

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6422161号
(P6422161)

(45) 発行日 平成30年11月14日(2018.11.14)

(24) 登録日 平成30年10月26日(2018.10.26)

(51) Int.Cl. F1
GO1N 33/53 (2006.01) GO1N 33/53 N

請求項の数 2 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2015-51874 (P2015-51874)	(73) 特許権者	502285457
(22) 出願日	平成27年3月16日 (2015.3.16)		学校法人順天堂
(65) 公開番号	特開2016-170154 (P2016-170154A)		東京都文京区本郷2-1-1
(43) 公開日	平成28年9月23日 (2016.9.23)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成29年10月17日 (2017.10.17)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g A腎症検査法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

I g A腎症の診断を目的として、尿潜血陽性被験者由来の血液中の糖鎖異常I g A 1値、I g A - I g G免疫複合体値及び糖鎖異常I g A 1特異的I g A値を測定し、当該3種の測定値をロジスティック回帰モデルにより解析することを特徴とする検査法。

【請求項2】

前記ロジスティック回帰モデルの解析スコアが健常人に比べて高いことが、I g A腎症の可能性あることを示す請求項1記載の検査法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、I g A腎症を早期に発見診断する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

I g A腎症は、世界で最も多い慢性糸球体腎炎であり、糸球体メサンギウム領域へのI g Aの沈着を主体とする顆粒状沈着を特徴とするメサンギウム増殖性腎炎、と定義され、約25年の経過で約半数が末期腎不全へと進行する予後不良な疾患である。メサンギウム領域には、しばしばI g Gの共沈着がみられる。その発症機序はいまだ十分に解明されておらず、その治療方法も、食事療法、抗血小板薬、降圧薬、副腎皮質ステロイド等による薬物治療が行なわれているが、十分な治療効果は得られていない。

【 0 0 0 3 】

I g A 腎症は、前記の定義に従い、現在、腎生検により診断されている。しかし、腎生検は、入院を要し、出血・感染のリスクを伴うために患者に対する負担が大きい、片腎の患者には腎生検施行が困難である等の問題がある。従って、採血や採尿などの非侵襲的な検者データによって I g A 腎症を診断することは重要課題である。

【 0 0 0 4 】

一方、I g A 腎症には、I g A 及び I g G がともに沈着する症例、I g A のみが沈着する症例が混在し、非侵襲的診断は困難である。また、I g A 腎症患者の血中には、糖鎖異常型 I g A 1 が増加している（非特許文献 1）ことが知られている。しかし、糖鎖異常 I g A 1 だけで、本症の病態を説明することは困難であり、糖鎖異常 I g A 1 が高分子の免疫複合体を形成し、腎臓に沈着することが病態において重要であると考えられる。免疫複合体を形成する I g A は糖鎖異常 I g A 1 であり、患者血中には、糖鎖異常 I g A 1 - I g A、および糖鎖異常 I g A 1 - I g G 免疫複合体が増加していることが判明し、近年本発明者らは、糖鎖異常 I g A 1 を特異的に認識する I g G 抗体を同定し、測定系を樹立した（非特許文献 2）。さらに、本発明者らは、少なくとも血中 I g A 値、血中糖鎖異常 I g A 1 値、血中 I g A - I g G 免疫複合体値、血中糖鎖異常 I g A 1 特異的 I g A 値及び尿中タンパク値の 5 種の測定値をロジスティック回帰モデルにより解析することにより I g A 腎症が診断できることを見出し、先に特許出願した（特許文献 1）。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 1 3 - 2 4 6 1 2 7 号 公 報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Kidney Int, 2007, 71: 1148-1154

【 非特許文献 2 】 J Clin Invest, 2009, 119: 1668-1677

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

しかしながら、従来の診断法では、尿タンパク値が高いなどの腎疾患が疑われる被験者でなければ I g A 腎症の発見には至らなかった。前記のように I g A 腎症は、進行すると治療が困難であることから、早期に発見することが必要であり、より早期の診断手法が望まれる。

従って、本発明の課題は、より早期に I g A 腎症を発見するための非侵襲的な診断手法を提供することにある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

尿潜血陽性者については、通常、尿路結石や尿路癌等が疑われるだけであり、慢性腎炎の検査対象とならないため、泌尿器科において異常なしと判断されることが多い。尿潜血陽性者が数年して蛋白尿が陽性になって初めて腎臓内科を受診し、腎炎と診断され、すでに進行している患者が少なくない。通常、蛋白尿が陽性にならなければ腎臓内科受診勧告はされない。

そこで本発明者は、蛋白尿は陽性ではないが、尿潜血陽性者に着目し、I g A 腎症を早期発見するための手段について種々検討したところ、尿潜血陽性者に対して、血中の 3 種のマーカーを測定し、その 3 種のマーカーをロジスティック回帰モデルにより解析したところ、当該解析スコアが高い被験者が I g A 腎症であると早期に診断できることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、次の〔 1 〕及び〔 2 〕を提供するものである。

【 0 0 1 0 】

10

20

30

40

50

〔 1 〕 I g A 腎症の診断を目的として、尿潜血陽性被験者由来の血液中の糖鎖異常 I g A 1 値、I g A - I g G 免疫複合体値及び糖鎖異常 I g A 1 特異的 I g A 値を測定し、当該 3 種の測定値をロジスティック回帰モデルにより解析することを特徴とする検査法。

〔 2 〕 前記ロジスティック回帰モデルの解析スコアが、健常人に比べて高い場合に I g A 腎症の可能性があると判定する〔 1 〕記載の検査法。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明の検査法によれば、蛋白尿が陽性になる前の早期に I g A 腎症が発見でき、病態が進行する前に的確な治療を行うことが可能となる。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 1 2 】

【図 1】ロジスティック回帰モデル解析結果とカットオフポイントを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

本発明の検査法は、尿潜血陽性被験者を対象として、血液中の糖鎖異常 I g A 1 値、I g A - I g G 免疫複合体値及び糖鎖異常 I g A 1 特異的 I g A 値を測定し、当該 3 種の測定値をロジスティック回帰モデルにより解析することを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

本発明の検査法の対象者は、尿潜血陽性被験者である。尿潜血は、通常健康診断等で行われる尿潜血試験紙による検査で測定することができる。尿潜血試験紙には、過酸化水素クメン等の過酸化剤と o - トリジン等の還元型色原体が含まれている、尿中に赤血球由来のヘモグロビンが含まれていれば、ヘモグロビンにより過酸化剤を分解し、活性酸素を遊離する。この遊離した活性酸素により還元型色原体が強化され、試験紙に色が発生する。

20

【 0 0 1 5 】

尿潜血陽性被験者の血液中の糖鎖異常 I g A 1 値、I g A - I g G 免疫複合体値及び糖鎖異常 I g A 1 特異的 I g A 値の 3 種を測定する。

【 0 0 1 6 】

糖鎖異常 I g A 1 値は、例えばレクチンを用いたアフィニティクロマト法、E L I S A 等の免疫測定法により測定することができる。このうち、E L I S A により測定するのが、正確であり好ましい。糖鎖異常 I g A 1 値は、精製された糖鎖異常 I g A 1 蛋白を対象として測定され、血清約 2 0 0 μ L 中に含まれる糖鎖異常 I g A 1 値が吸光度 (O D) として得られるので、この数値を I g A 値と掛け合わせ、糖鎖異常 I g A 1 値を算出し (U n i t s / m L) 、ロジスティックモデル解析に使用する。

30

【 0 0 1 7 】

I g A - I g G 免疫複合体値は、E L I S A 法より測定することができる。I g A - I g G 免疫複合体値は、通常血漿を対象として測定され、血清約 2 0 0 μ L 中の濃度が吸光度 (O D) として得られるので、この数値をロジスティックモデル解析に使用する。

【 0 0 1 8 】

糖鎖異常 I g A 1 特異的 I g A 値は、E L I S A 法により測定することができる。E L I S A で測定するのが、正確であり好ましい。糖鎖異常 I g A 1 特異的 I g A 値は、通常血漿を対象として測定され、血清約 2 0 0 μ L 中の濃度が吸光度 (O D) として得られるので、この数値をロジスティックモデル解析に使用する。

40

【 0 0 1 9 】

ロジスティック回帰モデルによる解析は、市販の統計解析ソフトに含まれる多変量解析 (ロジスティック回帰モデル) を用いて、前記 3 種の変数を入力して解析すればよい。ロジスティック回帰モデルは、J M P s o f t w a r e (S A S I n s t i t u t e J a p a n 株式会社) より入手できる。具体的には、ロジスティック回帰モデルの変数として、糖鎖異常 I g A 1 値、I g A - I g G 免疫複合体値、糖鎖異常 I g A 1 特異的 I g A 値を入力し、I g A 腎症患者と健常者の各々の数値を定量化する。

50

【0020】

得られた解析結果を、健常者についての解析結果と対比すれば、さらに正確な診断が可能である。また、健常者の解析結果、I g A腎症の患者の解析結果、他の腎疾患患者の解析結果を多数データベース化すれば、より正確な診断が可能となる。被験者の解析スコアが、健常者のそれに比べて高い場合にI g A腎症の可能性があると診断できる。

【実施例】

【0021】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

【0022】

実施例

10

尿潜血陽性者2747名に対して、血中の糖鎖異常I g A 1値、I g A - I g G免疫複合体値及び糖鎖異常I g A 1特異的I g A値を測定し、ロジスティック回帰モデル解析を行った。健常人74名の同マーカー値をコントロールとして用いた。

【0023】

(a) 糖鎖異常I g A 1 (E L I S A法)

糖鎖異常ヒトI g A 1に対するモノクローナル抗体を用いたE L I S A測定系のキットを用いて測定した。

【0024】

(b) I g A - I g G免疫複合体 (E L I S A法)

1) 抗ヒトI g G抗体 < F (a b ')₂ fragments of goat anti-human I g G (F c - specific) (Jackson ImmunoResearch Labs) > をP B Sを用いて2 μ g / m Lに調整し、E L I S Aプレートの各ウェルに100 μ Lずつ添加して4 で一晩インキュベートし、プレートをコーティングする。

20

2) プレートを3回洗浄する。

3) 1% B S A + P B S - Tを200 μ Lずつ各ウェルに添加し、4 で一晩インキュベートしてプレートをブロックする。

4) プレートを5回洗浄する。

5) P B S - Tで至適濃度に希釈したヒト血清を各ウェルに添加し、4 で一晩インキュベートする。

30

6) プレートを5回洗浄する。

7) H R P酵素標識抗ヒトI g A抗体をP B S - Tを用いて10000倍に希釈し、100 μ Lずつ各ウェルに添加する。37 で2時間インキュベートし、酵素標識を行う。

8) プレートを5回洗浄する。

9) 発色基質液を用いて5分間発色する。1規定の硫酸で反応を止める。

10) S p e c t r a M a x 340 P C (M o l e c u l a r D e v i c e s)を用いて吸光度を測定する(490 nm)。

【0025】

(c) 糖鎖異常I g A 1特異的I g A (E L I S A法)

40

1) 糖鎖異常I g A 1のF a b領域・ヒンジ部をP B Sで1.0 μ g / m Lに調整し、4 で一晩インキュベートしプレートをコーティングする。

2) プレートを3回洗浄する。

3) 2% B S A + P B S - Tを200 μ Lずつ各ウェルに添加し、4 で一晩インキュベートしてプレートをブロックする。

4) プレートを5回洗浄する。

5) P B S - Tで至適濃度に希釈したヒト血清を各ウェルに添加し、4 で一晩インキュベートする。

6) プレートを5回洗浄する。

7) F c領域特異的マウス抗ヒトI g A抗体 < m o u s e m o n o c l o n a l

50

antibody to human IgA (Fc specific) (Applied Biological Materials Inc.) > を PBS-T で 0.5 μg/mL に調整し、各ウェルに 100 μL ずつ添加し 37 で 2 時間インキュベートする。

8) プレート を 5 回 洗 浄 する。

9) ペルオキシダーゼで酵素標識された抗マウス IgG 抗体 < Peroxidase - conjugated AffiniPure Goat Anti - Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research) > を PBS-T で 20000 倍に希釈し、各ウェルに 100 μL ずつ添加し、37 2 時間でインキュベートする。

10

10) プレート を 5 回 洗 浄 する。

11) 発色基質液を用いて 15 分間発色する。1 規定の硫酸で反応を停止する。

12) SpectraMax 340PC (Molecular Devices) を用いて吸光度を測定する (490 nm)。

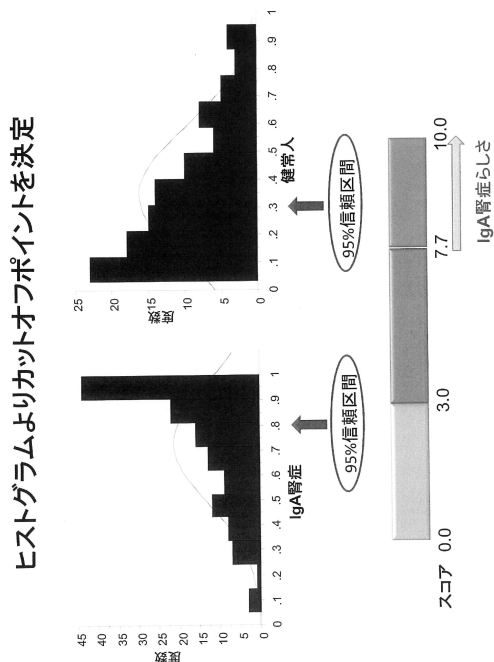
【0026】

用いたロジスティック回帰モデルは、実際には、透析解析ソフトに変数を入力し、自動的に算出されるものである。

IgA 腎症患者と健常人の測定結果を用いて、各々の 95% 信頼区間を計算した。その結果、IgA 腎症の 95% 信頼区間が 7.7、健常人の 95% 信頼区間が 3.0 と算出され、図 1 に示すように、解析スコアが 3.0 以下の場合に IgA 腎症の可能性が低い、3.1 以上 7.7 未満の場合には要観察、7.7 以上の場合に IgA 腎症の可能性が高いと判定できることが判明した。

20

【図 1】



フロントページの続き

- (72)発明者 鈴木 仁
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
(72)発明者 鈴木 祐介
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内

審査官 西浦 昌哉

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0266260 (US, A1)
特開2013-246127 (JP, A)
国際公開第2010/092961 (WO, A1)

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

专利名称(译)	IgA肾病的检测方法		
公开(公告)号	JP6422161B2	公开(公告)日	2018-11-14
申请号	JP2015051874	申请日	2015-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂		
申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人顺天堂		
[标]发明人	鈴木仁 鈴木祐介		
发明人	鈴木仁 鈴木祐介		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	村田正樹		
其他公开文献	JP2016170154A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本发明中提供为IgA肾病比的发现非侵入性诊断技术的早期。诊断的IgA肾病的目的，在从潜血阳性受试者中的血糖异常的IgA1水平，测定IgA的IgG的免疫复合物的值和糖异常特定的IgA1-IgA水平，3个检查方法的特征在于通过logistic回归模型分析所测量的值的种类。【选择图】无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6422161号 (P6422161)
(45) 発行日 平成30年11月14日(2018.11.14)	(24) 登録日 平成30年10月26日(2018.10.26)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) F I G O 1 N 33/53 N		
請求項の数 2 (全 6 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-51874(P2015-51874)	(73) 特許権者 502285457 学校法人順天堂	
(22) 出願日 平成27年3月16日(2015.3.16)	東京都文京区本郷2-1-1	
(65) 公開番号 特開2016-170154(P2016-170154A)	110000084	(74) 代理人
(43) 公開日 平成28年9月23日(2016.9.23)	特許業務法人アルガ特許事務所	100077562
審査請求日 平成28年10月17日(2017.10.17)	弁理士 高野 登志雄	(74) 代理人 100096736
	弁理士 中嶋 俊夫	(74) 代理人 100117156
	弁理士 村田 正樹	(74) 代理人 100111028
	弁理士 山本 博人	(74) 代理人 100111028
		弁理士 山本 博人
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 IgA腎症検査法		