

(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2017-129549

(P2017-129549A)

(43) 公開日 平成29年7月27日(2017.7.27)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	L	2 G O 4 5	
GO 1 N	33/50	(2006.01)	GO 1 N	33/50	Z	4 H O 4 5	
CO 7 K	17/00	(2006.01)	CO 7 K	17/00			
CO 7 K	16/42	(2006.01)	CO 7 K	16/42			
CO 7 K	16/36	(2006.01)	CO 7 K	16/36			
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 13 頁)							
(21) 出願番号 特願2016-11035 (P2016-11035)			(71) 出願人 302072136				
(22) 出願日 平成28年1月22日 (2016.1.22)			株式会社キューメイ研究所				
(出願人による申告) 平成27年度、国立研究開発法人			大分県大分市大字古国府字永畑549番3				
日本医療研究開発機構、難治性疾患実用化研究事業「後			(74) 代理人 100091096				
天性凝固異常症のP. O. C. テストによる迅速診断シ			弁理士 平木 祐輔				
ステムの開発」委託研究開発、産業技術力強化法第19			(74) 代理人 100118773				
条の適用を受ける特許出願			弁理士 藤田 節				
			(74) 代理人 100111741				
			弁理士 田中 夏夫				
			(74) 代理人 100101904				
			弁理士 島村 直己				
			(72) 発明者 一瀬 白帝				
			山形県山形市飯田西2-2-2 山形大学				
			医学部内				
最終頁に続く							

(54) 【発明の名称】 抗第X I I I / 1 3 因子Bサブユニット抗体検出法

(57) 【要約】

【課題】 血液中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を検出する方法及び該検出に用いるキットの提供。

【解決手段】 血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する遊離の抗体を検出する方法であって、第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIgG抗体を接触させ、支持体上で第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) - 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することを含む方法、並びに該方法に用いるキット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する遊離の抗体を検出する方法であって、第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIgG抗体を接触させ、支持体上で第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) - 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することを含む方法。

【請求項 2】

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する遊離の抗体が自己抗体である、請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 3】

血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を検出する方法であって、抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIgG抗体を接触させ、支持体上で抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体-第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体の複合体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することを含む方法。 20

【請求項 4】

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体が自己抗体である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

ウェスタンブロット法、ELISA法及びイムノクロマト法からなる群から選択される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

自己免疫性出血病XIII/13 (AH13) の検出のための補助的データを取得するための方法である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

自己免疫性出血病XIII/13 (AH13) が自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B) である、請求項 6 記載の方法。 30

【請求項 8】

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIgG抗体を含み、支持体上で第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) - 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する遊離の抗体を検出するためのキット。

【請求項 9】

抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIgG抗体を含み、支持体上で抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体-第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体の複合体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を検出するためのキット。 40

【請求項 10】

ウェスタンブロット法用キット、ELISA法用キット及びイムノクロマト法用キットからなる群から選択される、請求項 8 又は 9 に記載のキット。

【請求項 11】

自己免疫性出血病XIII/13 (AH13) の検出のための補助的データを取得するためのキット 50

である、請求項 8～10 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 12】

自己免疫性出血病XIII/13(AH13)が自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)である、請求項 11 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）抗体検出法に関する。

【背景技術】

【0002】

凝固第XIII/13因子（FXIII/13）の著明な低下が原因である自己免疫性出血病XIII/13（AH13；厚生労働省指定難病288）は、早期診断、早期治療が必要な重篤な出血性疾患であり、多彩な原因によって発症することが知られている（非特許文献 1～3 を参照）。そのうち、自己の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する抗体の出現に基づく自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)は、治療に免疫抑制療法が必要なため、迅速な抗体の検出が不可欠である。これまで、信頼できる抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）自己抗体の検出法がなかったため、全ての自己免疫性出血病XIII/13(AH13)の中でも本疾患の割合も不明であったので、再現性の高い検出法の確立が望まれていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】 Ichinose A, et al.; Haemophilia. 2015 Sep;21(5):653-8.

【非特許文献 2】 Souri M, et al.; J Thromb Haemost. 2015 May;13(5):802-14.

【非特許文献 3】 Wada H, et al.; Thromb Haemost. 2013 Apr;109(4):661-8.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、血液中の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する抗体を検出する方法及び該検出に用いるキットの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、自己の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する抗体の出現に基づく自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)を正確に検出すべく、第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する自己抗体の検出法について鋭意検討を行った。

【0006】

本発明者らは、第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する自己抗体が遊離の抗体の状態、又は第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）と複合体を形成した状態で血液中に存在することに鑑み、第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）を支持体に固相化して血中の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する遊離の自己抗体を捕捉して測定するサンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定法、及び抗第XIII/13因子Bサブユニット抗体を支持体に固相化し第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）と複合体を形成した状態で血液中に存在する第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する自己抗体を捕捉するサンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定法を開発し、血液中の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する自己抗体を高感度でかつ特異的に検出し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する遊離の抗体を検出する方法であって、第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIgG抗体を接触させ、支持体上で第XIII/13因子Bサブユニット

10

20

30

40

50

(FXIII/13-B) - 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することを含む方法。

[2] 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する遊離の抗体が自己抗体である、[1]の方法。

[3] 血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を検出する方法であって、抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIgG抗体を接触させ、支持体上で抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体-第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体の複合体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することを含む方法。

10

[4] 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体が自己抗体である、[3]の方法。

[5] ウェスタンブロット法、ELISA法及びイムノクロマト法からなる群から選択される、[1]～[4]のいずれかの方法。

[6] 自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の検出のための補助的データを取得するための方法である、[1]～[5]のいずれかの方法。

[7] 自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)が自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)である、[6]の方法。

20

[8] 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIgG抗体を含み、支持体上で第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) - 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する遊離の抗体を検出するためのキット。

[9] 抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を固相化した支持体及び標識した抗ヒトIgG抗体を含み、支持体上で抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体-第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体の複合体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体を形成させ、標識した抗ヒトIgG抗体からのシグナルを検出することにより血液試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を検出するためのキット。

30

[10] ウェスタンブロット法用キット、ELISA法用キット及びイムノクロマト法用キットからなる群から選択される、[8]又は[9]のキット。

[11] 自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の検出のための補助的データを取得するためのキットである、[8]～[10]のいずれかのキット。

[12] 自己免疫性出血病XIII/13(AH13)が自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)である、[11]のキット。

【発明の効果】

【0008】

40

本発明の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を固相化した支持体又は抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を固相化した支持体を用いた、サンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定法により、血液中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を高感度でかつ特異的に検出することができる。被験体の血液中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する自己抗体又は同種抗体を検出することにより、自己免疫性出血病XIII/13 タイプB (AH13-B)を含む自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の検出、遺伝性第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 欠乏症症例における「抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 同種抗体」の検出を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

50

【図 1】第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 検出に対する感度と特異度の高い抗体の選抜のためのウエスタンブロット法の結果を示す図である。

【図 2 - 1】抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体の反応性をELISA法で検討した結果を示す図である。

【図 2 - 2】抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体の検出感度をELISA法で検討した結果を示す図である。

【図 3 - 1】6種類のモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法による自己免疫性出血病XIII/13 タイプB (AH13-B)の診断の結果を示す図である。

【図 3 - 2】段階的に希釈したモノクローナル抗体1-3Cを用いたイムノクロマト法による自己免疫性出血病XIII/13 タイプB (AH13-B)の診断の結果を示す図である。

【図 4】酵素処理をしたモノクローナル抗体1-3Cを用いたイムノクロマト法による自己免疫性出血病XIII/13 タイプB (AH13-B)の診断の結果を示す図である。

【図 5】自己抗体陽性症例、同種抗体陽性例及び自己抗体陰性症例の抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体検出イムノクロマト法 (直接法)の結果を示す図である。

【図 6】抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体検出イムノクロマト法 (混合法と希釈混合法)の結果を示す図である。

【図 7】抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体検出イムノクロマト法 (混合法)の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、血液中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-Bタンパク質) に対する抗体を、サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法により測定する方法である。ここで本発明のサンドイッチ法を測定原理とした免疫学的測定法とは、抗体である標的物質を該標的物質に結合する抗原又は抗体を用いて挟み込むように捕捉して、標的物質を測定する方法をいい、単にサンドイッチ法ともいう。サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法においては、標的物質に結合し標的物質を捕捉し得る抗体又は抗原を結合させた固相を用いる。サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法としては、例えばイムノクロマト法、酵素免疫測定吸着法 (ELISA法)、ウエスタンブロット法等が挙げられる。

【0011】

なお、本発明において、「測定」という場合、定量、半定量、検出のいずれも含む。

本発明の測定対象となる第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-Bタンパク質) に対する抗体としては、自己抗体、すなわち、自己の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-Bタンパク質) に対する抗体だけでなく、同種抗体、すなわち、非自己の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-Bタンパク質)、例えば血漿由来FXIII/13濃縮製剤中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-Bタンパク質) に対する抗体も包含される。

【0012】

血液中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体は遊離の抗体として存在するか、あるいは第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した状態で存在する。血液中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) の量が多い場合、第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と自己抗体 (又は同種抗体) の複合体 (第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) - 自己抗体 (又は同種抗体) の複合体) が形成されやすくなる。従って、本発明の方法においては、遊離の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体又は第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と抗体の複合体を検出する。

【0013】

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する遊離の抗体をサンドイッチ法により測定する場合、第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIgG抗体を接触させる。接触方法は、支持体上に第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) - 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体 - 標識

10

20

30

40

50

した抗ヒトIgG抗体の複合体が形成されうる方法であれば特に制限はないが、好ましくは以下のように処理する。

【0014】

すなわち、固相に第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を結合させ、該固相に第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を含む試料を添加する。第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体は固相に結合した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に結合し捕捉される。次いで、自己抗体 (又は同種抗体) に対する抗体であって標識した抗体を添加し、自己抗体 (又は同種抗体) に結合させる。この結果、固相上に第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) - 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体-前記抗体に対する抗体であって標識した抗体の複合体が形成され、標識した抗体から発するシグナルを測定することにより、試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を測定することができる。この方法を「抗原塗布法」という。 10

【0015】

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した状態で存在する自己抗体 (又は同種抗体) をサンドイッチ法で測定する場合、抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を固相化した支持体に試料及び標識した抗ヒトIgG抗体を接触させる。接触方法は、支持体上に抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体-第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体の複合体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体が形成されうる方法であれば特に制限はないが、好ましくは以下のように処理する。 20

【0016】

すなわち、固相に抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を結合させ、該固相に第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と自己抗体 (又は同種抗体) の複合体を含む試料を添加する。第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と自己抗体 (又は同種抗体) の複合体は固相に結合した抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体に第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 部分が結合し捕捉される。次いで、自己抗体 (又は同種抗体) に対する抗体であって標識した抗体を添加し、自己抗体 (又は同種抗体) に結合させる。この結果、固相上に抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体-第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と自己抗体 (又は同種抗体) の複合体-前記抗体に対する抗体であって標識した抗体の複合体が形成され、標識した抗体から発するシグナルを測定することにより、試料中の第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) と複合体を形成した第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する抗体を測定することができる。この方法を「抗体塗布法」という。 30

【0017】

サンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定法において、第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 又は抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体を固相化する固相としては、抗体や抗原を公知技術により固定可能なものは全て用いることができ、例えば、毛細管作用を有する多孔性薄膜 (メンブレン)、マイクロタイタープレート、粒子状物質、試験管、樹脂平板など公知のものを任意に選択できる。イムノクロマト法やウェスタンブロット法においてはメンブレンを、ELISA法においてはマイクロタイタープレートを用いればよい。 40

【0018】

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 又は抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体の固相への結合は、吸着を利用してもよいし、アミノ基、カルボキシル基等の官能基を利用して共有結合により結合させてもよい。

【0019】

固相化する抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 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いが、好ましくはモノクローナル抗体を用いる。抗体は公知の方法で製造することができる。また、市販の抗体を用いてもよい。 50

【0020】

標識して用いる第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する抗体に対する抗体としては、抗ヒトIgG抗体を用いればよい。抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）抗体及び第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する抗体に対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いが、好ましくはモノクローナル抗体を用いる。抗体は公知の方法で製造することができる。また、市販の抗体を用いてもよい。

【0021】

固相化又は標識して用いる抗体は、FabやF(ab')₂のような免疫グロブリン断片、あるいは、組換え体として発現されたscFv、dsFv、diabody、minibody等の組換え抗体であってもよい。本発明において、「抗体」という語は、これらの断片も含む。これらの断片は公知の方法で調製することができる。

10

【0022】

標識抗体を標識する物質としては、アルカリホスファターゼ（ALP）や西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）等の酵素、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、着色ポリスチレン粒子等の有色粒子や金コロイド等のコロイド粒子などを用いることができる。抗体の標識は公知の方法で行うことができる。

【0023】

用いる試料としては、被験体の全血、血清、血漿等が挙げられる。本発明において、血液中の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する抗体を検出する場合、試料として全血、血清、血漿のいずれを用いる方法も含む。

20

【0024】

例えば、ELISA法は以下の工程で行う。

第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）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試料を添加し、抗原・抗体反応をさせ、さらに酵素標識した抗ヒトIgG抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して試料中の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する遊離の抗体を検出することができる。あるいは、抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）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試料を添加し、抗原・抗体反応をさせ、さらに酵素標識した抗ヒトIgG抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して試料中の第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）と複合体を形成した自己抗体（又は同種抗体）を検出することができる。また、酵素で標識した抗ヒトIgG抗体の代わりに蛍光標識した抗ヒトIgG抗体を用いて、抗原・抗体反応をさせた後に蛍光を測定してもよい。

30

【0025】

ELISA法において、添加する試料の量は数十μL～数百μLである。試料は数倍から十数倍に希釈して用いてもよい。

【0026】

抗原抗体反応は4℃～45℃、好ましくは20℃～40℃、さらに好ましくは25℃～38℃で行うことができ、また、反応時間は、10分～18時間、より好ましくは10分～1時間、さらに好ましくは30分～1時間程度である。

40

【0027】

また、イムノクロマト法は以下の工程で行う。

第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する遊離の自己抗体（又は同種抗体）を測定する場合、該自己抗体（又は同種抗体）を捕捉する第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）が固相化された検出領域を有する固相支持体（メンブレン）、着色ポリスチレン粒子や金コロイド等の標識物質で標識した展開移動可能な標識抗ヒトIgG抗体を有する標識物質領域、試料を添加するサンプルパッド、展開された試料液を吸収する吸収帯、これら部材を1つに貼り合わせるためのバックグシートからなるイムノクロマト法用免疫測定デバイスを用いて行えばよい。該方法においては、第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）を固相化した固相支持体に毛管現象を利用して、着色ポリスチレン粒子や金

50

コロイド等の適当な標識物質で標識した抗ヒトIgG抗体と第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する遊離の自己抗体（又は同種抗体）の複合体をメンブレン上に展開移動させる。この結果、固相化した第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）-第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する遊離の自己抗体（又は同種抗体）-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体が固相支持体上に形成され、該複合体から発する標識物質のシグナル（金コロイドの場合は、被検出物質と結合し得る物質を固定化した固相支持体部分が赤くなる）を検出することにより、遊離の自己抗体（又は同種抗体）を検出することができる。該免疫測定方法は、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。

【0028】

10

第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）と複合体を形成した自己抗体（又は同種抗体）を検出する場合、固相支持体上に抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）抗体を固相化すればよい。固相化する抗体は1種類でよいが、好ましくは複数種類を用いる。固相支持体上には、固相化した抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）抗体-第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）と自己抗体（又は同種抗体）の複合体-標識した抗ヒトIgG抗体の複合体が形成される。

【0029】

イムノクロマト法において、添加する試料の量は数十μL～数百μLである。試料は数倍から十数倍に希釈して用いてもよい。

【0030】

20

イムノクロマト法は、4℃～45℃、好ましくは20℃～40℃、さらに好ましくは25℃～38℃で行うことができ、試料添加から判定までの時間は、数分から十数分程度である。

【0031】

イムノクロマト法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。

【0032】

本発明のサンドイッチ法の測定原理を利用した免疫学的測定法により第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）に対する遊離の自己抗体（又は同種抗体）を測定するときに固相化に用いる第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）は、交叉反応が起こらない精製の高いものを利用することが好ましく、特に組換え第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）を用いることが好ましい。また、第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）の断片タンパク質を用いてもよい。

30

【0033】

また、測定の際に測定系に増感剤を添加してもよい。増感剤としては、ポリエチレングリコールやポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、ポリアミノ酸、アミノメタンスルホン酸誘導体等が挙げられる。

【0034】

40

本発明の方法により、自己免疫性出血病XIII/13 タイプB (AH13-B)疑い症例の血液において「抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）自己抗体」を確実に検出することができる。本発明は、自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)を含む自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)のポイント・オブ・ケア・テスト（臨床現場迅速試験）のために有用である。また、測定原理が共通であることから、遺伝性第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）欠乏症症例における「抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）同種抗体」の検出にも有用である[図4～7]。

【0035】

すなわち、本発明は、自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)を含む自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の検出方法、あるいは自己免疫性出血病XIII/13 タイプB(AH13-B)を

50

含む自己免疫性出血病XIII/13 (AH13)の診断を行うための補助的データの取得方法を含む。さらに、本発明は、遺伝性第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 欠乏症症例における「抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 同種抗体」を検出する方法を含む。

【実施例】

【0036】

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。

【0037】

自己免疫性出血病XIII/13 タイプB (AH13-B) は第XIII/13因子欠乏症様の病態を呈する比較的稀な出血性後天性凝固異常症である。その内、抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 自己抗体が原因である自己免疫性出血病XIII/13 タイプB (AH13-B) は、本出願人らの調査により我が国でも5例が確認されているが、抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 自己抗体を検出する測定法が存在しないため、より多数の症例が見逃されていると推定される。そこで、(1) ウェスタンブロット法で抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 自己抗体を検出するための抗体、抗原を選別し、(2) ELISA法により抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 自己抗体測定系を構築し、(3) 抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 自己抗体検出イムノクロマト法を開発した。

【0038】

1. 第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 検出に対する感度と特異度の高い抗体の選抜

(1) ウェスタンブロット法

〔方法〕

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗原として様々な長さの組換え第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を用いて、抗体として抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) モノクローナル抗体(Hoast: mouse, Species reactivity: human)7種類に対して、抗原に対する反応性の強さを調べて、ウェスタンブロット法にて最適な抗体を決定した。

【0039】

図1にウェスタンブロット法の結果を示す。

1-3Cが全ての長さの第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を認識したので、感度、特異度の両面で最適であり、1-3B, 5-6Cが次善であることが判明した。

【0040】

(2) ELISA法

(a) ELISA法 (抗原量固定)

〔方法〕

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗原として全長組換え第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を用いて、抗体として抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) モノクローナル抗体(Hoast: mouse, Species reactivity: human)培養液上清に対して、抗体を含む培養液量を段階的に変化させて、ELISA法にて最適な抗体を決定した。

【0041】

図2-1にELISA法の結果を示す。

1-3C, 1-3B, 6-5Fが添加量に正比例して、全長第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) に対する反応性が増強したので、感度の面で最適であり、5-6Cが次善であることが判明した。

【0042】

(b) ELISA法 (抗体量固定)

〔方法〕

第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗原として全長組換え第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) を用いて、抗体として一定量の抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) モノクローナル抗体(Host: mouse, Species reactivity: human)に対して、

抗原濃度を段階的に希釈して、ELISA法にて最適な抗体を決定した。

【0043】

図2-2にELISA法の結果を示す。

6-5F, 1-3B, 1-3Cが、全長第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 添加量に正比例して反応性が増強したので、感度の面で最適であり、5-6Cが次善であることが判明した。

【0044】

2. 抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 自己抗体検出イムノクロマト法

(1) 無処理抗体塗布直接法

無処理の抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) モノクローナル抗体 (6種類) をメンブレン側に塗布してイムノクロマト法を試作した。評価は抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法 (Rapid immunochromatographic test for detection of anti-factor XIII A subunit antibodies can diagnose 90 % of cases with autoimmune haemorrhaphilia XIII/13.; Osaki T, Sugiyama D, Magari Y, Souri M, Ichinose A. ; Thromb Haemost. 2015 Jun;113(6):1347-56. doi: 10.1160/TH14-09-0745. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25740658 ; 以下同様) と同様の方法で、10倍に希釈した検体を泳動し、その後洗浄液を泳動させ、最後に抗ヒトIgG抗体を感作した金コロイドを泳動させた。

別途、モノクローナル抗体 (1-3C) を塗布したイムノクロマト法で、検体を段階的に希釈して感度、特異度を検討した。

【0045】

結果を図3-1及び図3-2に示す。

症例検体と健常対照の血漿をそのままイムノクロマトストリップに泳動する測定系では、目視で陽性コントロールと陰性コントロールで差は見られたが、非特異反応が観測された (検体未処理直接法; 図3-1)。陽性検体に対する感度を調査し、陰性検体の非特異的反応を減弱させて信号/ノイズ比を改善するために、検体を段階的に希釈したところ、目視での陽性検体と陰性検体との差はほぼ不変であった (図3-2)。

【0046】

(2) 酵素処理抗体塗布直接法

〔方法〕

酵素 (ナカライテスク社製ペプシン) で処理した抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) モノクローナル抗体 (1-3C) をメンブレン側に塗布してイムノクロマト法を試作した。評価は前記抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法と同様の方法で、10倍に希釈した検体を泳動し、その後洗浄液を泳動させ、最後に抗ヒトIgG抗体を感作した金コロイドを泳動させた。イムノクロマトのストリップに使用する2種類のメンブレンの性能を比較した。

【0047】

結果を図4に示す。

抗体を酵素で処理すると非特異反応は著しく改善され、特異性が増加した (図4)。いずれも、陽性コントロールと陰性コントロールで明確な差が得られた。使用するメンブレンによる差は認められなかった。

【0048】

(3) 酵素処理抗体塗布直接・混合・希釈混合法

〔方法〕

抗第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗体 (1-3C) をメンブレン側に塗布したイムノクロマトストリップを用いて、自己抗体陽性症例、陰性症例、同種抗体陽性例、健常対照の血漿をそのまま (直接法)、遺伝性第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 欠乏症のように第XIII/13因子Bサブユニット (FXIII/13-B) 抗原がない症例検体は予め健常対照の血漿と1:1 (混合法) あるいは 1:10, 1:100の比率で混合した後 (希釈混合法) に泳動した。評価は前記抗FXIII/13-Aサブユニット自己抗体検出イムノクロマト法と同様の方法で、10倍に希釈した検体を泳動し、その後洗浄液を泳動させ、最後に抗ヒトIgG抗体を感作した金コロイドを泳動させた。

【0049】

結果を図5～7に示す。

自己抗体陽性症例（H県F病院、T都ST病院、K県T大学）はイムノクロマト法でも陽性で、自己抗体陰性症例（G県G大学、T都N大学、T県S病院）はイムノクロマト法でも陰性であった（図5）。しかしながら、同種抗体陽性例（O県K大学）は病期の異なる3検体いずれも陰性であり、検出されなかった。

第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）が先天性に欠損している同種抗体陽性症例の診断当初の検体（図6、110111）は、健常血漿と1:1混合して第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）を補充すると抗体陽性となったが（図6左）、著しく遊離型抗体が増加していた病期の検体（図7、120327、120820）では陰性のままであった（図7）。

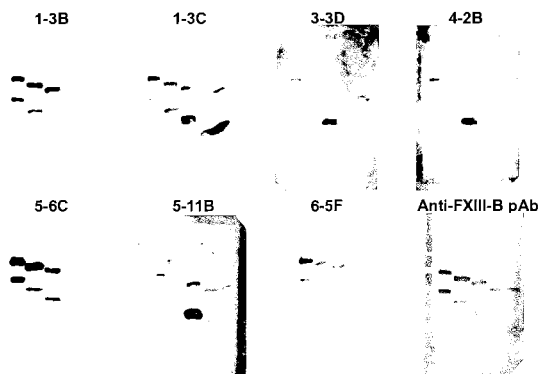
同種抗体陽性例の著しく遊離型抗体が増加していた病期の検体を健常血漿と1:10、1:100の比率で希釈混合して検査すると抗体陽性となった（図6右）。

【産業上の利用可能性】

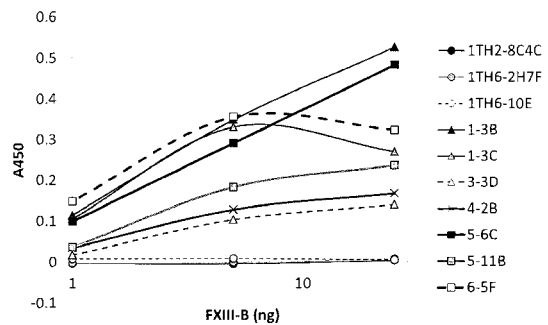
【0050】

本発明の方法により、自己免疫性出血病XIII/13タイプB(AH13-B)疑い症例の血液において「抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）自己抗体」を確実に検出することができる。また、遺伝性第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）欠乏症症例における「抗第XIII/13因子Bサブユニット（FXIII/13-B）同種抗体」の検出を行うこともできる。

【図1】



【図2-2】



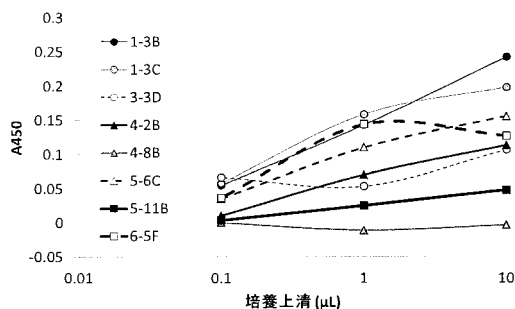
【図3-1】

検体ID	G県G大-1 884076(4)	G県G大-2 884076(6)	O県K大-1 887120(4)	O県K大-2 887120(6)	健常者 A
メンブレン 塗布抗体	患者血漿	健常者血漿	患者血漿	健常者血漿	
備考	FXIII-B陽性例		同種抗体陽性		
1-3B	3+	3+	5+	3+	2+
1-3C	4+	3+	5+	2+	2+
3-3D	3+	2+	4+	2+	2+
4-2B	4+	3+	4+	3+	2+
5-11B	4+	3+	5+	2+	2+
6-5F	3+	3+	5+	3+	3+

【図3-2】

検体ID	G県G大-1 884076(4)	G県G大-2 884076(6)	O県K大-1 887120(4)	O県K大-2 887120(6)	健常者 A
希釈倍率	患者血漿	健常者血漿	患者血漿	健常者血漿	
備考	FXIII-B陽性例		同種抗体陽性		
×10	3+	3+	5+	3+	2+
×40	4+	3+	5+	3+	3+
×160	4+	3+	5+	4+	3+
×640	3+	3+	3+	3+	3+
×2560	2+	3+	3+	4+	1+

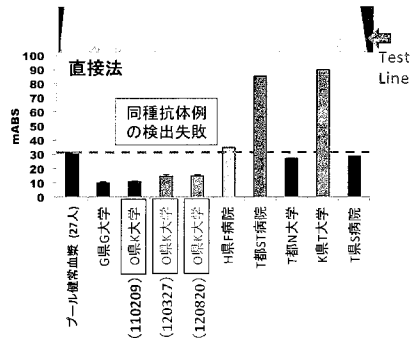
【図2-1】



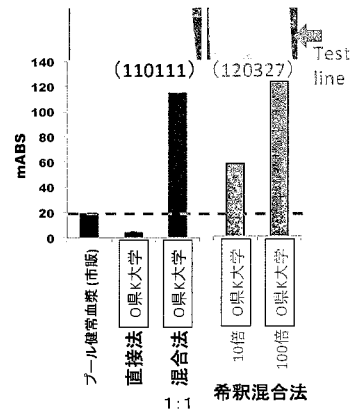
【図 4】

検体		健康者血漿1	健康者血漿2	患者血漿
ID				887120(4)
A社メンブレン 1-3CF(ab) ₂	目視	(1+)	(1+)	(3+)
B社メンブレン 1-3CF(ab) ₂	目視	(1+)	(1+)	(3+)-(3.5+)

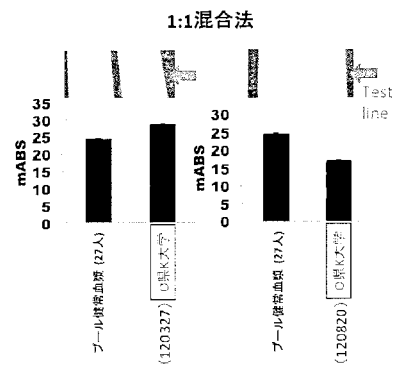
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(72)発明者 尾崎 司

山形県山形市飯田西 2-2-2 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

(72)発明者 杉山 大輔

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) 2G045 AA13 CA25 DA37 FB03

4H045 AA11 CA40 DA76 EA50

专利名称(译)	抗因子XIII / 13因子B亚基抗体检测方法		
公开(公告)号	JP2017129549A	公开(公告)日	2017-07-27
申请号	JP2016011035	申请日	2016-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	キューメイ研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社キューメイ研究所		
[标]发明人	一瀬白帝 尾崎司 曲泰男 杉山大輔		
发明人	一瀬 白帝 尾崎 司 曲 泰男 杉山 大輔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 C07K17/00 C07K16/42 C07K16/36		
FI分类号	G01N33/53.L G01N33/50.Z C07K17/00 C07K16/42 C07K16/36		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/CA25 2G045/DA37 2G045/FB03 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于所述方法的试剂盒，并且所述检测来检测抗体在血液中的XIII / 13因子B亚基 (FXIII / 13-B)。一种检测血液样品中因子XIII / 13因子B亚基 (FXIII / 13-B) 的游离抗体的方法，包括给予因子XIII / 13因子B亚基 (FXIII / 13-B) 的步骤在载体上固定有固相的样品和标记的抗人IgG抗体，并使载体与因子XIII / 13因子B亚基 (FXIII / 13-B) -XIII / 13接触一种方法，包括形成针对子B亚基 (FXIII / 13-B) 的抗体标记的抗人IgG抗体的复合物并检测来自标记的抗人IgG抗体的信号，以及用于该方法的试剂盒。

(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2017-129549 (P2017-129549A)
		(43) 公開日 平成29年7月27日 (2017.7.27)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	2G045
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50	L
C07K 17/00 (2006.01)	C07K 17/00	Z
C07K 16/42 (2006.01)	C07K 16/42	4H045
C07K 16/36 (2006.01)	C07K 16/36	
		審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 13 頁)
(21) 出願番号	特願2016-11035 (P2016-11035)	(71) 出願人 302072136
(22) 出願日	平成28年1月22日 (2016.1.22)	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
(出願人による申告) 平成27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		(74) 代理人 100091096
		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人 100118773
		弁理士 藤田 郎
		(74) 代理人 100111741
		弁理士 田中 夏夫
		(74) 代理人 100101904
		弁理士 島村 直己
		(72) 発明者 一瀬 白帝
		山形県山形市殿田西2-2-2 山形大学 医学部内
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 抗第XIII / 13因子Bサブユニット抗体検出法		