

(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2003 - 300961**

(P2003 - 300961A)

(43)公開日 平成15年10月21日(2003.10.21)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 D213/65		C 0 7 D213/65	4 C 0 5 5
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S
33/577		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 12数)

(21)出願番号	特願2002 - 109610(P2002 - 109610)	(71)出願人	801000050 財団法人くまもとテクノ産業財団 熊本県上益城郡益城町大字田原2081番地10
(22)出願日	平成14年4月11日(2002.4.11)	(72)発明者	堀内 正公 熊本県熊本市新大江3 - 15 - 5
		(72)発明者	永井 竜児 熊本県熊本市水前寺1 - 31 - 15
		(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外2名)
		Fターム(参考)	4C055 AA04 AA13 BA01 CA02 CA42 DA06 DA16 4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA72 GA26

(54)【発明の名称】 新規ビリジニウム誘導体およびその利用方法

(57)【要約】

【課題】 メイラード反応後期生成物 ( A G E ) に対する抗体がエピトープとして認識する新規化合物を提供する。さらに、該化合物を利用することにより、A G E の生成または蓄積が関与する疾患の検査方法、および該疾患に対する治療薬の薬効評価方法を提供する。

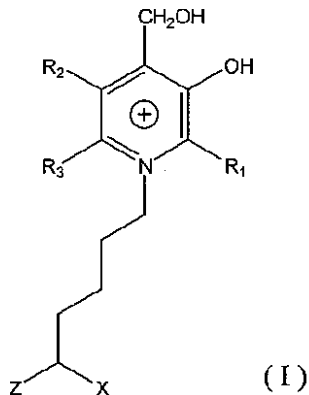
【解決手段】 一般式 ( I ) で表されるビリジニウム誘導体、およびこれを含む抗原に対する抗体を作製する。さらにこの抗体を用いて免疫標識測定法により A G E を検出する。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(I)で表されるピリジニウム誘導体。

## 【化1】



〔式中、R1、R2及びR3は水素または低級アルキル基を表す。Xはアミノ基、または保護基を有するアミノ基、Zはカルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基を表す〕

【請求項2】 前記ピリジニウム誘導体が、3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-1-(5-アミノ-5-カルボキシペンチル)ピリジニウムカチオンである、請求項1記載のピリジニウム誘導体。

【請求項3】 請求項1または2記載のピリジニウム誘導体からなるエピトープ。

【請求項4】 請求項1または2記載のピリジニウム誘導体をエピトープとして含む抗原。

【請求項5】 請求項1または2記載のピリジニウム誘導体をエピトープとして認識する抗体。

【請求項6】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項5記載の抗体。

【請求項7】 請求項5または6記載の抗体を用いてメイラード後期反応生成物(以下、「AGE」という。)を検出する方法。

【請求項8】 AGEがグリコールアルデヒド修飾タンパクのメイラード後期反応生成物である、請求項7記載の方法。

【請求項9】 検体中のAGE量を請求項5または6記載の抗体を用いて検出し、該AGE量に基づいて検体提供者のAGEの生成または蓄積が関与する疾患の病態を検査する方法。

【請求項10】 検体中のAGE量の検出が免疫標識測定法によって行われる、請求項9記載の方法。

【請求項11】 AGEの生成または蓄積が関与する疾患が、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症、および老化に伴う疾患から選ばれる少なくとも一または二以上の疾患である、請求項9または10記載の方法。

【請求項12】 検出するAGEがグリコールアルデヒド修飾タンパクのメイラード後期反応生成物である、請

2

求項9~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 被験物質の存在下および非存在下における、検体中のAGE量を請求項5または6記載の抗体を用いて検出し、比較することにより、該被験物質のAGEの生成または蓄積が関与する疾患の治療薬としての薬効を評価する方法。

【請求項14】 AGEの生成または蓄積が関与する疾患が、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症、および老化に伴う疾患から選ばれる少なくとも一または二以上の疾患である、請求項13記載の方法。

【請求項15】 以下の1)~4)から選ばれる少なくとも一つ以上を含む、AGE検出用キット。

1) 請求項1もしくは2記載のピリジニウム誘導体を含む抗原、またはその標識物

2) 前項1)記載の抗原またはその標識物を固定した固相化試薬

3) 請求項5もしくは6記載の抗体、またはその標識物

4) 前項3)記載の抗体またはその標識物を固定した固相化試薬

## 20 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、メイラード後期生成物(Advanced Glycation End Products;以下、「AGE」と略す)に対する抗体がエピトープとして認識する新規化合物に関する。さらに、本発明は該化合物を利用したAGEの生成または蓄積が関与する疾患の検査方法、および該疾患に対する治療薬の薬効評価方法に関する。

## 【0002】

30 【従来の技術】タンパク質への非酵素的糖付加反応はメイラード反応と呼ばれる。この反応においてはグルコースに代表される還元糖のアルデヒド基がタンパク質のN末端アミノ基や、リジン残基の $\epsilon$ -アミノ基と反応して Schiff塩基を形成し、アマドリ転位産物が生成する。これらの転移産物は、酸化・脱水・縮合等の複雑な反応を経て、褐色・蛍光・架橋形成等を特徴とするメイラード後期生成物(以下、「AGE」という。)に変化する。

40 【0003】最近、AGEがAGE受容体を經由して様々な細胞反応を誘発することが、糖尿病合併症の成因として注目されている。また、メイラード反応は健康人でも多少見られる現象であるが、血管系の障害、腎症、神経障害、網膜症および白内障等の糖尿病合併症、動脈硬化、透析性アミロイドーシス、アルツハイマー病、あるいは加齢によって促進されることがわかっている。従って、早期にAGEの生成および蓄積を把握することは、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症ならびに老化に伴う疾患等の予防および治療に対して極めて有効であると考えられている。

【0004】AGE量の測定は、以前はAGEの蛍光強

度により測定されていたが、最近には主に抗メイラード反応後期生成物抗体（以下、「抗AGE抗体」という。）を用いた抗原抗体反応により測定されている。ところで、AGEの構造としては、ピラリン、ペントシジン、クロスリン、イミダゾロン、およびN-カルボキシメチルリジン（CML）、N-カルボキシエチルリジン（CEL）等、17以上の構造が報告されているが、これら以外にも未知の構造が存在していると考えられている。そして、こうしたAGEの構造をエピトープとして作製した抗体を利用することにより、糖尿病等の疾患の検査方法や該疾患治療薬の薬効評価方法が提案されている（特開2001-059843号公報、特開2000-321273号公報等）。しかし、これまでに提案された検査方法では、測定感度、特異性、再現性において、必ずしも満足の行く結果が得られていなかった。

#### 【0005】

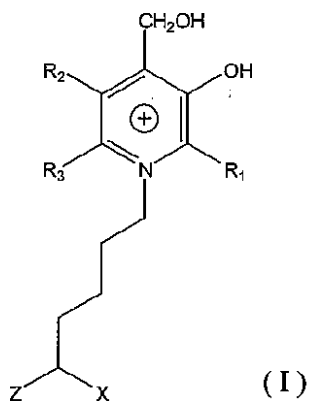
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、抗AGE抗体がエピトープとして認識する新規化合物を見出し、該化合物を利用して特異性の高い新規抗AGE抗体を提供することにある。本発明の他の目的は、前記化合物を臨床マーカーとする、AGEの生成または蓄積が関与する疾患の改善された検査方法、および該疾患に対する治療薬の新たな薬効評価方法を提供することにある。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、アミノ酸としてリジンを、アミノ酸を修飾する糖系化合物をグリコールアルデヒドとするグリコールアルデヒド-リジン化合物をもとに人為的にAGEを作製した。次いで、このグリコールアルデヒド-リジン化合物のAGEに含まれる構造のうち、抗AGE抗体がエピトープとして認識する新規構造：ピリジニウム誘導体を同定した。そして、このピリジニウム誘導体を利用すれば、AGE生成量を従来よりも高感度で検出できることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の(1)～(15)に関する。

【0007】(1) 下記一般式(I)で表されるピリジニウム誘導体。

#### 【化2】



\* [式中、R1、R2及びR3は水素または低級アルキル基を表す。Xはアミノ基、または保護基を有するアミノ基、Zはカルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、アリーロキシカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基を表す]

【0008】(2) 前記ピリジニウム誘導体が、3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-1-(5-アミノ-5-カルボキシペンチル)ピリジニウムカチオンであることを特徴とする、上記(1)記載のピリジニウム誘導体。

【0009】(3) 上記(1)または(2)記載のピリジニウム誘導体からなるエピトープ。

(4) 上記(1)または(2)記載のピリジニウム誘導体をエピトープとして含む抗原。

【0010】(5) 上記(1)または(2)記載のピリジニウム誘導体をエピトープとして認識する抗体。

(6) 前記抗体がモノクローナル抗体である、上記(5)記載の抗体。

(7) 上記(5)または(6)記載の抗体を用いてメイラード後期反応生成物（以下、「AGE」という。）を検出する方法。

【0011】(8) AGEがグリコールアルデヒド修飾タンパクのメイラード反応後期生成物である、上記(7)記載の方法。

(9) 検体中のAGE量を上記(5)または(6)記載の抗体を用いて検出し、該AGE量に基づいて検体提供者のAGEの生成または蓄積が関与する疾患の病態を検査する方法。

【0012】(10) 検体中のAGE量の検出が免疫標識測定法によって行われる、上記(9)記載の方法。

(11) AGEの生成または蓄積が関与する疾患が、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症、および老化に伴う疾患から選ばれる少なくとも一または二以上の疾患である、上記(9)または(10)記載の方法。

【0013】(12) 検出するAGEがグリコールアルデヒド修飾タンパクのメイラード反応後期生成物である、上記(9)～(11)のいずれかが1に記載の方法。

(13) 被験物質の存在下および非存在下における、検体中のAGE量を上記(5)または(6)記載の抗体を用いて検出し、比較することにより、該被験物質のAGEの生成または蓄積が関与する疾患の治療薬としての薬効を評価する方法。

【0014】(14) AGEの生成または蓄積が関与する疾患が、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症、および老化に伴う疾患から選ばれる少なくとも一または二以上の疾患である、上記(13)記載の方法。

(15) 以下の(1)～(4)から選ばれる少なくとも一つ以上を含む、AGE検出用キット。

【0015】1) 上記(1)もしくは(2)記載のピリジニウム誘導体を含む抗原、またはその標識物

2) 前項1)記載の抗原またはその標識物を固定した固相化試料

3) 上記(5)または(6)記載の抗体、またはその標識物

4) 前項3)記載の抗体またはその標識物を固定した固相化試料

【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。

#### 1. メイラード後期反応生成物(AGE)

本発明において、「AGE」とは、アミノ化合物とカルボニル化合物とのメイラード反応(タンパク質への非酵素的糖付加反応)によって生成する構造体を意味する。すなわち、カルボニル化合物中のアルデヒド基がアミノ化合物中のアミノ基と反応してアマドリ転位産物を生成し、さらに酸化・脱水・縮合等の複雑な反応を経て、褐色・蛍光・架橋形成等を特徴とするAGEを生成する。

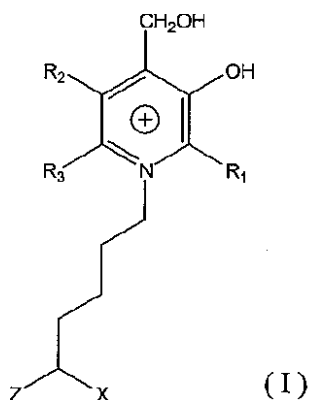
【0017】前記アミノ化合物は特に限定されず、例えば、アルブミン、グロブリン、ヘモグロビン等の単純タンパク質、コラーゲン等の糖タンパク質、リンタンパク質、リポタンパク質、金属タンパク質等の複合タンパク質、またはこれらの蛋白質の分解物であるペプチド、もしくはこれらを構成するアミノ酸等を使用することができる。

【0018】また、前記カルボニル化合物は特に限定されず、例えば、グルコース等のアルドース、フルクトース等のケトース、デオキシグルコース等のデオキシ糖、グルコサミン等のアミノ糖、グルクロン酸等のウロン酸、オリゴ糖等の糖類、グリコールアルデヒド、グリオキサール等を利用できる。

#### 【0019】2. 本発明のピリジニウム誘導体

本発明にかかる化合物は、下記一般式(I)で表されるピリジニウム誘導体である。

【化3】



[式中、R1、R2およびR3は水素または低級アルキル基を表す。Xはアミノ基、または保護基を有するアミノ基、Zはカルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、アリーールオキシカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基を表す]前記化合物において、「低級アルキル

基」とは炭素数1~6、好ましくは炭素数1~3の直鎖状または分岐状の炭化水素をいう。該低級アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1,2-ジメチルプロピル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、1-メチルペンチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、1,1-ジメチルブチル基、1,2-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基、2,3-ジメチルブチル基、3,3-ジメチルブチル基、1-エチルブチル基、2-エチルブチル基、1,1,2-トリメチルプロピル基、1,2,2-トリメチルプロピル基、1-エチル-1メチルプロピル基、1-エチル-2-メチルプロピル基等を挙げることができる。

【0020】前記化合物において、「保護基を有するアミノ基」とは、例えば、アミノ基にプロピオン酸、カプロン酸、カプリル酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、安息香酸、サリチル酸等の弱酸を結合させることにより保護したアミノ基を意味する。

【0021】前記化合物において、「低級アルコキシカルボニル基」とは、炭素数1~4の低級アルコールでエステル化されているカルボキシル基を意味する。該低級アルコールとしては、例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、tert-ブタノール等が挙げられる。

【0022】前記化合物において、「アリーールオキシカルボニル基」とは、フェノール類でエステル化されているカルボキシル基を意味する。該フェノール類としては、例えば、フェノール、レゾルシン等を挙げることができる。また、アルキルオキシカルボニル基とは、アルキル置換フェノールでエステル化されているカルボキシル基を意味し、該アルキル置換フェノール類としては、例えば、キシレノール、クミルアルコール、ベンジルアルコール等が挙げられる。

【0023】本発明では、前記一般式(I)で表されるピリジニウム誘導体の好ましい例として、3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-1-(5-アミノ-5-カルボキシペンチル)ピリジニウムカチオンを挙げることができる。

#### 【0024】3. 本発明のピリジニウム誘導体の製造方法

3.1 グリコールアルデヒド修飾リジンのAGE合成  
本発明のピリジニウム誘導体は、天然の、あるいは人為的に合成したAGEの構造に基づき、例えば以下のようにして製造することができる。まず、カルボキシル基をベンジルアルコールでブロックしたリジン(以下「Cbz-Lys」という。)をグリコールアルデヒドととも

にリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、この溶液を無菌状態にて反応させる。反応は、例えば80～120において、1～60分、好ましくは2～30分、特に好ましくは3～10分間行う。この方法は、グリコールアルデヒド修飾リジンのAGE（以下「GA-Cbz-Lys」という。）を一挙に製造することができるため好適である。

### 【0025】3.2 ピリジニウム誘導体の単離

上記方法で得たGA-Cbz-Lysは、適当な緩衝液、例えばアセトニトリルの濃度を例えば2%から70%に直線的に変化させた緩衝液を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、各画分に分離することができる。溶出された各画分は好ましくは270nmの吸収と蛍光（ $\text{ex/em} = 326 / 406 \text{ nm}$ ）の両方でモニターし、さらにグリコールアルデヒド修飾蛋白モノクローナル抗体による競合的ELISA分析により、3つの画分に分離することができる。

【0026】次に、上記3つの画分のうち最初に流出した画分は、更に逆相カラムを用いたHPLCにかけ、例えば、0.3%トリフロロ酢酸（TFA）-10%アセトニトリル含有液から0.3%TFA 50%アセトニトリル含有液まで濃度を直線的に変化させた溶出液を用いて溶出させる。溶出された各画分は好ましくは270nmの吸収と蛍光（ $\text{ex/em} = 326 / 406 \text{ nm}$ ）の両方でモニターし、さらにグリコールアルデヒド修飾蛋白モノクローナル抗体による競合的ELISA分析にかけて分画することができる。

【0027】上記方法で得られた画分のうちグリコールアルデヒド修飾蛋白モノクローナル抗体反応画分を、更にHPLCにかけ、例えば0.3%テトラヒドロフラン入り27%アセトニトリル溶媒を用いて溶出する。溶出された各画分は、好ましくは270nmの吸収と蛍光（ $\text{ex/em} = 326 / 406 \text{ nm}$ ）の両方でモニターし、さらにグリコールアルデヒド修飾蛋白モノクローナル抗体による競合的ELISA分析にかけ、免疫反応性を有しかつアルカリ性の流出画分のうち、中間部の画分を取り出す。

【0028】次いで、この画分のカルボキシベンゾエート基をカルボキシル基に変えるために、当該画分に、例えば30%ブロム酸/酢酸を反応させる。こうして得られた画分をピリジニウム誘導体含有画分として、次の同定工程に供する。

### 【0029】3.3 ピリジニウム誘導体の同定

前項で得られた、ピリジニウム誘導体を含有すると予測される画分を $^1\text{H-NMR}$ とESI-MSにかけ、目的とするピリジニウム誘導体の構造を同定する。本発明の好適な態様において、グリコールアルデヒド修飾リジンのAGEより同定されたピリジニウム誘導体は、3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-1-(5-アミノ-5-カルボキシペンチル)ピリジニウムカチオンであった（図1-A）。

### 【0030】4. 本発明のピリジニウム誘導体をエピトープとして認識する抗体

本発明の抗体は、本発明のピリジニウム誘導体をエピトープとして認識する抗体である。該抗体には、本発明のピリジニウム誘導体に対する抗体のほか、該ピリジニウム誘導体を1つのエピトープとする蛋白質のAGE（例えば、グリコールアルデヒドをタンパク質に反応させて得たAGE）に対する抗体も含まれる。本発明の抗体は、ポリクローナルであっても、モノクローナルであってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【0031】なお、本発明において、「抗体」とは、抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生されるタンパク質であって、抗原と特異的に結合する活性を有するものを意味する。また、「エピトープ」とは、抗原の中で生体の免疫反応を促し、産生された抗体と特異的に結合する部分を意味する。

### 【0032】5. 本発明の抗体の製造方法

本発明の抗体は、例えば、マウス、ラット、家兎その他適当な動物に本発明のピリジニウム誘導体、あるいはピリジニウム誘導体を含むAGEを常法に従って投与し、感作された動物の脾臓リンパ球より調製することができる。なお、使用する動物は特に限定されず、必要とされる脾臓リンパ球の数に応じて適宜選択すればよい。

【0033】5.1 モノクローナル抗体の製造方法  
抗ピリジニウム誘導体モノクローナル抗体は、公知のハイブリドーマ法により製造することができる。すなわち、アジュバント中に本発明のピリジニウム誘導体、またはピリジニウム誘導体を含むAGE（例えば、グリコールアルデヒド修飾タンパク質のAGE等、本発明のエピトープで修飾されたタンパク質）を懸濁し、該懸濁液を、例えば、マウスの皮下または真皮内に投与する。

【0034】用いられるアジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート（TDM）、リポ多糖（LPS）、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、フロイントの完全アジュバント（FCA）とフロイントの不完全アジュバント（FIA）とを組み合わせ使用することが好ましい。

【0035】マウスは前記初回免疫後、更に、追加免疫を数回行い、適当な日数を経過した後に部分採血を行い、抗体価を測定する。抗体価は、例えばELISA法等、公知の方法により測定することができる。

【0036】ついで、感作の終了した動物から脾臓を摘出し、得られた脾臓細胞を常法に従いミエローマ細胞と融合させて抗体産生ハイブリドーマを作製する。例えば、マウスの場合であれば、頸椎脱臼によって屠殺し、脾臓を摘出し、摘出した脾臓を、例えば、ハンクスの平衡塩溶液（HBSS）中に置き、ピンセットで細胞を押

し出して脾臓リンパ球を得る。得られた脾臓リンパ球は、トリパンブルー等の染色液で染めてパイアブルカウントし、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマとする。

【0037】用いられるミエローマ細胞は特に限定されず、公知のものを使用できる。例えば、マウスの細胞であれば、P3-X63-Ag8-01(P3U1)、P3-NS1-1-Ag4-1(NS4)、SP2/0-Ag14(SP2)等を挙げることができる。ミエローマ細胞の選択にあたっては、抗体産生細胞との適合性を考慮する必要がある。

【0038】細胞の融合方法は、センダイウイルス法、ポリエチレングリコール法、プロトプラスト法等、当該分野で公知の方法を任意に選択して用いることができるが、特にポリエチレングリコール法が、細胞毒性が比較的少なく、融合操作も簡単であるという理由から好ましい。なお、抗体を大量に作り出したい場合は、ビニルピリジン誘導体で刺激した抗体産生細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマを用いることが好ましい。

【0039】得られたハイブリドーマは、常法に従い、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン含有培地)中で適当な期間培養し、ハイブリドーマの選択を行う。次いで、目的とする抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った後、該ハイブリドーマのクローニングを行う。

【0040】スクリーニング法としては、公知の抗体検出方法を用いることができ、例えば、酵素イムノアッセイ(以下「ELISA」という)法、ラジオイムノアッセイ(以下「RIA」という)法、ブランク法、凝集反応法等を用いることができる。また、クローニング法としては、当該分野で公知の方法を用いることができ、例えば、限界希釈法、軟寒天法およびFACS法等を用いることができる。

【0041】得られたハイブリドーマは、適当な培養液中で培養するか、あるいはハイブリドーマと適合性のある、例えばマウス腹腔内に投与する。こうして得られる培養液中または腹水中から、塩析、イオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィ等により、所望のモノクローナル抗体を単離精製することができる。

【0042】5.2 ポリクローナル抗体の製造方法  
抗ピリジニウム誘導体ポリクローナル抗体は、公知の方法に従って作製することができる。例えば、アジュバント中に本発明のピリジニウム誘導体、またはピリジニウム誘導体を含むAGE(例えば、グリコールアルデヒド修飾タンパク質のAGE等、本発明のエピトープで修飾されたタンパク質)を懸濁し、該懸濁液を、例えば、ウサギの皮下または真皮内に投与する。

【0043】用いられるアジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバ

ント、BCG、トレハロースダイマイコレート(TDM)、リポ多糖(LPS)、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、フロイントの完全アジュバント(FCA)とフロイントの不完全アジュバント(FIA)とを組み合わせ使用することが好ましい。

【0044】ウサギは前記初回免疫後、更に、追加免疫を数回行い、適当な日数を経過した後に血清を採取する。この血清を、適当なアフィニティークラムにかけ、目的とする抗体以外の蛋白あるいは抗体を分離除去し、目的とするポリクローナル抗体を単離する。上記のようにして得られるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、AGEに存在するピリジニウム誘導体をエピトープとして特異的に認識することができる。

【0045】6. 本発明の抗体によるAGEの検出方法  
本発明はまた、本発明の抗体を利用したAGEの検出方法を提供する。対象とするAGEは特に限定されず、例えば、カルモジュリン、ヘモグロビン(A1a1、A1a2、A1c、AO、S)、水晶体のクリスタリン、筋繊維タンパク質、チューブリン等の細胞内タンパク質、アルブミン、アンチトロンピンIII、フェリチン、リポタンパク質、免疫グロブリンG(IgG)等の血漿タンパク質、インスリン、甲状腺ホルモン等のホルモン、皮膚、腱、大動脈、糸球体基底膜等のコラーゲン、毛髪、爪等の角質層、尿中ペプチド、骨中のオステオカルシン、アルコールデヒドロゲナーゼ、カテプシンB、リゾチーム等の酵素、赤血球グルコーストランスポーター、赤血球スペクトリン、赤血球膜タンパク質等の細胞膜タンパク質等の、生体タンパク質よりメイラード反応によって生じるAGEが挙げられる。このうち、血漿タンパク質は取り扱いが容易なため、検出対象として好ましい。

【0046】本発明の検出方法は、本発明の抗体を抗原抗体反応によってAGEに結合させ、結合した抗体量により目的とするAGEあるいはAGE量を検出するものである。抗体量の検出は、公知の免疫学的測定法に従って行えばよく、例えば、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比濁法、免疫比濁法等を用いることができる。特に標識免疫測定法が簡便かつ高感度という点で好ましい。標識免疫測定法では、検体中の抗体価は標識抗体を用いて直接検出した標識量で表すほか、既知濃度あるいは既知抗体価の抗体を標準液として用いて相対的に表してもよい。すなわち、標準液と検体を同測定系にて同時に測定し、標準液の値を基準にして検体中の抗体価を相対的に表すことができる。

【0047】前記標識免疫測定法としては、公知の測定法、例えば、ELISA法、RIA法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法等を任意に利用することができる。用いる標識物質は、上記測定法に応じて、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、および化学発光化合物等を適

宜選択すればよい。前記酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等を挙げることができる。上記標識物質はアビジン・ビオチン複合体を用いることにより、標識物質の検出感度を向上させることも可能である。また、放射性同位体としては、主に<sup>125</sup>Iが、蛍光化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)やテトラメチルローダミンイソチオシアネート(RITC)等が挙げられる。化学発光化合物としては、ロフィン、ルミノール、ルシゲニン等が挙げられる。上記標識物質による抗体の標識は、常法に従って行うことができる。以下、標識抗体を用いた標識免疫測定法について説明する。

#### 【0048】6.1 標識免疫測定法

標識免疫測定法による、本発明の抗体を検出する測定系は、公知の非競合反応系あるいは競合反応系を用いて構築することができる。非競合反応系においては、固相が必要である(固相法)。競合反応系においては、必ずしも固相を必要としない(液相法)が、固相を用いた方が、測定操作が簡便になるため好ましい。固相の材質としては、例えば、ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セルロース等が挙げられ、固相の形状としては、球状、ウェル状、チューブ状、シート状等が挙げられるが、これらに限定されず、標識免疫測定法に用いられる公知のものを任意に用いることができる。

【0049】測定操作は、非競合反応系であれば、例えば、検出すべき抗原(AGE)を固相化した後、本発明の抗体と反応させ、次いであらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体(二次抗体)を加えて固相化した抗原と反応している抗体と反応させる。この二次抗体の標識により、抗原に結合した抗体量を検出することができる。検出された標識量は、検出すべき抗原(AGE)量と正相関するので、これによりAGE量を求めることができる。

【0050】また、競合反応系では、一定量の抗体に対して、検出すべき抗原と一定量の別の抗原とを競合的に結合させる。例えば、検出すべき抗原(AGE)を固相化した後に、あらかじめ別の抗原を添加し反応させた本発明の抗体を反応させる。次に、固相化された抗原と反応した本発明の抗体を、あらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体(二次抗体)と反応させ、標識物質によって本発明の抗体を検出することができる。検出される標識量は、添加された別の抗原量と逆相関する。そのほかの競合反応系としては、本発明の抗体を固相化して、これに検体と反応させた後、あらかじめ標識しておいた別の抗原を反応させる。検出される標識量は、抗体と結合したAGE量と逆相関する。

【0051】前記した抗原または抗体の固相化法としては、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、架橋法等、公知の方法を使用できる。特に、物理的吸着法が簡

便という点で好ましい。また、抗免疫グロブリン抗体(二次抗体)としては、例えば、抗IgG抗体、抗IgM抗体等を用いることができる。これらの抗体は、抗体分子をそのまま使用してもよいし、あるいは抗体を酵素処理して得られる抗原結合部位を含む抗体フラグメントであるFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>を使用してもよい。さらに、標識した抗免疫グロブリン抗体の代わりに、抗体分子に特異的な親和性をもつ物質、例えばIgGに特異的な親和性をもつプロテインA等を標識して使用してもよい。

#### 【0052】6.2 ELISA法

前記標識免疫測定法の好適な例として、酵素を標識とした免疫測定法、ELISA法を挙げることができる。ELISA法は、例えば、96穴プレートに検体またはその希釈液を入れて、4～室温で一晩、または37で1～3時間程度静置して検出すべきAGEを吸着させて固相化する。次に、本発明の抗体を反応させ、次いであらかじめ酵素を結合させた抗免疫グロブリン抗体(二次抗体)を反応させる。最後に酵素と反応する適当な発色性の基質(例えば、酵素がホスファターゼならp-ニトロフェニルリン酸等)を加え、この発色によって抗体を検出する。

#### 【0053】7. AGEの生成または蓄積が関与する疾患の検査方法

生体タンパク質の糖化、さらにこの糖化がメイラード反応によって進行した結果生成されるAGEは、糖尿病等の生活習慣や老化の成因に強く関連していることが明らかにされつつある。例えば、AGE産生は、血管系の障害、腎症、神経障害、網膜症および白内障等の糖尿病合併症、動脈硬化、透析性アミロイドーシス、アルツハイマー病、あるいは加齢によって促進される。

【0054】従って、AGEの生成および蓄積量を把握すれば、AGEの生成または蓄積が関与する疾患の病態(発症や進行)を予測することができる。すなわち、本発明は、AGEの生成または蓄積が関与する疾患の病態を検査する方法を提供する。

【0055】前記AGEの生成または蓄積が関与する疾患としては、例えば、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症ならびに老化に伴う疾患を挙げることができる。ここで、「糖尿病性合併症」とは、糖尿病に伴って発生する症状・疾患を意味し、例えば、末梢神経障害や自律神経障害等の神経障害、網膜症、白内障、腎症、脳梗塞、心筋梗塞等を挙げることができる。また、「老化に伴う疾患」とは、その成因が老化と密接に関連する疾患を意味し、例えば、心筋梗塞等の冠動脈性疾患、高血圧等の末梢循環障害、脳梗塞、クモ膜下出血および慢性硬膜下血腫等の脳血管障害、アテローム性動脈硬化症、慢性関節リウマチ、骨関節症、関節周囲硬直症、関節硬化症、老人性骨粗鬆症、老人性白内障、アルツハイマー病、白内障、緑内障等を挙げることができる。

【0056】本発明の検査方法は、具体的には以下の工

程を含む。

1) AGEを含む検体に本発明の抗体を反応させ、該検体中のAGE量を検出する工程

2) 上記AGE量を健常人と検体提供者との間で比較することにより、該検体提供者のAGEの生成または蓄積が関与する疾患の病態を評価する工程

本発明の検査方法において、「検体」とは検出対象であるAGEを含む、生体から単離された試料であって、例えば、ヒトを含む動物の体液、尿、組織、血漿および血清等の血液成分、ヘモグロビン、アルブミン、神経ミエリン、眼球クリスタリン、皮膚、血管壁、腎臓の糸球体基底膜等の結合組織や該組織に含まれるコラーゲンやエラスチン等が挙げられる。特に、血液、尿等の液体成分が好ましい。また、検出対象であるAGEは特に限定されないが、グリコールアルデヒド修飾タンパクのメイラード反応後期生成物が好ましい。

【0057】本発明の検査方法において、検体中のAGE量は本発明の抗体を用いて検出する。前記検出は、公知の免疫学的測定法に従って行えばよく、例えば、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比濁法、免疫比濁法を用いることができる。特に、標識免疫測定法は検出感度が高く、また多数の検体を自動的に測定できる手法が確立されているという点で、病院あるいは研究機関等での使用に好適である。標識免疫測定法の詳細については、6.に記載したとおりである。

【0058】本発明の検査方法においては、検体中のAGE量を、健常人または対象疾患の罹患患者における平均値と比較することにより、該検体提供者の疾患の病態を診断することができる。あるいは当該疾患の各病期、例えば糖尿病性腎症の場合、腎症前期、早期腎症、顕性腎症期、腎不全期および透析療法期におけるAGE量の平均値と比較することで、当該疾患の病期（進行度）を診断することができる。

【0059】8. AGEの生成または蓄積が関与する疾患の治療薬の薬効評価方法

本発明はまた、AGEの生成または蓄積が関与する疾患の治療薬の薬効評価方法を提供する。本発明の薬効評価方法は、被験物質の存在下および非存在下における、各検体中のAGE量を本発明の抗体を用いて検出し、各AGE量を比較することにより、該被験物質のAGEの生成または蓄積が関与する疾患の治療薬としての薬効を評価するものである。ここで、「被験物質の存在下」とは、in vivoの評価系であれば、ヒトを含む動物等に該被験物質を投与した場合を意味し、in vitroの評価系であれば、検体に被験物質を添加するなどして作用させた場合を意味する。また、被験物質の非存在下とは、そのような該被験物質の投与や添加をしない場合を意味する。

【0060】9. AGE検出用キット

本発明はまた、AGE検出用キットを提供する。該キッ

トは、本発明の検査方法や本発明の薬効評価方法に使用することができる。本発明のキットは以下の1)~4)から選ばれる少なくとも一つ以上を含む。

1) 本発明のピリジニウム誘導体を含む抗原、またはその標識物

2) 前項1)記載の抗原またはその標識物を固定した固相化試薬

3) 本発明の抗体またはその標識物

4) 前項3)記載の抗体またはその標識物を固定した固相化試薬

ここで、抗原または抗体の標識物とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、または化学発光化合物によって標識されたものを意味し、その具体例は6.に記載したとおりである。

【0061】また前記抗原または抗体、もしくはこれらの標識物を固定する固相の材質としては、ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セルロース等が挙げられ、固相の形状としては、球状、ウェル状、チューブ状、シート状等が挙げられるが、これらに限定されない。該固相化試薬の代わりに、固相と固相化に必要な固相化試薬を添付したものでよい。固相化試薬として、例えば物理的吸着による固相化の場合は、50mM炭酸塩緩衝液(pH 9.6)、10 mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5、100mM塩化ナトリウム含有)、PBS等のコーティング液と、さらに必要に応じてコーティング液に0.5%のゼラチン等を含有させたブロッキング液が挙げられる。

【0062】また、前記抗原または抗体は、PBS等に溶解させた状態、あるいはゲルに結合させた状態（以下、「吸収用ゲル」と略す）であってもよい。前記吸収用ゲルはさらに適量を、バッチ法による吸収処理用に0.5~2 ml程度のマイクロ遠沈チューブに予めパッケージングされた状態であってもよく、あるいはカラム法による吸収処理用にカラム容量が0.1~5 mlのミニカラムに予め充填された状態であってもよい。

【0063】本発明のキットは、上記した構成要素のほか、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質（発色性基質等）、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釈液等を含んでいてもよい。前記検体用希釈液としては、例えばPBS（生理的リン酸緩衝液、pH 7.4）、137mM塩化ナトリウムおよび3mM塩化カリウムを含むpH7.4かつ20mMのトリス-塩酸緩衝液（以下、「TBS」と略す）、0.05%Tween20、0.1~1%のBSAを含有させたPBS、あるいはTBS等を挙げるることができる。該検体用希釈液は、検体希釈以外、例えば抗体の希釈等に用いてもよい。

【0064】

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

実施例1：ピリジニウム誘導体の作製

1. グリコールアルデヒド修飾タンパク質AGEの生成カルボニル基をベンジルアルコールでブロックしたリジン(Cbz-Lys: 100mM)を0.5Mのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中で50mMのグリコールアルデヒド(GA)と100 で5分間インキュベートし、(GA-Cbz-Lys)を得た。

【0065】2. ピリジニウム誘導体の単離

(第1工程)得られたGA-Cbz-Lysを高圧薄層クロマトグラフ(日立(株)製、ラクロムシステム、ポンプ、L-7100:蛍光検出器、L-7485;オートサンプラー、L-7200;カラム オープン、L-7300、以下「HPLC」という。)を準備して、GA-Cbz-Lysの反応混合物を、逆相カラム(マイトシルRP-18 GP 250x20mm:関東化学)に注入し(0.1mlづつ)、2%アセトニトリル溶液中に平衡させた。そして2~70%アセトニトリルを0から55分間かけて流下し、その後70%アセトニトリルを55~110分流下した。

【0066】流出物を蛍光(ex/em=326/406nm)でモニターして3つの画分(画分1:17~35分、画分2:41~61分、画分3:64~98分)に分けた。全ての分析は40 で流速5ml/分で行った。この分画は30回繰り返した。残留分は2mlの水で再構成させた。各画分は一定量づつ、実施例2記載のグリコールアルデヒド修飾蛋白モノクローナル抗体(以下、「GA5」という。)による競合的ELISA分析にかけた。

【0067】(第2工程)第1工程で得られた画分1(5mg)を更に逆相カラム(イナートシルODS-3V、250x4.6mm、GL科学製)を用いたHPLC(ジャスコ社製)により0.3%トリフロロ酢酸(TFA)-10%アセトニトリル含有液から0.3%トリフロロ酢酸(TFA)50%アセトニトリル含有液にまで濃度を直線的に変化させた溶出液により40分かけて順次溶出させた。0.3%トリフロロ酢酸(TFA)50%アセトニトリル含有液を40~50分かけて流速0.8ml/min、25 で溶出させた。溶出液を270nmの吸収と蛍光(ex/em=326/406nm)の両方でモニターし、時間により25画分に分けた。この分画を5回繰り返した。得られた残渣を500μlのH<sub>2</sub>Oでもとに戻し、各画分の分別物(100ml)はGA5による競合的ELISAにかけた。

【0068】(第3工程)第2工程で得られた免疫反応画分(画分11~13、各々400μl)を混合し、逆相カラム(イナートシルODS-3V、250x4.6mm、GL科学製)が取り付けられたHPLCを用いて、0.3%テトラヒドロフラン入り27%アセトニトリルで流速0.8ml/min、25 で溶出させた。溶出液を270nmの吸収と蛍光(ex/em=326/406nm)の両方でモニターし、時間により8画分に分けた。この分画を5回繰り返した。得られた残渣を1mlのH<sub>2</sub>Oでもとに戻

し、次いで競合的ELISAによる免疫反応にかけた。

【0069】3. 単離物質の構造解析

1) 画分5に含まれる化合物

上記方法で得た画分5を<sup>1</sup>H-NMRとESI-MSにより同定した。結果を以下に記載する。

<sup>1</sup>H-NMR: 1.18-1.38(2H, m)、1.55-1.69(1H, m)、1.69-1.95(3H, m) 4.04(1H, dd, J=4.6, 9.1 Hz)、4.27-4.42(2H, m)、4.72(1H, s)、4.98(1H, d, J=12.5 Hz)、7.21-7.36(5H, m)、7.80(1H, d, J=6.0 Hz)、8.10(1H, s)、8.19(1H, d, J=6.0 Hz)

ESI-MS: m/z389 [M+H]<sup>+</sup>M

この結果より、画分5はCbz基以外の芳香族環を含む単一の化合物を含んでいることが示唆された。

【0070】2) GA5中のエピトープ構造

次に、画分5を30%ブロム酸/酢酸で処理した化合物(以下「GA5エピトープ」という)の構造を<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、ESI-MSにより同定した。結果を以下に記す。

<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O): 1.31 | 1.42(1H, m)、1.42 | 1.53(1H, m)、1.84 | 1.96(2H, m)、1.96 | 2.05(2H, m)、3.94(1H, t, J=6.3 Hz)、4.47(2H, t, J=7.3 Hz)、4.8(2H, s)、7.89(1H, d, J=6 Hz)、8.20(1H, d, J=1.0 Hz)、8.30(1H, dd, J=1.0, 6.1 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR(D<sub>2</sub>O): 21.0, 29.3, 29.8, 53.1, 58.0, 60.7, 124.7, 129.9, 136.1, 147.7, 153.3, 172.7

ESI-MS: m/z255 [M+H]<sup>+</sup>

表1にプロテクトされないGA5エピトープからの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルと<sup>13</sup>C-NMRスペクトルのシグナルを示す。

【0071】

【表1】

GA5エピトープの<sup>13</sup>C-NMR分析結果

C#	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	
	13C	ppm	
1'	60.7	4.47	T(7.3)
2'	29.8	1.96-2.05	2H,m
3'	21.0	1.31-1.53	2H,m
4'	29.3	1.84-1.96	2H,m
5'	53.1	3.94	T(6.3)
6'	172.7	-	-
2	129.9	8.2	1H,d(1.0)
3	153.3	-	-
4	147.7	-	-
5	124.7	7.89	1H,d(6.1)
6	136.1	5.12	1H,dd(1.0,6.1)
4-CH <sub>2</sub> OH	58.0	4.81	2H,s

【0072】上記のとおり、ESI-MSのm/z255にピークを示し、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルが炭素数12をそれぞれ示すことから、GA5エピトープはカチオン実験式C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>を割り当てた。また、GA5エピトープではリジンの一部分のプロトンと炭素が存在するにもかかわらず、<sup>1</sup>H-NMRのメチレンプロトンの下領域シフトが観察されたこと(4.47ppm, 2H)より、リジンの一部の窒素が芳香族ヘテロサイクルを構成することが示唆された。プロテクトを解除されたGA5のエピトープの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは芳香族炭素領域を囲む5つの炭素の存在を示した。それ故、この化合物の芳香族環はピリジンカチオンであることが示唆された。

【0073】次に、HMQC、HMBC及びnOe実験の結果に基づき、プロトンと炭素の割当を行った。HMBC試験では、リジン構造の位置のプロトンと芳香族炭素間のクロスピークが観察された。(H1'-C2、H1'-C6、H2-C1'、H6-C1')。この結果はピリジウム核においてC2とC6とがN原子に隣接していることを示す。それ以上にH6はH5と6.1Hzで組になっており、H2と1.0Hzで組になっていた。これはC2(CH)-N1(CH2-)-C6(CH)-C5でありうることを示す。ピリジン環の残りの2つの炭素(C3とC4)は更に置換されている。プロテクトを外されたGA5エピトープの残りの部分はC<sub>1</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>であった。これは1つのヒドロキシメチル基と1つのヒドロキシ基からなると考えられた(図1)。

【0074】HMBC試験においては、4.81ppmのヒドロキシメチル基のメチレンプロトンとC3、C4およびC5とのクロスピークについて検討した。更にメチレンプロトンとH5との間にnOeが存在することからヒドロキシメチル基がC4に付いているとの結論となっ

た。これらの構造分析の結果より、プロテクトが外されたGA5エピトープの構造は3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-1-(5-アミノ-5-カルボキシペンチル)ピリジニウムカチオンであることの結論に達した。

#### 【0075】実施例2：GA変性タンパクのAGEに対するモノクローナル抗体(GA5)の作製

グリコールアルデヒドとLDLとを100で10分間反応させ、グリコールアルデヒド修飾LDLのAGE(GA-LDL)を製造した。このGA-LDLをアジュバンド中に50%懸濁した液を、Balb/cマウスの真皮内に1mgずつ1週間おきに4回投与した。感作したマウスから脾臓リンパ球を採取し、ミエローマP3U1細胞と融合させて融合細胞を得た。

【0076】1週間後、この融合細胞Balb/cを0.5mL(1x10<sup>7</sup>個/マウス)投与して腹水を産生させ、投与1週間後に腹水を採取した。採取した腹水5mLBSAを結合させたフォルミル-セルロフィンゲルが充填されているアフィニティカラム1(2.0x12cm)を通した。アフィニティカラム1における非吸着画分を更にGA-BSAを結合させたフォルミル-セルロフィンゲルが充填されたアフィニティカラム2(1.2x9.0cm)に通した。アフィニティカラム2のGA-BSAに吸着される画分を0.1Mクエン酸緩衝液(pH3.0)で溶出させた。

【0077】集められた抗体画分を中和し、更にCML-BSAが結合されたフォルミル-セルロフィンゲルが充填されたアフィニティカラム3を通し、CML-BSAに吸着されない画分を採取した。この画分を濃縮し、PBSで希釈後透析にかけ、CML以外のGA-BSAのAGEに対するモノクローナル抗体を精製した。

#### 【0078】実施例3：GA変性タンパク質のAGEに対するポリクローナル抗体の作製

CML以外のGA-派生AGE構造(非CML構造)に対するポリクローナル抗体を調製するために50%フロイントの完全アジュバントに懸濁した、GA-BSA1mgをウサギの皮下(20ヶ所)に投与した。続いて50%フロイントの不完全アジュバントに懸濁した、GA-BSA0.5mgを5回投与した。

【0079】最終投与10日経過後親和性精製にかけため血清を採取した。この血清を抗GA-BSA抗血清(10mL)をBSAに結合させたフォルミル-セルロフィンゲルが充填されているアフィニティカラム1(2.0x12cm)を通した。アフィニティカラム1における非吸収画分をフォルミル-セルロフィンゲルが充填されたアフィニティカラム2(1.2x9.0cm)に通した。アフィニティカラム2のGA-BSAに吸着される画分を0.1Mクエン酸緩衝液(pH3.0)で溶出させた。

【0080】集められた抗体画分を中和し、更にCML

- BSAが結合されたフォルミル-セロフィンゲルが充填されたアフィニティカラム3に通し、CML-BSAに吸着されない画分を採取した。この画分を濃縮し、PBSで透析にかけてCML以外のGA-BSAのAGEに対するポリクローナル抗体を精製した。

【0081】実施例4：モノクローナル抗体による抗体価の測定 / ELISA

競合的ELISAにより抗体価を測定した。すなわち、96ウェルマイクロの各ウェルを、後述する濃度で抗原を含む100μlのPBSでコートし、1時間インキュベートした。その後、ウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄し、0.5%ゼラチン緩衝液（洗浄緩衝液）を含むPBSを加え、室温で1時間静置してウェルをブロックした。

【0082】洗浄緩衝液で3回洗浄した後、50μlのテストサンプルと同容量のGA5溶液を各ウェルに加え、1時間インキュベートした。ウェルに結合した抗体はHRP-結合抗マウスIgG抗体を用いて検出した。ELISAを用いた試験では、同様の工程を少なくとも3回繰り返した。結果を図2に示す。

【0083】実施例5：ポリクローナル抗体による抗体価の測定 / ELISA

実施例3で得たポリクローナル抗体を用いて、実施例4と同様の方法でELISAを行い、抗体価を測定した。結果を図3に示す。

【0084】実施例6：ヒト大動脈のアテローム動脈硬化病巣におけるAGEの検出

1. 免疫染色用組織の調整

死後2～5時間以内に単離された、ヒト大動脈のアテローム動脈硬化病巣の組織検体をリジン-パラホルムアルデヒドからなる2%固定剤で4、6時間かけて固定した。次いで、シュークロース（特級）を10%、15%、及び20%含有するPBSで洗浄した。氷の結晶の生成を防ぐため、10%のグリセロールと20%シュークロースを含有するPBS中に浸漬した後、OCT化合物（さくらファインテクニカル（株））の中に置き、液体窒素で凍結し、使用するまで-80で保存した。検体組織（腹部大動脈（abdominal aorta）および冠大動

\*脈（coronaria））はクリオスタット（HM-500M、ミクロム社）で5μmにカットしポリリジンでコートされたスライド上に置いた。

【0085】2. 組織染色

ヒトアテローム動脈硬化病巣のAGE生成を間接免疫パーオキシダーゼ法により検査した。すなわち、組織断片はパーオキシダーゼ活性を止めた後、GA5（一次抗体）とともにインキュベートし、PBSで洗浄後、二次抗体として、1：100で希釈したパーオキシダーゼラベル抗マウスF(ab')<sub>2</sub>（アメルスハム社製）を反応させた。これに3,3'-ジアミノベンジジン（同仁化学（株）製）、ヘマトキシリン、マリノール（ムトウ化学（株）製）を添加して染色した（実施例6）。

【0086】対照として、GA5を抗原を含むGA-BSA（グリコールアルデヒド修飾BSA）とともに、37で1時間プレインキュベーションし、これをヒトアテローム動脈硬化病巣の組織片と反応させ、実施例6と同様に染色した（比較例1）。それぞれの染色結果を図4に示す。

【0087】

【発明の効果】本発明のピリジニウム誘導体を利用すれば、メイラード反応後期生成物を高感度で検出する抗体が提供される。従って、本発明によれば、AGEの生成および蓄積が関与する疾患、すなわち、糖尿病、糖尿病性合併症、非糖尿病性腎症または老化に伴う疾患の病態（発症や進行度）を高感度で検査することができる。また、上記疾患に対する治療薬あるいは治療薬候補化合物の薬効を評価することができる。

【図面の簡単な説明】

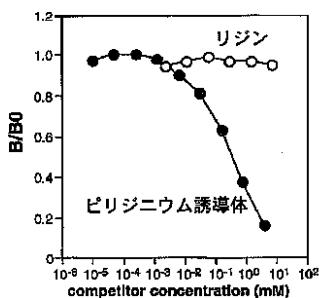
【図1】図1-AはGA5エpiteop構造を示す。また図1-BはHMBc試験結果を示す。

【図2】図2はGA変性タンパク質のAGEに対するモノクローナル抗体のELISA結果を示す。

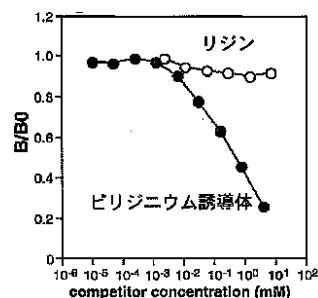
【図3】図3はGA変性タンパク質のAGEに対するポリクローナル抗体のELISA結果を示す。

【図4】図4はヒト大動脈のアテローム動脈硬化病巣の組織断片の免疫染色結果を示す。

【図2】



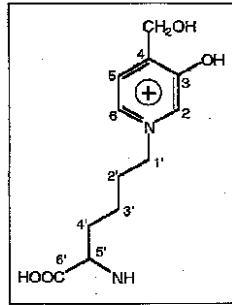
【図3】



【図1】

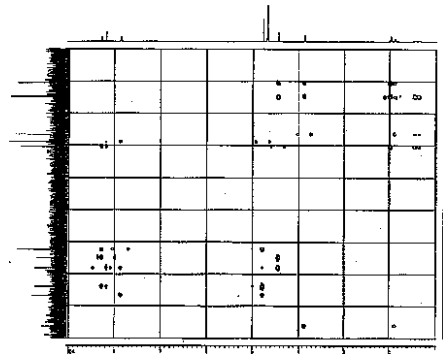
A

ピリジニウム誘導体の構造



B

HMBC spectra

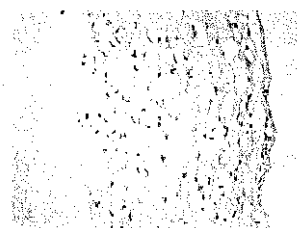
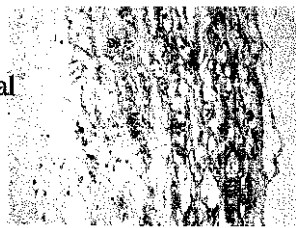


【図4】

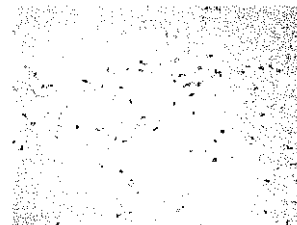
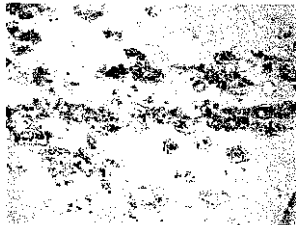
GA5 (2 $\mu$ g/ml)

GA5 + GA-BSA

Abdominal  
aorta



Coronaria



专利名称(译)	新型吡啶鎓衍生物及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003300961A</a>	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2002109610	申请日	2002-04-11
申请(专利权)人(译)	熊本基金会技术和产业基础		
[标]发明人	堀内正公 永井竜児		
发明人	堀内 正公 永井 竜児		
IPC分类号	G01N33/53 C07D213/65 C07K16/44 G01N33/577		
FI分类号	C07D213/65 C07K16/44 G01N33/53.S G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4C055/AA04 4C055/AA13 4C055/BA01 4C055/CA02 4C055/CA42 4C055/DA06 4C055/DA16 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新型化合物，该化合物被抗美拉德反应后期产物 ( AGE ) 的抗体识别为表位。此外，该化合物的用途提供了一种检查与AGE的产生或积累有关的疾病的方法，以及一种用于评估该疾病的治疗剂的功效的方法。制备针对通式 ( I ) 表示的吡啶鎓衍生物的抗体和包含该衍生物的抗原。此外，使用该抗体通过免疫标记测定法检测AGE。

