

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年12月10日(10.12.2009)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2009/147999 A1

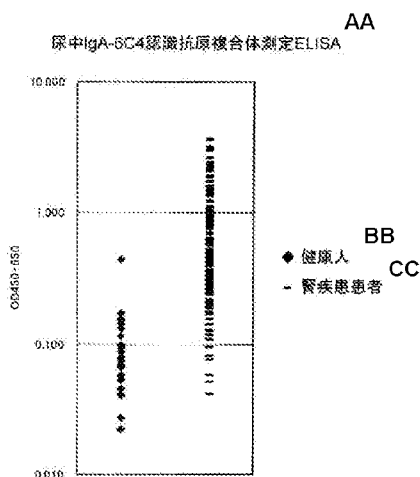
- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/059873
- (22) 国際出願日: 2009年5月29日(29.05.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-144883 2008年6月2日(02.06.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について):
エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社 (Eisai R&D Management Co., Ltd.)
[JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川四丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小原 隆 (OBARA, Takashi) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 溝口 貞明 (MI-ZOGUCHI, Sadaaki) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 堀田 修 (HOT-
- TA, Osamu) [JP/JP]; 〒9830823 宮城県仙台市宮城野区燕沢2丁目17番30号 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 中島 淳, 外 (NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号 H K新宿ビル7階 太陽国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

[続葉有]

(54) Title: IgA NEPHROPATHY DETECTION METHOD AND DETECTION KIT

(54) 発明の名称: I g A腎症の検査方法及び検査キット

[図1]



AA ELISA FOR MEASUREMENT OF IgA-6C4-RECOGNIZING ANIGEN COMPLEX IN URINE
 BB NORMAL PERSON
 CC RENAL DISEASE PATIENT

(57) Abstract: Disclosed is a renal disease detection method which involves a complex detection step of detecting a complex of an antigen derived from a human renal mesangial cell and human IgA in a sample derived from urine collected from a subject. It is preferred that the renal disease detection method further involves a determination step of determining the renal disease as IgA nephropathy based on the ratio of the quantity of the complex detected in the complex detection step to the quantity of a urinary protein in the sample. The renal disease detection method has good detection sensitivity and specificity, and can determine the occurrence of a renal disease (preferably, IgA nephropathy) conveniently and safely.

(57) 要約: 被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒトIgAとの複合体を検出する複合体検出工程を含む腎疾患の検査方法である。本発明の腎疾患の検査方法は、前記試料中の尿蛋白質量に対する前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出量の比率に基づいて、前記腎疾患をIgA腎症と判定する判定工程をさらに含むことが好ましい。本発明の腎疾患の検査方法は、検出感度及び特異性が良好で、簡便かつ安全に腎疾患(好ましくは、IgA腎症)と判定することができる。

WO 2009/147999 A1

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, 添付公開書類:
TG).

— 國際調查報告 (條約第 21 條(3))

明 細 書

発明の名称 : I g A腎症の検査方法及び検査キット

技術分野

[0001] 本発明は、I g A腎症の検査方法及び検査キットに関する。

背景技術

[0002] I g A腎症は1968年Bergerらによって記載された疾患であり、糖尿病性腎症を除く慢性糸球体腎炎の中で最も頻度の高い腎疾患である（例えば、非特許文献1参照）。I g A腎症は長期予後不良の疾患であり、透析治療を必要とする末期腎不全患者の約25%がI g A腎症を起因疾患とするものと推定されている。従来、I g A腎症の進行を遅延させる治療法はあっても治癒させる治療法はなかった。しかし、近年堀田らにより早期に治療を開始すれば完全寛解が得られる治療法が確立されてきた。

[0003] 一方、I g A腎症の診断方法は「厚生省特定疾患進行性腎障害調査研究班と日本腎臓学会の共同委員会」によると、尿検査（持続的顕微鏡的血尿、持続的または間欠的蛋白尿、肉眼的血尿）、血液検査（血清I g A値が350 mg/dl以上）を補助的診断基準とし、確定診断は腎生検によって腎糸球体メサンギウム領域へのI g Aの沈着を証明することを唯一の方法としている。しかし、腎生検は1週間程度の入院を必要とし、出血の多い危険な検査方法であるため、受診率は必ずしも高いとは言えない。早期のI g A腎症を簡便かつ安全な方法で診断できる検査方法が求められているのが現状である。

また、I g A腎症の診断方法としてI g A-フィブロネクチン複合体を用いる方法等が知られているが（例えば、特開2000-241431号公報、特許2592121号公報、Cederholm et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 85:4865-8, 1988参照）、これまで実用化された方法は無かった。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明の課題は、検出感度と特異性が良好で、簡便かつ安全にI g A腎

症と判定することができる I g A 腎症の検査方法及び検査キットを提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に特異的な抗体を作製し、その抗体を用いてヒト尿中のヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原と I g A との複合体の検出量を測定したところ、健康人や I g A 腎症以外の腎疾患患者に比べ I g A 腎症患者において、前記複合体がより高い濃度で存在することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち、前記課題を解決するための具体的手段は以下の通りである。

本発明の第 1 の態様は、被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体を検出する複合体検出工程を含む I g A 腎症の検査方法である。前記複合体検出工程は、前記試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒト I g A に対する抗体とを接触させることを含むことが好ましい。また前記複合体検出工程で検出された複合体の検出量の、被験者の尿に由来する試料中の尿蛋白質量に対する比率を得る工程をさらに含むことが好ましく、前記比率に基づいて、I g A 腎症と判定する判定工程をさらに含むことがより好ましい。

[0007] 本発明の第 2 の態様は、被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体を検出する複合体検出工程を含む腎疾患の検査方法である。前記複合体検出工程は、前記試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒト I g A に対する抗体とを接触させることを含むことが好ましく、前記複合体の検出量に基づいて、腎疾患と判定する工程をさらに含むことがより好ましい。

[0008] 本発明の第 3 の態様は、被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体を検出する複合体検出工程と、前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出量、あるいは前記試料中の尿蛋白質量に基づいて腎疾患と判定する第 1 の判定工程と、前記試料中の尿蛋白質量に対する前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出

量の比率に基づいて、前記腎疾患を I g A 腎症と判定する第 2 の判定工程と、を含む I g A 腎症の検査方法である。

本発明の検査方法における前記複合体検出工程は、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と、ヒト I g A に対する抗体とを用いる免疫化学的方法であることが好ましく、サンドイッチ法であることがより好ましい。

[0009] 本発明の第 4 の態様は、被験者の尿に由来する試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒト I g A に対する抗体とを接触させる工程を含む、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体の検出方法である。前記複合体は、前記ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と、ヒト I g A に対する抗体とを用いて免疫化学的方法で検出されることが好ましく、サンドイッチ法で検出されることがより好ましい。

また前記被験者は、腎疾患を発症しているヒト、腎疾患を発症していると疑われるヒト、または、腎疾患を発症する可能性を有しているヒトであることが好ましく、前記腎疾患は、I g A 腎症であることがより好ましい。

[0010] 本発明の第 5 の態様は、少なくとも、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と、ヒト I g A に対する抗体とを含む腎疾患の検査キットである。前記腎疾患は、I g A 腎症であることが好ましい。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、検出感度と特異性が良好で、簡便かつ安全に I g A 腎症と判定することができる I g A 腎症の検査方法及び検査キットを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]尿中の I g A - 6 C 4 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値の分布図である。

[図2]尿中の I g A - 6 C 4 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値についての R O C 解析の結果を示す図である。

[図3]尿中の I g A - 6 C 4 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値を尿蛋白濃度当りに補正した値の分布図である。

[図4]尿中の I g A - 6 C 4 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値を尿蛋白濃度当りに補正した値についての R O C 解析をした結果を示す図である。

[図5]尿中の I g A - 4 H 3 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値の分布図である。

[図6]尿中の I g A - 4 H 3 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値についての R O C 解析の結果を示す図である。

[図7]尿中の I g A - 4 H 3 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値を尿蛋白濃度当りに補正した値の分布図である。

[図8]尿中の I g A - 4 H 3 認識抗原複合体を E L I S A 法で検出した測定値を尿蛋白濃度当りに補正した値についての R O C 解析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

本発明の腎疾患の検査方法は、被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体を検出する複合体検出工程を含むものである。前記複合体を尿に由来する試料から検出することによって、被験者における腎疾患を良好な検出感度と良好な特異性で検出することができる。尚、前記腎疾患は、I g A 腎症と I g A 腎症以外の腎疾患とを含むものである。

[0014] 本発明において、前記試料とは、被験者から採取した尿自体であっても、採取した尿に通常行われる稀釈、濃縮等の処理を行ったものであってもよい。本発明においては、ヒトから採取した尿を常法により稀釈した尿試料であることが好ましい。

さらに前記被験者の尿に由来する試料は、前記尿試料をヒト腎メサンギウ

ム細胞に由来する抗原に対する抗体、またはヒト I g A に対する抗体と接触させて得られるものであってもよい。

[0015] また、本発明におけるヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とは、ヒト腎メサンギウム培養細胞、ヒト腎から分離したメサンギウム細胞及びこれらから抽出された細胞抽出物に存在する抗原であって、I g A と複合体を形成可能であり、腎疾患を有する被験者の尿中に存在する抗原であれば特に制限はない。中でも、腎疾患及び I g A 腎症の検出特異性の観点から、ヒト腎メサンギウム細胞以外の糸球体を構成する細胞に由来する抗原と識別可能な抗原であることが好ましく、ヒト近位尿細管上皮細胞に由来する抗原と識別可能な抗原であることがより好ましい。

[0016] また前記細胞抽出物は、ヒト腎メサンギウム培養細胞、又はヒト腎から分離したメサンギウム細胞から抽出されたものであれば特に制限はないが、腎疾患及び I g A 腎症の検出特異性の観点から、細胞の骨格成分抽出物であることが好ましい。

前記細胞抽出物は、通常の方法で調製することができる。例えば、ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem社製) を用いる方法等を挙げることができる。

[0017] 前記複合体の検出方法については特に制限はなく、通常用いられる蛋白質の検出方法を適用することができるが、検出される複合体を定量又は半定量可能な方法であることが好ましい。

[0018] 本発明において複合体の検出に用いる装置には特に制限はなく、複合体の検出方法に応じて適宜選択することができる。具体的には例えば、HPLC 機器、質量分析機器（マススペクトロメトリー）、電気泳動機器（キャピラリー電気泳動装置等）、全自動あるいは半自動酵素免疫測定機器、セルウォッシャー、全自動あるいは半自動化学発光免疫測定機器、発光測定装置、全自動あるいは半自動電気化学発光免疫測定機器、光学測定装置、プレートリーダー、CCDカメラ、全自動あるいは半自動蛍光免疫測定機器、蛍光測定装置、全自動あるいは半自動放射免疫測定機器、液体シンチレーションカウ

ンター、クールターカウンター、表面プラズモン測定装置、ブロットイング装置、デンストメーター等を挙げることができる。

[0019] 本発明においては、検出感度、特異性及び簡便性の観点から、前記複合体に対する結合する抗体を用いる免疫化学的方法であることが好ましい。本明細書において「複合体に対する抗体」とは、「複合体を認識する抗体」、「複合体に結合する抗体」等の抗体において通常用いられる意味で用いられるものである。すなわち、前記「複合体に対する抗体」は、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原及びヒト I g A からなる複合体の少なくとも一部と結合し、新たな複合体を形成する。以下、「ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体」、「ヒト I g A に対する抗体」等についても同様である。

本発明における免疫化学的方法としては、通常行われる方法を特に制限なく用いることができる。具体的には例えば、酵素免疫測定法（E L I S A）、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、吸光度測定、蛍光抗体法、放射免疫測定法（R I A）、表面プラズモン共鳴、ウェスタンブロット法、ドットブロット法等を挙げることができる。本発明においては、検出感度、特異性及び簡便性の観点から、酵素免疫測定法（E L I S A）を用いることが好ましい。

[0020] 本発明における免疫化学的方法としては、特異性と簡便性の観点から、前記複合体中のヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原を認識して結合する抗体と前記複合体中の I g A を認識して結合する抗体とを用いるサンドイッチ法であることが好ましい。

[0021] 前記サンドイッチ法は、例えば、以下のようにして行うことができる。前記複合体と結合する抗体（一次抗体）を、プレート等の担体に固相化する。通常プレート等の非特異的な結合部位をふさぐため、カゼイン等蛋白質あるいは界面活性剤でブロッキング操作を行なう。次いで尿に由来する試料または被検試料を添加してインキュベーションする。プレート等を洗浄した後、前記複合体と結合する抗体であって標識された二次抗体を添加し、インキュ

ベーション後、プレート等を洗浄し、標識を検出する方法で行うことができる。

[0022] 本発明においては、検出感度と特異性の観点から、前記一次抗体及び前記二次抗体として、前記複合体に結合する抗体から選ばれる2種の抗体を用いることが好ましく、前記一次抗体及び前記二次抗体のうち一方の抗体としてヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体を用い、他方の抗体としてヒトIgAに対する抗体を用いることが、より好ましく、前記一次抗体として、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体を用い、前記二次抗体としてヒトIgAに対する抗体を用いることがさらに好ましい。

[0023] 本発明において、前記複合体に結合する抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、腎疾患の検出特異性の観点から、モノクローナル抗体であることが好ましい。

前記複合体に結合する抗体は、通常行われる方法によって調製することができる。

[0024] ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対するポリクローナル抗体は、通常の作製方法に得ることができ、例えば、次のようにして得ることができる。ヒト腎メサンギウム培養細胞、ヒト腎から分離したメサンギウム細胞、又はその抽出物をウサギ、ヤギ等の動物に免疫して血清を得る。これを例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、ヒト腎メサンギウム細胞の抽出物をカップリングしたアフィニティカラム等により精製することで調製できる。

本発明においては、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原以外の抗原に結合する抗体を通常行われる方法、例えば吸収操作等によって除いたヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する特異性がより高い抗体であることが好ましい。

[0025] また例えば、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対するモノクローナル抗体であれば、ヒト腎メサンギウム培養細胞、ヒト腎から分離したメサンギウム細胞、又はその抽出物を、マウスなどの小動物に免疫を行い、同マ

ウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これにより形成された融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原と結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで選択したハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、ヒト腎メサンギウム細胞の抽出物をカップリングしたアフィニティカラム等により精製することで調製できる。

[0026] 前記ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に結合するモノクローナル抗体を産生するクローンの選択においては、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に反応性の高いクローンを選択することが好ましい。またこれに加えて、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原以外の抗原にも結合する抗体を産生するクローンを除外することが好ましい。前記ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原以外の抗原としては、例えば、尿中に混入する可能性の高い細胞であって、ヒト腎メサンギウム細胞以外の細胞に由来する抗原を挙げることができ、ヒト近位尿細管上皮細胞に由来する抗原であることが好ましい。

[0027] 本発明におけるヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体としては、腎疾患及びIgA腎症の検出特異性の観点から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に結合し、かつ、尿中に混入する可能性の高い細胞であってヒト腎メサンギウム細胞以外の細胞に由来する抗原には結合しない抗体であることが好ましく、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に結合し、かつ、ヒト近位尿細管上皮細胞に由来する抗原には結合しない抗体であることがより好ましい。

尚、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体は、上記のようにして得られるマウス等の小動物に由来する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および完全ヒト抗体等のいずれであってもよい。

[0028] ヒト I g A に対する抗体としては、前記複合体中の I g A と結合可能な抗体であれば特に制限はなく、ヒト I g A の H 鎖、J 鎖、分泌片 (secretory component) 等のいずれを認識するものであってもよい。

また、ヒト I g A に対する抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、複合体の検出特異性の観点から、ヒト I g A に対するモノクローナル抗体であることが好ましい。

前記ヒト I g A に対するモノクローナル抗体は、抗原としてヒト I g A を用いて、上記ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と同様にして調製することができる。またヒト I g A に対する抗体としては、市販の抗ヒト I g A 抗体を用いることもできる。

尚、ヒト I g A に対する抗体は、上記のようにして得られるマウス等の小動物に由来する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および完全ヒト抗体等のいずれであってもよい。

[0029] 前記標識としては特に制限なく公知の標識を用いることができる。例えば、酵素、化学発光物質、電気化学発光物質、放射性物質等を挙げることができる。

本発明においては、検出感度と簡便性の観点から、前記標識として酵素を用いることが好ましい。

前記酵素としては、物理的、化学的方法で定量可能な酵素であれば特に制限はない。例えば、アルカリフォスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、ルシフェラーゼ等の酵素を挙げることができる。

[0030] また標識の検出方法は、標識を定量又は半定量可能な検出方法であれば特に制限はなく、標識に応じて適宜選択することができる。例えば、吸光度、発光強度、蛍光強度、放射線計数等を挙げることができる。

標識を定量又は半定量することで、前記複合体を定量又は半定量することができる。

[0031] 本発明における複合体検出工程を、酵素免疫測定法 (ELISA) を用い、標識の検出を吸光度にて行なう場合、本発明に好ましく用いられる前記複

合体を検出する測定装置としては、複合体に結合した標識によって生じた色素の吸光度を測定可能な吸光度測定装置であって、標識によって生じた色素を含む試料を載置する試料載置部と、前記試料に光を照射する光照射部と、前記試料からの反射光及び透過光の少なくともいずれかを受光し、受光した光量を測定する光量測定部と、を備える吸光度測定装置を挙げることができる。

本発明においては、検体（被験者の尿に由来する試料）に含まれるヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト Ig A との複合体と結合した標識によって生じた色素に、前記光照射部により光を照射し、前記色素の吸光度を光量測定部により定量化することにより、検体中におけるヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト Ig A との複合体の存在量を測定することができる。

[0032] また、前記標識の検出を吸光度に代えて、検体からの発光を検出することによって行うこともできる。その場合は、前記吸光度測定装置に代えて、複合体に結合した標識そのものまたは反応液中の標識の基質から発せられる光を測定可能な測定装置であって、標識を含む試料を載置する試料載置部と、前記試料からの発光を受光し、受光した光量を測定する光量測定部と、を備える測定装置を挙げることができる。

本発明においては、検体（被験者の尿に由来する試料）に含まれるヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト Ig A との複合体と結合した標識を含む試料から発せられた光を前記光量測定部により定量化することにより、検体中におけるヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト Ig A との複合体の存在量を測定することができる。

[0033] 本発明の腎疾患の検査方法は、前記尿に由来する試料中に含まれる前記複合体の検出量に基づいて、腎疾患と判定する判定工程を含むことが好ましい。本発明における前記複合体の検出量としては、前記尿に由来する試料中に含まれる前記複合体の濃度又はそれに対応する定量値又は半定量値であれば特に制限なく用いることができる。例えば、前記複合体の検出量を直接的に

測定した測定値、前記複合体の検出量を標識の検出を介して間接的に測定した測定値等を挙げることができる。

[0034] また本発明の腎疾患の検査方法において I g A 腎症を検査する場合、I g A 腎症と判定することに用いる複合体の検出量は、被験者の尿に由来する試料中の総尿蛋白質量に対する複合体の検出量の比率であることが好ましい。前記比率は複合体の検出量の測定値を被験者の尿に由来する試料中の総尿蛋白質量の測定値で除して得られるものであっても、総尿蛋白質量に対する相対値として得られる複合体の検出量であってもよい。かかる比率に基づいて判定することで、より高い感度と特異性で I g A 腎症と判定することができる。

尚、総尿蛋白質量を測定する被験者の尿に由来する試料は、同一の被験者から得られるものであれば、前記複合体の検出に用いる尿に由来する試料とは異なる試料であってもよい。

[0035] 本発明の腎疾患の検査方法における判定工程は、被験者の尿に由来する試料からのヒト腎メサングウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体の検出量と、対照となる健常人の尿に由来する試料からの前記複合体の検出量とを比較する工程と、前記被験者の尿に由来する試料中の前記複合体の検出量が対照となる健常人の尿に由来する試料中の前記複合体の検出量よりも大きい場合と腎疾患とを関連づける工程と、を含むことが好ましい。

[0036] ここで対照となる健常人とは、腎疾患を発症していないことが予め判明している個体を意味する。また、検出量が大きいは、健常人と腎疾患患者とを区別するために設定された正常検出量（カットオフ値）よりも、被験者に由来する前記複合体の検出量のほうが大きいことである。

[0037] 前記カットオフ値は、例えば、腎疾患患者の尿に由来する試料群における前記複合体の検出量と、対照となる健常体群の尿に由来する試料群における前記複合体の検出量とを R O C 解析等に付することによって設定することができる。R O C 解析は、例えば、疾病の検査方法の検出能、診断能を評価可能な解析方法であって、例えば、日本臨床検査自動化学会会誌「臨床検査の診

断的有用性評価マニュアル」 Ver. 1.3 (2004. 9. 1)、Vol. 29 Suppl. 1 (通巻第154号) (2004年9月1日発行)に記載された解析方法である。

また、カットオフ値は、例えば、健常人の検出レベルの平均値に、標準偏差を2倍あるいは3倍した値を加算した値として定めることもでき、更に、感度（検出率）・特異性（偽陽性率の低さ）をバランスよく満たす値に適宜定めることができる。

[0038] 本発明における腎疾患としては、例えば、I g A腎症（I g A N）、膜性腎症（M N）、ループス腎炎（S L E）、巣状糸球体硬化症（F G S）、微小変化群ネフローゼ症候群（M C N S）、糖尿病性腎症（D M N）、アミロイドーシス、遺伝性腎症（A l p o r t）、燃え尽きI g A腎症（I g A腎症の自然寛解状態）、膜性増殖性糸球体腎炎（M P G N）、抗好中球細胞質抗体（A N C A）関連腎炎、菲薄基底膜症候群（T B M D）、腎硬化症等を挙げることができる。

本発明の腎疾患の検査方法は、尿中の前記複合体を検出することで、I g A腎症をはじめとする種々の腎疾患を検出することができる。

[0039] 本発明のI g A腎症の検査方法は、被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサングウム細胞に由来する抗原とヒトI g Aとの複合体を検出する複合体検出工程と、前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出量、あるいは被験者の尿に由来する試料中の尿蛋白質量に基づいて腎疾患と判定する第1の判定工程と、被験者の尿に由来する試料中の尿蛋白質量に対する前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出量の比率に基づいて、前記腎疾患をI g A腎症と判定する第2の判定工程と、を含むことを特徴とする。

尿に由来する試料中の総蛋白質量に対する前記複合体の検出量の比率に基づいて、I g A腎症と判定することで、高感度かつ高特異的であって、治療介入によって完全寛解が得られる初期段階においても、簡便かつ安全にI g A腎症を判定することができる。

[0040] 本発明における複合体検出工程は、前記腎疾患の検査方法における複合体検出工程と同様である。

また、尿蛋白質量の検出方法としては、尿に由来する試料中の総蛋白質量を測定可能であれば特に制限なく、通常行われる尿に由来する試料中の蛋白質検出方法を適用することができる。例えば、金井光正ら著の「臨床検査法概要改訂版第32版」、173～174頁、2005年に記載の方法を適用することができる。

[0041] 本発明における第1の判定工程において、前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出量に基づいて腎疾患と判定する工程は、前記腎疾患の検査方法における判定工程と同様である。

また、前記尿に由来する試料中の尿蛋白質量に基づいて腎疾患と判定する工程は、健常人と腎疾患患者とを区別するために設定された正常検出量（カットオフ値）よりも、被験者の尿に由来する試料中の尿蛋白質量のほうが大きい場合と腎疾患とを関連づける工程、を含むことが好ましい。

ここで尿蛋白質量の正常検出量は、通常の方法で設定することができる。

[0042] 本発明における第2の判定工程は、被験者の尿に由来する試料中の前記複合体の検出量の前記試料中の総蛋白質量に対する比率（複合体／総蛋白質）と、対照となるIgA腎症以外の腎疾患患者の尿に由来する試料中の前記複合体の検出量の前記試料中の総蛋白質量に対する比率とを比較する工程と、前記被験者の尿に由来する試料中の前記複合体の検出量の前記試料中の総蛋白質量に対する比率が対照となるIgA腎症以外の腎疾患患者の尿に由来する試料中の前記複合体の検出量の前記試料中の総蛋白質量に対する比率よりも大きい場合とIgA腎症とを関連づける工程と、を含むことが好ましい。

[0043] ここで、比率が大きいとは、IgA腎症とIgA腎症以外の腎疾患を区別するために設定されたカットオフ値よりも、被験者に由来する前記複合体の検出量比率のほうが大きいことである。

前記カットオフ値は上述した腎疾患の検査方法におけるカットオフ値と同様にして設定することができるが、検出特異性の観点から、ROC解析の結果に基づいてカットオフ値を設定することが好ましい。

[0044] 本発明のIgA腎症の検査方法は、尿中の前記複合体の検出量と総蛋白質

量とを測定し、前記総蛋白質量に対する前記複合体の検出量の比率に基づいて、I g A腎症を検出することが可能であることから、簡便で安全なI g A腎症の検査方法である。

[0045] 本発明のヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒトI g Aとの複合体の検出方法は、被験者の尿に由来する試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒトI g Aに対する抗体とを接触させる工程を含む。これによりヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒトI g Aとの複合体を、高感度かつ高い特異性で検出することができる。

本発明の複合体の検出方法には、前記腎疾患の検査方法における複合体検出工程において説明した事項を同様に適用することができる。

[0046] また前記被験者は、腎疾患を発症しているヒト、腎疾患を発症していると疑われるヒト、または、腎疾患を発症する可能性を有しているヒトであることが好ましい。ここで言う腎疾患を発症する可能性を有しているヒトとは、腎疾患を発症しているヒトまたは腎疾患を発症していると疑われるヒトのいずれでもないあらゆるヒトをいう。また前記腎疾患はI g A腎症であることがより好ましい。

[0047] 本発明の腎疾患の検査キットは、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体の少なくとも1種と、ヒトI g Aに対する抗体の少なくとも1種とを含むことを特徴とする。前記ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と、ヒトI g Aに対する抗体とを用いて、尿に由来する試料中のヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒトI g Aとの複合体を検出することで、良好な検出感度と特異性で腎疾患と判定することが可能になる。

本発明の腎疾患の検査キットは、前記抗体に加えて、被験者の尿に由来する試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒトI g Aに対する抗体とを接触させて、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒトI g Aとの複合体を検出し、その検出量と腎疾患と関連付けることが記載された取扱い説明書をさらに含むことが好ましい。

また、本発明の腎疾患の検査キットは、I g A腎症の検査用として好まし

く用いることができる。

[0048] 日本国出願番号第2008-144883号の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書に参照により取り込まれる。

実施例

[0049] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。尚、特に断りのない限り、「%」は質量基準である。

[0050] [実施例1]

＜ヒト腎メサンギウム細胞抗原認識モノクローナル抗体の取得＞

正常ヒト腎メサンギウム細胞（Cryo NHMC: Cambrex社）を培養し、その細胞またはその細胞骨格成分抽出フラクションを免疫源としてBALB/cマウス（メス）に免疫した。免疫源に対する抗体価が上昇したことを確認し、その脾臓細胞をP3U-1細胞と細胞融合してハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの1stスクリーニングは、2種類の免疫抗原（正常ヒト腎メサンギウム細胞またはその細胞骨格成分抽出フラクション）をマイクロプレートのカップに固相化したEIA法により行い、両方あるいはいずれか一方の抗原に対して高い発色値を示したハイブリドーマを選択した。尚、細胞骨格成分抽出フラクションは、ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem社製) を用いて調製した。

選択したハイブリドーマは、限界希釈法でモノクローンにした後、これらを用いてヒト腎メサンギウム細胞に特異的なハイブリドーマを選択するために2ndスクリーニングを行った。ハイブリドーマの2ndスクリーニングは、後述するELISA法を用い、固相に正常ヒト腎メサンギウム細胞またはその細胞骨格成分抽出フラクションを用いたもので反応し、対照用に培養した正常ヒト近位尿細管上皮細胞（Cryo RPTEC: Cambrex社）またはその細胞

骨格成分抽出フラクションを固相にしたものでは反応しないクローンを選択した。

[0051] ELISA法は次の通り行った。正常ヒト腎メサンギウム細胞と正常ヒト近位尿細管上皮細胞の、それぞれ4000 cells/200 μ lをポリソープカップ（NUNC社製）に注入し37°C、一夜培養した。カップをPBS（pH7.2）で5回洗浄した後、0.05%グルタルアルデヒド溶液100 μ l/wellを注入し室温、30分間反応させた。カップを洗浄液（50mM Tris/HCl（pH7.5）、150mM NaCl、0.01% Tween 20）で5回洗浄後、ブロッキング液（10%正常ウサギ血清（Pel-Freeze）、50mM Tris/HCl（pH7.5）、0.15M NaCl、10mM-EDTA-2Na、0.01% Tween 20、0.1% NaN₃）を150 μ l/well注入後、室温で2時間又は4°Cで1日以上ブロッキングした（以下、「抗体スクリーニング用カップ」という）。

一方、正常ヒト腎メサンギウム細胞と正常ヒト近位尿細管上皮細胞の骨格成分抽出フラクションは、それぞれ10 μ g/ml濃度に50mM Tris/HCl（pH7.5）、0.15M NaClで希釈した後、ポリソープカップ（NUNC社製）に50 μ l/well注入した。カップを湿潤ボックスに入れ4°Cで一夜コートした。コート後以降の操作は、前述の抗体スクリーニング用カップと同様に行った。

[0052] 4種類の抗体スクリーニング用カップを、それぞれ洗浄液（50mM Tris/HCl（pH7.5）、150mM NaCl、0.01% Tween 20）で3回洗浄し、ハイブリドーマ培養上清を50 μ l/well注入し、室温で1時間反応した。洗浄液（50mM Tris/HCl（pH7.5）、150mM NaCl、0.01% Tween 20）で3回洗浄後、0.2M Na₂HPO₄/0.1Mクエン酸で緩衝化（pH5.4）した25%正常ウサギ血清（Pel-Freeze）で希釈した2種類の標識抗体（HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG（Zymed社製：1000倍希釈）、HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG1（Zymed社製：4000倍希釈）を、50 μ l/well注入し、室温で1時間

反応した。洗浄液で3回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA (SIGMA社製)を100 μ l/well注入し、室温で30分反応した。0.5M H₂SO₄を100 μ l/well注入して反応を停止させた後、OD (450-650nm)を測定した。本測定結果において、特にHRP-Anti-Mouse IgG1で正常ヒト腎メサンギウム細胞及びその細胞骨格成分抽出フラクションの両方あるいはそのいずれか一方で高い発色値を示し、かつ、正常ヒト近位尿細管上皮細胞及びその細胞骨格成分抽出フラクションのいずれでも低い発色値を示したクローンを選択した。

[0053] <モノクローナル抗体の反応特性の確認>

上記で取得したハイブリドーマを培養し、その細胞をマウス腹腔に移植して得られた腹水からPROSEPA (MILLIPORE社製)によってIgGを精製した。精製モノクローナル抗体の特異性は、上記スクリーニングに用いたELISA法と同様の方法で特異性を確認した。

[0054] 精製モノクローナル抗体5種(4H3-1D12-1D2、4H3-2E7-1D2、6C4-6A8-1B4、14E11-2G7-1B2、11A11-2F9-1G3)はすべて、固相に正常ヒトメサンギウム細胞または細胞骨格成分抽出フラクションに対しては高い発色値を示し、対照用の正常ヒト近位尿細管上皮細胞(Cryo RPTEC: Cambrex社)またはその細胞骨格成分抽出フラクションを固相にしたものでは低い発色値しか示さなかった。

[0055] 次に、正常ヒト腎メサンギウム細胞の骨格成分抽出フラクションをSDS-PAGEにかけ、ニトロセルロースフィルター(Schleicher&Schuell社製、BA85)にブロッティングした。フィルターをブロッキング液(50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、5%スキムミルク、0.01%Tween20、0.1%NaN₃)に浸し、4°Cで一夜振とうした後、ブロッキング液を交換し、取得したモノクローナル抗体各クローンの培養上清を加え、室温で2時間振とうし、洗浄液で3回洗浄した。洗浄液に二次抗体のHRP標識抗マウスIgG(Zymed Laboratories, Inc.社製

)を1/1000濃度で加え、室温で1時間振とうし、洗浄液で3回洗浄した後、発色液(8.3mM Tris-HCl(pH6.5)、125mM NaCl、0.05% 4-Chloro-1-Naphtol、0.01% H₂O₂)を加えて発色させた。

[0056] 上記ウエスタンブロッティング解析実験の結果、クローン4H3と6C4はヒト腎メサンギウム細胞の骨格成分抽出フラクションの異なる分子量の成分と反応した。クローン4H3と6C4はヒト腎メサンギウム細胞の異なる抗原を認識していると考えられる。

[0057] <腎疾患の検出>

～ELISA法によるIgA-6C4認識抗原複合体の検出～

6C4-6A8-1B4抗体(以下、「6C4」という)をPROSEPA(MILLIPORE社製)で精製後、更に50mM Tris/HCl(pH7.5)、0.15M NaClで透析して精製した精製抗体を5μg/ml～10μg/ml濃度に50mM Tris/HCl(pH7.5)、0.15M NaClで希釈した後、ポリソープカップ(NUNC社製)に50μl/well注入した。カップを湿潤ボックスに入れ4℃で一夜コートした。コート後、洗浄液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01%Tween20)で3回洗浄し、ブロッキング液(50%N102(日本油脂社製)、25mM Tris/HCl(pH7.5)、75mM NaCl、2%ブロックエース(大日本住友製薬社製))を150μl/well注入後、室温で2時間又は4℃で1日以上ブロッキングした(以下、「6C4コートカップ」という)。

[0058] 6C4コートカップを洗浄液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01%Tween20)で3回洗浄し、検体希釈液(50%N102(日本油脂社製)、50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、2%ブロックエース(大日本住友製薬社製))で50倍希釈した尿検体を50μl/well注入し、室温で1時間反応した。洗浄液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl

、0.01% Tween 20)で3回洗浄後、Can Get Signal 2 (TOYOBO社製)で3000倍希釈したHRP-GOAT Anti-Human IgA (Zymed社製)を、50 μ l/well注入し、室温で1時間反応した。洗浄液で3回洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)Liquid Substrate System for ELISA (SIGMA社製)を100 μ l/well注入し、室温で30分反応した。0.5 M H₂SO₄を100 μ l/well注入して反応を停止させた後、OD(450-650 nm)を測定した。IgA腎症患者95例を含む腎疾患患者146例と健康人(健常人)28例について測定した結果を図1に示す。

[0059] 図1においてブランクを差し引いた値を比較することで、IgA腎症患者95例を含む腎疾患患者146例と健康人(健常人)28例を有意に区別できる結果が得られた。

また、腎疾患患者146例と健康人28例についてROC解析を行ったところ、図2に示すROC曲線が得られた。ROC曲線から求めたカットオフ値は0.155であった。そのカットオフ値から腎疾患患者146例と健康人28例の陽性率を求めた結果を表1に示す。表1に示す通り、腎疾患患者146例中陽性132例(90.4%)、健康人28例中陽性2例(7.1%)であり、両者を有意に区別できた。その時の感度は90.4%、特異度(特異性)は92.9%、診断効率(ROC面積)は90.8%であった。

[0060] [表1]

	腎疾患患者	健康人
検体数	146	28
陽性数	132	2
陽性率	90.4%	7.1%

[0061] < IgA腎症の検出 >

次に、複合体検出量が上記カットオフ値以上の発色値を示した検体についてピロガロールレッド法により尿中の蛋白濃度を定量した。上記で検出したIgA-6C4認識抗原複体の検出量(図1に示した値)を尿中の蛋白濃度で除して、尿中の蛋白量あたりの複合体検出量を算出した結果を図3に示した。図3から、IgA腎症患者83例とIgA腎症以外の腎疾患患者48

例とを有意に区別できることが分かる。

また、I g A腎症患者83例とI g A腎症以外の腎疾患患者48例についてROC解析を行ったところ、図4に示すROC曲線が得られた。ROC曲線から求めたカットオフ値は4509であった。そのカットオフ値からI g A腎症患者83例とI g A腎症以外の腎疾患患者48例の陽性率を求めた結果を表2に示した。表2から、I g A腎症患者83例中陽性61例(73.5%)、I g A腎症以外の腎疾患患者48例中陽性10例(20.8%)であり、両者を有意に区別できることが分かる。その時の感度は73.5%、特異度は79.2%、診断効率(ROC面積)は75.6%であった。

[0062] [表2]

	IgA腎症	IgA腎症以外の腎疾患
検体数	83	48
陽性数	61	10
陽性率	73.5%	20.8%

[0063] [実施例2]

<腎疾患の検出>

～ELISA法によるI g A-4H3認識抗原複合体の検出～

4H3-1D12-1D2抗体(以下、「4H3」という)をPROSEP-A(MILLIPORE社製)で精製後、50mM Tris/HCl(pH7.5)、0.15M NaClで透析した精製抗体を5μg/ml～10μg/ml濃度に50mM Tris/HCl(pH7.5)、0.15M NaClで希釈した後、ポリソープカップ(NUNC社製)に50μl/well注入した。カップを湿潤ボックスに入れ4℃一夜コートした。コート後、洗浄液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01%Tween20)で3回洗浄し、ブロッキング液(50% N102(日本油脂社製)、25mM Tris/HCl(pH7.5)、75mM NaCl、2%ブロックエース(大日本住友製薬社製))を150μl/well注入後、室温で2時間又は4℃で1日以上ブロッキングした(以下、「4H3コートカップ」という)。

[0064] 4H3コートカップを洗浄液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01%Tween20)で3回洗浄し、検体希釈液(50%N102(日本油脂社製)、50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、2%ブロッケーアス(大日本住友製薬社製))で50倍希釈した尿検体を50 μ l/well注入し、室温で1時間反応した。洗浄液(50mM Tris/HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.01%Tween20)で3回洗浄後、Can Get Signal 2 (TOYOBO社製)で3000倍希釈したHRP-GOAT Anti-Human IgA(Zymed社製)を、50 μ l/well注入し、室温で1時間反応した。洗浄液で3回洗浄後、3',5',5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA (SIGMA社製)を100 μ l/well注入し、室温で30分反応した。0.5M H₂SO₄を100 μ l/well注入して反応を停止させた後、OD(450-650nm)を測定した。IgA腎症患者95例を含む腎疾患患者149例と健康人28例について測定した結果を図5に示す。

[0065] 図5においてブランクを差し引いた値を比較することで、IgA腎症患者95例を含む腎疾患患者149例と健康人28例を有意に区別できる結果が得られた。

また、腎疾患患者149例と健康人28例についてROC解析を行ったところ、図6に示すROC曲線が得られた。ROC曲線から求めたカットオフ値は0.192であった。そのカットオフ値から腎疾患患者149例と健康人28例の陽性率を求めた結果を表3に示す。表3から、腎疾患患者149例中陽性147例(98.7%)、健康人28例中陽性1例(3.6%)であり、両者を有意に区別できた。その時の感度は98.7%、特異度は96.4%、診断効率は98.3%であった。

[0066] [表3]

	腎疾患患者	健康人
検体数	149	28
陽性数	147	1
陽性率	98.7%	3.6%

[0067] < I g A腎症の検出 >

次に、カットオフ値以上の発色値を示した検体についてピロガロールレッド法により尿中のタンパク濃度を定量した。上記で検出した I g A - 4 H 3 認識抗原複合体の検出量（図 5 に示した値）を尿中タンパク濃度で除して、尿中の蛋白量あたりの複合体検出量を算出した結果を図 7 に示した。図 7 から、I g A腎症患者 92 例と I g A腎症以外の腎疾患患者 54 例を有意に区別できることが分かる。

また、I g A腎症患者 92 例と I g A腎症以外の腎疾患患者 54 例について ROC 解析を行ったところ、図 8 に示す ROC 曲線が得られた。ROC 曲線から求めたカットオフ値は 15.07 であった。そのカットオフ値から I g A腎症患者 92 例と I g A腎症以外の腎疾患患者 54 例の陽性率を求めた結果を表 4 に示す。表 4 から、I g A腎症患者 92 例中陽性 71 例（77.2%）、I g A腎症以外の腎疾患患者 48 例中陽性 14 例（25.9%）であり、両者を有意に区別できた。その時の感度は 77.2%、特異度は 74.1%、診断効率は 76.0% であった。

[0068] [表4]

	IgA腎症	IgA腎症以外の腎疾患
検体数	92	54
陽性数	71	14
陽性率	77.2%	25.9%

[0069] 上記から、尿中に存在するヒト I g A とヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原の複合体を検出することで、健康人と腎症患者を識別できることが分かる。

また、尿中に存在するヒト I g A とヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原の複合体の尿蛋白濃度当りの検出量を測定することで I g A腎症とそれ以外の腎疾患を識別できることが分かる。

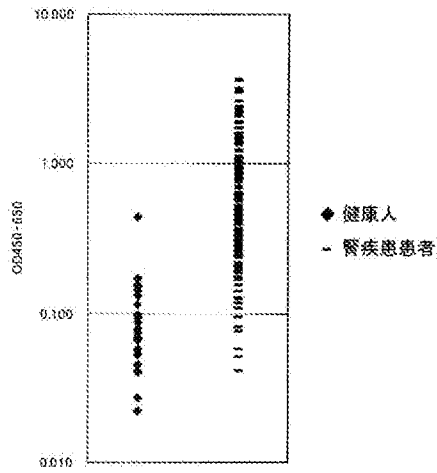
請求の範囲

- [請求項1] 被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体を検出する複合体検出工程を含む I g A 腎症の検査方法。
- [請求項2] 前記複合体検出工程は、前記試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒト I g A に対する抗体とを接触させることを含む請求項 1 に記載の検査方法。
- [請求項3] 前記複合体検出工程で検出された複合体の検出量の、被験者の尿に由来する試料中の尿蛋白質量に対する比率を得る工程をさらに含む請求項 1 または請求項 2 に記載の検査方法。
- [請求項4] 前記比率に基づいて、I g A 腎症と判定する判定工程をさらに含む請求項 3 に記載の検査方法。
- [請求項5] 被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体を検出する複合体検出工程を含む腎疾患の検査方法。
- [請求項6] 前記複合体検出工程は、前記試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒト I g A に対する抗体とを接触させることを含む請求項 5 に記載の検査方法。
- [請求項7] 前記複合体の検出量に基づいて、腎疾患と判定する判定工程をさらに含む請求項 5 または請求項 6 に記載の検査方法。
- [請求項8] 被験者の尿に由来する試料から、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体を検出する複合体検出工程と、
前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出量、あるいは前記試料中の尿蛋白質量に基づいて腎疾患と判定する第 1 の判定工程と、
前記試料中の尿蛋白質量に対する前記複合体検出工程で検出された前記複合体の検出量の比率に基づいて、前記腎疾患を I g A 腎症と判定する第 2 の判定工程と、を含む I g A 腎症の検査方法。

- [請求項9] 前記複合体検出工程は、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と、ヒト I g A に対する抗体とを用いる免疫化学的方法である請求項 1～請求項 8 のいずれか 1 項に記載の検査方法。
- [請求項10] 前記免疫化学的方法は、サンドイッチ法である請求項 9 に記載の検査方法。
- [請求項11] 被験者の尿に由来する試料と、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体及びヒト I g A に対する抗体とを接触させる工程を含む、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原とヒト I g A との複合体の検出方法。
- [請求項12] 前記複合体は、前記ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と、ヒト I g A に対する抗体とを用いて免疫化学的方法で検出される請求項 11 に記載の検出方法。
- [請求項13] 前記免疫化学的方法は、サンドイッチ法である請求項 12 に記載の検出方法。
- [請求項14] 前記被験者は、腎疾患を発症しているヒト、腎疾患を発症していると疑われるヒト、または、腎疾患を発症する可能性を有しているヒトである請求項 11～請求項 13 のいずれか 1 項に記載の検出方法。
- [請求項15] 前記腎疾患は、I g A 腎症である請求項 14 に記載の検出方法。
- [請求項16] 少なくとも、ヒト腎メサンギウム細胞に由来する抗原に対する抗体と、ヒト I g A に対する抗体とを含む腎疾患の検査キット。
- [請求項17] 前記腎疾患は、I g A 腎症である請求項 16 に記載の検査キット。

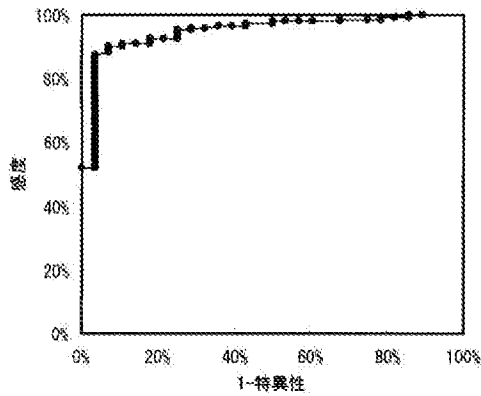
[図1]

尿中IgA-6C4認識抗原複合体測定ELISA



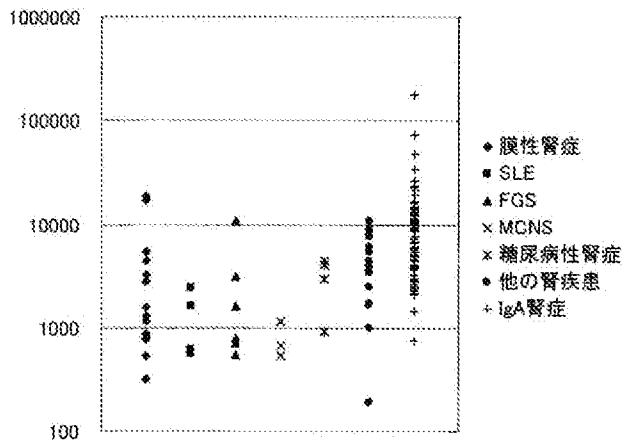
[図2]

ROC曲線

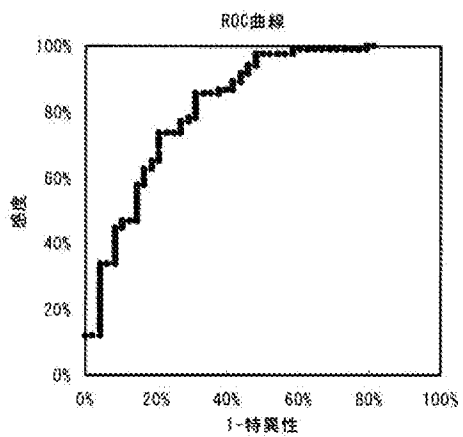


[図3]

尿中IgA-6C4認識抗原複合体測定ELISA
(タンパク濃度補正)

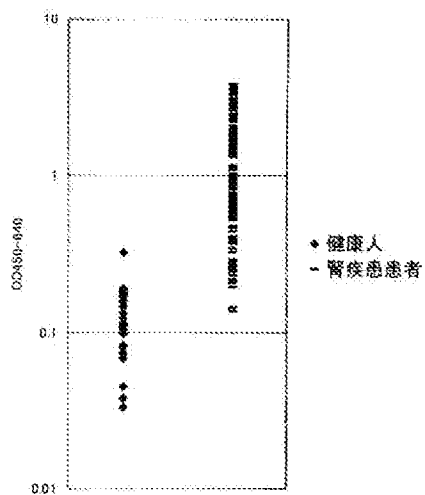


[圖4]

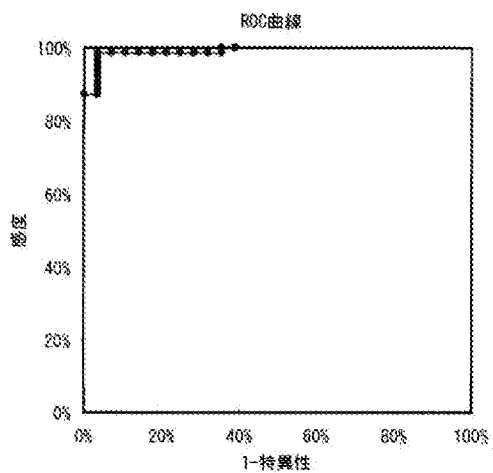


[圖5]

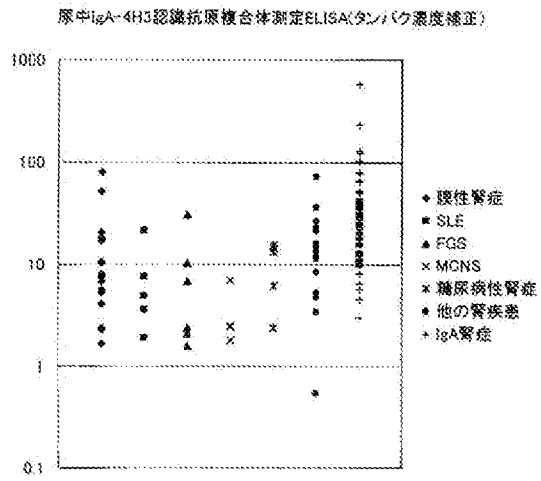
尿中IgA-4H3認識抗原複合体測定ELISA



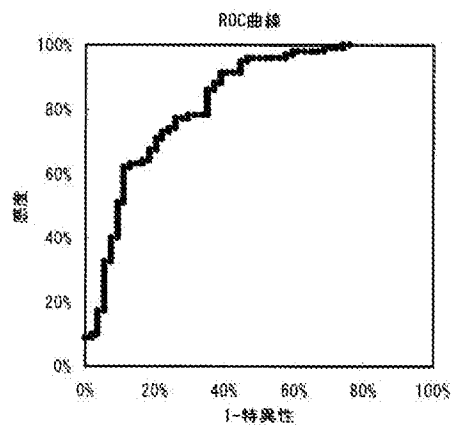
[圖6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2009/059873
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/53 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Science Direct CiNii JDreamII

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/121047 A1 (Tokai University), 16 November, 2006 (16.11.06), Full text (Family: none)	1-17
A	JP 2-503714 A (Biocarb AB.), 01 November, 1990 (01.11.90), Full text & EP 363397 A & US 5139932 A1 & WO 88/08983 A1	1-17
A	WO 2006/063567 A1 (MERTENS, Peter, Rene), 22 June, 2006 (22.06.06), Full text & JP 2008-523114 A & US 2008/311116 A1 & EP 1824505 A	1-17

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 August, 2009 (21.08.09)	Date of mailing of the international search report 01 September, 2009 (01.09.09)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059873

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-163151 A (Gakko Hojin Kitazato Gakuen), 28 June, 2007 (28.06.07), Full text (Family: none)	1-17
A	Kenneth J. McDonald et al., 'Expression of Fc α/μ Receptor by Human Mesangial Cells: A Candidate Receptor for Immune Complex Deposition in IgA Nephropathy', Biochem. Biophys. Res. Commun., (2002) Vol. 290, pp. 438-442	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Science Direct CiNii JDreamII

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2006/121047 A1 (学校法人東海大学) 2006.11.16, 全文 (ファミリーなし)	1-17
A	J P 2-503714 A (バイオカルブ・エイビー) 1990.11.01, 全文 & E P 363397 A & U S 5139932 A1 & W O 88/08983 A1	1-17

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.08.2009

国際調査報告の発送日

01.09.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浅野 美奈

2 J

9312

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2006/063567 A1 (MERTENS, Peter, Rene) 2006.06.22, 全文 & JP 2008-523114 A & US 2008/311116 A1 & EP 1824505 A	1-17
A	JP 2007-163151 A (学校法人北里学園) 2007.06.28 全文 (ファミリーなし)	1-17
A	Kenneth J. McDonald et al., ' Expression of Fc α/μ Receptor by Human Mesangial Cells: A Candidate Receptor for Immune Complex Deposition in IgA Nephropathy', Biochem. Biophys. Res. Commun., (2002) Vol. 290, pp. 438-442	1-17