

(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 - 96100

(P2003 - 96100A)

(43)公開日 平成15年4月3日(2003.4.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 0 7 K 16/28		C 0 7 K 16/28	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	V 4 H 0 4 5
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	ZNA A
	ZNA		A

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 数)

(21)出願番号 特願2001 - 296133(P2001 - 296133)

(22)出願日 平成13年9月27日(2001.9.27)

(71)出願人 597067493

株式会社アムサイト

神奈川県横浜市緑区長津田町5800番地3

(71)出願人 501378778

有限会社バイオエラスチックスジャパン

神奈川県横浜市緑区鴨居6 - 11 - 20

(72)発明者 広瀬 慎一

神奈川県横浜市旭区柏町5 - 8

(72)発明者 伊勢 裕彦

長野県松本市岡田下岡田22 - 1 荒川ハイツ
107号

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗アジア口糖タンパク質レセプター抗体

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 肝炎、肝硬変等の各種肝疾患、又はこれらに伴う外科手術後の経過観察のための試薬等を提供する。

【解決手段】 肝細胞から精製したアジア口糖タンパク質レセプター、または既知の遺伝子配列より遺伝子工学的に作製した抗原タンパク質を動物に免疫して、抗アジア口糖タンパク質レセプター抗体を調製した。この抗体を用いて、血液サンプル中のアジア口糖タンパク質レセプターを測定する試験方法である。またこの測定キットを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝炎、肝硬変等の各種肝疾患、又はこれらに伴う外科手術後の経過観察のための抗アジアロ糖タンパク質レセプター抗体。

【請求項2】 採取した血液と請求項1の抗体とを接触させる工程を含む、血漿中アジアロ糖タンパク質レセプター濃度の測定方法。

【請求項3】 請求項1の抗体を含む、採取した血液中のアジアロ糖タンパク質レセプターを測定するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、肝炎、肝硬変等の各種肝疾患、又はこれらに伴う外科手術後の経過観察のための抗アジアロ糖タンパク質レセプター抗体、採取した血液中のアジアロ糖タンパク質レセプターを測定するための試験方法及びこの測定に用いるキットに関する。

【0002】

【従来の技術】肝炎、肝硬変等の各種肝疾患、又はこれに伴う外科手術後の経過観察のための方法としては、アジアロ糖タンパク質レセプターのリガンドを用いるアジアロシンチグラフィ、超音波や磁気を用いる診断、臨床検査等が知られている。

【0003】アジアロ糖タンパク質は、シアル酸を含む糖タンパク質からシアル酸を取り除いたものをいう。血清中の糖タンパク質が血流中に安定に存在するためにはシアル酸を必要とするため、シアル酸を欠いた血清中の糖タンパク質は、肝細胞表面のガラクトースに特異的なレクチンに結合したのち、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リソソーム顆粒内で分解されることが知られている (Sawamura T. et al. (1984) *Gasterology* 87, 1217-1221)。

【0004】肝細胞表面には、アジアロ糖タンパク質に対する受容体 (アジアロ糖タンパク質レセプター) が存在し、リガンドであるアジアロ糖タンパク質のガラクトース残基を認識して肝細胞内に取り込む。そこで、アジアロ糖タンパク質と生理的に同じ挙動を示す人工糖タンパク質であるガラクトシルヒト血清アルブミンを^{99m}Tcで標識して体内に投与すると、肝細胞量を反映する情報 (機能診断) と肝細胞の分布を反映した肝臓の形態に関する情報 (形態診断) が得られる。このシンチグラフィをアジアロシンチグラフィと呼び、肝炎、肝硬変等の各種肝疾患の経過観察に利用されている (Kudo M et al. (1990) *Am. J. Gastroenterol.* 85, 1142-1148、Kudo M. et al. (1991) *J. Nucl. Med.* 32, 1177-1182)。

【0005】アジアロシンチグラフィの問題点としては、患者に放射性物質を投与する必要があることから、使用可能な施設が特定されること、また得られる情報が明瞭でないこと、さらに病状によっては、肝臓における

薬剤の取り込みが低下することがある。

【0006】超音波診断、CTスキャン、MRI (核磁気共鳴画像法) は、超音波や磁気を用いることによって非侵襲的な診断が可能であり、CTスキャンやMRIでは、明瞭な像が得られるが、直接肝臓の状態を判断することができるデータを得ることはできない。また、疾患によっては、造影剤の投与を必要とし、軽微であっても副作用の心配がある。

【0007】臨床検査による肝機能測定は、患者の血液を採取し、基質と反応させることによって肝臓に特異的とされている酵素、例えば、GPT、GOT、LDHを定量する方法である。しかし、これらの指標は、肝臓という臓器の障害度の指標とはなるものの、原疾患の直接の判定には不向きである。

【0008】発明者は、既に肝実質細胞に対する人工培養基質であるPVL A (ポリ-p-ビニルベンジル-O-b-D-ガラクトピラノシル-[1・4]-D-グルコンアミド)を開発している (Watanabe Y et al. (2000) *J. Biomaterial Sci. Polymer Edn.*, 11, 833-848)。実験室レベルでは、このPVL Aを用いることによって、肝実質細胞は、本来の肝機能を維持できることが知られている。PVL Aと肝実質細胞との相互作用は、上記のアジアロ糖タンパク質レセプターを介したものであり、この基質に接着することができる細胞は、非接着細胞に比べると分化能が高いと考えられる (Kobayashi A et al. (1994) *J. Biomaterial Sci. Polymer Edn.* 6, 325-342、Takei R et al. (1997) *Tissue Engineering*, 3, 281-288、Ise H. and Akaike T. (1999) *Hepatology* 30, 258A、Kobayashi K et al. (1985) *Polymer J.* 17, 567-575)。

【0009】この点に関して、増殖性を有する細胞は、PVL Aに対する接着性が低下することに注目して、動物個体を用いて血中のアジアロ糖タンパク質レセプターの検出を試みた。その結果、アジアロ糖タンパク質レセプターの血中濃度は、正常状態においては、極めて低いが、部分肝切除後の肝再生状態や四塩化炭素を投与したモデル肝障害においては、顕著に増加していること、特に、部分肝切除後の血液中的アジアロ糖タンパク質レセプターの濃度については、肝再生の状態に伴って変化することを発見し、本発明を完成した。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、肝炎、肝硬変等の各種肝疾患、又はこれらに伴う外科手術後の経過観察のための抗アジアロ糖タンパク質レセプター抗体、採取した血液中の血漿中アジアロ糖タンパク質レセプター濃度の測定方法及びこの測定に用いるキットを提供する。

【0011】

【課題を解決するための手段】したがって、本発明は、肝炎、肝硬変等の各種肝疾患、又はこれらに伴う外科手

術後の経過観察のための抗アシア口糖タンパク質レセプター抗体に関する。

【0012】抗アシア口糖タンパク質レセプター抗体は、肝細胞から分離、精製したアシア口糖タンパク質レセプター、または既知の遺伝子配列より遺伝子工学的に作成した抗原タンパク質をやぎ、ウサギ等の動物に免疫し、血清を採取（抗血清）し、IgGの精製（ポリクローナル抗体）を行ったもの、あるいは免疫動物から胸腺、脾臓、リンパ節を摘出し、ミエローマ細胞との融合から抗原特異的な抗体を産出するハイブリドーマの培養上清を精製したもの（モノクローナル抗体）をさす。

【0013】また本発明は、採取した血液と抗アシア口糖タンパク質レセプター抗体とを接触させることを含む、採取した血液中のアシア口糖タンパク質レセプターを測定するための試験方法にも関する。

【0014】血液中のアシア口糖タンパク質レセプターを、抗アシア口糖タンパク質レセプター抗体を用いる抗原抗体反応を利用して検出する方法としては、ウェスタンブロット、ELISA等の方法が挙げられる。

【0015】ウェスタンブロット法は、例えば、遺伝子・タンパク質 実験操作方法プロット法（ソフトサイエンス社（1987年）236-241）に記載されているような周知の方法を用いることができる。要約すると一般的に用いる場合は、ポリアクリルアミド電気泳動（SDSを含むものと含まないものがある）を行い、ニトロセルロース膜等に転写する。転写終了後酵素免疫学的なタンパク質の検出を行う。5%BSA-PBS pH7.2で転写膜をブロッキング（2時間～一晚インキュベート）し、5%BSA-PBSで希釈一次抗体をマウント（30分～2時間インキュベート）したのち、0.1%Tween20-PBSで洗浄する。5%BSA-PBSで希釈したペルオキシターゼ標識二次抗体を同操作方法でマウント（60分程度インキュベート）し、0.1%Tween20-PBSで洗浄。最後に、ペルオキシターゼ用発色液に転写膜を浸漬させ発色させる（5分程度）。発色バンドの検出はX線フィルムや蛍光イメージアナライザ等により像として結果を得ることが可能である。

【0016】ELISA法は、例えば、酵素免疫測定法（蛋白質・核酸・酵素 別冊3）（共立出版（1987年）74-79）に記載されているような周知の方法を用いることができる。要約すると一般的には、ELISA用96穴イムノプレートの各穴に、標的となる試料蛋白質溶液（50μg/ml）を50μl/穴ずつ分注し、4にて一晚放置する。0.05%Tween20添加PBS（TPBS）にて洗浄した後、5%ウシ血清アルブミン（BSA）溶液を100μl/穴ずつ加えて、室温で1時間ブロッキングを行う。TPBSで洗浄した後、適宜希釈したモノクローナル抗体を50μl/穴ずつ加え、室温にて45分間反応させる。再び、TPBSにて*

洗浄した後、ペルオキシターゼ標識された特異的抗体を50μl/穴ずつ分注し、室温にて30分～2時間反応させる。さらに、TPBSにて洗浄した後、0.4mg/ml o-フェニレンジアミンを基質として用い発色させ、マイクロプレートリーダーにより、492nmの波長で吸光度を測定する。

【0017】さらに、本発明は、上記の抗体を含む、採取した血液中のアシア口糖タンパク質レセプターを測定するためのキットにも関する。このキットには、例えば、ウェスタンブロット法を用いる場合には、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用（SDS-PAGE）用装置、PAGEからニトロセルロース膜等に転写する装置、泳動用ガラス板1ないし2組、ニトロセルロース膜等、緩衝液（1リットル中にTris 3g、グリシン14.4g、メタノール 200mlを含む。PH8.3）、マイクロスパーテル、免疫電気泳動用ガラス板、トレイ、定規、マイクロタイター用振とう器、0.5%Tween20-PBS pH7.2、0.1%アミドブラック、3%ウシアルブミン-PBS pH7.2、7%酢酸（アミドブラック脱色用）、一次抗体、ペルオキシターゼ標識二次抗体、ペルオキシターゼ発色液、湿潤箱等の一部あるいは全てを含むものとする。

【0018】ELISA法を用いる場合には、ELISA用プレートリーダー装置、96穴ELISA用イムノプレート、0.5%Tween20添加PBS、5%ウシ血清アルブミン（BSA）、一次抗体、ペルオキシターゼ標識された二次抗体、発色液（クエン酸緩衝液 20ml、o-フェニレンジアミン 8mg、過酸化水素水5μl）、停止液（8N-H₂SO₄）等の一部あるいは全てを含むものとする。

【0019】

【実施例】1.ウサギ抗アシア口糖タンパク質レセプター抗体の調製

本発明に用いた抗体は、すでにクローニングされたMHL-1遺伝子のcDNAの組み込まれたPT7T3/18uクローニングベクターより

プライマー1 5'-CGCTCGAG GATCTGCTGGCTCTAAGGCAG-3'
 プライマー2 5'-CGGGATCC CATGTCCTACCCAGTTATC -3'

BamHI

の配列を持つプライマー（R Takazawa, K Shinzawa, et al Biochem.Biophys.Acta1172,220(1993)）にて、MHL-1の細胞外ドメイン遺伝子を増幅後、pET-14bベクターへ組み入れ、大腸菌に導入後IPTG（イソプロピルチオガラクトシド）を誘導剤として4時間刺激した。このとき得られた大腸菌の破砕物より、ニッケルカラムにて精製後（このタンパクは6つのHisをタグに持つ）PBS透析によりタンパク溶液とした。ウサギ（ニュージーランドホワイト、雌、8週令、日本チャールズリバー）に精製したタンパク溶液を完全フロイントア

ジュバンド(和光純薬)に混合しエマルジョンを作製し、約500 μ lを皮下に投与した。免疫原のタンパク量は、1mg程度である。その後、毎週同量を皮下投与し、最終免疫は採血3日前に免疫原タンパク量も3mgとした。採血を行った後、37 $^{\circ}$ C 30分間インキュベーションを行い、一晩4 $^{\circ}$ Cで血液を凝固させた。その後、上清部分を回収、遠心を、行い沈殿物を除き0.22 μ mのフィルターを通して抗血清とし、ELISAを用いて抗体価を測定し確認した。

【0020】現在、アジア口糖タンパク質レセプターの抗体は、第一化学薬品のものが販売されているが、この抗体はヒトアジア口糖タンパク質レセプターを認識するモノクローナル抗体である。そして、ラビット、ラット、マウスに交差性を示すことが報告されているが、マウスやラットの免疫組織染色では検出不可能であった。また、本発明における目的を達成することはできなかった。

【0021】2. ウェスタンブロットによるアジア口糖タンパク質レセプターの検出

検体動物より血液を採取し、室温にて30分放置により血餅を形成後、遠心分離(3000回転、15分間)により血漿を得た。この血漿をリン酸緩衝液にて25倍に希釈し、2倍濃度の電気泳動用サンプル調製液にて、血漿と等量混合の後、メルカプトエタノールを12%となるように添加し、沸水(95 $^{\circ}$ C以上)で5分間加熱した。加熱後は速やかに氷冷し、これを電気泳動サンプルとした。12%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動(200V.Lammini緩衝液 45分)し、サンプルは、各10マイクロリットルを用いた(このときのタンパク質量は約5マイクログラムであった)。電気泳動の終了後、ゲルを取り出し、転写用緩衝液(緩衝液1lあたり、Tris 14.41g、グリシン 12.11g、メタノール 20%(v/v))にて平衡化し、泳動されたタンパク質をメタノールにて親水化したPVDf製の膜へと転写した。転写条件は、75mA、90分であった。転写した膜を、0.1%Tween 20含リン酸緩衝液で3回洗浄し、5%ウシ血清アルブミン含リン酸緩衝液にて2時間以上ブロッキングした。ブロッキング後の膜を、上記の0.1%Tween 20含有リン酸緩衝液にて3回洗浄し、5%ウシ血清アルブミン含リン酸緩衝液にて2500倍に希釈したウサギ抗アジア口糖タンパク質レセプター抗体を2時間作用させた。次いで、0.1%Tween 20含リン酸緩衝液で3回洗浄し、20,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ抗体を1時間反応させた。このようにして操作したPVDf膜を、0.1%Tween 20含リン酸緩衝液で3回洗浄し、発色基質(ECL:ファルマシア製)と反応させ、得られた蛍光をX線フィルムに30秒~10分間感光させた。

【0022】3. 動物個体(ラット、SD雄 施術時

7週齢 日本エスエルシー)に、ジエチルエーテルで麻醉し、ヒンギス、アンダーソンらの記述(Higgins GM, and Anderson RM. (1931) Arch. Pathol. 12, 186-202. [Experimental pathology of the liver.])をもとに2/3部分肝切除術(PH: partial hepatectomy)を施すことによって肝再生を誘導し、経時的(1~28日後)に肝細胞を採取した(Seglen PO. (1976) Methods Cell Biol. 13, 29-83 [Preparation of isolated rat liver cells.] Dalet C, Fehlmann M, and Debey P. (1982) Anal. Biochem. 122, 119-123. [Use of percoll density gradient centrifugation for preparing isolated rat hepatocytes having long-term viability.])。この肝細胞と肝実質細胞に対する人工培養基質であるPVL A(シャーレにPVL A水溶液100ng/mLにて一晩コートした後、0.1%BSA含PBSにて2時間以上ブロッキングをおこなった。)との相互作用を、肝細胞の接着率を指標として調べた。

【0023】接着細胞率は、部分肝切除術後7日まで経時的に減少し、術後7日を最低としてその後回復に転じ、術後28日では対照群と同レベルまで回復した。術後7日の肝細胞は、無処理ラットの肝細胞と比べると人工基質PVL Aに対する接着率(認識力)が約30%低下した(図1)。PVL Aと肝実質細胞との相互作用は、アジア口糖タンパク質レセプターを介したものであることから、この基質に接着することができる細胞は、非接着細胞に比べると分化能が高いと考えられた。

【0024】4. 肝再生モデル動物における血漿中アジア口糖タンパク質レセプターの経時変化

ラットに部分肝切除術を行い、その1、2、3、7、14、21及び28日後に血液を採取し、血漿中のアジア口糖タンパク質レセプターをウェスタンブロット法によって検出した。血漿は25倍に希釈して用いた。部分肝切除群では、アジア口糖タンパク質レセプターの検出量は、部分肝切除術後7日まで経時的に増加(無処理群の2.43倍)し、術後7日を頂点としてその後減少に転じ、術後28日では無処理群と同レベルまで減少した。これに対して、肝臓の切除を行わない擬似手術群では、アジア口糖タンパク質レセプターの検出量は、無処理群と比べた変化は認められなかった。一方、ELISAの応用による血中のアジア口糖タンパク質の測定によれば、肝再生に伴う負の相関、すなわちアジア口糖タンパク質レセプターが肝細胞表面において発現が減少すると、本来基質となるアジア口糖タンパク質は血中に増加する。

【0025】代償性肥大による肝再生とアジア口糖タンパク質レセプターの血漿中濃度との関連を調べるために、四塩化炭素(腹腔内投与 CCl₄相当量として、1.5ml/kg・Bwt 20%CCl₄オリーブ油溶液)を投与した急性肝不全モデルラット及び先天性高ビリルビン血症ラット(雄Gunnラット 日本エスエルシー 検体は2

0週齢)を用いてそれぞれの血漿中アシアロ糖タンパク質レセプターを検索した。その結果、両者の血漿中からアシアロ糖タンパク質レセプターが検出された(図3)。

【0026】これらの結果は、肝臓分化のマーカーとされるアシアロ糖タンパク質レセプターは、肝再生という増殖過程においては、細胞外に放出され、血液中に遊離し、その血漿中濃度が増加し、反対に増殖の終息に伴って、この放出が低減され、血液中に遊離せず、血漿中濃度が減少することを示している。

【0027】また、上記3種類のモデルにおける肝再生は、代償性肥大によるものである点で共通している。したがって、肝臓に何らかの障害による代償性肥大が生じた場合に、アシアロ糖タンパク質レセプターの血漿中濃度が変動する、すなわち、血漿からのアシアロ糖タンパク質レセプターの検出は、肝臓の状態の指標として有効であると考えられる。

【0028】本発明の抗体を用いることによって、患者に対する侵襲的負担を軽減することができ、そして簡便かつ的確なデータを提供することもできる。また、上記診断は、肝疾患の総体的な兆候を見出すものではなく、*

*肝細胞の生物学的活性を直接的に判断することから、肝臓の状態を判断するためには、最も適切なデータを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

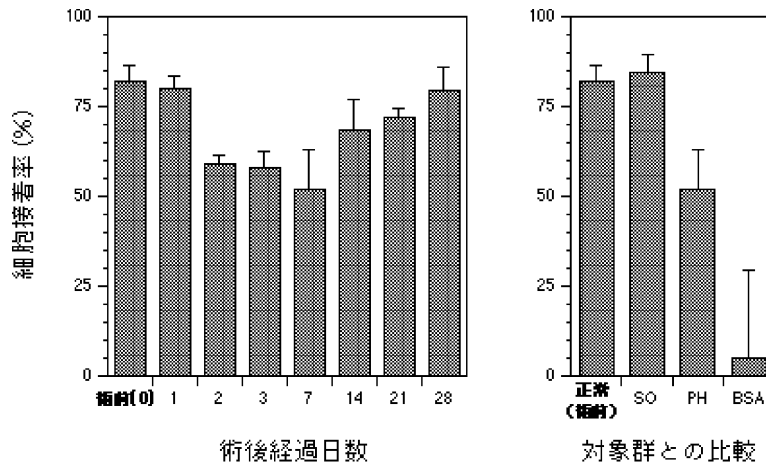
【図1】図1は、部分肝切除術後の人工基質PVL Aに対する接着性の経時変化を示す。PHは、部分肝切除(Partial Hepatectomy)7日後を表し、SOは、擬似手術(sham operation)7日後を表し、BSAは、0.1%ウシ血清アルブミンを含むPBS溶液コートを表し、Norは、正常を表す。

【図2】図2は、肝再生モデル動物における血漿中アシアロ糖タンパク質レセプターの経時変化を示す。上段は、部分肝切除群、下段は対照群(間切除をしない擬似手術群: sham operation)である。両断ともに、左端は、正常(無処理)個体である。

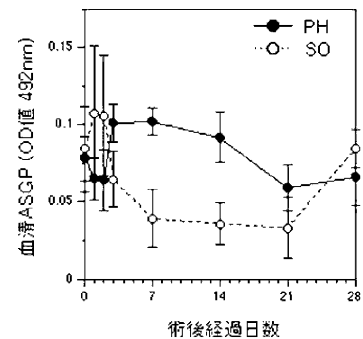
【図3】図3は、肝疾患モデル動物(部分肝切除)の血漿中のアシアロ糖タンパク質レセプターの検出を示す。

【図4】図4は、肝疾患モデル動物(急性肝不全モデルラット及び先天性高ビリルビン血症ラット)の血漿中のアシアロ糖タンパク質レセプターの検出を示す。

【図1】



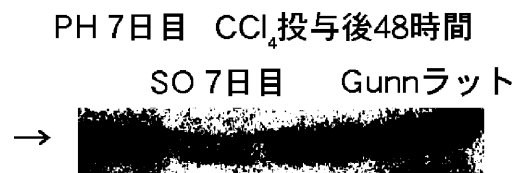
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 伊勢 裕彦
長野県松本市岡田下岡田22 - 1 荒川ハイ
ツ107号

(72)発明者 赤池 敏宏
東京都西東京市下保谷4 - 15 - 23
Fターム(参考) 4B024 AA11 BA61 CA01 DA06 HA11
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA51
FA74

专利名称(译)	抗脱唾液酸糖蛋白受体抗体		
公开(公告)号	JP2003096100A	公开(公告)日	2003-04-03
申请号	JP2001296133	申请日	2001-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	上午现场 生物希腊小鸡日本		
申请(专利权)人(译)	上午公司网站 有限公司生物希腊小鸡日本		
[标]发明人	広瀬慎一 伊勢裕彦 赤池敏宏		
发明人	広瀬 慎一 伊勢 裕彦 赤池 敏宏		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N15/09		
FI分类号	C07K16/28 G01N33/53.V C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/HA11 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA51 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 提供用于观察各种肝病例如肝炎, 肝硬化等的试剂, 或提供与之相关的手术后的后续观察的试剂。通过用从肝细胞中纯化的去唾液酸糖蛋白受体或从已知基因序列遗传改造的抗原蛋白对动物进行免疫, 可以制备出抗亚唾液酸糖蛋白受体抗体。一种使用该抗体测量血液样品中去唾液酸糖蛋白受体的测试方法。我们还提供此测量套件。

【図3】

