



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0108487
(43) 공개일자 2024년07월09일

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/577 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
G01N 33/577 (2013.01)
G01N 33/53 (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7020068</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년11월30일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년06월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/044078</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/100910
국제공개일자 2023년06월08일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2021-194361 2021년11월30일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
피에이치씨 주식회사
일본국 에히메켄 도온시 미나미가타 2131-1</p> <p>(72) 발명자
사토 아쓰시
일본국 에히메 7910395 도온시 미나미가타 2131-1, 피에이치씨 주식회사 내
나가하마 유타카
일본국 에히메 7910395 도온시 미나미가타 2131-1, 피에이치씨 주식회사 내</p> <p>(74) 대리인
특허법인 신우</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

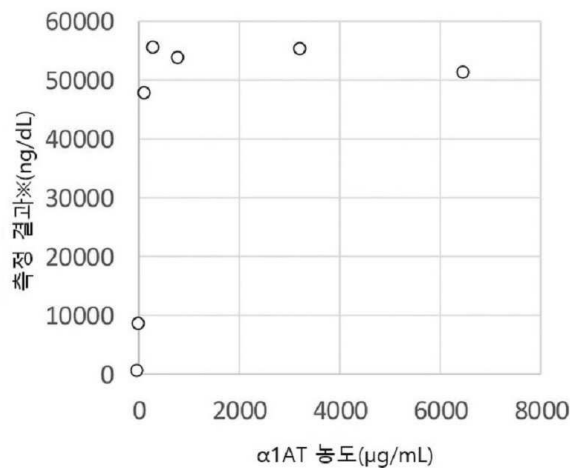
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **분변 중 엘라스테이스 1을 측정하는 방법**

(57) 요약

인간 분변 시료 중에 존재하는 엘라스테이스 1(E1)을 특별한 시설이나 기재를 필요로 하지 않고 대량의 검체에 대응할 수 있도록 간편하게, 긴급 검사에 대응할 수 있도록 단시간에 분석 가능한, 그리고 저농도 영역부터 고농도 영역까지 넓은 범위에 걸쳐 정량적으로 분석 가능한 엘라스테이스 1의 면역 분석용 시약 및 면역 분석 방법을 제공한다. 상기 분석 방법은, (a) 피검자로부터 얻은 분변 시료에 α1-안티트립신(α1AT)을 첨가하는 공정, (b) 상기 분변 시료를 인큐베이팅하고, E1과 α1AT를 반응시키고 복합체를 형성시키는 공정, (c) 상기 EI-α1AT 복합체를 인식하는 면역학적 파트너가 고상된 담체를 포함하는 용액을 상기 분변 시료와 함께 인큐베이팅하는 공정, (d) E1-α1AT 복합체와 면역학적 파트너 간의 반응에 의해 발생한 변화를 분석하는 공정을 포함한다.

대표도 - 도1



※ 측정값에 80배 곱한 것

(52) CPC특허분류
G01N 33/543 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

분변 시료 중에 존재하는 췌장 엘라스테이스 1의 측정 방법으로서,

- (a) 피검자로부터 얻은 분변 시료에 $\alpha 1$ -안티트립신을 첨가하는 공정,
- (b) 상기 분변 시료를 인큐베이팅하고, 췌장 엘라스테이스 1과 $\alpha 1$ -안티트립신을 반응시키고 복합체를 형성시키는 공정,
- (c) 상기 췌장 엘라스테이스 1- $\alpha 1$ -안티트립신 복합체를 인식하는 면역학적 파트너가 고상된 담체를 포함하는 용액을 상기 분변 시료와 함께 인큐베이팅하는 공정,
- (d) 췌장 엘라스테이스 1- $\alpha 1$ -안티트립신 복합체와 면역학적 파트너 간의 반응에 의해 발생한 변화를 분석하는 공정을 포함하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 공정 (a)를 분변 시료를 추출하는 전처리 공정에서 실시하는 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 공정 (a)에서 분변 시료에 $\alpha 1$ -안티트립신을 첨가하기 전에 분변 시료를 희석하는 공정을 포함하는 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공정 (a)에서 분변 시료에 첨가하는 $\alpha 1$ -안티트립신이 20 μg 이상인 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공정 (b)에서 반응 공정에 제공되는 반응액 중에 포함되는 $\alpha 1$ -안티트립신 양이 100 ng 이상인 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 기재된 측정 방법에 의해 췌장 엘라스테이스 1을 분석하는, 췌장 질환의 검출을 보조하는 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공정 (d)에서 실시하는 분석이 화학 발광 면역 측정법, 전기 화학 발광 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 면역 크로마토그래피, 웨스턴 블로팅법, 라텍스 응집법, 면역 비탁법 중 어느 하나인 방법.

청구항 8

췌장 엘라스테이스 1- $\alpha 1$ -안티트립신 복합체를 인식하는 면역학적 파트너를 담지한 고상 담체 및 $\alpha 1$ -안티트립신을 포함하는 면역학적 측정용 시약.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 반응 공정에 제공되는 반응액 중에 포함되는 $\alpha 1$ -안티트립신이 100 ng인 면역학적 측정용 시약.

청구항 10

췌장 엘라스테이스 1 또는 췌장 엘라스테이스 1- α 1-안티트립신 측정용 시약에 제공하는 분변 시료의 전처리 공정에 사용되는, α 1-안티트립신을 포함하는 전처리용 추출액.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 α 1-안티트립신을 41~975 ng 함유하는 전처리용 추출액.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분변 중 엘라스테이스 1(elastase 1)의 면역 분석용 시약 및 면역 분석 방법 및 췌질환의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 췌장의 질환은 각종 검사법이 발달한 현재에도 진단이 어려운 질환이라고 일컬어지고 있다. 그 이유는 췌장이 복강 내의 가장 깊은 안쪽에 위치하기 때문에, 촉진, 시진(視診), 청진 등의 고전적 진단 방법 및 X선 검사 등으로는 질환의 존재 또는 질환의 성질의 파악은 어려운 것, 또한 췌장 질환의 임상 증상이 다른 소화기계 질환과 유사한 것 및 간편하고 확실한 검사법이 없는 것 등이다(특허문헌 1). 특히 췌암은 5년 생존율이 극히 짧아, 예후의 개선에는 조기 발견이 불가결하다고 일컬어지고 있다.

[0003] 췌질환의 진단에 사용하는 생체 표지자(biomarker)로서 췌 효소인 엘라스테이스 1(CELA1; Chymotrypsin-like elastase family, member 1, 이하, 단순히 E1로 칭할 수 있음)이 측정되고 있다. E1은 세린 단백질가수분해효소(Serine protease, 세린 프로티에이스)속에 속하며, 백혈구, 혈소판 및 비장 등에도 존재하는 엘라스테이스와는 면역학적으로 구별된다. E1은 다른 소화 효소와 병행하여 췌장에서 십이지장으로 분비되는데, 췌관의 협착이나 췌염으로 인해 혈중으로 새어나온다. 혈중에서는 그 대부분이 α 1-안티트립신(이하, 단순히 α 1AT로 칭할 수 있음)과 결합해 있어 혈중 농도의 측정이 임상적으로 유용해진다. 특히, 췌장암(특히 췌두부(膵頭部)에 수반되는 췌염을 반영하여 비교적 조기에 높은 빈도로 비정상적으로 높은값을 나타내므로, 췌장 질환의 진단의 지표 또는 경과 관찰에 유용하다(특허문헌 2). 그러나, 침습성이 있는 검사이므로 적극적으로 실시되고 있다고는 하기 어려우며, 혈중 E1에 대한 보고는 많지는 않다.

[0004] E1 분비와 췌장의 라이페이스(lipase), 아밀레이스(amyase) 및 트립신 분비 사이에는 선형 상관 관계가 있으며, 나아가, 십이지장 내에 대한 E1 분비는 분변 중의 E1 농도와 상관 관계를 보인다(특허문헌 3). 췌외 분비 기능 장애는 E1의 분비 저하와 관련되어 있으며, 그 분비 저하의 결과, 변 중의 효소 농도가 저하된다고 생각되기 때문에, E1은 췌외 분비 기능 부전의 진단, 진성 당뇨병, 낭포성 섬유증 및 만성 췌염에 있어서의 췌외 분비 기능의 감시를 위한 마커로서의 사용이 보고되고 있다.

[0005] 인간 분변(糞便) 시료 중에 있어서의 E1을 진단 용도로 사용하는 경우, 그 농도는 췌액 중보다 5 내지 6배 높다는 보고가 있지만, 그 상세한 실태나 췌질환과의 관련에 대해서는 혈중 농도와 분변 중 농도의 어느 것이 가장 적합한지 등 충분히 이해되고 있다고는 할 수 없는 것이 현 실정이다.

[0006] 분변 시료 중의 E1을 정확하게 측정하고 그 실태가 파악되지 않은 이유로서 협잡물의 영향과, 분변 시료의 취급을 들 수 있다. 분변 시료는, 통상적으로 수분, 음식물 찌꺼기, 장 점막 세포, 장내 세포 등을 포함하는데, 체내에 흡수되지 않고 배설되는 성분이나 고체의 협잡물이 많은 것, 또한 배출 상태에 따라 성분이나 형상, pH 등이 다양하다고 하는 특유의 성질을 갖는다. 이 때문에, 측정 결과에 주는 영향도 원인도 다양하며, 분변 시료를 사용한 검사에 있어서 비특이적 반응의 억제 등의 취급에 통상적인 혈액 검체와는 다른 수고를 필요로 한다. 분변 시료의 취급에 대해서는, 예를 들면, Kampanis et al.의 건식 추출법은 인간 분변 중의 엘라스테이스 1의 측정에 관하여 개시하고 있는데, 실제의 취급이 번잡하고 대량의 검체 검사를 실시함에 있어서 현실적인 사용에 적합하다고는 하기 어렵다(비특허문헌 1). 또한, 습식 추출법의 경우, 축축히 젖은 분변 시료 또는 묽은 분변 시료는 건조시킨 다음에 칭량하여 마지막으로 추출 용액으로 희석할 필요가 있는 등 매우 중노동인데다가, 위생상의 문제도 발생시킬 수 있다. 나아가, 추출 방법 사이의 기준 농도의 적용에 관하여 통일이 어렵고 정확한 측

정이 어려운 한 요인도 된다.

[0007] 분변을 임상 검사의 시료로 사용한 경우, 변잡혈(便潛血)로 인한 영향을 고려해야 한다. 변잡혈은 분변 중에 혈액이 포함되는 것을 의미하는데, 장 내의 출혈이나 열창(裂肛, 항문 열창), 생리혈 등으로 인한 영향을 받아 정확하게 측정될 수 없을 수가 있다. 일반적으로 변잡혈 검사에서 양성률은 5~10% 정도로 여겨지고 있는데, 변 중의 공존 물질로 인해 발생할 수 있는 영향에 더하여, 피검자에 따라서는 변잡혈로 인한 혈액 중의 물질로 인한 영향도 검토해야 한다.

[0008] 상기와 같은 상황에서, 인간 분변 시료 중에 있어서의 E1을 정확하게 측정할 수 있는 방법 및 시약의 개발이 기대되고 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 일본 특허공개 소 63-73152호 공보
- (특허문헌 0002) W02002/079782호 공보
- (특허문헌 0003) 일본 특허공개 2017-516088호 공보

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Ann.Clin.Biochem 46:33-7,2009

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 과제는 인간 분변 시료 중에 존재하는 E1을 특별한 시설이나 기계를 필요로 하지 않고 대량의 검체에 대응할 수 있도록 간편하게, 긴급 검사에 대응할 수 있도록 단시간에 분석 가능한, 그리고 저농도 영역부터 고농도 영역까지 넓은 범위에 걸쳐 정량적으로 분석 가능한 E1의 면역 분석용 시약 및 면역 분석 방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 예의 검토를 수행하였다. 그 결과, α1AT를 사용하여 E1과 복합체를 형성시킨 상태에서 인간 분변 시료 중의 E1을 정확하게 측정 가능하다는 것을 깨닫고 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

[0013] 본 발명은 인간 분변 시료 중의 E1을 그 저해제인 α1AT과 복합체를 형성시켜 안정화시킨 상태에서 E1-α1AT 복합체에 대하여 특이적인 모노클로날 항체를 사용한 항원 항체 반응에 의해 분석하는 면역 분석 방법에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 상기 면역 분석 방법에 의해 E1을 분석하는 췌질환의 검출 방법에 관한 것이다.

[0014] 즉, 본 발명은 이하를 제공한다:

[0015] [1] 분변 시료 중에 존재하는 췌장 엘라스테이스 1의 측정 방법으로서,

[0016] (a) 피검자로부터 얻은 분변 시료에 α1-안티트립신을 첨가하는 공정,

[0017] (b) 상기 분변 시료를 인큐베이팅하고, 췌장 엘라스테이스 1과 α1-안티트립신을 반응시키고 복합체를 형성시키는 공정,

[0018] (c) 상기 췌장 엘라스테이스 1-α1-안티트립신 복합체를 인식하는 면역학적 파트너가 고상된 담체를 포함하는 용액을 상기 분변 시료와 함께 인큐베이팅하는 공정,

[0019] (d) 췌장 엘라스테이스 1-α1-안티트립신 복합체와 면역학적 파트너 간의 반응에 의해 발생한 변화를 분석하는 공정을 포함하는 방법.

- [0020] [2] [1]에 있어서, 상기 공정 (a)를 분변 시료를 추출하는 전처리 공정에서 실시하는 방법.
- [0021] [3] [1] 또는 [2]에 있어서, 상기 공정 (a)에서 분변 시료에 $\alpha 1$ -안티트립신을 첨가하기 전에 분변 시료를 희석하는 공정을 포함하는 방법.
- [0022] [4] [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 있어서, 상기 공정 (a)에서 분변 시료에 첨가하는 $\alpha 1$ -안티트립신이 20 μg 이상인 방법.
- [0023] [5] [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 있어서, 상기 공정 (b)에서 반응 공정에 제공되는 반응액 중에 포함되는 $\alpha 1$ -안티트립신 양이 100 ng 이상인 방법.
- [0024] [6] [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 측정 방법에 의해 췌장 엘라스테이스 1을 분석하는, 췌장 질환의 검출을 보조하는 방법.
- [0025] [7] [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 있어서, 상기 공정 (d)에서 실시하는 분석이 화학 발광 면역 측정법, 전기 화학 발광 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 면역 크로마토그래피, 웨스턴 블로팅법, 라텍스 응집법, 면역 비탁법(免疫比濁法) 중 어느 하나인 방법.
- [0026] [8] 췌장 엘라스테이스 1- $\alpha 1$ -안티트립신 복합체를 인식하는 면역학적 파트너를 담지한 고상 담체 및 $\alpha 1$ -안티트립신을 포함하는, 면역학적 측정용 시약.
- [0027] [9] [8]에 있어서, 반응 공정에 제공되는 반응액 중에 포함되는 $\alpha 1$ -안티트립신이 100 ng인 면역학적 측정용 시약.
- [0028] [10] 췌장 엘라스테이스 1 또는 췌장 엘라스테이스 1- $\alpha 1$ -안티트립신 측정용 시약에 제공하는 분변 시료의 전처리 공정에 사용되는, $\alpha 1$ -안티트립신을 포함하는 전처리용 추출액.
- [0029] [11] [10]에 있어서, 상기 $\alpha 1$ -안티트립신이 41~975 ng 함유하는 전처리용 추출액.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 방법인, 인간 분변 시료 중에 존재하는 E1을 측정함으로써 간편하게 췌장 질환의 검출의 보조를 행하는 것이 가능해진다. 인간 분변 시료 중의 E1을 정확하게 측정함으로써 췌외 분비 기능의 감시를 위한 마커로서의 사용이 가능해지고, 치료 방침 결정 등의 유용성이 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 $\alpha 1$ AT 용액 첨가 농도에 대한 E1 농도 측정 결과를 나타낸 도면이다.
 도 2는 E1 샘플의 조제 이론값에 대한 $\alpha 1$ AT 용액 농도별 회수율을 나타낸 도면이다.
 도 3은 복수 개의 측정 시약을 이용하여 $\alpha 1$ AT를 첨가한 경우의 측정값을 비교한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은 인간 분변 시료 중에 존재하는 E1을 $\alpha 1$ AT와 복합체를 형성시킨 상태에서 측정하는 면역 분석 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 인간 분변 시료 중에 존재하는 E1- $\alpha 1$ AT 복합체를 측정하는 면역학적 분석 시약에 관한 것이다.
- [0033] 이하에서 인간 분변 시료 중에 존재하는 E1을 측정하는 방법의 실시 태양에 대하여 상세하게 설명하는데, 이용 방법의 태양은 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 본 발명에는,
 [0034] 분변 시료 중에 존재하는 췌장 엘라스테이스 1을 측정하는, 췌장 질환의 검출 방법;
 [0035] 분변 시료 중에 존재하는 췌장 엘라스테이스 1을 측정하는, 췌장 질환의 검출을 보조하는 방법;
 [0036] 췌장 질환을 검출하기 위하여, 분변 시료 중에 존재하는 췌장 엘라스테이스 1을 측정하는 방법;
 [0037] 분변 시료 중에 존재하는 췌장 엘라스테이스 1을 측정하는, 췌장 질환의 in vitro 검출 방법;
 [0038] 췌장 엘라스테이스 1- $\alpha 1$ -안티트립신 복합체를 인식하는 면역학적 파트너의, 췌장 질환의 검출용 키트의 제조에 있어서의 사용;

- [0039] 채장 질환의 검출에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 분변 시료 중에 존재하는 채장 엘라스테이스 1을 측정하는 방법이 포함된다.
- [0040] 덧붙여, 본 명세서에 있어서 "측정"(넓은 의미)에는 분석 대상물의 양을 정량적 또는 반정량적으로 결정하는 "측정"(좁은 의미)에 더하여, 분석 대상물의 존재 여부를 결정하는 "검출"의 의미가 포함되는 것으로 한다.
- [0041] 본 발명의 측정에 사용하는 시료로는, 인간 유래 분변 시료, 장관 세정액 등을 사용할 수 있다. 분변 시료는 분변 유래 시료인 한 그 구체적인 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 딱딱함(경변, 보통변, 연변, 설사똥, 물찌똥 등) 등의 형상이나 수분의 함유량 등은 불문하고 사용할 수 있다. 장관 세정액이란 장관 내강을 거쳐 회수된 것을 의미하며, 경구로 섭취된 장관 세정제가 장관 내강을 거쳐 회수된 경구 장관 세정액도 포함한다. 장관 세정액은 대상으로부터 배설된 것을 회수할 수도 있고, 대상인 직장에 저장되어 있는 배설 직전의 것을 회수할 수도 있다. 아울러, 본 명세서에서, 측정에 사용하는 "시료"의 의미로 용어 "분변 시료"를 사용하는 경우(예를 들면, 청구항 1)에는, 분변 시료뿐만 아니라, 장관 세정액 등을 포함하는 것으로 한다.
- [0042] 분변 시료는 전처리로서의 E1의 추출 조작이나 불용성 획분의 제거를 행하는 일반적인 기법을 채용하여 사용할 수 있다. 추출 조작에 사용하는 추출액에는 생리 식염수를 사용할 수 있으나, Good's buffer나 인산염 등의 완충제, BSA(Bovine Serum Albumin, 소혈청 알부민) 등의 단백질이나 계면 활성제를 포함한 용액을 사용할 수도 있다. 이 때 완충액의 농도·pH, 계면 활성제나 BSA의 농도 등의 추출액의 각종 조건은 당업자라면 적당히 설정하여 사용할 수 있다.
- [0043] 추출 조작은 상기 추출액을 첨가하여 분변 시료를 충분히 분산시켜 E1을 추출액에 용출시킨다. 이 때, 필요에 따라 호모제네이터나 볼텍스 믹서(vortex mixer)를 사용할 수도 있다. 보다 E1을 용출시키기 위하여, 분변 시료를 추출액에 분산시킨 다음 30분 내지 1시간 정도 정치할 수도 있다.
- [0044] 불용성 획분의 제거에는 원심 분리나 필터 여과를 이용할 수 있다. 원심 분리 조건이나 여과에 사용하는 필터 멤브레인 등은 전처리로 사용 가능한 것이면 특별히 제한되지 않고 사용할 수 있다. 예를 들면 필터를 구성하는 담체로는, 예를 들면, 폴리프로필렌(PP), 폴리불화 비닐리덴(PVDF), 유리 섬유(GF), 폴리테트라설폰(PES), 나일론(NY), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 재생 셀룰로오스(RC), 아세트산 셀룰로오스(CA), 메타크릴레이트 부타디엔스티렌(MBS)을 포함할 수 있다. 또한, 이들 구성요소가 복수 개 조합되어 구성된 하이브리드형일 수도 있다.
- [0045] 이상의 조작은 일반적인 채변 키트를 사용하여 행할 수도 있다. 채변 키트의 예로서, 변잠혈을 위한 채변 키트인 OC-헤모캐치(Hemocatch)(등록상표) S(에이켄 화학사(Eiken Chemical Co., Ltd.) 제조)를 사용할 수도 있다. 또한 전처리 후의 분변 시료는 차갑고 어두운 곳 또는 냉동으로 보존하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 초저온 냉동고(-85 ~ -40℃)를 이용한 보존이며, 측정 시에는 동결한 분변 시료를 용해하여 사용할 수 있다.
- [0046] 이들 추출 조작에 사용하는 추출액에 후술하는 α 1AT를 첨가시키도록 할 수도 있다.
- [0047] 본 발명의 E1을 측정하기 위한 방법은 특별히 제한되지 않으나, E1을 측정할 수 있는 면역학적 파트너를 사용하는 것이 가능하다. 면역학적으로 단백질의 검출을 행하는 방법으로는, 예를 들면, 효소 면역 측정법(ELISA법), 화학 발광 면역 측정법, 전기 화학 발광 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 면역 크로마토그래피 등의 표지 항체를 이용한 면역 측정법, 혹은 웨스턴 블로팅법, 라텍스 응집법, 면역 비탁법 등의 그 자체 공지의 통상 이용되는 방법이면 어떠한 방법이라도 이용할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 사용하는 용어 "면역학적 파트너"란, 측정 대상 물질과 면역학적으로 특이적으로 결합하는 파트너, 예를 들면, 각종 단백질, 다당류, 지질, 핵산, 핵텐 및 그들의 복합체 또는 단편 등과 특이적으로 결합할 수 있는 면역학적 물질(즉, 항원 또는 항체)을 의미한다. 면역학적 파트너가 항체인 경우, 사용하는 항체는 모노클로날 항체일 수도 폴리클로날 항체일 수도 있으며, 그들을 효소 등으로 처리한 단편일 수도 있다. 항체의 단편이란 항체의 항원 결합 영역 또는 그 가변 영역을 포함하는 기능성의 단편인 것이 바람직하며, 예를 들면, F(ab')₂, Fab', Fab 등을 들 수 있다. F(ab')₂, Fab'란 면역 글로블린(Immunoglobulin)을 단백질 분해 효소(예를 들면, 펩신 또는 파파인 등)로 처리함으로써 제조되는 것으로, 인지 영역 중의 2개의 H사슬 사이에 존재하는 디설피드 결합의 전후에서 소화되어 생성되는 항체 단편이다. 또한, 면역학적 파트너는 복수 종류를 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0049] 이하, 예로서 면역학적 파트너로서 항체를 사용하는 경우에 대하여 기재하기로 한다. 본 발명의 방법에서, E1-

α 1AT의 복합체를 측정 대상 물질로 하여 측정을 실시하기 위하여, 사용하는 항체는 E1- α 1AT 복합체를 인식할 수 있는 항체이면 되며, E1을 특이적으로 인식하는 항 E1 항체일 수도 있고, E1- α 1AT와의 복합체를 특이적으로 인식하는 항 E1- α 1AT 복합체 항체일 수도 있다. 항 E1 항체는 E1- α 1AT 복합체를 인식하지 않는 항체가 아니라면, 적당히 선택하여 사용할 수 있다. 사용하는 항체의 수는 E1을 특이적으로 인식하는 항체 한 종류만일 수도 있고, E1을 특이적으로 인식하는 제1 항체, 제1 항체와는 상이한 E1을 인식하는 제2 항체의 조합일 수도 있다. 또한, E1- α 1AT 복합체를 특이적으로 인식하는 항체 한 종류만일 수도 있고, E1- α 1AT 복합체를 특이적으로 인식하는 제1 항체, 제1 항체와는 상이한 E1- α 1AT 복합체를 인식하는 제2 항체의 조합일 수도 있다. 또한, 이들을 조합하여 사용할 수도 있다(이하, 이들을 총칭하여 "항 E1 항체"라고 칭할 수 있음). 특이적으로 결합하는 부위가 상이한 항 E1 항체인 한, 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0050] 항 E1 항체는 예를 들면, E1 또는 E1- α 1AT 복합체의 아미노산 서열의 일부 또는 전부를 포함하는 폴리펩타이드를 면역원으로 하여 제작할 수 있다. 항원 폴리펩타이드는 공지의 방법에 따라 화학적으로 합성된 합성 폴리펩타이드일 수도, 유전자 재조합 등에 의해 생산된 것일 수도 있다.

[0051] 본 발명에 사용하는 항체는 고상 담체 등의 불용성 담체 위에 담지된 고정화 항체로서 사용하거나, 표지 물질로 표지한 표지 항체로서 사용할 수 있다.

[0052] 고정화 항체란 불용성 담체에 물리적 흡착 혹은 화학적 결합 등에 의해 담지된 상태에 있는 항체를 말한다. 이들 고정화 항체는 시료 중에 포함되는 측정 대상 물질을 검출 또는 정량하기 위하여 사용할 수 있다. 항체를 담지시키는 데 사용할 수 있는 불용성 담체로는, 예를 들면, 라텍스, 고무, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 스티렌-부타디엔 공중합체, 폴리염화 비닐, 폴리아세탄산 비닐, 폴리아크릴아미드, 폴리메타크릴레이트, 스티렌-메타크릴레이트 공중합체, 폴리글리시딜메타크릴레이트, 아크롤레인-에틸렌글리콜디메타크릴레이트 공중합체, 폴리비닐리덴디플루오라이드(PVDF), 실리콘(silicone) 등의 폴리머 재료; 아가로스; 젤라틴; 적혈구; 실리카겔, 유리, 비활성 알루미늄, 자성체 등의 무기 재료 등을 들 수 있다. 이들 1종 또는 2종 이상을 조합할 수도 있다.

[0053] 본 발명의 방법에서는, 예를 들면, 항 E1 항체를 라텍스 입자에 담지하여 실시할 수 있다. 그 경우에 사용할 수 있는 라텍스 입자는 통상적인 면역 분석용 시약에 사용 가능한 라텍스 입자인 한 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 폴리스티렌 또는 스티렌-스티렌술폰산염 공중합체 등을 들 수 있다. 라텍스 입자의 평균 입경은 측정 대상물의 검출 농도 또는 측정 기기에 따라 적당히 선택할 수 있으며, 예를 들면, 0.05~0.5 μ m의 입경을 갖는 입자를 사용할 수 있다. 서로 다른 입경의 라텍스 입자를 사용함으로써 특히 낮은 값부터 높은 값까지를 정확하게 분석할 수 있어 바람직하다. 특히, 높은 값 측에서는 고농도 엘라스테이스 1라 하더라도 응집능의 저하로 인한 오인(과도한 고농도로 인해 응집능이 저하되고, 겔보기 상 응집이 감소되어 버려 실제의 값보다 적은 측정 결과가 되어 버리는 소위 프로존(prozone) 현상)을 방지할 수 있기 때문에 바람직하다. 아울러, 본 발명에 있어서 라텍스 입자의 평균 입경이란 전자 현미경에 의해 측정된 값을 의미한다.

[0054] 항 E1 항체를 라텍스 입자에 고정(固相)하는 경우, 예를 들면, E1 또는 E1- α 1AT 복합체에 대하여 서로 다른 특이성을 갖는 2종류의 항 E1 항체를 담지한 서로 다른 입경의 2종류의 라텍스 입자, 바람직하게는, (1) E1 또는 E1- α 1AT 복합체에 대한 제1항 E1 항체를 담지한 제1 라텍스 입자와, (2) 상기 제1항 E1 항체와는 상이한 특이성을 갖는 E1 또는 E1- α 1AT 복합체에 대한 제2항 E1 항체를 담지한, 상기 제1 라텍스 입자와 상이한 입경의 제2 라텍스 입자를 적어도 포함하도록 할 수도 있다.

[0055] 효소 면역 측정법(ELISA법), 화학 발광 면역 측정법, 전기 화학 발광 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 면역 크로마토그래피 등의 표지 항체를 이용한 면역 측정법의 경우, 표지 물질을 사용하는 것이 바람직하다. 표지 물질은, 통상적인 면역학적 측정법에서 사용할 수 있는 표지 물질이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 효소, 형광 물질, 방사성 동위 원소, 불용성 입상 물질 등을 들 수 있다. 그 표지용 효소로는, 알칼리 포스파테이스(Alkaline Phosphatase), 퍼옥시데이스(oxidase), 글루코스옥시데이스, 티로시네이스, 산성 포스파테이스 등을 들 수 있다. 형광 물질로는 플루오레세인이소티오시아네이트(FITC), 그린 형광 단백질(GFP), 루시페린 등을 들 수 있다. 방사성 동위 원소로는 ¹²⁵I, ¹⁴C, ³²P 등을 들 수 있다.

[0056] 또한, 표지 물질이 효소인 경우, 그 효소에 대한 기질을 이용하여 발광, 형광 또는 발색 반응을 행함으로써 표지 물질을 측정할 수 있다. 예를 들면, 효소가 알칼리 포스파테이스인 경우, 기질로는 CDP-star(등록상표)(2-클로로-5-(4-메톡시시피로{1,2-디옥세탄-3,2'-(5'-클로로)-트리시클로[3.3.1.1.3,7]데칸}-4-일)-1-페닐포스페이트·이나트륨), CSPD(등록상표)(3-(4-메톡시시피로{1,2-디옥세탄-3,2'-(5'-클로로)트리시클로[3.3.1.1.3,7]데칸}-4-일)페닐인산 2나트륨), AMPPD(등록상표)(아다만틸메톡시페닐포스포릴디옥세탄), APS-5 등의 화학 발광 기질;

4-메틸움벨리페릴포스페이트(4-methylumbelliferylphosphate) 등의 형광 기질; p-니트로페닐포스페이트, BCIP(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-인산), NBT(4-니트로블루테트라졸륨 클로라이드), INT(요오도니트로테트라졸륨) 등의 발색 기질을 사용할 수 있다.

- [0057] 본 발명의 면역학적 측정 방법은 1액 혹은 2액 이상으로 구성되는 면역학적 측정 시약을 사용하여 실시할 수 있다.
- [0058] 본 발명을 실시하기 위한 시약이 1액으로 구성되는 경우, 예를 들면, 적어도 면역학적 복합체를 형성하기 위한 면역학적 파트너를 담지시킨 불용성 담체를 포함하는 반응 시약으로 이루어질 수 있다. 공지의 방법에 따라 시료를 시약과 반응시키고, 시그널을 검출한다.
- [0059] 분변 시료 중에 존재하는 E1을 직접 정확하게 측정하기는 어렵기 때문에, 본 발명의 측정에서는 E1과 α 1AT로 복합체를 형성시킨 상태에서 측정한다.
- [0060] 본 발명에서 사용하는 α 1AT는 최종적으로 시료와 혼화되는 태양이면 되며, 전처리 공정에 사용되는 전처리 시약에 함유되어 있을 수도 있고, 안정화 시약에 함유되어 있을 수도 있고, 전술한 불용성 담체를 포함하는 시약에 함유되어 있을 수도 있다. 본 발명에서는 분변 시료 중에 존재하는 E1을 정확하게 측정하기 위해서는 일정 농도 범위의 α 1AT를 시료 중 또는 시약에 첨가하는 것이 중요하다는 것을 깨달았다.
- [0061] 본 발명에서 사용하는 α 1AT는 시료와 시약이 반응하기 전에 시료에 첨가되어 있을 수도 있고, 시약에 첨가된 상태로 공급될 수도 있다. 측정 대상 물질인 E1- α 1AT 복합체와 면역 반응이 이루어지는 반응액 중에 포함되어 있으면 되며, 예를 들면, 측정 시료를 미리 희석하는 희석액, 불용성 담체에 결합한 고상화한 항 E1 항체와 측정 시료를 혼합하고 측정 대상 물질인 E1- α 1AT 복합체와 고상화한 항 E1 항체와 반응시키는 시약, 표지 항체와 측정 샘플과 혼합 반응하고 표지 항체와 측정 대상 물질인 E1- α 1AT 복합체와 반응시키는 시약 중 어느 하나 또는 이들 각각의 시약에 첨가할 수도 있다.
- [0062] 사용하는 α 1AT는 인간 체장 유래 엘라스테이스 1과 복합체를 형성하는 것이면 되며, 바람직하게는, 인간 유래 α 1AT가 사용된다. 인간 유래 α 1AT는 혈액 중에 존재하는 α 1AT를 정제한 것일 수 있고, 배양 세포 등을 사용하여 재조합 발현시킨 것일 수도 있으며, 당업자라면 적당히 선택하여 사용할 수 있다.
- [0063] E1과 복합체를 형성시키기 위하여 첨가되는 α 1AT의 양은 E1과 복합체를 형성할 수 있는 충분한 양이 첨가되는 것이 바람직하다. 첨가되는 하한량은 20 μ g 이상이면 되며, 상한량은 시료 중에 포함되는 E1의 양에 따라 적당히 설정할 수 있다. 예를 들면, 하한은 41 μ g 이상이 바람직하고, 49 μ g 이상이 보다 바람직하다. 상한 975 μ g 이하가 바람직하다. 아울러, 상기 하한 및 상한은 적당히 조합할 수 있다.
- [0064] 반응액 중에 포함되는 α 1AT 양의 하한으로는 E1과 복합체를 형성할 수 있는 충분한 양이 존재하고, α 1AT 무첨가 시에 비해 반응성이 확인되는 농도에서 적당히 설정할 수 있으며, 100 ng 이상이면 된다. 예를 들면, 514 ng 이상이 바람직하며, 609 ng 이상이 보다 바람직하다. 또한, 반응액 중에 포함되는 α 1AT 양의 상한은 12188 ng 이하가 바람직하며, 6094 ng 이하가 보다 바람직하고, 5143 ng 이하가 더 바람직하다. 당업자라면 분변 시료 중에 포함된다고 상정되는 E1 농도를 고려한 후에, 측정 시약마다 가장 적합한 첨가량을 결정할 수 있다. 아울러, 상기 하한 및 상한은 적당히 조합할 수 있다.
- [0065] 또한, 측정에 사용하는 시약의 측정 가능 범위에 따라 E1과 α 1AT의 중량비에 따라 첨가할 양을 결정할 수도 있다. 그 경우, 예를 들면, E1 중량에 대하여 6~2400배의 중량의 α 1AT를 첨가함으로써 E1과 α 1AT 간의 복합체를 충분히 형성시키는 것이 가능해지며, 분변 시료 중의 E1 측정을 정확하게 실시할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 시약이 2액 이상으로 구성되는 경우, 예를 들면, 안정화 시약과, 적어도 면역학적 복합체를 형성하기 위한 항체 혹은 항원을 담지시킨 불용성 담체를 포함하는 반응 시약으로 이루어질 수 있다. 안정화 시약은 시료를 적당한 농도로 희석하거나 전처리를 행하는 시약으로, 공지의 방법에 따라 조제할 수 있다. 공지의 방법에 따라 시료를 안정화 시약과 반응시키고, 그 다음 반응 시약과 반응시키고, 시그널을 검출한다. 본 발명에서 사용하는 α 1AT는 시료와 반응 시약이 반응하기 전에 안정화 시약 및/또는 반응 시약에 첨가되어 있을 수도 있으나, 바람직하게는, 해당 안정화 시약 및/또는 그 반응 시약에 첨가된 상태로 공급할 수 있다.
- [0067] 혈중에 존재하는 E1은 그 90% 가까이가 α 1AT와 복합체를 형성하고 있는 것이 알려져 있으며, E1- α 1AT 복합체를 측정함으로써 E1의 측정으로 간주함으로써 임상 검사에 사용되고 있다. α 1AT가 속하는 세프린 수퍼패밀리(Serpin superfamily)의 세린 단백질가수분해효소 저해제는 단백질가수분해효소 분자의 활성 중심의 세린 잔기와 공유 결합으로 연결되어 루프 삽입(loop insertion)에 수반하여 세프린 분자에 강하게 끌어당겨짐으로써 활

성 중심 근방의 구조가 깨지고, 가수 분해에 의한 단백질가수분해효소의 해리가 일어나지 않게 된다고 여겨진다. 이와 같이 E1과 α 1AT는 공유 결합에 의해 연결되어 용이하게 해리되지 않는다고 생각된다. 분변 시료 중에서도 E1과 α 1AT는 복합체를 형성하고 있는 상태에 있다고 생각되고 있었던 바, 분변 시료 중에 α 1AT를 첨가함으로써 E1이 측정 가능해졌다는 것은 뜻밖의 효과였다.

- [0068] 본 발명의 E1 측정 방법을 채장 질환의 검출의 보조를 행하는 방법으로서, 판정용 문턱값(컷오프값)을 산출하기 위한 오리지널 데이터 또는 통계 처리 데이터 등으로서는 분변 시료 중의 E1 농도와 각종 질환 간의 상관 관계를 보이는 통계 데이터 등으로부터 산출된 판정용 문턱값(컷오프값)을 적당히 사용하여 실시할 수도 있다. 당업자라면 채질환과의 관련성으로부터 컷오프값을 적당히 설정하여 사용할 수 있다. 예를 들면, 이들 컷오프값을 산출하기 위한 방법으로는, 예를 들면, E1 농도로부터 ROC 곡선(Receiver Operating Characteristic Curve)을 작성하고 분석을 행하여 진단의 감도와 특이도가 유효한 범위로부터 컷오프값을 설정할 수 있다.
- [0069] 또한, 측정된 E1 농도를 리스크 평가를 위한 값으로 사용하는 것도 가능하다. 채장의 염증이나 채장압 등이 투약 등의 치료에 의해 개선되어 있는지 여부를 판정하기 위한 지표로 삼는 것이 가능하다. 예를 들면, E1 농도가 높은 값을 지속하거나 또는 증가하는 것 같은 경우에는 치료 방침을 재검토할 필요성을 시사한다.
- [0070] 본 발명의 시약은 항 E1 항체 담지 라텍스 입자 이외에도 라텍스 시약에 첨가 가능한 다양한 첨가제, 예를 들면, 완충액, 응집 촉진제(예를 들면, 폴리에틸렌글리콜 등의 수용성 고분자), 비특이적 반응 억제제(예를 들면, 알칼리 금속염 또는 당류 등) 또는 단백질[예를 들면, 소혈청 알부민(BSA)] 등을 추가로 함유시킬 수도 있다.
- [0071] 상기 완충액으로는 pH6~8.5에 완충능을 갖는 완충액이 바람직하다. pH6~8.5의 완충액은 종래 주지의 완충액이며, 예를 들면, 트리스 완충액, 인산 완충액 또는 굿 완충액 등을 들 수 있다.
- [0072] 본 발명의 시약에서, 예를 들면, 트리스 완충액을 사용하는 경우에는, 트리스 완충액 중의 트리스 농도는 그것을 사용할 때 라텍스 응집 반응을 실시하는 계(系)에서 이하에 설명하는 소정의 트리스 농도를 달성할 수 있는 농도인 한 특별히 한정되는 것은 아니나, 0.1~0.5 mol/L인 것이 바람직하다.
- [0073] 라텍스 응집 반응을 실시하는 계에 있어서의 트리스 농도는 라텍스 입자의 자가 응집 반응을 억제할 수 있는 농도인 한 특별히 한정되는 것은 아니며, 공존하는 염, 단백질 및/또는 당류 등의 첨가물의 농도에 따라 적당히 선택할 수 있다. 라텍스 응집 반응을 실시하는 계에 있어서의 트리스 농도는, 0.1~0.5 mol/L인 것이 바람직하고, 0.2~0.3 mol/L인 것이 보다 바람직하다. 0.1 mol/L 미만이면, 라텍스 입자가 자가 응집 반응을 일으킬 수 있고, 0.5 mol/L를 초과하면 항원 항체 반응을 억제해 버려 검출 감도가 나빠질 수 있다. 아울러, 트리스 농도의 상기 하한 및 상한은, 예를 들면, 0.1~0.3 mol/L와 같이 적당히 조합할 수 있다.
- [0074] 또한, 완충액의 pH는 6~8.5인 것이 바람직하다. pH가 이 범위 밖이면, 라텍스 입자가 자가 응집하거나 측정 정밀도의 면에서 문제가 발생할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 시약이 pH6~8.5의 완충액을 함유하는 경우에는, 그 사용 시에 있어서의 라텍스 응집 반응 시에 항체를 담지한 각각의 라텍스 입자, pH6~8.5의 완충액 및 피검 시료가 접촉할 수 있는 한, 시약 중에 있어서의 각각 항 E1 항체 담지 라텍스 입자 및 pH6~8.5의 완충액의 상태는 특별히 한정되는 것은 아니다. 즉, 이 경우, 본 발명의 시약의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 각 항 E1 항체 담지 라텍스 입자와 pH6~8.5의 완충액을 모두 포함하는 1액계의 시약일 수도 있고, 혹은 각 항 E1 항체 담지 라텍스 입자를 포함하는 제1 시약과, pH6~8.5의 완충액인 제2 시약으로 구성되는 2액계의 시약일 수도 있다.
- [0076] 본 발명의 측정 방법에서는, 바람직하게는 pH6~8.5의 조건 하에서 항체를 담지한 각각의 라텍스 입자와 피검 시료를 접촉시킴으로써 항원 항체 반응 및 그에 의해 발생하는 라텍스 응집 반응을 수행시키고, 그 응집 정도를 분석함으로써 피검 시료 중의 E1을 분석할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 측정 방법에서, pH6~8.5의 완충액을 이용하여 pH6~8.5의 조건 하에서 라텍스 응집 반응을 실시하는 경우에는, 각 항 E1 항체 담지 라텍스 입자와, pH6~8.5의 완충액과 피검 시료를 접촉시킬 때에는 pH6~8.5의 완충액 부재 하에서 항원 항체 반응이 진행되는 일이 없는(즉, 각 항 E1 항체 담지 라텍스 입자와 피검 시료를 먼저 접촉시키지 않는) 한, 그 접촉 순서는 특별히 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 각 항 E1 항체 담지 라텍스 입자와 pH6~8.5의 완충액을 미리 접촉시켜 두었다가 그 혼합물과 피검 시료를 접촉시킬 수도 있고, 혹은 피검 시료와 pH6~8.5의 완충액을 미리 접촉시켜 두었다가 그 혼합물과 각 항 E1 항체 담지 라텍스 입자를 접촉시킬 수도 있다.

- [0078] 본 발명의 측정 방법에 있어서의 항원 항체 반응의 조건은, 통상적인 면역학적 라텍스 비탁 분석 방법의 실시 조건과 동일할 수 있다. 예를 들면, 반응의 pH는 6~8.5로 실시하는 것이 바람직하다. 반응 온도는 0~50℃인 것이 바람직하고, 20~40℃가 보다 바람직하다. 반응 시간은 적당히 결정할 수 있으며, 예를 들면, 범용 자동 분석기로는 10~15분 동안에 측정을 완료할 수 있다. 아울러, 반응 온도의 상기 하한 및 상한은, 예를 들면, 0~40℃와 같이 적당히 조합할 수 있다.
- [0079] 항원 항체 반응에 의해 발생한 응집의 정도는 공지의 분석 방법, 예를 들면, 광학적 분석 방법에 의해 분석할 수 있다. 상기 광학적 분석 방법으로는, 예를 들면, 반응액에 광을 조사하여 산란광 또는 투과광을 분석하는 방법을 들 수 있으며, 보다 구체적으로는, 산란광 강도, 흡광도 또는 투과광 강도를 측정하는 광학 기기를 이용하여 분석을 행할 수 있다. 바람직한 측정 파장은 300~800 nm이다. 상기 광학 기기를 이용한 분석에서는, 공지의 방법에 따라, 사용하는 라텍스 입자의 크기 및/또는 농도의 선택 및 반응 시간의 설정에 의해 산란광 강도, 흡광도 또는 투과광 강도의 증가 또는 감소를 측정함으로써 실시할 수 있다. 또한, 이들 방법을 병용하는 것도 가능하다.
- [0080] 본 발명에 의한 체장 질환의 검출 방법에서는 피검 시료로서 혈청 또는 혈장을 사용하고, 본 발명의 측정 방법에 의해 분변 시료 중의 E1을 분석함으로써 체장 질환(특히는 급성 체염)의 검출(진단)을 수행할 수 있다.
- [0081] 이들 사실로부터, 본 발명을 사용하여 인간 분변 시료 중에 존재하는 E1을 신속하고 정확하게 측정하는 것은 체장 질환의 진단의 보조뿐만 아니라, 치료 경과의 모니터링에 있어서 보다 신뢰성이 높은 측정값을 제공하게 되어 극히 유용한 정보를 제공하는 것이 가능해진다.
- [0082] **실시에**
- [0083] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명하는데, 이들은 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [0084] [실시예 1: 변 추출 용액에 대한 α1AT 첨가 실험]
- [0085] 분변 시료 중의 E1 측정 시약으로 아이에트로(iatro) IRE1 II(이하, IRE1, LSI 메디언스사 제조(LSI Medience Corporation))를 사용하고, 변 추출 용액에 α1 안티트립신을 첨가함으로써 아이에트로 IRE1III의 측정값이 얻어지는지를 확인하였다.
- [0086] 인간 혈장 유래 α1AT의 정제품(시그마 알드리치사(Sigma-Aldrich Co. LLC) 제조)을 Tris 버퍼에 용해하고, α1AT의 흡광 계수에 의한 환산으로 0, 16, 130, 325, 813, 3250, 6500 μg/mL의 농도가 되는 α1AT 용액을 조제하였다. 150 μL의 인간 변의 추출 용액(이하, 변 추출 용액)에 조제한 각 농도의 α1AT 용액 150 μL를 가하여 α1AT 첨가 변 추출 용액을 조제하였다. IRE1 시약의 측정 범위에 넣기 위하여, α1AT 첨가 변 추출 용액을 추가로 80배로 희석하였다. 희석에는 시판하는 D-D 다이머 희석액(LSI 메디언스사 제조)을 사용하였다. 80배로 희석한 α1AT 첨가 변 추출 용액을 7180형 히타치 자동 분석 장치(이하, H7180, 히타치 하이테크사(Hitachi High-Tech Corporation.))에 탑재한 IRE1 시약을 사용하여 다중도 2로 측정하였다.
- [0087] 도 1에 변 추출 용액에 첨가한 α1AT 용액의 농도에 대한 IRE1 시약의 측정결과를 나타내었다. 변 추출 용액에 α1AT를 첨가함으로써 IRE1 시약의 측정값이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, α1AT 용액의 농도가 325~3250 μg/mL일 때 최대를 나타내었다. 실험 조건 중에서 최대 농도인 6500 μg/mL에서는 측정값이 3250 μg/mL에 비해 7.5%의 저하가 보였지만, E1 측정에 사용하기 위해서는 충분한 회수율인 것이 확인되었다. 이 때 측정 공정에 제공된 시료 중에 첨가된 각 α1AT 양은 49, 122, 488, 975 μg인데, 80배 희석되어 측정에 제공되고 있기 때문에 실질적으로 609, 1523, 6094, 12188 ng이 된다. 이로부터, α1AT를 첨가함으로써 변 추출 검체에서 IRE1 시약의 측정값이 얻어지는 것을 확인하였다.
- [0088] [실시예 2: α1AT 용액 농도의 검토]
- [0089] IRE1 시약의 측정 레인지인 80~4000 ng/dL에 있어서의, 첨가하는 α1AT의 지극히 적합한 농도를 검토하고, 이후의 실험에서 사용하는 α1AT 용액 농도를 결정하였다.
- [0090] 인간 체장액으로부터 정제한 엘라스테이스 1을 인산 버퍼를 사용하여 E1의 흡광 계수에 의한 환산으로 14, 57, 142, 285, 571 ng/mL의 농도가 되는 E1 샘플을 조제하였다. α1AT도 동일하게 인산 버퍼를 사용하여 α1AT의 흡광 계수에 의한 환산으로 171, 875, 3429, 8571, 17143, 34268 ng/mL의 농도가 되는 α1AT 용액을 조제하였다. 150 μL의 E1 샘플에 α1AT 용액 150 μL를 가하여, E1-α1AT 혼합 용액을 조제하였다.
- [0091] H7180에 IRE1 시약을 탑재하고, E1-α1AT 혼합 용액을 다중도 3으로 측정하였다. 571 ng/mL의 E1 샘플 1과

34268 ng/mL의 α1AT 용액 1의 혼합 용액의 측정값을 E1 샘플 1의 조제 이론값(3778 ng/dL)으로 하였다. 각 E1 샘플의 조제 이론값은 E1 샘플 1로부터의 희석 배율로부터 설정하였다.

[0092] 도 2에 각 E1 샘플의 조제 이론값에 대한, α1AT 용액 농도별 회수율을 나타내었다. 조제 이론값이 378~3778 ng/dL인 E1 샘플 1~4에서는 α1AT 농도가 3429~34286 ng/mL인 α1AT 용액 1~4에서 90% 이상의 회수율이 보였다. 조제 이론값이 94 ng/dL인 E1 샘플 5에서는 α1AT 농도가 3429~17143 ng/mL인 α1AT 용액 2~4에서 최대인 87.6%를 나타내었고, 34286 ng/mL α1AT 용액에서는 69.7%의 회수율로, E1 측정으로서는 충분한 회수율인 것이 확인되었다. IRE1 시약의 측정 레인지인 80~4000 ng/dL가 되는 E1 농도를 대상으로 하였을 때, α1AT 농도 3429~17143 ng/mL가 조제 이론값에 대한 회수율로서 양호하다. 구체적으로는, E1의 회수율이 70% 이상이 되는 경우의 α1AT의 첨가량은 각각 514, 1286, 2571, 5143 ng이었다. 그 때문에, 이후의 실험에서는 잠정적으로 8600 ng/mL를 α1AT 용액의 농도로 사용하고, 1290 ng이 측정에 제공되는 시료 중에 포함되도록 하였다.

[0093] [실시예 3: IRE1 시약과 fPELA 시약의 비교 실험]

[0094] IRE1 시약을 사용하여 α1AT를 첨가하는 평가계와 기존의 변 중 엘라스테이스 1 LTX 시약의 반응성을 비교하였다.

[0095] 기존의 변 중 E1 측정 시약으로 fPELA turbo(이하, fPELA, BUHLMANN사 제조)를 사용하였다.

[0096] 인간 췌장액으로부터 정제한 E1과 인산 버퍼를 사용하여 E1의 흡광 계수에 의한 환산으로 14, 57, 142, 285, 571 ng/mL의 농도가 되는 E1 샘플을 조제하였다. α1AT도 동일하게 인산 버퍼를 사용하여 α1AT의 흡광 계수에 의한 환산으로 8600 ng/mL의 농도가 되는 α1AT 용액을 조제하였다. 조제한 각 E1 용액 200 μL와 α1AT 용액 200 μL를 혼합하여 E1-α1AT 혼합 용액을 조제하였다.

[0097] 자동 분석 장치 cobas c501(이하, c501, Roche사 제조)에 탑재한 fPELA 시약을 사용하여 각 E1 샘플과 E1-α1AT 혼합 용액, IRE1 시약의 표준품, IRE1 시약의 대조군(control)을 다중도 2로 측정하였다.

[0098] H7180에 탑재한 IRE1 시약을 사용하여 E1-α1AT 혼합 용액을 다중도 2로 측정하였다.

[0099] 도 3에 IRE1의 값에 대한 각 E1 샘플과 E1-α1AT 혼합 용액, IRE1 시약의 표준품, IRE1 시약의 대조군의 fPELA 시약의 측정값을 표시(plot)하였다. IRE1 시약에 있어서의 E1-α1AT 혼합 용액의 측정값과 fPELA 시약으로 E1 샘플을 측정하였을 때의 값은 농도 의존적으로 양호한 선형이 얻어졌다. fPELA 시약에서는 E1-α1AT 혼합 용액을 측정하면, E1 용액을 그대로 측정하였을 때보다 측정값이 저하되었다. fPELA 시약의 E1-α1AT 혼합 용액의 측정값은 IRE1 시약의 표준품이나 대조군을 측정한 값에 가까웠다. IRE1 시약의 표준품 및 대조군에서는 E1은 α1AT와의 복합체로서 포함되어 있으며, fPELA 시약은 α1AT의 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 분변 시료의 경우에는 변잡혈이 보이는 검체인 경우가 있으며, 혈중의 α1AT가 혼입되어 측정값에 영향을 줄 가능성이 있으나, E1-α1AT 복합체를 인식하는 시약을 사용하면, 변잡혈이 보이는 검체라도 측정값이 영향을 받지 않는 것이 확인되었다.

[0100] E1-α1AT 복합체를 인식하는 IRE1 시약의 측정값과 E1을 인식하여 측정하는 fPELA 시약의 측정값이 상관되므로, 분변 시료에 α1AT를 첨가하여 측정하여 얻어진 결과가 신뢰성이 있는 데이터인 것이 확인되었다.

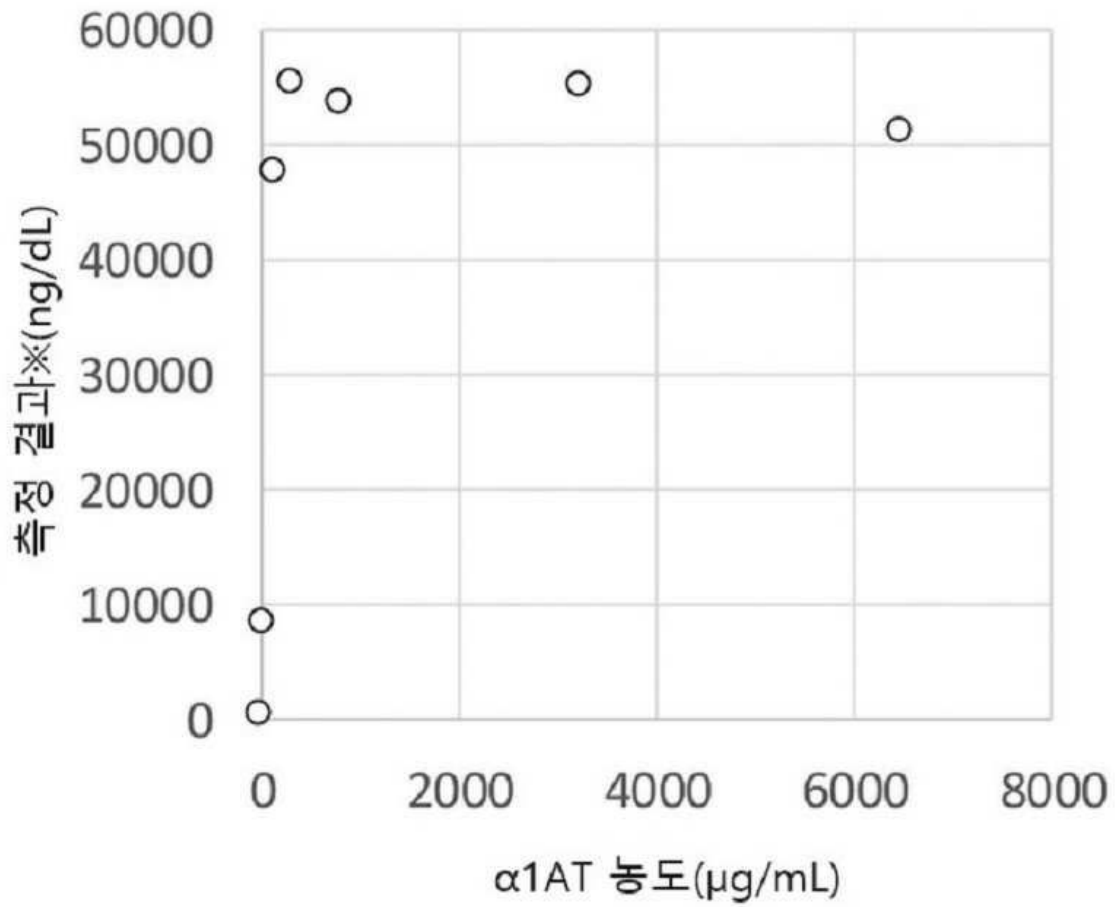
산업상 이용가능성

[0101] 본 발명의 측정 시약 및 측정 방법을 사용함으로써, 측정 방해 물질의 영향을 받지 않고 분변 시료 중의 E1의 농도 측정이 가능해지고, 췌장 질환의 진단에 보조로 사용할 수 있다.

[0102] 또한, 건강한 사람의 분변 시료 중의 E1 농도를 정확하게 파악할 수 있으므로, 췌장 질환의 진단뿐만 아니라, 적절한 치료법의 선택이나 치료 효과의 모니터링, 예후 예측으로 사용함으로써 신뢰성이 높은 측정값을 제공하게 되어 진료에 극히 유용한 정보를 제공할 수 있다.

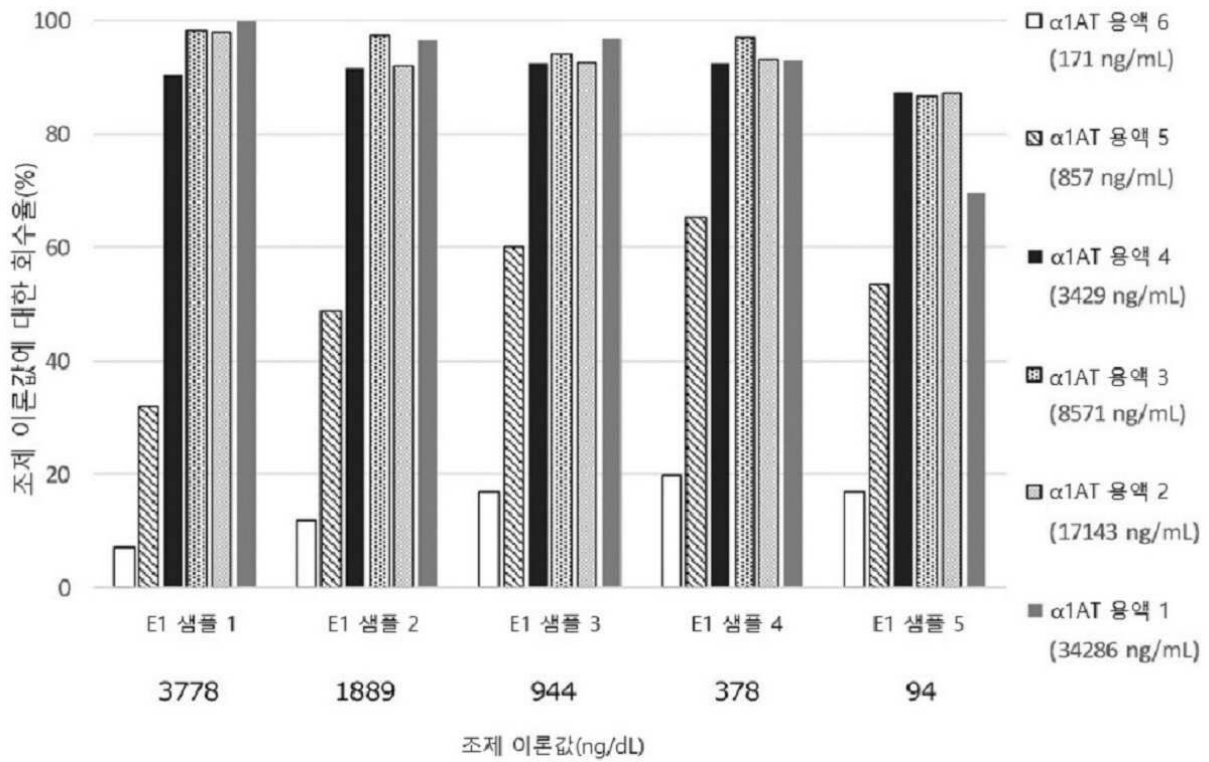
도면

도면1



※ 측정값에 80배 곱한 것

도면2



도면3

