

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3730919号
(P3730919)

(45) 発行日 平成18年1月5日(2006.1.5)

(24) 登録日 平成17年10月14日(2005.10.14)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	

請求項の数 12 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2001-530579 (P2001-530579)	(73) 特許権者	000238201 扶桑薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(86) (22) 出願日	平成12年10月6日(2000.10.6)	(73) 特許権者	599144424 三輪 匡男 静岡県静岡市常磐町2丁目6-13
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/006972	(73) 特許権者	599144435 菅谷 純子 静岡県清水市川原町21-11-204
(87) 国際公開番号	W02001/027620	(74) 代理人	100065868 弁理士 角田 嘉宏
(87) 国際公開日	平成13年4月19日(2001.4.19)	(74) 代理人	100106242 弁理士 古川 安航
審査請求日	平成15年6月13日(2003.6.13)		
(31) 優先権主張番号	特願平11-291096		
(32) 優先日	平成11年10月13日(1999.10.13)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペロトキシン産生大腸菌に起因する腎障害、溶血性尿毒症症候群および腸管出血性大腸菌感染症の検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ペロトキシン産生大腸菌に起因する腎障害の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄量を定量し、ペロトキシン産生大腸菌に起因する腎障害への罹患を検査する工程を含む方法。

【請求項2】

ペロトキシン産生大腸菌に起因する溶血性尿毒症症候群の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄量を定量し、ペロトキシン産生大腸菌に起因する溶血性尿毒症症候群への罹患を検査する工程を含む方法。

【請求項3】

ペロトキシン産生大腸菌に起因する腸管出血性大腸菌感染症の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄量を定量し、ペロトキシン産生大腸菌に起因する腸管出血性大腸菌感染症への罹患を検査する工程を含む方法。

【請求項4】

ペロトキシン産生大腸菌に起因する腎障害の重症度の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄量を定量し、ペロトキシン産生大腸菌に起因する

10

20

腎障害の重症度を検査する工程を含む方法。

【請求項 5】

ペロトキシン産生大腸菌に起因する溶血性尿毒症症候群の重症度の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン 2 および / またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン 2 および / またはその由来分子の排泄量を定量し、ペロトキシン産生大腸菌に起因する溶血性尿毒症症候群の重症度を検査する工程を含む方法。

【請求項 6】

ペロトキシン産生大腸菌に起因する腸管出血性大腸菌感染症の重症度の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン 2 および / またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン 2 および / またはその由来分子の排泄量を定量し、ペロトキシン産生大腸菌に起因する腸管出血性大腸菌感染症の重症度を検査する工程を含む方法。

10

【請求項 7】

前記ペロトキシン産生大腸菌が、ペロドキシン 1 産生株である請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の検査方法。

【請求項 8】

前記ペロトキシン産生大腸菌が、ペロドキシン 2 産生株である請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の検査方法。

【請求項 9】

前記ペロトキシン産生大腸菌が、0-157:H7である請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の検査方法。

20

【請求項 10】

前記アクアポリン 2 および / またはその由来分子の検出または定量が、免疫学的方法により行われる請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の検査方法。

【請求項 11】

前記免疫学的方法が、E L I S A 法により行われる請求項 10 に記載の検査方法。

【請求項 12】

抗アクアポリン 2 抗体を含む、請求項 10 に記載の検査方法において使用されるためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

30

【発明の属する技術分野】

本発明は、アクアポリン 2 (以下、「AQP2」と称する) および / またはその由来分子の尿試料中への排泄を検出、または排泄量を定量することによる、ペロトキシン産生大腸菌に起因する腎障害、溶血性尿毒症症候群または腸管出血性大腸菌感染症への罹患を検査する工程を含む検査方法、ならびにそれらの重症度の検査方法に関する。さらには、それら検査方法に使用するキット製品に関する。

【0002】

【従来の技術】

大部分の大腸菌は特に病気を起こさず、健康なヒトや動物の腸管内に存在している。しかし、一部の大腸菌は病原性を有しており、腹痛・嘔吐・下痢等の消化器系の感染症、尿道炎・膀胱炎・髄膜炎等の非消化器系の感染症を引き起こす。消化器系の感染症を引き起こす大腸菌は経口的に感染し、腸管で病原性を示すことから、下痢性大腸菌あるいは広義の病原性大腸菌と言われている。病原性大腸菌は次の 5 つに分類することができる。

40

1. 毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic Escherichia coli; ETEC)、
2. 腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive Escherichia coli; EIEC)、
3. 腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic Escherichia coli; EPEC)、
4. 腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic Escherichia coli; EHEC) もしくはペロトキシン産生性大腸菌 (Verotoxin-producing Escherichia coli; VTEC)
5. 腸管付着性大腸菌 (Enteroadherent Escherichia coli; EAEC)

0-157:H7 (以下、「0-157」と称する) は腸管出血性大腸菌に属し、0抗原は細胞表面に

50

存在するリポポリサッカライド (LPS) の抗原構造の違いによって1~173型に、H抗原は鞭毛の抗原構造の違いによって1~57型に分けられている。0-157は食中毒菌の中でも特に感染力が強く、腸管出血性大腸菌の約60~80%は0-157によるものである。多くの食中毒原因菌は十万~百万個摂取しないと発症しないが、0-157は数十~数百個程度でも食中毒発症をもたらす。0-157の潜伏期は4~10日と、一般食中毒と比べてかなり長く、感染すると下痢、吐き気、腹痛等、一般の食中毒と区別がつかない症例で始まることが多い。また、悪寒、発熱、上気道感染症状を呈すなど、風邪のような症状を示す場合もある。

【0003】

0-157が産生するベロトキシン (以下、「VT」と称する; アフリカミドリザルの腎尿細管細胞由来であるVero細胞に致死的な変化を起こす毒素) は志賀赤痢菌毒素に類似した毒素である。VTはサブユニットAおよびサブユニットBから成り、サブユニットAは毒素活性を示し、サブユニットBは粘膜への結合活性を示す部分である。遺伝学的に、VTには少なくとも6種類の型があることが明らかにされているが、ヒトの感染症には主にベロトキシン1 (以下、「VT1」と称する; 志賀赤痢菌毒素とアミノ酸配列がほぼ同一の毒素、分子量約70,000) およびベロトキシン2 (以下、「VT2」と称する; 志賀赤痢菌毒素との相同性が約60%の毒素、分子量約46,000) が関与している。0-157にはVT1のみを産生するもの、VT2のみを産生するもの、および両方とも産生するものの3タイプがあり、両方とも産生する株が比較的多いことが知られている。

【0004】

0-157はヒトの消化管に侵入するとpH2~3の胃酸に耐え、大腸上皮細胞に初期定着する。その後、attaching and effacing B(eae B)の遺伝子産物を菌体外分泌し、eae A遺伝子産物であるintiminを介して細胞表面に定着するという、attaching and effacing(A/E:付着と退縮)lesionモデルが提唱されている(永山憲市 他、エマージング感染症、日本内科学会誌86(11), 37, 1997)。VTはGb3 (ガラクトース 1-4ガラクトース 1-4グルコース-セラミド構造を有するグロボトリアオシルセラミド (globotriaosylceramide) と呼ばれる中性糖脂質) 受容体に結合し (Newburg, D. S. et al. ; J. Infect Dis., 168, 476, 1993)、被覆小胞を介して細胞内に取り込まれ、細胞内膜輸送系 (trans-Golgi network) により小胞体 (endoplasmic reticulum) に運ばれる (Sandvig, K. et al. ; Nature, 358, 510, 1992)。その後、サブユニットAが脂質二重膜を通り細胞質に移動して毒性を発揮する。VTのサブユニットAは、強力な植物毒素であるヒマ種子のリシンと同じRNA N-グリコシダーゼ活性を持ち、真核生物の60Sリボソームを構成する28Sリボソームの5'末端から4324番目のアデノシンのN-グリコシド結合を加水分解する。その結果、アミノアシルtRNAのリボソームへの結合を阻害し、蛋白合成を阻害することにより細胞を死に至らしめる。また、主としてトランス-ゴルジネットワーク (trans-Golgi network) までの輸送の過程で、サブユニットAが加水分解を受けてA1およびA2に分解され、活性が増強されることも報告されている (Garred, O. et al. ; Exp. Cell Res., 218, 39, 1995)。

【0005】

腸管出血性大腸炎の約10%が溶血性尿毒症症候群 (以下、「HUS」と称する; Hemolytic Uremic Syndrome)、血栓性血小板減少性紫斑病および脳症等の重症合併症を引き起こす。HUSとは、血栓性微小血管障害の形で乳幼児期に好発する急性腎不全であり、原因として腸管出血性大腸炎、肺炎球菌感染、遺伝、薬剤または膠原病等に伴うものがあるが、0-157感染によるHUSが最も頻度が高い。特に、腎の細小動脈や糸球体毛細血管等の血管内皮細胞が障害される。また、HUSの中樞神経障害は今日HUSの死因の第1位を占めている。動物にVTを静脈内投与すると大脳、小脳の血管内皮障害とブルキンエ細胞の障害、脳幹・脊髄での神経細胞の浮腫や出血が生じることが報告されている (Mizuguchi, M. et al. ; Acta Neuropathol., 91, 254, 1996; Fujii, J. et al. ; Infect Immun., 62, 3447, 1994; Fujii, J. et al. ; Infect Immun., 64, 5043, 1996)。ゆえに、血管内皮細胞の浮腫や血管内腔の狭小化、血小板血栓、フィブリン血栓さらにはVTが血液脳関門を破壊することにより、直接的あるいは間接的に神経細胞、グリア細胞等に影響を与えることが原因

10

20

30

40

50

と考えられる。

【 0 0 0 6 】

HUSにおける血管内皮障害の主な要因は菌体外毒素であるVTであると考えられており、VT2がより重篤なHUS発症に関わっていることが知られている (Ostroff, S. M. et al. ; J. Infect. Dis., 160, 994 - 998, 1989)。ところが、近年、VTや菌体内毒素であるリポポリサッカライド (LPS) により単球、マクロファージ、血管内皮細胞等から産生された、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン1 (IL-1) 等のサイトカインが血管内皮細胞障害の成立に重要な役割を担っていることが報告された (Setten, P. A. et al. ; Blood, 88, 174, 1996、Tesh, V. L. et al. ; Infect Immun., 62, 5085, 1994)。実際に、HUS患者の急性期の血中TNF- α やIL-1 の濃度は上昇し、さらにVTが便中に検出される患者では下痢発症早期に血中TNF- α が高値であることも報告されている (Lopez, E. L. et al. ; Pediatr. Infect Dis. J., 14, 594, 1995、Kar, N. C. et al. ; Nephron, 71, 309, 1995、Inward, C. D. et al. ; Arch. Dis. Child, 77, 145, 1997)。

10

【 0 0 0 7 】

TNF- α やIL-1 等のサイトカインはVTやLPSと共役して、多形核白血球を活性化して血管内皮細胞への接着を促進し、活性酸素やエラスターゼを放出して血管内皮細胞に障害を与える (Kar, N. C. et al. ; Behring Inst. Mitt., 92, 202, 1993、Morgi, M. et al. ; Blood, 86, 4553, 1995、Fitzpatrick, M. M. et al. ; Pediatr. Nephrol., 6, 50, 1992、Forsyth, K. D. et al. ; Lancet, 2, 411, 1989) だけでなく、血管内皮細胞のGb3の発現を数百倍に増加させ、VT感受性を増強させる (Lopez, E. L. et al. ; Pediatr. Infect Dis. J., 14, 594, 1995、Kaye, S. A. et al. ; Infect Immun., 61, 3886, 1993、Keusch, G. T. et al. ; J. Infect Dis., 173, 1164, 1996、Forsyth, K. D. et al. ; Lancet, 2, 411, 1989)。また、VTは培養血管内皮細胞に対して白血球接着能 (Morigi, M. et al. ; Blood, 86, 4553, 1995) やエンドセリンの産生を亢進させ (Bitzan, M. M. et al. ; J. Clin. Invest., 101, 372, 1998)、末梢血白血球がVTを投与された糸球体血管内皮細胞を障害することも報告されている (Mahan, J. D. et al. ; 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin-Producing E. coli infections, p83, Baltimore, 1997)。その他、VTによりネクロシス (Obrig, T. G. et al. ; Infect Immun., 56, 2373, 1988)、アポトーシス (Laurence, J. et al. ; Semin. Hematol., 34, 98, 1997)、von Willbrand factorによる血小板凝集の亢進 (Moake, J. L. et al. ; Blood, 64, 592, 1984)、プロスタグランジンI₂の産生能低下 (Karch, H, et al. ; Microb. Pathog., 5, 215, 1988)、血管内皮細胞へのフィブリンの沈着 (Menzel, D. et al. ; Ann. Hematol., 68, 43, 1994)、メサンギウム細胞の増殖およびNO産生障害 (Dietrich, D. et al. ; J. Am. Soc. Nephrol., 1, 609, 1990) 等を引き起こし、HUSが惹起されることが考えられる。

20

30

【 0 0 0 8 】

【 発明が解決しようとする課題 】

現在までに0-157感染患者の血中よりVTが検出されたという報告はなく、血中に入ったVTは速やかに血管内皮細胞等に取り込まれて消失するために、血中のVTを検出することができないものと考えられている。ゆえに、現在までに、腸管出血性大腸菌感染症の検査・診断方法は多数開発されているが、それらは糞便を対象とするものであった。

40

【 0 0 0 9 】

例えば、病原性大腸菌0-157のVTをPCRを利用した方法で検出する、0-157ベロ毒素遺伝子直接検査キット (宝酒造)、その他、E.coli 0-157 VIP 10minutes検出キット (グンゼ産業)、ペトリフィルム (スリーエムヘルスケア)、BAXシステム (クオリコン)、米国デイツコ製キット (和光純薬工業)、48時間で検出できるキット (メルクジャパン)、病原大腸菌0157検査キットTECRA (セティカンパニーリミテッド)、リヴェール0157 : H7検査キット (エア・ブラウン)、Wellcolex E.coli 0-157 (International Murex Technologies Corporation)、GenePathシステム (日本バイオラド)、0-157検査キット (ATC Corporation) が販売されている。これら0-157の糞便を対象とした検査は、迅速

50

診断、確定診断および遺伝子診断に大別することができ、以下にそれぞれの診断について説明するが、いずれにしても欠点があった。

【0010】

腸管出血性大腸菌感染症の迅速診断には、O抗原の検出を目的としたEIA法、イムノクロマト法およびラテックス法が知られている。しかし、これらいずれも検出感度に問題があり、また、糞便中に存在する*Citrobacter freundii*、*Escherichia hermannii*および*Hafnia alvei*等の非特異的反応も認め、さらに、VT非産生株である菌にも反応するため、診断を確定する根拠とはならない。また、糞便中からのVTの直接検出をEIA法を用いて行うことも試みられているが、VT1とVT2との区別ができなく、また、感染初期の糞便でしか検出できないという欠点がある。

10

【0011】

腸管出血性大腸菌感染症の確定診断には、菌の分離とその分離菌のVT産生株を確認する2段階が必要である。菌の分離に使用される培地として、ソルビトール・マッコンキー（SMAC）寒天培地、SIB（Sorbitol IPA Bile Salts）寒天培地およびSMAC寒天培地にセフィキシムと亜テルル酸カリウムを添加したCT-SMAC寒天培地がある。さらに、レインボーアガーやクロモアガーを用いる選択培地もある。この様にして選択された菌のVT産生性を確認することが必須であり、該確認方法として免疫学的反応を利用したラテックス凝集反応法およびEIA法もしくはPCR反応を利用した方法が用いられている。しかしながら、このような培養方法では多くの時間が必要であり、診断結果がでるまでに病態が進行する恐れがある。また、操作が煩雑で実用的でない。さらに、多くの病院検査室ではO157を分離した経験

20

【0012】

また、腸管出血性大腸菌感染症の遺伝子診断には、PCR法による便からの直接検出、菌培養液からの検出および分離した大腸菌のVT産生株の確認が行われている。糞便中には多くのPCR反応阻害物質が存在しており前処理が必要であるため、操作が煩雑になる。さらに、DNAプローブ法によりベロトキシン産生菌を迅速に検出する方法、蛍光を当てることで細菌遺伝子のDNA配列の違いを検出するバイオセンサー技術を応用した蛍光偏光法の開発が進められているが、良好な結果は得られていない。

【0013】

ゆえに、臨床医からは腸管出血性大腸菌に感染したことを早期に診断でき、かつ簡便な方法の確立が切に望まれていた。

30

【0014】

一方、腸管出血性大腸菌によるHUSは、下痢、血便の始まりから数日～2週間以内に発症することが多く、また、出血性大腸炎の症状が強くなくても重症合併症が起こる例も報告されているため、重症合併症の予測および早期発見は極めて困難である。また、HUSの根本的および特異的治療法のないために、無尿のため透析が必要な症例や脳症を合併する症例があり、HUSの早期診断が不可欠であった。

【0015】

現在の我が国のHUS診断は、溶血性貧血（破碎状赤血球を伴う貧血でHb 10g/dL以下）、血小板減少（血小板数 100,000万/ μ L以下）および急性腎機能障害（乏尿、無尿あるいは年齢相当血清クレアチニン基準値の1.5倍以上の上昇）の3主徴をもって診断している。しかしながら、3主徴を伴うHUSと伴わないHUSがあり、その他の随伴する臨床症状（例えば、肝機能障害、脾炎、乏尿、浮腫、出血斑、頭痛、傾眠、不穏、血尿、蛋白尿、痙攣および意識障害等）があり、血液生化学検査においては、ハプトグロブリン値低下、LDH上昇、血清ビリルビン値上昇、赤血球数減少、ヘモグロビンヘマトクリット低下、血清BUN（30mg/dl以上）、GOTおよびGPTの上昇等）を勘案して診断しているのが現状である。

40

【0016】

HUSにおける腎障害は糸球体の血管内皮障害が主体であり、VTによる直接的な尿細管障害（Takeda, T et al. ; J. Infect., 27, 339, 1993）以外に、VT、LPSもしくは各種サイトカインが糸球体血管内皮細胞と尿細管細胞からオートクラインまたはパラクライン的に

50

サイトカインの産生を促進させ、腎障害を惹起する可能性が考えられる (Kohan, D. et al. ; 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin-Producing E. coli infections, p81, Baltimore, 1997)。これらのことから、VTおよびLPSは生体内においてマクロファージおよび白血球等のサイトカイン産生細胞に対し、各種サイトカインの産生を促進させ、該サイトカインと相加的または相乗的に血管内皮細胞 (特に腎において) を障害すると予想でき、O-157によるHUSは様々な要因が重なり合って生じると考えられている。

【0017】

ゆえに、VTのみを検出して、腎に対する障害およびHUSの診断には到底利用することができないことから、臨床医にとってはO-157感染患者がHUSに進行するか否かを早期に検査できる方法、あるいは集中治療を行うべき患者であるか否かを選択する方法が切に望まれていた。また、腸管出血性大腸菌感染による重篤な病状への移行を防ぐためには、毒素暴露による腎機能低下の徴候を早期に見出す方法が望まれていた。

10

【0018】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、VTを血中より検出することが不可能であることから、尿に存在する物質が腸管出血性大腸菌に感染したことを示すパラメータとして利用可能であるか精意研究したところ、尿中に排泄されたAQP2をパラメータとして用いることにより、腸管出血性大腸菌の感染を早期に検査できることを見出した。また、VT2の暴露量と尿中に排泄されるAQP2量が相関することを見出し、尿中AQP2量を測定することによりVT2の暴露量を間接的に知ることができるとの知見に至った。そして、VT2により腎障害が惹起されることが知られていることから、尿中AQP2量を測定することにより、腎障害の重症度の検査および/または腎機能低下の早期検査をすることもできる。さらに、VT2暴露量と全身症状が相関することから、尿中AQP2量を測定することにより、HUSへの移行を早期に検査することもできる。

20

【0019】

従って本発明は、ベロトキシン産生大腸菌に起因する腎障害の検査方法であって、尿試料中へのAQP2および/またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのAQP2および/またはその由来分子の排泄量を定量し、腎障害への罹患を検査する工程を含む方法を提供する。本実施例に示す様に、腎障害の指標となる公知のパラメータ (2-ミクログロブリン、N-アセチル-D-グルコサミダーゼ、尿クレアチニン、血液尿素窒素、血清クレアチニン等) に比較して、AQP2の尿中排泄量を測定することにより、健常人との有意差が確実に且つ早期に認められることから、AQP2の尿中排泄を検出するかまたは排泄量を定量することで腎障害への罹患を早期に検査することが可能となる。尿中AQP2含量の定量は、尿をサンプルとして直接実施しても、あるいは尿からAQP2を単離した後に実施してもよい。

30

【0020】

さらに本発明は、ベロトキシン産生大腸菌に起因する溶血性尿毒症症候群の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄量を定量し、溶血性尿毒症症候群への罹患を検査する工程を含む方法を提供する。この方法によって、従来困難であった溶血性尿毒症症候群の早期検査が実現される。

40

【0021】

本発明はまた、ベロトキシン産生大腸菌に起因する腸管出血性大腸菌感染の検査方法であって、尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄を検出、または尿試料中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄量を定量し、腸管出血性大腸菌による感染を検査する工程を含む方法を提供する。この方法によって、腸管出血性大腸菌感染、特にVT2産生株である大腸菌による感染を早期に検査することができるので、菌の培養やVT2の検出結果を待つことなく、VT産生株、特にVT2産生株やO-157:H7などの腸管出血性大腸菌感染に適した治療を施すことが可能となる。また、VT1を産生する大腸菌による感染も早期に検査することができる。

50

【0022】

本発明のさらなる特徴として、前記3種の疾患の重症度を、尿中のアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄量によって検査する工程を含む方法が提供される。被検者の尿中アクアポリン2排泄量が高いほど、これらの疾患が重症となっていることが示されるので、かかる重症度を検査することができる。

【0023】

以上の方法において、アクアポリン2および/またはその由来分子の尿中への排泄の検出または排泄量の定量は、免疫学的方法、好ましくはELISA法によって実施される。

【0024】

また、本発明により腎機能の検査方法であって、被検者の尿中へのアクアポリン2および/またはその由来分子の排泄を検出、または排泄量を定量し、被検者の腎機能を判定する工程を含む方法が提供される。この方法は、腎機能の低下に伴って尿中へのアクアポリン2排泄量が増加することに基づくものであり、例えば抗アクアポリン2抗体を利用した上記免疫学的方法、好ましくはELISA法によってアクアポリン2および/またはその由来分子の検出、定量が実施される。

10

【0025】

本発明はさらに、抗アクアポリン2抗体を含む、上記検査方法において使用されるための検査用キットを提供する。本キットによって、上記疾患の迅速且つ正確な検査が可能となる。

【0026】

【発明の実施の形態】

1992年にPrestonらは、赤血球膜に多量に存在するCHIP28 (Channel like membrane intrinsic protein of 28kDa、28kDaのチャンネル様膜内因性蛋白質)のcDNAをクローニングし、該蛋白質をアフリカツメガエルの卵に発現させ、CHIP28が特異的に水分子を透過させる水チャンネルであることを証明した (Preston, G. M. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 11110, 1991、Preston, G. M. et al. ; Science, 256, 385, 1992)。その後、類似蛋白質が次々と同定され、遺伝子ファミリーが存在していることが明らかとなった。これらの水チャンネルは構造的、機能的に類似しているため、アクアポリン(以下、「AQP」と称する)ファミリーと呼ばれている (Agre, P. et al. ; Am. J. Physiol., 265, 1993)。AQPはMIP (Major intrinsic protein、主要内在性蛋白質)ファミリーと呼ばれる膜蛋白質の一群に属している。MIP/AQPファミリーの蛋白質は約270個のアミノ酸から成り、細胞膜を6回貫通する膜蛋白質である。さらに、アスパラギン(N)、プロリン(P)、アラニン(A)の3つのアミノ酸が連なったNPAボックス配列が2回保存されている。また、アミノ酸配列中の前半部と後半部は高い相同性を有している。AQPは大腸菌、植物、両生類および哺乳類等で存在が確認されており、AQPファミリーを形成している (Chrispeels, M. J. et al. ; TIBS, 19, 421, 1995、Park, L. H. et al. ; J. Membr. Biol., 153, 171, 1996)。

20

【0027】

哺乳類においては現在までに、少なくとも9種のアクアポリンがクローニングされている。AQPは全身の至る所に発現が認められ、AQP0は眼の水晶体、AQP1は近位尿細管・ヘンレ下降脚・脳脈絡膜・胆・眼・毛細血管内皮、AQP2は集合管管腔膜、AQP3は集合管管腔膜・大腸・小腸・脳脈絡膜・眼、AQP4は集合管・脳・眼・肺、AQP5は唾液腺・眼・気管支、AQP6は腎、AQP7は精巣・精子およびAQP8は精巣・精子・肝に発現している。

40

【0028】

特に、腎臓には4種類のAQPが存在し、水の再吸収を司っている。近位尿細管、ヘンレ下降脚の尿細管上皮細胞管腔膜および側底膜の両方の膜上にAQP1が存在している。一方、集合管の主細胞にはAQP2およびAQP3が存在し、特にAQP2は管腔膜ならびに管腔膜直下の細胞内の小胞膜上、AQP3は側底膜上に存在する。従って、水の再吸収は主細胞の管腔膜上のAQP2から管腔膜のAQP3を介して行われているものと考えられる。AQP4は主に集合管の終末の乳頭部集合管側底膜に存在することが報告されている。

50

【0029】

本発明者らは、尿中に排泄されたAQP2および/またはその由来分子を測定することにより、腸管出血性大腸菌の感染検査、HUSの早期検査、腎機能低下および腎障害の重症度検査方法を提供する。

【0030】

本明細書で言う腸管出血性大腸菌とは、腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic Escherichia coli; EHEC) およびベロトキシン産生性大腸菌 (Verotoxin-producing Escherichia coli; VTEC) を総称したものをいう。

【0031】

本明細書で言うAQP2とは、AQP2の成熟体または完全体をいい、その由来分子とは、AQP2の前駆体すなわちシグナル配列を含むAQP2前駆体、断片すなわちAQP2の細胞外ドメインの一部を含む断片; AQP2の膜貫通ドメインの一部を含む断片; およびAQP2の細胞内ドメインの一部を含む断片、ならびに変異体すなわちAQP2遺伝子の変異によりAQP2蛋白質のアミノ酸配列の1個または数個のアミノ酸が置換、付加、挿入および/または欠失されたAQP2をいう。尚、AQP遺伝子変異によるアミノ酸配列の変異は、これまでに少なくとも13カ所で見出されている(最新医学、52、8、1806-1811、1997)。

10

【0032】

腎障害、溶血性尿毒症症候群または腸管出血性大腸菌感染を検査する方法として、尿試料中へのAQP2および/またはその由来分子の排泄を検出する方法または尿試料中へのAQP2および/またはその由来分子の排泄量を定量する方法には、免疫学的結合性を利用した方法(例えば、AQP2、好ましくはヒトAQP2に対するペプチド抗体、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体等)を用いることができる。この方法において、前記抗体を好ましくはイムノプロットティング、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降またはELISAにおいて使用することができる。また、これらの検査方法において同様の免疫学的結合性を利用した方法に基づき、AQP2および/またはその由来分子を単離する工程をさらに含んでもよい。

20

【0033】

このように抗体を用いてAQP2および/またはその由来分子を検出または定量する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりAQP2および/またはその由来分子を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化AQP2および/またはその由来分子と検体中のAQP2および/またはその由来分子を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のAQP2および/またはその由来分子を測定する競合法を利用して検体中のAQP2および/またはその由来分子を測定する方法が挙げられる

30

また、これら抗体を用いてAQP2および/またはその由来分子を単離する方法としては、例えば、AQP2および/またはその由来分子を単離するために、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび/または免疫沈降が好適に用いられる。すなわち、前記抗体を結合させた担体に被検試料を接触させて抗原-抗体間の特異的な相互作用を許容し、次いで担体を洗浄した後、結合された新規コレクチンを溶出する工程を含む、カラム法、バッチ法等によるアフィニティークロマトグラフィーおよび/または免疫沈降が実施されるとよい。

40

【0034】

サンドイッチELISA法によるAQP2および/またはその由来分子の測定においては、まず、固定化抗体とAQP2および/またはその由来分子とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加する2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびAQP2および/またはその由来分子を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

【0035】

上記方法に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセター

50

ル、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

【0036】

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N - スクシニイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレートおよびN - スクシニイミジル - 2 - マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシサクシニミドエステル法、N - サクシミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

10

【0037】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α - D - ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ - 5 - ステロイドイソメラーゼ、 α - グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等が挙げられるが、これらのほか免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

20

30

【0038】

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H_2O_2 を用い、発色剤として2, 2' - アジノ - ジ - [3 - エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5 - アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4 - アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に α - D - ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン - ジ - (α - D - ガラクトピラノシド)、4 - メチルウンベリフェニル - α - D - ガラクトピラノシド等を使用することができる。

40

【0039】

架橋剤としては、N, N' - オルトフェニレンジマレイミド、4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N - スクシニイミドエステル、6 - マレイミドヘキサン酸・N - スクシニイミドエステル、4, 4' - ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既

50

知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

【0040】

また、本発明は尿中AQP2の簡易検出/測定キットを提供する。具体的には、AQP2に対する一次抗体を適当な固相に結合させ、該固相に尿を接触させ、その後AQP2と一次抗体との複合体に対する酵素標識化二次抗体を含む液体を接触させる。その後、酵素に対する基質を含む液体を接触させることにより発色し、当該色により尿中AQP2濃度を測定することができる。

10

【0041】

【実施例】

以下、本発明を実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定的に解釈されるべきでなく、請求の範囲における限定事項のみが、本発明に付されるべきものである。

【0042】

本発明の下記実施例中に使用したベロ毒素(VT)は、VT2またはVT1である。VT1を実験動物に静脈内投与すると、貧血、血小板減少、脳障害は起こるものの明らかな腎病変は認められないことが知られている。すなわち、VT1のみを用いた実験系ではHUSに典型的な糸球体病変を実験動物に惹起することは困難であり、HUSに伴う急性脳症の動物モデルとしては適用できるが、腎障害を中心とするHUSの動物モデルとはなり得ない(Strockbine, N. A. et al.; *Infect Immun.*, 53, 135, 1986、Yutsudo, T. et al.; *Microb. Pathog.*, 3, 21, 1987、Zoja, C. et al.; *J. Lab. Clin. Med.*, 120, 229, 1992、Richardson, S. E. et al.; *Infect Immun.*, 60, 4154, 1992)。一方、VT2産生EHECを実験動物に経口投与することにより、下痢・血便、貧血、血小板減少、糸球体障害、尿細管壊死、中枢神経障害等のHUSに特有の病変を惹起させることが可能となる(Wadolowski, E. A. et al.; *Infect Immun.*, 58, 3959, 1990、Zepada, H. M. et al.; 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin-Producing *E. coli* infections, p73, Baltimore, 1997、Valdivia-Anda, G. et al.; 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin-Producing *E. coli* infections, p70, Baltimore, 1997)。ゆえに、HUSのモデルとしては、VT1よりもVT2を用いる方が適切であると考えられる。

20

30

【0043】

実施例1：AQP2に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製

まず、ヒトAQP2アミノ酸配列(Sasaki, S. et al.; *Clin. Invest.*, 93, 1250-1256, 1994)のC末端15アミノ酸に相当するペプチドのN末端側にシステインを付加したペプチド(アミノ酸配列：NH₂-Cys-Val-Glu-Leu-His-Ser-Pro-Gln-Ser-Leu-Pro-Arg-Gly-Thr-Lys-Ala-COOH(配列番号：1))を、標準固相ペプチド合成法(Carpino, L. A. et al.; *J. Org. Chem.*, 37, 3404-3409, 1972)により合成した。その後、当該合成ペプチドをHPLC法にて精製し、得られたペプチドをN末端のシステインに結合するマレイミド活性化キーホールリンペットヘモシニアン(maleimide-activated keyhole limpet hemocyanin)に混合させた。0.1mgの合成ペプチドをRibiaジュバント(Ribi ImmunoChem Research, Inc.)と混合し、当該混合物1.0mLをニュージーランド白色種雌性ウサギの皮下および皮内に注入した。14日毎に前記混合物1.0mLを追加免疫した。4回目の追加免疫後、ELISAにて1:16,000比以上の力価の抗ヒトAQP2抗血清を有するウサギが得られ、以後の実験には全て当該ウサギの抗血清を用いた。抗血清をプロテインGアフィニティークラム(Amersham Pharmacia)にて精製した。

40

【0044】

50

ヒトAQP2に対するモノクローナル抗体は、配列番号：1に示す合成ペプチド20 μ gをRibiaジュバントと混合し、当該混合物0.2mLをBALB/c雌性マウスの皮下に注入し、14日毎に前記混合物0.2 mLを皮下に追加免疫した。4回目の追加免疫は、同様の合成ペプチド20 μ gを含む混合物を生理食塩液にて静脈内投与することにより行った。脾臓細胞をP3x63Aq8.653ミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマを同じペプチドを抗原として用いたEIAアッセイにてスクリーニングした。

【0045】

得られたモノクローナル抗体をプロテインGセファロースにて精製し、ラットおよびヒトのAQP1, AQP2, AQP3, AQP4およびAQP5のC末端に相当する合成ペプチドに対する交差反応性をEIAアッセイにて調べた。その結果、ヒトおよびラットAQP2に相当する合成ペプチドには100%反応し、ヒトおよびラットAQP1, AQP3, AQP4およびAQP5に対する反応性は0.01%以下であった。下記表1に、ヒトおよびラットのAQP1, AQP2, AQP3, AQP4およびAQP5のC末端に相当するペプチドのアミノ酸配列を示す。当該合成ペプチドのN末端にはシステインを有しており、標準固相ペプチド合成法にて合成し、HPLC法にて精製した(Halnann, S. et al. ; Am. J. Physiol. 274 (CellPhysiol. 43), C1332 - C1345, 1998)。

10

【0046】

【表1】

ヒトアポリンC末端ペプチドアミノ酸配列

- AQP1 : NH₂-Cys-Leu-Asp-Ala-Asp-Ile-Asn-Ser-Arg-Val-Glu-Met-Lys-Pro-Lys-COOH (配列番号 : 2)
- AQP2 : NH₂-Cys-Val-Glu-Leu-His-Ser-Pro-Gln-Ser-Leu-Pro-Arg-Gly-Thr-Lys-Ala-COOH (配列番号 : 1)
- AQP3 : NH₂-Cys-Glu-Glu-Glu-Asn-Val-Lys-Leu-Ala-His-Val-Lys-His-Lys-Glu-Gln-Ile-COOH (配列番号 : 3)
- AQP4 : NH₂-Cys-Glu-Lys-Gly-Lys-Asp-Gln-Ser-Gly-Glu-Val-Leu-Ser-Ser-Val-COOH (配列番号 : 4)
- AQP5 : NH₂-Cys-Glu-Pro-Glu-Asp-Glu-Trp-Glu-Gln-Arg-Glu-Glu-Arg-Lys-Lys-Thr-Met-Glu-Leu-Thr-Arg-COOH (配列番号 : 5)

ラットアポリンC末端ペプチドアミノ酸配列

- AQP1 : NH₂-Cys-Leu-Asp-Ala-Asp-Ile-Asn-Ser-Arg-Val-Glu-Met-Lys-Pro-Lys-COOH (配列番号 : 6)
- AQP2 : NH₂-Cys-Val-Glu-Leu-His-Ser-Pro-Gln-Ser-Leu-Pro-Arg-Gly-Ser-Lys-Ala-COOH (配列番号 : 7)
- AQP3 : NH₂-Cys-Glu-Ala-Glu-Asn-Val-Lys-Leu-Ala-His-Met-Lys-His-Lys-Glu-Gln-COOH (配列番号 : 8)
- AQP4 : NH₂-Cys-Ile-Asp-Ile-Asp-Arg-Gly-Asp-Glu-Lys-Lys-Gly-Lys-Asp-Ser-Ser-Gly-Glu-COOH (配列番号 : 9)
- AQP5 : NH₂-Cys-Glu-Pro-Glu-Glu-Asp-Trp-Glu-Asp-His-Arg-Glu-Glu-Arg-Lys-Lys-Thr-Ile-Glu-Leu-Thr-Ala-His-COOH (配列番号 : 10)

【 0 0 4 7 】

実施例 2 : イムノアッセイによる尿中AQP2排泄量の定量

尿中のAQP2排泄量を定量するため、VT2処理群および未処理群ラットの尿をサンプルとして、実施例 1 に前記したウサギ抗ヒトAQP2ポリクローナル抗体を用いてAQP2濃度を測定し

10

20

30

40

50

た。

【0048】

4週齢のウィスター系雄性ラットに、VT2および0.1(重量/容量%)ラット血清アルブミン(Sigma, St Louis, ミズーリ州)を含む100 μ L生理食塩水に溶解したものを静脈注射してVT2処理群とした。対照群は、0.1%(W/V)ラット血清アルブミンを含む生理食塩液100 μ L静脈内投与したものとした。なお、VT2はE.coli C6000を培養した上清から精製したものをを用いた(Yutsudo, T. et al.; Microb. Pathogenesis, 3, 21-30, 1987)。

【0049】

各群のラットから採取した尿サンプル10 μ Lを96ウェルのマイクロプレートに被覆し、EIA法を実施した。標準AQP2は、Kishore, B.らの方法に準じて調製した(Kishore, B. et al.; Am. J. Physiol., 27, 1(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 40), F62 - F70, 1996) 10。標準AQP2を0~4,000fmol/10 μ Lとなるよう連続的に希釈し、該容量をそれぞれのウェルに加えた。次に、0.5%カゼインを含むPBS(リン酸塩緩衝性生理食塩水、phosphate buffered saline)液にてインキュベーションすることによりブロッキングを行い、その後、精製した前記ウサギ抗ヒトAQP2抗体を、0.5%カゼインを含むPBSで1:1,000に希釈したものを各ウェルに50 μ Lずつ加え、1時間室温にて反応させた。ウェルを洗浄することにより一次抗体を除去し、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG+IgM(H+L)「F(ab')断片」(1,000倍希釈)を1時間、室温にて反応させた。結合していない二次抗体を洗浄除去後、免疫複合産物を0.01% H₂O₂、2.2mM o-フェニレンジアミンジヒドロクロライド含有、0.1Mクエン酸バッファー(pH=4.2)にて室温下、15分間反応させることにより可視化した。酵素反応を1N HClを添加することにより停止させ、EIAマルチスペクトロメーターにて490 nmの吸光度を測定した。尿中AQP2量の測定は、標準AQP2の標準曲線に基づいて算出した。その結果、VT2で処理したラットの尿において0~400pmol/mLの濃度でAQP2の尿中排泄量を測定できることが判った。 20

【0050】

実施例3：サンドイッチELISA法によるヒト尿中AQP2排泄量の定量

抗ヒトAQP2マウスモノクローナル抗体(実施例1参照)をPBSで1,000倍希釈した溶液50 μ Lを、ELISA用プレートのウェルに結合させた。0.5%カゼイン含有PBSにてブロッキングを行った後、5倍希釈したヒト尿サンプル50 μ Lを加えて抗原-抗体結合反応を許容した。その後、1,000倍希釈した精製ウサギ抗ヒトAQP2抗体および西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG+IgM(H+L)「F(ab')断片」を加え、室温にて1時間反応させ、以下実施例2と同様の手順で発色させて尿サンプル中のAQP2量を定量した。その結果、VT2で処理したヒトの尿において0~20pmol/mLの濃度でAQP2の尿中排泄量を測定できることが判った。 30

【0051】

実施例4：ウェスタンブロット法による尿中AQP2排泄量の定量

VT2処理(実施例2と同様)および非処理群のラット膜画分はHalnannらの方法に準じて調製した(Halnann, S. et al.; Am. J. Physiol., 274 (Cell Physiol. 43), C1332 - C1345, 1998)。腎を10mLの解離液(0.3Mシュクロース、25mMイミダゾール、1mM EDTA、pH=7.2、8.5mMロイペプチン、1mMフェニルメチルスルフォニルフルオリド)にてホモジナイズした。ホモジネートを、核を除去させるために20分間、1,000 \times gにて遠心して上清を採取し、20分間、100,000 \times gにて遠心した。得られたペレットを再度上記解離液10mLにて懸濁し、Pierce BCA Protein Assay Reagent Kit(Pierce社)を用いてタンパク濃度を測定した。サンプル調製液(2% SDS、65mM Tris-HCl、10%グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール)にて10分間、90 $^{\circ}$ で溶解させた膜画分をSDS-PAGEにて分離させ、PVDF膜(ポリ(ビニリデンフルオリド)膜、Milipore社製)に転写させた。このPVDF膜を、2% 脱脂粉乳を含むPBSにてブロッキングし、1時間、室温にて、1,000倍希釈した精製抗ヒトAQP2ウサギ抗体で反応させた。その後、膜をPBSにて3回洗浄し、2,000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG+IgM(H+L)「F(ab)2断片」にて1時間反応させた。二次抗体を洗浄除去後、得られた免疫複合体を1.2mMジメチル-p-フェニレンジアミン/ 40 50

2.2mM 4-クロロ-1-ナフトール含有、0.1Mクエン酸緩衝液 (pH=6.0) にて可視化した。その結果、AQP2に相当するバンド (7.5kDa、14.4kDaおよび45kDa) が確認された。

【0052】

実施例5：VT2静脈内投与によるラット尿排泄量に対する影響

4週齢のウィスター系雄性ラットに、10、20および30ng/kg・体重のVT2 (0.1 (重量/容量%) ラット血清アルブミン (Sigma, St Louis, ミズーリ州) を含む100μl生理食塩水に溶解したものを) を静脈注射し、その後排泄される尿を代謝ケージを用いて採取して12時間ごとに尿量を測定し、それぞれの採尿時間までの蓄積尿量を記録した。ここでVT2は、実施例2に記載したと同様、大腸菌0157:H7、C6000株 (933w) の培養上清から、Yutsudo, T. et. al., ; Microb. Pathogenesis, 3: 21-30, 1987の方法に従って精製したものを

10

【0053】

その結果を図1に示すが、毒素投与後に四肢の麻痺も認められない致死量以下のVT2を10ng/kg投与したラットにおいては、毒素投与24時間の総排泄尿量は対照ラットのそれと比較して増加傾向が認められ、48時間以降では有意な尿排泄量の増加が認められた、この10ng/kg投与ラットの一週間後の尿量は正常時と同じレベルにまで回復した。尚、致死量以上 (20mg/kg、30ng/kg) のVT2を静脈内に投与したラットを経時的に観察すると65~75時間後に後肢の麻痺が起り、その後投与量に比例してより重篤な症状が現れ死亡に至った。また、尿排泄量は経時的に且つVT2投与量に依存して有意な増加が認められた。VT2 20ng/kgおよび30ng/kgを投与したラットの平均生存時間はそれぞれ79.6±2.2時間および68.8±

20

【0054】

本実験結果より、VT2投与量に依存して、尿量増加および全身症状の悪化が惹起されることが判明した。

【0055】

実施例6：VT2静脈内投与によるラット尿浸透圧に対する影響

実施例5のVT2処理を施したラットにおいて、尿浸透圧の変化を調べた。浸透圧は、蒸気圧浸透圧計 (OM-6020、京都第一社製) を用いて測定した。

【0056】

その結果、10、20および30ng/kgのVT2を投与したラットの尿の浸透圧は排泄尿量の増加と相反して顕著に低下し、またその浸透圧低下はVT2投与量に依存していることが明らかになった (図2)。致死作用を示さなかったVT2 (10ng/kg) を投与したラットの尿浸透圧は投与後96時間後に最小値を示し、対照ラットの浸透圧の約29%であった。

30

【0057】

従って、VT2投与により尿量が増加すると共に尿浸透圧が低下することより、腎障害が惹起されていることが判明した。

【0058】

実施例7：VT2静脈内投与によるラット腎に対する影響 (1)

VT2による処理が腎障害を受けているか否か検討する為に、実施例5に記載のVT2処理ラットにおける尿中への 2-ミクログロブリン排泄量を測定した (図3)。2-ミクログロブリン排泄量は、ウサギ抗ヒト 2-ミクログロブリン抗体 (Rockland, Gilbertsville, ペンシルバニア州) を用いたEIAによって定量した。

40

【0059】

その結果、VT2 (20ng/kg) を投与したラットの投与2日目の24時間蓄積尿 (24~48時間) 中の 2-ミクログロブリン値は非投与対照に比して有意に増加し、投与3日目の24時間蓄積尿 (48~72時間) 中の 2-ミクログロブリン値は最大に達していた。

【0060】

実施例8：VT2静脈内投与によるラット腎に対する影響 (2)

VT2による腎障害のさらなる確認の為に、実施例5のVT2処理ラットで、尿中への集合管細胞に由来すると考えられるリソソーム酵素 (N-アセチル-D-グルコサミダーゼ、以下NA

50

Gと称する)の排泄量を測定した。NAG量は、NAG Test Shionogi(塩野義製薬社製)のアクセイキットを用いN-アセチル-D-グルコサミニダーゼ活性を測定することによって定量した(図4)。

【0061】

VT2(20ng/kg)を投与したラットの投与2日目の24時間蓄積尿(24~48時間)中の2-ミクログロブリン値は有為に増加し、投与3日目の24時間蓄積尿(48~72時間)中の2-ミクログロブリン値は最大に達した。また、10ng/kgの用量においても24時間蓄積尿(48~72時間)中の2-ミクログロブリン値は有意に増加していた。

【0062】

実施例9：VT2静脈内投与によるラット腎系球体に対する影響

10

さらに、実施例5のVT2処理ラットにおける腎系球体への影響を確認するため、尿クレアチニン(図5)、血清中の尿素窒素量(BUN、図6)および血清クレアチニン(図7)を定量した。クレアチニン量は、Creatinine-Test-Wako(アルカリ・ピクリン酸塩法、和光純薬社製)を用いて定量した。BUNの定量は、Urea Nitrogen B-Test Wako(ウレアーゼ-インドフェノール法、和光純薬社製)を用いて行った。血清を得るため、血液をラット上大静脈から採取し、7.6%クエン酸ナトリウム液に18:1の比率となるよう添加して、その後2,000×gで10分間遠心分離して上清を保存した。

【0063】

これらの結果、死亡直前の24時間に排泄された尿量やクレアチニン量(図5)は減少し、血漿中の尿素窒素(図6)およびクレアチニンレベル(図7)の上昇が認められ、しかし

20

VT2投与ラットで認められる障害の最終ステージでの系球体機能の低下が認められた。

【0064】

実施例10：VT2静脈内投与によるラットのアクアポリン2尿中排泄量の亢進

実施例5および6に示される浸透圧低下を伴った尿排泄量亢進は、水再吸収機構の機能不全を示唆している(図1および図2)。VT2による水バランス不全が尿中へのAQP2排泄増加と関係するか否か検討する為に、ラット水チャンネル(AQP2)のC末端ペプチドを用いて作製した抗AQP2ポリクローナル抗体(実施例1参照)を利用した免疫化学的測定法(実施例2参照)を実施した。

【0065】

この測定法により、AQP2は0~4,000fmolの範囲で検出可能であった。VT2非投与ラットの尿中のAQP2蛋白質量は13.0pmol/mLであった(BCAタンパク分析試薬、Pierce社製で測定した蛋白質量を標準とした)。VT2投与ラットの24時間蓄積尿中のAQP2濃度は有意に上昇し、2日目の24時間蓄積尿中のAQP2濃度は、VT2を10、20または30ng/kg投与したラットで、対照ラットのそれと比べて有意に増加していた(図8)。

30

【0066】

従って、VT2により惹起された溶血性尿毒症症候群が、速やかなAQP2の尿中排泄量増大をもたらすことが示唆された。また、実施例5~9に示される腎機能の低下とAQP2の尿中排泄量とが相関性を有することも明らかになった。

【0067】

実施例11：VT2投与および非投与ラットの腎臓細胞膜中のAQP2発現の検討

40

実施例4の方法に準じて、VT2投与ラットと非投与の対照ラットの腎臓細胞膜におけるAQP2発現レベルをウェスタンブロット法によって調べた。VT2投与ラットとしては、実施例2に記載の方法で処理したものを使用した。

【0068】

その結果、図9に示すようにVT2投与による尿中へのAQP2排泄亢進(図9(B))が、腎臓細胞膜中のAQP2発現量の低下(図9(A))と関連していた。また、AQP2の糖鎖が導入された分子形を表す45kDaに近い高分子の幅の広いバンドと、29kDaのAQP2バンドが検出された。AQP2蛋白質(45kDa)の免疫反応性はVT2を投与5日後のラットで著しい減少が認められた。尿試料を2,000×g遠心後の上清画分をSDS-PAGEで分離後、免疫染色すると、VT2非投与ラットでは反応性のあるバンドは全く認められなかったが、VT2投与ラット5日後の

50

尿中には7.5kDa, 14.4kDa, 45kDaの3つの抗体反応陽性のバンドが検出された。随時収集された尿中とカテーテルにより膀胱より採取した尿中の2,000×g上清中に大部分のAQP2抗体陽性物質が検出されたことは、尿中に検出されたAQP2が細胞に結合したAQP2では無く腎細胞からAQP2あるいはその代謝産物が遊離したことを示す結果であった。

【0069】

実施例12：病原性大腸菌0157:H7消化器感染により発症したヒトHUS患者尿中のAQP2含量測定

ヒト由来AQP2のC末端ペプチドを用いて免疫付与・調製し、アフィニティカラムによって精製することにより得られる抗ヒトAQP2ポリクローナル抗体と非特異的に交差反応する物質がヒト尿中に存在することから、ヒト尿中のAQP2レベルを測定する為の、より高い特異性を持ったヒトAQP2の高感度免疫化学的測定法を開発した。すなわち、実施例3に示すサンドイッチELISA法を使用することにより、ヒト尿中AQP2を以下の通り高感度で検出した

10

。

【0070】

病原性大腸菌0157:H7に消化器経路により感染し、菌集落形成を防ぐ為に抗生物質を下痢症状が出る前に投与したにもかかわらずHUSを発症した患者(3才女児)について表2に示す通り、上記ヒトAQP2の高感度測定方法を含む検査を行った。この患者は、発症後3日目に腹痛と血便、乏尿となった。この時点で患者からカテーテルを介して採取した尿をサンプルとして定量した結果、2-ミクログロブリンと同様顕著なAQP2レベルの上昇が認められた。この患者は、連続して腹膜透析による治療が施され、12日後にはHUS緩解に伴い、尿中への全蛋白質排泄は減少し、血清中のクレアチニンおよび尿素窒素レベルも低下した。さらに2-ミクログロブリンやN-アセチル-D-グルコサミダーゼ(NAG)の尿中排泄レベルはまだ高かったが、尿中AQP2レベルは低下していた。

20

【0071】

尚、表2に示した尿浸透圧、尿中2-ミクログロブリン、尿中NAG、血清クレアチニンおよび血液BUNは、実施例6~9に記載した方法に準じて測定し、尿蛋白は、BCAタンパク分析試薬(Pierce)を用いて定量した。統計解析にはANOVAもしくは独立t検定を用いた。

【0072】

【表2】

発症後 日数 (日)	尿					血 清	
	浸透圧 (mOsm/kg)	AQP2 (fmol/mg/リアチニン)	β 2-ミクログロブリン (μ g/mg/リアチニン)	N-アセチル- β -D-グルコサミンダーゼ (U/mg/リアチニン)	蛋白 (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)	BUN (mg/dl)
3	307	681	868	44.40	895	5.4	147
14	242	0	1457	45.80	360	3.1	65

10

20

30

40

【0073】

この結果、ヒトにおけるHUS罹患の重症度とAQP2の尿中排泄量には相関関係があることが示唆された。このHUS罹患の重症度はすなわち、腎障害および腸管出血性大腸菌感染の重症度と相関するものと考えられ、尿中AQP2排泄量の定量がこれら疾患への罹患の早期検査および重症度検査に適用しうることを示唆するものであった。

【0074】

50

実施例 1 3 : VT1静脈内投与によるラットのアクアポリン 2 尿中排泄量の亢進

実施例 2 にて前記したと同様の手法で、4 週齢のウィスター系雄性ラットに、10、40および100ng/kg・体重のVT1 (0.1 (重量/容量%) ラット血清アルブミン (Sigma、St Louis、ミズーリ州) を含む100 μl生理食塩水に溶解したもの) を静脈注射した。その後尿中へのラット水チャンネル (AQP2) の排泄量の経時変化を、実施例 1 におけると同様にAQP2のC末端ペプチドを用いて作製した抗AQP2ポリクローナル抗体 (実施例 1 参照) を利用した免疫化学的測定法 (実施例 2 参照) によって測定した。ここでVT1は、大腸菌0157:H7の培養上清から、Noda, M. et. al., ; Microb. Pathogenesis, 2: 339-349, 1987の方法に従って精製したものをを用いた。

【0075】

その結果を図 1 0 に示すが、VT1 10ng/kgおよび40ng/kg投与では4 8時間より、またVT1 100ng/kg投与では2 4時間後より、尿中AQP2濃度が有意に上昇することが明らかになった。このことから、VT1暴露によっても尿中にAQP2が排泄されることが判明し、従って尿中AQP2濃度の測定を、VT1を産生する腸管出血性大腸菌の感染症の早期検査に利用できることが示された。

【0076】

実施例 1 4 : VT1またはVT2静脈内投与によるラットのアクアポリン 2 尿中排泄量の亢進
実施例 1 3 および 2 にそれぞれ記載したと同様に、ラットにVT1またはVT2を投与し、その後、尿中AQP2濃度に加え、NAG (実施例 8 参照) およびクレアチニン (実施例 9 参照) の尿中排泄量を経時的に測定した。こうして得られた結果を、クレアチニン補正後のAQP2濃度 (図 1 1 および図 1 3) ならびにNAG濃度 (図 1 2 および図 1 4) として示した。図 1 1 に示した通り、VT1投与により用量依存的にAQP2の尿中排泄量が増加し、100ng/kgの用量では投与 2 4 時間後に対照との有意差が認められた。また、図 1 3 に示した通り、VT2投与により用量依存的にAQP2の尿中排泄量が増加し、10ng/kg以上の用量で投与 2 4 時間後に対照との有意差が認められた。一方、図 1 2 および図 1 4 に示すように、VT1およびVT2投与によってN-アセチル-D-グルコサミニダーゼの尿中排泄量も用量依存的に増加したが、いずれの場合にも対照との有意差が認められたのは4 8時間経過以降であり、AQP2排泄量の方がより早期に増加することが示された。

【0077】

以上の結果より、VT1およびVT2暴露による指標として、尿中AQP2量が有用であることが判明し、従って尿中AQP2濃度の測定を、VT1および/またはVT2を産生する腸管出血性大腸菌の感染症の早期検査に利用できることが示唆された。

【0078】

【発明の効果】

以上示した実施例によって、公知の腎障害の指標となる 2-ミクログロブリンおよびN-アセチル-D-グルコサミニダーゼよりも早期にAQP2の尿中への排泄増加が有意に認められ、AQP2を指標とすることにより、ペロトキシン産生大腸菌に起因する各種腎障害、特に腸管出血性大腸菌感染による腎障害を早期に発見することができることが明示された。また、AQP2を指標とすることにより、腸管出血性大腸菌感染を早期に検査することができる。さらに、VT2またはVT1の暴露量、腎障害度、全身症状悪化およびAQP2排泄量がそれぞれ正の相関関係を示すことから、AQP2を指標とすることにより、本発明の方法に従って、HUSへの移行危険度、腎障害度等を間接的に検査することができる。

【0079】

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCING LIST

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Method for Diagnosing Renal Diseases, Hemolytic Uremic Syndrome and Infections by Enterohemorrhagic Escherichia coli.

<130> 99PA0341

<160> 10

10

<210> 1

<211>

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220> 16

<223> Carboxy-terminal Peptide of Human AQP2

<400> 1

Cys Val Glu Leu His Ser Pro Gln Ser Leu Pro Arg Gly Thr Lys Ala

20

1

5

10

15

<210> 2

<211>

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220> 16

<223> Carboxy-terminal Peptide of Human AQP1

30

<400> 2

Cys Leu Asp Ala Asp Asp Ile Asn Ser Arg Val Glu Met Lys Pro Lys

1

5

10

15

<210> 3

<211>

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

40

<220> 17

<223> Carboxy-terminal Peptide of Human AQP3

<400> 3

Cys Glu Glu Glu Asn Val Lys Leu Ala His Val Lys His Lys Glu Gln

1

5

10

15

Ile

<210> 4

10

<211>

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220> 16

<223> Carboxy-terminal Peptide of Human AQP4

<400> 4

Cys Glu Lys Lys Gly Lys Asp Gln Ser Gly Glu Val Leu Ser Ser Val

1

5

10

15

20

<210> 5

<211>

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220> 23

<223> Carboxy-terminal Peptide of Human AQP5

<400> 5

30

Cys Glu Pro Asp Glu Asp Trp Glu Glu Gln Arg Glu Glu Arg Lys Lys

1

5

10

15

Thr Met Glu Leu Thr Thr Arg

20

<210> 6

<211>

40

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220> 16

<223> Carboxy-terminal Peptide of Murine AQP1

<400> 6

Cys Leu Asp Ala Asp Asp Ile Asn Ser Arg Val Glu Met Lys Pro Lys

1

5

10

15

<210> 7

10

<211>

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220> 16

<223> Carboxy-terminal Peptide of Murine AQP2

<400> 7

Cys Val Glu Leu His Ser Pro Gln Ser Leu Pro Arg Gly Ser Lys Ala

1

5

10

15

<210> 8

20

<211>

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220> 16

<223> Carboxy-terminal Peptide of Murine AQP3

<400> 8

30

Cys Glu Ala Glu Asn Val Lys Leu Ala His Met Lys His Lys Glu Gln

1

5

10

15

<210> 9

<211>

<212> PRT

<213> Rattus sp.

40

<220> 16

<223> Carboxy-terminal Peptide of Murine AQP4**<400> 9****Cys Ile Asp Ile Asp Arg Gly Asp Glu Lys Lys Gly Lys Asp Ser Ser****1****5****10****15****Gly Glu****<210> 10****<211>****<212> PRT****<213> Rattus sp.****<220> 23****<223> Carboxy-terminal Peptide of Murine AQP5****<400> 10****Cys Glu Pro Glu Glu Asp Trp Glu Asp His Arg Glu Glu Arg Lys Lys****1****5****10****15****Thr Ile Glu Leu Thr Ala His****20****【図面の簡単な説明】****【図1】**ラットへのVT2投与による尿排泄量への影響を示すグラフである。**【図2】**ラットへのVT2投与による尿浸透圧への影響を示すグラフである。**【図3】**ラットへのVT2投与による腎障害を確認するための、尿中 2-ミクログロブリン排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図4】**ラットへのVT2投与による腎障害を確認するための、尿中NAG排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図5】**ラットへのVT2投与による腎障害を確認するための、尿中クレアチニン排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図6】**ラットへのVT2投与による腎障害を確認するための、血漿に含まれる尿素窒素量の経時変化を示すグラフである。**【図7】**ラットへのVT2投与による腎障害を確認するための、血漿中のクレアチニンレベルの経時変化を示すグラフである。**【図8】**ラットへのVT2投与に伴う尿中へのAQP2排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図9】**ラットへのVT2投与に伴う腎臓細胞膜および尿中のAQP2の挙動を調べたウェスタンブロッティングの結果を示す図である。**【図10】**ラットへのVT1投与に伴う尿中へのAQP2排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図11】**ラットへのVT1投与に伴う尿中へのAQP2排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図12】**ラットへのVT1投与による腎障害を確認するための、尿中NAG排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図13】**ラットへのVT2投与に伴う尿中へのAQP2排泄量の経時変化を示すグラフである。**【図14】**ラットへのVT2投与による腎障害を確認するための、尿中NAG排泄量の経時変化

10

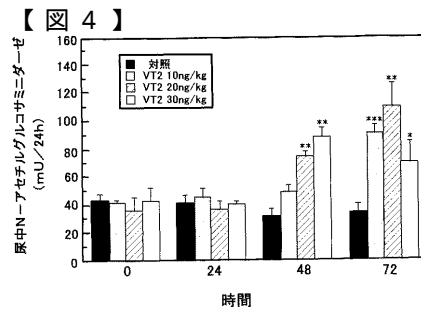
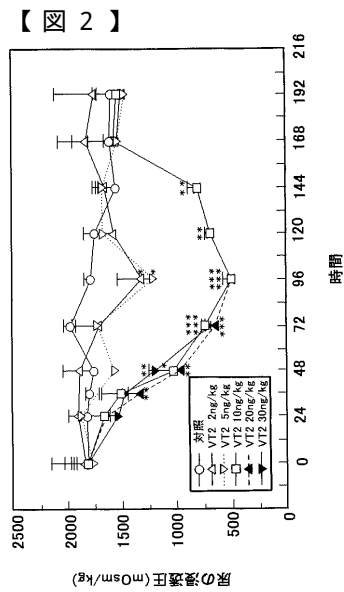
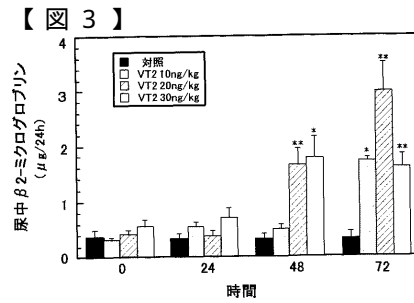
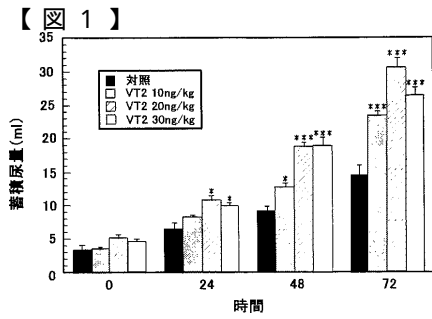
20

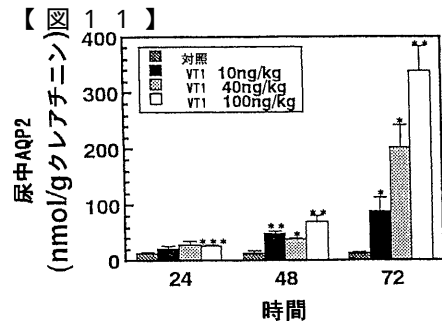
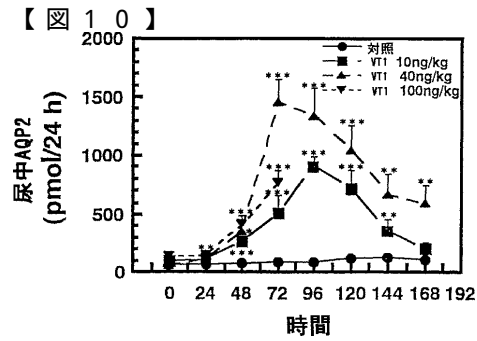
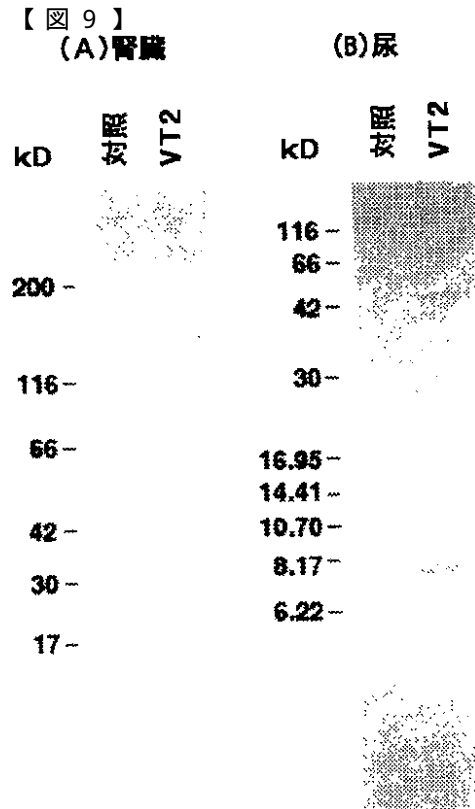
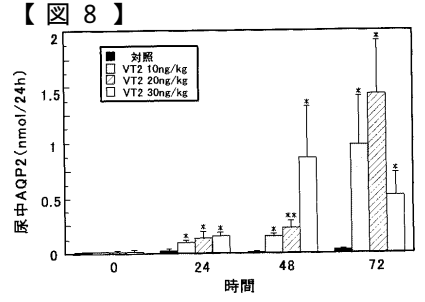
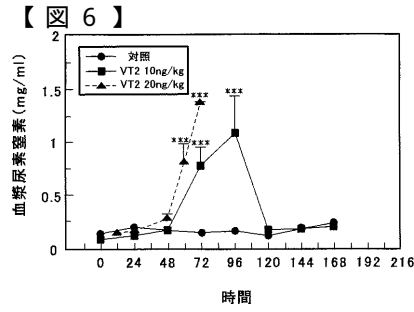
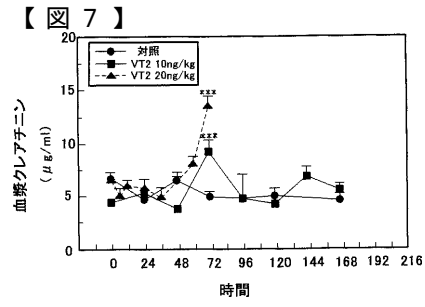
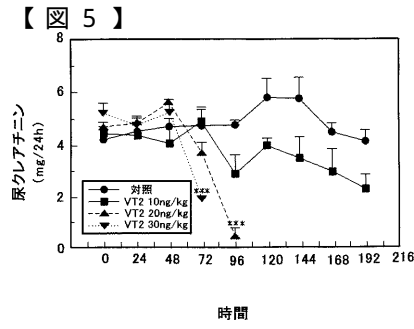
30

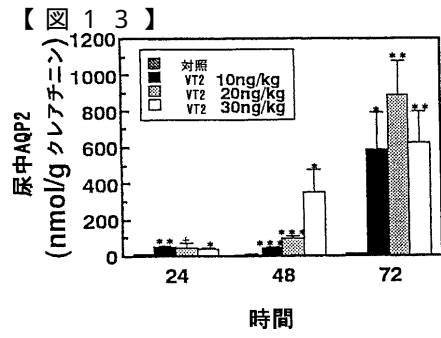
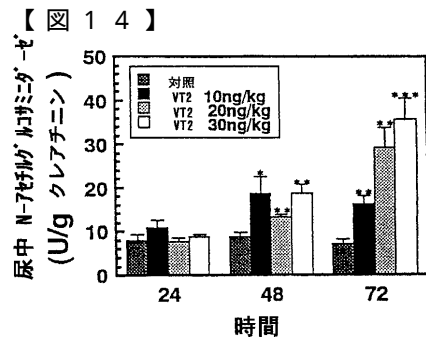
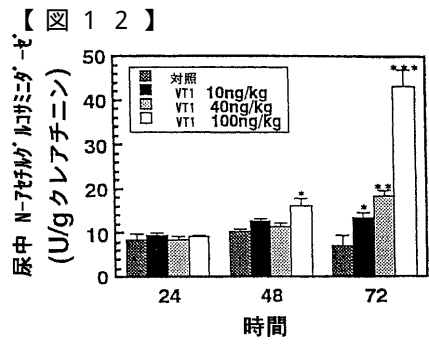
40

50

を示すグラフである。







フロントページの続き

(72)発明者 三輪 匡男

静岡県静岡市常磐町二丁目6 - 13

(72)発明者 菅谷 純子

静岡県清水市川原町21 - 11 - 204

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特表2001 - 510850 (JP, A)

特開平10 - 206429 (JP, A)

臨床病理, 1999年, vol.47, no.5, p.402-407

医学のあゆみ, 1995年 5月27日, vol.173, no.9, p.745-748

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol.82, no.2, p.686-689

Medical Technology, vol.27, no.6, p.498-499

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

G01N 33/68

