

(19)日本国特許庁（ J P ）

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 249128

(P2001 - 249128A)

(43)公開日 平成13年9月14日(2001.9.14)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D P W

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 3 数)

(21)出願番号 特願2000 - 60737(P2000 - 60737)

(22)出願日 平成12年3月6日(2000.3.6)

(71)出願人 000141875

株式会社いかがく

京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地

(72)発明者 内田 壱夫

京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地

株式会社いかがく内

(74)代理人 100085316

弁理士 福島 三雄 (外 2 名)

(54)【発明の名称】 動脈硬化症またはアルツハイマー病の診断用キット

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 動脈硬化症、アルツハイマー症の発症・進展に共通して深く関わる物質を明らかにし、これら疾患の新規な診断法を提供する。

【解決手段】 血液中のLp(a)と 2-マクログロブリン/インターロイキン6との複合体を測定対象にし、抗ヒト 2-マクログロブリン抗体および、抗ヒトLや(a)抗体を用いて免疫学的方法により測定することからなる動脈硬化症またはアルツハイマー病を診断する方法および、その診断用キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Lp(a)と 2-マクログロブリン/インターロイキン6との複合体を測定対象にする動脈硬化症またはアルツハイマー病を診断キット。

【請求項2】 Lp(a)中でアポ(a)遺伝子の5'領域中に存在する数カ所のインターロイキン6反応部位に結合した 2-マクログロブリン/インターロイキン6複合体を測定することによる請求項1に記載の診断用キット。

【請求項3】 酵素免疫法、イムノクロマト法、ラテックス凝集法などの免疫学的方法により、血液中のLp(a)と 2-マクログロブリン/インターロイキン6との複合体を測定することを特徴とする請求項1又は2に記載の診断用キット。

【請求項4】 デキストラン硫酸/Ca²⁺ + 沈澱法で得たVLDL、LDL、Lp(a)画分を試料として、血液中のLp(a)と 2-マクログロブリン/インターロイキン6との複合体を測定することを特徴とする請求項1又は2又は3に記載の診断用キット。

【請求項5】 抗ヒト 2-マクログロブリン抗体および、抗ヒトLp(a)抗体を用いることを特徴とする請求項3又は4に記載の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、血液中のLp(a)と 2-マクログロブリン(2M)/インターロイキン6(IL6)との複合体を測定することにより、動脈硬化症およびアルツハイマー病を診断するキットに関するものである。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】Lp(a)は1963年にBerg (Berg K. Acta Pathol Microbiol Scand, 59: 369-382, 1963)によって発見されたりポ蛋白で、動脈硬化発症・進展の危険因子とされてきた。即ち、動脈硬化性疾患の範疇である虚血性心疾患、脳血管障害、末梢動脈硬化症、家族性高コレステロール血症などで高値を示す。また、Lp(a)は急性相反応物質の一つであって、炎症などの急性相反応によって血中濃度が増加することはよく知られている。しかし、プロスペクティブな疫学調査では、多くの報告があるが、その半数は疾患群と健常群との間で有意差を認めないなど、動脈硬化症 = 高Lp(a)血症とは考えられず、なんらかの機序によってLp(a)濃度が上昇することが虚血性心疾患などの発症を規制していることが推測されている状況にある(野間昭夫. 動脈硬化, 24: 369-374, 1996)。

【0003】一方、2M/LDL受容体関連蛋白(2M/LRP)は、中枢神経系では神経細胞と一部のグリア細胞に発現していることが知られている。2M/LRPの主要なリガンドであるアポリポ蛋白E、2M、その他のプロテアーゼインヒビターとプロテアーゼの複合体などは、いずれも中枢神経系で生成され、とくにアルツハイマー病脳ではその生成が亢進していることが知られている(秋山

治彦, 他. 蛋白質 核酸酵素, 41: 1470-1475, 1996)。また、アルツハイマー病患者脳では老人斑への2Mの沈着が報告されている(Bauer, J. ET al. FHBS Lett, 285: 111-114, 1991)。

【0004】最近の疫学調査ではアルツハイマー病の発症の背景には動脈硬化症があることが指摘されており(Kalaria, RN. Pharmacol & Ther. 72: 193, 1996)、リポ蛋白の酸化変性やアポ蛋白Eの表現型と動脈硬化症やアルツハイマー病の発症との関連が注目されている(Prem Kumar, DRD. et al. Am J Pathol. 148: 2083, 1996)。現時点で考えうる可能性としては、活性酸素によりVLDLが酸化修飾されてヘパリン結合能を失い、難溶性の沈澱を形成することによって脂質過酸化物が血管や神経組織に蓄積し、細胞を傷害することが予想されている(中村和行, 他. Jpn J Electroph. 42: 27, 1998)。最近の一般的な考え方として、動脈硬化症の発症・進展に関わる原因物質として酸化LDLがクローズアップされているが、動脈硬化症とアルツハイマー病の発症・進展に共通する関与物質はいまだに不明である。したがって、本研究は、動脈硬化症、アルツハイマー症の発症・進展に共通して深く関わる物質を明らかにし、これら疾患の新規な診断法を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は上述の動脈硬化症およびアルツハイマー病の診断システムの新規開発が急務であるという要望に応える目的でなされたものであり、更に詳細には、上述の技術背景に鑑み鋭意研究を進めた結果、本発明は血液中にLp(a)/(2M-IL6)複合体が存在する事実を発見することによりなされたものである。

【0006】以下、本発明を詳しく説明する。アポ(a)遺伝子はプラスミノーゲン遺伝子、プラスミノーゲン関連遺伝子、肝細胞増殖因子遺伝子などとともにプラスミノーゲン・アポ(a)遺伝子ファミリーに属しており、第6染色体長腕のバンド26-27に隣接して存在することが知られている。また、5'領域においてWade (Wade DP, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 1369, 1993)らは、この領域中の数カ所にIL6に反応する部位が存在することを確認している。

【0007】一方、IL6は血液中の2Mと安定した複合体を形成して存在することが知られており、これらの諸事実から本発明は、血液中においてLp(a)/(2M/IL6)複合体の存在を予測し、研究を重ねた結果、Lp(a)/(2M/IL6)複合体は、Lp(a)(易酸化性で動脈硬化症惹起性リポ蛋白)、2M(この複合体中の2MはLDL受容体関連蛋白受容体:LRPのリガンドとなり得る)、IL6(炎症に関与する蛋白)で構成されていることから、上述の動脈硬化症発症・進展およびアルツハイマー病発症に関与する共通因子であるといえる。

【0008】なお典型的には、本発明は、抗ヒト 2マクログロブリン抗体を固相抗体として用い、Lp(a)/(2M/IL6) と反応させた後に、酵素をはじめとする標識物質をラベルした抗ヒトLp(a)抗体、もしくは抗ヒトアポB抗体を反応させて、血液中のLp(a)/(2M/IL6) 複合体を検出する方法である。この場合、血液中のリポ蛋白を超遠心法や化学物質を用いた沈澱法で分画したものを試料とすることが可能である。また、この検出の臨床応用としては、動脈硬化症やアルツハイマー病の早期診断に好適である。

【0009】

【実施例】以下、本発明について具体的に説明する。

[ELISAによる血液中のLp(a)/(2M/IL6) 複合体の検出法]

A. 試料の調製

1. デキストラン硫酸液 (0.05M CaCl₂) 1.5mlに、血清50μlを添加し、混和後室温に30分間放置する。
2. 3000rpmで15分間遠心し、上清をデカントで捨てる。
3. 250μlの2.5% NaCl液で沈澱を溶解する。この溶解液をELISAのサンプルとする。

【0010】B. ELISAの操作手順

1. 抗ヒト 2マクログロブリンポリクローナル抗体を0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH8.0緩衝液に5μg/mlで溶解し、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。
2. 4 下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1% ショ糖と牛血清アルブミン、0.05% アジ化ナトリウムを含む0.05M、pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100μl/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。
3. マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma Globulin とRabbit Gamma Globulin 含有1% BSA溶液を100μl/well分注し、これに試料あるいは標準液を50μl添加する。

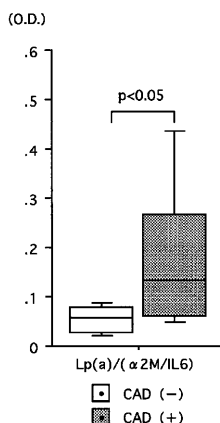
- *4. 室温下 1.5時間反応させる。
5. 0.005% Tween 20溶液250μl/wellで5回洗浄する。
- 【0011】6. ピオチン標識Fab´化抗ヒトLp(a)ポリクローナル抗体を1% BSA溶液で1.6μg/mlとし、100μl/well分注する。
7. 室温下 1.5時間反応させる。
8. 5. と同様、0.005% Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。
9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製) を1% カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100μl/well分注する。
10. 室温下 30分間反応させる。
11. 5. と同様、0.005% Tween20溶液250μl/wellで5回洗浄する。
12. 発色試薬を100μl/well分注し、室温下 30分間反応させる。
13. 1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応を停止する。
14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。
- 20 15. 人工的に調整したLp(a)/ 2マクログロブリン複合体により求めた検量線から試料中の複合体濃度を算出する。

【0012】 [冠動脈疾患における血中Lp(a)/(2M/IL6) 複合体濃度] 冠動脈造影検査により、1segmentに50%以上の有意狭窄病変を有するものを動脈硬化症と定め、これに基づき冠動脈硬化症と診断された患者、CAD (+) 群 (n=30)、健常者群、CAD (-) 群 (n=30) を対象に、血中Lp(a)/(2M/IL6) 複合体を測定し、比較検討したところ、CAD (+) 群が有意な高値を示した (図1)。

【図面の簡単な説明】

【図1】冠動脈硬化症における血中のLp(a)/(2M/IL6) 濃度を図示したものである。

【図1】



冠動脈硬化症における血中のLp(a)/(α2M/IL6) 濃度

专利名称(译)	用于动脉硬化或阿尔茨海默病的诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP2001249128A	公开(公告)日	2001-09-14
申请号	JP2000060737	申请日	2000-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	IKAGAKU		
申请(专利权)人(译)	株式会社いかがく		
[标]发明人	内田 壹夫		
发明人	内田 壹夫		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.P G01N33/53.W		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 要解决的问题: 澄清与动脉硬化和阿尔茨海默病的发作和发展密切相关的物质, 并为这些疾病提供新颖的诊断方法。 解决方案: 血液中的Lp(a)与 α 2-巨球蛋白/白介素6的复合物用作检测目标, 并用抗人 α 2-巨球蛋白抗体和抗人L或(a)抗体免疫。 诊断动脉硬化或阿尔茨海默病的方法, 其包括通过生物学方法进行测量, 以及用于该方法的诊断试剂盒。

