

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580017718.0

[43] 公开日 2007年5月23日

[11] 公开号 CN 1969187A

[22] 申请日 2005.3.31

[21] 申请号 200580017718.0

[30] 优先权

[32] 2004.3.31 [33] JP [31] 134823/2004

[32] 2004.3.31 [33] JP [31] 134824/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/006395 2005.3.31

[87] 国际公布 WO2005/094188 日 2005.10.13

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.30

[71] 申请人 前田和久

地址 日本大阪府

共同申请人 山本宽

[72] 发明人 前田和久 山本宽

[74] 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所
代理人 刘新宇

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

侵袭控制方法和脂联素的利用

[57] 摘要

通过以血液中的脂联素作为应激标记并测量脂联素的量，可以对应激下的身体状况进行控制。另外可以用脂联素抑制内毒素。

1. 侵袭控制方法，其包括：以血液中的脂联素作为应激标记，测定脂联素的量以及应激前的脂联素的量与应激后的脂联素的量的比例。
2. 根据权利要求1所述的侵袭控制方法，其中侵袭控制是人的手术后感染症控制。
3. 根据权利要求1、2任一项所述的侵袭控制方法，其中侵袭控制是人的胰岛素抗性的控制。
4. 根据权利要求2所述的侵袭控制方法，其中手术是移植治疗。
5. 根据权利要求2所述的侵袭控制方法，其中感染症是败血症、高细胞因子血症、多脏器衰竭。
6. 依照权利要求1~5的侵袭控制方法的侵袭控制系统。
7. 利用权利要求6的侵袭控制系统作为子类的临床路径制定方法。
8. 利用权利要求6的侵袭控制系统的术后感染症表现预测方法。
9. 利用权利要求6的侵袭控制系统的代谢综合征患者的手术应激测定方法。
10. 作为败血症的应激标记的脂联素。
11. 作为高细胞因子血症的应激标记的脂联素。
12. 作为多脏器衰竭的应激标记的脂联素。
13. 作为侵袭控制中的应激标记的脂联素的使用。
14. 根据权利要求13所述的使用，其中脂联素被用作败血症、高细胞因子血症或多脏器衰竭的应激标记。
15. 应激因子的分析方法，其包括使用脂联素。
16. 根据权利要求15所述的方法，其中应激是基于败血症、高细胞因子血症或多脏器衰竭的应激。

17. 内毒素中和剂，其包含用于抑制内毒素活性的有效量的人脂联素。

18. 根据权利要求17所述的内毒素中和剂，其特征在于，中和剂中的人脂联素的浓度为0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ 。

19. 根据权利要求17所述的内毒素中和剂，其中中和剂是固定了人脂联素的吸附材料。

20. 根据权利要求17~19任一项所述的内毒素中和剂，其中中和剂的目的在于败血症治疗、内科疾病治疗、或多脏器衰竭治疗。

21. 疾病的治疗方法，其中包括将权利要求18的中和剂直接给予体内的对内毒素活性的抑制是必需的。

22. 治疗方法，其特征在于，使体内的血液在体外与权利要求19的中和剂接触，然后再返回到体内的方法。

23. 根据权利要求21或22任一项所述的治疗方法，其中还包括结合使用使体内的人脂联素浓度增加的医药品。

24. 根据权利要求21~23任一项所述的治疗方法，其中，治疗以败血症、内科疾病、多脏器衰竭作为目的。

侵袭控制方法和脂联素的利用

技术领域

本发明涉及生物学、医学等领域中的侵袭控制方法以及脂联素（adiponectin）的利用。

背景技术

近年来，肥胖人口的比例增加，人们认为在外科领域对肥胖患者的围手术期控制也变得更重要了。人们认为肥胖不仅是手术本身困难，而且经常并发动脉硬化、高血压、糖尿病等所谓的代谢综合征，包括术后感染的并发症的概率高，是手术时的重要的危险因子。然而，到目前为止，对于带有这样的危险的患者的手术应激的影响和术后并发症的危险尚未数值化。已知脂联素在以肥胖患者为首的多发性危险因子综合征的患者中表现出低值。围手术期脂联素的测定可以测知对多发性危险因子综合征患者的手术的影响。

另外，有时由于围手术期中过大的手术侵袭会使患者走向不幸的危象。为了使术后并发症，特别是术后感染症的发生防患于未然，重要的是怎样控制术后早期发生的过剩的炎症性细胞因子的发生。最近，在术后控制中开始导入血中细胞因子的迅速测定，但人们认为作为细胞因子的控制法重要的是只对过剩的反应进行控制，并维持基本的生物体反应本身。认为今后有必要进行更为精细的细胞因子的控制、或需要将各个人的反应的不同加以考虑的定向治疗，强烈期盼更简便、更确实的应激标记。

另外，在近年的生物学领域的研究、医学领域中的治疗和研究中有关内毒素的研究盛行，特别是免疫系统的激活、刺激细胞

因子产生的作用引人注目。这些作用直接与败血症、肝衰竭、呼吸衰竭、DIC、多脏器衰竭(MOF)等疾病密切相关,一直以来对其对策给予了充分的关注。另外最近了解到慢性的内毒素刺激、以及由此诱导的包括TNF- α 在内的细胞因子与以脂肪肝、炎症性肠道疾病为首的内科疾病的病态有关系。

到目前为止,作为内毒素的中和、除去技术虽然已经开发了若干技术,但也指出了各个问题点。例如,在利用抗核心多糖LPS免疫球蛋白的球蛋白补充疗法中,没有达到预防感染的效果,没有达到改善由于休克导致的死亡率的目的。在对脂质A的单克隆抗体疗法中也没有达到改善由于休克导致的死亡率的目的。从人嗜中性粒细胞发现的抗菌肽(CAP18肽)疗法、以及通过内毒素特异性受体(TLR)的信号解析正在发展,预期抗TLR抗体有作为内毒素休克治疗药的可能性,但无论那一个都没有达到临床应用。另外,唯一在临床使用的多粘菌素B吸附柱,由于使用体外循环,存在着经济性、血小板减少等问题,另外,是否对作为败血症的根源的细胞因子血症有改善也不清楚。如上所述,就现有技术来说还没有效果好的内毒素中和技术,强烈期盼该技术的改善、开发。

发明内容

发明要解决的课题

本发明的意图是要解决上述那样的现有技术的各种问题点。即,本发明的目的在于提供基于与现有技术完全不同的构思的应激标记。

另外,本发明的目的在于提供基于与现有技术完全不同的构思的内毒素中和剂。

用于解决课题的手段

本发明人们为了解决上述课题，从各个角度加以探讨，进行研究开发。结果发现通过将血液中的脂联素作为应激标记并测定脂联素的量，可以控制侵袭。

另外，本发明人们为了解决上述课题，从各个角度加以探讨，进行研究开发。结果发现人脂联素对于抑制内毒素活性是有效的。

本发明正是基于这样的见解完成的。

即，本发明提供如下各发明。

(1) 侵袭控制方法，其包括以血液中的脂联素作为应激标记，测定脂联素的量以及应激前的脂联素的量与应激后的脂联素的量的比例（例如，手术前的脂联素的量和手术后的脂联素的量的比例）。

(2) 依照上述(1)的侵袭控制方法的侵袭控制系统。

(3) 利用上述侵袭控制系统(2)作为子类的临床路径制定方法。

(4) 利用上述侵袭控制系统(2)的术后感染症表现预测方法。

(5) 利用上述侵袭控制系统(2)的代谢综合征患者的手术应激测定方法。

(6) 作为用于败血症、高细胞因子血症、多脏器衰竭等的应激标记的脂联素。

(7) 作为侵袭控制中的应激标记的脂联素的使用。

(8) 应激因子的分析方法，其特征在于，使用脂联素。

(9) 内毒素中和剂，其特征在于，包含有效抑制内毒素活性的有效量的人脂联素。

(10) 一种需要抑制内毒素活性的疾病的治疗方法，其特征在于，将含有人脂联素的内毒素中和剂直接体内给予。

发明的效果

如果利用本发明所述的身体状况控制方法，可以可靠地进行手术后或败血症治疗时的侵袭控制。

另外，如果利用本发明所述的内毒素中和剂，可以有效地进行例如败血症、多脏器衰竭（MOF）、DIC、呼吸衰竭（ARDS）、肝硬变、脂肪肝、肝衰竭、炎症性肠道疾病、腹膜炎、脏器移植、透析、烫伤、外伤、中心静脉营养、急性重症胰腺炎等的治疗。

附图说明

[图1]图1是表示计算出术后血中脂联素浓度的平均值和标准误差的结果的图。是表示血中脂联素值由于手术侵袭导致降低的图。

[图2]图2是表示对术后第10天受感染的组（血中SLP值的阳性组）和阴性组进行比较的结果的图。可知SLP阳性组在手术前后脂联素值显著降低。

[图3]图3是表示脂联素的生理浓度中和低浓度LPS、内毒素的图。

具体实施方式

脂联素是在大阪大学细胞工程中心由发明人克隆的脂肪组织特异性内分泌因子（Maeda K et al. : Biochem Biophys Res Commun 221(2): 286 - 9, 1996）。已经明确它的血中浓度在肥胖者中降低，并且即使肥胖程度相同，心肌梗塞、心绞痛这样的动脉硬化性疾病以及糖尿病会导致血中脂联素降低（前田和久等：Annual Review 2004 内分泌，代谢 p15 - 19）。因此，人们认为脂联素在糖尿病或高血压、高脂血症等所谓代谢综合征患者中对于把握手术前后的全身状态也是有效的。

最近，本发明人们发现脂联素具有直接抑制内毒素活性的抑

制作用。术后血中存在较高浓度的内毒素。具有抑制该内毒素的活化的功能的脂联素变成同样程度的低浓度。推测这可能是由于脂联素起着内毒素的内源性中和物质的作用并被消耗掉了，另外由于内毒素或感染症导致高细胞因子血症，其结果使得脂联素浓度降低。因此在监视术后的侵袭方面，如果关注该脂联素，对于身体状况的控制更有用。

内毒素是革兰氏阴性菌的菌体成分，具有各种各样的生理活性，由于临床上败血症（内毒素血症）的治疗非常困难，现在还没有有效的治疗方法，所以死亡率也高。最近本发明人们制作了大鼠的腹膜炎模型并测定了血中的脂联素、内毒素、 $\text{TNF}-\alpha$ 。结果发现该腹膜炎模型与对照组相比虽然血中内毒素和 $\text{TNF}-\alpha$ 增加，但血中脂联素明显降低，与 $\text{TNF}-\alpha$ 呈镜像关系。这可能是在腹膜炎这样的高内毒素血症中，脂联素作为内毒素的内源性中和物质起作用并被消耗的缘故。由于已报道脂联素在体外与作为炎症性细胞因子的 $\text{TNF}-\alpha$ 相互抑制，该脂联素的降低也许是伴随着被内毒素活化的 $\text{TNF}-\alpha$ 的增加发生的间接反应。总之，脂联素或脂联素产生增强剂也许能够成为困难的败血症治疗的突破口。

人们认为在术后特别是腹部外科手术后的血中存在着较高浓度的内毒素。本发明人们在腹部外科手术前后测定血中脂联素值，发现在手术前后血中脂联素值降低，且并发术后感染症的病例中脂联素的降低率高。通过手术前后的脂联素值的测定可知手术应激的程度，可以做到术后感染的预测。到目前为止，作为术后急性炎症反应的标记，CRP在临床上被频繁使用，但不能说是实时反映实际的炎症的发展状况。发生包括手术侵袭在内的急性炎症时，不但关注炎症性细胞因子、CRP，若还关注作为抗炎症性细胞因子的脂联素的动态，则对以感染对策为主体的术后控制更为有用。该技术在患者可以了解自身的治疗计划是怎样的或处于治

疗的哪一个阶段这一点上，对于最近全国性导入的临床路径是有用的。并且可强烈期待该方法是对于综合医疗、医疗经济有很大影响的技术。在决定术后感染预防的治疗方针时也可考虑使用脂联素，以便考虑临床路径的术后子类的变更。

脂联素的围手术期测定的意义归纳如下，其中，围手术期是指从手术前到手术中、手术后的期间。

(1) 可进行到目前为止尚未数值化的代谢综合征的危险评价。

(2) 反映手术应激或术后炎症性细胞因子TNF- α 的上升的术后血中脂联素值的降低成为手术应激的指标。

(3) 根据术后第10天的血中SLP值和脂联素的相关图表，可以预测术后的感染。

其中有关(3)，术后抗菌剂的预防给予在欧美基本上只限于手术当日和手术次日，在日本，往往给予数天。另外，怀疑有感染时，由于直至获得细菌培养的结果要花费数日，大多在此之前继续给予抗菌剂。现在，多个大学医院开始进行大规模临床试验，其内容是测定手术次日的SLP值，研究能否将其作为此后有无必要继续给予抗菌剂的指标。像这样在术后感染的预测中使用SLP。此次，术后第10天的血中SLP值与脂联素的相关性变得明确，表明反映手术应激的脂联素对于围手术期的感染预测也是有用的。如上所述，当例如根据手术前后的脂联素值的测定考虑临床路径（工程管理手法）的术后子类的变更的情况下，也可考虑在决定预防术后感染的治疗方针时使用脂联素。

在本发明中作为对象的脂联素其种类没有特别限制，可举出全长蛋白型、球状蛋白质型等。另外，它来自什么样动物也没有特别限制，将人的术后控制作为目标时，将人脂联素作为标记。

测定标记的方法可以按照常规方法，可举出例如使用特异性

抗体进行蛋白质印迹 (Western blotting) 的方法、使用Linco公司生产的ELISA试剂盒的方法等, 并没有特别限制。另外样品可以是血液本身、除去血液血球成分后的样品以及对其进行浓缩后的样品。

本发明给出的侵袭控制的目的是制定包括术后感染的预测、和早期治疗、临床路径的子类在内的治疗计划。特别是对于认为今后会越来越增加的代谢综合征患者的手术应激的影响的数值化是极其重要的。

在控制侵袭时, 可以对要预测的个体的手术前和手术后的血中脂联素浓度进行比较研究。其中, 将手术前的血中脂联素浓度值作为基准, 若增加至少10%以上、优选为20%以上、更优选为30%以上, 可明确要预测的个体容易发生由于应激导致的感染症、胰岛素抗性、败血症、高细胞因子血症、多脏器衰竭。

人脂联素其种类并没有特别限制, 可举出全长蛋白型、球状蛋白质型等。在本发明中, 以0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度含有中和低浓度内毒素浓度(50 pg/ml ~50 ng/ml)的人脂联素, 优选以0.5~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度含有, 更优选以1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度含有, 如果是0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下的浓度, 则达不到充分的血中浓度, 相反, 如果是100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上的浓度, 则偏离人的生理浓度, 不是优选。

本发明涉及到的人脂联素可以做成各种形态的制剂使用。具体来说, 可举出注射剂、悬浮剂、栓剂、软膏、乳膏剂、凝胶剂、贴剂、吸入剂等, 并没有特别限定。特别是注射剂的情况中, 将人脂联素溶解于适当的溶剂中制备, 也可以添加缓冲剂、保存剂。

另外, 本发明中给出的中和剂也可以是人脂联素被固定化的形态。此时, 固定化方法没有特别限定, 作为常规方法已知的缩合剂等就可以。另外吸附的载体的形状也没有特别限定, 例如膜、纤维、中空丝、粒状物、无纺布等。

作为本发明给出的内毒素中和剂的医药品，只要显示出该功能，就没有特别限定，可举出例如败血症、多脏器衰竭（MOF）、DIC、呼吸衰竭（ARDS）、肝硬变、脂肪肝、肝衰竭、炎症性肠道疾病、腹膜炎、脏器移植、透析、烫伤、外伤、中心静脉营养、急性重症胰腺炎等的治疗药。另外，人脂联素由于抑制TNF- α 产生和抑制其作用，所以也期待作为抗TNF- α 作用药。

人脂联素其种类并没有特别限制，可举出全长蛋白型、球状蛋白质型等。在本发明中，以0.1~100 μ g/ml的浓度含有中和低浓度内毒素浓度（50pg/ml~50ng/ml）的人脂联素，优选以0.5~50 μ g/ml的浓度含有，更优选以1~10 μ g/ml的浓度含有，如果是0.1 μ g/ml以下的浓度，则达不到充分的血中浓度，相反，如果是100 μ g/ml以上的浓度，则偏离人的生理浓度，不是优选。

本发明涉及到的人脂联素可以做成各种形态的制剂使用。具体来说，可举出注射剂、悬浮剂、栓剂、软膏、乳膏剂、凝胶剂、贴剂、吸入剂等，并没有特别限定。特别是注射剂的情况中，将人脂联素溶解于适当的溶剂中制备，也可以添加缓冲剂、保存剂。

另外，本发明中给出的中和剂也可以是人脂联素被固定化的形态。此时，固定化方法没有特别限定，作为常规方法已知的缩合剂等就可以。另外吸附的载体的形状也没有特别限定，例如膜、纤维、中空丝、粒状物、无纺布等。

作为本发明给出的内毒素中和剂的医药品，只要显示出该功能，就没有特别限定，可举出例如败血症、多脏器衰竭（MOF）、DIC、呼吸衰竭（ARDS）、肝硬变、脂肪肝、肝衰竭、炎症性肠道疾病、腹膜炎、脏器移植、透析、烫伤、外伤、中心静脉营养、急性重症胰腺炎等的治疗药。另外，人脂联素由于抑制TNF- α 产生和抑制其作用，所以也期待作为抗TNF- α 作用药。

[实施例]

以下基于实施例对本发明进行更详细的说明，但这些实施例对本发明并没有任何限定。

实施例1

根据常规方法测定38例（男性19例，女性19例）腹部外科手术例的术前、术后血中脂联素浓度，算出其平均值和标准误差。得到的结果如图1所示。可知腹部外科手术导致血中脂联素浓度降低。术前、术后血中脂联素浓度分别为 $10 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $8.1 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ ，术后脂联素浓度与术前相比明显降低（ $p < 0.0001$ ）。

实施例2

计算出38例腹部外科手术例的血中脂联素浓度的手术前后的比（术后脂联素浓度/术前脂联素浓度）、并对术后第10天的血中SLP值的阳性组和阴性组进行比较。得到的结果如图2所示。在SLP值的阳性组中为 0.71 ± 0.05 、在阴性组中为 0.90 ± 0.06 ，阳性组中表现出明显的低值（ $p < 0.03$ ）。由此可知通过测定术前和手术刚结束后的血中脂联素浓度，可以预测围手术期的感染症，手术前后的血中脂联素浓度之比对于腹部外科手术的围手术期感染症的预测是有用的。其中SLP（Silkworm larvae plasma）测试是对作为血液中的细菌的细胞壁成分的 β 葡聚糖（来自真菌）、肽聚糖（来自革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌）的总体进行测定的方法，以往显示出反映向血中的细菌移位（文献Crit. Care. Med., 2002）。

实施例3

配制脂多糖（来自大肠杆菌的脂多糖，0111:B4，目录编号#4391、Sigma公司生产）水溶液（最终浓度50ng/ml、5ng/ml、500pg/ml、50pg/ml），将100 μl 蒸馏水或100 μl 的50 $\mu\text{g/ml}$ 脂联素（テクネ公司人重组脂联素，目录编号21065X）溶液混合到各100 μl 上述配制的溶液中。于37 $^{\circ}\text{C}$ 下在恒温槽中温育1小时后，用

比浊时间分析法测定脂多糖浓度。得到的结果如图3所示。可知生理浓度的脂联素中和低浓度的LPS。

实施例4

测定30例（15例术后感染例，15例术后没有感染的例）腹部外科手术例的术前、术后血中脂联素浓度。术后血中脂联素浓度对术前的脂联素浓度的比例，在术后感染的例子中为0.68，在术后没有感染的例子中为1.00，可知在术后感染的例子中该比例明显高。由此通过手术前后的脂联素值的测定，可以知道手术应激的程度，可以做到术后感染的预测。

产业上的实用性

根据本发明所述的方法，通过测定手术前后的脂联素值，可以了解手术应激的程度，能够做到术后感染的预测。该技术在患者可了解自身的治疗计划是怎样的或处于治疗的哪一个阶段这一点上，对于最近在很多医院中导入的临床路径是有用的。因此，可强烈期待该方法对于例如综合医疗、医疗经济有很大影响的技术。因此本发明是在医学、生物学等领域中极其有用的发明。

另外根据本发明，通过给予脂联素可中和内毒素。因此，除了降低内毒素值以外，可以抑制内毒素刺激包括TNF- α 在内的细胞因子的产生。另外，如果利用脂联素的抗TNF- α 作用，也可以进行由于高TNF- α 引起的病态的治疗。强烈期待该方法在例如败血症时的内毒素中和、抗细胞因子（抗TNF- α ）中的应用。因此，本发明是在医学、生物学等领域中极其有用的发明。

脂联素
(μg)

$*p < 0.0001$

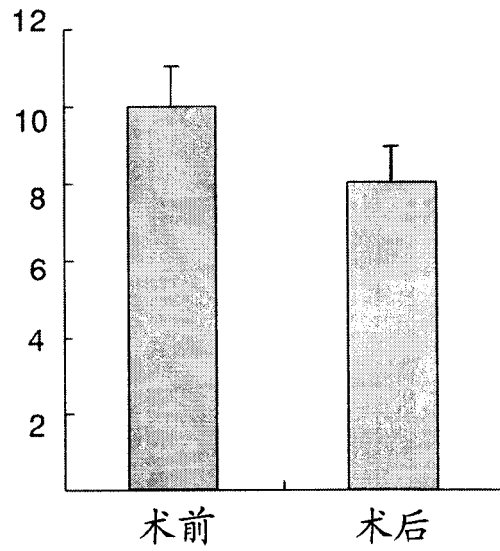


图 1

脂联素
(手术刚结束后/手术前的比值)

$*p < 0.03$

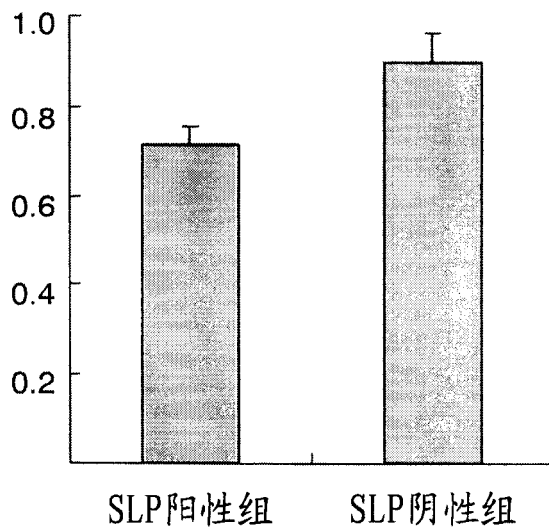


图 2

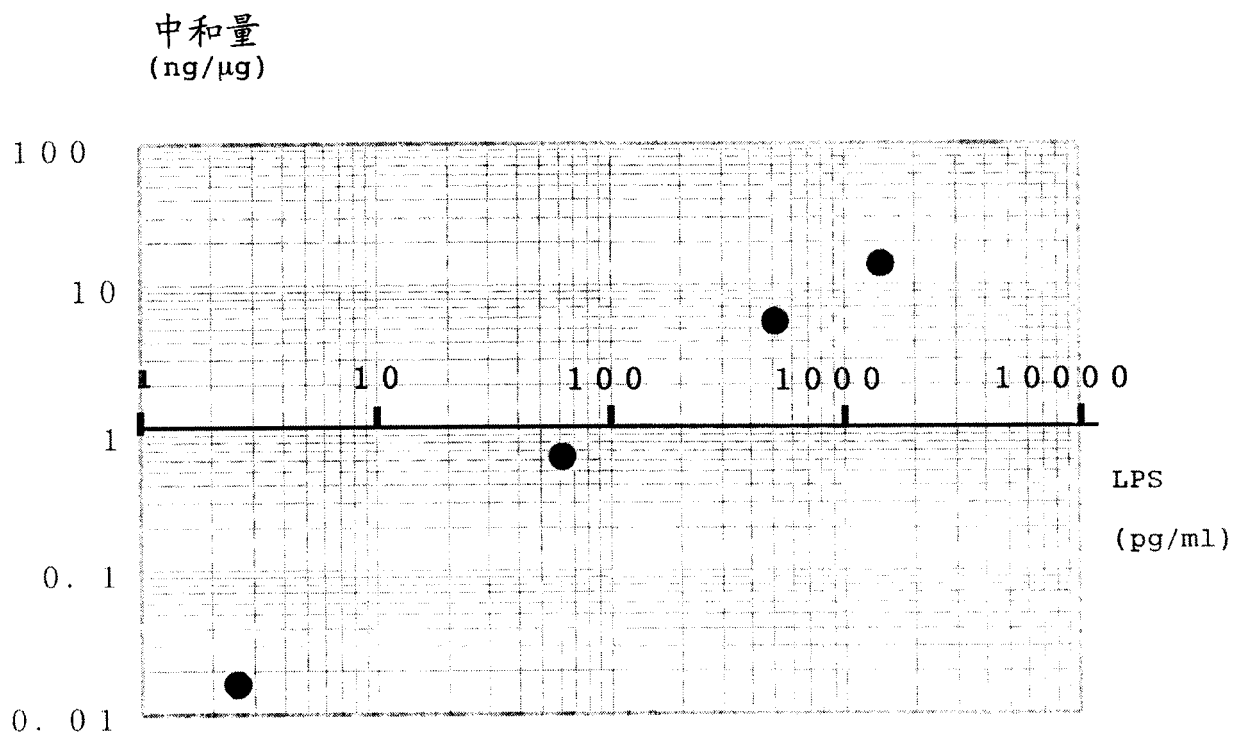


图 3

专利名称(译)	侵袭控制方法和脂联素的利用		
公开(公告)号	CN1969187A	公开(公告)日	2007-05-23
申请号	CN200580017718.0	申请日	2005-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	前田和久 山本宽		
申请(专利权)人(译)	前田和久 山本宽		
当前申请(专利权)人(译)	前田和久 山本宽		
[标]发明人	前田和久 山本宽		
发明人	前田和久 山本宽		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/095 G01N33/68 G01N33/76		
CPC分类号	A61K38/2264 G01N33/74		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2004134824 2004-03-31 JP 2004134823 2004-03-31 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过以血液中的脂联素作为应激标记并测量脂联素的量，可以对应激下的身体状况进行控制。另外可以用脂联素抑制内毒素。

脂联素
(μg)

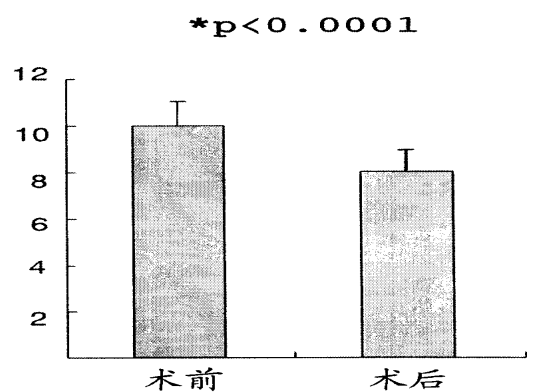


图 1