

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7366428号  
(P7366428)

(45)発行日 令和5年10月23日(2023.10.23)

(24)登録日 令和5年10月13日(2023.10.13)

(51)国際特許分類	F I		
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Q
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Z
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	

請求項の数 11 (全12頁)

(21)出願番号	特願2020-539451(P2020-539451)	(73)特許権者	320003264 K A G A M I 株式会社 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7番15号
(86)(22)出願日	令和1年8月26日(2019.8.26)	(74)代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/033364	(74)代理人	100123582 弁理士 三橋 真二
(87)国際公開番号	WO2020/045364	(74)代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(87)国際公開日	令和2年3月5日(2020.3.5)	(74)代理人	100141977 弁理士 中島 勝
審査請求日	令和4年8月19日(2022.8.19)	(74)代理人	100138210 弁理士 池田 達則
(31)優先権主張番号	特願2018-158504(P2018-158504)	(74)代理人	100197169
(32)優先日	平成30年8月27日(2018.8.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乾癬を判定するための皮膚試料の分析方法及びシステム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象において、乾癬を判定するための皮膚試料の分析方法であって、D - セリンの量を指標とする、前記分析方法。

【請求項2】

以下の：

皮膚試料においてD - セリンの量を測定する工程；

D - セリン量の低下と、乾癬とを関連付ける工程

を含む、請求項1に記載の分析方法。

【請求項3】

皮膚試料の内部標準の量を定量し、内部標準の量を用いて、D - セリン量を正規化する工程をさらに含む、請求項1又は2に記載の分析方法。

【請求項4】

前記内部標準が、タンパク質量、遺伝子量、総アミノ酸量、総D - アミノ酸量、総L - アミノ酸量、任意のL - アミノ酸の量、角層重量、からなる群から選ばれる少なくとも1である、請求項3に記載の分析方法。

【請求項5】

前記内部標準が、L - セリン量、又はD , L - セリン量である、請求項4に記載の分析方法。

【請求項6】

D - セリン量の低下が、予め決定されたカットオフ値と比較することで、決定される、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の分析方法。

【請求項 7】

記憶部、入力部、データ処理部、及び出力部を含む、対象において、乾癬を判定するための皮膚試料分析システムであって、

入力部から、乾癬を判定するための皮膚試料中の D - セリンの量のカットオフ値と乾癬の病態情報が入力され、記憶部に記憶し、

入力部から、対象の皮膚試料中の D - セリンの量の測定値が入力され、記憶部に記憶し、データ処理部が、記憶された D - セリンの量の測定値を、記憶されたカットオフ値と比較して、対象の乾癬の病態情報を決定し；

乾癬の病態情報を出力部に出力する

前記皮膚試料分析システム。

【請求項 8】

分析測定部をさらに含み、該分析測定部が、対象の皮膚試料から D - セリンを定量して測定値を決定し、入力部に代わり又は入力部を介して測定値を入力する、請求項 7 に記載の分析システム。

【請求項 9】

入力部から内部標準の量が入力され、データ処理部が、さらに内部標準の量に基づき D - セリン量を正規化する、請求項 7 又は 8 に記載の分析システム。

【請求項 10】

前記内部標準が、タンパク質量、遺伝子量、総アミノ酸量、総 D - アミノ酸量、総 L - アミノ酸量、任意の L - アミノ酸の量、角層重量、からなる群から選ばれる少なくとも 1 である、請求項 9 に記載の分析システム。

【請求項 11】

前記内部標準が、L - セリン量、又は D , L - セリン量である、請求項 10 に記載の分析システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚試料から D - セリン量を指標として乾癬を判定するための皮膚試料の分析方法、乾癬の検査方法、並びに乾癬についての病態情報を出力する試料分析システムに関する。乾癬の判定は、D - セリン量のみならず、D - セリン量から算出されるパラメータを用いて行うことができる。

【背景技術】

【0002】

乾癬は、ケラチノサイトの異常増殖に伴う皮膚角化を伴う炎症性皮膚疾患であり、主に鱗屑で覆われた紅疹を特徴とする。乾癬の原因はいまだ特定されていないものの、遺伝的要因と、複数の要因が寄与すると考えられる。乾癬の治療には、外用療法、光線療法、内服療法、外科療法などが用いられている。特にシクロスポリンなどの免疫抑制剤、TNF - 抗体であるインフリキシマブやアダリムマブなどは治療効果も高いものの、高い薬価のため患者の負担が大きく、乾癬を正確に診断した上でこれらの治療方法を適用することが必要とされている。

【0003】

乾癬の診断は、病変の外観や分布に基づいて行われるが、鱗屑で覆われた紅疹を特徴とする疾患としては、乾癬の他に、類乾癬、ばら色秕糠疹、毛孔性紅色秕糠疹、苔癬状秕糠疹、扁平苔癬、および硬化性苔癬といった異なる皮膚疾患も知られている。また、乾癬の診断には、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、皮膚糸状菌症、皮膚エリテマトーデス、湿疹、扁平苔癬、ばら色秕糠疹、表皮内有棘細胞癌、慢性単純性苔癬、第 2 期梅毒といった疾患との鑑別診断が必要となり、経験を有する医師の判断が必要となる。これまで、TNF - 、IFN - 、IL - 6、IL - 8、IL - 10 及び IL - 12 といった炎症性マ

10

20

30

40

50

ーカーを乾癬マーカーとすることは行われてきている（特許文献1）が、他の炎症性疾患と区別しうる乾癬を特異的に診断できる実用化されたマーカーは存在していなかった。

【0004】

従来、哺乳類の生体には存在しないと考えられていたD-アミノ酸が、検出技術の発達に伴い（特許文献2）、様々な組織において存在することが明らかにされてきており、何らかの生理機能を担うことが予測されていた。D-アミノ酸はタンパク質中にアミノ酸残基として存在する結合型と、組織液や細胞内に溶解する遊離型に大別され、体液中の幾つかの遊離D-アミノ酸は、L-アミノ酸とは独立して含量が変動することが分かっており、疾病の種類に応じて変動することが示された（特許文献3）。また、皮膚においては、D-セリン、D-アラニン、D-グルタミン酸、D-アスパラギン酸が遊離型として存在

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開第2009/093288号

特許第4291628号公報

国際公開第2013/140785号

【非特許文献】

【0006】

【文献】生物工学（2014）、第92巻、第12号第653～656頁

Fragrance Journal (2016), vol. 4, pages 14-18

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従来の熟練の専門医による外観判定や炎症性マーカーなどに基づく乾癬診断に代わり、より乾癬に特徴的な診断マーカーの開発、並びにそれにより乾癬を正確に判定、検査又は診断する技術の開発が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、様々な皮膚疾患の患者の皮膚試料において、キラルアミノ酸の解析をしていたところ、乾癬特異的に、D-セリン量が減少することを見出し、本発明に至った。

【0009】

したがって、本発明は、D-セリン量を指標として乾癬を判定するための皮膚試料の分析方法に関する。本発明によれば、D-セリン量の低下と、乾癬とを関連付けることができる。乾癬の判定は、D-セリン量のみならず、D-セリン量から算出されるパラメータを用いて行うことができる。

【0010】

さらに別の態様では、本発明の分析方法を実施することができる試料分析システムに関する。このような試料分析システムは、記憶部と、入力部と、データ処理部と、出力部とを含んでおり、入力部から皮膚試料の分析結果が入力され、乾癬の病態情報を出力部に出力することができる。

40

【0011】

さらに別の態様では、本発明の試料分析システムにインストールされうるプログラム及び当該プログラムを格納する記憶媒体にも関する。さらに、別の態様では、本発明の試料分析システムを作動させる方法にも関する。

【0012】

さらに別の態様では、本発明は、抗D-セリン抗体を含む、乾癬を判定するためのキットにも関する。

50

**【発明の効果】****【0013】**

従来知られていた炎症性マーカーとは異なる乾癬マーカーを提供することができる。

**【図面の簡単な説明】****【0014】**

【図1】図1は、乾癬患者、アトピー性患者、乾皮症患者の皮疹部と、無疹部とから取得された皮膚試料中におけるD-セリンの割合を示すグラフである。

【図2】図2は、本発明の分析システムの構成図の一例である。

【図3】図3は、乾癬を決定するための動作の例を示すフローチャートである。

**【発明を実施するための形態】****【0015】**

本発明は、皮膚試料中のD-セリン量を指標とする乾癬を判定するための皮膚試料の分析方法に関する。「D-セリン量を指標とする」とは、D-セリン量を判定のための指標として使用する任意の態様を指す。したがって、D-セリン量のみを用いることを意図するものではなく、D-セリン量から算出されるパラメータを用いることを包含する。本発明の分析方法は、具体的には、皮膚試料においてD-セリンの量を測定する工程、及びD-セリン量の低下と乾癬とを関連付ける工程を含む分析方法に関する。本発明の分析方法によって、乾癬を判定できることから、別の態様では、本発明は診断方法ということもできる。

**【0016】**

本発明で、判定できる乾癬は、尋常性乾癬、関節症性乾癬、膿疱性乾癬、滴状乾癬など乾癬に分類するすべての疾患を判定することができる。本実施例では、本発明の分析方法により、乾癬と、炎症性の皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎や、乾皮症との区別が可能であることが示されており、他の炎症性皮膚疾患からも、乾癬を特異的に区別し、判定しうる。

**【0017】**

本発明において、対象とは、任意の対象であってよく、例えば病因不明の皮膚疾患を患う患者について、本発明の分析方法が行われてもよいし、乾癬と臨床診断された患者において、確定診断のために、本発明の分析方法が行われてもよい。

**【0018】**

D-セリンの量を測定する工程は、目的のキラルアミノ酸のみを測定してもよいし、他のキラルアミノ酸とまとめて測定することもできる。また、キラルアミノ酸は、他の疾患の診断マーカーになりうる。したがって、複数の疾患を一度に解析する観点から、他の疾患の診断マーカーとなるアミノ酸、例えば20種のタンパク質構成アミノ酸について、D体及びL体をまとめて測定することが好ましい。特に皮膚には、D-アミノ酸としてD-セリン、D-アラニン、D-グルタミン酸、D-アスパラギン酸が存在することが示されていることから、これらのD-アミノ酸と、対応するL-アミノ酸とをまとめて測定することがより好ましい。

**【0019】**

D-セリンの量を測定する工程の前に、皮膚試料を取得する工程、取得された皮膚試料を処理する工程が行われてもよい。皮膚試料は、皮膚切片や、テープストリップにより取得された角層試料が挙げられる。皮膚試料は、皮疹部から取得されてもよいし、無疹部からとられてもよいが、乾癬の判定の正確度を高めるために、皮疹部から取得されることが好ましい。乾癬の皮疹部は、鱗屑で覆われていることから、鱗屑を除去する目的で複数回テープストリップを行ったうえで、角層試料を取得してもよい。テープストリップにより取得された角層試料は、メタノールなどの溶媒で処理することで、試料に含まれるアミノ酸を抽出することができる。抽出されたキラルアミノ酸を、キラルカラムを用いたHPLCやキラルアミノ酸を検出可能な抗体を用いた免疫学的手法に供して、各キラルアミノ酸量を測定することができる。D-セリン量の測定においてHPLCを用いる場合、キラルカラムの前に別のカラムを用いて、多段階HPLCを行うことができる。多段階HPLC

10

20

30

40

50

は、一例として、カラムでの分離後に、分離された画分をマルチループユニット中に保持し、順次、次のカラムに導入することでおこなわれる。

#### 【0020】

試料中のD-セリン量の測定は、当業者に周知ないかなる方法を用いて実施してもよい。例えば、予めo-フタルアルデヒド(OPA)、N-tert-ブチルオキシカルボニル-L-システイン(Boc-L-Cys)その他の修飾試薬で立体異性特異的にD-及びL-アミノ酸を誘導体化し、その後、ODS-80TsQAのような分析カラムを用いて100mMの酢酸塩緩衝液(pH6.0)とアセトニトリルの混液をグラジエント溶離して分離する方法により、アミノ酸のD-体及びL-体の同時測定に用いることができる。また、予め4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール(NBD-F)のような蛍光試薬でD-及びL-アミノ酸を誘導体化し、その後、ODS-80TsQA、Mighty sil RP-18GP等のような分析カラムを用いて立体異性非特異的に各アミノ酸を分離した後、Pirkle型キラル固定相カラム(例えばSumichiral OA-2500S又はR)を用いて光学分割する方法が、タンパク質を構成するアミノ酸の微量測定に用いることができる(浜瀬健司及び財津潔、分析化学、53巻、677-690(2004))。本明細書における光学分割カラム系は、少なくとも光学分割カラムを用いる分離分析系をいい、光学分割カラム以外の分析カラムによる分離分析を含む場合がある。より具体的に、光学異性体を有する成分を含む試料を、移動相としての第一の液体と共に、固定相としての第一のカラム充填剤に通じて、前記試料の前記成分を分離するステップ、前記試料の前記成分の各々をマルチループユニットにおいて個別に保持するステップ、前記マルチループユニットにおいて個別に保持された前記試料の前記成分の各々を、移動相としての第二の液体と共に、固定相としての光学活性中心を有する第二のカラム充填剤に流路を通じて供給し、前記試料の成分の各々に含まれる前記光学異性体を分割するステップ、及び前記試料の成分の各々に含まれる前記光学異性体を検出するステップを含むことを特徴とする光学異性体の分析方法を用いることにより、試料中のD-/L-アミノ酸濃度を測定することができる(特許第4291628号)。

10

20

#### 【0021】

D-セリン量の測定については、代替的に、D-セリンの光学異性体を識別するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によってD-アミノ酸を定量することができる(特開2009-184981)。具体的に、一例として、D-セリンに結合するモノクローナル抗体と、当該抗体に結合し、標識を有する2次抗体とを用いてELISAの手法により検出することができる。

30

#### 【0022】

D-セリン量の低下と乾癬とを関連付ける工程は、D-セリン量から算出されるパラメータを用いて、乾癬との関連付けを行ってもよい。D-セリン量から算出されるパラメータとして、例えばD-セリン量と、皮膚試料中に含まれる内部標準を用いて、D-セリン量を正規化して得たパラメータを用いることができる。このようなパラメータとして、D-セリンと内部標準の比や割合を算出してもよいし、さらに任意の定数を加減乗除してもよい。皮膚試料、特にテープストリップにより得られた角層試料は、皮膚の状態に応じ、取得できる量が一定にはならない。特に皮疹部では、鱗屑で覆われていることから、どのような手技を用いても、一定量を取得することは困難である。したがって、皮膚試料中の内部標準を用いて正規化することで、皮膚試料の取得の手技にかかわらず安定した結果を得ることができる。

40

#### 【0023】

使用しうる内部標準としては、タンパク質量、遺伝子量、総アミノ酸量、総D-アミノ酸量、総L-アミノ酸量、任意のL-アミノ酸の量、角層重量といった、皮膚試料中に、通常、一定の割合で含まれる物質であれば任意のものを使用することができる。本発明では特に、総L-アミノ酸量や、個別のL-アミノ酸の量を内部標準として用いることが好ましい。さらに好ましくはL-セリンを内部標準として用いることができる。一例として、L-セリン量を内部標準として用いた場合、D-セリン量/L-セリン量や、D-セリ

50

ン% ( = 100 × D - セリン量 / D - セリン量 + L - セリン量 ) を用いることができる。

【0024】

D - セリン量の低下と乾癬とを関連付ける工程において、上述のようにして導いた D - セリン量から算出されるパラメータのカットオフ値と比較することで乾癬の罹患の有無を判定することができる。したがって、判定は、医師ではない医療補助者などにより行われてもよいし、分析機関などが行うこともできる。したがって、本発明の分析方法は、診断の予備的方法又は補助方法ということもできる。

【0025】

本発明の別の態様では、本発明の分析方法は、D - セリン量の低下と乾癬とを関連付ける工程に代わり、乾癬を判定するためのパラメータとして算出する工程を含んでもよい。

10

この分析方法で算出されたパラメータを、予め決定されたカットオフ値と比較することで、乾癬を判定することができる。

【0026】

乾癬の判定のためのカットオフ値は、コホートを解析し、統計処理することで任意に決定することができる。統計処理の手法は、当業者に周知のものを使用すればよく、例えばROC解析、t検定などが用いられてもよいし、健常者群又は乾癬患者群の平均値、中央値、Xパーセンタイル値を使用することもできる。ここでXは任意の数値を選択することができ、3、5、10、15、20、30、40、60、70、80、85、90、95、97を適宜使用することができる。カットオフ値は1つであってもよいし、疾患の重篤度に応じて病態を分類することもできる。また、乾癬以外の皮膚疾患を有する患者群との比較によりカットオフ値を決定することができる。

20

【0027】

本発明の分析方法で乾癬を判定した場合に、乾癬に適した治療が選択して行われる。以下のものに限定されるものではないが、外用療法、光線療法、内服療法、注射療法、外科療法、生活習慣の改善からなる群から選ばれる少なくとも1の乾癬の治療工程がさらに行われる。外用療法としては、ステロイド系の外用剤、免疫抑制剤の外用剤、ビタミンD3およびその誘導体外用剤が挙げられる。光線療法としては、紫外線照射、例えば中波長紫外線(UVB)と長波長紫外線(UVA)の照射が挙げられる。内服療法としては、レチノイドなどのビタミンA誘導体や、ステロイド、シクロスポリンなどの免疫抑制剤、PDE4阻害剤が投与される。注射療法としては、炎症性サイトカインに対する抗体などの抗体医薬が投与される。乾癬の治療工程は、上述のものに限定されることを意図しておらず、医療の進歩に応じて新たな療法及び薬剤が用いられてもよい。

30

【0028】

近年、乾癬は、インターロイキン17を産生するTh17細胞性慢性疾患と考えられるようになっており、その治療には、Th17細胞の活性を抑制する薬剤が用いられている。具体的には、抗TNF-モノクローナル抗体のアダリムマブとインフリキシマブ、抗ヒトIL-12/23p40モノクローナル抗体のウステキヌマブ、抗IL-23p19モノクローナル抗体のグセルクマブ、抗IL-17Aモノクローナル抗体のセクキヌマブとイキセキズマブ、抗IL-17A受容体Aモノクローナル抗体のプロダルマブなどが効果をあげている。一方これらの抗体医薬は、非常に高額であり、その効果が乾癬と誤診されうる皮膚疾患に対しては低いか全くないことが多いため、乾癬を正確に判定又は診断後に行うことが肝要となる。したがって、本発明の方法により、判定又は診断後に、これらの抗体医薬を投与することを含む治療工程を含んでもよい。

40

【0029】

本発明の試料分析システムは、本発明の方法を実施するように構成される。図2は、本発明の試料分析システムの構成図である。このような試料分析システム10は、記憶部11と、入力部12、データ処理部14と、出力部15とを含んでおり、対象の皮膚試料を分析し、病態情報を出力することができる。より具体的に、本発明の試料分析システム10において、

記憶部11は、入力部12から入力された乾癬を判別するための、D - セリン量のカッ

50

トオフ値と乾癬の病態情報を記憶し、

入力部 1 2 から、対象の皮膚試料中の D - セリンの量の測定値が入力され、記憶部に記憶し、

データ処理部 1 4 は、D - セリン量の測定値を、記憶部 1 1 に記憶されたカットオフ値と比較することにより、対象の乾癬の病態情報を決定し、

出力部 1 5 が対象の乾癬についての病態情報を出力することができる。

#### 【 0 0 3 0 】

本発明のさらなる態様では、かかる試料分析システムを作動させるプログラムに関していてもよく、かかるプログラムを記録した媒体にも関する。図 3 は、本発明のプログラムによる乾癬を決定するための動作の例を示すフローチャートである。かかるプログラムは、以下の：

D - セリン量のカットオフ値と、乾癬の病態情報との関連を記憶部 1 1 に記憶させる指令；

入力部 1 2 から、対象の皮膚試料中の D - セリンの量の測定値を読みだして記憶部 1 1 に記憶させる指令；

データ処理部 1 4 を作動させて、記憶部に記憶された D - セリン量の測定値を、カットオフ値と比較させて、対照の乾癬の病態情報を決定させて記憶部 1 1 に記憶させる指令；及び

出力部 1 5 を作動させて、記憶された乾癬についての病態情報を出力させる指令

を含む。このようなプログラムは、記憶媒体に格納されてもよいし、インターネット又は LAN 等の電気通信回線を介して提供されてもよい。

#### 【 0 0 3 1 】

記憶部 1 1 は、RAM、ROM、フラッシュメモリ等のメモリ装置、ハードディスクドライブ等の固定ディスク装置、又はフレキシブルディスク、光ディスク等の可搬用の記憶装置などを有する。記憶部 1 1 は、分析測定部で測定したデータ、入力部 1 2 から入力されたデータ及び指示、データ処理部 1 4 で行った演算処理結果等の他、情報処理装置の各種処理に用いられるコンピュータプログラム、データベースなどを記憶する。コンピュータプログラムは、例えば CD - ROM、DVD - ROM 等のコンピュータ読み取り可能な記録媒体や、インターネットを介してインストールされてもよい。コンピュータプログラムは、公知のセットアッププログラム等を用いて記憶部にインストールされる。

#### 【 0 0 3 2 】

入力部 1 2 は、インターフェイス等であり、キーボード、マウス等の操作部を含む。また、分析測定部 1 3 が外部にある場合は、入力部のインターフェイスを介し、測定したデータ等を直接、又はネットワークや記憶媒体を介して入力することができる。これにより、入力部は、分析測定部 1 3 で測定したデータ、データ処理部 1 4 で行う演算処理の指示等を入力することができる。

#### 【 0 0 3 3 】

本発明の分析システムは、入力部を介して分析測定部 1 3 を備えてもよいし、入力部を介さず分析測定部 1 3 を備えていてもよい。本発明の分析システムが分析測定部 1 3 を備える場合、入力部 1 2 から、対象の皮膚試料中の D - セリンの量の測定値が入力され、記憶部に記憶する工程に代えて、分析測定部 1 3 が、皮膚試料中のキラルアミノ酸の量を測定し、記憶部に記憶する工程を含む。その場合の、プログラムは、分析測定部 1 3 を作動させて、D - セリン量の測定値を決定し、記憶部に記憶させる指令を含む。

#### 【 0 0 3 4 】

分析測定部 1 3 は、キラルアミノ酸の分離及び測定を可能にする構成を有する。アミノ酸は、1 つずつ分析されてもよいが、一部又は全ての種類のアミノ酸についてまとめて分析することができる。分析測定部 1 3 は、以下のものに限定されることを意図するものではないが、例えば試料導入部、光学分割カラム、検出部を備えた高速液体クロマトグラフィシステム (HPLC) であってもよい。かかる HPLC は、光学分割カラムとは別にアミノ酸を分離するカラムを含む 2 次元 HPLC であることが好ましい。分析測定部 1 3

10

20

30

40

50

は、試料分析システム 10 に含まれていてもよい。また、試料分析システム 10 とは別に構成されていてもよく、測定したデータ等をネットワークや記憶媒体を用いて入力部 12 を介して入力されてもよい。

【0035】

データ処理部 14 は、測定されたキラルアミノ酸の量を、記憶部 11 に記憶されたカットオフ値と比較することにより、乾癬を判定するように構成される。データ処理部 14 は、記憶部 11 に記憶しているプログラムに従って、分析測定部 13 で測定され記憶部 11 に記憶されたデータに対して、各種の演算処理を実行する。演算処理は、データ処理部 14 に含まれる CPU によりおこなわれる。この CPU は、分析測定部 13、入力部 12、記憶部 11、及び出力部 15 を制御する機能モジュールを含み、各種の制御を行うことができる。これらの各部分は、それぞれ独立した集積回路、マイクロプロセッサ、ファームウェアなどで構成されてもよい。

10

【0036】

出力部 15 は、データ処理部 14 で演算処理を行った結果である病態指標値及び/又は病態情報を入力するように構成される。データ処理部 14 における演算処理結果は、直接出力部 15 に出力されてもよいし、いったん記憶部 11 に記憶された上で、必要に応じて出力部 15 に出力されてもよい。出力部 15 は、演算処理の結果を直接表示する液晶ディスプレイ等の表示装置、プリンタ等の出力手段であってもよいし、外部記憶装置への出力又はネットワークを介して出力するためのインターフェイス部であってもよい。

【0037】

20

本発明のさらなる態様では、乾癬を判定するためのキットに関していてもよい。かかるキットは、D-セリン検出用の抗体を含み、試料中の D-セリンの検出ができる。D-セリン検出用の抗体として、抗 D-セリン抗体が挙げられ、一例として特開 2009-184981 号公報に記載の抗体を使用する。乾癬患者から得られた試料では、D-セリン量が極めて少ないか、又は存在しないため、D-セリンの存在を検出することで、乾癬の判定が可能である。より好ましい態様では、皮膚試料中に一定量存在する物質の検出を可能にする対照抗体をさらに含む。これにより、D-セリンが検出できていない場合であっても、試料調製の失敗か否かを判定することができる。

【0038】

乾癬を判定するためのキットは、抗体に加えて、テープストリップ用のテープ、及びアミノ酸抽出用の溶媒をさらに含んでもよい。このようなキットは、さらに検出部を備える基材であって、検出部において D-セリンを補足する抗体を固定化した基材さらに含んでもよい。この場合、テープストリップにより取得された角層試料は、アミノ酸抽出用溶媒で処理され、かかる溶液を基材上で展開され、検出部の抗体に D-セリンが補足される。そののちに、補足された D-セリンを検出可能な標識を展開させることで、補足された D-セリンを検出することができる。このような標識として、金コロイドなどで標識された抗体が挙げられる。

30

【0039】

本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

40

【0040】

以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

【実施例】

【0041】

集団及びサンプルの分析

21名の尋常性乾癬患者、31名のアトピー性皮膚炎患者、8名の乾皮症患者の皮疹部と、無疹部とから、テープストリップ法により角層試料を取得した。同様に、対照として

50

42名の健常者の皮膚から角層試料を取得した。乾癬患者の重症度は、軽症8名、中等症7名、重症3名、不明3名であった。角層試料は、 $5.6\text{ cm}^2$ の採取面積の角層テープを用い、同じ個所で3回テープストリップを行い、3枚目の試料を用いた。角層テープに付着した角層試料を、95%メタノール $1500\text{ }\mu\text{l}$ で処理し、超音波処理を行い、 $15000\text{ rpm}$ で10分遠心した。上清を $250\text{ }\mu\text{l}$ 分取し、減圧下で乾固させた。乾固物に対し、 $200\text{ mM}$ ホウ酸ナトリウム水溶液( $\text{pH}8.0$ ) $30\text{ }\mu\text{l}$ を添加し溶解させた。得られた溶液に対し、 $40\text{ mM}$ のNBD-Fアセトニトリル溶液( $5\text{ }\mu\text{l}$ )を添加して、 $60^\circ\text{C}$ で2分間反応させ、2%(v/v)トリフルオロ酢酸水溶液 $90\text{ }\mu\text{l}$ を添加して、2次元HPLC分析に供した。

【0042】

#### 2D-HPLCによるアミノ酸エナンチオマーの測定

アミノ酸のエナンチオマーを、J Chromatogr A 1217, 1056-1062 (2010)やJournal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 877, 2506-2512 (2009)に記載される通りに、マイクロ2D-HPLCプラットフォームを用いて定量した。簡潔に記載すると、アミノ酸のNBD-誘導体を、逆相カラム(モノリシックODSカラム、 $0.53\text{ mm i.d.} \times 100\text{ mm}$ (ML-750)販売元:非売品・資生堂試作品)を用い、MeCN、THF及びTFAを含む水性移動相を用いて勾配溶出した。D体及びL体を分離して測定するために、標的アミノ酸の画分をマルチループバルブを用いて自動的に回収し、そして光学分割カラム(OA2500S-15250,  $1.5\text{ mm i.e.} \times 250\text{ mm}$ )販売元:ダイセル工業)に供した。移動相は、クエン酸又はギ酸を含むMeOH-MeCNの混合溶液であり、そしてNBD-アミノ酸の蛍光を、 $470\text{ nm}$ で励起し、 $530\text{ nm}$ で検出した。全ての定量データを蛍光検出により取得した。HPLC-MS/MSを用いて、実際の生物学的マトリクス中のD-アミノ酸の存在を確認した。

【0043】

試料中におけるD-セリン及びL-セリンの濃度を測定し、下記の式:

【数1】

$$\%D(\text{Ser}) = 100 \times [D\text{-Ser}] / [D\text{-Ser}] + [L\text{-Ser}]$$

に基づいて、D-セリンの含有率を測定した。各疾患における測定結果を、図1に示した。

【0044】

#### 統計処理

健常者と、各疾患の皮疹部と無疹部とに分けて、各群における%D-Serについて、Student's t-testによる群間比較(等分散仮定)を行い、有意差を検証した(表1)。これらの結果は%D(Ser)が健常者と乾癬の区別利用できることを示すだけでなく、乾癬特徴的なパラメータ変動であるためにそのほかの皮膚疾患との鑑別にも有用であることを端的に示している。

10

20

30

40

50

【表 1】

%D(Ser)をパラメータとしたときの Student's t-testによるp値							
VS							
	健常	乾癬 皮疹	乾癬 無疹	アトピー 皮疹	アトピー 無疹	乾皮症 皮疹	乾皮症 無疹
健常	-	0.0000010	0.0000056	0.58	0.79	0.57	0.64
乾癬 皮疹		-	0.24	0.0018	0.010	0.0000025	0.000014
乾癬 無疹			-	0.0043	0.017	0.0000026	0.000069
アトピー 皮疹				-	0.58	0.55	0.59
アトピー 無疹					-	0.86	0.89
乾皮症 皮疹						-	0.95
乾皮症 無疹							-

10

## 【0045】

健常者と乾癬の鑑別はD-Ser量を計算式に含む別の指標でも行うことができる。たとえばD-Ser量を別のアミノ酸量で乗除したパラメータ(ここでは例としてD-Ser/D-Ala)は、健常者と乾癬皮疹部の間に有意な差を認めた。また、D-Ser量を角層面積当たりの量でノーマライズしたパラメータ(D-Ser/cm<sup>2</sup>)も、健常者と乾癬皮疹部の間に有意な差を認めたことから診断、鑑別に有用であることがわかる。

20

【表 2】

D-Ser/D-Alaをパラメータとしたときの Student's t-testによるp値				
	健常	乾癬	アトピー	乾皮症
健常	-	0.0000014	0.57	0.57
乾癬		-	0.0028	0.0000024

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

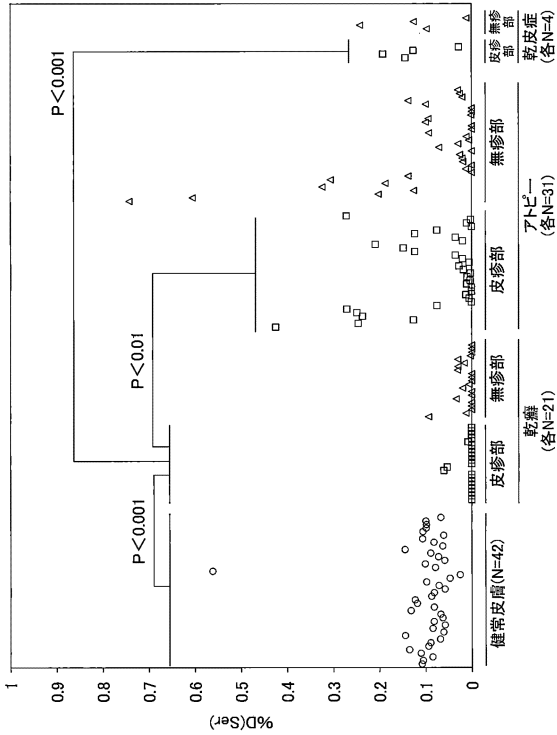


図1

【 図 2 】

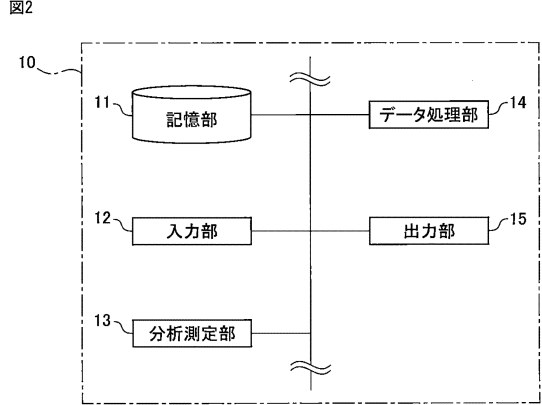


図2

10

20

【 図 3 】

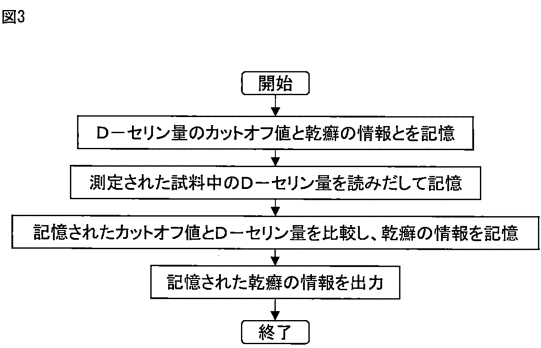


図3

30

40

50

## フロントページの続き

弁理士 柴田 潤二

(72)発明者 東條 洋介

東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内

(72)発明者 水本 智恵子

東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内

(72)発明者 秀 道広

広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学内

(72)発明者 菅 崇暢

広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学内

審査官 小澤 理

(56)参考文献 特開2013-224929(JP,A)

特開2009-184981(JP,A)

特開2015-180198(JP,A)

特許第4291628(JP,B2)

SCHELL, M. J. et al., D-Serine, an endogenous synaptic modulator: Localization to astrocytes and glutamate-stimulated release, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995年, Vol.92, p.3948-3952, ISSN 1091-6490

Advanced Targeting Systems, Anti-Conjugated D.Serine Mouse Monoclonal, カタログ, 2016年, <https://www.atsbio.com/catalog/data/abt175.pdf>

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G01N 33/50

G01N 33/53

C07K 16/44

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPlus/REGISTRY(STN)

Scopus