

(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2007-163505

(P2007-163505A)

(43) 公開日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50	J	2 GO 4 5
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68		

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2007-14847 (P2007-14847)	(71) 出願人	500121300 エール ユニバーシティ アメリカ合衆国コネチカット州 0652 0-8336 ニュー ヘブーン ホイット ニー アベニュー 155, オフィス オブ コーパレティブ リサーチ
(22) 出願日	平成19年1月25日 (2007.1.25)	(74) 代理人	100071755 弁理士 齊藤 武彦
(62) 分割の表示	特願平10-513008の分割	(74) 代理人	100070530 弁理士 畑 泰之
原出願日	平成9年9月5日 (1997.9.5)	(72) 発明者	コール, ローレンス エイ アメリカ合衆国コネチカット州 0647 7 オレンジ ノースウッド ドライブ 402
(31) 優先権主張番号	60/025,568	Fターム(参考)	2G045 AA27 CA26 CB03 CB07 CB11 DA44 FB03 FB05 FB06
(32) 優先日	平成8年9月6日 (1996.9.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 高グリコシル化ゴナドトロピンを用いるダウン症候群の出生前のスクリーニング

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】高グリコシル化ゴナドトロピンのからなる妊婦の胎児のダウン症候群の存否をスクリーニングテストするための被検体を提供する。

【解決手段】高グリコシル化ゴナドトロピンは絨毛ゴナドトロピンの変異体母集団、絨毛ゴナドトロピン - 遊離 - サブユニット、 - コアフラグメント、及び/又は - サブユニットからなり、これらは正常の胎児をもつ妊婦から得られるサンプル中で観察されるものと炭水化物含量が異なることを示す。正常のゴナドトロピン母集団を含有する対照サンプルからの高グリコシル化ゴナドトロピン母集団の炭水化物含量の相違の定量的又は定性的観察又はダウン症候群中に見られる変異体種の直接観察は女性の胎児がダウン症候群をもつことを示す。典型的なスクリーニングテストは炭水化物分析、免疫分析、又はこれらの組合せを含む。例えば、炭水化物部分に対して反応するコカバリン A、高グリコシル化種に対する抗体を用いる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高グリコシル化ゴナドトロピンのからなる妊婦の胎児のダウン症候群の存否をスクリーニングテストするための被検体。

【請求項 2】

スクリーニングテストがさらにエストリオールと - フェトタンパクの分析からなる請求項 1 記載の被検体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は出生前女性のダウン症候群のスクリーニングに関するものである。

【背景技術】

【0002】

血清中の - フェトプロテイン、絨毛膜のゴナドトロピン及び非共役エストロゲンの 3 重のスクリーニングがダウン症候群の出生前の診断方として示唆されている [非特許文献 1]。しかしながら、この診断法は遺伝的異常をもつ胎児のわずか 60 ~ 65 % の検出を可能にし、そして 5 % の間違っただ陽性結果を与える。またこの診断法は妊娠のセコンドトリメスター (妊娠期間の 15 ~ 24 週) に制限され、かなりの特許料が通常の方法を用いるヒト絨毛膜ゴナドトロピン分析を実施する研究所に支払われるので費用がかかる [非特許文献 2]。

【非特許文献 1】Bennett, J. C., 及び Plum, F. Cecil's Textbook of Medicine, W. B. Saunders, Philadelphia, 1996, 165 頁

【非特許文献 2】Auxter, So. Clin. Labor News 23: 1-3 (1997)

【0003】

700 人中の 1 人の新生児に影響するダウン症候群を導く胎児の染色体異常の最も信頼できる出生前診断法は典型的にはその代わりに 3 ヶ月間の妊娠期間中に羊水細胞の培養を包含する。この方法は少量の羊水 (羊水穿刺) の吸収、この流体中に含有される胎児細胞の培養及びこれらの細胞の核型の決定を包含する。従って妊娠 3 ヶ月後の胎児を包含する。染色体異常の検出のためにこの技術の使用の多くの適用は (出産予定の時に 35 才の年齢以上の全ての母親に通常適用される) 妊婦年齢、親の染色体異常の存在、又は先の三染色体胎児を身ごもった又は三染色体である核型の胎児を流産した経験のある妊婦に対してである。絨毛膜の絨毛の直接トランスサ - ビカル吸引 (絨毛膜の絨毛のサンプリング又は CVS) がまた出生前診断法に使用される。

【0004】

2 つの方法が比較的に安全であり信頼できるものとして示されているが、これらは流産の危険を含むいくつかの危険を包含し、CVS の場合にはその方法後に生まれた胎児の手足の発育不全の危険を包含する。ダウン症候群に対する妊娠した女性をスクリーニングするために他の方法をもつことが好ましい。特に非侵入性であり且つ感度のよいスクリーンをもつことが好ましい。多くにダウン症候群のケースは若くして妊娠した女性、予定された出産の 때가 35 才以上の女性、又は多くの妊婦生ずる。より少ない身体への侵入のスクリーニングテストは、血清又は尿サンプルを用いることによって羊水穿刺又は CVS の危険を望まないダウン症候群妊婦のために、高い危険度でこれらを同定することを要求される。

【0005】

ヒト絨毛膜のゴナドトロピン (hCG) は胎盤のトロホプラスト細胞によって比較的少量に分泌されるグリコプロテインホルモンである [非特許文献 3]。hCG は非共有結合で結合される 2 つの異なるサブユニット、 (92 アミノ酸及び N - 結合オリゴ糖類) 及び (145 アミノ酸及び 2 つの N - 結合及び 4 つの O - 結合オリゴ糖類) から構成され

10

20

30

40

50

、妊婦の血清又は尿中に又はトロホプラスト疾病（水胞形の奇胎及び絨毛癌）をもつものに検出される。遊離の α -及び β -サブユニット、及び分離したhCG及び遊離のサブユニット分子はまた血清及び尿サンプル中に検出される〔非特許文献4〕。分解した分子は α -サブユニット残基47及び48（又は残基43及び44又は44及び45の間には通常少ない）の間に各々開裂されたニックを入れた（nicked）hCG及びニックを入れた遊離の α -サブユニットを含み、 β -サブユニットはC-末端配列（93～145）の全て又は一部を欠失し、及び末端分解生成物は尿サンプル中で主として見出されるジスルフィド結合によって一緒に保持される2つのフラグメント、 α -サブユニット配列6～40及び55～92からなる（図1）。末端分解生成物はO-結合オリゴ糖類及び分解N-結合オリゴ糖類、1つ又は2つのN-結合ペンタ糖類対遊離の α -サブユニット及びhCG上に2つのウンデカ糖類をもたない（図2A）。末端分解生成物は、第1にそのサイズが小さいので（～9,000ダルトン；hCGは37,000ダルトン）及び第2にhCGラジオイムノアッセイ又は α -サブユニットコア抗血清（対C-末端他）免疫反応性（非特許文献5）のその保持の故に、 β -コアフラグメントと呼ばれる（非特許文献6）。妊娠期間のほとんどを通じて、 β -コアフラグメントは尿サンプル中の主なhCG α -サブユニット関連分子である。

10

20

30

40

50

【非特許文献3】Measure, H. R., 他 J. Clin. Endocrinol. Metab. 53:1014-1020 (1981)

【非特許文献4】Birken, S., 他 Endocrinology 122:572-583 (1988)

【非特許文献5】Birken, S., 他 Endocrinology 122:572-583 (1988)

【非特許文献6】Core, Blithe; D., 他 Endocrinology 122:173-180 (1988)

【0006】

血清及び尿遊離 α -サブユニットは3つの源；トロホプラスト細胞による直接分泌、循環するhCGの遊離の α -及び β -サブユニットへの遅い解離、そしてトロホプラスト組織と関連のあるマクロファージ及びニュートロフィル酵素によるhCGのニックングによる直接分泌、そして循環中のニックを入れられたhCGより速い解離、に由来する（図1）。遊離 α -サブユニットは循環中に酵素をニックングすることによりニックを入れ得る。尿 β -コアフラグメントは腎臓中のニックを入れられた遊離の α -サブユニットの解離から誘導されるように思われる。

【0007】

1980年の終り頃に、上記記載のトリプルマーカーテストがダウン症候群の妊婦に対するスクリーニングのために開発された。それは妊婦の年齢をhCG、 α -フェトプロテイン、及び非結合エストジオールと組合わせた〔非特許文献7〕、〔特許文献1〕、〔非特許文献8〕、〔非特許文献9〕。より最近では、血清遊離 α -サブユニット及び遊離 β -サブユニット- α -フェトプロテインの組合せが別法のダウン症候群スクリーニング方法として紹介されている〔非特許文献10〕、〔非特許文献11〕。しかしながら、最良の血清遊離 α -サブユニット結合、又は最適のトリプルマーカーテストは5%の間違った陽性割合をもつ、たった60～65パーセントのダウン症候群ケースを検出するにすぎない。これらの間違った陽性割合及び検出では、ほぼ80の羊水穿刺がダウン症候群の単一のケースを検出するために実施されることが必要であり、無視できない数のダウン症候群ケースの見落としがある〔非特許文献12〕。出産前スクリーニング方法の改良の必要性がある。

【非特許文献7】Bogart, M. H., 他 Prenat. Diagn. 7:623-630 (1987)

【特許文献1】Bogart Wald, N. J. 他 米国特許第4,874,693

【非特許文献8】Br. J. Obstet. Gynaecol. 95:334-341 (1988)

【非特許文献9】Canick, J. A., J. Clin. Immunoassay 13: 30 - 33 (1990)

【非特許文献10】Macri, J. N. 他 Am. J. Obstet. Gynecol. 163; 1248 - 1253 (1990)

【非特許文献11】Spencer, K., 他 Ann. Clin. Biochem. 30: 394 - 401 (1993)

【非特許文献12】Cole, L. A. 他 Prenatal Diagnosis 17: 607 - 614 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本願発明の目的はダウン症候群妊婦用の出産前スクリーニングテストを提供することにある。

【0009】

本願発明の他の1つの及びより具体的な目的は妊婦中のダウン症候群胎児のための感度の高い、非侵入性(noninvasive)のテストを提供することである。

【0010】

本願発明のさらなる目的は間違いのない陽性割合を示すトリプルマーカテストの改善を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

これらのそして他の目的は、女性から生物学的テストサンプルを得、そしてこのサンプル中の高グリコシル化ゴナドトロピン(hyperglycosylated gonadotropin)の観察によってダウン症候群の存在を決定することからなる、出産前の女性の胎児におけるダウン症候群の存在又は非存在についてスクリーニングする新規な診断法を提供する本願発明によって達成される。これは典型的には、テストサンプル中の高グリコシル化ゴナドトロピン、その遊離の - サブユニット、その遊離の - サブユニット、及び/又はその - コアフラグメントの濃度を測定し、そしてこのテストサンプル母集団(ポピュレーション)中の濃度が通常の高グリコシル化ゴナドトロピン又は遊離の - サブユニット、遊離の - サブユニット、又は - コアフラグメント母集団と異なるか、及び/又はダウン症候群母集団と同じか又は類似することを観察することによってダウン症候群の存在を決定することを包含する。好ましい態様では、テストサンプルは尿、唾液、血漿又は血清であり、母集団は高グリコシル化hCG, - コアフラグメント、遊離の - サブユニット、遊離の - サブユニット、及びこれらの混合物からなり、そして通常の高グリコシル化サンプル中で観察される特性間の相違はグリコポリペプチド及び/又はグリコペプチドの炭水化物含量で観察される相違を反映する。

【0012】

炭水化物組成又は構造分析、イムノアッセイ及びこれらの方法の組合せは一般に採用されている。ある態様では、高グリコシル化ゴナドトロピンは少なくとも1つの高グリコシル化種、例えば変異体hCG, 遊離 - サブユニット、遊離 - サブユニット及び/又は - コアフラグメントに対する分析によって直接決定される。これらのスクリーニング(又はスクリーン、screens)は典型的にはELISA、ウエスタンブロット等において高グリコシル化又は炭水化物 - 変異体hCG種に対するモノクローナル、ポリクローナル又は融合ファージ抗体を使用する。他の態様では、単糖類(モノサッカライド)の高レベルがダウン症候群に対する陽性サンプル中に観察される。他のスクリーンは炭水化物部分を結合するレクチン、hCGのグリコシル化(glycosylation)変異体を検出するクロマトグラフィー、化学又は電気泳動又は等電点電気泳動(isoelectric focusing)テストを使用する。レクチンはイムノアッセイ前に異常型の炭水化物部分をもつhCG種を分離及び/又は濃縮するためにまた使用される。

【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

【0013】

本発明は正常な胎児をもつ妊婦からではなくダウン症候群胎児をもつ妊婦の尿又は血清から得られたhCG種(高グリコシル化ゴナドトロピン)中の異常型炭水化物プロフィールの観察に基づくものである。

【0014】

本発明の実施において、妊婦の胎児中のダウン症候群の存在又は非存在は女性からの生物学的テストサンプルを得て、そしてそのサンプル中の高グリコシル化ゴナドトロピンを分析することによって決定される。これはテストサンプル中の絨毛膜のゴナドトロピン母集団又は物理特性が通常の絨毛膜ゴナドトロピン母集団を含有する対応する対照サンプルと異なるかどうかの決定を含み、及び/又はそのサンプルがダウン症候群中で観察された高グリコシル化ゴナドトロピン母集団の少なくとも1種の高レベルを含有することの決定を含む。

10

【0015】

ここで使用される如く、「絨毛膜ゴナドトロピン母集団(chorionic gonadotropin population)」は絨毛膜ゴナドトロピン、 α -サブユニット、 β -サブユニット、 β -コアフラグメント、及びこれらの混合物を含み、そして特にダウン症候群hCG母集団中に観察されるこれらの如く高グリコシル化される又はオリゴ糖類部分中の異常な単糖類組成物をもつこれらの種の異性体を包含する。用語「高グリコシル化ゴナドトロピン(hyperglycosylated gonadotropin)」は正常レベルに比べて異常型炭水化物プロフィール及び/又は異常型炭水化物レベルを示す高グリコシル化ゴナドトロピン、ニックを入れたゴナドトロピン、 α -サブユニット、 β -サブユニット、 β -コアフラグメント及びこれらの混合物からなる、これらの後者の種を絨毛膜ゴナドトロピン母集団内に一般に包含する。

20

【0016】

hCG及び β -コアフラグメントは多くの態様で使用される。本願発明の利点は妊娠血清が多量のhCGを含有すること、hCGが妊娠血清中に全 β -免疫反応性の99%以上を占めていることである。同様に、妊婦の尿は大きい母集団の β -コアフラグメントをもつ。実際に、 β -コア母集団は妊婦の尿中の全 β -免疫反応性の70%と同程度を占める(上記非特許文献6)。従って、本願発明の好ましい態様では、豊富な種、血清中のhCG及び尿中の β -コアフラグメント及びイムノアッセイを含む標準的な技術を用いて容易に検出されるもの、ここで説明されるそして上記非特許文献5及び6に記載されている同様の臨床測定、又はダウン症候群hCG種の炭化水素中に観察される変異体の故に、炭化水素に特異的にレクチンの使用の如き炭水化物分析、単糖類組成物テストの使用、グリコシル化変異体を検出するための電気泳動又は等電点電気泳動に対するスクリーニング方法を提供する。ダウン症候群及び関連異常妊娠中に観察される種々の変異種は図3に記載され、[非特許文献13]に記載される。多くの高グリコシル化ダウン症候群hCG種は、hCG β -サブユニット中にマンノースコアに結合したシアリルラクトサミン(NeuAc-Gal-GlcNAc)ピアンテナリー構造の代りに(図2)、追加のシアリルラクトサミンをもつリアンテナリー構造(図3)をもつ。他の高グリコシル化特性はフコース含有(対フコース遊離)N-結合オリゴ糖類の増加したレベルを含有し、そして β -サブユニットO-結合炭化水素部位にヘキサ糖類構造を含有する(図3c)。従って、高グリコシル化はダウン症候群hCG種中に著しく高められる。

30

40

【非特許文献13】Elliott, M. M., 他 Endocrine J., 7巻(1997)

【0017】

本発明の方法では生物学的サンプルはいずれのものも使用される。次のものを含むがこれらに限定されない。尿、唾液、血清、血漿、涙、及び羊膜流体等が使用できるが、涙、尿、血清又は血漿が好ましい。これらのサンプルは多量に存在し、そしてサンプリングが胎児を傷つける恐れがない。第1期(第1トリメスター)(一般に約9週~13週として定義される)又は第2期(一般に約14~28週)の妊婦から得られる尿がある態様では

50

特に好ましい。本願発明の利点は〔特許文献2〕（18～25週）に記載されたもののよ
うに胎盤の機能不全を評価する先に記載された方法よりも妊娠においてより早く第1期（
第1トリメスター）中に分析することができることである。妊娠期間の11～19週に使用
するのに適するスクリーニング方法は、例えば、次の実施例に及び図4に説明される。

【特許文献2】米国特許第4,874,693号

【0018】

本発明のダウン症候群スクリーニング（又はスクリーン）は高グリコシル化ゴナドトロ
ピンの検出用に炭水化物分析、イムノアッセイ、又はこれらの方法の組合せを一般に使用
するが、高グリコシル化ゴナドトロピンのサンプル濃度中の変化を通常のレベルから質的
又は量的に決定するために機能する、及び/又はサンプル中のゴナドトロピン母集団中の
異常な炭水化物hCG部分を検出するいずれの分析も本発明の実施に使用できる。変異体ダ
ウン症候群の絨毛膜ゴナドトロピン母集団の少なくとも一員の直接分析が好ましい。ある
スクリーンは炭水化物部分を分析するレクチン、クロマトグラフィー、化学的又は電気泳
動又は等電点電気泳動テストを使用し、hCGに対する抗体を検出する。

10

【0019】

イムノアッセイはこれに限定されないが標準方法で生じた高グリコシル化ゴナドトロ
ピンに対する特異的抗体を使用する分析、及び標準的方法を用いてダウン症候群hCG又は
絨毛癌hCGをテスト動物へのブラインド注射によって得られるひ特異的に限定された抗
体を用いる分析を包含する。融合ファージの任意のタイプ、モノクローナル又はポリク
ローナル抗体は、抗体が正常の種を認識することなく変異体ダウン症候群高グリコシル化
hCG種に対するマーカーとして、又は通常及び変異体母集団中に観察されることな
ったレベルの測定として再生型で使用できる限り、本発明のイムノアッセイで使用でき、
又は正常及び変異体母集団中に観察される異なるレベルの測定として使用できるし、
そして特にフラグメントの変異体炭化水素部分に対する抗体を包含できる。絨毛癌患者
から得られたニックを入れた高グリコシル化hCGを認識するが正常のhCGを検出し
ないB152として示される、抗体は下記に記載されるイムノアッセイで使用される。

20

【0020】

本発明の典型的なイムノアッセイでは、B152の如き高グリコシル化変異体用の特異
的な抗体がhCG、
- コアフラグメント、
- サブユニット、及び/又は
- サブユニ
ットに対する第2標識抗体をもつ捕獲用抗体として使用でき、そのポリペプチドの特異性
をもつ分析を提供する。第2抗体上のラベルは酵素結合イムノソーベントアッセイ（E
L I S A s）で使用される任意の化学的、放射性活性、ランタニド、着色顔料又は遺伝子
タグからなり、ウエスタンブロット及び周知の方法論を用いる他の高感度且つ特異的な
イムノアッセイ及びイムノラジオメトリックアッセイに使用できる。これらは典型的
には比色、蛍光、発光物質を用いて容易に測定し得るホースラディッシュパーオキシ
ダーゼ又はアルカリホスファターゼと抗体を結合することからなる。遺伝子ラベルは、
ルシフェラーゼはその基質、ルシプリンとインキュベートされるとき、バイオルミ
ネセンス分子を生成するので、使用されるホタルルシフェラーゼを包含する。別の
態様は他の抗体の存在を検出するために第三の抗体を用いる。

30

【0021】

他の態様は捕獲抗体としてペプチド - 特異的抗体を用いる。そして高グリコシル化
又は炭水化物 - 変異体ゴナドトロピン及び/又はその異常な炭水化物部分に対する特
異的抗体は上記記載のイムノアッセイのいずれかの第2標識抗体からなる。B152の
ような抗体を用いる、競合イムノアッセイが高グリコシル化ゴナドトロピンを競
合的に検出するためにまた使用され得る。コンカナバリンA又は他の炭水化物 -
特異的レクチンを用いる別の態様は捕獲抗体又は標識抗体の代りに使用できる。
ある態様はイムノアッセイ前に炭水化物 - 変異体hCGを抽出するためにレクチン
又はクロマトグラフィー - 方法を使用する。

40

【0022】

炭水化物分析は下記の実施例に記載する正常及びダウン症候群hCG母集団の間の物
理的特性の相違の定性的観察を包含する。炭水化物同定は標準レクチンスクリー
ニング方法

50

によって得られるダウン症候群の変異体炭水化物に対して特異的な植物レクチンを使用する。又は他のフィンガープリント技術が定量的又は定性的炭水化物組成物分析を包含する。hCGの炭水化物部分中の3のマンノース単位に結合する(図2)、固体担体に付着したコンカナバリンAを用いる例が下記に説明する態様で使用されるが、高グリコシル化対正常hCG種の特異的結合を示す任意のレクチンが本発明に包含される方法で使用できる。

【0023】

1つの態様において、例えば、妊婦の胎児におけるダウン症候群の存在又は非存在は、女性からの尿、唾液、血漿又は血清テストサンプル、好ましくは血清又は尿を得る、テストサンプル中のhCGの炭水化物含量を決定し、得られた炭水化物含量を正常hCG母集団を含む対応するサンプルの炭水化物含量と比べ、そしてhCG母集団の炭水化物が対照サンプルと相違することを観察することによってダウン症候群の存在を決定することからなる方法で決定される。少なくとも1つの高グリコシル化種のレベルで少なくとも約25%、好ましくは少なくとも約50%、の観察増加が好ましい。

10

【0024】

図3に記載されているものの如く、正常なhCGサンプル中では全く観察されない異常型種の観察が特に好ましい。

【0025】

本発明の1つの態様ではダウン症候群の存在は、テストサンプル中の単糖類含量が対照サンプルに比べて高められることを観察することによって決定される。これは、下記に述べる如く、溶離パターンの相違の観察又はN-アセチルグルコサミンの分析を含む。少なくとも約50%の増加が典型的な分析で観察される。

20

【0026】

別法として、サンプル中の絨毛膜ゴナドトロピン母集団の特性はhCGのグリコシル化変異体を検出する電気泳動、等電点電気泳動テスト、クロマトグラフィ及びこれらの技術の組合せを用いることによって決定される。クロマトグラフィ法は下記に記載するBlue Dextran Sepharose(登録商標)を用いる如き、疎水性相互作用又は他のリガンドクロマトグラフィを使用するものを包含するが、グリコポリペプチド又はグリコペプチドの物理的特性を比べる任意の方法、例えば、溶離パターンが相違する単純な定性的な観察を採用し得る。これらは、しかし限定するものではないが、カラムクロマトグラフィ、被覆ビーズ、被覆テストチューブ又は板、示差結合、抽出液等、及びこれらの技術の組合せを包含する。本発明の利点は - コアフラグメントが分析される場合、マーカーは少量で且つ溶解することにある。

30

【0027】

本発明の多くのスクリーニングで対照(コントロール)として使用される正常の絨毛膜ゴナドトロピン母集団は正常のカロタイプ胎児をもつ女性から得ることができ又はクローンで、又は商業的に得ることができる。

【0028】

hCG - コアフラグメントは、例えば、上記引用された非特許文献5によって記載されているOrganon Diosynth Division(Oss, Holland)から得られるhCG調製剤から抽出することができる。

40

【0029】

本発明のスクリーニング方法は単独で、又は他のスクリーニング方法と組合せて使用できる。他のスクリーニング方法は、限定するものではないが、非共役及び/又は共役エストリオール測定法、hCG分析、 - コアフラグメント分析、遊離 - サブユニット又は遊離 - サブユニット分析、PAPP-A又はCA125分析、 - フェトプロテイン分析、インヒピン分析、血清中の胎児細胞の観察及び超音波を包含する。

【0030】

本発明の利点は方法が上記記載のトリプルマーカーテストで現在使用されるhCG決定方法に取り替えることができ、それによってその感度及び信頼性を改善することである。上記の如く、トリプルマーカー又は他のテスト中の通常のhCG分析の代わりにするもの

50

として本発明の方法を使用することにより、高グリコシル化hCGスクリーンが第1期(第1トリメスター)で使用できるので、ダウン症候群のより早い分析のさらなる利点を提供する。この高グリコシル化hCGスクリーンは妊娠の第1期(第1トリメスター)で使用できる。より早い診断によって、女性は最小のモニター又は出生ロスによって、非外科的方法によって妊娠をより早く決定する選択権をもつ。

【実施例】

【0031】

次に本発明の実施例を示すがこれはいかなる観点においても本発明を制限するものではない。

【0032】

例1:

ダウン症候群と正常な妊娠 - コアフラグメントとの間の識別のために構造的な処理をした。 - コアフラグメントの試料を、3人が正常な核型をもち、3人がダウン症候群第2トリメスター妊娠の計6人の女性の尿から精製し、また2人の正常な核型の患者からの2つの試料を用いた。 - コアフラグメントを2容量のアセトンを用いて4で抽出した。このアセトン沈殿を集め、乾燥し、ホスフェートバッファの生理食塩水(PBS)に入れた。これらの試料をPBSで洗浄したブルーデキストランセファロース(Pharmacia製、登録商標)のカラムに付与し、0.6MのNaClを含有するPBS及び次いで1.0MのNaClを含有するPBSで連続的に溶解した。溶解液中の - コアフラグメント濃度を測定した。3つのダウン症候群 - コアフラグメント試料のすべてを0.6MのNaClを含有するPBSで上記ブルーデキストランカラムから溶解し、一方5つの正常な核型試料を次の段階で1.0MのNaClを含有するPBSで同じカラムから溶解した。これはダウン症候群 - コアフラグメントの物理的性質に差があることを示している。

【0033】

2つの個々ダウン症候群 - コアフラグメント試料、即ち1の個別対照 - コアフラグメント試料とプールされた対照尿から精製した1つの - コアフラグメント試料、から得た精製フラグメントについてN-末端ペプチドシーケンス分析を行った。精製した試料はいずれも前記の非特許文献4(Birken他)が記載しているものと同じN-末端ペプチドシーケンスをもたらした。個別試料とプールした対照試料は、他の正常核型 - コアフラグメント試料のために前記の非特許文献6(Blithe等)が記載しているものと同じ炭水化物組成(マンノース残基5、フコース残基0.5及びN-アセチルグルコサミン残基2)をもっていた。(図2.Bの構造参照。N-アセチルグルコサミン含量は加水分解瀨生物、グルコサミンとして測定した。)しかし2個のダウン症候群試料は、N-アセチルグルコサミン残基がかなり多いという幾分異なる組成を示した(即ち、それぞれ、マンノース残基3、フコース残基1及びN-アセチルグルコサミン残基3、及びマンノース残基3、フコース残基1及びN-アセチルグルコサミン残基3、図3.Bの構造参照)。

【0034】

図1に示すように、 - コアフラグメントはhCGの - サブユニットから誘導される。異なるダウン症候群 - コアフラグメント上の炭水化物部分が追加のN-アセチルグルコサミン残基を含有している場合には、 - コアフラグメントが誘導されるhCGの - サブユニットに異なる量のN-アセチルグルコサミンと同様に増加した量のシアリルラクトサミン触角(sialyl lactosamine antennae)を、サブユニットの分解のしかたに応じて、含有している。ダウン症候群 - コアフラグメントの異常性炭水化物組成はブルーデキストランセファロースから異常性のある溶出プロフィールを示す。

【0035】

例2

尿 - サブユニットのアガロース - 結合したコンカナバリンA(Con A)への結合

10

20

30

40

50

を調べた。Con Aは正常妊娠hCGにみられるようにバイアンテナリー型のN-結合したオリゴサッカライドでオリゴタッカライドとグリコプロテインに結合している。グリコプロテインは競争阻害剤の α -メチルマンノシドでCon Aから遊離しうる。トリアンテナリーオリゴサッカライド、たとえば高グリコシル化したhCG、をもつ分子はCon Aとゆるく結合する。それ故Con A結合をダウン症候群妊娠のスクリーニングに用いた。

【0036】

Con A-アガロース0.15mlを1.5mlの円錐形遠心チューブに入れ、0.5mlの尿をさらに加え、さらに0.5ml PBS, pH 7.3バッファを加えた。チューブを15分間ゆすり、次いで500xgで回転させゲルを沈降させた。結合していない尿-PBSを除いた。次いで、ゲルを1ml PBSで洗浄した。洗浄によりゆるやかに結合していたタンパクが分離した。チューブを再びゆすり、回転させ、洗浄を終えた。次にCon Aを0.05Mの α -メチルマンノシドを含有する1mlのPBSで特別に溶離した。再度チューブをゆすり、回転させ溶離液を除いた。次いで、免疫検定法により洗液と溶離液の遊離のサブユニットを調べた。

10

【0037】

尿のない α -サブユニットの大部分が結合しており、 α -メチルマンノシドで溶離しうるだけだが、少量のしかし異なる成分がゆるやかに結合しておりPBS洗液に抽出した。フリーの α -サブユニット(>0.5ng/ml)が109(17%)の対照試料洗液の18個及び15(16%)のダウン症候群試料洗液の9個中に検出された。より高い濃度のフリーの α -サブユニット(>17ng/ml)が109(8%)の対照試料洗液の9個及び15(47%)のダウン症候群試料洗液の7個にみられた。異なる妊娠年齢での対照試料についてメディアン(中央値)を求めた。すべてのメディアンが0(<0.5ng/ml)だったのでフリーの α -サブユニットと妊娠年齢間に相関のないことが判った。ROC分析を用いてカットオフ濃度と独立の測定法の有効性をしらべた。ROC曲線の下の領域は0.68であり、試料間の識別率68%を示した。洗液ともとの尿試料中のフリーの α -サブユニット濃度の間の関係をしらべた。相関がないことが観察され($r^2 < 0.5$)、それらが独立の変数であることを示している。結果は、ダウン症候群妊娠における非Con A結合分子、又はオリゴサッカライド変異分子の割合が高いことを示している。

20

30

【0038】

α -コアフラグメントはN-アセチルグルコサミン残基2.0及びフコース残基0.5をマンノース残基3.0用にもつ分解したN-結合したオリゴサッカライドをもつ[非特許文献14][非特許文献15]。アセトン及びエタノール抽出及びゲルろ過、ブルーセパロース及びDEAE-セパロースクロマトグラフィー、の組合せを用いて α -コアフラグメントを2つの第2トリメスターダウン症候群尿と2つの対照調合物から精製した。N-末端ペプチドシーケンス分析(15ラウンド)を行った。対照試料はマンノース残基3.0に対しN-アセチルグルコサミン残基2.1及び2.0、及びフコース残基0.6及び0.5を含有しており、上記非特許文献14及び15(Blithner及びEndo等)が示した組成と一致した。ダウン症候群試料はマンノース残基3.0に対し異なる組成、N-アセチルグルコサミン残基3.5及び3.2、及びフコース残基0.8及び1.4をもっていた。これはダウン症候群からの α -コアフラグメント上のオリゴサッカライド構造がより複雑であることを示している。

40

【非特許文献14】Blithner, D. L. 他 Endocrinology 125: 2267-2272 (1989)

【非特許文献15】Endo, T. 他 Endocrinology 130: 2052-2058 (1992)

【0039】

例3

この例はダウン症候群妊娠用の免疫検定を示す。

50

【0040】

個々の正常妊娠（6人の女性）、囊腫型奇胎（3人の女性）及び絨毛癌（4人の女性）からのhCG組成物を前記〔非特許文献16〕したように妊婦の尿から分離し、精製した。簡潔に述べると、hCGをアセトンにより尿から抽出し、次いで、エタノールで沈澱させ、セファクリルS-200によるサイズ除去クロマトグラフィー及びDEAE-セファロースを用いるイオン交換クロマトグラフィー及びさらに高分解性セファクリルS-200によるサイズ除去クロマトグラフィーを行った。クロマトグラフィーによる操作中すべてのhCGフラクションを回収するように注意した。

【非特許文献16】Kardana, A.他 Endocrinology 129: 1541-1550 (1991)

10

【0041】

種々のhCG形のペプチドシーケンスとN-及びO-結合したオリゴサッカライド構造を前記〔非特許文献17〕〔非特許文献18〕のようにして求めた。高グリコシル化したN-及びO-結合したオリゴサッカライド（hCGバッチC5）をもつ非ニックhCG、インタクトhCG、フリー-サブユニット、-コアフラグメント及び絨毛癌hCGに対するモノクローナル抗体を上記

のhCG組成物を用いて標準法〔非特許文献19〕に従ってつくった。簡潔に述べると、マウスをhCG試料で免疫し、約3週間第2感作を与え、そしてそれらの脾臓をそれらの血液抗体濃度が試料に対し正しい応答を示した後にとった。その細胞を骨髓腫と共に融合しそしてハイブリドーマセルラインを得た。妊娠尿の分析用のそれらのモノクローナルの使用は1996年10月3～6日の早期妊娠に関する第3回世界会議でアブストラクト番号66で報告された。

20

【非特許文献17】Elliott, M.他 Endocrine J., Vol. 7, 1997

【非特許文献18】Cole, L. A., Birken, S., Mol. Endocrinol, 2: 825-830 (1988)

【非特許文献19】Ausubel, F. M., 他 Short Protocols 印Molecular Biology, 第2編、1992, ユニット11

【0042】

これらのモノクローナルを例2のCon Aレクチン法を用いて分析した尿試料のスクリーンに用いた。高グリコシル化したhCG（hCGバッチC5）に対する1のモノクローナルをB152として示した。これは正常hCGの<1%であり、レクチン法で陽性とされた試料の60%であった。

30

【0043】

次いで、B152モノクローナルを正常な胎児をもつ130人の妊婦及びダウン症の胎児をもつ9人の妊婦から得た139の尿試料をスクリーンするのに用いた。キャプチャー抗体としてB152を用い、トレーサーとしてhCG、バッチ4001に対するパーオキシターゼで標識したモノクローナル抗体（Genzyme, カルフォルニア州サンカーロス）を用いて前記した免疫検定法〔非特許文献20〕〔非特許文献21〕を用いる2段サンドイッチ免疫検定法で調べた。純粋な高グリコシル化したゴナドトロピン（上記したCole他（非特許文献16）の1988年に記載されているバッチC7）をこの分析法を標準化するために用いた。正規のhCG（hCGダイマーのすべての形）の濃度を標準としてN1HCR127 hCGを用いる2段サンドイッチ法で求めた。正規hCGと高グリコシル化したゴナドトロピン濃度値を例1に記載したようにクレアチニン濃度を標準化した。

40

【非特許文献20】Elliott, M.他 Endocrine J., Vol. 7, 1997

【非特許文献21】Cole, L.他 J. Clin. Endocrinol, Metab. 76: 704-710 (1993)

【0044】

50

妊娠の11～19週間に集めた試料からデータを図4のグラフに示す。ここで黒丸印は正常試料値を示しそして白丸印はダウン症候群の値を示す。標準統計法を用いて結果を分析した。130対照試料用の妊娠年齢特異的メディアン(中央値)はすべて、影響のない妊娠とダウン症候群データ(影響のない試料のメディアン、MoMの倍数で示す)の両方にとって、第5センチルと第95センチルの間で対数ガウス分布に合致した。スクリーン精度を評価するため、メディアンと対数標準偏差(2.56で割ったlog MoM値の第10センチルから第90センチルの差によって推測)を求め、得た検知率(即ちダウン症候群ケースと影響のない妊娠の第95センチルをこえるレベルとの比)を記録した。メディアンライン用の式 $= 390(0.826^x)$ であり、ここでyはメディアンでありxは妊娠年齢である。対照試料の対数メディアンは-0.007であり、対数標準偏差は0.45である。9つのダウン症候群ケースはいずれも影響のない妊娠の第70センチルをこえた。ダウン症候群のメディアン高グリコシド化ゴナドトロピン濃度は影響のないメディアン(対数メディアン=0.065)の4.4倍だった。3つの第1トリメスターケースのうち2つと6つの第2トリメスターケースのうち4つを含む。9つのダウン症候群試料のうち6つ(67%)は第95センチルを超えており、9つの試料のうち3つ(33%)は影響のない妊婦の第100センチルをこえていた。

10

【0045】

正規hCG濃度を求めた。高グリコシル化ゴナドトロピンは正常妊娠において正規hCG分子の3.7%を示し、(それぞれ平均29ng/mg及び781ng/mgクレアチニン)、そしてダウン症候群妊婦試料において正規hCG分子の11%を示した(それぞれ平均193ng/mg及び1690ng/mg)。

20

【0046】

結果はモノクローナルB152がhCG炭水化物変異を認識しており、本発明の方法における高グリコシル化hCG用の免疫検知法に用いることを示している。

【0047】

上記の記載は本発明方法をどのように実施するかを当業者に教示する目的でなされており、そこから当業者が理解できることまで詳細に記載することは意図していない。しかし、それらの自明の態様や変形はすべて特許請求の範囲に記載した本発明の範囲に含まれる。前記した文献及び特許はそれらの全体が参考としてここに含まれる。

【図面の簡単な説明】

30

【0048】

【図1】図1はhCG関連分子の構造を説明する図解のライン図である。太いラインはペプチドバックボーン、数字はアミノ酸の位置を示す。そして細いラインはジスルフィド結合の部位を示す。文字はオリゴ糖側鎖の単糖類を示す。S = シアル酸; G = ガラクトース; A = N - アセチルグルコサミン; M = マンノース; 及び L = N - アセチルガラクトサミンである。

【図2】図2はN - 結合オリゴ糖類の図解説明図である。Aの構造は通常妊娠hCG及びその遊離 - サブユニット、及び - サブユニット上のN - 結合オリゴ糖類を説明する。Bの構造は通常妊娠 - コアフラグメント上の分解されたN - 結合オリゴ糖類を示す。Cの構造は通常妊娠hCGの遊離 - サブユニットとしてのhCG上のO - 結合オリゴ糖類を示す。略語は、Manはマンノース、Galはガラクトース、GlcNAcはN - アセチルグルコサミン、Fucはフコース及びGalNAcはN - アセチルガラクトサミンを示すものとして使用される。変異性(variable)は±で示される。

40

【図3】図3はダウン症候群及び/又は絨毛癌のような関連する異常状態で発見される異常なhCG種上の高グリコシル化N - 結合及びO - 結合オリゴ糖類を説明する。Aは高グリコシル化ゴナドトロピン及びその遊離の - サブユニット及び遊離の - サブユニット上のN - 結合オリゴ糖類を示す。Bは高グリコシル化ゴナドトロピン - コアフラグメント上のN - 結合オリゴ糖類を示す。Cは高グリコシル化ゴナドトロピン及びその遊離の - サブユニット上のO - 結合オリゴ糖類を示す。略語は図2で用いたものと同じである。

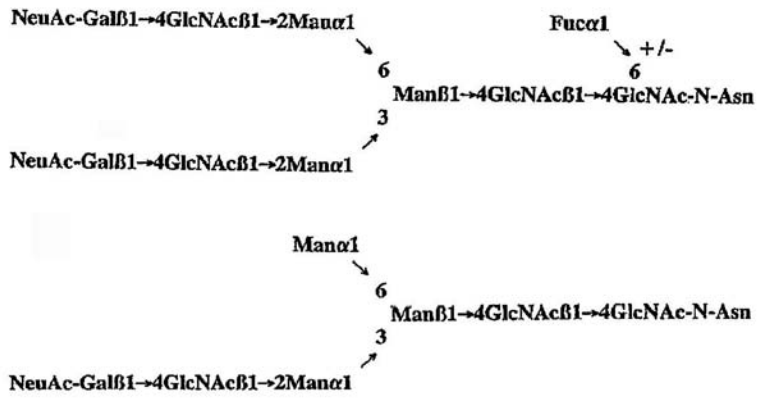
【図4】図4は130人の通常の胎児(黒丸)をもつ妊婦及び9人のダウン症候群の胎児

50

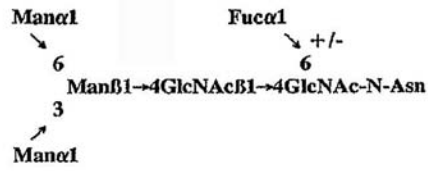
(白丸)をもつ妊婦から所定の周期的間隔で採取された尿サンプル中の高グリコシル化hCGについてのイムノアッセイにおけるモノクローナルB152活性のプロットである。中央値が決定されそしてサンプルが通常の妊娠中央値の倍数として表現された。長いガウスラインは妊娠年齢(第50センチル)に調整された通常の妊娠中央値に対して一致した。第95センチルがまた決定された。

【 図 2 】

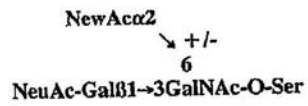
A



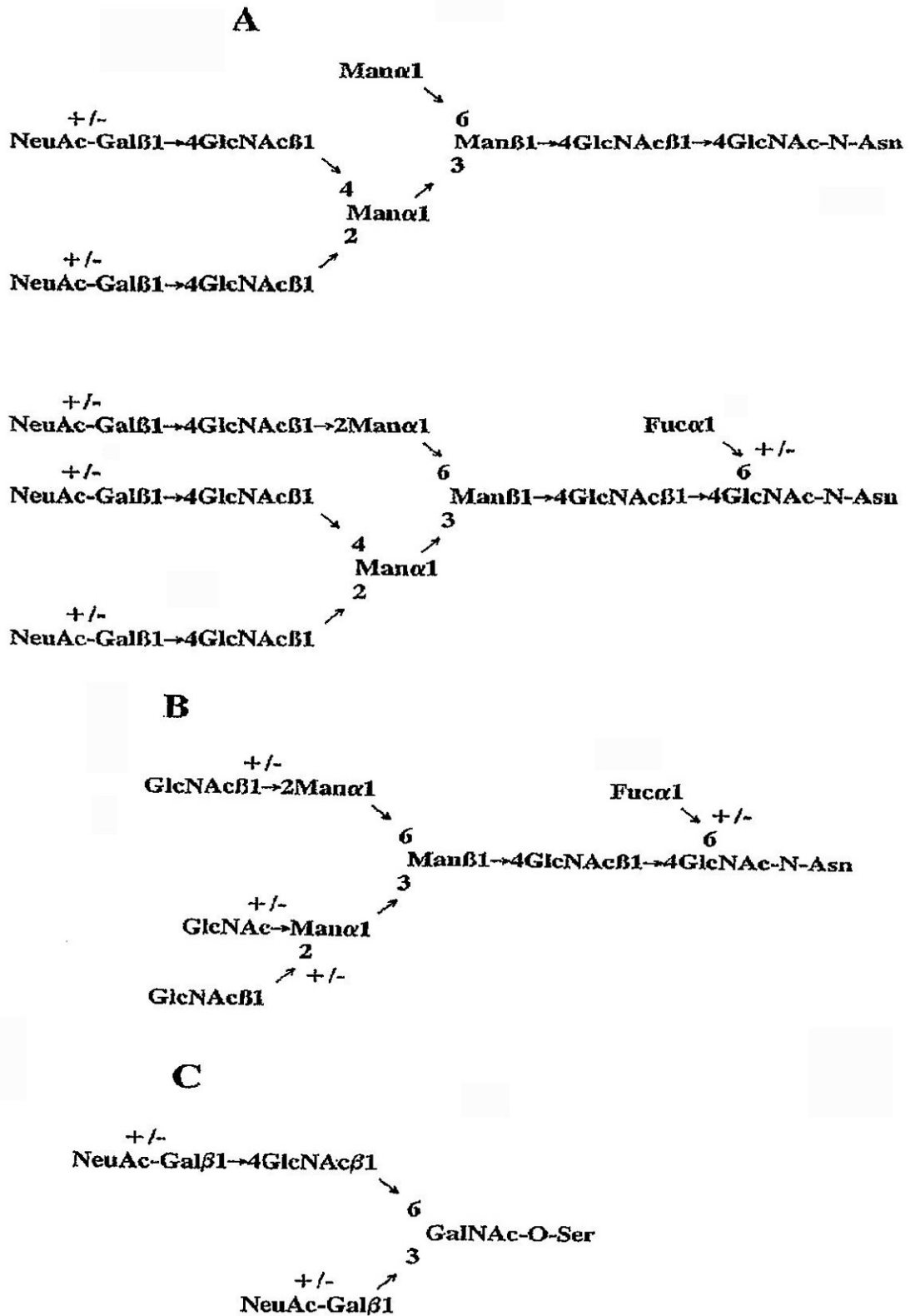
B



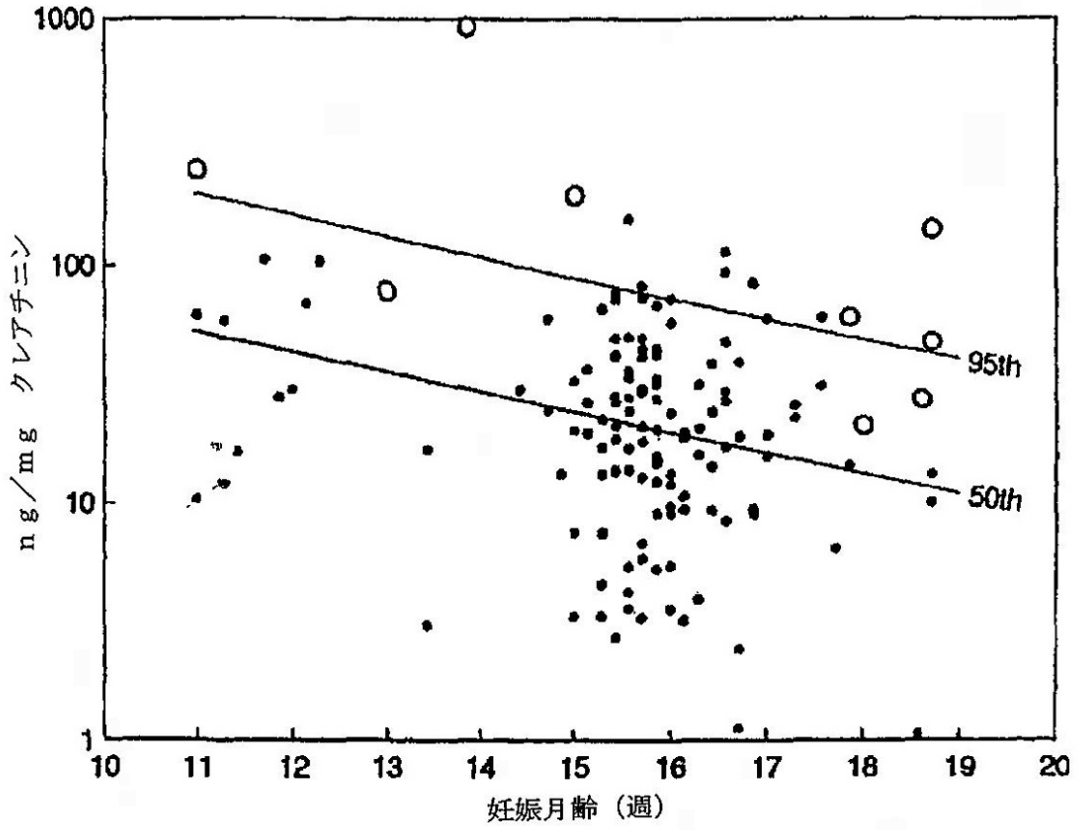
C



【 図 3 】



【 図 4 】



专利名称(译)	使用高糖基化促性腺激素对产前筛查唐氏综合症		
公开(公告)号	JP2007163505A	公开(公告)日	2007-06-28
申请号	JP2007014847	申请日	2007-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	コールローレンスエイ		
发明人	コール, ローレンス エイ		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/76		
CPC分类号	G01N33/76 Y10S435/806 Y10S436/808 Y10S436/813 Y10S436/814 Y10S436/817 Y10S436/818		
FI分类号	G01N33/50.J G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA27 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/DA44 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06		
代理人(译)	齐藤雄彦		
优先权	60/025568 1996-09-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为由高糖基化促性腺激素组成的孕妇胎儿中唐氏综合症的存在/不存在进行筛查测试。高糖基化促性腺激素由绒毛促性腺激素，无绒毛促性腺激素的β-亚基，β-核心片段和/或α-亚基的突变群体组成，它们均来自具有正常胎儿的孕妇。它表明碳水化合物含量与所得样品中观察到的不同。定量或定性观察含有正常促性腺激素种群的对照样品中高糖基化促性腺激素种群碳水化合物含量的差异，或直接观察唐氏综合症中发现的突变种，表明女性胎儿患有唐氏综合症表示。典型的筛选测试包括碳水化合物分析，免疫测定或其组合。例如，使用可卡瓦林A，其与碳水化合物部分反应，是针对高糖基化物质的抗体。[选择图]无

