

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5176239号

(P5176239)

(45) 発行日 平成25年4月3日(2013.4.3)

(24) 登録日 平成25年1月18日(2013.1.18)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	B
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K 16/18	

請求項の数 6 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2008-509891 (P2008-509891)	(73) 特許権者	506137147 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ ジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(86) (22) 出願日	平成19年4月6日(2007.4.6)	(73) 特許権者	504159235 国立大学法人 熊本大学 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/057779	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開番号	W02007/116975	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(87) 国際公開日	平成19年10月18日(2007.10.18)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
審査請求日	平成22年4月6日(2010.4.6)		
(31) 優先権主張番号	特願2006-105516 (P2006-105516)		
(32) 優先日	平成18年4月6日(2006.4.6)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チトクロムcの定量による非アルコール性脂肪性肝炎の非侵襲的な検査方法及び検査キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

採取された血液中のチトクロムcを定量する工程を含むことを特徴とする、非アルコール性脂肪性肝炎の検査方法。

【請求項2】

(1) 血液中のチトクロムcを定量する工程、及び、
(2) チトクロムcの定量値が高い場合に非アルコール性脂肪性肝炎であると判定する工程、
を含む請求項1に記載の非アルコール性脂肪性肝炎の検査方法。

【請求項3】

血液中のチトクロムcを定量する工程が、チトクロムcに対する抗体を用いて定量する工程である、請求項1または2に記載の検査方法。

【請求項4】

チトクロムcに対する抗体を用いて定量する工程が、血液中のチトクロムcとチトクロムcに対する抗体を酸性領域で反応させることを含む工程である、請求項3に記載の検査方法。

【請求項5】

血液中のチトクロムcをチトクロムcに対する抗体を用いて定量するための試薬を含むことを特徴とする、非アルコール性脂肪性肝炎を検査する検査キット。

【請求項6】

10

20

血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液を含む、請求項 5 に記載の検査キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非侵襲的に非アルコール性脂肪性肝炎を検査する方法、及びその方法に用いる検査キットに関する。

【背景技術】

【0002】

慢性肝疾患は、慢性肝炎・肝硬変、そして最終的には肝細胞癌に移行する。その主たる原因はC型肝炎ウイルスあるいはB型肝炎ウイルス感染によるものである。一方、明らかな飲酒歴がないものの、脂肪肝を背景にしてアルコール性肝炎類似の組織像を呈する病態である非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steato-hepatitis: NASH) が近年、注目されるようになり、非アルコール性脂肪性肝炎が肝硬変、肝細胞癌へと進展する事も明らかとなっている。

10

【0003】

非アルコール性脂肪性肝炎の病態では、第一段階(first hit)としての肝脂肪化に引き続き、第二段階(second hit)として種々のストレスが加わることで肝細胞障害(アポトーシス)や線維化が惹起されるというtwo hit theoryが推定されている。非アルコール性脂肪性肝炎を含む非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)は肥満・糖尿病・高脂血症などのインスリン抵抗性症候群との強い関連が明らかで、アメリカでは最も一般的な肝疾患であり、肥満者の70%に脂肪肝が合併しているとされている。さらに高度肥満者(BMI>30)では10%が非アルコール性脂肪性肝炎であると報告されていることから、本邦でも25万人以上は非アルコール性脂肪性肝炎患者が存在すると推定される。

20

【0004】

現在のところ、肝細胞癌の発症原因のうち約8割弱はC型肝炎ウイルス感染であり、非アルコール性脂肪性肝炎は数%にも過ぎないが(非特許文献1)、今後、輸血血液のC型肝炎ウイルススクリーニング、C型肝炎の診断薬及びインターフェロンなどの治療薬の開発により、C型肝炎ウイルスによる肝細胞癌の発症リスクが減少すると考えられるのとは対照的に、食生活の欧米化によるインスリン抵抗性症候群の増加に伴い、本邦でも非アルコール性脂肪性肝炎による肝細胞癌は上昇する事が予想される。

30

【0005】

しかしながら、非アルコール性脂肪性肝炎には特異的なマーカーが存在しないために、侵襲的な肝生検による病理診断に頼らざるを得ないところが現状である。

【非特許文献1】Bugianesi E et al. Gastroenterology 2002;123:134-140

【発明の開示】

【0006】

本発明の課題は、非侵襲的に非アルコール性脂肪性肝炎を検査する方法、及び検査キットを開発することにある。

40

【0007】

非アルコール性脂肪性肝炎では、脂肪肝に種々のストレスが加わることで惹起される肝細胞障害(アポトーシス)が関与していると考えられている(Ribeiro PS et al. Am J Gastroenterol. 2004 Sep;99(9):1708-17)。

【0008】

本発明者らは、血球貪食症候群(HPS)、GVHD、急性リンパ性白血病及びインフルエンザ脳炎で起こっている生体内のアポトーシスを測定したWO 01/35093と同様、非アルコール性脂肪性肝炎で起こっているストレス依存性の肝細胞障害(アポトーシス)を、血中チトクロム c により評価しうるのではないかと考えた。

【0009】

50

そして、非アルコール性脂肪性肝炎の患者では健常人に比べて、血中のチトクロム c の定量値が高いこと、また血中のチトクロム c の定量値と肝細胞内の脂肪沈着率とが相関することを見出し、本発明を完成するに到った。

【0010】

すなわち本発明は、以下に関する。

[1] 採取された血液中のチトクロム c を定量する工程を含むことを特徴とする、非アルコール性脂肪性肝炎の検査方法。

[2] (1)血液中のチトクロム c を定量する工程、及び、
(2)チトクロム c の定量値が高い場合に非アルコール性脂肪性肝炎であると判定する工程、
を含む [1] に記載の非アルコール性脂肪性肝炎の検査方法。

10

[3] 血液中のチトクロム c を定量する工程が、チトクロム c に対する抗体を用いて定量する工程である、[1] または [2] に記載の検査方法。

[4] チトクロム c に対する抗体を用いて定量する工程が、血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させることを含む工程である、[3] に記載の検査方法。

[5] 血液中のチトクロム c をチトクロム c に対する抗体を用いて定量するための試薬を含むことを特徴とする、非アルコール性脂肪性肝炎を検査する検査キット。

[6] 血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液を含む、[5] に記載の検査キット。

20

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】非アルコール性脂肪性肝炎患者と健常人の血清中のチトクロム c 量の定量結果を示す。

【図2】肝細胞内の脂肪沈着率と血清中のチトクロム c 定量値の相関関係を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下に本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本明細書中において血液とは、生体より採取された血液・血漿・血清を意味するものである。

30

【0013】

チトクロム c を測定する方法としては、免疫化学的方法・電気泳動・クロマトグラフィ等が考えられるが、感度・簡便性から免疫化学的方法が好ましい。

【0014】

ここで免疫化学的方法とは、チトクロム c に対する抗体を用いて、チトクロム c を定量する方法である。免疫化学的方法としては、チトクロム c を標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体コートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法等、様々な方法があるが、チトクロム c に対する抗体を用いた方法であれば、本発明に含まれる。抗体はモノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また標識する方法にも、放射性同位元素による標識、電気化学発光する化合物による標識、蛍光標識、酵素標識、ビオチン標識等、様々な方法があるが、本発明はこれらの例に限られるものではない。抗体の作製法及び標識法は、例えば続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法 (社団法人日本生化学会編 株式会社東京化学同人発行) または新生化学実験講座 12 分子免疫学 111 (社団法人日本生化学会編 株式会社東京化学同人発行) に記載されている。

40

【0015】

チトクロム c を測定する免疫化学的方法の例として、以下にサンドイッチ法についてステップを追って説明する。

【0016】

1). チトクロム c に対する抗体をビーズあるいはカップ上に固相化する。固相化する抗体は、必要な感度、好ましくは 0.5 ng/mL、更に好ましくは 0.1 ng/mL のチトクロム c が測定

50

できる感度が得られる抗体であれば、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても許される。モノクローナル抗体としては、市販の抗体、例えばclone : 6H2.B4, (Becton Dickinson社)またはclone:2B5F8 (TECHNE 社)を使っても良い。ビーズはマイクロビーズでもよく、その場合は磁性体のマイクロビーズが好ましい。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。通常、ビーズあるいはカップ上の非特異的な結合部位をふさぐため、ウシ血清アルブミン (BSA) ・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤でブロッキング操作を行う。

【 0 0 1 7 】

2). 検体を、必要であればBSA・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファで希釈し、ビーズあるいはカップに加える。また、既知の量のチトクロム c も同様に希釈して加える。

10

【 0 0 1 8 】

3). ビーズあるいはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファで洗浄後、できればBSA・カゼイン等の蛋白質、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファで希釈された標識抗チトクロム c 抗体を加える。標識抗体は、必要な感度、好ましくは0.5 ng/mL、更に好ましくは0.1 ng/mLのチトクロム c が測定できる感度が得られる抗体であれば、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても許される。固相化抗体がモノクローナル抗体の場合、標識モノクローナル抗体は固相化抗体と異なるcloneを使うことが好ましく、市販の抗体、例えばclone : 6H2.B4, (Becton Dicknson社) またはclone:2B5F8 (TECHNE 社)を使っても良い。

20

【 0 0 1 9 】

4). ビーズあるいはカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファで洗浄後、標識に応じた方法、放射性標識であれば放射活性を、電気化学発光する化合物による標識であれば電圧を加えて発光を、酵素標識であれば酵素活性を測定する。また、ビオチン化標識であれば更に標識アビジンを加えて、標識に応じた方法で測定する。

【 0 0 2 0 】

5). 既知量のチトクロム c を含む検体の測定値から検量線を作成し、検体中に含まれるチトクロム c 量を計算する。

以上のステップにより、検体中のチトクロム c が定量される。

【 0 0 2 1 】

30

本発明の方法では、酸性領域 (酸性条件) で抗チトクロム c 抗体とチトクロム c 含有試料を反応させることが好ましい。本願明細書でいう酸性領域とは、抗体とチトクロム c の結合に影響を与える血液、例えば血清中の妨害物質の影響が減弱するpH領域である。pHを低下させることにより妨害物質の影響を減弱させることができるが、同時に抗体とチトクロム c の結合も弱くなるため、免疫化学的な測定におけるpHは、以下のようなpHに決められる。

【 0 0 2 2 】

1 . 緩衝液中で10 ng/mL、好ましくは1 ng/mLのチトクロム c が定量可能な測定感度が得られ、かつ、

2 . 血液、例えば血清存在下での添加回収試験における回収率が70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上得られる。

40

【 0 0 2 3 】

妨害物質の影響及び抗体とチトクロム c の結合に及ぼすpHの効果は用いる抗体により異なるため、当該免疫化学的方法に用いるpHは、抗体毎に最適なpHを決めることができる。好ましくはpH 7以下、更に好ましくはpH 3~pH 6、更に好ましくはpH 3.5~pH 5、更に好ましくはpH 3.5~pH 4.5である。

【 0 0 2 4 】

以下に、免疫化学的な測定におけるpHを決める方法を具体的に示すが、pHを決める方法は、これに限定されるものではない。

【 0 0 2 5 】

50

1. 測定感度へのpHの影響

BSA等の適当な蛋白質、NaCl等の適当な塩類、必要により適当な界面活性剤他を含むpH 3~pH 7.5の緩衝液に、チトクロム c を1~1000 ng/mLに希釈する。当該免疫化学的な測定法がサンドイッチ法の場合、希釈したチトクロム c と固相化した抗チトクロム c 抗体を反応させ、洗浄後、標識した抗チトクロム c 抗体を加えて標識物質に対応した活性、放射性標識であれば放射活性、酵素標識であれば酵素活性により標識物質を検出する。

【0026】

10 ng/mL、好ましくは1 ng/mLのチトクロム c を含む検体から得られるシグナルが、チトクロム c を含まない緩衝液のみの検体のシグナルと比較して十分に強ければ、当該pHは免疫化学的測定法に用いる緩衝液のpHの候補として挙げられる。

10

【0027】

2. 添加回収へのpHの影響

免疫化学的測定法に用いる検体に対応した血液、例えば血清中のチトクロム c を測定するのであれば血清に、既知量のチトクロム c を添加する。チトクロム c を添加した血清、及び添加しなかった血清中のチトクロム c 量を、当該免疫化学的な方法により測定し、理論値に対する測定値の比率を回収率とする。

【0028】

回収率は、添加したチトクロム c 量をA、チトクロム c 未添加血清中のチトクロム c 測定値をB、チトクロム c 添加血清中のチトクロム c 測定値をCとして、

(1)測定値(C) / 理論値(AとBの加重平均)、

20

(2)チトクロム c 添加による測定値の上昇値(C - B) / 添加量(A)、

の何れでも計算できる。

【0029】

回収率が70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の場合、当該pHは免疫化学的測定法に用いる緩衝液のpHの候補として挙げられる。

【0030】

また、免疫化学的なチトクロム c の測定に当たり、酸性領域の緩衝液を用いる方法は、固相化した抗体と検体中のチトクロム c とを反応させる第1反応のみならず、第1反応で妨害物質が除去しきれなかった時に、第2反応(チトクロム c と標識抗体を反応させる工程)に用いても有効である。

30

本発明の方法は、第1反応で酸性領域の緩衝液を用いる方法に限られるものではない。

【0031】

血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液は、上記1. 測定感度へのpHの影響、2. 添加回収へのpHの影響を勘案して決定される。緩衝液の種類は、酸性条件に調整し得る緩衝液であれば特に制限されないが、例えばコハク酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液などが挙げられる。

【0032】

更に本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎を検査するために使用する、血液中のチトクロム c をチトクロム c に対する抗体を用いて定量するための試薬(チトクロム c 測定試薬)を含むキットにも関する。チトクロム c 測定試薬の一例として、サンドイッチ法によりチトクロム c を測定する測定試薬は、例えば1). 抗チトクロム c 抗体コートカップ、あるいは抗チトクロム c 抗体コートビーズ、2). 標識抗チトクロム c 抗体を含み、好ましくは更に3). 既知濃度のチトクロム c 標準溶液、4). 希釈液、5). 洗浄液を含有する試薬である。更に酵素標識であれば、6). 発色基質、7). 反応停止液が含まれてもよい。

40

【0033】

本発明の検査キットは、血液中のチトクロム c とチトクロム c に対する抗体を酸性領域で反応させる緩衝液を含むことが好ましい。

【0034】

本発明の検査キットに含まれる緩衝液は、そのまま反応に用いることができる緩衝液であっても、希釈して用いる緩衝液であっても許される。また、適当な量の酸性あるいは

50

アルカリ性の溶液を加えて本発明に適した酸性領域のpHとなるように調整されたものであっても良い。

【0035】

本発明で開示されるチトクロムcの測定方法ならびに測定キットは、非アルコール性脂肪性肝炎を検査するために用いることができる。

【0036】

本発明で開示されるチトクロムc測定方法ならびに測定キットにより測定された、チトクロムcの定量値が高い患者、通常には、該定量値がカットオフ値以上の患者は非アルコール性脂肪性肝炎であると判定され、治療法選択の目安として用いることができる。カットオフ値は、的確に非アルコール性脂肪性肝炎を診断できれば特に限定されないが、通常、健常人の平均から2SD離れた値を使用するか、あるいは35 ng/mLを使用する。

チトクロムcは、ストレス依存性肝細胞障害を評価する良い指標であり、非アルコール性脂肪性肝炎をより早く的確に診断するための有用な臨床検査項目となり得る。

【実施例】

【0037】

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

【0038】

[参考例1] 抗チトクロムcモノクローナル抗体の作製

ヒトチトクロムc (TECHNE社) 110 µg/100 µLと65 mMリン酸緩衝液pH 7.5に溶解した2 mg/mLオプアルブミン55 µLを混合して、そこへ65 mMリン酸緩衝液pH 7.5で希釈した1 mMグルタルアルデヒド42 µLを加え、室温で2時間攪拌した。次に、0.15 M NaClで4 において4 8時間透析し、等量のFCAとの混合物を作製し、BALB/Cマウス腹腔に0.1 mL免疫した。2週間おきに合計3回同様に免疫した。3回目の免疫の2週間後、マウスに生理食塩水に溶解したヒトチトクロムc 50 µg/100 µLを尾静脈より静注した。3日後マウスから脾臓を摘出して、常法に従い、脾臓リンパ球をポリエチレングリコール法によりミエロマ細胞P3X63 Ag8U.1と細胞融合した。ヒトチトクロムcを抗原としてスクリーニングを行い、ヒトチトクロムcに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(clone: 27G9)を樹立した。

【0039】

樹立したハイブリドーマをエスクロンSF-B培地(三光純薬社)で培養して増殖させ、BALB/Cマウス腹腔に接種した。1週間後、腹水を採取した。採取した腹水からプロテインAを用いてIgGを精製し、抗チトクロムc抗体(27G9抗体)を得た。

【0040】

[参考例2] 抗チトクロムc抗体固相化ビーズの作製

抗チトクロムcモノクローナル抗体(clone: 2B5F8 (TECHNE社製))を、0.15M NaClを含む0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.2)で透析し、OD 280 nmが0.56になるよう0.15M NaClを含む0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.2)で希釈した。希釈した抗体1.67 mLを、あらかじめ磁石を用いて0.15M NaClを含む0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.2) 3 mLで3回洗浄したビーズ(Dynabeads(登録商標) M-450 Epoxy, Dynal) 3.36 mL分と混合し、室温で17時間攪拌した。次にビーズをブロッキングバッファー(50 mM Tris・HCl, 1% BSA, 0.15 M NaCl, 0.1% NaN₃, pH 7.5) 3 mLで懸濁し、室温で7時間攪拌してビーズをブロッキングした。ブロッキングされたビーズを150mM Tris・HCl, 3% BSA, 0.3% トレハロース, 0.45M NaCl, 0.03容量% Tween 20, 0.3% NaN₃, 30mM EDTA, pH7.5, 3 mLで3回洗浄し、150mM Tris・HCl, 0.45M NaCl, 3% BSA, 0.9% トレハロース, 0.03容量% Tween 20, 75 µg/mLマウスIgG, 0.3% NaN₃, pH 7.5, 12.5mLに懸濁した。これを使用時に、精製水で3倍に希釈した。

【0041】

[参考例3] ルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体の作製

参考例1で作製した抗チトクロムcモノクローナル抗体(27G9抗体)をPBSで透析し、抗体濃度を0.5 mg/mLから2 mg/mLの範囲に調製した。抗体1 mLにジメチルスルホキシドに10mg/mL濃度で溶解したルテニウム錯体(ruthenium(II) tris(bipyridyl)-N-hydroxysucc

10

20

30

40

50

inimide, IGEN Corp. USA) を12.2 μ L 加え室温で30分攪拌した。次に2 M グリシンを50 μ L 加え、室温で10分攪拌した。それを、PBS-3 (10 mMリン酸カリウム, 0.15M NaCl, 0.05% NaN_3 , pH 6) であらかじめ平衡化したSephadex G-25 (Amersham Pharmacia Biotec 社製) カラム (1.5 cm x 30 cm) にアプライしてPBS-3で溶出し、1 mLでフラクション分取した。各フラクションのOD 280 nmを測定し、第1ピークのフラクションを集め、ルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体とした。抗体濃度をMicro BCA protein Assay kit (PIERCE社製) を用いて測定した。

【0042】

[参考例4] ヒトチトクロムc標準抗原の調製

チトクロムc標準抗原液は、ヒトチトクロムc (TECHNE社製) を5% BSA、0.15 M NaCl, 0.1% NaN_3 を含む0.05 M トリス塩酸緩衝液pH 7.8で3000 ng/mL, 1000 ng/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mLに希釈して作製した。

10

【0043】

[実施例1] チトクロムcの測定

検体希釈液 (0.15M NaCl, 15mM EDTA, 2容量% Lipidure(登録商標)-BL802 (日本油脂社製), 2容量% Lipidure(登録商標)-BL405 (日本油脂社製), 0.1% NaN_3 を含む0.1M コハク酸緩衝液, pH4.0) をピコルミ^R 8220用反応管 (三光純薬社製) に200 μ L 入れ、次に検体を20 μ L 注入した。

【0044】

以下の測定は、電気化学発光酵素免疫測定機ピコルミ^R 8220 (三光純薬社製) を用いて行った。

20

【0045】

反応管に、参考例2で作製した抗チトクロムc抗体固相化ビーズ25 μ Lを加えて9分反応させ、ピコルミ^RBF洗浄液 (三光純薬社製) 350 μ Lで2回洗浄後、参考例3で作製したルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体希釈液 (0.05 M Tris·HCl, 1% BSA, 0.15M NaCl, 0.3% トレハロース, 0.01 容量% Tween 20, 0.3% NaN_3 , pH 7.5) で0.5~2 μ g/mLに希釈したルテニウム錯体標識抗チトクロムc抗体200 μ Lを加えて9分反応させた。ピコルミ^RBF洗浄液350 μ Lで2回洗浄後、ピコルミ^R発光電解液 (三光純薬社製) を300 μ L加えて発光カウント値を計測した。

【0046】

30

横軸にヒトチトクロムc標準抗原濃度、縦軸にヒトチトクロムc標準抗原の発光カウント値をプロットして標準曲線を描き、その標準曲線を基に、それぞれの発光カウント値から検体に含まれるチトクロムc量を算出した。

【0047】

[実施例2] 非アルコール性脂肪性肝炎患者血清中のチトクロムcの定量

確立したチトクロムcのELISA系を用いて、健常人と非アルコール性脂肪性肝炎患者の血清中のチトクロムc量を定量した。

【0048】

その結果、図1に示すように、健常人のチトクロムc定量値が20~30 ng/mLであるのに対して、非アルコール性脂肪性肝炎患者では30 ng/mL以上の高値を示し、血中チトクロムcを定量することにより非アルコール性脂肪性肝炎か否かを判別することが可能であった。

40

【0049】

血清中のチトクロムc定量値による、非アルコール性脂肪性肝炎の検査が可能であることが示された。

【0050】

[実施例3] 非アルコール性脂肪性肝炎患者の肝組織脂肪率と、血清中のチトクロムc定量値との相関

非アルコール性脂肪性肝炎患者より生検した肝細胞内の脂肪沈着率と、患者血清中のチトクロムcの定量値を比較した。

50

【 0 0 5 1 】

患者の肝細胞内の脂肪沈着率は、生検にて採取した肝組織をHE染色（ヘマトキシリン・エオジン染色）及びAZAN染色し、脂肪沈着の占める面積から算出した。また、患者血清中のチトクロムcは上述した方法により定量した。その結果、図2に示す通り、肝細胞内の脂肪沈着率と血清中のチトクロムc定量値は正の相関関係（ $R^2 = 0.6452$ ）を示し、チトクロムc定量値が肝細胞内の脂肪沈着とそれにより発生するストレスの良い目安となることが示された。

【 0 0 5 2 】

血中チトクロムcを測定することにより、肝生検することなく非侵襲的に肝細胞内の脂肪沈着とそれに伴うストレスを評価することが可能であり、血中チトクロムcが非アルコール性脂肪性肝炎の良い指標となることが示された。

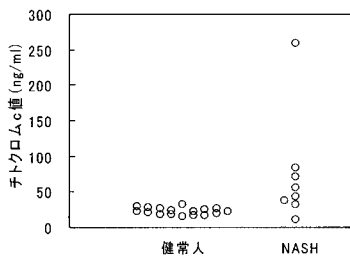
10

【産業上の利用の可能性】

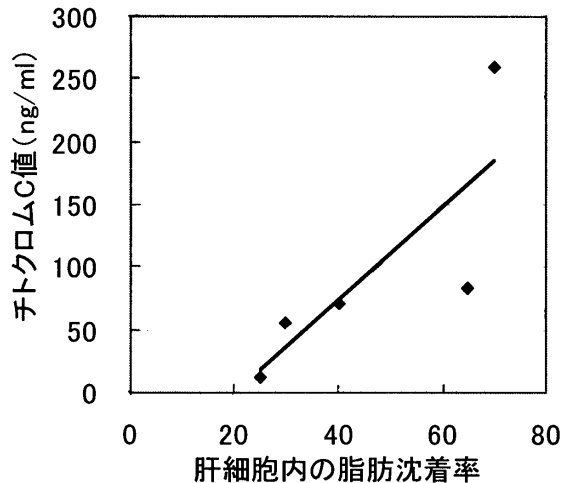
【 0 0 5 3 】

本発明により、血液中のチトクロムcを定量することで非侵襲的に非アルコール性脂肪性肝炎を検査することが可能となった。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 佐々木 裕
日本国熊本県熊本市本荘1の1の1 熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科学内
- (72)発明者 葦原 浩
日本国熊本県熊本市本荘1の1の1 熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科学内
- (72)発明者 永濱 裕康
日本国熊本県熊本市本荘1の1の1 熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科学内
- (72)発明者 青山 宗夫
日本国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

審査官 竹中 靖典

- (56)参考文献 大須賀 勝ほか, A S HとN A S H, 診断と治療, 日本, 2005年, Vol.93, No.12, 2171-2177
川中美和ほか, N A S Hとストレス, 診断と治療, 日本, 2005年, Vol.93, No.12, 2165-2168

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

G01N 33/53

G01N 33/531

C07K 16/18