



(21)申請案號：105123899

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 28 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/53 (2006.01)**

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2015/08/06 日本

2015-155975

(71)申請人：愛代爾股份有限公司 (日本) EIDIA CO., LTD. (JP)

日本

宮崎徹 (日本) MIYAZAKI, TORU (JP)

日本

(72)發明人：宮崎徹 MIYAZAKI, TORU (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：4 共 28 頁

(54)名稱

腎疾病之檢查方法

(57)摘要

本發明之課題為提供感度及特異性優異的腎疾病之檢測方法或腎疾病的診斷之輔助方法、以及能夠使用於此等方法之套組。本發明之解決手段為提供包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟之腎疾病之檢測方法或腎疾病的診斷之輔助方法、以及包含結合至 free AIM 之抗體之腎疾病之檢查或診斷輔助用套組。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

腎疾病之檢查方法

【技術領域】

[0001] 本發明係典型地關於腎疾病之檢查方法或診斷之輔助方法。具體而言，本發明係關於包含檢測被驗體之生體試料中之 free AIM 之腎疾病之檢查方法或診斷之輔助方法。本發明係進一步關於腎疾病之檢查或診斷輔助用套組。

【先前技術】

[0002] AIM (巨噬細胞凋亡抑制劑 (apoptosis inhibitor of macrophage) ; 亦稱為 CD5L、api6、Spα) 為組織巨噬細胞特異性地產生之分子量約 50 kDa 的分泌型蛋白質 (非專利文獻 1)。一般認為 AIM 係呈串列地連接 3 個屬於包含大量半胱胺酸殘基之特異性序列之清道夫受體富含半胱胺酸 (scavenger receptor cysteine-rich (SRCR)) 結構域而成之結構，各個半胱胺酸殘基係藉由在各結構域內互相進行二硫鍵結而呈緊密的球狀立體結構。

[0003] AIM 為具黏著性之蛋白質，作為其結合配偶體，已有報告指出各式各樣的分子。舉例而言，已知其擁

有識別脂磷壁酸 (lipoteichoic acid (LTA)) 或脂多醣 (lipopolysaccharide (LPS)) 等細菌 / 菌類之病原體相關分子模式 (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) , 並使細菌凝集之能力 (非專利文獻 2) 。此外, 已有報告指出在體內亦大量存在有將 AIM 結合至在其表面或攝入細胞內之細胞, 除了攝入至屬於產生細胞之巨噬細胞自身中, 在脂肪細胞中係經由清道夫受體 CD36 藉由內吞作用進行攝入, 誘導脂肪分解 (非專利文獻 3) 。

[0004] 此外, 自古以來, 已知在血液中, AIM 係結合至 IgM (非專利文獻 4) 。近年來, 已有報告指出 AIM 為了不排出至尿中而在血液中安定地存在, 係深切涉及與 IgM 之結合; 幾乎所有的 AIM 在血液中皆結合至 IgM, 幾乎不以單體存在 (非專利文獻 5、6) 。

[0005] 直至目前為止, 針對 AIM 與腎疾病之關連, 存在有數篇報告。舉例而言, 在專利文獻 1 中, 已揭示 AIM 相關疾病之診斷或檢查方法, 其係包含對採取自被檢者之試料中之 AIM 濃度進行測定, 作為前述相關疾病, 已列舉腎疾病。

[0006] 在非專利文獻 7 中, 已記載在 SHRsp 大鼠的腎組織中之巨噬細胞之 AIM 表現、與巨噬細胞浸潤數之相關性, 暗示 AIM 的表現對腎硬化症的進展甚為重要。

[0007] 在非專利文獻 8 中, 已記載血中 AIM 的不足係明顯地提高自腎障礙事件進展成慢性腎功能不全之風

險。

[0008] 在非專利文獻 9 中，已記載於檢討腎障礙的發作／進展過程中之 AIM 的角色之過程，在單側尿管結紮模型或腎缺血再灌流模型中，相較於野生型小鼠而言，在 AIM 缺損小鼠中，伴隨腎小管壞死之腎組織障礙係明顯地亢進。

[0009] 然而，直至目前為止，針對以未與其他結合配偶體進行結合之游離形態存在之 AIM 與腎疾病之關係，則尚未有報告。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[0010]

[專利文獻 1] 國際公開公報 WO2011 / 145725 A1

[非專利文獻]

[0011]

[非專利文獻 1] Miyazaki, J Exp Med 189:413-422, 1999

[非專利文獻 2] Sarrias MR et al: A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. J Biol Chem 280: 35391-35398, 2005

[非專利文獻 3] Kurokawa J. et al: Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid Droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. Cell Metab 11: 479-492, 2010

〔非專利文獻 4〕 Tissot JD et al: IgM are associated to Sp alpha (CD5 antigen-like) . Electrophoresis 23: 1203-1206, 2002.

〔非專利文獻 5〕 宮崎等人，「源自巨噬細胞之蛋白質 AIM 之最新見解-其多樣的機能與生活習慣病之關連性-」日本臨床 71 卷 9 號 (2013-9) ， 1681 頁-1689 頁

〔非專利文獻 6〕 Miyazaki et al., Obesity-Associated Autoantibody Production Requires AIM to Retain the Immunoglobulin M Immune Complex on Follicular Dendritic Cells, Cell Reports 3, 1187-1198, April 25, 2013

〔非專利文獻 7〕 Involvement of Apoptosis Inhibitor of Macrophages in a Rat Hypertension Model with Nephrosclerosis: Possible Mechanisms of Action of Olmesartan and Azelnidipine: Biol. Pharm. Bull. 36(8) 1271-1277 (2013) 1271

〔非專利文獻 8〕 2014 年日本獸醫臨床病理學會 學術大會 抄錄集

〔非專利文獻 9〕 2014 年日本腎臟學會誌 56 卷 3 號 321 頁

【發明內容】

〔發明所欲解決之課題〕

[0012] 本發明之課題係在於提供感度及特異性優異的腎疾病之檢測方法或腎疾病的診斷之輔助方法、以及能

夠使用於此等方法之套組。

[解決課題之手段]

[0013] 本發明者等人為了解決上述課題而反覆致力研究，結果發現在腎疾病之被驗體之生體試料中，free AIM 係顯著地增加。由於在血液中，本來 free AIM 被認為幾乎無法確認，因而在腎疾病之被驗體之血液中確認到 free AIM 的顯著增加係格外令人驚訝。

[0014] 本案發明係基於上述見解而成者，其係包含以下特徵。

[0015] 即，本發明在一實施態樣中，係關於腎疾病之檢查方法，其係包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟。本發明在另一態樣中，可為輔助腎疾病的診斷之方法，其係包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟。本發明在又一態樣中，可為對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之方法，其係用於檢查腎疾病。

[0016] 在本發明之方法中，前述生體試料可設為體液。此外，在本發明之方法之一實施態樣中，前述體液可設為選自血清、血漿、全血及尿所組成群組者。

[0017] 本發明之方法在一實施態樣中，其特徵為前述檢測或定量為透過免疫分析而得者。舉例而言，在本發明之方法中，前述檢測或定量可設為藉由使生體試料與結合至 free AIM 之抗體進行接觸而施行。在本發明之方法

之一實施態樣中，前述結合至 free AIM 之抗體為特異性地結合至 free AIM 之抗體。此外，在本發明之一實施態樣中，前述檢測或定量可為透過 ELISA 之測定。

[0018] 本發明之方法在一實施態樣中，其特徵為前述檢測或定量係在未將選自血清、血漿或全血之血液試料暴露於蛋白質變性條件且未暴露於還原條件之情形下施行。

[0019] 本發明復關於腎疾病之檢查或診斷輔助用套組，其係包含結合至 free AIM 之抗體。在本發明之套組之一實施態樣中，前述結合至 free AIM 之抗體為特異性地結合至 free AIM 之抗體。

[0020] 在本發明中，前述腎疾病可為急性腎障礙或慢性腎臟病。在一實施態樣中，前述慢性腎臟病可為慢性腎炎、慢性腎功能不全、腎病症候群、糖尿病性腎病、腎硬化症、IgA 腎病、高血壓性腎病、膠原病所伴隨之腎病或 IgM 腎病。

[發明效果]

[0021] 根據本發明，可提供感度及特異性優異的腎疾病之檢測方法或腎疾病的診斷之輔助方法、以及能夠使用於此等方法之套組。

【圖式簡單說明】

[0022]

〔圖 1〕圖 1 為示出在健常人及急性腎障礙（AKI）患者的血清中，使用抗 AIM 抗體來檢測 free AIM 及 IgM 結合的 AIM 之結果之電泳圖。

〔圖 2〕圖 2 係示出使用人類 AIM 單株抗體各自檢測健常人 5 例、AKI 患者（急性）5 例、自 AKI 康復之患者（康復）5 例的尿中之 free AIM 濃度之 ELISA 分析之結果。

〔圖 3〕圖 3 為示出在慢性腎障礙（CKD）患者的血清中，使用抗 AIM 抗體來檢測 free AIM 及 IgM 結合的 AIM 之結果之電泳圖。

〔圖 4〕圖 4 係示出在健常人及慢性腎障礙（CKD）患者的血清中，使用 Human AIM ELISA kit（CY-8080；CircuLex 公司）來檢測 free AIM 之結果。

【實施方式】

[0023] 以下，具體說明本發明之實施形態。

[0024] 本發明所涉及之腎疾病之檢查方法係包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟。已知 AIM 係如上述，為組織巨噬細胞特異性地產生之分子量約 50 kDa 的分泌型蛋白質，其係在人類及人類以外之許多哺乳類或鳥類中表現。此外，已知 AIM 在血液中，為了不排出至尿中而安定地存在，其大部分與 IgM 形成複合體，幾乎不以單體存在（非專利文獻 5、6）。再者，亦有報告指出血液中之 AIM 不足係與進展成

慢性腎功能不全之風險相關（非專利文獻 8）。另一方面，儘管有此等見解，此次發現在急性腎障礙及慢性腎臟病之被驗體中，包含血液試料在內之生體試料中之 free AIM 係顯著地增加。從而，藉由對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量，可以良好的檢測感度及特異性檢測該被驗體中之腎疾病。本說明書中，「free AIM」係指在生體試料中，未與 AIM 之其他結合配偶體，特定而言 IgM，形成複合體之單體的 AIM。

[0025] 在另一態樣中，本發明係關於輔助腎疾病的診斷之方法，其係包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟。

[0026] 在本說明書中，「腎疾病之檢查」或「腎疾病的診斷之輔助」係意味為了獲得診斷所需的情報，而對採取自被驗體之試料進行調查。從而，本發明之方法可例如由檢驗公司等實施。

[0027] 再者，在另一態樣中，本發明係關於對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之方法，其係用於檢查腎疾病。

[0028] 在本發明中，被驗體並無特別限制，可列舉例如有腎疾病發作之疑慮、或被懷疑正在發作之被驗體。在被驗體中，復亦包含腎疾病已發作之被驗體，在該情況，可在判定該種被驗體的預後之目的下、或在判定特定的腎疾病治療效果之目的下，實施本發明。被驗體典型地指人類，亦可包含例如其他靈長類、嚙齒類、包含犬、

貓、馬、羊、豬等之其他動物。

[0029] 在本發明中，在腎疾病中，係包含急性腎障礙及慢性腎臟病兩者。作為慢性腎臟病，雖然並不限定於此，但可列舉例如慢性腎炎、慢性腎功能不全、腎病症候群、糖尿病性腎病、腎硬化症、IgA 腎病、高血壓性腎病、膠原病所伴隨之腎病、及 IgM 腎病等。

[0030] 在本發明中，源自被驗體之生體試料在屬於能夠採取自被驗體者之前提下，即無特別限定，可設為例如組織或體液。作為組織，可非限定地列舉卵巢、子宮、乳房、甲狀腺、腦、食道、舌、肺、胰臟、胃、小腸、十二指腸、大腸、膀胱、腎臟、肝臟、前列腺、膽囊、咽喉、肌肉、骨及皮膚等，但不限定於此等。作為體液，可非限定地列舉血清、血漿或全血等血液、淋巴液、組織液、體腔液、消化液、鼻水、尿等，但不限定於此等。由取得及處理的簡便性而言，較佳係使用血液或尿作為生體試料。此外，前述體液可為採取自被驗體之體液本身，亦可為對所採取之體液施行通常所施行之稀釋、濃縮等處理而成者。另外，施行用於本發明之源自被驗體之生體試料的採取或調製者可為與施行本發明之步驟者相同的人物，亦可為另一人物。此外，用於本發明之源自被驗體之生體試料可為在實施本發明時所採取或調製者，亦可為經預先採取或調製並保存者。

[0031] free AIM 之檢測或定量方法只要是可區別 free AIM、及與其他結合配偶體（例如 IgM 等）形成複合體之

AIM（以下，亦稱為複合體 AIM）並進行檢測之方法，即無特別限制，可應用通常所使用之蛋白質檢測方法。此外，該種蛋白質檢測方法較佳為可定量或半定量地測定 free AIM 之方法。作為該種方法，雖然並不限定於此，但可列舉使用結合至 free AIM 之抗體之方法、離子交換層析、質量分析等。

[0032] 在本發明中，用於檢測 free AIM 之裝置並無特別限制，可視 free AIM 之檢測或測定方法而適宜選擇。具體而言，可列舉例如 HPLC 機器、質量分析機器（質譜儀）、電泳機器（毛細管電泳裝置等）、全自動或半自動酵素免疫測定機器、細胞清洗器、全自動或半自動化學發光免疫測定機器、發光測定裝置、全自動或半自動電化學發光免疫測定機器、光學測定裝置、平板讀數儀、CCD 照相機、全自動或半自動螢光免疫測定機器、螢光測定裝置、全自動或半自動放射免疫測定機器、液體閃爍計數器、庫爾特計數器（Coulter counter）、表面電漿測定裝置、轉印裝置、光密度計等。

[0033] 在本發明中，從檢測感度、特異性及簡便性之觀點而言，較佳係使用：使用結合至 free AIM 之抗體（本說明書中，亦稱為「抗 free AIM 抗體」）之方法，例如使用結合至 free AIM 之抗體之免疫分析。抗 free AIM 抗體只要是能夠識別並結合 AIM 之抗體，即無特別限制。

[0034] 抗 free AIM 抗體係單株抗體及多株抗體皆可

依照公知的方法予以製作。單株抗體可藉由例如自以 free AIM 或 free AIM 片段進行免疫之非人類哺乳動物中單離出抗體產生細胞，使其與骨髓瘤細胞等進行融合而製作融合瘤，並將此融合瘤所產生之抗體進行精製而獲得。此外，多株抗體可自以 free AIM 或 free AIM 片段進行免疫之動物的血清中獲得。

free AIM 片段為 free AIM 之部分胜肽，抗 free AIM 片段抗體係識別 free AIM。此外，作為免疫原，可列舉例如人類或猿猴等靈長類、大鼠或小鼠等嚙齒類、犬、貓、馬、羊、豬等之 free AIM 或 free AIM 片段，但並不限定於此等。

[0035] 另外，在本說明書中，「抗體」係指天然存在、或藉由基因重組技術所產生之全長的免疫球蛋白分子、或諸如抗體片段般免疫球蛋白分子之免疫學上活性的片段。在無特別斷定之前提下，本發明之抗體係所有類型、群集、亞型皆包含在內，包含例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 及 IgA₂ 等。此等抗體可使用慣用技術予以製作，多株抗體、單株抗體皆可。作為抗體片段，可列舉 F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv 等。抗體片段亦可例如使用編碼出該等之核酸藉由基因重組技術予以製作，亦可將全長的抗體以酵素進行切割而予以製作。在本發明中，抗 free AIM 抗體較佳為單株抗體。

[0036] 在本發明中，作為抗 free AIM 抗體之例，可

列舉例如寄存於獨立行政法人製品評估技術基礎機構專利微生物寄存中心之 AIM-CL-6 (受託編號: NITE BP-1092) 及 AIM-CL-7 (受託編號: NITE BP-1093)。

[0037] 在本發明中所使用之抗 free AIM 抗體較佳為特異性地結合至 free AIM 之抗體。「特異性結合」係指經測定與非特異性相互作用有所不同之結合, 在本發明中進一步指相較於與 IgM 形成複合體之 AIM 而言, 對 free AIM 具有更高的結合親和性之抗體。在本發明之一態樣中, 「特異性結合」可藉由例如對 free AIM 保有至少約 10^{-4} M、或至少約 10^{-5} M、或至少約 10^{-6} M、或至少約 10^{-7} M、或至少約 10^{-8} M、或至少約 10^{-9} M、或至少約 10^{-10} M、或至少約 10^{-11} M、或至少約 10^{-12} M、或其以上的 Kd 之抗體來表示。在另一態樣中, 「特異性結合」係意味結合至 free AIM, 而實質上不結合至包含與 IgM 形成複合體之 AIM 在內之與 free AIM 不同的其他多肽。

[0038] 作為本發明中之免疫分析, 可使用熟習該項技術者一般所使用之方法, 但應選擇可區別 free AIM、及複合體 AIM 並進行檢測或定量之方法或條件。舉例而言, 在本發明之方法中, 在使用尿以外之生體試料, 例如選自血清、血漿或全血之血液試料之情況, 於使用抗 free AIM 抗體之檢測或定量時, 為了區別 free AIM、及複合體 AIM 並進行檢測, 較佳係視需要基於分子量施行生體試料的劃分。此外, 亦較佳係自複合體 AIM 中分離出 free AIM 後, 使用抗 free AIM 抗體施行檢測或定量。此外,

在本發明之方法中，應留意不將前述生體試料暴露於會解除與 IgM 結合而形成複合體之 AIM 的結合狀態之蛋白質變性條件或還原條件。該種蛋白質變性條件或還原條件係作為破壞蛋白質的四級結構之方法或條件而為熟習該項技術者所周知。

[0039] 免疫分析係使用經可檢測地標識之抗 free AIM 抗體、或對抗經可檢測地標識之抗 free AIM 抗體之抗體（二次抗體）。藉由抗體之標識法，可分類成酵素免疫分析（EIA 或 ELISA）、放射免疫分析（RIA）、螢光免疫分析（FIA）、螢光偏光免疫分析（FPIA）、化學發光免疫分析（CLIA）、電化學發光免疫分析（ECLIA）等，此等皆可用於本發明之方法中。

[0040] 在 ELISA 法中，係使用經過氧化酶、鹼性磷酸酶等酵素標識之抗體，在 RIA 法中，係使用經 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等放射性物質標識之抗體，在 FPIA 法中，係使用經螢光異硫氰酸鹽、羅丹明（rhodamine）、丹磺醯氯（dansyl chloride）、藻紅素、四甲基羅丹明異硫氰酸鹽、近紅外螢光材料等螢光物質標識之抗體，在 CLIA 法中，係使用經螢光素酶、螢光素、水母素（aequorin）等發光物質標識之抗體。除此以外，亦可對經金膠體、量子點等奈米粒子標識之抗體進行檢測。

[0041] 此外，在免疫分析中，亦可使抗 free AIM 抗體結合經生物素標識、經酵素等標識之抗生物素蛋白（avidin）或鏈黴抗生素蛋白（streptavidin），而對 free

AIM 進行檢測、測定。

[0042] 在免疫分析之中，使用酵素標識之 ELISA 法可簡便且迅速地對標的進行測定，實屬較佳。

[0043] 在 ELISA 法中，可使用例如夾心法。將抗 free AIM 抗體固定於固相載體，添加經適宜處理之生體試料並使其進行反應後，進一步添加經酵素標識之識別另一抗原決定基之抗 free AIM 抗體並使其進行反應。

洗淨後，藉由與酵素基質進行反應，使其顯色，並測定吸光度，可求出 free AIM 濃度。此外，亦可使固定於固相載體之抗 free AIM 抗體與生體試料中之 free AIM 進行反應後，添加非標識 free AIM 抗體（一次抗體），將對抗此非標識抗體之抗體（二次抗體）進行酵素標識並進一步進行添加。

[0044] 酵素基質在酵素為過氧化酶之情況，可使用 3,3'-二胺基聯苯胺（3,3'-diaminobenzidine, DAB）、3,3',5,5'-四甲基聯苯胺（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB）、鄰苯二胺（o-phenylenediamine, OPD）等，在鹼性磷酸酶之情況，可使用磷酸對硝基苯酯（p-nitrophenyl phosphate, NPP）等。

[0045] 此外，在上述免疫分析之中，作為可簡便地檢測微量的蛋白質之方法，凝集法亦較佳。作為凝集法，可列舉例如使抗體結合至乳膠粒子之乳膠凝集法。

[0046] 若使抗 free AIM 抗體結合至乳膠粒子並混合至生體試料中，則只要 free AIM 存在，抗體結合乳膠粒

子便會凝集。於是，可藉由對試料照射近紅外光，並測定吸光度（比濁法）或測定散射光（比臙法）而對凝集塊進行定量，求出抗原的濃度。

[0047] 在本發明中，free AIM 之檢測或定量可使用能夠特異性地檢測 free AIM 之套組。作為該套組，可列舉例如市售的套組，亦可藉由依照該套組之製品說明書使用而施行。作為該種套組，雖然並不限定於此，但可列舉 Human AIM ELISA kit (CY-8080; Circulex 公司) 等。

[0048] 本發明之方法可進一步包含基於前述源自被驗體之生體試料中之 free AIM 的量而判定為腎疾病之步驟。作為本發明中之 free AIM 的量，只要是前述源自被驗體之生體試料中所包含之前述 free AIM 的濃度或其所對應之定量值或半定量值，即無特別限制。舉例而言，作為本發明中之 free AIM 的量，可列舉直接測定前述 free AIM 的檢測量而得之測定值、經由標識的檢測間接地測定前述 free AIM 的檢測量而得之測定值等。

[0049] 在本發明之方法中之判定步驟中，係將源自被驗體之生體試料中之 free AIM 的量以例如作為對照之健常人的生體試料中之 free AIM 的量為基準值進行比較，在前述源自被驗體之生體試料中之 free AIM 的量較大之情況，可判定為腎疾病。

[0050] 作為對照之健常人係意味預先判明腎疾病未發作之個體。此外，free AIM 的量較大係指相較於為了區別健常人及腎疾病患者而設定之基準值（截止值）而言，

源自被驗體之 free AIM 的量較大。

[0051] 前述基準值可藉由例如將腎疾病患者的生體試料中之 free AIM 的量、及作為對照之健常體群的生體試料中之 free AIM 的量交付予 ROC 解析等而設定。ROC 解析係例如為日本臨床檢查自動化學會會誌「臨床檢查的診斷有用性評估手冊」Ver. 1.3 (2004.9.1), Vol. 29 Suppl. 1 (通卷第 154 號) (2004 年 9 月 1 日發行) 所記載之解析方法，其係能夠評估疾病之檢查方法的檢測能力、診斷能力之解析方法。

此外，基準值亦可定為例如對健常人的檢測水平之平均值加上將標準偏差倍增 2 倍或 3 倍之值所得之值，再者，可適宜定為平衡良好地滿足感度（檢測率）／特異性（偽陽性率低）之值。

[0052] 在另一態樣中，本發明係關於腎疾病之檢查或診斷輔助用套組。本發明所涉及之套組，在本發明之一態樣中，係用於施行上述之本發明所涉及之腎疾病之檢查方法之套組，其係包含抗 free AIM 抗體。在本發明之套組之一實施形態中，抗 free AIM 抗體為特異性地結合至 free AIM 之抗體。

[0053] 該檢查或診斷輔助用套組係包含為了藉由利用 free AIM、與抗 free AIM 抗體之抗原抗體反應之免疫分析來測定生體試料中之 free AIM 濃度所需的試藥及裝置。

[0054] 本發明之套組，在一態樣中，係用於藉由夾

心 ELISA 法來測定 free AIM 濃度者，其係包含微量滴定板；捕獲用抗 free AIM 抗體；經鹼性磷酸酶或過氧化酶標識之抗 free AIM 抗體；以及鹼性磷酸酶基質（NPP 等）或過氧化酶之基質（DAB、TMB、微量滴定板 OPD 等）。

捕獲抗體及標識抗體係識別不同的抗原決定基。

在此種套組之情況，首先，將捕獲抗體固定於微量滴定板，於其中添加經適宜處理並稀釋之生體試料後進行培養，去除試料並洗淨。其次，添加標識抗體後進行培養，加入基質而使其顯色。藉由使用微量滴定板讀數儀等測定顯色，可求出 free AIM 濃度。

[0055] 本發明之套組，在另一態樣中，係用於藉由使用二次抗體之夾心 ELISA 法來測定 free AIM 濃度者，其係包含微量滴定板；捕捉用抗 free AIM 抗體；作為一次抗體之抗 free AIM 抗體；作為二次抗體之經鹼性磷酸酶或過氧化酶標識之對抗於抗 free AIM 抗體之抗體；以及鹼性磷酸酶（NPP 等）或過氧化酶之基質（DAB、TMB、OPD 等）。

捕獲抗體及一次抗體係識別不同的抗原決定基。

在此種套組中，首先，將捕獲抗體固定於微量滴定板，於其中添加經適宜處理並稀釋之生體試料後進行培養，去除試料並洗淨。接著，添加一次抗體並施行培養及洗淨，進一步添加經酵素標識之二次抗體並施行培養後，加入基質而使其顯色。藉由使用微量滴定板讀數儀等測定

顯色，可求出 free AIM 濃度。藉由使用二次抗體，可使反應獲得增幅並提高檢測感度。

[0056] 本發明之套組亦較佳係進一步包含必要的緩衝液、酵素反應停止液、微量板等。

[0057] 標識抗體並不限定於經酵素標識之抗體，亦可為經放射性物質（ ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等）、螢光物質（螢光異硫氰酸鹽、羅丹明、丹磺醯氯、藻紅素、四甲基羅丹明異硫氰酸鹽、近紅外螢光材料等）、發光物質（螢光素酶、螢光素、水母素等）、奈米粒子（金膠體、量子點）等標識之抗體。此外，亦可使用生物素化抗體作為標識抗體，並在套組中加入經標識之抗生物素蛋白或鏈黴抗生素蛋白。

[0058] 作為本發明之診斷用套組之又另一態樣，亦可列舉用於藉由乳膠凝集法來測定 free AIM 濃度者。此套組係包含抗 free AIM 抗體致敏化乳膠，並將生體試料及抗 free AIM 抗體進行混合，以光學方法對集塊進行定量。亦較佳係在套組中包含使凝集反應可視化之凝集反應板。

作為本發明之診斷用套組之又另一態樣，亦可列舉用於藉由電化學發光法來測定 free AIM 濃度者。此套組係包含載持抗 free AIM 抗體之載體，並在添加經適宜處理並稀釋之生體試料並培養後，去除試料並洗淨。其次，加入電化學發光物質（鈦等）標識抗體並培養後，在電極上施予電能而使其發光。藉由計測此發光量，而對 free AIM

濃度進行定量。

[0059] 以下，示出實施例而更具體地說明本發明，但本發明不受以下所示之實施例任何限定。

[實施例]

[0060]

(實施例 1：小鼠抗人類 AIM 單株抗體的製作)

< 動物致敏化 >

將作為抗原之全長人類 rAIM (2 mg/ml) 與等量的 TiterMaxGold (G-1 Funakoshi) 進行混合並製作乳液。使用 Balb/c 小鼠 (Charles River (股)) 8 週齡的雌性 2 隻當作免疫動物，對後足底部投予 50 μ L。在 2 週後施行同樣的投予，再相隔 2 週以上對後足底部投予抗原溶液 50 μ g 並為 3 日後之細胞融合進行準備。

[0061]

< 骨髓瘤細胞 >

使用小鼠 P3U1 當作骨髓瘤細胞，在增殖培養中，係使用在 RPMI1640 (11875-119 GIBCO) 中加入麩胺酸及丙酮酸並以成為 10% 之方式添加 FBS (S1560 BWT 公司) 而得之培養基。作為抗生物質，係適量加入青黴素、鏈黴素。

[0062]

< 細胞融合 >

在麻醉下自經施行心臟採血之小鼠無菌地摘取膝窩淋

巴結，置放於附有 # 200 篩孔之燒杯中，一面以矽棒按壓一面調整細胞懸浮液。細胞係以 RPMI1640 施行 2 次離心洗淨後，計算細胞數。藉由離心收集並洗淨對數增殖期狀態的骨髓瘤細胞後，以淋巴細胞與骨髓瘤細胞之比率成為 5 比 1 之方式進行調整，施行混合離心。細胞融合係使用 PEG1500 (783641 Roche) 施行。即，對細胞團粒澆淋 1 mL 的 PEG 液 3 分鐘並使其進行反應，然後，施行階段性稀釋並以離心洗淨後，加入培養基並每 200 μ L 裝入至 96 孔盤共 15 片，施行 1 週的培養。使用在骨髓瘤細胞用培養基中加入 HAT 補充物 (21060-017 GIBCO) 並使 FBS 濃度成為 15% 者當作培養基。

[0063]

< 小鼠腹水採取 >

將經凍結保存之融合細胞進行解凍，施行增殖培養後，對在 1 週以上之前經腹腔內投予 0.5 ml 的姥鮫烷 (42-002 Cosmobio) 之裸小鼠 (BALB / cAJcl-nu / nu 日本 CLEA) 的腹腔投予 1×10^7 個，在約 2 週後獲得 4 ~ 12 ml 的腹水。以離心處理去除固形物後，施行凍結保存。

[0064]

(實施例 2 : 急性腎障礙患者血清中之血清中 free AIM 的表現)

將健常人 3 例、急性腎障礙 (AKI) 患者 6 例的血清中之 AIM 以使用抗 AIM 抗體之西方墨點法 (Western blot) 進行檢討。將血清在非還原條件下施行 SDS-聚丙稀

醃胺凝膠電泳，將蛋白質轉印於 PVDF 膜（Immobilon，Millipore 公司），與實施例 1 所製作之小鼠抗人類 AIM 單株抗體以 4°C、一整夜施行一次抗體反應。使用 HRP 結合抗小鼠 IgG 抗體當作二次抗體、Luminata Forte Western HRP Substrate（Millipore 公司）作為檢測試藥，以 Image Quant LAS 4000（GE Healthcare）施行訊號的檢測。

[0065] 在非還原條件中，在健常人血清中可檢測到分子量 > 600 kDa 的與 IgM 結合之 AIM，而在 AKI 患者 6 位血清中係除了 IgM 結合 AIM 之條帶以外，尚可檢測到分子量 < 40 kDa 的 free AIM 之條帶（圖 1）。

[0066]

（實施例 3：急性腎障礙患者尿中之 free AIM 的增加）

使用對 AIM 進行定量之 ELISA，測定健常人及 AKI 患者的尿中之 free AIM 濃度。在 AIM ELISA 中，將實施例 1 所製作之小鼠抗人類 AIM 單株抗體固相化於平板，添加患者尿。洗淨後，使 HRP 標識小鼠抗人類 AIM 單株抗體進行反應，藉由 HRP 基質使其顯色。由於在尿中僅存在有 free AIM，故藉由本 ELISA 所檢測之尿中 AIM 為 free AIM。

對健常人 5 例、AKI 患者（急性）5 例、自 AKI 康復之患者（康復）5 例的尿中之 free AIM 濃度進行測定。統計解析係使用 Man-Whitney U test。其結果，尿中之 free AIM 濃度係相較於健常人而言，在 AKI 患者中顯著較高（ $p < 0.001$ ）。此外，顯示出隨著自 AKI 康復，尿中 free

AIM 濃度係降低（圖 2）。

[0067]

（實施例 4：慢性腎臟病患者血清中之血清中 free AIM 的表現）

將健常人 3 例、慢性腎臟病（CKD）患者 13 例的血清中之 AIM 以依照實施例 2 所記載之方法之使用抗 AIM 抗體之西方墨點法進行檢討。在 CKD 患者血清中，除了分子量 > 600 kDa 的 IgM 結合 AIM 之條帶以外，尚可檢測到分子量 < 40 kDa 的 free AIM 之條帶（圖 3）。在本方法中之 CKD 患者中，包含慢性腎炎（慢性絲球體腎炎）、糖尿病性腎病、IgA 腎病、腎硬化症之患者。

[0068]

（實施例 5：CKD 患者血清之 free AIM 濃度）

使用對 free AIM 進行定量之 Human AIM ELISA kit（CircuLex 公司 CY-8080），對健常人 20 例、CKD 患者 15 例的血清中之 free AIM 濃度進行測定。測定係依照套組之操作順序書實施。統計解析係使用 Man-Whitney U test。其結果，free AIM 濃度係相較於健常人而言，在 CKD 患者中顯著地較高（圖 4）（ $p < 0.001$ ）。

〔產業上之可利用性〕

[0069] 藉由使用本發明之方法及／或檢查或診斷輔助套組，可以優異的感度及特異性檢查腎疾病。

201719169

201719169

發明摘要

※申請案號：105123899

※申請日：105年07月28日

※IPC分類：**G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

腎疾病之檢查方法

【中文】

本發明之課題為提供感度及特異性優異的腎疾病之檢測方法或腎疾病的診斷之輔助方法、以及能夠使用於此等方法之套組。

本發明之解決手段為提供包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟之腎疾病之檢測方法或腎疾病的診斷之輔助方法、以及包含結合至 free AIM 之抗體之腎疾病之檢查或診斷輔助用套組。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種腎疾病之檢查方法，其係包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟。
2. 一種輔助腎疾病的診斷之方法，其係包含對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之步驟。
3. 一種對源自被驗體之生體試料中之 free AIM 進行檢測或定量之方法，其係用於檢查腎疾病。
4. 如請求項 1 至 3 中任一項之方法，其中，前述生體試料係選自血清、血漿、全血及尿所組成群組。
5. 如請求項 1 至 4 中任一項之方法，其中，前述腎疾病為急性腎障礙或慢性腎臟病。
6. 如請求項 5 之方法，其中，前述慢性腎臟病為慢性腎炎、慢性腎功能不全、腎病症候群、糖尿病性腎病、腎硬化症、IgA 腎病、高血壓性腎病、膠原病所伴隨之腎病或 IgM 腎病。
7. 如請求項 1 至 6 中任一項之方法，其中，前述檢測或定量為透過免疫分析而得者。
8. 如請求項 7 之方法，其中，前述檢測或定量係藉由使生體試料與結合至 free AIM 之抗體進行接觸而施行。
9. 如請求項 8 之方法，其中，前述檢測或定量係藉由特異性地結合至 free AIM 之抗體施行。
10. 如請求項 8 或 9 之方法，其中，前述檢測或定量

為透過 ELISA 之測定。

11. 如請求項 7 至 10 中任一項之方法，其中，前述檢測或定量係在未將選自血清、血漿或全血之血液試料暴露於蛋白質變性條件且未暴露於還原條件之情形下施行。

12. 一種腎疾病之檢查或診斷輔助用套組，其係包含結合至 free AIM 之抗體。

13. 如請求項 12 之套組，其中，前述抗體為特異性地結合至 free AIM 之抗體。

14. 如請求項 12 或 13 之套組，其中，前述腎疾病為急性腎障礙或慢性腎臟病。

15. 如請求項 14 之套組，其中，前述慢性腎臟病為慢性腎炎、慢性腎功能不全、腎病症候群、糖尿病性腎病、腎硬化症、IgA 腎病、高血壓性腎病、膠原病所伴隨之腎病或 IgM 腎病。

圖式

圖 1

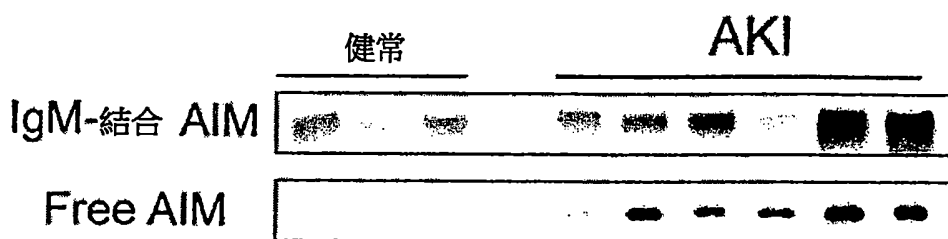


圖 2

