

(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 - 4627

(P2001 - 4627A)

(43)公開日 平成13年1月12日 (2001.1.12)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	V 4 B 0 6 4
33/532		33/532	A 4 H 0 4 5
33/564		33/564	Z
// C 0 7 K 16/42		C 0 7 K 16/42	
16/44		16/44	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 17数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 74398(P2000 - 74398)

(22)出願日 平成12年3月16日(2000.3.16)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 111314

(32)優先日 平成11年4月19日(1999.4.19)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000226998

日清製粉株式会社

東京都千代田区神田錦町1丁目25番地

(72)発明者 堀内 正公

熊本県熊本市新大江3 - 15 - 5

(72)発明者 荒木 令江

熊本県阿蘇郡阿蘇町永草市ノ川1778 - 14

(72)発明者 柴山 利恵

埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5丁目3番1号 日

清製粉株式会社創薬研究所内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 メイラード反応後期生成物に対する自己抗体の免疫学的検出法

(57)【要約】

【課題】 臨床検査に多用されている血液または血清を用いて、実際には摘出検査が困難な臓器中のメイラード反応後期生成物 (A G E) の存在を知るために、血液または血清中の、A G E に対する自己抗体を測定する方法ならびに該方法の実施に使用される検査用キットおよび検査用試薬の提供。

【解決手段】 A G E に対する自己抗体を免疫学的方法により測定することにより、A G E の生成および蓄積が関与する疾患である糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患を検査する。また、A G E に対する自己抗体の測定を利用して、該疾患の治療薬の薬効を評価する。

【効果】 本発明の方法により測定したA G E の値から、該疾患を診断するとともに、該疾患の進行の段階を精度よく判断することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により検出する方法。

【請求項 2】 該自己抗体が、メイラード反応後期生成物における N-カルボキシメチルリジン以外をエピトープとして認識する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 該自己抗体が、N-カルボキシエチルリジンをエピトープとして認識する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 該免疫学的測定法が、標識構造体を用いた標識免疫学的測定法である、請求項 1~3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】 標識構造体が、標識されたメイラード反応後期生成物、抗メイラード反応後期生成物抗体または抗免疫グロブリン抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 該標識が、酵素、放射性同位体、蛍光化合物および化学発光化合物から選ばれる、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】 メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により検出する工程と、検出された自己抗体の抗体価を健康人の自己抗体の抗体価と比較する工程とを含む、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査方法。

【請求項 8】 少なくとも、検体用希釈液およびメイラード反応後期生成物を含む、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査用キット。

【請求項 9】 標識されたメイラード反応後期生成物、標識された抗メイラード反応後期生成物抗体または標識された抗免疫グロブリン抗体をさらに含む、請求項 8 に記載の検査用キット。

【請求項 10】 メイラード反応後期生成物、抗メイラード反応後期生成物イディオタイプ抗体または抗メイラード反応後期生成物抗体を固相化するための固相をさらに含む、請求項 8 または 9 に記載の検査用キット。

【請求項 11】 メイラード反応後期生成物、標識されたメイラード反応後期生成物、抗メイラード反応後期生成物イディオタイプ抗体、抗メイラード反応後期生成物抗体、標識された抗メイラード反応後期生成物抗体および標識された抗免疫グロブリン抗体から選ばれる 1 以上を含む、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査用試薬

【請求項 12】 糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の治療薬を投与したヒトを含む動物の血漿または血清中の、メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により測定し、これと治療薬を投与しないヒトを含む動物の血漿または血清中の、メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により測定し、上記 2 つの測定値を比較して評価することからなる、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の治療薬の薬効評

価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、メイラード反応後期生成物 (Advanced Glycation End Products; 以下、「AGE」と略す) に対する自己抗体を免疫学的に測定して検出する方法に関する。さらに、本発明は、AGE に対する自己抗体の測定による、AGE の生成および蓄積が関与する糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患等の検査方法、その検査用キット、検査用試薬ならびに AGE の生成および蓄積が関与する疾患治療薬の薬効評価方法に関する。

【0002】

【従来技術】メイラード反応は、ブドウ糖などの還元糖によるタンパク質の非酵素的糖化反応 (Maillard, L. C., Acad. Sci. 154; 66-68 (1912)) であり、近年、生体内におけるメイラード反応が糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症および老化に伴う疾患など種々の疾患の発症要因の 1 つであることが明らかにされた。

【0003】メイラード反応は、大きく前期反応と後期反応の二段階に分けられている。前期段階反応では、タンパク質のアミノ基と還元糖との反応によりアマドリ転位生成物 (前期反応生成物) が可逆的に生成される。生体内における前期反応生成物として、ヘモグロビン A1c およびフルクトサミン (糖化アルブミン) が知られており、糖尿病における臨床マーカーとして用いられている。後期段階では、酸化・脱水・重合・開裂などの複雑な反応を経て AGE と呼ばれる後期反応生成物が不可逆的に生成される。AGE の特徴として褐色変化、蛍光性、あるいは分子内・分子間架橋形成などが挙げられている。AGE の構造として、ピラリン、ペントシジン、クロスリン、X1、イミダゾロン、およびカルボキシメチルリジンなどが提唱されているが、これら以外にも未知の構造が存在していると考えられている。

【0004】メイラード反応は、健康人でも見られる現象であるが、糖尿病のような高血糖状態が持続する場合や、腎臓疾患のようなクリアランスの低下が認められる場合、あるいは加齢により、代謝速度の遅いタンパク質に AGE が蓄積されることが報告されている。

【0005】生体内での AGE の生成が報告されているタンパク質として、ヘモグロビン、アルブミン、皮膚や血管壁等の結合組織のコラーゲンやエラスチン、腎臓の糸球体基底膜、神経ミエリン、眼球クリスタリンなどがあり、これらのタンパク質がメイラード反応を受けることによって、タンパク質の変性、機能低下および異常をもたらす、血管系の障害、腎症、神経障害、網膜症および白内障などの糖尿病性合併症や老化に伴う疾患を引き起こす原因の 1 つと考えられている (Harding,

J., Adv. Prot. Chem., 37; 247-334 (1985)。

【0006】したがって、早期にAGEの生成および蓄積を把握することは、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症ならびに老化に伴う疾患などの予防および治療に対して極めて有効であると考えられている。AGE量の測定は、当初、蛍光強度(P. A. Finot, In Modification of Protein s. R. E. Feeny and J. R. Whitaker editd., American Chemical Society, Washington, D. C. 198: 91-124 (1982))を用いて行われていたが、近年、主に抗メイラード反応後期生成物抗体(以下、「抗AGE抗体」という)を用いた抗原抗体反応により行われている。また、臨床検査で用いられる方法として、血液中のヘモグロビンあるいはアルブミン中のAGE量を抗AGE抗体で測定する方法が報告されている(特開平7-502534、特開平9-17840、特開平9-257792)。

【0007】しかし、血中ヘモグロビンやアルブミン中のAGE量を測定しても、これらのタンパク質は、代謝回転が比較的速いため、臓器中に蓄積している代謝回転の遅いタンパク質中のAGEの存在を知ることが困難である。また、測定の意義として、ヘモグロビンA1cと糖化アルブミンとの違いも不明瞭である。その上、血中ヘモグロビンやアルブミン中のAGE量は、血糖コントロールや血液透析などの影響を受けやすい。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】以上の問題点に鑑み、本発明は、臨床検査に多用されている血漿または血清を用いて、実際には摘出検査が困難な臓器中のAGEの存在を知ることが目的とする。このようなAGEの存在を知るために、本発明は血液または血清中の、AGEに対する自己抗体の測定方法を提供し、さらに、AGEの生成および蓄積が関与する、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患などに対して、この自己抗体を新規臨床マーカーとした検査方法を提供する。また、AGEの生成・蓄積量を知るための検査用試薬、検査用キットを提供する。さらにまた、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の治療薬の薬効評価方法を提供する。

【0009】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1)メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により検出する方法。

(2)該自己抗体が、メイラード反応後期生成物におけるN-カルボキシメチルリジン以外をエピトープとして認識する、1項に記載の方法。

(3)該自己抗体が、N-カルボキシエチルリジンをエ

ピトープとして認識する、1項に記載の方法。

【0010】(4)該免疫学的測定法が、標識構造体を用いた標識免疫学的測定法である、1~3項のいずれかに記載の方法。

(5)標識構造体が、標識されたメイラード反応後期生成物、抗メイラード反応後期生成物抗体または抗免疫グロブリン抗体である、4項に記載の方法。

(6)該標識が、酵素、放射性同位体、蛍光化合物および化学発光化合物から選ばれる、4または5項に記載の方法。

【0011】(7)メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により検出する工程と、検出された自己抗体の抗体価を健常人の自己抗体の抗体価と比較する工程とを含む、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査方法。

(8)少なくとも、検体用希釈液およびメイラード反応後期生成物を含む、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査用キット。

【0012】(9)標識されたメイラード反応後期生成物、標識された抗メイラード反応後期生成物抗体または標識された抗免疫グロブリン抗体をさらに含む、8項に記載の検査用キット。

(10)メイラード反応後期生成物、抗メイラード反応後期生成物イディオタイプ抗体または抗メイラード反応後期生成物抗体を固相化するための固相をさらに含む、8または9項に記載の検査用キット。

【0013】(11)メイラード反応後期生成物、標識されたメイラード反応後期生成物、抗メイラード反応後期生成物イディオタイプ抗体、抗メイラード反応後期生成物抗体、標識された抗メイラード反応後期生成物抗体および標識された抗免疫グロブリン抗体から選ばれる1以上を含む、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査用試薬

【0014】(12)糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の治療薬を投与したヒトを含む動物の血漿または血清中の、メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により測定し、これと治療薬を投与しないヒトを含む動物の血漿または血清中の、メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により測定し、上記2つの測定値を比較して評価することからなる、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の治療薬の薬効評価方法。

【0015】上記したとおり、本発明では、生体試料中に存在するAGEに対する自己抗体を免疫学的測定法により検出して測定する。上記自己抗体は、AGEにおけるN-カルボキシメチルリジン以外のエピトープを認識するものであることが好ましく、N-カルボキシエチルリジンをエピトープとして認識するものであることがさらに好ましい。

【0016】また、上記免疫学的測定法は、標識免疫測定法が好ましく、またこの場合、自己抗体に対して反応性を有する標識構造体としては、AGE、抗AGE抗体または抗免疫グロブリン抗体であることが好ましく、上記標識は、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、および化学発光化合物から選ばれるものであることが好ましい。

【0017】本発明はまた、AGEに対する自己抗体を免疫学的測定法により検出する工程と、検出された抗体価を健常人の抗体価と比較する工程とを含む、糖尿病、糖尿病合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査方法に関する。上記自己抗体は、AGEにおけるN-カルボキシメチルリジン以外のエピトープを認識するものであることが好ましく、N-カルボキシエチルリジンを認識するものであることがさらに好ましい。

【0018】上記免疫学的測定法としては、標識免疫測定法が好ましく、またこの場合、自己抗体に対して反応性を有する標識構造体は、AGE、抗AGE抗体または抗免疫グロブリン抗体であることが好ましい。また、上記標識は、酵素、放射性同位体、蛍光化合物および化学発光化合物から選ばれることが好ましい。

【0019】本発明はまた、少なくとも、生体試料用希釈液と、AGEとを含む、糖尿病、糖尿病合併症、非糖尿病性腎症あるいは老化に伴う疾患の検査用キットに関する。上記キットは、標識されたAGE、標識された抗AGE抗体あるいは標識された抗免疫グロブリン抗体のいずれかをさらに含むことが好ましい。また、上記キットは、AGE、抗AGEイディオタイプ抗体あるいは抗AGE抗体を固定化する固相を更に含むことができる。

【0020】本発明はさらにまた、AGE、標識されたAGE、標識された抗免疫グロブリン抗体、抗AGEイディオタイプ抗体、抗AGE抗体、標識された抗AGE抗体を含む糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の検査用試薬に関する。上記標識は、酵素、放射性同位体、蛍光化合物および化学発光化合物から選ばれるものであることが好ましい。

【0021】本発明はさらにまた、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の治療薬を投与したヒトを含む動物の血漿または血清中の、メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により測定し、これと治療薬を投与しないヒトを含む動物の血漿または血清中の、メイラード反応後期生成物に対する自己抗体を免疫学的測定法により測定し、上記2つの測定値を比較して評価することからなる、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の治療薬の薬効評価方法に関する。

【0022】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。本明細書において、「AGE」とは、アミノ化合物とカルボニル化合物のメイラード反応によって生成する構造体をいう。アミノ化合物としては、アミン、アミノ

酸、ペプチド、タンパク質、核酸の塩基などが挙げられ、またカルボニル化合物としては、還元糖、脂質およびこれらから生成するアルデヒド、ケトン、その他ポリフェノール、アスコルビン酸、ステロイド等が挙げられる。

【0023】メイラード反応を受けている生体タンパク質は、カルモジュリン、ヘモグロビン(A1a 1、A1a 2、A1c、AO、S)、水晶体のクリスタリン、筋繊維タンパク質、チューブリンなどの細胞内タンパク質、アルブミン、アンチトロンピンIII、フェリチン、リポタンパク質、免疫グロブリンG(IgG)などの血漿タンパク質、インスリン、甲状腺ホルモンなどのホルモン、皮膚、腱、大動脈、糸球体基底膜などのコラーゲン、毛髪、爪などの角質層、尿中ペプチド、骨中のオステオカルシン、アルコールデヒドロゲナーゼ、カテプシンB、リゾチーム等の酵素、赤血球グルコーストランスporter、赤血球スペクトリン、赤血球膜タンパク質などの細胞膜タンパク質などが例示される。

【0024】これらのタンパク質の糖化は、糖尿病などの生活習慣や老化の成因に強く関連していることが明らかにされつつある。図1にアルドースとタンパク質とのメイラード反応の反応経路を示す。タンパク質の関与するメイラード反応は、図1のように進行するが、この反応経路の中でアマドリ転移生成物までを前期段階(または初期段階)、それ以降を後期段階として区別している。生体内におけるメイラード反応前期段階で生成される物質を「メイラード反応前期段階生成物」という。メイラード反応前期段階生成物の1つとして、ヘモグロビン鎖のN末端のバリンにグルコースがアマドリ型として結合した糖化タンパク質であるヘモグロビンA1c(HbA1c)が知られている。HbA1cの含量は血糖値をよく反映するので、現在、臨床検査によく用いられており、また、糖尿病患者の場合には、アマドリ転位生成物のレベルが健常人の場合と比べて2~4倍に増大することが報告されている。

【0025】図1に示すタンパク質のメイラード反応が後期段階に進むと、タンパク質のN末端のアミノ基のほかに、-リジン残基でメイラード反応が起こるほかに、アルギニン残基、トリプトファン残基の損傷が顕著に起こり、褐変、蛍光の発生、架橋形成などの現象が見られる。特に、代謝回転の遅い生体タンパク質、例えばコラーゲンや水晶体のクリスタリンなどには後期段階のメイラード反応が起こっていることが証明されている。

【0026】AGEは単一の化合物ではなく、リジンの-アミノ基がピロールアルデヒドで修飾されたリジルピラリン、リジン残基とアルギニン残基とがペントースを介して架橋したイミダゾピリジニウム環を形成しているペントシジン、グルコース2分子とリジン2分子とからなる架橋生成物であるクロスリン、その他X1、イミダゾロン化合物、カルボキシメチルリジン等が混合した

ものである。

【0027】本明細書中において「生体試料」とは、ヒトまたは動物から単離した各種の組織および体液をいう。各種の組織としては、腎臓、肝臓、眼球などの各種の臓器から得られる組織、動脈、静脈等の脈管、坐骨神経や末梢神経などの神経組織、および血液などが例示されるが、これらに限定されるものではない。

【0028】メイラード反応はブドウ糖などの還元糖によるタンパク質の非酵素的糖化反応であり、糖尿病性合併症や老化に起因する疾患などの発症要因の1つであることから、こうした疾病の発症時に病変が顕著に見られる、腎臓、水晶体、大動脈、坐骨神経等の各種の組織、および血液を生体試料として好適に使用することができる。生体試料中において自己抗体を検出するためのAGEは、以下のようにして作製することができる。

【0029】メイラード反応後期生成物を得るためには、上述のようにアミノ化合物とカルボニル化合物とが必要である。アミノ化合物としては、アルブミン、ヘモグロビンなどの単純タンパク質、コラーゲンなどの糖タンパク質、リンタンパク質、リポタンパク質、金属タンパク質などの複合タンパク質あるいはリジンを含むペプチド等を使用することができる。また、カルボニル化合物としては、グルコース等のアルドース、フルクトース等のケトース、デオキシグルコース等のデオキシ糖、グルコサミン等のアミノ糖、グルクロン酸等のウロン酸、オリゴ糖等の糖類のほか、グリオキシル酸などのアルデヒド化合物、ピルビン酸などのケト化合物、アスコルビン酸などを利用できる。

【0030】例えば、ウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）とグルコースを使用して、AGE化ウシ血清アルブミン（以下「AGE-BSA」という）を得る場合、BSAを、例えば、リン酸ナトリウム緩衝液にグルコースとともに溶解して滅菌し、この溶液を、無菌状態にて数十日間、好ましくは50～120日の間、所定の温度、好ましくは約37℃でインキュベーションする。

【0031】また、BSAとグリオキシル酸を使用してN-カルボキシメチルリジン化BSA（以下「CML-BSA」という）を得る場合、BSAを例えば、リン酸ナトリウム緩衝液にグリオキシル酸と共に溶解して、水素化ホウ素ナトリウムあるいは水素化シアノホウ素ナトリウム存在下で、この溶液を所定の温度および時間、好ましくは約37℃で24時間インキュベーションする。

【0032】また、BSAとピルビン酸ナトリウムを使用してN-カルボキシエチルリジン化BSA（以下「CEL-BSA」という）を得る場合、BSAを例えば、リン酸ナトリウム緩衝液にピルビン酸ナトリウムと共に溶解して、水素化ホウ素ナトリウムあるいは水素化シアノホウ素ナトリウム存在下で、この溶液を所定の温度及び時間、好ましくは約37℃で24時間インキュベシ

ョンする。

【0033】カルボキシエチルリジン（CEL）は、リン酸緩衝液に溶解したN-フォルミルリジンとリン酸緩衝液に溶解したヨウ化酢酸とを、例えば、室温で約40時間インキュベーションすることにより得ることができる。未反応のヨウ化酢酸をアンモニア水で除き、ついで終夜インキュベーションする。この反応液を、例えば、Dowex 1-X8アセテートカラムにアプライしてリン酸およびヨードを除去し、吸着画分を酢酸で溶出する。溶出画分を濃縮し、塩酸で脱フォルミル化する。

【0034】ChinとWoldの方法（Chin, C.C.Q., and Wold, F. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167: 448-451）に従い、この画分を、例えば、Dowex 50-X8によるイオン交換クロマトグラフィーにかけるとCELを単離することができる。

【0035】「抗体」とは、抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生されるタンパク質で、免疫原（抗原）と特異的に結合する活性を有するものをいい、外来性の非自己抗原に結合する活性を有する抗体のみならず、自己抗原に結合する活性を有する自己抗体も含まれる。

【0036】「自己抗体」とは、一般的にはある個体自身の構成物を抗原成分（自己抗原）として認識する抗体をいうが、本明細書中においては、その個体自身の中で生成されたAGEに対して産生された抗体であり、AGEを認識する抗体をいう。

【0037】本発明で用いる抗AGE抗体は、以下のような標準的な方法で作製できる。上記抗AGE抗体がモノクローナル抗体の場合には、以下のようにして作製する。すなわち、マウス、ラット、家兎その他適当な動物にAGEを標準的な方法で投与して、これらの動物を感作動物とする。使用する動物は、必要とされる脾臓リンパ球の数に応じて適当に選択すればよく、特に限定されない。

【0038】これらの動物に、適当なアジュバントに懸濁させたAGE-BSAを適当量投与する。投与部位としては、皮内（i.d.）、皮下（s.c.）、腹腔内（i.p.）、筋肉内（i.m.）等を挙げることができるが、投与する動物の大きさ等に応じて、適宜選択すればよい。

【0039】アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート（TDM）、リポ多糖（LPS）、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、フロイントの完全アジュバント（FCA）とフロイントの不完全アジュバント（FIA）とを組み合わせ使用することが好ましい。具体的には、AGE-BSAをフロイントの完全アジュバントにエマルジョン化させた後、

例えばマウスの皮下に投与し、さらに追加免疫を数回、適当な日数を経過したときに行う。

【0040】について、感作の終了したこれらの動物から脾臓を摘出し、得られた脾臓細胞を標準的な方法でミエローム細胞と融合させて抗体を産生するハイブリドーマを作製する。例えば、マウスの場合には、頸椎脱臼によって屠殺し、脾臓を摘出し、摘出した脾臓を、例えば、ハンクスの平衡塩溶液（HBSS）中に置き、ピンセットで細胞を押し出して脾臓リンパ球を得る。

【0041】こうして得られた脾臓リンパ球を、トリパンブルー等の染色液で染めてパイアブルカウントし、ミエローム細胞と融合させてハイブリドーマとする。ミエローム細胞としては、特に限定されるものではなく、公知のものを使用できる。例えば、マウスのものとしては、P3-X63-Ag8-01（P3U1）、P3-NS1-1-Ag4-1（NS4）、SP2/0-Ag14（SP2）等を挙げることができる。ミエローム細胞を選択するに際しては、抗体産生細胞との適合性を考慮する必要がある。

【0042】細胞の融合は、センダイウイルス法、ポリエチレングリコール法、プロトプラスト法等、当業者に公知の方法で行えばよく、特に限定されないが、ポリエチレングリコール法で融合させる方法が、細胞毒性も比較的少なく、融合操作も簡単であるという理由から好ましい。

【0043】得られたハイブリドーマを、常法に従って、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン含有培地）中で適当な期間培養し、ハイブリドーマの選択を行う。次いで、目的とする抗体を産生するハイブリドーマを得るためのスクリーニングを行った後、クローニングを行う。スクリーニング法としては、抗体を検出するための公知の方法を用いることができる。例えば、酵素イムノアッセイ（以下「ELISA」という）法、ラジオイムノアッセイ（以下「RIA」という）法、プラーク法、凝集反応法などを用いることができる。

【0044】また、クローニング法としては、免疫学的に公知の方法を用いればよく、限界希釈法、軟寒天法およびFACS法などを使用できる。上記のようにして得たハイブリドーマを、適当な培地中で培養するか、あるいはハイブリドーマと適合性のある、例えばマウス腹腔内に投与する。これにより得られる培養液中または腹水中から塩析、イオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィなどの常法により、所望のモノクローナル抗体を単離精製することができる。

【0045】AGEに対するポリクローナル抗体は、例えば、以下のようにして作製する。すなわち、フロイントの完全アジュバント中に懸濁したAGE-BSAを、例えば、家兎の皮下または真皮内に投与する。更に、追加免疫を数回、適当な日数を経過した後に行う。適当な

日数を経過した後部分採血を行い、抗体価を測定する。この抗体価の測定は、公知の方法により行うことができ、例えば沈降反応、ELISA法、RIA法等を用いることができる。抗体価の十分な上昇を確認した後に全採血を行い、抗血清を得る。これを、塩析、イオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィ等の公知の方法を用いて精製する。

【0046】上記のようにして得られるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体は、AGEに存在するエピトープのみを特異的に認識する。「エピトープ」とは、抗原の中で生体の免疫反応を促し、産生された抗体と特異的に結合する部分をいう。上記の抗体が認識するエピトープとしては、カルボキシエチルリジンその他のものが挙げられる。本発明において、上記のようにして作製したAGEあるいは抗AGE抗体を用いてAGEに対する自己抗体を測定する。

【0047】本発明において、上記の自己抗体は、免疫学的測定法により検出する。用いる免疫学的測定法としては、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比濁法、免疫比濁法などいずれを用いてもよいが、特に標識免疫測定法が自己抗体を高感度に検出でき、かつ多数の検体を自動的に測定できるので、病院あるいは研究機関などでの使用に好適である。

【0048】標識免疫測定法としては、公知の測定法が応用できる。例えば、ELISA法、RIA法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法などが挙げられる。用いる標識物質は、上記の測定法に応じて、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、および化学発光化合物などを適宜選択すればよい。

【0049】具体的な標識物質として、酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどを挙げることができる。さらに、上記の標識物質とアビジン-ビオチン複合体を用いることにより、標識物質の検出感度を向上させることが可能である。放射性同位体としては、主に¹²⁵Iが、蛍光化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（RITC）などが挙げられる。化学発光化合物としては、ロフィン、ルミノール、ルシゲニンなどが挙げられる。上記の標識物質は、常法に従って標識して使用すればよい。

【0050】標識免疫測定法により、自己抗体を検出する測定系は、公知の非競合反応系あるいは競合反応系を用いて構築することができる。非競合反応系においては、固相が必要である（固相法）。競合反応系においては、必ずしも固相を必要としない（液相法）が、固相を用いた方が、測定操作が簡便であり好ましい。固相の材質として、ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セルロースなどが挙げられ、固相の形状としては、球状、ウェル状、チューブ状、シート状など標識免

疫測定法に用いられる公知のものを応用できる。

【0051】本発明における測定操作として、非競合反応系では、例えば、抗原を固相化した後に、検体と反応させる。次に、固相化されている抗原と反応している自己抗体を、あらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）と反応させ、標識物質によって自己抗体を検出することができる。検出する標識量は抗AGE自己抗体量と正相関する。

【0052】また、競合反応系では、例えば、抗原を固相化した後に、あらかじめ抗原を添加し反応させた検体を反応させる。次に、固相化された抗原と反応している自己抗体を、あらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）と反応させ、標識物質によって自己抗体を検出することができる。検出する標識量は、添加する抗原量と逆相関する。そのほかの競合反応系としては、抗原を固相化して、検体を反応させた後、あらかじめ標識しておいた、前述した抗AGE抗体（ポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体）を固相化した抗原と反応させる。検出する標識量は自己抗体量と逆相関する。このような競合反応系の使用は、自己抗体の抗原エピトープを解析する場合に、特に好ましい。

【0053】上記の抗原としては、例えば、メイラード反応後期生成物を、前述したようにタンパク質などから化学的に合成したもの、あるいは生体試料中から精製したものなどが挙げられる。さらに、本発明の方法では、AGEのかわりとして、抗AGEイディオタイプ抗体などが使用できる。

【0054】上記の生体試料中からAGEを分離精製するには、慣用的な手技、例えばアフィニティークロマトグラフィーを使用できる。すなわち、メイラード反応後期生成物に対するポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体を前述したような方法により作製する。さらに、これらの抗体を用いて、公知の方法でアフィニティークラムを調製し利用することにより、生体試料からメイラード反応後期生成物を分離精製できる。

【0055】「抗AGEイディオタイプ抗体」とは、免疫グロブリンのAGE結合部位をエピトープとして認識する抗体のことである。いいかえると、抗AGEイディオタイプ抗体は、抗原のエピトープと同様の立体構造をとりうるため、抗原の代わりに使用することも可能である。抗イディオタイプ抗体は、公知の方法により作製が可能であり、本発明においては、例えば、前述したAGEに対する、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を用いて作製することが可能である。また、抗AGEイディオタイプ抗体は抗体分子をそのまま使用するか、あるいは抗体を酵素処理して得られる抗原結合部位を含む抗体フラグメントであるFab、Fab'、F(ab')₂を使用してもよい。

【0056】上記した固相化の方法としては、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、架橋法など公知の方

法を使用できる。なかでも、物理的吸着法が簡便であり好ましい。上記した抗免疫グロブリン抗体としては、例えば抗IgG抗体、抗IgM抗体などが挙げられる。これらの抗体は、抗体分子をそのまま使用、あるいは抗体を酵素処理して得られる抗原結合部位を含む抗体フラグメントであるFab、Fab'、F(ab')₂を使用してもよい。さらに、本発明の方法では、標識した抗免疫グロブリン抗体の代わりに、抗体分子に特異的な親和性をもつ物質、例えばIgGに特異的な親和性をもつプロテインAなどを標識して使用することもできる。

【0057】本発明で利用可能な検体はヒトを含む動物の体液であり、血漿、血清などの血液成分、髄液、関節液、腹水などが挙げられるが、採取の容易な血漿あるいは血清が好ましい。本発明方法において、上記の検体は無希釈、好ましくは適当な溶液で希釈して用いることができる。さらに、検体中に、測定に用いた抗原中のAGE以外の構造をエピトープとする抗体を多く含む検体場合には、本発明方法で測定する前に、不要な特異性を有する抗体を除くための操作（以下、「吸収」という）を、加えることが可能である。

【0058】上記した吸収には、免疫学的に公知の方法が応用できる。例えば、抗原としてBSAから作製したAGE-BSAを用いた場合、吸収抗原として例えばBSAを検体に十分量を加えたものをそのまま測定に使用するか、あるいは遠心して吸収抗原抗体複合体を沈殿させて、上清を測定に使用すればよい。そのほか、吸収抗原を不溶性担体、例えば、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、セルロースゲルなどに公知の方法で結合させた調製ゲルを用いたカラム法あるいはバッチ法により、吸収を行うことも可能である。

【0059】上記のカラム法とは、上記の調製ゲルを用いてカラムを作製した後、検体を流し、カラム非吸着画分を測定に使用する方法である。また、バッチ法とは、上記の調製ゲルを検体に適量加えて十分に反応させた後、遠心除去して上清を測定に使用する方法である。バッチ法はカラム法にくらべて、一度に多検体を処理することができるので好ましい。

【0060】また、本発明の自己抗体の測定方法では、検体中の抗体価を検出した標識量で表すほかに、既知濃度あるいは既知抗体価の抗AGE抗体などを標準液として用いることで相対的に表すこともできる。すなわち、標準液と検体を同測定系にて同時に測定し、標準液の値を基準にして検体中の抗体価を相対的に表すことができる。

【0061】本発明のAGEに対する自己抗体の測定方法は、AGEが関与する疾患の検査方法としても有益である。先に述べたように、AGEは、糖尿病のような高血糖状態が持続する場合や腎臓疾患のようなクリアランスの低下が認められる場合、また健康人においても加齢により、代謝回転の遅いタンパク質中に著しく蓄積される。

蓄積が認められるタンパク質としては、ヘモグロビン、アルブミン、神経ミエリン、眼球クリスタリン、そのほか皮膚、血管壁、腎臓の糸球体基底膜などの結合組織のコラーゲンやエラスチンなどが挙げられる。これらのタンパク質にAGEが生成すると、変性や機能低下などが生じて各種疾患が惹起される。AGEが関与している疾患としては、糖尿病や冠動脈性疾患、末梢循環障害、脳血管障害、動脈硬化症、凝固障害症、神経障害、腎症、関節硬化症、骨減少症、白内障および網膜症などの糖尿病性合併症、糸球体腎炎などの非糖尿病性腎症、そのほか老化に伴う疾患としてアテローム性動脈硬化症、骨関節症、関節周囲硬直症、関節硬化症、老人性骨粗鬆症、老人性白内障、アルツハイマー病などが挙げられる。

【0062】このように、糖尿病や腎症の進行あるいは老化によりAGEの蓄積量が増加するのに伴って、上述した各組織または血中におけるAGEに対する抗体価も上がることから、両者の間には一定の相関関係があるものと考えられる。したがって、血中における自己抗体の量を測定することにより、ある個体が当該疾患である可能性や当該疾患のどの段階（病期）まで進行しているかなどを診断することができる。さらに、AGEに対する抗体価を測定することによって、当該疾患に対する治療薬の薬効を評価することもできる。

【0063】本発明の自己抗体測定方法を用いた当該疾患の検査方法としては、検体中の抗体価を上述した自己抗体測定方法により測定し、得られた抗体価を当該疾患の抗体価の平均値、あるいは当該疾患の各病期例えば糖尿病性腎症の場合、腎症前期、早期腎症、顕性腎症期、腎不全期および透析療法期における抗体価の平均値と比較することで、当該疾患の可能性あるいはどの病期に相当するかを診断することができる。

【0064】また、本発明の当該疾患の検査方法を、当該疾患の治療薬の薬効評価方法として使用する場合には、検体中の抗体価を上述した自己抗体測定方法により測定し、治療薬の投与による抗体価の低下度を算出して評価することができる。本発明の自己抗体測定方法を用いた当該疾患の検査用試薬としては、上述した自己抗体測定方法に用いた試薬を用いることができる。具体的には、AGE、標識された抗免疫グロブリン抗体などが挙げられる。

【0065】本発明の検査キットは、上述した自己抗体測定方法に用いた試薬、少なくとも検体用希釈液、AGE、抗AGEイディオタイプ抗体、抗AGE抗体および抗免疫グロブリン抗体を含む試薬のいずれかから構成される。上記の構造物および抗体は、上述したような標識物質で標識されたものであってもよい。

【0066】さらに標識物質を検出するための試薬として、例えば標識物質が酵素の場合は、酵素基質、酵素基質溶解液、酵素反応停止液を添付するのが好ましい。検体用希釈液とは、上述のように検体を希釈するために使

用するもので、例えばPBS（生理的リン酸緩衝液、pH 7.4）、137mMの塩化ナトリウムおよび3mMの塩化カリウムを含むpH7.4で20mMのトリス-塩酸緩衝液（以下、「TBSと」略す）、0.05% Tween 20や0.1~1%のBSAを含有させたPBSあるいはTBSなどがあげられる。この検体用希釈液は、検体のほか上記のAGEや抗体の希釈の場合にも用いられる。

【0067】本発明キット中に、上記のAGEあるいは抗体を固相化させる、上述した固相をさらに含めてもよい。固相は、予めこれらを固相化させたものでも、固相と固相化に必要な固相化試薬を添付したのもでもよい。固相化試薬として、例えば物理的吸着による固相化の場合は、50mM炭酸塩緩衝液（pH 9.6）、10 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.5、100mM塩化ナトリウム含有）、PBSなどのコーティング液と、さらに必要に応じてコーティング液に0.5%のゼラチンなどを含有させたブロッキング液が挙げられる。

【0068】また、本発明のキットに上述の吸収抗原を含む吸収試薬をさらに含めてもよい。吸収試薬としては、適当な濃度の吸収抗原をPBSなどに溶解させたもの、あるいは上述のように吸収抗原をゲルに結合させたもの（以下、「吸収用ゲル」と略す）などが挙げられる。吸収用ゲルはさらに適量を、パッチ法による吸収処理用に0.5~2 ml程度のマイクロ遠沈チューブに予めパッケージングしてもよく、あるいはカラム法による吸収処理用にカラム容量が0.1~5 mlのミニカラムに予め充填しておいてもよい。そのほか、本発明のキットに上述の標準液をさらに含めてもよい。標準液としては、既知濃度あるいは既知抗体価の抗AGE抗体を含むものなどが挙げられる。

【0069】本発明に使用する試薬が溶液の場合、防腐剤の添加が可能などときには、適当な防腐剤、例えば0.01%~0.1%程度のアジ化ナトリウムを含有させることが好ましい。また、抗体の場合、必要に応じてさらに適当な安定化剤、例えば1~10mg/mL程度のBSAを含有させることもできる。また、試薬溶液をパッケージングする場合は、高濃度の試薬溶液を0.1~10mL程度適当な容器にパッケージングして希釈液を添付するか、予め適当な濃度に希釈した試薬を10~200mL程度適当な容器にパッケージングすることができる。そのほか、試薬が粉末の場合は適当な溶解液を添付するのが好ましい。

【0070】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

（実施例1）使用した試薬

（1）試薬

ウシ血清アルブミン（BSA、fraction V）およびストレプトゾトシン（STZ）は、Sigma社（St. Louis, MO, 米国）より購入した。D-グルコース、グリオキシ酸および水酸化シアノホウ素ナ

トリウムは和光純薬工業より購入した。PBS(-)は、ニッスイ製薬より購入した。

【0071】ヤギ抗ヒトIgG抗体のビオチン化調製物は、Vector Laboratories (Burlingame, CA) から購入した。ペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗ラットIgG抗体および抗マウスIgGはAmersham社 (Buckinghamshire, 英国) より購入した。96ウェルイムノプレート (Nunc Immunoplate II) は、Nalge Nunc International社 (Roskilde, デンマーク) より購入した。フォルミルセルロファインゲルは生化学工業より購入した。

【0072】(実施例2) AGE構造体の作製

(1) AGE化ウシ血清アルブミン (AGE-BSA) の作製

AGE-BSAを以下のようにして調製した。1.6gのBSA (Sigma社製) を3.0gのD-グルコースとともに、0.5Mのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 10mLに溶解した。この溶解液を濾過滅菌 (孔径0.45 μmのフィルター、ミリポア社製) した後に、37°Cで9カ月間インキュベーションし、1000倍容の0.15Mの塩化ナトリウムを含む20mMのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に対して透析した。グルコースを除く他はすべて同様の操作をBSAに対して行い、AGE-BSAの対照とした。

【0073】(2) CML化ウシ血清アルブミン (CML-BSA) の調製

CML-BSAはIkedaらおよびDunnらの方法 (27, 29; K. Ikeda et al., Biochemistry, 35: 8075-8083 (1996), J. A. Dunn et al., Biochemistry, 30: 1205-1210 (1991)) にて調製した。以下、簡単に説明する。

【0074】20mg/mLのBSAを、750mMのグリオキシル酸 (Ikedaらの論文では1.0~450mM) および300mM (同じく750mM) の水素化シアノホウ素ナトリウムとともに、0.5Mのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中にて、37°Cで24時間インキュベーションした後、PBSに対して透析した。生成したCMLは、アミノ酸分析計にて確認した。グリオキシル酸および水素化ホウ素ナトリウムを除く他はすべて同様の操作をBSAに対して行い、CML-BSAの対照とした。

【0075】(3) CEL化ウシ血清アルブミン (CEL-BSA) の作製

CEL-BSAをAhmedらの方法 (M. U. Ahmed et al., Biochem J., 324: 565-570 (1977)) にて調整した。すなわち、40mg/mLのBSAを、0.2Mピルビン酸ナトリウムと0.3M水素化シアノホウ素ナトリウムを含む10m

MPBS中37°Cで24時間反応させた後、PBSにて透析した。生成したCELは、アミノ酸分析計にて確認した。ピルビン酸および水素化シアノホウ素ナトリウムを除く他はすべて同様の操作をBSAに対して行い、CEL-BSAの対照とした。

【0076】(実施例3) AGE-BSAに対する抗体の調製

(1) AGE-BSAに対するモノクローナル抗体の作製

AGE-BSAに対するモノクローナル抗体は、以下のようにして作製した。Balb/c (8週齢、日本SLC社より購入) に、50%のフロイントの完全アジュバントに懸濁した0.1mgのAGE-BSAを2週間間隔で4回皮下投与した。免疫したマウスの血清中のAGE-BSAに対する抗体価は、以下のようにELISAで測定した。

【0077】96ウェルイムノプレート (Nunc社製) のウェルに、50mM炭酸緩衝液 (pH 9.7) で0.1~1000ng/mLに希釈したAGE-BSAおよび対照としてBSAを100 μL分注し、室温で1時間静置して固相化させた。0.05% Tween 20含有PBS (以下、「緩衝液A」という) で3回洗浄後、0.5%ゼラチン含有50mM炭酸緩衝液 (pH 9.7) を200 μL分注し、室温で1時間静置してウェルをブロッキングした。緩衝液Aで3回洗浄後、0.1% BSA含有緩衝液A (以下、「希釈溶液」という) で20倍希釈したマウス血清を100 μL分注し、室温で1時間反応させた。次いで、緩衝液Aで3回洗浄後、希釈溶液で2000倍希釈したビオチン化抗マウスIgG抗体を100 μL分注した。室温で30分間反応させた後、緩衝液Aで3回で洗浄した。

【0078】これに、アビジン-ビオチン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体溶液を100 μL分注し、室温で1時間反応させた後、緩衝液Aで3回洗浄した。次いで、o-フェニレンジアミン55mgを100mLの0.1Mクエン酸 0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、使用直前に50 μLの30%過酸化水素水を添加して、ペルオキシダーゼ基質溶液を調整した。この基質溶液を100 μL分注して室温で発色させ、10分間後に100 μLの1M硫酸を添加して反応を停止した。

【0079】Micro-ELISAプレートリーダー (Titer tek Multiscan PLUS MKII) を用いて、492nmの波長で吸光度を測定した。最初の投与から2ヶ月後に、最も高い抗体価を有するマウスに、0.1mgのAGE-BSAを腹腔内にブースター投与した。この3日後に、このマウスから脾臓リンパ球を採取し、ポリエチレングリコールの存在下で、ミエローマであるP3U1細胞と融合させて融合細胞を得た (G. Galfre and C. Milst

ein, Methods in Enzymol. 73: 3-47 (1981)).

【0080】上記融合細胞を、10%のBSAを含むHAT培地中にて培養しハイブリドーマを得た。ハイブリドーマの培養上清中の抗体のAGE-BSAまたはBSAに対する反応性を上記のELISA系で測定し、限界希釈法によってサブクローニングした。このスクリーニングの結果、AGE-BSAとは反応し、BSAとは反応しない2株のハイブリドーマが得られた。これらの2株をそれぞれ、6Dおよび1D6と命名した。

【0081】Balb/Cマウス(8週齢、)にプリスタン 0.5 mL /マウス腹腔内投与した1週間後、これらのハイブリドーマをそれぞれBalb/cに 1×10^7 個/マウスで 0.5 mL 投与して腹水を産生させ、投与1~2週間後に腹水を採取した。採取した腹水を 3000 rpm で4にて10分間遠心して上清をとった。 50 mL の無細胞上清に40%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加して、それぞれの抗体を沈殿させた。

【0082】沈殿物を 50 mL の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)に溶解し、同じ緩衝液に対して透析し、 10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)を溶離液として、DEAE-セルロースカラムで精製した。これらのモノクローナル抗体を、 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)を溶離液として、プロテインAアフィニティカラムでさらに精製し、サブクラスをIgG1と決定した。

【0083】(2) AGE-BSAに対するポリクローナル抗体の作製

50%のフロイントの完全アジュバント中に 1.0 mg の抗AGE-BSAを懸濁させ、白色家兔(日本SLC社より購入、体重 $2\sim 3\text{ kg}$)の皮内に $20\sim 30$ 箇所投与した。皮内投与後10日目に、50%のフロイントの完全アジュバントに懸濁した同量のAGE-BSAでブースターをかけ、週1回ずつ4週間、追加のブースター接種を行った。各家兔の皮内および筋肉内に50%の

フロイントの不完全アジュバントに懸濁した 2.0 mg の同じ抗原を最終投与した。最終投与後、10日目に採血し、血清を得た。

【0084】この抗血清は、AGE-BSAを用いた二重免疫拡散法で単一の沈降線を示した。フォルミルセルロファインゲルにBSAまたはAGE-BSAを結合させ、 $1.4 \times 10\text{ cm}$ のカラムに0.02%のNaN₃を含むPBSで充填した。 20 mL の抗血清をこのカラムにかけ、非吸着画分を得て、さらに、同じゲルを充填した別のカラムにかけてBSAに反応する抗体の集団を完全に除去した。

【0085】非吸着画分を合わせて、AGE-BSAを結合させたフォルミルセルロファインゲル($1.5 \times 10\text{ cm}$)にアプライし、このカラムをPBSで洗浄した。カラム吸着画分を 0.1 M のグリシン-塩酸緩衝液(pH 3.0)で溶出し、抗体画分を得た。この抗体画分を中和し、濃縮し、PBSに対して透析した。タンパク質量は 7 mg であった。

【0086】(実施例4)糖尿病ラット血漿中における自己抗体の検出

(1)糖尿病ラットの作製

以下のように、ラットに糖尿病を誘発した。体重 150 g のWistar系ラット(雄、6週齢、日本SLC社より購入)を、ランダムに健常群と糖尿病群とに群分けした。

【0087】糖尿病群のラットに、 10 mM のクエン酸緩衝液(pH 4.3)に溶解したSTZ(ストレプトゾトシン、シグマ社製)を $50\text{ mg}/\text{kg}$ で尾静脈内投与して、糖尿病を誘発した。水と餌とは、両群ともに自由に摂取させた。STZ投与後、1週、3週、5週、14週、および29週間後に、エーテル麻酔下で、採血および組織の摘出を行った。表1に各週のラットの状態を示す。

【0088】

【表1】

表1 STZ誘発糖尿病および同週齢の健常ラットの状態

週	体重		血漿グルコース値 (mg/dL)	
	健常群	糖尿病群	健常群	糖尿病群
1	180.0±2.9 (n=7)	158.5±4.8** (n=24)	133.4±10.1 (n=6)	401.5±10.3**** (n=24)
5	259.7±7.1 (n=6)	157.2±3.9**** (n=24)	157.0±11.5 (n=6)	556.0±8.7**** (n=24)
14	324.3±21.3 (n=7)	131.2±5.9** (n=7)	159.4±18.6 (n=7)	574.4±21.3**** (n=7)
29	378.0±7.2 (n=7)	139.5±13.4**** (n=7)	139.4±5.7 (n=7)	514.7±24.5**** (n=7)

データは平均値±標準偏差 (SEM) で表した。

**P < 0.01 対同週齢の健常ラット群

****P < 0.001 対同週齢の健常ラット群

【0089】STZ投与後1~29週の間、糖尿病ラット群は同週齢の健常ラット群と比較して、体重は有意に少なかったが、血糖値は有意に高かった。

(2-1) ラット組織の調製

STZ誘発糖尿病ラット群および同週齢の健常ラット群の水晶体、腎臓、動脈、坐骨神経組織を摘出し、4あるいは氷上で調製した。上記の組織はそれぞれミンスし、氷冷PBSにより3回洗浄し、組織の10倍容の5mMのEDTAを含む氷冷PBS中で破碎した。これらのホモジネートに最終濃度が0.1MとなるようにNaOHを添加し、4で1晩、振盪した。4にて、12,000rpmで15分間遠心分離し、得られた上清を試料(アルカリ可溶性画分)とした。

【0090】赤血球は、これらの各ラットの血液5mLを遠心分離して採取し、5mLの氷冷PBSにより3回洗浄した。洗浄後、赤血球を、5mMのEDTAを含む0.1MのNaOH2mL中に懸濁し、以下、上記の組織の場合と同様に処理を行った。

【0091】(2-2) AGEの測定

実施例3と同様の非競合ELISA法で、上記ラット組織抽出液中のAGE化タンパク質を測定した。50mM炭酸緩衝液(pH9.7)で各ラット組織抽出液を10ng-10μg/mLに希釈し、4で一晩静置して固相化した。ブロッキング処理後、希釈溶液で1μg/mLに希釈した抗AGEモノクローナル抗体(6D12)を100μL分注し、室温にて1時間反応させた。次いで、希釈溶液で2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下、「HRP」という)標識抗マウスIgG抗体を100μL分注し、室温で30分間反応させた。次に、実施例3と同様に調製したペルオキシダーゼ

基質溶液を100μL分注し、室温で発色させた後、100μLの1M硫酸を添加して反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。

【0092】それぞれの組織中のAGE量は、AGE-BSA(1pg-1μg/mL)を6D12と反応させて作成した検量線より算出し、1mgのタンパク質当たりのAGE-BSA換算量を求めた。結果は、健常ラット組織中AGE量を1として糖尿病ラット組織中AGE量を算出した相対比として表した。

【0093】図2に示すように、赤血球においてSTZ投与後1週間で、健常ラットと比較して1.3倍のAGEの有意な増加が認められた。さらに、その後も増加が続き、STZ投与後5週間で定常状態(1.9倍)となった。他の組織(腎臓、水晶体、動脈および坐骨神経)においても、それぞれのAGEの増加速度に違いがあるものの、同様にAGEの顕著な増加が認められた。

【0094】以上の結果ならびに他の研究者らの同様の報告(H.Nakayama, et al., Diabetes 42:345-350(1993); T.Mitshuhashi, et al., Diabetes 42:826-832(1993))により、実際に、STZ誘発糖尿病状態では、赤血球、水晶体、腎臓、動脈および坐骨神経の組織中において、AGEが生成されることが明らかになった。

【0095】(3) AGEに対する免疫活性の測定

実施例3と同様の非競合ELISA法で、AGEに対する免疫活性を測定した。10μg/mLのAGE-BSAおよび対照としてBSAを100μL分注して固相化した後、ブロッキング処理を行った。ついで、希釈溶液で1mg/mLに希釈したラット血漿を100μL分注して室温で1時間反応させた後、希釈溶

液で2,000倍希釈したHRP標識抗ラットIgG抗体を100 μ L分注し、室温で30分間反応させた。次に、ペルオキシダーゼ基質溶液を100 μ L分注し、室温で10分間発色させた後、100 μ Lの1M硫酸100 μ Lを添加して反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。

【0096】図3に、AGE-BSAあるいはBSAに対する健常ラット血漿および糖尿病ラット血漿の免疫活性の経時変化を示す。AGE-BSAおよびBSAに対する免疫活性は、健常ラットではいずれも変化はなかったが、糖尿病ラットでは、糖尿病の進行（罹病期間の長期化）とともにAGE-BSAに対する免疫活性が大きく上昇することが示された。これより、糖尿病ラットにおいて組織中にAGEが生成するにつれ、これに対する自己抗体が産生されることが示唆された。

【0097】（実施例5）糖尿病ラット血漿中の自己抗体のAGEに対する特異性競合ELISA法により、上記の糖尿病ラット血漿中（STZ投与5週間後）の自己抗体のAGEに対する特異性について検討を行った。実施例3の非競合ELISA法の場合と同様に、10 μ g/mLのAGE-BSAを100 μ L分注して固相化した後、ブロッキング処理を行った。次に、あらかじめ1mg/mLの糖尿病ラット血漿中に0~1mg/mLになるように競合物質を添加し、室温で30分間反応させた血漿100 μ Lを入れた。競合物質としては、実施例2で作製したAGE構造体のAGE-BSA、CML-BSAおよびCEL-BSA、さらに対照としてBSAを用いた。室温で1時間血漿を反応させた後、実施例4と同様に2000倍希釈のHRP標識抗ラットIgG抗体と反応させて、492nmの吸光度を測定した。

【0098】結果は、競合物質の非存在下に対する以下に示す相対比（B/B₀）で表した。B/B₀ = （競合物質存在下の吸光度） / （競合物質非存在下の吸光度）図4に示すように糖尿病ラット血漿中の自己抗体のAGE-BSAに対する反応性は、AGE構造体であるAGE-BSA、CML-BSAおよびCEL-BSAにより阻害されたが、BSAによっては阻害されなかった。このことから、糖尿病ラット血漿中の自己抗体は、AGE構造に対して特異的であることが示唆された。

【0099】（実施例6）糖尿病ラットにおける自己抗体の抗体価

非競合ELISA法により、上記の糖尿病ラット血漿中（STZ投与5週間後）のAGEに対する自己抗体の抗体価を測定した。実施例3の非競合ELISA法と同様に、10 μ g/mLのAGE-BSA、CML-BSA、CEL-BSAおよび対照としてBSAを100 μ L分注して固相化を行った。以下、実施例4の非競合ELISA法と同じ操作により最終的に492nmの吸光度を測定し、各血漿試料のAGE-BSA、CML-BSAあるいはCEL-BSAに対する吸光度から、対照のBSAに対する吸光度を差し引いた値（492nm）をAGE構造に特異的な反応性とし、自己抗

体の抗体価の指標とした。上記した結果を示す図5から明らかとなり、健常ラットに比較して糖尿病ラットにおいては、AGEに対する抗体価の有意な上昇が示された。

【0100】（実施例7）糖尿病患者血漿中の自己抗体の検出

（1）自己抗体のカラムによる精製
AGE-BSAあるいはBSAをフォルミルセルロファイニングルに、Takataらの方法（K.Takata et al., J. Biol. Chem. 263:14819-14825(1988)）に従ってカップリングした。8名の糖尿病患者の血漿20mLを、PBSにより充填したBSAカップリング-フォルミルセルロファイニングルカラム（1.0 \times 10cm）に通した。カラム非吸着画分を、AGE-BSAカップリング-フォルミルセルロファイニングル充填カラム（1.5 \times 10cm）に通した。大量のPBSでカラムを洗浄した後、カラム吸着画分を50mLの1.0Mグリシン-塩酸緩衝液（pH3.0）にて溶出させた。溶出画分をPBSにて透析した後、自己抗体測定用試料とした。

【0101】（2）自己抗体のAGE構造に対する特異性
実施例5と同様の競合ELISA法により検討した。実施例5の非競合ELISAと同様に、10 μ g/mLのAGE-BSAを100 μ L分注して固相化した後、ブロッキング処理を行った。ついで、あらかじめ0.1 μ g/mLの上記の自己抗体測定用試料に0~1mg/mLになるように競合物質を添加して、室温で30分間反応させたものを100 μ L入れた。競合物質としては、実施例5と同じくAGE-BSA、CML-BSA、CEL-BSA、およびBSAを用いた。室温で1時間反応させた後、2000倍希釈のビオチン化抗ヒトIgG抗体と室温で30分間反応させた。ついで、アビジン-ビオチン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体溶液と反応させ後、ペルオキシダーゼ基質溶液で発色させて492nmの吸光度を測定した。結果は、実施例5と同様にB/B₀で表した。

【0102】図6に示すように、自己抗体のAGE-BSAに対する反応性は、AGE構造体であるAGE-BSA、CML-BSAおよびCEL-BSAにより阻害されたが、BSAによっては阻害されなかった。この結果から、糖尿病患者においても糖尿病ラットと同様に、AGEに対して特異的な自己抗体が存在することが示唆された。

【0103】（実施例8）糖尿病患者、糖尿病性腎症および非糖尿病性腎症患者血漿中の自己抗体の測定
糖尿病患者、糖尿病性腎症および非糖尿病性腎症患者血漿中の自己抗体を実施例6と同様に非競合ELISA法により測定した。

（1）ヒト血漿試料
ヒトの血漿試料は、下記表2の6グループ（各10名で構成）より採取した。

【0104】

【表2】

表 2 ²⁴

グループ	分類	平均年齢 (歳) (平均値 ± S E M)	ヘモグロビン A 1 c (%)
1	健常人	72.8 ± 2.9	
2	腎症を伴わない糖尿病患者	63.2 ± 3.8	8.4 ± 0.3
3	糖尿病性腎症：早期	68.5 ± 4.6	8.8 ± 0.3
4	糖尿病性腎症：顕性期	63.5 ± 6.3	9.4 ± 0.6
5	糖尿病性腎症：透析療法期 * 透析治療期間 2.5 ± 1.3年	67.7 ± 6.6	6.6 ± 0.7
6	非糖尿病性腎症：透析療法期 * 透析治療期間 3.6 ± 1.3年	64.7 ± 5.6	

【0105】表中、糖尿病性腎症：早期は微量アルブミン尿を伴う糖尿病患者を、糖尿病性腎症：顕性期は持続性タンパク尿を伴う糖尿病患者をそれぞれ表す。透析患者からの採血は透析治療直前に行った。

(2) AGE-BSAを用いた自己抗体の測定
表2に示した患者血漿に以下の前処理を行った後、非競合ELISA法にて自己抗体を測定した。

【0106】(2-1) ヒトの血漿試料のバッチ法による前処理

マイクロ遠沈チューブ(容量1.5mL)に、ゲル容量が500 μLとなるようにBSAカップリング-フォルミルセルロファインゲルを充填した後、500 μLのPBSを添加する。このチューブに6グループそれぞれの血漿100 μLを加えて、4 で1晩振盪させた後15,000rpmで30秒間遠心した。

【0107】上清 550 μL を、ゲル容量500 μLのAGE-BSAカップリング-フォルミルセルロファインゲル充填マイクロ遠沈チューブ(容量1.5mL)に添加し、4 で6時間振盪した。ゲルを3回 PBSで洗浄した後、500 μLの0.1 Mのグリシン-塩酸緩衝液(pH2.3)に添加して、4 20 で30分間振盪後15,000rpmで30秒間遠心した。400 μLの上清に1 Mトリス-塩酸緩衝液(pH9.5)を50 μL添加して中和し、自己抗体測定用の試料とした。

【0108】(2-2) AGE-BSAを用いた非競合ELISA法による測定

実施例6の非競合ELISA法と同様に、10 μg/mLのAGE-BSA、および対照としてBSAを100 μL分注して固相化し、ブロッキング処理を行った。次に、希釈溶液で2倍希釈した上記自己抗体測定用試料を100 μL入れて、室温で1時

間反応させた後、ビオチン化抗ヒトIgG抗体を室温で30分間反応させた。以下、実施例4の非競合ELISA法と同じ操作により最終的に492 nmの吸光度を測定し、各測定試料のAGE-BSAに対する吸光度から、対照のBSAに対する吸光度を差し引いた値(492nm)をAGE構造に特異的な反応性とし、自己抗体の抗体価の指標とした。

【0109】図7に示すように、ヒト血漿中の抗体価は糖尿病により上昇し、さらに糖尿病性合併症の糖尿病性腎症においては腎症の進展とともに顕著な上昇が認められた。特に、糖尿病性腎症の顕性期および透析療法期の患者においては、健常人に対してだけでなく腎症を伴わない糖尿病患者に対しても有意な上昇を示した。また、糖尿病の他にAGEの関与が示唆されている非糖尿病性腎症においても、有意な上昇が示された。

【0110】(3) CEL-BSAを用いた自己抗体の測定
表2に示した患者血漿に以下の前処理を行った後、非競合ELISA法にて自己抗体を測定した。

(3-1) ヒトの血漿試料の前処理
10mg/mLのBSA含有PBS 1.5 mLに、上記6グループそれぞれの血漿5 μLを添加して4 で1晩静置したものを測定用試料とした。

【0111】(3-2) CEL-BSAを用いた非競合ELISA法による測定

実施例6の非競合ELISA法と同様に、10 μg/mLのCEL-BSA、および対照としてBSAを100 μL分注して固相化し、ブロッキング処理を行った。次に、希釈溶液で300倍希釈した上記の血漿を100 μL入れて、室温で1時間反応させた。以下、実施例8(2-2)と同じ操作により最終的に492 nmの吸光度を測定し、各測定試料のCEL-BSAに対する

吸光度から、対照のBSAに対する吸光度を差し引いた値 (492nm)をAGEに特異的な反応性とし、自己抗体の抗体価の指標とした。

【0112】上記結果を示す図8から明らかなように、図7のAGEとしてAGE-BSAを用いて測定した場合と同様に、ヒト血漿中の抗体価は、糖尿病により上昇し、さらに糖尿病性腎症および非糖尿病性腎症において健常に対して有意な上昇が認められた。

【0113】

【発明の効果】本発明の方法により、AGEに対する自己抗体を免疫学的に測定することにより、AGEの生成および蓄積が関与する疾患、すなわち、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患を検査できる。本発明は、このような疾患の検査用キットおよび検査用試薬を提供する。これらの検査試薬または検査キットを使用すれば、自己抗体の量から糖尿病合併症などがどの段階にあるかを精度よく判断することができる。また、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患に対する治療薬あるいは治療薬候補*

*化合物を投与したときと投与しなかったときのAGEに対する自己抗体を測定して、比較することにより上記疾患治療薬の薬効を評価することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】メイラード反応の反応経路を示す図である。

【図2】糖尿病ラット組織中のAGEの増加を示す図である。

【図3】糖尿病ラット血漿のAGEに対する免疫反応性と糖尿病罹病期間との関係を示す図である。

【図4】糖尿病ラット血漿の自己抗体のAGE特異性を示す図である。

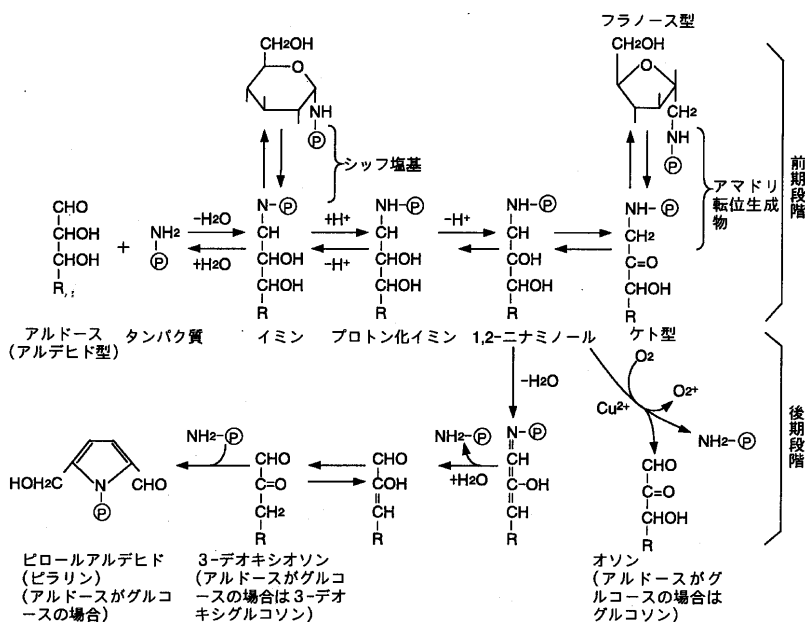
【図5】糖尿病ラット血漿の自己抗体価を示す図である。

【図6】糖尿病患者血漿中の自己抗体のAGE特異性を示す図である。

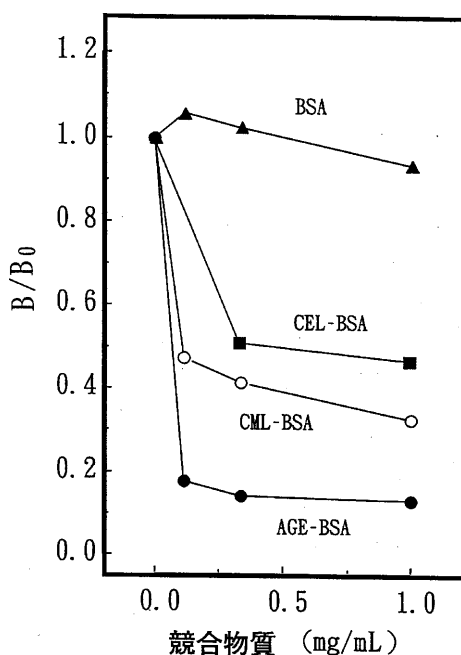
【図7】AGE-BSAを用いて測定したヒト血漿の自己抗体価と疾患との関係を示す図である。

【図8】CEL-BSAを用いて測定したヒト血漿の自己抗体価と疾患との関係を示す図である。

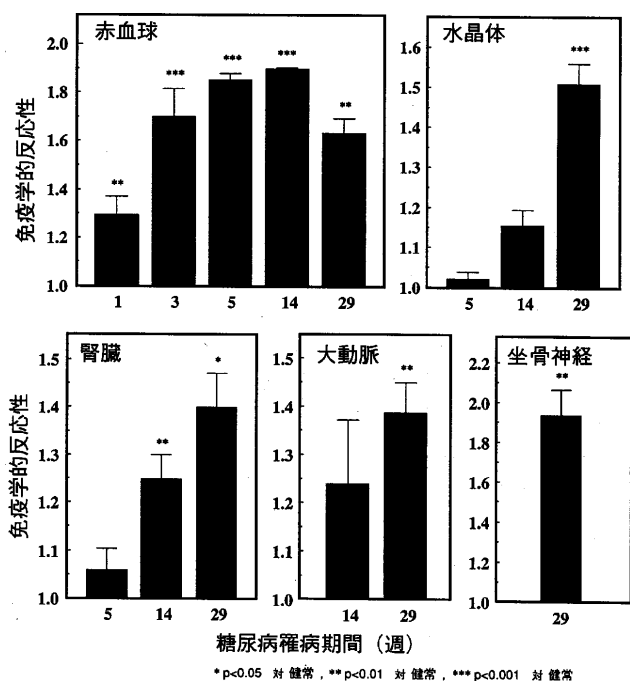
【図1】



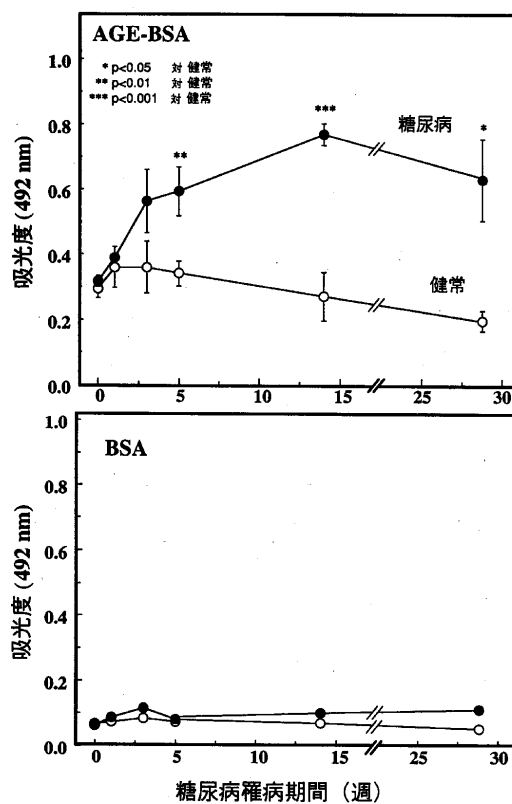
【図6】



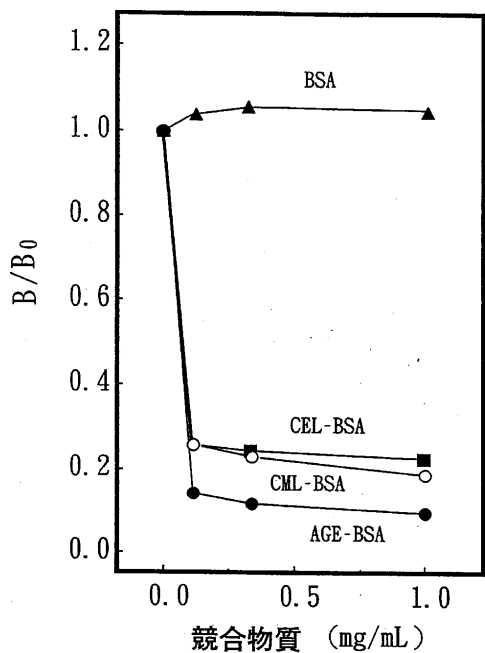
【圖2】



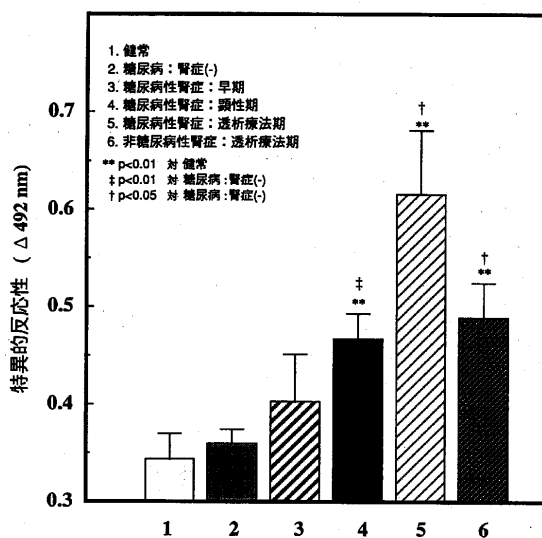
【圖3】



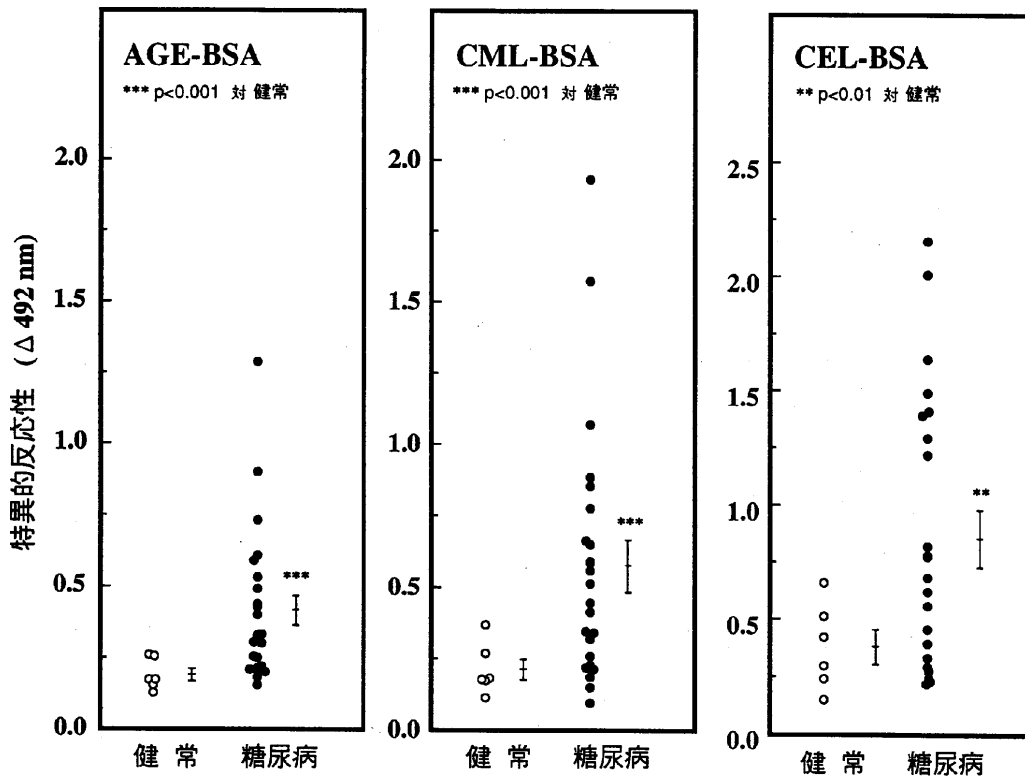
【圖4】



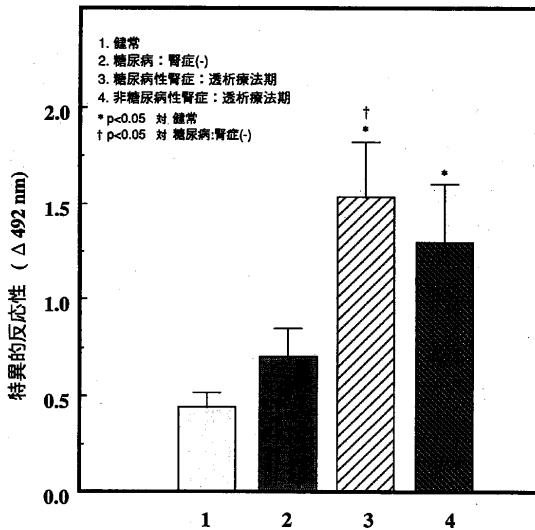
【圖7】



【図5】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C 1 2 P 21/08

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

C 1 2 P 21/08

テマコード(参考)

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4H045 AA10 AA11 BA10 BA50 CA40
DA75 DA76 DA86 EA50 FA51
FA52 FA72

专利名称(译)	免疫学检测美拉德反应晚期产物的自身抗体		
公开(公告)号	JP2001004627A	公开(公告)日	2001-01-12
申请号	JP2000074398	申请日	2000-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	日清制粉株式会社		
申请(专利权)人(译)	日清制粉株式会社		
[标]发明人	堀内正公 荒木令江 柴山利惠		
发明人	堀内 正公 荒木 令江 柴山 利惠		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/42 C07K16/44 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/532 G01N33/564		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/532.A G01N33/564.Z C07K16/42 C07K16/44 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA51 4H045/FA52 4H045/FA72		
优先权	1999111314 1999-04-19 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：使用临床测试中经常使用的血液或血清来检测器官中美拉德反应后期产物 (AGE) 的存在，而器官难以进行切除测试以检测血液或血清中AGE的存在。以及用于执行该方法的测试试剂盒和测试试剂。通过免疫学方法测量抗AGE的自身抗体，以检查与AGE产生和积累有关的疾病，例如糖尿病，糖尿病并发症，非糖尿病性肾病或与衰老有关的疾病。。另外，使用针对AGE的自身抗体的测量来评估治疗药物对该疾病的功效。[效果]从通过本发明的方法测量的AGE值，可以诊断疾病并且可以准确地确定疾病的进展阶段。

【图1】

