

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5413863号
(P5413863)

(45) 発行日 平成26年2月12日(2014.2.12)

(24) 登録日 平成25年11月22日(2013.11.22)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 N

請求項の数 3 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2012-181577 (P2012-181577)	(73) 特許権者	304023994 国立大学法人山梨大学
(22) 出願日	平成24年8月20日(2012.8.20)		山梨県甲府市武田四丁目4番37号
(62) 分割の表示	特願2008-147059 (P2008-147059) の分割	(73) 特許権者	598135980 株式会社コスミックコーポレーション
原出願日	平成20年6月4日(2008.6.4)		東京都文京区小石川2-7-3 富坂ビル
(65) 公開番号	特開2012-225941 (P2012-225941A)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(43) 公開日	平成24年11月15日(2012.11.15)	(72) 発明者	小林 哲郎 山梨県中央市下河東1110番地 国立大 学法人山梨大学内
審査請求日	平成24年9月14日(2012.9.14)	(72) 発明者	遠藤 登代志 山梨県中央市下河東1110番地 国立大 学法人山梨大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 劇症1型糖尿病の検査方法及び検査試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体中の、HSP10と免疫学的に反応する抗体を検出することにより劇症1型糖尿病を検査することを特徴とする劇症1型糖尿病の検査方法。

【請求項2】

前記抗体と免疫学的に反応する抗原を用いることにより前記抗体を検出する請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】

前記抗体と免疫学的に反応する抗原を含む、請求項1記載の検査方法に用いるための検査試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、劇症1型糖尿病(FT1DM)の検査方法及び検査試薬に関するものである。

【背景技術】

【0002】

現在、AIPの診断は2002年に日本膵臓学会が発表した「自己免疫性膵炎診断基準」に従って行われている。この基準によれば、血液検査の項目である、高グロブリン血症、高IgG血症、自己抗体のいずれかを認める、ことが診断の十分条件になっている。さらに、高IgG血症のなかでも、IgG4サブクラスが特異的に上昇するとの報告があり、自己抗体と

しては抗核抗体、リウマチ因子が陽性になることもある、としている。

【0003】

したがって、本疾患の血液検査では、これら グロブリン、IgG、IgG4、抗核抗体（SS-A抗体及びSS-B抗体）及びリウマチ因子の測定を行わなければならない、非常に高コストとなることが問題となっている。また、これら検査項目は他疾患でも上昇、あるいは陽性となり、その診断的特異性は乏しい。さらに、本疾患は上記診断基準に従って診断したとしても膵癌との鑑別が非常に困難であり、不必要な手術が行われていると言う現実があるため、両疾患の確実な鑑別法が望まれている。

【0004】

各研究者はAIPに特異的な自己抗体の探索を行っているが、これまでに、血中ラクトフェリン（LF）抗体及びカルボニックアンヒドラーゼII（CAII）抗体の活性があることを見出している。しかしながら、AIPにおける抗体陽性率はそれぞれ73%、53.8%と臨床的感度に欠けており、方法的な信頼性・再現性も乏しく、診断や鑑別診断には不相当である（非特許文献1、2）。

10

【0005】

さらに言えば、AIPの治療の経過を血液検査によりモニタリングすることは投薬量や投薬時期の決定に必要であるが、先に述べた理由と同様に、検査費用が高コストであることが問題となっている。

【0006】

一方、現在、FT1DMの診断は、2004年に日本糖尿病学会劇症型糖尿病調査委員会により提示された、「劇症1型糖尿病診断基準」により診断されている。それによれば、検体検査として、HbA1C、血糖値、尿中または血中C-ペプチドを測定する。さらに、参考所見として、GAD抗体、IA-2抗体などの自己抗体が陰性であることを確認し、血中膵外分泌酵素の上昇を見ることになっている。

20

【0007】

したがって、本疾患においても検査項目数が多く、その診断には費用がかかること、検査が非特異的であることが問題である。

【0008】

また、本疾患は、高血糖による症状が発現した後、数日でケトアシドーシスに陥ることが多く、確実に診断し治療を早急に開始しないと生命の危機にさらされる。また妊娠中に発症する例が多く、その際は胎児死亡をほとんどがきたす。したがって、通常の糖尿病の発症時にも上記検査項目の測定を行い、FT1DMと1型糖尿病及び2型糖尿病を鑑別するのが望ましいが、良い除外診断のためのFT1DMの検査マーカーがなく、検査項目数が多いため、実際には鑑別診断がなされていないと言うのが現状である。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】N. Engl. J. Med. 2001, 344:732-8

【非特許文献2】J. Gastroenterol. 2001, 36:293-302

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みてなされたものであり、自己免疫性膵炎(AIP)及び劇症1型糖尿病(FT1DM)の検査方法及び検査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】

【0011】

本発明者は、AIP及びFT1DMの患者並びにFT1DMの発症可能性の高い者の血清にヒートショックタンパク質の一種であるHSP10に対する抗体が存在することを見出し、本発明を完成した。

50

【0012】

すなわち、本発明は、以下のものを提供する。

(1) 検体中の、HSP10と免疫学的に反応する抗体を検出することにより自己免疫性膵炎を検査することを特徴とする自己免疫性膵炎の検査方法。

(2) 検体中の、HSP10と免疫学的に反応する抗体を検出することにより劇症1型糖尿病を検査することを特徴とする劇症1型糖尿病の検査方法。

上記(1)～(2)の検査方法においては、前記抗体と免疫学的に反応する抗原を用いることにより前記抗体を検出することが好ましい。

【0013】

また、本発明は、HSP10と免疫学的に反応する抗体と免疫学的に反応する抗原を含む、
上記(1)～(2)の検査方法に用いるための検査試薬を提供する。

10

【発明の効果】

【0014】

抗HSP10抗体の測定による自己免疫性膵炎の診断は特異的である。従って、検査項目が1項目になることによる検査コストの削減、膵癌との鑑別診断が確実に行われること、治療経過観察が可能であること、による不必要な手術や投薬の削減により、医療費の大幅な削減が実現する。

【0015】

劇症1型糖尿病と急性発症1型及び2型糖尿病の鑑別は、従来の技術の欄で説明したように、特異的なマーカーがなく、また除外診断のための検査項目数が多いために実際には行われていない。しかし、本発明による測定を行えば、わずか1項目の測定で確定診断及び鑑別診断を行うことができる。またイムノクロマト法をはじめとした簡易検査方法に本測定法を応用すれば、さらに迅速にその場で劇症1型糖尿病の診断を行うことができる。このようにして、従来は死に至っていた患者(さらに患者の胎児)を早期診断、救命することができるとともに、検査にかかる費用の削減及び重症化することによる医療費の削減に大きく寄与する。

20

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】参考例2の測定結果を示す(電気泳動写真)。(a)ウェスタンブロット分析、(b)ELISA。

30

【図2】実施例1で得られた、種々の膵臓疾患患者におけるヒトHSP10に対する自己抗体の存在率の測定結果を示す。AIP:自己免疫性膵炎(before:コルチコステロイド治療前、after:コルチコステロイド治療後)、CP:アルコール性慢性膵炎、PT:膵腫瘍、N:健常人。図中、点線は、健常人の平均値+3SDを示す。

【図3】実施例2で得られた、種々の糖尿病患者におけるヒトHSP10に対する自己抗体の存在率の測定結果を示す。FT1DM:劇症1型、AT1DM:急性1型、T2DM:2型、N:健常人、FDR:FT1DM患者の第1度近親者、Hashimoto:橋本病。図中、点線は、健常人の平均値+3SDを示す。

【図4】実施例3で得られた、AIP患者及びFT1DM患者における抗HSP10抗体の経時変化を示す。(a)AIP(図中矢印は、コルチコステロイド治療開始時を示す)、(b)FT1DM。図中、点線は、健常人の平均値+3SDを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明の実施の形態を説明する。先ず、本発明検査方法について説明する。

本発明検査方法は、検体中の、HSP10と免疫学的に反応する抗体(以下、「抗HSP10抗体」とも表記する)を検出することにより自己免疫性膵炎(AIP)もしくは劇症1型糖尿病(FT1DM)を検査することを特徴とする。

【0018】

検出の方法としては、抗HSP10抗体を検出できる限り限定されない。通常には、抗HSP10抗体と免疫学的に反応する抗原または抗体を用いる免疫学的方法が挙げられる。抗体より

50

も抗原の方が、調製が容易であることから、抗HSP10抗体と免疫学的に反応する抗原を用いる免疫学的方法が好ましい。免疫学的方法としては、一般に広く使用されているELISA法が挙げられる。

【0019】

抗原は、検体に存在する抗HSP10抗体と免疫学的に反応するものであればよく、ヒトまたは動物から精製したHSP10分子を使用できる。リコンビナント技術によりHSP10分子を調製してもよい。例えば、ヒトHSP10をコードする塩基配列が公知である（GenBankアクセッション番号NM_002157。コードされるアミノ酸配列を配列番号1に示す。また、検体に存在する抗HSP10抗体と免疫学的に反応するものである限り、HSP10分子の部分断片を使用することもできる。

10

【0020】

測定対象となる検体は、通常には、血清であるが、反応工程の反応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。

【0021】

検出の条件は、従来の免疫学的方法と同様の条件で行うことができる。すなわち、各反応物質の添加順序や量、反応温度、反応時間等の条件は、従来の免疫学的方法と同様でよく、例えば、ビーズ、チューブまたはプレート等などの固相に固定した抗原と、血清を反応させ、血清中に含まれる未結合のIgGを除去した後、抗原に結合した抗体に、酵素標識した抗IgG抗体を結合させ、酵素の反応により検出する方法が挙げられる。

【0022】

抗HSP10抗体の量は、通常には、標識の測定値として算出される。あるいは、既知濃度の抗HSP10抗体を含む標準試料により検量線を作成して検量線により濃度を求めてもよい。

20

【0023】

陽性の判定は、健常人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人の値から有意に値が高い場合（例えば、2SD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。

【0024】

本発明検査方法により測定される抗HSP10抗体の上昇は、AIPやFT1DMに特異的なため、本発明検査方法によれば、AIPやFT1DMが疑われる場合において、1項目の測定により特異的にAIPやFT1DMを検査できる。

30

【0025】

次に、本発明検査試薬について説明する。本発明検査試薬は、本発明検査方法を実施するためのものであって、抗HSP10抗体と免疫学的に反応する抗原を含む。

【0026】

抗HSP10抗体と免疫学的に反応する抗原については、本発明検査方法に関し説明した通りである。

【0027】

さらに、本発明検査試薬は、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いてもよく、キットとして提供することもできる。

40

【0028】

本発明検査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検査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。

【0029】

例えば、ELISAのキットの場合、抗原を固定した固相プレート、洗浄液、検体希釈液、酵素標識抗HSP10抗体溶液、基質液、及び、反応停止液を含むキットとすることができる。また、イムノクロマト法のキットでは、反応デバイス及び展開液を含むキットとすることができる。

50

【実施例】

【0030】

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。

【0031】

[参考例1] ヒト膵臓からのcDNAのクローニング

ヒト膵臓cDNAライブラリー (TriplEx2ヒト膵臓ライジンサートcDNAライブラリー、BD Bioscience Clontech) 及びE. coli XL-1コンピテント細胞 (BD Bioscience Clontech) を用いた。プレート上のプラークを、10 mMイソプロピル-D-チオガラクトシド (IPTG) に予め浸したニトロセルロース膜に転写し、0.05% Tween 20を含むTris緩衝食塩水 (TBST) で洗浄し、1%ウシ血清アルブミンを含むTris緩衝食塩水でブロッキングした。膜を、慢性膵炎 (AIP) 患者 (67歳、男性) から提供された血清 (TBSTで500倍に希釈) と共に、一晚、4℃でインキュベートした。TBSTで4回洗浄し、ヤギセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG (American Qualex、TBSTで2000倍に希釈) と、室温で30分、反応させた。TBSTで4回洗浄し、3,3'-ジアミノベンチジンで陽性反応を検出した。

10

【0032】

以上の方法により、AIP患者の血清を用いて得た 2×10^6 個のプラークをスクリーニングして、陽性クローンを得た。

【0033】

陽性クローンのcDNA断片を、センスプライマー-5'-ATGGGGATCCGCAGGACAAGCGTTTAGA-3' (配列番号2) 及びアンチセンスプライマー-5'-CTTCGAAT TCTCAGTCTACGTACTTTCC -3' (配列番号3) を用いてPCRで増幅した。PCR産物をBamHI及びEcoRIで消化し、pTrcHisB (Invitrogen) に連結した。挿入cDNAの配列決定及びホモロジー検索により、10クローンのうち一つはヒトHSP10の配列に一致した。Monziniら (Biochim. Biophys. Acta. 1218:478-480, 1994) によりクローニングされたヒトHSP10の配列と比較した結果、全長のコード配列を含んでいた。

20

【0034】

[参考例2] ヒトHSP10に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析及びELISA

参考例1に示すように、スクリーニングに用いたAIP患者のIgGは、HSP10を認識した。E. coli BL21を用いて、ヒスチジンタグを付けたHSP10を調製した。具体的には、配列決定後、プラスミドをE. coli BL-21 (Novagen) にトランスフェクトし、組換えタンパク質は、1 mM IPTGで誘導して生成させ、His Bondカラムクロマトグラフィーにより精製した。

30

【0035】

調製したタンパク質0.1%SDS-15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜への転写を、Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:774-779, 2006に記載された方法を下記のように改変して行った。膜を、2%BSA及び2%ヤギ血清を含むTris緩衝食塩水 (TBS) でブロックし、0.1%BSAを含むTBSで1000倍に希釈したAIP患者の血清と室温で1時間インキュベートした。TBSTで5回洗浄し、ヤギセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG (American Qualex、1%BSAで2000倍に希釈) と、室温で30分、反応させた。参考例1と同様にして陽性反応を検出した。

40

【0036】

結果を図1(a)に示す。患者の血清 (レーン1) は明確に14kDa組換えタンパク質を認識したが、健康人の血清 (レーン2及び3) は認識しなかった。患者の血清を組換えタンパク質と4℃で一晚、予めインキュベートすると免疫染色は消失した (図1(b)、はめ込み図)。

【0037】

Diabetes Care 24:1661-7, 2001に記載されたELISAに準じて、調製したタンパク質をプレートにコートし、血清中の抗HSP10抗体を検出するELISAを構築した。具体的には以下の通りである。マイクロタイタープレート (Coster 3590, Corning Inc.) を、組換えヒトHSP10の0.1 µg (50 µl) により、一晚4℃でコーティングした。0.05% Tween 20を含むリン酸

50

緩衝食塩水(PBST)で3回洗浄し、リン酸緩衝液中10%ウシ血清アルブミン(BSA)溶液の200 μ lと共に30分インキュベートした。PBSTで洗浄後、測定に用いた。測定は、患者の血清を、1%BSAで200倍に希釈して3連で行った。結合した抗体を、ヤギセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG(American Qualex、1%BSAで2000倍に希釈)と、室温で30分、反応させた。PBSTで洗浄後、プレートを、1-Step Slow TMB-ELISA(PIERCE)100 μ lと共に30分インキュベートした。100 μ lの1 M H_2SO_4 を加えて反応を停止し、450nmの吸光度を測定した。

【0038】

正常血清と比較して、患者血清は、強いシグナルを生じた。このシグナルは、患者の血清(1000倍希釈、1 ml)をHSP10(1 μ g)と、4 で一晚、予めインキュベートすると消失した。三連で行われた測定結果を図1(b)に示す。

10

【0039】

[実施例1] 膵臓疾患患者におけるヒトHSP10に対する自己抗体の存在率

参考例のELISAを用いて種々の膵臓疾患患者(AIP 12例、アルコール性慢性膵炎 13例、膵腫瘍[膵臓癌 2例、膵管内乳頭腫瘍(IPMT) 6例])及び健常人(71例)におけるヒトHSP10に対する自己抗体の存在率を測定した(図2)。健常人の平均値+3SDを超えるときを陽性としたとき、AIP患者(治療前)は12例中10例(95%)でHSP10に対して陽性であった。しかし、その他の血清では、健常人で1例陽性になった他は全て陰性であった。また、コルチコステロイドで治療したAIP患者では8例中5例(63%)が陰性となった。

【0040】

20

以上の結果から、本検査方法はAIPの確定診断に非常に有効な方法であることが示された。

【0041】

[実施例2] DM患者におけるヒトHSP10に対する自己抗体の存在率

参考例2のELISAを用いて種々の型のDM患者(劇症1型DM 16例、急性1型DM 40例、2型糖尿病 50例)、FT1DM患者の第1度近親者 21例、橋本病患者 54例及び健常人 71例におけるヒトHSP10に対する自己抗体の存在率を測定した(図3)。FT1DM患者16例中13例(81%)で陽性を示した。しかし、急性発症1型DM患者及び健常人では、低頻度で検出された(それぞれ、10%及び2%)。2型糖尿病患者では全て陰性であった。代表的な器官特異的自己免疫疾患である橋本病の患者では1例(2%)が陽性であった。FT1DM発症患者の第1度近親者では1例(5%)で本抗体が陽性であった。

30

【0042】

以上の結果から、本検査方法がFT1DMの診断に有用であることが示された。

【0043】

[実施例3] AIP患者及びFT1DM患者における抗HSP10抗体の経時変化

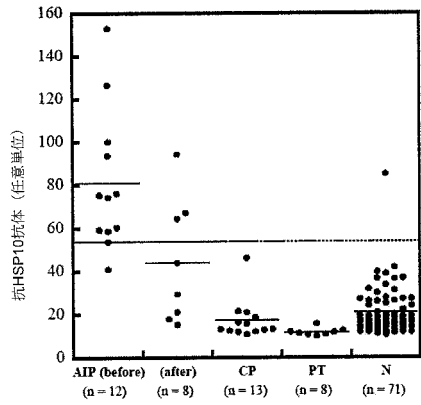
上記ELISAを用いて、AIP患者及びFT1DM患者における抗HSP10抗体の経時変化を調べた。AIP患者(2例)では12~14月、FT1DM患者(2例)では7~10週、それぞれ経過を観察した。三連で行われた測定結果を図4に示す。AIP患者では、発症時から陽性であり、コルチコステロイド治療を開始するまで陽性が継続し、コルチコステロイド治療を開始後、抗体価が低下または消失した(図4(a))。FT1DM患者では、発症時は陽性であったが、経過と共に抗体価が低下した(図4(b))。

40

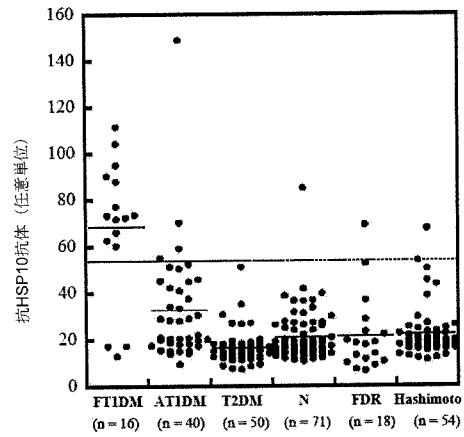
【0044】

以上の結果から、本検査方法はAIP及びFT1DMの経過観察に非常に有効な方法であることが示された。

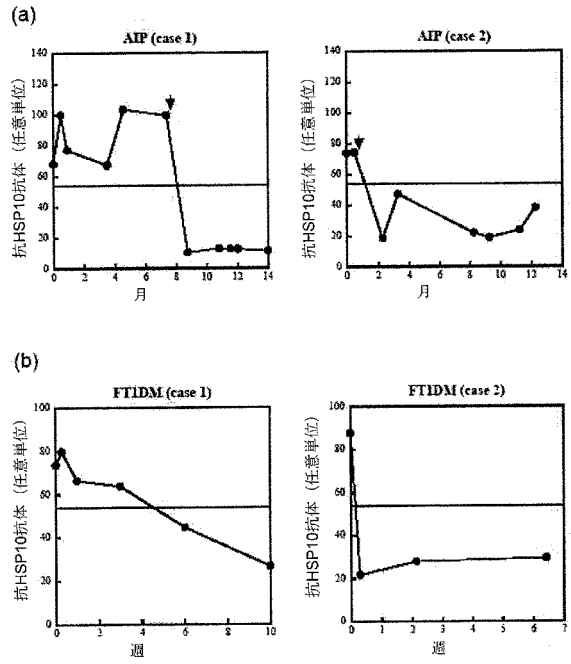
【 図 2 】



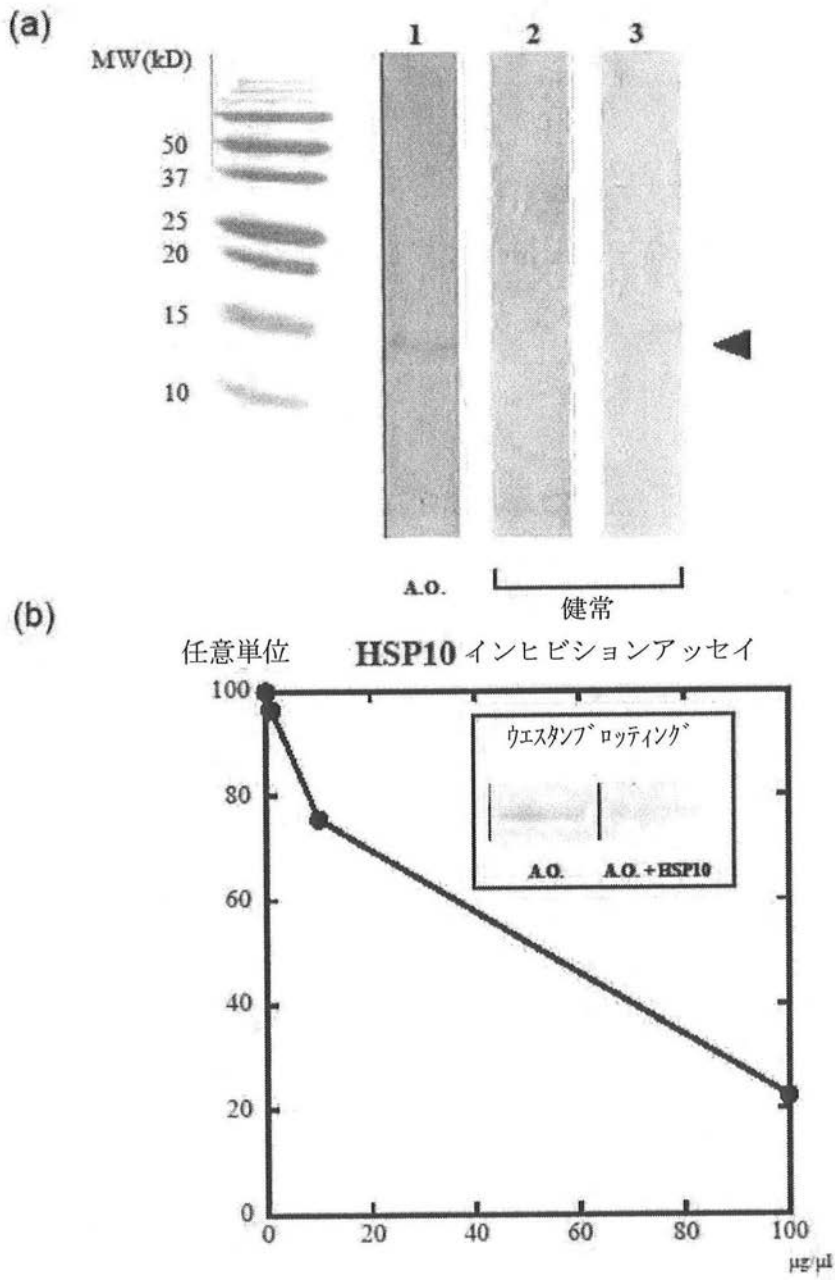
【 図 3 】



【 図 4 】



【図1】



【配列表】

0005413863000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第1項適用 68 th scientific sessions JUNE 6-10
2008 American Diabetes Association 掲載日 2008年5月23日
掲載アドレス http://professional.diabetes.org/Congress_Display.aspx?TYP=9&CID=58000

(72)発明者 滝澤 壮一
山梨県中央市下河東1110番地 国立大学法人山梨大学内

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第2008/136510(WO, A1)

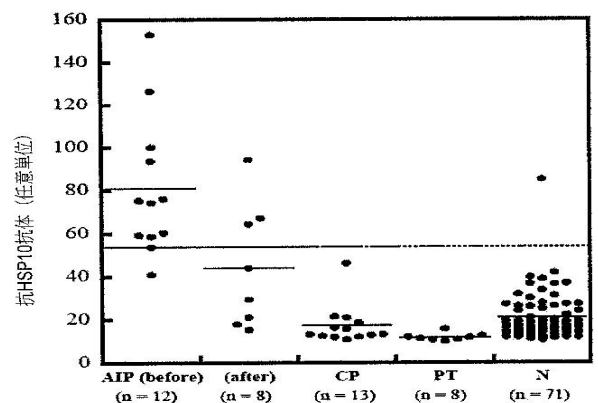
(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	暴发性1型糖尿病的试验方法和试验试剂		
公开(公告)号	JP5413863B2	公开(公告)日	2014-02-12
申请号	JP2012181577	申请日	2012-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人山梨大学 コスミック集团		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人山梨大学 宇宙有限公司总公司		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人山梨大学 宇宙有限公司总公司		
[标]发明人	小林哲郎 遠藤登代志 滝澤壮一		
发明人	小林 哲郎 遠藤 登代志 滝澤 壮一		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	川口义行		
其他公开文献	JP2012225941A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为暴发性1型糖尿病 (FT1DM) 提供检查方法和检查试剂。解决方案：通过检测样品中与HSP 10免疫反应的抗体，检查 FT1DM。抗体的检测通过例如使用待与抗体免疫反应的抗原的免疫学方法进行。

【 图 2 】



【 图 3 】