

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3896303号  
(P3896303)

(45) 発行日 平成19年3月22日(2007.3.22)

(24) 登録日 平成18年12月22日(2006.12.22)

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

請求項の数 4 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-129478 (P2002-129478)	(73) 特許権者	506137147
(22) 出願日	平成14年5月1日(2002.5.1)		エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
(65) 公開番号	特開2003-28860 (P2003-28860A)		ジメント株式会社
(43) 公開日	平成15年1月29日(2003.1.29)		東京都文京区小石川四丁目6番10号
審査請求日	平成16年12月22日(2004.12.22)	(74) 代理人	100100549
(31) 優先権主張番号	特願2001-138369 (P2001-138369)		弁理士 川口 嘉之
(32) 優先日	平成13年5月9日(2001.5.9)	(74) 代理人	100090516
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		(72) 発明者	遠藤 文夫
			熊本県熊本市出水7丁目733-103
		(72) 発明者	足立 尚登
			熊本県熊本市京町1丁目7-35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チトクロムC測定によるSIRSにおける多臓器不全の検査試薬

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

体液中のチトクロムCを定量し、定量結果を多臓器不全の指標として用いることを特徴とする、SIRS(systemic inflammatory response syndrome)における多臓器不全を検査する方法。

## 【請求項2】

チトクロムCを免疫化学的方法により定量する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

体液中のチトクロムCを定量するための試薬を含む、SIRSにおける多臓器不全の検査用試薬。

## 【請求項4】

チトクロムCを免疫化学的方法により定量する、請求項3に記載の試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome; SIRS)における多臓器不全の検査方法及び検査試薬に関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

SIRSは、全身性エリテマトーデス(SLE)や移植片対宿主反応疾患(GVHD)のように、特定

の抗原（SLEの場合の二本鎖DNA等自己抗原、GVHDの場合の同種抗原）に反応して、サイトカイン量が上昇し炎症反応を起こすのではなく、具体的なターゲット無しに、生体に対する侵襲に反応して非特異的に免疫反応が活性化し、サイトカイン産生が制御不能になって、重篤な多臓器不全（MOF）を起こす疾患群である（Bone RC, Crit Care Med 24: 1125-1128, 1996、Davies MG. Et al., Br J Surgery 84: 920-935, 1997）。

【0003】

SIRSには、血球貪食症候群（hemophagocytic syndrome; HPS）、敗血症、急性膵炎などの重症膵炎、外科手術後に起こる臓器障害などが含まれ、殆どがICU患者で見られ、予後の予測が難しい疾患群である。

【0004】

多臓器不全（MOF）の指標としては、体温、呼吸数、血液ガス、心拍数などの身体徴候をスコア化（APACHE II、MOF score、PRISM III score）して判断しているが、客観性に乏しいと言われている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、SIRSにおける多臓器不全を検査する、簡便で感度・定量性に優れた検査試薬及び検査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】

チトクロムCは、ミトコンドリアにおける電子伝達系の重要な蛋白質として知られているが、細胞がアポトーシスの引き金となる刺激に曝され、アポトーシスの状態になると、ミトコンドリアにあったチトクロムCが急速にサイトゾルへと放出されることが報告されている（Dinsdale D. et al., American J. Pathol. 155:607-18, 1999）。そしてサイトゾルのチトクロムCは、アポトーシスのキーファクターであるカスパーゼ(caspase)-3の活性化に関与し、チトクロムCの増加が、アポトーシス進行と関係することが報告されている（Medina V. et al., Cancer Research 57:3697-707, 1999）。

【0007】

本発明者らは、非特異的に免疫反応が活性化しサイトカイン産生能が制御不能になって、多臓器不全に陥れば、各臓器でアポトーシスが起り、臓器のミトコンドリアより放出されたチトクロムCが、血液などの体液中でも測定できるのではないかと考えた。そして、チトクロムCを測定するELISAを確立し、血中のチトクロムCの量が多臓器不全のスコアと強く相関することを見出して、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、チトクロムCを定量することにより、SIRSにおける多臓器不全を検査する方法及びその方法に使用できる試薬に関する。より具体的には、以下のものに関する。

【0009】

- 1．体液中のチトクロムCを定量し、定量結果を多臓器不全の指標として用いることを特徴とする、SIRSにおける多臓器不全を検査する方法。
- 2．チトクロムCを免疫化学的方法により定量する、1に記載の方法。
- 3．体液中のチトクロムCを定量するための試薬を含む、SIRSにおける多臓器不全の検査試薬。
- 4．チトクロムCを免疫化学的方法により定量する、3に記載の試薬。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施の形態について詳細に説明する。

【0011】

本発明の検査方法は、SIRSにおける多臓器不全を検査する方法であって、体液中のチトクロムCを定量し、定量結果を多臓器不全の指標として用いることを特徴とする。

【0012】

10

20

30

40

50

ここで、体液とは、生体より採取された血液、血漿、血清、脳脊髄液等を意味する。

【0013】

体液中のチトクロムCを測定する方法としては、免疫化学的方法、電気泳動による方法、クロマトグラフィーによる方法等が考えられる。電気泳動による方法としては、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ってチトクロムCをバンドとして検出する方法、キャピラリー電気泳動でピークとして検出する方法等がある。また、クロマトグラフィーによる方法としては、高速液体クロマトグラフィーでピークとして検出する方法等がある。場合によっては感度を上げるために、蛍光標識することも許されるが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0014】

チトクロムCを測定する方法としては、感度及び簡便性から免疫化学的方法が好ましい。ここで免疫化学的方法とは、チトクロムCに対する抗体を用いて、チトクロムCを定量する方法である。免疫化学的方法としては、チトクロムCを標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体コートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法等、様々な方法があるが、チトクロムCに対する抗体を用いた方法であれば、本発明の好ましい態様に含まれる。抗体はモノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また標識する方法にも、放射性同位元素による標識、電気化学発光する化合物による標識、蛍光標識、酵素標識、ビオチン標識等、様々な方法があるが、本発明はこれらの例に限られるものではない。

【0015】

チトクロムCを測定する免疫化学的方法の例として、以下にサンドイッチ法についてステップを追って説明する。

【0016】

1).チトクロムCに対する抗体をビーズまたはカップ上に固相化する。ビーズはマイクロビーズでもよく、その場合は磁性体のマイクロビーズが好ましい。固相化は、共有結合により結合させても非共有結合により結合させても構わない。通常、ビーズまたはカップ上の非特異的な結合部位をふさぐため、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤でブロック操作を行う。

【0017】

2).検体を、必要であればBSA、カゼイン等の蛋白質、または、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈し、ビーズまたはカップに加える。また、既知の量のチトクロムCも同様に希釈して加える。

【0018】

3).ビーズまたはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、できればBSA、カゼイン等の蛋白質、または、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈された標識抗体を加える。

【0019】

4).ビーズまたはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、標識に応じた方法で測定する。例えば、放射性標識であれば放射活性を、酵素標識であれば酵素活性を測定する。また、ビオチン化標識であれば更に標識アビジンを加えて、標識に応じた方法で測定する。

【0020】

5).既知量のチトクロムCから検量線を作成し、検体中に含まれるチトクロムC量を計算する。

【0021】

以上のステップにより、検体中のチトクロムCが定量される。

【0022】

チトクロムCの定量結果を指標として用いることにより、SIRSにおける多臓器不全が検査される。例えばチトクロムCの定量値が正常値よりも高い場合に、SIRSにおける多臓器不全が検出されたとすることができる。

10

20

30

40

50

## 【0023】

また本発明は、チトクロムCを測定することによりSIRSにおける多臓器不全を検査する検査試薬にも関し、この試薬は体液中のチトクロムCを定量するための試薬を含む。チトクロムCを定量するための試薬は、好ましくは、免疫化学的方法により定量するための試薬である。このような試薬としては、チトクロムCに対する抗体が挙げられる。

## 【0024】

免疫化学的方法としては、サンドイッチ法が好ましい。サンドイッチ法は、固定化抗体と標識抗体により抗原がサンドイッチされた状態を利用する、ELISAなど免疫化学的方法である。サンドイッチ法は、蛋白質濃度の高い体液中のチトクロムCを高感度で定量するのに適した方法である。

10

## 【0025】

本発明の検査試薬は、好ましくは、チトクロムCに対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量する検査試薬である。この態様の検査試薬は、抗体として抗チトクロムC抗体を用いる以外は、通常のスンドイッチ法に用いられる試薬(キット)と同様の構成でよい。その一例としてサンドイッチ法によりチトクロムCを測定する検査試薬は、例えば1).抗チトクロムC抗体コートカップ、抗チトクロムC抗体コートビーズなどの抗チトクロムC抗体コート固相、2).標識抗チトクロムC抗体、3).既知濃度のチトクロムC標準溶液、4).希釈液、5).洗浄液、を含有する試薬である。更に酵素標識であれば、6).発色基質、7).反応停止液が含まれてもよい。

## 【0026】

体液中のチトクロムC濃度は、多臓器不全の指標として用いられるPRISM IIIスコアと良く相関し、チトクロムC濃度を測定することにより、SIRSで起こっている多臓器不全を客観的に評価することが可能である。

20

## 【0027】

特に、血清の場合にはチトクロムC濃度が10 ng/mlを超えると予後が悪く、チトクロムC濃度を測定することにより予後を予測することが可能である。

## 【0028】

## 【実施例】

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。％は、特記しない限り質量％である。

30

## 【0029】

## 【参考例1】

チトクロムCのELISAによる測定

チトクロムCの測定法は、以下の手順で実施する。

## 【0030】

## 1).抗チトクロムC抗体の精製

ラットのチトクロムC(シグマ社)をウサギに免疫し、チトクロムCに対する抗血清を得る。その抗血清に最終濃度2 Mになるように硫酸を添加し、室温(20~30 )で5時間攪拌する。攪拌した溶液を10000回転で30分遠心し上清を捨て、沈殿物を0.1 Mリン緩衝液pH 7.2で溶解後、同一緩衝液に対して透析する。透析した溶液は、CNBr-Sepharose 4B(ファルマシア社)にウシのチトクロムCを結合させて得たカラムに流す。0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5でカラムを洗浄後、0.1 M塩酸グアニジンで抗チトクロムC抗体を溶出し、0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5に対して透析し抗体(IgG)精製物とする。

40

## 【0031】

2).チトクロムC F(ab')<sub>2</sub>の調製

精製したIgGを0.1 M酢酸緩衝液pH 4.2に対して透析する。透析したIgG溶液にペプシン(シグマ社)を質量濃度比で20:1の割合になるように加え、37 で16時間反応させる。反応後の溶液のpHを1 N NaOHで7.5に調整した後、0.15 M NaClを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5で平衡化したSephacryl S-200(ファルマシア社)カラムでゲル濾過を行う。ゲル

50

濾過したフラクションの第一ピークを集め、濃縮し抗チトクロムC抗体 F(ab')<sub>2</sub>液とする。

【0032】

3). 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗チトクロムC F(ab')<sub>2</sub>抗体の作製

4 mg/mlに調整したHRP(東洋紡)の1 mlに0.1 Mメタ過ヨウ素酸ナトリウムを60 μl加え、室温(20~30 )で20分攪拌後、0.001 M酢酸緩衝液pH 4.4に対して透析する。透析後、0.2 M炭酸ナトリウム液でpH 9.0~9.5に調整する。この溶液に0.1 M炭酸緩衝液pH 9.5に対して透析したチトクロムC F(ab')<sub>2</sub>溶液4 mg/mlを加え、室温(20~30 )で2時間攪拌する。4 mg/mlに調整した水素化ホウ素ナトリウム液を50 μl加え、4 で2時間攪拌後、16時間静置保存する。この溶液を0.15 M NaClを含むリン酸緩衝液 pH 7.2で透析後、Sephacryl S-200(ファルマシア社)カラムでゲル濾過を行う。ゲル濾過したフラクションの第一ピークを集め、25% ウサギ血清(日本生物材料)を含む0.2 Mリン酸二ナトリウム緩衝液pH 5.4で希釈し、HRP標識抗チトクロムC抗体 F(ab')<sub>2</sub>液(標識抗体液)とする。

10

【0033】

4). 抗チトクロムC抗体固相化カップの作製

上記1)で得られたIgG精製物を、0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5で吸光度0.1に調整する。この抗体溶液を、ポリスチレンカップに100 μl注入し4 で16時間反応後、EIA法専用洗浄機によって0.15 M NaCl及び0.01% Tween 20を含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5で3回(各4秒間)洗浄する。洗浄したカップに0.5% ウシアルブミンを含む0.01 Mトリス塩酸緩衝液pH 7.5を200 μl加え、再度4 で16時間反応させ固相化カップとする。

20

【0034】

5). 標準抗原の調製

ラットのチトクロムC(シグマ社)を2% BSA、0.01 M EDTA 2Na、0.1% NaN<sub>3</sub>、0.01% Tween 20及び0.15 M NaClを含む0.05 Mトリス緩衝液pH 7.5で50 ng/ml~0.05 ng/mlの希釈液を作製する。

【0035】

6). 測定

抗チトクロムC抗体を固相化したカップ中のウシアルブミン液を吸い取り、全カップに2% BSA、0.01 M EDTA 2Na、0.1% NaN<sub>3</sub>、0.01% Tween 20及び0.15 M NaClを含む0.05 Mトリス緩衝液pH 7.5を50 μl注入する。そのカップに標準抗原希釈液及び検体を50 μl加え、室温(20~30 )で1時間反応させる。反応後、EIA専用洗浄機を用い0.01% Tween 20、0.0015 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル及び0.005% 2-クロロアセトアミドを含む0.005 Mトリス緩衝液pH 7.5で3回(各4秒間)洗浄する。洗浄後、標識抗体を100 μl加え室温(20~30 )で1時間反応させる。反応後、EIA専用洗浄機を用い0.01% Tween 20、0.15 M NaCl、0.0015% パラオキシ安息香酸メチル及び0.005% 2-クロロアセトアミドを含む0.005 Mトリス緩衝液pH 7.5で3回(各4秒間)洗浄する。洗浄後、1.5 mg/mlのABTS(2,2-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)を含む0.1 M クエン酸緩衝液pH 4.2を100 μl加え室温(20~30 )で1時間反応させ、0.013% NaN<sub>3</sub>液を100 μl加え反応を停止する。発色した溶液の405nmの吸光度を分光光度計で測定する。

30

【0036】

7). 標準抗原曲線の特性

各濃度のチトクロムC及び検体の吸光度値からブランクの吸光度値を引く。横軸に標準抗原濃度、縦軸に標準抗原の吸光度をプロットし、標準曲線を描く。その標準抗原曲線を基に、検体中に含まれるチトクロムC量を計算する。

40

【0037】

【実施例1】

SIRSの患者血清中のチトクロムCの定量

参考例1に記載したチトクロムCのELISA系を用いて、SIRSのHPS、敗血症、熱傷、急性膵炎及び外科手術後の患者ならびに健常人の血清中チトクロムC濃度を測定した。

【0038】

50

その結果、表 1 に示す通り、健常人15人では全て陰性 (< 0.05 ng/ml) であったが、HPSでは13例中13例 (100%)、敗血症では8例中8例 (100%)、熱傷では6例中4例 (67%)、急性膵炎では9例中9例 (100%)、外科手術後では8例中6例 (75%) が陽性であった。

【 0 0 3 9 】

【 表 1 】

SIRS患者血清中のチトクロムC濃度

疾患名	血清中チトクロムC濃度 (ng/ml)				
HSP	38.0	22.0	19.0	18.8	16.5
	7.2	4.3	3.6	2.9	2.7
	2.1	1.2	1.1		
敗血症	7.6	19.0	17.0	5.4	17.0
	16.0	18.0	11.0		
熱傷	0.39	1.2	0.6	2.5	< 0.05
	< 0.05				
急性膵炎	36.0	175.0	58.0	30.0	14.0
	16.5	170.0	420.0	13.5	
外科手術後	0.23	7.0	0.24	3.1	< 0.05
	< 0.05	0.18	0.3		

\* : 健常人 15 人は全て検出限界以下 (< 0.05 ng/ml) であった。

【 0 0 4 0 】

またHPSでは、血清中チトクロムC濃度が10 ng/ml以上であった5例中4例 (80%) が死亡したのに対し、10 ng/ml未満であった8例中に死亡例は無く (0%)、血清中チトクロムC濃度が10 ng/ml以上の患者で予後が悪いことが示された。

【 0 0 4 1 】

【 実施例 2 】

SIRS患者血清中のチトクロムC測定値と多臓器不全スコアの相関 SIRSの患者12人に関し、多臓器不全のスコアPRISM IIIをPollack MMらの報告 (Crit Care Med 24: 743-752, 1996) に従って算定し、血清中チトクロムC濃度との相関を調べた。

【 0 0 4 2 】

その結果、図 1 に示す通りチトクロムC濃度はPRISM IIIスコアと良く相関し、チトクロムC濃度が多臓器不全の客観的な指標として有用であることが示された。

【 0 0 4 3 】

【 発明の効果 】

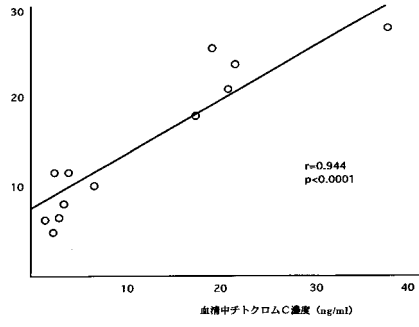
チトクロムCの測定が、SIRSの多臓器不全の検査、予後の予測に有用であることが明らかにされた。したがって、SIRSにおける多臓器不全を検査する、簡便で感度・定量性に優れた検査試薬及び検査方法が提供される。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 SIRS患者血清中のチトクロムC測定値と多臓器不全スコアの相関を示す。

【 1】

多嚢胎不全スコア  
(FRISM III score)



---

フロントページの続き

- (72)発明者 布井 博幸  
宮崎県宮崎市学園木花台北2丁目5-2
- (72)発明者 渡辺 啓祐  
茨城県つくば市吉沼3495-7

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 国際公開第98/002579(WO, A1)  
国際公開第01/035093(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	通过细胞色素C测量测试SIRS中多器官衰竭的试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP3896303B2</a>	公开(公告)日	2007-03-22
申请号	JP2002129478	申请日	2002-05-01
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
[标]发明人	遠藤 文夫 足立 尚登 布井 博幸 渡辺 啓祐		
发明人	遠藤 文夫 足立 尚登 布井 博幸 渡辺 啓祐		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB30 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/FB12		
代理人(译)	川口 义行 远山 勉		
优先权	2001138369 2001-05-09 JP		
其他公开文献	JP2003028860A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种试剂和一种检查方法，其中简单地检查SIRS中的多器官衰竭，具有优异的灵敏度和优异的定量性。解决方案：使用诸如血清等体液中的细胞色素C量作为由SIRS引起的多器官衰竭的指标。

【 図 1 】

