

(19)日本国特許庁(J P)

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 324506

(P2001 - 324506A)

(43)公開日 平成13年11月22日(2001.11.22)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	W

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 6 数)

(21)出願番号 特願2000 - 143493(P2000 - 143493)

(22)出願日 平成12年5月16日(2000.5.16)

(71)出願人 000141875

株式会社いかがく

京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地

(72)発明者 内田 壱夫

京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地

株式会社いかがく内

(72)発明者 真柴 新一

京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地

株式会社いかがく内

(74)代理人 100085316

弁理士 福島 三雄 (外2名)

(54)【発明の名称】 血液中の変性リポ蛋白の検出方法および動脈硬化症の診断用キット

(57)【要約】

【課題】 より有効な動脈硬化症の診断用キットを提供する。

【解決手段】 リポ蛋白が酸化変性されてなる変性リポ蛋白(変性リポ蛋白:酸化リポ蛋白を含む)と急性相反応物質、血液凝固・線溶系関連蛋白、もしくはマクロファージなどの炎症細胞が産生する殺菌物質との複合体を抗4-ヒドロキシ-2-ノネナル(HNE)抗体を用いて検出する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 リポ蛋白が酸化変性されてなる変性リポ蛋白（変性リポ蛋白：酸化リポ蛋白を含む）と急性相反応物質、血液凝固・線溶系関連蛋白、もしくはマクロファージなどの炎症細胞が産生する殺菌物質との複合体を抗4-ヒドロキシ-2-ノネナル(HNE)抗体を用いて検出する方法。

【請求項2】 1-アンチトリプシン、フィブリノーゲン、C-reactive protein (CRP)、フィブロンectin、

1-アンチキモトリプシン、1-アシドグリコプロテイン、補体成分などの急性相反応物質と変性リポ蛋白との複合体を測定対象とする請求項1に記載の変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項3】 組織因子、プラスミノゲン、プロトロンビン、トロンビン、アンチトロンビン3、プラスミンアクチベーターインヒビター1などの凝固・線溶系関連蛋白と変性リポ蛋白との複合体を測定対象とする請求項1に記載の変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項4】 ミエロペルオキシダーゼ、ラクトフェリン、リゾチーム、塩基性蛋白などのマクロファージをはじめとする炎症細胞が産生する殺菌物質と変性リポ蛋白との複合体を測定対象とする請求項1に記載の変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項5】 酵素免疫法、ラテックス凝集法、免疫発光分析法、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用いる請求項1～4に記載の変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項6】 2-マクログロブリン/LDL複合体、Serum amyloid A (SAA)とLDLの複合体（軽度酸化リポ蛋白）、及び、4-ヒドロキシ-2-ノネナルを含有する変性リポ蛋白（強度酸化変性リポ蛋白）を分別測定するようにした変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項7】 抗4-ヒドロキシ-2-ノネナル(HNE)抗体と酵素をはじめとする標識物質を標識した抗ヒトApoB抗体もしくは、抗ヒトApoA1抗体などの免疫反応検出試薬を用いる請求項2～4に記載の変性リポ蛋白検出方法

【請求項8】 マウス骨髄腫細胞と、4-ヒドロキシ-2-ノネナル(HNE)が1アンチトリプシンで修飾された、4-ヒドロキシ-2-ノネナル修飾1アンチトリプシンで免疫された哺乳類の脾臓細胞とを融合させて得られるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であって、nativeな1アンチトリプシンや血漿蛋白には反応せず、変性リポ蛋白に含まれる4-ヒドロキシ-2-ノネナルを特異的に認識するモノクローナル抗体を用いる請求項2～4に記載の変性リポ蛋白検出方法。

【請求項9】 請求項2～4に記載のいずれかの変性リポ蛋白中の4-ヒドロキシ-2-ノネナルに特異的に結合する抗体と免疫反応検出試薬とを含むことを特徴とする動脈硬化症の診断用キット。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】酸化変性リポ蛋白は、急性相反応物質、血液凝固・線溶系関連蛋白、及び炎症細胞が産生する殺菌物質と複合体を形成して存在するが、本発明は、変性リポ蛋白と各種蛋白との複合体中に、4-ヒドロキシ-2-ノネナルが産生されている複合体（強い酸化）と、産生されていない複合体（弱い酸化）が存在することを発見し、抗4-ヒドロキシ-2-ノネナル抗体を用いて強い酸化度の変性リポ蛋白を特異的に検出するようにしたものである。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】酸化変性を受けた低密度リポ蛋白は、マクロファージのスカーベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれる。大量の低密度リポ蛋白コレステロールを取り込んだマクロファージは泡沫化して、粥状動脈硬化病変の形成に重要な役割を果たしていることが知られている。即ち、酸化低密度リポ蛋白（酸化LDLと略記する）が粥状動脈硬化症の発症に直接関連する物質であるとみなされている。また、最近では酸化HDLの存在が確認され、(Nakajima, Tほか. Ann Clin Biochem, 37: 179-186, 2000)酸化LDL同様に動脈硬化症の発症に直接関連する物質であるとみなされている。

【0003】故に、循環血液中で酸化変性リポ蛋白の情報が得られれば、動脈硬化症のメカニズムの解明や、治療薬の薬効評価、臨床検査への応用面での活用が期待できる。但し、血液中の酸化変性リポ蛋白の実態については、ほとんど不明であり、本発明者らの特願平8-317162号、特許平11-109001、特願平11-207913号、特願2000-012210に開示した手法によって明らかになりつつあるのが実情である。

【0004】ところが、上記の各発明は、それぞれの測定対象が多岐にわたっており、それぞれを別々に測定することによる煩雑さがあった。ここで、これら多種類の複合体に共通する性質を見出すことができれば極めて有効である。この発明は、このような実情に鑑みてなされたものであって、より実用的で有効な動脈硬化症の診断方法並びに診断用キットを提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決する手段】上記の課題を解決するべく、本発明者らが、血液中から単離、精製したLDL中の酸化変性LDLと各種蛋白との複合体およびHDL中の酸化変性HDLと各種蛋白との複合体の物性を解析した結果、酸化変性リポ蛋白には酸化の程度が異なる、弱い酸化変性リポ蛋白（2マクログロブリンや Serum amyloid A (SAA)と酸化変性リポ蛋白との複合体など）と強度酸化変性リポ蛋白（1アンチトリプシン、フィブリノーゲン、CRP、ラクトフェリン、ミエロペルオキシダーゼと酸化変性リポ蛋白との複合体など）が存在し、特に強度酸化変性リポ蛋白は血管内壁で形成されるとともに、強度酸化変性リポ蛋白中には4-ヒドロキシ-2-ノネナルが形成さ

れていることが特徴的であることを見出した。

【0006】そして、その後、更なる研究と検討を繰り返した結果、循環血液中にはリポ蛋白の表層部に存在するリン脂質のみ酸化状態にある変性リポ蛋白が弱い酸化変性リポ蛋白であって、血中濃度も比較的高く（全リポ蛋白の1~2%）、この変性リポ蛋白は動脈硬化症の危険因子であると考えられること、さらにリポ蛋白の核（コア）に存在するエステル型コレステロールの脂肪酸も酸化されて4-ヒドロキシ-2-ノネナルが形成された、強度酸化リポ蛋白（血中濃度は弱い酸化変性リポ蛋白の数百分の一と非常に少ない）が存在し、この変性リポ蛋白が動脈硬化症のマーカーとなりうる事実を発見し、本発明に至った。

【0007】即ち、特願平8-317162号、および特願2000-012210号の手法を発展させて、血液中の変性リポ蛋白の検出方法を確立して本発明を完成させたものである。特願2000-012210号の2-マクログロブリン/LDL複合体およびSerum amyloid A (SAA)とLDLの複合体（軽度酸化リポ蛋白：動脈硬化症危険因子）と本発明の4-ヒドロキシ-2-ノネナルを含有する変性リポ蛋白（強度酸化変性リポ蛋白：動脈硬化症のマーカー）を分別測定することにより、動脈硬化症の早期診断や動脈硬化症治療薬投与時の薬効評価などがより適切に出来る。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明について具体的に説明する。

1. 各種脂質酸化剤による酸化LDLと1アンチトリプシン複合体形成時の4-ヒドロキシ-2-ノネナル生成との関係性

LDLと1-アンチトリプシンを実例として用いて、各種酸化剤による酸化時に於ける、酸化LDL/1アンチトリプシン複合体形成状態と形成された酸化LDL中の4-ヒドロキシ-2-ノネナル生成量との関係性について検討した。結果は図1に示すごとく、いずれの酸化剤酸化によっても酸化LDL/1アンチトリプシン複合体が形成されるが、4-ヒドロキシ-2-ノネナルの生成は、水溶性酸化剤を用いた時のみ生成されにくいことが分かった。これは表層部のリン脂質のみが酸化状態にあると考えられる。

【0009】2. 各種蛋白/LDL複合体と4-ヒドロキシ-2-ノネナル/LDLとの関係性

多数の臨床検体（血清）を用いて、各検体のLDL画分中の各種蛋白/LDL複合体（1アンチトリプシン/LDL複合体、SAA/LDL複合体、CRP/LDL複合体、2マクログロブリン/LDL複合体、フィブリノーゲン/LDL複合体、ミエロペルオキシダーゼ/LDL複合体、アルブミン/LDL複合体を実例として用いた）と同一のLDL画分中の4-ヒドロキシ-2-ノネナル量を測定し（抗4-ヒドロキシ-2-ノネナル抗体を固相抗体として用い、標識抗体として抗ヒトapoB抗体を用いたELISA）、その関係性を検討したとこ

ろ、図2に示すごとく、1アンチトリプシン、CRP、フィブリノーゲン、ミエロペルオキシダーゼの各蛋白と酸化LDLとの複合体と4-ヒドロキシ-2-ノネナル濃度間に関係性が強く、SAA/LDL、2マクログロブリン/LDL、アルブミン/LDL複合体においては、4-ヒドロキシ-2-ノネナル濃度と関係性を示さなかった。

【0010】3. 臨床検体のLDLおよびHDL画分中の4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有リポ蛋白（LDL, HDL）中に含まれる各種蛋白の同定

10 高脂血症を呈する臨床検体（血清）のLDLおよびHDL画分を超遠心法により分離し、これを抗4-ヒドロキシ-2-ノネナル抗体アフィニティカラム処理して、4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有LDLおよびHDL画分を単離精製した。この4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有LDLおよびHDL中に含まれる各種微量蛋白をSDS-PAGE後、化学発光法による各種蛋白免疫染色を行ったところ、4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有LDLおよびHDL中には、1アンチトリプシン、フィブリノーゲン、ラクトフェリン、ミエロペルオキシダーゼ、CRPの存在を確認した。

【0011】4. 4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有LDLの検出例

1) 抗1アンチトリプシン修飾4-ヒドロキシ-2-ノネナルモノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl (0.15M NaClを含む、pH8.0)緩衝液に10μg/mlの割合で加え、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。

2) 4下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Tris-HCl緩衝液（pH7.5）を10μl/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250μl/wellで3回洗浄する。

【0012】3) マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアアルブミン溶液を100μl/well分注し、これに試料（PBSで5倍希釈した血清）あるいは標準液を50μl添加する。

4) 37下で1.5時間反応させる。

5) 0.005%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

6) ビオチン標識Fab'化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6μg/mlとしたものを100μl/well分注する。

7) 37で1.5時間反応させる。

8) 5)と同様に0.005%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

9) HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100μl/well分注する。

【0013】10) 37下で30分間反応させる。

11) 0.005%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。

12) 過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100μl/well分注し、室温下30分間反応させる。

13) 1Mリン酸水溶液を100  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

14) 主波長450nm、副波長630nmで測光する。

15) 人工的に調整した変性LDL (酸化LDL) により求めた検量線から試料中の4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有変性LDL (酸化LDL) 濃度を算出する。

【0014】5. 4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有HDLの検出例

1) 抗 1アンチトリプシン修飾4-ヒドロキシ-2-ノネナルモノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl (0.15M NaCl)を含む、pH8.0) 緩衝液に10  $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに100  $\mu$ l/wellで分注する。

2) 4 下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) を10  $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4 下で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250  $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3) マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma Globulin と Goat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を20 100  $\mu$ l/well分注し、これに試料 (PBSで5倍希釈した血清) あるいは標準液を50  $\mu$ l添加する。

【0015】4) 37 下で1.5時間反応させる。

5) 0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

6) ピオチン標識Fab'化IgG-apoA1/ポリクローナル抗体 (DAKO) を1%BSA溶液で1.6  $\mu$ g/mlとしたものを100  $\mu$ l/well分注する。

7) 37 下で1.5時間反応させる。

8) 5) と同様に0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

9) HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100  $\mu$ l/well分注する。

\* 【0016】10) 37 下で30分間反応させる。

11) 0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

12) 過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100  $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13) 1Mリン酸水溶液を100  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

14) 主波長450nm、副波長630nmで測光する。

15) 人工的に調整した変性HDL (酸化HDL) により求めた検量線から試料中の4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有変性HDL (酸化HDL) 濃度を算出する。

【0017】6. 血液中4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有酸化変性リポ蛋白濃度と血清脂質 (コレステロール、HDLコレステロール) 濃度との関係性

図3A,Bに血中4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有酸化LDL、酸化HDL濃度と血清脂質濃度の関係性を示した。いずれの酸化変性リポ蛋白においても、高脂血症に4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有酸化変性リポ蛋白が高濃度を呈する頻度が高いことを認めた。

【0018】7. 血液中に存在する2種の酸化変性LDLの存在様式とその臨床的意義 (仮説) 酸化変性LDLを実例として、血液中に存在する酸化程度の異なる変性リポ蛋白の存在様式とその臨床的意義を図4に示した。

【図面の簡単な説明】

【図1】各種酸化剤による酸化LDLの複合体形成の検討と4-ヒドロキシ-2-ノネナル生成量との関係性を図示したものである。

【図2】各種蛋白/LDL複合体とHNE/LDL (高度過酸化LDL) との関係性を図示したものである。

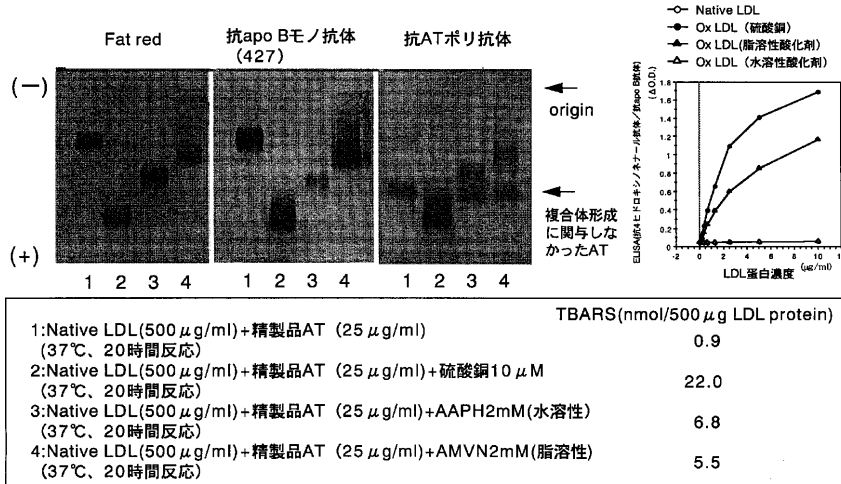
【図3】血中4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有酸化LDL、酸化HDL濃度と血清脂質濃度の関係性を図示したものである。

【図4】血液中に存在する酸化程度の異なる変性リポ蛋白の存在様式とその臨床的意義を示したものである。

【図1】

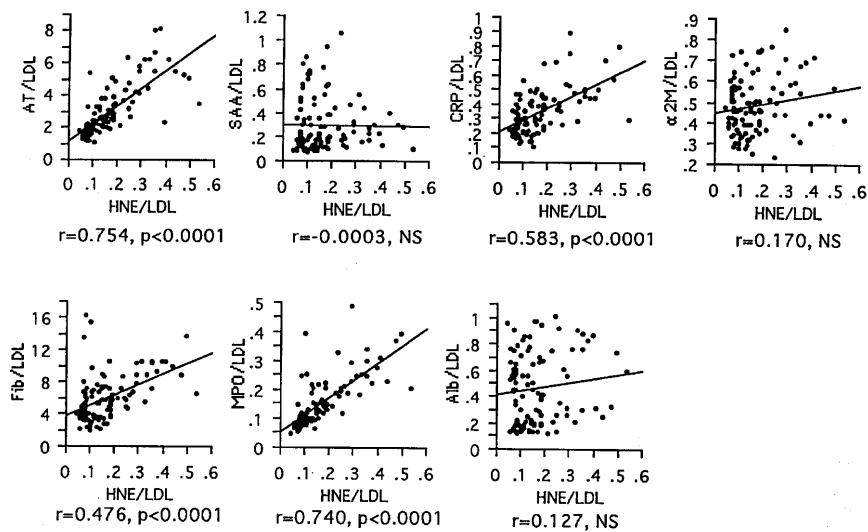
各種脂質酸化剤による酸化LDLの複合体形成の検討  
および4ヒドロキシノネナル生成の確認

(アガロース電気泳動からの脂質染色および免疫染色)



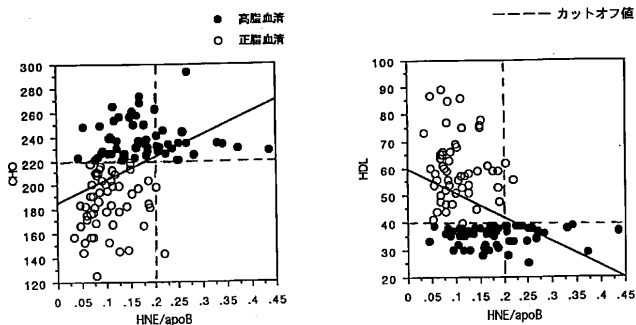
【図2】

各種蛋白/LDL複合体とHNE/LDL(高度過酸化LDL)との関係性

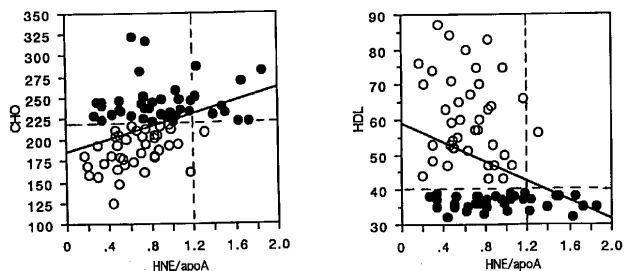


【図3】

A 血液中4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有酸化変性LDL濃度と  
血清脂質（コレステロール、HDLコレステロール）濃度との関係性

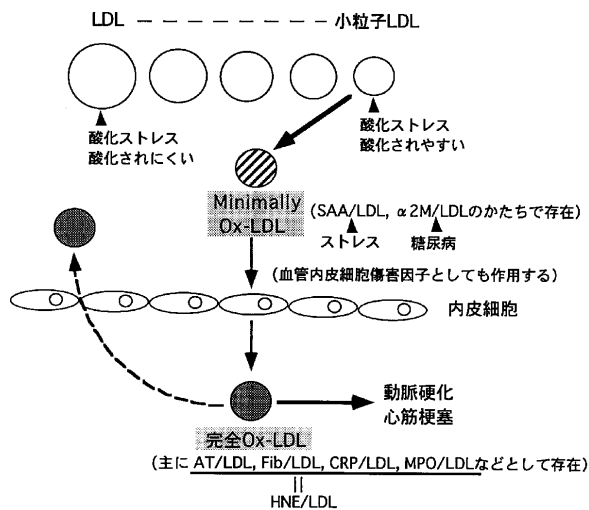


B 血液中4-ヒドロキシ-2-ノネナル含有酸化変性HDL濃度と  
血清脂質（コレステロール、HDLコレステロール）濃度との関係性



【図4】

血中には性質の異なる2種類のOx-LDLが存在する  
(Minimally oxidized LDLは血管内壁にとりこまれ完全酸化LDL  
となって動脈硬化の原因になる)



Minimally Ox-LDL : 動脈硬化の危険因子? (SAA/LDL,  $\alpha$ 2M/LDL)

完全Ox-LDL : 動脈硬化のマーカ-? (HNE/LDL)

专利名称(译)	检测血液中变性脂蛋白的方法和用于诊断动脉硬化的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001324506A</a>	公开(公告)日	2001-11-22
申请号	JP2000143493	申请日	2000-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	IKAGAKU		
申请(专利权)人(译)	株式会社いかがく		
[标]发明人	内田 壹夫 真柴 新一		
发明人	内田 壹夫 真柴 新一		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.W		
其他公开文献	JP3507407B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供更有效的试剂盒来诊断动脉硬化。 解决方案：变性脂蛋白（变性脂蛋白：包括氧化脂蛋白）是由脂蛋白，急性期反应性物质，凝血/纤溶系统相关蛋白的氧化变性或由巨噬细胞等炎性细胞产生的杀菌作用形成的 使用抗4-羧基-2-壬烯（HNE）抗体检测与该物质的复合物。

【図1】

各種脂質酸化剤による酸化LDLの複合体形成の検討  
および4ヒドロキシノネナル生成の確認

(アガロース電気泳動からの脂質染色および免疫染色)

