

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3989223号
(P3989223)

(45) 発行日 平成19年10月10日(2007.10.10)

(24) 登録日 平成19年7月27日(2007.7.27)

(51) Int. Cl.		F I		
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	W
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D

請求項の数 11 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2001-339937 (P2001-339937)	(73) 特許権者	000162478
(22) 出願日	平成13年11月5日(2001.11.5)		協和メデックス株式会社
(62) 分割の表示	特願平7-106153の分割		東京都中央区晴海一丁目8番10号
原出願日	平成7年4月28日(1995.4.28)	(74) 代理人	100072349
(65) 公開番号	特開2002-214234 (P2002-214234A)		弁理士 八田 幹雄
(43) 公開日	平成14年7月31日(2002.7.31)	(74) 代理人	100110995
審査請求日	平成14年1月22日(2002.1.22)		弁理士 奈良 泰男
		(74) 代理人	100114649
			弁理士 宇谷 勝幸
		(74) 代理人	100129126
			弁理士 藤田 健
		(74) 代理人	100130971
			弁理士 都祭 正則
		(74) 代理人	100134348
			弁理士 長谷川 俊弘

特許法第30条第1項適用 平成7年2月25日 日本
動脈硬化学会発行の「動脈硬化第2巻第8号」に発表

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 循環器系疾患の診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血漿中の酸化リポタンパク質を固相に直接固定化することなく、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体とリポタンパク質を認識する抗体とを用いて、血液成分中の各種の酸化リポタンパク質を別々に測定し、該測定値から循環器系疾患を評価することを特徴とする循環器系疾患の検査方法。

【請求項2】

リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体がホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原を認識するものである請求項1に記載の方法。

【請求項3】

リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体が、粥状硬化病巣のホモジネートで適当な哺乳動物及び/または哺乳動物の抗体産生担当リンパ球を免役し、該動物の抗体産生リンパ球とミエローマ細胞を融合させ、形成された抗ヒト粥腫抗体産生細胞融合細胞群を単離し、該細胞群の中から酸化したリポタンパク質と特異的に反応するものとして選別された融合細胞が産生するものである請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体がハイブリドーマセルラインF0H1a/DLH3(受託番号FERM BP-7171)により生産されるものである請求項1~3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

10

20

血液成分中の各種の酸化リポタンパク質を別々に測定する方法が、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体とリポタンパク質を認識する抗体とを用いるサンドイッチ免疫測定法により行われる請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

リポタンパク質を認識する抗体が、抗アポ B 抗体であり、酸化リポタンパク質が酸化低密度リポタンパク質である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

リポタンパク質を認識する抗体が、抗 Lp (a) 抗体であり、酸化リポタンパク質が酸化 Lp (a) である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

循環器系疾患が冠動脈系疾患、脳動脈系疾患、腎動脈系疾患または末梢動脈系疾患である請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法に用いられる、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体。

【請求項 10】

リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を含み、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法に用いられる、循環器系疾患検査用キット。

【請求項 11】

リポタンパク質を認識する抗体をさらに含む、請求項 10 に記載の循環器系疾患検査用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヒト酸化リポタンパク質の測定法に関するものである。また、本発明は、循環器系疾患の診断方法に関するものである。詳しく述べると、本発明は、血液成分を酸化リン脂質を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定することによって血液成分中に含まれる酸化リポタンパク質を測定することを特徴とする血液中のヒト酸化リポタンパク質の測定法に関するものである。本発明は、また上記測定法を用いて心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患および末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などの各種循環器系疾患を診断する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈及び頸動脈などの筋型動脈に多く発生し、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。その原因として血清コレステロールの上昇、血小板凝集、内皮傷害などが提唱されているが、その成因はほとんど解析されていないのが現状である。

【0003】

変性リポタンパク質の一つである酸化リポタンパク質と粥状硬化病巣の進展との関連性が、スタインバーグ(Steinberg)らにより指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化リポタンパク質の問題は脚光を浴びるようになってきている(例えば Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L., (1989) N. Engl. J. Med. 320:915)。

【0004】

スカベンジャー受容体など酸化を受けたりポタンパク質に対する受容体の存在が明らかにされ、酸化LDLが、これらの受容体を介して細胞内に取り込まれることによって、泡沫細胞となり粥腫形成のイニシエーションが起こるといふ仮説、また酸化LDLが内皮細胞を傷害することで、血小板の粘着凝集や、白血球の集結、血漿成分の血管内への浸潤がおり、これらが引き金になって、平滑筋細胞の遊走や増殖を引き起こすといふ仮説が提唱さ

10

20

30

40

50

れている。

【0005】

酸化LDLが病巣に確かに蓄積しているかどうかについては、例えば1988年にハーバーランド(Haberland)等がマロンジアルデヒドで修飾したLDLに対する抗体；抗MDA-LDL抗体により動脈硬化病巣部が染色されることを示し(Herberland, M. E., Fong, D., and Cheng, L., (1988) Science 241:215)、また1989年にイラ - ハーテュアラ(YLa-Herttuala)等は、やはり抗MDA-apoB抗体によるイムノプロットティング法により、病巣部から抽出されたアポB(apoB)を検索し、酸化変性を受けたLDLが確かに病巣部から抽出されたと報告している(YLa-Herttuala, S., Parinski, W., Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Butler, S., Witztum, J. L., and Steinberg, D., (1989) J. Clin. Invest. 84:1086 10)。

しかしここで用いられた抗体はマロンジアルデヒドを用いて人工的に修飾したLDLを抗原として得られたものであるが、LDLの酸化生成物だけでなく他の酸化蛋白、例えば酸化アルブミンなどとも交叉反応を示すという性質を有している。

【0006】

しかるに、粥状硬化病巣のホモジネートを抗原としてハイブリドーマを作成し、その中から、酸化LDLを特異認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択すると、特異性の高いモノクロナル抗体が得られることが開示されている(Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., Takano, T., (1994) J. Biol. Chem. 269 (21):15274)。

この抗体は、クローンFOH1a/DLH3が産生することから、FOH1a/DLH3と名付けられているが、同抗体が、酸化リポタンパク質と特異的に反応し、正常なリポタンパク質、マロンジアルデヒド化LDL、アセチル化LDLなどとは、交叉反応を示さないことや、同抗体の認識するエピトープは、リポタンパク質の構成成分であるフォスファチジルコリンというリン脂質が酸化されたときに生成することが開示されている。また、同抗体が、ヒト粥状硬化病巣内の泡沫細胞を特異的に認識する抗体であることも開示されている。 20

【0007】

一方、これまでの研究ではLDLの酸化は、血管組織への沈着後の二次的な化学修飾によって引き起こされると考えられているが、炎症部位で発生する活性酵素などにより循環血液中に酸化変成を受けたリポタンパク質が存在する可能性もある。実際に、ヒト血液あるいはそのLDL画分から脂質を抽出し、その中に過酸化リン脂質の存在を立証し、心虚血、糖尿病や肝炎などの疾患時に上昇するとする報告がある(Miyazawa, T., (1989) Free Radical Biology 7: 209、Hodis, H.N., Kramsch, D. M., Avogaro, P., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hwang, J., Peterson, H., and Sevanian, A., (1994) J. Lipids Res. 35: 669)。

しかしながら、その測定法は複雑であり、多数の臨床検体を測定して、血中酸化リポタンパク質の臨床診断的な意義を明らかにするには不向きであるため、血液中の酸化リポタンパク質と疾病との関りについては未だ明確になっていない現状である。酸化LDLが粥状効果病巣の進展と深く関わっているならば、循環血液中の酸化LDL等の酸化リポタンパク質を高感度にかつ定量的に検出することが、病態進展の早期診断に役立つことは明らかであり、そのような方法の開発は強く望まれていた。 30

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明は、新規なヒト酸化リポタンパク質の測定法を提供することを目的とする。本発明はさらに、比較的簡単な手順により、比較的簡単な手順により、循環血液中の酸化LDL等の酸化リポタンパク質を高感度にかつ定量的に検出するヒト酸化リポタンパク質の測定法を提供することを目的とするものである。本発明はまた、新規な循環器系疾患の診断方法を提供することを目的とし、および血液中のヒト酸化リポタンパク質を測定することにより、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患、末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などを含む、粥状硬化症を主因とする各種循環器系疾患を診断する方法を提供することを目的とするものである。 40

【0009】

【課題を解決するための手段】

上記諸目的は、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて血漿中の酸化リポタンパク質を測定するヒト酸化リポタンパク質の測定法によって達成される。

【0010】

本発明はまた、抗体が、ペプチドの共存下にホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原を認識するものであるヒト酸化リポタンパク質の測定法である。本発明はまた、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体が、粥状硬化病巣のホモジネートで適当な哺乳動物及び/または哺乳動物の抗体産生担当リンパ球を免疫し、該動物の抗体産生リンパ球とミエローム細胞を融合させ、形成された抗ヒト粥腫抗体産生融合細胞群を単離し、該細胞群の中から酸化したヒトリポタンパク質と特異的に反応するものとして選別された融合細胞が産生するものであるヒト酸化リポタンパク質の測定法である。本発明はまた、抗体が、ハイブリドーマセルラインF0H1a/DLH3(受託番号 FERM BP-7171)により産生されるものであるヒト酸化リポタンパク質の測定法である。本発明はさらに、血漿および/またはこれより分離したリポタンパク質画分を至適な濃度に希釈した後、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体と接触させ、当該抗体と結合した酸化リポタンパク質をさらに当該リポタンパク質を認識する抗体と接触させることを特徴とするヒト酸化リポタンパク質の測定法である。

10

【0011】

更に、本発明は、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いて、血液成分の該抗体に対する反応性の測定値から循環器系疾患を評価することを特徴とする循環器系疾患の診断方法を提供するものである。

20

【0012】

また、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体がホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原を認識するものである上記記載の方法を提供するものである。

【0013】

また、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体が、粥状硬化病巣のホモジネートで適当な哺乳動物及び/または哺乳動物の抗体産生担当リンパ球を免疫し、該動物の抗体産生リンパ球とミエローム細胞を融合させ、形成された抗ヒト粥腫抗体産生細胞融合細胞群を単離し、該細胞群の中から酸化したリポタンパク質と特異的に反応するものとして選別された融合細胞が産生するものである上記記載の方法を提供するものである。

30

【0014】

また、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体がハイブリドーマセルラインF0H1a/DLH3(受託番号FERM BP-7171)により生産されるものである上記記載の方法を提供するものである。

【0015】

また、血液成分の該抗体に対する反応性の測定値が血漿中の酸化リポ蛋白質の測定値である上記記載の方法を提供するものである。

【0016】

また、血漿中の酸化リポ蛋白質の測定値を測定する方法が、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体とリポタンパク質を認識する抗体とを用いるサンドイッチ免疫測定法により行われる上記記載の方法を提供するものである。

40

【0017】

また、リポタンパク質を認識する抗体が、抗アポB抗体であり、酸化リポタンパク質が酸化低密度リポタンパク質(LDL)である上記記載の方法を提供するものである。

【0018】

また、リポタンパク質を認識する抗体が、抗Lp(a)抗体であり、酸化リポタンパク質が酸化Lp(a)である上記記載の方法を提供するものである。

【0019】

50

また、循環器系疾患が冠動脈系疾患、脳動脈系疾患、腎動脈系疾患または末梢動脈系疾患である上記記載の方法を提供するものである。

【0020】

【作用】

上記したような問題を解決するためには、エピトープが明確でかつ酸化LDLに対する特異性が高く、また各種のリポタンパク質を別々に定量する方法が必要である。本発明者らは、粥状硬化病巣を抗原として得られた抗体F0H1a/DLH3は、リン脂質の酸化により生成するエピトープを認識し、酸化リポタンパク質へ特異的に結合する性質を有することを明らかにした(特許出願番号平6-51,209号、Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., Takano, T., (1994) J. Biol.Chem. 269 (21) :15274)。

10

【0021】

本発明者らは、このような抗体について鋭意研究を進めた結果、このような抗体こそが、上記した要求される測定法を提供できる最も優れた抗体であることを発見し、本発明に至ったものである。

【0022】

すなわち、上記したように、酸化リポタンパク質を高感度にかつ定量的に検出することは、リン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を用いることによって行ない得るものである。特に、その抗体が、実際に粥状硬化病巣を適当な動物に感作させて得られたものである場合、また、その認識するエピトープがペプチドの共存下にホスファチジルコリンの酸化により生成する構造に由来する場合、その効果はより確実になる。

20

【0023】

このような抗体が上記課題を解決するに優れていることは以下のような性質を持つ抗体が得られることによる。このような抗体の抗原は、実際にヒト組織中で起こるリポタンパク質の生成によって発現し、しかも血漿蛋白質の中でペプチドとリン脂質を両方備えたりポタンパク質の酸化によって生じる可能性が非常に高い。ハイブリドーマF0H1a/DLH3の産生する抗体は、まさにその性質を備えている。

【0024】

なお、このような抗体を用いて測定する場合、血漿および/または血清を直接抗体と接触させることで目的は達成されるが、後述するサンドイッチELISA法などを用いる場合、その測定法に起因する非特異的な吸着などを防ぐため、前もって試料を適当な方法(例えば、超遠心分離)により、あらかじめリポタンパク質画分まで分画して用いてもよい。

30

【0025】

第二に、このような抗体は、その認識するエピトープがアポ蛋白に依存しないため、血液中の異なるリポタンパク質の酸化物を別々に評価するための方法を提供することができる。このためには、酸化リン脂質特異抗体と当該リポタンパク質特異的な抗体の2種類の組み合わせによる必要がある。この際、どちらかの抗体をプラスチックプレートやガラスビーズなどの平板状または球状等の担体に固相化した、いわゆるサンドイッチELISA法とするのが簡便である。

【0026】

この際、どちらかの抗体を固相化するかに制限はないが、酸化リン脂質を認識する抗体の抗体価が高い場合、そちらを固相化した方が抗原を濃縮でき、高感度化できる点で有利である。実施例には、ハイブリドーマF0H1a/DLH3の産生する抗体を固相化して作製したELISA法の例を示すが、本発明がこの実施例に限定されるものではないことはいうまでもないことである。

40

【0027】

第三に、このような抗体を用いることによって、実施例に示すように、例えば、人工的に作製した酸化LDLを標準物質として用いることにより、その値を、例えば、LDL蛋白1 μ g当たりの酸化LDLのng量などの形で定量的に評価することができる。

【0028】

50

このように、特異性が高く、高感度で、個々のリポタンパク質毎の酸化度を識別可能であり、定量化が可能な血液中の酸化LDLの測定をE L I S A法のような簡便な、それ故、多数の臨床検体について測定可能な形で提供し得たのは、本発明が初めてのことである。

【0029】

以下、本発明を実施態様に基づきより詳細に説明する。

【0030】

本発明の測定法は、被験体の血液成分を上記したようなリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体と接触させ、該抗体と特異的に反応した抗原量を定量することにより血液中に含まれる酸化リポタンパク質を特徴とするものである。測定は、R I A法、E L I S A法、イムノプロット法、免疫沈降法等の公知の方法に基づき行なうことができる。

10

【0031】

さらに、前記したように本発明に係る上記したようなリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体が認識するエピトープがアポ蛋白に依存しないため、当該リポタンパク質に特異的な抗体を組合せることにより、血液中の異なるリポタンパク質の酸化物を別々に評価することができる。このようなりポタンパク質に特異的な抗体としては、特にカイロミクロン、VLDL、LDL、HDL2、HDL3、Lp(a)などの1つないし2つ以上を認識する抗体を用いることができる。特にこの中で、酸化LDLの評価は、酸化LDLと粥状硬化症との関連から重要であるが、これに加えて最近、動脈硬化の独立した危険因子として注目されているLp(a) (例えば、Scanu, A.M., Lawn, R.M., and Berg, K., (1991) Lipoprotein(a) and atherogenesis, Ann, Int. Med. 115:209-218)の酸化変成の有無を評価することは重要である。これら

20

【0032】

被測定試料としての血液成分は、被験体より採血、好ましくはヘパリン等の抗凝固剤を添加して採血して得た血液試料を、遠心分離法等の常法に基づき成分分離して得られた血漿

30

【0033】

また、測定に当っては、このような血漿および/またはリポタンパク質画分を、至適な濃度に希釈する。その濃度は測定条件によっても左右されるため一概には規定できないが、例えば、 $0 \sim 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは $0 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ へと希釈する。希釈媒体としては、特に限定されるものではないが、例えば、生理食塩水、EDTAを含むリン酸緩衝液(PBS)等が用いられ得る。

【0034】

至適な濃度とされた血漿および/またはリポタンパク質画分と上記したような酸化リン脂質特異抗体との接触は、このような血液成分中に含まれる酸化リン脂質と酸化リン脂質特異抗体との特異的な反応が十分に進行するものであればよく特に限定されるものではないが、例えば、 $4 \sim 30$ 、より好ましくは 25 の下、 $1 \sim 24$ 時間、より好ましくは $1 \sim 2$ 時間程度静置反応させることが望ましい。また、その際の酸化リン脂質特異抗体の濃度としては、血液試料中に存在すると思われるリン脂質の量よりも十分に過飽和な量であればよく、またこの抗体の抗体価、測定方法のタイプによっても左右されるが、例えば、血漿 $1 \mu\text{g}$ 当りに存在する酸化LDL量が $0 \sim 1 \text{ ng}$ 程度であると想定される場合において、酸化リン脂質特異抗体として後述するようなDLH3抗体を用いる場合、当該血漿 $1 \mu\text{g}$ 当りに $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g}$ 、より好ましくは $0.5 \mu\text{g}$ 前後であることが望ましい。

40

50

【0035】

次に本発明の測定法において用いられるリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体について詳述する。

【0036】

このような抗体を得る方法としては、特に限定されるものではないが、好ましくは以下に述べるように粥状硬化病巣を適当な動物に感作する方法であり、一般的な細胞融合法に基づき次のような手法により得られるハイブリドーマセルラインにより産生される。

【0037】

ハイブリドーマ作製に用いられる動物種としては、特に限定されるものではなく、従来使用されているマウス、ラット、ハムスター等が使用可能であるが、特に入手および取扱いの容易性からB a l b / cマウスが好ましく、主にこれらの動物の脾細胞が用いられる。また、ヒトのリンパ節細胞や末梢リンパ球を用いることもできる。

10

【0038】

これらの動物に対する免疫用の抗原は、粥状硬化病巣より調製される。例えば、動脈硬化症患者の死亡直後における剖検あるいはバイパス手術等において取出された病変血管を入手し、この病変血管から粥状硬化病巣を含む血管部を切出し、緩衝液中で血管外膜部を剥離除去した後、病巣の内膜と中膜部(intima and media)をホモジナイザーを用いて冷却下、好ましくは氷冷下にホモジナイズし、静置後得られる上清を抗原液とする。さらに必要に応じて、静置後に遠心処理を行ない、得られたペレットに緩衝液を加えて同様の操作を行ない、得られる上清を前の上清と合せて抗原液とすることもできる。このようにして調製された抗原液は、例えばアルゴン等の不活性ガスで置換の後、使用直前まで凍結保存することが望ましい。

20

【0039】

次いで、このようにして調製された粥状硬化病巣のホモジェネートからなる抗原を、所定蛋白(抗原)濃度として、前記したような動物種に免疫する。なおこの際、必要に応じて、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント等のアジュバントを添加してもよい。

【0040】

投与量は、動物種によって左右されるが、マウスの場合、初回免疫で2.0~60μg(蛋白)/匹、より好ましくは40μg(蛋白)/匹程度である。

30

【0041】

さらに、初回免疫の後、例えば、2週間および4週間程度の間隔で、初回免疫と同量ないしそれ以下の蛋白量で、追加免疫を行なうことが望ましい。

【0042】

最終免疫の後、2~3日後に免疫動物から採血し、E L I S A (enzyme-linked immunosorbent Assay)法、イムノプロット法等の検定法により、血清抗体価上昇の確認を行ない、抗体価上昇の認められた免疫動物をスクリーニングする。

【0043】

スクリーニングされた免疫動物から脾細胞、あるいはリンパ節などから抗体産生細胞を採取し、約37℃に加温したRPMI培地、DMEM培地等の維持培地で洗浄、懸濁し、生細胞数を計測する。

40

【0044】

一方、HGPRT(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)欠損株の腫瘍細胞を、胎児ウシ血清(FCS)添加RPMI培地、FCS添加DMEM培地等の増殖培地において増殖させ、対数増殖期になるように培養しておく。なお、HGPRT 欠損株の腫瘍細胞としては、例えば、P3/X63-Ag8(X63)(カッコ内は略名 以下同じ)、P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3/U1)、Sp2/0-Ag14(Sp2/0)、F0、210.RCY3.Ag 1.2.3.(Y3)、U-266AR1(SK0-007)、LICR-LON-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)などの公知の腫瘍細胞を、使用する動物種に応じて用いることができる。対数増殖期にある腫瘍細胞を、前記抗体産生細胞の細胞数に対して腫瘍細胞の細胞数が1:1~1:10となるように調整し、約3

50

7 に加温したRPMI培地、DEME培地等の維持培地で洗浄して細胞融合を阻害するFCS成分を除去する。

【0045】

そして、細胞数を調整された抗体産生細胞と腫瘍細胞を、例えばガラスチューブ等の容器内で混和し、遠心してペレットを得、上清をなるべく除去する。なお、この操作を含めて以下の操作は、20～37℃、より好ましくは約37℃の温度条件下で行なうことが望ましい。

【0046】

次いで、得られたペレットに対して、0～37℃、より好ましくは約37℃に加温された細胞凝集性媒体を、ペレットをほぐしながら、ゆっくりと添加する。細胞凝集性媒体としては、ポリエチレングリコール(PEG)、リゾレシチン、グリセロールオレイン酸エステルなどの化合物、あるいは不活化されたセンダイウィルス(HVJ)、麻疹ウィルス、ニューカッスル病ウィルス等のパラミクソウィルスなどが使用可能であるが、このうち特にPEGが好ましい。PEGを使用する場合には、例えば、RPMI培地、DMEM培地等で、その平均分子量にもよるがPEG4000の場合は4.5～5.0重量%程度の濃度に希釈して用いることが望ましい。

10

【0047】

細胞凝集性媒体の添加後、さらに1～2分間程度攪拌した後、RPMI培地等の維持培地を、2～3回に別けてゆっくりと添加する。

【0048】

その後、PEG等の細胞凝集性媒体を除去するため、例えば800～1200×g、3～5分間という弱い条件で遠心し、上清を除去する。

20

【0049】

続いて、得られたペレットをほぐしながら、FCS添加HAT培地等の選択培地を、脾臓細胞濃度が $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mlとなるように、ゆっくりと添加し、96穴プレートのような多穴プレートの各ウェルに分注し、温度約37℃、CO₂濃度約7%、湿度100%の条件下で培養する。なお、培養期間中、細胞の状態にもよるが、2～3日程度の間隔で、液替えを行なう。なお、培地条件としては、上記に例示したようなものに限定されるものではなく、これ以外にも、例えば、最初にFCS添加RPMI培地等の増殖培地をペレットに添加し、培養開始後、選択培地を各ウェルに添加するといった態様とすること等も可能である。融合しなかった細胞は、3日目あたりから急速に死滅しはじめ、7日程度で完全に死滅する。一方、融合に成功した細胞、すなわち、ハイブリドーマはこのころよりコロニーを形成しはじめる。ハイブリドーマコロニーの形成が認められたウェルより次に述べるようなスクリーニングを開始し、必要に応じて24穴プレート等のより大きなプレートに継代していく。

30

【0050】

スクリーニングは、RIA法、ELISA法、イムノプロット法等によって行なうことができるが、このうち好ましくはELISA法である。抗原としては、CuSO₄と3時間以上反応させることにより得られた酸化LDLを使用する。必要に応じて、未変性のLDLを併用してもよい。特に好ましくはホスファチジルコリンの酸化により生成する抗原であり、これをペプチドの共存下に認識するものが望ましい。各アッセイ法に基づき、ハイブリドーマコロニーの形成が認められたウェルから採取した培養上清を、スクリーニングし、酸化LDLとの反応で陽性(かつ未変性LDLとの反応で陰性)となる細胞株を選択する。

40

【0051】

そして、スクリーニングで陽性となったウェルから直ちにクローニングを行なう。クローニングは、限界希釈法(limiting dilution)、単個細胞マニピュレーション法(single cell manipulation)などを用いて行なうことができるが、限界希釈法の方が技術的に容易であるため好ましい。

【0052】

クローニングした細胞が再び増殖してきたら、上記と同様にしてスクリーニングを行ない

50

、再度クローニングを繰り返し、未変性LDLとは反応せず、酸化LDLとのみ反応する高産生細胞株を同定する。

【0053】

なお、得られたハイブリドーマの保存法としては、特に限定されるものではないが、例えば、凍結保存用のバイアルになるべく多くの細胞、例えば $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 個程度を、90%FCS、10%ジメチルスルフォキシド(DMSO)1~2ml程度に懸濁して、液体窒素中に凍結保存する方法が適当である。

【0054】

Balb/cマウスを用いて上記したような細胞融合操作により、未変性のLDLとは反応せず、酸化LDLとのみ反応する細胞株を得ることができ、前述の論文(Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., Takano, T., (1994) J. Biol.Chem. 269 (21):15274)に開示されている。特に、同論文に記載されている抗体F0H1a/DLH3は、マロンジアルデヒド修飾LDL(MDA-LDL)、アセチル化LDL(AcLDL)とは、反応しない点で、特に好ましいモノクローナル抗体である。この抗体を産生するマウス-マウスハイブリドーマセルライン F0H1a/DLH3は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、受託番号FERM BP-7171を付与されている。

【0055】

モノクローナル抗体F0H1a/DLH3は、LDLを銅イオンを用いて人工的に酸化したLDLに反応するが、未変性のLDLには反応せず、他の方法(たとえばマロンジアルデヒド化や、アセチル化など)でLDLを修飾したのものにも反応しない。また他の血清蛋白質たとえばアルブミンやグロブリンを酸化させたのものにも反応しない。しかし、LDLとは異なるリポタンパク質である高比重リポタンパク質(HDL)を酸化したものには反応する。

【0056】

しかしながら、本発明に係るリン脂質の酸化により生成する抗原を認識する抗体を得る方法としては、上記のごとき粥状硬化病巣を適当な動物に感作する方法に限定されるのではなく、これ以外にも例えば酸化LDLを免疫源とする方法、アポタンパク質あるいは、その構成ペプチドの一部の共存下で、リン脂質を酸化させたものを免疫源とする方法などが考えられる。

【0057】

なお、本発明の測定方法、ないし測定方法に用いられる抗体を産生するハイブリドーマを得るにおいて必要とされる人工的な酸化リポタンパク質の生成条件としては、次のようなものが考えられる。すなわち、ヒト正常血清から、例えば遠心沈降法などによりリポタンパク質分画を得、この分画を必要により透析、脱塩によって精製処理した後、蛋白濃度0.1~1mg/ml、より好ましくは0.2mg/ml、CuSO₄濃度2.5~25μM、より好ましくは5μMの割合で、リポタンパク質分画にCuSO₄を添加し、約37°Cの下に、3~24時間反応させるものである。

【0058】

【実施例】

次に、実施例を示して本発明による酸化リポタンパク質のサンドイッチELISA分析法をより具体的に説明する。

【0059】

実施例1

酸化LDLのサンドイッチELISA分析法

(1)ヒト血漿中のLDL画分の調製

ヘパリン採血で得られたヒト血漿に最終濃度で0.25mMとなるようにEDTAを加えて、その0.75mlずつを超遠心分離用試験管(1~4ml容)に採り、0.3mMEDTAを含む0.15M NaClを250μl重層して185,000×gにて10分で2.5時間遠心する。上層150μlを捨て、下層750μlを分取して、KBr溶液(50w/v%)150μlを加えて、比重1.063とする。超遠心分離用試験管(1~4ml容)の底に比重調整した血漿を移して244,000×gにて10分で16時

10

20

30

40

50

間遠心する。上層の橙色バンド(約100~150 μ l)を注意深く回収し、0.25 mM EDTAを含むPBSに対して4、6時間(3リットルを2時間間隔で2回交換)透析する。得られたLDL試料は、蛋白質およびコレステロールの定量を行なう。

【0060】

(2) サンドイッチELISA分析

プレートにPBSで希釈下DLH3抗体および非免疫マウスIgM抗体(各0.6 μ g/ウェル)を加えて、室温で2時間放置する。続けて、1%BSA-TBS溶液(pH7.4)200 μ lを加えて、室温で2時間放置してブロッキングする。ブロッキング溶液を捨て、そのまま酸化LDL標準品およびヒトLDL画分を分注(酸化LDL標準品は0.1~20ng LDL蛋白質/ウェル、ヒトLDL画分は2 μ g LDL蛋白質/ウェル)し、4、18時間放置する。0.05% ツイーン20-TBS(pH7.4)で3回洗浄した後、5,000倍希釈ヒツジ抗ヒトアポB抗体(Bindind Site社)100 μ lを加えて、室温で2時間放置する。0.05% ツイーン20-TBS(pH7.4)で3回洗浄した後、2%スキムミルク-TBSで2,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識ロバ抗ヒツジIgG抗体(ケミコン(Chemicon)社製)100 μ lを加え、室温で2時間放置した後、0.05% ツイーン20-TBS(pH7.4)で3回洗浄した。0.1%p-ニトロフェニルリン酸溶液(pH8.8)100 μ lを加えて発色させ、10~60分後の405nmの吸光度を測定する。

10

【0061】

(3) ヒト血漿(健常人および腎透析患者)を用いた分析結果

酸化LDLを標準品とした典型的な検量線および臨床検体について分析した結果を図1および図2にそれぞれ示した。

20

【0062】

実施例2

酸化Lp(a)のサンドイッチELISA分析法

(1) ペルオキシダーゼ標識抗Lp(a)抗体の調製

ヘパリン採血で得たヒト血漿に最終濃度で0.25mMとなるようにEDTAを加え、0.3mM EDTAを含む0.15M NaCl 250 μ lを重層して105,000 \times gにて8で20時間遠心する。上層を捨て、下層に予め乳鉢で粉末化したKBrを加えて、4にて泡立てないようにして溶解し、比重を1.125に調製し105,000 \times gにて8で20時間遠心する。上層の橙色バンドを注意深く回収しバイオゲルA-5mを用いて1M NaCl, 2mM EDTA, 10mMリン酸緩衝液を展開溶媒として、ゲル濾過する。得られた各フラクションをテルモ株式会社製Lp(a)測定キットにより測定しLp(a)画分を回収する。この画分をファルマシア製リジンセファロース4Bにかけ、吸着画分を0.2M -アミノカプロンサンを含む緩衝液により溶出させ、0.25mM EDTAを含むPBSに対して透析して、Lp(a)画分を得た。得られたLp(a)0.5mgをウサギに免疫して抗血清を作成した。得られた抗Lp(a)血清をファルマシア製プロテインGカラムを用いて、IgGに精製し、別に調製した、LDLカラムを通して、抗LDL抗体を除去し、抗Lp(a)抗体とした。精製した抗Lp(a)抗体をマレイミド法を用いてペルオキシダーゼで標識した。

30

40

【0063】

(2) ヒト血漿中のリポ蛋白質画分の調製

ヘパリン採血で得たヒト血漿に最終濃度で0.25mMとなるようにEDTAを加え、その0.75mlずつを超遠心分離用試験管(1ml容)に採り、0.3mM EDTAを含む0.15M NaClを250 μ l重層して185,000 \times gにて10で2.5時間遠心する。上層150 μ lを捨て、下層750 μ lを分取して予め乳鉢で粉末化したKBr(70.0mg)を加えて、4にて泡立てないようにして溶解する。超遠心分離用試験管(1ml容)の底に比重調整した血漿(d=1.12)を移して244,000 \times gにて10で16時間遠心する。上層の橙色バンド(約100~150 μ l)を注意深く回収し、0.25mM EDTAを含むPBSに対して4、6時間(3リッターを

50

2時間間隔で2回交換)透析する。得られたリポタンパク質画分は、タンパク質およびコレステロールの定量を行う。

【0064】

(3) サンドイッチELISA分析

プレートにPBSで希釈した部分精製したF0H1a/DLH3抗体および非免疫ラットIgM抗体(各0.6μg/well)を加えて、室温で2時間放置する。続けて、1%BSA-TBS溶液(pH7.4)200μlを加えて室温で2時間放置してブロッキングする。ブロッキング溶液を捨て、そのまま酸化Lp(a)標準品およびヒトリポタンパク質画分を分注し(酸化Lp(a)標準品は0.1~10ng/well、ヒトリポタンパク質画分はPBS20倍希釈液)、室温で2時間放置する。0.05%Tween20-TBS(pH7.4)で3回洗浄した後、2%スキムミルク溶液で2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗Lp(a)ポリクローナル抗体100μlを加えて、室温で1時間放置する。0.05%Tween20-TBS(pH7.4)で3回洗浄した後、o-フェニレンジアミン3mg/mlを含む0.03%過酸化水素水100μlを加えて発色させ、10~15分後に2N硫酸50μlで反応を停止させて492nmの吸光度を測定する。

10

【0065】

(4) ヒト血漿(腎血管系疾患患者)を用いた分析結果

酸化Lp(a)を標準品とした典型的な検量線および臨床検体について分析した結果を図3および図4にそれぞれ示した。

【0066】

20

【発明の効果】

以上述べたように本発明は、血液成分と酸化リン脂質を認識する抗体を接触させ、該抗体の該試料に対する反応性を測定することを特徴とする血液中の酸化リポタンパク質の検出法に関し、また、その検出法を用いて、粥状硬化症を主因とする各種循環器系疾患を診断する方法に関するものである。このような循環器系疾患としては、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患、末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患まで、全ての循環器系疾患がある。実施例に示すように、本発明により、糖尿病性腎症により血液透析に移行した患者の血液中に高濃度の酸化LDL及び酸化Lp(a)が検出され、このような疾患と酸化LDL酸化Lp(a)の因果関係が明確になった。しかし、本発明の効果は、これに限定されるものではなく、およそ酸化リポタンパク質が関与する全ての疾患が適用になるのであり、その疾患の範囲は、本発明を用いた今後の臨床的検討により拡大するものであることはいうまでもない。

30

【図面の簡単な説明】

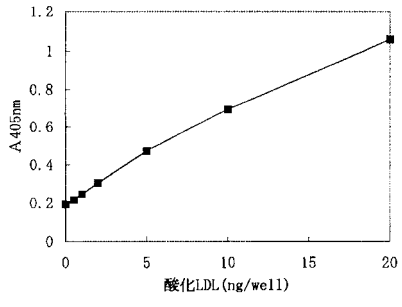
【図1】 本発明の実施例1において得られた酸化LDLを標準品とした検量線、

【図2】 本発明の実施例1において臨床検体について分析した結果を示すグラフ、

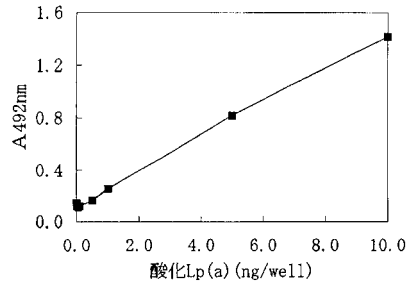
【図3】 本発明の実施例2において得られた酸化Lp(a)を標準品とした検量線、

【図4】 本発明の実施例2において臨床検体について分析した結果を示すグラフ。

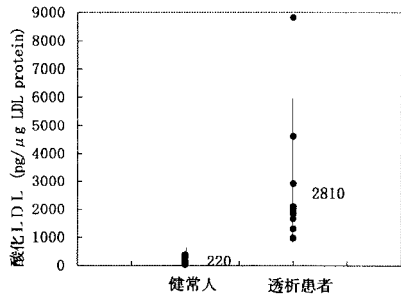
【 図 1 】



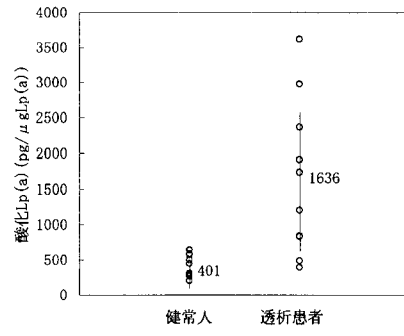
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



フロントページの続き

- (72)発明者 板部 洋之
東京都八王子市館町723-1 リンド・プレジオ 305号
- (72)発明者 木村 順治
東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー内
- (72)発明者 内山 英樹
東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー内
- (72)発明者 島村 京子
東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー内
- (72)発明者 高野 達哉
東京都八王子市寺田町432番地 グリーンヒル寺田 44-3

審査官 竹中 靖典

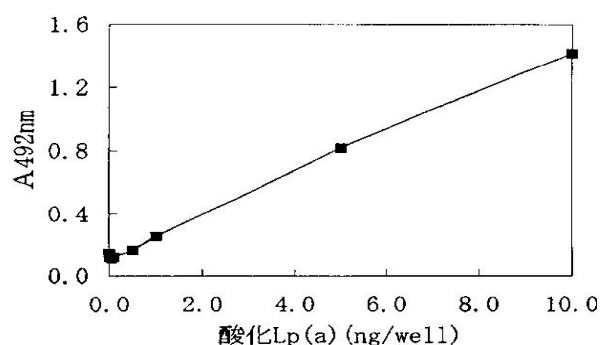
- (56)参考文献 特開平06-213901(JP,A)
国際公開第95/009363(WO,A1)
Hiroyuki Itabe et.al, A Monoclonal Antibody against Oxidized Lipoprotein Recognizes Cells in Atherosclerotic Lesions, The Journal of Biological Chemistry, 1994年, Vol.269, No.21, pp15274-15279
Hualiang Wang, et.al, Quantitation of plasma oxidatively modified low density lipoprotein by sandwich enzyme linked immun, Clinica Chimica Acta, 1993年, 218, 97-103

专利名称(译)	诊断心血管疾病的方法		
公开(公告)号	JP3989223B2	公开(公告)日	2007-10-10
申请号	JP2001339937	申请日	2001-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	贝塞尔研究实验室		
申请(专利权)人(译)	贝塞尔有限公司研究实验室		
当前申请(专利权)人(译)	协和メデックス株式会社		
[标]发明人	板部洋之 木村順治 内山英樹 島村京子 高野達哉		
发明人	板部 洋之 木村 順治 内山 英樹 島村 京子 高野 達哉		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395		
FI分类号	G01N33/53.W A61K39/395.D		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/AA19 4C085/KA03 4C085/LL01		
代理人(译)	宇谷 胜幸 藤田 健		
其他公开文献	JP2002214234A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种诊断循环系统疾病的方法，通过使用一种测量人类脂蛋白氧化物的方法，通过一个相对简单的程序，在循环血液中高灵敏度和定量检测脂蛋白氧化物如LDL氧化物等。解决方案：通过使用识别由磷脂氧化产生的抗原的抗体，从用于诊断循环系统疾病的方法中的血液成分对抗体的反应性的测量值评估循环系统疾病。在使用通过与肽共存的磷脂酰胆碱氧化产生的抗原的物质或通过用白垩硬焦点使适当的动物致敏而获得的物质作为抗体的情况下，可以获得特别令人满意的结果。另外，由杂交瘤细胞系FOH1a / DLH3 (接受编号FERM BP-7171) 产生的抗体特别令人满意地用于该方法中。

【 図 3 】



【 図 4 】

4000