

(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2006-208119

(P2006-208119A)

(43) 公開日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	W	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	B	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2005-19004 (P2005-19004)	(71) 出願人	000006770 ヤマサ醤油株式会社 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
(22) 出願日	平成17年1月27日 (2005.1.27)	(72) 発明者	中野 貴成 千葉県銚子市栄町2丁目2-2
		(72) 発明者	長田 篤雄 千葉県銚子市豊里台1丁目1044-734
		Fターム(参考)	2G045 AA25 BB31 CA25 DA62 DA63

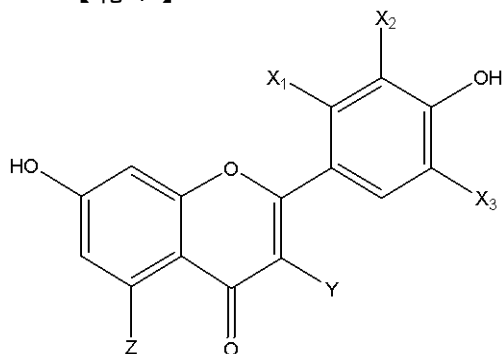
(54) 【発明の名称】 試料の安定化法

(57) 【要約】

【課題】 高密度リポタンパク質 (High-density lipoprotein; H D L) を含有する試料の安定化法を提供する。

【解決手段】 下記式 (I) で表される化合物を試料に添加し、試料中の酸化された H D L の酸化度合いを安定化することを特徴とする酸化 H D L の安定化法を提供する。

【化 1】



(I)

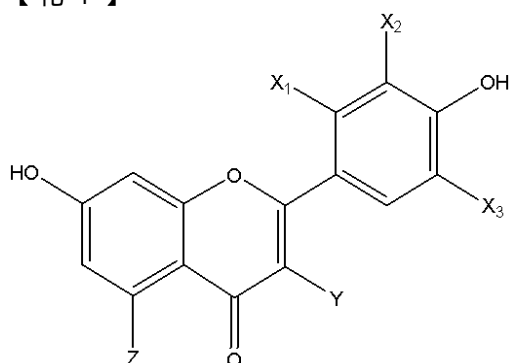
(式中、X 1、X 2、X 3、Y 及び Z は、水素原子、水酸基、カルボキシル基、糖残基を示す。)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (I) で表される化合物を試料に添加し、試料中の酸化された高密度リポタンパク質 (H D L) の酸化度合いを安定化することを特徴とする酸化 H D L の安定化法。

【化 1】



10

(I)

(式中、 X 1 、 X 2 , X 3 , Y 及び Z は、水素原子、水酸基、カルボキシル基、糖残基を示す。)

【請求項 2】

X 1 、 X 2 , X 3 , Y 及び Z が水素原子又は水酸基である化合物を使用する、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

X 1 、 X 2 , X 3 及び Z が水素原子又は水酸基で、 Y が糖残基である化合物を使用する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

クエルセチン、モリン、ルチンから選ばれた化合物を使用する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

2 種以上の化合物を併用する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

クエルセチン及び / 又はルチンを使用する、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 7】

血液試料である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 記載の方法により安定化された酸化 H D L を含有する試料。

【請求項 9】

酸化 H D L を含有する試料を保管する際、請求項 1 記載の方法により安定化された試料として保管する、酸化 H D L を含有する試料の保管法。

【請求項 10】

酸化 H D L を免疫学的測定法により測定する方法において、試料として請求項 1 記載の方法により安定化された酸化 H D L を含有する試料を使用する、酸化 H D L の免疫学的測定法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高密度リポタンパク質 (High-density lipoprotein; H D L) を含有する試料の安定化法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

50

酸化ストレスは、生体の構造や機能を担っている脂質、タンパク質、核酸などを酸化し、生体の構造や機能に損傷を与えることにより、癌、生活習慣病など数多くの疾患の発症に関与している。

【0003】

なかでも、循環器系疾患発症のリスクファクターとして知られる動脈硬化の進行は、酸化された低密度リポタンパク質 (Low-density lipoprotein; LDL) との関連が強く示唆されている。酸化LDL (もしくは変性LDL) は、マクロファージに取り込まれ、動脈壁に蓄積するため、酸化ストレスまたは動脈硬化のリスクマーカーとしての酸化LDLが広く研究されている。

【0004】

一方、循環器系疾患発症の予防因子として知られるHDLは、LDLよりも酸化感受性が高く、自らが酸化されることによってLDLの酸化を抑制したり、増悪因子としての酸化LDLの作用効果を中和するなど、酸化ストレスのスカベンジャーとしての役割が注目されている。すなわち、酸化HDLは、酸化ストレスの亢進や酸化LDLなどの増悪因子の増加を予測または示唆する鋭敏なマーカーとして期待されている。

【0005】

【非特許文献1】Kohnoら、2000, Clin Biochem, 33, 243-53

【非特許文献2】Whalleyら、1990, Biochem. Pharmacol., 39, 1743-1750

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従来、このような酸化HDLを特異的に測定する方法としては、免疫学的測定法等が報告されている。しかしながら、HDLは前述したとおり、容易に酸化されることから、免疫学的測定法等で正確な測定値を得るためには、試料中のHDLの酸化度合いを採取時以降は変化させずに安定化すること(以下、単に「安定化」と言うこともある)が必要とされていた。

【0007】

たとえば、酸化LDLを測定する際、EDTA、ビタミンE、テオフィリン、ジピダモール、2,6-ジ-tブチル-p-クレゾール(buthylated hydroxytoluene; BHT)などの化合物を試料中に添加し、試料中の酸化LDLを安定化する方法が報告されている(Kohnoら、2000, Clin Biochem, 33, 243-53)。

【0008】

本発明者らは、酸化LDLの安定化剤として報告されている上記化合物が酸化HDLの安定化剤としても利用できるのではないかと考え検討した結果、残念ながらこれらの化合物はHDLの酸化を抑制する効果は認められず、安定化剤としては利用できないことを確認した。その理由としては、LDLとHDLは共にリポタンパク質であるものの、HDLの酸化抵抗性はLDLより低く、HDLはリポタンパク質に含まれている抗酸化物質であるビタミンEやユビキノール10の含量も低く、しかもHDLの主要な蛋白成分であるアポリタンパク質AⅠが高い酸化感受性を有すること等が考えられるが、確証は得られていない。

【0009】

また、生体内におけるLDL酸化の原因の1つとしては、マクロファージによる酸化も指摘されている。すなわち、Whalleyら(1990, Biochem. Pharmacol., 39, 1743-1750)は、モリン、フィセチン、クエルセチン及びゴシペチンがマクロファージによる酸化LDLの取り込みを抑制し、この抑制はこれら化合物の抗酸化作用によるものと推測している。

【0010】

しかしながら、これらの化合物がどの程度LDLの酸化を抑制するのかの定量的な評価は行われていない。また、上述したように、EDTA、ビタミンE、テオフィリン、ジピダモール、BHTなどのように、酸化LDLの安定化には効果を示すが、酸化HDLの安

10

20

30

40

50

定化には全く効果を示さない例もあり、モリン、フィセチン、クエルセチン又はゴシペチンが酸化HDLの安定剤として利用できるか否かを予想することは全く不可能なものである。さらに、仮に、モリン、フィセチン、クエルセチン又はゴシペチンが酸化HDLの安定剤として利用できるとしても、免疫学的測定法等の測定に悪影響を及ぼす可能性もあり、上記報告ではそのような検討は全く行われていないし、その示唆もない。

【課題を解決するための手段】

【0011】

このような状況下、本発明者らは、酸化HDLの安定化剤として利用可能な化合物を見出すべく、種々の化合物をスクリーニングした結果、フラバノール骨格を有する特定の化合物が酸化HDLの安定剤として利用できることを見出し、これを基に本発明を完成させた。したがって、本発明は、以下の通りである。

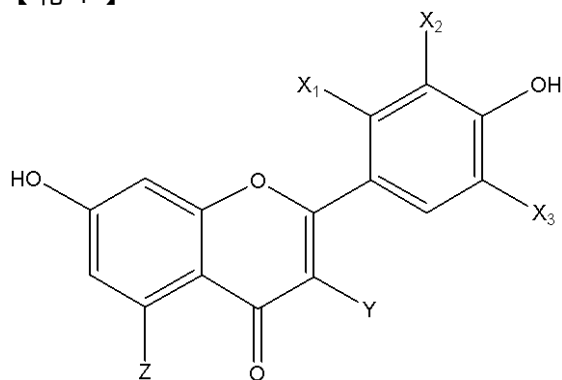
10

【0012】

[1] 下記式(I)で表される化合物を試料に添加し、試料中の酸化されたHDLの酸化度合いを安定化することを特徴とする酸化HDLの安定化法。

【0013】

【化1】



20

(I)

(式中、X1、X2、X3、Y及びZは、水素原子、水酸基、カルボキシル基、糖残基を示す。)

【0014】

30

[2] X1、X2、X3、Y及びZが水素原子又は水酸基である化合物を使用する、[2]記載の方法。

[3] X1、X2、X3及びZが水素原子又は水酸基で、Yが糖残基である化合物を使用する、[1]記載の方法。

【0015】

[4] クエルセチン、モリン、ルチンから選ばれた化合物を使用する、[1]記載の方法。

[5] 2種以上の化合物を併用する、[1]記載の方法。

【0016】

[6] クエルセチン及び/又はルチンを使用する、[1]記載の方法。

40

[7] 血液試料である、[1]記載の方法。

【0017】

[8] 上記[1]記載の方法により安定化された酸化HDLを含有する試料。

[9] 酸化HDLを含有する試料を保管する際、上記[1]記載の方法により安定化された試料として保管する、酸化HDLを含有する試料の保管法。

[10] 酸化HDLを免疫学的測定法により測定する方法において、試料として上記[1]記載の方法により安定化した酸化HDLを含有する試料を使用する、酸化HDLの免疫学的測定法。

【発明の効果】

【0018】

50

本発明によれば、上記式 (I) で示される化合物、とくにクエルセチン及びノ又はルチンを用いることにより酸化 HDL を安定化することができ、しかも式 (I) 化合物は免疫学的測定法に何ら影響を及ぼさないことから、このような安定化された試料は長期保管に適しており、このような安定化された試料を用いて免疫学的に酸化 HDL を測定することで、たとえば、採取した時点の酸化 HDL の正確な値を、採取後時間が経っても安定して得ることができるという、格別の効果を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 9 】

本発明で安定化剤として使用する化合物は、前記式 (I) に含まれる化合物であれば、いずれのものも使用可能であるが、中でも (a) 群の化合物 (X 1、X 2、X 3、Y 及び Z が水素原子又は水酸基である化合物) と (b) 群の化合物 (X 1、X 2、X 3 及び Z が水素原子又は水酸基で、Y が糖残基である化合物) が安定化の効果の点で好適である。

10

【 0 0 2 0 】

(a) 群の化合物としては、クエルセチン (Quercetin; X 1 = X 3 = 水素原子、X 2 = Y = Z = 水酸基)、ミリセチン (myricetin; X 1 = 水素原子、X 2 = X 3 = Y = Z = 水酸基)、モリン (morin; X 2 = X 3 = 水素原子、X 1 = Y = Z = 水酸基)、ケンペロール (kaempferol; X 1 = X 2 = X 3 = 水素原子、Y = Z = 水酸基) など例示することができ、好ましくはクエルセチン又はモリン、より好ましくはクエルセチンを挙げることができる。

【 0 0 2 1 】

また、(b) 群の化合物における Y の糖残基としては、グルコース、アラビノース、ラムノースなど単糖残基、ルチノース、グルコピオース、ピシアノース、ラクトースなどの二糖残基を例示することができる。(b) 群の化合物を具体的に例示すれば、ルチン (rutin; X 1 = X 3 = 水素原子、X 2 = Z = 水酸基、Y = ルチノース残基) などのフラボノール配糖体を挙げることができる。

20

【 0 0 2 2 】

このような化合物の中でも、後述実施例に示すように、クエルセチン及びノ又はルチンが特に好適であり、使用濃度としては、100 μ M 以上、好ましくは 1 mM ~ 10 mM の範囲から適宜選定すればよい。なお、上記化合物は、単独で用いてもよく、又は 2 種以上を併用してもかまわない。併用する場合のそれぞれの使用濃度は組み合わせ毎に、適宜小規模試験により決定すればよい。

30

【 0 0 2 3 】

本発明の安定化剤を試料に添加し、安定化させた試料を用いた免疫学的測定法による酸化 HDL の測定は、公知の方法に準じて行うことができる (J Lab Clin Med. 2003. 141: 378-84、特開平 9 - 3 3 5 2 5 号公報など参照)。

また、試料を保管する場合、上記の本発明の安定化剤を添加した場合であっても、冷蔵庫等の低温暗所条件下で試料を保存するのが好ましい。

【実施例】

【 0 0 2 4 】

以下、本発明について実施例をあげて具体的に説明するが、本発明はこれらによって何等限定されるものではない。

40

【 0 0 2 5 】

(1) 方法

(1 - 1) 試料

HDL を含む試料として健常者 3 名より得た新鮮血清を用いた。採血して得られた血清は使用するまで - 80 に保存した。また、採取した血液の一部から超遠心法により HDL を精製し、以下の試験に供した。

【 0 0 2 6 】

(1 - 2) 酸化 HDL の測定

試料中の酸化 HDL の測定は 2 ステップのイムノアッセイ法により行った (Nakano and

50

Nagata, J Lab Clin Med. 2003. 141:378-84)。すなわち、モノクローナル抗酸化アポリポタンパク質 A I 抗体をコートした 96 穴マイクロプレートに試験試料を 100 μ l 毎分注し、4 で 1 晩反応させ、未反応成分を洗浄除去した。次いで西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗アポリポタンパク質 A I 抗体を 100 μ l 加え、室温で 1 時間反応させた。TMB 溶液(Scytek)を 100 μ l 毎分注して発色させた後、1 N 硫酸にて反応を停止し、450 nm における各ウエル (well) の吸光度を測定し、標準品を参照することで、各検体の酸化 HDL 濃度を定量した。なお、40 mM の 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH、和光純薬工業)で酸化したアポリポタンパク質 A I (1 μ g) と同等の免疫反応性を示す値を 1 ユニット (U) として表した。

【0027】

10

(1-3) 酸化 LDL の測定

試料中の酸化 LDL の測定は、アポリポタンパク質 B のアルデヒド化リジン残基を認識する酸化 LDL 測定 ELISA キット (Mercodia, Sweden) を用いた。

【0028】

(1-4) 試料の酸化

試料の酸化は、以下に示すように、ラジカル発生剤の添加、光暴露及び長期保存により行った。

(a) ラジカル発生剤添加

市販のラジカル発生剤である AAPH を用い、試料に 40 mM になるように添加することで試料の酸化を行った。その濃度以外の場合はその都度表示してある。

20

【0029】

(b) 光暴露

光暴露は、紫外線 (365 nm) 又は蛍光灯の光を試料に暴露することにより実施した。紫外線暴露は、MINELIGHT LAMP UVGL-58 (UVP, USA) を用いて行った。また、蛍光灯の光による酸化は、デスクランプ (IC インバーター、日立) を用い、ルクスマーターにより光量を測定しながら行った。

(c) 長期保存

試料を、遮光した状態で、-20、4、23、37 の各条件下、任意の時間放置することで実施した。

【0030】

30

(2) 結果

(2-1) 各種酸化ストレスの影響

健常人 3 名より採取した血清に対し、ラジカル発生剤添加、光暴露、長期保存の各種酸化処理を実施し、処理前後の酸化リポタンパク質を測定した。各酸化処理条件下における酸化リポタンパク質の値の処理前後の変動の平均値 (倍率) を表 1 に示す。なお、未処理の時の酸化 HDL 測定値は 1.54 ± 0.50 U/dl であり、酸化 LDL 測定値は 39.3 ± 5.7 U/l であった。

【0031】

表 1 から明らかなように、AAPH による酸化では酸化 HDL は劇的に増加し、また光暴露でも数十倍の増加が認められた。長期保存でも 2 - 4 割増加した。一方、酸化 LDL はすべての条件においてその値は増加せず、LDL と比較し、HDL の方は酸化ストレスに対する感受性が極めて高いことが明らかとなった。

40

【0032】

【表 1】

酸化処理	酸化HDL増加倍率 (標準偏差)	酸化LDL増加倍率 (標準偏差)
ラジカル発生剤添加 AAPH 60mM	20.2 (9.0)	1.1 (0.0)
AAPH 120mM	1998 (865)	1.0 (0.2)
光暴露 700ルクス 7日間	25.3 (12.3)	0.9 (0.7)
UVA 4日間	58.8 (21.5)	0.6 (0.4)
長期保存 -20℃ 56日間	1.4 (0.4)	0.8 (0.2)
4℃ 42日間	1.2 (0.2)	0.7 (0.1)
23℃ 14日間	1.4 (0.5)	0.9 (0.3)
37℃ 14日間	1.3 (0.2)	1.0 (0.3)

10

カッコ内は、標準偏差を示す。

【0033】

(2-2) 抗酸化物質のスクリーニング

試料中のHDLを安定化する化合物をランダムスクリーニングし、被験化合物の精製HDLに対する抗酸化効果を評価した。結果の一部を図1に示す。図1から明らかのように、紫外線暴露による酸化処理では、ビタミンEやBHTなどはHDLに対する抗酸化効果は認められず、酸化HDLの増加率は5倍以上であったが、フラボノイド化合物(エピカテキンとフィセチンを除く)ではその増加率は5倍以内であった。

20

【0034】

次に、カテキン、モリン、ミリセチン、クエルセチン、ルチンおよびタンニンについて、血清HDLでの安定化効果について検討した。すなわち、これら化合物を血清試料に添加し、紫外線で24時間照射したところ、カテキンではコントロールとほぼ変わらず、暴露なしの値に比べ4倍ほど上昇していた。一方、モリン、クエルセチン、ルチン並びにタンニンでは暴露なしの値に比べ、暴露ありの値は2倍程度と顕著な安定化効果が認められた(図2)。フィセチンとミリセチンについても、安定化効果は認められたが、その効果は他のものと比較し、若干弱いものであった。

30

【0035】

安定化物質として有望なルチン、クエルセチン、モリン及びタンニンについて、それぞれの有効濃度を確認するため、濃度依存試験を実施した。

その結果、図3に示すように、ルチン、クエルセチン及びモリンは濃度依存的にその安定化効果を示し、かつコントロールの結果から判断して上記化合物は免疫測定に何ら影響を及ぼさないことが確認された。

【0036】

さらに、血清に4mMのクエルセチンを添加した場合の安定化効果を、上記と同様に紫外線照射と蛍光灯下という過酷な条件下において経時的に評価した。その結果、図4に示すように、添加群では紫外線暴露でもその酸化HDL値はほとんど変化しなかった。また、蛍光灯暴露では2倍程度の上昇のみであった。これらの結果から、クエルセチンは、血清など生体試料中の酸化HDLの長期の安定化に効果的であることが確認された。

40

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、紫外線で24時間暴露後の精製HDL中の酸化HDL値の増加率(倍率)を示したものである。

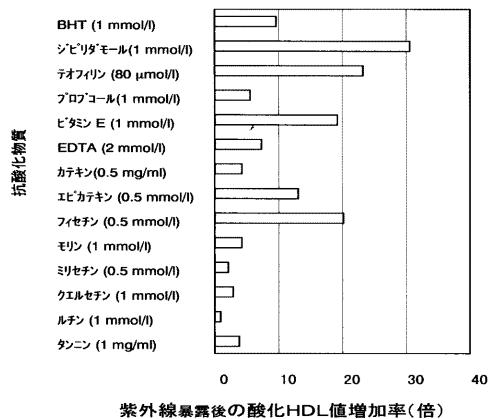
【図2】図2は、紫外線で24時間暴露後の血清HDL中の酸化HDL値を示したものである。

50

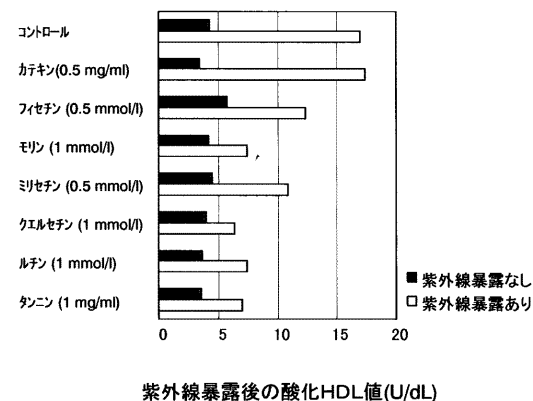
【図3】図3は、各種化合物を添加した血清試料を紫外線または蛍光灯で24時間暴露後の酸化HDLの変動を示したものである。なお、各条件で3回実験し、図にはその平均値を示し、エラーバーは3回の測定値の標準偏差を示す。また、白丸(○)は紫外線暴露を、黒三角(▲)は蛍光灯700ルクス暴露を、バツ(x)はコントロールを示す。

【図4】図4は、4mMクエルセチン添加ならびに未添加の血清試料を紫外線または蛍光灯で暴露し、各酸化HDL値を経時的に測定した結果を示したものである。なお、各条件で3回実験し、図にはその平均値を示し、エラーバーは3回の測定値の標準偏差を示す。白丸(○)はクエルセチン添加で紫外線暴露の結果を、黒丸(●)はクエルセチン未添加で紫外線暴露の結果を；白三角(△)はクエルセチン添加で蛍光灯暴露の結果を、黒三角(▲)はクエルセチン未添加で蛍光灯暴露の結果をそれぞれ示す。

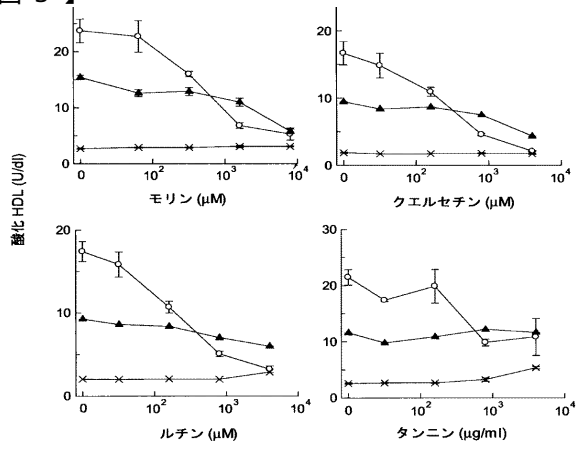
【図1】



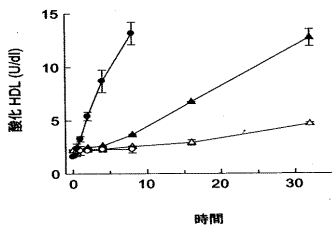
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

【要約の続き】

また、上記方法により安定化された酸化HDLを含有する試料、酸化HDLを含有する試料を保管する際、上記方法により安定化された試料として保管する、酸化HDLを含有する試料の保管法、及び酸化HDLを免疫学的測定法により測定する方法において、試料として上記記載の方法により安定化した酸化HDLを含有する試料を使用する、酸化HDLの免疫学的測定法も提供する。

专利名称(译)	稳定样品的方法		
公开(公告)号	JP2006208119A	公开(公告)日	2006-08-10
申请号	JP2005019004	申请日	2005-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	山佐株式会社		
申请(专利权)人(译)	山佐公司		
[标]发明人	中野貴成 長田篤雄		
发明人	中野 貴成 長田 篤雄		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.W G01N33/48.B		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB31 2G045/CA25 2G045/DA62 2G045/DA63		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种稳定含有HDL（高密度脂蛋白）的样品的方法。ZOLUTION：通过添加式（I）表示的化合物（其中，X1-X3，Y和Z独立地为氢原子，羟基，羧基或糖残基）来稳定氧化HDL的方法。提供了稳定样品中氧化HDL的氧化程度的样品。含有通过该方法稳定的氧化HDL的样品；含有氧化HDL的样品的储存方法，用于储存它们作为当储存含有氧化HDL的样品时通过该方法稳定的样品；提供了使用含有通过该方法稳定的氧化HDL的样品作为样品的氧化HDL的免疫测定方法。Z

(57)【要約】

【課題】 高密度リポタンパク質（料）の安定化法を提供する。

【解決手段】 下記式（I）で表されるの酸化度合いを安定化することを特徴【化1】

