

(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2018-128388

(P2018-128388A)

(43) 公開日 平成30年8月16日(2018.8.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 L	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/52 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/52 Z N A	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
	GO 1 N 33/53 U	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2017-22348 (P2017-22348)

(22) 出願日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構難治性疾患実用化研究事業「後天性凝固異常症のP. O. C. テストによる迅速診断システムの開発」委託研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 304036754

国立大学法人山形大学  
山形県山形市小白川町1丁目4-12

(71) 出願人 302072136

株式会社キューメイ研究所  
大分県大分市大字古国府字永畑549番3

(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 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72) 発明者 一瀬 白帝

山形県山形市飯田西2-2-2 国立大学  
法人山形大学医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FXIII (F13、凝固第XIII因子) 活性測定法

(57) 【要約】

【課題】迅速かつ簡便なFXIII活性の測定方法および該測定のための試薬キットの提供。

【解決手段】血漿試料中で、FXIIIの活性により、プラスミンインヒビター(α<sub>2</sub>-PI)またはMycタグ付加α<sub>2</sub>-PI(α<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>)にBAPA(5-ビオチンアミドペンチルアミン)が取り込まれることを利用し、ELISAプレートまたは免疫クロマトグラフィ用ストリップ上に抗α<sub>2</sub>-PI抗体または抗Myc抗体を固相化し、血漿試料中のα<sub>2</sub>-PIとBAPAの結合体またはα<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>とBAPAの結合体を捕捉し、α<sub>2</sub>-PIまたはα<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>を定量することにより、FXIIIの活性を測定する方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体におけるFXIIIの活性を測定する方法であって、

- (i) 被験体から採取した血漿 5 ~ 50  $\mu$ L
- (ii) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン) 1 ~ 5 mM
- (iii) カルシウム塩 2 ~ 10mM
- (iv) DTT (ジチオトレイトール) 1 ~ 5 mM
- (v) トロンビン 5 ~ 15U/mL
- (vi) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド) 0.5 ~ 1.5mM
- (vii) Mycタグ付加  $_2$ -PI (  $_2$ -PI<sup>Myc</sup> )

を混合し反応させ、血漿中のMycタグ付加  $_2$ -PI (  $_2$ -PI<sup>Myc</sup> ) にBAPAを取り込ませ、Mycタグ付加  $_2$ -PI (  $_2$ -PI<sup>Myc</sup> ) に取り込まれたBAPAを定量することを含むFXIIIの活性を測定する方法。

10

## 【請求項 2】

Mycタグ付加  $_2$ -PI (  $_2$ -PI<sup>Myc</sup> ) に取り込まれたBAPAの定量を抗Myc抗体および標識したストレプトアビジンまたはアビジンを用いたELISAまたは免疫クロマトグラフィで行う請求項 1 記載のFXIIIの活性を測定する方法。

## 【請求項 3】

FXIIIの活性を測定することにより被験体におけるFXIIIインヒビターを検出または定量する、請求項 1 または 2 に記載のFXIIIの活性を測定する方法。

20

## 【請求項 4】

- (a) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)
- (b) カルシウム塩
- (c) DTT (ジチオトレイトール)
- (d) トロンビン
- (e) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド)
- (f) Mycタグ付加  $_2$ -PI (  $_2$ -PI<sup>Myc</sup> )
- (g) 標識ストレプトアビジン
- (h) 発色基質

及び抗Myc抗体を固相化したELISAプレートもしくは免疫クロマトグラフィ用ストリップを含む、被験体におけるFXIIIの活性を測定するためのキット。

30

## 【請求項 5】

被験体におけるFXIIIの活性を測定する方法であって、

- (i) 被験体から採取した血漿 5 ~ 50  $\mu$ L
- (ii) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン) 1 ~ 5 mM
- (iii) カルシウム塩 2 ~ 10mM
- (iv) DTT (ジチオトレイトール) 1 ~ 5 mM
- (v) トロンビン 5 ~ 15U/mL
- (vi) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド) 0.5 ~ 1.5mM

を混合し反応させ、血漿中の  $_2$ -PIにBAPAを取り込ませ、  $_2$ -PIに取り込まれたBAPAを定量することを含むFXIIIの活性を測定する方法。

40

## 【請求項 6】

$_2$ -PIに取り込まれたBAPAの定量を抗  $_2$ -PI抗体および標識したストレプトアビジンまたはアビジンを用いたELISAまたは免疫クロマトグラフィで行う請求項 5 記載のFXIIIの活性を測定する方法。

## 【請求項 7】

FXIIIの活性を測定することにより被験体におけるFXIIIインヒビターを検出する、請求項 5 または 6 に記載のFXIIIの活性を測定する方法。

## 【請求項 8】

- (a) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)

50

- (b) カルシウム塩
- (c) DTT (ジチオトレイトール)
- (d) トロンビン
- (e) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド)
- (f) 標識ストレプトアビジン
- (g) 発色基質

及び抗<sub>2</sub>-PI抗体を固相化したELISAプレートもしくは免疫クロマトグラフィ用ストリップを含む、被験体におけるFXIIIの活性を測定するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、FXIII (F13、凝固第XIII因子) (以下、FXIIIと称する) の活性測定法に関し、ELISAまたは免疫クロマトグラフィを利用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

FXIIIは、Aサブユニット二量体とBサブユニット二量体からなる異種四量体として血中を循環しており、トロンビンにより活性化される。FXIIIは、血液凝固の最終段階で作用する因子であり、止血凝固系の最終段階でフィブリン間の架橋を促進し、安定化フィブリン塊を保ち、止血の完了維持と創傷治癒作用に働く。FXIIIをフィブリン安定化因子ともいう。

20

【0003】

原因不明の出血傾向が認められるときには、FXIIIの活性を測定する。先天性FXIII因子欠乏症、後天性自己免疫性出血病FXIII/13、クローン病、潰瘍性大腸炎、肝不全、播種性血管内凝固、Schonlein-henoch紫斑病等ではFXIIIの活性が低下する。

従って、これらの疾患の診断にはFXIIIの活性測定が不可欠である(非特許文献1)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】一瀬白帝、日本内科学雑誌、第99巻、第8号、pp.1934-1943、(2010)

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、迅速かつ簡便なFXIII活性の測定方法および該測定のための試薬キットを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは免疫クロマトグラフィやELISAを利用して迅速かつ簡便にFXIIIの活性を測定し得る方法について鋭意検討を行った。

【0007】

その結果、血漿試料中で、FXIIIの活性により、プラスミンインヒビター(<sub>2</sub>-PI)またはMycタグ付加<sub>2</sub>-PI(<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>)にBAPA(5-ビオチンアミドペンチルアミン)が取り込まれることを利用し、ELISAプレートまたは免疫クロマトグラフィ用ストリップ上に抗<sub>2</sub>-PI抗体または抗Myc抗体を固相化し、血漿試料中の<sub>2</sub>-PIまたは<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>を捕捉し、<sub>2</sub>-PIまたは<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>に結合したBAPAを定量することにより、FXIIIの活性を測定し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

40

【0008】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 被験体におけるFXIIIの活性を測定する方法であって、

(i) 被験体から採取した血漿 5 ~ 50 μL

(ii) BAPA(5-ビオチンアミドペンチルアミン) 1 ~ 5 mM

50

- (iii) カルシウム塩 2 ~ 10mM
- (iv) DTT (ジチオトレイトール) 1 ~ 5 mM
- (v) トロンビン 5 ~ 15U/mL
- (vi) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド) 0.5 ~ 1.5mM
- (vii) Mycタグ付加  $\alpha_2$ -PI (  $\alpha_2$ -PI<sup>Myc</sup> )

を混合し反応させ、血漿中のMycタグ付加  $\alpha_2$ -PI (  $\alpha_2$ -PI<sup>Myc</sup> ) にBAPAを取り込ませ、Mycタグ付加  $\alpha_2$ -PI (  $\alpha_2$ -PI<sup>Myc</sup> ) に取り込まれたBAPAを定量することを含むFXIIIの活性を測定する方法。

[ 2 ] Mycタグ付加  $\alpha_2$ -PI (  $\alpha_2$ -PI<sup>Myc</sup> ) に取り込まれたBAPAの定量を抗Myc抗体および標識したストレプトアビジンまたはアビジンを用いたELISAまたは免疫クロマトグラフィで行う[ 1 ]のFXIIIの活性を測定する方法。 10

[ 3 ] FXIIIの活性を測定することにより被験体におけるFXIIIインヒビターを検出または定量する、[ 1 ]または[ 2 ]のFXIIIの活性を測定する方法。

[ 4 ](a) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)

- (b) カルシウム塩
- (c) DTT (ジチオトレイトール)
- (d) トロンビン
- (e) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド)
- (f) Mycタグ付加  $\alpha_2$ -PI (  $\alpha_2$ -PI<sup>Myc</sup> )
- (g) 標識ストレプトアビジン 20
- (f) 発色基質

及び抗Myc抗体を固相化したELISAプレートもしくは免疫クロマトグラフィ用ストリップを含む、被験体におけるFXIIIの活性を測定するためのキット。

[ 5 ] 被験体におけるFXIIIの活性を測定する方法であって、

- (i) 被験体から採取した血漿 5 ~ 50  $\mu$ L
- (ii) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン) 1 ~ 5 mM
- (iii) カルシウム塩 2 ~ 10mM
- (iv) DTT (ジチオトレイトール) 1 ~ 5 mM
- (v) トロンビン 5 ~ 15U/mL
- (vi) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド) 0.5 ~ 1.5mM 30

を混合し反応させ、血漿中の  $\alpha_2$ -PIにBAPAを取り込ませ、  $\alpha_2$ -PIに取り込まれたBAPAを定量することを含むFXIIIの活性を測定する方法。

[ 6 ]  $\alpha_2$ -PIに取り込まれたBAPAの定量を抗  $\alpha_2$ -PI抗体および標識したストレプトアビジンまたはアビジンを用いたELISAまたは免疫クロマトグラフィで行う[ 5 ]のFXIIIの活性を測定する方法。

[ 7 ] FXIIIの活性を測定することにより被験体におけるFXIIIインヒビターを検出する、[ 5 ]または[ 6 ]のFXIIIの活性を測定する方法。

[ 8 ](a) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)

- (b) カルシウム塩
- (c) DTT (ジチオトレイトール) 40
- (d) トロンビン
- (e) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド)
- (f) 標識ストレプトアビジン
- (g) 発色基質

及び抗  $\alpha_2$ -PI抗体を固相化したELISAプレートもしくは免疫クロマトグラフィ用ストリップを含む、被験体におけるFXIIIの活性を測定するためのキット。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明の方法により、免疫クロマトグラフィまたはELISAを利用して迅速かつ簡便にFXIIIの活性を測定することができる。さらに、自己免疫性出血病FXIII/13 (AHFXIII/13) や 50

先天性FXIII/13欠乏症の同種抗体発生時におけるFXIIIインヒビターの検出も可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】フィブリン形成を抑制するFXIII活性化方法（GPRP濃度）の検討結果を示す図である。図1AはGPRP濃度の検討の結果を示し、図1Bは血漿濃度の検討の結果を示す。

【図2-1】抗 $\alpha_2$ -PI抗体を固相化したプレートを用いて、BAPAを取り込んだ $\alpha_2$ -PIを捕捉するELISAの結果を示す図である。

【図2-2】図2-1に結果を示す実験のプロトコールを示す図である。

【図3-1】PI-BAPA反応の飽和に達する時間を示す図である。

10

【図3-2】図3-1に結果を示す実験のプロトコールを示す図である。

【図4-1】PI-BAPA反応がFXIII依存性であることを示す図である。

【図4-2】図4-1に結果を示す実験のプロトコールを示す図である。

【図5】本発明のPI-BAPAアッセイを利用した方法とMDCアッセイとの相関を示す図である。図5Aはトータルの検体のデータを用いた相関を示し、図5Bはとコントロール（健常人）群と後天性F13欠乏症（AF13D）症例群と自己免疫性出血病13（AH13）症例群を分けた場合のそれぞれの相関を示す図である。

【図6-1】正常血漿をAH13症例血漿にて5段階混合希釈を行ったときの、Aa型のAH13-FXIIIインヒビターによる阻害の結果を示す図である。

【図6-2】正常血漿をAH13症例血漿にて5段階混合希釈を行ったときの、Ab型のAH13-FXIIIインヒビターによる阻害の結果を示す図である。

20

【図7】AH13症例の1:1交差混合試験における阻害率を示す図である。

【図8】PI-BAPA反応について、抗 $\alpha_2$ -PI抗体を塗布したストリップを用いた免疫クロマトグラフィによる検出の検討のプロトコールを示す図である。

【図9】FXIII欠乏血漿で段階希釈した正常血漿のPI-BAPA反応について免疫クロマトグラフィを行ったときの正常血漿量との直線性を示す図である。図9Aは反応終了液を100倍希釈したときの結果、図9Bは反応終了液を400倍希釈したときの結果、図9Cは反応終了液を800倍希釈したときの結果を示す。

【図10】免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイにより、1:1交差混合試験によるFXIIIインヒビターによるAa型の阻害（図10A）およびAb型の阻害（図10B）の結果を示す図である。

30

【図11】ELISAを利用したMyc-BAPAアッセイのプロトコールを示す図である。

【図12】ELISAを利用したMyc-BAPAアッセイの結果（正常血漿量依存性）を示す図である。

【図13】 $\alpha_2$ -PIあるいはフィブリノーゲンを欠乏した血漿を用いた場合のELISAを利用したMyc-BAPAアッセイ（図13A）とMDCアッセイ（図13B）との比較を示す図である。

【図14】正常血漿をAH13症例血漿にて5段階混合希釈を行ったときの、Myc-BAPAアッセイにより測定した、AH13-FXIIIインヒビターによるAa型およびAb型の阻害の結果を示す図である。

【図15】PI-BAPAアッセイとMDCアッセイの相関（図15A）、およびMyc-BAPAアッセイとMDCの相関（図15B）を示す図である。

40

【図16】Myc-BAPAアッセイを行うときの反応組成（図16Aの上）、ELISAによるMyc-BAPAの結果（図16Aの下）および免疫クロマトグラフィによるMyc-BAPAアッセイの結果（図16B）を示す図である。

【図17】「免疫クロマトグラフィによるMyc-BAPAアッセイ」により、1:1交差混合試験によるFXIIIインヒビターによる阻害を示す図である。

【図18】PI-BAPAアッセイおよびMyc-BAPAアッセイの阻害率、感度及び特異度を示す図である。

【図19】PI-BAPA反応によるベセスダアッセイの結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

50

## 【 0 0 1 1 】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、FXIIIの活性測定法であり、試料として被験体から採取した血漿または全血、好ましくは血漿を用い、血漿内 $\alpha_2$ -PI（プラスミンインヒビター）へのアミン取り込み反応（PI-BAPA反応）を利用した方法、及び血漿内Mycタグ付加 $\alpha_2$ -PI（ $\alpha_2$ -PI<sup>Myc</sup>）へのアミン取り込み反応（Myc-BAPA）を利用した方法がある。

## 【 0 0 1 2 】

公知のFXIIIの活性測定法として、MDC（モノダンシルカタベリン：monodansylcadaverine）取り込みを測定する方法（MDCアッセイ）があった。該方法においては、FXIIIの作用により、MDCが基質であるカゼインに取り込まれることを利用し、取り込まれたMDCの量を蛍光強度を測定することにより求める。

10

## 【 0 0 1 3 】

1. 血漿内 $\alpha_2$ -PI（プラスミンインヒビター）へのアミン取り込み反応（PI-BAPA反応）を利用した方法

該方法をPI-BAPAアッセイと呼び、例えば、ELISAと組合せた方法をELISAによるPI-BAPAアッセイと呼び、免疫クロマトグラフィを組合せた方法を免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイと呼ぶ。

## 【 0 0 1 4 】

該方法においては、FXIIIの作用で血漿内の $\alpha_2$ -PI（プラスミンインヒビター）にアミンが取り込まれることを利用してFXIIIの活性を測定する際に、抗 $\alpha_2$ -PI抗体を用いる。

20

## 【 0 0 1 5 】

アミンとしては、ビオチンが結合した5-ビオチンアミドペンチルアミン（5-biotinamidopentylamine：BAPA、以下、BAPAと称する）を用いる。

## 【 0 0 1 6 】

本方法は、最初に

(i) FXIIIの活性を測定しようとする被験体から採取した血漿

(ii) BAPA（5-ビオチンアミドペンチルアミン）

(iii) カルシウム塩

(iv) DTT（ジチオトレイトール）

(v) トロンピン

(vi) GPRP（Gly-Prp-Arg-Proアミド）

を混合し、30～40℃で5～60分間反応する。この反応をPI-BAPA反応と呼ぶ。

30

## 【 0 0 1 7 】

(i)の血漿は5～50 $\mu$ L、好ましくは5～20 $\mu$ L、さらに好ましくは10 $\mu$ L添加する。反応液の総容積に対する容積比は、10～40(v/v)%、好ましくは15～25(v/v)%、さらに好ましくは20(v/v)%である。

(ii)のBAPA（5-ビオチンアミドペンチルアミン）の濃度は、1～5mM、好ましくは1～3mM、さらに好ましくは2mMである。

(iii)のカルシウム塩としては、塩化カルシウム（CaCl<sub>2</sub>）、グルコン酸カルシウム等のカルシウム塩を添加して反応液中でCaイオンを生じさせればよい。好ましくはCaCl<sub>2</sub>を用いる。Ca塩の濃度は、1～10mM程度であり、例えば、CaCl<sub>2</sub>を用いる場合、CaCl<sub>2</sub>の濃度は、2～10mM、好ましくは3～7mM、さらに好ましくは5mMである。Caイオンは架橋に必要となる。

40

(iv)のDTTの濃度は、1～5mM、好ましくは1.5～2.5mM、さらに好ましくは2mMである。DTTはFXIIIの活性部位を保護する。DTTの代わりにDTE（ジチオエリトリトール）を用いてもよい。

(v)のトロンピンの濃度は、5～15U/mL、好ましくは7.5～12.5U/mL、さらに好ましくは10U/mLである。トロンピンはFXIIIを活性化する。トロンピンはヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ等の血液由来のものを使用できる。

(vi)のGPRPの濃度は0.5～1.5mM、好ましくは0.75～1.25mM、さらに好ましくは1mMである

50

。GPRPはフィブリンの多量体化を抑制する。

【0018】

反応液の総量は、10~100  $\mu$ L、好ましくは15~50  $\mu$ L、さらに好ましくは25  $\mu$ Lである。

反応液のpHは、6.5~8.5、好ましくは7~8、さらに好ましくは7.5である。pHはトリス、バルビタール、グッドバッファー等の緩衝剤で調整すればよい。

上記の反応条件は、フィブリンのクロットができない条件である。

反応は、EDTAやEGTA等のキレート剤を添加し、Caイオンを除去し停止させる。

【0019】

反応後、 $\alpha_2$ -PIに取り込まれたBAPA ( $\alpha_2$ -PI-BAPA)を定量すればよい。 $\alpha_2$ -PIに取り込まれたBAPAは抗 $\alpha_2$ -PI抗体および標識したストレプトアビジンもしくはアビジンを用いた抗原抗体反応を利用して測定することができる。抗 $\alpha_2$ -PI抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体を用いる。

10

【0020】

抗原抗体反応を利用した測定法は、抗 $\alpha_2$ -PI抗体を固相化し、固相化した抗 $\alpha_2$ -PI抗体に反応液中の $\alpha_2$ -PIに取り込まれたBAPA ( $\alpha_2$ -PI-BAPA)を結合させる。次いで、発色酵素で標識したアビジンまたはストレプトアビジンを添加し、ビオチンとアビジンの結合反応を利用して固相上に抗 $\alpha_2$ -PI抗体： $\alpha_2$ -PI-BAPA：酵素で標識したアビジンまたはストレプトアビジンの複合体を形成させる（「：」は結合を表す）。発色酵素の基質を加え発色させる。発色の程度を測定することにより、 $\alpha_2$ -PIに取り込まれたBAPA ( $\alpha_2$ -PI-BAPA)を定量することができ、定量値によりFXIIIの活性を求めることができる。

20

【0021】

酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼを用いることができ、前者の基質としてTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)等が挙げられ、後者の基質として、NBT (4-ニトロブルーテトラゾリウムクロライド)とBCIP (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸)混合液等が挙げられる。

【0022】

抗原抗体反応を利用した測定法として、ELISAまたは免疫クロマトグラフィが挙げられる。

ELISAは、例えば以下の工程で行うことができる。

抗 $\alpha_2$ -PI抗体を固相化したポリスチレン等でできたマイクロタイタープレートにPI-BAPA反応の反応液を添加し、抗原・抗体反応により固相化した抗 $\alpha_2$ -PI抗体とBAPAが取り込まれた $\alpha_2$ -PI ( $\alpha_2$ -PI-BAPA)の複合体を形成させる。さらに酵素標識したストレプトアビジンまたはアビジンを添加し、BAPAのビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンを結合させ、プレート上に抗 $\alpha_2$ -PI抗体： $\alpha_2$ -PI-BAPA：酵素で標識したアビジンまたはストレプトアビジンの複合体を形成させる（「：」は結合を表す）。洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して反応液中の $\alpha_2$ -PI-BAPAを検出することができる。 $\alpha_2$ -PI-BAPAの定量値から被験血漿中のFXIIIの活性を求めることができる。

30

【0023】

ELISA法において、抗 $\alpha_2$ -PI抗体溶液を数百ng~数十 $\mu$ g/ウェルの濃度でELISA用プレートのウェルに添加し、1時間から十数時間、好ましくは1~数時間インキュベートし、吸着により固相化する。固相化したウェルに添加する反応液の量は数 $\mu$ L~数十 $\mu$ Lである。

40

【0024】

結合反応は4~45分、好ましくは20~40分、さらに好ましくは25~38分で行うことができ、また、反応時間は、10分~十数時間、より好ましくは10分~数時間、さらに好ましくは30分~1時間程度である。

【0025】

免疫クロマトグラフィは、例えば、以下の工程で行うことができる。

抗 $\alpha_2$ -PI抗体が固相化された検出領域を有する固相支持体（ストリップ）に反応液を展開させ、抗原・抗体反応により検出領域に固相化した抗 $\alpha_2$ -PI抗体とBAPAが取り込まれた $\alpha_2$ -PI ( $\alpha_2$ -PI-BAPA)の複合体を形成させる。次いで、酵素標識したストレプトアビジ

50

ンまたはアビジンを展開させ、BAPAのビオチンとストレプトアビジンまたはアビジンを結合させ、検出領域上に抗<sub>2</sub>-PI抗体：<sub>2</sub>-PI-BAPA：酵素で標識したアビジンまたはストレプトアビジンの複合体を形成させる（「：」は結合を表す）。洗浄後、酵素基質を展開させ、検出領域で反応・発色させ、発色の強さを定量すればよい。反応液や酵素標識したストレプトアビジンもしくはアビジンはストリップに添加してもよいし、反応液や酵素標識したストレプトアビジンもしくはアビジンを入れた容器にストリップの一端を浸してもよい。

【0026】

酵素で標識したアビジンまたはストレプトアビジンの代わりに、着色ポリスチレン粒子や金コロイド等の着色された標識物質で標識したアビジンまたはストレプトアビジンを用いてもよい。この場合、酵素反応を行わせることなく、検出領域に標識用の着色された標識物質が集積するので発色する。また、標識したアビジンまたはストレプトアビジンはあらかじめストリップ上の検出領域と反応液を添加する領域の間に固相化しておいてもよい。この場合、反応液を展開するとき反応液により標識したアビジンまたはストレプトアビジンが溶解し、反応液と一緒に展開され、検出領域で複合体を形成する。

10

【0027】

抗<sub>2</sub>-PI抗体等のストリップへの固相化は、抗<sub>2</sub>-PI抗体溶液等をストリップ上に塗布し、吸着させることにより行うことができる。

【0028】

免疫クロマトグラフィは、5～35、好ましくは室温で行うことができ、試料を添加後数分で判定することができる。

20

【0029】

免疫クロマトグラフィで用いる固相支持体の材料は毛管現象により試料が吸収され展開流動し得るものであれば限定されない。例えば、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、ポリスチレン等の天然、合成ポリマー、又はこれらの混合物を用いることができる。固相支持体は好ましくは短冊状のストリップの形状を有する。

免疫クロマトグラフィにおいて、添加する試料の量は数十 $\mu$ L～数百 $\mu$ Lである。

【0030】

本発明の方法で測定したときに、<sub>2</sub>-PIに取り込まれたBAPA量が多いほど、すなわち、<sub>2</sub>-PI-BAPAの定量値の定量値が大きいほど、被験血漿中のFXIII活性は高いと判断できる。

30

【0031】

2. Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI（<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>）へのアミン取り込み反応（Myc-BAPA反応）を利用した方法

該方法をMyc-BAPAアッセイと呼び、例えば、ELISAと組合せた方法をELISAによるMyc-BAPAアッセイと呼び、免疫クロマトグラフィを組合せた方法を免疫クロマトグラフィによるMyc-BAPAアッセイと呼ぶ。

【0032】

該方法においては、FXIIIの作用で、血漿内に添加したc-Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI（<sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup>）にアミンが取り込まれることを利用してFXIIIの活性を測定する際に、抗Myc抗体を用いる。

40

【0033】

アミンとしては、ビオチンが結合した5-ビオチンアミドペンチルアミン（5-biotinamidopentylamine：BAPA、以下、BAPAと称する）を用いる。

【0034】

Mycタグを<sub>2</sub>-PIに付加する際は、<sub>2</sub>-PIのコードするcDNAにc-Mycエピトープタグ配列（ATGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTG（配列番号1））を連結し、融合タンパク質として発現させればよい。

【0035】

50

本方法は、最初に

- (i) FXIIIの活性を測定しようとする被験体から採取した血漿
- (ii) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)
- (iii) カルシウム塩
- (iv) DTT (ジチオトレイトール)
- (v) トロンビン
- (vi) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド)
- (vii) Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> )

を混合し、30~40 で5~60分間反応する。この反応をMyc-BAPA反応と呼ぶ。

【0036】

(i)の血漿はTBS等の緩衝液で数倍、好ましくは5倍希釈し、2~20 μL、好ましくは2.5~10 μL、さらに好ましくは5 μL添加する。反応液の総容積に対する血漿の容積比は、低い方がクロットを生じにくいので好ましい。例えば、5~30(v/v)%、好ましくは5~25(v/v)%、さらに好ましくは5~20(v/v)%である。

(ii)のBAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)の濃度は、1~5 mM、好ましくは1~3 mM、さらに好ましくは2 mMである。

(iii)のカルシウム塩としては、塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>)、グルコン酸カルシウム等のカルシウム塩を添加して反応液中でCaイオンを生じさせればよい。好ましくはCaCl<sub>2</sub>を用いる。Ca塩の濃度は、1~10mM程度であり、例えば、CaCl<sub>2</sub>を用いる場合、CaCl<sub>2</sub>の濃度は、2~10mM、好ましくは3~7 mM、さらに好ましくは5 mMである。Caイオンは架橋に必要となる。

(iv)のDTTの濃度は、1~5 mM、好ましくは1.5~2.5mM、さらに好ましくは2 mMである。DTTはFXIIIの活性部位を保護する。DTTの代わりにDTE (ジチオエリトリトール)を用いてもよい。

(v)のトロンビンの濃度は、5~15U/mL、好ましくは7.5~12.5U/mL、さらに好ましくは10 U/mLである。トロンビンはFXIIIを活性化する。トロンピンはFXIIIを活性化する。トロンピンはヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ等の血液由来のものを使用できる。

(vi)のGPRPの濃度は0.5~1.5mM、好ましくは0.75~1.25mM、さらに好ましくは1.1mMである。GPRPはフィブリンの多量体化を抑制する。

(vii)のMycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> )の添加量は2U/mLの標品を2~10 μL、好ましくは2~6 μL、さらに好ましくは4 μLである。すなわち、濃度は4 mU/mL~20mU/mL、好ましくは4 mU/mL~12mU/mL、さらに好ましくは8mU/mLである。

【0037】

反応液の総量は、10~100 μL、好ましくは15~50 μL、さらに好ましくは25 μLである。

反応液のpHは、6.5~8.5、好ましくは7~8、さらに好ましくは7.5である。pHはトリス、バルビタール、グッドバッファー等の緩衝剤で調整すればよい。

上記の反応条件は、フィブリンのクロットができない条件である。

反応は、EDTAやEGTA等のキレート剤を添加し、Caイオンを除去し停止させる。

【0038】

反応後、Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> )に取り込まれたBAPAを定量すればよい。Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> )に取り込まれたBAPAは抗Myc抗体及び標識したストレプトアビジンまたはアビジンを用いた抗原抗体反応を利用して測定することができる。抗Myc抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体を用いる。

【0039】

抗原抗体反応を利用した測定法は、抗Myc抗体を固相化し、固相化した抗Myc抗体に反応液中のBAPAが取り込まれたMycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> )を結合させる。次いで、発色酵素で標識したアビジンまたはストレプトアビジンを添加し、ビオチンとアビジンの反応を利用して固相上に抗Myc抗体 : Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> ) : 酵素で標識したアビジンまたはストレプトアビジンの複合体を形成させる (「:」は結合を表す)。発色酵素

10

20

30

40

50

の基質を加え発色させる。発色の程度を測定することにより、Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> ) に取り込まれたBAPAを定量することができ、定量値によりFXIIIの活性を求めることができる。

【0040】

抗原抗体反応を利用した測定法としては、ELISAまたは免疫クロマトグラフィが挙げられる。これらの方法は、(1)のELISAによるPI-BAPAアッセイ、または免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイにおいて、抗<sub>2</sub>-PI抗体の代わりに抗Myc抗体を用いればよい。

【0041】

### 3. 本発明の方法の用途

#### (1) FXIIIの活性測定

本発明のELISAによるPI-BAPAアッセイ、免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイ、ELISAによるMyc-BAPAアッセイ、免疫クロマトグラフィによるMyc-BAPAアッセイにより、被験体から採取した血漿中のFXIII活性を測定することができる。

FXIII因子の活性が低いと止血栓が弱くなり、溶けやすくなる。

【0042】

被験体において原因不明の出血傾向が認められるとき本発明の方法でFXIII活性を測定すればよく、FXIII活性が低い場合、被験体は先天性FXIII因子欠乏症、後天性自己免疫性出血病FXIII/13、クローン病、潰瘍性大腸炎、肝不全、播種性血管内凝固、Schonlein-he noch紫斑病等に罹患している可能性がある判断することができる。

【0043】

#### (2) FXIIIインヒビターの検出

FXIIIインヒビターとは、FXIIIに対する自己抗体が作られてFXIIIが働かなくなることをいう。FXIIIには、AサブユニットとBサブユニットがあり、どちらに対しても自己抗体が作られる。

【0044】

本発明のELISAによるPI-BAPAアッセイ、免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイ、ELISAによるMyc-BAPAアッセイ、免疫クロマトグラフィによるMyc-BAPAアッセイにより、被験体におけるFXIIIインヒビターを検出することができる。

【0045】

特に自己免疫性出血病FXIII/13 (AHFXIII/13) はFXIIIインヒビター (自己抗体) によるので、FXIIIインヒビターの検出により、自己免疫性出血病FXIII/13の診断が可能になる。また、自己免疫性出血病FXIII/13においては、自己抗体がFXIIIのAサブユニット (FXIII-A) を認識してFXIIIの活性化を阻害するAa型や自己抗体が活性化FXIIIを認識してFXIIIの活性を阻害するAb型等に分けられる。

【0046】

FXIIIインヒビターは患者の血漿と健常人の正常血漿を用いた1:1 交差混合試験により検出することができる。すなわち患者の血漿、正常血漿および患者の血漿と正常血漿を1:1で混合した血漿について、本発明の方法でFXIIIの活性を測定する。患者の血漿と正常血漿を1:1で混合した血漿について、FXIII活性が患者血漿と正常血漿の平均より低くなり、活性の阻害が認められる場合に、患者においてFXIIIインヒビターが検出されたと判断することができる。自己免疫性出血病FXIII/13のAa型、Ab型のいずれについてもFXIIIインヒビターを検出することができる。

【0047】

さらに、FXIIIインヒビターは患者の血漿と健常人の正常血漿を用いた5段階希釈混合試験によっても検出することができる。5段階希釈混合試験においては、正常人の血漿と患者の血漿とを1:0、1:3、1:1、3:1、0:1で混合し、それぞれについて本発明の方法でFXIIIの活性を測定する。希釈度を横軸にとって、FXIII活性を縦軸にとって、値をプロットしたときに、プロットを結んだ線分が下向きに凸になった場合を「因子欠乏型」ではなくて、「インヒビター型」といい、FXIIIインヒビターが検出されたと判断することができる。すなわち、FXIII活性の低下が「インヒビター型」であるか「因子欠乏型」であるか

10

20

30

40

50

を区別することもできる。

【0048】

(3) FXIIIインヒビター力価の定量

本発明のELISAによるPI-BAPAアッセイ、免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイ、ELISAによるMyc-BAPAアッセイ、免疫クロマトグラフィによるMyc-BAPAアッセイにより、被験体におけるFXIIIインヒビター力価を定量することができる（いわゆるベセスダ法）。

【0049】

ベセスダ法でインヒビター力価を定量する場合は、段階希釈した被験血漿と正常血漿を1:1で混合し、37℃で2時間加温後に残存FXIII活性を測定する。残存FXIII活性が50%になる希釈倍率で得られたインヒビター力価に、その希釈倍率を乗じて最終インヒビター力価とする。正確なインヒビター力価を得るためには、残存FXIII活性が25~75%に入るように被験血漿を段階希釈すると良い。

10

【0050】

(4) FXIII活性測定用キット

本発明は、FXIII活性測定用キットも包含する。該キットは、ELISAによるMyc-BAPAアッセイ、免疫クロマトグラフィによるMyc-BAPAアッセイ、ELISAによるPI-BAPAアッセイ、および免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイを含む。

【0051】

Myc-BAPAアッセイ用キットは、

20

- (a) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)
- (b) カルシウム塩
- (c) DTT (ジチオトレイトール)
- (d) トロンピン
- (e) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド)
- (f) Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> )
- (g) 標識ストレプトアビジン
- (h) 発色基質

及び抗Myc抗体を固相化したELISAプレートもしくは免疫クロマトグラフィ用ストリップを含む。

30

【0052】

PI-BAPAアッセイ用キットは、

- (a) BAPA (5-ビオチンアミドペンチルアミン)
- (b) カルシウム塩
- (c) DTT (ジチオトレイトール)
- (d) トロンピン
- (e) GPRP (Gly-Prp-Arg-Proアミド)
- (f) 標識ストレプトアビジン
- (g) 発色基質

及び抗<sub>2</sub>-PI抗体を固相化したELISAプレートもしくは免疫クロマトグラフィ用ストリップを含む。

40

【0053】

上記キットにおける、各試薬の濃度等は「1. 血漿内<sub>2</sub>-PI (プラスミンインヒビター)へのアミン取り込み反応(PI-BAPA反応)を利用した方法」、および「2. Mycタグ付加<sub>2</sub>-PI ( <sub>2</sub>-PI<sup>Myc</sup> )へのアミン取り込み反応(Myc-BAPA反応)を利用した方法」に記載のとおりである。

【0054】

(a)から(h)または(a)から(g)の試薬は、別々の容器に含まれていてもよいし、複数または全ての試薬が同じ容器に含まれていてもよい。

【実施例】

50

## 【0055】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

## 【0056】

以下の実施例において、%は、特に断らない場合はw/v%を示す。

本実施例で用いた材料は以下のとおりである。

## 【0057】

5-ビオチンアミドペンチルアミン(5-biotinamidopentylamine : BAPA)(EZ-link pentyl amine-biotin, Cat. No. 21345)はThermo Scientific社(Rockford, IL, USA)より購入した。

10

## 【0058】

ヤギ抗ヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター( $\alpha_2$ -PI)抗体(Cat. No. GA2AP-AP)は、Affinity Biologicals社(Ancaster, ON, Canada)より入手した。

## 【0059】

西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(Cat. No. RPN1231)は、GE Healthcare社(Bioscience AB, Uppsala, Sweden)から購入した。

## 【0060】

アルカリホスファターゼ(AP)標識ストレプトアビジン(Cat. No. AR001)は、R&D Systems社(Minneapolis, MN, USA)から入手した。

## 【0061】

テトラメチルベンチジン(Tetramethylbinzidine)(TMB)パーオキシダーゼEIA複合体基質キット(Cat. No. 1721067)および5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸(5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt (BCIP))、4-ニトロブルーテトラゾリウムクロライド(p-nitro blue tetrazolium chloride (NBT)) AP発色キット(Cat. No. 1706432)は、Bio-Rad社(Hercules, CA, USA)より購入した。

20

## 【0062】

Nジメチルカゼイン(N,N-dimethylcasein)(Cat. No. C9801)、モノダンシルカタベリン(monodansylcadaverine ; MDC, Cat. No. D4008)、Gly-Pro-Arg-Pro amide (GPRP, Cat. No. G5779)およびウシ血漿由来トロンピン(Cat. No. T4648)はSigma-Aldrich社(St. Louis, MO, USA)より購入した。

30

抗c-Myc抗体(Cat. No. 04362-34)はナカライテスク社(京都、日本)から入手した。

## 【0063】

[比較例] MDC取り込み反応(MDCアッセイ)(Lorand-Urayama法)

10 $\mu$ Lの血漿に、50 $\mu$ Lの0.4% N,N-dimethylcasein(終濃度0.2%)、25 $\mu$ L 2 mM MDC(終濃度0.5 mM)、0.2 $\mu$ L 1 M dithiothreitol (DTT, 終濃度2 mM)、0.5 $\mu$ L 1 M CaCl<sub>2</sub>(終濃度5 mM)、1 $\mu$ L 1kU/mLトロンピン(終濃度10 U/mL)を混合し、13.3 $\mu$ Lの150 mM NaClを含む20 mM Tris (pH 7.5)(TBS)で全量0.1 mLの反応液とした。37 $^{\circ}$ Cで30分間反応し、0.1 mL 10%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止した。10,000xgで5分間遠心して沈殿を回収し、0.3 mLのエタノール・エーテル1:1混合液で3回洗浄後、0.3 mLの8 M尿素、1% SDS、50 mM Tris (pH 8.0)に溶解して、360 nmの励起光における520 nmの蛍光を測定した。

40

## 【0064】

[実施例1] 血漿内 $\alpha_2$ -PIへのアミン取り込み反応(PI-BAPA反応)を利用した方法

[方法]

(1) 血漿内 $\alpha_2$ -PIへのアミン取り込み反応(PI-BAPA反応)

5 $\mu$ Lの血漿に、0.5 $\mu$ L 0.1 M BAPA(終濃度2 mM)、0.5 $\mu$ L 0.1 M DTT(終濃度2 mM)、1.25 $\mu$ L 0.1 M CaCl<sub>2</sub>(終濃度5 mM)、2.5 $\mu$ L 11 mM GPRP(終濃度1.1 mM)、0.25 $\mu$ L 1kU/mLトロンピン(終濃度10 U/mL)と15 $\mu$ L 150 mM NaClを含む20 mM Tris (pH 7.5)(TBS)を加えて全量25 $\mu$ Lとし、37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした。反応は、0.5 mLの10 mM EDTAを含むTBSを添加して停止させた。

## 【0065】

50

## (2) ELISAによるPI-BAPAアッセイ (図2)

50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で2,000倍に希釈した抗<sub>2</sub>-PI抗体0.1 mLを96穴プレートに入れ、抗<sub>2</sub>-PI抗体を固相化した。PI-BAPA反応終了液10 μLを、90 μLの2%牛血清アルブミン (BSA) を含むTBSとともに抗<sub>2</sub>-PI抗体プレートに入れ、37 °Cで1時間インキュベートした。0.1% Tween 20を含むTBS (TBS-T)0.15 mLで5回洗浄後、2% BSA-TBSで2,000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン0.1 mLを入れて、室温で1時間インキュベートした。0.15 mL TBS-Tで5回洗浄後、0.1 mL TMB基質液と37 °Cで5分間反応させた。50 μLの0.3 M 硫酸を入れて反応を停止後、450 nmの吸光度を測定した。

【0066】

## (3) 免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイ

TBSで800倍に希釈したPI-BAPA反応終了液40 μLを、抗<sub>2</sub>PI抗体を塗布したニトロセルロース膜ストリップ (株式会社キューメイ研究所にて作製) に37 °Cで5分間展開した。0.1 mLのTBS-Tで5分間、3回洗浄後、TBSで100倍希釈したAP標識ストレプトアビジン 50 μLを37 °Cで10分間展開した。0.1 mLのTBS-Tで5分間、3回洗浄後、0.1 mLのAP基質 (NBT-BCIP) を37 °Cで10分間展開し、発色した。蒸留水で10分間洗浄した後、自動濃度読み取り機にて発色度を測定した。

【0067】

[結果]

ELISAによるPI-BAPAアッセイの確立

ELISAや免疫クロマトグラフィにて血漿のFXIII活性を測定する際、フィブリン形成に大きく妨害されることが予想された。そこで、まず、フィブリン形成を抑制するFXIII活性化方法について検討した。フィブリン多量体化を抑制するGPRP存在化でトロンビンによる活性化を行った場合、血漿濃度10%の反応液において、GPRP 0.1 mM では反応液がゲル化した。1 mMではクロットの形成は認められなかった (図1A、MDC取り込み)。1 mM GPRP存在化で、血漿濃度20%までは反応液のゲル化は抑制されたが、50%ではクロット化した (図1B、PI-BAPA反応)。高濃度のカルシウムがトロンビン非依存性にFXIIIを活性化することが知られているが、反応液のゲル化は起こらないものの、トロンビンで活性化させた場合と比べてFXIIIの活性化効率極めて低かった (図1Aの100 mMのカルシウムを用いた場合)。

【0068】

血漿中の<sub>2</sub>-PIに、FXIII依存性にBAPAが取り込まれ、かつ抗<sub>2</sub>-PI抗体でビオチン化した<sub>2</sub>-PIが捕捉されるかを、ELISAにて検討した。プロトコルを図2-2に示す。1 mM GPRP存在化、血漿濃度10%の反応液で20分間反応し、抗<sub>2</sub>-PI抗体固相化プレートに捕捉されるビオチン標識タンパク質をHRP標識ストレプトアビジンで検出を試みたところ、発色が確認された。正常血漿にトランスグルタミナーゼ阻害剤 (iodoacetamide) を添加した反応液、FXIIIあるいは<sub>2</sub>-PI欠乏血漿での反応液ではいずれも発色しないことから、FXIIIによる<sub>2</sub>-PIへのBAPA取り込みであることが確認された。1 μg/mLの抗<sub>2</sub>-PI抗体溶液0.1 mLを固相化したプレートにおいて、おおよそ0.3 μLまでの正常血漿に含まれる<sub>2</sub>-PIを捕捉できることを確認した (図2-1)。また、反応が飽和に達する時間について検討を行った。プロトコルを図3-2に示す。PI-BAPA反応は10分でほぼ飽和に達しており (図3-1)、この結果より、反応時間を5分間と決定した。

【0069】

上述の検討等から、PI-BAPAの反応およびELISAの反応条件を以下のように決定した。

(a) 反応組成: 20%(v/v)血漿、2 mM BAPA, 2 mM DTT, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GPRP, 10 U/mL トロンビン

通常はトータル反応液量は25 μLであるので、5 μLの血漿を用いる。

(b) 反応条件: 37 °C、5分間

0.5mLの10mM EDTA-TBS添加で反応を停止する (20倍希釈)。

(c) ELISA条件

(i) 0.1 μg/wellでウェルに抗<sub>2</sub>PI抗体を添加して1時間インキュベートして固相化を

10

20

30

40

50

行う。

(ii) 上記の反応停止液(10 mM EDTA-TBS)で20倍希釈した反応液10  $\mu$ Lをプレートのウェルに添加する。

(iii) TBS-Tで5回洗浄後、1% BSA-TBSで2,000倍希釈したHRP標識ストレプトアビジン0.1mLを添加し、1時間インキュベートする。

(iv) TBS-Tで5回洗浄後、TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)0.1mLを添加し、5分間反応させる。

(v) 0.3M硫酸を添加し反応を停止し、450nmの吸光度を測定する。

#### 【0070】

決定した反応条件では、FXIII欠乏血漿で正常血漿を段階的に希釈した場合(図4-2にプロトコルを示す)、正常血漿の濃度に対して直線的な反応を示した(図4-1)。この結果は、PI-BAPA反応がFXIII依存性であることを示す。また、繰り返し反応における変動係数は5.7%と、安定した測定値を示すことを確認した(データは示さない)。また、トータルの検体のデータを用いた場合、従来のMDC法とおおよそ良好な相関を示した(図5A)。しかし、コントロール(健常人)群と後天性F13欠乏症(AF13D)症例群と自己免疫性出血病XIII/13(AH13)症例群を分けた場合、特に自己免疫性出血病XIII/13(AH13)症例群において、より低値を示す傾向にあった(図5B)。

#### 【0071】

PI-BAPAアッセイによるAH13-FXIIIインヒビターの検出を検討した。正常血漿をAH13症例血漿にて5段階混合希釈を行ったところ、Aa型、Ab型ともに、良好な阻害パターンを示した(図6-1(AH13 Aa型)および図6-2(AH13 Ab型))。

#### 【0072】

1:1交差混合試験における阻害率を従来の活性測定法と比較したところ、AH13症例全体にアンモニア放出法(AR)とほぼ同等の高い阻害率を示し、特にARでは阻害が検出困難なAb型でも高い阻害率を認めた(図7)。

#### 【0073】

免疫クロマトグラフィによるPI-BAPAアッセイ

PI-BAPA反応について、抗<sub>2</sub>-PI抗体を塗布したストリップを用いた免疫クロマトグラフィによる検出を検討した。プロトコルを図8に示す。展開する反応終了液量(濃度)について、まず10倍ずつ希釈したところ、10倍希釈した場合に強い発色が見られ、1,000倍希釈まで検出可能であった。血漿(FXIII)量に対する直線性を確認するため、FXIII欠乏血漿で段階希釈した正常血漿のPI-BAPA反応について免疫クロマトグラフィを行ったところ、反応終了液800倍希釈(図9C)において、正常血漿量との直線性が示された(図9)。

#### 【0074】

さらに、1:1交差混合試験によるFXIIIインヒビターの検出を試みたところ、Aa型(図10A)、Ab型(図10B)とも、免疫クロマトグラフィにおいても阻害が検出された(図10)。図10中、Pは患者の血漿を示し、Cは健常人の正常血漿を示し、1:1は患者の血漿と正常人の血漿を1:1で混合したことを示す。すなわち、1:1交差混合試験によりFXIIIインヒビターを検出することが可能であった。

#### 【0075】

最終的にPI-BAPAの反応および免疫クロマトグラフィの反応条件を以下のように決定した。

(a) 反応組成: 20%血漿、2 mM BAPA, 2 mM DTT, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM GPRP, 10 U/mL トロロンピン

通常はトータルの反応液量は25  $\mu$ Lであるので、5  $\mu$ Lの血漿を用いる。

反応組成は、ELISAを行う方法の場合と同じである。

(b) 反応条件: 37℃、5分間

0.5mLの10mM EDTA-TBS添加で反応を停止する。

(c) イムノクロマトグラフィの条件

10

20

30

40

50

- (i) 反応停止液をTBSで800倍希釈する。
- (ii) 40  $\mu$ Lを抗  $\alpha$ -PI抗体を固相化したストリップに展開させる(37  $^{\circ}$ C、10分間)。
- (iii) 0.1mL TBS-Tで洗浄する(5分間、3回)。
- (iv) 50mL AP標識ストレプトアビジン(100倍希釈液)を展開させる(37  $^{\circ}$ C、10分間)。
- (v) 0.1mL TBS-Tで洗浄する(5分間、3回)。
- (vi) 0.1mL NBS-BCIP基質液を展開させ発色させる(37  $^{\circ}$ C、10分間)。
- (vii) H<sub>2</sub>Oで10分間洗浄し、発色を確認する。

#### 【0076】

[実施例2] 血漿内  $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>へのアミン取り込み反応(Myc-BAPA反応)

(1) Mycタグ付加  $\alpha$ -PI ( $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>)の作製

$\alpha$ -PI cDNA(開始Met~Lys-464)は、ヒト肝臓mRNAを鋳型として、プライマーA<sub>2</sub>PI-BF: 5'-cagcaaggatccccgagaggaacATGgagc-3'(配列番号2)(下線はBamHI切断配列、大文字は開始コドン)、A<sub>2</sub>PI-XR: 5'-cggcctcgagccttggggctgcccactggg-3'(配列番号3)(下線はXhoI切断配列)を用いてRT-PCRにより増幅した。BamHIとXhoIで切断したcDNA断片をc-Mycエピトープタグ配列とともに発現ベクター-pcDNA3に挿入した。発現ベクターを導入したBaby hamster kidney (BHK)細胞をgeneticinで選別し、 $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>高発現細胞株を樹立した。 $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>高発現細胞を培養した無血清D-MEM培地を回収し、30%硫酸で生じた沈殿を除去後、終濃度70%硫酸で $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>を沈殿させた。TBSに溶解し、透析脱塩した溶液を $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>標品とした。段階希釈した正常プール血漿(n=17)を標準(1U/mL)として、Western blottingにより2U/mLと定量した。

#### 【0077】

(2) 血漿中の  $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>へのアミン取り込み反応(Myc-BAPA反応)

TBSで5倍希釈した血漿5  $\mu$ Lに、0.5  $\mu$ L 0.1 M BAPA(終濃度2 mM)、0.5  $\mu$ L 0.1 M DT T(終濃度2 mM)、1.25  $\mu$ L 0.1 M CaCl<sub>2</sub>(終濃度5 mM)、2.5  $\mu$ L 11 mM GPRP(終濃度1.1 mM)、0.25  $\mu$ L 1kU/mL トロンピン(終濃度10 U/mL)および4  $\mu$ L  $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>標品を加えて、11  $\mu$ L TBSにて全量25  $\mu$ Lの反応液を調製した。37  $^{\circ}$ Cで5分間インキュベート後、0.5 mLの10 mM EDTAを含むTBSを添加して反応を停止させた。

#### 【0078】

(3) ELISAによるMyc-BAPA測定

50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で2,000倍に希釈した抗c-Myc抗体0.1 mLを96穴プレートに入れ、抗c-Myc抗体を固相化した。Myc-BAPA反応終了液0.1 mLを抗c-Myc抗体プレートに入れ、37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。0.1% Tween 20を含むTBS(TBS-T) 0.15 mLで5回洗浄後、2% BSA-TBSで2,000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン0.1 mLを入れて、室温で1時間インキュベートした。0.15 mL TBS-Tで5回洗浄後、0.1 mL TMB基質液と37  $^{\circ}$ Cで5分間反応させた。50  $\mu$ Lの0.3 M 硫酸を入れて反応を停止後、450 nmの吸光度を測定した。

#### 【0079】

[結果]

Myc-BAPAアッセイ

PI-BAPAアッセイでは血漿中に内在する  $\alpha$ -PIを基質とするため、血漿  $\alpha$ -PI濃度に大きく影響を受ける。反応における検体毎の  $\alpha$ -PI濃度を一定にし、かつ内在の  $\alpha$ -PIおよびその他の基質タンパク質の影響を低減させるため、Mycタグを付加した  $\alpha$ -PI ( $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>)を用い、より少量(低濃度)の血漿での反応を検討した(Myc-BAPA反応、図11)。抗c-Myc抗体を用いたELISAにおいて、FXIII活性および  $\alpha$ -PI<sup>Myc</sup>に依存した発色が確認された(図12)。 $\alpha$ -PIあるいはフィブリノーゲンを欠乏した血漿(図12においては、それぞれ「 $\alpha$ -PI(-)」、「Fbg(-)」で表す)においてもMDCアッセイとよく一致した測定が認められた(図13)。FXIII-Aを欠乏した血漿では発色は認められなかった(図12のFXIII-A(-))。

#### 【0080】

5段階希釈混合試験において、Aa型、Ab型とも阻害パターンが示され(図14)、PI-BAPAアッセイおよびMDCアッセイともおおよそ良好な相関を示したものの(図15Aおよび

10

20

30

40

50

図15B)、測定のパックグラウンド値が高く、1:1交差混合試験での阻害率はPI-BAPA アッセイとくらべて低値となった(図7)。

【0081】

抗c-Myc抗体を塗布したストリップによる免疫クロマトグラフィによるMycアッセイは、図16Aの上を示す反応組成で行った。図16Aの下にELISAによるMycアッセイによる測定結果を示し、図16Bに免疫クロマトグラフィによるMycアッセイの結果を示す。Myc-BAPA反応液を抗 $\alpha$ -PI抗体ストリップでクロマトグラフした場合、PI-BAPA反応と同様正常血漿量に対する良好な直線性が示された(図16B)。さらに、1:1交差混合試験によるFXIIIインヒビターの検出を試みたところ、FXIIIインヒビターの検出も認められた(図17)。すなわち、1:1交差混合試験によりFXIIIインヒビターを検出することが可能であった。

10

【0082】

以上の検討から、 $\alpha$ -PIを十分量補充し、血漿濃度を低く抑えて反応を行うことで、FXIII活性に完全に依存した $\alpha$ -PIへのビオチン化(BAPA取り込み)が可能となること、抗 $\alpha$ -PI抗体を用いた免疫クロマトグラフィによる定量的な測定が可能であることが示された。

【0083】

図18に、PI-BAPAアッセイおよびMyc-アッセイの阻害率、感度及び特異度を示す。いずれも良好な結果が得られた。

【0084】

[実施例3] PI-BAPAによるベセスダアッセイ

20

[方法]

FXIII欠乏血漿で1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64に希釈した患者血漿5 $\mu$ Lを健常者プール血漿5 $\mu$ Lと混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。5 $\mu$ Lの混合血漿について、PI-BAPA反応を行った。10 mM EDTAを含むTBS 0.5 mLを加えて反応を停止した液10 $\mu$ Lについて、ELISAによるPI-BAPA測定を行い、解析ソフトウェア Prism 7を用いてベセスダ単位(BU)を算出した。

【0085】

[結果]

インヒビター力価を求めるため、PI-BAPA反応によるベセスダアッセイを行った。アンモニア放出(AR)法でのベセスダ単位(BU)がそれぞれ高値(118.5)、中等度の値(20.1)を示した症例17、46について、ELISA測定により検討した。高BUの症例17はPI-BAPA反応でも強い阻害が確認され、そのBUは83.5と算出された(図19)。AR法でのBUと同様に、症例46検体のPI-BAPA反応でも中程度の阻害が認められたが、算出されたBU値はAR法と比べていずれの症例ともに低値であった。

30

【産業上の利用可能性】

【0086】

本発明の方法により、出血傾向が認められる疾患の原因解明が可能になる。

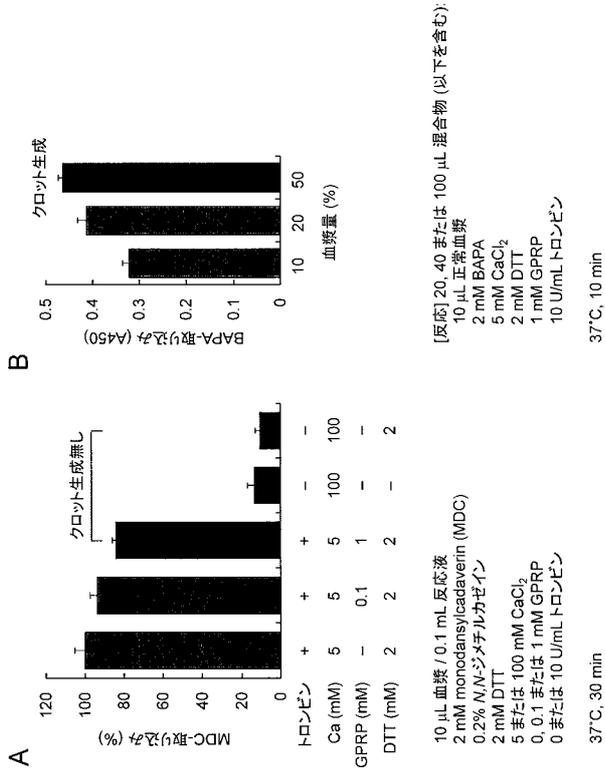
【配列表フリーテキスト】

【0087】

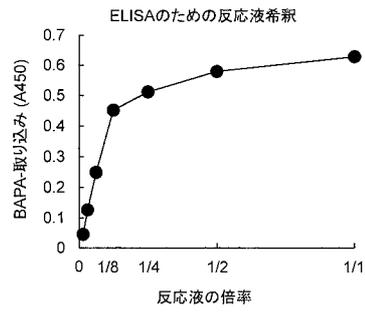
配列番号2、3 プライマー

40

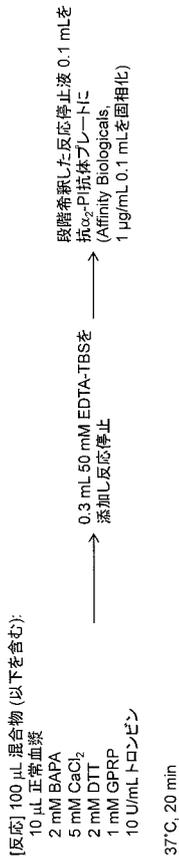
【 図 1 】



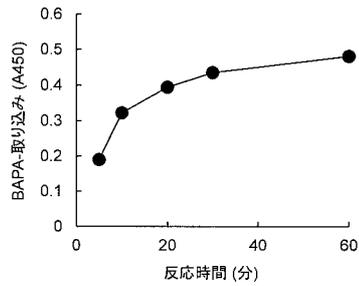
【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 2 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

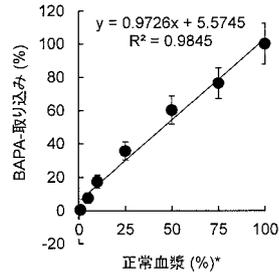
[反応] 100  $\mu$ L 混合物 (以下を含む):  
 10  $\mu$ L 正常血漿  
 2 mM BAPA  
 5 mM CaCl<sub>2</sub>  
 2 mM DTT  
 1 mM GPRP  
 10 U/mL トロンピン

→ 0.3 mL 50 mM EDTA-TBS を 添加し、反応停止

→ 1/10 希釈した反応停止液 0.1 mL を 抗 $\alpha_2$ -PI 抗体プレートに

37°C, 5, 10, 20, 30, 60 min

【 図 4 - 1 】



\*正常プール血漿をFXIII欠乏血漿で希釈

【 図 4 - 2 】

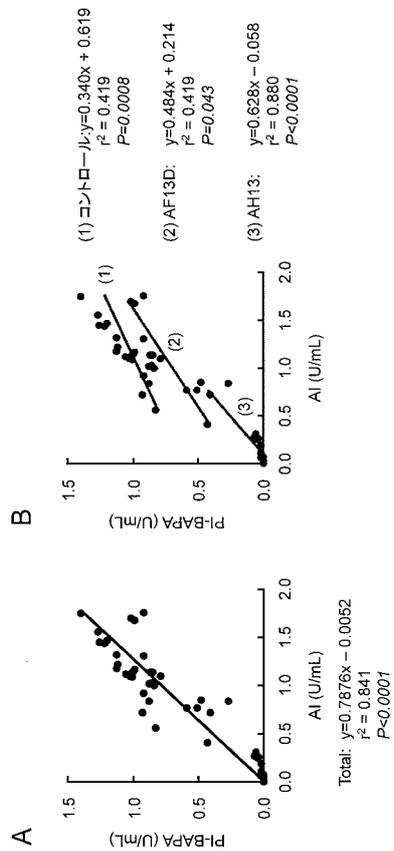
[反応] 25  $\mu$ L 混合物 (以下を含む):  
 5  $\mu$ L 血漿\*  
 2 mM BAPA  
 5 mM CaCl<sub>2</sub>  
 2 mM DTT  
 1 mM GPRP  
 10 U/mL トロンピン

→ 0.5 mL 50 mM EDTA-TBS を 添加し反応停止

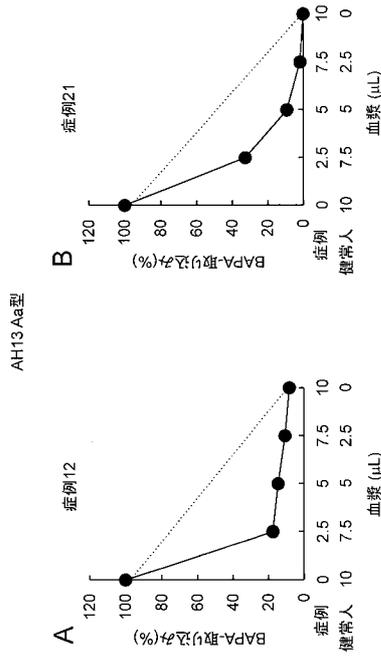
→ 段階希釈した反応停止液 0.05 mL を 抗 $\alpha_2$ -PI 抗体プレートに

37°C, 10 min

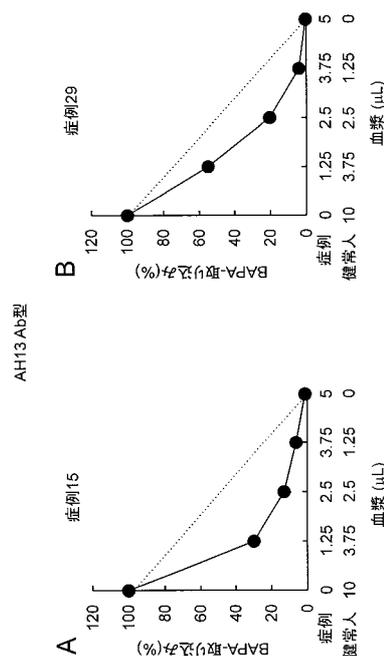
【 図 5 】



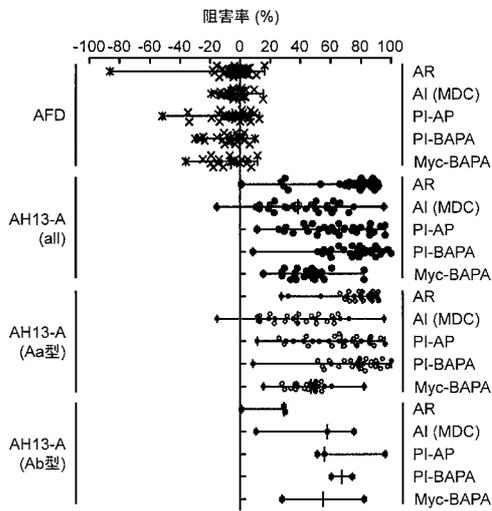
【 図 6 - 1 】



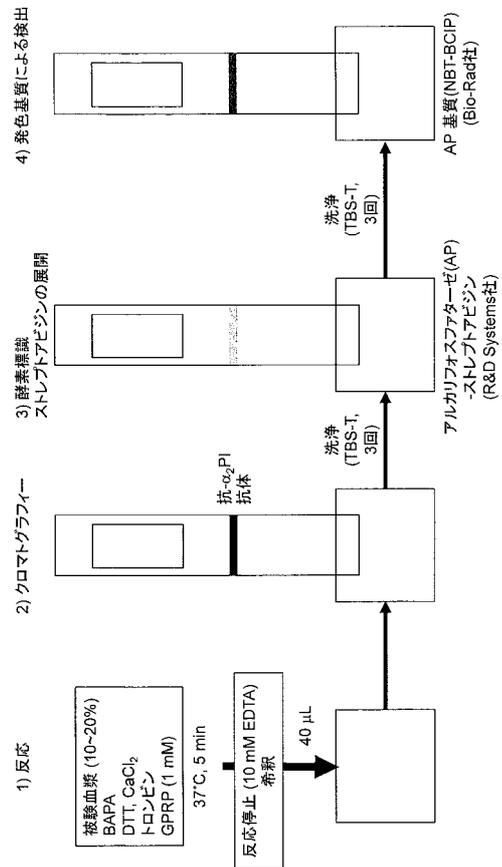
【 図 6 - 2 】



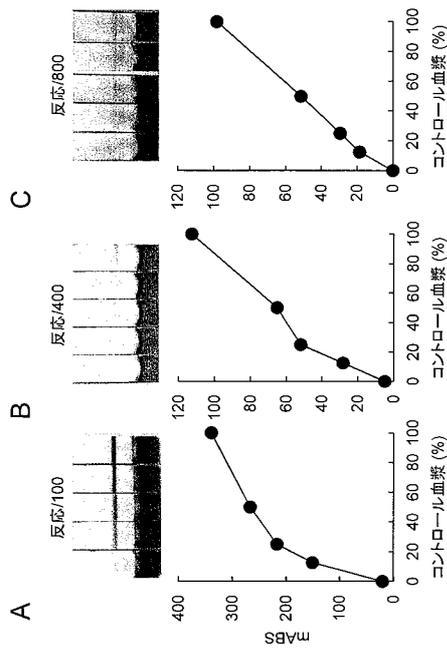
【 図 7 】



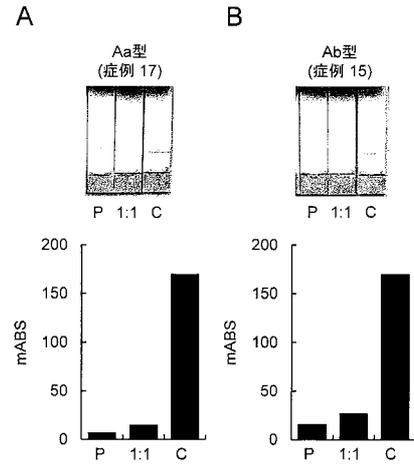
【 図 8 】



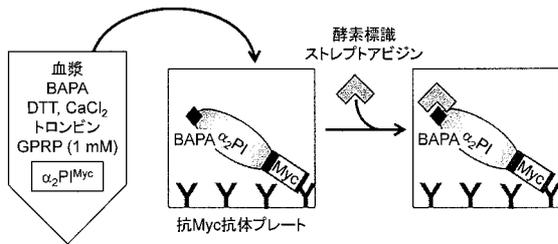
【 図 9 】



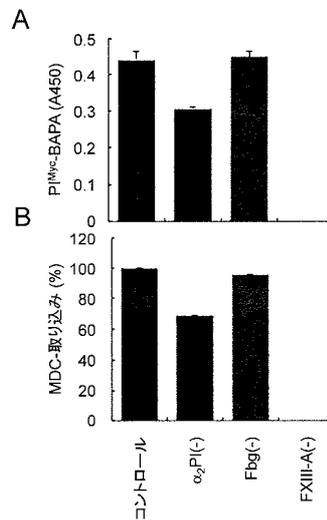
【 図 1 0 】



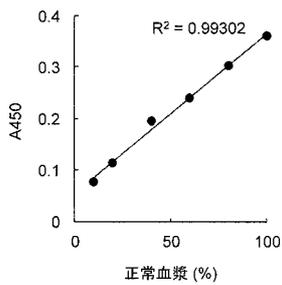
【 図 1 1 】



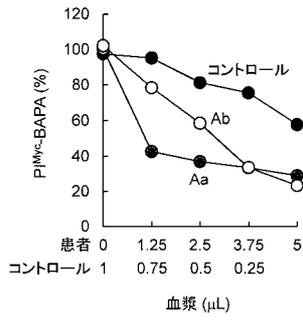
【 図 1 3 】



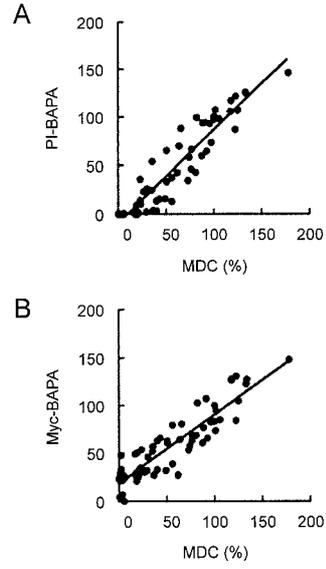
【 図 1 2 】



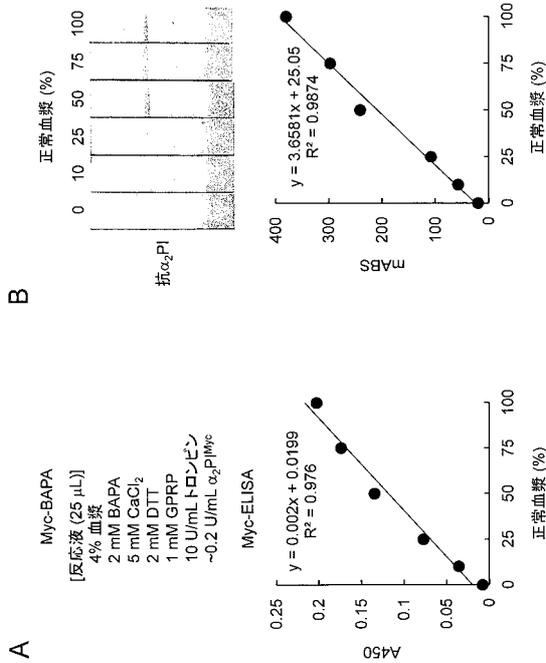
【 図 1 4 】



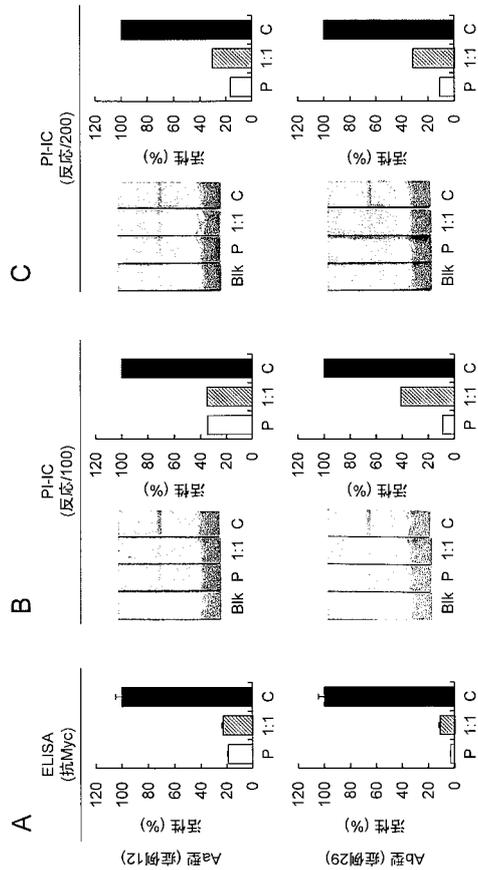
【 図 1 5 】



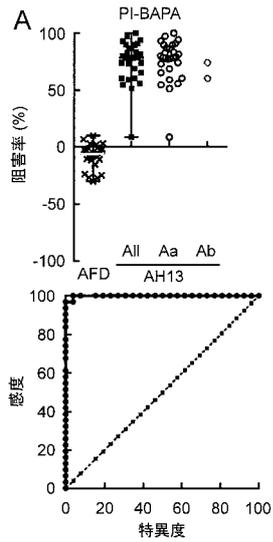
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

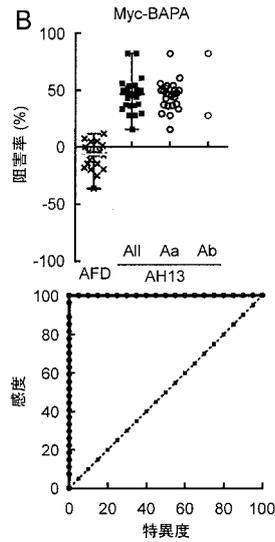


【 図 1 8 】

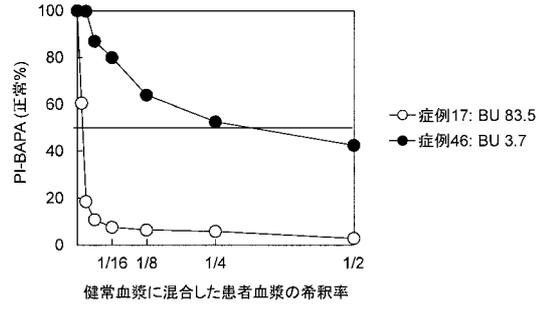


カットオフ(%)	感度	特異度
>7.5	100%	96.15%
>30.65	96.77%	100%

【 図 1 9 】



カットオフ(%)	感度	特異度
>13.5	100%	100%
>21.55	96.3%	100%



【 配 列 表 】

2018128388000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 惣宇利 正善

山形県山形市飯田西 2 - 2 - 2 国立大学法人山形大学医学部内

(72)発明者 曲 泰男

大分県大分市大字古国府字永畑 5 4 9 番 3 株式会社キューメイ研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ26 QR48 QR50 QS33 QX02

