

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-163924

(P2014-163924A)

(43) 公開日 平成26年9月8日(2014.9.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	N
	GO 1 N 33/543	5 4 5 A

審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2013-48429 (P2013-48429)  
 (22) 出願日 平成25年2月21日 (2013.2.21)

(71) 出願人 598100346  
 横山 司甫  
 東京都東久留米市氷川台2-13-19  
 (72) 発明者 横山 司甫  
 東京都東久留米市氷川台2-13-19

(54) 【発明の名称】 高血圧検出試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】生体組織基底膜の成分を用いて生体組織基底膜の障害を見出す検出方法、その方法に必要な試薬を提供する。

【解決手段】ヒト及び/又は動物の組織から生体組織の主要成分である抽出したタイプIVコラーゲン、その構成領域(7S領域又は中央部螺旋領域又はNC1領域)、その構成ペプチド、又は特異的に結合する抗タイプIVコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチド抗体を用いて、対応する抗体又は抗原を検出する方法、その方法に必要な試薬。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生体組織基底膜の障害を検出する方法であって、ヒト及び／又は動物から血液を試料として、その中に障害組織由来のタイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチド、もしくはそれらの抗体が存在するか否かを分析することから成り、存在することが生体組織基底膜の障害を生じていることを示すこととなる方法。

**【請求項 2】**

請求項 1 の生体組織基底膜の障害を検出する方法が高血圧疾患及び／又はメタボリック症候群を検出する方法であって、ヒト及び／又は動物から血液を試料として、その中に障害組織由来のタイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチド、もしくはそれらの抗体が存在するか否かを分析することから成り、存在することが高血圧疾患及び／又はメタボリック症候群を生じていることを示すこととなる方法。

10

**【請求項 3】**

高血圧疾患及び／又はメタボリック症候群を検出する為の請求項 2 の方法であって、試料由来のタイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチドと別途に加えた特異的に結合する抗タイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチド抗体との免疫複合物及び／又は試料中の抗タイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチド抗体と別途に加えたタイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチドとの免疫複合物を検出することで、高血圧疾患及び／又はメタボリック症候群が生じていることを示すこととなる方法。

20

**【請求項 4】**

高血圧疾患及び／又はメタボリック症候群を検出する為の請求項 3 の方法であって、試料由来のタイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチドと別途に加えた特異的に結合する抗タイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチド抗体との免疫複合物及び／又は試料中の抗タイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチド抗体と別途に加えたタイプⅤコラーゲン又はその分画領域又はそのペプチドとの免疫複合物を検出することで、高血圧疾患及び／又はメタボリック症候群が生じていることを示すこととなる酵素免疫測定法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

30

**【0001】**

本発明は、高血圧及びメタボリック症候群の診断補助法及びその検出試薬に関する。更に、治療の用具、医薬品を含む。

**【背景技術】****【0002】**

従来、高血圧の診断は器具による血圧の物理的な測定であった。又、高血圧に伴う組織障害を簡便に見る方法は無かったので、血管組織がどの程度傷んでいるかは不明だった。従って、現状は、高血圧に伴う血管の組織障害が起こっているか否かに関わらず、高血圧なら一律に降圧剤を漫然と投与しがちである。又、降圧剤には、長年の投与が腎臓の微細血管に悪影響を指摘されるものもある。

40

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0003】**

高血圧者は血管の組織障害が起こっていると考えられながらも、これまで、その検出方法は無かった。組織の障害が診断できれば、より一層、治療薬開発での効果の指標や高血圧治療の経緯観察の指標として役立つ。

**【課題が解決するための手段】****【0004】**

本願発明は、タイプⅤコラーゲン、その構成領域、もしくはその構成ペプチドを用いることで、高血圧のみならずメタボリック症候群による組織障害を検出できる方法と試薬、

50

更には治療補助方法、治療薬を提供するものである。

**タイプIVコラーゲンは生体組織基底膜の主要成分で $\alpha$ 鎖3本から構成される。 $\alpha$ 鎖は $\alpha$ 1鎖から $\alpha$ 6鎖までの6種鎖があり、組織により $\alpha$ 鎖の種類や量に偏りがある。 $\alpha$ 1鎖、 $\alpha$ 2鎖は全身に分布するが、腎糸球体基底膜は $\alpha$ 3鎖から $\alpha$ 6鎖が富む。生体組織からタイプIVコラーゲンを取り出す**

には、存在量の多さが知られる胎盤、腎臓系球体基底膜、眼球が出発材料となる。

タイプIVコラーゲンの構成領域はN端の7S、中央部らせん領域、C端のNC1の三領域に分けられる。タイプIVコラーゲンを構成するアミノ酸配列は、

**動物種が異なっても $\alpha$ 鎖が同じなら類似している。一方、同じ動物種でも、**

**$\alpha$ 鎖が異なればアミノ酸配列は大きく異なる。例えば $\alpha$ 3鎖と $\alpha$ 1鎖のよう**

**に、異なる $\alpha$ 鎖の同じ配列順序を用いてそれぞれ20残基の合成ペプチド**

を作製し比較すると、多くの場合はいくつかのアミノ酸が異なっている。

【0005】

タイプIVコラーゲンと疾患の係わりについて。

稀な腎炎である抗糸球体基底膜（GBM）抗体腎炎では、タイプIVコラーゲンのNC1領域（NC1）に対する抗体（抗NC1抗体）が血液中で増加するとして、その測定が有用として臨床の場で用いられている。一方、本願発明者は健常者や尿アルブミン高値者の血清もしくは尿に抗NC1抗体が高頻度に存在することを指摘した（細胞35：150-154，2003）。しかし、本願発明者に限らず血清で高値を示した例がどのような疾患に関わっているのかは未解明であった。その後、本願発明者は、腎炎一般の尿中に抗NC1抗

**体が存在すること(医学と薬学 51: 567-572, 2004)、及び、 $\alpha$ 5鎖が腎**

炎患者尿中のIgGと反応することを合成ペプチドで示した（医学と薬学57：605-613，2007）。

【0006】

今回、更に本願発明者は以下の各事実を発見した。

その実験には次のタイプIVコラーゲンを用いる。タイプIVコラーゲンの出発材料には胎盤もしくは腎臓皮質を用い、構成領域として三本鎖らせん領

**域もしくはNC1領域を用いる。 $\alpha$ 鎖を代表して $\alpha$ 1鎖と $\alpha$ 5鎖を用い、その**

合成ペプチド鎖yp12、yp08他を用いた。

測定の結果で明らかになった一つは、尿と血液の抗NC1抗体は抗原NC1の由来組織が異なっていたことである。ヒト及びラットの抗NC1抗体を測定すると血中の抗NC1抗体と尿中の抗NC1抗体は相関しない。

10

20

30

40

## 腎炎患者の尿中の IgG は $\alpha 5$ 鎖 NC1 に反応し、高血圧患者の血中の I

### gG は $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖の NC1 に反応した。 $\alpha 5$ 鎖は腎臓で富み、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha$

2 鎖は血管や皮膚の基底膜を始め全身の基底膜に分布する。腎炎では腎臓の濾過機能を担う糸球体、尿細管、ボウマン嚢の基底膜に障害が起きて、障害腎組織基底膜中の NC1 が抗原となって尿中に抗 NC1 抗体を産生するものと考えられる。又、高血圧患者やメタボリック症候群では、脳その他の微小血管や組織の基底膜に障害が生じて、障害基底膜中の NC1 が抗原となり、血液中に抗 NC1 抗体を産生させるものと考えられる。実際、初期の高血圧患者やメタボリック症候群では、尿中に抗 NC1 抗体は検出されなかった。

10

【0007】

### 各 $\alpha$ 鎖由来のペプチドに対する抗体。

詳細な検討をするために実験動物、ここではラットを用いた。WKY 及び WKY から派生した 3 系統である。高血圧を生じる高血圧ラット (SHR)、異常な高血圧で脳卒中を生じる脳卒中ラット (SHRsp)、及びメタボリック症候群ラット (SHRcp) である。

### 尿中の抗 NC1 抗体は、 $\alpha 5$ 鎖 NC1 由来の複数のペプチド鎖 (20 残基)

20

- y p 0 5、y p 0 8、y p 1 2 - に対する抗体 (抗 y p 0 5 抗体、抗 y p 0 8 抗体、抗 y p 1 2 抗体) と相関する。逆に血中の抗 NC1 抗体は、y p 0 5 抗体、y p 0

### 8 抗体と相関しない。従って、尿中の抗 NC1 抗体は抗 $\alpha 5$ 鎖 NC1 抗体を含

### み、血中の抗 NC1 抗体は抗 $\alpha 5$ 鎖 NC1 抗体を含まないことになる。血中に

抗 NC1 抗体が検出された場合、「高血圧で、特に遺伝性高血圧で、加えて脳卒中家系なら、免疫抑制剤を微量から用いる。その結果、血中の抗 NC1 抗体が低下するなら、治療効果を判定できる。

30

【0008】

測定方法は、検出対象が抗原にしる、抗体にしる、免疫反応を用いる。検出には発光法を、例えば、アイソトープ、化学発光、生物発光を用いる。発光法を用いないで凝集や光散乱を、あるいは電気泳動、沈降法などでもよい。ヒト測定の一例として ELISA 法による抗体測定を示す。抗原固相化マイクロプレートに、50 - 100 倍に希釈した血清を加えて、反応させて、洗浄後に酵素標識抗ヒト (測定対象動物に合わせる) 抗体を加えて反応後、洗浄して酵素基質液を加えて、呈色した濃さを見ながら、5 - 30 分で反応停止液を加え、直ちに波長 450 nm で吸光度を測定する。

【発明の効果】

【0009】

40

本発明は、高血圧による組織障害の検出や治療補助方法として有用である。又、動物及びヒトでの測定は、疾患の程度把握、降圧剤や生活習慣病改善剤 (抗コレステロール剤、抗脂質剤他)、糖尿病治療薬、薬物評価の指標となる。

【実施例 1】

【0010】

測定対象；

ラット 4 系統 (WKY、SHR、SHRsp、SHRcp) 各 5 匹の 6 週齢と 21 週齢の血漿、

測定項目；抗タイプ IV コラーゲン NC1 抗体、

測定方法；NC1 (ウシ腎臓由来) を固相化した 96 穴のマイクロプレートに 血漿 (1

50

00倍希釈)添加 インキュベーション及び洗浄

酵素標識抗ラットIgG抗体添加 インキュベーション及び洗浄

酵素基質液添加 呈色を観察しながら5-30分後に

反応停止液(1N硫酸)添加 直ちに波長450nmで吸光度を測定

結果(吸光度の平均、標準偏差)；

6週齢 SHRcp(0.653, 0.127)、SHRsp(0.412, 0.071)  
)、SHR(0.262, 0.036)、WKY(0.243, 0.016)

21週齢 SHRcp(0.826, 0.110)、SHRsp(0.629, 0.071)  
)、SHR(0.470, 0.036)、WKY(0.520, 0.065)

結論；

1)メタボリック症候群ラット(SHRcp)は早期より抗NC1抗体が上昇するので、  
メタボリック状態に伴う組織障害の指標となる

2)脳卒中ラット(SHRsp)は早期より抗NC1抗体が上昇するので、異常高血圧に  
伴う脳血管はじめ微細血管障害の指標となる

【実施例2】

【0011】

測定対象；ヒト健常者(86例)及び高血圧患者(11例)の血清、

測定項目；抗タイプIVコラーゲンNC1抗体、

測定方法；実施例1に同じ、ただし酵素標識抗体は抗ヒト抗体を使用

結果(吸光度の平均はAve.と表示、標準偏差はSDと表示)；

健常者(0.467, 0.186)、高血圧患者(0.632, 0.405)

カットオフ値はAve+2SDとした(0.839)

カットオフ値以上は高血圧患者11例中で4例(36%)、健常者86例中で8例であっ  
た

結論；高血圧例では血管組織障害の生じている可能性が大きい。

10

20

专利名称(译)	高血压检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014163924A</a>	公开(公告)日	2014-09-08
申请号	JP2013048429	申请日	2013-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	横山 司甫		
申请(专利权)人(译)	横山 司甫		
[标]发明人	横山司甫		
发明人	横山 司甫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/543.545.A		
其他公开文献	JP6150161B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种使用生物组织基膜的成分来检测生物组织基膜的障碍的检测方法以及该方法所需的试剂。 种类代码：从人和/或动物组织中提取的A1型IV型胶原蛋白，它是生物组织的主要成分，其组成区域（7S区或中央螺旋区或NC1区），其组成肽或特异性结合。一种使用抗IV型胶原蛋白或其分级区域或其肽抗体检测相应抗体或抗原的方法，以及该方法所需的试剂。 [选择图]无