCK in patients with chronic pancreatits with and without enzyme substitution. Pancreas 6: 260-265

23. REINECKE M., WEIHE E., CARRAWAY R. E., LEEMAN S. E., FORSSMANN W. G. (1982). Localization of neurotensin immunoreactive nerve fibres in the guinea-pig heart: evidence derived by immunohistochemistry, radioimmunoassay and chromatography. Neuroscience 7: 1785-1795

24. ROKAEUS A., FRIED G., LUNDBERG J. M. (1984). Occurrence, storage and release of neurotensin-like immunoreactivity from the adrenal gland. Acta Physiology Scandinavia 120: 373-80

25. ROVERE C., BARBERO P., MAORET J.-J., LABURTHE M., KITABGI P. (1998). Pro-neurotensin/neuromedin N expressiion and processing in human colon cancer cell lines. Biochemical and Biophysical Research Communications 246: 155-159

26. RÖKAEUS A., THOR K., ROSELL S. (1984). Cigarette smoking potentiates fat-induced elevation of neurotensin-like immunoreactivity in human plasma. Acta Physiologica Scandinavia 121: 181-184

27. ROSELL S., RÖKAEUS A. (1979). The effect of ingestion of amino acids, glucose and fat on circulating neurotensin-like immunreactivity. Acta Physiologica Scandinavia 107: 263-267

28. ROSTENE W., BROUARD A., DANA C., MASUO Y., AGID F., VIAL M., LHIAUBET A. M., PELAPRAT D. (1992). Interaction between neurotensin and dopamine in the brain. Morphofunctional and clinical evidence. Annals N Y Academy Sciences 668:217-31

29. ROWE W, VIAU V, MEANEY MJ, QUIRION R. (1992). Central administration of neurotensin stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal activity. The paraventricular CRF neuron as a critical site of action. Annals N Y Academy Sciences 668:365-7

30. SCHIMPFF R.-M., AVARD C., FENELON G., LHIAUBET A.-M., TENNEZE L., VIDAILHET M., ROSTENE W. (2001). Increased plasma neurotensin concentrations in patients with parkinson´s disease. Journal of Neurological and Neurosurgical Psychiatry 70: 784-786

31. SCHIMPFF R. M., GOURMELEN M., SCARCERIAUX V., LHIAUBET A. M., ROSTENE W. (1995). Plasma neurotensin levels in humans: relation to hormone levels in diseases involving the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. European Journal of Endocrinology 133: 534-538

32. STROUD RM, WALTER P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. Current Opinion Structure Biology 9:754-9

33. VINCENT J. P. (1995). Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure. Cellular Molecular Neurobiology 15:501-12

34. WILDING J. P. (2002). Neuropeptides and appetite control. Diabetic medicine 19: 619-627

35. WISEN O. BJORVELL H., CANTOR P., JOHANNSSON C., THEODORSSON E. (1992). Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding (MSF) and a liquid test meal. Regulatory Peptides 39: 43-54

36. WOOD J. G., HOANG H. D., BUSSJAEGER L. J., SOLOMON T. E. (1988). Neurotensin stimulates growth of small intestine in rats. American Journal of Physiology 255:G813-7.

【図面の簡単な説明】

【００５７】

【図１】図1は、テスト被検体の血液から得られた血清、EDTA血漿およびヘパリン血漿サンプルにおける、7日間までの期間にわたる、室温での、ヒトPNTのN末端配列にアサイメントされた免疫反応性のex vivo安定性の測定結果を示す。

【図２】図2は、実施例においてより詳細に記載したPNTサンドイッチアッセイの標準曲線を示す。

【図３】図3は、前記したサンドイッチアッセイを用いた、通常に栄養を摂取したノーマルなヒトおよび人工的に栄養を与えた患者の場合における、血漿中のPNT免疫反応性の測定結果を示す。

【図４】図4は、前記したサンドイッチアッセイを用いた、食物の供給に依存した、通常に栄養を摂取したノーマルなヒトの血漿におけるPNT免疫反応性の経時変化の測定結果を示す。

【図５】図5は、前記したサンドイッチアッセイを用いた、通常に栄養を摂取したノーマルなヒト、ならびに、慢性炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）および肝炎の患者の場合における、血漿中のPNT免疫反応性の測定結果を示す。

【図１】

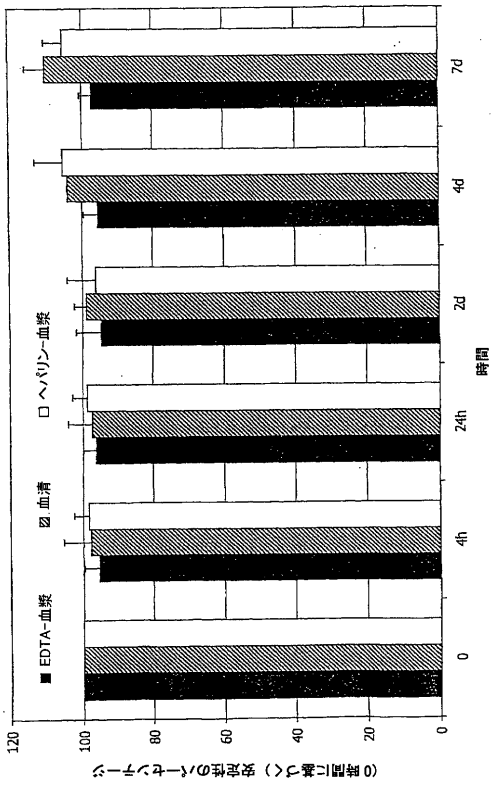

Fig. 1

【図２】

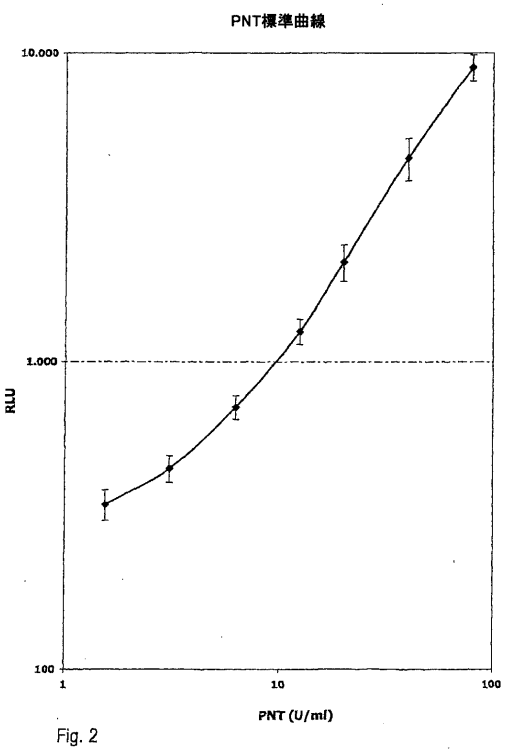

Fig. 2

【図３】

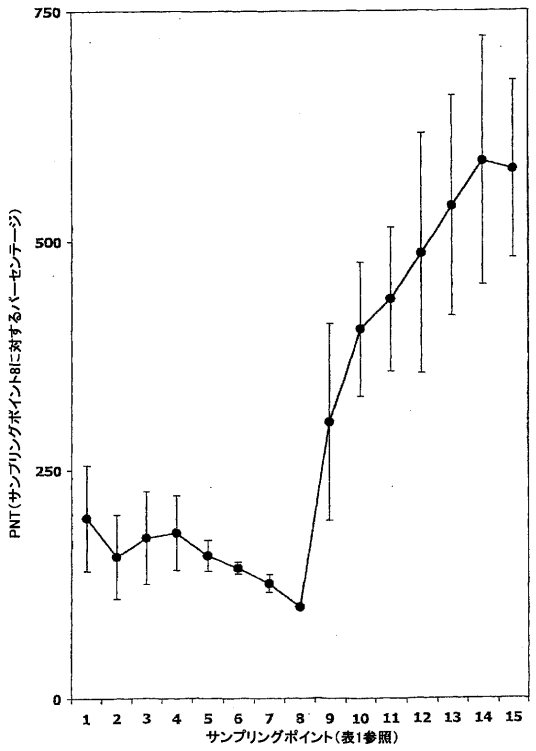

Fig. 3

【図４】

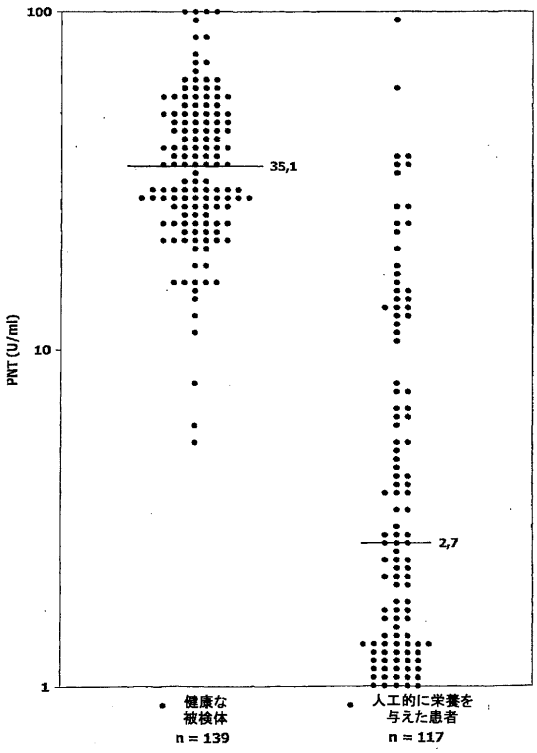

Fig. 4

【図５】

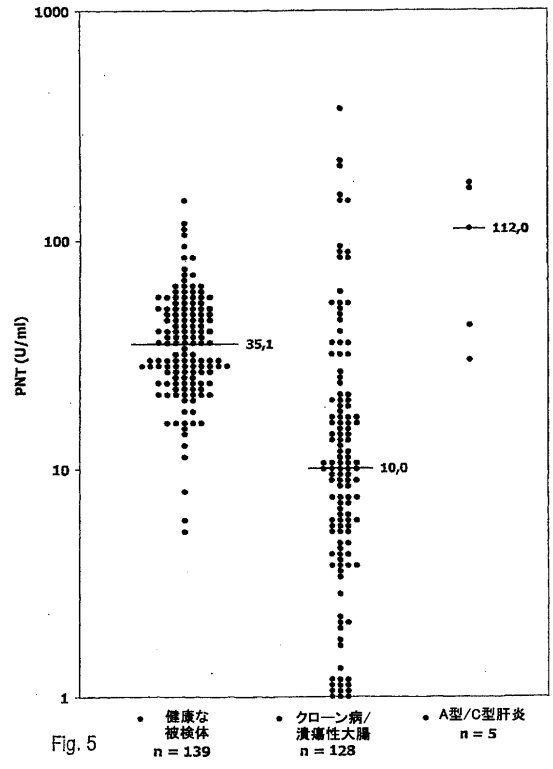

Fig. 5

【配列表】
0005133066000001.app

フロントページの続き

審査官　吉田　将志

(56)参考文献　特表２００２－５３５６５４（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０６２７４７２０（ＵＳ，Ｂ１）
特表２００３－５０８７２４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 33/48-98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CA/MEDLINE(STN)

专利名称(译)	用于测量神经降压素释放到循环液中的免疫测定法		
公开(公告)号	JP5133066B2	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	JP2007552570	申请日	2006-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	鞘脂技术游戏的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	鞘脂科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	鞘脂科技有限公司		
[标]发明人	アンドレアエルンスト		
发明人	アンドレア·エルンスト		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/543.575		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	102005003687 2005-01-26 DE		
其他公开文献	JP2008528984A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

哺乳动物血液中神经降压素的免疫诊断测定方法包括将免疫活性N末端哺乳动物神经降压素（PNT-免疫反应性）注射到血清样品或血浆样品中，其中神经降压素或神经介素不具有免疫反应性。包括用于实施该方法的试剂盒的独立权利要求包括至少一种辅助试剂，例如缓冲液和清洁溶液，其包含第一免疫试剂，其含有针对固定化固相中的人抗神经降压素的部分序列的第一抗体，含有第二免疫试剂。抗可溶形式的人源性降血压素的部分序列的第二抗体，以及含有用于结合第一和第二抗体的肽制剂的标准和校准溶液。 - 活动：Antiparkinsonian;免疫抑制;胃肠道根;抗炎;抗溃疡;抑制细胞生长;抗甲状腺; CNS根;呼吸根;嗜肝。

サンプリングポイント	栄養状態
1	14 時間の断食後
2	15 時間の断食後
3	液体（11 の水）摂取後 5 分
4	液体摂取後 15 分
5	液体摂取後 45 分
6	液体摂取後 1 時間 15 分
7	液体摂取後 1 時間 45 分
8	液体摂取後 3 時間
9	食物摂取後 5 分 （約 250kcal のサラダおよび約 100kcal のピザ）
10	食物摂取後 15 分
11	食物摂取後 30 分
12	食物摂取後 1 時間
13	食物摂取後 2 時間
14	食物摂取後 3 時間
15	食物摂取後 4 時間