

(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2002 - 273

(P2002 - 273A)

(43)公開日 平成14年1月8日 (2002.1.8)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		14/81	4 B 0 5 0
14/81		16/18	4 B 0 6 4
16/18		16/38	4 H 0 4 5
16/38		16/40	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 9 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 187605(P2000 - 187605)

(22)出願日 平成12年6月22日(2000.6.22)

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 鈴木 宏治

三重県津市上浜松町六丁目4 - 35

(72)発明者 仲 大地

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内

(72)発明者 長池 一博

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロテインCインヒビターと肝細胞増殖因子アクチベーターとの複合体およびその測定方法並びに臓器障害の検出方法

(57)【要約】

【課題】 臓器障害の状態を測定する方法を提供する。

【解決手段】 臓器障害の患者から採取された生体試料中のプロテインCインヒビターと肝細胞増殖因子アクチベーターとの複合体を、臓器障害の状態の指標として測定する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロテアーゼCインヒビターと肝細胞増殖因子アクチベーター（HGF A）との複合体。

【請求項2】 プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を測定する方法であって、（1）プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を認識する抗体、および、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体中のプロテインCインヒビターを認識する抗体のいずれか又は両方を含む試薬を検体中の前記複合体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、（2）免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のHGF Aを認識する標識抗体と反応させる工程、及び（3）免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法。

【請求項3】 プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を測定する方法であって、（1）プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を認識する抗体、および、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体中のHGF Aを認識する抗体のいずれか又は両方を含む試薬を検体中のプロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、（2）免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のプロテインCインヒビターを認識する標識抗体と反応させる工程、及び（3）免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法。

【請求項4】 プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体をプロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体に対する抗体と反応させることを含む、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を測定する方法。

【請求項5】 検体が、臓器障害の患者から採取された生体試料である請求項2～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を認識する抗体、および、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体中のプロテインCインヒビターを認識する抗体の少なくとも一つである第1の抗体と、第1の抗体およびプロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体の反応により生成する免疫反応物中のHGF Aを認識する第2の抗体とを含む、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体の測定キット。

【請求項7】 プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を認識する抗体、および、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体中のHGF Aを認識する抗体の少なくとも一つである第1の抗体と、第1の抗体およびプロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体の反応により生成する免疫反応物中のプロテインCインヒビターを認識する第2の抗体とを含む、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体の測定キット。

【請求項8】 プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を認識する抗体を含む、プロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体の測定キット。

【請求項9】 請求項2～4のいずれか一項に記載の方法によりプロテインCインヒビターとHGF Aとの複合体を測定し、測定された結果に基づき臓器障害を検出することを含む、臓器障害の検出方法。

【請求項10】 プロテアーゼCインヒビターとHGF Aとの複合体を認識するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臓器障害に関連する新規複合体、その測定法および測定キットに関する。また、臓器障害の検出方法に関する。さらに、新規複合体に対するモノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】腎臓、肝臓、心臓、肺等の臓器や血管等の組織の修復・再生を目指す医療が臓器移植などの再生医療を中心に普及しつつある。この臓器移植や障害臓器を対象とした治療においては、その治療の有効性の評価、すなわち移植あるいは治療した臓器の再生の状態を正確に診断する検査法の確立が重要である。こうした検査法において、従来、臓器からの穿刺吸引による細胞診断が実施されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、従来の臓器からの穿刺吸引による細胞診断は侵襲的で苦痛を伴う。また従来のその他の、臓器の機能を診断する検査法（臓器固有の酵素の活性や代謝機能の測定、臓器の死細胞から遊離する酵素や代謝産物の測定から関係臓器の状態を類推する方法等）の感度や特異性は必ずしも充分でない。そのため、鋭敏で特異性が高く、採取が容易な血液検体を用いることのできる、臓器再生状況等の臓器の状態の測定方法の開発が望まれる。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、生体内に種々存在して、タンパク質、ペプチド中のペプチド結合を加水分解する機能を有するタンパク質すなわちプロテアーゼやその活性を抑制するタンパク質であるプロテアーゼインヒビターに焦点をあて、臓器や組織の修復・再生時におけるそれらの血中濃度に関して検討を行った。

【0005】

具体的には生体内に存在する各種プロテアーゼまたはプロテアーゼインヒビターを免疫抗原として用い、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ等の動物に対して通常行われる免疫操作を実施してポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作成した。次にこの得られた各種抗体を組み合わせ、2抗体サンドイッチ法を用いた酵素標識抗体測定法（enzyme-linked immunosorbent assay；以下ELISAと略する）を用い、種々の臓器障害の患者の血液（血漿または血清）における反応性を解析した。すなわち（1）各種プロテアーゼまたはプロテアーゼインヒビターに対する抗体の固相プレートへの個別の吸着（2）固

相の過剰なタンパク結合部位のブロッキングと洗浄

(3) 固相プレートに吸着させた抗体と各種ヒト血液(血漿または血清)との反応および洗浄(4) 各種プロテアーゼまたはプロテアーゼインヒビターに対する抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ等で酵素標識した標識抗体の反応(5) 未反応標識抗体の除去と洗浄(6) 酵素標識抗体と酵素基質による酵素(発色)反応(7) 吸光操作を実施し、種々の臓器障害にあって臓器再生中の患者の血液と反応するプロテアーゼおよびプロテアーゼインヒビターに対する抗体およびその組合せを探した。

【0006】その結果、驚いたことに、血液凝固・線溶系に關与するプロテアーゼインヒビターの1つであるプロテインCインヒビター(以下PCIと略す)に対する抗体とセリンプロテアーゼの一種である肝細胞増殖因子アクチベーター(HepatocyteGrowth Factor Activator、以下HGFAと略す)に対する抗体との組合せが臓器障害の患者の血液、例えば肝臓や腎臓の手術後の患者の血液と強く反応性を有すること、そして、PCIとHGFAが複合体を形成し、その量が臓器障害の患者の血液で著しく増加することを初めて見出すに至った。

【0007】本発明は、上記の知見に基づいてなされたものであり、以下のものを提供する。

1. PCIとHGFAとの複合体。

【0008】2. PCIとHGFAとの複合体を測定する方法であって、(1) PCIとHGFAとの複合体を認識する抗体、および、PCIとHGFAとの複合体中のPCIを認識する抗体のいずれか又は両方を含む試薬を検体中のPCIとHGFAとの複合体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2) 免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のHGFAを認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3) 免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法。

【0009】3. PCIとHGFAとの複合体を測定する方法であって、(1) PCIとHGFAとの複合体を認識する抗体、および、PCIとHGFAとの複合体中のHGFAを認識する抗体のいずれか又は両方を含む試薬を検体中のPCIとHGFAとの複合体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2) 免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のPCIを認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3) 免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法。

【0010】4. PCIとHGFAとの複合体をPCIとHGFAとの複合体に対する抗体と反応させることを含む、PCIとHGFAとの複合体を測定する方法。

【0011】5. 検体が、臓器障害の患者から採取された生体試料である上記2~4のいずれかに記載の方法。

【0012】6. PCIとHGFAとの複合体を認識する抗体、および、PCIとHGFAとの複合体中のPCIを認識する抗体の少なくとも一つである第1の抗体と、第1の抗体およびPCIとHGFAとの複合体の反

応により生成する免疫反応物中のHGFAを認識する第2の抗体とを含む、PCIとHGFAとの複合体の測定キット。

【0013】7. PCIとHGFAとの複合体を認識する抗体、および、PCIとHGFAとの複合体中のHGFAを認識する抗体の少なくとも一つである第1の抗体と、第1の抗体およびPCIとHGFAとの複合体の反応により生成する免疫反応物中のPCIを認識する第2の抗体とを含む、PCIとHGFAとの複合体の測定キット。

【0014】8. PCIとHGFAとの複合体を認識する抗体を含む、PCIとHGFAとの複合体の測定キット。

【0015】9. 上記2~4のいずれかに記載の方法によりPCIとHGFAとの複合体を測定し、測定された結果に基づき臓器障害を検出することを含む、臓器障害の検出方法。

【0016】10. PCIとHGFAとの複合体を認識するモノクローナル抗体。

【0017】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

【0018】<1> PCIとHGFAとの複合体 PCIとHGFAとの複合体(以下、HGFA-PCI複合体ともいう)を形成するPCIおよびHGFAは特に限定されず、例えば、天然に存在する形態のものでよい。

【0019】PCIは分子量約57,000(57kDa)の一本鎖糖蛋白質で、主に活性化されたプロテインC(Activated protein C、以下APCと略す)に対して分子比が1対1のアシル結合複合体を形成することによりその活性を阻害することが知られている。またPCIはAPC以外にも、トロンビン、第Xa因子、第XIa因子、カリクレイン、ウロキナーゼ、組織中プラスミノゲン活性化因子も阻害すること報告されており(鈴木、Methods in Enzymology, 222, 385-399, 1993)、血液・尿・精漿・滑液等に広く存在することから血液凝固系の制御のみならず、多彩な生理機能があると考えられている。

【0020】HGFAはセリンプロテアーゼの一種で分子量約98,000(以下98kDa HGFAと示す)を示すものとそのN末端から数えたアミノ酸残基数で372番目のアルギニンと373番目のバリン間で限定分解をうけたC末端側のペプチドである分子量約34,000(以下34kDa HGFAと略す)を示すものが存在することが知られている。各HGFAは98kDa HGFAのN末端から数えたアミノ酸残基数で407番目のアルギニンと408番目のイソロイシン間で限定分解を受けることにより活性化しセリンプロテアーゼとしての活性を有する。活性化したHGFAは増殖因子の一種として知られている肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor; 以下HGFと略す)に作用してこれを特異的に活性化させることが知られている(下村ら、The

Journal of Biological Chemistry, 268, 22972-22932, 1993)。

【0021】HGFA-PCI複合体は、PCIおよびHGFAを適切な溶液中で混合し、両方を反応させることで得ることができる。溶液としては、生理的リン酸緩衝水溶液が挙げられる。混合の条件は、通常には、HGFAが10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、PCIが10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、HGFAとPCIの比はモル比で1:1~1:10である。反応の温度および時間は、通常には、20~40 $^{\circ}\text{C}$ で0.5~6時間である。

【0022】HGFA-PCI複合体は、臓器の障害に続く再生時に生成され、従って臓器傷害の特異的マーカーとして極めて有用である。また、HGFA-PCIの測定における標準物質または競合イムノアッセイにおける標識抗原として使用できる。

【0023】<2>HGFA-PCI複合体の測定方法PCIまたはHGFAまたはHGFA-PCI複合体を認識する抗体を使用して、生体試料中のHGFA-PCI複合体を定性または定量的に測定することが可能である。その方法としては、HGFA-PCI複合体を検出する目的であれば特に限定されない。例えば、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光免疫測定法、イムノプロットング法、イムノクロマト法、ラテックス凝集法などが挙げられる。また本発明で使用する抗体はそのまま用いてもよいし、定法によりFabまたはF(ab')₂化した形態の抗体を用いてもよい。なお、本明細書において、抗体が「認識する」とは、抗体が特異的に結合することを意味する。

【0024】このような方法として具体的には、(1)PCIとHGFAとの複合体を認識する抗体、および、PCIとHGFAとの複合体中のPCIを認識する抗体のいずれか又は両方を含む試薬を検体中のPCIとHGFAとの複合体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のHGFAを認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む、または、(1)PCIとHGFAとの複合体を認識する抗体、および、PCIとHGFAとの複合体中のHGFAを認識する抗体のいずれか又は両方を含む試薬を検体中のPCIとHGFAとの複合体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のPCIを認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む、2抗体サンドイッチ法が挙げられる。

【0025】以下、2抗体サンドイッチ法を用いたELISA法を例として説明するが、標識が酵素に限定されるものではない。

【0026】まずマイクロタイターウェルやマイクロ磁気ビーズなどの固相に対してHGFAまたはPCIまた

はHGFA-PCI複合体を認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を定法により固定化する。次にこの抗体固定化表面の過剰なタンパク結合部位をウシ血清アルブミンまたはスキムミルクまたはゼラチン等でブロッキングする。その後、HGFA-PCI複合体を含む可能性のある検体を添加して固相上で免疫反応物を形成させた後に洗浄する。固相に抗PCIポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用した場合、次に免疫反応物中のHGFAまたはHGFA-PCI複合体を認識する標識ポリクローナル抗体または標識モノクローナル抗体を添加して反応させる。固相に抗HGFAポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用した場合、次に免疫反応物中のPCIまたはHGFA-PCI複合体を認識する標識ポリクローナル抗体または標識モノクローナル抗体を添加して反応させる。固相に抗HGFA-PCI複合体ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用した場合、次に免疫反応物中のPCIまたはHGFAまたはHGFA-PCI複合体を認識する標識ポリクローナル抗体または標識モノクローナル抗体を添加して反応させる。さらに洗浄後、免疫反応物に結合した標識抗体を定量することにより、生体中のHGFA-PCI複合体量を測定することが出来る。ここで使用するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の標識とはアルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素でもよいしフルオレッセイン誘導体やローダミン誘導体などの蛍光物質でもよい。またアクリジニウムエステル等の化学発光物質であってもよいし¹²⁵Iなどのラジオアイソトープでもよい。すなわち発色、蛍光、化学発光、放射活性等により測定可能な標識であればよい。

【0027】HGFA-PCI複合体を検出する検体は特に限定されず、血清、血漿、尿、漿液、髄液、細胞組織の抽出液等の生体試料のいずれも適切な前処理を必要により行うことによって使用可能である。特にHGFA-PCI複合体は腎臓、肝臓、心臓、肺等の臓器や血管等の組織の修復・再生中の患者血液中で増加するので、血液や、血清、血漿等の血液由来画分が検体として好ましい。

【0028】また、HGFA-PCI複合体を認識する抗体を用いる場合は、2抗体サンドイッチ法に限定されない。すなわち、HGFA-PCI複合体をHGFA-PCI複合体に対する抗体と反応させることを含む方法であればよい。このような方法としては、競合法として知られるものがあり、例えば、一定量の抗体と一定量の標識したHGFA-PCI複合体を、測定すべきHGFA-PCI複合体と共存させ、共存した測定すべきHGFA-PCI複合体による、抗体と結合する標識したHGFA-PCI複合体の量の減少を指標として測定すべきHGFA-PCI複合体を定量する方法や、標識した

抗体を、HGFA-PCI複合体を固定化した固相へ結合させる際に、測定すべきHGFA-PCI複合体と共存させ、共存した測定すべきHGFA-PCI複合体による、固相と結合する標識した抗体の量の減少を指標として測定すべきHGFA-PCI複合体を定量する方法などが挙げられる。

【0029】HGFA-PCI複合体またはこの複合体中のHGFAもしくはPCIを認識する抗体は、HGFAまたはPCIまたはHGFA-PCI複合体を抗原として使用し、通常行われる免疫学的方法で取得すればよい。また特開平11-124399に記載された活性型プロテインC(APC)とPCIの複合体を抗原として使用することも出来る。HGFA-PCI複合体の作成は上述の通りである。免疫に使用する動物は特に限定されないがウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ等はいずれも使用できる。抗原の接種は皮下、筋肉内、腹腔内に完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントとよく混和して行う。投与は2~5週間ごとに実施し、抗原に対する免疫動物の抗体価が十分に上昇するまで続ける。この後、免疫動物に対して抗原のみの静脈注射を行い3~7日後に血清を取得する。モノクローナル抗体を取得する際は、免疫を行った動物より抗体産生細胞を含むと考えられる脾臓またはリンパ節を採取し、この脾臓細胞またはリンパ細胞と腫瘍細胞との細胞融合を行う。この後、細胞融合して不死化した抗体産生細胞(ハイブリドーマ)を単離する。ここで使用する腫瘍細胞は一般的に免疫を行った動物から調製される脾臓細胞またはリンパ細胞と同一種のものであることが望ましいが、異種動物のものでも可能である。例えば腫瘍細胞としてp3(p3/x63-Ag8)、P3-U1、NS-1、MPC-11、SP2/0、FO、x63.6.5.3、S194、R210等の骨髓腫瘍細胞が使用される。細胞融合は一般に行われている方法、例えば「単クローン抗体実験マニュアル」(講談社サイエンティフィック 1987年出版)に記載の方法に従って実施すればよい。細胞融合促進剤としてはセンダイウイルスや平均分子量1000~6000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。この際、更に融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤やIL-6等のサイトカインを添加することも出来る。免疫を行った脾臓細胞またはリンパ細胞に対する腫瘍細胞の混合比は、例えば腫瘍細胞に対し、脾臓細胞またはリンパ細胞を約1~10倍程度用いればよい。上記融合培地としてはERDF培地、RPMI-1640培地、MEM培地等の通常の各種培地を使用することが出来、融合時は通常、牛胎児血清(FCS)等の血清を抜いておくのがよい。融合は上記の免疫を行った脾臓細胞またはリンパ細胞と腫瘍細胞との所定量を上記培地内でよく混合し、予め37程度に加熱しておいたポリエチレングリコール溶液を20~50%程度加え、好ましくは30~37で1~10分程度反応させることによって実施する。以降、適当な培地

を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰り返す。目的とするハイブリドーマは通常の選択培地、例えばHAT培地(ヒポキチンサン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)で培養する。このHAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間行えばよい。さらに得られたハイブリドーマの選別は、HGFAまたはPCIまたはHGFA-PCI複合体を認識する抗体産生を種々の免疫化学的方法で解析することにより可能である。例えばHGFAまたはPCIまたはHGFA-PCI複合体を抗原としてハイブリドーマ培養上清中に分泌される抗体との結合をELISA法等の酵素免疫測定法(Enzyme Immunoassay、以下EIA法と略す)、ウエスタンブロットング法などで解析し、目的とするHGFAまたはPCIまたはHGFA-PCI複合体を認識する抗体を分泌しているハイブリドーマを選択することが出来る。このような方法で目的とする抗体産生能を確認した後、例えば限界希釈法により単一のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを得ることが出来る。このハイブリドーマクローンは、あらかじめFCS中に含まれるウシ抗体(IgG)を除いたFBSを1~5%程度加えた培地を用いて培養を行い、得られた培養上清を目的のモノクローナル抗体を精製する原料とする。あるいは得られたハイブリドーマクローンをあらかじめプリステンを投与したBalb/CマウスまたはBalb/c(nu/nu)マウスの腹腔内に移植し、10~14日後にモノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を採取し、目的のモノクローナル抗体を精製する原料としてもよい。先の方法によって調製した抗血清よりHGFAまたはPCIまたはHGFA-PCI複合体を認識するポリクローナル抗体を精製したり、ハイブリドーマの培養上清またはその腹水よりモノクローナル抗体を精製したりする際は通常の免疫グロブリン精製法を用いればよく、例えば、硫酸分画法、ポリエチレン分画法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAまたはプロテインGが結合したアフィニティークロマトグラフィー等により実施することが出来る。

【0030】上記のように取得された抗体の中から、2抗体サンドイッチ法に用いるのに適した2抗体を選択することは当業者に容易である。

【0031】HGFA-PCI複合体の測定結果は、臓器障害の状態の指標として利用できる。

【0032】<3>HGFA-PCI複合体の測定キット

HGFA-PCI複合体の測定キット(本発明測定キット)は、上記のHGFA-PCI複合体の測定方法に使用できるものであり、その態様としては以下の抗体を含むものが挙げられる。

【0033】(1)HGFA-PCI複合体を認識する抗体、および、HGFA-PCI複合体中のPCIを認

識する抗体の少なくとも一つである第1の抗体と、第1の抗体およびHGFA-PCI複合体の反応により生成する免疫反応物中のHGFAを認識する第2の抗体とを含む測定キット。

【0034】(2)HGFA-PCI複合体を認識する抗体、および、HGFA-PCI複合体中のHGFAを認識する抗体の少なくとも一つである第1の抗体と、第1の抗体およびHGFA-PCI複合体の反応により生成する免疫反応物中のPCIを認識する第2の抗体とを含む測定キット。

【0035】(3)HGFA-PCI複合体を認識する抗体を含む測定キット。

【0036】各抗体は、上記のHGFA-PCI複合体の測定方法に関して説明した通りである。

【0037】本発明測定キットは、上記の抗体の他、標識抗体、標準抗原(HGFA-PCI複合体)、酵素、基質などをさらに含んでもよい。使用する抗体と酵素が同時に含まれる場合には両者が結合した状態でもよいし、使用する抗体を認識する酵素標識抗体を用いてもよい。また測定の場合により、適切な抗原希釈液、反応希釈液、基質溶液、反応停止液等が含まれていてもよい。

【0038】<4>細胞障害の検出方法

細胞障害の検出方法(本発明検出法)は、上記のHGFA-PCI複合体の測定方法によりHGFA-PCI複合体を測定し、測定された結果に基づき臓器障害を検出することを含む。

【0039】HGFA-PCI複合体は、臓器や組織の修復・再生の指標であるため、HGFA-PCI複合体の測定結果に基づいて臓器障害を検出できる。測定結果に基づく臓器障害の検出は、健常人で得られる測定結果と比較することによって行うことができる。

【0040】本発明において、臓器障害とは、臓器切除、臓器炎症、臓器移植等の、臓器や組織の修復・再生をその後に伴う疾患を意味する。

【0041】本発明検出法は、特にHGFA-PCI複合体は腎臓、肝臓、心臓、肺等の臓器や血管等の組織の修復・再生中の患者血液中で増加するので、これらに関連する臓器障害の検出に有利に用いることができる。

【0042】<5>HGFA-PCI複合体を認識するモノクローナル抗体

HGFA-PCI複合体を認識するモノクローナル抗体は、上記のHGFA-PCI複合体の測定方法、本発明測定キットおよび本発明検出法に使用できる。この抗体は、上記の測定方法について説明したようにして取得することができる。

【0043】

【実施例】以下に実施例を挙げ本発明を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。

【0044】

【調製例1】PCIの精製およびHGFA(34kDa HG

FAおよび98kDa HGFA)の精製

PCIの精製は、鈴木らの文献(The Journal of Biological Chemistry, 258, 163-168, 1983)に従って行った。ヒト新鮮血漿4Lに、塩酸ベンズアミジン(10mM)、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)(1mM)、フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)(1mM)および大豆トリプシンインヒビター(50mg/L)を加え、1Mの塩化バリウムを320ml滴下した。混合液を1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心し、上清を採取し、固形ポリエチレングリコール(PEG6000)を60g/Lになるように加えた。1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心し、沈殿を除去した。上清にはさらに固形ポリエチレングリコール(PEG6000)を60g/Lになるように加え、1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心して沈殿を採取した。この沈殿に0.1Mの塩化アンモニウム、10mMの塩酸ベンズアミジン、1mMのDFPおよび1mMのPMSFを含む0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて溶解した。同一の緩衝液で平衡化したDEAE-セファロースCL-6Bカラムにかけ素通り画分を採取した。採取液に硫酸アンモニウム粉末を加え50%飽和とし、1時間攪拌後、8000rpm/minで15分間遠心し、沈殿を採取した。この沈殿に0.1Mの塩化アンモニウム、10mMの塩酸ベンズアミジン、1mMのDFPおよび1mMのPMSFを含む0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH6.0)を加えて溶解し、同一緩衝液に対して透析した。この試料をデキストラン硫酸アガロースカラムにかけてPCI画分を回収し、この画分に対して硫酸アンモニウム粉末を加えて80%飽和とした。10000rpm/minで15分間遠心して沈殿を採取して、溶解可能な最小容量の、0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解した後、UltroGel AcA44カラムにかけ、PCI画分を集めて0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH9.0)に対して透析した。その後DEAE-セファロースCL-6Bにかけ精製PCI画分を得た。

【0045】HGFAの精製は、下村らの文献(The Journal of Biological Chemistry, 268, 22927-22932, 1993)に従って行った。10mM EDTA, 10mMベンズアミジン、100μMナファモスタットメシレート、0.1mg/L大豆トリプシンインヒビター、1000KIU/mlアプロチニンを含むプロテアーゼインヒビターを添加した状態で取得したヒト血漿4Lを蒸留水で3倍に希釈した後、50mM NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したヘパリン-セファロースCL-6Bカラムにかけた。10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中の50mMから700mMのNaClの直線勾配で溶出し、HGFA画分(100-250mM NaCl画分)を回収した。回収した画分と等容量の2M硫酸アンモニウム溶液を添加後、2M硫酸アンモニウム溶液で平衡化したフェニル-セファロースCL-6Bカラムにかけた。この後1Mから0Mまでの硫酸アンモニウム濃度を減少させた直線勾配で溶出し、HGFA画分(400-100mM NaCl画分)を回収した。得られた画分は150mM NaClを含む10mMのトリ

ス塩酸緩衝液 (pH8.0) に対して透析後、A6モノクローナル抗体アフィニティカラムにかけ、50mMグリシン-HCl (pH3.0)緩衝液で溶出を行った。得られたHGFA画分は100 mM NaClおよび0.05%CHAPSを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.3) に置換した後、一部はHGFAに対する重量比で1/100量のプラズマカリクレインおよびトロンピンを添加し37 °Cで充分反応させた。また一部はHGFAに対する重量比で1/100量のトロンピンのみを添加し37 °Cで充分反応させた。反応させた画分については、再度A6モノクローナル抗体アフィニティカラムにて精製後、100mM NaClおよび0.05%CHAPSを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.3) で平衡化したGS520カラムを使用したHPLC操作を実施し、精製34kDa HGFAおよび精製98kDa HGFAを得た。

【0046】

【実施例1】 HGFA - PCI複合体の形成とその検出

調製例1で調製した分子量約57kDaを示すPCIおよびHGFA (34kDa HGFAまたは98kDa HGFA) を150mM NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) 中で混合し (PCI濃度: 100 µg/ml、HGFA濃度: 100 µg/ml)、37 °Cで30分間反応させた後、非還元下のSDS-PAGEにて解析を行った結果、HGFA - PCI複合体を示す約91kDa複合体 (34kDa HGFA - PCI複合体) 及び約155kDa複合体 (98kDa HGFA - PCI複合体) が検出された。さらにPCIがHGFAに対してHGFA - PCI複合体を形成することによりHGFA活性を阻害していることを確認するために、上記操作でPCIおよびHGFA (34kDa HGFAまたは98kDaHGFA) を混合して37 °Cで反応させる際、経時的にそのHGFA活性を解析した結果、PCI添加により34kDa HGFAおよび98kDa HGFAの活性が抑制されることが解った (図1)。HGFA活性は、合成基質 (Ac-AKTKQLR (配列番号1)-MCA) を用いて、分解反応により生じたAMC (7-アミノ-4-メチルクマリン) 量を励起波長380 nm、蛍光波長460 nmの条件で測定することにより測定した。

【0047】

【実施例2】 抗HGFA - PCI複合体モノクローナル抗体および標識抗HGFAポリクローナル抗体の調製
実施例1で作成したHGFA - PCI複合体100 µg (34kDa HGFA - PCI複合体及び98kDa HGFA - PCI複合体の各50 µgの混合物) を含む溶液を同容量のフロイント完全アジュバントとともに、Balb/cマウスの腹腔内に2週間間隔で5回投与した。マウスの血清中に抗体が産生していることを確認後、100 µgのHGFA - PCI複合体を含む溶液を尾静脈内に投与した。3日後に脾臓を取り出し、「単クローン抗体実験マニュアル」(講談社サイエンティフィック 1987年出版) に従い、ポリエチレングリコール1500を使用して脾臓細胞をミエローマ細胞P3U1と細胞融合させた。その後、HGFA - PCIを抗

原として、ELISA法でスクリーニングを実施し、34kDa HGFA - PCI複合体及び98kDa HGFA - PCI複合体の両方に特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。

【0048】またHGFAに対するポリクローナル抗体は調製例1で調製した精製34kDa HGFAおよび精製98kDa HGFAを各100 µg混合し、抗原としてウサギ皮下へ2週間間隔で5回投与した。血清中に抗体が産生していることを確認後、100 µgの抗原を脈内に投与し、3日後に抗血清を取得してさらに定法の精製操作により抗HGFAポリクローナル抗体を作成した。次に得られた抗HGFAポリクローナル抗体を「免疫生化学研究法」(1986年出版 日本生化学会編集 東京化学同人出版) 107-112頁に従いペルオキシダーゼ標識することにより標識抗HGFAポリクローナル抗体を調製した。

【0049】

【実施例3】 HGFA - PCI複合体の形成とその測定系の構築

実施例2で作成した抗HGFA - PCI複合体モノクローナル抗体を3 µg/mlの濃度になるように0.1M炭酸 - 重炭酸緩衝液 (pH9.3) に溶解して一次抗体溶液を調製した。一次抗体溶液を96ウェルプレートのウェルに添加し、4 °Cにて一昼夜 (12時間程度以上) おいた。このようにして得られた一次抗体付着プレートより一次抗体溶液を除き、5% BSAを含むPBS(-)をウェルに添加して4 °Cにて一昼夜 (12時間程度) または37 °Cにて2時間以上おくことによりブロッキングを行った。

【0050】次に、200nMの、調製例1で作成した34kDa - HGFAまたは98kDa - HGFAを、種々の濃度の、調製例1で作成したPCIと、100mM NaCl, 2mM CaCl₂および0.05% CHAPSを含む50mM HEPES緩衝液中で37 °Cで2時間反応させた後、先にブロッキングを行ったプレートからブロッキング溶液を除いたウェルに添加し、37 °Cで2時間反応させた。次に0.05% Tween 20を含むPBS(-)液 (以下PBST液と略す) を用いて洗浄を行なった後、実施例2で作成した標識抗HGFAポリクローナル抗体1 µg/mlおよび1%BSAを含むPBS(-)をウェルに添加し、さらに37 °Cで1時間反応させた。再びPBST液で洗浄操作を行った後、0.4mg/mlオルトフェニレンジアミン (OPD, Sigma社P-9029) および0.015-0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸 - リン酸緩衝液 (pH5.0) を添加して室温にて充分反応させ、発色を行なった。この後1 NH₂SO₄溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行ない、HGFA - PCI複合体の定量を行った (図2)。この測定系によりHGFA - PCI複合体の定量が可能であることが確認された。

【0051】

【実施例4】 健常人および肝臓切除患者血漿中におけるHGFA - PCI複合体の測定
健常人の血漿20検体および手術にて肝臓切除を行ない肝再生時にある患者の血漿20検体中に存在するHGFA

A - P C I 複合体を実施例3で構築したHGFA - P C I 複合体測定系を用いて測定した。その結果、患者血漿中に高い濃度のHGFA - P C I 複合体が存在することが解った(図3)。

*よびその測定方法が提供される。また、HGFA - P C I 複合体の測定に基づく臓器障害の検出方法が提供される。

【0052】

【0053】

【配列表】

【発明の効果】本発明によりHGFA - P C I 複合体お*

- <110> 三菱化学株式会社(Mitsubishi Chemical Corporation)
- <120> プロテインCインヒビターと肝細胞増殖因子アクチベーターとの複合体およびその測定方法並びに臓器障害の検出方法
- <130> J05315
- <160> 1
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic peptide
- <400> 1

【図面の簡単な説明】la Lys Thr Lys Gln Leu Arg

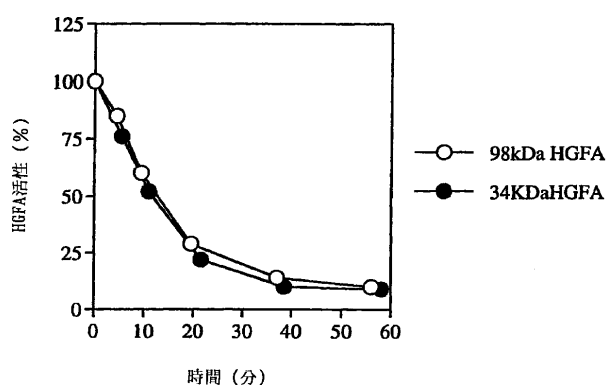
図である。

【図1】 P C I 存在下におけるHGFAの活性変化を示す図である。

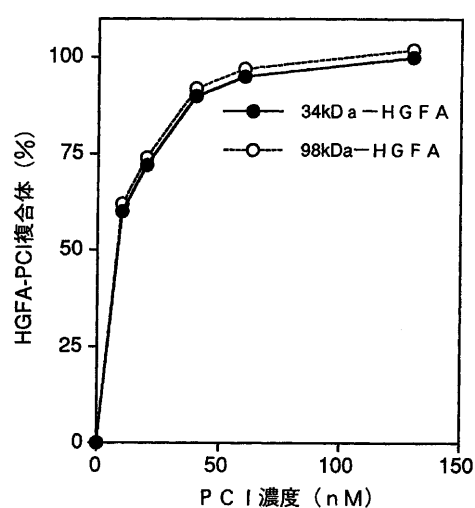
【図3】 健常人および肝臓切除患者の血漿中におけるHGFA - P C I 複合体量を測定した結果を示す図である。

【図2】 HGFA - P C I 複合体の定量の結果を示す

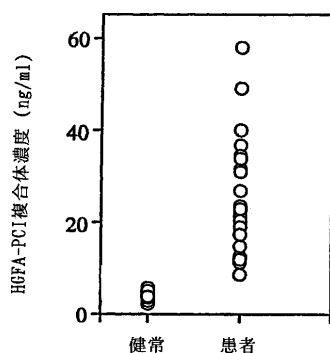
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト' (参考)
C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 19/00	
		C 1 2 N 9/50	
C 1 2 N 9/50		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53			B
		33/577	
		(C 1 2 P 21/08	
//(C 1 2 P 21/08		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 15/00	Z N A A

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03 HA15
 4B050 CC10 LL03 LL10
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41
 CA40 DA86 DA89 EA50 FA20
 FA71 FA72 HA06 HA07

专利名称(译)	蛋白C抑制剂与肝细胞生长因子激活剂的复合物，其测定方法，器官衰竭的检测方法		
公开(公告)号	JP2002000273A	公开(公告)日	2002-01-08
申请号	JP2000187605	申请日	2000-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
[标]发明人	鈴木宏治 仲大地 長池一博		
发明人	鈴木 宏治 仲 大地 長池 一博		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K14/81 C07K16/18 C07K16/38 C07K16/40 C07K19/00 C12N9/50 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	C07K14/47 C07K14/81 C07K16/18 C07K16/38 C07K16/40 C07K19/00 C12N9/50 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B050/CC10 4B050/LL03 4B050/LL10 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/HA06 4H045/HA07		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测量器官损伤状态的方法。测量从患有器官疾病的患者收集的生物样品中的蛋白C抑制剂和肝细胞生长因子活化剂的复合物作为器官疾病状态的指标。

【图 2】

