

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2005/093415

発行日 平成20年2月14日(2008.2.14)

(43) 国際公開日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	W 2 G O 5 4
GO 1 N 33/535 (2006.01)	GO 1 N 33/535	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
	GO 1 N 21/78	Z

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

出願番号 特願2006-511376 (P2006-511376)	(71) 出願人 592055956
(21) 国際出願番号 PCT/JP2004/004434	株式会社シバヤギ
(22) 国際出願日 平成16年3月29日(2004.3.29)	群馬県渋川市石原1062-1
(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(72) 発明者 小島 正章 群馬県渋川市石原1062-1 株式会社シバヤギ内
	Fターム(参考) 2G054 AA07 AB04 CA23 EA06 GA03 GB01 GB05

(54) 【発明の名称】 アポリポタンパク質B-48の測定方法およびその用途

(57) 【要約】

この発明は、検体をトリス緩衝剤および必要に応じて添加される界面活性剤で希釈し、この希釈検体に抗アポB-48モノクローナル抗体を反応させてアポB-48を測定することからなるアポB-48測定方法およびそれに使用するアポB-48測定用キットを提供する。これによって、特に血液中のアポB-48を正確に、迅速にかつ簡便に測定することができる。また、この発明のアポB-48測定方法および/またはそれに使用するアポB-48測定用キットはアポB-48関連疾患を診断するとともに、血液中のアポB-48を増減させる高脂血症治療薬成分並びに機能性食品成分の効能評価にも応用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体をトリス緩衝剤で希釈し、この希釈検体に抗アポB-48モノクローナル抗体を反応させてアポB-48を測定することを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項 2】

請求の範囲第1項に記載のアポB-48測定方法において、前記希釈検体に抗アポB-48モノクローナル抗体を反応させて前記検体中のアポB-48を結合させ、抗アポB-48/アポB-100-ビオチン標識抗体を添加して前記アポB-48に結合させた後、アビジン結合パーオキシダーゼとを反応させ、更に発色基質と反応させることによってアポB-48を測定することを特徴とするアポB-48測定方法。

10

【請求項 3】

請求の範囲第1項または第2項に記載のアポB-48測定方法において、前記トリス緩衝剤がトリス、トリス塩酸緩衝液、トリスマレイン酸緩衝液またはグッドバッファーであることを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項 4】

請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のアポB-48測定方法において、前記希釈検体に界面活性剤が更に添加されていることを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項 5】

請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載のアポB-48測定方法において、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であることを特徴とするアポB-48測定方法。

20

【請求項 6】

アポB-48測定用キットであって、トリス緩衝剤と抗アポB-48モノクローナル抗体とを含んでいることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項 7】

請求の範囲第6項に記載のアポB-48測定用キットにおいて、抗アポB-48/アポB-100-ビオチン標識抗体と、アビジン結合パーオキシダーゼと、発色基質とを更に含んでいることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項 8】

請求の範囲第6項または第7項に記載のアポB-48測定用キットにおいて、前記トリス緩衝剤がトリス、トリス塩酸緩衝液、トリスマレイン酸緩衝液またはグッドバッファーであることを特徴とするアポB-48測定用キット。

30

【請求項 9】

請求の範囲第6項ないし第8項のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットにおいて、界面活性剤が更に含まれていることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項 10】

請求の範囲第6項ないし第9項のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットにおいて、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項 11】

請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載のアポB-48測定方法および/または請求の範囲第6項ないし第10項のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットを用いて、検体中のアポB-48を測定することを特徴とするアポB-48測定方法。

40

【請求項 12】

請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項もしくは請求の範囲第11項に記載のアポB-48測定方法および/または請求の範囲第6項ないし第10項のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットを用いて、検体中のアポB-48を測定することによってアポB-48関連疾患を診断することを特徴とする疾患診断方法。

【請求項 13】

請求の範囲第12項に記載の疾患診断方法において、前記アポB-48関連疾患が高脂血

50

症、動脈硬化性疾患、心機能不全症またはポックリ病であることを特徴とする疾患診断方法。

【請求項 1 4】

請求の範囲第 1 項ないし第 5 項のいずれか 1 項もしくは請求の範囲第 1 1 項に記載のアポ B-48 測定方法および／または請求の範囲第 6 項ないし第 1 0 項のいずれか 1 項に記載のアポ B-48 測定用キットを用いて、高脂血症治療薬成分並びに機能性食品成分の効能評価法。

【請求項 1 5】

請求の範囲第 1 項ないし第 5 項のいずれか 1 項に記載のアポ B-48 測定方法とアポ B-48 以外の他の測定項目を組みあせて同一検体で同一測定器により同時多項目に測定することを特徴とする疾患分析法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

この発明は、アポリポタンパク質 B-48 の測定方法およびその用途に関するものである。更に詳細には、この発明は、アポリポタンパク質 B-48 の測定方法ならびにアポリポタンパク質 B-48 測定用キットまたはそれらを用いたアポリポタンパク質 B-48 関連疾患の診断方法ならびに血液中のアポリポタンパク質 B-48 を増減させる高脂血症治療薬成分並びに機能性食品成分の効能評価法に関するものである。

【背景技術】

現在、日本人の死因は、心疾患と脳血管疾患、いわゆる動脈硬化性疾患が、悪性新生物（がん）に次いで多く、動脈硬化の予防ならびに治療により、この動脈硬化性疾患による死亡率を低下させることは、高齢化社会における国民健康の上からも急務である。

20

ところが、動脈硬化性疾患は、必ずしも確実に効果的な診断法も治療法も確立されていないのが現状であるところから、確実にかつ有効な診断法ならびに治療法の開発が待望されている。しかしながら、この動脈硬化性疾患の発症の原因は、一様ではなく、高脂血症、高血圧症、糖尿病、肥満、喫煙、遺伝、加齢など実に多くの要因が関係していることが明らかになっている。その中でも、最大の危険因子といわれているのが、高脂血症である。

高脂血症は、全身の血管に動脈硬化を発症させ、動脈硬化が進展すると、血液の流れが悪くなり、各種臓器に障害が発生する。この動脈硬化が心臓血管（冠動脈）に発症すると、虚血性心疾患（狭心症や心筋梗塞）の原因となり、脳血管に発症すると、脳血管疾患（脳梗塞）の原因となる。

30

高脂血症とは、血液中の脂肪、特にコレステロールと中性脂肪（トリグリセリド）などの脂質が過剰に存在している状態である。コレステロールとトリグリセリド（中性脂肪）は、そのままでは水分が大半を占める血液中には溶け込むことができない。そこで、コレステロールと中性脂肪は、球状のリポタンパク質という粒子に形を変えて血液の中に溶け込んでいる。このリポタンパク質は、その表層が親水性のリン脂質、遊離コレステロール、アポタンパク質から構成され、その内部の核層には、疎水性のコレステロール（多くはエステル型コレステロール）とトリグリセリド（中性脂肪）とが存在している。これらの脂肪は、体内の細胞膜を構成するとともに、ステロイドホルモンなどの材料として元来重要な役割を担っている。しかしながら、血液中の脂肪、特にコレステロールとトリグリセリドとが過剰に存在すると、高脂血症の原因となる。

40

高脂血症などにより動脈硬化が起こると、体内を循環する血液中に存在するコレステロールやトリグリセリド（中性脂肪）を構成しているリポタンパク質のうち、血管内壁へのコレステロールの沈着促進または沈着防止に関与する種々のリポタンパク質が増減する。これらのリポタンパク質の血中量を正確に測定することができれば、高脂血症や動脈硬化症の診断および治療に役立てることができることになる。

ところで、血液中のリポタンパク質は、血清脂質とアポリポタンパク質とが結合してできていて、血清脂質の運搬体としての役割を果たしている。

また、リポタンパク質は、その脂質構成などによって比重や粒子サイズが異なり、一般

50

的には、カイロミクロン (CM)、超低比重リポタンパク質 (VLDL)、中間比重リポタンパク質 (IDL)、低比重リポタンパク質 (LDL)、高比重リポタンパク質 (HDL) の5種類に分けられる。このリポタンパク質は、この順に比重が重くなり、粒子の大きさはこの順に小さくなっている。また、これらのリポタンパク質は、コレステロールと中性脂肪 (トリグリセリド TG) との割合がそれぞれ異なっており、大きい粒子では中性脂肪の割合が多くなり、小さい粒子ではコレステロールの割合が多くなっている。

これらリポタンパク質のうち、カイロミクロン (CM) は、トリグリセリド (中性脂肪) が主成分であり、食物由来のトリグリセリドやコレステロールから合成され、小腸から産生分泌される。また、CMは、胸管リンパ管を経て血液中に分泌され、リポタンパクリパーゼ (LPL) により、トリグリセリドが分解されてその粒子が小さくなり、コレステロールに富んだカイロミクロンレムナント (CM-R) になる。このカイロミクロンレムナントは、アポリポタンパク質 E を介して肝臓に取り込まれる。このように、カイロミクロン (CM) は、外因性 (食事由来) トリグリセリドを脂肪組織や筋肉に運搬するとともに、コレステロールを肝臓に運搬する役目を果たしている。

超低比重リポタンパク質 (VLDL) も、トリグリセリド (中性脂肪) が主成分であり、肝臓と小腸で生成され分泌された後、主に内因性の脂質、つまり、肝細胞で合成された内因性トリグリセリドと内因性コレステロールとを肝臓から血液中に運搬する。VLDL は、その1部は直接組織に取り込まれるが、そのほとんどはリポタンパクリパーゼ (LPL) によってそのトリグリセリドが分解されて中間比重リポタンパク質 (IDL = VLDL レムナント) になる。

この中間比重リポタンパク質 (IDL) は、アポリポタンパク質 E を介して肝臓に取り込まれ、リパーゼによって分解されて低比重リポタンパク質 (LDL) になる。

この低比重リポタンパク質 (LDL) は、上記したように、超低比重リポタンパク質 (VLDL) から中間比重リポタンパク質 (IDL) を介して代謝されて生成される。LDL は、コレステロールが最も多く含まれていて、約40%がコレステロールで構成されていて、主としてコレステロールを肝臓を始めほとんど全ての組織に供給している。このLDLは、粒子が小さいことから、動脈壁を透過しやすいという性質を持っている。動脈壁中に透過したLDLは、血液中とは異なって、非常に酸化されやすくなって、酸化LDLになる。この酸化LDLが動脈硬化発症の引き金として作用している。したがって、動脈硬化の予防・治療には、コレステロールの量を減らすとともに、この酸化から守ることが重要と考えられるようになった。

他方、高比重リポタンパク質 (HDL) は、主に小腸と肝臓で生成されるほか、カイロミクロン (CM) や超低比重リポタンパク質 (VLDL) がリポタンパクリパーゼの作用を受けて異化される過程でも生成される。このHDLは、末梢組織の細胞での余剰なコレステロールや動脈壁に蓄積したコレステロールを回収して肝臓に運搬して異化する役目を果たしている。したがって、このHDLの量を増やすことは、高脂血症を改善することになり、動脈硬化の予防・治療に繋がることになる。

ところが、最近では、空腹時の脂質レベルのみでは、動脈硬化のリスクを評価するには不十分であることが明らかとなってきている。この食後の脂質レベルによって動脈硬化のリスク、つまり食後高脂血症の評価が必要であると考えられている。

食後に増加する脂質としては、トリグリセリド (TG) がある。高トリグリセリド血症は、TGを豊富に含むリポタンパク質、つまり、TGリッチリポタンパク質であるカイロミクロン (CM)、超低比重リポタンパク質 (VLDL) および代謝物であるレムナントリポタンパク質の増加による。この高トリグリセリド血症の原因となる3つのリポタンパク質の内、レムナントリポタンパク質が動脈硬化の危険性評価をする場合には最も重要と考えられている。

つまり、小腸で産生され食事由来の外因性TGを豊富に含んでいるカイロミクロン (CM) は、リポタンパクリパーゼ (LPL) により分解されCMレムナントになり、肝臓でアポリポタンパク質 E を認識するレムナントレセプターに取り込まれ処理される。

今のところ、食物由来の循環中の外因性脂質の結合体、つまりカイロミクロンならびに

10

20

30

40

50

カイロミクロンレムナントと、肝臓から分泌された内因性脂質の結合体、つまり超低比重リポタンパク質 (VLDL) ならびに低比重リポタンパク質 (LDL) とを識別する簡単で、再現性ある迅速なアッセイ法は存在していない (Lovegrove, J. A., et al.: *Biochim. et Biophys. Acta*, 1301 (1996) 221-229)。

しかし、カイロミクロン (CM) と超低比重リポタンパク質 (VLDL) は食事の前後では大きな変動は認められない。これに対して、このレムナントリポタンパク質は、カイロミクロン (CM) と超低比重リポタンパク質 (VLDL) が、リポタンパクリパーゼ (LPL) によって、そのトリグリセリドが分解代謝されて生成する代謝産物 (CMレムナントとVLDLレムナント) であり、健常人では肝細胞などによって速やかに吸収分解される。したがって、このレムナントリポタンパク質は、食後には増加するものの空腹時血中には存在していない。しかし、このレムナントリポタンパク質は、代謝異常や、過食・運動不足などにより代謝が遅くなり、食後の血液中に停滞すると、動脈壁のマクローファージに容易に取り込まれ、動脈硬化の初期病変の原因となると考えられている。このレムナントリポタンパク質は、レムナント様リポタンパク質 (remnant-like particles: RLP) と呼ばれていて、食後高脂血症を構成する重要な因子であると考えられている。

一方、このレムナント様リポタンパク質を構成するタンパク質成分としてアポリポタンパク質 (アポタンパク質) が存在する。このアポタンパク質は、水に不溶性の脂質 (エステル型コレステロール、中性脂肪など) に結合して脂質を血液中に溶解しやすくして運搬する役目を持っているとともに、アポタンパク質自体も各種の脂質代謝に深く関与している。かかるアポタンパク質として、アポタンパク質A-I、アポタンパク質A-II、アポタンパク質B、アポタンパク質C-I、アポタンパク質C-II、アポタンパク質Eなど現在10数種類が存在していることが確認されている。

このうち、アポタンパク質Bにはアポタンパク質B-100 (アポB-100) とアポタンパク質B-48 (アポB-48) の2種類がある。前者は肝臓で合成される。ヒト血漿VLDLの主要なタンパク質成分であり、その合成ならびに分泌に重要な役割を果たしている。後者は小腸で産生され、カイロミクロン (CM) の合成に関与しているアポB-48とがある。アポB-100は、超低比重リポタンパク質 (VLDL) 中に存在するタンパク質の約40~60%を、また低比重リポタンパク質 (LDL) の約98%を占めている (Mahley, R. W., et al.: *J. (1984) Lipid Res.* 25, 1277-1294)。また、アポB-48は、ヒト血中において高脂血症と密接に関連しているリポタンパク質の構成タンパク質であり、その測定が正確に可能であれば、高脂血症や動脈硬化症の診断及び治療に有用である。

ところが、アポB-48は、肝臓によって分泌されたアポB-100のN末端アミノ酸配列と48%が同一のアミノ酸配列を有していて相同性が非常に高いので、アポB-48と、アポB-100とは正確に区別することが非常に困難である (Lovegrove, J. A., et al.: *ibid*)。

このように、このレムナントリポタンパク質は、動脈硬化の危険因子であることは知られていたが、その測定が容易でなかったために、実際の臨床検査には長年利用されてこなかった。これまでの測定法としては、密度で分ける超遠心分離法や、荷電で分けるアガロース電気泳動法、またサイズで分ける電気泳動法や、アポタンパク質に対する抗体を使用したりポタンパク質を測定する方法などがあるが、これらはいずれも測定が困難であったり、定量性に欠けたり、または特異性がないなどの理由により、実用的ではなかった。

しかしながら、レムナント様リポタンパク質 (RLP) 自体を正確に測定することは非常に難しい。そこで、レムナント様リポタンパク質 (RLP) の血中濃度を、そのレムナントタンパク質中に存在するコレステロール、つまり、レムナント様リポタンパク質コレステロール (remnant-like particles-cholesterol: RLP-C) として測定する方法が開発された。

このRLP-C測定法は、抗アポA-Iモノクローナル抗体と抗アポB-100モノク

10

20

30

40

50

ローナル抗体とを用いて、アポA-IとアポB-100とを上記モノクローナル抗体に結合させて除去して、上清中に残存する未結合リポタンパク質の量をコレステロールの量として測定するものである。つまり、アポA-IはCM、HDLの主要なアポタンパク質として存在し、またアポB-100はVLDL、VLDLレムナント、LDLの主要なアポタンパク質として存在するところから、抗アポA-Iモノクローナル抗体には、CMとHDLとが結合し、抗アポB-100モノクローナル抗体には、nascent（原始型）VLDL（又はVLDL-2）とLDLとが結合することになる。しかし、この抗アポB-100モノクローナル抗体は、アポB-100の特定アミノ酸領域を特異的に認識するものであり、アポB-100のアミノ酸配列の1部からなるアポB-48を認識しない。したがって、RLP-C測定法では、アポB-48含有カイロミクロンとAPO-E rich VLDLが測定される。 10

しかしながら、このRLP-C測定法は、吸着除去操作が必須であり、作業が煩雑であるとともに、完全な吸着が必要であるところから測定操作に熟練が要求される。

上記したように、アポB-48は、CMとCMレムナントにアポタンパク質として含有されている。CMは、食後速やかにリポタンパク質リパーゼによりCMレムナントに変換されるので、空腹時等においては、血中にCMは存在しない。したがって、CMレムナントに含まれるアポB-48のみの量を正確に測定することができれば、より確実な高脂血症の診断が可能となり、動脈硬化症の診断および治療に大いに役立つものと考えられる。

アポB-48だけを特異的に認識できる抗アポB-48モノクローナル抗体が開発できれば、血中に含まれるCMレムナントのみの量を直接測定することができると考えられる。 20

かかる測定方法の1つとして、食後高脂血症を定量的に診断するために抗アポB-48モノクローナル抗体を用いたELISA測定方法が報告されている（木下誠ら、「アポB-48含有リポ蛋白の測定法の開発」、第30回日本動脈硬化学会総会抄録集（1999年6月11-12日）、133頁）。この方法は、アポB-48を特異的に認識するモノクローナル抗体（4C8）を作成し、それを用いたプレートに2%SDSを含むPBSで希釈した血清を添加して、アポB-48含有リポ蛋白を測定することからなっている。しかしながら、2%SDS中では血清中のアポB-48を測定できず、SDSは、逆に免疫反応を阻害するため、アポB-48のエピトープを露出させるための界面活性剤として好ましくないとの記載がある（日本国特許p3440852、第8欄、7-9頁）。 30

また、抗アポB-48モノクローナル抗体を用いた別の測定方法として、検体を、非イオン性界面活性剤および陰イオン性界面活性剤としてのデオキシコール酸ナトリウムから選択される界面活性剤による処理または凍結融解処理してエピトープを露出させるための処理後、該検体と、実質的なアポB-100には反応せず、アポB-48を特異的に認識するモノクローナル抗体とを反応させることを特徴とするアポB-48および・またはアポB-48含有リポ蛋白の免疫測定方法からなっている（日本国特開P2003-270247A）。 40

また、この特許記載の方法では、各種界面活性剤を含むPBSで血清を希釈し、この希釈血清にアポB-48を特異的に認識するモノクローナル抗体B48-151（同特許、第12欄、第30-38行）を添加して、アポB-48C末エピトープが露出されているかどうかを判断している。その結果、界面活性剤が含まれていない場合には、上記エピトープは露出しておらず、全く発色していないのに対し、トライトン^{T M}X-100、トライトン^{T M}X-114、ツィーン^{T M}-20、NP^{T M}-40などの非イオン性界面活性剤を使用した場合には、強い発色が認められ、アポB-48C末エピトープが露出されていると判断している（同特許、第14欄、第12-26行）。 40

そこで、本発明者らは、アポB-48をより正確に測定することができる更に別のアポB-48の測定方法を開発すべく種々検討した結果、アポB-48をより正確に測定することができるアポB-48測定方法を見出して、この発明を完成した。

【発明の開示】

したがって、この発明は各種界面活性剤を必ずしも使用しない測定方法である。トリス 50

緩衝液で希釈した検体を、抗アポB-48モノクローナル抗体を用いてアポB-48を測定することからなるアポB-48測定方法を提供することを目的としている。

また、この発明は、上記アポB-48測定方法に利用することができるアポB-48測定用キットを提供することを目的としている。

この発明の好ましい態様としては、更に界面活性剤を使用することからなるアポB-48測定方法およびアポB-48測定用キットを提供することを目的としている。

更に、この発明は、上記アポB-48測定方法またはアポB-48測定用キットを使用して、アポB-48を正確にかつ迅速簡単に測定することにより、アポB-48が関連している各種疾患を診断もしくは治療する方法を提供することを目的としている。

また、アポB-48測定用キットを用いて、高脂血症治療薬成分並びに機能性食品成分の効能評価方法を提供することを目的としている。

【発明を実施するための最良の形態】

この発明に係るアポB-48測定方法は、トリス緩衝剤で希釈した検体を、抗アポB-48モノクローナル抗体を用いてアポB-48を測定することからなる方法である。

この発明に使用することができるモノクローナル抗体は、アポB-48のC末端からのアミノ酸配列の一部を特異的に認識することができる抗アポB-48モノクローナル抗体であればいずれも使用することができ、例えば、上記抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8)を使用することができる。これらのモノクローナル抗体は、いずれも当業者に周知の慣用方法によって製造することができる。

一方、この発明に使用することができるトリス緩衝剤としては、この発明の目的を適うものであればいずれも使用することができ、例えば、トリス(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール・トリス)、トリス-塩酸緩衝液(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンヒドロクロリド)(pH7.2-9.0)、トリス-マレイン酸緩衝液(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンマレエート)(pH5.2-8.6)などが挙げられる。また、この発明に使用できるトリス緩衝剤は、Good's buffer(グッドバッファ)に分類されるものであって、例えば、MES、Bis-tris、ADA、Bis-trisプロパン、PIPES、ACES、MOPSO、コラミンクロリド、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、HEPPS(EPPS)、Tricine、Bicine、グリシンアミドなどが挙げられる。

かかるトリス緩衝剤の使用濃度は、その種類などによって適宜変することができるが、例えば、トリス-塩酸緩衝液を使用する場合は、10mM~0.5Mの範囲であるのが好ましい。

この発明に係るアポB-48測定方法においては、界面活性剤を用いる必要はないが、所望により、界面活性剤を使用することもできる。かかる界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤が好ましく、トライトンX-100^{T M}、トライトンX-114^{T M}、ツイーン-20^{T M}、NP-40^{T M}などが例示される。これらの界面活性剤は、単独でも、または混合しても用いることができる。

かかる界面活性剤は、エピトープを露出させ易くするために用いるものであるが、一般に界面活性剤は免疫反応を阻害するので、エピトープの露出効果と免疫反応の阻害作用とのバランスによって使用濃度を適宜選択することができる。上記界面活性剤は、検体とモノクローナル抗体との免疫反応を行う際の溶液に共存させることもでき、通常0.01%~2%、好ましくは0.02%~0.5%の濃度で使用するのがよい。上記界面活性剤の処理温度および処理時間は、特に限定されるものではなく、例えば、通常4℃~40℃の温度で約5分~48時間の範囲であるのがよい。

なお、この発明においては、リポタンパク質のエピトープを露出させるために、検体を凍結融解を繰り返すことも可能であり、この凍結融解処理を行なう場合には、1回以上行うのがよい。

ここで、この発明に係るアポB-48測定方法について更に詳細に説明する。ただし、下記の説明は、この発明を限定するために記載するものではなく、この発明を具体的

に説明するための単なる例示であるものと理解すべきである。したがって、この発明は、下記説明に一切限定されるものではないと理解すべきである。

この発明のアポB-48測定方法は、例えば、検体をトリス緩衝剤で希釈し、この希釈検体を抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8) IgG精製品を固相化したプレートに添加して、その検体に含まれているアポB-48を結合させ、抗アポB-48/アポB-100-ビオチン標識抗体を結合させ、更にアビジン結合西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)を結合させた後、ELISA法によってアポB-48を測定することから構成されている。

このアポB-48測定方法では、まず、検体としての血清に、例えば、0.1Mトリス塩酸(pH7.8)を添加して血清サンプルを調製する。この血清サンプルを、抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8) IgG固相化96穴プレートに添加して、所定時間反応させて、血清サンプル中のアポB-48と抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8)とを結合させる。その後、抗アポB-48/B-100-ビオチン標識抗体を添加して、所定時間反応させて、上記標識抗体を結合させる。更に、アビジン結合HRPなどのアビジン結合パーオキシダーゼを反応させて、上記標識抗体に結合させる。その後、テトラメチルベンチジン(TMB)などの発色基質と反応させ、硫酸などの反応停止剤で反応停止させて、450nmでの発色吸光を測定する。

この発明に係るアポB-48測定方法は、ELISAによるイムノアッセイ法(抗原抗体反応を原理とした測定法)に基づいて実施するのが好ましいが、その他のイムノアッセイ法にも使用することができる。例えば、無標識沈降法(比濁法、比ろう法等)、固相法(ラテックス法、Surface Plasmon Resonance法、水晶発振子法等)、標識測定法(ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ法、発光イムノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法、金属標識イムノアッセイ法等)に応用できる。

この発明の別の態様であるアポB-48測定用キットは、上記抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8)などの抗アポB-48モノクローナル抗体と、トリス塩酸緩衝液などのトリス緩衝剤と、抗アポB-48/アポB-100-ビオチン標識抗体と、アビジン結合西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)などのアビジン結合パーオキシダーゼと、テトラメチルベンチジン(TMB)などの発色基質と、硫酸などの反応停止剤と、から構成されている。また、抗アポB-48モノクローナル抗体としては、抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8) IgG固相化96穴プレートなどが使用することができる。

以下、この発明を実施例によって更に説明するが、この発明は、下記実施例に一切限定されるものではなく、下記実施例は、この発明を更に具体的に例示して説明をする目的だけに記載するものと理解すべきである。

【実施例】

実施例1:

検体としての血清に、0.1Mトリス塩酸(pH7.8)を添加して測定用検体とした。一方、抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8) IgG固相化96穴プレートを洗浄用緩衝液で3回洗浄した。このプレートに、各ウエル当たりアポB-48標準品(160ng/ml-2.5ng/ml) 50 μ l並びに上記測定用検体50 μ lを添加した。このプレートを室温で1時間反応させ、検体中のアポB-48と抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8)とを結合させた。その後、洗浄用緩衝液で3回洗浄した。次に、この反応生成物に、抗アポB-48/B-100-ビオチン標識抗体(各ウエル当たり50 μ lづつ)を添加して、室温で1時間反応させ上記標識抗体を結合させた。その後、洗浄用緩衝液で3回洗浄した。更に、アビジン結合HRP(各ウエル当たり50 μ lづつ)を室温で30分間反応させて、上記標識抗体に結合させた。その後、テトラメチルベンチジン(TMB)(各ウエル当たり50 μ lづつ)を添加して、室温で30分間反応させて、1M硫酸(各ウエル当たり50 μ lづつ)を添加して反応停止させて、450nmでの発色吸光を測定した。その結果は下表1に示す。

実施例2

検体としての血清に、0.1%トリトン^{T M}X-100含有0.1Mトリス塩酸(pH

7. 8) を添加して測定用検体とした。一方、抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8) IgG固相化96穴プレートを洗浄用緩衝液で3回洗浄した。このプレートに、各ウエル当たりアポB-48標準品(160 ng/ml-2.5 ng/ml) 50 μl並びに上記測定用検体50 μlを添加した。このプレートを室温で1時間反応させ、検体中のアポB-48と抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8)とを結合させた。その後、洗浄用緩衝液で3回洗浄した。次に、この反応生成物に、抗アポB-48/B-100-ビオチン標識抗体(各ウエル当たり50 μlづつ)を添加して、室温で1時間反応させ上記標識抗体を結合させた。その後、洗浄用緩衝液で3回洗浄した。更に、アビジン結合HRP(各ウエル当たり50 μlづつ)を室温で30分間反応させて、上記標識抗体に結合させた。その後、テトラメチルベンチジン(TMB)(各ウエル当たり50 μlづつ)を添加して、室温で30分間反応させて、1M硫酸(各ウエル当たり50 μlづつ)を添加して反応停止させて、450 nmでの発色吸光を測定した。その結果は下表1に示す。

【表1】

表1:		(μg/ml)
緩衝剤	0.1M Tris-HCl pH7.8	0.1% triton X-100 含有 0.1M tris-HCl pH7.8
平均	1.64	1.70

実施例3:キット

この発明の別の態様であるアポB-48測定用キットは、次の構成を有している。

抗アポB-48モノクローナル抗体(4C8) IgG固相化96穴プレート

アポB-48標準品(検量線作製用抗原)

トリス塩酸緩衝液

抗アポB-48/AポB-100-ビオチン標識抗体

アビジン結合西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)

テトラメチルベンチジン(TMB)

硫酸

濃縮洗浄液

実施例4:

実施例1と同様にして、健常者の空腹時アポB-48の量を測定した結果を下表2に示す。

【表2】

表2:	
	アポB-48 (μg/ml)
平均	4.56

実施例5:

実施例1と同様にして、ポックリ病患者からの検体中のアポB-48の量を測定した結果を下表3に示す。

【表3】

表3:	
	アポB-48 (μg/ml)
平均	17.60

実施例6:

実施例1と同様にして、急性心筋梗塞患者からの検体中のアポB-48の量を測定した結果を下表4に示す。

【表 4】

表4:

	アポB-48 (µg/ml)
平均	30.97

発明の工業利用性

この発明のアポB-48測定方法は、検体中のアポB-48を正確に、迅速にかつ簡単に測定することができることから、高脂血症や動脈硬化症などの疾患の予防や治療に有用である。また、血液中のアポB-48を正確にかつ確実に測定することができることから、心冠動脈疾患の検査方法としても有効であり、また突然死（ポックリ病）の予防に役立つことが可能である。

10

更に、この発明は、血液中のアポB-48を増減させる高脂血症治療薬成分並びに機能性食品成分の効能評価法に応用できる。

【手続補正書】

【提出日】平成19年1月10日(2007.1.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体をトリス緩衝剤で希釈し、この希釈検体に抗アポB-48モノクローナル抗体を反応させてアポB-48を測定することを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項2】

請求項1に記載のアポB-48測定方法において、前記希釈検体に抗アポB-48モノクローナル抗体を反応させて前記検体中のアポB-48を結合させ、抗アポB-48/アポB-100-ビオチン標識抗体を添加して前記アポB-48に結合させた後、アビジン結合パーオキシダーゼとを反応させ、更に発色基質と反応させることによってアポB-48を測定することを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項3】

請求項1または2に記載のアポB-48測定方法において、前記トリス緩衝剤がトリス、トリス塩酸緩衝液、トリスマレイン酸緩衝液またはグッドバッファーであることを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項4】

請求項1ないし3のいずれか1項に記載のアポB-48測定方法において、前記希釈検体に界面活性剤が更に添加されていることを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項5】

請求項1ないし4のいずれか1項に記載のアポB-48測定方法において、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であることを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項6】

アポB-48測定用キットであって、トリス緩衝剤と抗アポB-48モノクローナル抗体とを含んでいることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項7】

請求項6に記載のアポB-48測定用キットにおいて、抗アポB-48/アポB-100-ビオチン標識抗体と、アビジン結合パーオキシダーゼと、発色基質とを更に含んでいることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項8】

請求項6または7に記載のアポB-48測定用キットにおいて、前記トリス緩衝剤がトリ

ス、トリス塩酸緩衝液、トリスマレイン酸緩衝液またはグッドバッファーであることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項9】

請求項6ないし8のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットにおいて、界面活性剤が更に含まれていることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項10】

請求項6ないし9のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットにおいて、前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤であることを特徴とするアポB-48測定用キット。

【請求項11】

請求項1ないし5のいずれか1項に記載のアポB-48測定方法および/または請求項6ないし10のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットを用いて、検体中のアポB-48を測定することを特徴とするアポB-48測定方法。

【請求項12】

請求項1ないし5のいずれか1項もしくは請求項11に記載のアポB-48測定方法および/または請求項6ないし10のいずれか1項に記載のアポB-48測定用キットを用いて、高脂血症治療薬成分並びに機能性食品成分の効能評価法。

【請求項13】

請求項1ないし5のいずれか1項に記載のアポB-48測定方法とアポB-48以外の他の測定項目を組みあせて同一検体で同一測定器により同時に多項目を測定することを特徴とする疾患分析法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2004/004434												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/53 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 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), JICST (JOIS)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Category*</th> <th style="width: 65%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>Julie A., LOVEGROVE, Quantitation of apolipoprotein B-48 in triacylglycerol-rich lipoproteins by a specific enzyme-linked sorbent assay, <i>Biochimica et Biophysica Acta</i>, 1996, Vol.1301, pages 221 to 229</td> <td style="text-align: center;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>Naohiko SAKAI, Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA, <i>Journal of Lipid Research</i>, 2003, Vol.44, No.6, pages 1256 to 1262</td> <td style="text-align: center;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>Andrew S., PEEL, A novel antiserum specific to apolipoprotein B-48: application in the investigation of postprandial lipidaemia in humans, <i>Clinical Science</i>, 1993, Vol.85, No.5, pages 521 to 524</td> <td style="text-align: center;">1-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	Julie A., LOVEGROVE, Quantitation of apolipoprotein B-48 in triacylglycerol-rich lipoproteins by a specific enzyme-linked sorbent assay, <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 1996, Vol.1301, pages 221 to 229	1-15	A	Naohiko SAKAI, Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA, <i>Journal of Lipid Research</i> , 2003, Vol.44, No.6, pages 1256 to 1262	1-15	A	Andrew S., PEEL, A novel antiserum specific to apolipoprotein B-48: application in the investigation of postprandial lipidaemia in humans, <i>Clinical Science</i> , 1993, Vol.85, No.5, pages 521 to 524	1-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	Julie A., LOVEGROVE, Quantitation of apolipoprotein B-48 in triacylglycerol-rich lipoproteins by a specific enzyme-linked sorbent assay, <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 1996, Vol.1301, pages 221 to 229	1-15												
A	Naohiko SAKAI, Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA, <i>Journal of Lipid Research</i> , 2003, Vol.44, No.6, pages 1256 to 1262	1-15												
A	Andrew S., PEEL, A novel antiserum specific to apolipoprotein B-48: application in the investigation of postprandial lipidaemia in humans, <i>Clinical Science</i> , 1993, Vol.85, No.5, pages 521 to 524	1-15												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 26 April, 2004 (26.04.04)		Date of mailing of the international search report 18 May, 2004 (18.05.04)												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004434

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 11-239479 A (Fujirebio Inc.), 07 September, 1999 (07.09.99), & EP 0911344 A & US 6309844 B	1-15
A	JP 61-7299 A (Daichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 13 January, 1986 (13.01.86), (Family: none)	1-15
A	JP 60-193927 A (President of The University of Tokyo), 02 October, 1985 (02.10.85), (Family: none)	1-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2004/004434	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ G01N33/53			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最下限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ G01N33/53			
最下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 1971-2004年			
日本国登録実用新案公報 1994-2004年			
日本国実用新案登録公報 1996-2004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)			
CA (STN)、JICST (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリ*	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	Julie A. LOVEGROVE, Quantitation of apolipoprotein B-48 in triacylglycerol-rich lipoproteins by a specific enzyme-linked immunosorbent assay, Biochimica et Biophysica Acta, 1996, Vol. 1301, P. 221-229	1-15	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 26. 04. 2004		国際調査報告の発送日 18. 5. 2004	
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) 山村 祥子	2 J 3312
		電話番号 03-3581-1101	内線 3251

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/004434

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	Naohiko SAKAI, Measurement of fast ing serum apoB-48 levels in normo lipidemic and hyperlipidemic subj ects by ELISA, Journal of Lipid Research, 2003, Vol. 44, No. 6, P. 1256-1262	1-15
A	Andrew S. PEEL, A novel antiserum specific to apolipoprotein B-48: application in the investigation of postprandial lipidaemia in hum ans, Clinical Science, 1993, Vol. 85, No. 5, P. 521-524	1-15
A	JP 11-239479 A (富士レビオ株式会社), 1999. 09. 07 & EP 0911344 A & US 6309844 B	1-15
A	JP 61-7299 A (第一化学薬品株式会社), 1986. 01. 13 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 60-193927 A (東京大学長), 1985. 10. 02 (ファミリーなし)	1-15

(注) この公表は、国際事務局（WIPO）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	测定载脂蛋白B-48的方法及其用途		
公开(公告)号	JPWO2005093415A1	公开(公告)日	2008-02-14
申请号	JP2006511376	申请日	2004-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	SHIBAYAGI		
申请(专利权)人(译)	株式会社シバヤギ		
[标]发明人	小島正章		
发明人	小島 正章		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/531 G01N21/78 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/92		
FI分类号	G01N33/53.W G01N33/535 G01N33/53.U G01N33/531.B G01N21/78.Z		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/EA06 2G054/GA03 2G054/GB01 2G054/GB05		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明是一种载脂蛋白方法，包括用Tris缓冲液和任选加入的表面活性剂稀释样品，并使稀释的样品与抗载脂蛋白B-48单克隆抗体反应以测量载脂蛋白B-48。提供一种B-48测量方法及其所用的载脂蛋白B-48测量试剂盒。结果，特别地，可以准确，快速且简单地测量血液中的载脂蛋白B-48。此外，本发明的apoB-48测定方法和/或用于其的apoB-48测定试剂盒用于诊断与apoB-48相关的疾病以及血液中增加或减少apoB-48的高脂血症。它也可以用于评估治疗药物成分和功能性食品成分的功效。

表 1

表 1:

($\mu\text{g/ml}$)

緩衝剤	0.1M Tris-HCl pH7.8	0.1% triton X-100 含有 0.1M tris-HCl pH7.8
平均	1.64	1.70