

(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2006-312621

(P2006-312621A)

(43) 公開日 平成18年11月16日(2006.11.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	4B064
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4H045
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 545Z	
GO1N 33/545 (2006.01)	GO1N 33/543 541B	
GO1N 33/553 (2006.01)	GO1N 33/545 B	
審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-94937 (P2006-94937)	(71) 出願人	000153030 株式会社ジェイ・エム・エス 広島県広島市中区加古町12番17号
(22) 出願日	平成18年3月30日 (2006.3.30)	(74) 代理人	110000040 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
(31) 優先権主張番号	特願2005-108623 (P2005-108623)	(72) 発明者	山本 敬史 広島市中区加古町12番17号株式会社ジェイ・エム・エス内
(32) 優先日	平成17年4月5日 (2005.4.5)	(72) 発明者	木村 祐子 広島市中区加古町12番17号株式会社ジェイ・エム・エス内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	Fターム (参考)	4B064 AG26 AG27 CA10 DA13 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 CA42 DA70 DA75 DA76 DA86 EA50 FA71 FA72

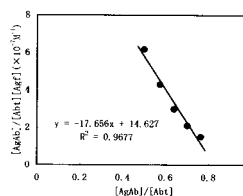
(54) 【発明の名称】 3, 4-DGE に由来する AGE s に特異的に反応する抗体

(57) 【要約】

【課題】 タンパク質やペプチドとの反応性が強いカルボニル化合物由来のAGEs抗体の提供、ならびに、前記カルボニル化合物由来AGEsの検出方法の提供である。

【解決手段】 3,4-ジデオキシグルコソ-3-エン (3,4-DGE) とタンパク質とを反応させ、その反応生成物AGEsを宿主動物に免疫感作し、前記宿主動物から回収した血清より、前記反応生成物AGEsに対する抗体 (抗AGEs抗体) を単離する。この単離した抗AGEs抗体と試料とを反応させ、前記試料中のAGEsと抗AGEs抗体との抗原抗体反応を検出することによって、前記試料中におけるAGEsの有無または含量を検出できる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

後期糖化反応生成物 (AGEs: advanced glycation endproducts) に対する抗体であって、前記AGEsが、3,4-ジデオキシグルコソン-3-エン (3,4-DGE) とタンパク質またはペプチドとの反応生成物であることを特徴とする抗AGEs抗体。

【請求項 2】

メチルグリオキサール (MGO)、グリオキサール (GO)、3-デオキシグルコソン (3-DG)、5-ヒドロキシメチル-フルフラール (5-HMF)、フルフラール (Fur)、ホルムアルデヒド (FA)、グルコース (Glu) およびアセトアルデヒド (AA) からなる群から選択された少なくとも一つのカルボニル化合物とタンパク質またはペプチドとの反応生成物に反応しない、請求項 1 記載の抗AGEs抗体。

10

【請求項 3】

ペントシジン残基およびカルボキシメチルリジン (CML) 残基の少なくとも一方を有するタンパク質もしくはペプチドに反応しない、請求項 1 または 2 に記載の抗AGEs抗体。

【請求項 4】

前記AGEsが、3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとを25~50 でインキュベートすることにより得られる反応生成物である、請求項 1~3 のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体。

【請求項 5】

前記タンパク質が血清アルブミンである、請求項 1~4 のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体。

20

【請求項 6】

前記血清アルブミンが、ウサギ血清アルブミン、ウシ血清アルブミンおよびヒト血清アルブミンからなる群から選択された少なくとも一つのアルブミンである、請求項 5 記載の抗AGEs抗体。

【請求項 7】

前記AGEsが、タンパク質に対して、前記タンパク質のアミノ基の2.5等量となるように3,4-DGEを添加して37 で3日間インキュベートした後、さらに、前記タンパク質のアミノ基の2.5等量となるように3,4-DGEを添加して37 で4日間インキュベートすることにより得られた反応生成物である、請求項 6 記載の抗AGEs抗体。

30

【請求項 8】

抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 1~7 のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体。

【請求項 9】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1~7 のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体。

【請求項 10】

抗体が、前記AGEsを抗原として宿主動物を免疫感作した後、前記動物の血液または腹水より単離することによって得られた抗体である、請求項 1~9 のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体。

40

【請求項 11】

前記宿主動物が、ウサギである請求項 10 記載の抗AGEs抗体。

【請求項 12】

試料とAGEsに対する抗AGEs抗体とを反応させ、前記試料中のAGEsと抗AGEs抗体との抗原抗体反応により、前記試料中のAGEsを検出する方法であって、

前記AGEsが、3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとの反応生成物であり、前記抗AGEs抗体が、請求項 1~11 のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体であることを特徴とする、AGEs検出方法。

【請求項 13】

前記抗原抗体反応を、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法、ラテックス凝集法および金

50

コロイド粒子法からなる群から選択された少なくとも一つの免疫学的方法により検出する、請求項 1 2 記載の AGEs 検出方法。

【請求項 1 4】

AGEs に対する抗 AGEs 抗体を用いて、前記 AGEs を生成する試料中のカルボニル化合物を検出する方法であって、

前記カルボニル化合物が、3,4-DGE であり、前記 AGEs が、3,4-DGE とタンパク質またはペプチドとの反応生成物であり、前記抗 AGEs 抗体が、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の抗 AGEs 抗体であり、

前記試料中の 3,4-DGE とタンパク質またはペプチドとを反応させる工程、

前記反応による生成物と前記抗 AGEs 抗体とを反応させる工程、

前記生成物と前記抗 AGEs 抗体との抗原抗体反応により、生成した AGEs を検出する工程、および、

前記 AGEs の有無または量から、試料中の 3,4-DGE を定性または定量する工程を含む、カルボニル化合物の検出方法。

【請求項 1 5】

前記抗原抗体反応を、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法、ラテックス凝集法および金コロイド粒子法からなる群から選択された少なくとも一つの免疫学的方法により検出する、請求項 1 4 記載のカルボニル化合物の検出方法。

【請求項 1 6】

前記試料が、透析液、点滴液、注射液、食品または体液である、請求項 1 4 または 1 5 記載のカルボニル化合物の検出方法。

【請求項 1 7】

AGEs に対する抗 AGEs 抗体を含む免疫試薬であって、

前記 AGEs が、3,4-DGE とタンパク質またはペプチドとの反応生成物であり、前記抗 AGEs 抗体が、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗 AGEs 抗体であることを特徴とする、免疫試薬。

【請求項 1 8】

3,4-DGE とタンパク質またはペプチドとの反応生成物である AGEs を検出するための試薬である、請求項 1 7 記載の免疫試薬。

【請求項 1 9】

3,4-DGE を検出するための試薬である、請求項 1 7 記載の免疫試薬。

【請求項 2 0】

後期糖化反応生成物 (AGEs: advanced glycation endproducts) に対する抗体の製造方法であって、前記 AGEs が、3,4-ジデオキシグルコソン-3-エン (3,4-DGE) とタンパク質またはペプチドとの反応生成物であり、前記 AGEs を抗原として、ヒトを除く宿主動物を免疫感作する工程と、前記免疫感作により生成した前記 AGEs に対する抗体を回収する工程とを含むことを特徴とする抗 AGEs 抗体の製造方法。

【請求項 2 1】

3,4-DGE とタンパク質またはペプチドとを 25 ~ 50 でインキュベートすることにより前記 AGEs を生成する工程を含む、請求項 2 0 記載の抗 AGEs 抗体の製造方法。

【請求項 2 2】

前記タンパク質が血清アルブミンである、請求項 2 0 または 2 1 記載の抗 AGEs 抗体の製造方法。

【請求項 2 3】

前記血清アルブミンが、ウサギ血清アルブミン、ウシ血清アルブミンおよびヒト血清アルブミンからなる群から選択された少なくとも一つのアルブミンである、請求項 2 2 記載の抗 AGEs 抗体の製造方法。

【請求項 2 4】

前記 AGEs の生成工程が、タンパク質に対して、前記タンパク質のアミノ基の 2.5 等量となるように 3,4-DGE を添加して 37 で 3 日間インキュベートした後、さらに、前記タンパク

10

20

30

40

50

質のアミノ基の2.5等量となるように3,4-DGEを添加して37 で4日間インキュベートすることによりAGEsを生成する工程である、請求項20～23のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体の製造方法。

【請求項25】

前記回収工程が、免疫感作した前記宿主動物の血液または腹水より抗体を単離する工程である、請求項20～24のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体の製造方法。

【請求項26】

前記宿主動物が、ウサギである、請求項20～25のいずれか一項に記載の抗AGEs抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、後期糖化反応生成物（AGEs：advanced glycation endproducts）に対する抗体、ならびにこれを用いたAGEsの検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質糖化反応（メイラード反応）は、アミノ酸、ペプチド、タンパク質のアミノ基と、ケトンやアルデヒド（特に還元糖）との非酵素的反応であり、前期段階と後期段階の2つの反応に分けられる。前期段階の反応は、可逆反応であり、例えば、アミノ基と還元糖とが反応して Schiff塩基を形成し、ついで分子内転移反応によりアムドリ化合物を形成するまでの反応である。一方、後期段階の反応は、不可逆反応であり、前記アムドリ化合物が、さらに、転移や縮合などの複雑な反応過程を経て、後期糖化反応生成物（AGEs）と呼ばれる安定な物質を形成する反応である。前記AGEsとしては、例えば、カルボキシメチルリジン（CML）、ペントシジン、ピラリン、クロスリン等が知られているが、生体内には構造が明らかにされていない未知のAGEsが多種存在していると考えられている。

20

【0003】

近年、前記メイラード反応の生成物は、医学領域で注目されており、様々な病気、疾患、老化との関連性が発表されている。中でも、公知のAGEsは、タンパク質の機能を低下させるのみならず、細胞障害性や炎症反応を誘発する事が知られており、さらに、AGEsの形成によって、タンパク質が凝集、不溶化して組織中に異常蓄積し、これにより組織を変性させているとも考えられている。また、糖尿病患者におけるヘモグロビンA1C（前期反応のアムドリ化合物）の上昇、糖尿病性腎症や慢性腎不全の腎臓や、動脈硬化病変部におけるAGEsの蓄積は、生体内におけるタンパク糖化反応の代表的な例として知られている。

30

【0004】

前述のようなメイラード反応生成物の測定には、高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーの他に、免疫学的な測定方法が知られている。中でも、簡便且つ特殊な分析機器を必要としない等の理由により、免疫学的検出方法、具体的には、免疫組織学的方法、酵素免疫学的測定方法等が、医学分野における研究や臨床診断で広く使われている。このことから、糖化タンパク質やAGEsに特異的に反応する抗体が各種作製されている。具体的には、CML、ペントシジン、クロスリン、ピラリンに対する抗体が調製され、老化、糖尿病、腎症等の疾患動物の組織における免疫学的研究が報告されている（例えば、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5）。また、抗CML抗体を糖尿病マーカーとして利用する方法（特許文献1）や、AGEsであるN⁻-(5-ヒドロキシ-4,6-ジメチルピリミジン-2-イル)オルチニンに対するモノクローナル抗体（特許文献2）の報告もなされている。

40

【0005】

ところで、前記メイラード反応の前期段階や生体内での糖質の代謝分解、還元糖の熱分解等において、還元糖が分解し、3-デオキシグルコソン（3-DG）、メチルグリオキサール、グリオキサール等のカルボニル化合物の生成が確認されている。これらの3-DG、メチルグリオキサール、グリオキサールは、タンパク質との反応性に富み、前述のようなAGEs生

50

成に關与する強力なメディエータ（以下、「AGEs前駆体」ともいう）であることが報告されている。そして、これらのカルボニル化合物に由来するAGEsが、血液透析患者の血液内に多量に存在することから、透析合併症との関連性が推測されている（非特許文献6、非特許文献7）。

【0006】

このように、還元糖の分解生成物は、AGEs産生の原因物質として注目を集めており、研究が進められている。しかしながら、還元糖の分解経路は複雑であり、非常に多種多様のカルボニル化合物を生成することが知られているものの、実際にどのようなカルボニル化合物がAGEs生成に關与しているのか、また、それらのカルボニル化合物に由来するAGEsが明らかとなっていないものが多い。したがって、AGEs定量をはじめとするAGEsの研究には、構造が明らかとなっているAGEs、特にCMLで代用されることが一般的であった。

10

【非特許文献1】Schleicher, E. D. et al., J. Clin. Invest. 99, 457, 1997

【非特許文献2】Sanaka, T. et al., Nephron 91, 64, 2002

【非特許文献3】Obayashi, H. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. 226, 37, 1996

【非特許文献4】Miyata, S. and Monnier, V., J. Clin. Invest. 89, 1102, 1992

【非特許文献5】Hayase, F. et al., J. Biol. Chem. 263, 3758, 1989

【非特許文献6】竹内正義ほか、日本臨牀60巻、増刊号8、2002年、日本臨牀社

【非特許文献7】Takeuchi, M. et al., Molecular Medicine 7, 783, 2001

【特許文献1】特開平9-178740号公報

【特許文献2】特開平11-246599号公報

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

このため、医療の分野においては、生体内に蓄積し、また生物活性を有する、種々の病気や疾患の原因となり得る新たなAGEsを解析・測定する方法が求められている。

【0008】

そこで、本発明の目的は、タンパク質やペプチドとの反応性が強い、すなわちAGEs産生能が高いカルボニル化合物を特定し、前記カルボニル化合物に起因するAGEsの抗体を提供し、さらに、前記抗体を用いた前記AGEsの検出方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

30

【0009】

本発明の抗体は、後期糖化反応生成物（AGEs）に対する抗体であって、前記AGEsが、3,4-ジデオキシグルコソン-3-エン（3,4-DGE）とタンパク質またはペプチドとの反応生成物であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0010】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、グルコースから生じるカルボニル化合物（3,4-DGE）が、公知のAGEs前駆体（すなわち、タンパク質等のAGEs化原因物質となるカルボニル化合物等）と比較して、タンパク質との反応性が極めて高く、生体機能に及ぼす影響が大きいことを見出した。そして、この知見に基づき、前記3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとの反応生成物に対する抗体を作製し、本発明を完成させるに至ったのである。このように本発明の抗体は、3,4-DGEとタンパク質等との反応生成物を特異的に認識する抗体であるため、生体機能に及ぼす影響が大きいと考えられる3,4-DGE由来AGEsを効率的に検出することが可能である。このため、前記3,4-DGE由来AGEsが關与すると推測される後述するような各種疾患の診断や治療に有用になると考えられる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の抗AGEs抗体は、前述のように、3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとの反応生成物AGEsに対する抗体である。

【0012】

50

そして、本発明の抗AGEs抗体は、例えば、公知のAGEs前駆体であるメチルグリオキサール(MGO)、グリオキサール(GO)、3-デオキシグルコソン(3-DG)、5-ヒドロキシメチル-フルフラール(5-HMF)、フルフラール(Fur)、ホルムアルデヒド(FA)、グルコース(Glu)、アセトアルデヒド(AA)等のカルボニル化合物由来のAGEs、特に、前記カルボニル化合物とタンパク質またはペプチドの反応生成物に反応せず、また、公知のAGEsである、ペントシジン残基およびカルボキシメチルリジン(CML)残基の少なくとも一方を有するタンパク質やペプチドにも反応しないことが好ましい。

【0013】

以下に本発明の抗AGEs抗体の調製方法の一例について説明する。

【0014】

(1) 抗原(免疫原)となるAGEsの調製

3,4-DGEとタンパク質(またはペプチド、以下同じ)とをメイラード反応させることによって、AGEsを調製する。後述する参考例1にも示すように、3,4-DGEは、AGEs化に関するメチルグリオキサール(MGO)、グリオキサール(GO)、3-デオキシグルコソン(3-DG)等の公知のAGEs前駆体に比べて、タンパク質に対する反応性が極めて高い。このため、3,4-DGEとタンパク質とを混合してインキュベートすれば、3,4-DGEによるタンパク質のAGEs化が起こり、反応生成物AGEsが得られる。

【0015】

AGEs化の有無は、通常、3,4-DGEとタンパク質との反応液が褐色を呈するか否かによって判断でき、その進行は、褐色の濃度の変化によって判断することができる。なお、前記反応液の褐色化については、参考例において後述する(図9参照)。また、3,4-DGEによるタンパク質のAGEs化によって、反応生成物は蛍光を呈することから、例えば、蛍光強度によって判断することもできる。蛍光強度の測定条件は、特に制限されないが、例えば、励起波長320~370nm、蛍光波長400~470nmであり、励起波長345nm、蛍光波長425nmが好ましい。

【0016】

3,4-DGEをメイラード反応させるタンパク質としては、何ら制限されず、例えば、血清アルブミン等のアルブミン、ヘモグロビン、ミオグロビン、ヘモシアニン等があげられ、その由来も、例えば、ウサギ、ウシ、ヒト等の各種哺乳類や、ニワトリ、ウズラ等の各鳥類等があげられる。具体例としては、例えば、RSA(ウサギ血清アルブミン)、BSA(ウシ血清アルブミン)、HSA(ヒト血清アルブミン)、卵白アルブミン等があげられる。また、ペプチドとしては、天然ペプチド、合成ペプチドのいずれでもよく、また、オリゴペプチドでもポリペプチドであってもよい。

【0017】

作製した抗体は、反応程度(例えば、3,4-DGEの添加量)に関わらず、3,4-DGE由来AGEsを検出できる。抗原を調製する際のタンパク質の完全なAGEs化には、例えば、タンパク質のNH₂基に対して等量以上の3,4-DGEを添加することが必要であると考えられ、例えば、タンパク質のアミノ基に対して0.1~100等量となるように3,4-DGEを添加することが好ましく、より好ましくは1~10等量であり、特に好ましくは3~5等量である。また、タンパク質に対する3,4-DGEの添加は、十分にAGEs化を行うために、2回以上行ってもよい。

【0018】

3,4-DGEとタンパク質とのインキュベーション温度は、特に制限されないが、例えば、25~50であり、好ましくは35~40であり、一回当たりのインキュベーション時間も、特に制限されず、例えば、3~14日間であり、好ましくは7~10日間である。

【0019】

3,4-DGEとタンパク質との反応は、通常、緩衝液中で行うことが好ましく、そのpHは、例えば、6~8、好ましくは7~7.5である。緩衝液の種類や濃度は特に制限されず、所望のpHに応じて選択できるが、例えば、リン酸緩衝液、マレイン酸水素ナトリウム-NaOH緩衝液等があげられ、アミノ基を含まないものが好ましい。反応液における緩衝液の濃度も特に制限されないが、例えば、10~500mMの範囲である。

10

20

30

40

50

【0020】

また、前記反応液には、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）等のキレート剤を添加してもよく、その濃度は、例えば、1～100mMの範囲である。

【0021】

3,4-DGEによりタンパク質がAGEs化すると、反応生成物AGEsは、通常、蛍光を発生し、また、褐色化が生じる。このため、例えば、前述のように反応生成物を目視で観察したり、蛍光強度を測定することによって、AGEs化の有無を確認することができる。

【0022】

得られた反応生成物（AGEs）は、通常、脱塩や低分子化合物（例えば、未反応3,4-DGE等）を除去するために、透析を行い、ろ過滅菌したものを免疫原として使用することが好ましい。

10

【0023】

(2) 抗体の調製

抗体の調製方法は、何ら制限されず、例えば、動物への免疫感作を行うことにより抗体を産生する従来公知の方法によって、ポリクローナル抗体ならびにモノクローナル抗体を調製できる。免疫感作させる宿主動物の種類は、特に制限されず、例えば、ヒト、ウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、モルモット等のヒトを除く哺乳動物、ニワトリ、ハト、アヒル、ウズラ等の鳥類等が使用できる。また、抗原の投与方法も、特に制限されず、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等が採用でき、好ましくは皮下投与、腹腔内投与、静脈内投与、より好ましくは皮下投与である。

20

【0024】

例えば、ポリクローナル抗体を調製する場合には、前述のような宿主動物に前記抗原（AGEs）を投与して免疫し、回収した血清や腹水液等から抗AGEs抗体を単離、精製すればよい。また、モノクローナル抗体を調製する場合には、例えば、免疫した宿主動物における脾臓細胞やリンパ球様細胞等の抗体産生細胞とミエローム細胞とを融合してハイブリドーマを調製し、前記ハイブリドーマを増殖させ、特異性を持つ抗体を産生するハイブリドーマ細胞を単離することによって、モノクローナル抗体を得ることができる。

【0025】

ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体の精製方法も何ら制限されず、例えば、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動等、従来公知の方法によって行うことができる。

30

【0026】

なお、目的抗体の産生をスクリーニングする方法は、特に制限されず、従来公知のラジオイムノアッセイ（RIA）法、エンザイムイムノアッセイ（EIA）法等が採用できる。

【0027】

このようにして得られる抗体は、通常、免疫グロブリンクラスがIgMまたはIgGである。また、得られた抗体分子は、それ自体を抗体として使用することもでき、さらに酵素処理して得られるFab、Fab'、F(ab')₂等の抗体の活性フラグメントを本発明の抗体として使用することもできる。

【0028】

つぎに、本発明の抗体を用いて、3,4-DGEとタンパク質（またはペプチド）との反応生成物AGEsを検出する方法について説明する。本発明は、試料とAGEsに対する抗AGEs抗体とを反応させ、前記試料中のAGEsと抗AGEs抗体との抗原抗体反応により、前記試料中のAGEsを検出する方法であって、前記AGEsが、3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとの反応生成物であり、前記抗AGEs抗体が、前記本発明の抗AGEs抗体であることを特徴とする。

40

【0029】

このような検出方法を用いれば、種々の試料における3,4-DGEにより生成されたAGEsを検出することができる。前述のように、3,4-DGEはタンパク質等に対する反応性が極めて高く、それ自身および生成したAGEsも、細胞に対する毒性が強いものである。したがって、このような3,4-DGE由来AGEsを検出する本発明の方法を、例えば、臨床医療等に利用す

50

れば、3,4-DGE由来AGEsが影響すると考えられる疾患の診断や予防に有用であると解される。具体例としては、3,4-DGE由来AGEsを検出することによって、糖尿病や腎不全病態に関連する各種疾患；糖尿病や腎不全の合併症；老化に伴う疾患；腹膜繊維症、腹膜硬化症および硬化性被嚢性腹膜硬化症等の腹膜透析に付随する合併症；等について、発症の可能性、発症程度、進行度等を判断できると推測される。

【0030】

前記抗原抗体反応は、例えば、EIA法（例えば、競合的EIA法、間接的EIA法）やRIA法、蛍光免疫測定法（FIA）、化学発光免疫測定法（CLIA）、免疫比濁法（TIA）やラテックス免疫比濁法（LTIA）、金コロイド粒子法等の免疫凝集法等により検出できる。例えば、抗AGEs抗体と試料（抗原AGEs含有試料）とを反応させ、この反応液を、予め抗原AGEsを固定化した担体に添加する。ここで、前記反応液において試料中の抗原と反応しなかった抗体は、前記固定化抗原AGEsと結合することとなる。続いて、前記担体から前記反応液を除去し、前記抗AGEs抗体に対する標識化抗体（二次抗体）を添加する。これによって、前記二次抗体を、固定化抗原AGEsに結合した抗AGEs抗体に結合させ、最終的に結合した前記二次抗体の標識を検出すればよい。

10

【0031】

前記担体としては、特に制限されず、例えば、ビーズ、プレート（例えば、イムノプレート）、チューブ等があげられる。また、前記標識としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素等があげられる。

20

【0032】

抗体の標識化は、標識の種類に応じて常法により行うことができる。前記標識が、例えば、酵素の場合には、酵素反応により発色する基質を添加して、前記基質の発色度を吸光度等により測定すればよい。また、放射性同位元素の場合には、例えば、シンチレーションカウンターで放射活性を測定すればよい。このような吸光度や放射活性、蛍光強度等は、固定化抗原に結合している抗体の量と相対関係にあるため、例えば、予め準備した検量線等を用いて抗体量を定量できる。また、固定化抗原に結合している抗体量は、試料中の抗原と反応しなかったフリーの抗体である。したがって、フリーの抗体量から試料中の抗原と結合した抗体が算出でき、これが試料中に含まれる抗原に相当することから、前記試料中の抗原AGEsも定量可能となる。なお、抗原抗体反応の検出方法は、これらの方法には何ら制限されず、従来公知の方法が採用できる。

30

【0033】

この検出方法における被検試料は、特に制限されず、例えば、血清、血漿、血液、尿、髄液等の体液、生体細胞の抽出液、菌体等の培養液等、種々のものが上げられる。また、本発明の検出方法は、生体組織に対して直接行うことも可能である。

【0034】

つぎに、本発明の抗体を用いて、AGEsを生成するカルボニル化合物を検出する方法について説明する。本発明のカルボニル化合物の検出方法は、AGEsに対する抗AGEs抗体を用いて、前記AGEsを生成する試料中のカルボニル化合物を検出する方法であって、前記カルボニル化合物が、3,4-DGEであり、前記AGEsが、3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとの反応生成物であり、前記抗AGEs抗体が、前記本発明の抗AGEs抗体であり、前記試料中の3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとを反応させる工程、前記反応による生成物と前記抗AGEs抗体とを反応させる工程、前記生成物と前記抗AGEs抗体との抗原抗体反応により、生成したAGEsを検出する工程、および、前記AGEsの有無または量から、試料中の3,4-DGEを定性または定量する工程を含むことを特徴とする。

40

【0035】

前述のように3,4-DGEは、それ自身またはそれにより生成したAGEsも、細胞に対する毒性が強いものである。このため、例えば、透析液等に3,4-DGEが含まれると、これらが投与された生体には3,4-DGE由来AGEsが発生し、生体に影響を及ぼすおそれがある。本発明の3,4-DGEの検出方法によれば、例えば、前記透析液等の試料における3,4-DGEの存在を確

50

認（定性）したり、その含量を定量できるため、危険性の低い透析液であるか否かを評価することができ、医療面において極めて有用な品質の判断方法になると言える。

【0036】

本発明のカルボニル化合物の検出方法を適用する被検試料としては、特に制限されないが、例えば、前述のような透析液、点滴液、注射液、飲料等の食品類等があげられる。特に、透析液や点滴液は、一般に糖類が含まれており、滅菌のための加熱処理によって、その成分がAGEs化に關与する物質（AGEs前駆体）に変化している場合がある。したがって、予め、本発明の検出方法によって、AGEs前駆体である3,4-DGEの存在を確認することによって、より安全性の高い透析液や点滴液等を患者に提供できる。

【0037】

本発明の方法は、試料とタンパク質またはペプチドを予め反応させておき、この反応生成物に本発明の抗体を反応させる以外は、前述の本発明のAGEs検出方法と同様にして行うことができる。すなわち、試料をタンパク質等と反応させて、この反応生成物と本発明の抗体との抗原抗体反応が確認された場合には、3,4-DGE由来AGEsが生成されていることとなるため、前記試料中には3,4-DGEが存在すると判断できる。また、抗原抗体反応の程度によって、3,4-DGEの含有量も定量可能である。

【0038】

前記試料と反応させるタンパク質としては、特に制限されず、血清アルブミンやヘモグロビン等をあげることができるが、例えば、試料である点滴液等が投与された場合に、前記点滴液と接触する可能性が高い組織のタンパク質を使用することも好ましい。これによって、さらに生体へ投与した際のAGEs化を十分に予測することが可能になる。

【0039】

また、本発明の免疫試薬は、AGEsに対する抗AGEs抗体を含む免疫試薬であって、前記AGEsが、3,4-DGEとタンパク質またはペプチドとの反応生成物であり、前記抗AGEs抗体が、前記本発明の抗AGEs抗体であることを特徴とする。本発明の免疫試薬は、前述の本発明のAGEs検出方法や3,4-DGEの検出方法に使用することができ、その使用方法は、本発明の抗AGEs抗体と同様である。

【0040】

また、本発明の免疫試薬において、抗AGEs抗体は、例えば、抗原抗体反応の検出方法に応じて、各種標識物質により標識化されてもよい。また、本発明の免疫試薬は、本発明の抗AGEs抗体を含んでいればよく、その他の構成は何ら制限されない。

【0041】

以下、実施例および比較例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、特に示さない限り、「%」は質量%を示す。

【実施例1】

【0042】

抗3,4-DGE由来AGEsポリクローナル抗体の調製

(1) AGEs抗原(3,4-DGE由来AGEs)の調製

まず、500mMの3,4-DGE水溶液を調製した。一方、0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(PB: pH7.4)に、RSA(10mg/ml)とDTPA(5mM)とを溶解し、さらに、3,4-DGE量がRSA中のNH₂基の2.5等量となるように前記3,4-DGE水溶液を混合した。この混合液を0.2μmフィルターで濾過滅菌してから、37℃で3日間インキュベートし、さらに、3,4-DGE量がRSA中のNH₂基の2.5等量となるように前記3,4-DGE水溶液を再び添加して、37℃で4日間インキュベートした。そして、この反応液を脱塩カラム(商品名PD-10、Amarsham Biosciences社製)に供し、その回収液をPBS(-)で一昼夜透析することにより脱塩と低分子化合物の除去を行った。前記PBSは、0.15M塩化ナトリウム含有10mMリン酸緩衝液である。この透析後の溶液を0.2μmフィルターで濾過滅菌し、抗原(3,4-DGE由来AGEs)溶液とした。なお、この抗原溶液の濃度は、タンパク質濃度7mg/mlとした。

【0043】

(2) ウサギへの免疫

10

20

30

50

前記抗原溶液（タンパク質濃度：7mg/ml）を、等量のフロイント完全アジュバントと混合してエマルジョン化させ、このエマルジョンを、ウサギの背部皮下数箇所隔週投与した。なお、1回の投与量はタンパク質量で5mg/匹とした。免疫開始時より経時的に採血を行い、間接ELISA法により抗体価を確認した結果、合計5回の背部皮下免疫で抗体価の上昇が十分であると判断できた。このため、最終回（6回目）の投与は、前記抗原溶液をそのままウサギの耳静脈へ投与し、それから10日後に、麻酔をかけた状態で、免疫したウサギから全採血を行った。

【0044】

(3) 抗3,4-DGE由来AGEsポリクローナル抗体の精製

(3-1) 抗血清の分離

得られたウサギ血液を室温で約3時間静置させ、血餅と血清とを自然分離させた後、これらを遠心分離(3500rpm、10分)して、回収した上清を再び遠心分離(3500rpm、10分)した。こうして得られた上清(抗血清)を10mlずつに小分けして56 で30分間非働化处理し、使用時まで-80 で凍結保存した。

10

【0045】

(3-2) ポリクローナル抗体の精製

前記処理を行った抗血清10mlを、等量の0.02Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)と混合した後、0.45 μ mフィルターで濾過し、以下に示す条件で、IgGアフィニティークロマトグラフィーに供して、ポリクローナル抗体の精製を行った。

【0046】

カラム： Affi-Gel Protein A Agarose for IgG Purification
(Bio-Rad社製)

カラムサイズ： 10ml(10 \times 100mm)

溶出液： (A) 0.02Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)

(B) 0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.7)

溶出条件： 溶出液(A)から(B)へのステップグラジエント

流速： 1ml/分

20

【0047】

まず、溶出液(A)で平衡化した前記カラムに前記抗血清をアプライし、前記溶出液(A)により溶出を行った。そして、溶出画分の波長280nmの吸光度を順次測定し、前記溶出画分の吸光度がほぼ0になった時点で、溶出液を溶出液(B)に置換した。溶出液(B)による溶出画分(タンパク質画分)を回収し、この回収画分に1Mトリス-HCl緩衝液(pH9.0)を加えて中和した後、約10mlになるまで遠心濃縮し、これを精製抗3,4-DGE由来AGEsポリクローナル抗体溶液とした(タンパク質濃度9.7mg/ml)。なお、前記抗体は、1mlずつに小分けして使用時まで-80 で凍結保存した。得られた抗3,4-DGE由来AGEsポリクローナル抗体について、実施例2~5においてその性質等の確認を行った。なお、本実施例1の方法に基づいて、数回、ポリクローナル抗体を調製した結果、同様の抗体が再現性をもって得られた。

30

【実施例2】

【0048】

実施例1で得られた抗3,4-DGE由来AGEsポリクローナル抗体について、その結合定数を確認した。

40

【0049】

結合定数は、競合ELISA法により決定した。まず、実施例1で調製した抗原溶液を1 μ g/mlとなるように50mM炭酸ナトリウム緩衝液で希釈した。これを96穴イムノプレートに1ウェル当たり100 μ l加え、室温で2時間インキュベートして抗原を固相化した。2時間後、抗原溶液を除去して、各ウェルを0.05% Tween20含有PBS(TPBS)で洗浄した後、0.5% スキムミルク含有PBSを1ウェル当たり300 μ l加え、室温で2時間インキュベートして抗原が固定されていない部分をブロッキングした。2時間後、ブロッキング溶液を除去してTPBSで洗浄した後、ここに、0.1%グリセリンおよび0.1% Tween20含有50mlトリス-HCl緩衝液

50

(pH7.4:TB)で希釈した様々な濃度の抗原溶液50 μ lと、0.1%スキムミルク含有TBで250倍希釈した実施例1の抗体(一次抗体)溶液50 μ lとを加えて、室温で2時間インキュベートした。2時間後、反応液を除去し、TPBSで洗浄してから、0.3%スキムミルク含有TBで2250倍希釈した前記一次抗体に対するアルカリホスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgG抗体溶液(凍結乾燥品(CHEMICON社製)に水1mlとグリセリン1mlとを加えて溶解した溶液)100 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。1時間後、反応液を除去し、TPBSで洗浄してから、発色試薬(水9mlに商品名Diethanolamine Substrate Buffer(5x)(PIERCE社製)2mlと商品名ImmunoPure PNP PTablets(PIERCE社製)2錠とを溶解したものを)を1ウェル当たり100 μ l加え、室温で30分間インキュベートした。インキュベート後、1ウェル当たり2M水酸化ナトリウム水溶液50 μ lを加えてアルカリホスファターゼの反応を停止させ、405nmにおける吸光度を測定した。そして、以下の式より図1のグラフを作成し、解離定数Kdを算出した。

$$Kd = k2/k1 = [Agf][Abf]/[AgAb]$$

[Agf]: 遊離の抗原濃度

[Abf]: 遊離の抗体濃度

[AgAb]: 抗原抗体複合体の濃度

【0050】

前記図1から求めた解離定数Kdは、 5.7×10^{-9} (M)であった。また、結合定数Kaは、解離定数Kdの逆数であることから、 1.8×10^8 (M^{-1})と算出された。一般的なポリクローナル抗体の結合定数は、 $10^7 \sim 10^9$ (M^{-1})であるため、実施例1で得られた抗体は、抗原との結合力が十分であると言える。

【実施例3】

【0051】

実施例1で得られた抗3,4-DGE由来AGEsポリクローナル抗体について、その反応特異性を確認した。

【0052】

結合定数の測定と同様の競合ELISA法ならびにウエスタンブロットィング法によって、3,4-DGE由来AGEsタンパク質に対する特異性を確認した。以下に示す各種AGEs化タンパク質は、前記実施例1における「(1)抗原の調製」と同様にして調製した。なお、Glu-BSAは、0.2M PB(pH7.4)にBSA(10mg/ml)とDTPA(5mM)とを溶解し、これに100mMとなるようにGluを添加し、37 $^{\circ}$ Cで8週間インキュベートして調製した。

【0053】

(1)競合ELISA法

競合阻害物質として、3,4-DGEでAGEs化したタンパク質「3,4-DGE-RSA」、nativeタンパク質「RSA、BSA、HSA」、3,4-DGE以外のカルボニル化合物(MGO、GO、3-DG)でAGEs化させたタンパク質「MGO-BSA、GO-BSA、3-DG-BSA」、ならびに、糖化タンパク質「glycated HSA(SIGMA社製:商品名A-8301)」を使用した以外は、前記実施例2と同様にしてELISA法により反応特異性を評価した。この結果を、図2(A)(B)に示す。同図において(A)は、3,4-DGE-RSA、nativeタンパク質およびglycated HSAの結果を示すグラフ、(B)は、3,4-DGE-RSAおよび他のAGEs化タンパク質の結果を示すグラフである。また、同図における「B」は競合阻害物質をウェルに加えた場合の405nmにおける吸光度を、「B0」は競合阻害物質をウェルに加えていない場合の405nmにおける吸光度を示し、競合物質の単位(μ g/ml)は、ウェルに添加した競合阻害物質の濃度を示す。

【0054】

図2(A)に示すように、実施例1で得られたポリクローナル抗体は、nativeタンパク質およびglycated HSAとは交差反応を示さず、また、同図(B)に示すように、他のAGEs化タンパク質とも交差反応を示さなかった。

【0055】

(2)ウエスタンブロットィング法

3,4-DGEでAGEs化したタンパク質「3,4-DGE-RSA、3,4-DGE-BSA、3,4-DGE-HSA」、native

タンパク質「RSA、BSA、HSA」、3,4-DGE以外のカルボニル化合物(MGO、GO、3-DG、5-HMF、Fur、AA、FA、glycer、glycol)およびGluでAGEs化させたタンパク質「MGO-BSA、GO-BSA、3-DG-BSA、5-HMF-BSA、Fur-BSA、AA-BSA、FA-BSA、glycer-BSA、glycol-BSA、Glu-BSA」を試料として使用した。これらの試料(各1 μ g)をSDS-PAGEに供し、タンパク質バンドをPVDF(ポリビニリデンフルオリド)メンブレンにブロッティングした。このメンブレンを0.3%スキムミルク含有TTBS(0.15M塩化ナトリウムおよび0.1%Tween20含有25mMトリス-HCl緩衝液(pH7.4))に浸し、室温で1時間インキュベートしてブロッティングした。インキュベート後、ブロッティング溶液を除去し、TTBSで洗浄してから、ブロッティング溶液で12000倍希釈した実施例1の抗体(一次抗体)溶液に浸して室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、一次抗体溶液を除去し、TTBSで洗浄してから、ブロッティング溶液で12000倍希釈した前記一次抗体に対するアルカリホスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgG抗体溶液(CHEMICON社製)に浸し、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、反応液を除去し、TTBSで洗浄してから、使用説明書に従って調製した発色試薬(BCIP/NBT(ニトロブルーテトラゾリウム/5-プロモ-4-クロロ-インドリルリン酸);プロメガ社製)で発色させた。この結果を図3の写真に示す。なお、前記5-HMFは5-ヒドロキシメチル-フルフラールを、前記Furはフルフラールを、前記AAはアセトアルデヒドを、前記FAはホルムアルデヒドを、前記glycerはグリセルアルデヒドを、前記glycolはグリコールアルデヒドをそれぞれ示す。

10

【0056】

図3に示すように、3,4-DGEでAGEs化された3,4-DGE-BSA(Lane No.1)、3,4-DGE-RSA(Lane No.3)、3,4-DGE-HSA(Lane No.5)にのみ発色が確認され、nativeタンパク質や他のカルボニル化合物でAGEs化したタンパク質とは交差反応を示さなかった。

20

【0057】

以上の競合ELISA法ならびにウエスタンブロッティング法の結果から、実施例1のポリクローナル抗体は、3,4-DGEでAGEs化されたタンパク質のみを特異的に認識するものであることがわかった。

【実施例4】

【0058】

3,4-DGEによる細胞内タンパク質のAGEs化を行い、実施例1のポリクローナル抗体によるAGEsの検出を行った。

30

【0059】

20%FBS(ウシ胎児血清)を含むM199培地(以下、「FBS-M199培地」という)に懸濁したヒト腹膜中皮細胞(HPMC)を、8穴スライドチャンバーに播種し、コンフルエントになるまで培養した(37 $^{\circ}$ C)。培養後、前記スライドチャンバーから培地を除去し、M199培地で30 μ M、250 μ Mとなるよう希釈した3,4-DGE溶液をHPMCに曝露させた。なお、コントロールは、M199培地を曝露させた。2時間培養後、前記M199培地を除去してから、HPMCをPBSで洗浄し、さらに、-30 $^{\circ}$ Cの冷メタノールを注いで-30 $^{\circ}$ Cで5分間固定した。続いて、PBSで洗浄後、0.2%TritonX-100含有PBSを滴下し、室温で5分間おいて浸透化処理を行った。浸透化溶液を除去してPBSで洗浄した後、5%正常ブタ血清(DAKO社製)含有PBSを滴下して室温で5分間おき、ブロッティングを行った。ブロッティング溶液を除去して5%正常ブタ血清含有PBSで500倍希釈した実施例1の抗体(一次抗体)溶液を滴下し、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、一次抗体溶液を除去し、PBSで洗浄してから、5%正常ブタ血清含有PBSで30倍希釈した前記一次抗体に対するFITC標識ブタ抗ウサギIgG抗体溶液(DAKO社製)を滴下し、暗所にて室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、反応液を除去し、PBSで洗浄してから、蛍光顕微鏡で観察した。この結果を、図4の顕微鏡写真に示す。同図において(a)は、3,4-DGEで曝露していないコントロール、(b)は3,4-DGE濃度が30 μ Mの結果、(c)は3,4-DGE濃度が250 μ Mの結果であり、左列が明視野での写真、右列が蛍光顕微鏡写真である。

40

【0060】

同図(b)および(c)に示すように、3,4-DGEで曝露したHPMCにのみ蛍光が観察さ

50

れ、同図 (a) のコントロールでは蛍光は検出されなかった。このことから、実施例 1 のポリクローナル抗体が、ヒト細胞において、暴露した 3,4-DGE で AGEs 化されたタンパク質にのみ特異的に結合し、また、ヒト細胞の抗体染色に使用できることがわかった。

【実施例 5】

【0061】

腹膜透析のモデルラットについて、腹膜における 3,4-DGE 由来 AGEs の蓄積を確認した。

【0062】

2群のラット腹腔に、それぞれ 3,4-DGE 濃度が $2\mu\text{M}$ 、 $58\mu\text{M}$ の透析液を 30 日間に渡って投与した (2回/日: 各群 7匹)。なお、コントロール群 (7匹) は、透析液を投与せず針刺しのみとした。各ラットから壁側腹膜を採取して凍結包埋し、薄切切片を作製した。この切片をパラホルムアルデヒド固定し、0.5% スキムミルク含有 PBS で 500 倍希釈した実施例 1 の抗体 (一次抗体) 溶液を滴下し、室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、一次抗体溶液を除去し、TTBS で洗浄してから、使用説明書に従って前記一次抗体に対するアルカリホスファターゼ標識二次抗体キット (商品名 DAKO LSAB 2 System Alkaline Phosphatase; DAKO 仕製) で処理した。反応液を除去して TTBS で洗浄した後、使用説明書に従って調製した発色試薬 (商品名 ニューフクシン; DAKO 社製) で発色させた。この結果を、図 5 の写真に示す。同図において (A) は、コントロールであり、(B) は、 $2\mu\text{M}$ 3,4-DGE 含有透析液で透析したラットの結果を示す写真であり、(C) は、 $58\mu\text{M}$ 3,4-DGE 含有透析液で透析したラットの結果を示す写真である。

10

【0063】

同図に示すように、コントロール (同図 (A)) に比べて、前記 3,4-DGE 含有透析液で透析したラット (同図 (B)、(C)) において、発色が確認され、特に 3,4-DGE 含有量が多いラットにおいて強い発色が見られた (同図 (C))。このことから、透析液に含まれる 3,4-DGE によって、腹膜組織が AGEs 化されていることが推測される。また、この実験より、実施例 1 のポリクローナル抗体によれば、生体組織の抗体染色も可能であるといえる。

20

【実施例 6】

【0064】

前記実施例 1 と同様の方法によって抗 3,4-DGE 由来 AGEs ポリクローナル抗体を調製し、反応特異性および結合定数により、前記実施例 1 の抗体との比較を行った。

30

【0065】

反応特異性は、前記実施例 3 と同様に競合 ELISA 法により確認した。この結果を、図 6 (A) (B) に示す。同図において (A) は、3,4-DGE-RSA、native タンパク質および glycosylated HSA の結果を示すグラフ、(B) は、3,4-DGE-RSA および他の AGEs 化タンパク質の結果を示すグラフである。また、同図における「B」および「B0」は前述と同様である。

【0066】

この結果を、前記実施例 1 で調製した抗体の結果 (図 2 (A) (B)) と比較すると、実施例 6 のポリクローナル抗体は、native タンパク質および glycosylated HSA とは交差反応を示さず、また、同図 (B) に示すように、他の AGEs 化タンパク質とも交差反応を示さず、実施例 1 の抗体と同様の挙動を示した。

40

【0067】

結合定数は、前記実施例 2 と同様に競合 ELISA 法により決定し、同様にして、図 7 に示すグラフから結合定数を算出した。この結果、前記図 7 から求めた結合定数解は $1.9 \times 10^8 (\text{M}^{-1})$ と算出され、前記実施例 2 における実施例 1 のポリクローナル抗体の結合定数と同程度であることが証明された。以上の結果から、前記実施例 1 の方法に基づいて、再現性よく同様の抗体が得られることがわかる。

【実施例 7】

【0068】

反応時間が異なる AGEs 抗原 (3,4-DGE 由来 AGEs) を調製し、反応時間に関わらず、前記実施例 1 の抗 3,4-DGE 由来 AGEs ポリクローナル抗体による検出が可能であるか否かを確認

50

した。

【0069】

PBS(pH7.4)にBSA(5mg/ml)を溶解し、さらに、3,4-DGE量がBSA中のNH₂基の4等量となるように前記3,4-DGE水溶液を混合し、37℃で所定時間(2, 4, 8, 24, 72, 168時間)インキュベートする以外は、前記実施例1と同様にして抗原(3,4-DGE由来AGEs)を調製した。そして、得られた各抗原と、実施例1のポリクローナル抗体との反応性を、前記実施例3と同様の競合ELISA法により評価した。この結果を、図8のグラフに示す。なお、同図における「B」および「B0」は、前述の通りである。

【0070】

同図に示すように、各抗原に対する結果は全て同様に右下がりの挙動を示し、その反応性は競合濃度に依存的であることがわかる。この結果より、タンパク質と3,4-DGEとの反応時間に関わらず、同様のAGEsが生成しているといえる。なお、反応時間に依存してB/B0値が減少していることより、反応時間によってAGEs化の程度が異なると言え、タンパク質の完全なAGEs化には、例えば、72時間程度のインキュベートを要すると推測される。

【0071】

(参考例1)

3,4-DGEによるタンパク質のAGEs化を行い、得られたAGEsの反応性や物性を確認した。

【0072】

1.タンパク質との反応性

(外観)

カルボニル化合物(3,4-DGE、MGO、GO、3-DG、Glu)を用いて、タンパク質BSAのAGEs化を行った。まず、BSA(シグマ社製;商品名A-0281)を濃度5mg/ml(塩基性アミノ酸残基6.2mM)となるように、PBS(pH7.4)に溶解してBSA溶液を調製した。前記BSA溶液に、カルボニル化合物を濃度25mM(BSA中の塩基性アミノ酸残基の4当量)となるように添加し、37℃で所定時間(2, 4, 8, 24, 72, 168時間)インキュベートした。なお、各種カルボニル化合物は、500mM 3,4-DGE水溶液(自社調製)、40% MGO水溶液(シグマ社製)、40% GO水溶液(和光純薬工業社製)、3-DG(同仁化学社製)、Glu(局方、サンエイ糖化社製)を用いた。なお、カルボニル化合物無添加のものを同様にインキュベートしたものをコントロールとした。インキュベート168時間後の反応液の外観を、図9の写真に示す。同図において、左から3,4-DGE(DGE)、MGO、GO、3-DG(3DG)、Glu、Blank(コントロール)の結果である。

【0073】

3,4-DGEを用いた場合、反応液は約2時間で着色し、その後経時的に褐色の色味が強くなり、168時間後には図示のように濃い褐色が確認された。また、図示のように、Gluとの反応液では褐色化が確認されず、AGEs化のメディエータとして知られるMGO、GO、3-DGについては褐色化が見られることから、3,4-DGEについて、MGO、GO、3-DGと同様に、メイラード反応後期のAGEs化が起こっていると言える。さらに、褐色が濃いことから、3,4-DGEのタンパク質に対する反応性が強力であることもわかる。

【0074】

(蛍光強度)

前述のようにしてインキュベートした反応液をサンプリングし、これらのサンプリング反応液を、脱塩カラム(商品名PD-10、amersham pharmacia biotech社製)に供して脱塩した。脱塩後の反応液について、BCA protein assay kit(Pierce社製)を用いてBSA濃度を測定し、その濃度が1.0mg/mlとなるよう水で希釈したものを試料溶液とした。なお、これらの試料溶液は、使用時まで-30℃で凍結保存した。これらの試料溶液を96穴白色プレートに分注し、励起波長360nm、蛍光波長430nmで蛍光強度を測定した(測定装置:商品名SPECTRAFLUOR PLUS、TECAN社製)した。これらの結果を図10に示す。なお、図において「BSA」とは、カルボニル化合物を添加していないコントロールを示す。

【0075】

図示のように、3,4-DGEを用いた試料は、他のカルボニル化合物に比べ、蛍光強度が極めて強く、24時間の反応でほぼ平衡に達した。

【 0 0 7 6 】

2 . 反 応 物 の 評 価

カルボニル化合物 (3,4-DGE、3-DG、GO、MGO) についての前記試料溶液について、既知のAGEsであるペントシジン、カルボキシメチルリジン (CML)、メイラード反応生成物 (MRX : 8-hydroxy-5-methylidihydrothiazolo [3,2-]) の生成の有無を、ELISA法により確認した。その結果、GOを用いた反応液は、24時間インキュベートした段階で、すでにBSA1分子あたり3.025分子のCML生成が、168時間後で、BSA1分子あたり3.7分子のCMLの生成が確認された。また、MGOを用いた反応液は、168時間経過に、BSA1分子あたり0.0028分子のペントシジンが確認された。これに対して、3,4-DGEを用いた反応液からは、CML、ペントシジン、MRX全てについて生成は確認されなかった。このことから、3,4-DGEにより生成されるAGEsは、従来公知のAGEsとは異なることは明らかといえる。

10

【 0 0 7 7 】

3 . アミノ酸分析

前述の試料溶液を凍結乾燥した後、6N塩酸中で酸加水分解した (120℃、24時間)。これを、従来公知の方法に従って、ダンシルクロライドで誘導体化し、HPLCで分離し、試料中のアルギニン (Arg) およびリジン (Lys) 残基量を調べた (n=3)。この結果を、図 1 1 (A) (B) に示す。同図 (A) は、Arg残基の残存率を示すグラフであり、(B) は、Lys残基の残存率を示すグラフである。なお、この残存率は、未処理のnative BSA中の残基量を100%とした時の残存率を示す。

20

【 0 0 7 8 】

同図 (A) に示すように、他のカルボニル化合物によるAGEsと同様に、フリーのArgおよびLysが減少した。このことから、従来公知のAGEsと同様に、Arg残基、Lys残基に、3,4-DGEが反応したと推測される。

【 0 0 7 9 】

4 . 等 電 点 電 気 泳 動

予め、等電点マーカーを電気泳動にかけ、pIと移動度との検量線を作成した。そして、前記試料溶液についても電気泳動を行い、各試料について最も濃く染色された部分をバンドの中心として、等電点を前記検量線を用いて算出した。なお、各試料についての等電点の変化を図 1 2 に示す。

30

【 0 0 8 0 】

同図に示すように、3,4-DGEを使用した試料は、反応24時間後において酸性側へのシフトが確認された。このことより、24時間反応させた時点で、すでにタンパク質のAGEs化が開始していることがわかる。

【 0 0 8 1 】

5 . SDS-PAGE

3,4-DGEおよびMGOを使用した試料について、それぞれSDS-PAGEを行った。これらの結果を図 1 3 の電気泳動写真に示す。なお、同図 (A) が3,4-DGEの結果、同図 (B) がMGOの結果、レーンは左から順に、分子量マーカー、native BSA、試料 (2、4、8、24、72、168時間) の結果を示す。

40

【 0 0 8 2 】

図示のように、反応2～4時間においてバンドに乱れが観察されることから、タンパク質構造が大きく変化してAGEs化が起こったと考えられる。なお、公知のAGEs化を起こすカルボニル化合物であるMGOについても、どのようにバンドの変化が見られた。

【 0 0 8 3 】

(参 考 例 2)

3,4-DGEをはじめとするカルボニル化合物について、タンパク質との反応性を確認した。カルボニル化合物としては、3,4-DGE、MGO、GO、3-DG、AA、FA、Fur、5-HMF、Gluを使用した。

【 0 0 8 4 】

BSAを10mg/mLとなるようにPBS (pH 7.4) に溶解し、これに各種のカルボニル化合物を濃度

50

30mmol/Lとなるように添加して37℃で24時間反応させた。反応後、BSAの変性(AGEs化)は、反応液の蛍光強度(励起波長360nm、蛍光波長430nm)で評価した。この結果を、図14に示す。

【0085】

同図に示すように、3,4-DGEを添加したBSA溶液は、他のカルボニル化合物に比べて極めて強い蛍光を示した。この結果から、3,4-DGEはタンパク質との反応性に富む、強力なAGEsのメディエータである事が確認された。

【0086】

(参考例3)

3,4-DGEに由来するAGEs化タンパク質の細胞毒性を確認した。

10

【0087】

各種のカルボニル化合物に由来するAGEs化タンパク質の生物活性を検討するために、細胞毒性試験を実施した。なお、AGEs化タンパク質としては、実施例3と同様にして調製した3,4-DGE-BSA、MGO-BSA、GO-BSA、AA-BSAを使用した。

【0088】

FBS-M199培地に懸濁したヒト腹膜中皮細胞(HPMC)を、96ウェルプレート(Iwaki社製)に3400cells/wellずつ播種して1晩培養した。ウェル中の接着細胞を、1mg/mLとなるようにAGEs化タンパク質を溶解させた8.4%FBSを含有するM199培地(0.1mL/well)に曝露し、4日間培養を行った。曝露終了後、前記培地を除去し、10%の発色基質(商品名WST-1;タカラバイオ社製)を含むM199培地で培養し、40分後における波長450nmの吸光度を測定して生細胞数を求めた。この結果を図15のグラフに示す。なお、図においてDGE-BSAは3,4-DGE-BSAを示す。

20

【0089】

図示のように、他のタンパク質は細胞活性に影響を与えなかったのに対して、3,4-DGEでAGEs化したBSA溶液に曝露した細胞は、その活性が約25%まで低下していた。この結果から、3,4-DGEから生成するAGEs化タンパク質は、極めて強い細胞毒性を示すことが確認された。

【実施例8】

【0090】

腹膜透析液に含まれる3,4-DGEからAGEsが形成されることを、前記実施例1で調製した抗体を用いて検出した。

30

【0091】

腹膜透析液として、3,4-DGEを含まない透析液A、3,4-DGE濃度が15μMの透析液B、3,4-DGE濃度が6μMの透析液Cをそれぞれ使用した。まず、各透析液と200mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)とを体積比9:1(v/v)で混合し、pHを7.15~7.27に調整した後、2mg/mlとなるようHSA(ヒト血清アルブミン)を溶解した。この溶液を37℃で4週間インキュベートしたものを分析試料とした。これらの各試料3μgをSDS-PAGEに供し、前記実施例1で作製した抗体を用いて、前記実施例3と同様にして、ウェスタンブロッティングを行った。また、陰性コントロールとして、HSA、陽性コントロールとして3,4-DGE-HSAについて、同様にSDS-PAGEとウェスタンブロットを行った。なお、陽性コントロールの3,4-DGE-HSAは、前記実施例3と同様にして調製した。この結果を図16に示す。同図に示すように、3,4-DGEを含む透析液A、B、CとHSAとをインキュベートして得られた分析試料では、116kDa、200kDa付近で、抗体との反応を示すバンドが確認された。これらの116kDa、200kDa付近のバンドは、HSAの分子量が66kDaであることから、3,4-DGEとの反応により架橋したHSAの二量体および三量体と思われる。このように、3,4-DGEを含有する透析液を使用すると、これとタンパク質とが反応して3,4-DGEに由来するAGEsが形成されることが確認された。また、前記実施例1で作製した抗体によりこれらのAGEsが検出できることから、バンドの濃さを比較することで、生成したAGEsの定量も可能であると考えられる。

40

【実施例9】

【0092】

50

腎不全患者の結成タンパク質を分析試料とし、前記実施例 1 で作製した抗体を用いて、3,4-DGE由来のAGEsの有無を確認した。

【0093】

9人の腎不全患者の血清タンパク質（アルブミンリッチの総タンパク質）を試料とし、それぞれ8 μ gをSDS-PAGEに供し、前記実施例 1 で作製した抗体を用いて、実施例 3 と同様にウエスタンブロッティングを行った。また、あわせて健常者の血清タンパク質も試料とした。陽性コントロールは、前記実施例 8 と同様の3,4-DGE-HSAを使用した。この結果を図 17 に示す。なお、同図においては、9人の患者のうち二名（患者Aおよび患者B）の結果を示す。同図に示すように、患者Aおよび患者Bの試料では、116kDa付近で抗体との反応を示すバンドが確認された。また、残りの7名の患者についても、同図と同様の結果が得られた。これに対して健常者においてはほとんどバンドが確認されなかった。この結果から、腎不全患者の血清には、3,4-DGEに由来するAGEsが存在することが確認された。

10

【産業上の利用可能性】

【0094】

以上のように、本発明の抗AGEs抗体によれば、例えば、3,4-DGE由来のAGEsを検出することができる。このため、本発明は、前記3,4-DGE由来AGEsのさらなる研究や、また、前記3,4-DGE由来AGEsが関与すると考えられる各種疾患の診断等に有用であると言える。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図 1】図 1 は、本発明の実施例において、抗3,4-DGE-RSA抗体の結合定数を求めるためのグラフである。

20

【図 2】図 2 (A) および (B) は、本発明の他の実施例における、抗3,4-DGE-RSA抗体の反応特異性を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、本発明のさらに他の実施例における、抗3,4-DGE-RSA抗体のウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。

【図 4】図 4 は、本発明のさらに他の実施例において、ヒト腹膜中皮細胞を3,4-DGEに暴露した後、抗3,4-DGE-RSA抗体との抗原抗体反応を行った結果を示す写真であり、(a) はコントロールであり、(b) および (c) が実施例の結果である。

【図 5】図 5 は、本発明のさらに他の実施例において、ラット腹腔を透析液に暴露した後、抗3,4-DGE-RSA抗体との抗原抗体反応を行った結果を示す写真であり、(A) はコントロール、(B) は2 μ Mの3,4-DGE含有透析液、(C) は58 μ Mの3,4-DGE含有透析液をそれぞれ使用した結果である。

30

【図 6】図 6 (A) および (B) は、本発明のさらに他の実施例における、抗3,4-DGE-RSA抗体の反応特異性を示すグラフである。

【図 7】図 7 は、前記実施例において、抗3,4-DGE-RSA抗体の結合定数を求めるためのグラフである。

【図 8】図 8 (A) および (B) は、本発明のさらに他の実施例における、抗3,4-DGE-RS抗体と、3,4-DGEおよびタンパク質の反応時間が異なるAGEs化タンパク質との反応性を示すグラフである。

【図 9】図 9 は、本発明の参考例において、3,4-DGEとタンパク質との反応液の呈色を示す写真である。

40

【図 10】図 10 は、前記参考例において、3,4-DGEとタンパク質との反応における、経時的な蛍光強度変化を示すグラフである。

【図 11】図 11 は、前記参考例において、3,4-DGEとタンパク質との反応生成物についての、Arg残基およびLys残基の残存率の経時変化を示すグラフであり、(A) がArg残基の残存率、(B) がLys残基の残存率を示す。

【図 12】図 12 は、前記参考例において、3,4-DGEとタンパク質との反応生成物についての等電点の経時変化を示すグラフである。

【図 13】図 13 は、前記参考例において、3,4-DGEとタンパク質との反応生成物についてのSDS-PAGEの経時変化を示すグラフであり、(A) が3,4-DGEの結果、(B) がMGOの結

50

果である。

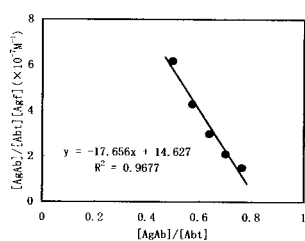
【図14】図14は、本発明の他の参考例において、各種カルボニル化合物のタンパク質に対する反応性を示すグラフである。

【図15】図15は、本発明のさらに他の参考例において、各種カルボニル化合物とタンパク質の生成物についての細胞毒性を示すグラフである。

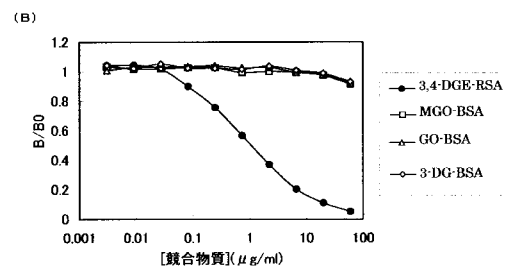
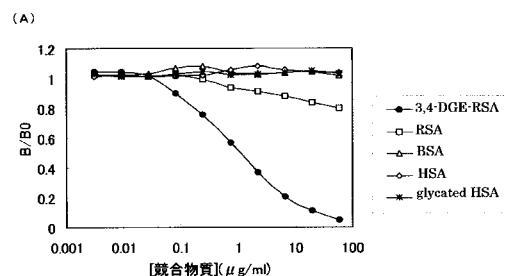
【図16】図16は、本発明のさらに他の実施例における、抗3,4-DGE-RSA抗体のウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。

【図17】図17は、本発明のさらに他の実施例における、抗3,4-DGE-RSA抗体のウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。

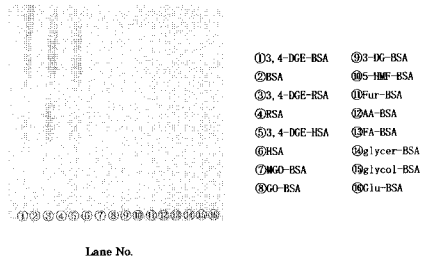
【図1】



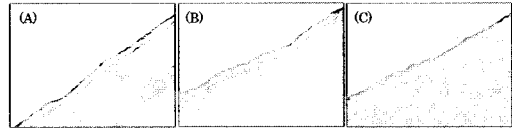
【図2】



【 図 3 】

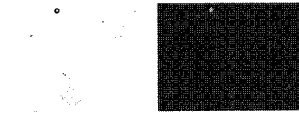


【 図 5 】



【 図 4 】

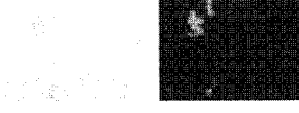
(a) 3, 4 DGE 曝露なし (コントロール)



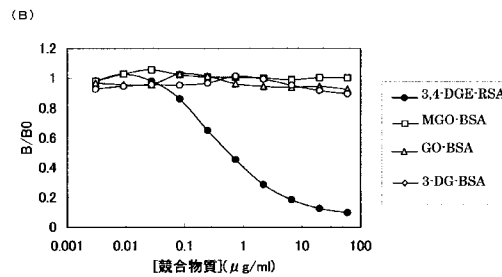
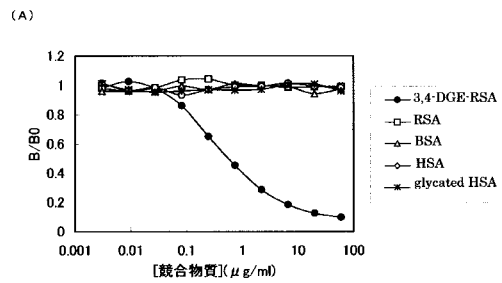
(b) 30 μM 3, 4-DGE 曝露



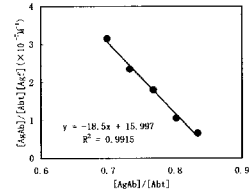
(c) 250 μM 3, 4-DGE 曝露



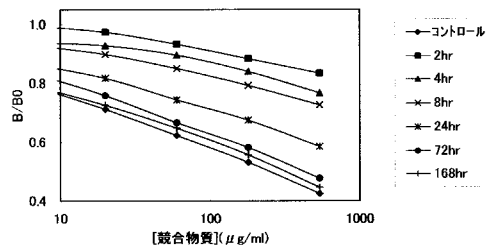
【 図 6 】



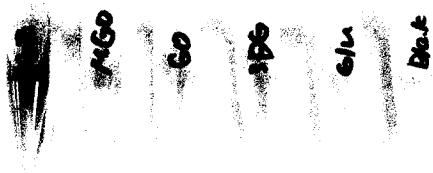
【 図 7 】



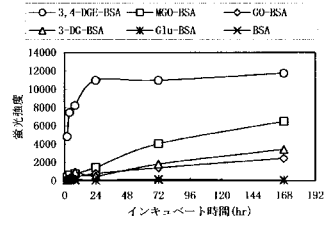
【 図 8 】



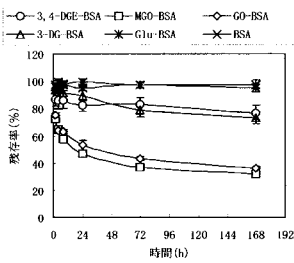
【 図 9 】



【 図 10 】

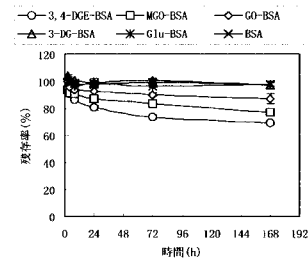
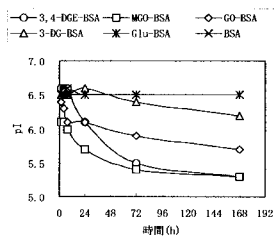


【 図 11 】



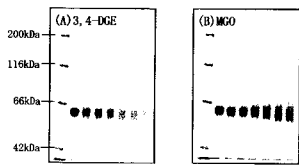
(A) Arg 残基の残存率(%)

【 図 12 】

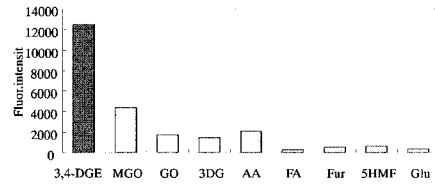


(B) Lys 残基の残存率(%)

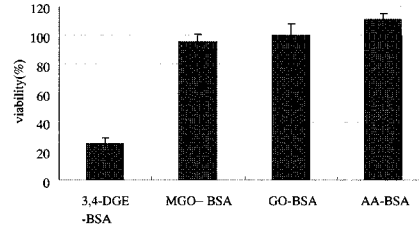
【 図 1 3 】



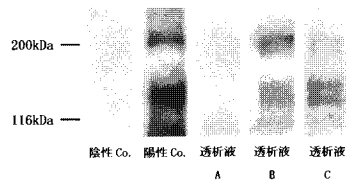
【 図 1 4 】



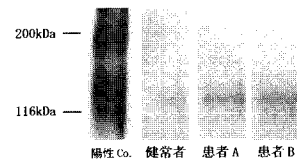
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 图 1 7 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/553

C 1 2 P 21/08

テーマコード(参考)

专利名称(译)	特异性地与衍生自3,4-DGE的AGEs反应的抗体		
公开(公告)号	JP2006312621A	公开(公告)日	2006-11-16
申请号	JP2006094937	申请日	2006-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社ETC.		
申请(专利权)人(译)	有限公司周杰伦IMS		
[标]发明人	山本敬史 木村祐子		
发明人	山本 敬史 木村 祐子		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/543.545.Z G01N33/543.541.B G01N33/545.B G01N33/553 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/DA70 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72		
优先权	2005108623 2005-04-05 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供衍生自与蛋白质或肽具有强反应性的羰基化合物的AGE化合物抗体，并提供检测源自AGE化合物的AGE的方法。 解决方案：使3,4-dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE) 与蛋白质反应，并用AGEs反应产物免疫宿主动物，从宿主动物中回收血清。 因此，分离了针对反应产物AGEs的抗体 (抗AGEs抗体)。 通过使分离的抗AGEs抗体与样品反应，并检测样品中的AGE与抗AGEs抗体之间的抗原抗体反应，可以检测出样品中AGE的存在与否。 [选型图]图1

