

(43) 国際公開日
2006年3月23日 (23.03.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/030985 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/017558
- (22) 国際出願日: 2005年9月16日 (16.09.2005)
- (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2004-269186 2004年9月16日 (16.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉田 謙一

(YOSHIDA, Ken-ich) [JP/JP]; 〒114-0024 東京都北区西ヶ原3-46-6-104 Tokyo (JP). 木村 博子 (KIMURA, Hiroko) [JP/JP]; 〒151-0052 東京都渋谷区代々木1-44-9-403 Tokyo (JP). 内田 浩二 (UCHIDA, Koji) [JP/JP]; 〒458-0015 愛知県名古屋市緑区篠ノ風3-252-1-302 Aichi (JP). 松本 和子 (MATSUMOTO, Kazuko) [JP/JP]; 〒155-0032 東京都世田谷区代沢3-9-12-105 Tokyo (JP).

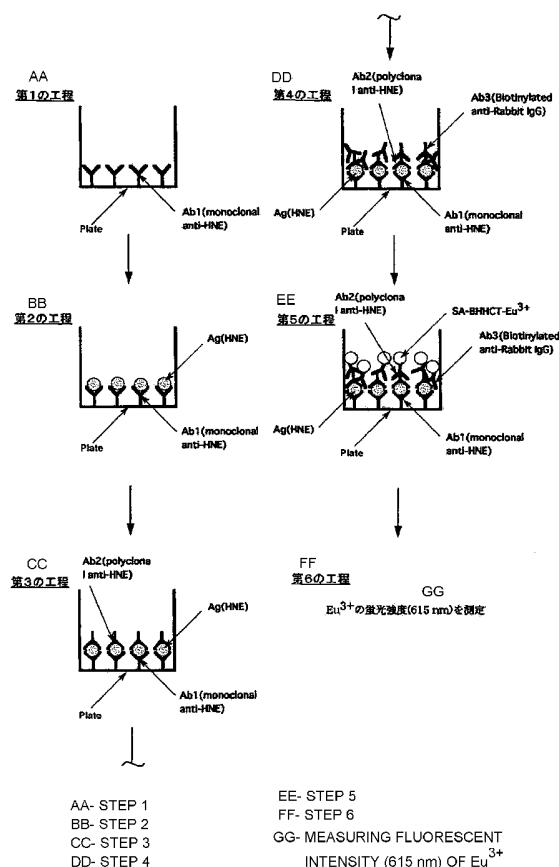
(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).

(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, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ASSAYING LIPID PEROXIDE

(54) 発明の名称: 過酸化脂質の測定方法



(57) Abstract: A method of assaying a lipid peroxide by the time-resolved fluorescent sandwich immunoassay with the use of antibodies against 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and a modified antibody capable of binding to the anti-HNE antibodies which comprises: contacting a test sample with a support having an anti-HNE antibody A as a first antibody immobilized thereon; contacting the test sample with another anti-HNE antibody B as a second antibody; contacting the second antibody with a modified antibody as a third antibody; then contacting the third antibody with a lanthanoid to form a complex composed of the first antibody, the test sample, the second antibody, the third antibody and the lanthanoid; and measuring the fluorescence from the lanthanoid. Namely, a method of assaying a lipid peroxide whereby 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) can be economically assayed at a high sensitivity and a high accuracy within a short period of time so as to evaluate changes in blood HNE in infection model animals or females associating with menopause or stress loading.

(57) 要約: 抗4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)抗体と抗HNE抗体に結合する修飾抗体を用いるサンドイッチ式時間分解蛍光免疫測定による過酸化脂質の測定方法であって、第1抗体として抗HNE抗体Aを担体上に固定した担体に被測定試料を接触させ、次に被測定試料に第2抗体として抗HNE抗体Bを接触させ、さらにこの第2抗体に第3抗体として修飾抗体を接触させ、この第3抗体にランタノイドを接触させて、第1抗体、被測定試料、第2抗体、第3抗体およびランタノイドからなる複合体を形成させ、複合体のランタノイドの蛍光を測定する。すなわち、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)を高感度、高精度、短時間・低コストで、感染症動物モデルや女性の閉経・ストレス負荷に伴う血中HNEの変化等を測

定できる過酸化脂質の測定方法を提供する。



MZ, NA, NG, 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, 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, LV, 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
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

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。

明 細 書

過酸化脂質の測定方法

5 技術分野

本願発明は、過酸化脂質の測定方法に関するものである。

背景技術

生態における脂質は、生体内で発生する活性酸素によって、たとえば
10 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) やマロンジアルデヒド (MDA)、チ
オバルビツール酸反応物 (TABARS) 等のような過酸化脂質となることが
知られている。このような脂質の過酸化 (過酸化脂質) が、動脈硬化症、
糖尿病、虚血性心疾患、高血圧症、高脂肪血症等の各種の疾病に関与す
ることが、近年明らかにされてきている。このため、生体内の脂質の過
15 酸化の状態を把握して、その結果を上記各種の疾病の重症度、病態評価、
治療薬や食事療法の方針決定や効果判定等に活用すべく、各種の手法が
検討されている。たとえば、脂質の過酸化物がチオバルビツール酸と反
応することを利用した TBA 法や、赤血球内ヘモグロビン中のグルタチオン
付加ヘモグロビン量を酸化ストレスのマーカーとして測定する酸化
20 ストレスの測定方法が提案されている。

特に、4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) は、生成量や反応性、生理
作用等から最も代表的な過酸化脂質である。このため、この HNE を、高
速液体クロマトグラフィーを利用して測定する方法等が開発され臨床
検査にも応用されている。さらに、より効率的な HNE の測定として、た
25 とえば、HNE に対する特異抗体 (抗 HNE 抗体) を作成し、これを ELISA
に用いた免疫学的測定法が提案されている (特許文献 1)。

特許文献 1 : 特開平 8-168394 号公報

発明の開示

従来からある過酸化脂質の測定である TBA 法や、グルタチオン付加ヘモグロビン量による測定、高速液体クロマトグラフィーによる HNE 測定方法等では、抽出操作や反応生成物の測定操作が困難であることや、測定感度が低く、測定の精度が十分でないという問題があった。また、各種クロマトグラフィー質量分析計等を利用して測定する過程で、競合阻害をする類似物質の除去や感度の向上のためにカラムによる分離を行う必要があり、測定に長時間を要した。さらに、比較的高価な機器や維持費用を要する等、コストが高くなる問題もあった。

一方、特許文献 1 記載の方法は、上記の問題を解決し、短時間に多数の検体を測定できる利点を有するものの、使用する抗体（つまり、抗 HNE 抗体）の抗体量や、抗体と抗原との結合能力を示す力価に左右されてしまい、必ずしも高感度・高精度に HNE を測定することができなかった。このため、高感度・高精度に HNE を測定することが要求される、過酸化脂質（つまり、HNE）が関与する種々の疾病やストレス、つまり、たとえば女性の閉経・ストレス負荷に伴う血中 HNE の変化を捉えることや、また、これら疾病やストレス等のモデル動物、たとえば感染症動物モデルの血中 HNE の変化等を捉えるまでには至っていないという問題があった。

そこで、本願発明は、従来の脂質過酸化物測定技術の問題点を解決すべく、代表的な過酸化脂質である 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) を高感度、高精度、短時間、かつ、低コストで、たとえば、感染症動物モデルや女性の閉経・ストレス負荷に伴う血中 HNE の変化等を測定することのできる、新しい過酸化脂質の測定方法を提供することを課題としている。

本願発明は、前記の課題を解決するものとして、第 1 には、4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) 特異的に結合する 2 つの抗 HNE 抗体とこの抗 HNE 抗体に結合する修飾抗体を用いるサンドイッチ式時間分解蛍光

免疫測定による過酸化脂質の測定方法であって、以下の工程：

<1> 担体上に、第1抗体として抗HNE抗体Aを固定し、第1抗体固相化担体とする工程；

<2> 前記第1抗体固相化担体に、被測定試料を接触させる工程；

5 <3> 前記被測定試料に、第2抗体として抗HNE抗体Bを接触させる工程；

<4> 前記第2抗体に、第2抗体と結合する第3抗体として結合性物質で修飾された修飾抗体を接触させる工程；

10 <5> 前記第3抗体に、上記<4>の工程の結合物質と対応する結合性物質で修飾されたランタノイドを接触させる工程；および

<6> 上記<1>から<5>の工程によって、第1抗体、被測定試料、第2抗体、第3抗体およびランタノイドからなる複合体を形成させ、この複合体のランタノイドが発する蛍光を測定する工程；
を含むことを特徴とする。

15 また、本願発明は、第2には、上記第1の発明における結合性物質が、ビオチンとストレプトアビジンであることを特徴とし、第3には、上記第1または第2の発明におけるランタノイドが、サマリウム、ユウロピウム、テルビウムおよびジスプロシウムの内の少なくとも1つであることを特徴とする。

20

図面の簡単な説明

図1は、本願発明にかかる過酸化脂質測定方法の工程を例示した概略図である。

25 図2は、本願発明の過酸化脂質の測定方法である2種類の抗HNE抗体（第1抗体と第2抗体）と第3抗体を用いた場合と、2種類の抗HNE抗体を用いた場合との比較評価の結果を示した図である。

図3は、本願発明の過酸化脂質の測定方法による、HNE各濃度の測定評価の結果を示した図である。

図 4 は、従来の過酸化脂質の測定方法（競合式 ELISA）による、HNE 各濃度の測定評価の結果を示した図である。

図 5 は、本願発明の過酸化脂質の測定方法による、敗血症モデル動物（ラット）の血中 HNE 濃度の測定結果（A）と、HNE 濃度と NADPH 酸化
5 酵素との関係を検証した結果（B）を示した図である。

図 6 は、本願発明の過酸化脂質の測定方法による、心理ストレス負荷を与えたヒトの血中 HNE 濃度の測定結果を示した図である。

図 7 は、本願発明の過酸化脂質の測定方法による、in vitro 実験として、ヒト末梢血の HNE 濃度の測定結果（A）と、HNE 濃度と NADPH 酸化
10 酵素との関係を検証した結果（B）を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本願発明は、上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について詳しく説明する。

15 本願発明は、生体（特に血中）において、その生成量や反応性（たとえば、タンパク質と安定に結合）、生理作用等から最も代表的な過酸化脂質ともいえる、4-ヒドロキシ-2-ノネナール（HNE）を測定の対象としている。本願発明は、この HNE と特異的に結合する 2 種類の抗 HNE 抗体を用いるサンドイッチ式時間分解蛍光免疫測定（TR-FIA）であって、
20 さらに前記 2 種類の抗 HNE 抗体のうちの一方の抗 HNE 抗体に結合する修飾抗体を用いる過酸化脂質の測定方法である。図 1 の例に沿って、具体的にその工程を説明すると、以下の工程を経ることで、本願発明の過酸化脂質の測定を実現することができる。すなわち：

まず、第 1 工程として、試験管や培養シャーレ、測定プレート等の担
25 体上に、第 1 抗体として抗 HNE 抗体 A を固定して、担体を第 1 抗体固相化担体とする工程を行う。このとき、第 1 抗体としての抗 HNE 抗体 A は、HNE との特異的な結合反応を高めるため、モノクローナル抗体であることが好ましい。

つぎに、第2工程として、前記第1抗体固相化担体に、たとえば、ヒトやサル、マウス、ラット、ヒツジ、ウマ等の生体から公知の方法で被測定試料（たとえば、血液）を採取し、前処理を行って希釈調整した被測定試料を接触させることで、第1抗体固相化担体の第1抗体と被測定試料中に含まれるHNEもしくはHNE付加物質とを結合させる。もちろん、被測定試料の由来は、上記生体由来である天然の試料に限定されるものではない。

つづいて、第3工程として、リン酸緩衝液やトリス緩衝液等の洗浄液で、第2工程における余分な成分（たとえば、未結合のHNEもしくはHNE付加物質等）を洗浄した後、前記被測定試料に、第2抗体として抗HNE抗体Bを接触させることで、被測定試料中に含まれるHNEもしくはHNE付加物質に、第2抗体がさらに結合する。これにより、HNEもしくはHNE付加物質は、第1抗体と第2抗体との間に挟まれた状態（サンドイッチ）となる。このとき、第2抗体は、ポリクローナル抗体であってもよい。なお、洗浄液には、必要に応じて、界面活性剤としてTween-20（登録商標）やTriton-X（登録商標）等や、ブロッキング剤としてスキムミルクやウシ血清アルブミン（BSA）等を含有させてもよい。

第4の工程として、第3工程と同様に洗浄液で、余分な成分（たとえば、未結合の第2抗体等）を洗浄した後、前記第2抗体に、第3抗体として結合性物質で修飾された修飾抗体を接触させて、第2抗体と第3抗体とを結合させる。

さらに、第5の工程として、第3工程および第4工程と同様に洗浄液で、余分な成分（たとえば、未結合の第3抗体等）を洗浄した後、前記第3抗体に、第4の工程における修飾抗体の結合物質と対応する結合性物質で修飾されたランタノイドを接触させ、結合性物質を介して第3抗体とランタノイドとを結合させる。

そして、第6の工程として、上記第1の工程から第5の工程によって、第1抗体、被測定試料、第2抗体、第3抗体およびランタノイドから構

成される複合体を形成させ、この複合体のランタノイドが強く発する金属イオン特有の蛍光を、分光光度計や蛍光測定器、マルチラベルカウンタ等で測定する。

したがって、本願発明では、使用する抗体（第1抗体である抗HNE抗体Aおよび第2抗体である抗HNE抗体B）の力価が低い場合でも、被測定試料の血清中の代表的な過酸化脂質であるHNEもしくはHNE付加物質を高感度、高精度、短時間、かつ、低コストで測定できることから、臨床応用に活用することができる。つまり、このような特徴を有する本願発明によって、従来のHNE測定方法では困難であった、たとえば、感染症動物モデルや女性の閉経・ストレス負荷に伴う血中HNEの変化等を測定することができる。その他にも、本願発明は、脂質過酸化（過酸化脂質）が関与する動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧症、高脂血症等の重症度、病態評価、治療薬や食事療法の方針決定や効果判定等に活用することができる。さらにまた、本願発明の測定方法は、従来、酸化ストレスや脂質過酸化の関与確証が得られなかった炎症、閉経、心理的ストレス、喫煙、飲酒等に対しての評価にも活用することも考慮される。

また、本願発明における結合性物質が、ビオチンとストレプトアビジンであることが好ましい。ビオチンとストレプトアビジンは生体結合性物質であり、この両物質による結合は特異的で強い等から、その取り扱いが容易である。

さらに、特定の配位子と錯生成をすると金属イオン特有の蛍光を強く発することを考慮すると、ランタノイドが、サマリウム、ユウロピウム、テルビウムおよびジスプロシウムの内の少なくとも1つであることが好ましい。ランタノイドの蛍光は、通常の有機蛍光化合物の蛍光と比べると、これらの錯体の蛍光は次の優位な特徴を有している。つまり、＜1＞蛍光寿命が非常に長い。たとえば、通常の有機蛍光化合物は、数ナノ秒の蛍光寿命であるが、ランタノイドの蛍光、その中でも特にユウロ

ピウムとテルビウムは、数百マイクロ秒以上の蛍光寿命を有する。＜2＞ストークスシフトが非常に大きい。多くの場合、これらのランタノイドは紫外光を吸収して励起され、500nm以上の可視光を発する。一番強い発光の波長は、ユウロピウムで約615nm、サマリウムで約643nm、テルビウムで約545nm、ジスプロシウムで約574nmである。＜3＞蛍光発光ピークの半値幅が約10-20nmであり、非常にシャープである。本願発明の過酸化脂質の測定方法は、このような特徴を有するランタノイドを利用することで、様々な短寿命のバックグラウンド蛍光をなくすことができ、より高感度な測定を実現することができる。

- 10 本願発明の過酸化脂質の測定方法における、抗HNE抗体は、市販のものでよいし、公知である種々の抗体作製方法によって作製することもできる。たとえば、抗原（この場合、HNE）感作させたラットやマウス、ウサギ、ヒツジ、ヤギ等の動物の血清免疫グロブリンの画分から、抗原アフィニティーカラム等を利用して精製したり（ポリクローナル抗体
- 15 ）、抗体産生細胞と骨髓腫細胞株とを融合させて融合細胞を作製する細胞融合法を利用して抗体を作製したり（モノクローナル抗体）、さらに遺伝子組換え技術によっても抗体を作製することができる（モノクローナル抗体）。

- 以下に実施例を説明し、さらに詳しく本願発明の過酸化脂質の測定方法について説明する。もちろん、以下の例によって発明が限定されることはない。
- 20

実施例

実施例1：過酸化脂質の測定方法の評価

- 25 （1）2種類の抗HNE抗体を用いた場合と、さらに第3抗体として第2抗体に対するビオチン化抗体を用いた場合との比較評価

本願発明の過酸化脂質の測定方法は、2種類の抗HNE抗体を用いてのサンドイッチ式時間分解蛍光測定である。そこで、ランタノイドとして

Eu³⁺を用いて、2種類の抗 HNE 抗体（第1抗体および第2抗体）を用いたサンドイッチ式時間分解蛍光測定と、さらに第3抗体として第2抗体に対するビオチン化抗体を用いたサンドイッチ式時間分解蛍光測定とを比較評価した。

- 5 なお、本実施例における第1抗体はモノクローナル抗体 (2.5 μ g/ml, 100 μ l/well) を、第2抗体はポリクローナルウサギ抗体 (3.6 μ g/ml 50 μ l) を、第3抗体はビオチン化ウサギ IgG (7.5 μ g/ml, 50 μ l) を、そして、Eu³⁺はストレプトアビジン結合 Eu³⁺-BHHCT を用いた。そして、波長 615nm で Eu³⁺が発する蛍光を測定した。反応固相は蛍光測定用 μ タ
10 イタープレート「Fuloronunc」を用い、蛍光測定は ArvoSX1420 を利用して行った。

- 結果は、図2に示したとおり、2種類の抗 HNE 抗体とさらに第3抗体を用いた場合（図2中の丸印で示したグラフ）のほうが、2種類の抗 HNE 抗体を用いただけの場合（図2中の三角印で示したグラフ）よりも、最大で約10倍も最小検出感度が優れていることを確認できた。
- 15

(2) ヒト血清中における本願発明の過酸化脂質の測定方法の評価

- ヒト血清中に含まれる HNE の回収率を測定し、測定精度を評価した。具体的には、ヒト血清 0.157nmol/ml に、0.001nmol/ml、0.01nmol/ml および 0.1nmol/ml の HNE を加え、その添加回収率を、本願発明の過酸化脂質の測定方法で測定した。
- 20

結果は、表1に示したとおりであった。すなわち、いずれの HNE 添加濃度でも、高い回収率を示し、微量の HNE でも検出でき、測定感度および測定精度が高いことを確認できた。

表 1

理論値-HNE conc. (nmol/ml)	測定値-HNE conc. (nmol/ml)	回収率 %
0.157+0.1	0.215	83.7
0.157+0.01	0.151	90.4
0.157+0.001	0.163	103.2
0.157+0	0.160	101.8

(3) 各濃度における HNE の測定の評価

さらに、0.0001nmol/ml、0.001nmol/ml、0.01nmol/ml、0.1nmol/ml、
 5 1nmol/ml、10nmol/ml および 100nmol/ml の HNE における蛍光強度を、サ
 ンドイッチ式時間分解蛍光測定で測定した。なお、ランタノイドは、 Eu^{3+}
 を用いた。

結果は、図 3 に示したとおり、HNE の濃度依存的に蛍光強度が上昇し
 た。つまり、HNE の濃度が高いほど、蛍光を発する Eu^{3+} が、第 1 抗体や
 10 第 2 抗体、第 3 抗体を介して HNE に多く結合していることが分かる。し
 かも、図 3 の結果をみると、HNE の濃度が、0.0001nmol/ml ($0.1\mu\text{M}$) であ
 っても、蛍光測定できることが確認できた。本願発明の方法では、血中
 HNE の測定感度が、従来の HNE 測定方法（たとえば、特開平 8-168394
 号公報）の測定感度（約 0.1mM）に比べて、1000 倍高いことが確認さ
 15 れた。そして、比較実験として行った、従来の競合式免疫分析法（競合
 式 ELISA）による蛍光強度の測定（波長 450nm）の場合では、図 4 に示
 したとおり、HNE 濃度依存的に蛍光強度が低下することが確認できた。
 この競合 ELISA の HNE の検出感度は約 1 nmol/mL ($1\mu\text{M}$) であり、これに
 比べても高い検出感度であることが確認できた。

20 また、表 2 に示した本願発明の過酸化脂質の測定方法における誤差
 (CV%) は、併行精度 (intra-assay precision) を行ったところ、小
 さいことが確認できた。さらに、表 3 に示した従来の競合式免疫分析法
 (競合式 ELISA) の場合と比べても小さいことが確認できた。つまり、

本願発明による過酸化脂質の測定方法の測定精度は、従来に比べて優れていることが確認できた。

なお、表 2 における、Flu1、Flu2 および Flu3 は、Eu の 615 nm の蛍光強度を表し、それぞれ n=2 または n=3 で行った結果を表している。また、表 3 における、Abs1、Abs2 および Abs3 は、450 nm の吸光度を表し、n=3 で行った結果を表している。

表 2

HNE concn. (nmol/ml)	Flu. 1	Flu. 2	Flu. 3	average	STDEV	CV%
100	95421		101043	98232	3975.4	4.0
10	87250	95635		91443	5929.1	6.5
1	52272	53490	61657	55806	5103.3	9.1
0.1	24279	26711		25495	1719.7	6.7
0.01	19856	18537	18332	18908	827.1	4.4
0.001	18561	17528		18045	730.4	4.0
0.0001	19175		18457	18816	507.7	2.7

10

表 3

HNE concentrati on (nmol/ml)	ABS 1(450	ABS 2	ABS 3	average	STDEV	CV%
50	0.128	0.111	0.15	0.130	0.020	15.1
25	0.24	0.266	0.277	0.261	0.019	7.3
12.5	0.437	0.413	0.473	0.441	0.030	6.8
6.25	0.705	0.625	0.712	0.681	0.048	7.1
3.13	0.926	0.895	0.947	0.923	0.026	2.8
1.56	1.071	1.033	1.086	1.063	0.027	2.6
0.78	1.107	1.127	1.215	1.150	0.057	5.0
0.39	1.156	1.272	1.178	1.202	0.062	5.1
0.2	1.213	1.188	1.167	1.189	0.023	1.9
0.1	1.241	1.25	1.195	1.229	0.030	2.4

実施例 2：敗血症モデル動物の血中 HNE 濃度の測定 (in vivo)

(1) 敗血症モデル動物として、ラット (n=3) に細胞毒であるリポ多糖 (lipopolysccaride、LPS) を 0.5mg/kg を投与した。LPS 投与後、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間および 24 時間における血中 HNE を測定した。

結果は、図 5 (A) に示したとおりであった。LPS を投与した後、3 つのピークがあり、HNE が上昇していた。これは感染症の初期の血中過酸化脂質上昇を示したはじめての結果である。この結果より、本願発明の過酸化脂質の測定方法は、高感度な炎症指標として活用することができることを確認することができた。

(2) また、HNE 生成に関与する NADPH 酸化酵素についても検証するため、3 グループ (n=4、各グループ) のラットに、前処理として、75mg/kg のアポシニン (apocynin; Calbio-chem, la Jolla, CA) または 0.6% のジメチルスルフォキシド (DMSO) もしくは生理食塩水を投与し、30 分後に実験を行った。その後、このラットに LPS を投与し、20 分間静置し、血中の HNE を測定した。

結果は、図 5 (B) に示したとおり、アポシニンを用いた場合、HNE 濃度は顕著に抑制された。アポシニンは、NADPH 酸化酵素の活性阻害物であることから、NADPH 酸化酵素が HNE 生成に関与していることが示唆された。

実施例 3 : 心理ストレス負荷を与えたヒトの血中 HNE 濃度の測定

被験者として、閉経女性 (n=7) と若年女性 (n=5) に対して、カラーワードテストを行い、被験者それぞれの血中の HNE 濃度を測定した。測定のタイミングは、休憩時 (図 6 中の rest)、カラーワードテスト時 (図 6 中の CW) およびカラーワードテスト終了時 (図 6 中の recovery) であった。

結果は、図 6 に示したとおり、閉経女性は、若年女性と比べ全体的に HNE の濃度が高かった。また、ストレス負荷後の上昇度が高かった。つまり、閉経女性は、若年女性と比較して、血中脂質過酸化 (酸化ストレス) の平常時のレベルが高く、心理ストレス負荷によってより高度に上昇することがわかった。このことより、閉経後の女性の虚血性心疾患硬化発症率の上昇に、脂質過酸化が関与していることが示唆された。なお、若年女性の月経期 (M-Phase) および排卵期 (F-Phase) において、大き

な差異はなかった。

実施例 4：ヒト末梢血における HNE 濃度の測定 (in vitro)

(1) ヒト末梢血を、密度勾配遠心法で、単核性白血球と多形核性白血球とに分画し、リン酸緩衝液 (PBS, pH7.3) で 2 回洗浄した。この各
5 分画を、それぞれ血漿で再懸濁し、LPS ($7.2 \mu\text{g/mL}$; 血漿で溶解) を加えて、測定試料として調整した。この測定試料 (単核性白血球含有試料および多形核性白血球含有試料) を、 37°C で、10 分間、20 分間、30 分間、60 分間インキュベーションして、HNE を測定した。

結果は、図 7 (A) に示したとおり、特にインキュベーション時間 1
10 0 分のピークにおいて、HNE 濃度は、単核性白血球含有試料の方が、多形核性白血球含有試料によりも高いことを測定、確認することができた。なお、このインキュベーション時間 10 分でピークが確認できたことは、図には示していないが、実施例 2 のラットを用いた血中の HNE 濃度測定 (in vivo) よりも、早い段階 (実施例 2 では、20 分) で測定された
15 ものである。

(2) また、HNE 生成に関与する NADPH 酸化酵素についても検証した。具体的には、上記の単核性白血球含有試料を、NADPH 酸化酵素の活性阻害物であるアポシニン (apocynin; Calbio-chem, La Jolla, CA) を用いて 30 分間の前処理を行い、その後、LPS と 37°C で 15 分間のイン
20 キュベーションを行った。また、DMSO (0.2mM , 0.2%)、生理食塩水を用いた場合もそれぞれ検証した。

結果は、図 7 (B) に示したとおり、アポシニンを用いた場合、HNE 濃度は顕著に抑制された。アポシニンは、NADPH 酸化酵素の活性阻害物であることから、NADPH 酸化酵素が HNE 生成に関与していることが改め
25 て示唆された。

産業上の利用可能性

本願第 1 の発明によれば、測定対象として、その生成量や反応性、生

理作用等から最も代表的な過酸化脂質である 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) を、高感度かつ高精度に測定でき、測定に要する時間を短縮でき、しかもコストを低減することをもできる。

また、第 2 の発明によれば、第 3 抗体とランタノイドとをより確実に
5 結合させることができ、より高感度に過酸化脂質を測定することができる。

さらに、第 3 の発明によれば、ランタノイドの長寿命蛍光を利用した時間分解蛍光測定により生体物質中に含まれる蛍光を除去して測定のパックグラウンドを下げ、さらに効率よく過酸化脂質を測定することが
10 できる。

請求の範囲

1. 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) に特異的に結合する2つの抗 HNE 抗体とこの抗 HNE 抗体に結合する修飾抗体を用いるサンドイッチ式時間分解蛍光免疫測定による過酸化脂質の測定方法であって、以下の工程：

<1> 担体上に、第1抗体として抗 HNE 抗体 A を固定し、第1抗体固相化担体とする工程；

<2> 前記第1抗体固相化担体に、被測定試料を接触させる工程；

10 <3> 前記被測定試料に、第2抗体として抗 HNE 抗体 B を接触させる工程；

<4> 前記第2抗体に、第2抗体と結合する第3抗体として結合性物質で修飾された修飾抗体を接触させる工程；

15 <5> 前記第3抗体に、上記<4>の工程の結合物質と対応する結合性物質で修飾されたランタノイドを接触させる工程；および

<6> 上記<1>から<5>の工程によって、第1抗体、被測定試料、第2抗体、第3体およびランタノイドからなる複合体を形成させ、この複合体のランタノイドが発する蛍光を測定する工程；

を含むことを特徴とする過酸化脂質の測定方法。

20 2. 結合性物質が、ビオチンとストレプトアビジンである請求項1記載の過酸化脂質の測定方法。

3. ランタノイドが、サマリウム、ユウロピウム、テルビウムおよびジスプロシウムの内の少なくとも1つである請求項1または2記載の過酸化脂質の測定方法。

図 1

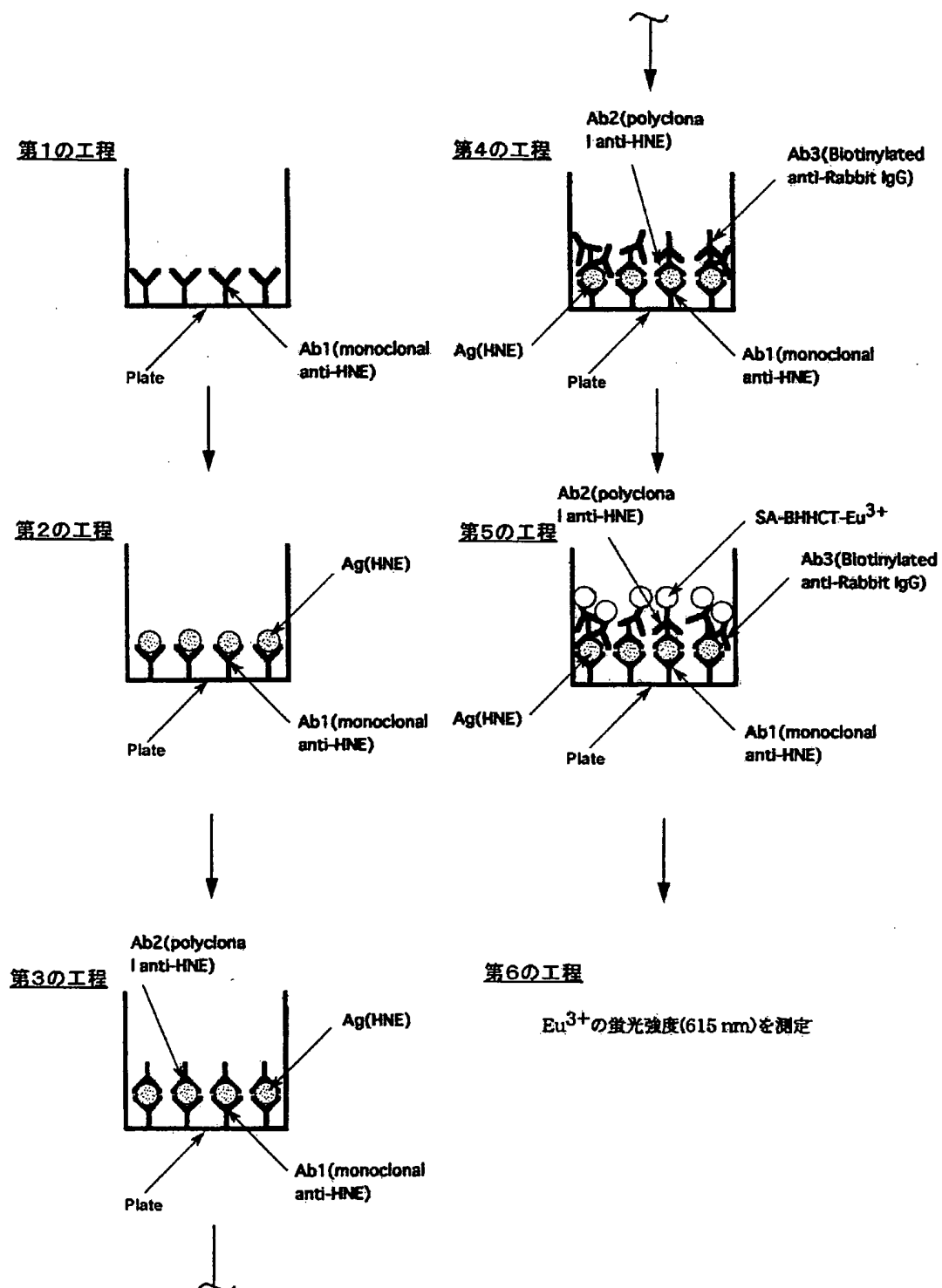


図 2

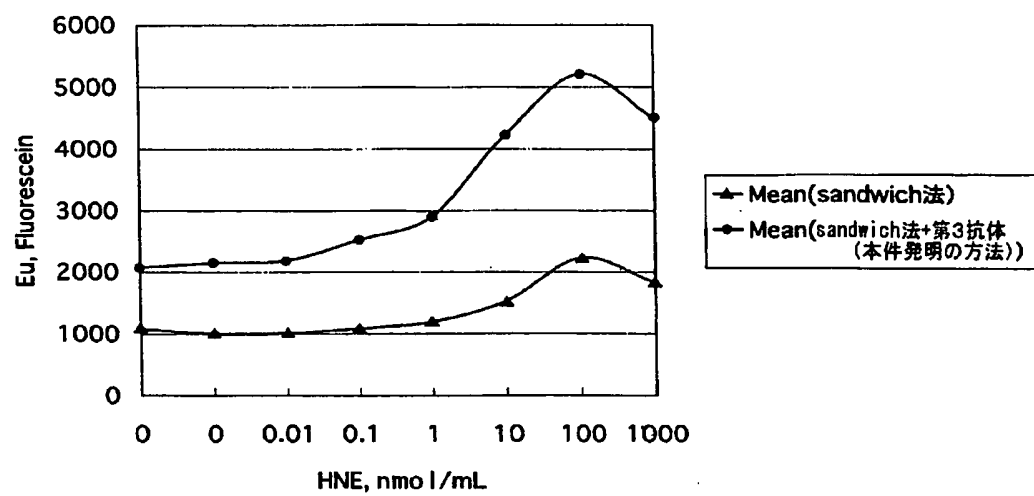


図 3

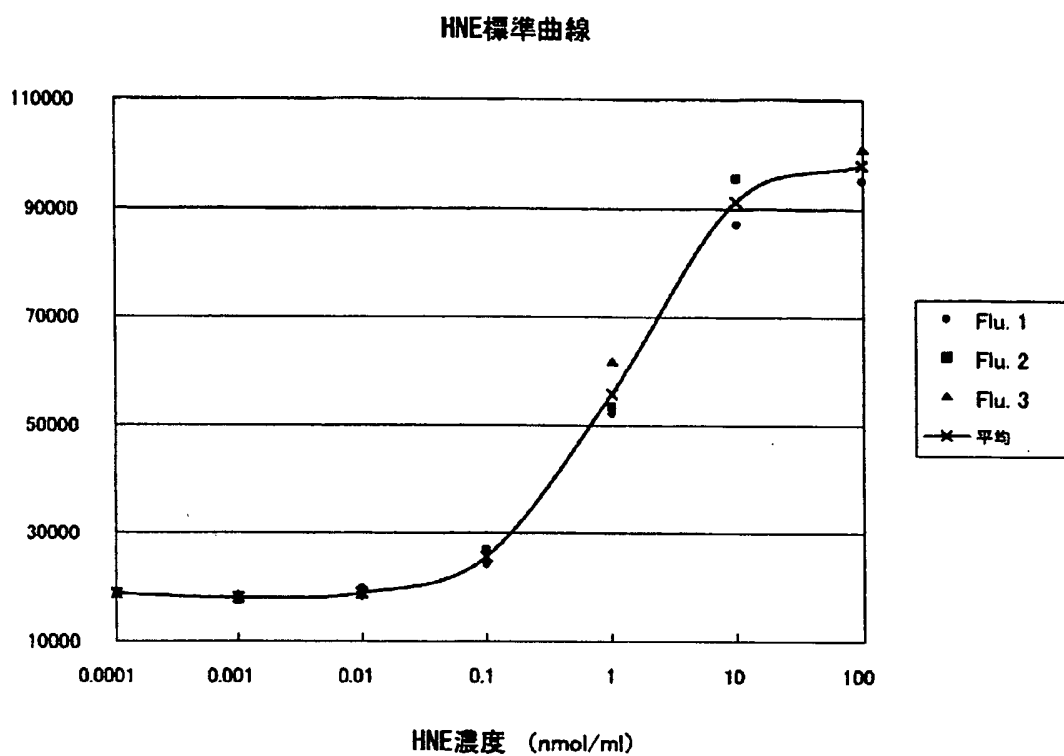


図 4

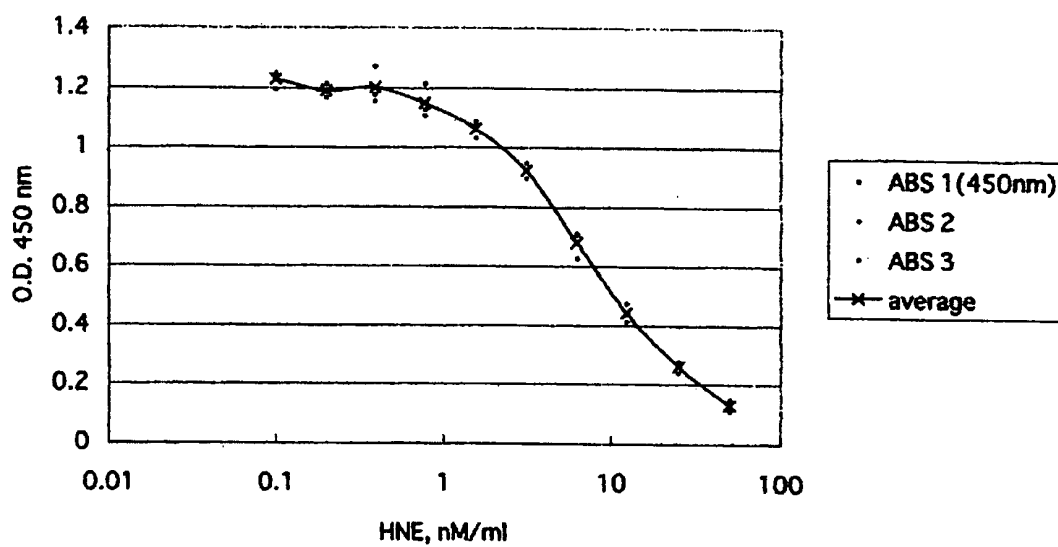
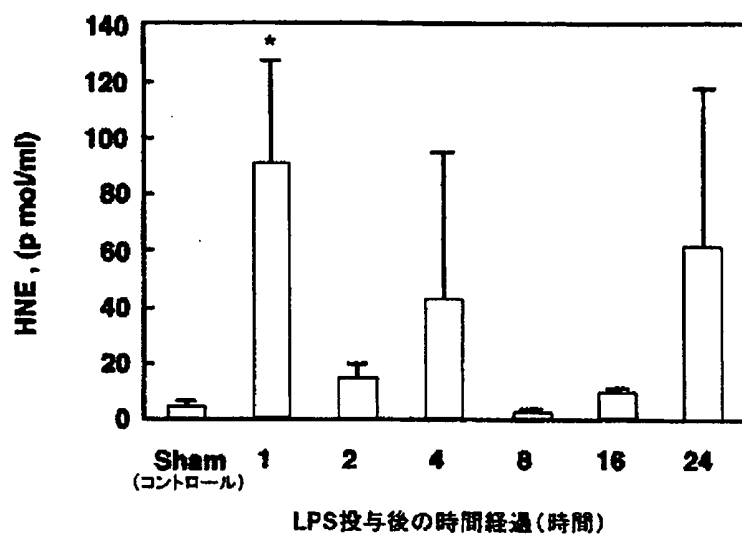


図 5

(A)



(B)

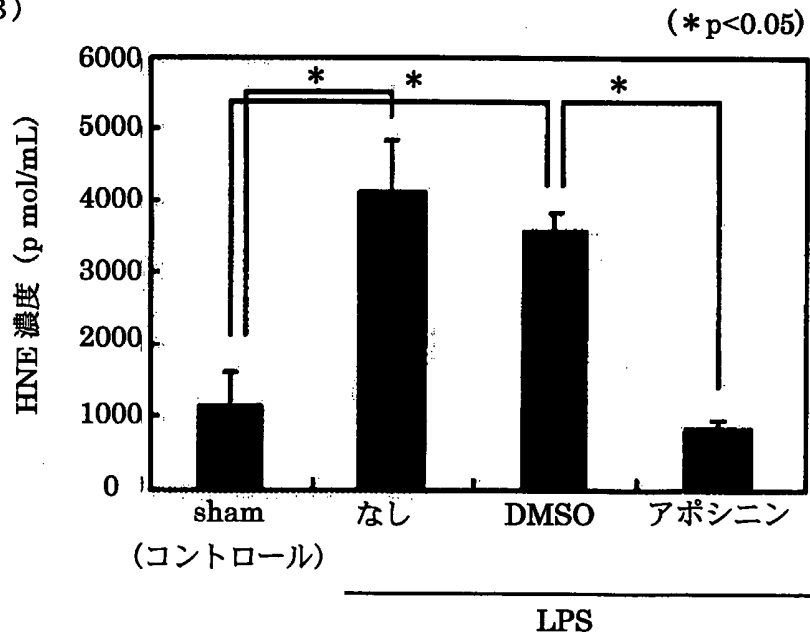


図 6

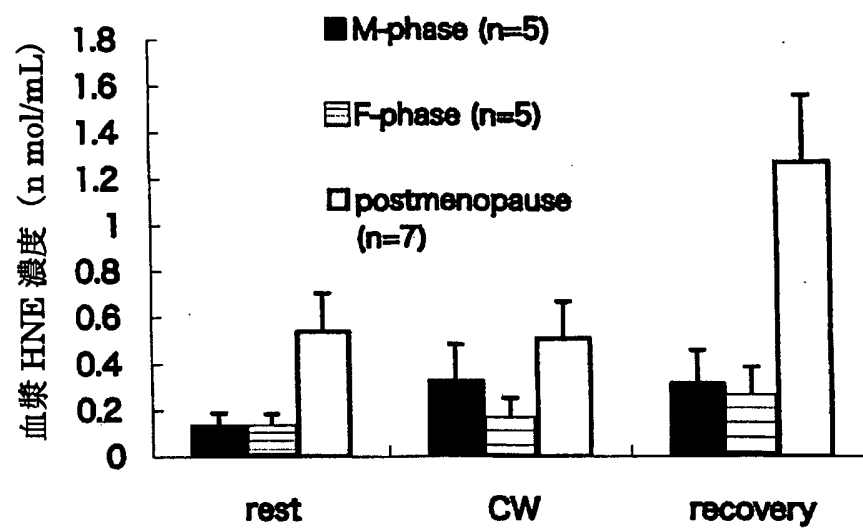
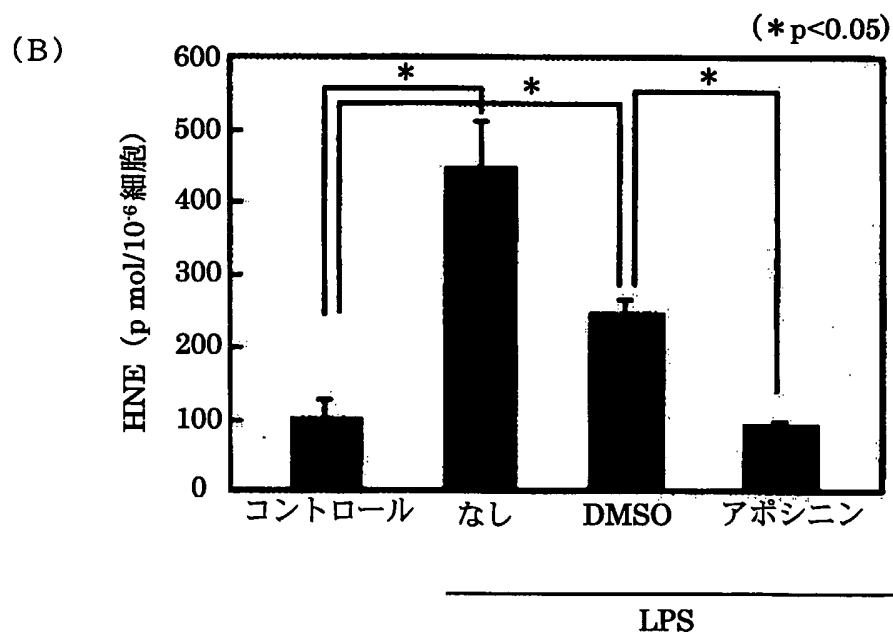
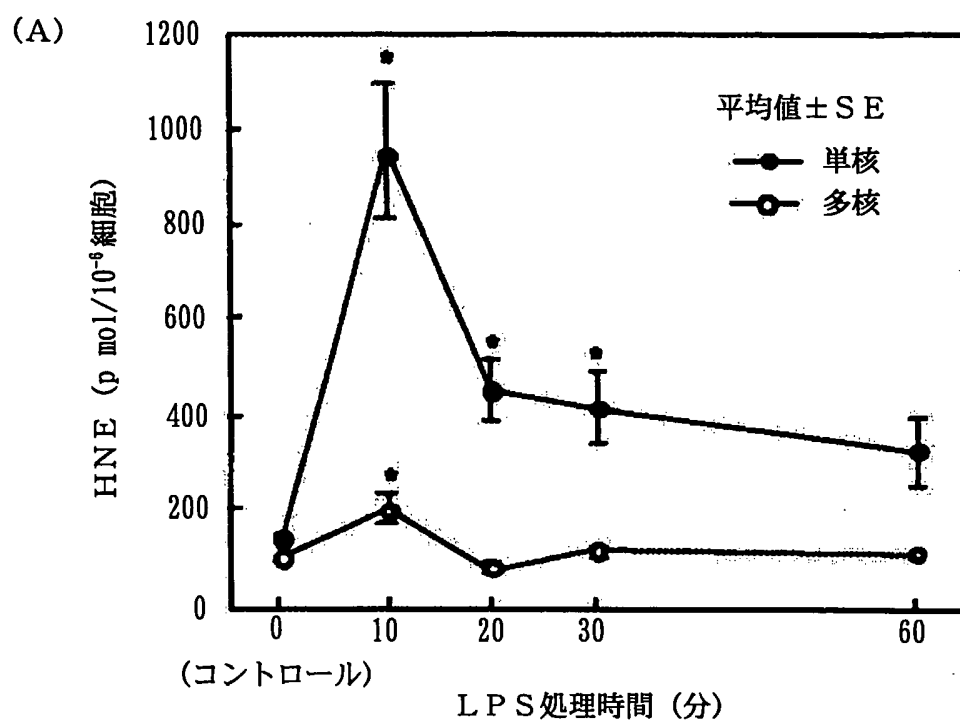


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01), **G01N33/543**(2006.01)

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)

G01N33/53(2006.01), **G01N33/543**(2006.01)

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-168394 A (Nikken Foods Co., Ltd.), 02 July, 1996 (02.07.96), (Family: none)	1-3
Y	JP 2001-324506 A (Ikagaku Co., Ltd.), 22 November, 2001 (22.11.01), (Family: none)	1-3
Y	JP 5-5739 A (Nippon Telegraph And Telephone Corp.), 14 January, 1993 (14.01.93), (Family: none)	1-3
Y	JP 10-160735 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 19 June, 1998 (19.06.98), (Family: none)	1-3

☒ 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
21 December, 2005 (21.12.05)Date of mailing of the international search report
10 January, 2006 (10.01.06)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017558

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-108914 A (Norio KUDO), 08 April, 2004 (08.04.04), & EP 1542011 A & CA 2499692 A & WO 2004/027423 A	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **G01N33/53** (2006.01), **G01N33/543** (2006.01)

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. **G01N33/53** (2006.01), **G01N33/543** (2006.01)

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)

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
Y	J P 8-168394 A (日研フード株式会社) 1996. 07. 02 (ファミリーなし)	1-3
Y	J P 2001-324506 A (株式会社いかがく) 2001. 11. 22 (ファミリーなし)	1-3

☒ 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

21. 12. 2005

国際調査報告の発送日

10. 01. 2006

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)

竹中 靖典

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

9507

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
Y	J P 5-5739 A (日本電信電話株式会社) 1993. 01. 14 (ファミリーなし)	1-3
Y	J P 10-160735 A (明治乳業株式会社) 1998. 06. 19 (ファミリーなし)	1-3
A	J P 2004-108914 A (工藤憲雄) 2004. 04. 08 & EP 1542011 A & CA 2499692 A & WO 2004/027423 A	1-3