(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6231307号
(P6231307)

(45)発行日　平成29年11月15日(2017.11.15)　(24)登録日　平成29年10月27日(2017.10.27)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	W
G01N 33/566	(2006.01)	G01N	33/566	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	５１５Ａ
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	F

請求項の数 10　(全 12 頁)

(21)出願番号　特願2013-135064(P2013-135064)
(22)出願日　平成25年6月27日(2013.6.27)
(65)公開番号　特開2015-10879(P2015-10879A)
(43)公開日　平成27年1月19日(2015.1.19)
審査請求日　平成28年6月9日(2016.6.9)

(73)特許権者　513163258
中野　恵正
大阪府大阪市生野区巽南３丁目３－２７
(74)代理人　100100480
弁理士　藤田　隆
(74)代理人　100135839
弁理士　大南　匡史
(72)発明者　向井　準
京都府京都市西京区山田弦馳町３６－１－１０５
(72)発明者　大木　誠
大阪府大阪市生野区巽南３丁目１１－３３－４０５

審査官　海野　佳子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能不全ＨＤＬの測定方法、機能不全ＨＤＬ測定用キット、並びに、生活習慣病マーカーの測定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中に含まれる機能不全ＨＤＬの測定方法であって、機能不全ＨＤＬの受容体に前記試料を接触させて、試料中の機能不全ＨＤＬを前記受容体に結合させ、受容体に結合した機能不全ＨＤＬを検出するものであり、
前記受容体は、ＬＯＸ－１又はその改変体であり、
前記受容体は、担体に固定化されており、
前記受容体に結合した機能不全ＨＤＬに、機能不全ＨＤＬを認識する抗体をさらに結合させることを特徴とする機能不全ＨＤＬの測定方法。
【請求項２】
前記機能不全ＨＤＬは、酸化ＨＤＬであることを特徴とする請求項１に記載の機能不全ＨＤＬの測定方法。
【請求項３】
前記抗体は、抗アポリポタンパク質Ａ１抗体であることを特徴とする請求項１又は２に記載の機能不全ＨＤＬの測定方法。
【請求項４】
請求項１～３のいずれかに記載の機能不全ＨＤＬの測定方法に用いるためのキットであって、ＬＯＸ－１又はその改変体と機能不全ＨＤＬを認識する抗体とを含むことを特徴とする機能不全ＨＤＬ測定用キット。
【請求項５】

前記抗体は、抗アポリポタンパク質Ａ１抗体であることを特徴とする請求項４に記載の機能不全ＨＤＬ測定用キット。
【請求項６】
さらに、機能不全ＨＤＬの標準品を含むことを特徴とする請求項４又は５に記載の機能不全ＨＤＬ測定用キット。
【請求項７】
機能不全ＨＤＬからなる生活習慣病マーカーの測定方法であって、
請求項１～３のいずれかに記載の機能不全ＨＤＬの測定方法によって、被験者から採取した体液中の機能不全ＨＤＬを測定することを特徴とする生活習慣病マーカーの測定方法。
【請求項８】
前記体液は、血清又は血漿であることを特徴とする請求項７に記載の生活習慣病マーカーの測定方法。
【請求項９】
前記生活習慣病は、メタボリックシンドローム、耐糖能異常、糖尿病、脂質異常症、動脈硬化、及び高血圧からなる群より選ばれた少なくとも１つであることを特徴とする請求項７又は８に記載の生活習慣病マーカーの測定方法。
【請求項１０】
得られた機能不全ＨＤＬの測定値を基準値と比較する工程を包含することを特徴とする請求項７～９のいずれかに記載の生活習慣病マーカーの測定方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、機能不全ＨＤＬの測定方法、機能不全ＨＤＬ測定用キット、並びに、生活習慣病マーカーの測定方法に関し、さらに詳細には、機能不全ＨＤＬの受容体を使用する機能不全ＨＤＬの測定方法、当該方法に用いられる機能不全ＨＤＬ測定用キット、並びに当該方法を利用したマーカーの測定方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年、食生活の欧米化が進み、それに起因すると考えられるメタボリックシンドローム、耐糖能異常、糖尿病、脂質異常症、高血圧、動脈硬化等の生活習慣病が増加している。これら生活習慣病に共通して問題になるのは、血中コレステロールの濃度と質である。
【０００３】
コレステロールは脂質の一種でステロイドに分類され、中でもステロールと呼ばれるサブグループに属する有機化合物の一種である。このコレステロールが血中を運ばれるとき、タンパク質と結合して複合体となったリポタンパク質の分子形態をとる。肝臓から末梢へのコレステロール輸送は、比較的比重が軽く粒子径の大きなリポタンパク質（低比重リポタンパク質。low-density lipoprotein。以下、「ＬＤＬ」と称する）が担当し、組織から肝臓への輸送は、比較的比重が重く粒子径の小さなリポタンパク質（高比重リポタンパク質。high-density lipoprotein。以下、「ＨＤＬ」と称する）が担当する。ＬＤＬ分子に含まれるタンパク質はアポリポタンパク質Ｂである。ＨＤＬ分子には多種類のタンパク質が含まれるが、その大半はアポリポタンパク質Ａ１（以下、「ＡｐｏＡ１」と略記することがある。）である。
【０００４】
１９６０年代にリポタンパク質の研究が進歩し、ＬＤＬが動脈硬化のリスクを高め、ＨＤＬがリスクを低減させるという学説が定着した。このため、ＬＤＬを「悪玉コレステロール」、ＨＤＬを「善玉コレステロール」と呼ぶことがある。現在、一般的な健康診断では総コレステロール、ＨＤＬ、中性脂肪を測定し、３者の測定値から計算式によってＬＤＬを算出している。日本動脈硬化学会が発出した動脈硬化性疾患予防ガイドラインでは、望ましいＬＤＬ、ＨＤＬ、中性脂肪、非ＨＤＬ（総コレステロール－ＨＤＬ）の血中濃度

を定義し、薬剤の服用によるコレステロールの管理目標を明記している。
【０００５】
このように、ＬＤＬは動脈硬化の原因であり、血中濃度を管理するべきであるとされているが、１９９０年代末からの研究の進歩により、ＬＤＬそのものよりもむしろ、ＬＤＬが体内で酸化修飾を受けた酸化変性ＬＤＬ（酸化ＬＤＬ）が動脈硬化のリスクを高める分子であることが明らかにされている。そして、酸化ＬＤＬの測定法がいくつか開発されており、そのような測定法の一部は、重症糖尿病患者の予後管理に用いる体外診断用医薬品に採用されている。
【０００６】
しかし近年、善玉とされていたＨＤＬにも、酸化などの修飾により、機能が損なわれて動脈硬化のリスクを高める「機能不全ＨＤＬ」があることが明らかになってきている。機能不全ＨＤＬは正常なＨＤＬとは異なり、動脈硬化や炎症を促進又は惹起することが明らかになっている。
【０００７】
機能不全ＨＤＬにはさまざまな分子形態の種類が知られている。例えば、ＨＤＬの構成成分のアポリポタンパク質Ａ１のリジン残基が過酸化脂質によって酸化修飾された「ＭＤＡ－ＨＤＬ」、メチオニン残基が酸化修飾された「ＭｅｔＯ－ＨＤＬ」、ミエロペルオキシダーゼの作用によって次亜塩素酸塩化した「ＨＯＣｌ－ＨＤＬ」、などである。さらにこのほかにも、ＨＤＬの構成成分の脂質部分が酸化された分子種もあるとされている。
【０００８】
このような機能不全ＨＤＬの血中濃度の測定は、動脈硬化のリスク及び進展を判定する検査方法としての有用性が期待されるため、その測定技術の研究が進められた。測定技術としては、メチオニン残基が酸化修飾されたアポリポタンパク質Ａ１（ＭｅｔＯ－アポＡ１）をエピトープとするモノクローナル抗体と、抗アポリポタンパク質Ａ１抗体とを用いるサンドイッチＥＬＩＳＡ法が報告されている（例えば、特許文献１～４、非特許文献１，２）。
【０００９】
しかし、これらの方法ではモノクローナル抗体を利用するため、検出できる機能不全ＨＤＬの分子形態が限定される。そのため、上記のように多様な分子形態の機能不全ＨＤＬを広く捕捉して検出することはできないという共通の問題がある。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【特許文献１】特許第４５８８０５３号公報
【特許文献２】特許第３９９８２４５号公報
【特許文献３】特許第３４３６４４４号公報
【特許文献４】特許第４６２５８１２号公報
【非特許文献】
【００１１】
【非特許文献１】Wang et al., "A sensitive and specific ELISA detects methionine sulfoxide-containing apolipoprotein A-I in HDL", Journal of Lipid Research 50, 2009, 586-594
【非特許文献２】Ueda et al., "Establishment and evaluation of 2 monoclonal antibodies against oxidized apolipoprotein A-I (apoA-I) and its application to determine blood oxidized apoA-I levels", Clinica Chimica Acta 378, 2007,105-111
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
上記のように、動脈硬化の原因は一種類の因子に帰するのではなく、ＬＤＬやＨＤＬをはじめとするさまざまな生体分子が、病態準備状態にある生体内環境のストレスによって

変質し、変質した分子が特異的受容体と結合することによって動脈硬化のリスクを高めていることが、近年の研究によって明らかになりつつある。このため、循環血中の機能不全ＨＤＬの濃度を測定することは、動脈硬化のリスクの程度を判定し、適切な医療介入を支援する有用な検査になる可能性がある。

【００１３】

しかし、変質又は酸化を受けて生じた機能不全ＨＤＬの特定の構造をエピトープとするモノクローナル抗体を利用する方法では、異なる修飾基の構造を有する機能不全ＨＤＬを検出することができない。モノクローナル抗体を用いる限り、この制約を払拭できない。

【００１４】

そこで本発明は、多様な分子形態の機能不全ＨＤＬを広く検出できる機能不全ＨＤＬの測定技術を提供するとともに、当該技術を利用した生活習慣病の検出技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

上記の課題を解決すべく、本発明者らは、モノクローナル抗体を用いずに機能不全ＨＤＬを測定するための研究を進めた。その結果、機能不全ＨＤＬの受容体（受容体タンパク質）を利用することにより、上記した課題を解決できることを見出した。すなわち、受容体を用いることにより、多様な機能不全ＨＤＬを広く捕捉することができることを見出した。そして、当該方法で測定した血中の機能不全ＨＤＬが、糖尿病、非アルコール性脂肪肝の患者では高値を示し、生活習慣病の検出が可能であることを見出し、本発明を完成した。

【００１６】

上記した知見に基づいて提供される１つの様相は、試料中に含まれる機能不全ＨＤＬの測定方法であって、機能不全ＨＤＬの受容体に前記試料を接触させて、試料中の機能不全ＨＤＬを前記受容体に結合させ、受容体に結合した機能不全ＨＤＬを検出することを特徴とする機能不全ＨＤＬの測定方法である。

【００１７】

この発明は機能不全ＨＤＬの測定方法に係るものである。この発明では、機能不全ＨＤＬが含まれる試料を機能不全ＨＤＬの受容体に接触させ、試料中の機能不全ＨＤＬを前記受容体に結合させる。そして、受容体に結合した機能不全ＨＤＬを検出することにより、試料中の機能不全ＨＤＬを測定する。この発明では、機能不全ＨＤＬの受容体を用いるので、多様な分子形態の機能不全ＨＤＬを受容体上に捕捉することができる。そのため、機能不全ＨＤＬを幅広く捉えることができる。モノクローナル抗体を用いた従来技術のように、測定対象が特定の機能不全ＨＤＬに限定されることはない。

【００１８】

「機能不全ＨＤＬ」とは、修飾を受けたＨＤＬ（修飾ＨＤＬ）であって、構成タンパクや構成脂質の酸化や欠損などにより、機能に異常を来したＨＤＬを指す。

機能不全ＨＤＬには、ＨＤＬを構成するタンパク質や脂質部分が酸化された修飾ＨＤＬ（酸化ＨＤＬ）が含まれる。また機能不全ＨＤＬには、ＨＤＬを構成するタンパク質の一部が欠損した修飾ＨＤＬが含まれる。

例えば、上述したような、ＨＤＬの構成成分のアポリポタンパク質Ａ１のリジン残基が過酸化脂質によって酸化修飾された「ＭＤＡ－ＨＤＬ」、メチオニン残基が酸化修飾された「ＭｅｔＯ－ＨＤＬ」、ミエロペルオキシダーゼの作用によって次亜塩素酸塩化した「ＨＯＣｌ－ＨＤＬ」が、機能不全ＨＤＬの具体例として挙げられる。

【００１９】

「機能不全ＨＤＬの受容体」には、受容体としての機能、すなわち、リガンドである機能不全ＨＤＬに対する結合性を保持している限り、天然型の受容体（受容体タンパク質の全長）の他、その改変体も含まれる。受容体の改変体としては、受容体タンパク質の変異体（アミノ酸置換体等）、受容体タンパク質の部分断片、受容体タンパク質と他タンパク質との融合タンパク質（キメラタンパク質）、等が例示される。

機能不全ＨＤＬの受容体としては、ＬＯＸ－１（ＯＬＲ－１とも呼ばれる）、ＣＤ３６、等が知られている。

【００２０】

好ましくは、前記受容体は、担体に固定化されている。

【００２１】

かかる構成により、受容体に結合した機能不全ＨＤＬの検出が容易となる。例えば、固相法による測定が可能となる。

【００２２】

好ましくは、前記受容体は、ＬＯＸ－１又はその改変体である。

【００２３】

ＬＯＸ－１とは、レクチン様酸化ＬＤＬ受容体（Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1）のことであり、酸化ＬＤＬの受容体の一種として知られている（日薬理誌，第１１９巻，ｐ１４５－１５４，２００２年；特開２０１１－１０６８４７号公報；特開２０１２－１００５８５号公報）。近年、修飾されたＨＤＬがＬＯＸ－１のリガンドとして作用しているとの報告がある（Besler C, et al. J Clin Invest. 2011;121:2693-708）。そしてこの発明は、機能不全ＨＤＬの受容体として、ＬＯＸ－１又はその改変体を用いるものである。

【００２４】

ＬＯＸ－１の改変体の例としては、ＬＯＸ－１の変異体（アミノ酸置換体等）、ＬＯＸ－１の部分断片、ＬＯＸ－１と他タンパク質との融合タンパク質（キメラタンパク質）等であって、受容体としての機能を保持しているものが挙げられる。

【００２５】

好ましくは、前記機能不全ＨＤＬは、酸化ＨＤＬである。

【００２６】

酸化ＨＤＬは、ＨＤＬの構成タンパク質や構成脂質が酸化された修飾ＨＤＬであり、機能不全ＨＤＬの代表例である。

【００２７】

好ましくは、受容体に結合した機能不全ＨＤＬに、機能不全ＨＤＬを認識する抗体をさらに結合させる。

【００２８】

かかる構成により、受容体に結合した機能不全ＨＤＬを抗体で検出することができる。

【００２９】

好ましくは、前記抗体は、抗アポリポタンパク質Ａ１抗体である。

【００３０】

他の様相は、上記の機能不全ＨＤＬの測定方法に用いるためのキットであって、機能不全ＨＤＬの受容体を含むことを特徴とする機能不全ＨＤＬ測定用キットである。

【００３１】

この発明は、機能不全ＨＤＬ測定用キットに係るものであり、機能不全ＨＤＬの受容体を含むことを特徴とする。この発明のキットによれば、上記した受容体を用いた機能不全ＨＤＬの測定を簡便に行うことができる。

【００３２】

好ましくは、さらに、機能不全ＨＤＬを認識する抗体を含む。

【００３３】

かかる構成により、受容体に結合した機能不全ＨＤＬの検出を簡便かつ容易に行うことができる。

【００３４】

好ましくは、さらに、機能不全ＨＤＬの標準品を含む。

【００３５】

かかる構成により、検量線の作成が容易となる。

【００３６】

他の様相は、上記の機能不全ＨＤＬの測定方法によって、被験者から採取した体液中の機能不全ＨＤＬを測定し、その測定結果に基づいて前記被験者における生活習慣病の有無を検出することを特徴とする生活習慣病の検出方法である。

【００３７】

この発明は生活習慣病の検出方法に係るものであり、上記した機能不全ＨＤＬの測定方法によって体液中の機能不全ＨＤＬを測定し、その測定結果に基づいて生活習慣病の有無を検出する。この発明によれば、体液中に存在する多様な分子形態の機能不全ＨＤＬを指標とすることができるので、機能不全ＨＤＬが関与する生活習慣病を幅広く高感度で検出することができる。

【００３８】

ここで「生活習慣病」とは、食生活や運動習慣、休養や喫煙、飲酒などの生活習慣が、病気の発症や進行に関与している疾患と定義される。当該生活習慣病には、少なくともメタボリックシンドローム、耐糖能異常、糖尿病、脂質異常症、動脈硬化、及び高血圧、並びにこれらの合併症が含まれる。

【００３９】

「生活習慣病の有無の検出」とは、生活習慣病の罹患の有無だけでなく、将来の発症リスクの有無も含む概念である。生活習慣病の将来の発症リスクの有無とは、生活習慣病を発症していない時点において、将来、生活習慣病に罹患する可能性（危険性）の有無を指す。

【００４０】

好ましくは、前記体液は、血清又は血漿である。

【００４１】

好ましくは、前記生活習慣病は、メタボリックシンドローム、耐糖能異常、糖尿病、脂質異常症、動脈硬化、及び高血圧からなる群より選ばれた少なくとも１つである。

【００４２】

請求項１に記載の発明は、試料中に含まれる機能不全ＨＤＬの測定方法であって、機能不全ＨＤＬの受容体に前記試料を接触させて、試料中の機能不全ＨＤＬを前記受容体に結合させ、受容体に結合した機能不全ＨＤＬを検出するものであり、前記受容体は、ＬＯＸ－１又はその改変体であり、前記受容体は、担体に固定化されており、前記受容体に結合した機能不全ＨＤＬに、機能不全ＨＤＬを認識する抗体をさらに結合させることを特徴とする機能不全ＨＤＬの測定方法である。

【００４３】

請求項２に記載の発明は、前記機能不全ＨＤＬは、酸化ＨＤＬであることを特徴とする請求項１に記載の機能不全ＨＤＬの測定方法である。

【００４４】

請求項３に記載の発明は、前記抗体は、抗アポリポタンパク質Ａ１抗体であることを特徴とする請求項１又は２に記載の機能不全ＨＤＬの測定方法である。

【００４５】

請求項４に記載の発明は、請求項１～３のいずれかに記載の機能不全ＨＤＬの測定方法に用いるためのキットであって、ＬＯＸ－１又はその改変体と機能不全ＨＤＬを認識する抗体とを含むことを特徴とする機能不全ＨＤＬ測定用キットである。

【００４６】

請求項５に記載の発明は、前記抗体は、抗アポリポタンパク質Ａ１抗体であることを特徴とする請求項４に記載の機能不全ＨＤＬ測定用キットである。

【００４７】

請求項６に記載の発明は、さらに、機能不全ＨＤＬの標準品を含むことを特徴とする請求項４又は５に記載の機能不全ＨＤＬ測定用キットである。

【００４８】

請求項７に記載の発明は、機能不全ＨＤＬからなる生活習慣病マーカーの測定方法であって、請求項１～３のいずれかに記載の機能不全ＨＤＬの測定方法によって、被験者から

採取した体液中の機能不全ＨＤＬを測定することを特徴とする生活習慣病マーカーの測定方法である。

【００４９】

請求項８に記載の発明は、前記体液は、血清又は血漿であることを特徴とする請求項７に記載の生活習慣病マーカーの測定方法である。

【００５０】

請求項９に記載の発明は、前記生活習慣病は、メタボリックシンドローム、耐糖能異常、糖尿病、脂質異常症、動脈硬化、及び高血圧からなる群より選ばれた少なくとも１つであることを特徴とする請求項７又は８に記載の生活習慣病マーカーの測定方法である。

【００５１】

請求項１０に記載の発明は、得られた機能不全ＨＤＬの測定値を基準値と比較する工程を包含することを特徴とする請求項７～９のいずれかに記載の生活習慣病マーカーの測定方法である。

【発明の効果】

【００５２】

本発明の機能不全ＨＤＬの測定方法によれば、多様な分子形態の機能不全ＨＤＬを測定することができる。

【００５３】

本発明の機能不全ＨＤＬ測定用キットによれば、受容体を用いた上記機能不全ＨＤＬの測定方法を簡便に実施することができる。

【００５４】

本発明の生活習慣病マーカーの測定方法によれば、機能不全ＨＤＬが関与する生活習慣病の有無を幅広く高感度で検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【００５５】

【図１】本発明の方法で作成した検量線を表すグラフである。

【図２】本発明の方法で血清中の機能不全ＨＤＬを測定した結果を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００５６】

以下、本発明の実施形態について説明する。

本発明の機能不全ＨＤＬの測定方法は、機能不全ＨＤＬの受容体に試料を接触させて、試料中の機能不全ＨＤＬを受容体に結合させ、受容体に結合した機能不全ＨＤＬを検出することを特徴とするものである。

【００５７】

上述したように、「機能不全ＨＤＬ」とは、修飾を受けたＨＤＬ（修飾ＨＤＬ）であって、構成タンパクや構成脂質の酸化や欠損などにより、機能に異常を来したＨＤＬを指す。例えば、ＨＤＬを構成するタンパク質や脂質部分が酸化されたＨＤＬ（酸化ＨＤＬ）、ＨＤＬを構成するタンパク質の一部が欠損したＨＤＬが、機能不全ＨＤＬに含まれる。機能不全ＨＤＬの具体例としては、ＭＤＡ－ＨＤＬ、ＭｅｔＯ－ＨＤＬ、ＨＯＣｌ－ＨＤＬ等が挙げられる。

特に酸化ＨＤＬは、本発明の測定対象である機能不全ＨＤＬの代表例である。

【００５８】

なお当然ながら、機能不全ＨＤＬの受容体には、機能不全ＨＤＬに対する抗体（イムノグロブリン）は含まれない。

【００５９】

本発明では、試料中の機能不全ＨＤＬを「機能不全ＨＤＬの受容体」に結合させる。機能不全ＨＤＬの受容体としては、機能不全ＨＤＬがリガンドとなる受容体であれば特に限定はない。機能不全ＨＤＬの受容体の具体例としては、上述したＬＯＸ－１、ＣＤ３６が挙げられる。

【００６０】

ＣＤ３６はクラスＢスカベンジャー受容体ファミリーのひとつで、細胞の表面に発現する膜タンパク質である。分子量は８８ｋＤで、コラーゲン、トロンボスポンジンをはじめとするさまざまなタンパク質と結合し、各種のシグナル伝達に重要な役割を果たすことが知られており、酸化ＨＤＬとも結合する。

【００６１】

また、機能不全ＨＤＬの受容体には、機能不全ＨＤＬに対する結合性を保持している限り、天然型の受容体（受容体タンパク質の全長）の他、その改変体（受容体タンパク質の変異体、受容体タンパク質の部分断片、受容体タンパク質と他タンパク質との融合タンパク質等）が含まれる。

【００６２】

好ましい実施形態では、機能不全ＨＤＬの受容体としてＬＯＸ－１を用いる。なお、ＬＯＸ－１の遺伝子は既にクローニングされており、組換え型のＬＯＸ－１が入手可能である(特開平９－９８７８７号公報）。

【００６３】

本発明における試料としては特に限定はないが、例えば、ヒトから採取した体液（例えば、血清や血漿）を挙げることができる。

【００６４】

本発明では、受容体に結合した機能不全ＨＤＬを検出する。この際、担体（支持体）に固定化された受容体を用いることが好ましい。これにより、いわゆる固相法による測定が可能となる。担体としては、受容体を固定化できるものであれば特に限定はなく、マイクロタイタープレート、ビーズ、ラテックス粒子等、公知の担体を用いることができる。

【００６５】

また、機能不全ＨＤＬを認識する抗体をさらに用いることができる。当該抗体の例としては、抗アポリポタンパク質Ａ１抗体（抗ＡｐｏＡ１抗体）が挙げられる。本実施形態によれば、例えば、受容体によって機能不全ＨＤＬを捕捉し、抗体によって機能不全ＨＤＬを検出することができる。

【００６６】

一例として、担体に固定化されたＬＯＸ－１（機能不全ＨＤＬの受容体）で試料中の機能不全ＨＤＬを捕捉し、抗ＡｐｏＡ１抗体（機能不全ＨＤＬを認識する抗体）で機能不全ＨＤＬを検出する測定系について説明する。この例は、いわゆるサンドイッチ法に属するものである。

【００６７】

まず、ＬＯＸ－１をマイクロタイタープレート等の担体に固定化する。そして、固定化されたＬＯＸ－１に血清等の試料を添加して接触させ、試料中の機能不全ＨＤＬをＬＯＸ－１に結合させる。洗浄後、抗ＡｐｏＡ１抗体を添加して、ＬＯＸ－１に結合した機能不全ＨＤＬに抗ＡｐｏＡ１抗体を結合させる。そして、結合した抗ＡｐｏＡ１抗体検出し、これを指標として試料中の機能不全ＨＤＬを測定する。

抗ＡｐｏＡ１抗体は、標識と未標識のいずれでもよい。未標識の抗ＡｐｏＡ１抗体を用いる場合には、抗ＡｐｏＡ１抗体に結合する標識抗体（標識二次抗体）を用いればよい。標識の種類としては、酵素、蛍光物質、放射性物質等の公知のものを採用することができる。また抗ＡｐｏＡ１抗体は、ポリクローナルとモノクローナルのいずれでもよい。

【００６８】

サンドイッチ法に代えて、競合法を用いることもできる。また、抗ＡｐｏＡ１抗体を固相化し、ＬＯＸ－１で機能不全ＨＤＬを検出することも可能である。

【００６９】

なお、本発明の機能不全ＨＤＬの測定方法において、検量線の作成等に使用する標準品（標準物質）としては、例えば、ヒト血液から調製したＨＤＬ画分を硫酸銅等で酸化処理したもの（以下、「人工酸化ＨＤＬ」と称することがある。）を用いることができる。そして、当該標準品を用いて、タンパク濃度測定またはコレステロール測定によって濃度を規定した標準機能不全ＨＤＬの希釈系列を作製し、これらの測定結果から検量線を作成す

ることができる。
【００７０】
本発明の機能不全ＨＤＬ測定用キットは、機能不全ＨＤＬの受容体を含むものである。好ましい実施形態では、機能不全ＨＤＬを認識する抗体（例えば、抗ＡｐｏＡ１抗体）をさらに含む。また、機能不全ＨＤＬの標準品（例えば、上記の人工酸化ＨＤＬ）をさらに含む。
【００７１】
本発明のキットの構成例を以下に挙げる。本構成のキットには、さらにプレートやビーズ等の担体、発色基質、等を含めてもよい。
【００７２】
〔キットの構成例〕
（ａ）ＬＯＸ－１（溶液又は凍結乾燥品）　適量
（ｂ）ＨＲＰ標識抗ＡｐｏＡ１抗体（溶液又は凍結乾燥品）　適量
（ｃ）人工酸化ＨＤＬ（標準品。溶液又は凍結乾燥品）　適量
【００７３】
本発明の生活習慣病の検出方法は、上記した機能不全ＨＤＬの測定方法によって、被験者から採取した体液中の機能不全ＨＤＬを測定し、その測定結果に基づいて前記被験者における生活習慣病の有無を検出するものである。体液の例としては、血清又は血漿が挙げられる。
【００７４】
例えば、健常人の体液を用いて上記の方法で機能不全ＨＤＬを測定し、基準値（カットオフ値）を設定することができる。そして、被験者の体液を用いて同様にして機能不全ＨＤＬを測定し、その測定値を基準値と比較して、当該被験者における生活習慣病の有無を検出することができる。
【００７５】
検出対象となる生活習慣病としては、メタボリックシンドローム、耐糖能異常、糖尿病、脂質異常症、動脈硬化、高血圧、及びこれらの合併症が挙げられる。
【００７６】
以下に、実施例をもって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。
【実施例】
【００７７】
（１）機能不全ＨＤＬの標準品（人工酸化ＨＤＬ）の調製
常法によりヒト血液からＨＤＬ画分を調製した。得られた画分のＨＤＬ濃度を０．５ｍｇ／ｍＬに調整し、終濃度が５０マイクロモルになるように硫酸銅を加え、３７℃で４８時間インキュベートし、ＨＤＬを酸化修飾した。その後、終濃度２ミリモルになるようにＥＤＴＡを加えて、酸化を停止させ、標準品となる人工酸化ＨＤＬを得た。
【００７８】
（２）サンドイッチ法による測定系の構築と検量線の作成
ヒトＬＯＸ－１のＰＢＳ溶液（０．５μｇ／ｍＬ）を調製した。これをマイクロタイタープレートの各穴に１００μＬ注入し、４℃で一晩インキュベートした（ＬＯＸ－１の固相化）。ＬＯＸ－１溶液を排出し、各穴をＰＢＳＴ（ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で３回洗浄した後、各穴にブロッキング液（５％ ＢＳＡ）を２００μＬ注入した。室温で２時間インキュベートした（ブロッキング）。
【００７９】
ブロッキング液を排出し、各穴をＰＢＳＴで３回洗浄した後、試料として上記（１）で調製した検量線作成用の標準品（人工酸化ＨＤＬ。０～１０００ｎｇ／ｍＬ）を１００μＬ注入した。室温で２時間インキュベートした。試料を排出し、各穴をＰＢＳＴで３回洗浄した後、各穴にＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトＡｐｏＡ１抗体の３０００倍希釈液を１００μＬ注入した。室温で２時間インキュベートした。

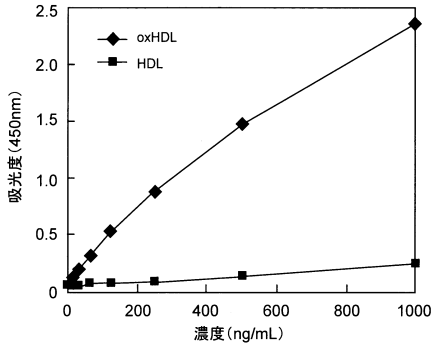
【００８０】
抗ヒトＡｐｏＡ１抗体溶液を排出し、各穴をＰＢＳＴで５回洗浄した後、各穴にＴＭＢ基質（バイオラッド社）を１００μＬ注入した。遮光して３０分間インキュベートした後、１Ｍ硫酸を５０μＬ注入して酵素反応を停止した。マイクロプレートリーダーにて４５０ｎｍにおける吸光度（Ａ４５０）を測定した。得られた吸光度から検量線を作成した。
コントロールとして、酸化処理していないＨＤＬ（０～１０００ｎｇ／ｍＬ）も同時に測定した。
【００８１】
結果を表１と図１に示す。表１と図１において、「ｏｘＨＤＬ」は人工酸化ＨＤＬ、「ＨＤＬ」は酸化処理していないＨＤＬを示す。すなわち、人工酸化ＨＤＬについては、その濃度に相関したＡ４５０値が得られた。そして、少なくとも０～１０００ｎｇ／ｍＬの濃度範囲で直線性が得られており、機能不全ＨＤＬ（酸化ＨＤＬ）の測定が可能であった。
【００８２】
【表１】

表1

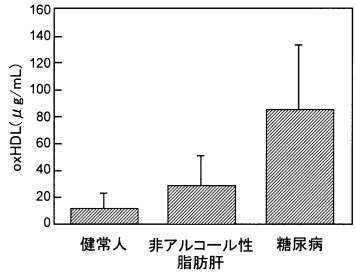
濃度(ng/mL)	A450	
	oxHDL	HDL
1000	2.35	0.25
500	1.47	0.13
250	0.88	0.09
125	0.53	0.07
62.5	0.31	0.08
31.3	0.18	0.05
15.6	0.12	0.05
0	0.05	0.06

【００８３】
（３）血清試料を用いた検討
健常人（２５例）、非アルコール性脂肪肝患者（１１５例）、および糖尿病患者（４１５例）の血清を試料として、上記（２）の方法で酸化ＨＤＬを測定した。血清は、希釈液（5% BSA, 2mM EDTA in HEPES with 0.05% Tween20）で５０倍希釈して使用した。標準品として、（１）で作製した人工酸化ＨＤＬを用いた。標準品の希釈系列は、４０００ｎｇ／ｍＬを先頭に１／２倍ずつ段階希釈した７点とした。測定結果を図２に示す。
【００８４】
機能不全ＨＤＬ濃度（人工酸化ＨＤＬ換算）の平均値±標準偏差（μｇ／ｍＬ）について、健常人では１１．９±１１．２μｇ／ｍＬ、非アルコール性脂肪肝患者では２９．６±２１．９μｇ／ｍＬ、糖尿病患者では８５．９±４８．０μｇ／ｍＬであった。そして、健常人と非アルコール性脂肪肝患者との間、並びに、健常人と糖尿病患者との間に有意差が認められた。なお、非アルコール性脂肪肝はメタボリックシンドロームの一態様と捉えることができる。
以上より、本発明の方法によって血清中の機能不全ＨＤＬを測定することにより、糖尿病等の生活習慣病の検出が可能であることが示された。

【図１】


oxHDL
HDL
吸光度（450nm）
濃度（ng/mL）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
0
200
400
600
800
1000

【図２】


oxHDL（μg/mL）
160
140
120
100
80
60
40
20
0
健常人
非アルコール性脂肪肝
糖尿病

フロントページの続き

(56)参考文献 特開２００７－２７９０６６（ＪＰ，Ａ）
特開２０１１－１０６８４７（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－２０３２６９（ＪＰ，Ａ）
特開２００４－０６９６７２（ＪＰ，Ａ）
特開平０９－０３３５２５（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５１５６３２（ＪＰ，Ａ）
特開２０１２－１００５８５（ＪＰ，Ａ）
Besler C, et al., , J. Clin. Invest., ２０１１年, vol.121 , p2693-2708

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）