

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 11 月 17 日 (17.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/108985 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/53, 33/577 // C12P 21/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/008070

(22) 国際出願日: 2005 年 4 月 27 日 (27.04.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-137441 2004 年 5 月 6 日 (06.05.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 10 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀田 修 (Hotta, Osamu) [JP/JP]; 〒9830823 宮城県仙台市宮城野区燕沢 2 丁目 17 番 30 号 Miyagi (JP). 片山 政彦

(KATAYAMA, Masahiko) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台 5 丁目 1 番地 3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 アクロポリス 21 ビル 6 階 Tokyo (JP).

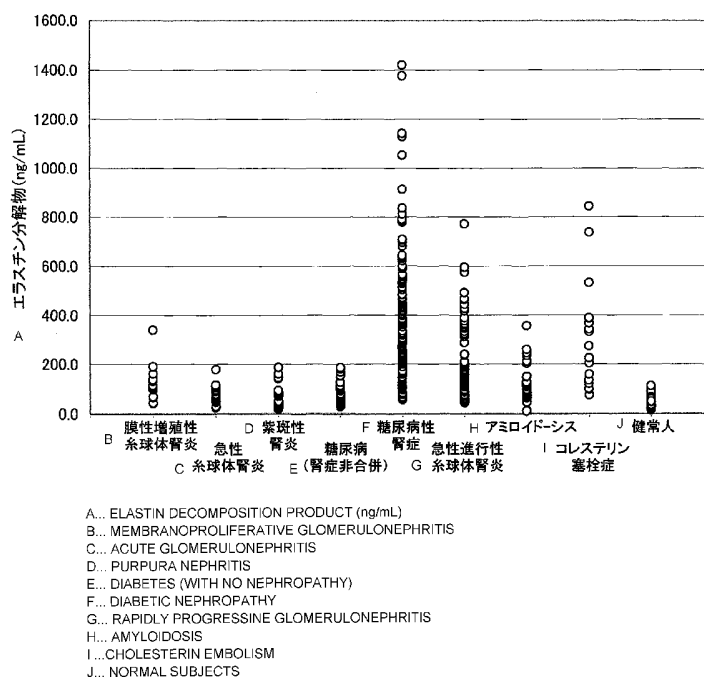
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF JUDGING SYSTEMIC ARTERIOSCLEROSIS AND JUDGEMENT REAGENT

(54) 発明の名称: 全身性動脈硬化症の判定方法、及び判定試薬



(57) Abstract: An elastin decomposition product in a circulating fluid of a subject is quantified by an immunochemical method with the use of, for example, an antibody having specificity and affinity for the elastin decomposition product and then systemic arteriosclerosis such as diabetic nephropathy, rapidly progressive glomerulonephritis, amyloidosis or cholesterol embolism, preferably diabetic nephropathy, is judged based on the measurement data.

[続葉有]



SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 被験者の循環液中のエラスチン分解物の量を、例えばエラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体を用いる免疫化学的方法により測定し、その測定値に基づいて糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を判定する。

明 細 書

全身性動脈硬化症の判定方法、及び判定試薬

技術分野

- [0001] 本発明は、糖尿病性腎症の判定方法及びそれに用いるキットに関し、詳しくは、被験者の循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を判定する方法及び同方法に用いるキットに関する。

背景技術

- [0002] 糖尿病は、インスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。その発症には遺伝因子と環境因子がともに関与する。代謝異常の長期間にわたる持続は特有の合併症を来たしやすく、動脈硬化症をも促進する(非特許文献1)。
- [0003] また、糖尿病性腎症は糖尿病の細小血管合併症のひとつであり、糖尿病患者の予後を左右する重要な疾患である。近年、糖尿病性腎症の患者数は増加の一途をたどり、その診断と治療の成否は多くの糖尿病患者の予後や生活の質に対してのみならず、医療経済的にもますます重要性を増している(非特許文献2)。糖尿病性腎症の病期は第1期(腎症前期)～第5期(透析療法期)に分類されており、後期へ移行するほど重篤性が増していき厳格な治療が施される必要性が出てくる。第5期の透析療法期ではもはや腎臓移植しか治療法がなく、生命予後も極端に悪化する。すなわち、できるだけ早期に正確な診断を施し、適切な治療や食事制限により疾患の進行を阻止することが望ましいと考えられている。
- [0004] 糖尿病性腎症は前述の如く細小血管合併症のひとつであり、腎臓に限局しない全身性動脈硬化症を基礎疾患としており、全身血圧降下治療が極めて効果的に糖尿病性腎症を改善することは既に証明されている(非特許文献3)。糖尿病患者の動脈硬化度を診断し、合併症の重症度が動脈硬化度と良好に相関することも示されている。現在、動脈硬化度の診断は、脈波速度(Pulse Wave Velocity: PWV)等により広く

一般の医療機関で実施されている。脈波速度は特定部位の血管壁に脈波を通じてその速度を計ることにより血管壁硬化度を測定するものである(非特許文献4)。この診断技術は体液の採取を伴わないものであり、診断再現性も高いものであるが、特定の機器の設置が必要不可欠であり、患者を一定時間拘束する必要もある。

[0005] 実際の臨床現場における糖尿病性腎症のスクリーニング検査、及び早期診断は、患者からの随時尿による試験紙法による尿蛋白の検出、ないしは尿中微量アルブミンの検出・定量により行われている。この検査は簡便であるが、同一患者でも水分摂取量などが日々変動することにより、尿中への蛋白・アルブミンの排泄量が一定しないことから、同一患者へも一定期間内に数回に渡る検査を施行して陽・陰性を確認することが求められている。この検査法以外にも、糖尿病性腎症の病期を診断するために、腎機能検査を目的としてクレアチニンクリアランス測定(以降「Ccr」と略記)が一般に行われている(非特許文献5)。Ccrは血漿中の特定成分を一定時間中に腎臓から尿中へ排泄されるのに必要な血漿量を示しており、腎臓の糸球体濾過能を正確に診断する検査項目であるが、患者を数時間、ないしは24時間拘束する必要がある、尿と血漿を同時に採取する必要性もあることから、汎用性に欠けており、多数の患者へ頻繁に行うことは困難である。また、尿中蛋白・尿中微量アルブミン測定やCcrはいずれも腎機能を中心として診断する指標であり、腎臓に局限した腎機能不全症でも陽性と診断されることがあり、必ずしも糖尿病性腎症の特異的診断指標とはなっていない。糖尿病患者においても、急性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、紫斑性腎炎等の原発性糸球体腎炎が合併する場合があります、それぞれにおいて治療法が異なっており、正確な診断のためには腎生検が必要とされている(非特許文献6)。腎生検は患者への身体的負担が大きく頻繁に施行することが困難であることが問題となっている。

[0006] 最近、発明者らは、血中のエラスチン分解物の特異的測定試薬を開発することに成功し、その試薬を用いて、大動脈解離症の体液診断が可能となることを見出した(特許文献1)。大動脈解離症は、動脈硬化症を基礎疾患としており、血圧の上昇により血管壁が破裂・剥離する疾患である。動脈硬化が進行するに従って、血管壁に主として局在しているエラスチン分子が様々な蛋白質分解酵素により切断を受けて、その

分解物が循環液中に出現すると予想されており、ひいてはその分解物の血中濃度が上昇することとなる。

[0007] ところで、免疫学的測定方法によりヒト血中を循環しているエラスチン分解物量の測定が可能であることが示されている(非特許文献7～10参照)。また、本発明者らは、エラスチン分解物を免疫学的に測定する方法に好適なモノクローナル抗体として、ハイブリドーマHASG-2及びHASG-30が産生するモノクローナル抗体を開示している(特許文献1)。

[0008] これまで、血中エラスチン分解物の濃度と動脈硬化症および動脈硬化関連疾患との関連は示唆されて来た(非特許文献8、11、12参照)。この中で血中エラスチン分解物の濃度と糖尿病との関連についても示唆されている(非特許文献8)。最近では、糖尿病における循環障害合併症において血中エラスチン分解物の濃度が上昇することが示された(非特許文献13)。しかし、この報告では足部潰瘍・壊疽症状という極めて重症な糖尿病性循環障害患者群における傾向を示したのみであった。さらに最近では、血中エラスチン分解物の濃度はむしろ糖尿病患者では低値となるという報告や糖尿病性循環障害合併症の診断に使用することに困難性を示す報告がなされている(非特許文献14、15)。しかし、本発明者らが明らかにした大動脈解離症との関連を除いて、具体的に血中エラスチン分解物の濃度がどのような疾患に関連するかは知られていない。

特許文献1:特開2002-350439号公報

非特許文献1:糖尿病 42, 385(1999)

非特許文献2:日本臨床 60, 260-269 (2002)

非特許文献3:高血圧治療ガイドライン2000年版, 55-58 (2000) 杏林舎

非特許文献4:日本臨床 62, 80-86 (2004)

非特許文献5:糖尿病 44, 623 (2001)

非特許文献6:日本臨床 60, 316-322 (2002)

非特許文献7:Meth. Enzymol., 163, 656-673 (1988)

非特許文献8:Clin. Physiol. Biochem., 8, 273-282 (1990)

非特許文献9:J. Immunol. Methods, 164, 175-187 (1993)

非特許文献10: Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 14, 12-16 (1997)

非特許文献11: Atherosclerosis, 66, 163-168 (1987)

非特許文献12: Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 24, 440-444 (2002)

非特許文献13: Diabetologia Croatica, 26-3, 151-155 (1997)

非特許文献14: Atherosclerosis, 131, 73-78 (1997)

非特許文献15: General Pharmacology, 35, 59-64 (2000)

発明の開示

[0009] 本発明は、簡便で精度良く糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を判定する方法及びキットを提供するものである。

[0010] 本発明者らは、全身性動脈硬化症を基礎疾患とする大動脈解離症以外の疾患群の中で、エラスチン分解物の血中測定値が上昇する疾患があるのではないかと考え、糖尿病患者、及びその他の関連疾患を対象として研究を実施した。

そして本発明者らは、糖尿病患者群と糖尿病性腎症合併患者群で両患者群の血中のエラスチン分解物濃度を比較測定したところ、糖尿病性腎症合併群でのみ極めて高い血中濃度を検出し、エラスチン分解物の量の測定が糖尿病性腎症診断に有用であることを見出すに至った。また、急性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎や紫斑性腎炎といった原発性糸球体腎炎(腎臓限局型の腎機能不全)ではいずれも血中濃度が上昇しないことも併せて見出した。さらに詳細な検討を加えたところ、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシス、コレステリン塞栓症といった糖尿病性腎症と同様に全身性動脈硬化症を基礎疾患とする関連疾患においても血中濃度が上昇することも見出した。すなわち、本発明は、血中エラスチン分解物を測定することにより糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を診断する新規の診断指標を提供するものである。

[0011] 本発明は、被験者の循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を判定することを含む、

全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症の判定方法(以下「本発明方法」ともいう)を提供する。

糖尿病性腎症を対象とした場合においては、本発明における判定は、糖尿病性腎症であるか否か判定するのみならず、糖尿病性腎症の重症度を判定することまで含むものである。

[0012] 本発明方法においては、エラスチン分解物に対する持つ抗体を用いる免疫化学的方法によりエラスチン分解物の量を測定測定することが好ましい。

[0013] 前記抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。また、本発明方法は、第1又は第2のモノクローナル抗体を用い、抗体の一方が固相に固定され、及び、もう一方が標識物質により標識されていることが好ましい。

[0014] 前記モノクローナル抗体としては、HASG-2(FERM BP-08488)、HASG-30(FERM BP-08489)、HASG-61-1(FERM BP-08490)から選ばれるハイブリドーマにより產生されるモノクローナル抗体であることが好ましい。

本発明方法においては、前記第1及び第2のモノクローナル抗体は、HASG-30及びHASG-61-1のハイブリドーマにより產生されるモノクローナル抗体の組み合わせであることが好ましい。

[0015] 本発明はまた、エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体の1種又は2種以上を含み、被験者の循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を判定するための、全身性動脈硬化症の判定キット(以下「本発明キット」ともいう)を提供する。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]被験検体中の大動脈エラスチン分解物濃度と吸光度との関係を示す標準曲線である。

[図2]膜性増殖性糸球体腎炎(17例)、急性糸球体腎炎(20例)、紫斑性腎炎(23例)、糖尿病(腎症非合併例)55例と糖尿病性腎症(172例)、急性進行性糸球体腎炎(85例)、アミロイドーシス(26例)、コレステリン塞栓症(17例)、健常人(108例)における血清中エラスチン分解物濃度の分布を示す。

[図3]糖尿病患者群(129例)中の、糖尿病患者(腎症非合併例)53例、糖尿病性腎症患者(51例)、糖尿病性腎症＋慢性腎不全患者(25例)、第4群として糖尿病性腎症＋透析療法導入患者(53例)における血清中エラスチン分解物濃度の分布を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0017] <1>本発明測定法

本発明方法は、被験者の循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて糖尿病性腎症を判定することを特徴とする。

[0018] 本発明における循環液とは、血清、血漿、髄液、腹水といった体液又はその画分を示しており、医療機関等において通常採取されるものであれば特に限定されるものではないが、被験者からの血清などの血液検体が特に好適である。

[0019] 循環液中のエラスチン分解物の量の測定方法としては、循環液中のエラスチン分解物の量を測定することができればどのような方法でも用いることができるが、例えば、エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体を用いる免疫化学的方法が挙げられる。

[0020] 免疫学的方法は、エラスチン分解物、好適にはヒト大動脈エラスチン分解物に対する抗体を用いた方法であれば特に制限されず、ラテックス凝集方法、ウエスタンブロット法、サンドイッチ法、競合法などの方法があつて、特に限定されるものではないが、サンドイッチELISA法が好ましい。

その検出方法としては、放射性物質標識物を用いる方法、蛍光標識物を用いる方法、酵素標識物を用いる方法や電気化学発光を用いる方法などがあり、特に限定されるものではないが、安全で簡便な酵素免疫測定方法(ELISA)または電気化学発光免疫測定法であることが好ましい。

[0021] また、使用される抗体としては、ヒト大動脈エラスチン分解物を、ポリクローナル抗体としてはウサギ、ヤギ、ヒツジ等に免疫した血清から精製される抗体、モノクローナル抗体としてはマウスやラット、ハムスター等の齧歯類動物に免疫して作製されるモノクローナル抗体を用いることが可能であるが、好ましくはモノクローナル抗体が適している。モノクローナル抗体の作製に用いる動物種は特に限定されるものではないが、一般的にはBalb/Cマウスが最もよく用いられる。モノクローナル抗体は、通常のモノクロ

ーナル抗体の作製と同様の方法により作製することができる。

[0022] 抗体は、所定の特性及び親和性を有する限り、Fab、Fab'、F(ab')₂などのフラグメントであってもよい。また、抗体は、標識物質により標識されていてもよい。標識物質としては、二つの抗体を抗原に免疫学的に結合させる通常のサンドイッチ法に使用されるものが挙げられ、例えば、酵素、電気化学発光錯体、放射性物質、ラテックス、蛍光物質、化学発光物質、金属コロイド粒子などが挙げられる。本発明においては、酵素又は電気化学発光錯体が好ましい。標識と抗体との結合は、通常の方法に従って行うことができる。

[0023] また、抗体は、固相化されていてもよい。固相の形状や材質は特に限定されず、具体的には、マイクロタイタープレート、ビーズなどが挙げられる。抗体の固相への固定は、通常の方法に従って行うことができる。

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体及びそのFab、Fab'、F(ab')₂などのフラグメントの作製、マイクロプレート、磁気ビーズ、ラテックスビーズなどの固相への抗体の固定化、酵素、電気化学発光錯体、放射性物質、蛍光物質、化学発光物質、金属コロイド粒子など標識物質の抗体への結合、ラテックス凝集方法、ウェスタンブロット法、サンドイッチ法、競合法などの免疫学的測定は、Antibodies A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory (1988))、酵素免疫測定法(石川栄治ら、医学書院)などに記載の周知の方法に基づいて行うことができる。

[0024] 本発明に用いるモノクローナル抗体として具体的には、ハイブリドーマHASG-2 (FERM BP-08488)、HASG-30 (FERM BP-08489)、HASG-61-1 (FERM BP-08490) が産生するモノクローナル抗体、又はこれらの抗体のいずれかと同等の、ヒト大動脈エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体が挙げられる。HASG-2及びHASG-30は、特開2002-350439号公報に開示されている。

[0025] HASG-2及びHASG-30は、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に2001年5月18日に寄託され、受託番号FERM P-18335及びFERM P-18336が付与され、2003年9月18日に、ブタペスト条約に基く国際寄託に移管され、それぞれ、FERM BP-08488及びFERM BP-08489の受託番号が付与されている。また、HASG-61-1は、独立行

政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに2002年10月8日に寄託され、受託番号FERM P-19058が付与され、2003年9月18日に、ブタペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-08490の受託番号が付与されている。HASG-2により産生されるモノクローナル抗体、HASG-30により産生されるモノクローナル抗体、及び、HASG-61-1により産生されるモノクローナル抗体のいずれかと同等の、ヒト大動脈エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体は、以下に挙げるような方法により選択することができる。

- [0026] 同等の特異性及び親和性を持つ抗体は、例えば競合試験により選択することができる(Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) p.567)。具体的には、抗原物質であるヒト大動脈エラスチン分解物を適当な濃度で生理緩衝液に溶解し、マイクロプレート固相部に吸着させる。ブロッキング処理を行った後に、酵素標識したHASG-2、HASG-30又はHASG-61-1モノクローナル抗体とともに評価すべき抗体を同量で添加する。同様な特異性及び親和性を有する抗体は、酵素標識したHASG-2、HASG-30又はHASG-61-1モノクローナル抗体の反応を阻害する性能を確認することにより選択することができる。
- [0027] 別法としては、例えばペプチドマッピング法により選択することができる。具体的には、抗原物質であるヒト大動脈エラスチン分解物を高速液体クロマトグラフィー装置等により、分子量や疎水性等の違いにより分離し、分離された様々なエラスチン抗原断片に対する結合をHASG-2、HASG-30及びHASG-61-1モノクローナル抗体と比較することにより、特異性及び親和性を評価するものである。HASG-2、HASG-30又はHASG-61-1モノクローナル抗体が反応する抗原断片に同等に反応する抗体はそれぞれ同等の特異性を有すると判断される。
- [0028] ヒト大動脈エラスチン分解物は、Biochem. J., 61, 11-21(1955)に記載の方法によって得ることができるものであり、市販品として入手することができる。
- [0029] 生体試料中のエラスチン分解物のELISAにおいては、その測定方式としても様々な方法が知られているが、特に簡便で定量性が高い方法として固相化した第1抗体とペルオキシダーゼなどの酵素を標識した第2抗体を用いたサンドイッチ方式がよく用いられる。この場合の第1抗体と第2抗体はエラスチン分解物に対して特異的に反応

することが望ましく、第1抗体と第2抗体は同一のものであっても構わない。具体的には、大動脈エラスチン分解物を認識する抗体(第1抗体)を96ウェルマイクロプレートなどの固相に結合させる。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。次いで、固相への非特異的吸着を低減するためにミルクカゼインなどのブロッキングタンパク質を吸着させることが好ましい。そこへあらかじめ濃度の明らかな標準大動脈エラスチン分解物溶液と被験生体試料を加えて一定時間放置する。試料中の大動脈エラスチン分解物抗原を固相に吸着させた後に洗浄し、今度はペルオキシダーゼなどの酵素標識した別の抗大動脈エラスチン分解物抗体(第2抗体)を適当な濃度で加える。一定時間まで放置して第1抗体と大動脈エラスチン分解物と第2抗体の三者の複合体を固相上に形成させる。その後に固相を洗浄して、酵素の基質、酵素がペルオキシダーゼであれば過酸化水素とTMBZ等の発色基質の混合溶液を添加し、標識酵素による発色を得る。酵素反応を阻害剤等を添加して停止させた後に、その発色の吸光度をプレートリーダー等の機器により測定する。発色基質に代えて発光基質を使用することも許され、この場合は吸光度に代えて発光強度を測定する。被験液の吸光度と標準品の吸光度を検量線等を用いて比較することにより精度良く被験液中の大動脈エラスチン分解物量を知ることができる。

[0030] 電気化学発光免疫測定においては、その測定方式としても様々なものが知られているが、特に簡便で定量性が高いものとして第1抗体に、例えば磁気ビーズに固相化した抗体、第2抗体に、化学発光性錯体好ましくはルテニウム錯体によって標識した抗体を用いたサンドイッチ方式が好ましい。この場合の第1抗体と第2抗体はエラスチン分解物に対して特異的に反応することが望ましく、第1抗体と第2抗体は同一のものであっても構わない。具体的には、大動脈エラスチン分解物を認識する抗体(第1抗体)を磁気ビーズなどの固相に結合させる。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。次いで、固相への非特異結合を低減するためにミルクカゼインなどのブロッキングタンパク質を吸着させることが好ましい。そこへあらかじめ濃度の明らかなエラスチン分解物溶液、または被験生体試料を加えて一定時間放置する。固相が磁気ビーズであれば攪拌することが好ましい。試料中のエラスチン分解物抗原を抗体結合粒子表面に吸着させた後に固相を洗浄し、化

学発光性錯体好ましくはルテニウム錯体にて標識した別の抗エラスチン分解物抗体(第2抗体)を適当な濃度で加える。一定時間放置し、固相が磁気ビーズの場合は好ましくは攪拌して、第1抗体とエラスチン分解物抗原と第2抗体の三者の複合体を磁気ビーズ上に形成させる。その後に固相を洗浄して、好ましくは専用の装置中の電極間にて電流を通し化学発光性錯体、好ましくはルテニウム錯体を発光させ、発光強度を計測する。被験生体試料の発光量と標準品の発光量を検量線等を用いて比較することにより精度良く被験生体試料中のエラスチン分解物量を知ることができる。

[0031] 上記サンドイッチ法のように、第1抗体及び第2抗体を用いる場合、いかなる組合せも許されるが、好ましい各々の抗体の組み合わせとしては、具体的には以下ハイブリドーマにより産生されるモノクローナルの組合せが例示される。

(a) HASG-30及びHASG-61-1、

(b) HASG-61-1及びHASG-2、

(c) いずれもHASG-2、又は

(d) HASG-30及びHASG-2。

更に好ましくは、HASG-30及びHASG-61-1の組合せが望ましい。

[0032] 本発明における判定とは、糖尿病性腎症であるか否か判定するのみならず、糖尿病性腎症の重症度を判定することまで含むものである。

糖尿病性腎症であるか否かの判定は、エラスチン分解物の測定値がカットオフ値より高いか否かにより行われる。カットオフ値は通常、従来の方法により糖尿病性腎症ではないと診断された糖尿病患者の血中エラスチン分解物の濃度を測定し、その平均値+3SD(標準偏差)の値として設定される。実施例に記載した55例の糖尿病患者を測定した例においては、カットオフ値は184.9 ng/mLであった。

場合によっては、糖尿病性腎症ではないと診断された糖尿病患者の血中エラスチン分解物の測定値の最高値をカットオフ値と定めても良く、また糖尿病性腎症を発症しているか否かを判定できれば、他の値をカットオフ値と定めることも許される。

急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症のカットオフ値は、糖尿病性腎症と同様に行うことができるが、糖尿病患者に代えて健常人の測定値を用いることもできる。

[0033] 血中エラスチン分解物の測定値は、糖尿病、糖尿病性腎症、慢性腎不全まで進行した糖尿病性腎症患者、透析療法を導入するまで進行した糖尿病性腎症患者と、糖尿病性腎症の重症度に従って増大するため、血中エラスチン分解物の測定値は、糖尿病性腎症であると判定された後も、糖尿病性腎症の進行をモニターする指標として使用することも可能である。

[0034] 本発明者らは、後述する実施例に示すように、腎症を合併していない糖尿病患者ではほとんど測定値が上昇せず、糖尿病性腎症の患者で極めて高い陽性率で高い血中エラスチン分解物濃度を示すことを初めて発見した。また、健常人ではほとんど陽性となるケースはなく、腎症を合併しない糖尿病や原発性糸球体腎炎の患者においても陽性となった症例はわずかであった。また、糖尿病性腎症と同じく全身性動脈硬化症を基礎疾患とする各種疾患（急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシス、コレステリン塞栓症）においてもいずれも高い陽性率で高いエラスチン分解物濃度を示すことを初めて発見した。また、エラスチン分解物濃度は、糖尿病性腎症の重症度に従って上昇し、エラスチン分解物の濃度により糖尿病性腎症の重症度を判定することができた。したがって、循環液中のエラスチン分解物の量を測定することにより、糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を判定することが可能である。

また、循環液中のエラスチン分解物の量を測定することができる手段、例えば、エラスチン分解物に対する抗体は、糖尿病性腎症の診断薬の製造に用いることができる。

[0035] <2> 本発明キット

本発明キットは、エラスチン分解物に対する特異性及び親和性を持つ抗体の1種又は2種以上を含むことを特徴とする。同キットは、被験者の循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症を判定するために用いられる。前記抗体は、本発明方法に関して記載した通りである。

[0036] 本発明キットにおいては、抗体はモノクローナル抗体であることが好ましく、第1及び

第2のモノクローナル抗体を用いることがより好ましい。また、第1及び第2の抗体の一方が固相に固定され、及び、もう一方が酵素又は電気化学発光錯体により標識されていることが好ましい。標識及びは、本発明方法に関して記載したとおりである。

[0037] 本発明キットにおける抗体は溶液とされたものでも、凍結乾燥されたものであってもよい。

本発明キットは、第1及び第2の抗体の他に、免疫学的測定法で通常に使用される試薬を含んでいてもよい。この様な試薬としては、標準抗原(ヒト大動脈エラスチン分解物)液、基質溶液、検体希釈液、洗浄液などが挙げられる。これらの試薬としては、上述のエラスチン分解物を測定する方法で記載した試薬を用いることができる。

本発明キットは、本発明方法に従って使用することができる。具体的には、本発明キットは、糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症の診断薬として使用することができる。

実施例

[0038] 以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されるものではない。

[0039] <実施例1>

1) 大動脈エラスチン分解物に対するモノクローナル抗体の作製

ヒト大動脈エラスチン分解物(エラスチン・プロダクツ社製、カタログ番号:HA587)を、Balb/C雌マウス(6週齢)の腹腔内へ、一匹当たり0.1 mgの量でコンプリート・フロイント・アジュバント(ディフコ社製)とともに投与した。3週間後に同量の当該ヒト大動脈エラスチン分解物をインコンプリート・フロイント・アジュバント(ディフコ社製)とともに腹腔内へ投与した。さらに3週間後に同マウスへ当該ヒト大動脈エラスチン分解物のみを一匹当たり0.1 mg投与した。最終の免疫感作が終了した3日後にマウスから脾臓を摘出した。以降の作業は無菌クリーンベンチ内で実施した。摘出した脾臓をメッシュで分散させ、あらかじめ培養しておいたSp2/0-Ag14マウスミエローマ細胞と混合し、50%ポリエチレングリコール1500(ロッシュ・ダイアグノスティック社製)存在下で細胞融合した。融合したハイブリドーマ細胞は、96ウェルマイクロカルチャープレート数枚に

分散させ、10%牛胎児血清とHAT試薬(シグマ・アルドリッチ社製)を含むRPMI1640液体培地(シグマ・アルドリッチ社製)中で1~2週間培養した。この間にモノクローナル抗体を安定的に産生するハイブリドーマ細胞のみが生存し、融合しなかったミエローマ細胞やマウス脾臓細胞は死滅した。当該ヒト大動脈エラスチン分解物に対するモノクローナル抗体を産生する細胞の選択は抗原固相プレートによるELISAにより実施した。すなわち、ハイブリドーマ細胞のコロニーが十分に育った時点でその培養上清を採取し、免疫抗原を固相吸着した96ウェルマイクロプレート(ナルジェ・ヌンク社製)へ添加して、その上清中のモノクローナル抗体を免疫抗原に反応させた。その後、マウスIgGへ反応する2次抗体のペルオキシダーゼ標識物(ダコ・ジャパン社製)を適当な濃度で添加した。一定時間後にプレートを洗浄し、ABTS基質溶液(ロシュ・ダイアグノスティック社製)を加えた。その発色の有無により目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択した。選択された株は、それぞれ数回のクローニングを施した。こうして得られた3株のハイブリドーマは、HASG-2、HASG-30、HASG-61-1と命名された。それぞれのモノクローナル抗体の大量製造は、常法に従いマウス腹水からプロテインA固定化セファロースゲル(ファルマシア社製)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行った。以下、HASG-30及びHASG-61-1が産生するモノクローナル抗体を、それぞれ「HASG-30モノクローナル抗体」及び「HASG-61-1モノクローナル抗体」と呼ぶことがある。

[0040] 2) 血清中大動脈エラスチン分解物の酵素免疫測定法による測定

(1)項で作製されたHASG-30モノクローナル抗体とHASG-61-1モノクローナル抗体を精製IgGとして用意した。これらのモノクローナル抗体は、競合試験により互いに競合しないことを確認した。HASG-30モノクローナル抗体を最終濃度0.01mg/mLとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解して96ウェルマイクロプレート(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウェルに0.1mLずつ添加した。含有するモノクローナル抗体を吸着させた後に溶液を捨てて、ブロッキングを目的として1%スキムミルクを含有するトリス緩衝生理食塩水(以降「TBS」と略記)溶液を各ウェルに0.2mLずつ添加した。1時間後にスキムミルク溶液を廃棄し、TBSにて洗浄した。洗浄したウェルに、あらかじめ濃度を設定した標準ヒト大動脈エラスチン分解物、または被験血清を添加した。この際に被検

血清は1%スキムミルクを含有するPBS溶液にて10倍に希釈したのちに測定に供した。そのプレートをフィルムでカバーして1時間室温にて静置した後に溶液をすべて廃棄して、0.05%Tween-20(シグマ・アルドリッチ社製)を含むTBS(以降、Tween-TBSと略記する)にて3回洗浄した。その後に、過ヨウ素酸法 [Antibodies: a Laboratory Manual, by Ed. Harlow & D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press p.348 (1988)]によりペルオキシダーゼ(ロシュ・ダイアグノスティックス社)にて標識されたHASG-61-1モノクローナル抗体を含む1%スキムミルク含有TBS溶液をそれぞれ別々のウエルに0.1mLずつ添加した。その後、フィルムでカバーして室温にて1時間静置した。反応が終了した後に、プレート中の溶液をすべて廃棄し、Tween-TBSにて3回洗浄した。洗浄が終了した後に、過酸化水素含有TMBZ(テトラメチルベンチジン)塩酸基質溶液(シグマ社製)を各ウエルに0.1mLずつ添加した。そのままプレートを静置して10分間発色させた。その後にプレートの各ウエルへ2N塩酸溶液を0.1mLずつ添加し、よく混和して反応を停止させた。反応停止後にマイクロプレートリーダー(モレキュラーデバイス社製)にてプレート各ウエルの450nm波長における吸光度を測定し、発色の強さを数値化した。市販解析プログラムソフト(SOFTmax-J Ver.2.1 和光純薬工業社製)を用いて、標準ヒト大動脈エラスチン分解物溶液の抗原濃度と吸光度値から標準曲線を作製し(図1)、被験血清中の抗原濃度を算定した。上記測定方法によって、以下の被験患者の血清中の抗原濃度を測定した。結果を図2に示す。

[0041] 3) 糖尿病患者における血中エラスチン分解物の測定値

上記図2のヒト大動脈エラスチンの測定値について解析を行った。腎症合併のない糖尿病患者 55例の測定値の平均値と標準偏差は $79.2\text{ng/mL} \pm 35.2$ であり、糖尿病患者群における測定値分布上限(カットオフ値)を平均値 + 3SDの値 184.9ng/mL と設定した。これを目安とすると、172例の糖尿病性腎症患者群(平均値と標準偏差は $363.8 \pm 252.1\text{ng/mL}$)では172例中129例が陽性(陽性率75.0%、以下同様)となった。健常人108例における血中エラスチン分解物濃度を調査したところ $44.2 \pm 19.9\text{ng/mL}$ となり全例陰性となった。これに対して、糖尿病(腎症非合併例) 55例では1例のみ陽性(1.8%)となった。膜性増殖性糸球体腎炎17例では2例のみ陽性(11.8%)、急性糸球体腎炎 20例では全例陰性(0%)、紫斑性腎炎 23例においても1

例のみ陽性(4.3%)となり、腎臓限局型の腎炎である原発性糸球体腎炎ではいずれもほとんど陰性という結果が得られた。また、糖尿病性腎症と同様に全身性動脈硬化症を基礎疾患とする急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシス、及びコレステリン塞栓症ではそれぞれ85例中33例(38.8%)、26例中6例(23.1%)、17例中11例(64.7%)が陽性となって判定された。

以上の結果より、ヒト大動脈エラスチンの測定値により腎臓限局型の腎炎から全身性動脈硬化の起きている糖尿病性腎症を分別することが可能であり、また他の全身性動脈硬化症を基礎疾患とする急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシス、及びコレステリン塞栓症を診断することも可能であることが示された。

[0042] 4) 糖尿病性腎症患者の進行度と血中エラスチン分解物の測定値

これらの糖尿病患者群129例を疾患の進行度別に3段階に分類した。糖尿病患者群全体は、第1群として糖尿病患者(腎症非合併例)53例、第2群として糖尿病性腎症患者51例、第3群として慢性腎不全まで進行した糖尿病性腎症患者(以下、及び図3で糖尿病性腎症+慢性腎不全と記載)25例、第4群として透析療法を導入するまで進行した糖尿病性腎症患者(以下、及び図3で糖尿病性腎症+透析療法導入と記載)53例に分類した。また、健常人108例の血清における測定値もこれらの4群と比較した。

結果を図3にまとめた。この図は箱ヒゲ図と言われる図であり、各群を測定値順に並べた時の中央値(ボックス中央の横線)、25%~75%が含まれる範囲(ボックスの上端と下端の横線)、10%~90%が含まれる範囲(バーの上端と下端の横線)を表している。

エラスチン分解物の測定値は健常人では、 $44.2 \pm 19.9 \text{ ng/mL}$ 、第1群の糖尿病では $80.2 \pm 35.8 \text{ ng/mL}$ 、第2群の糖尿病性腎症では $224.6 \pm 149.6 \text{ ng/mL}$ 、第3群の糖尿病性腎症+腎不全では $337.8 \pm 170.4 \text{ ng/mL}$ 、第4群の糖尿病性腎症+透析導入では $590.7 \pm 267.6 \text{ ng/mL}$ となり、疾患の進行に伴って明らかに測定値が上昇するという結果が得られた。

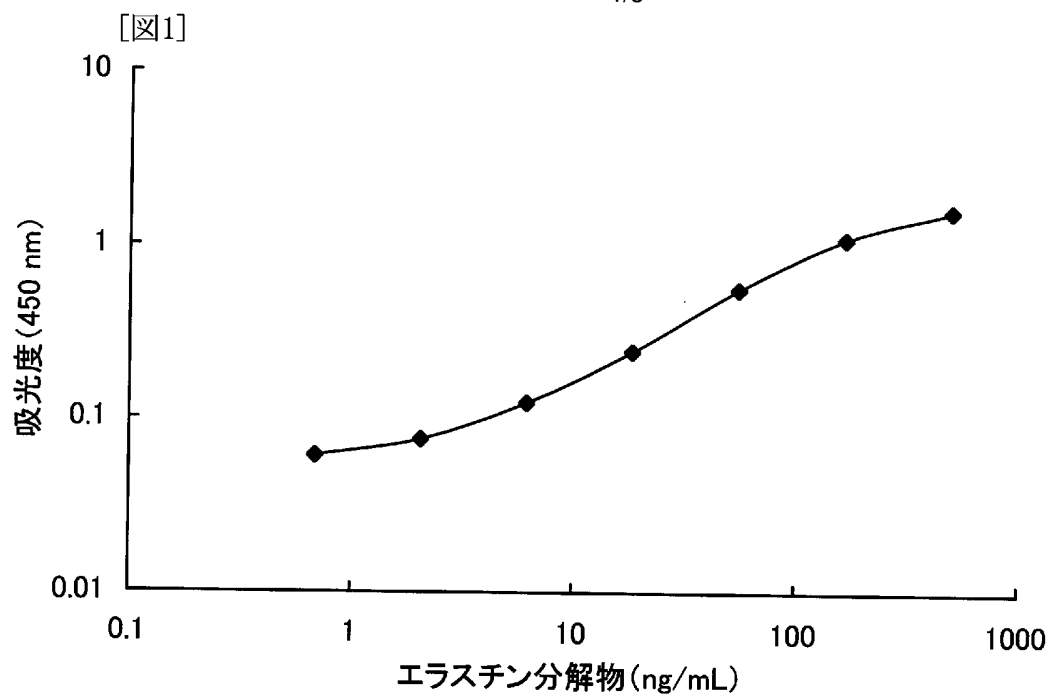
産業上の利用の可能性

[0043] 本発明によれば、血清などの循環液中のエラスチン分解物の量を測定することにより、特別な装置を用いることなく、迅速で簡便に、高い陽性率で糖尿病性腎症、急性

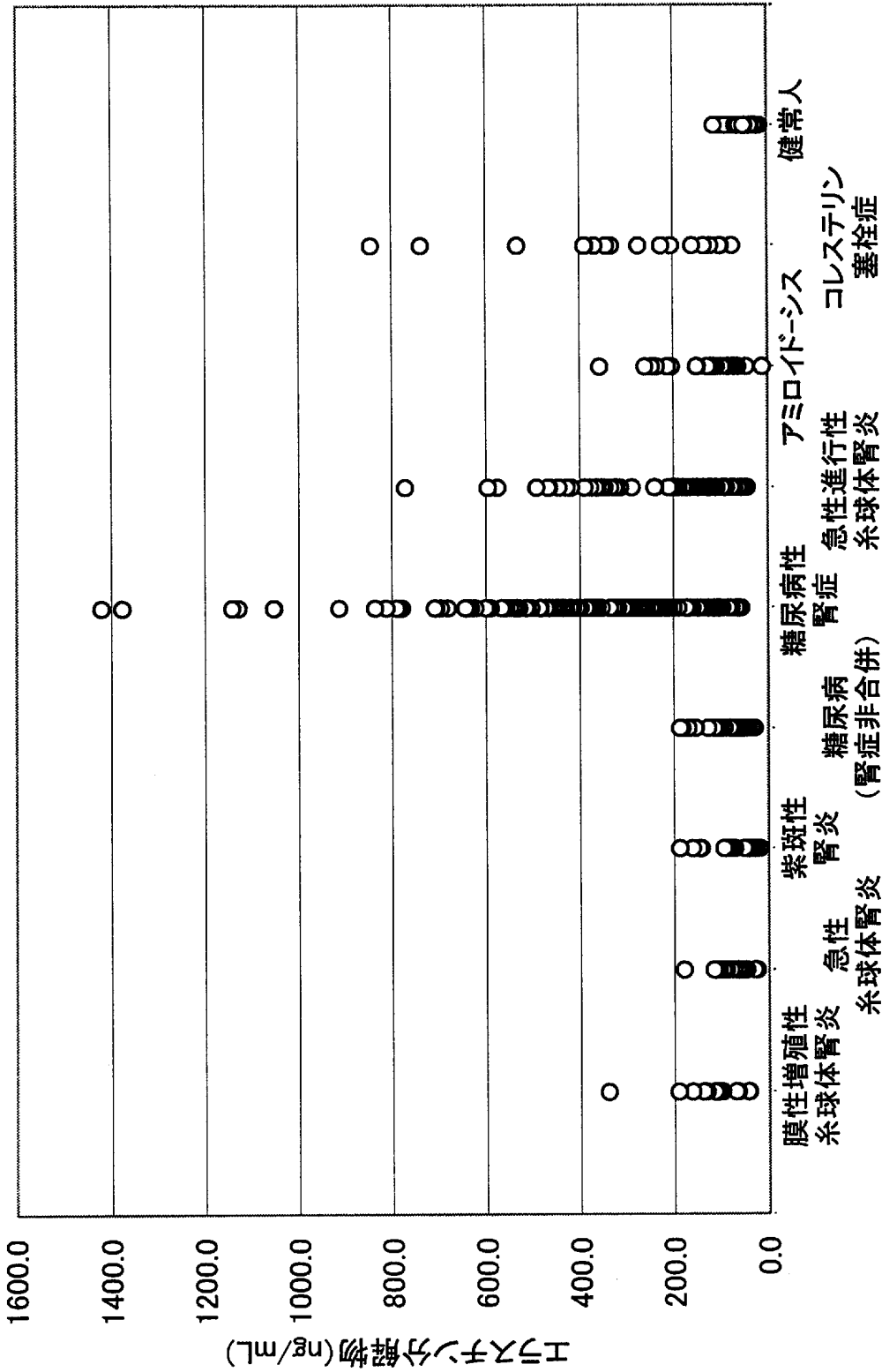
進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症といった全身性動脈硬化症、好ましくは糖尿病性腎症と判定することが可能になり、また糖尿病性腎症については重症度を判定することが可能となる。

請求の範囲

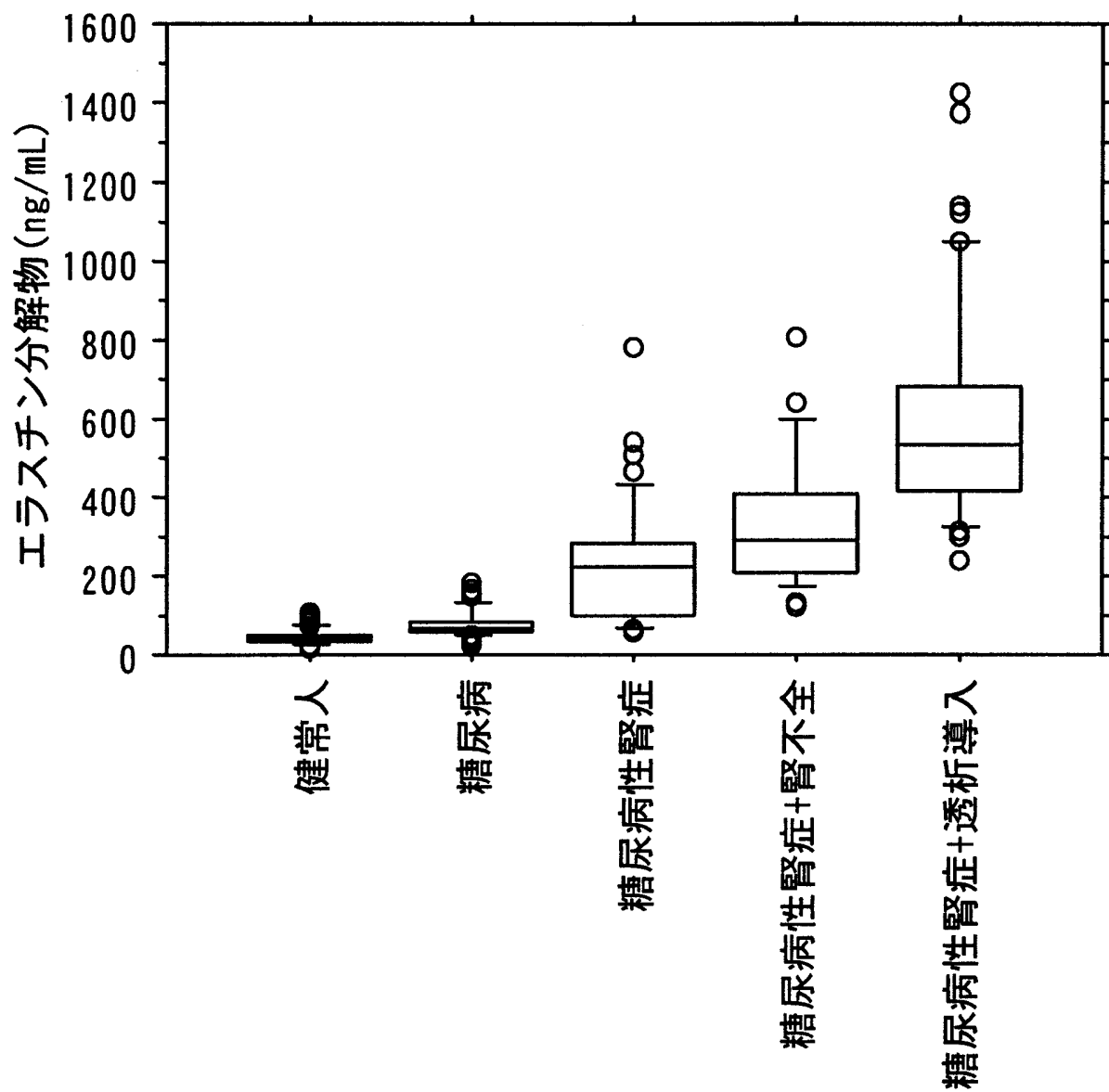
- [1] 被験者から採取した循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて全身性動脈硬化症を判定することを含む、全身性動脈硬化症の判定方法。
- [2] 全身性動脈硬化症が糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症である請求項1に記載の判定方法。
- [3] 全身性動脈硬化症が糖尿病性腎症である請求項1に記載の判定方法。
- [4] 糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症の判定が、糖尿病性腎症を発症しているか否かの判定である、請求項2に記載の方法。
- [5] 糖尿病性腎症の判定が、糖尿病性腎症の重症度の判定である、請求項3に記載の方法。
- [6] エラスチン分解物に対する抗体を用いる免疫化学的方法によりエラスチン分解物の量を測定する、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [7] 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項6に記載の方法。
- [8] 第1及び第2のモノクローナル抗体を用い、抗体の一方が固相に固定され、及び、もう一方が標識物質により標識されている請求項7に記載の方法。
- [9] モノクローナル抗体が、HASG-2 (FERM BP-08488)、HASG-30 (FERM BP-08489)、HASG-61-1 (FERM BP-08490)から選ばれるハイブリドーマにより産生される請求項8に記載の方法。
- [10] 前記第1及び第2のモノクローナル抗体が、HASG-30及びHASG-61-1のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体の組み合わせである請求項9に記載の方法。
- [11] エラスチン分解物に対する抗体の1種又は2種以上を含み、被験者の循環液中のエラスチン分解物の量を測定し、その測定値に基づいて糖尿病性腎症を判定するための、全身性動脈硬化症の判定キット。
- [12] 全身性動脈硬化症が糖尿病性腎症、急性進行性糸球体腎炎、アミロイドーシスまたはコレステリン塞栓症である請求項11に記載の判定キット。
- [13] 全身性動脈硬化症が糖尿病性腎症である請求項11に記載の判定キット。



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/53, 33/577//C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/53, 33/577//C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-350439 A (Eisai Co., Ltd.), 04 December, 2002 (04.12.02), Claims (Family: none)	1, 6-11
A	THONGBOONKERD, Alterations in the Renal Elatin-Elastase System in Type 1 Diabetic Nephropathy Identified by Proteomic Analysis, J.Am.Soc.Nephrol., 15(3), 2004, March, pages 650 to 662, abstract	1-13
A	JP 2002-537775 A (HIBERGEN LTD.), 12 November, 2002 (12.11.02), Claims & AU 2936400 A & CN 1343259 A & EP 1157130 A & NO 20013873 A & WO 2000/050637 A	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May, 2005 (18.05.05)

Date of mailing of the international search report

31 May, 2005 (31.05.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008070

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Dahlbaeck, Immunohistochemical demonstration of vitronectin in association with elastin and amyloid deposits in human kidney, Histochemistry, 87(6), 1987, summary	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/53, 33/577 // C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/53, 33/577 // C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-350439 A (エーザイ株式会社) 2002. 12. 04, 特許請求の範囲等参照 (ファミリーなし)	1, 6-11
A	THONGBOONKERD, Alterations in the Renal Elastin-Elastase System in Type 1 Diabetic Nephropathy Identified by Proteomic Analysis, J Am Soc Nephrol., 15(3), 2004. 03, p650-662, Abstract 等参照	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 05. 2005

国際調査報告の発送日

31. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

9408

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-537775 A (ハイパージェン・リミテッド) 2002.11.12, 特許請求の範囲等参照 & AU 2936400 A & CN 1343259 A & EP 1157130 A & NO 20013873 A & WO 2000/050637 A	1-13
A	Dahlbaeck, Immunohistochemical demonstration of vitronection in association with elastin and amyloid deposits in human kidney, Histochemistry, 87(6), 1987, Summary 等参照	1-13