

(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2002 - 48790

(P2002 - 48790A)

(43)公開日 平成14年2月15日 (2002.2.15)

(51) Int.Cl ⁷	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	D
	33/543	501	33/543	K
				H

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 5 数)

(21)出願番号 特願2000 - 236154(P2000 - 236154)

(22)出願日 平成12年8月3日 (2000.8.3)

(71)出願人 000141875

株式会社いかぐ

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

株式会社いかぐ内

(74)代理人 100085316

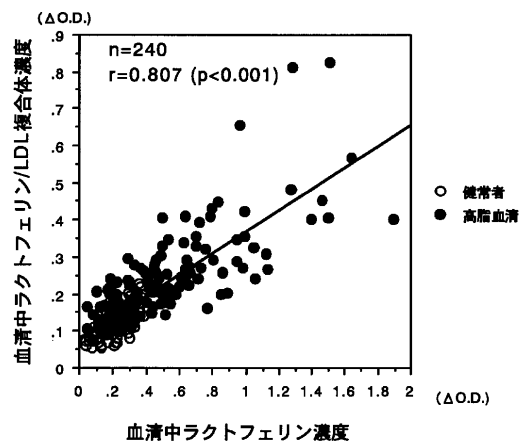
弁理士 福島 三雄 (外2名)

(54)【発明の名称】 動脈硬化性病変の診断用キット

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 動脈硬化性病変の発症・進展に関わる酸化LDLを血中で簡便に検出する方法を提供する。

【解決手段】 血清もしくは血漿中に存在する酸化LDLと複合体を形成するクラトフェリンまたはミエロペルオキシダーゼまたは顆粒球エラストラーゼなどの血清もしくは血漿中の好中球、単球/マクロファージなどの、炎症細胞由来成分を免疫学的方法により測定し、これに基づいて血清もしくは血漿中に存在する酸化LDL量を検知することにより動脈硬化性疾患を診断する。



血清中ラクトフェリン濃度と血清中ラクトフェリン/LDL濃度との関係性

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血清もしくは血漿中の好中球、単球/マクロファージなどの、炎症細胞由来成分を測定対象とすることを特徴とする動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項2】 血清もしくは血漿中のラクトフェリンまたはミエロペルオキシダーゼまたは顆粒球エラスターゼを測定対象にすることを特徴とする請求項1に記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項3】 採血時、静脈血中における好中球、単球の活性化に対する防止策をほどこした状態で採取した血清もしくは血漿中のラクトフェリンまたはミエロペルオキシダーゼまたは顆粒球エラスターゼを測定対象とすることを特徴とする請求項1、または請求項2に記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項4】 好中球、単球の活性化を防止するために、血液1ml当り、EDTA-2Kもしくは、EDTA-3Kを5mg以上添加して採取した血漿中のラクトフェリンもしくはミエロペルオキシダーゼまたは顆粒球エラスターゼを測定対象とする請求項1、請求項2、請求項3に記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項5】 酵素免疫法やラテックス凝集反応法、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ことを特徴とする請求項1または請求項2、請求項3、請求項4に記載の動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項6】 少なくとも、抗ヒトラクトフェリン抗体と、酵素標識抗ヒトラクトフェリン抗体と、前記酵素測定用の試薬とを備え、免疫学的測定法によって血清または血漿中のラクトフェリン濃度を測定して動脈硬化性病変を診断することを特徴とする動脈硬化性疾患の診断用キット。

【請求項7】 少なくとも、抗ヒトミエロペルオキシダーゼ抗体と、酵素標識抗ヒトミエロペルオキシダーゼ抗体と、前記酵素測定用の試薬とを備え、免疫学的測定法によって血清もしくは血漿中のミエロペルオキシダーゼ濃度を測定して動脈硬化性病変を診断することを特徴とする動脈硬化性疾患の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、動脈硬化性疾患の診断方法に関し、特に血清もしくは血漿中のラクトフェリンやミエロペルオキシダーゼもしくは顆粒球エラスターゼを測定することによって動脈硬化性病変を診断する方法に関する。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】動脈硬化症は大動脈、冠動脈、脳動脈および頸動脈に多く発生し、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。従来、血液中ですべての生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する測定対象がなく、血清中あるいは血漿中のLDL、リポ蛋

白(a)、レムナントリポ蛋白、酸化LDLなどが血管壁脂質蓄積と関わりの深い、動脈硬化性病変に関わる新規なリポ蛋白として測定されてきた。なかんずく、酸化LDLと粥状動脈硬化病変の進展との関連性がスタインバーグ(Steinberg, D. et al. Engl. J. Med. 320: 915, 1989)らにより指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化LDLの関与が注目されてきた。

【0003】その後、スカベンジャー受容体(Kodama T, et al. Nature343: 531, 1990)など酸化を受けたLDLに対する受容体の存在が明らかにされ、酸化LDLがこれらの受容体を介して、マクロファージに取り込まれることによって、泡沫細胞となり粥腫形成のきっかけとなるという仮説、また、酸化LDLが血管内皮細胞を障害することで、血小板の粘着凝集や白血球の遊走集結、血漿成分の血管内壁への浸潤がおこり、さらには血管平滑筋細胞の内膜への遊走や増殖を促進する作用も伴い、複雑な病変に進行し、血管の内腔を狭めるという仮説が提唱されている。

【0004】この酸化LDLが動脈硬化病巣に存在するかどうかについての検討は、Herberlandら(Science241: 215, 1988.)や、Yla-Herttulaら(Clin. Invest. 84: 1086, 1989.)が、マロンジアルデヒドを用いて人工的に修飾したLDLを抗原として得た抗体で動脈硬化病巣部が染色されることを確認している。一方、本発明者らが先に発見した酸化LDL/1アンチトリプシン複合体(特願平8-317162号)も動脈硬化病巣部に存在することを確認した(Mashiba S, et al. Atherosclerosis: 151, 54, 2000)。

【0005】その後、本発明者らは、フィブリノーゲンもしくはフィブリンと酸化LDL複合体の存在の発見(特願平11-207913号)をはじめ、数多くの種類の蛋白と酸化LDLとの複合体が動脈硬化病巣部および血液中に存在することを発見した(特願2000-12210号)。

【0006】しかし、血液中の酸化LDLと1アンチトリプシン複合体、酸化LDLとフィブリノーゲンもしくはフィブリン複合体をはじめする、酸化LDLと各種蛋白との複合体を測定することによって、動脈硬化性病変の診断をするには、血液試料中からまずLDL画分を超速心法や、デキストラン硫酸/カルシウムイオンを用いたLDL分画法によって得る繁雑な操作が必須であった。したがって、本研究は、動脈硬化性病変の発症・進展に関わる酸化LDLを血中で簡便に検出する方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者は血液中に存在する酸化LDLと各種蛋白との複合体の存在様式を丹念に調べた結果、血清もしくは血漿中に存在するラクトフェリンやミエロペルオキシダーゼ、顆粒球エラスターゼなどの炎症細胞由来成分は酸化LDLと複合体を形成したもののみであることを発見して、血液中の酸化LDL

Lの簡便な検出方法を確立し、本発明を完成させたものである。

【0008】すなわち、血清もしくは血漿中に存在する上記炎症細胞由来成分は、酸化LDLと複合体を形成したのみであるから、これを測定対象とすれば簡易に動脈硬化疾患を検出することが可能となる。測定対象は、好ましくは、採取した血清もしくは血漿試料中のラクトフェリンもしくはミエロペルオキシダーゼもしくは顆粒球エラスターゼである。

【0009】但し、好ましくは、好中球や単球の活性化を防止する必要がある、その点に関する更なる検討研究の結果、本発明者は、採血時に過剰のEDTAを添加することによって高精度の測定が可能となることを見出した。血液1ml当たりの添加量は、好ましくはEDTA-2K又はEDTA-3Kを5mg以上、より好ましくは5mg~50mgであり、更に好ましくは10mg~20mgである。このような措置を講じることによって、静脈血中の炎症細胞を活性化することなく、確実に、血中に存在する酸化LDL量を知ることが可能となる。

【0010】

【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。

[血清もしくは血漿中ラクトフェリンの測定]

1. 試料の準備

採血後、室温で30分以内放置条件下で遠心分離して得られた血清もしくは、採血時、血液1ml当り12mgの割合でEDTA-2KまたはEDTA-3Kを加えて採取した血液を遠心分離して得た血漿を試料とする。

【0011】2. ELISAによる血清もしくは血漿中ラクトフェリン測定操作抗ヒトラクトフェリン抗体を固相化した各ウェルに上述の方法で得た血清もしくは血漿を50μl分注し、混和した後、37℃で1時間反応させる。次にマイクロプレートをTween 20を0.05%含むトリス-塩酸緩衝液(0.05M pH7.5)で3回洗浄する。その後、酵素標識抗ヒトラクトフェリン抗体2.5μg/mlおよび1%の牛血清アルブミンを含むトリス-塩酸緩衝生理食塩水(0.1M pH8.0)を100μlずつ分注し、混和した後、37℃で1時間反応させる。

【0012】次にマイクロプレートをTween 20を0.05%含むトリス-塩酸緩衝液(0.05M pH7.5)で3回洗浄する。その後、Kind-King法の基質緩衝液100μlを各ウェルに加え、37℃で30分間反応させる。ここで基質緩衝液は、Disodium Phenyl phosphate0.215gと4-aminoantipyrine 0.09gを炭酸緩衝液(0.05M pH10.15)100mlに溶解したものである。

【0013】次いで、100μlの呈色液を各ウェルに加えて、呈色させる。ここで呈色液は、200mlの脱イオン水に2.6gのホウ酸を溶解させた後、0.38gのPotassium Ferricyanideを溶解させたものである。最後に、各ウェルの呈色をマイクロプレート用比色計を用いて510/630nm

の波長で比色し検量線から血清または血漿中ラクトフェリン濃度を算出する。

【0014】[血清もしくは血漿中ミエロペルオキシダーゼの測定] 上述のラクトフェリン測定時と同様の方法で採取した血清もしくは血漿を試料とする。抗ヒトミエロペルオキシダーゼ抗体を固相化した各ウェルに血清または血漿を50μl分注し、混和した後、37℃で1時間反応させる。次にマイクロプレートをTween 20を0.05%含むトリス-塩酸緩衝液(0.05M pH7.5)で3回洗浄する。その後、酵素標識抗ヒトミエロペルオキシダーゼ抗体2.5μg/mlおよび1%の牛血清アルブミンを含むトリス-塩酸緩衝生理食塩水(0.1M pH8.0)を100μlずつ分注し、混和した後、37℃で1時間反応させる。

【0015】次にマイクロプレートをTween 20を0.05%含むトリス-塩酸緩衝液(0.05M pH7.5)で3回洗浄する。その後、Kind-King法の基質緩衝液100μlを各ウェルに加え、37℃で30分間反応させる。ここで基質緩衝液は、Disodium Phenyl phosphate0.215gと4-aminoantipyrine 0.09gを炭酸緩衝液(0.05M pH10.15)100mlに溶解したものである。

【0016】次いで、100μlの呈色液を各ウェルに加えて、呈色させる。ここで呈色液は、200mlの脱イオン水に2.6gのホウ酸を溶解させた後、0.38gのPotassium Ferricyanideを溶解させたものである。最後に、各ウェルの呈色をマイクロプレート用比色計を用いて510/630nmの波長で比色し検量線から血清または血漿中ミエロペルオキシダーゼ濃度を算出する。

【0017】[血清中ラクトフェリン濃度とラクトフェリン/LDL複合体濃度の関係性] 健常者群〔血清コレステロール濃度 220mg/dl以下、血清中性脂肪 150mg/dl以下、血清HDLコレステロール 40mg/dl以上と血清脂質3項目全てがこの条件を満たす〕120例、高脂血症群〔血清コレステロール221mg/dl、血清中性脂肪 151mg/dl以上、血清HDLコレステロール 39mg/dl以下の3条件を全て満たす〕120例を対象に両群間の血清中ラクトフェリン濃度と血清中ラクトフェリン/LDL複合体濃度の関係性を見たところ、図1に示すごとく、相関係数 $r=0.804$ ($p<0.001$)と良好な相関を示した。

【0018】また、血清中ラクトフェリン濃度と血清中ラクトフェリン/LDL複合体濃度について両群間の平均値の有意差検定を行ったところ、図2に示すごとくラクトフェリン、ラクトフェリン/LDL複合体のいずれにおいても高脂血症群が有意な高値を示した。

【0019】[血清中ラクトフェリン濃度とミエロペルオキシダーゼ濃度の関係性および血清中ラクトフェリン/LDL複合体濃度と血清中ミエロペルオキシダーゼ/LDL複合体濃度の関係性] 無作為に選んだ80例の血清中のラクトフェリン濃度とミエロペルオキシダーゼ濃度の関係性をみたところ、図3に示すごとく $r=0.933$ ($p<0.0001$)と良好な相関性を示した。また同じ血清中のラクトフェ

リン/LDL複合体濃度とミエロペルオキシダーゼ/LDL複合体濃度との関係性についても $r=0.957$ ($p<0.0001$) と良好であった(図4)。

【0020】[健常者群と冠動脈疾患群における血清中のラクトフェリン濃度] 健常者(n=22)と冠動脈疾患群(n=22)について血清中ラクトフェリン濃度を比較した結果、図5に示すごとく血清中ラクトフェリン濃度は冠動脈疾患群において有意に高値を示した。

【図面の簡単な説明】

【図1】血清中ラクトフェリン濃度と血清中ラクトフェリン/LDL濃度との関係性を図示したものである。

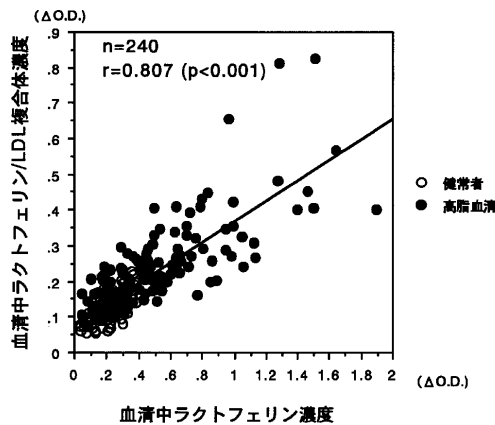
*【図2】健常者群と高脂血症者群における血清中のラクトフェリン及びラクトフェリン/LDL複合体濃度の比較を示したものである。

【図3】血清中ラクトフェリン濃度とミエロペルオキシダーゼ濃度の関係性を図示したものである。

【図4】血清中ラクトフェリン/LDL複合体濃度とミエロペルオキシダーゼ/LDL複合体濃度の関係性を図示したものである。

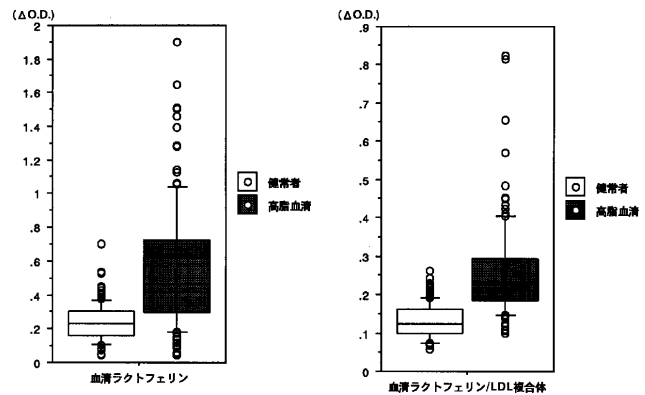
【図5】健常者及び冠動脈疾患患者血清中のラクトフェリン/LDL複合体濃度を図示したものである。

【図1】



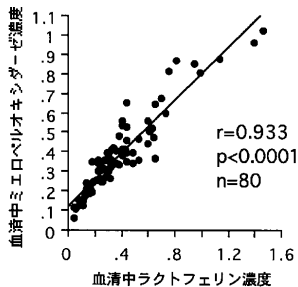
血清中ラクトフェリン濃度と血清中ラクトフェリン/LDL濃度との関係性

【図2】



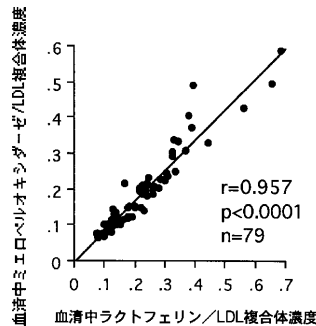
健常者群、高脂血症者群血清中のラクトフェリンおよびラクトフェリン/LDL複合体濃度の比較

【図3】



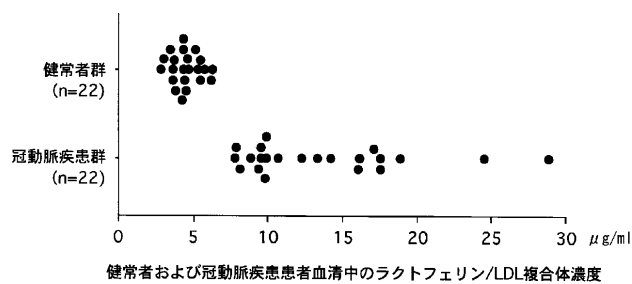
血清中ラクトフェリン濃度とミエロペルオキシダーゼ濃度の関係性

【図4】



血清中ラクトフェリン/LDL複合体濃度とミエロペルオキシダーゼ/LDL複合体濃度の関係性

【図5】



专利名称(译)	用于动脉硬化病变的诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP2002048790A	公开(公告)日	2002-02-15
申请号	JP2000236154	申请日	2000-08-03
[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		
发明人	内田 壹夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.K G01N33/543.501.H		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 要解决的问题: 提供一种容易检测与血液中动脉硬化病变的发生和发展有关的氧化LDL的方法。 解决方案: 炎性细胞来源的成分, 例如血清或血浆中的中性粒细胞, 单核细胞/巨噬细胞, 例如claferferrin或髓过氧化物酶或粒细胞弹性蛋白酶, 与血清或血浆中存在的氧化的LDL形成复合物。 通过免疫学方法进行测量, 并以此为基础, 通过检测血清或血浆中氧化的LDL的量来诊断动脉硬化疾病。

