

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3561218号
(P3561218)

(45) 発行日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(24) 登録日 平成16年6月4日(2004.6.4)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/53
GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/53 W
GO 1 N 33/543 5 O 1 A

請求項の数 5 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2000-242345 (P2000-242345) (22) 出願日 平成12年8月10日 (2000.8.10) (65) 公開番号 特開2002-55106 (P2002-55106A) (43) 公開日 平成14年2月20日 (2002.2.20) 審査請求日 平成14年3月20日 (2002.3.20)</p>	<p>(73) 特許権者 000141875 株式会社いかがく 京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地 (74) 代理人 100085316 弁理士 福島 三雄 (74) 代理人 100100376 弁理士 野中 誠一 (74) 代理人 100110685 弁理士 小山 方宜 (72) 発明者 内田 壺夫 京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地 株式会社いかがく内 審査官 宮澤 浩</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動脈硬化性病変の診断用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液中のアポB100を有するリポ蛋白もしくはアポB100を有するリポ蛋白が変性されてなる変性リポ蛋白と、
 高比重リポ蛋白(HDL)の構成蛋白との複合体を測定対象にすることを特徴とする動脈硬化性病変の診断用キット。

【請求項2】

血液中のアポB100を有するリポ蛋白もしくはアポB100を有するリポ蛋白が変性されてなる変性リポ蛋白と、
 アポA1との複合体、アポC3との複合体、又はserum amyloid A1(SAA-1)もしくはパラオキシネースとの複合体を測定対象にすることを特徴とする請求項1に記載の動脈硬化性病変の診断用キット。

【請求項3】

免疫学的方法により、血液中のアポB100を有するリポ蛋白もしくはアポB100を有するリポ蛋白が変性されてなる変性リポ蛋白と高比重リポ蛋白(HDL)の構成蛋白との複合体を測定することを特徴とする請求項1又2に記載の動脈硬化性病変の診断用キット。

【請求項4】

血清又は血漿を試料としてデキルトラン硫酸/カルシウムイオン沈澱法で得たVLDL、LDL画分中に存在する、アポB100を有するリポ蛋白もしくはアポB100を有する蛋白が変性されてなる変性リポ蛋白と高比重リポ蛋白の構成蛋白との複合体を測定することを特徴とする請

求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の動脈硬化性病変の診断用キット。

【請求項 5】

抗ヒトアポA1抗体、抗ヒトアポC3抗体、抗ヒトSAA1抗体、又は抗ヒトパラオキシナーゼ抗体と、

抗ヒトアポB100抗体とを用いることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の動脈硬化性病変の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、血液中に存在するアポ蛋白 apoB100を有するリポ蛋白とHDLの構成蛋白との複合体に関するもので、具体的には、LDL(Lp(a)を含む)もしくは変性(酸化による変性など)LDL並びに、VLDL(レムナントVLDLやカイロミクロンレムナントなどを含む)もしくは変性VLDLとHDLの構成蛋白との複合体(動脈硬化惹起性リポ蛋白とHDLの構成蛋白との複合体)を測定することにより、動脈硬化性病変を診断するキットに関するものである。

10

【0002】

【発明が解決しようとする課題】

動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈および頸動脈に多く発生し、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。また、最近ではアルツハイマー病も動脈硬化症と関連性の大きい疾患であることがわかってきた。従来、血液中で、これらの生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する測定対象がなく、血清中あるいは血漿中のLDL、Lp(a)、レムナントリポ蛋白、Small, dense LDL、酸化LDLなど、LDLを主体とした血管壁脂質蓄積と関わりの深い、動脈硬化性病変に関わるリポ蛋白として測定されてきた。

20

【0003】

なかんずく、酸化LDLと粥状動脈硬化病変の進展との関連がスタインバーグ(Steinberg, D. et al. Engl. Med. 320: 915, 1989)により、一方、Rossらが提唱した傷害反応仮説(Ross, R. Nature. 362: 801, 1993)によって指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化LDLの関与が注目されてきた。

30

【0004】

しかし、最近の研究では酸化LDLのみならず酸化HDL(Nakajima, T et al. Biochem Biophys Biophys Res Commun. 217: 407, 1995)が動脈硬化症患者部に局在する事実、大村らは(大村寛敏, 他. 動脈硬化. 25: NO4, 126, 1997)冠動脈硬化症において、血清HDL中の過酸化脂質量が増大しているのを認め、動脈硬化の形成にHDLの酸化変性も関与していることを報告している。同様に楠美らは(楠美嘉晃, 他. 動脈硬化. 24: 327, 1996)動脈内膜に酸化等による変性Lp(a)が沈着しているのを認め、Lp(a)の動脈硬化進展機序に変性Lp(a)の関与の可能性を示している。

40

【0005】

また最近の疫学調査では、アルツハイマー病の発症の背景には動脈硬化があることが指摘されており(Kalaria, RN. Pharmacol & Ther. 72: 193, 1996)、リポ蛋白の酸化変性やapoEの表現型と動脈硬化症やアルツハイマー病の発症との関連が注目されている(Prem Kumar, DRD. et al. AM J Pathol. 148: 2083, 1996)。即ち、活性酸素によりVLDLが酸化修飾されてヘパリン結合性を失い、難溶性の沈澱を形成することによって脂質過酸化物が血管や神経組織に蓄積し、細胞を傷害することが予想されている。(平村和行, 他. Jpn J Electroph. 42: 27, 1998)。

【0006】

50

最近までは、動脈硬化の発症進展に関して、LDLに関する生化学的、分子生物学的研究の進歩が大きく、酸化LDLがatherogenicityの主役であることが強調されすぎているきらいがある。しかし、近年の研究の成果として、上述のごとく動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展への関与物質として、LDLのみでなく、HDL、Lp(a)、VLDLなど多種の酸化変性リポ蛋白が含まれることが明らかとなった。

【0007】

このような現状において、本発明者らは血液中に存在する変性LDLの検出が 特願平8-317162号、特願平11-109001号、特願平11-2027913号、特願2000-012210号に開示した手法によって可能であること、さらに変性HDLやVLDLの検出が 特願平11-24440号に開示した手法によって可能であることを 10

【0008】

上述のごとく、動脈硬化性病変の発症・進展に関わる要因が多様であることが判明するにつれ、本発明者らは、これら諸要因を個々に検出する手法を発見してきたが、これらの手法を臨床応用する場合には論理性、技術面で十分に活用できる状況にあるとはいえない。

【0009】

したがって本研究は、動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と深く関わる要因間の関連性を明らかにしたうえで、新規な検出方法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

LDLとならび、HDLは虚血性心疾患の主要な危険予知因子の一つであるとされている。欧米人と異なり、日本人の場合は冠動脈疾患患者のなかでLDLの上昇を示すものの割合が比較的少ない場合、リポ蛋白質側の危険因子として低HDL血症はむしろ高LDL血症よりも重要であるかも知れないとの指摘もある(横山信治, ホルモンと臨床, 48: 39, 2000)。即ち、血中HDLレベルと虚血性心疾患の発症頻度との間には負の相関があり、臨床疫学的にHDLの抗動脈硬化作用は明確であり、コレステロール逆転送系がHDLの抗動脈硬化作用に関係していると考えられてきた。 20

【0011】

しかし最近では、HDL上に存在するパラオキシネースと動脈硬化との関連が注目され、パラオキシネース自身がLDLの酸化を抑制することにより冠動脈硬化の進展を予防しているらしいことも分ってきた(Mackness, M, I., et al. F E B S Letters, 286: 152, 1991)。 30

【0012】

このような状況下で、本発明者らは、HDLの抗動脈硬化作用はHDLの方がLDLより酸化変性を受けやすい特性を有すること、HDL自身が酸化変性を受けると抗動脈硬化作用を失う事実を勘案すると、HDL分子そのものが抗酸化的に作用するのではないかと考えた。より具体的には動脈硬化病巣局部において酸化LDLとHDLが共存することは周知の事実であり(Mackness, B. et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 1233, 1997)、この場合生体にとって不都合な物質である酸化LDLの生成を防止すべくHDLがHDL/LDL複合体 40

【0013】

そこで、in vitroで正常なLDLとHDLを共存させて酸化したところ、HDLのアポ蛋白を構成するアポA1、アポC3、SAA1などがLDLに移行するかたちでHDL/LDL複合体を形成することによって、HDLがLDLの酸化変性を防止する仕組みを発見した。即ち、この現象は動脈硬化病巣部位における本質的なものと考えられるので、HDL/LDL複合体が血液中で検出できれば動脈硬化性病変を診断するうえで、優れたマーカーになると考えた。そしてその後、更なる研究と検討を繰り返した結果、循環血液中にアポB100を有するVLDL、IDL、LDLもしくは、これ等の変性したものがHDLを構成する蛋白と複合体を形成して存在する事実を発見して本発明に至った。 50

【0014】

なお、具体的には、本発明は、血液中のVLDL、LDLを超遠心法や、デキストラン硫酸とカルシウムイオンなどの化学物質を用いた沈澱法で分画したVLDL、LDLを試料として、抗ヒトアポA1、抗ヒトアポC3、抗ヒトアポE、抗ヒトSAA抗体、抗ヒトパラオキシネース抗体などのHDL中に含まれるアポ蛋白やその他の構成成分に対する抗体と抗ヒトアポB100抗体を反応させて血液中のアポB100を有するリポ蛋白もしくは変性したリポ蛋白とHDL構成蛋白との複合体を検出する方法である。

【0015】

【実施例】

以下、本発明について具体的に説明する。

10

[血清中の変性LDL(VLDL)/アポA1複合体の測定]

A. 試料の調製

1. デキストラン硫酸液(0.05M CaCl₂)1.5mlに対して血清50μlを添加し、混和した後室温で30分間放置する。
2. 3000rpmで15分間遠心し、上清をデカントで捨てる。
3. 1mlの2.5%NaCl溶液で沈澱を溶解し、この溶解液を試料とする。

【0016】

B. ELISAによる測定例

1. 抗ヒトアポA1抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に10μg/mlで溶解し、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。
2. 4下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1%ショ糖と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M、pH7.5で調製したTris-HCl緩衝液を100μl/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。
3. マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとRabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100μl/well分注し、これに上述の試料あるいは標準液を50μl添加する。
4. 室温下一晩反応させる。

20

30

【0017】

5. 0.005%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する
6. ビオチン標識Fab'化IgG-アポB100抗体を1%BSA溶液で1.6μg/mlとし、100μl/well分注する。
7. 37下1.5時間反応させる。
8. 5.と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。
9. HRP標識アビジンD(Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100μl/well分注する。

【0018】

10. 37下30分間反応させる。
11. 5.と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。
12. 発色試薬を100μl/well分注し、室温下30分間反応させる。
13. 1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応を停止する。
14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。
15. 人工的に調製した変性LDL/アポA1複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL(VLDL)/アポA1複合体濃度を算出する。

40

【0019】

[血清中の変性LDL(VLDL)/アポC3複合体の測定]

50

A. 試料の調製

1. デキストラン硫酸液 (0.05 M CaCl₂) 1.5 ml に対して血清 50 µl を添加し、混和した後室温で30分間放置する。
2. 3000 rpmで15分間遠心し、上清をデカントで捨てる。
3. 1 mlの2.5% NaCl溶液で沈澱を溶解し、この溶解液を試料とする。

【0020】

B. ELISAによる測定例

1. 抗ヒトアポC3抗体を0.05 M Tris-HCl、0.15 M NaCl pH 8.0緩衝液に10 µg/mlで溶解し、マイクロプレートに100 µl/wellで分注する。
2. 4 下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1%ショ糖と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05 M、pH 7.5で調製したTris-HCl緩衝液を100 µl/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250 µl/wellで3回洗浄する。
3. マイクロプレートに55 mg/ml Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulin含有1% BSA溶液を100 µl/well分注し、これに上述の試料あるいは標準液を50 µl添加する。
4. 室温下一晩反応させる。

10

【0021】

5. 0.005% Tween 20溶液250 µl/wellで5回洗浄する
6. ビオチン標識Fab'化IgG-アポB100抗体を1% BSA溶液で1.6 µg/mlとし、100 µl/well分注する。
7. 37 下1.5時間反応させる。
8. 5. と同様、0.005% Tween 20溶液250 µl/wellで5回洗浄する。
9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 µl/well分注する。

20

【0022】

10. 37 下30分間反応させる。
11. 5. と同様、0.005% Tween 20溶液250 µl/wellで5回洗浄する。
12. 発色試薬を100 µl/well分注し、室温下30分間反応させる。
13. 1 Mリン酸水溶液を100 µl/well分注し、反応を停止する。
14. 主波長450 nm、副波長620 nmで測光する。
15. 人工的に調製した変性LDL/アポC3複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL (VLDL)/アポC3複合体濃度を算出する。

30

【0023】

[血清中の変性LDL (VLDL)/SAA1複合体の測定]

A. 試料の調製

1. デキストラン硫酸液 (0.05 M CaCl₂) 1.5 ml に対して血清 50 µl を添加し、混和した後室温で30分間放置する。
2. 3000 rpmで15分間遠心し、上清をデカントで捨てる。
3. 1 mlの2.5% NaCl溶液で沈澱を溶解し、この溶解液を試料とする。

【0024】

B. ELISAによる測定例

1. 抗ヒト serum amyloid A1抗体を0.05 M Tris-HCl、0.15 M NaCl pH 8.0緩衝液に10 µg/mlで溶解し、マイクロプレートに100 µl/wellで分注する。
2. 4 下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1%ショ糖と牛血清アルブミ

40

50

ン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M、pH7.5で調製したTris-HCl緩衝液を100 μ l/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250 μ l/wellで3回洗浄する。

3. マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma Globulin とRabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100 μ l/well分注し、これに上述の試料あるいは標準液を50 μ l添加する。

【0025】

4. 室温下一晩反応させる。

5. 0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する

10

6. ビオチン標識Fab'化IgG-アポB100抗体を1%BSA溶液で1.6 μ g/mlとし、100 μ l/well分注する。

7. 37 $^{\circ}$ C下1.5時間反応させる。

8. 5. と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

9. HRP標識アビジンD(Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μ l/well分注する。

10. 37 $^{\circ}$ C下30分間反応させる。

【0026】

11. 5. と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

20

12. 発色試薬を100 μ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13. 1Mリン酸水溶液を100 μ l/well分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 人工的に調製した変性LDL/SAA1複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL(VLDL)/SAA1複合体濃度を算出する。

【0027】

[酸化によるLDLとHDLの複合体形成試験]

超遠心により調製したLDLとHDLを等量混和し、硫酸銅を終濃度10 μ Mの割合で加え、37 $^{\circ}$ Cで酸化反応を行った。その結果図1に示すごとく、HDLのアポ蛋白にのみ存在する

30

Serum amyloid A1が酸化反応を受けることによってLDL画分に移行した図1(B)。この時、ELISAによってもLDL/SAA1複合体が形成されていることが、確認された図1(D)。また、LDL-コレステロール値図1(C)、Fat Redによる脂質染色の結果からも酸化を受けることにより、HDLの量が減少する傾向が認められた図1(A)。

【0028】

[血清中のアポA1/アポB100複合体、アポC3/アポB100複合体、SAA1/アポB100複合体間の関係性]

健常者血清(n=40)、高脂血症患者血清(n=40)を用いて血清中のアポA1/アポB100複合体、アポC3/アポB100複合体、SAA1/アポB100複合体濃度間の関係性は図2に示すごとく良好な相関を示した。

40

【0029】

[血清中酸化LDLと各複合体濃度間の関係性]

上述と同じ血清を用いて、酸化LDLを測定し、各複合体と比較したところ、図3に示すごとく良好な相関を示した。

【0030】

[健常者群および高脂血症患者血清中の各種複合体濃度の比較]

上述と同じ血清を用いて測定した各種複合体濃度について健常者群、高脂血症患者群間の比較を行ったところ、いずれの複合体についても高脂血症患者群において高値であった(

50

図4)。

【0031】

[冠動脈硬化症患者血清中のアポA1 / アポB100複合体濃度]

健常者群と冠動脈硬化症患者血清中のアポA1 / アポB100複合体濃度を比較したところ図5に示すごとく冠動脈硬化症群において明らかな高値を示した。

【0032】

[高脂血症患者のアポB100含有リポ蛋白中に存在するアポA1の証明]

高脂血症患者の血清を試料として超遠心によって調製したアポB100含有リポ蛋白であるVLDL、IDL、LDL中のアポA1を抗ヒトアポA1抗体による免疫染色法によって調べた。

その結果、図6に示すごとくアポB100含有リポ蛋白であるVLDL、IDL、LDLのいずれの画分にもアポA1が認められた。

【図面の簡単な説明】

【図1】酸化によるLDLとHDLの複合体形成試験の結果を示すものである。

【図2】血清中のapoA1/apoB100複合体、apoC3/apoB100複合体、SAA1/apoB100複合体間の関係性を示したものである。

【図3】血清中の酸化LDL濃度と各種HDLアポ蛋白と変性LDLとの複合体間の関係性を示したものである。

【図4】健常者及び高脂血症者血清中の各種複合体濃度の比較を示すものである。

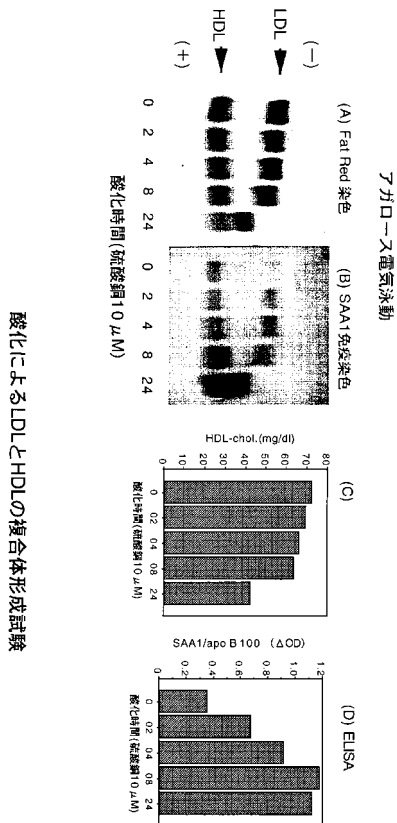
【図5】健常者及び冠動脈疾患患者血清中のアポA1 / アポB100複合体濃度を示すものである。

【図6】apoB100含有リポ蛋白中におけるapoA1の存在を示す図面である。

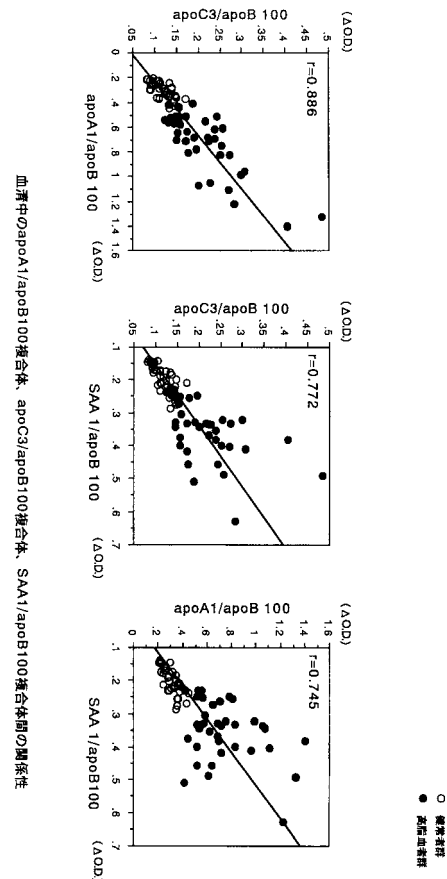
10

20

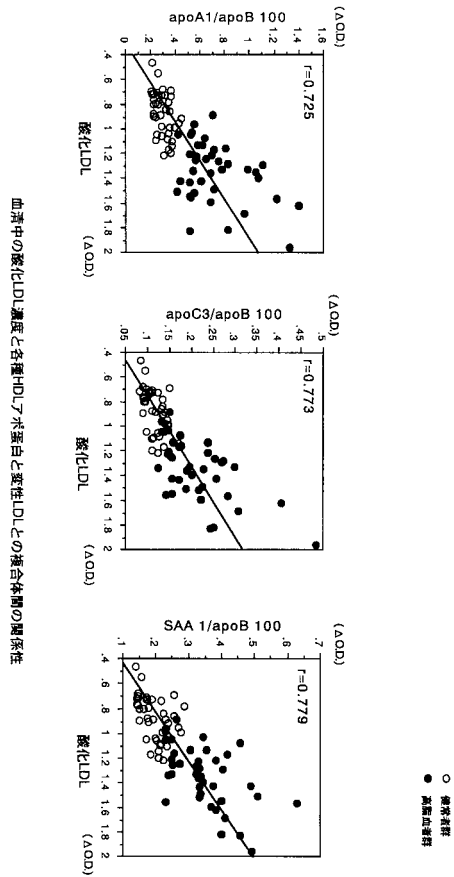
【図1】



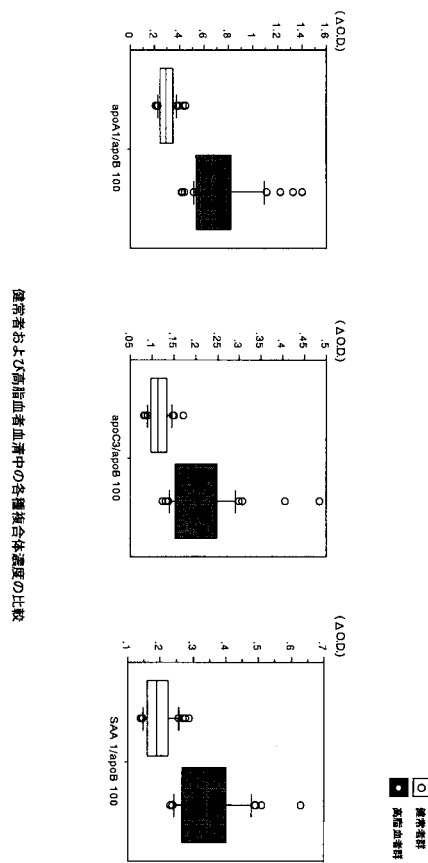
【図2】



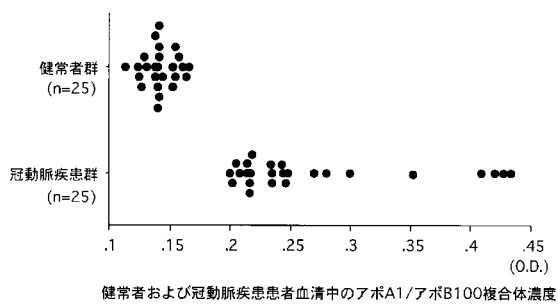
【 図 3 】



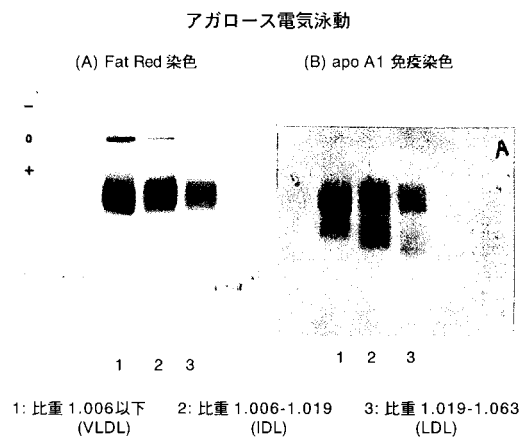
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



apoB100含有リポ蛋白中におけるapoA1存在の証明

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2000-333674(JP,A)
特開平09-033525(JP,A)
特開平04-104798(JP,A)
特開平02-242158(JP,A)
特開平08-178923(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
G01N 33/53
G01N 33/543 501

专利名称(译)	用于动脉硬化病变的诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP3561218B2	公开(公告)日	2004-09-02
申请号	JP2000242345	申请日	2000-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	IKAGAKU		
申请(专利权)人(译)	株式会社いかがく		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社いかがく		
[标]发明人	内田 壹夫		
发明人	内田 壹夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.W G01N33/543.501.A		
代理人(译)	福岛三雄 野精一 小山 方宜		
审查员(译)	宫泽浩		
其他公开文献	JP2002055106A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：在澄清与动脉硬化和阿尔茨海默病的发病和进展密切相关的因素之间的关系后，提供一种新的检测方法。 溶液：测量通过使血液中具有apo B 100的脂蛋白或具有apo B 100的脂蛋白和高密度脂蛋白（HDL）的组成蛋白质变性而获得的变性脂蛋白的复合物。

図 2

血清中apoA1/apoB100複合体、apoC3/apoB100複合体、SMA1/apoB100複合体中の脂質

