

(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2015-212237

(P2015-212237A)

(43) 公開日 平成27年11月26日(2015.11.26)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 7/06	C 0 7 K 7/06	4 H 0 4 5
G01N 33/53	G 0 1 N 33/53	V

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2014-95286 (P2014-95286)	(71) 出願人	504224153 国立大学法人 宮崎大学 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
(22) 出願日	平成26年5月2日 (2014.5.2)	(71) 出願人	000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区晴海一丁目8番10号
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100120905 弁理士 深見 伸子
		(72) 発明者	北村 和雄 宮崎県宮崎市清武町木原5200 国立大学法人宮崎大学医学部内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規ペプチドおよびその使用方法

(57) 【要約】

【課題】検体中の、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配列の18位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの14位のアスパラギン酸残基に糖鎖が付加されたN-結合型糖鎖ペプチド(ビッグアンジオテンシン-25)を特異的、且つ、高感度に測定する手段を提供すること。

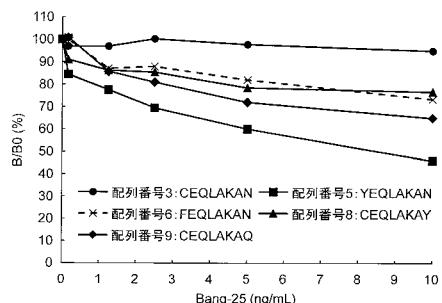
【解決手段】下記式(I)で表されるペプチド：

Xaa1-Glu-Gln-Leu-Ala-Lys-Ala-Xaa2 (I)

(式(I)において、Xaa1はシステインまたは芳香族アミノ酸を表し、Xaa2は芳香族アミノ酸、酸性アミノ酸、またはカルボン酸アミドを有するアミノ酸を表す。但し、Xaa1がシステインであり、且つ、Xaa2がアスパラギンであるペプチドを除く。)、当該ペプチドを用いる、検体中のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法。

。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (I) で表されるペプチド。

Xaa1-Glu-Gln-Leu-Ala-Lys-Ala-Xaa2 (I) (配列番号 2)

(式 (I) において、Xaa1はシステインまたは芳香族アミノ酸を表し、Xaa2は芳香族アミノ酸、酸性アミノ酸、またはカルボン酸アミドを有するアミノ酸を表す。但し、Xaa1がシステインであり、且つ、Xaa2がアスパラギンであるペプチドを除く。)

【請求項 2】

Xaa1がシステイン、チロシン、またはフェニルアラニンであり、Xaa2がチロシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、またはアスパラギンである、請求項 1 に記載のペプチド。

10

【請求項 3】

Xaa1がチロシンであり、Xaa2がアスパラギンである、請求項 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

検体中の、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配列の 18 位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの 14 位のアスパラギン残基に糖鎖が付加された N - 結合型糖鎖ペプチド (以下、ビッグアンジオテンシン - 25 という) の免疫学的測定法であって、検体中のビッグアンジオテンシン - 25 を、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体、および、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のペプチドと反応させることを特徴とする方法。

20

【請求項 5】

抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ペプチドが、標識物質が結合した標識化ペプチドである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

検体中の、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配列の 18 位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの 14 位のアスパラギン残基に糖鎖が付加された N - 結合型糖鎖ペプチド (以下、ビッグアンジオテンシン - 25 という) の免疫学的測定法であって、グリコシダーゼ処理された検体を、担体に固定化された配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体、および、アンジオテンシン II に結合する抗体と反応させることを特徴とする方法。

30

【請求項 8】

以下の工程を含む、請求項 7 に記載の方法。

(1) 検体をグリコシダーゼ処理し、検体中のビッグアンジオテンシン - 25 の N - 結合型糖鎖を切断する工程；

(2) (1) の工程で生成した、N - 結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン - 25 と、担体に固定化された配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体とを反応させて、担体上に、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体と、N - 結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン - 25 とからなる免疫複合体 1 を生成させる工程；

40

(3) (2) の工程で生成した免疫複合体 1 と、アンジオテンシン II に結合する抗体とを反応させ、担体上に、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体、N - 結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン - 25 、および、アンジオテンシン II に結合する抗体からなる免疫複合体 2 を生成させる工程；

(4) (3) の工程で生成された担体上の免疫複合体 2 と、それ以外の物質とを分離する工程；および、

(5) (4) の工程で得られた担体上の免疫複合体 2 の生成量を測定する工程。

【請求項 9】

50

アンジオテンシンIIに結合する抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

検体が尿である、請求項4～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

検体中の、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配列の18位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの14位のアスパラギン残基に糖鎖が付加されたN-結合型糖鎖ペプチド（以下、ビッグアンジオテンシン-25という）の免疫学的測定用試薬であって、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体、および、請求項1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有する試薬。

10

【請求項12】

抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、請求項11に記載の試薬。

【請求項13】

ペプチドが、標識物質が結合した標識化ペプチドである、請求項11に記載の試薬。

【請求項14】

検体中の、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配列の18位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの14位のアスパラギン残基に糖鎖が付加されたN-結合型糖鎖ペプチド（以下、ビッグアンジオテンシン-25という）の免疫学的測定用試薬であって、グリコシダーゼ、担体に固定化された配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体、および、アンジオテンシンIIに結合する抗体を含有する試薬。

20

【請求項15】

アンジオテンシンIIに結合する抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、請求項14に記載の試薬。

【請求項16】

検体が尿である、請求項11～15のいずれかに記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、検体中の配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または当該アミノ酸配列の18位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの14位のアスパラギン残基に糖鎖が付加されたN-結合型糖鎖ペプチド（以下、ビッグアンジオテンシン-25といい、Bang-25と略記することもある）の免疫学的測定法、免疫学的測定用試薬、および当該測定法または当該測定用試薬に用いる新規ペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

レニン・アンジオテンシン系（Renin-Angiotensin System: RAS）は、血圧および体液バランスにおいて重要な役割を果たしており、腎臓疾患または循環器疾患の発症や進展に深く関与している。循環液中のRASの機序において、まず、主に肝臓で合成される452個のアミノ酸からなるアンジオテンシノーゲンが、腎臓から分泌されるレニンによって、アンジオテンシンI(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)に変換される。続いて、アンジオテンシンIは、肺毛細血管に存在するアンジオテンシン変換酵素（ACE）によって、アンジオテンシンII(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)に変換される。アンジオテンシンIIは、その受容体であるアンジオテンシンII受容体に結合することによって、血管の収縮、アルドステロンの分泌、ナトリウムの再吸収を促し、血圧上昇を惹起する。また、最近では、アンジオテンシンII由来のペプチドであるアンジオテンシン（1-7）(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro)、アンジオテンシンIII(Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)、アンジオテンシンIV(Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)の報告もある（非特許文献1、2）。

40

50

【0003】

本発明者らは、これまでに、アンジオテンシンIよりC末端側に2アミノ酸長い12アミノ酸からなり、アンジオテンシノーゲンのN末端のアミノ酸1から12番目に相当するポリペプチド(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile)(特許文献1)、ならびに、アンジオテンシノーゲンのN末端のアミノ酸1から25番目に相当するポリペプチド(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Asn-Glu-Ser-Thr-Cys-Glu-Gln-Leu-Ala-Lys-Ala-Asn)、または、当該アミノ酸配列の18位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの14位のアスパラギン残基にN-結合型糖鎖を付加したポリペプチド、すなわち、ビッグアンジオテンシン-25(Bang-25)を見出した(非特許文献3)。また、本発明者らは、アンジオテンシノーゲンのN末端のアミノ酸1から12番目に相当するポリペプチドに結合する抗体を用いたラジオイムノアッセイ法(RIA法)を構築し、尿中Bang-25濃度を測定する方法を開発した(非特許文献4)。しかしながら、当該抗体は、Bang-25以外に、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシン(1-7)、アンジオテンシンIII、アンジオテンシンIV等にも結合することから、試料中のBang-25を特異的に測定できないという問題があった。また、ラジオイムノアッセイ法は操作が煩雑で有り、測定時間が長いという問題もあった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

20

【特許文献1】特開2008-7482号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Science, Vol. 184, pp. 994-996 (1974)

【非特許文献2】Am. J. Physiol., Vol. 268, pp. 302-308 (1995)

【非特許文献3】Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 29 pp. 757-762 (2013)

【非特許文献4】Circ J. 2014;78 (Suppl I):abstract No. OE-329 page No. 999

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

30

従って、本発明の課題は、検体中のビッグアンジオテンシン-25を特異的、且つ、高感度に測定する手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、アンジオテンシノーゲンのN末端のアミノ酸18から25番目に相当する配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの特定の置換体と、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体(以下、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体という)とを用いる免疫学的測定法により、検体中のビッグアンジオテンシン-25を特異的に、且つ、高感度に測定できるという知見を見いだした。本発明者らはまた、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体と、アンジオテンシンIIに結合する抗体とを用いる、検体中のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法において、担体に固定化したビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、グリコシダーゼ処理した検体を用いることにより、ビッグアンジオテンシン-25を特異的に、且つ、高感度に測定できるという知見を見いだした。本発明はかかる知見により完成されたものである。

40

【0008】

すなわち、本発明は、以下の[1]～[16]に関する。

[1] 下記式(I)で表されるペプチド。

Xaa1-Glu-Gln-Leu-Ala-Lys-Ala-Xaa2 (I) (配列番号2)

(式(I)において、Xaa1はシステインまたは芳香族アミノ酸を表し、Xaa2は芳香族アミ

50

ノ酸、酸性アミノ酸、またはカルボン酸アミドを有するアミノ酸を表す。但し、Xaa1がシステインであり、且つ、Xaa2がアスパラギンであるペプチドを除く。)

[2] Xaa1がシステイン、チロシン、またはフェニルアラニンであり、Xaa2がチロシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、またはアスパラギンである、[1]に記載のペプチド。

[3] Xaa1がチロシンであり、Xaa2がアスパラギンである、[2]に記載のペプチド。

[4] 検体中のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法であって、検体中のビッグアンジオテンシン-25を、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、[1]～[3]のいずれかに記載のペプチドと反応させることを特徴とする方法。

[5] 抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、[4]に記載の方法。 10

[6] ペプチドが、標識物質が結合した標識化ペプチドである、[4]に記載の方法。

[7] 検体中のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法であって、グリコシダーゼ処理された検体を、担体に固定化されたビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、アンジオテンシンIIに結合する抗体と反応させることを特徴とする方法。

[8] 以下の工程を含む、[7]に記載の方法。

(1) 検体をグリコシダーゼ処理し、検体中のビッグアンジオテンシン-25のN-結合型糖鎖を切断する工程；

(2) (1)の工程で生成した、N-結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン-25と、担体に固定化されたビッグアンジオテンシン-25C末抗体とを反応させて、担体上に、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体と、N-結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン-25とからなる免疫複合体1を生成させる工程； 20

(3) (2)の工程で生成した免疫複合体1と、アンジオテンシンIIに結合する抗体とを反応させ、担体上に、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、N-結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン-25、および、アンジオテンシンIIに結合する抗体からなる免疫複合体2を生成させる工程；

(4) (3)の工程で生成された担体上の免疫複合体2と、それ以外の物質とを分離する工程；および、

(5) (4)の工程で得られた担体上の免疫複合体2の生成量を測定する工程。

[9] アンジオテンシンIIに結合する抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、[7]または[8]に記載の方法。 30

[10] 検体が尿である、[4]～[9]のいずれかに記載の方法。

[11] 検体中のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定用試薬であって、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、[1]～[3]のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有する試薬。

[12] 抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、[11]に記載の試薬。

[13] ペプチドが、標識物質が結合した標識化ペプチドである、[11]に記載の試薬。

[14] 検体中のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定用試薬であって、グリコシダーゼ、担体に固定化されたビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、アンジオテンシンIIに結合する抗体を含有する試薬。 40

[15] アンジオテンシンIIに結合する抗体が、標識物質が結合した標識化抗体である、[14]に記載の試薬。

[16] 検体が尿である、[11]～[15]のいずれかに記載の試薬。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、検体中のビッグアンジオテンシン-25を特異的、且つ、高感度に検出する免疫学的測定法、免疫学的測定用試薬、および当該測定法または当該測定用試薬に用いる新規ペプチドが提供される。本発明の免疫学的測定法により、腎臓疾患および循環器疾患を早期、且つ、簡便に診断することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

10

30

40

50

【0010】

【図1】ビッグアンジオテンシン-25C末抗体と、配列番号3、4、7で表されるアミノ酸配列からなる各ペプチドとの反応性を示す。

【図2】配列番号3、5、6、8、9で表されるアミノ酸配列からなる各ペプチドを競合物質として用いて検体中のビッグアンジオテンシン-25を競合法で測定した際の、検体中のビッグアンジオテンシン-25濃度とB/B0の関係を表すグラフである。 は配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを、 は配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを、 × は配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを、 △ は配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを、 ■ は配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるペプチドをそれぞれ用いた結果を表す。

10

【図3】サンドイッチ法での検体中のビッグアンジオテンシン-25濃度と吸光度の関係を表すグラフである。 はグリコシダーゼ処理しない場合の結果を、 はグリコシダーゼ処理した場合の結果をそれぞれ表す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

<ペプチド>

本発明の新規ペプチドとしては、下記式(I)で表されるペプチドが挙げられる。

Xaa1-Glu-Gln-Leu-Ala-Lys-Ala-Xaa2 (I) (配列番号2)

(式(I)において、Xaa1はシステインまたは芳香族アミノ酸を表し、Xaa2は芳香族アミノ酸、酸性アミノ酸、またはカルボン酸アミドを有するアミノ酸を表す。但し、Xaa1がシステインであり、且つ、Xaa2がアスパラギンであるペプチドを除く。)

20

【0012】

Xaa1における芳香族アミノ酸としては、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン等が挙げられ、チロシン、フェニルアラニン等が好ましい。Xaa2における芳香族アミノ酸としては、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン等が挙げられ、酸性アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられ、カルボン酸アミドを有するアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン等が挙げられる。

【0013】

本発明における配列番号2で表されるアミノ酸配列の具体例としては、配列番号5で表されるアミノ酸配列、配列番号6で表されるアミノ酸配列、配列番号8で表されるアミノ酸配列、配列番号9で表されるアミノ酸配列等が挙げられ、配列番号5で表されるアミノ酸配列が好ましい。

30

【0014】

本発明のペプチドは、有機合成化学的方法、遺伝子工学的方法、固相法等の通常の方法によって合成できる。

【0015】

本発明のペプチドは、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体を用いる、本発明のビッグアンジオテンシン-25の競合法による免疫学的測定法において、競合物質として用いることができる。

40

【0016】

<免疫学的測定法>

本発明のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法は、ビッグアンジオテンシン-25とビッグアンジオテンシン-25C末抗体との抗原抗体反応において、本発明のペプチドを競合物質として用いる競合法による免疫学的測定法である。また、本発明のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法は、グリコシダーゼ処理した検体を用い、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体とアンジオテンシンIIに結合する抗体を用いるサンドイッチ法による免疫学的測定法である。

【0017】

本発明の測定法の具体例として、競合法として以下の測定方法1および2、サンドイッチ法として以下の測定方法3の方法が挙げられるが、本発明は、これら の方法に限定され

50

るものではない。本発明のビッグアンジオテンシン - 25 の免疫学的測定法において、検体中のビッグアンジオテンシン - 25 濃度は、免疫複合体の生成量により決定され、下記の測定方法ではいずれも免疫複合体の生成量は、免疫複合体中の標識量として測定される。

【0018】

・測定方法 1

以下の(1)～(4)の工程を順次行う測定方法。

(1) 検体中のビッグアンジオテンシン - 25 を、標識化競合物質、および、ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と反応させて、ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と標識化競合物質とからなる免疫複合体、および、ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体とビッグアンジオテンシン - 25 とからなる免疫複合体を生成させる工程；

(2) ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と標識化競合物質とからなる免疫複合体を、未反応の標識化競合物質から分離する工程；

(3) ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と標識化競合物質とからなる免疫複合体中の標識量を測定する工程；および、

(4) ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と標識化競合物質とからなる免疫複合体中の標識量を、予め作成したビッグアンジオテンシン - 25 濃度と標識量との間の関係を示す検量線に照らし合わせて、検体中のビッグアンジオテンシン - 25 の濃度を決定する工程。

【0019】

測定方法 1において、ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体は、担体に固定化されていることが好ましい。工程(1)の反応は、後述の水性媒体中で行われることが好ましい。工程(1)の反応における反応温度は、当該免疫複合体を生成し得る反応温度であれば特に制限はなく、例えば 0～50 であり、4～40 が好ましい。また、工程(1)の反応における反応時間は、当該免疫複合体を生成し得る反応時間であれば特に制限はなく、例えば 1 分間～24 時間であり、5 分間～20 時間が好ましい。工程(3)における標識量の測定は後述の方法により行うことができる。

【0020】

・測定方法 2

以下の(1)～(4)の工程を順次行う測定方法。

(1) 検体中のビッグアンジオテンシン - 25 を、ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体に標識物質が結合した標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体、および、競合物質と反応させて、標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と競合物質とからなる免疫複合体、および、標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体とビッグアンジオテンシン - 25 とからなる免疫複合体を生成させる工程；

(2) 標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と競合物質とからなる免疫複合体を、未反応の標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体、および、標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体とビッグアンジオテンシン - 25 とからなる免疫複合体から分離する工程；

(3) 標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と競合物質とからなる免疫複合体中の標識量を測定する工程；および、

(4) 標識化ビッグアンジオテンシン - 25 C 未抗体と競合物質とからなる免疫複合体中の標識量を、予め作成したビッグアンジオテンシン - 25 濃度と標識量との間の関係を示す検量線に照らし合わせて、検体中のビッグアンジオテンシン - 25 の濃度を決定する工程。

【0021】

測定方法 2において、競合物質は、担体に固定化されていることが好ましい。工程(1)の反応は、後述の水性媒体中で行われることが好ましい。工程(1)の反応における反応温度は、当該免疫複合体を生成し得る反応温度であれば特に制限はなく、例えば 0～50 であり、4～40 が好ましい。また、工程(1)の反応における反応時間は、当該

10

20

30

40

50

免疫複合体を生成し得る反応時間であれば特に制限はなく、例えば1分間～24時間であり、5分間～20時間が好ましい。工程(3)における標識量の測定は後述の方法により行うことができる。

【0022】

測定方法1および2において使用される標識化競合物質としては、標識化された本発明のペプチドが用いられる。本発明のペプチドを標識化する方法は、本発明のペプチドと後述の標識物質とを用いて、後述の方法により作製することができる。

【0023】

・測定方法3

以下の(1)～(6)の工程を含む測定方法。

(1) 検体をグリコシダーゼ処理し、検体中のビッグアンジオテンシン-25のN-結合型糖鎖を切断する工程；

(2) (1)の工程で生成した、N-結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン-25と、担体に固定化されたビッグアンジオテンシン-25C末抗体とを反応させて、担体上に、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体と、N-結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン-25とからなる免疫複合体1を生成させる工程；

(3) (2)の工程で生成した免疫複合体1と、アンジオテンシンIIに結合する抗体に標識物質が結合した標識化抗アンジオテンシンII抗体とを反応させ、担体上に、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、N-結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン-25、および、標識化抗アンジオテンシンII抗体からなる免疫複合体2を生成させる工程；

(4) (3)の工程後の担体を洗浄し、担体上の免疫複合体2と、それ以外の物質とを分離する工程；

(5) (4)の工程で得られた担体上の免疫複合体2中の標識量を測定する工程；および、

(6) (5)の工程で測定された標識量を、予め作成したビッグアンジオテンシン-25濃度と標識量との間の関係を示す検量線に照らし合わせて、検体中のビッグアンジオテンシン-25の濃度を決定する工程。

【0024】

測定方法3の工程(1)におけるグリコシダーゼ処理に用いられるグリコシダーゼとしては、本発明のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法を可能にするグリコシダーゼであれば特に制限は無く、例えばN-結合型糖鎖を切断するグリコシダーゼ、O-結合型糖鎖を切断するグリコシダーゼ等が挙げられ、N-結合型糖鎖を切断するグリコシダーゼが好ましい。N-結合型糖鎖を切断するグリコシダーゼの具体例(市販品)としては、例えばPeptide-N-Glycosidase F (PNGase F) (ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン社、シグマ・アルドリッヂ社等)、Endoglycosidase H (Endo H) (コスモ・バイオ社)、Endoglycosidase Hf (Endo Hf) (ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン社)、Endoglycosidase D (コスモ・バイオ社)、Endoglycosidase F1 (コスモ・バイオ社)、Endoglycosidase F2 (コスモ・バイオ社)、Endoglycosidase F3 (コスモ・バイオ社)等が挙げられる。また、N-結合型糖鎖を切断するグリコシダーゼとしては、生物由来であっても、組み換え遺伝子産物(リコンビナントタンパク質)であってもよい。

【0025】

工程(2)と工程(3)との間に担体の洗浄工程が含まれていてもよい。工程(2)と工程(3)は順次行われても、同時に行われてもよい。工程(2)の反応、および、工程(3)の反応は、後述の水性媒体中で行われることが好ましい。工程(2)の反応、および、工程(3)の反応における反応温度は、各工程で免疫複合体を生成し得る反応温度であれば特に制限はなく、例えば0～50であり、4～40が好ましい。また、工程(2)の反応、および、工程(3)の反応における反応時間は、各工程で免疫複合体を生成し得る反応時間であれば特に制限はなく、例えば1分間～24時間であり、5分間～20時間が好ましい。工程(5)における標識量の測定は後述の方法により行うことができる。

10

20

30

40

50

【0026】

また、工程(3)において、アンジオテンシンIIに結合する抗体に標識物質が結合した標識化抗アンジオテンシンII抗体の代わりに、標識物質が結合していないアンジオテンシンIIに結合する抗体を用いることもできる。その場合には、工程(3)の後、担体上で、免疫複合体2と、アンジオテンシンIIに結合する抗体に結合する抗体(第三抗体)に標識物質が結合した標識化第三抗体とを反応させ、担体上に、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、N-結合型糖鎖が切断されたビッグアンジオテンシン-25、アンジオテンシンIIに結合する抗体、および、標識化第三抗体からなる免疫複合体3を生成させ、免疫複合体3中の標識量を測定することにより、検体中のビッグアンジオテンシン-25濃度を決定することができる。

10

【0027】

測定方法1および2の工程(2)は、反応溶液を除去した後、担体を洗浄することにより容易に行うことができる。すなわち、抗原抗体反応後に反応溶液を除去し、担体を洗浄液により洗浄することにより、担体上に生成した免疫複合体と未反応の標識体(標識化抗体、標識化競合物質)とを分離することができる。

【0028】

洗浄液としては、リン酸緩衝化生理食塩水(0.15 mol/L 塩化ナトリウムを含有する10 mmol/L リン酸緩衝液、pH 7.2、以下、PBSと記す)、界面活性剤を含有するPBS、後述の水性媒体等をあげることができる。当該界面活性剤としては、例えばツイーン(Tween)20等の非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

20

【0029】

測定方法1において、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体が担体に固定化されていない場合は、(3)の工程で標識化競合物質に結合せず、当該抗体に結合する結合性物質を固定化した担体を添加して、免疫複合体を担体に結合させた後、反応溶液を除去し、さらに担体を洗浄することにより、免疫複合体と、免疫複合体に含まれない標識化競合物質とを分離することができる。また、標識化競合物質に結合せず、当該抗体に結合する結合性物質を固定化した担体の存在下で、(1)の工程の免疫複合体を生成させる反応を行い、免疫複合体の生成と免疫複合体の担体への固定化を同時に行った後、反応溶液を除去し、さらに担体を洗浄することにより、免疫複合体と、免疫複合体に含まれない標識化競合物質を分離することができる。標識化競合物質に結合せず、当該抗体に結合する結合性物質としては、例えば、当該抗体の定常領域と結合する抗体等が挙げられる。

30

【0030】

<検体>

本発明における検体としては、本発明のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法を可能にする検体であれば特に制限は無く、例えば全血、血漿、血清、髄液、唾液、腹水、リンパ液、羊水、尿、汗、脣液等が挙げられるが、血漿、血清、尿等が好ましい。また、本発明における検体としては、前処理された検体であってもよい。前処理としては、本発明のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法を可能にする前処理であれば特に制限は無く、例えば、前記したグリコシダーゼ処理等が挙げられる。

40

【0031】

<ビッグアンジオテンシン-25>

本発明の免疫学的測定法におけるビッグアンジオテンシン-25は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配列の18位のシステイン残基にさらにシステインが付加したアミノ酸配列からなるペプチドの14位のアスパラギン残基に糖鎖が付加されたN-結合型糖鎖ペプチドである。

【0032】

ビッグアンジオテンシン-25中のN-結合型糖鎖は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配列の18位のシステイン残基にさらにシステインが付加されたアミノ酸配列からなるペプチドの14位のアスパラギンに付加する糖鎖であり、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるペプチド、または、当該アミノ酸配

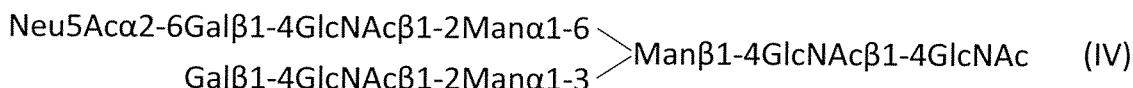
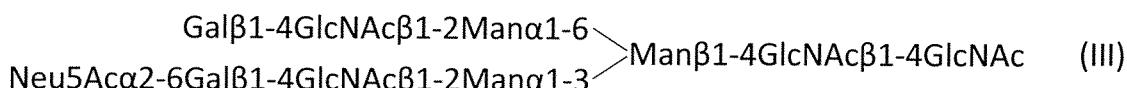
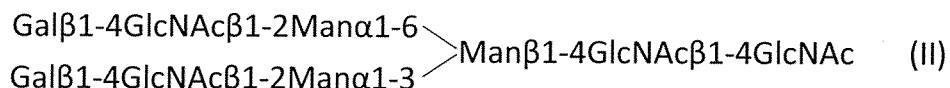
50

列の 18 位のシステイン残基にさらにシステインが付加されたアミノ酸配列からなるペプチドにレニン抵抗性を付与する活性を有する限り、特に制限はない。ビッグアンジオテンシン - 25 中の N - 結合型糖鎖は、ガラクトース (Gal)、N - アセチルグルコサミン (GlcNAc)、およびマンノース (Man) を含み、糖鎖の非還元末端に、N - アセチルノイラミン酸等のシアル酸が結合していてもよい。また、グルコース (Glu)、フコース (Fuc)、N - アセチルガラクトサミン (GalNAc)、グルクロン酸 (GlcA)、イズロン酸 (IdoA)、キシロース (Xyl)、ガラクツロン酸 (GlcA) 等を含んでいてもよい。糖鎖が分岐する場合、分岐数は、典型的には二本であるが、三本以上であってもよい。

【0033】

上記 N - 結合型糖鎖の好ましい例としては、下記式 (II)、(III)、または (IV) のいずれかに示される N - 結合型糖鎖が挙げられる。

【化1】



(上記式 (II)、(III)、(IV) 中、Gal はガラクトース、Man はマンノース、GlcNAc は N - アセチルグルコサミン、Neu5Ac は N - アセチルノイラミン酸を示す。)

【0034】

<抗体および標識化抗体>

本発明の免疫学的測定法に用いられる、ビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体としては、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体であれば特に制限はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用できる。本発明における、ビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体は、通常の抗体製造方法により取得することができ、例えば配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを、動物（マウス、ラット、ウサギ等）に免疫することにより取得することができる。本発明における、アンジオテンシン II に結合する抗体としては、アンジオテンシン II に結合し得る抗体であれば特に制限はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも使用できる。また、本発明における、アンジオテンシン II に結合する抗体は、通常の抗体製造方法により取得することができ、例えばアンジオテンシン II を、動物（マウス、ラット、ウサギ等）に免疫することにより取得することができる。また、本発明に用いる抗体としては、抗体断片を包含する。具体的には、抗体をパパイン処理により得られる F(ab)2、ペプシン処理により得られる F(ab')2、ペプシン処理 - 還元処理により得られる F(ab') 等の Fc 部分を除去した抗体断片が挙げられる。

【0035】

本発明における標識化抗体は、本発明に用いられるビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体またはアンジオテンシン II に結合する抗体と後述の標識物質とを用いて、後述の方法により作製される。

【0036】

10

20

30

40

50

< 担体 >

本発明の免疫学的測定法に用いられる担体は、本発明の免疫学的測定法に用いられる抗体または競合物質を安定に保持できるものであれば特に制限はない。担体の好ましい素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックス、磁性粒子や金属等が挙げられる。担体の好ましい形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックス等の微粒子、スティック等が挙げられる。例えば、1枚に96ウェルを有するポリスチレン製のマイクロタイプレート等が好ましい。

10

【 0 0 3 7 】

< 抗体または競合物質の担体への固定化 >

本発明の免疫学的測定法において、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質の担体への固定化方法としては、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質が担体上に安定に保持される方法であれば特に制限はなく、例えば物理学的結合を利用した方法と化学的結合を利用した方法またはこれらの併用等、公知の方法が挙げられる。物理学的結合としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学的結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。例えば、ポリスチレン製免疫測定用マイクロタイプレートを担体として使用する場合には、プレート内のウェルに抗体または競合物質の溶液を添加して、1時間から24時間、4~30でインキュベートすることにより、物理吸着させ固定化する方法をあげることができる。

20

【 0 0 3 8 】

ビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質は、直接、担体に固定化してもよいし、間接的に担体に固定化してもよい。間接的な固定化方法としては、例えばアビジンを固定化した担体に、ビオチン化した抗体または競合物質を添加し、ビオチンとアビジンとの特異的結合を介して、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質を担体に固定化する方法が挙げられる。また、担体に、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体に特異的に結合する抗体または競合物質に特異的に結合する抗体を固定化し、この抗体を介してビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質を担体に固定化してもよい。あるいは、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質は、リンカーを介した共有結合により担体に固定化してもよい。

30

【 0 0 3 9 】

リンカーとしては、例えば、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質の官能基と担体の側鎖の官能基の両者と共有結合できる分子であればどのようなものでもよい。好ましい態様は、例えば、ビッグアンジオテンシン-25C末抗体または競合物質が有する官能基と反応することができる第1の反応活性基と、担体の側鎖の官能基と反応することができる第2の反応活性基を同時に持つ分子であり、第1の反応活性基と第2の反応活性基が異なる基であることが好ましい。抗体または競合物質の官能基および担体がその表面に保持している官能基としては例えば、カルボキシ基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、N-ヒドロキシサクシニル基、マレイミド基等が挙げられる。リンカーにおける活性な反応性基としては、例えば、アリルアジド、カルボジイミド、ヒドラジド、アルデヒド、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル、ペンタフルオロフェニル(PFP)エステル、ソラレン、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン等の基が挙げられる。

40

【 0 0 4 0 】

< 標識物質 >

本発明の免疫学的測定法における、標識化抗体、すなわち、標識化ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、アンジオテンシンIIに結合する抗体に標識物質が結合した標識化抗アンジオテンシンII抗体、ならびに、標識化競合物質に使用される標識物質は、

50

本発明のビッグアンジオテンシン-25の免疫学的測定法を可能とする標識物質であれば特に制限はなく、例えば酵素、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、ビオチン、ジゴキシゲニン、タグ配列を含むポリペプチド、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子等が挙げられる。

【0041】

酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

【0042】

蛍光物質としては、例えば、FITC(フルオレッセイン イソチオシアナート)、RITC(ローダミンB-イソチオシアナート)等が挙げられる。その他の蛍光物質として、例えばquantum dot(Science, 281, 2016-2018, 1998)、フィコエリスリソニン等のフィコビリ蛋白質、GFP(Green fluorescent Protein)、RFP(Red fluorescent Protein)、YFP(Yellow fluorescent Protein)、BFP(Blue fluorescent Protein)等の蛍光を発する蛋白質が挙げられる。

10

【0043】

発光物質としては、例えば、アクリジニウムおよびその誘導体、ルテニウム錯体化合物、ロフイン等が挙げられる。またルテニウム錯体化合物としては、電子供与体と共に電気化学的に発光する、Clin. Chem. 37, 9, 1534-1539, 1991に示されたものが好ましい。

【0044】

放射性同位元素としては、例えば、³H、¹⁴C、³⁵S、³²P、¹²⁵I、¹³¹I等が挙げられる。

20

タグ配列を含むポリペプチドとしては、FLAGペプチド(FLAGタグ、Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)、ポリヒスチジン(Hisタグ、His-His-His-His-His)、mycエピトープペプチド(mycタグ、Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu)、ヘマグルチニンエピトープペプチド(HAタグ、Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala)等が挙げられる。

10

【0045】

本発明における標識化抗体および標識化競合物質は、標識化抗体および標識化競合物質を調製し得る方法であれば如何なる方法でも調製することができ、例えば標識される抗体または競合物質が有する官能基と、標識物質が有する官能基との間で、リンカーを介してまたは介さず共有結合を生じる反応によって行うことができる。官能基としては、カルボキシル基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、ヒドロキシサクシニルエステル基、マレイミド基、イソチオシアナート基等が挙げられる。この官能基同士の間で縮合反応を行わせることにより、標識物質を抗体および競合物質に共有結合させることができる。

30

【0046】

リンカーを介さない結合方法としては例えば、EDC[1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩]等のカルボジイミド化合物を用いる方法等が挙げられる。この場合、NHSまたはその誘導体等の活性エステルを使用することも可能である。イソチオシアナート基とアミノ基の間の縮合反応は、他の試薬を必要とせず、中性～弱アルカリ性の条件で混合するだけで進行するため、好ましい。

40

【0047】

リンカーとしては、例えば、標識物質と抗体とをそれぞれの官能基を介して結合させうる分子であれば如何なる分子でもよい。好ましい態様は、例えば、抗体のアミノ酸残基と反応することができる第1の官能基と、標識物質の側鎖の官能基と反応することができる第2の官能基とを同一分子内に有する分子であり、第1の官能基と第2の官能基とが異なる基であることが好ましい。リンカーの官能基としては、例えば前述の官能基が挙げられる。

【0048】

放射性同位元素を化学的に結合させる方法としては、例えば文献(Antibody Immunoconj. Radiopharm., 3, 60, 1990)記載の方法等が挙げられる。

50

【 0 0 4 9 】

＜標識量の測定＞

免疫複合体中の標識量の測定方法は、標識物質に応じて適切なものを選ぶことができる。すなわち、標識物質が発色物質すなわちある波長の光を吸収する物質の場合、或いは凝集等により生じる濁度（吸光度）変化量の場合、分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が蛍光物質の場合には、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が発光物質の場合には、発光光度計や発光マルチウェルプレートリーダー等を用いることができる。標識物質が放射性同位元素である場合、放射性同位元素の量は、放射活性をシンチレーションカウンター、-ウェルカウンター等により測定することができる。

10

【 0 0 5 0 】

標識物質が酵素である場合、標識量は、酵素活性を測定することにより定量することができる。例えば酵素の基質を当該酵素と反応させ、生成した物質を測定することにより、標識量を測定することができる。

【 0 0 5 1 】

酵素がペルオキシダーゼである場合には、例えば吸光度法、蛍光法等によりペルオキシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および酸化発色型色原体の組み合わせとを反応させ、反応液の吸光度を分光光度計やマルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。

20

[0 0 5 2]

ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、テトラメチルベンジン、o-フェニレンジアミン、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ナトリウム塩(DA-64)、4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等が挙げられる。

30

【 0 0 5 3 】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カプラーとアニリン類（トリンダー試薬）との組み合わせ、カプラーとフェノール類との組み合わせ等が挙げられる。カプラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン（4-AA）、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等が挙げられる。アニリン類としては、N-（3-スルホプロピル）アニリン、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3-メチルアニリン（TOPS）、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3,5-ジメチルアニリン（MAOS）、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3,5-ジメトキシアニリン（DAO）、N-エチル-N-（3-スルホプロピル）-3-メチルアニリン（TOPS）、N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3,5-ジメトキシアニリン（HDAOS）、N,N-ジメチル-3-メチルアニリン、N,N-ジ（3-スルホプロピル）-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-（3-スルホプロピル）アニリン、N-エチル-N-（3-スルホプロピル）-3,5-ジメトキシアニリン、N-（3-スルホプロピル）-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-（3-スルホプロピル）-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）

40

50

アニリン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3,5-ジメトキシアニリン(F-DAO S)等が挙げられる。フェノール類としては、フェノール、4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸(HTIB)等が挙げられる。

【0054】

蛍光法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および蛍光物質の組み合わせとを反応させ、蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で生成した蛍光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該蛍光物質としては、例えば4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、クマリン等が挙げられる。

10

【0055】

発光法によりペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えばペルオキシダーゼとその基質である過酸化水素および発光物質の組み合わせとを反応させ、発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で生成した発光の強度を測定する方法等が挙げられる。当該発光物質としては、例えばルミノール化合物、ルシゲニン化合物等が挙げられる。

【0056】

酵素がアルカリホスファターゼである場合には、例えば発光法等によりアルカリホスファターゼ活性を測定することができる。発光法によりアルカリホスファターゼ活性を測定する方法としては、例えばアルカリホスファターゼとその基質とを反応させ、生成した発光の発光強度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。アルカリホスファターゼの基質としては、例えば3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・ニナトリウム塩(AMPD)、2-クロロ-5-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.13,7]デカン]-4-イル}フェニルホスフェート・ニナトリウム塩(CDP-StarTM)、3-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.13,7]デカン]-4-イル}フェニルホスフェート・ニナトリウム塩(CSPDTM)、[10-メチル-9(10H)-アクリジニルイデン]フェノキシメチルリン酸・ニナトリウム塩(LumigenTMAPS-5)等が挙げられる。

20

【0057】

酵素が-D-ガラクトシダーゼである場合には、例えば吸光度法(比色法)、発光法または蛍光法等により-D-ガラクトシダーゼ活性を測定することができる。吸光度法(比色法)により-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の吸光度を測定する方法等が挙げられる。-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えばO-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド等が挙げられる。発光法により-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えばガラクトン-プラス[Galacton-Plus、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)社製]またはその類似化合物等が挙げられる。蛍光法により-D-ガラクトシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば-D-ガラクトシダーゼとその基質とを反応させ、反応液の蛍光度を蛍光光度計や蛍光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。-D-ガラクトシダーゼの基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシド等が挙げられる。

30

【0058】

酵素がルシフェラーゼである場合には、例えば発光法等によりルシフェラーゼ活性を測定することができる。発光法によりルシフェラーゼ活性を測定する方法としては、例えば

40

50

ルシフェラーゼとその基質とを反応させ、反応液の発光度を発光強度計や発光マルチウェルプレートリーダー等で測定する方法等が挙げられる。ルシフェラーゼの基質としては、例えばルシフェリン、セレンテラジン等が挙げられる。

【0059】

標識物質が蛍光物質、発光物質、放射性同位元素および酵素以外の場合は、当該標識物質に特異的に結合する物質を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、酵素等で標識した標識体と、免疫複合体中の標識化抗体または標識化競合物質を構成している当該標識物質とを結合させ、当該標識物質に特異的に結合する物質を標識している蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素を用いて、上記の記載と同様にして検出を行うことができる。標識物質に特異的に結合する物質としては、標識物質に特異的に結合する抗体、また標識物質がビオチンの場合は、アビジンやストレプトアビジン等が挙げられる。また、標識物質に特異的に結合する物質（標識物質に特異的に結合する抗体、アビジンまたはストレプトアビジン等）を用いて、免疫複合体中の標識物質と結合させた後、標識物質に特異的に結合する物質に結合する抗体、例えば、抗体の定常領域に特異的に結合する抗体またはアビジンまたはストレプトアビジンに特異的に結合する抗体を蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素で標識したものを結合させ、これらの抗体を標識している蛍光物質、発光物質、放射性同位元素または酵素を用いて、上記の記載と同様にして検出を行うこともできる。

10

【0060】

これらの検出に用いる抗体、アビジンまたはストレプトアビジンや標識物質に特異的に結合する抗体、抗体の定常領域に特異的に結合する抗体、アビジンまたはストレプトアビジンに特異的に結合する抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、あるいはF_ab、ペプシン処理により得られるF(a_b)₂、ペプシン処理-還元処理により得られるF_ab'等のFc部分を除去した抗体フラグメントでもよい。

20

【0061】

<水性媒体およびその他の共存物>

本発明における水性媒体としては、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等があげられ、緩衝液が好ましい。緩衝液の調製に使用される緩衝剤としては、緩衝能を有するものならば特に限定されないが、pH 1～11の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルビツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グット緩衝剤等が挙げられる。

30

【0062】

グット緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝剤、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Triis)緩衝剤、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝剤、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝剤、2-[N-(2-アセトアミド)アミノ]エタンスルホン酸(ACES)緩衝剤、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPS)緩衝剤、2-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エタンスルホン酸(BES)緩衝剤、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)緩衝剤、2-{N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}エタンスルホン酸(TEES)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-スルホエチル)ピペラジン(HEPEs)緩衝剤、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)緩衝剤、2-ヒドロキシ-3-{[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}プロパンスルホン酸(TAPSO)緩衝剤、ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸)(POPSO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)ピペラジン(HEPPSO)緩衝剤、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(3-スルホプロピ

40

50

ル) ピペラジン (EPPS) 緩衝剤、トリシン [N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン] 緩衝剤、ビシン [N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン] 緩衝剤、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノプロパンスルホン酸 (TAPS) 緩衝剤、2-(N-シクロヘキシルアミノ)エタンスルホン酸 (CHES) 緩衝剤、3-(N-シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (CAPSO) 緩衝剤、3-(N-シクロヘキシルアミノ)プロパンスルホン酸 (CAPS) 緩衝剤等が挙げられる。

【0063】

緩衝液の濃度は測定に適した濃度であれば特に制限はされないが、0.001~2.0 mol/L が好ましく、0.005~1.0 mol/L がより好ましく、0.01~0.1 mol/L が特に好ましい。

【0064】

本発明の免疫学的測定法においては、金属イオン、塩類、糖類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等を共存させることができる。

金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。

塩類としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム等が挙げられる。

糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール等が挙げられる。

界面活性剤としては、例えば非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤等が挙げられる。

防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質 (ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、バイオエース、プロクリン300、プロキセル (Proxel) GXL 等が挙げられる。

蛋白質としては、例えばウシ血清アルブミン (BSA)、ウシ胎児血清 (FBS)、カゼイン、ブロックエース (大日本製薬社製) 等が挙げられる。

蛋白質安定化剤としては、例えばペルオキシダーゼ安定化緩衝液 [Peroxidase Stabilizing Buffer、ダコサイトメーション (DakoCytomation) 社製] 等が挙げられる。

【0065】

<免疫学的測定用試薬>

本発明の免疫学的測定用試薬は、本発明の免疫学的測定法に使用され得るものである。本発明の免疫学的測定用試薬の具体例として、以下の試薬1~3が挙げられるが、本発明は、これらの試薬に限定されるものではない。

【0066】

・試薬1

(a) ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、(b) 本発明のペプチド (競合物質) に標識物質が結合した標識化ペプチド (標識化競合物質) を含有する試薬。

ビッグアンジオテンシン-25C末抗体は、担体に固定化されていることが好ましい。

・試薬2

(a) ビッグアンジオテンシン-25C末抗体に標識物質が結合した標識化ビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、(b) 本発明のペプチド (競合物質) を含有する試薬。

本発明のペプチド (競合物質) は、担体に固定化されていることが好ましい。

・試薬3

(a) グリコシダーゼ、(b) 担体に固定化されたビッグアンジオテンシン-25C末抗体、および、(c) アンジオテンシンIIに結合する抗体に標識物質が結合した標識化抗アンジオテンシンII抗体を含有する試薬。

【0067】

上記試薬1は、上記測定方法1に使用される試薬であり、上記試薬2は、上記測定方法2に使用される試薬である。また、上記試薬3は、上記測定方法3に使用される試薬である。上記試薬3におけるグリコシダーゼは、検体の前処理用に使用される。

10

20

30

40

50

【0068】

本発明の免疫学的測定用試薬の形状は、本発明の免疫学的測定法を可能とする形状であれば特に制限はない。試薬の形状としては、例えば液状、凍結状態または凍結乾燥状態等の形状が挙げられる。凍結乾燥状態の試薬を使用する場合には、測定前に前述の水性媒体等で溶解して測定に供する。

【0069】

本発明の免疫学的測定用試薬において使用されるビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体、アンジオテンシンIIに結合する抗体、ペプチド（競合物質）、グリコシダーゼ、ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体に標識物質が結合した標識化ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体、アンジオテンシンIIに結合する抗体に標識物質が結合した標識化抗アンジオテンシンII抗体、標識化ペプチド（標識化競合物質）としては、それぞれ、前述のビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体、アンジオテンシンIIに結合する抗体、ペプチド（競合物質）、グリコシダーゼ、ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体に標識物質が結合した標識化ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体、アンジオテンシンIIに結合する抗体に標識物質が結合した標識化抗アンジオテンシンII抗体、標識化ペプチド（標識化競合物質）を挙げることができる。また、本発明の免疫学的測定用試薬は、必要に応じて、前述の水性媒体、金属イオン、塩類、糖類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質、蛋白質安定化剤等を含有することができる。

10

【0070】

また、本発明の免疫学的測定用試薬は、キットの形態で保存、流通されてもよい。キットとしては、2試薬系、3試薬系等の形態が挙げられるが、キットを構成する各試薬中の構成要素は、当業者が適宜選択することができる。

20

【0071】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0072】

[実施例1] 配列番号3～9で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの合成

-アミノ基がFmoc（フルオレニルメトキシカルボニル）基で保護されたアミノ酸を用意し、表面がアミノ基で修飾されたポリスチレン（担体）に、C末端となるアミノ酸のカルボキシル基を固定させた。C末端となるアミノ酸が固定化された当該担体と、20%ビペリジンを含むN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）（ナカライトスク社製）溶液とを混合し、Fmoc基を除去し、アミノ基を脱保護した。その後、DMFで洗浄し、脱保護により生じた副生成物を除去した。洗浄後の当該溶液と、C末端から2番目に結合させるべきアミノ酸、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（東京化成工業社製）、およびN,N-ジイソプロピルカルボジイミド（東京化成工業社製）を含むN-メチルピロリドン（東京化成工業社製）溶液とを混合し、C末端となるアミノ酸とC末端から2番目に結合させるべきアミノ酸とを縮合させ、ジペプチドを生成させた。その後、未反応のアミノ酸を洗浄除去した。C末端から3番目以降のアミノ酸について、順次、上記と同様の操作を行い、目的のアミノ酸数のペプチドを合成した。アミノ酸鎖の伸長操作が終了した後、アミノ酸鎖をトリイソプロピルシランと純水とを含むトリフルオロ酢酸の混合液で処理して、ペプチドを構成するアミノ酸残基の側鎖官能基の保護基を脱保護した。

30

【0073】

[実施例2] ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体の各ペプチドに対する反応性

(1) ペプチド固相化プレートの作製

配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドをPBS溶液（150mmol/L 塩化ナトリウム（関東化学社製）を含有するpH7.4, 10mmol/Lリン酸緩衝液）で0.5μg/mLに希釈し、1ウェル当たり50μLずつ、96穴マイクロタイタープレート（サーモフィッシュ・サイエンティフィック社製）に分注した。25℃で24時間静置後、ブロッキング液[1%BSA（BOVOCGEN社製）、0.05%Tween20（関東化学社製）、150mmol/L 塩化ナトリウムを含有するpH7.50

4, 10 mmol/L リン酸緩衝液] で洗浄し、プロッキング液を 300 μL 加え、25 で 24 時間静置しプロッキングした。プロッキング液を除去した後、乾燥し、配列番号 3 のペプチドが固相化されたプレートを作製した。

【0074】

同様の方法で、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなる各ペプチドが固相化されたプレートを調製した。

【0075】

(2) ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体のペルオキシダーゼ標識

配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを免疫したウサギから得られた抗血清を、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを固定化したペプチドカラムを用いて精製し、ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体を得た。ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体 200 μg 分を使用し、Peroxidase labeling kit (同仁化学研究所社製) を用いてペルオキシダーゼ (POD) 標識し、POD 標識ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体を得た。

【0076】

(3) ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体の各ペプチドに対する反応性

(1) で作製した、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドがそれぞれ固相化されたプレートの各ウェルに、POD 標識抗体希釈液 (0.1% BSA、0.1% Tween 20、150 mmol/L 塩化ナトリウムを含有する pH 7.4, 10 mmol/L リン酸緩衝液) で 10000 倍に希釈した POD 標識ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体を 50 μL 添加して、25 で 1 時間静置した。洗浄液 (0.05% Tween 20、150 mmol/L 塩化ナトリウムを含有する pH 7.4, 10 mmol/L リン酸緩衝液) で各ウェルを 3 回洗浄した後、ELISA POD 基質 TMB 溶液 (EASY) (ナカライトスク社製) を各ウェル 100 μL 添加し、25 で 30 分間静置した。停止液として 0.5 mol/L 硫酸 (関東化学社製) を 100 μL 添加し、反応液の吸光度を主波長 450 nm、副波長 660 nm で測定した。この他、陰性コントロールとして、ペプチドを固相化せず、(1) に記載された手順に従い、プロッキングのみ実施したプレートを作製し、前述した方法と同様の手順でアッセイを実施し、吸光度を測定した。測定した吸光度を表 1 と図 1 に示した。ここで得られる吸光度が高いほど、ペプチドと結合しているビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体が多いことを意味しており、ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体のペプチドに対する反応性が高いことを示す。

【0077】

【表 1】

固相化したペプチド				
	配列番号 3	配列番号 4	配列番号 7	陰性コントロール 固相無し
吸光度	1.676	0.041	0.039	0.055

【0078】

表 1 および図 1 に示したように、ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体は、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドと反応するが、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの N 末端の 1 アミノ酸を欠損させた配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、および、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの C 末端の 1 アミノ酸を欠損させた配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド

10

20

30

40

50

とは反応しなかった。すなわち、ビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体と配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドとの結合には、N 末端のシステイン、または C 末端のアスパラギンが必須であることが判明した。

【0079】

[実施例 3] 各ペプチドを競合物質として用いた際の試料中のビッグアンジオテンシン - 25 (Bang - 25) の検出感度

検体希釈液 (0.1% BSA、0.5% Tween 20、150 mmol/L 塩化ナトリウムを含有する pH 7.4, 10 mmol/L リン酸緩衝液) を用いて Bang - 25 (ペプチド研究所社製) を希釈し、0.0.16、1.25、2.50、5.00、10.00 ng/mL の Bang - 25 溶液を調製した。実施例 2 で調製した、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、および配列番号 9 でそれぞれ表されるアミノ酸配列からなるペプチドが固相化されたそれぞれのプレートの各ウェルに、各濃度の Bang - 25 溶液、および、前記の POD 標識抗体希釈液で 10000 倍に希釈した POD 標識ビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体を、それぞれ 50 μL ずつ添加して 25 で 1 時間静置した。洗浄液 (0.05% Tween 20、150 mmol/L 塩化ナトリウムを含有する pH 7.4, 10 mmol/L リン酸緩衝液) で各ウェルを 3 回洗浄した後、ELISA POD 基質 TMB 溶液 (Easy) を各ウェル 100 μL 添加し、25 で 30 分間静置した。停止液として 0.5 mol/L 硫酸を 100 μL 添加し、反応液の吸光度を主波長 450 nm、副波長 660 nm で測定した。この際、各濃度の Bang - 25 溶液 (0.16 ~ 10.00 ng/mL) を添加した時の吸光度 (B) を、Bang - 25 を全く含まない溶液 (検体希釈液) を添加したときの吸光度 (B0) を 100% としたときの相対的な値 (B/B0 (%)) として算出した (表 2)。また、Bang - 25 濃度を横軸、B/B0 (%) を縦軸にとり、各濃度の Bang - 25 溶液の測定結果をプロットした図を、図 2 に示した。

【0080】

【表 2】

Bang-25 (ng/mL)	B/B0(%)				
	配列番号3 CEQLAKAN	配列番号5 YEQLAKAN	配列番号6 FEQLAKAN	配列番号8 CEQLAKAY	配列番号9 CEQLAKAQ
0.00	100	100	100	100	100
0.16	97	84	100	91	101
1.25	97	78	87	86	86
2.50	100	69	88	85	81
5.00	98	60	82	78	72
10.00	95	46	73	77	65

【0081】

競合法において、B/B0 (%) が 100% の時、ビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体と試料中の Bang - 25 とが結合しておらず、試料中の Bang - 25 を検出できないことを示し、B/B0 (%) が低いほど、ビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体と試料中の Bang - 25 とが結合し、Bang - 25 の検出感度が高いことを示している。表 2 および図 2 に示したように、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを競合物質として固相化した場合、10 ng/mL Bang - 25 溶液の B/B0 (%) が 95% であり、10 ng/mL の Bang - 25 を検出できなかった。一方、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、および配列番号 9 でそれぞれ表されるアミノ酸配列からなるペプチドを競合物質として固相化した場合、10 ng/mL Bang - 25 溶液を測定したときの B/B0 (%) は、46%、73%、77%、65% であり、配列番号 3

10

20

30

40

50

のペプチドを競合物質として固相化した場合と比べ、試料中の Bang - 25 の検出感度が高かった。また、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを競合物質として固相化した場合、0.16 ng/mL Bang - 25 溶液の B / B0 (%) は、84 % であり、0.16 ng/mL の Bang - 25 を検出できた。以上のことより、競合物質として配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドのアミノ酸を置換した配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなる各ペプチドを競合物質として用いることで、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを用いたときに比べて、高感度で Bang - 25 を検出できることが判明した。

【0082】

[実施例 4] 希釀直線性試験（競合法）

免疫測定法において、生体試料（尿等）中の測定対象物の測定の正確さを評価する方法の 1 つに希釀直線性試験がある。この方法を用いて、本発明の方法が尿中の Bang - 25 濃度を正しく測定できているか否かを評価した。

【0083】

尿検体を検体希釀液（0.1 % BSA、0.5 % Tween 20、150 mmol/L 塩化ナトリウムを含有する pH 7.4, 10 mmol/L リン酸緩衝液）にて、2 倍、4 倍、8 倍に希釀し、2 倍希釀尿検体、4 倍希釀尿検体、および 8 倍希釀尿検体を調製した。配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドが固相化されたプレートの異なるウェルに、原液尿検体（1 倍希釀尿検体）、調製した各希釀尿検体、および実施例 3 で用いた各濃度の Bang - 25 溶液（キャリブレーター）を、それぞれ 25 μL ずつ分注した。続いて、検体希釀液を各ウェルに 25 μL ずつ分注した。さらに、POD 標識抗体希釀液で 10000 倍に希釀した POD 標識ビッグアンジオテンシン - 25 C 末抗体を、各ウェルに 50 μL ずつ添加して 25 で 1 時間静置した。これ以後は、実施例 3 と同じ作業を実施し、B / B0 (%) を算出した。Bang - 25 濃度を横軸、各濃度の Bang - 25 を含むキャリブレーターの B / B0 (%) を縦軸にプロットして作成した検量線を用い、原液尿検体および希釀尿検体中の Bang - 25 濃度を算出した。また、下記式（1）に従い、原液尿検体（1 倍希釀検体）中の Bang - 25 濃度を 2 倍、4 倍、8 倍希釀した際の理論濃度に対する対理論濃度を算出した。その結果を表 3 に示す。

【0084】

【数 1】

$$\text{対理論濃度} (\%) = (\text{各希釀尿検体の測定濃度}) / (\text{理論濃度}) \times 100 \quad (1)$$

【0085】

【表 3】

希釀倍率	理論濃度 ng/mL	測定濃度 ng/mL	対理論濃度 %
1	1.33	1.33	100
2	0.66	0.58	88
4	0.33	0.28	85
8	0.17	0.16	94

【0086】

対理論濃度が 100 % に近い程、測定が正確であることを意味する。表 3 に示した通り、85 ~ 100 % と良好な対理論濃度が得られたことから、本発明の方法により尿中の Bang - 25 を正確に測定できることが判明した。

【0087】

[実施例 5] サンドイッチ法での Bang - 25 検出感度

10

20

30

40

50

(1) 抗アンジオテンシンII抗体のペルオキシダーゼ標識

アンジオテンシンIIを免疫したウサギから得られた抗血清を、アンジオテンシンIIを固定化したペプチドカラムを用いて精製し、抗アンジオテンシンII抗体を得た。抗アンジオテンシンII抗体 200 µg分を使用し、Peroxidase labeling kit を用いてペルオキシダーゼ (POD) 標識し、POD 標識抗アンジオテンシンII抗体を得た。

【0088】

(2) 抗体固相化プレートの作製

ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体を、終濃度 5 µg / mL になるように PBS で希釈し、固相用の 96 穴マイクロタイプレートの各ウェルに 50 µL ずつ添加した。25 で 24 時間静置後、前記のブロッキング液で洗浄し、ブロッキング液を 300 µL 加え、25 で 24 時間静置しブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、乾燥し、ビッグアンジオテンシン - 25C 末抗体が固相化されたプレートを作製した。

【0089】

(3) サンドイッチ法での Bang - 25 検出感度

前記の検体希釈液を用いて、0.0.03、0.06、0.13、0.25、0.50、1.00、2.00 ng / mL の各濃度に希釈した Bang - 25 溶液 (グリコシダーゼ処理していない試料)、および、各濃度の Bang - 25 溶液に、終濃度が 5 U / mL になるように PNGase F (グリコシダーゼ；シグマ・アルドリッヂ社製) を添加し、37 で 3 時間反応させた試料 (グリコシダーゼ処理した試料) を調製した。調製したグリコシダーゼ処理していない試料、および、グリコシダーゼ処理した試料を、プレートの異なるウェルに 50 µL ずつ添加し、25 で 1 時間静置した。洗浄液 (0.05% Tween 20、150 mmol / L 塩化ナトリウムを含有する pH 7.4, 10 mmol / L リン酸緩衝液) で各ウェルを 3 回洗浄した後、各ウェルに、前記の POD 標識抗体希釈液で 10000 倍に希釈した POD 標識抗アンジオテンシンII抗体を 50 µL 添加して、25 で 1 時間静置した。洗浄液で各ウェルを 3 回洗浄した後、ELISA POD 基質 TMB 溶液 (Easy) を各ウェル 100 µL 添加し、25 で 30 分間静置した。停止液として 0.5 mol / L 硫酸を 100 µL 添加し、反応液の吸光度を主波長 450 nm、副波長 660 nm で測定した。吸光度の測定結果を表 4 に、Bang - 25 濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、各濃度の Bang - 25 溶液の測定結果をプロットした図を、図 3 に示した。

【0090】

【表 4】

抗原濃度 (ng/mL)	グリコシダーゼ処理無	グリコシダーゼ処理有
0.00	0.171	0.174
0.03	0.175	0.183
0.06	0.171	0.199
0.13	0.181	0.231
0.25	0.199	0.268
0.50	0.219	0.377
1.00	0.266	0.642
2.00	0.376	1.073

【0091】

10

20

30

40

50

サンドイッチ法においては、吸光度が高いほど、Bang - 25の検出感度が高いことを示している。表4および図3に示されている様に、グリコシダーゼ処理したBang - 25溶液を試料として用いた方が、グリコシダーゼ処理しないBang - 25溶液を試料として用いた場合に比べて吸光度が高かった。従って、グリコシダーゼ処理した試料を用いるサンドイッチ法により、Bang - 25を高感度に検出できることが判明した。

【0092】

【実施例6】希釈直線性試験（サンドイッチ法）

サンドイッチ法を用いる、本発明の尿中のBang - 25の免疫学的測定法の正確さを希釈直線性試験で評価した。

尿検体を前記の検体希釈液にて、2倍、4倍、8倍、16倍、32倍に希釈し、2倍希釈尿検体、4倍希釈尿検体、8倍希釈尿検体、16倍希釈尿検体、および32倍希釈尿検体を調製した。原液尿検体（1倍希釈尿検体）、および、調製した各希釈尿検体に、終濃度が5U/mLになるようにPNGaseFを添加し、37℃で3時間反応させた。また、実施例5で用いたPNGaseF処理した各濃度のBang - 25溶液をキャリブレーターとして用いた。実施例5で作製した、ビッグアンジオテンシン - 25C末抗体が固相化されたプレートの異なるウェルに、PNGaseF処理した尿検体、およびキャリブレーターを、それぞれ25μLずつ分注した。続いて、検体希釈液を各ウェルに25μLずつ分注し、25℃で1時間静置した。これ以後は、実施例5と同じ手順でアッセイを実施し、反応液の吸光度を主波長450nm、副波長660nmで測定した。Bang - 25濃度を横軸、各濃度のBang - 25を含むキャリブレーターの吸光度を縦軸にプロットして作成した検量線を用い、原液尿検体および希釈尿検体中のBang - 25濃度を算出した。下記式（1）に従い、原液尿検体（1倍希釈尿検体）中のBang - 25濃度を2倍、4倍、8倍、16倍、32倍希釈した際の理論濃度に対する対理論濃度を算出した。その結果を表5に示す。

【0093】

【数2】

$$\text{対理論濃度} (\%) = (\text{各希釈尿検体の測定濃度}) / (\text{理論濃度}) \times 100 \quad (1)$$

【0094】

【表5】

希釈倍率	理論濃度 ng/mL	測定濃度 ng/mL	対理論濃度 %
1	1.14	1.14	100
2	0.57	0.64	112
4	0.29	0.31	107
8	0.14	0.16	114
16	0.07	0.07	100
32	0.04	0.04	100

【0095】

対理論濃度が100%に近い程、測定が正確であることを意味する。表5に示した通り、100～114%と良好な対理論濃度が得られたことから、本発明のサンドイッチ法を用いる免疫学的測定法により、尿中のBang - 25を正確に測定できることが判明した。

【産業上の利用可能性】

【0096】

本発明により、検体中のビッグアンジオテンシン - 25を特異的、且つ、高感度に検出

10

20

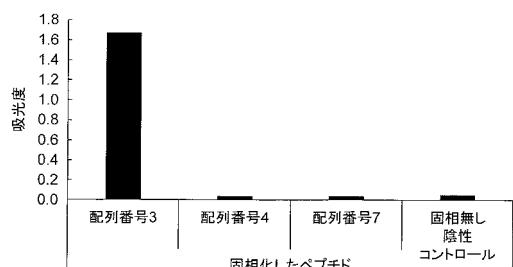
30

40

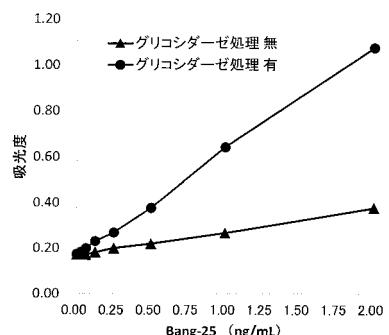
50

する免疫学的測定法、免疫学的測定用試薬、および当該測定法または当該測定用試薬に用いる新規ペプチドが提供される。本発明の免疫学的測定法により、腎臓疾患および循環器疾患を早期、且つ、簡便に診断することが可能になる。本発明は、腎臓疾患や循環器疾患等の診断薬およびキットの製造分野に利用できる。

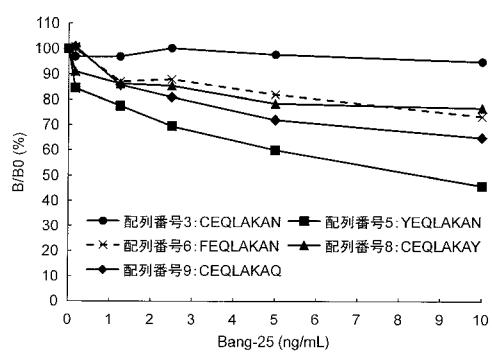
【図1】



【図3】



【図2】



【配列表】

2015212237000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 永田 さやか

宮崎県宮崎市清武町木原 5200 国立大学法人宮崎大学医学部内

(72)発明者 和泉 裕一

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所
内

(72)発明者 守田 和樹

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所
内

(72)発明者 三次 瞳

静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所
内

F ターム(参考) 4H045 AA10 BA15 EA50 FA33 FA44 FA61

专利名称(译)	新肽及其使用方法		
公开(公告)号	JP2015212237A	公开(公告)日	2015-11-26
申请号	JP2014095286	申请日	2014-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人宮崎 協和メデックス株式会社		
[标]发明人	北村和雄 永田さやか 和泉裕一 守田和樹 三次瞳		
发明人	北村 和雄 永田 さやか 和泉 裕一 守田 和樹 三次 瞳		
IPC分类号	C07K7/06 G01N33/53		
FI分类号	C07K7/06.ZNA G01N33/53.V		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/BA15 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA44 4H045/FA61		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

样品中具有由SEQ ID NO : 1表示的氨基酸序列的肽，或在具有氨基酸序列的肽的第14位的天冬氨酸残基，其中向该氨基酸序列的第18位的半胱氨酸残基进一步添加了半胱氨酸。提供一种用于特异性和高度灵敏地测量在其碱基上添加糖链的N-连接糖链肽 (Big Angiotensin-25) 的方法。下式 (I) 表示的肽：Xaa1-Glu-Gln-Leu-Ala-Lys-Ala-Xaa2 (I) (式 (I) 中，Xaa1为半胱氨酸，Xaa2为天冬酰胺，Xaa1为半胱氨酸或芳香族氨基酸，Xaa2为芳香族氨基酸，酸性氨基酸或具有羧酸酰胺的氨基酸。排除某些肽。)，一种使用该肽的样品中大血管紧张素25的免疫测定方法。[选择图]图2

(21)出願番号	特願2014-95286 (P2014-95286)	(71)出願人	504224153
(22)出願日	平成26年5月2日 (2014.5.2)	国立大学法人 宮崎大学	宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
		(71)出願人	000162478
		協和メデックス株式会社	東京都中央区晴海一丁目8番10号
		(74)代理人	100091096
		弁理士	平木 裕輔
		(74)代理人	100118773
		弁理士	藤田 節
		(74)代理人	100120905
		弁理士	深見 伸子
		(72)発明者	北村 和雄
			宮崎県宮崎市溝武町木原5200 国立大学法人宮崎大学医学部内
			最終頁に続く