

(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
2018年1月25日(25.01.2018)



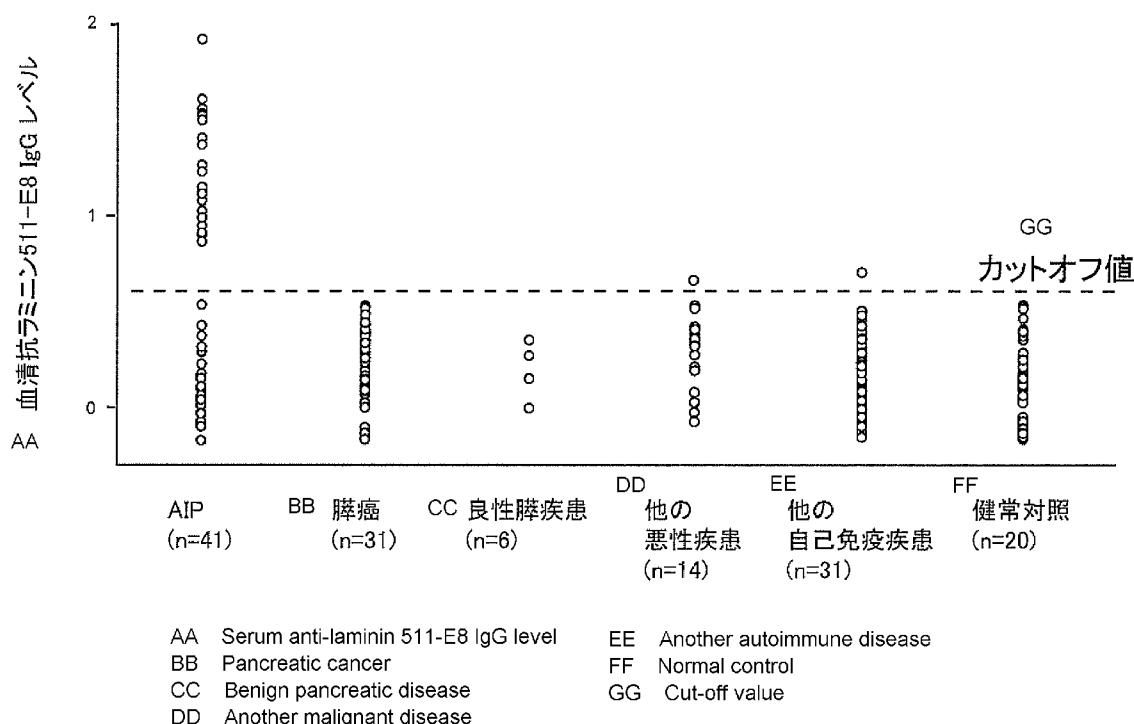
(10) 国際公開番号

WO 2018/016607 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/026359
- (22) 国際出願日: 2017年7月20日(20.07.2017)
- (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 2016-142701 2016年7月20日(20.07.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 塩川 雅広 (SHIOKAWA Masahiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 児玉 裕三 (KODAMA Yuzo); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 千葉 勉 (CHIBA Tsutomu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー3 2階 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,

(54) Title: METHOD FOR TESTING FOR IgG4-RELATED DISEASE

(54) 発明の名称: IgG4関連疾患の検査方法



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of finding a pathogenic substance causing an IgG4-related disease and providing a method for testing for an IgG4-related disease and others using the pathogenic substance. The present invention provides a method for testing for an IgG4-related disease, said method comprising an anti-laminin antibody detection step of detecting, as an indicator for an IgG4-related disease, an antibody capable of immunologically reacting with laminin in a sample and/or an anti-integrin antibody detection step of detecting, as an indicator for an



BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

IgG4-related disease, an antibody capable of immunologically reacting with integrin in the sample. The present invention also provides: a test reagent for use in the testing for an IgG4-related disease, which contains laminin; and a test reagent for use in the testing for an IgG4-related disease, which contains integrin.

(57) 要約: 本発明は、IgG4関連疾患の病原物質を明らかにし、それを利用して、IgG4関連疾患の検査方法等を提供することを目的とする。本発明は、IgG4関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び／又は、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含むIgG4関連疾患の検査方法を提供する。本発明はまた、ラミニンを含む、IgG4関連疾患を検査するための検査試薬、及び、インテグリンを含む、IgG4関連疾患を検査するための検査試薬を提供する。

明 細 書

発明の名称： I g G 4 関連疾患の検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、I g G 4 関連疾患の検査方法、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法、及び、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

[0002] I g G 4 関連疾患とは、血清 I g G 4 高値と I g G 4 陽性形質細胞の組織浸潤または腫瘍形成を特徴とする疾患群である。

[0003] I g G 4 関連疾患は比較的新しい疾患概念であり、これまでのところ原因は不明である。罹患臓器としては膵臓、胆管、涙腺・唾液腺、中枢神経系、甲状腺、肺、肝臓、消化管、腎臓、前立腺、後腹膜、動脈、リンパ節、皮膚、乳腺等が知られている。病変が複数臓器におよび全身疾患としての特徴を有することが多いが、単一臓器病変の場合もある。

[0004] 自己免疫性膵炎（A I P）、I g G 4 関連腎疾患、I g G 4 関連涙腺唾液腺炎等が I g G 4 関連疾患に分類される疾患として知られている。

[0005] I g G 4 関連疾患の原因は従来知られておらず、I g G 4 関連疾患の指標となるマーカー物質も知られていない。このため従来 I g G 4 関連疾患であると診断することは容易ではなかった。例えば、A I P は膵臓での組織浸潤を特徴とするが、組織の観察像からは膵癌との判別が難しく、A I P が誤って膵癌と診断される可能性もあった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2009-294040号公報

特許文献2：特開2008-275527号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] これまでに自己免疫性膵炎の検査方法として、HSP10と免疫学的に反応する抗体を検出する方法（特許文献1）や、アミラーゼ $\alpha 2-A$ と免疫学的に反応する抗体を検出する方法（特許文献2）が知られている。しかしながら、これらの方法は、自己免疫性膵炎の検査方法として必ずしも満足できるものではない。

[0008] IgG4関連疾患の病原物質が特定できれば、病原物質を指標としてIgG4関連疾患を検査すること、病原物質を用いてIgG4関連疾患のモデル動物を作製すること、病原物質を標的として新たな治療薬を開発すること、等が可能になる。しかし、これまでのところIgG4関連疾患の病原物質は解明されていない。

[0009] IgG4関連疾患の病原物質を明らかにし、それを利用して、IgG4関連疾患の検査方法、IgG4関連疾患を検査するための検査試薬、IgG4関連疾患に対する治療の効果を評価する方法、IgG4関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法として有効な手段を提供することが求められている。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは驚くべきことに、IgG4関連疾患の病原物質が、ラミニンに対する自己抗体であること、及び、血清中における抗ラミニン抗体及び抗インテグリン抗体がIgG4関連疾患の指標となることを解明し、この知見に基づいて以下の発明を完成するに至った。

（1）IgG4関連疾患の検査方法であって、

IgG4関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び／又は

IgG4関連疾患の指標として、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

（2）前記IgG4関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン-511と免疫学的に反応する抗体である、(1)に記載の方法。

(3) 前記IgG4関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

抗インテグリン抗体検出工程における前記抗体が、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体である、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 前記IgG4関連疾患が、IgG4関連腎疾患であり、

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン-521と免疫学的に反応する抗体である、(1)に記載の方法。

(5) 前記抗ラミニン抗体検出工程が、ラミニンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 前記抗インテグリン抗体検出工程が、インテグリンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 前記検体が血液試料である、(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(7') 自己免疫性膵炎の検査方法であって、

自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、ラミニン-511と免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び

自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

(8) ラミニンを含む、IgG4関連疾患を検査するための検査試薬。

(9) 前記IgG4関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

前記ラミニンが、ラミニン-511である、(8)に記載の検査試薬。

(10) 前記IgG4関連疾患が、IgG4関連腎疾患であり、

前記ラミニンが、ラミニン-521である、(8)に記載の検査試薬。

(11) 前記ラミニンを、固相に固定された形態で含む、(8)～(10)のいずれかに記載の検査試薬。

(12) インテグリンを含む、IgG4 関連疾患を検査するための検査試薬。

(13) 前記 IgG4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、
前記インテグリンが、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ である、(12) に記載の検査試薬。

(14) 前記インテグリンを、固相に固定された形態で含む、(12) 又は
(13) に記載の検査試薬。

(14') ラミニン-511 とインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ とを固相に固定された
形態で含む、自己免疫性膵炎の検査試薬。

(15) IgG4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法であって、
IgG4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、ラ
ミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び
／又は、

IgG4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、イ
ンテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工
程
を含む方法。

(16) IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法で
あって、

試験物質を作用させた動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応
する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程と、

前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場
合に、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜す
る選抜工程と
を含む方法。

(17) IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法で
あって、

試験物質を作用させた動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に

反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程と、

前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程とを含む方法。

(18) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、

非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラミニン抗体投与工程、及び

非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラミニン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法。

(19) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、

非ヒト動物に、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗インテグリン抗体投与工程、及び

非ヒト動物を、インテグリンを抗原として免疫するインテグリン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法。

(20) IgG4 関連疾患の指標を取得する方法であって、

検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び／又は

検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

(21) 前記 IgG4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン-511 と免疫学的に反応する抗体である、(20) に記載の方法。

(22) 前記 IgG4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

抗インテグリン抗体検出工程における前記抗体が、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体である、(20) 又は (21) に記載の方法。

(23) 前記 IgG4 関連疾患が、IgG4 関連腎疾患であり、

抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン-521と免疫学的に反応する抗体である、(20)に記載の方法。

(24) 前記抗ラミニン抗体検出工程が、ラミニンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、(20)～(23)のいずれかに記載の方法。

(25) 前記抗インテグリン抗体検出工程が、インテグリンを抗原として用いて前記抗体を検出することを含む、(20)～(24)のいずれかに記載の方法。

(26) 前記検体が、被検動物から分離された血液試料である、(20)～(25)のいずれかに記載の方法。

(26') 自己免疫性膵炎の指標を取得する方法であって、

検体中の、ラミニン-511と免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び

検体中の、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程を含む方法。

(27) IgG4関連疾患を検査するための検査試薬の製造における、ラミニンの使用。

(28) 前記IgG4関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

前記ラミニンが、ラミニン-511である、(27)に記載の使用。

(29) 前記IgG4関連疾患が、IgG4関連腎疾患であり、

前記ラミニンが、ラミニン-521である、(27)に記載の使用。

(30) 前記ラミニンが、ラミニンが固定された固相の形態である、(27)～(29)のいずれかに記載の使用。

(31) IgG4関連疾患を検査するための検査試薬の製造における、インテグリンの使用。

(32) 前記IgG4関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、

前記インテグリンが、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ である、(31)に記載の使用。

(33) 前記インテグリンが、インテグリンが固定された固相の形態である、(31)又は(32)に記載の使用。

(33') 自己免疫性膵炎の検査試薬の製造における、固相に固定された形態の、ラミニン-511及びインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の使用。

(34) IgG4関連疾患の検査に使用するためのラミニン。

(35) 前記IgG4関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、
前記ラミニンが、ラミニン-511である、(34)に記載のラミニン。

(36) 前記IgG4関連疾患が、IgG4関連腎疾患であり、
前記ラミニンが、ラミニン-521である、(34)に記載のラミニン。

(37) 前記ラミニンが、ラミニンが固定された固相の形態である、(34)～(36)のいずれかに記載の使用。

(38) IgG4関連疾患を検査に使用するためのインテグリン。

(39) 前記IgG4関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、
前記インテグリンが、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ である、(38)に記載のインテグリン。

(40) 前記インテグリンが、インテグリンが固定された固相の形態である、(38)又は(39)に記載のインテグリン。

(40') 自己免疫性膵炎の検査に使用するための、固相に固定された形態の、ラミニン-511及びインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の組み合わせ。

(41) IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、ラミニンと免疫学的に反応する抗体。

(42) IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、ラミニン。

(43) IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、インテグリンと免疫学的に反応する抗体。

(44) IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法に使用するための、インテグリン。

(45) IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造

における、ラミニンと免疫学的に反応する抗体の使用。

(46) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造における、ラミニンの使用。

(47) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造における、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の使用。

(48) IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製するための試薬の製造における、インテグリンの使用。

[0011] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号 2016-142701 号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明の 1 つ以上の実施形態によれば、IgG4 関連疾患の検査方法、IgG4 関連疾患を検査するための検査試薬、IgG4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法として有効な手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1A]図1Aは、実験1での、対照IgG投与マウス（左列）と、患者IgG投与マウス（右列）の、IgG投与から12時間後の脾臓のH&E染色（上段）と、Gr1の染色（下段）の結果を示す。観察像中のスケールバーは上段では50 μ m、下段では20 μ mを示す。

[図1B]図1Bは、実験1での、対照IgG（三角）及び患者IgG（丸）の投与量と、浮腫面積との相関関係を示す。

[図1C]図1Cは、実験1での、対照IgG投与マウス（左）と、患者IgG投与マウス（右）の、IgG投与から12時間後の脾臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、Gr1陽性細胞数を示す（* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$: paired Student's testによる）。

[図2A]図2Aは、実験1での、対照IgG投与マウス（左列）と、患者IgG投与マウス（右列）の、IgG投与から12時間後の脾臓でのIgG（上段）、IgG1（中段）、IgG4（下段）の免疫組織化学的染色の結果を

示す。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図2B]図2Bは、実験1での、対照IgG投与マウスと患者IgG投与マウスの、膵臓組織の免疫蛍光染色の結果を示す。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図3A]図3Aの上段の「対照1」は、10名の対照のうち特定の1名（対照1）から得た対照IgG1及び対照IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の膵臓のH&E染色の観察像である。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。図3Aの中段及び下段「患者9」は、10名のIgG4関連疾患患者のうち特定の1名（患者9）から得た患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の膵臓の、H&E染色の観察像（中段）、及び、Gr1の免疫組織化学的染色の観察像（下段）である。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図3B]図3Bは、対照IgG1及び対照IgG4の一方又は両方を投与したマウス（左）と、患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウス（右）の、投与から12時間後の膵臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、Gr1陽性細胞数を示す（* $p < 0.05$: paired Student's testによる）。

[図3C]図3Cは、10名のIgG4関連疾患患者のうち特定の1名（患者1）から得た患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の膵臓の、ヒトIgG1又はヒトIgG4の免疫組織化学的染色の観察像である。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。

[図4A]図4A上段左は、AIP病変のある部位（左側）と、病変のない部位（右側）との境界部分から採取した、AIP患者の膵臓組織切片をH&E染色した観察像を示す。図4A上段右は、同様の膵臓組織切片の、IgG4に対する免疫組織化学的染色の観察像を示す。スケールバーは200 μ mを示す。図4A下段左は、図4A上段右の観察像のうち、病変のある腺房の部分を拡大した観察像である。図4A下段中は、図4A上段右の観察像のうち、病変のある小葉間隙の部分を拡大した観察像である。図4A下段右は、図4

A上段右の観察像のうち、病変のない正常な腺房の部分を拡大した観察像である。図4 A下段の各観察像においてスケールバーは20 μ mを示す。

[図4B]図4 Bの各像は、A I P患者の膵臓での病変のある腺房を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4 Bの各像ではスケールバーは20 μ mを示す。図4 B上段左は、A I P患者の膵臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたI g G 4の観察像を示す。図4 B上段中は、図4 B上段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたアミラーゼの観察像を示す。図4 B上段右は、図4 B上段左のI g G 4の観察像と、図4 B上段中のアミラーゼの観察像とを重ね合わせた像である。図4 B下段左は、A I P患者の膵臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたI g G 4の観察像を示す。図4 B下段中は、図4 B下段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンI Vの観察像を示す。図4 B下段右は、図4 B下段左のI g G 4の観察像と、図4 B下段中のコラーゲンI Vの観察像とを重ね合わせた像である。

[図4C]図4 Cの各像は、A I P患者の膵臓での病変のある小葉間隙を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4 Cの各像ではスケールバーは20 μ mを示す。図4 C左は、A I P患者の膵臓での病変のある小葉間隙の、免疫蛍光染色されたI g G 4の観察像を示す。図4 C中は、図4 C左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンI Vの観察像を示す。図4 C右は、図4 C左のI g G 4の観察像と、図4 C中のコラーゲンI Vの観察像とを重ね合わせた像である。

[図5A]A I P患者血清及び対照血清中の抗ヒトラミニン-511活性断片抗体の濃度を示す。

[図5B]A I P患者血清及び対照血清中の抗ヒトコラーゲンI V抗体の濃度を示す。

[図5C]A I P患者血清及び対照血清中の抗ヒトフィブロネクチン抗体の濃度を示す。

[図5D]A I P患者血清及び対照血清中の抗G F P抗体の濃度を示す。

[図6]図6は、H & E染色により染色した膵臓の組織切片の観察像を示す。図

6 左が対照群の膵臓の観察像、図 6 右がラミニン-511 により免疫した試験群の膵臓の観察像である。

[図7] AIP 患者血清及び対照血清中の抗ヒトラミニン-521 抗体の濃度を示す。

[図8] 図 8 左側に IgG4 関連腎疾患患者 IgG を皮下投与したマウスの腎臓の観察像を示し、図 8 右側に対照 IgG を皮下投与したマウスの腎臓のヒト IgG4 染色観察像を示す。上段は、腎臓全体のヒト IgG4 染色観察像を示し、下段は糸状体のヒト IgG4 染色観察像を示す。

[図9A] 実験 8 における、トレーニング群である 10 名の AIP 患者及び 10 名の対照からの血清試料の、抗ヒトラミニン-511-E8 IgG 抗体レベルの測定結果を示す。

[図9B] 実験 8 における、バリデーション群である 41 名の AIP 患者及び 102 名の対照（健常者 20 名、AIP 以外の疾患患者 82 名）からの血清試料の、抗ヒトラミニン-511-E8 IgG 抗体レベルの測定結果を示す。

[図10] 実験 9 における、26 名の抗ラミニン 511-E8 抗体陽性 AIP 患者、25 名の抗ラミニン 511-E8 抗体陰性 AIP 患者、及び、112 名の対照からの血清試料での、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ IgG 抗体レベルの測定結果を示す。

[図11] 実験 9 における、26 名の抗ラミニン 511-E8 抗体陽性 AIP 患者、25 名の抗ラミニン 511-E8 抗体陰性 AIP 患者、及び、112 名の対照からの血清試料での、抗インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ IgG 抗体レベルの測定結果を示す。

[図12] 図 12 上段は、抗ラミニン 511-E8 抗体陽性 AIP 患者の造影 CT による膵画像である。図 12 下段は、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陽性 AIP 患者の造影 CT による膵画像である。各画像中の矢印は病変箇所を指す。

[図13] 抗ラミニン 511-E8 抗体陽性 AIP 患者 5 名の、ステロイド（プ

レドニゾン）を用いた治療の前後での、血清中の抗ラミニン 511-E8 抗体レベルの測定結果を示す。

発明を実施するための形態

[0014] <1. IgG4 関連疾患>

本発明において IgG4 関連疾患とは、血清 IgG4 高値と IgG4 陽性形質細胞の組織浸潤または腫瘍形成を特徴とする疾患群であり、具体的には、自己免疫性膵炎（AIP）、IgG4 関連腎疾患、IgG4 関連涙腺唾液腺炎、IgG4 関連硬化性胆管炎、IgG4 関連眼疾患、IgG4 関連動脈周囲炎、IgG4 関連下垂体炎、IgG4 関連肺疾患、IgG4 関連後腹膜線維症が例示できる。

<2. IgG4 関連疾患の検査方法>

本発明は第一に、

IgG4 関連疾患の検査方法であって、

IgG4 関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び／又は

IgG4 関連疾患の指標として、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程

を含む方法に関する。

[0015] 本発明の検査方法の1つ以上の実施形態は、ラミニンに対する抗体（自己抗体）が、IgG4 関連疾患の病原物質であり、被検動物から取得した検体中の前記抗体が、IgG4 関連疾患に罹患していることの指標となるという驚くべき知見に基づき完成された。

[0016] また、本発明の検査方法の1つ以上の実施形態は、ラミニンとインテグリンとの結合が、IgG4 関連疾患の病原物質のターゲットであり、被検動物から取得した検体中の抗ラミニン抗体及び／又は抗インテグリン抗体が、IgG4 関連疾患に罹患していることの指標となるという驚くべき知見に基づき完成された。

[0017] 本発明の検査方法が対象とする被検動物は特に限定されずヒトであっても

よいし、他の非ヒト哺乳動物であってもよいが、好ましくはヒトである。

[0018] 本発明の検査方法に用いる検体としては、被検動物から採取される体液が挙げられる。具体的には、血清、血漿、全血等の血液試料のほか、唾液、髄液、尿などの血液以外の体液試料であってもよい。また、体液に限らず、被検動物から採取される組織、例えば、検査しようとする IgG4 関連疾患の疾患部位（例えば脾臓、腎臓、唾液腺等）から採取される組織も、検体として用いることができる。検体は、被検動物から分離された形態で本発明の検査方法に用いる。

[0019] ラミニンは、天然型では、 α 鎖、 β 鎖および γ 鎖の3本のサブユニット鎖からなる巨大なヘテロ3量体分子である。 α 鎖として $\alpha 1 \sim \alpha 5$ 、 β 鎖として $\beta 1 \sim \beta 3$ 、 γ 鎖として $\gamma 1 \sim \gamma 3$ が知られており、それらの組み合わせで12種類以上のアイソフォームが存在する（表1参照）。本発明においてラミニンのアイソフォームは限定されない。すなわち検出しようとする抗体が免疫学的に反応するラミニンは、 $\alpha 1 \sim \alpha 5$ から選択される1種の α 鎖、 $\beta 1 \sim \beta 3$ から選択される1種の β 鎖、 $\gamma 1 \sim \gamma 3$ から選択される1種の γ 鎖からなるものであることができ、具体的には、表1に記載の12種類のいずれか、或いは他のアイソフォームであることができ、好ましくは α 鎖が $\alpha 5$ 、 β 鎖が $\beta 1$ 、 γ 鎖が $\gamma 1$ である「ラミニン-511」、及び、 α 鎖が $\alpha 5$ 、 β 鎖が $\beta 2$ 、 γ 鎖が $\gamma 1$ である「ラミニン-521」である。

[0020]

[表1]

α 鎖	三量体組成	主な発現部位
$\alpha 1$	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (ラミニン-111) $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ (ラミニン-121)	胎児組織 (成体組織には発現していない)
$\alpha 2$	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$ (ラミニン-211) $\alpha 2\beta 1\gamma 3$ (ラミニン-213) $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ (ラミニン-221)	筋肉、神経(シュワン細胞)
$\alpha 3$	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$ (ラミニン-311) $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ (ラミニン-321) $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (ラミニン-332)	皮膚、肺
$\alpha 4$	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$ (ラミニン-411) $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ (ラミニン-421)	毛細血管
$\alpha 5$	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$ (ラミニン-511) $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ (ラミニン-521)	腎臓、肺、脾臓、血管

[0021] 本発明において、検出しようとする抗体が免疫学的に反応するラミニンの起源は特に限定されないが、IgG4 関連疾患は通常は自己免疫疾患であることから、被検動物と同じ種のラミニンであることが好ましく、特にヒトが好ましい。ヒト等の哺乳動物の種のラミニンの α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖をコードする遺伝子の塩基配列情報および各鎖のアミノ酸配列情報は、公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。表2に、ヒトを含む主な哺乳類について、ラミニンを構成する各鎖のアクセッション番号を示す。表2に示すアミノ酸配列を有するラミニンの各鎖が、更に翻訳後修飾を受けたものが、ラミニンを形成してもよい。これら以外の各種哺乳動物のラミニン構成鎖の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報も同様に公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。

[0022]

[表2]

	アミノ酸配列	塩基配列
ヒトラミニン α 1	NP_005550	NM_005559
ヒトラミニン α 2	NP_000417	NM_000426
ヒトラミニン α 3	NP_000218	NM_000227
ヒトラミニン α 4	NP_002281	NM_002290
ヒトラミニン α 5	NP_005551	NM_005560
ヒトラミニン β 1	NP_002282	NM_002291
ヒトラミニン β 2	NP_002283	NM_002292
ヒトラミニン β 3	NP_000219	NM_000228
ヒトラミニン γ 1	NP_002284	NM_002293
ヒトラミニン γ 2	NP_005553	NM_005562
ヒトラミニン γ 3	NP_006050	NM_006059
マウスラミニン α 5	NP_001074640	NM_001081171
マウスラミニン β 1	NP_032508	NM_008482
マウスラミニン γ 1	NP_034813	NM_010683
ラットラミニン α 5	NP_001178538	NM_001191609
ラットラミニン β 1	NP_001100191	NM_001106721
ラットラミニン γ 1	NP_446418	NM_053966

[0023] 本発明においてラミニン、ラミニン-5 1 1、ラミニン-5 2 1という各用語は、特に限定しない場合は、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖がそれぞれ全長からなる天然型の形態には限定されず、それぞれ、ラミニンの断片、ラミニン-5 1 1の断片、ラミニン-5 2 1の断片や、天然型のラミニン、天然型のラミニン-5 1 1、天然型のラミニン-5 2 1と等価な形態のものを包含する。従って、検出しようとする抗体は、ラミニンの断片と免疫学的に反応するものであってもよい。ラミニンの断片としては、天然型のラミニンの3量体を構成する α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖のうち少なくとも1つが全長よりも短いものが挙げられる。ラミニンの断片は、3量体を形成していることが好ましく、インテグリン結合活性を有していることがより好ましい。ラミニンの断片が3量体を形成していることは、ラミニンの断片をSDS-PAGEに供し、バンドの数を検出すること等により確認できる。ラミニンの断片がインテグリン結合活性を有していることは、ELISA法等により確認することができる。

。

[0024] 3量体を形成し、且つ、インテグリン結合活性を有するラミニンの断片としては、天然型のラミニンをエラスターゼ等のタンパク質分解酵素で消化して得られる断片が挙げられ、特に好ましくはE 8フラグメントである。ラミニンのE 8フラグメントは、 α 鎖のC末端断片から、C末端の球状(G)ドメイン4および5が除かれた断片(α 鎖E 8)、 β 鎖のC末端断片(β 鎖E 8)および γ 鎖のC末端断片(γ 鎖E 8)が3量体を形成したフラグメントである(Hiroyuki Ido, Aya Nakamura, Reiko Kobayashi, Shunsuke Ito, Shaoliang Li, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi, The Journal of Biological Chemistry, 282, 11144-11154, 2007)。ラミニンのE 8フラグメントは、全長ラミニンを胰エラスターゼにより酵素的に消化して得ることができる。市販のラミニンのE 8フラグメントとしては、ヒトラミニン-511-E 8(892012, 株式会社ニッピ製)が例示できる。

[0025] インテグリンは、天然型では、 α 鎖及び β 鎖の2本のサブユニット鎖からなるヘテロ2量体分子である。 α 鎖として $\alpha 1 \sim \alpha 11$ 、 αV 、 αX 、 αM 、 αL 、 αD 、 αE 、 $\alpha I I b$ 、 β 鎖として $\beta 1 \sim \beta 8$ が知られており、それらの組み合わせが異なる複数のアイソフォームが存在する。ラミニンのリガンドとなり得るインテグリンのアイソフォームとしては、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ 、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ が知られている。本発明においてインテグリンのアイソフォームは限定されないが、好ましくは α 鎖が $\alpha 6$ 、 β 鎖が $\beta 1$ である「インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 」である。

[0026] 本発明において、検出しようとする抗体が免疫学的に反応するインテグリンの起源は特に限定されないが、IgG4関連疾患は通常は自己免疫疾患であることから、被検動物と同じ種のインテグリンであることが好ましく、特にヒトが好ましい。ヒト等の哺乳動物の種のインテグリンの α 鎖、 β 鎖をコードする遺伝子の塩基配列情報および各鎖のアミノ酸配列情報は、公知のデータベース(GenBank等)から取得することができる。表3に、ヒトインテグリンを構成する各鎖のアミノ酸配列及び塩基配列のアクセッション

番号を示す。ヒトインテグリンの $\alpha 6$ 鎖及び $\beta 1$ 鎖には、それぞれ、3つのスプライシングバリエーションが知られている。表3に示すアミノ酸配列を有するヒトインテグリンの α 鎖、 β 鎖が、更に翻訳後修飾を受けたものが、ヒトインテグリンを形成してもよい。これら以外の各種哺乳動物のインテグリン構成鎖の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報も同様に公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。

[0027] [表3]

		アミノ酸配列	塩基配列
ヒトインテグリン $\alpha 3$		NP_002195.1 (配列番号 1)	NM_002204.3
ヒトインテグリン $\alpha 6$	integrin alpha-6 isoform b preproprotein	NP_000201.2 (配列番号 2)	NM_000210.3
ヒトインテグリン $\alpha 6$	integrin alpha-6 isoform a preproprotein	NP_001073286.1	NM_001079818.2
ヒトインテグリン $\alpha 6$	integrin alpha-6 isoform c	NP_001303235.1	NM_001316306.1
ヒトインテグリン $\beta 1$	integrin beta-1 isoform 1A precursor	NP_002202.2 (配列番号 3)	NM_002211.3
ヒトインテグリン $\beta 1$	integrin beta-1 isoform 1D precursor	NP_391988.1	NM_033668.2
ヒトインテグリン $\beta 1$	integrin beta-1 isoform 1A precursor	NP_596867.1	NM_133376.2

[0028] 本発明においてインテグリン、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ という各用語は、特に限定しない場合は、 α 鎖及び β 鎖がそれぞれ全長からなる形態には限定されず、それぞれ、インテグリンの断片、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の断片、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の断片や、天然型のインテグリン、天然型のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 、天然型のインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ と等価な形態のものを包含する。従って、検出しようとする抗体は、インテグリンの断片と免疫学的に反応するものであってもよい。インテグリンの断片としては、インテグリンの2量体を構成する α 鎖、 β 鎖のうち少なくとも1つが全長よりも短いものが挙げられる。インテグリンの断片は、2量体を形成して

いることが好ましく、ラミニン結合活性を有していることがより好ましい。インテグリンの断片が2量体を形成していることは、インテグリンの断片をSDS-PAGEに供し、バンドの数を検出すること等により確認できる。インテグリンの断片がラミニン結合活性を有していることは、ELISA法等により確認することができる。市販のインテグリンとしては、リコンビナントヒトインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ (R&D Systems、米国ミネソタ州、製品番号7809-A6)、リコンビナントヒトインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ (R&D Systems、米国ミネソタ州、製品番号2840-A3) が例示できる。

[0029] インテグリンの断片としては、市販されているヒトインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の断片であるHuman ITGA6 & ITGB1 (中国北京、Sin o Biological、製品番号CT013-H2508H-20) が例示できる。

[0030] 抗ラミニン抗体検出工程は、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する工程である。抗インテグリン抗体検出工程は、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する工程である。各工程において「検出」とは、検体中に、ラミニン又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体が存在するか否かを確認することのほか、検体中における該抗体の含有量を測定すること、すなわち「定量」すること、も包含する概念である。

[0031] 抗ラミニン抗体検出工程及び抗インテグリン抗体検出工程は、検体中の前記抗体を定量的又は定性的に検出可能な方法であればよく、具体的な態様は特に限定されない。例えば、免疫学的手法を用いることができ、例えば、抗体酵素法 (ELISA法)、免疫沈降法 (IPP法)、免疫ブロット法 (IB法)、ラテックス凝集法、免疫クロマトグラフィー法、間接蛍光抗体法 (IF法)、ラジオイムノアッセイ法 (RIA法) などの手法を挙げることができる。多くの検体を処理し得るELISA法が特に好ましい。ELISA法では、具体的には、前記抗体の抗原である、上記で詳述したようなラミニン又はインテグリンを固相に固定し、該固相に固定した抗原に検体を接触さ

せ、抗原と、検体中に含有される可能性のある前記抗体との免疫複合体を検出することで、前記抗体を検出することができる。ELISA法の実施に伴う非特異反応の抑制方法や、検出の際に使用し得る標識物質、測定機器などは、特に限定されない。抗原を固定するための固相としては、プレート、ビーズ、チューブなどの任意の形状の固相を用いることができる。

[0032] 抗ラミニン抗体検出工程におけるラミニンと免疫学的に反応する抗体の量、及び、抗インテグリン抗体検出工程におけるインテグリンと免疫学的に反応する抗体の量は、前記抗体と前記抗原との免疫複合体の標識の測定値として求めることができる。既知濃度の前記抗体を含む標準試料により検量線を作成し、検量線を用いて標識の測定値から前記抗体の量を算出することもできる。

[0033] 抗ラミニン抗体検出工程におけるラミニンと免疫学的に反応する抗体が存在するか否かの判定（陽性／陰性の判定）、及び、抗インテグリン抗体検出工程におけるインテグリンと免疫学的に反応する抗体が存在するか否かの判定（陽性／陰性の判定）は、それぞれ、被検動物個体（例えば、IgG4関連疾患の罹患が疑われるヒト）から得た検体中の前記抗体の測定値を、IgG4関連疾患を罹患していない動物個体（例えば健常者）から得た検体中の前記抗体の測定値と比較することによって行うことができる。ここで、IgG4関連疾患を罹患していない個体から得た検体中の前記抗体の測定値は、同時に測定して得た値であってもよいし、予め測定して得た値であってもよい。被検動物個体から得た検体中の前記抗体の測定値が、IgG4関連疾患を罹患していない動物個体から得た検体中の前記抗体の測定値よりも有意に大きい場合に、陽性と判断することができる。

[0034] 抗ラミニン抗体検出工程におけるラミニンと免疫学的に反応する抗体、及び、抗インテグリン抗体検出工程におけるインテグリンと免疫学的に反応する抗体のクラスは特に限定されないが、好ましくはIgG抗体である。IgG抗体のなかのサブクラスは特に限定されないが、例えばIgG1抗体又はIgG4抗体を検出することができる。本発明者らは、IgG4関連疾患で

は、ラミニンと免疫学的に反応する I g G 抗体、特に I g G 1 抗体又は I g G 4 抗体が病原物質であることを見出していることから、これらは I g G 4 関連疾患の指標として特に有用である。

[0035] 検査する I g G 4 関連疾患の種類と、ラミニンと免疫学的に反応する抗体の種類、又は、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の種類との組み合わせは特に限定されない。

[0036] 例えば、自己免疫性膵炎（A I P）の指標としては、ラミニン-5 1 1 と免疫学的に反応する抗体（実験 4 参照）及びインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体（実験 9 参照）が有用である。ラミニン-5 1 1 と免疫学的に反応する抗体は、ラミニン-5 1 1 の断片（特に、インテグリン結合活性を有する 3 量体断片）を抗原として用いた検出法により前記抗体を検出することが特に好ましい。インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体は、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を抗原として用いた検出法により前記抗体を検出することが特に好ましい。

[0037] 一方、I g G 4 関連腎疾患の指標としては、ラミニン-5 2 1 と免疫学的に反応する抗体が有用である（実験 6 参照）。この場合、ラミニン-5 2 1 を抗原として用いた検出法により前記抗体を検出することが特に好ましい。

[0038] 本発明の I g G 4 関連疾患の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態により、検体中の、ラミニン、特にラミニン-5 1 1、特にラミニン-5 1 1-E 8 と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、I g G 4 関連疾患、特に自己免疫性膵炎（A I P）に罹患していると判断することができる。ラミニン、特にラミニン-5 1 1、特にラミニン-5 1 1-E 8 と免疫学的に反応する抗体は、膵癌患者の検体からは検出されないことから、本発明の I g G 4 関連疾患の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態は、A I P と膵癌とを判別する指標を得ることができ、特に有用である。

[0039] また、本発明の I g G 4 関連疾患の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態により、検体中の、ラミニン、特にラミニン-5 1 1、特に

ラミニン-5 1 1 -E 8 と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、IgG4 関連疾患、特に AIP に、悪性腫瘍を合併するリスクが低いと判断することができる。

[0040] 本発明の IgG4 関連疾患の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態により、検体中の、インテグリン、特にインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、IgG4 関連疾患、特に AIP に罹患していると判断することができる。

[0041] 膵癌を罹患する被験動物と、AIP を罹患する、抗インテグリン抗体陽性の被験動物とでは、膵画像が類似しており、膵画像所見のみによる区別は難しい。ところが、インテグリン、特にインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体は、膵癌患者の検体からは検出されないことから、本発明の IgG4 関連疾患の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態は、AIP と膵癌とを判別する指標を得ることができるため特に有用である。

[0042] また、本発明の IgG4 関連疾患の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態により、検体中に、インテグリン、特にインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と免疫学的に反応する抗体が検出された場合、検出結果に基づき、検体が由来する被験動物が、IgG4 関連疾患、特に AIP に、悪性腫瘍を合併するリスクが高いと判断することができる。悪性腫瘍を合併するリスクが高いと判断された被験動物に対しては、全身における悪性腫瘍のスクリーニングを実施する必要性が高いと判断することが可能である。

[0043] 本発明の IgG4 関連疾患の検査方法は、抗ラミニン抗体検出工程と抗インテグリン抗体検出工程の少なくとも一方を含んでいればよいが、より好ましくは、抗ラミニン抗体検出工程と抗インテグリン抗体検出工程の両方を含む。抗ラミニン抗体陰性の検体であっても、抗インテグリン抗体陽性である場合があり、抗インテグリン抗体陰性の検体であっても、抗ラミニン抗体陽性である場合があるため、検体中において両方の抗体を検出することにより、IgG4 関連疾患、特に AIP に罹患している被験動物の検体の検出漏

れの可能性を低減することができる。

<3. I g G 4 関連疾患の検査試薬>

本発明は第二に、

ラミニンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、

インテグリンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬、或いは、

ラミニン及びインテグリンを含む、I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬に関する。

[0044] ここで、I g G 4 関連疾患、ラミニン、及び、インテグリンについては、本発明の検査方法に関して既述の通りである。

[0045] 本発明の検査試薬の、ラミニンを含む実施形態は、上記の本発明の検査方法の、抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態に使用することができる。

[0046] 本発明の検査試薬の、インテグリンを含む実施形態は、上記の本発明の検査方法の、抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態に使用することができる。

[0047] 本発明の検査試薬の1以上の実施形態は、免疫学的測定に必要な試薬類、例えば、緩衝液等を必要に応じて含んでよく、複数の成分からなるキットとして提供されてもよい。

[0048] 本発明の検査試薬の、ラミニンを含む実施形態において、ラミニンの形態は特に限定されず、溶液状態であってもよいし、乾燥状態であってもよいし、固相に固定された形態であってもよい。ラミニンが乾燥状態である場合、使用前に溶液状態にするための緩衝液や溶媒を本発明の検査試薬に含めてもよい。

[0049] 本発明の検査試薬の、インテグリンを含む実施形態において、インテグリンの形態は特に限定されず、溶液状態であってもよいし、乾燥状態であってもよいし、固相に固定された形態であってもよい。インテグリンが乾燥状態である場合、使用前に溶液状態にするための緩衝液や溶媒を本発明の検査試

薬に含めてもよい。

[0050] 固相に固定された形態のラミニンを含む本発明の検査試薬の実施形態は、E L I S A法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットの形態とすることができる。固相に固定された形態のインテグリンを含む本発明の検査試薬の実施形態もまた、E L I S A法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットの形態とすることができる。固相に固定された形態のラミニン及びインテグリンを含む本発明の検査試薬の実施形態もまた、E L I S A法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットの形態とすることができる。各実施形態において、固相の形態としては、プレート、ビーズ、チューブなどの任意の形態であってよい。E L I S A法により I g G 4 関連疾患を検査するためのキットは、前記固相以外に、ブロッキング液、洗浄液、検体希釈液、酵素標識した二次抗体、基質液等を含むことができる。

<4. I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法>

本発明は第三に、

I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法であって、

I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び／又は、

I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程

を含む方法に関する。

[0051] 上記の「I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法」は、「I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価するための指標を取得する方法」と表現してもよい。

[0052] 本発明の検査方法に関して既述の通り、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体、及び、インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、I g G 4 関連疾患の指標として有用である。このため、I g G 4 関連疾患に対する治

療が施された被検動物から得た検体中の前記抗体は、治療が有効で治癒している場合は低下し、治療が十分に効果を発揮していない場合は治療開始前から変化しない又は上昇する。そこで、IgG4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の。ラミニンと免疫学的に反応する抗体、及び／又は、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出することで、治療の効果を評価することが可能となる。

[0053] 被検動物としては、IgG4 関連疾患の治療を受けたヒトや非ヒト動物が例示できる。

[0054] IgG4 関連疾患の治療としては、ステロイド投与等の、IgG4 関連疾患の治療が挙げられる。

[0055] 本発明の治療効果の評価方法における、検体、ラミニン、インテグリン、抗体、抗ラミニン抗体検出工程、抗インテグリン抗体検出工程などの具体的な態様は、本発明の検査方法に関して説明したのと同様である。

[0056] 本発明の治療効果の評価方法における抗ラミニン抗体検出工程及び／又は抗インテグリン抗体検出工程で得た、IgG4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び／又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果を、例えば、前記治療を開始する前の同一動物個体から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び／又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果と比較して、前者が後者よりも小さい場合には、治療が有効であると評価することができる。一方、前者が後者と同程度或いは後者よりも大きい場合には、治療が有効でない又は十分でないと評価することができる。この評価結果に基づいて、治療を更に継続する、治療方針を変更する、治療を中止するなどの判断が可能である。

[0057] また、本発明の治療効果の評価方法における抗ラミニン抗体検出工程及び／又は抗インテグリン抗体検出工程で得た、IgG4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び／又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果を、例えば、同

一動物種の健常個体から得た検体中のラミニンと免疫学的に反応する抗体及び／又はインテグリンと免疫学的に反応する抗体の定量結果と比較して、前者が後者と同程度である又はより小さい場合には、治療が有効であると評価することができる。一方、前者が後者よりも大きい場合には、治療が有効でない又は十分でないと評価することができる。この評価結果に基づいて、治療を更に継続する、治療方針を変更する、治療を中止するなどの判断が可能である。

<5. I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法 1>

本発明は第四に、

I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、

試験物質を作用させた動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程と、

前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程と

を含む方法に関する。

[0058] 本発明の検査方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態に関して既述の通り、検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体は、I g G 4 関連疾患の指標として有用である。このため、試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することが可能となる。

[0059] 本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態における、検体、ラミニン、抗体、抗ラミニン抗体検出工程などの具体的態様は、本発明の検査方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態に関して説明したのと同様である。

[0060] 本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態において、試験物質としては、新規医薬の候補となる可能性のある試験物質で

あり特に限定されない。試験物質を作用させる動物は、典型的には、IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物等の、健常個体と比較して、ラミニンと免疫学的に反応する抗体の検体中での量が多い動物である。

[0061] 本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗ラミニン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、前記試験物質を作用させる前の同一動物個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者よりも小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

[0062] また、本発明のスクリーニング方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗ラミニン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、同一動物種の健常個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者と同程度である又はより小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

<6. IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法2>

本発明は第五に、

IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、

試験物質を作用させた動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程と、

前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程と

を含む方法に関する。

[0063] 本発明の検査方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態に関して

既述の通り、検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、IgG4 関連疾患の指標として有用である。このため、試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することが可能となる。

[0064] 本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態における、検体、インテグリン、抗体、抗インテグリン抗体検出工程などの具体的態様は、本発明の検査方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態に関して説明したのと同様である。

[0065] 本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態において、試験物質としては、新規医薬の候補となる可能性のある試験物質であり特に限定されない。試験物質を作用させる動物は、典型的には、IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物等の、健常個体と比較して、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の検体中での量が多い動物である。

[0066] 本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗インテグリン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、前記試験物質を作用させる前の同一動物個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者よりも小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

[0067] また、本発明のスクリーニング方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態における選抜工程では、抗インテグリン抗体検出工程で得た、試験物質を作用させた動物から得た検体中の前記抗体の定量結果を、例えば、同一動物種の健常個体から得た検体中の前記抗体の定量結果と比較して、前者が後者と同程度である又はより小さい場合には、前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少したと判断し、前記試験物質を、IgG4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜することができる。

<7. IgG4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法1>

本発明は第六に、

Ⅰ g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、

非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラミニン抗体投与工程、及び

非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラミニン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法に関する。

[0068] 本発明の非ヒトモデル動物の作製方法の抗ラミニン抗体投与工程又はラミニン免疫工程を含む実施形態での、ラミニン、抗体等の具体的形態は、本発明の検査方法の抗ラミニン抗体検出工程を含む実施形態におけるものと同様である。

[0069] 本明細書に記載の実験 1 及び実験 2 では、Ⅰ g G 4 関連疾患患者から得た血清又は該血清から精製した抗体をマウスに投与したとき、マウスはⅠ g G 4 関連疾患を発症することが確認されている。そして、実験 4 では、Ⅰ g G 4 関連疾患患者から得た血清が、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を含むことが確認されている。このことから、非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラミニン抗体投与工程により、Ⅰ g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物の作製が可能であると言える。

[0070] 抗ラミニン抗体投与工程における非ヒト動物としては、例えば B A L B / c マウス、B 6 マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

[0071] 抗ラミニン抗体投与工程における、ラミニンと免疫学的に反応する抗体の投与経路は特に限定されないが、例えば、皮下投与、腹腔内投与、静脈投与等が例示できる。ラミニンと免疫学的に反応する抗体は、精製された抗体として非ヒト動物に投与される必要はなく、例えば、抗体を含む血清として非ヒト動物に投与されてもよい。

[0072] 抗ラミニン抗体投与工程において、ラミニンと免疫学的に反応する抗体は、投与を受ける非ヒト動物が有するラミニンと免疫学的に反応できるように選択する。例えば、ヒト由来抗ヒトラミニン抗体は、マウスが有するラミニンと免疫学的に反応することができ、マウスにおいてⅠ g G 4 関連疾患の病

変を惹起することができる。

[0073] 一方、本明細書に記載の実験5では、ヒトラミニン-511-E8フラグメントを抗原としマウスを免疫したとき、該抗原に対する抗体が形成され、該マウスはIgG4関連疾患を発症することが確認されている。このことから、非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラニン免疫工程により、IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物の作製が可能であると言える。

[0074] ラニン免疫工程における非ヒト動物としては、例えばBALB/cマウス、B6マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

[0075] ラニン免疫工程における方法は特に限定されない。ラニンを、完全フロイントアジュバント等の適当なアジュバントとともに、非ヒト動物に皮下投与、静脈内投与、或いは腹腔内投与等の経路で投与することで、非ヒト動物を免疫することができる。

[0076] ラニン免疫工程において、抗原として投与するラニンは、それに対する抗体が、免疫される非ヒト動物が有するラニンに自己免疫により免疫学的に反応できるように選択する。例えば、ヒトラミニン-511は、それに対するマウス抗体が、マウスが有するラニンと自己免疫により免疫学的に反応することができ、マウスにおいてIgG4関連疾患の病変を惹起することができる。

<8. IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法2>

本発明は第七に、

IgG4関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、

非ヒト動物に、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗インテグリン抗体投与工程、及び

非ヒト動物を、インテグリンを抗原として免疫するインテグリン免疫工程のうち少なくとも一方を含む方法に関する。

[0077] 本発明の非ヒトモデル動物の作製方法の抗インテグリン抗体投与工程又はインテグリン免疫工程を含む実施形態での、インテグリン、抗体等の具体的な形態は、本発明の検査方法の抗インテグリン抗体検出工程を含む実施形態に

おけるものと同様である。

[0078] 抗インテグリン抗体投与工程における非ヒト動物としては、例えばBALB/cマウス、B6マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

[0079] 抗インテグリン抗体投与工程における、インテグリンと免疫学的に反応する抗体の投与経路は特に限定されないが、例えば、皮下投与、腹腔内投与、静脈投与等が例示できる。インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、精製された抗体として非ヒト動物に投与される必要はなく、例えば、抗体を含む血清として非ヒト動物に投与されてもよい。

[0080] 抗インテグリン抗体投与工程において、インテグリンと免疫学的に反応する抗体は、投与を受ける非ヒト動物が有するインテグリンと免疫学的に反応できるように選択する。例えば、ヒト由来抗ヒトインテグリン抗体（特に、ヒト由来抗ヒトインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体）は、マウスが有するインテグリンと免疫学的に反応することができ、マウスにおいてIgG4関連疾患の病変を惹起することができる。

[0081] インテグリン免疫工程における非ヒト動物としては、例えばBALB/cマウス、B6マウス等のマウス、その他の非ヒト動物が例示できる。

[0082] インテグリン免疫工程における方法は特に限定されない。インテグリンを、完全フロイントアジュバント等の適当なアジュバントとともに、非ヒト動物に皮下投与、静脈内投与、或いは腹腔内投与等の経路で投与することで、非ヒト動物を免疫することができる。

[0083] インテグリン免疫工程において、抗原として投与するインテグリンは、それに対する抗体が、免疫される非ヒト動物が有するインテグリンに自己免疫により免疫学的に反応できるように選択する。例えば、ヒトインテグリン（特にヒトインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ ）は、それに対するマウス抗体が、マウスが有するインテグリンと自己免疫により免疫学的に反応することができ、マウスにおいてIgG4関連疾患の病変を惹起することができる。

実施例

[0084] <1. 実験1：IgG4関連疾患患者のIgGのマウスへの投与>

実験1では、IgG4関連疾患患者の血清から精製したIgGを健常マウス新生仔に投与し、投与後の脾臓への影響を観察した。その結果、IgG4関連疾患患者の血清から精製したIgGは、脾臓に対して病原性を示すことが明らかとなった。

1. 1. 血清

IgG4関連疾患と診断された10名の患者から血清試料を取得した。

[0085] 対照血清試料として、5名の健常者からの血清試料と、5名の疾患患者（3名の脾臓癌患者、2名の原発性硬化性胆管炎患者）からの血清試料を取得した。対照血清試料は、IgG4関連疾患患者血清試料と、年齢（±5歳）、性別を揃えた。

1. 2. ヒトIgGの調製

上記の血清試料から、Ab-Rapid PuRe Ex (P-015, Porte Nova製)を用い、製品の指示書に沿った手順により、ヒトIgGを調製した。IgGはpH7.2のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)により透析し、Amicon Ultra (UFC805024, Millipore製)を用いた限外濾過により濃縮し、使用時まで-20℃で保存した。精製されたIgGの濃度は、Human IgG ELISA Kit (MK136, Takara製)を用いて測定した。IgG画分の純度を、Human IgA ELISA Kit (E88-102, Bethyl Labori res製)、Human IgM ELISA Kit (E88-100, Bethyl Labori res製)、Human IgE ELISA Kit (E88-108, Bethyl Labori res製)、及び、クーマシーブリリアントブルー染色をそれぞれ用いてIgA、IgM、IgE及びタンパク質の混入を求め、確認した。

[0086] IgG4関連疾患患者の血清試料から得られたIgGを「患者IgG」とした。対照血清試料から得られたIgGを「対照IgG」とした。

1. 3. 動物試験

マウスとしてBALB/cマウスの雄の新生仔を用いた。

[0087] 各血清試料から調製されたIgGをマウスに皮下投与した。10～20mgのヒトIgGをマウス体重1gに対して投与した。

1. 4. 結果と考察1 (図1A～図1C)

患者IgG又は対照IgGの皮下投与から12時間後に、マウスの脾臓の組織切片を採取し、H&E (ヘマトキシリン&エオシン) 染色及び免疫組織化学的染色により染色し、観察した。免疫組織化学的染色では、骨髓細胞分化抗原Gr1に対する抗体を一次抗体として用い、Gr1陽性細胞を染色した。

[0088] また、皮下投与から12時間後に、マウスの血清中のヒトIgG濃度を測定した。

[0089] 結果を図1A～図1Cに示す。

[0090] 図1Aは、対照IgG投与マウス (左列) と、患者IgG投与マウス (右列) の、IgG投与から12時間後の脾臓のH&E染色 (上段) と、Gr1の染色 (下段) の結果を示す。観察像中のスケールバーは上段では50μm、下段では20μmを示す。

[0091] 図1Bは、対照IgG (三角) 及び患者IgG (丸) の投与量と、浮腫面積との相関関係を示す。図中のカットオフ値 (21.1%) は、対照IgG又はPBS投与マウスでの浮腫面積の平均値に、標準偏差 (SD) の2倍の値を加えた値である。

[0092] 図1Cは、対照IgG投与マウス (左) と、患者IgG投与マウス (右) の、IgG投与から12時間後の脾臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、Gr1陽性細胞数を示す (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$: paired Student's testによる)。

[0093] 図1Bに示す通り、患者IgG投与マウスと、対照IgG投与マウスとで、血清中のヒトIgG濃度に有意な差はなかった (19.4mg/mlと21.4mg/ml)。一方で、患者IgGのマウスへの投与により脾臓が損傷し、図1Aに示す通り、投与後12時間で損傷が最大となった。対照Ig

Gのマウスへの投与では、図1Aに示す通り、投与後12時間で脾臓の損傷は生じなかった。

[0094] 組織学的観察では、腺房壊死、出血及びGr1陽性多形核白血球の浸潤が、患者IgGを投与したマウスの脾臓で観察された（図1A）。

[0095] 浮腫の面積を定量したところ、患者IgG投与マウスでは浮腫形成が認められたが、対照IgG投与マウスでは浮腫形成は認められなかった（図1B）。

[0096] 脾臓における壊死、出血、及びGr1陽性細胞の浸潤は、患者IgG投与マウスにおいて、対照IgG投与マウスよりも有意に大きかった（図1C）。

1. 5. 結果と考察2（図2A及び図2B）

図2A及びBに結果を示す試験は、患者IgGの病原性が、脾臓組織への直接的な結合により生じるのか否かを確認する試験である。

[0097] 患者IgG又は対照IgGの皮下投与から12時間後に、マウスの脾臓の組織切片を採取し、免疫組織化学的染色により染色し、観察した。免疫組織化学的染色では、抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgG1抗体又は抗ヒトIgG4抗体を一次抗体として用い、常法により、ヒトIgG、ヒトIgG1又はヒトIgG4を染色した。

[0098] また、前記の、マウスの脾臓の組織切片を免疫蛍光染色により染色し、蛍光顕微鏡により観察した。免疫蛍光染色では、フルオロセインイソシアネートがコンジュゲートされたウサギ抗ヒトIgG抗体、ウサギ抗アミラーゼ抗体又はウサギ抗コラーゲンIV抗体を抗体として、常法により、ヒトIgG、アミラーゼ又はコラーゲンIVを染色した。

[0099] 図2Aは、対照IgG投与マウス（左列）と、患者IgG投与マウス（右列）の、IgG投与から12時間後の脾臓でのIgG（上段）、IgG1（中段）、IgG4（下段）の免疫組織化学的染色の結果を示す。観察像中のスケールバーは20μmを示す。

[0100] 図2Bは、対照IgG投与マウスと患者IgG投与マウスの、脾臓組織の

免疫蛍光染色の結果を示す。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。

[0101] 図2Bの上段の左端は、対照IgG投与マウスの脾臓組織での、免疫蛍光染色されたヒトIgGの観察像を示す。ヒトIgGはマウスの脾臓では観察されなかった。

[0102] 図2Bの上段の左から2つ目は、患者IgG投与マウスの脾臓組織での、免疫蛍光染色されたヒトIgGの観察像を示す。図2Bの上段の左から3つ目は、患者IgG投与マウスの脾臓組織での、図2Bの上段の左から2つ目と同じ観察領域における、免疫蛍光染色されたアミラーゼの観察像を示す。図2Bの上段の右端は、上記のヒトIgGの観察像と、上記のアミラーゼの観察像とを重ね合わせた像である。

[0103] 図2Bの下段の左から1つ目は、患者IgG投与マウスの脾臓組織での、免疫蛍光染色されたヒトIgGの観察像を示す。図2Bの下段の左から2つ目は、患者IgG投与マウスの脾臓組織での、図2Bの下段の左から1つ目と同じ観察領域における、免疫蛍光染色されたコラーゲンIVの観察像を示す。図2Bの下段の右端は、上記のヒトIgGの観察像と、上記のコラーゲンIVの観察像とを重ね合わせた像である。

[0104] 図2Aに示すように、患者IgG投与マウスの全てにおいて、脾臓の腺房の基部及び脾臓組織の小葉間隙においてIgG及びIgG4が蓄積していることが観察されたが、対照IgG投与マウスの脾臓ではIgG及びIgG4は観察されなかった。また、患者IgG投与マウスでは10匹中6匹においてIgG1が観察されたが、対照IgG投与マウスではIgG1は観察されなかった。

[0105] 図2Bの上段に示す通り、患者IgG投与マウスにおいて、ヒトIgGと、脾臓の腺房で発現するアミラーゼとは共存していないことが確認された。また、図2Bの下段に示す通り、患者IgG投与マウスにおいて、ヒトIgGの大部分と、基底膜又は細胞外マトリクスで発現するコラーゲンIVと共存することが確認された。

[0106] 以上の結果から、患者IgGの抗原は、基底膜又は細胞外マトリクスに含

まれる成分であると推定される。

＜2. 実験2：IgG4関連疾患のIgG1、IgG4のマウスへの投与＞

実験2では、IgG4関連疾患患者の血清からIgGのサブクラスIgG1とIgG4を精製し、健常マウス新生仔に投与し、投与後の脾臓への影響を観察した。その結果、IgG4関連疾患患者の血清から精製したIgG1とIgG4はどちらも脾臓に対して病原性を示すこと、IgG1の病原性はIgG4の病原性よりも大きいこと、IgG1とIgG4を併用して投与するとIgG1の病原性は抑制されることが確認された。

2. 1. ヒトIgGの調製

上記1. 1. 得たIgG4関連疾患の患者の血清試料及び対照血清試料から、IgG1及びIgG4を精製した。IgG1及びIgG4の精製は、それぞれ、Capture Select IgG1 (Hu) affinity matrices (191303005, Invitrogen製)、及び、Capture Select IgG4 (Hu) affinity matrices (290005, Invitrogen製)を用い、製品の指示書に沿った手順により行った。手順の概要は、ヒト血清試料を前記製品のカラムに負荷し、PBSで洗浄した。目的とするサブクラス(IgG1又はIgG4)の画分を0.1Mグリシン(pH2.8)により溶出させ、1.5M Tris(pH7.5)により中和した。溶出したサブクラス(IgG1又はIgG4)の画分を、PBS(pH7.2)により十分に洗浄しながら、Amicon Ultra (UFC805024, Millipore製)を用いた限外濾過により濃縮した。精製されたIgGサブクラスの濃度を、Human IgG1 Platinum ELISA (BMS2092, eBioscience製)、Human IgG2 Platinum ELISA (BMS2093, eBioscience製)、Human IgG3 Platinum ELISA (BMS2094, eBioscience製)、Human IgG4 Platinum ELISA (BMS2095, eBioscience製)を製品の指示書

に従って用い、定量した。サブクラスの純度を、上記と同様の手順により I g A、I g M、I g E、他の I g G サブクラス及びタンパク質の混入を求め、確認した。

[0107] I g G 4 関連疾患の患者の血清試料から得られた I g G 1、I g G 4 をそれぞれ「患者 I g G 1」、「患者 I g G 4」とした。対照血清試料から得られた I g G 1、I g G 4 をそれぞれ「対照 I g G 1」、「対照 I g G 4」とした。

2. 2. 動物試験

マウスとして B A L B / c マウスの雄の新生仔を用いた。

[0108] 各血清試料から調製された I g G 1 及び I g G 4 の一方又は両方、をマウスに皮下投与した。マウスへの投与量は、I g G 1 のみを投与する場合は I g G 1 を 10 m g / マウス体重 1 g の量で投与し、I g G 4 のみを投与する場合は I g G 4 を 1 m g / マウス体重 1 g の量で投与し、I g G 1 と I g G 4 とを投与する場合は I g G 1 を 10 m g / マウス体重 1 g で投与し I g G 4 は 1 m g / マウス体重 1 g の量で投与した。

2. 3. 結果と考察 (図 3 A ~ 図 3 C)

患者 I g G 1 及び患者 I g G 4 の一方又は両方、或いは、対照 I g G 1 及び対照 I g G 4 の一方又は両方の皮下投与から 12 時間後に、マウスの脾臓の組織切片を採取し、H & E (ヘマトキシリン & エオシン) 染色及び免疫組織化学的染色により染色し、観察した。免疫組織化学的染色では、骨髄細胞分化抗原 G r 1 に対する抗体を一次抗体として用い、G r 1 陽性細胞を染色した。免疫組織化学的染色ではまた、ヒト I g G 1 又はヒト I g G 4 に対する抗体を一次抗体として用い、マウス脾臓組織中のヒト I g G 1 又はヒト I g G 4 を染色した。

[0109] 結果を図 3 A ~ 図 3 C に示す。

[0110] 図 3 A の上段の「対照 1」は、10 名の対照のうち特定の 1 名 (対照 1) から得た対照 I g G 1 及び対照 I g G 4 の一方又は両方を投与したマウスの投与 12 時間後の脾臓の H & E 染色の観察像である。観察像中のスケールバ

ーは20 μ mを示す。

[0111] 図3Aの中段及び下段の「患者9」は、10名のIgG4関連疾患患者のうち特定の1名（患者9）から得た患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の脾臓の、H&E染色の観察像（中段）、及び、Gr1の免疫組織化学的染色の観察像（下段）である。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。

[0112] 図3Bは、対照IgG1及び対照IgG4の一方又は両方を投与したマウス（左）と、患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウス（右）の、投与から12時間後の脾臓の壊死又は出血の病理組織的グレードと、Gr1陽性細胞数を示す（* $p < 0.05$: paired Student's testによる）。この結果、患者IgG1及び患者IgG4はどちらも脾臓に対して病原性を示すこと、患者IgG1の病原性は患者IgG4の病原性よりも大きいこと、患者IgG1と患者IgG4を併用して投与すると患者IgG1の病原性は抑制されることが確認された。

[0113] 図3Cは、10名のIgG4関連疾患患者のうち特定の1名（患者1）から得た患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスの投与12時間後の脾臓の、ヒトIgG1又はヒトIgG4の免疫組織化学的染色の観察像である。観察像中のスケールバーは20 μ mを示す。患者IgG1及び患者IgG4の両方を投与したマウスでの脾臓のヒトIgG1染色強度（図3C上右）は、患者IgG1のみを投与したマウスでの脾臓のヒトIgG1染色強度（図3C上左）よりも小さいことが確認された。一方、患者IgG1及び患者IgG4の両方を投与したマウスでの脾臓のヒトIgG4染色強度（図3C下右）は、患者IgG4のみを投与したマウスでの脾臓のヒトIgG4染色強度（図3C上中）と同程度であった。

[0114] 図3A及び図3Bからわかるように、患者IgG1及び患者IgG4の一方又は両方を投与したマウスでは、脾臓において、浮腫形成、腺房壊死、出血及びGr1陽性多形核白血球の浸潤が観察されたのに対して、対照IgG1及び対照IgG4の一方又は両方を投与したマウスでは脾臓に異常は見ら

れなかった。

[0115] IgG1及びIgG4はともに病原性を有し、IgG1はIgG4よりも顕著な病原性を有する。しかし、IgG1の病原性は、IgG4を同時に投与すると顕著に抑制されたことから、IgG4はIgG1の働きを阻害することが示唆される(図3B)。実際に、IgG1のみを投与したマウスでのIgG1の染色量は、IgG1とIgG4とを併用して投与した場合よりも顕著に多い(図3C)。一方、IgG4のみを投与したマウスでのIgG4の染色量は、IgG1とIgG4とを併用して投与した場合と同程度であった(図3C)。このことから、IgG1とIgG4とは膵臓組織へ競合的に結合すること、及び、IgG4の膵臓組織への結合親和性は、IgG1よりも高いことが分かる。

<3. 実験3：AIP患者の膵臓の観察>

上記の実験1及び2から、IgG4関連疾患の患者のIgG1及びIgG4が、膵臓組織に結合して病原性を示すことが判明した。そこで実験3では、自己免疫性膵炎(AIP)患者の膵臓において、IgG4が蓄積しているかどうかを観察した。観察では、H&E染色によりヒト膵臓組織を染色し、病変がある部分と、病変のない部分を判別した、また、免疫組織化学的染色及び免疫蛍光染色によりヒト膵臓組織中のIgG4、コラーゲンIV、アミラーゼを可視化した。免疫組織化学的染色及び免疫蛍光染色の手順は実験2と同様である。

[0116] 図4A上段左は、AIP病変のある部位(左側)と、病変のない部位(右側)との境界部分から採取した、AIP患者の膵臓組織切片をH&E染色した観察像を示す。図4A上段右は、同様の膵臓組織切片の、IgG4に対する免疫組織化学的染色の観察像を示す。スケールバーは200µmを示す。

[0117] 図4A下段左は、図4A上段右の観察像のうち、病変のある腺房の部分を拡大した観察像である。図4A下段中は、図4A上段右の観察像のうち、病変のある小葉間隙の部分を拡大した観察像である。図4A下段右は、図4A上段右の観察像のうち、病変のない正常な腺房の部分を拡大した観察像であ

る。図4 A下段の各観察像においてスケールバーは20 μm を示す。病変のある膵臓組織では、IgG4陽性形質細胞が染色されていることに加えて、腺房の基部及び小葉間隙において、IgG4が線状に染色された。一方、病変のない膵臓組織では、このような染色は見られなかった。

[0118] 図4 Bの各像は、AIP患者の膵臓での病変のある腺房を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4 Bの各像ではスケールバーは20 μm を示す。

[0119] 図4 B上段左は、AIP患者の膵臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたIgG4の観察像を示す。図4 B上段中は、図4 B上段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたアミラーゼの観察像を示す。図4 B上段右は、図4 B上段左のIgG4の観察像と、図4 B上段中のアミラーゼの観察像とを重ね合わせた像である。この結果から、IgG4はアミラーゼとは共存せず異なる部位に存在することが分かる。

[0120] 図4 B下段左は、AIP患者の膵臓での病変のある腺房の、免疫蛍光染色されたIgG4の観察像を示す。図4 B下段中は、図4 B下段左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンIVの観察像を示す。図4 B下段右は、図4 B下段左のIgG4の観察像と、図4 B下段中のコラーゲンIVの観察像とを重ね合わせた像である。図4 B下段右では、赤色のIgG4と、緑色のコラーゲンIVとが重複した部分が、黄色で示される。この結果から、IgG4はコラーゲンIVと共に腺房の基部に存在することが分かる。

[0121] 図4 Cの各像は、AIP患者の膵臓での病変のある小葉間隙を免疫蛍光染色した観察像を示す。図4 Cの各像ではスケールバーは20 μm を示す。

[0122] 図4 C左は、AIP患者の膵臓での病変のある小葉間隙の、免疫蛍光染色されたIgG4の観察像を示す。図4 C中は、図4 C左と同じ観察領域の、免疫蛍光染色されたコラーゲンIVの観察像を示す。図4 C右は、図4 C左のIgG4の観察像と、図4 C中のコラーゲンIVの観察像とを重ね合わせた像である。図4 C右では、赤色のIgG4と、緑色のコラーゲンIVとが重複した部分が、黄色で示される。この結果から、IgG4は、コラーゲンIVを発現する細胞外マトリクスに存在することが分かる。

[0123] データは示さないが、観察した全てのA I P患者からの脾臓組織が同様の傾向を示した。

[0124] 一方、データは示さないが、健常者の脾臓及び慢性脾炎患者の脾臓ではI g G 4は染色されなかった。

<4. 実験4：A I P患者が有する抗体の、抗原の特定>

上記実験1～3から、A I P患者では、脾臓組織での細胞外マトリクスに特異的に結合するI g G 1及びI g G 4が増加し、それが脾臓の病変を誘導していることが推定された。

[0125] そこで本発明者らは、A I P患者の血清に含まれる抗体は、脾臓で発現している細胞外マトリクスタンパク質を抗原として認識していると推測した。本発明者らは、抗原を特定するために、文献から既知の、脾臓で発現している細胞外マトリクスタンパク質を、抗原候補として、個別に固相に固定し、A I P患者の血清中に、前記細胞外マトリクスタンパク質に結合する抗体が含まれるか否かを、E L I S A (E n z y m e - L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a y) 法により確認した。E L I S A法では、A I P患者の血清中に含まれ得る、固相に固定された抗原候補と結合するヒトI g Gを一次抗体とし、H R P (セイヨウワサビペルオキシダーゼ) により標識されたウサギ抗ヒトI g Gポリクローナル抗体を二次抗体とした。

4. 1. 抗原の候補

抗原候補として、脾臓で発現している細胞外マトリクスタンパク質として既知の以下のタンパク質を試験した。

[0126] ヒトラミニン-511-E8 (892012, 株式会社ニッピ製) (ラミニン-511活性断片)

ヒトコラーゲンIV (a b 7 5 3 6, a b c a m)

ヒトフィブロネクチン

G F P (緑色蛍光タンパク質) (MB-0752, VECTOR LABORATORIES)

ヒトN o t c h 1 (a b 6 8 5 8 0, a b c a m)

ヒトAnnexin A2 (ab93005, abcam)

ヒトSDF2L1 (TP313102, OriGene Technologies) ヒトBile salt-activated lipase (ab167963, abcam)

4. 2. 血清試料

AIPと診断された9名の患者から血清試料を取得した。

[0127] 対照血清試料として、5名の健常者からの血清試料と、5名の疾患患者（3名の膵癌患者、2名の原発性硬化性胆管炎患者）からの血清試料を取得した。

4. 3. 手順

以下の試験では、特に明示しない場合は、ELISA Starter Accessory Kit (E101, Bethyl Laboratories) を用いた。

[0128] ELISA用コーティングバッファー (ELISA Coating Buffer)、ELISA用洗浄溶液 (ELISA Wash Solution)、ELISA用ブロッキングバッファー (ELISA Blocking Buffer)、コンジュゲート希釈剤 (Conjugate Diluent) は全て前記キットの指示書に従い調製した。

[0129] 全ての工程は室温で行った。

4. 3. 1. 抗原候補によるコーティング

(1) 上記の抗原候補の1つを前記キットのELISA用コーティングバッファーに希釈して2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度溶液とした。この溶液を、前記キットのマイクロウェルプレートに、1つのウェルあたり100 μL となるように加えた。

[0130] (2) 上記のマイクロウェルプレートを60分間インキュベートした。

[0131] (3) インキュベート後に各ウェルから溶液を吸引除去した。

[0132] (4) 各ウェルを前記キットのELISA用洗浄溶液により洗浄した。具体的には、各ウェルに前記ELISA用洗浄溶液を満たし、次いで、前記E

ELISA用洗浄溶液を吸引除去する洗浄操作を3回行った。

4. 3. 2. ブロッキング

(1) 前記キットのELISA用ブロッキングバッファー200 μ lを各ウェルに添加した。

[0133] (2) 30分間インキュベートした。

[0134] (3) インキュベート後、前記ELISA用ブロッキングバッファーを除去した後、各ウェルを3回洗浄した。

4. 3. 3. 一次抗体

(1) 前記AIP患者血清試料 ($n=9$) 又は前記対照血清試料 ($n=10$) を、前記キットのコンジュゲート希釈剤 (Conjugate Diluent) により1:50の割合で希釈した。

[0135] (2) 前記希釈により得られた血清 (一次抗体) 希釈液を、ブロッキング後のマイクロウェルプレートの各ウェルに100 μ l加えた。

[0136] (3) 60分間インキュベートした。

[0137] (4) インキュベート後、前記血清希釈液を除去し、各ウェルを3回洗浄した。

4. 3. 4. HRPコンジュゲート二次抗体

(1) HRP (セイヨウワサビペルオキシダーゼ) とコンジュゲートされた二次抗体 (abcam6759, ウサギ抗ヒトIgG H&L (HRP), ポリクローナル) を、前記キットのコンジュゲート希釈剤 (Conjugate Diluent) により1:2000の割合で希釈した。

[0138] (2) 前記希釈により得られた二次抗体希釈液を、血清 (一次抗体) を接触させたマイクロウェルプレートの各ウェルに100 μ l加えた。

[0139] (3) 60分間インキュベートした。

[0140] (4) インキュベート後、前記二次抗体希釈液を除去し、各ウェルを5回洗浄した。

4. 3. 5. 酵素基質反応

(1) 製造元の推奨条件に従ってTMB (3, 3', 5, 5' -テトラメ

チルベンジジン) 溶液を調製した。

[0141] (2) 前記 TMB 溶液を、二次抗体を接触させたマイクロウェルプレートの各ウェルに 100 μ l 加えた。

[0142] (3) 5 分間～30 分間インキュベートし、HRP による TMB の酸化反応を行った。

[0143] (4) 前記酸化反応後に、0.18 M H_2SO_4 100 μ l を、各ウェルに加えた。

[0144] (5) マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の波長にて、前記酸化反応の生成物による呈色を測定した。

4. 4. 結果と考察

結果を図 5 A (抗ヒトラミニン-511 活性断片抗体)、図 5 B (抗ヒトコラーゲン I V 抗体)、図 5 C (抗ヒトフィブロネクチン抗体)、図 5 D (抗 GFP 抗体) に示す。ヒトラミニン-511 活性断片を抗原とした試験では、試験する AIP 患者血清試料及び対照血清試料の母数を更に増やし、図 5 A に示すように、AIP 患者血清試料では $n=40$ 、対照血清試料では $n=40$ とした。同様に、ヒトコラーゲン I V を抗原とした試験では、試験する AIP 患者血清試料及び対照血清試料の母数を更に増やし、図 5 B に示すように、AIP 患者血清試料では $n=40$ 、対照血清試料では $n=40$ とした。

[0145] 図 5 A～図 5 D において縦軸は、各抗原候補に対する抗体の血清中濃度に比例する 450 nm での吸光度の相対値を示す。カットオフ値は、前記対照血清試料の、各抗原候補に対する抗体の血清中濃度の平均値に、標準偏差 (SD) の 2 倍の値を加えた値である。抗原候補に対する抗体の血清中濃度が、前記カットオフ値よりも高い場合に、抗原候補に対する抗体に関し陽性であると判断することができる。

[0146] 図 5 A に示すように、抗ヒトラミニン-511 抗体に関して、AIP 患者血清では 40 例中 20 例で陽性であったのに対し、対照血清では 40 例中に陽性例はなかった。このことから、抗ヒトラミニン-511 抗体の血清中濃

度を指標として、A I Pに罹患していることを検出できることが裏付けられた。また、抗ヒトラミニン-511抗体が陽性のA I P患者血清のうち1例では、血中I g G濃度及び血中I g G4濃度については、対照血清と実質的な差が無く正常値であったことから、抗ヒトラミニン-511抗体の血清中濃度を指標としてA I Pを判別する方法は、血中I g G濃度及び血中I g G4濃度を指標とする方法よりも高感度でA I Pを判別することができる可能性がある。

[0147] 一方、図5 B、5 C及び5 Dに示す結果から、抗ヒトコラーゲンI V抗体、抗ヒトフィブロネクチン抗体、及び、抗G F P抗体に関しては、A I P患者血清と対照血清とで血清中濃度に差異は認められず、A I Pの判別指標として有用でないことが判明した。

[0148] 図示しないが、抗ヒトN o t c h 1抗体、抗ヒトA n n e x i n A 2抗体、抗ヒトS D F 2 L 1抗体、抗ヒトB i l e s a l t - a c t i v a t e d l i p a s e抗体に関しても、A I P患者血清と対照血清とで血清中濃度に明確な差異は認められなかった。

<5. 実験5：ラミニン-511によるマウスの免疫>

上記の実験4の結果は、ヒトラミニン-511に対する抗体がA I Pの原因物質であると推定される。そこでこの推定を裏付けるべく、実験5では、ヒトラミニン-511によりマウスを免疫し、マウスの脾臓での病変の有無を確認した。

5. 1. 手順

8週齢の雄マウス（B 6マウス、及び、B A L B / cマウス）を麻酔した。P B Sと完全フロイントアジュバント（C F A）（2 6 3 8 1 0, D i f f c o製）との等量混合液1 0 0 μ l 中で乳化させた、1 2 0 μ g のラミニン-511-E 8（ヒトラミニン-511活性断片）（8 9 2 0 1 2, 株式会社ニッピ製）で、実験を開始した日（第0日）に、麻酔された前記マウスの両方の後足蹠に皮下投与により投与して免疫し、第28日及び第56日に、第0日の免疫に用いたのと同じ量の、C F A中のラミニン-511-E 8に

よりブーストを行った。

[0149] 対照群では、同じ体積の、CFAにより乳化させた $120\mu\text{g}$ のオボアルブミン（OVA）を、ラミニン-511-E8の前記乳化液に代えて用いる以外は同様の手順及びスケジュールでマウスを処理した。

[0150] 3回目の免疫から28日後に試験を終了した。試料血清は、最初の投与の前にマウスから採取した血液の血清（免疫前血清）と、屠殺後に採取した血液の血清である。試料血清は分析まで -80°C に保存した。また、3回目の免疫から28日後にマウスの脾臓の組織切片を採取し、H&E染色により染色し観察した。

[0151] 上記の操作を、ヒトラミニン-511活性断片を投与した試験群、及び、対照群のそれぞれについて $n=3$ となるよう実施した。

5. 2. 結果と考察

H&E染色により染色した脾臓の組織切片の観察像を図6に示す。図6左が対照群の観察像、図6右がヒトラミニン-511活性断片（i511ラミニン）により免疫した試験群の観察像である。ヒトラミニン-511活性断片により免疫した試験群のマウスでは脾臓に細胞浸潤の病変が形成されたのに対して、対照群のマウスでは脾臓に異常は見られなかった。ヒトラミニン-511活性断片により免疫した試験群のマウスでも、脾臓以外の部位には異常は見られなかった。図6に示す観察像を得たマウス個体以外のマウス個体においても、同様の傾向であった。

<6. 実験6：IgG4関連腎疾患の患者が有する抗ラミニン抗体の分析>

実験4に記載のAIP患者からの血清試料又は対照血清試料を用い、抗原候補としてヒトラミニン-521を用いて、実験4に記載の手順により抗ヒトラミニン-521抗体の血清中濃度を求めた。

[0152] ヒトラミニン-521としてHuman recombinant laminin 521（BLA-LN521-02、Bio Lamina）を用いた。

[0153] 結果を図7に示す。

[0154] 9例のA I P患者のうち、I g G 4関連腎疾患を持つのは1例のみであった。この1例のI g G 4関連腎疾患を持つA I P患者からの血清試料のみが、抗ヒトラミニン-521抗体を有意に高濃度で含んでいた。

[0155] この結果から、I g G 4関連腎疾患に関しては、抗ヒトラミニン-521抗体の血清中濃度が判別の指標として有効である可能性が示唆された。

<7. 実験7：I g G 4関連腎疾患患者I g Gのマウスへの投与>

実験6において抗ヒトラミニン-521抗体陽性であることが確認されたI g G 4関連腎疾患患者の血清から、実験1と同様の手順でI g Gを調製した。このI g Gを「I g G 4関連腎疾患患者I g G」とした。

[0156] 一方、実験1で調製した対照I g Gを用意した。

[0157] また、腎疾患を有していないI g G 4関連疾患患者の血清から、実験1と同様の手順でI g Gを調製した。このI g Gを「腎疾患のないI g G 4関連疾患患者I g G」とした。

[0158] 上記のI g G 4関連腎疾患患者I g G、対照I g G、及び、腎疾患のないI g G 4関連疾患患者I g Gを、それぞれ、実験1と同様の手順でBALB/cマウスの雄の新生仔に皮下投与した。

[0159] 投与から12時間後に、実験1と同様の手順で、マウスの腎臓を採取し免疫組織化学的染色によりヒトI g G 4を染色し観察した。

[0160] 結果を図8に示す。

[0161] 図8左側にI g G 4関連腎疾患患者I g Gを皮下投与したマウスの腎臓の観察像を示し、図8右側に対照I g Gを皮下投与したマウスの腎臓のヒトI g G 4染色観察像を示す。上段は、腎臓全体のヒトI g G 4染色観察像を示し、下段は糸状体のヒトI g G 4染色観察像を示す。図示しないが、腎疾患のないI g G 4関連疾患患者I g Gを皮下投与した場合の腎臓の観察像は、対照I g Gと同様であった。

[0162] 図8の結果から、I g G 4関連腎疾患患者I g Gをマウスに投与した場合、腎臓の糸状体の間質にヒトI g G 4が結合するのに対して、対照I g Gをマウスに投与した場合にはそのような状態は生じないことが分かる。

[0163] 一方、ラミニン β 2鎖の遺伝子異常によりP i e r s o n症候群が生じることが知られている。P i e r s o n症候群は、腎不全（メザンギウム増殖性糸状球腎炎）、神経障害（筋力低下）、縮腫を含む。上記のI g G 4関連腎疾患患者I g Gを取得した、抗ヒトラミニン-5 1 1抗体陽性のI g G 4関連腎疾患患者は、腎生検からメザンギウム増殖性糸状球腎炎であることが確認されており、筋力低下も確認されていることから、P i e r s o n症候群と症状、病理が合致する。従って、このI g G 4関連腎疾患患者は、ラミニン β 2鎖に対する自己抗体を有しており、それが原因でI g G 4関連腎疾患の症状が現れていると推測される。

<8. 実験8：A I P患者の血清中の抗ラミニン5 1 1-E 8自己抗体の測定>

8. 1. 試料

I g G 4-R D 2 0 1 1の診断基準又はA I Pの診断基準を満たす5 1名の治療中のA I P患者からの血清試料を取得した。2 5名の健常者及び8 6名の疾患患者（4 9名の、組織学的に確認された癌患者、及び、3 9名の、癌以外の疾患患者）から、対照の血清試料を取得した。A I P患者5 1名のうち1 0名からの血清試料と、対照者1 1 2名のうち1 0名からの血清試料をそれぞれトレーニング群として用い、残りをバリデーション群として用いた。全ての血清試料は- 8 0℃にて保存した。

8. 2. E L I S Aの手順

抗原の候補物質であるヒトラミニン5 1 1-E 8として、ヒト由来リコンビナントラミニン-5 1 1-E 8（8 9 2 0 1 2，株式会社ニッピ製）を用いた。ラミニン5 1 1-E 8は、ラミニンの α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖のC末端領域がヘテロ三量体を形成した活性フラグメントであり、インテグリンへの結合能力を有する。ヒトラミニン-5 1 1-E 8に対する血清抗体を、E L I S A S t a r t e r A c c e s s o r y K i t（E 1 0 1，B e t h y l L a b o r a t o r i e s）を該キットの指示の通り用いるE L I S A（E n z y m e - L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a

y) により定量した。定量方法の概要は以下の通りである。

[0164] ヒトラミニン-511-E8を前記キットのELISA用コーティングバッファーに希釈して $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度溶液とし、この溶液を、前記キットのマイクロタイタープレートに、1つのウェルあたり $100\mu\text{L}$ となるように加え、室温で1時間インキュベートしてコーティングした。0.05% Tween 20含有Tris緩衝生理食塩水（洗浄液）で前記プレートを5回洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン含有Tris緩衝生理食塩水で前記プレートをコーティングし、 $100\mu\text{L}$ の、1:20希釈血清で室温にて30分間インキュベートした。前記洗浄液で5回洗浄した後、前記プレートを、 $100\mu\text{L}$ の、HRP（セイヨウワサビペルオキシダーゼ）とコンジュゲートされたヤギ抗ヒトIgG抗体（1:4000; ab6759, Abcam）と、室温にて1時間インキュベートした。前記洗浄液で3回洗浄した後、前記プレートをTMB（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン）により3分間インキュベートし、 450nm での吸光度を測定して結合物を定量した。ヒトラミニン-511-E8でコーティングしていない対照ウェルを、各血清試料についてのELISAにおけるネガティブコントロールとして用いた。各アッセイは $n=3$ で行い、ヒトラミニン-511-E8でコーティングしたウェルでの吸光度の平均値から、対照ウェルでの吸光度の平均値を引いた値を、血清抗体のヒトラミニン-511-E8への特異的結合量、すなわち、血清中の抗ヒトラミニン-511-E8 IgG抗体レベルとした。

8. 3. 結果

トレーニング群である10名のAIP患者、及び、10名の対照（膵臓癌患者3名、原発性硬化性胆管炎患者2名、健常者5名）からの血清試料の、抗ヒトラミニン-511-E8 IgG抗体レベルの測定結果を図9Aに示す。カットオフ値（光学密度単位[OD]）は、前記対照からの血清試料での抗ヒトラミニン-511-E8 IgG抗体レベルの平均値に、標準偏差（SD）の3倍の値を加えた値である。10名のAIP患者のうち6名から

の血清試料が、ヒトラミニン-511-E8に対するIgG抗体が陽性であったのに対して、10名の対照者の全員がヒトラミニン-511-E8に対するIgG抗体が陰性であった。

[0165] バリデーション群の41名のAIP患者、及び、102名の対照（健常者20名、AIP以外の疾患患者82名）からの血清試料の、抗ヒトラミニン-511-E8 IgG抗体レベルの測定結果を図9Bに示す。カットオフ値（光学密度単位[OD]）は、前記対照からの血清試料での抗ヒトラミニン-511-E8 IgG抗体レベルの平均値に、標準偏差（SD）の3倍の値を加えた値である。41名のAIP患者のうち20名からの血清試料が、抗ヒトラミニン-511-E8 IgG抗体を有していた（陽性であった）のに対して、102名の対照者のうち2名のみが、抗ヒトラミニン-511-E8 IgG抗体陽性であった。

[0166] 上記のトレーニング群及びバリデーション群の測定結果をまとめると、ヒトラミニン-511-E8に対するIgG抗体陽性は、AIP患者血清では26/51（51.0%）であったのに対して、対照血清では2/112（1.8%）であった（ $P < 0.001$ ）。

[0167] 51名のAIP患者の血清試料の測定結果、及び、被験者の臨床像を下記の表4にまとめた。

[0168]

[表4]

	抗ラミニン 511 抗体 陽性 AIP 患者	抗ラミニン 511 抗体 陰性 AIP 患者	P 値
症例数	26	25	
性 (男性/女性)	19/7	21/4	0.34
年齢	67	63	0.53
血清 IgG (mg/dl)	1918	1760	0.32
血清 IgG4 (mg/dl)	447	408	0.8
びまん性/限局性	22/4	16/9	0.091
頭部病変 (%)	2 (8)	18 (72)	<0.0001
悪性腫瘍 (%)	0 (0)	8 (32)	0.0017
糖尿病 (%)	11 (44)	10 (40)	0.87
低補体血症 (%)	3 (12)	5 (20)	0.41
アレルギー (%)	3 (12)	12 (48)	0.0043

[0169] 抗ヒトラミニン-511-E8抗体陽性のAIP患者では、陰性のAIP患者と比較して、悪性腫瘍及びアレルギー疾患の頻度が有意に低いことが判明した。

[0170] 抗ヒトラミニン-511-E8抗体陽性のAIP患者26名の全員が悪性腫瘍を合併していなかったのに対して、陰性のAIP患者25名中8名が悪性腫瘍を合併していた。

[0171] 抗ヒトラミニン-511-E8抗体陽性のAIP患者26名中3名のみがアレルギー疾患を合併していたのに対して、陰性のAIP患者25名中12名がアレルギー疾患を合併していた。

[0172] また、造影CTによる脾画像の比較から、抗ヒトラミニン-511-E8抗体陽性のAIP患者では、脾臓の頭部病変を示す患者の割合が、陰性のAIP患者と比較して有意に低いことが判明した。

<9. 実験9：抗ラミニン511-E8自己抗体陰性のAIP患者における抗インテグリン自己抗体の測定>

脾臓においてラミニン511は、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 又はインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ と結合することが知られている。本発明者らは、AIP患者では、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 又はインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ も自己抗原となるという仮

説を立てた。

9. 1. 試料

実験8と同じ、51名のAIP患者及び112名の対照からの血清試料を用いた。

9. 2. ELISA

抗原候補物質としてインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 又はインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ を用いた以外は、実験8と同じ手順で、ELISAにより、血清試料中の抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体及び抗インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ 抗体を定量した。

[0173] インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ として、リコンビナントヒトインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ (R&D Systems、米国ミネソタ州、製品番号7809-A6)を用いた。

[0174] インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ として、リコンビナントヒトインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ (R&D Systems、米国ミネソタ州、製品番号2840-A3)を用いた。

9. 3. 結果

26名の抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者、25名の抗ラミニン511-E8抗体陰性AIP患者、及び、112名の対照からの血清試料での、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ IgG抗体レベルの測定結果を図10に、抗インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ IgG抗体レベルの測定結果を図11に、それぞれ示す。カットオフ値（光学密度単位 [OD]）は、前記対照からの血清試料での抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ IgG抗体レベル又は抗インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ IgG抗体レベルの平均値に、標準偏差（SD）の3倍の値を加えた値である。

[0175] 図10に示す通り、26名の抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者、及び、112名の対照は、全員が、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ IgG抗体陰性であった。25名の抗ラミニン511-E8抗体陰性AIP患者のうち4名が、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ IgG抗体陽性であった。

[0176] 図11に示す通り、51名のAIP患者及び112名の対照は、全て、抗

インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ IgG抗体陰性であった。

[0177] 以上の結果は、ラミニン511に加えてインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ が、一部のAIP患者において自己抗原であることを示す。このことは、ラミニン511とインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ との結合が、AIPでの自己抗体の標的であることを示唆する。

[0178] 51名のAIP患者を、26名の抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者（抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体は陰性）と、4名の抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陽性AIP患者（抗ラミニン511-E8抗体は陰性）と、21名の抗ラミニン511-E8抗体陰性抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陰性AIP患者に分類し、各群のAIP患者の臨床像を下記の表5にまとめた。なお、抗ラミニン511-E8抗体と抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体が両方とも陽性の被験者はいなかった。

[0179] [表5]

	抗ラミニン 511-E8 抗体陽性 AIP 患者	抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陽性 AIP 患者	両者陰性 AIP 患者
症例数	26	4	21
性 (男性/女性)	19/7	3/1	18/3
年齢	67	61	66
血清 IgG (mg/dl)	1918	1459	1919
血清 IgG4 (mg/dl)	447	297	469
びまん性/限局性	22/4	1/3	15/6
頭部病変 (%)	2 (8)	0 (0)	18 (86)
悪性腫瘍 (%)	0 (0)	2 (50)	6 (29)
糖尿病 (%)	11 (44)	0 (27)	10 (48)
低補体血症 (%)	3 (12)	0 (0)	5 (24)
アレルギー (%)	3 (12)	2 (50)	10 (48)

[0180] 26名の抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者は、悪性腫瘍を合併している者が皆無であった。一方、4名の抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陰性AIP患者のうち2名（50%）が悪性腫瘍を合併していた。また、21名の抗ラミニン511-E8抗体陰性抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陰性AIP患者のうち6名（29%）が悪性腫瘍を合併していた。このことから、AIP

P患者において、血清中の抗ラミニン511-E8抗体レベル及び抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体レベルを指標として、悪性腫瘍の発症の可能性を予測することが可能である。例えば、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陽性のAIP患者は、悪性腫瘍を合併する可能性が高いため、全身をスクリーニングする必要性が高いと言える。

<10. 実験10：脾画像の比較>

図12上段は、抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者の造影CTによる脾画像である。図12下段は、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陽性AIP患者の造影CTによる脾画像である。各画像中の矢印は病変箇所を指す。

[0181] 図12上段に示すように、抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者の脾画像では、脾臓の体部及び尾部に病変が認められた。図12下段に示すように、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陽性AIP患者の脾画像では、脾臓の体部に病変が認められ、これは脾癌患者の脾画像と類似しており、抗インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 抗体陰性AIP患者47例では同様の脾画像は皆無であった。

<11. 実験11：抗ラミニン511-E8抗体力価の治療による低減>

11. 1. 手順

実験8で抗ラミニン511-E8抗体陽性であった26名のAIP患者のうち5名について、ステロイドを用いたAIP治療の前後での、血清中の抗ラミニン511-E8抗体レベルを調べた。抗体レベルの測定は実験8と同様の方法で行った。

[0182] 各患者はAIPと診断された後、ステロイドの1種であるプレドニゾンの経口投与による治療を6～8カ月間にわたり受けた。

11. 2. 結果

5名の抗ラミニン511-E8抗体陽性AIP患者の、ステロイド治療前後での、血清中の抗ラミニン511-E8抗体レベルを図13に示す。ステロイド治療により各AIP患者の血清中の抗ラミニン511-E8抗体力価はカットオフ値未満に低減された。また、図示しないが、各AIP患者の血清中の抗ラミニン511-E8抗体力価の低減に伴い脾画像所見も改善した。

。このことは、血清中の抗ラミニン511-E8抗体は、AIP治療の効果の指標としても有用であることを裏付ける。

[0183] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] I g G 4 関連疾患の検査方法であって、
 I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、ラミニンと免疫学的に
 反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び／又は
 I g G 4 関連疾患の指標として、検体中の、インテグリンと免疫学
 的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程
 を含む方法。
- [請求項2] 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、
 抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン-511 と
 免疫学的に反応する抗体である、請求項1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、
 抗インテグリン抗体検出工程における前記抗体が、インテグリン α
 6 β 1 と免疫学的に反応する抗体である、請求項1 又は2 に記載の方
 法。
- [請求項4] 前記 I g G 4 関連疾患が、I g G 4 関連腎疾患であり、
 抗ラミニン抗体検出工程における前記抗体が、ラミニン-521 と
 免疫学的に反応する抗体である、請求項1 に記載の方法。
- [請求項5] 前記抗ラミニン抗体検出工程が、ラミニンを抗原として用いて前記
 抗体を検出することを含む、請求項1 ～4 のいずれか1 項に記載の方
 法。
- [請求項6] 自己免疫性膵炎の検査方法であって、
 自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、ラミニン-5
 11 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、
 及び
 自己免疫性膵炎の指標として、検体の血液試料中の、インテグリン
 α 6 β 1 と免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検
 出工程
 を含む方法。

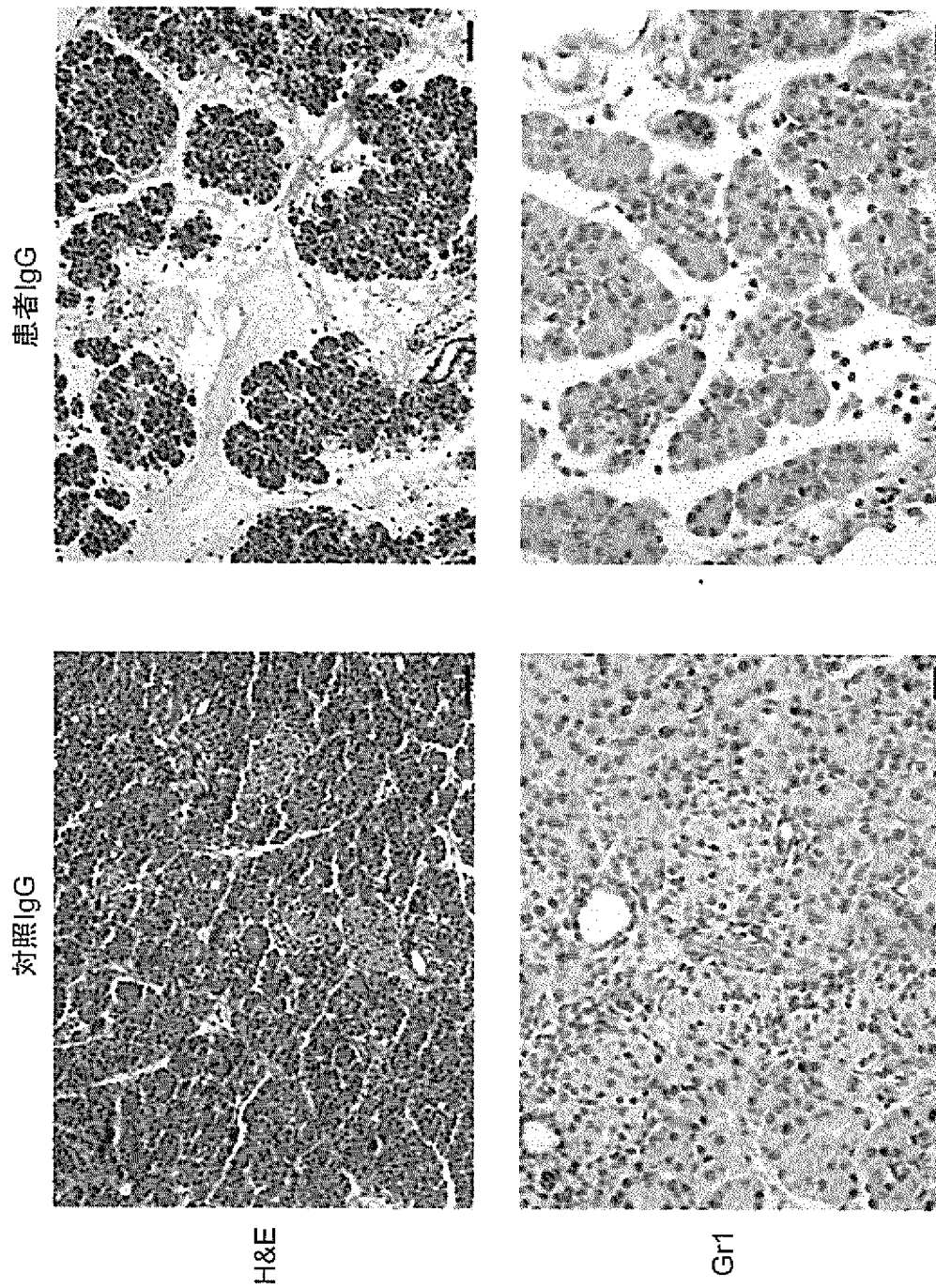
- [請求項7] ラミニンを含む、 I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬。
- [請求項8] 前記 I g G 4 関連疾患が、自己免疫性膵炎であり、
前記ラミニンが、ラミニン-5 1 1 である、請求項 7 に記載の検査試薬。
- [請求項9] 前記 I g G 4 関連疾患が、 I g G 4 関連腎疾患であり、
前記ラミニンが、ラミニン-5 2 1 である、請求項 7 に記載の検査試薬。
- [請求項10] 前記ラミニンを、固相に固定された形態で含む、請求項 7 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の検査試薬。
- [請求項11] インテグリンを含む、 I g G 4 関連疾患を検査するための検査試薬。
- [請求項12] ラミニン-5 1 1 とインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ とを固相に固定された形態で含む、自己免疫性膵炎の検査試薬。
- [請求項13] I g G 4 関連疾患に対する治療の効果を評価する方法であって、
I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程、及び／又は、
I g G 4 関連疾患に対する治療が施された被検動物から得た検体中の、インテグリンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗インテグリン抗体検出工程
を含む方法。
- [請求項14] I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質をスクリーニングする方法であって、
試験物質を作用させた動物から得た検体中の、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を検出する抗ラミニン抗体検出工程と、
前記試験物質を作用させたことにより前記検体中の前記抗体が減少した場合に、前記試験物質を、 I g G 4 関連疾患の治療薬の候補物質として選抜する選抜工程と

を含む方法。

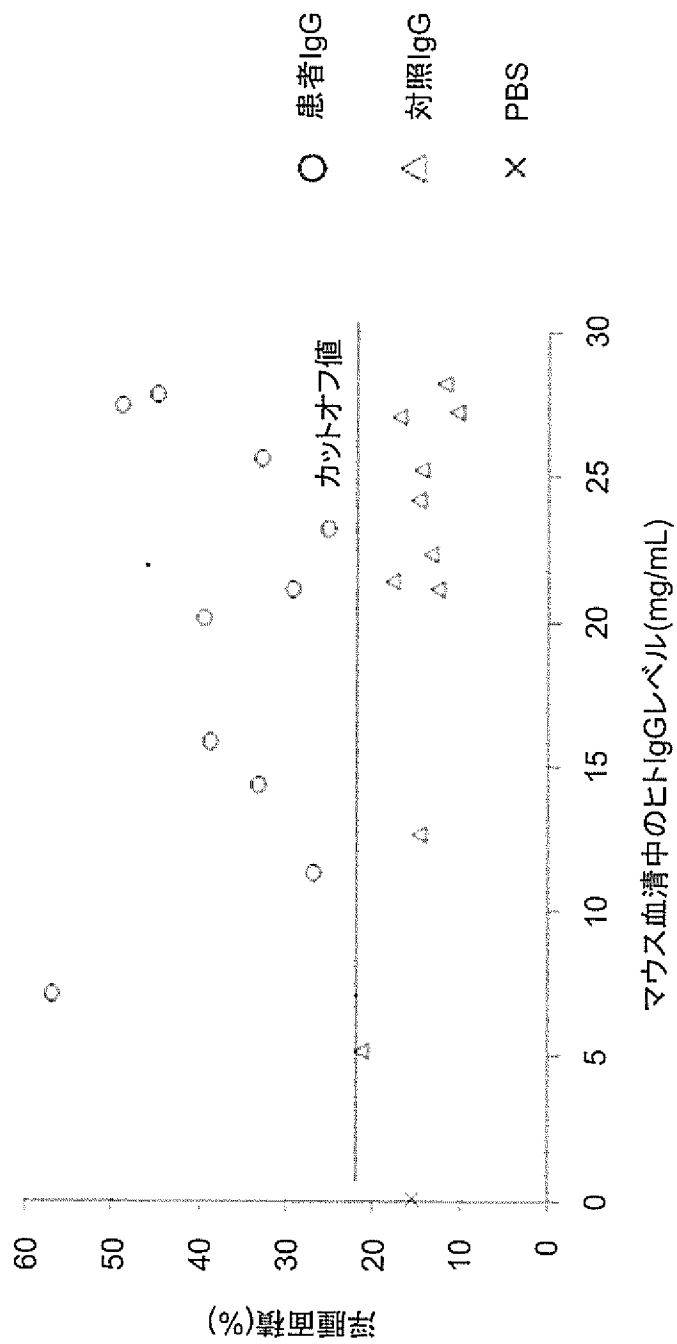
[請求項15]

I g G 4 関連疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、
非ヒト動物に、ラミニンと免疫学的に反応する抗体を投与する抗ラ
ミニン抗体投与工程、及び
非ヒト動物を、ラミニンを抗原として免疫するラミニン免疫工程
のうち少なくとも一方を含む方法。

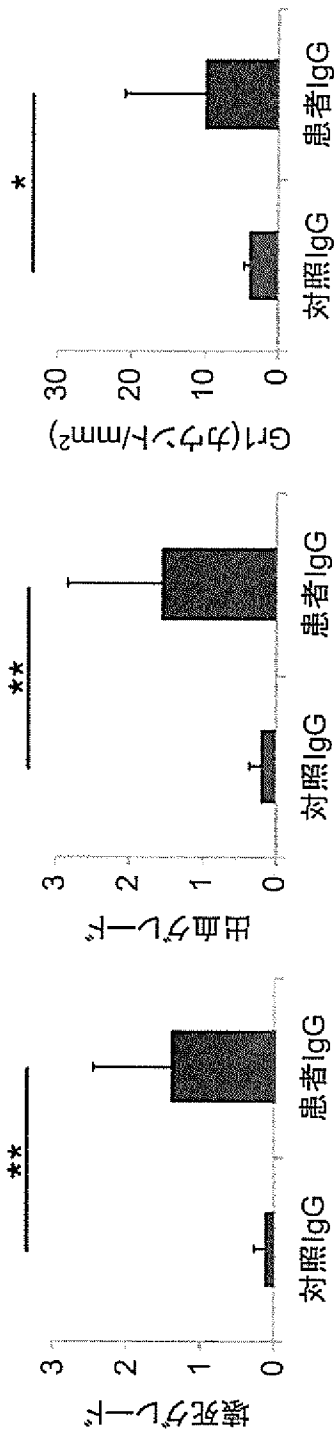
[図1A]



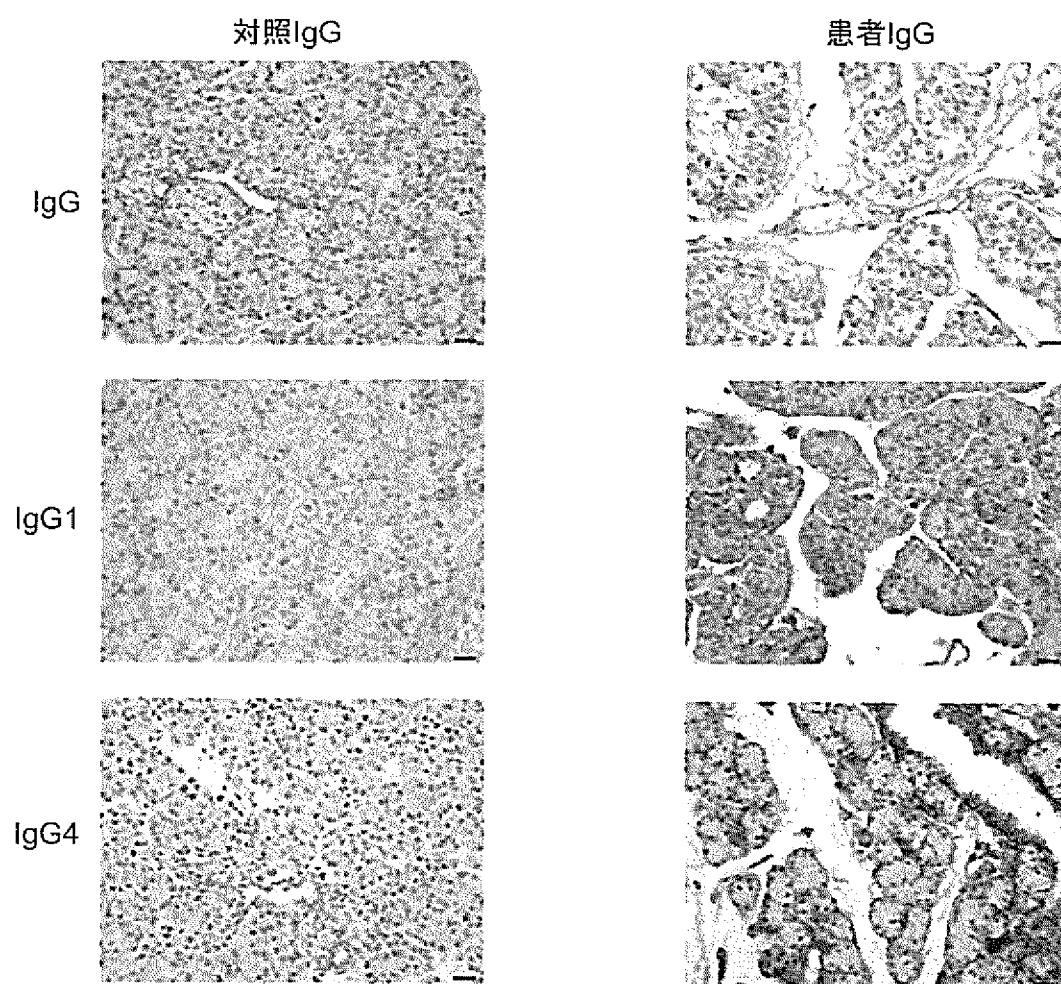
[図1B]



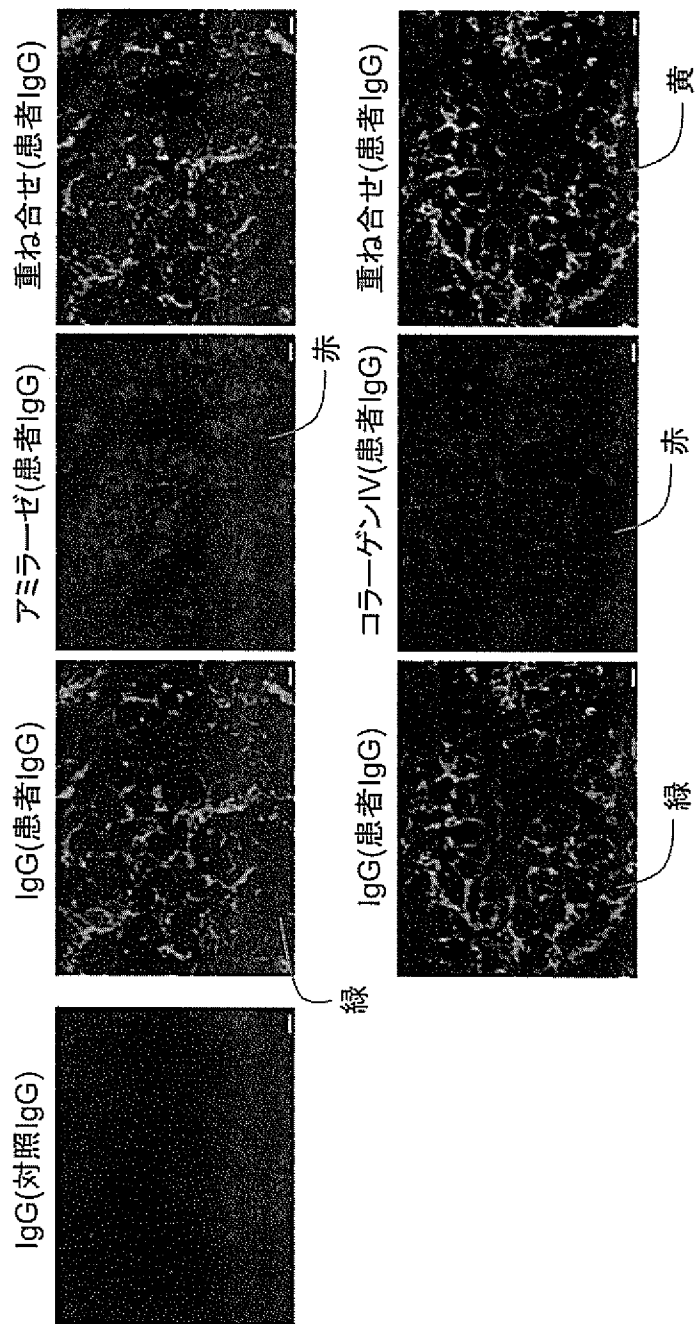
[図1C]



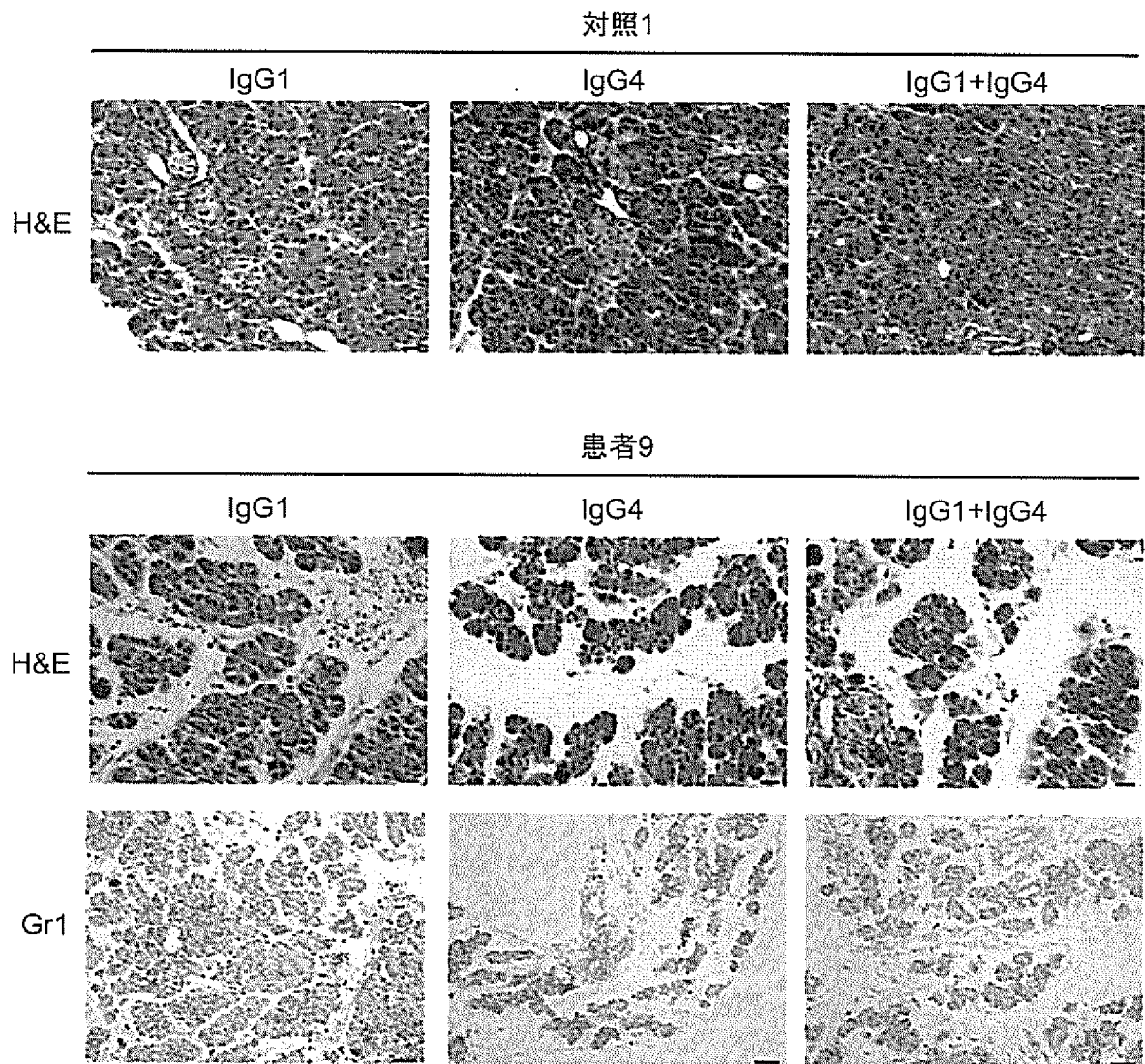
[図2A]



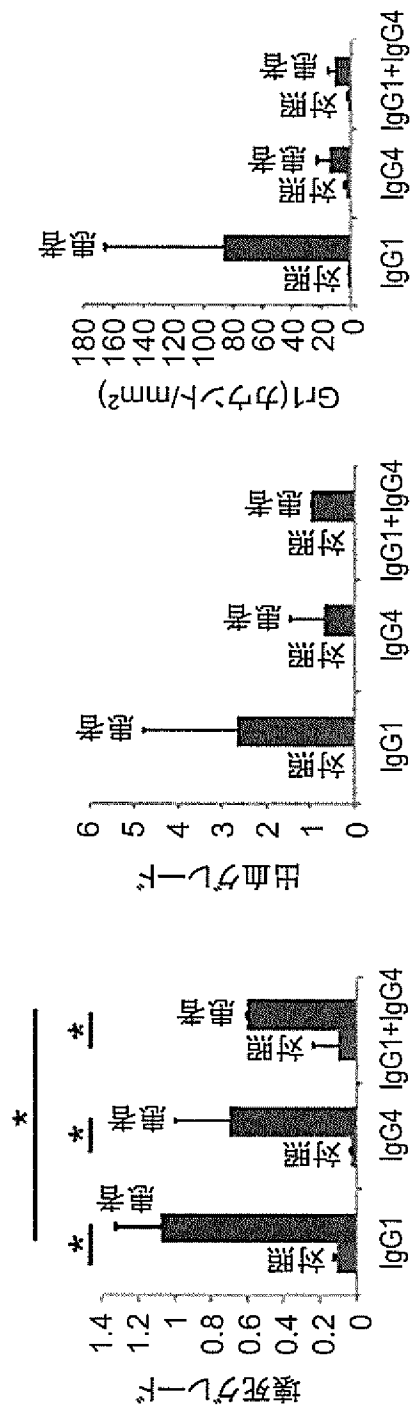
[図2B]



[図3A]

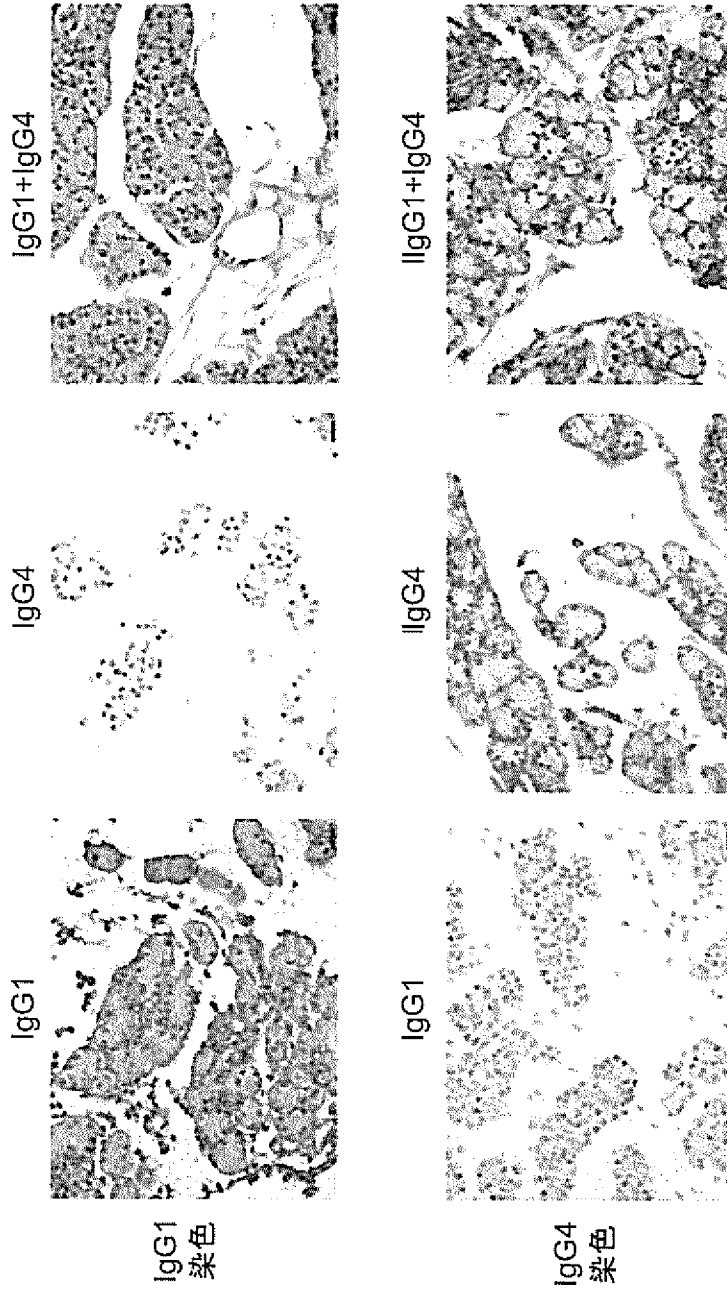


[図3B]

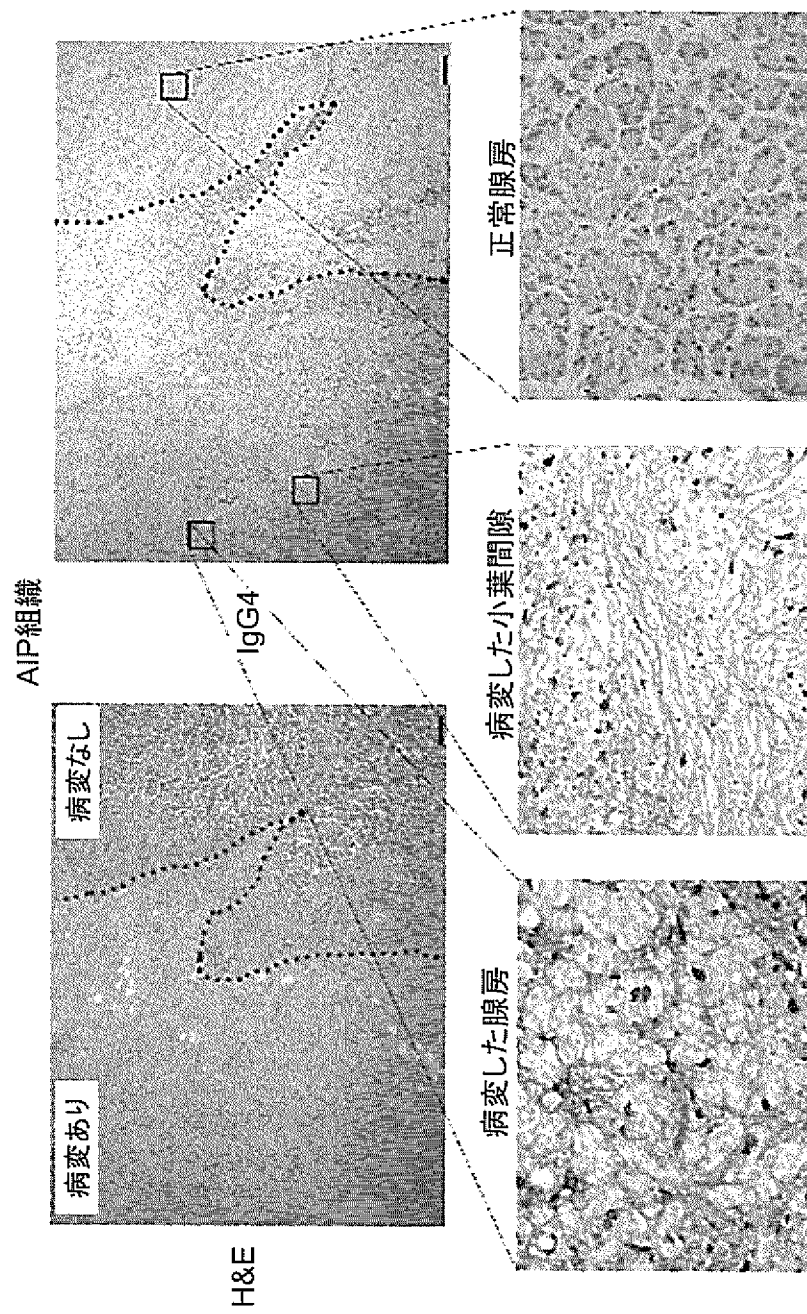


[図3C]

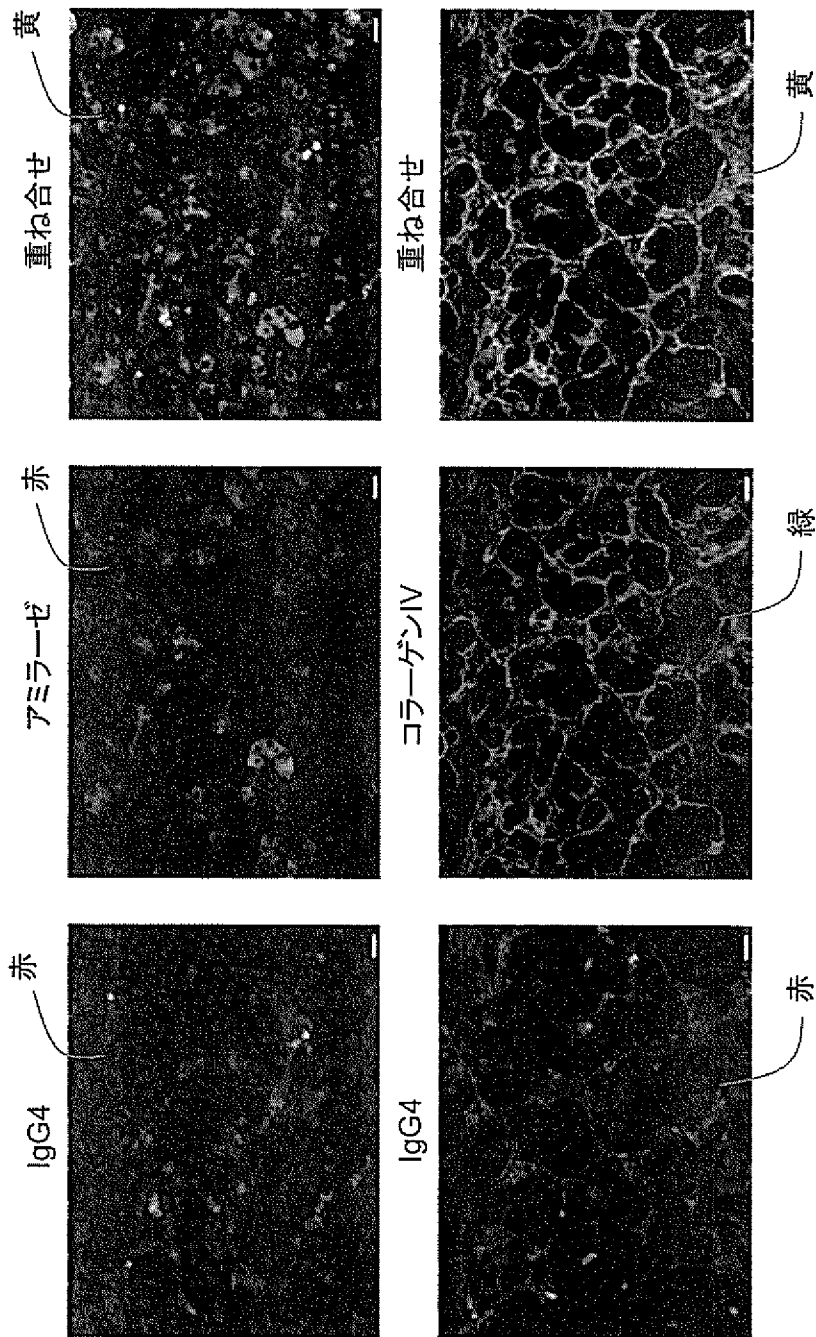
患者1



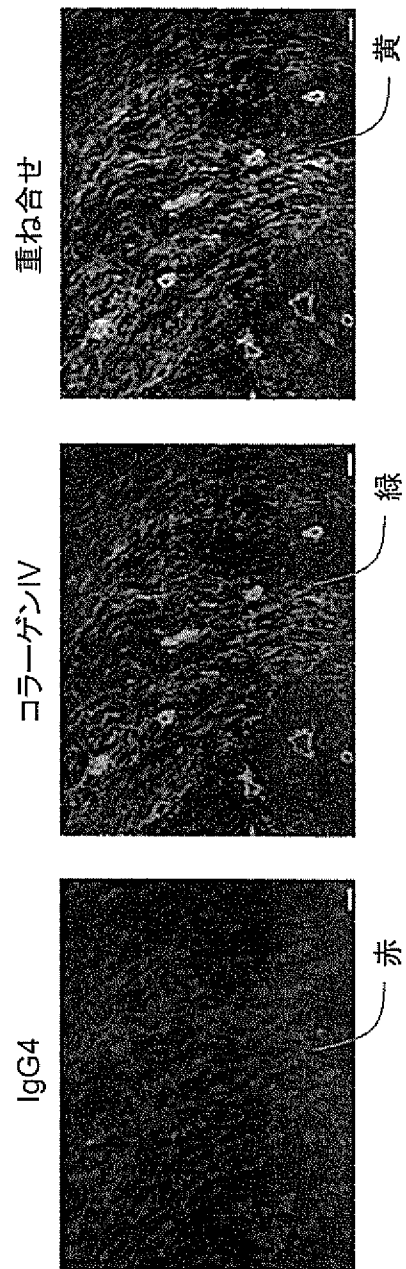
[図4A]



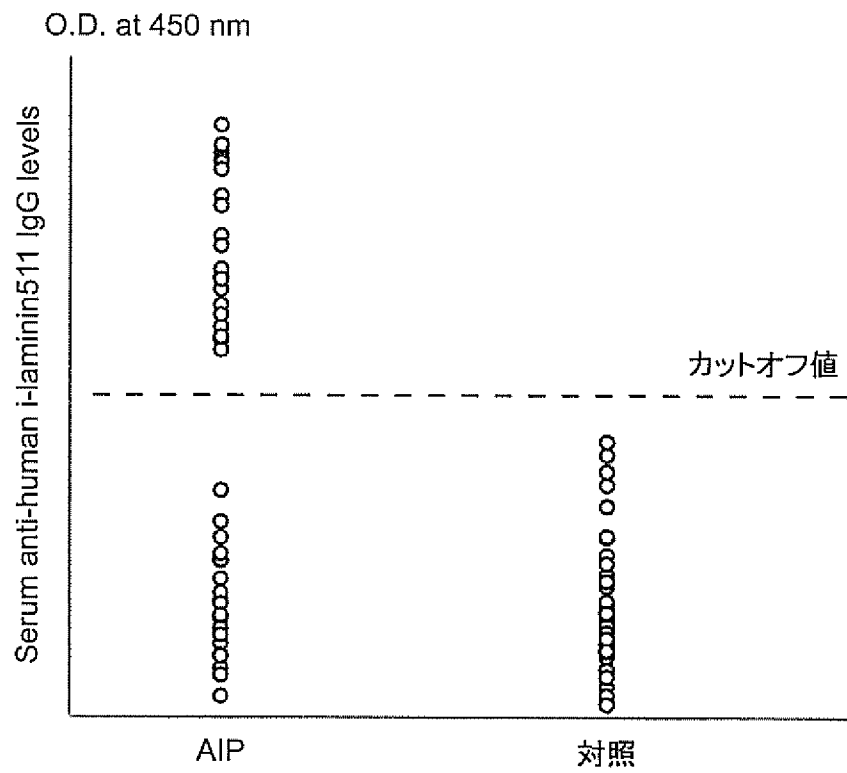
[図4B]



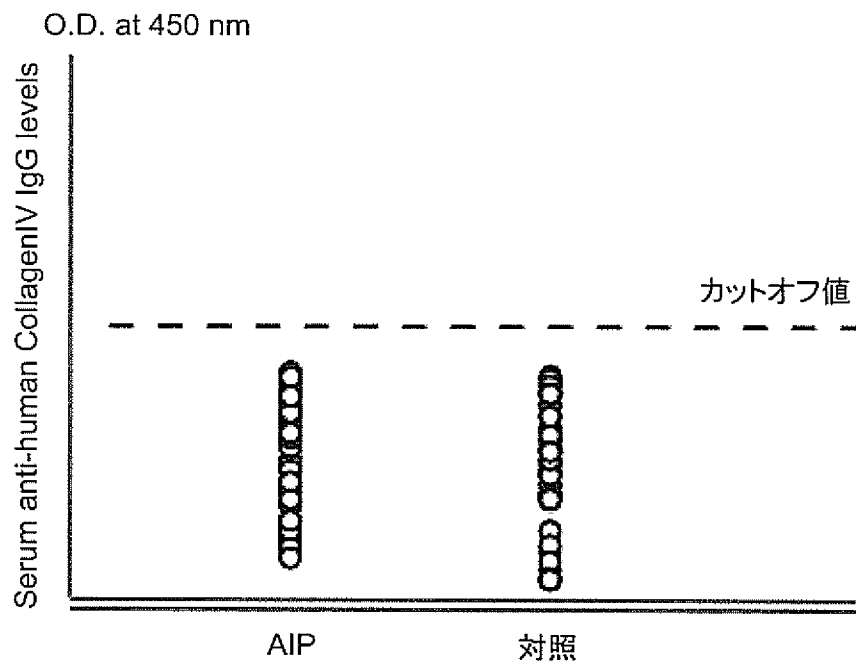
[図4C]



[図5A]



[図5B]



Scatter plot showing Serum anti-human fibronectin IgG levels (O.D. at 450 nm) for AIP and 対照 (Control) groups. The y-axis is labeled 'Serum anti-human fibronectin IgG levels' and 'O.D. at 450 nm'. A dashed horizontal line indicates the 'カットオフ値' (Cut-off value). The AIP group shows significantly higher O.D. values compared to the 対照 group.

Group	O.D. at 450 nm (Approximate values)
AIP	0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1.00, 1.05, 1.10, 1.15, 1.20, 1.25, 1.30, 1.35, 1.40, 1.45, 1.50, 1.55, 1.60, 1.65, 1.70, 1.75, 1.80, 1.85, 1.90, 1.95, 2.00, 2.05, 2.10, 2.15, 2.20, 2.25, 2.30, 2.35, 2.40, 2.45, 2.50, 2.55, 2.60, 2.65, 2.70, 2.75, 2.80, 2.85, 2.90, 2.95, 3.00, 3.05, 3.10, 3.15, 3.20, 3.25, 3.30, 3.35, 3.40, 3.45, 3.50, 3.55, 3.60, 3.65, 3.70, 3.75, 3.80, 3.85, 3.90, 3.95, 4.00, 4.05, 4.10, 4.15, 4.20, 4.25, 4.30, 4.35, 4.40, 4.45, 4.50, 4.55, 4.60, 4.65, 4.70, 4.75, 4.80, 4.85, 4.90, 4.95, 5.00, 5.05, 5.10, 5.15, 5.20, 5.25, 5.30, 5.35, 5.40, 5.45, 5.50, 5.55, 5.60, 5.65, 5.70, 5.75, 5.80, 5.85, 5.90, 5.95, 6.00, 6.05, 6.10, 6.15, 6.20, 6.25, 6.30, 6.35, 6.40, 6.45, 6.50, 6.55, 6.60, 6.65, 6.70, 6.75, 6.80, 6.85, 6.90, 6.95, 7.00, 7.05, 7.10, 7.15, 7.20, 7.25, 7.30, 7.35, 7.40, 7.45, 7.50, 7.55, 7.60, 7.65, 7.70, 7.75, 7.80, 7.85, 7.90, 7.95, 8.00, 8.05, 8.10, 8.15, 8.20, 8.25, 8.30, 8.35, 8.40, 8.45, 8.50, 8.55, 8.60, 8.65, 8.70, 8.75, 8.80, 8.85, 8.90, 8.95, 9.00, 9.05, 9.10, 9.15, 9.20, 9.25, 9.30, 9.35, 9.40, 9.45, 9.50, 9.55, 9.60, 9.65, 9.70, 9.75, 9.80, 9.85, 9.90, 9.95, 10.00, 10.05, 10.10, 10.15, 10.20, 10.25, 10.30, 10.35, 10.40, 10.45, 10.50, 10.55, 10.60, 10.65, 10.70, 10.75, 10.80, 10.85, 10.90, 10.95, 11.00, 11.05, 11.10, 11.15, 11.20, 11.25, 11.30, 11.35, 11.40, 11.45, 11.50, 11.55, 11.60, 11.65, 11.70, 11.75, 11.80, 11.85, 11.90, 11.95, 12.00, 12.05, 12.10, 12.15, 12.20, 12.25, 12.30, 12.35, 12.40, 12.45, 12.50, 12.55, 12.60, 12.65, 12.70, 12.75, 12.80, 12.85, 12.90, 12.95, 13.00, 13.05, 13.10, 13.15, 13.20, 13.25, 13.30, 13.35, 13.40, 13.45, 13.50, 13.55, 13.60, 13.65, 13.70, 13.75, 13.80, 13.85, 13.90, 13.95, 14.00, 14.05, 14.10, 14.15, 14.20, 14.25, 14.30, 14.35, 14.40, 14.45, 14.50, 14.55, 14.60, 14.65, 14.70, 14.75, 14.80, 14.85, 14.90, 14.95, 15.00, 15.05, 15.10, 15.15, 15.20, 15.25, 15.30, 15.35, 15.40, 15.45, 15.50, 15.55, 15.60, 15.65, 15.70, 15.75, 15.80, 15.85, 15.90, 15.95, 16.00, 16.05, 16.10, 16.15, 16.20, 16.25, 16.30, 16.35, 16.40, 16.45, 16.50, 16.55, 16.60, 16.65, 16.70, 16.75, 16.80, 16.85, 16.90, 16.95, 17.00, 17.05, 17.10, 17.15, 17.20, 17.25, 17.30, 17.35, 17.40, 17.45, 17.50, 17.55, 17.60, 17.65, 17.70, 17.75, 17.80, 17.85, 17.90, 17.95, 18.00, 18.05, 18.10, 18.15, 18.20, 18.25, 18.30, 18.35, 18.40, 18.45, 18.50, 18.55, 18.60, 18.65, 18.70, 18.75, 18.80, 18.85, 18.90, 18.95, 19.00, 19.05, 19.10, 19.15, 19.20, 19.25, 19.30, 19.35, 19.40, 19.45, 19.50, 19.55, 19.60, 19.65, 19.70, 19.75, 19.80, 19.85, 19.90, 19.95, 20.00, 20.05, 20.10, 20.15, 20.20, 20.25, 20.30, 20.35, 20.40, 20.45, 20.50, 20.55, 20.60, 20.65, 20.70, 20.75, 20.80, 20.85, 20.90, 20.95, 21.00, 21.05, 21.10, 21.15, 21.20, 21.25, 21.30, 21.35, 21.40, 21.45, 21.50, 21.55, 21.60, 21.65, 21.70, 21.75, 21.80, 21.85, 21.90, 21.95, 22.00, 22.05, 22.10, 22.15, 22.20, 22.25, 22.30, 22.35, 22.40, 22.45, 22.50, 22.55, 22.60, 22.65, 22.70, 22.75, 22.80, 22.85, 22.90, 22.95, 23.00, 23.05, 23.10, 23.15, 23.20, 23.25, 23.30, 23.35, 23.40, 23.45, 23.50, 23.55, 23.60, 23.65, 23.70, 23.75, 23.80, 23.85, 23.90, 23.95, 24.00, 24.05, 24.10, 24.15, 24.20, 24.25, 24.30, 24.35, 24.40, 24.45, 24.50, 24.55, 24.60, 24.65, 24.70, 24.75, 24.80, 24.85, 24.90, 24.95, 25.00, 25.05, 25.10, 25.15, 25.20, 25.25, 25.30, 25.35, 25.40, 25.45, 25.50, 25.55, 25.60, 25.65, 25.70, 25.75, 25.80, 25.85, 25.90, 25.95, 26.00, 26.05, 26.10, 26.15, 26.20, 26.25, 26.30, 26.35, 26.40, 26.45, 26.50, 26.55, 26.60, 26.65, 26.70, 26.75, 26.80, 26.85, 26.90, 26.95, 27.00, 27.05, 27.10, 27.15, 27.20, 27.25, 27.30, 27.35, 27.40, 27.45, 27.50, 27.55, 27.60, 27.65, 27.70, 27.75, 27.80, 27.85, 27.90, 27.95, 28.00, 28.05, 28.10, 28.15, 28.20, 28.25, 28.30, 28.35, 28.40, 28.45, 28.50, 28.55, 28.60, 28.65, 28.70, 28.75, 28.80, 2

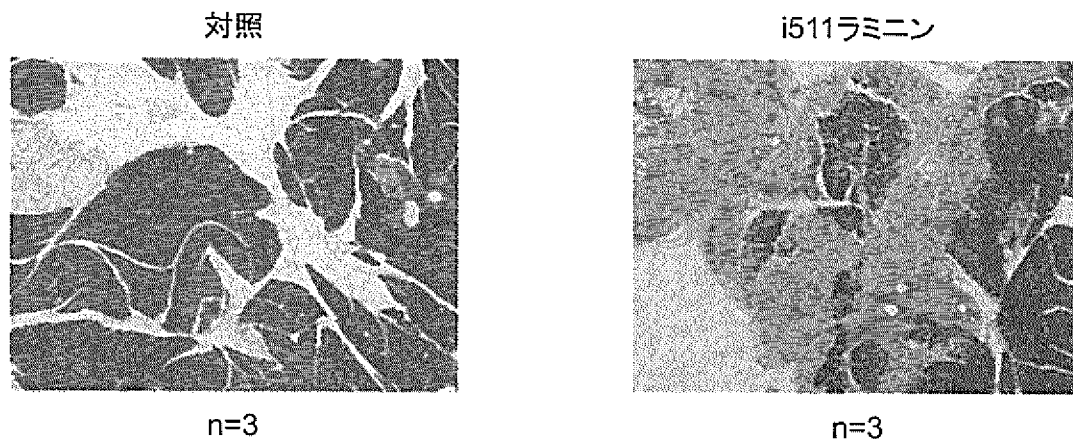
O.D. at 450 nm

Serum anti-GFP IgG levels

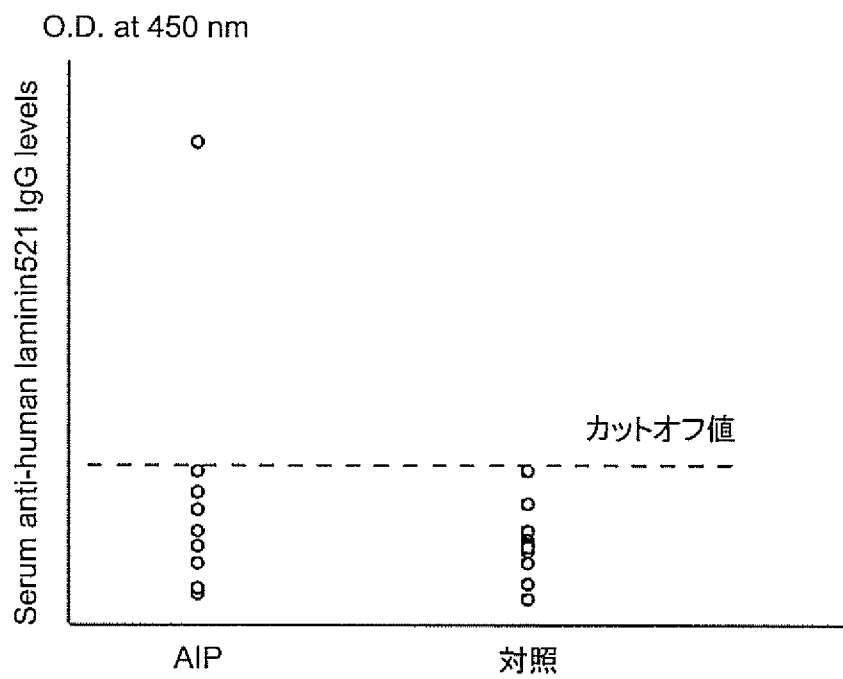
カットオフ値

AIP 対照

[図6]

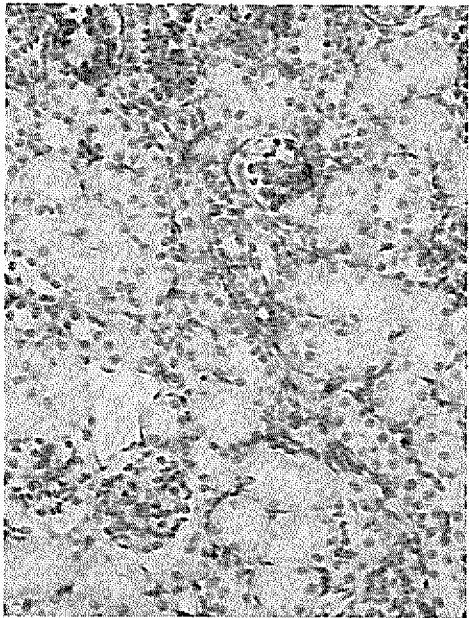
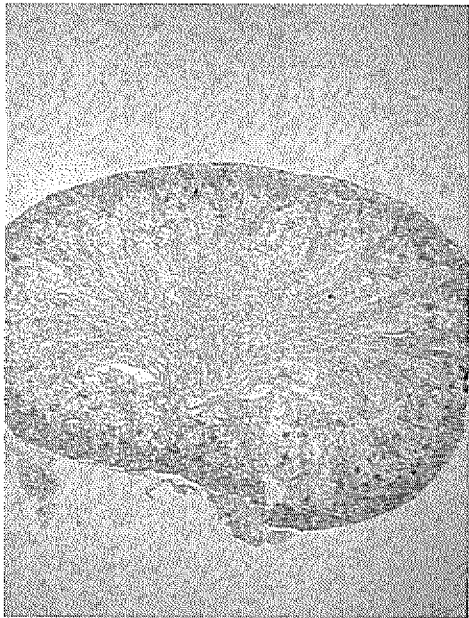


[図7]

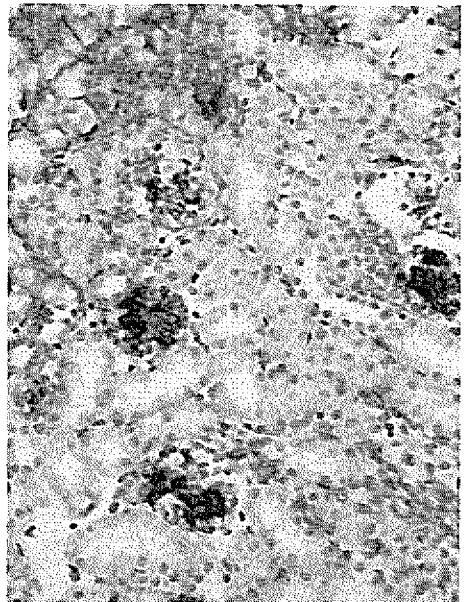
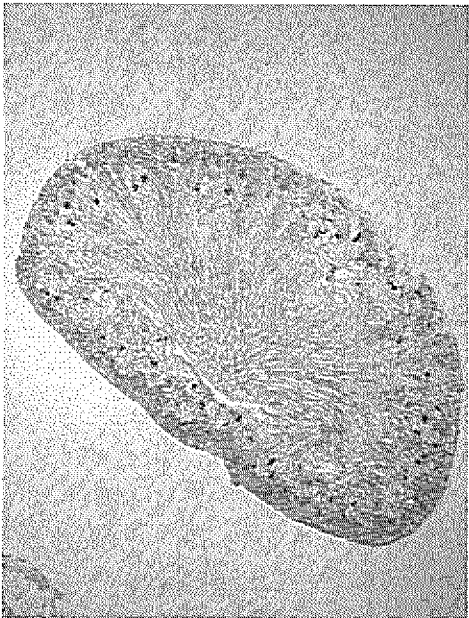


[図8]

対照IgG



IgG4関連腎疾患患者IgG

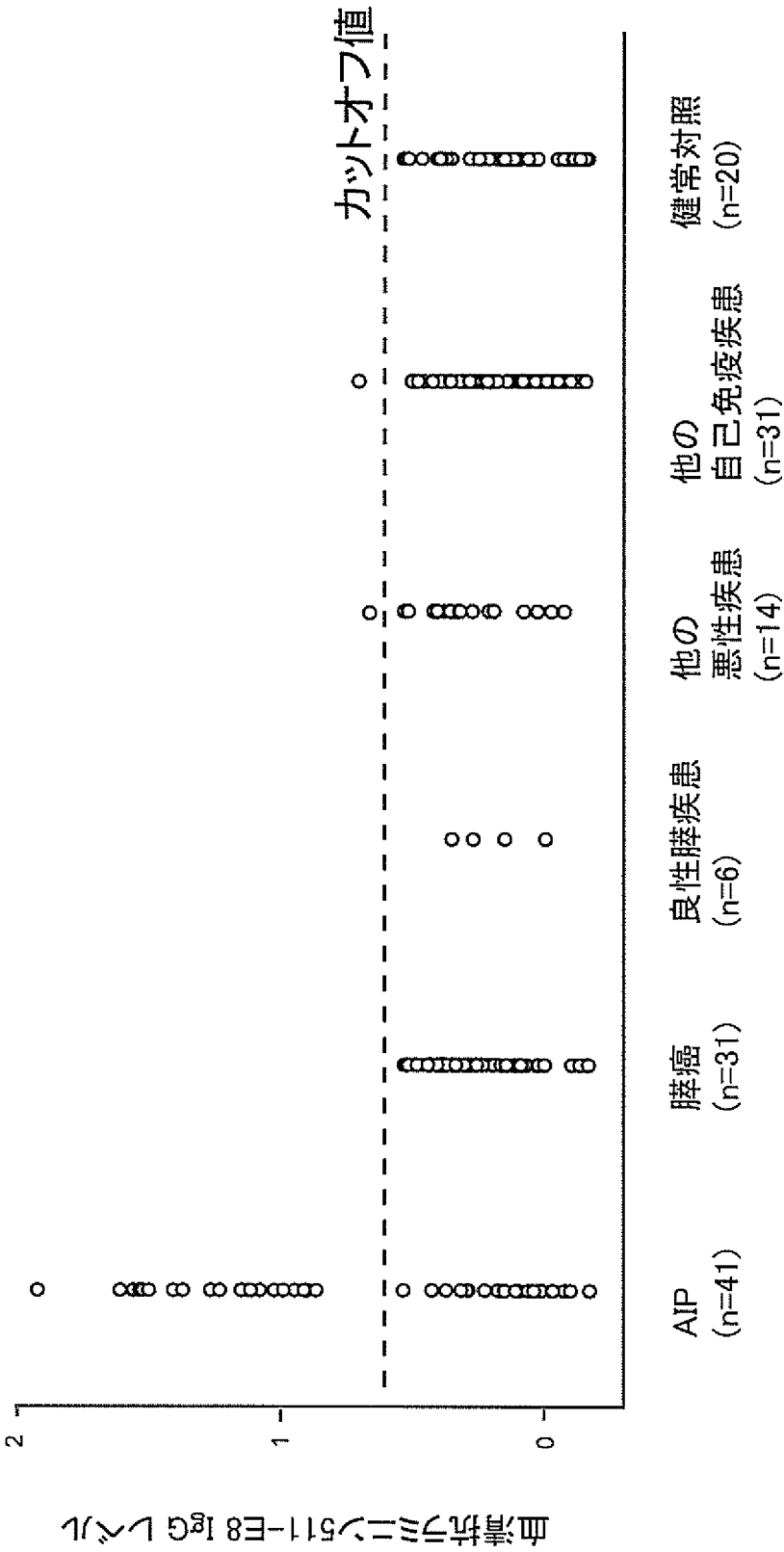


腎臓
IgG4

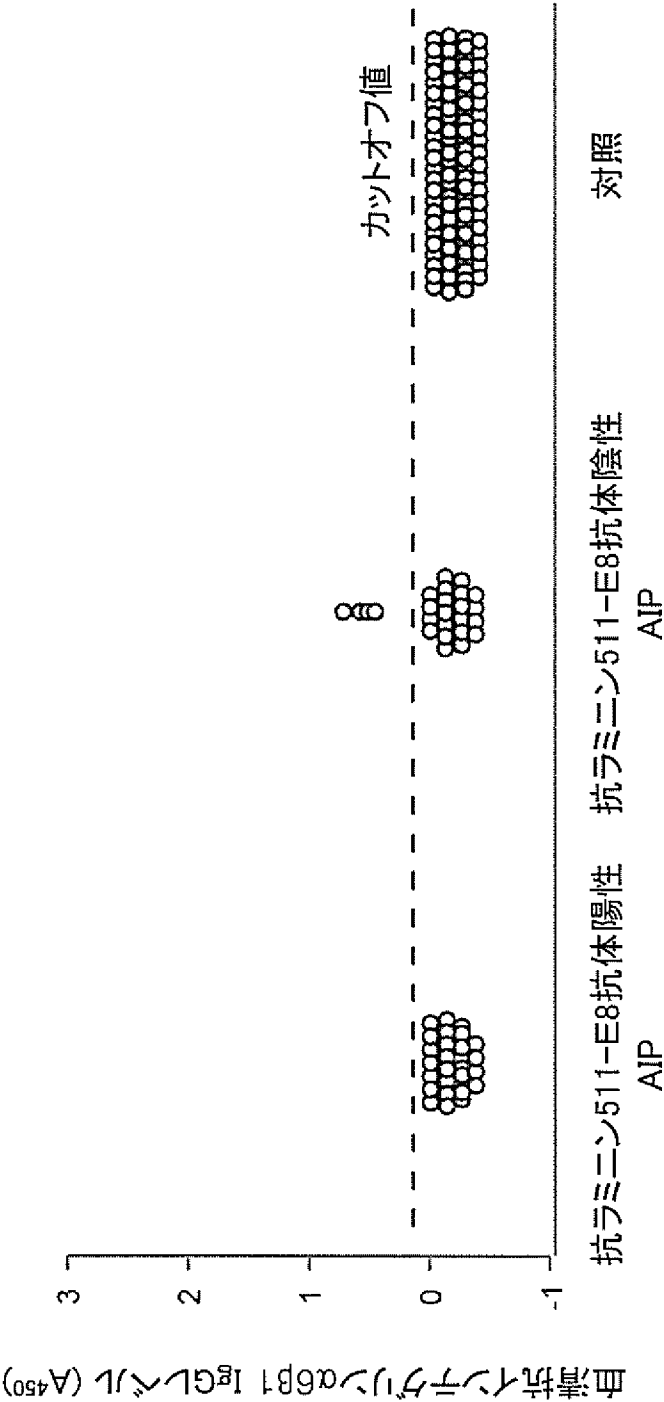
糸状体
IgG4

[illegible]

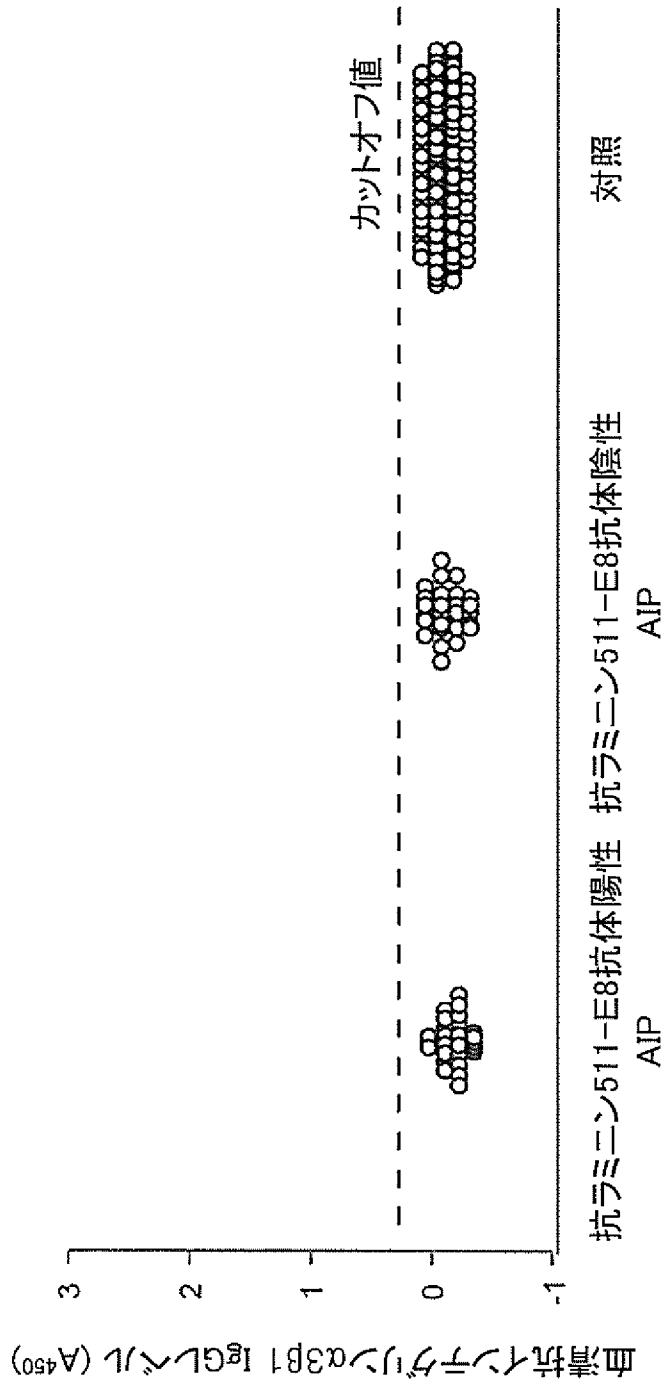
[図9B]



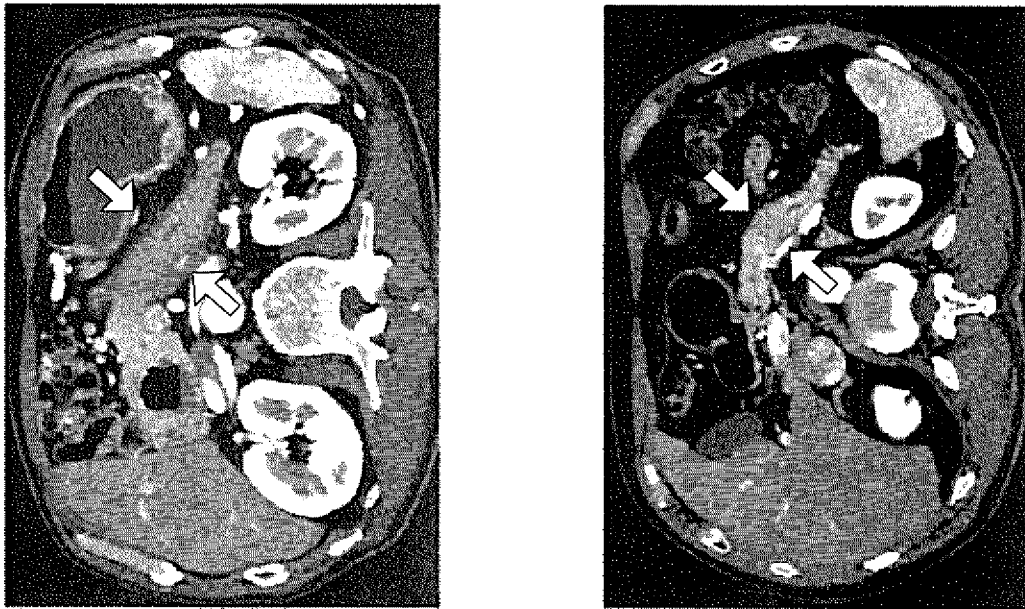
[図10]



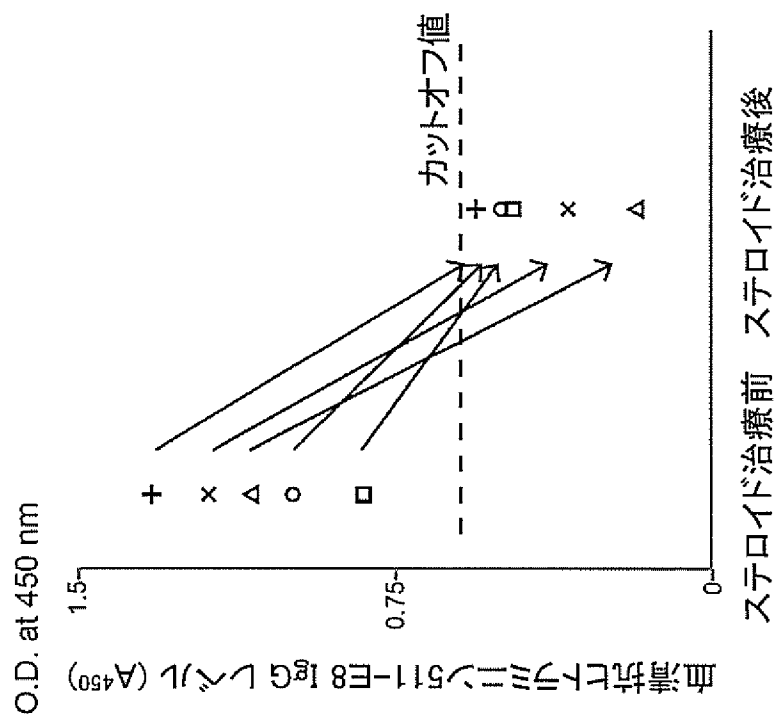
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n

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, G01N33/15, G01N33/50, C07K16/18

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2012-050369 A (Kanazawa Medical University), 15 March 2012 (15.03.2012), table 1, (1), (B) (Family: none)	11 1-10, 12-15
A	WO 2015/123565 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 20 August 2015 (20.08.2015), entire text & US 2015/0232935 A1	1-15
A	WO 2002/042769 A1 (Eiji MATSUURA), 30 May 2002 (30.05.2002), claims & JP 3989837 B2 & US 2004/0082011 A1 claims	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 August 2017 (29.08.17)

Date of mailing of the international search report
12 September 2017 (12.09.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026359

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/013508 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 29 January 2015 (29.01.2015), entire text & US 2016/0159918 A1 & EP 3024482 A2	1-15
A	JP 2002-514660 A (Genentech, Inc.), 21 May 2002 (21.05.2002), entire text & WO 1999/058573 A1 entire text & EP 1078006 A1	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease, Gut, 2016.03.10, 65(8), 1322-1332	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis, The American Journal of GASTROENTEROLOGY, 2013.04, Vol. 108, 610-617	1-15
A	Mitsuhiro KAWANO et al., "IgG4-related kidney disease. Diagnosis and treatment", Japanese journal of clinical immunology, 2015, vol.38, no.1, 8 to 16	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53, G01N33/15, G01N33/50, C07K16/18

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
X A	JP 2012-050369 A (学校法人金沢医科大学) 2012.03.15, 表 1 (1) (B) (ファミリーなし)	11 1-10, 12-15
A	WO 2015/123565 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2015.08.20, 全文 & US 2015/0232935 A1	1-15
A	WO 2002/042769 A1 (松浦栄次) 2002.05.30, 請求の範囲 & JP 3989837 B2 & US 2004/0082011 A1 (請求の範囲)	1-15

☑ 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

2 9 . 0 8 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 9 . 2 0 1 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

赤坂 祐樹

2 J

3 3 1 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

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 2015/013508 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2015. 01. 29, 全文 & US 2016/0159918 A1 & EP 3024482 A2	1-15
A	JP 2002-514660 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2002. 05. 21, 全文 & WO 1999/058573 A1(全文) & EP 1078006 A1	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease, Gut, 2016. 03. 10, 65(8), 1322-1332	1-15
A	SHIOKAWA, M et al., Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis, The American Journal of GASTROENTEROLOGY, 2013. 04, Vol. 108, 610-617	1-15
A	川野充弘 ほか, IgG4 関連腎臓病 診断と治療, 日本臨床免疫学会 会誌, 2015, Vol. 38 No. 1, 8-16	1-15