

(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2019-100762
(P2019-100762A)

(43) 公開日 令和1年6月24日(2019.6.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18 Z N A	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2017-229248 (P2017-229248)	(71) 出願人	517417681
(22) 出願日	平成29年11月29日 (2017.11.29)		株式会社TKResearch
			千葉県柏市逆井五丁目8番9号
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司
		(74) 代理人	100151596
			弁理士 下田 俊明
		(72) 発明者	鈴木 重明
			東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医
			学部神経内科内
		(72) 発明者	稲垣 貴之
			千葉県柏市逆井五丁目8番9号 株式会社
			TKResearch内
		Fターム(参考)	4H045 AA11 AA30 DA76 EA50

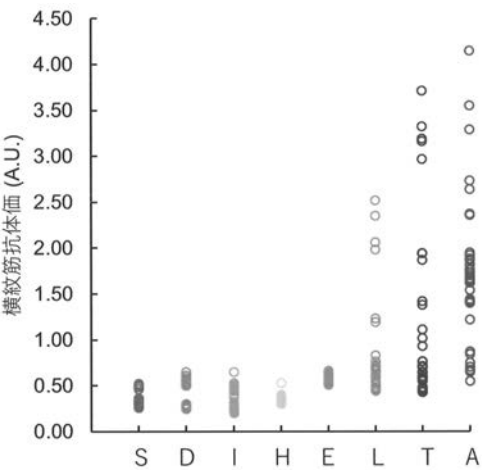
(54) 【発明の名称】 抗横紋筋抗体の測定方法及び測定試薬

(57) 【要約】

【課題】簡便で感度の高い抗横紋筋抗体の測定方法を提供する。

【解決手段】検体中の抗横紋筋抗体と、前記抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する生細胞とを免疫学的に結合させることを含む免疫学的方法により前記抗横紋筋抗体を定量する、抗横紋筋抗体の測定方法。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体中の抗横紋筋抗体と、前記抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する生細胞とを免疫学的に結合させることを含む免疫学的方法により前記抗横紋筋抗体を定量する、抗横紋筋抗体の測定方法。

【請求項 2】

前記抗横紋筋抗体の抗原が、titin、リアノジン受容体、及び、Kv1.4からなる群から選ばれる 1 種以上である、請求項 1 記載の測定方法。

【請求項 3】

前記抗横紋筋抗体の抗原が、titin、リアノジン受容体、及び、Kv1.4からなる群から選ばれる 2 種以上である、請求項 2 記載の測定方法。

【請求項 4】

前記細胞が、titin、リアノジン受容体、又は、Kv1.4を細胞表面に発現する細胞を混合したものである、請求項 3 記載の測定方法。

【請求項 5】

前記免疫学的手法が、フローサイトメトリー、免疫染色又はCell ELISAである、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の測定方法に用いるための、前記抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する生細胞を含む、抗横紋筋抗体の測定試薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗横紋筋抗体の測定方法及び測定試薬に関する。

【背景技術】**【0002】**

重症筋無力症（MG）は自己免疫疾患であり、自己抗体として、抗アセチルコリン受容体（AChR）抗体、抗筋特異的チロシンキナーゼ（MuSK）抗体などが関与する（非特許文献 1）。心筋・骨格筋をターゲットとしたMGには抗横紋筋抗体が関係していることが示唆されている（非特許文献 2）。抗横紋筋抗体の抗原として、titin、リアノジン受容体、抗電位依存性Kチャネル（Kv1.4）が知られており、各抗体の意義についても報告がある（非特許文献 3）。

【0003】

抗横紋筋抗体の代表的な検出法は、抗titin抗体ではELISA、抗リアノジン受容体抗体ではイムノブロット、抗Kv1.4抗体では放射線同位元素（RI）を用いる免疫沈降と手法が異なっている（非特許文献 2）。

【0004】

抗リアノジン受容体抗体については、抗原を発現させた細胞を用いる間接蛍光免疫染色法による測定が報告されている（非特許文献 4）。この方法では、細胞がアセトンにより脱水固定された後に免疫染色されている。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0005】**

【非特許文献 1】 仙台医療センター医学雑誌, 6: 21-26 (2016)

【非特許文献 2】 臨床神経学, 52(11): 1312-1314 (2012)

【非特許文献 3】 BRAIN and NERVE 63(7): 705-712(2011)

【非特許文献 4】 金沢大学十全医学界雑誌, 106(4-5):465-472 (1997)

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

10

20

30

40

50

本発明は、簡便で感度の高い抗横紋筋抗体の測定方法及び測定試薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、抗原発現細胞を用いる免疫的手法を用いることにより、感度の良い測定ができることを確認し、本発明を完成した。

【0008】

本発明は、下記のものを提供する。

(1) 検体中の抗横紋筋抗体と、前記抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する生細胞とを免疫学的に結合させることを含む免疫学的方法により前記抗横紋筋抗体を定量する、抗横紋筋抗体の測定方法。

(2) 前記抗横紋筋抗体の抗原が、titin、リアノジン受容体、及び、Kv1.4からなる群から選ばれる1種以上である、前記測定方法。

(3) 前記抗横紋筋抗体の抗原が、titin、リアノジン受容体、及び、Kv1.4からなる群から選ばれる2種以上である、前記測定方法。

(4) 前記細胞が、titin、リアノジン受容体、又は、Kv1.4を細胞表面に発現する細胞を混合したものである、前記測定方法。

(5) 前記免疫学的方法が、フローサイトメトリー、免疫染色又はCell ELISAである、前記測定方法。

(6) 前記測定方法に用いるための、前記抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する生細胞を含む、抗横紋筋抗体の測定試薬。

【発明の効果】

【0009】

抗横紋筋抗体を簡便かつ高感度で測定できる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】5'末端にneurofacin由来のシグナル配列を、細胞膜上に固定化されるように、3'末端側にneurotoxin-like protein 1由来のGPIアンカーを融合したtitinをコードする塩基配列。

【図2】実施例3で測定した抗横紋筋抗体価を示す。検体は、SRP陽性壊死性ミオパチー30例(Sと表記)、同30例(Dと表記)、同30例(Iと表記)、健常者30例(Hと表記)、若年発症重症筋無力症30例(E)、老年発症重症筋無力症30例(L)、胸腺腫合併重症筋無力症30例(T)、筋炎・心筋炎合併重症筋無力症重症筋無力症33例(A)。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明の実施の形態を説明する。先ず、本発明方法について説明する。

本発明方法は、検体中の抗横紋筋抗体と、前記抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する生細胞とを免疫学的に結合させることを含む免疫学的方法により前記抗横紋筋抗体を定量することを特徴とする。

【0012】

測定対象となる検体は、通常には、血清や血漿であるが、免疫学的方法における免疫学的結合を妨げる物質が含まれていない限り、特に限定はされない。

免疫学的方法における結合の条件は、従来の免疫学的方法と同様の条件で行うことができる。また、結合の検出に基づく定量も、従来の免疫学的方法と同様の条件で行うことができる。免疫学的方法としては、フローサイトメトリー、免疫染色又はCell ELISAが挙げられる。

フローサイトメトリーの例としては、J Vis Exp. 2013; (81): 50935.を参照できる。免疫染色の例としては、PLoS One. 2014; 9(3): e92698.を参照できる。Cell ELISAの例としては、Ann Rheum Dis. 2007 Apr; 66(4): 530-532.を参照できる。

【0013】

10

20

30

40

50

抗横紋筋抗体の抗原としては、titin、リアノジン受容体、及び、Kv1.4が挙げられる。これらの抗原の分子構造は、非特許文献2に記載されている通り公知であり、これらの遺伝子も同定されている。抗原は2種以上を用いてもよい。異なる抗原を発現する生細胞を混合して用いてもよい。

【0014】

抗横紋筋抗体の抗原を発現する生細胞は、抗原をコードする核酸で細胞を形質転換することで得られる。細胞としては、培養細胞が使用でき、例えば、293F細胞が挙げられる。例えば、抗原をコードする核酸を形質転換ベクター（例えば、pD647）に挿入し、そのベクターを用いて形質転換することができる。本発明において生細胞とは、細胞表面に発現する抗原がインタクトな状態にあることを意味する。例えば、アセトンによる脱水固定を細胞が受けている場合には、細胞表面の抗原（タンパク質）が変性して立体構造が変化するためインタクトな状態ではなく、このような脱水固定を受けた細胞は生細胞に含まれない。立体構造が変化していると正確な測定ができない恐れがある。

10

【0015】

例えば非特許文献1～2により知られているような抗横紋筋抗体と重症筋無力症との病態との関連に基づき、測定結果に基づき、重症筋無力症の検査や診断を行うことができる。特に、重症筋無力症の種類の鑑別に有利である。

【0016】

検査や診断における陽性の判定は、健常者の値と比較することによって行うことができる。同時に測定した、あるいは、予め測定された健常者の値から有意に値が高い場合（例えば、2.5 SD以上高い、統計学的テストにより有意に高い）に、陽性と判定できる。陽性には、重症筋無力症の疑いがあることも含まれる。

20

【0017】

次に、本発明測定試薬について説明する。本発明測定試薬は、本発明測定方法を実施するためのものであって、抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する細胞を含む。

【0018】

抗横紋筋抗体の抗原を細胞表面に発現する細胞については、本発明測定方法に関し説明した通りである。

【0019】

さらに、本発明測定試薬は、免疫学的測定に必要な試薬類、例えば、陽性コントロール、緩衝液等を必要に応じ含んでもよく、キットとして提供することもできる。

30

【0020】

本発明測定試薬の各構成要素は、溶液状態であってもよいし、凍結乾燥品などの乾燥状態であってもよい。乾燥状態である場合には、使用前に溶液状態にするための緩衝液等をさらに本発明測定試薬に含めてもよい。各構成要素の量や形態は、測定方法の条件に合わせて調整される。

【実施例】

【0021】

以下、実施例により本発明を説明する。なお、実施例中、「%」は、特記しない限り重量%を示す。

40

【0022】

< 材料調製及び手法 >

（1）抗原発現用プラスミドの調製

抗原遺伝子配列は、配列番号1、3及び4に示す配列を化学合成にて調製し、ATUM社のpD647プラスミドに挿入し、GFPと共発現できるよう調製した。

【0023】

Titin(MGT-30)に関しては、可溶性タンパク質として発現されるので、5'末端にneurofacin由来のシグナル配列を、細胞膜上に固定化されるように、3'末端側にneurotoxin-like protein 1由来のGPIアンカーを融合した。融合した配列を図1及び配列番号2に示す。

50

【 0 0 2 4 】

(2) 恒常発現株の調製

Lipofectoamine2000 (Thermo Sientific社) を用いて、293F細胞をトランスフェクションした。トランスフェクションに際しては、メーカー推奨プロトコルにて実施した。遺伝子導入の成否はGFPの蛍光を蛍光顕微鏡を用いて確認した。Hygromycin Bを用いて恒常発現株のセレクションを実施し、それぞれ恒常発現株を取得した。

【 0 0 2 5 】

(3) Flow Cytometry

70%コンフルエント細胞を0.05%EDTA/PBS(-)にて剥離し、PBS(-)にて 3×10^6 cells/mLの細胞溶液を調製した。細胞溶液100 μ Lに対して、血清を10 μ L添加し、氷上で1時間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 100 μ Lに再懸濁した。細胞溶液に二次抗体 (PE標識抗ヒトIgG抗体、BD Biocscience社) を20 μ L添加し、氷上で30分間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 200 μ Lに再懸濁し、Flow Cytometerにて解析した。

10

【 0 0 2 6 】

(4) Flow Cytometry解析

FSC/SSCにて培養細胞のみを解析対象とした。その細胞のGFP蛍光強度を横軸に、PE蛍光強度を縦軸にプロットを作成した。このプロットを用いてGFP陽性細胞群とGFP陰性細胞群を識別し、それぞれの群のPE蛍光強度の幾何平均を算出した。算出には、Kaluza 1.5ソフトウェア (Beckman Colter社) を用いた。

20

【 0 0 2 7 】

[GFP陽性細胞群のPE蛍光強度の幾何平均]/[GFP陰性細胞群のPE蛍光強度の幾何平均]を計算し、各検体の抗体価とした。

【 0 0 2 8 】

実施例 1 使用細胞数の検討

Titin発現細胞を10%FBS含有DMEM培地にて培養し、70%コンフルエント細胞を0.05%EDTA/PBS(-)にて剥離し、PBS(-)にて 1×10^7 , 5×10^6 , 3×10^6 , 1×10^6 cells/mLの細胞溶液を調製した。細胞溶液100 μ Lに対して、血清を10 μ L添加し、氷上で1時間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 100 μ Lに再懸濁した。細胞溶液に二次抗体 (PE標識抗ヒトIgG抗体、BD Biocscience社) を20 μ L添加し、氷上で30分間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 200 μ Lに再懸濁し、Flow Cytometerにて解析した。

30

【 0 0 2 9 】

血清として、titin ELISAにて陽性と確認されている陽性検体および陰性検体を用いた。

結果を表 1 に示す

【 0 0 3 0 】

【表 1】

表 1

使用細胞数	陽性検体		陰性検体	
	Average	SD	Average	SD
1×10^7	1.68	0.11	0.93	0.02
5×10^6	1.67	0.03	0.94	0.06
3×10^6	1.90	0.25	0.95	0.02
1×10^6	1.63	0.34	0.90	0.02

40

【 0 0 3 1 】

50

どの細胞数であっても陽陰性を鑑別できることが確認できた。作業中のロスにより細胞数が減少し、FACS解析が困難になることが予想されたため、細胞数は 3×10^6 cells/mLを用いることとした。

【0032】

実施例2 使用血清量の検討

Titin発現細胞を10%FBS含有DMEM培地にて培養し、70%コンフルエント細胞を0.05%EDTA/PBS(-)にて剥離し、PBS(-)にて 3×10^6 cells/mLの細胞溶液を調製した。細胞溶液100 μ Lに対して、血清を1, 5, 10 μ L添加し、氷上で1時間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 100 μ Lに再懸濁した。細胞溶液に二次抗体(PE標識抗ヒトIgG抗体、BD Biocscience社)を20 μ L添加し、氷上で30分間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 200 μ Lに再懸濁し、Flow Cytometerにて解析した。

【0033】

血清として、titin ELISAにて陽性と確認されている陽性検体および陰性検体を用いた。

結果を表2に示す。

【0034】

【表2】

表2

血清量	陽性検体		陰性検体	
	Average	SD	Average	SD
10 μ L	2.17	0.27	0.93	0.02
5 μ L	2.23	0.33	0.86	0.03
1 μ L	2.19	0.34	0.82	0.05

【0035】

どの血清量であっても陽陰性を鑑別できることが確認できた。血清量が少なくなるにつれて陽性検体のばらつきが大きくなった。血清量が大きくなると、陰性検体の測定値が大きくなる傾向にあったが、10 μ Lで問題なく判定可能であると判断し、10 μ Lで測定することとした。

【0036】

実施例3 各種検体の測定

70%コンフルエント細胞を0.05%EDTA/PBS(-)にて剥離し、PBS(-)にて 3×10^6 cells/mLの細胞溶液を調製した。細胞溶液100 μ Lに対して、血清を10 μ L添加し、氷上で1時間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 100 μ Lに再懸濁した。細胞溶液に二次抗体(PE標識抗ヒトIgG抗体、BD Biocscience社)を20 μ L添加し、氷上で30分間反応させた。血清との反応後PBS(-)1mLで2回洗浄を行い、PBS(-) 200 μ Lに再懸濁し、Flow Cytometerにて解析した。

【0037】

検体は、SRP陽性壊死性ミオパチー30例(Sと表記)、同30例(Dと表記)、同30例(Iと表記)、健常者30例(Hと表記)、若年発症重症筋無力症30例(E)、老年発症重症筋無力症30例(L)、胸腺腫合併重症筋無力症30例(T)、筋炎・心筋炎合併重症筋無力症筋無力症33例(A)を用いた。

【0038】

結果を図2に示す。陰性と思われるS,D,I,H,Eの検体の測定値より、平均値+3SDである0.8をカットオフとした。その結果、Lは30例中7検体(陽性率28.3%)、Tは30検体中13検体(陽性率43.3%)、Aは33検体中28検体(陽性率84.8%)であった。

【0039】

この結果から、本法は抗横紋筋抗体として主要な抗原であるtitinに対する自己抗体を

検出できていることが確認した。

【 0 0 4 0 】

実施例 4 筋炎・心筋炎合併重症筋無力症の検体33例での市販のELISAとの測定結果比較
筋炎・心筋炎合併重症筋無力症筋無力症の検体について、市販ELISAと、本発明の方法
(本法) を用いてtitinに対する自己抗体の測定を行った。市販ELISAとして、DLD Diagnostics社のAnti-Titin-Antibody ELISA (製品番号EA601/48) を用い、測定に際しては、メーカープロトコルに従った。本法による測定は、実施例 3 と同様の手法で実施した。

検体は実施例 3 とは異なる33検体を使用した。結果を表 3 及び 4 に示す

【 0 0 4 1 】

【表 3】

表 3

検体番号	市販ELISA	本法
1	4.58	1.26
2	0.79	0.73
3	0.59	0.29
4	4.47	3.08
5	4.05	3.04
6	4.33	3.08
7	4.97	1.91
8	1.21	4.07
9	1.39	3.22
10	1.53	2.18
11	4.48	1.93
12	0.71	1.50
13	5.69	1.42
14	0.49	0.73
15	0.86	1.18
16	6.83	1.41
17	0.73	0.62
18	4.12	2.57
19	0.71	0.55
20	0.42	0.52
21	0.22	0.48
22	3.41	3.35
23	1.43	1.00
24	3.50	1.00
25	0.38	0.92
26	0.38	1.02
27	0.69	0.93
28	0.69	0.96
29	0.36	1.00
30	3.19	1.03
31	6.81	1.13
32	10.20	1.10
33	0.37	0.94

10

20

30

40

【 0 0 4 2 】

【表 4】

表 4

	陽性検体数	陽性率
市販ELISA	18	54.5%
本法	22	66.6%

10

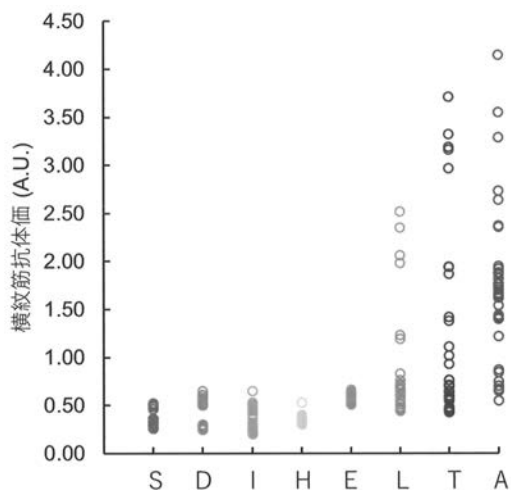
【 0 0 4 3 】

上記の結果から、市販ELISAよりも陽性率が向上し、感度が上昇したことが示された。

【 図 1 】

ATGGCCAGGAGCCACCGCCCTGGGTCCATGCAGCCTTCCTCCTGCTCCTCAGTCTTGGCGGAGCC_{gagga}
 CGATGGGAAGGAAAAGATAATTGGATTCGTTGCAATATGAAACTGTCCCTGAACGACTTACAAGGTACCGGATT
 GGAAAAAGGAAATAATATTTATATAGAGTATCTGCAGAAAAATAAGCTGGTGTTCAGATCCATCTGAAATCTTGGTC
 CTCTCACCCTGACGATGCATTGTTGAACCAACAATGGATTAAAGTGCATTAAAGATGGTCTGGAGTTATTGTCCCA
 AATCCTATCAGATCCTGGTTCCAAGTACAGGCTATCCAAGGCCAAGTCAACCTGGTGTTCAGAGATAAAGTACTAGA
 AACAGGGGACCGGGTGAAGAACCTTGTCTGCCTATGCCGAAGTGTGATTCTCCAAGTGAACGTTGAGACAAGG
 GCATTATACACTGAAATTAGAAAACCGTGTGAAAACAATTCCTGGGGAAATTGATGTCATGTAATTGCTGCCCAAGT
 GCACCAAGAATTGAAATTTGGTGATATAACCAAGGACTCAGTACATTGACTTGGGAACCACTGATGATGATGGAGG
 AAGTCCGTTAAGTGGATACGTTGTTGAAAAACGAGAAGTCAGCCGGAAAAACATGGACTAAAGTTATGGACTTTGTGACTG
 ATCTAGAAATTCAGTTCTCTGATCTGTTCAAGGAAAAGAGTACTTAATTAAGTTTGTGCTCGTAACAAATGTGGCCCT
 GGAGAACTGCATATGTTGATGAACCTGTAAATATGTCAACTCCTGCAACGGTACTGACCCACAGAGAATGTTAAATG
 GAGAGATCGAACAGCAATAGCATCTTCTTAACATGGGATCCACCTAAAAATGATGGTGGT_{gagga}CATCATCACCATC
 ACCAC_{gagga}ggagTggaTGCAACGGTGTGGCTTTGCTACCCCGGTGACCTTGGCCCTGGTCCAGCACTCTAGCTACCTTC
 TGGAGCTTCTGTGA

【 図 2 】



【配列表】

2019100762000001.app

专利名称(译)	抗横纹肌肉瘤抗体的测定方法和测定试剂		
公开(公告)号	JP2019100762A	公开(公告)日	2019-06-24
申请号	JP2017229248	申请日	2017-11-29
[标]发明人	鈴木重明 稲垣貴之		
发明人	鈴木 重明 稲垣 貴之		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K16/18		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.597 C07K16/18.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于测定抗横纹肌肉瘤抗体的简单且高度灵敏的方法。 解决方案：抗条纹抗体通过免疫结合样品中的抗核糖核糖核苷酸抗体和在细胞表面表达抗核糖核糖核苷酸抗体的抗原的活细胞而免疫结合。 一种测量抗横纹肌肉瘤抗体的方法，该抗体定量肌肉抗体。 [选择图]图2

