

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6166062号
(P6166062)

(45) 発行日 平成29年7月19日(2017.7.19)

(24) 登録日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(51) Int.Cl. F1
GO1N 33/53 (2006.01) GO1N 33/53 D

請求項の数 3 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2013-39875 (P2013-39875)	(73) 特許権者	390037327
(22) 出願日	平成25年2月28日 (2013.2.28)		積水メディカル株式会社
(65) 公開番号	特開2014-167446 (P2014-167446A)		東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(43) 公開日	平成26年9月11日 (2014.9.11)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成27年12月15日 (2015.12.15)		特許業務法人アルガ特許事務所
特許法第30条第2項適用	(1) 平成24年9月1日	(74) 代理人	100077562
http://www.jddw.jp/jddw2012/oshirase/index.html	(2) 平成24年9月10日 日本肝臓学会 発行「第16回日本肝臓学会講演要旨集」、及び平成24年10月10日 日本肝臓学会 「第16回日本肝臓学会大会」において文書をもって発表		弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓疾患の評価方法及び診断キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物におけるウイルス性肝炎、肝硬変、アルコール性肝炎、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、又は特発性門脈圧亢進症の重篤の程度及び予後予測を評価するために、該哺乳動物由来の血液由来試料中の可溶性LR11濃度を測定する方法。

【請求項2】

前記重篤の程度及び予後予測の評価が、血液由来試料中の可溶性LR11濃度を免疫学的方法により測定し、カットオフ値を設定して、該測定値を該カットオフ値と比較するものである請求項1記載の方法。

【請求項3】

可溶性LR11測定試薬を含有するウイルス性肝炎、肝硬変、アルコール性肝炎、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、又は特発性門脈圧亢進症の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液中の新規な肝臓疾患マーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

肝臓疾患の中でも、ウイルス性肝炎はHBV（B型肝炎ウイルス）及びHCV（C型肝炎ウイルス）感染によって引き起こされるもので、日本国におけるB型肝炎とC型肝炎を合わせた感染者数は300万人前後にも達する。HBVに感染すると一過性の急性肝炎を発症するが、感染者の約80～90%においてはセロコンバージョンにより、感染したウイルスが増殖性の低いウイルスに変化し、多くの場合、肝炎を発症しない無症候性キャリアに移行する。一方、残りの10～20%の持続感染者は、慢性肝炎へ移行し、さらに肝硬変へと進行する。HCV感染者の多くは不顕性感染であり、その後60～80%が慢性化するといわれている。慢性肝炎は、約20年の経過で、その罹患者の30～40%が肝硬変に移行する。日本国における最近の肝硬変の成因としては、先ずウイルス感染によるものが約72%（HCV感染：約60%、HBV感染：約12%）を占め、残りの約28%の半分をアルコール性肝炎が占め、それ以外には、最近増加傾向にある非アルコール脂肪肝炎や自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変などが占めている。

10

【0003】

上記したいずれの成因においても、肝硬変まで進行した場合には、治療することが困難で、肝移植による根本治療が必要となる。さらに、肝細胞癌発症のリスクも増大することから、慢性肝炎から肝硬変への進行を防ぐことが重要である。現在、肝機能検査におけるマーカー（以下、肝機能マーカーということがある）としては、肝細胞の障害により肝細胞から逸脱する酵素であるASTやALT、肝細胞のみが産生するアルブミンやコリンエステラーゼ、肝細胞の繊維化に伴い増加するIV型コラーゲンやヒアルロン酸などが臨床応用されている。しかしながら、特にHCV感染陽性で前記肝機能マーカーの検査数値が基準値以下の症例であっても、肝生検を実施した結果、軽度の肝臓繊維化を認めるケースが多くあり、現在臨床応用されている肝機能マーカーの検査のみでは、肝臓疾患の存在や肝臓疾患の状態（例えば重症度など）の評価が十分になされているとはいえず、既存の肝機能マーカー検査では検出困難な早期の段階で、肝臓疾患の罹患や進行を的確に捉えることができる新しい肝臓疾患マーカーが望まれていた。

20

【0004】

一方、肝臓疾患が肝硬変まで進行した場合の重症度分類として、5つの因子（アルブミン及びビリルビン濃度、プロトロンビン時間、腹水及び肝性脳症の度合い）を点数化して算出するChild-Pughスコアが、予後予測に応用されている。また、クレアチニン、ビリルビン及びプロトロンビン時間の3の因子で規定されるMELDスコアは、肝移植の予後予測に応用されている。これら既存の予後予測方法に加え、ごく最近、血清中の可溶性uPAR（urokinase plasminogen activator receptorの略、PLUAR、CD87とも称される。以下、suPARということがある）濃度が、慢性肝臓疾患の予後予測因子であることが報告された（非特許文献1）。この報告において、suPAR濃度は、肝機能マーカーであるコリンエステラーゼ活性と強い負の相関性を示す一方、繊維化マーカーであるヒアルロン酸とは強い正の相関性を示し、さらに、肝移植の予後予測に有用なMELDスコアとも強い正の相関性を示したことより、suPAR濃度が肝臓疾患の予後予測の指標として使用できることが記載されている。

30

【0005】

一方、LR11（LDL receptor relative with 11 ligand-binding repeats）は、LDL受容体ファミリーに特徴的な構造を有する新規なLDL受容体類似タンパク質として同定された（特許文献1、非特許文献2）。LR11は、アポEを共通のリガンドとする11回の繰り返し構造のリガンド結合領域を有し、正常血管壁細胞ではほとんど発現が認められないが、肥厚内膜平滑筋細胞には特異的に発現が認められることが知られている（非特許文献3）。さらに、培養平滑筋細胞を用いた検討から、平滑筋細胞の細胞増殖に伴いLR11の発現量が亢進し、培養液中への分泌が認められ、また、カフ傷害マウスモデルにおいて、抗LR11抗体を腹腔内投与することにより、平滑筋細胞の遊走及び増殖によって引き起こされる血管内膜の肥厚が阻害されたことが知られている（非特許文献4）。

40

50

【0006】

本発明者らは、ごく最近、悪性腫瘍患者の血液中の可溶性LR11 (soluble LR11。以下、sLR11ということがある)濃度が、健常者と比較して有意に増加していることを見出し、その濃度が治療により正常化することや、再発時には再び上昇している等の知見を得、悪性腫瘍の存在、重篤度、治療方法の選択若しくは効果判定、再発の危険性又は再発の有無を判定するための腫瘍マーカーとして有用であることを見出し、特許出願した(特許文献2)。当該出願においては、腫瘍マーカーとしての適用対象となる悪性腫瘍として、上皮性悪性腫瘍である胃癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、大腸癌、胆嚢癌などが挙げられ、肝臓疾患の一つである肝癌患者検体由来血清中の可溶性LR11濃度が高値化していることが確認されている。しかしながら、癌を発症していない肝臓疾患患者血清中の可溶性LR11濃度の変動については記載されておらず、癌以外の肝臓疾患において血液中の可溶性LR11濃度が高値化し、この濃度変動が肝細胞の障害の状態ならびに肝臓疾患の予後予測に活用できることは知られていなかった。

10

また、血管平滑筋におけるLR11の機能は、uPARを介して細胞内にシグナルが伝達される経路が解析されており、LR11はuPARのリガンドになることが、報告されている(非特許文献5)が、直接この2つのマーカーの関係を検討した報告はなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開平9-163988号公報

【特許文献2】国際公開第2011/074594号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Liver Int. 2012; 32, 500-509

【非特許文献2】J. Biol. Chem. 1996; 271, 24761-24768

【非特許文献3】Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999; 19, 2687-2695

【非特許文献4】CirCres. 2004; 94; 752-758

【非特許文献5】J. Clin. Invest. 2008; 118; 2733-2746

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、新たな肝臓疾患のマーカーを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、治療中の各種肝臓疾患患者から、血清検体の提供を受け、血清中の可溶性LR11濃度及びusPAR濃度を測定し、各種肝機能マーカーとの関係を検証した結果、可溶性LR11及びusPAR共に、各種肝機能マーカーと有意に相関関係があることを見出した。さらに、健常者の濃度レベルを求め、各種肝臓疾患での濃度と比較した結果、可溶性LR11濃度はほとんどの肝臓疾患で有意に高値化しているのに対して、usPAR濃度は意外にも肝硬変群以外の肝臓疾患では、有意差を認めなかった。さらに、健常者の濃度レベルから参考基準範囲を設定し、その上限を超えた検体を陽性として、各種肝臓疾患別に、可溶性LR11及びusPAR、さらに肝繊維化のマーカーであるIV型コラーゲンを加えた3項目での陽性率の比較を行った。その結果、usPARは有意差が認められないことから陽性率も非常に低かったが、可溶性LR11は肝硬変群ではほぼ100%となった他、その他の肝臓疾患においても高い陽性率となった。さらに意外なことに、その陽性率はIV型コラーゲンと同等であった。また、可溶性LR11とIV型コラーゲンを組合わせた陽性率は、さらに大きく向上することを見出した。

40

本発明者は、上述した知見を基に、ガラクトサミンによる急性肝障害モデルラットでの

50

動物実験を行った結果、ガラクトサミン投与による肝障害が引き起こされたと同時に血中の可溶性LR11濃度が増加し、肝細胞障害が収束した後も増加傾向が続くことが確認され、可溶性LR11が肝繊維化を呈する初期の段階の肝臓疾患においても、病態を的確に捉えうるマーカーになりうることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔4〕を提供するものである。

〔1〕哺乳動物由来の血液由来試料中の可溶性LR11濃度を測定することを特徴とする、該動物における肝臓疾患（肝癌を除く）の重篤の程度及び予後予測の評価方法。

〔2〕可溶性LR11濃度の測定が、血液由来試料中の可溶性LR11濃度を免疫学的方法により測定し、カットオフ値を設定して、カットオフ値以上になった場合に肝硬変や肝癌へのリスクが高まりつつある肝臓疾患と判定するものである〔1〕記載の評価方法。

〔3〕肝臓疾患が、ウイルス性肝炎、肝硬変、アルコール性肝炎、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、特発性門脈圧亢進症である〔1〕又は〔2〕記載の評価方法。

〔4〕可溶性LR11測定試薬を含有する肝臓疾患（肝癌を除く）の診断キット。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、新たな肝臓疾患のマーカーが提供され、肝繊維化を呈する初期の段階の肝臓疾患においても、病態を的確に捉えることが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】健常者の血清及び肝癌を除く各種肝臓疾患患者の血漿中のsLR11濃度を比較した図である。

【図2】健常者の血清及び肝癌を除く各種肝臓疾患患者の血漿中のsUPAR濃度を比較した図である。

【図3】ガラクトサミン投与又は非投与による急性肝炎モデルラットの血清中のsLR11濃度の変動を示した図である。

【図4】ガラクトサミン投与又は非投与による急性肝炎モデルラットの血清中のAST活性の変動を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明における被検対象である哺乳動物由来の血液は、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウマなどから採取したものを使用できるが、ヒトが好ましい。可溶性LR11を測定を行う場合の血液由来試料としては、測定系の特性にあわせ、全血、血清又は血漿のいずれかを使用することができる。

【0015】

血液由来試料中の可溶性LR11の測定は、可溶性LR11に親和性のある物質を用いて行われる。該親和性物質は、可溶性LR11に結合能を有する物質であれば特に制限されず、例えば、apo E、VLDL、RAP、uPA、PAI-1、それらの複合体（uPA-PAI-1）、及び抗可溶性LR11抗体等が挙げられるが、RAP及び抗可溶性LR11抗体が好ましく、抗可溶性LR11抗体がより好ましい。

【0016】

抗可溶性LR11抗体としては、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体のいずれでも良く、当該抗体は、周知の方法にて作製できる。また、これらの抗体は、市販品として入手することも可能であり、本発明にも利用できる。例えば、Mouse anti-LR11 monoclonal antibody（BD biosciences社）、Rabbit anti-LR11 Polyclonal antibody（CHEMICON社）、国際公報第2009/116268号公報記載の抗LR11抗体などが挙げられる。

【0017】

本発明における可溶性LR11の測定方法としては、抗LR11抗体を使用した免疫学的測定方法が好ましい。免疫学的方法としては、例えば免疫染色（ウエスタンブロット）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫比濁法（TIAやLTIA）、エンザイム免疫アッセイ、化学発光免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイなどが挙げられるが、ELISAが好ましい。ELISAキットとしては、積水メディカル社から市販されているものを用いることができる。

【0018】

本発明における重篤の程度及び予後予測の評価の対象となる、肝臓疾患としてはウイルス性肝炎（B型、C型）、肝硬変、アルコール性肝炎、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、及び特発性門脈圧亢進症などが挙げられる。

10

【0019】

評価方法としては、例えば、血液由来試料中の可溶性LR11濃度を免疫学的方法により測定し、カットオフ値を設定して、カットオフ値以上になった場合に肝硬変や肝臓へのリスクが高まりつつある肝臓疾患と判定する方法を挙げることができる。

【0020】

また、本発明の血液由来試料中の可溶性LR11濃度による評価と、IV型コラーゲンによる評価とを併せて評価すれば、肝臓疾患重篤化の程度及び予後予測の評価方法として有用である。特に、肝線維化の評価方法として有用である。

【0021】

20

また、可溶性LR11測定試薬は、肝臓疾患（肝臓を除く）の診断キットとして有用である。当該診断キットが、ELISAキットである場合には、抗可溶性LR11抗体を固定化させた免疫アッセイ用プレート、固定化させた抗可溶性LR11抗体とは抗原認識部位が異なる抗可溶性LR11抗体（酵素やビオチンなどで標識されていてもよい。以下、検出用抗体ということがある）を含有する試薬を主要な構成要素として、血液由来試料を希釈あるいは前処理等するための緩衝液、抗可溶性LR11抗体を固定化させた免疫アッセイ用プレートを洗浄するための洗浄液、検出用抗体と結合する成分（検出用抗体を認識する酵素標識された抗体や酵素標識されたアビジンなど）、酵素反応を検出するための成分を含有する検出試薬（基質剤、発色剤などの名称で呼ばれることがある）、可溶性LR11濃度を換算・算出するための校正基準物質（精製された可溶性LR11や可溶性LR11濃度既知の血清などを含有する）が適宜に組み合わせられて構成される。

30

【実施例】

【0022】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0023】

〔実施例1〕各種肝臓疾患における血中可溶性LR11の検出

1. 材料と方法：

(1) 治療中の各種肝臓疾患患者、ウイルス性肝炎〔CH〕（B型42名、C型204名）、肝硬変〔LC〕43名、アルコール性肝炎〔AL〕10名、脂肪肝〔FL〕21名、非アルコール性脂肪肝炎〔NASH〕12名、自己免疫性肝炎〔AIH〕44名、原発性胆汁性肝硬変〔PBC〕88名、原発性硬化性胆管炎〔PSC〕3名、及び特発性門脈圧亢進症〔IPH〕4名から採取された血漿中の可溶性LR11（sLR11）濃度を、可溶性LR11測定試薬（積水メディカル社製）を用いて測定した。比較として、健常者ボランティア57名の血清中の可溶性LR11濃度も測定した。さらに、これら検体中の可溶性uPAR（suPAR）濃度を、以下のELISA法で測定した。その他の肝機能マーカーの測定は、臨床検査結果より引用した。

40

【0024】

(2) suPAR濃度測定方法

96穴ELISAプレートに、PBSで10µg/mLに希釈した抗ヒトuPARモノ

50

クローナル抗体 (R & D systems 社、M A B 8 0 7) を 1 ウェルあたり 5 0 μ L 添加し、室温で 2 時間放置し、抗体を固相した。その後、0 . 0 5 % Tween (登録商標) 2 0 を含む P B S (P B S T) にてプレートを洗浄後、1 % B S A を含む P B S T (B S A - P B S T) を、1 ウェルあたり 2 0 0 μ L 添加し、室温で 1 時間放置して、プレートを B S A でブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、検体を B S A - P B S T で 5 倍希釈した液を、1 ウェルあたり 5 0 μ L 添加し、室温で 1 時間反応させた。別に、R e c o m b i n a n t H u m a n u P A R (R & D systems 社、8 0 7 - U K) を用いて B S A - P B S T にて希釈系列を作成してキャリブレーターとし、検体と同じ条件で反応させた。P B S T にてプレートを洗浄後、抗ヒト u P A R ポリクローナル抗体 (R & D systems 社、A F 8 0 7) にビオチン標識した標識抗体を B S A - P B S T にて 0 . 1 μ g / m L となるように希釈した液を、1 ウェルあたり 5 0 μ L 添加し、室温で 1 時間反応させた。P B S T にてプレートを洗浄後、H R P 標識ストレプトアビジン (T h e r m o S c i e n t i f i c 社、2 1 1 2 6) を B S A - P B S T にて 0 . 5 μ g / m L となるように希釈した液を、1 ウェルあたり 5 0 μ L 添加し、室温で 3 0 分間反応させた。P B S T にてプレートを洗浄後、過酸化水素を含むクエン酸緩衝液を用いて、テトラメチルベンチジンを 0 . 3 m g / m L になるように溶解した基質液を、1 ウェルあたり 5 0 μ L 添加し、室温で 1 0 分間反応させた後、希硫酸液を 1 ウェルあたり 5 0 μ L 添加し、反応を停止させた。4 5 0 n m の吸光度を測定し、キャリブレーターの希釈系列より作成された検量線を用いて、検体中の s u P A R の濃度を算出した。

【 0 0 2 5 】

2 . 結果及び考察

(1) 解析 1 : 肝機能マーカーとの相関性

一般的な肝機能マーカーの検査、7 項目 (A S T 、 A L T 、アルカリフォスファターゼ [A L P] 、コリンエステラーゼ [C h E] 、アルブミン [A l b] 、血小板 [P L T] 、IV 型コラーゲン [I V c]) に加えて、腎機能検査 2 項目 (尿素窒素 [U N] 、クレアチニン [C r]) について、s L R 1 1 及び s u P A R 濃度との相関関係を確認した。表 1 には、算出された相関係数並びに回帰分析結果を示した。

【 0 0 2 6 】

【表 1】

s L R 1 1 又は s u P A R と各肝機能マーカー又は腎機能マーカーとの相関性

	suPAR	AST	ALT	ALP	ChE	Alb	PLT	4・c	UN	Cr
可溶性LR11	0.429**	0.517**	0.229**	0.449**	-0.408**	-0.384**	-0.304**	0.664**	0.097	-0.003
可溶性uPAR		0.296**	0.076	0.441**	-0.419**	-0.378**	-0.301**	0.515**	0.496**	0.515**

** : $p < 0.001$ 、* : $p < 0.01$

4・c は I V c を意味する (以下、本明細書において同様) 。

【 0 0 2 7 】

s L R 1 1 濃度は、肝細胞の障害を反映する A S T 、 A L T 及び A L P と有意な正の相関関係を認める一方、肝臓でのタンパク質合成機能を反映する C h E 、 A l b そして P L T とは負の相関関係を認めた。ここで興味深いことに、肝繊維化のマーカーである I V c と一番強い正の相関関係があることが見いだされた。s u P A R 濃度と各肝機能マーカーとの関係は、A L T を除き、s L R 1 1 濃度と同様であった。

これに対して、s u P A R 濃度は腎機能マーカーと有意な正の相関関係を認めたが、s L R 1 1 濃度は全く相関関係を認めないことから、腎機能の影響を受けにくいことが新たに判明した。

また、s L R 1 1 濃度と s u P A R 濃度の間でも、比較的強い正の相関関係を認め、s L R 1 1 濃度と s u P A R 濃度のいずれもが肝臓疾患の有用なマーカーとなることが示された。

【 0 0 2 8 】

(2) 解析2：健常者におけるsLR11及びsUPAR濃度の参考基準値の設定

sLR11及びsUPARの参考基準値は、健常者ボランティア57名の血清中の濃度の平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差(2SD)として算出した。sLR11は $7.8 \pm 3.2 \text{ ng/mL}$ ($4.6 \sim 11.0 \text{ ng/mL}$)、sUPARは $2.4 \pm 0.7 \text{ ng/mL}$ ($1.0 \sim 3.8 \text{ ng/mL}$)と算出された。

【0029】

(3) 解析3：肝臓疾患別のsLR11及びsUPAR濃度比較

各種肝臓疾患検体中のsLR11及びsUPAR濃度測定結果を、疾患別に解析2で得られた健常者ボランティア(normal)のそれぞれの濃度と比較した。その結果を表2、図1並びに表3、図2に示す。

【0030】

【表2】

各種肝臓疾患別のsLR11濃度の有意差検定結果

	normal	CH(B)	CH(C)	LC	AL	FL	NASH	AIH	PBC	PSC	IPH
平均濃度 (ng/mL)	7.8	10.7	14.0	23.1	10.6	11.5	12.5	12.8	13.9	34.3	15.5
標準偏差	1.6	4.8	6.9	9.8	4.4	8.1	4.9	5.8	5.8	31.1	7.0
有意差(Dunn)検定 normal vs.		p<0.05	p<0.01	p<0.01	NS	NS	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.05

10

20

【0031】

表2の結果より、sLR11濃度は、AL及びFL以外の肝臓疾患群では、normal群と比較して有意に高値化していることが確認された。

【0032】

【表3】

各種肝臓疾患別のsLR11濃度の有意差検定結果

	normal	CH(B)	CH(C)	LC	AL	FL	NASH	AIH	PBC	PSC	IPH
平均濃度 (ng/mL)	2.4	2.1	3.0	4.5	2.8	2.0	1.8	2.4	2.3	5.2	3.3
標準偏差	0.7	0.7	2.0	2.7	1.8	0.9	0.5	0.9	0.9	3.4	1.2
有意差(Dunn)検定 normal vs.		NS	NS	p<0.01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

30

【0033】

表3の結果より、sUPAR濃度は、意外にもLC以外の肝臓疾患群では、normal群と比較して有意に高値化していないことが確認された。

【0034】

(4) 解析4：肝臓疾患別のsLR11、sUPAR、IVcの陽性率比較

解析1で得られたsLR11及びsUPARの参考基準範囲($4.6 \sim 11.0 \text{ ng/mL}$ 、 $1.0 \sim 3.8 \text{ ng/mL}$)、加えて、解析で強い正の相関関係を認めたIVcのカットオフ値を 150 ng/mL と定め、それぞれその上限を超えた検体を陽性として、肝臓疾患別に各検査項目の陽性率を算出した(表4)。さらに、sLR11とIVcを組合わせた場合(いずれかが陽性である場合)の陽性率も求めた。

40

【0035】

【表4】

肝臓疾患別のsLR11、suPAR、IVcの陽性率比較

	suPAR	sLR11	4・c	sLR11+4・c
CH(B) 陽性率	2/42 4.8%	15/42 35.7%	18/42 42.9%	23/42 54.8%
CH(C) 陽性率	34/204 16.7%	118/204 57.8%	119/204 58.3%	157/204 77.0%
LC 陽性率	18/43 41.9%	42/43 97.7%	41/43 95.3%	43/43 100.0%
AL 陽性率	2/10 20.0%	4/10 40.0%	6/10 60.0%	7/10 70.0%
FL 陽性率	1/21 4.8%	7/21 33.3%	5/21 23.8%	9/21 42.9%
NASH 陽性率	0/12 0.0%	7/12 58.3%	8/12 66.7%	10/12 83.3%
AIH 陽性率	2/44 4.5%	22/44 50.0%	20/44 45.5%	28/44 63.6%
PBC 陽性率	8/88 9.1%	51/88 58.0%	35/88 39.8%	61/88 69.3%
PSC 陽性率	2/3 66.7%	2/3 66.7%	2/3 66.7%	2/3 66.7%
IPH 陽性率	1/4 25.0%	3/4 75.0%	3/4 75.0%	4/4 100.0%
全体 陽性率	70/471 14.9%	271/471 57.5%	257/471 54.6%	344/471 73.0%

10

20

【0036】

表4の結果より、suPARと比較して、sLR11及びIVcの陽性率が格段に高いことが確認された。一方、sLR11とIVcの陽性率は、各種疾患群で同等であったが、興味深いことに、この2つの項目を組み合わせ、いずれかが陽性である場合を陽性であるとする、陽性率が大きく向上することが新たに判明した。さらに、慢性ウイルス性肝炎群の陽性率が、sLR11及びIVcともに50%前後であったのに対して、慢性肝炎が繊維化を伴い進行した肝硬変群ではほぼ100%となり、sLR11が繊維化マーカーとして臨床応用されているIVcと同等の検出性能を有するだけでなく、IVcを補完できる、すなわちIVcのみでは見落としていた患者を発見することができる、新たな肝臓疾患マーカーになりうるということが判明した。

30

【0037】

〔実施例2〕ガラクトサミン投与肝炎モデルラットでのsLR11濃度変化についての検討

1. 材料と方法:

(1) Fischer 344ラット(体重100~110g)4匹を4時間絶食させた後、その内の2匹に、PBSに溶解させたD(+)-ガラクトサミン塩酸塩(和光純薬工業社、075-05013)を、800mg/kgとなるように腹腔内に投与した。残りの2匹には、PBSを同量(約1mL)腹腔内投与し、対照群とした。投与後、さらに4時間絶食させた後、通常の飼育に切り替えた。ガラクトサミン投与前及び投与後3、6、9、24、48、72時間及び13日間経過時点で尾静脈から採血し、血清を得た。その血清中のsLR11は、以下のELISA法にて測定した。肝臓細胞の障害の程度は、オートセラAST試薬(積水メディカル社)を用いて、ラット血清中のASTを測定することで確認した。それぞれの結果を、図3及び図4に示す。

40

【0038】

(2)ラット血清中のsLR11測定方法

特異抗体の作製:

大阪大学蛋白質研究所より供与されたLR11部分蛋白質(Actacryst. 2011, F67, 129-132)を、千葉大学から提供を受けたLR11ノックア

50

ウトマウス (J . C l i n . I n v e s t . , 2 0 0 8 , 1 1 8 : 2 7 3 3 - 2 7 4 6) に免疫後、通常の方法に基づいて、特異抗体を作製した。その中から、ラットを含めた動物由来の L R 1 1 に反応する抗体を選択し、サンドイッチ E L I S A 系が成立する組み合わせで、ラット血清中の s L R 1 1 を定量できる測定系を構築した。測定条件の詳細を以下に示す。

サンドイッチ E L I S A :

96穴 E L I S A プレートに、P B S で $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した抗 L R 1 1 モノクローナル抗体 (クローン No . 9 3 2 2 2) を 1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 2 時間放置し、抗体を固相した。その後、P B S T にてプレートを洗浄後、B S A - P B S T を、1 ウェルあたり $200 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 1 時間放置して、プレートを B S A でブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、検体を B S A - P B S T で 5 倍希釈した液を、1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 2 時間反応させた。別に、キャリブレーターとして、市販ウサギ血清 (ジャパンバイオシーラム社) の B S A - P B S T による希釈系列を作成し、検体と同じ条件で反応させた。P B S T にてプレートを洗浄後、抗 L R 1 1 モノクローナル抗体 (クローン No . 9 3 2 1 3) にビオチン標識したものを調製し、B S A - P B S T にて $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した液を、1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 1 時間反応させた。P B S T にてプレートを洗浄後、H R P 標識ストレプトアビジン (T h e r m o S c i e n t i f i c 社、2 1 1 2 6) を B S A - P B S T にて $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した液を、1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 30 分間反応させた。P B S T にてプレートを洗浄後、過酸化水素を含むクエン酸緩衝液を用いて、テトラメチルベンチジンを $0.3 \text{mg}/\text{mL}$ になるように溶解した基質液を、1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 10 分間反応させた後、希硫酸液を 1 ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ 添加し、反応を停止させた。450 nm の吸光度を測定し、キャリブレーターの希釈系列より作成された検量線を用いて、ラット血清中の s L R 1 1 の濃度を算出した。

【 0 0 3 9 】

2 . 結果と考察

図 4 の結果より、ガラクトサミン投与ラットの血清 A S T 活性の著明な増加が認められ、24 時間後でピークとなった。一方、血清中の s L R 1 1 濃度は、投与後 24 時間から序々に増加しはじめ、A S T 活性を指標とした肝臓細胞障害がほぼ収束した 72 時間後でも、まだ増加傾向にあった。その後、13 日を経過した段階では、s L R 1 1 濃度は初期値まで戻っていた (図 3) 。この結果から、急性期の状態において、血液中の s L R 1 1 濃度増加を認めることから、肝繊維化を呈する初期の段階の肝炎においても、病態を的確に捉えうる優れたマーカーになりうることを示唆された。

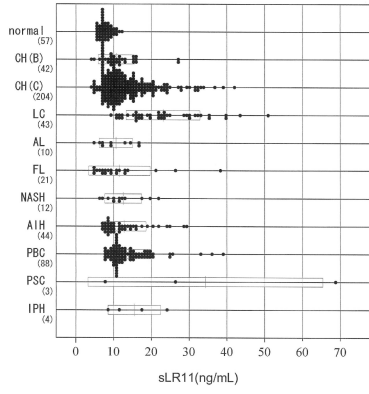
ガラクトサミン誘発肝障害ラットは、ヒトのウイルス性肝炎に類似した病態を呈するモデルと言われている。ウイルス性肝炎では、ウイルスが感染した肝細胞を宿主のリンパ球が破壊して、ウイルスを排除する状態が継続する。破壊された細胞は直ぐに再生されるが、上記データよると肝細胞が再生される状態と s L R 1 1 濃度の上昇がほぼ一致していることから、血液中の s L R 1 1 濃度は、肝細胞の障害並びに修復再生状況を反映する指標となる可能性が考えられた。

【 産業上の利用可能性 】

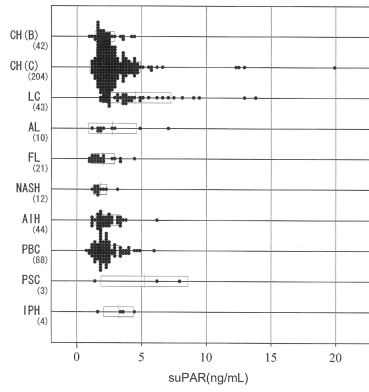
【 0 0 4 0 】

本発明により、新たな肝臓疾患のマーカーが提供される。

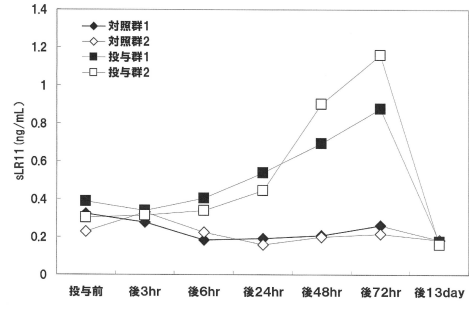
【 図 1 】



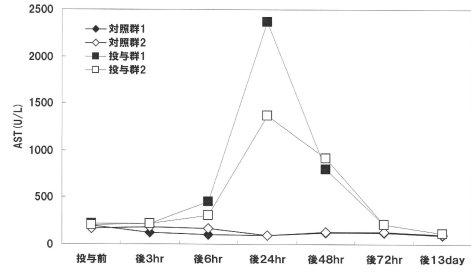
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

- (72)発明者 海老沼 宏幸
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 深町 勇
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 藤村 建午
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 穂苅 厚史
東京都港区三田4-18-20-421
- (72)発明者 銭谷 幹男
東京都港区南青山6-10-3-301

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第2011/074594(WO, A1)
国際公開第2008/155891(WO, A1)
米国特許出願公開第2009/0247605(US, A1)
Zimmermann HW、他4名、Circulating soluble urokinase plasminogen activator is elevated in patients with chronic liver disease, discriminates stage and aetiology of cirrhotics and predicts prognosis., Liver Int., 2012年, Vol. 32, No.3, Page.500-509

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	评估肝脏疾病的方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP6166062B2	公开(公告)日	2017-07-19
申请号	JP2013039875	申请日	2013-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	海老沼宏幸 深町勇 藤村建午 穗苅厚史 銭谷幹男		
发明人	海老沼 宏幸 深町 勇 藤村 建午 穗苅 厚史 銭谷 幹男		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	村田正树		
其他公开文献	JP2014167446A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) (19) 日本国特許庁(JP) (12) 特許公報(B2) (11) 特許番号 特許第6166062号 (P6166062)

(45) 発行日 平成29年7月19日(2017.7.19) (24) 登録日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(51) Int. Cl. F I
G O 1 N 33/53 (2006.01) G O 1 N 33/53 D

要解决的问题：为本发明中的新肝脏疾病提供标记物。 解决方案：通过测量源自哺乳动物的血液衍生样品中可溶性LR11的浓度，评估肝病（不包括肝癌）的严重程度和动物的预后。 点域1

請求項の数 3 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2013-39875 (P2013-39875)	(73) 特許権者 390037327 积水メディカル株式会社
(22) 出願日 平成25年2月28日(2013.2.28)	東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(65) 公開番号 特願2014-167446 (P2014-167446A)	(74) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(43) 公開日 平成26年9月11日(2014.9.11)	(74) 代理人 100077562 弁理士 高野 登志雄
審査請求日 平成27年12月15日(2015.12.15)	(74) 代理人 100096736 弁理士 中嶋 俊夫
特許法第30条第2項適用 (1) 平成24年9月1日 http://www.jddw.jp/jddw2012/oshirase/index.html (2) 平成24年9月10日 日本肝臓学会 発行「第16回日本肝臓学会講演要旨集」、及び平成24年10月10日 日本肝臓学会 「第16回日本肝臓学会大会」において文書をもって発表	(74) 代理人 100117156 弁理士 村田 正樹
	(74) 代理人 100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓疾患の評価方法及び診断キット