

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6150161号
(P6150161)

(45) 発行日 平成29年6月21日(2017.6.21)

(24) 登録日 平成29年6月2日(2017.6.2)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/53 N
 GO 1 N 33/543 5 4 5 A

請求項の数 4 (全 5 頁)

<p>(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) (65) 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) 審査請求日 平成27年6月12日 (2015.6.12)</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 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</p> <p>審査官 大瀧 真理</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高血圧検出試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

腎、肺を除いたタイプIVコラーゲンの存在する生体組織基底膜の障害を検出するための方法で、ヒト及び/又は動物から採取された血液を試料として、その中に障害生体組織基底膜由来のタイプIVコラーゲンNC1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、障害生体組織基底膜由来のタイプIVコラーゲンNC1領域又はそのペプチド、もしくはそれらの抗体の測定値に基づき算出されたカットオフ値よりも、前記試料中の障害生体組織基底膜由来のタイプIVコラーゲンNC1領域又はそのペプチド、もしくはそれらの抗体の測定値が高く存在することにより、その存在することがタイプIVコラーゲンの存在する生体組織基底膜の障害が生じていることを示すことからなる方法。

10

【請求項2】

タイプIVコラーゲンの存在する生体組織基底膜の障害を検出するための方法がヒトに於いては高血圧群を見出すための方法であって、又、非ヒト動物では脳卒中群とメタボリック症候群を見出すための方法であって、ヒト及び/又は動物のそれぞれから採取された血液を試料として、その中の障害生体組織基底膜由来のタイプIVコラーゲンNC1領域又はそのペプチド、もしくはそれらの抗体の検出値が、障害生体組織基底膜由来のタイプIVコラーゲンNC1領域又はそのペプチド、もしくはそれらの抗体の検出値に基づき算出されたカットオフ値よりも高いことにより、タイプIVコラーゲンの存在する生体組織基底膜の障害が生じていることを示すことからなる方法。

20

【請求項 3】

抗NC1抗体測定を用いて、高血圧群、メタボリック症候群または脳卒中予備群のタイプIVコラーゲンNC1領域の障害診断を行うための方法。

【請求項 4】

抗NC1抗体測定を用いて、高血圧群から、脳卒中予備群の可能性を識別するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【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。

10

【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。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【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IV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、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鎖3本から構成される。鎖は1鎖から6鎖までの6種類があり、組織により鎖の種類や量に偏りがある。1鎖、2鎖は全身に分布するが、腎系球体基底膜は3鎖から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。

30

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3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鎖が同じなら類似している。一方、同じ動物種でも、鎖が異なればアミノ酸配列は大きく異なる。例えば3鎖と1鎖のように、異なる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。

40

【0005】

タイプIVコラーゲンと疾患の係わりについて。

稀な腎炎である抗系球体基底膜（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、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57：6

50

05 - 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。鎖を代表して1鎖と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

腎炎患者の尿中のIgGは5鎖NC1に反応し、高血圧患者の血中のIgGは1鎖、2鎖のNC1に反応した。5鎖は腎臓で富み、1鎖、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。

【0007】

各鎖由来のペプチドに対する抗体。

20

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、5鎖NC1由来の複数のペプチド鎖(20残基)-yp05、yp08、yp12-に対する抗体(抗yp05抗体、抗yp08抗体、抗yp12抗体)と相関する。逆に血中の抗NC1抗体は、yp05抗体、yp08抗体と相関しない。従って、尿中の抗NC1抗体は抗5鎖NC1抗体を含み、血中の抗NC1抗体は抗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450nmで吸光度を測定する。

【発明の効果】

40

【0009】

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、

50

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（100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）

10

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

20

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。

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2007/145192(WO, A1)

特開2009-014695(JP, A)

特開2007-332122(JP, A)

特開2002-302457(JP, A)

NIKOLOV, A.G. et al., Anti-Collagen Type IV Antibodies and the Development of Microvascular Complications in Diabetic Patients with Arterial Hypertension, *Journal of IMAB*, 2012年11月9日, Vol. 18, No. 3, p. 315 - 322, URL, <http://www.journal-imab-bg.org/issue-2012/book3/JofIMAB2012vol18b3p315-322.pdf>

YANO, Y. et al., Serum 7S domain of type IV collagen levels in essential hypertension and hypertensive type 2 diabetic patients, *Diabetic Medicine*, 1997年6月, Vol. 14, Issue 6, p. 466 - 471, URL, [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199706\)14:6<466::AID-DIA383>3.0.CO;2-U/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9136(199706)14:6<466::AID-DIA383>3.0.CO;2-U/abstract)

KALLURI, R. et al., Identification of the $\alpha 3$ Chain of Type IV Collagen as the Common Autoantigen in Antibasement Membrane Disease and Goodpasture Syndrome, *Journal of American Society of Nephrology*, 1995年, Vol. 6, No. 4, p. 1178 - 1185, URL, <http://jasn.asnjournals.org/content/6/4/1178.full.pdf>

高田俊範ほか, Goodpasture症候群, *臨床検査*, 2011年, Vol. 55, No. 11, p. 1312 - 1317, URL, http://www.med.niigata-u.ac.jp/nephrol/archivement/research_archivement/catalog/2011/09_sousetsu/2011-024.pdf

横山司甫ほか, 尿と血清におけるNC1(タイプIVコラーゲンNC1領域)と抗NC1抗体の測定, *細胞*, 2003年, Vol. 35, No. 4, p. 150 - 154

BROCKS, D.G. et al., Type IV collagen antigens in serum of diabetic rats: a marker for basement membrane collagen biosynthesis, *Diabetologia*, 1985年, Vol. 28, p. 928 - 932

市田隆文ほか, 肝疾患における血清IV型コラーゲンの動向, *肝臓*, 1988年, Vol. 29, No. 10, p. 1427, URL, http://www.jstage.jst.go.jp/article/kanzo1960/29/10/29_10_1427/article/-char/ja

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	高血压检测试剂		
公开(公告)号	JP6150161B2	公开(公告)日	2017-06-21
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		
当前申请(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	JP2014163924A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种使用身体组织基底膜的成分检测身体组织基底膜的缺陷并提供该方法所需的试剂的检测方法。解决方案：作为基础成分的IV型胶原蛋白从人体和/或动物的组织提取的身体组织，其构型区域（7S区域，中心螺旋区域或NC1区域），其构型肽，抗IV型胶原蛋白结合物，其截留区域，或其肽抗体用于检测相应的抗体或抗原的方法。还提供了该方法所需的试剂。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6150161号 (P6150161)
(45) 発行日 平成29年6月21日(2017.6.21)		(24) 登録日 平成29年6月2日(2017.6.2)
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)	F I G01N 33/53 D G01N 33/53 N G01N 33/543 545A	請求項の数 4 (全 5 頁)
(21) 出願番号 特願2013-48429(P2013-48429)	(73) 特許権者 598100346 横山 司甫 東京都東久留米市氷川台2-13-19	
(22) 出願日 平成25年2月21日(2013.2.21)		
(65) 公開番号 特開2014-163924(P2014-163924A)	(72) 発明者 横山 司甫 東京都東久留米市氷川台2-13-19	
(43) 公開日 平成26年9月8日(2014.9.8)		
審査請求日 平成27年6月12日(2015.6.12)	審査官 大瀬 真理	
早期審査対象出願		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 高血圧検出試薬		