

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/107398

発行日 平成23年6月30日(2011.6.30)

(43) 国際公開日 平成21年9月3日(2009.9.3)

(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	B 2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	A 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

出願番号	特願2010-500577 (P2010-500577)	(71) 出願人	390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/000903	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(22) 国際出願日	平成21年2月27日(2009.2.27)	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(31) 優先権主張番号	特願2008-49198 (P2008-49198)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(32) 優先日	平成20年2月29日(2008.2.29)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子量アディポネクチンの測定方法

(57) 【要約】

多量体アディポネクチンの中で、高活性型であるHMWアディポネクチンを分別測定する方法を提供する。

プロテアーゼを使用して多量体アディポネクチンを分別して免疫学的に測定する方法であって、多量体アディポネクチンを含む試料に、キモトリプシンを作用させることを特徴とする、試料中の高分子量アディポネクチンの測定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテアーゼを使用して多量体アディポネクチンを分別して免疫学的に測定する方法であって、多量体アディポネクチンを含む試料に、キモトリプシンを作用させることを特徴とする、試料中の高分子量アディポネクチンの測定方法。

【請求項 2】

試料が、ヒト、マウス又はラットの血清又は血漿である、請求項 1 項に記載の測定方法

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、生体試料中に含まれる多量体アディポネクチンの内、高分子量（HMW）画分を分別して免疫学的に測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アディポネクチンは、脂肪組織特異的に産生、分泌され、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用を有するホルモンで、血中に比較的豊富に存在する。近年、肥満を伴う、特に内臓脂肪の蓄積による低アディポネクチン血症は、糖尿病、動脈硬化性疾患や高血圧の発症につながると考えられている。

【0003】

20

アディポネクチンは、構造上 C1q（Complement 1q）ファミリーに属し、C1qファミリーの特徴であるコラーゲン様ドメインを有していることから、3量体を基本とした多量体を形成して存在していることが報告されている。最近、本発明者らにより、ヒト血中に存在する多量体アディポネクチンの形態（アルブミン結合型を含む3量体、6量体及びHMW画分）が解明され、さらに糖の取り込みや脂肪酸燃焼を促進するAMPK（adenosine monophosphate activated protein kinase）のリン酸化を指標とした多量体アディポネクチンの活性化作用においては、HMW型が最も高い活性を示すことも報告した（非特許文献1）。加えて、ヒト由来多量体アディポネクチンを含む生体試料に、ある種のプロテアーゼを作用させることにより、測定対象以外の画分を選択的に消化し、残存するアディポネクチンを免疫学的に測定することによって、直接HMWアディポネクチン濃度を、又間接的には3量体や6量体画分をそれぞれ分別測定する方法を開示した（特許文献1、非特許文献2）。

30

【0004】

さらに、本分別測定系を利用した糖尿病及び冠動脈疾患群における多量体アディポネクチンの臨床研究では、インスリン抵抗性やメタボリックシンドロームの予知指標として、トータル濃度に占めるHMWアディポネクチンの比率（HMWR）がトータル濃度以上に、感度・特異性が高いという知見を報告している（非特許文献3）。従って、トータル濃度のみならず、各分画を分別測定する臨床的有用性について期待されている。

【0005】

一方、メタボリックシンドローム関連疾病（糖尿病、高血圧、高脂血症）の治療薬の中には、アディポネクチンを増加させる作用を有するものがあり、注目されている。例えば、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体は、HMWアディポネクチンを増加させることが報告されている（非特許文献4）。その他では、最近降圧剤のアンジオテンシン受容体拮抗薬に分類されるある薬剤や、高脂血症治療薬の一部の薬剤でも、アディポネクチン増加作用を有することが報告され（非特許文献5）、メタボリックシンドロームを呈する疾患群に高頻度に認められるインスリン抵抗性に対して、改善が期待されている。

40

【0006】

このように、メタボリックシンドローム関連疾病に対する薬剤開発において、アディポネクチン増加作用を有することは、有用な付加価値である。さらに、薬剤開発のみならず、健康食品分野においても注目されており、このアディポネクチン増強作用を有する機能

50

性食品の探索も精力的に行われている。

【0007】

薬剤や機能性食品の効能効果は、通常まずマウスやラット等の実験動物を用いて行われるが、アディポネクチン増加作用に関しても、実験動物の血中アディポネクチン濃度の変化を指標として利用することは有用である（例えば、特許文献2，3）。マウスやラットのアディポネクチン濃度は、既に測定キットとして市販されており入手可能であるが、単に総量を測定するのみで、多量体アディポネクチンを分別できるものではなく、特に高活性型であるHMWアディポネクチンを分別して測定する方法が要望されていた。

【0008】

本発明者らは、ヒト生体試料中に存在する多量体アディポネクチンに対して、特定のプロテアーゼを作用させることで、多量体アディポネクチンの分別測定方法を見出しているが（特許文献1、非特許文献2）、興味深いことに、この時利用したプロテアーゼを、マウス由来の多量体アディポネクチンの分別測定への適用を試みた場合、特にHMW画分の正確な測定には適さないことが判明した。

【0009】

一方、Pajvaniらは、組換え発現させたマウス由来アディポネクチンを用いて、トリプシンの消化特異性を報告しているが、低分子量画分（LMW）は消化するものの、中分子量画分（MMW）やHMW画分は消化されないことが示されており、HMWアディポネクチンの分別測定には不向きである（非特許文献6）。

【先行技術文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開 WO2005/038457 公報

【特許文献2】特開2005-232150号公報

【特許文献3】特開2006-56836号公報

【非特許文献1】Hada Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:487-493, 2007.

【非特許文献2】Ebinuma H, et al. *Clinica Chimica Acta.* 372:47-53, 2006.

【非特許文献3】Hara K, et al. *Diabetes Care.* 29:1357-1362, 2006.

【非特許文献4】Tsuchida A, et al. *Diabetes.* 54:3358-3370, 2005.

【非特許文献5】Nakano S, et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:1213-1222, 2007.

【非特許文献6】Pajvani UB, et al. *J Biol Chem.* 278:9073-85, 2003.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、多量体アディポネクチンの中で、高活性型であるHMWアディポネクチンを分別測定する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意研究したところ、多量体アディポネクチンを含有する試料に対して、種々のプロテアーゼのうち、キモトリプシンを作用させることによって、マウスやラット等においてもHMW画分以外のアディポネクチンを選択的に消化しうること、及びキモトリプシンによる消化処理の後、残ったHMWアディポネクチンを、免疫学的に測定すれば、HMWアディポネクチンが分別測定できることを見出した。

【0013】

すなわち、本発明は、プロテアーゼを使用して多量体アディポネクチンを分別して免疫

学的に測定する方法であって、多量体アディポネクチンを含む試料にキモトリプシンを作用させることを特徴とする、試料中のHMWアディポネクチンの分別測定方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、ヒトだけでなく、マウスやラット等の多量体アディポネクチンの内、HMWアディポネクチンを分別して測定できることから、開発された薬剤や機能性食品等のアディポネクチン増強作用を、より正確に評価することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】キモトリプシンのマウス由来多量体アディポネクチンに対する消化特異性を示す図である。

【図2】キモトリプシンのラット由来多量体アディポネクチンに対する消化特異性を示す図である。

【図3】トリプシンのマウス、ラット及びヒト由来多量体アディポネクチンに対する消化特異性を示す図である。Aはマウス血清、Bはラット血清、Cはヒト血清である。

【図4】プロテイナーゼKのヒト及びマウス由来多量体アディポネクチンに対する消化特異性を示す図である。Aはヒト血清、Bはマウス血清である。

【図5】キモトリプシンのヒト由来多量体アディポネクチンに対する消化特異性を示す図である。

【図6】ゲル濾過分離検出法によるマウス高分子量アディポネクチンの測定結果を示す図である。

【図7】ELISA測定とゲル濾過分離検出法との相関性を示す図である。

【図8】キモトリプシン処理法とプロテイナーゼK処理法におけるヒト由来高分子量アディポネクチン測定結果の相関性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明において使用できる試料としては、哺乳類由来多量体アディポネクチンを含有するものであればすべて対象となり、哺乳類から得られた血液、尿などの体液、組織抽出液や組織由来の細胞の培養上清液などが挙げられる。ここで、哺乳類としては、マウスやラット等のげっ歯類、及びヒト等が挙げられる。これらのうち、開発された薬剤や機能性食品等のアディポネクチン増強作用を、より正確に評価するための試料としては、マウス又はラットの血液（血清、血漿）、特にマウスの血液が好適である。また、糖尿病等の診断のための試料としてはヒトの血液（血清、血漿）が好適である。

【0017】

HMWアディポネクチンを分別して免疫測定するための方法について説明する。多量体アディポネクチンが含まれる試料にキモトリプシンを作用させ、HMW画分以外のアディポネクチンを消化し、キモトリプシンによる消化処理の後、残ったHMWアディポネクチンを、抗アディポネクチン抗体を用いて免疫学的に測定する。本発明に使用されるキモトリプシンは、精製されたものが市販品として入手されるが、本発明が成り立つ程度に粗精製されたものも利用できる。又、遺伝子組換え技術により得られたものであっても差し支えない。またキモトリプシン活性を有する限り、化学修飾を施されていてもよい。

【0018】

生体試料のキモトリプシンによる処理は、リン酸、トリス、グッド等の緩衝液中、4～60℃で、好ましくは4～45℃で5分～24時間行うことが好ましい。キモトリプシンの使用濃度は、反応温度及び反応時間等を考慮して決定されるが、概ね0.1～1000 u/mLの範囲で使用され、さらに好ましくは、1～100 u/mLの範囲で使用される。キモトリプシン処理におけるキモトリプシンの使用濃度、反応温度、及び反応時間は、試料の動物種によって相違するため、予備試験により試料中のHMWアディポネクチンだけを消化しない条件を確認しておくのが好ましい。ここでいうキモトリプシンの活性（u

10

20

30

40

50

)は、pH 7.8の条件下25℃で、N-ベンゾイル-L-チロシンエチルエステル (BTEE)が、1分間当たり1 μ mol加水分解される量を示す。

【0019】

キモトリプシンにより前処理された試料中の多量体アディポネクチンは、キモトリプシン消化によりHMWアディポネクチンが残存するので、当該試料中のアディポネクチン濃度を抗アディポネクチン抗体を用いる免疫測定を行えば、HMWアディポネクチンのみが分別測定できる。従って、キモトリプシン処理された試料の免疫学的測定は、抗アディポネクチン抗体を用いる通常の手段によって行うことができる。

【0020】

試料をキモトリプシンで処理し、残存するHMWアディポネクチンを測定するための抗体としてはアディポネクチンを認識する抗体を使用することができる。抗アディポネクチン抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれも利用でき、公知の手法によって適当な動物に免疫して得ることができるが、市販品として入手することも可能であり、本発明に使用できる。例えば、抗マウスアディポネクチン抗体は、「Anti-mouse Adiponectin monoclonal antibody」や「Anti-mouse Adiponectin polyclonal antibody, Goat」(R&D Systems社)、「Anti-mouse Adiponectin, mAd (MADI04)」(AdipoGen社)、「Anti-mouse Adiponectin monoclonal antibody」(CHEMICON社)などが挙げられ、抗ラットアディポネクチン抗体は、「Anti-rat Adiponectin polyclonal antibody, Goat」(R&D Systems社)、「Anti-rat Adiponectin monoclonal antibody」や「Anti-rat Adiponectin polyclonal antibody, Rabbit」(CHEMICON社)などが挙げられる。抗ヒトアディポネクチン抗体としては、Goat α human Acrp30 antibody (コスモバイオ社、GT社)、rabbit α hu adiponectin-PoAb (コスモバイオ社、chemicon社)、hu Acrp30-MoAb (藤沢薬品工業社、BD社)、Mouse α hu Adiponectin MoAb (コスモバイオ社、chemicon社)、抗ヒトACRP30モノクローナル抗体 (AX773、AX741、Ne, Na、和光純薬工業社)などが挙げられる。これらの抗体は、それぞれ単独又は適宜組み合わせで使用することができる。また、市販のアディポネクチン総量を測定するキットも使用することも可能となる。他に、生体試料を、還元剤、酸又はその塩、界面活性剤及びキモトリプシン以外のプロテアーゼの内の少なくとも一つ若しくは二つ以上の組み合わせをアディポネクチンに作用させ、多量体アディポネクチンを一定の形態に変換させて免疫学的に測定する本発明者らの開発した方法 (WO2005/038458)も利用できる。

【0021】

本発明の免疫学的測定方法としては、アディポネクチンに対して特異的に結合する抗体を不溶性担体に結合させ、それによってアディポネクチンを捕捉し、試料中に存在するアディポネクチンの有無の確認 (定性) 又は定量する方法が使用される。なかでも、L T I A (ラテックス免疫比濁法)、E L I S A (酵素免疫測定法)、C L E I A (化学発光酵素免疫測定法)、R I A (ラジオイムノアッセイ) などと言った方法が挙げられる。このうち、L T I Aはアディポネクチンと特異的に結合する抗体を担持させた不溶性担体と、予めキモトリプシンを作用させ残存するHMWアディポネクチンとを混合することにより、アディポネクチンを介した不溶性担体の架橋 (凝集) が起こり、その結果生じる濁りを光学的に測定することでアディポネクチンの有無の確認 (定性) 又は定量する方法であり、HMWアディポネクチンを簡便、迅速かつ正確に測定するのに好ましい。

【0022】

本発明に使用される不溶性担体としては、通常免疫学的測定試薬に使用され工業的に大量生産可能な有機系の不溶性担体を使用される。L T I Aにおいては抗体の吸着性に優

れかつ生物学的活性を長期間安定的に保持できるポリスチレン系のラテックス粒子やE L I S Aにおいてはポリスチレンなどの96穴のマイクロプレートが好ましい。

【0023】

上記不溶性担体の表面に抗体を担持させる手法は種々知られており、本発明において適宜利用できる。例えば、担持（感作）方法として不溶性担体表面に抗体を物理的に吸着させる方法や、官能基を有する不溶性担体表面に既知の方法である物理結合法や化学結合法により抗体を効率的に感作する方法が挙げられる。

【0024】

抗体を担持させた抗体不溶性担体とアディポネクチンとの反応は、抗原抗体反応が起こり得る条件であれば、その反応条件は特に限定されない。反応液としては、アディポネクチンとの抗原抗体反応が起こり得る溶液であればどのようなものでも良い。例えば、pHを制御するためのリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液などの緩衝成分、非特異反応を回避するための界面活性剤や塩化ナトリウムなど、安定化剤としてのウシ血清アルブミン、ショ糖、高分子多糖類など、反応性を制御する前記物質の他にデキストランなどの水溶性多糖類、還元剤や酸の中和剤、プロテアーゼの不活性化剤などの添加剤を適宜溶解させても良い。

【0025】

前記したL T I AやE L I S Aにおける検出方法としては、次の方法が挙げられる。L T I Aにおける不溶性担体の凝集程度を測定する方法は特に限定されないが、例えば、凝集を定性的ないし半定量的に測定する場合は、既知濃度試料の濁度程度と測定試料の濁度程度との比較から、凝集の程度を目視によって判定することも可能である。また、該凝集を定量的に測定する場合は、簡便性及び精度の点からは、光学的に測定することが好ましい。凝集の光学的測定法としては、公知の方法が利用可能である。より具体的には、例えば、いわゆる比濁法（凝集塊の形成を濁度の増加として捕らえる）、粒度分布による測定法（凝集塊の形成を粒度分布ないしは平均粒径の変化として捕らえる）、積分球濁度法（凝集塊の形成による前方散乱光の変化を積分球を用いて測定し、透過光強度との比を比較する）などの種々の方式が利用可能である。E L I S Aにおける酵素標識抗体の酵素活性に由来する、基質と酵素の反応生成物を測定する方法は特に限定されない。例えば、酵素反応生成物固有の波長、例えばH R P標識抗体の酵素活性を基質としてオルトフェニレンジアミン塩酸塩と過酸化水素を用いて検出する場合などでは、492 nmにおける吸光度として96穴マイクロプレートリーダーで読み取ることが可能である。

【0026】

さらにまた、生体試料を、キモトリプシン処理しない場合は、アディポネクチンの総量が測定されることから、キモトリプシンを処理することで算出されるHMWアディポネクチンの比率を簡単に求めることもできる。

【実施例】

【0027】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

【0028】

実施例1 マウス血清中の多量体アディポネクチンに対する消化特異性

マウス血清10 μ Lに、 α -キモトリプシン（Type I-S；No. C7762，シグマアルドリッチ社）を10 u/mLとなるよう、50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解した酵素液を100 μ L加え、37°Cで20分間加温した。その反応液に、BSA-PBST（1% ウシ血清アルブミン及び0.05% Tween 20を含む20 mMリン酸緩衝液，pH 7.2）を、400 μ L加えた後、全量をSuperdex 200（GEヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて、ゲルろ過クロマトグラフィーを実施した。溶離液には、PBS（20 mMリン酸緩衝液，pH 7.2）を用いて、1 mLずつ分取した。対照として、上記条件でキモトリプシンを含まない以外は、同様の条件でゲルろ過クロマトグラフィーを実施したフラクションを用意した。

10

20

30

40

50

【0029】

各フラクション中のアディポネクチンの検出は、次の通りに行った。Anti-mouse Adiponectin monoclonal antibody (R&D Systems社)をPBSで $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した後、ELISA用プレートに1ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ を添加し、一晚感作した。PBST (0.05% Tween 20を含むPBS液, pH 7.4)でプレートを洗浄後、BSA-PBSTを $100 \mu\text{L}$ 添加しブロッキングした。続いて、各フラクションをBSA-PBSTで2倍希釈したものを $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBSTでプレートを洗浄後、BSA-PBSTで $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したGoat anti-mouse Adiponectin polyclonal antibody (R&D Systems社)を $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBSTでプレートを洗浄後、BSA-PBSTで1/2000倍希釈したRabbit anti-goat Ig' s HRP標識抗体液 (DAKO社)を $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBSTでプレートを洗浄後、基質液 ($2 \text{mg}/\text{mL}$ オルトフェニレンジアミン塩酸塩、0.02% 過酸化水素を含む、 250mM クエン酸緩衝液、pH 5.0)を $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で10分間反応させ、停止液 (1.5N 硫酸、 1mM EDTA-2Na)を $50 \mu\text{L}$ 添加し反応を停止させた後、 492nm の吸収を測定した。測定結果を図1に示した。

10

【0030】

キモトリプシン消化処理を実施していない場合では、マウス血清中の多量体アディポネクチンは、3つのピークに分離された。一方、マウス血清をキモトリプシンで処理した場合は、アルブミン結合型 (A1b-) LMWを含むMMWアディポネクチン溶出ピーク (2番目) やLMWアディポネクチン溶出ピーク (3番目) は消えたのに対し、HMWアディポネクチン溶出ピーク (1番目) は残存していた。この結果より、マウス由来多量体アディポネクチンを含む試料に、キモトリプシンを作用させることで、HMWアディポネクチンのみを消化せずに残存させることができることから、この処理液中のアディポネクチンを測定することによって、HMWアディポネクチンの濃度が算出される。

20

【0031】

実施例2 ラット血清中の多量体アディポネクチンに対する消化特異性

ラット血清 $50 \mu\text{L}$ に、 α -キモトリプシン (Type I-S; No. C7762, シグマアルドリッチ社)を $100 \text{u}/\text{mL}$ となるよう、 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した酵素液を $100 \mu\text{L}$ 加え、 37°C で20分間加温した。その反応液に、BSA-PBSTを、 $400 \mu\text{L}$ 加えた後、全量をSuperdex 200 (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いて、ゲルろ過クロマトグラフィーを実施した。溶離液には、PBSを用いて、 1mL ずつ分取した。対照として、上記条件でキモトリプシンを含まない以外は、同様の条件でゲルろ過クロマトグラフィーを実施したフラクションを用意した。

30

【0032】

各フラクション中のアディポネクチンの検出は、次の通りに行った。Goat anti-rat Adiponectin polyclonal antibody (R&D Systems社)をPBSで $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した後、ELISA用プレートに1ウェルあたり $50 \mu\text{L}$ を添加し、一晚感作した。PBSTでプレートを洗浄後、BSA-PBSTを $100 \mu\text{L}$ 添加しブロッキングした。続いて、各フラクションをBSA-PBSTで2倍希釈したものを $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBSTでプレートを洗浄後、BSA-PBSTで $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したRabbit anti-mouse globular Adiponectin polyclonal antibody (WO2005-038457)を $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBSTでプレートを洗浄後、BSA-PBSTで1/2000倍希釈したGoat anti-rabbit Ig' s HRP標識抗体液 (BIOSOURCE社)を $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBSTでプレートを洗浄後、基質液 ($2 \text{mg}/\text{mL}$ オルトフェニレンジアミン塩酸塩、0.02% 過酸化水素を含む、 250mM

40

50

クエン酸緩衝液、pH 5.0)を50 μ L添加し、室温で10分間反応させ、停止液(1.5 N硫酸、1 mM EDTA-2Na)を50 μ L添加し反応を停止させた後、492 nmの吸収を測定した。測定結果を図2に示した。

【0033】

キモトリプシン消化処理を実施していない場合では、ラット血清中の多量体アディポネクチンは、2つのピークに分離されたが、HMWアディポネクチンを示す溶出ピーク(1番目)は非常に少なかった。ラット血清をキモトリプシンで処理した場合は、アルブミン結合型(A1b-)LMWを含むMMWアディポネクチン溶出ピーク(2番目)は消失したのに対し、HMWアディポネクチン溶出ピーク(1番目)は残存していた。この結果より、ラット由来多量体アディポネクチンを含む試料に、キモトリプシンを作用させることで、HMWアディポネクチンのみを消化せずに残存させることができることから、この処理液中のアディポネクチンを測定することによって、HMWアディポネクチンの濃度が算出される。

10

【0034】

参考例1 トリプシンを用いた多量体アディポネクチンの消化特異性

マウス血清、ラット血清及びヒト血清それぞれ10 μ Lに、トリプシン(No. T1426, シグマアルドリッチ社)を0~50 u/mLとなるよう、50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解した酵素液を100 μ L加え、37°Cで20分間加温した。その反応液に、BSA-PBSTを、400 μ L加えた。その一部を非変性系のポリアクリルアミド電気泳動(native-PAGE)で分離後、セミドライブロッキングによりPVDF膜に転写後、免疫染色を行なった。手順は、転写膜をBSA-PBSTでブロッキング後、PBSTで洗浄し、Goat anti-mouse Adiponectin polyclonal antibody (R&D systems社) 0.1 μ g/mLを室温で1時間反応させた。PBSTで十分に洗浄した後、Vector ABC kit (Goat)及びDAB基質キット(フナコシ社)を用いて発色させた。各血清の免疫染色結果は、図3(A:マウス、B:ラット、C:ヒト)に示した。

20

【0035】

トリプシン活性が0 u/mLの場合は、凡そ泳動距離の短い方から、HMW画分、6量体(MMW)画分、アルブミン結合3量体(A1b-LMW)を含む3量体画分(LMW)に分離された(ラット血清は、MMW画分が主で、HMWやLMW画分は少なく明確な染色バンドとしては見えていない)。10~50 u/mLトリプシン活性での消化後では、LMW画分は消化されているが、MMWやHMW画分は消化できていないことが観察された。この結果より、トリプシンは、動物血清中のHMWアディポネクチンの分別消化測定には利用できないことが判明した。

30

【0036】

参考例2 プロテイナーゼKを用いた多量体アディポネクチンの消化特異性

参考例1の方法に準じて、プロテイナーゼを7.5 u/mLのプロテイナーゼKに変えて、ヒト又はマウス血清の消化を行い、その反応液の一部を免疫染色した(図4、A:ヒト、B:マウス)。

【0037】

ヒト血清では、HMW画分のみが消化されずに残存しているが、マウス血清では、HMW画分を含むすべての画分が消化されているのが観察された。この結果より、プロテイナーゼKは、マウス血清中のHMWアディポネクチンの分別消化測定には利用できないことが判明した。

40

【0038】

実施例3 ヒト血清中の多量体アディポネクチンに対する消化特異性

ヒト血清10 μ Lに、キモトリプシン(Type II; No. C4129, シグマアルドリッチ社)を0~100 u/mLとなるよう、50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解した酵素液を100 μ L加え、37°Cで20分間又は60分間加温した。その反応液に、BSA-PBSTを、400 μ L加えた。その一部を非変性系のポリアクリル

50

アミド電気泳動 (native-PAGE) で分離後、セミドライブロットティングにより PVDF 膜に転写後、免疫染色を行なった。手順は、転写膜を BSA-PBST でブロッキング後、PBST で洗浄し、Goat anti-human Adiponectin polyclonal antibody (R&D systems 社) $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を室温で 1 時間反応させた。PBST で十分に洗浄した後、Vector ABC kit (Goat) 及び DAB 基質キット (フナコシ社) を用いて発色させた。各血清の免疫染色結果は、図 5 に示した。

【0039】

キモトリプシン消化時間が 20 分間の場合は、 $25 \text{ u}/\text{mL}$ 濃度でも MMW 以下の画分が若干残るが、 $50 \sim 100 \text{ u}/\text{mL}$ 濃度では、HMW のみ残存していた。一方、消化時間が 60 分間の場合は、 $10 \text{ u}/\text{mL}$ 濃度では、消化はほとんど進んでいないが、 $25 \sim 50 \text{ u}/\text{mL}$ 濃度では、HMW のみ残存していた。一方、 $100 \text{ u}/\text{mL}$ では HMW を含むすべての画分が消化された。

10

【0040】

参考例 3 マウス血清由来多量体アディポネクチン (Ms-mAd) の精製

抗マウスグロブラーアディポネクチン抗体結合樹脂 (WO2005-038457) に、マウス血清 180 mL をに添加し、 0.5 M NaCl を含む 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) で十分量洗浄した後、さらに 0.5 M NaCl を含む 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で洗浄した。次に、 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.5) でマウスアディポネクチン画分を溶出し、溶出画分に 2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を $1/10$ 量添加して中和した。さらに、中和した溶出画分を、Protein A 樹脂に添加し、Protein A 樹脂への非吸着画分を精製 Ms-mAd として回収し、PBS にて透析後、「マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット」(大塚製薬社) によりアディポネクチン含量を測定した。

20

【0041】

参考例 4 抗マウスアディポネクチンラットモノクローナル抗体の作製

参考例 3 で得た精製 Ms-mAd $50 \mu\text{g}$ を等量のフロイドのコンプリートアジュバントと混合して、ラット (F344/Jc1) に 2 週間おきに 2 回免疫を行った後、免疫したラットより脾臓並びにリンパ節細胞を摘出し、ポリエチレングリコールを用いた常法により、sp2/0 ミエロマ細胞と細胞融合を行った。抗マウスアディポネクチンモノクローナル抗体産生融合細胞の選択は、ELISA 法によりリコンビナントマウスアディポネクチン (rMs-Ad) (BioVendor 社) と反応性が高いウエルを選択し、ついで限界希釈法にて選択する常法により行なった。抗マウスアディポネクチンモノクローナル抗体は、選択した融合細胞をプリスタン処理したヌードマウス腹腔内に投与し腹水として回収した。腹水からの特異抗体 (IgG) の精製は、 50% 飽和硫酸沈殿を回収し、 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて透析した後、DEAE イオン交換樹脂 (東ソー社) に添加し、NaCl の濃度変動 ($0 \sim 200 \text{ mM}$) によるグラジエント溶出により、精製 IgG を得た (MoAb83201R)。

30

【0042】

参考例 5 抗マウスアディポネクチンウサギポリクローナル抗体の作製及びビオチン標識

参考例 3 で調製した精製 Ms-mAd $120 \mu\text{g}$ を等量のフロイドのコンプリートアジュバントと混合して、ウサギに 2 週間おきに 5 回免疫して、抗血清を作製した。抗血清中の特異抗体 (IgG) の精製は、メロンゲル (Melon Gel) (ピアス社) を用いて常法により行なった。さらに、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (ピアス社) を精製 IgG に混ぜ、ビオチン標識を実施した (Biotinylated PoAb)。

40

【0043】

実施例 4 マウスアディポネクチン総量及び HMW の ELISA 測定とゲル濾過分離検出法との比較

1-1) 検体の前処理

50

HMW測定用：マウス血清（ $n = 10$ ） $10 \mu\text{L}$ に、キモトリプシン $35 \text{ u}/\text{mL}$ を含むプロテアーゼ溶解液（ 50 mM トリス塩酸緩衝液、 $\text{pH} 8.0$ ） $100 \mu\text{L}$ を加え、 37°C で20分間加温した。さらに、検体処理液（ 100 mM ほう酸緩衝液、 $\text{pH} 11.0$ ）を $700 \mu\text{L}$ 加えたものを、HMW測定用の処理検体液とした。

総量測定用：マウス血清 $10 \mu\text{L}$ に、キモトリプシンを含まないプロテアーゼ溶解液 $100 \mu\text{L}$ を加え、さらに、検体処理液を $700 \mu\text{L}$ 加えたものを、総量測定用の処理検体液とした。

【0044】

1-2) ELISA測定

ELISA用プレートに参考例4で作製した抗マウスアディポネクチンモノクローナル抗体（83201R）をPBSで $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した後、感作した。次に、BSA-PBSTでブロッキング後、それぞれの処理検体液を、さらにBSA-PBSTにて101倍希釈した希釈検体液をプレートに $50 \mu\text{L}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBSでプレートを洗浄後、参考例5で作製したビオチン標識抗マウスアディポネクチンポリクローナル（Biotinylated PoAb） $50 \mu\text{L}$ を加え、室温で1時間反応させた。PBSTでプレートを洗浄し、さらに、BSA-PBSTで2000倍希釈したHRP-Avidinを添加し、室温で30分間反応させた。PBSTでプレートを洗浄し、OPD発色液（ $2 \text{ mg}/\text{mL}$ オルトフェニレンジアミン塩酸塩、 0.02% 過酸化水素を含む、 250 mM クエン酸緩衝液、 $\text{pH} 5.0$ ）により発色させ、停止液（ 1.5 N 硫酸、 1 mM EDTA-2Na）を添加して反応を停止させた後、 492 nm の吸収を測定した。標準品としてリコンビナントマウスアディポネクチン（rMs-Ad）を標準品として用いて、検体中のアディポネクチン濃度の算出を行った。

【0045】

2) ゲル濾過分離検出法

上記1-1)と同じマウス血清（ $n = 10$ ）それぞれ $50 \mu\text{L}$ 分に対して、実施例1と同じ条件で、ゲルろ過クロマトグラフィーを実施し、フラクションを用意した。各フラクション中のアディポネクチンの検出は、BSA-PBSTにより21倍希釈した後、上記1-2)のELISA測定に従って実施した（図6）。

【0046】

3) 総量に対するHMWの割合値（HMWR）の比較

1-2)で求められたHMW及び総量濃度から、HMWRを算出した。一方、2)で検出された3つのアディポネクチン溶出ピークの中で、最初のピークがHMWに相当することから、そのフラクション濃度の合計を、アディポネクチン全フラクションの合計濃度で除することでHMWRを算出した。各々のHMWRを比較した結果、両法での検出には、極めて強い相関性が得られ、かつHMWR値もほぼ一致した（図7）。この結果から、本発明のキモトリプシンを用いて、検体処理することにより、非常に簡単に正確なマウスHMWアディポネクチンの測定が可能であることが言える。

【0047】

実施例5 ヒト血清中のHMWアディポネクチン分別測定へのキモトリプシンの利用

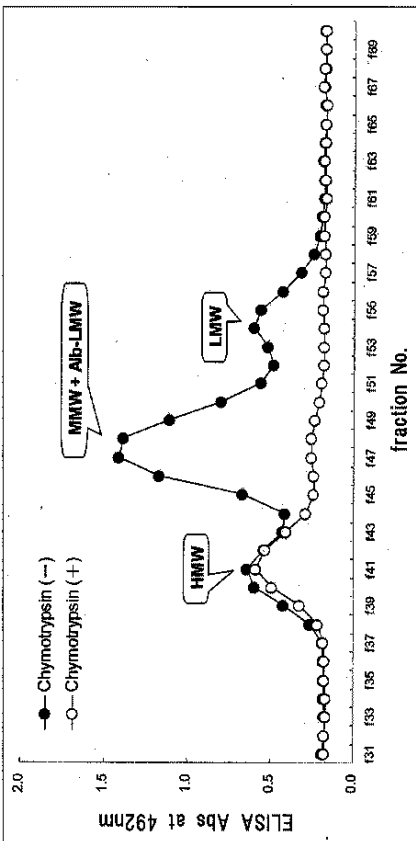
ヒト血清（ $n = 14$ ） $10 \mu\text{L}$ に、キモトリプシン $50 \text{ u}/\text{mL}$ を含むプロテアーゼ溶解液（ 50 mM トリス塩酸緩衝液、 $\text{pH} 8.0$ ） $100 \mu\text{L}$ を加え、 37°C で20分間加温した。さらに、検体処理液（ 100 mM ほう酸緩衝液、 $\text{pH} 11.0$ ）を $700 \mu\text{L}$ 加えたものを、ヒトHMW測定用の処理検体液とした。対象として、キモトリプシンの代わりに、プロテイナーゼK $7.5 \text{ u}/\text{mL}$ で、同様の検体処理を実施した。各処理検体中のアディポネクチン濃度は、処理検体液をBSA-PBSTでさらに10倍に希釈後、実施例3の方法と同様に測定した。測定結果を図8に示した。

【0048】

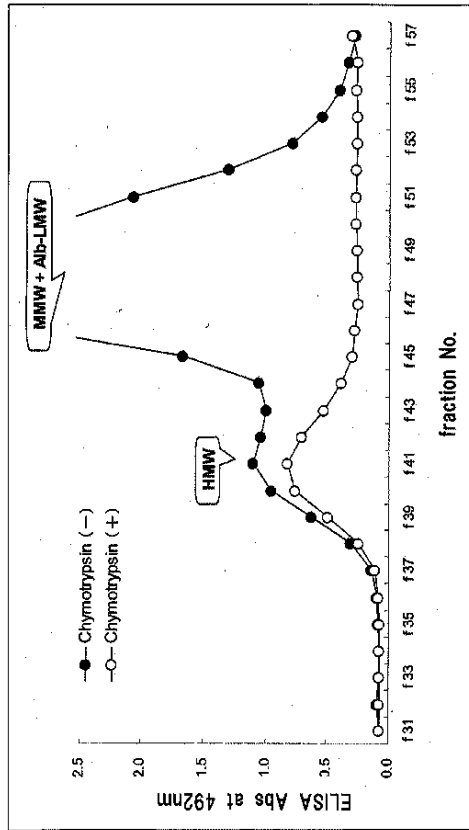
ヒト血清中のHMWアディポネクチンを分別測定するのに利用されているプロテイナーゼK処理後の残存するアディポネクチン量を表す吸光度と、キモトリプシン処理後の測定吸光度がほぼ完全に一致したことから、キモトリプシンもヒト血清中のHMWアディポネ

クチンの分別測定に利用できることが示された。

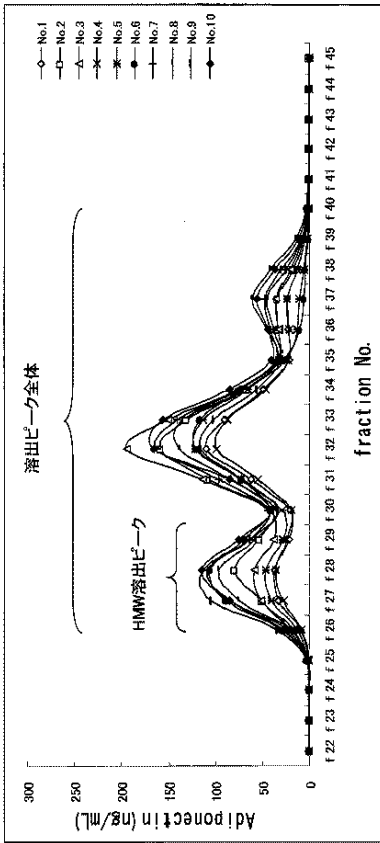
【図 1】



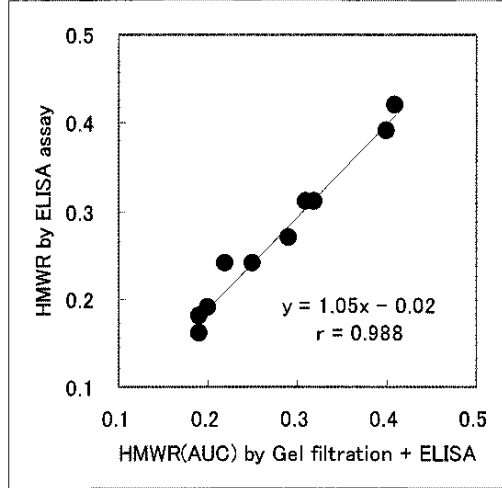
【図 2】



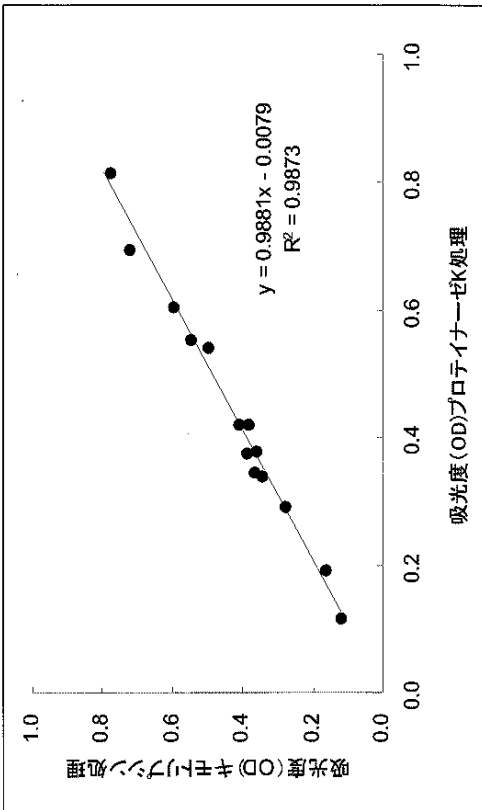
【図 6】



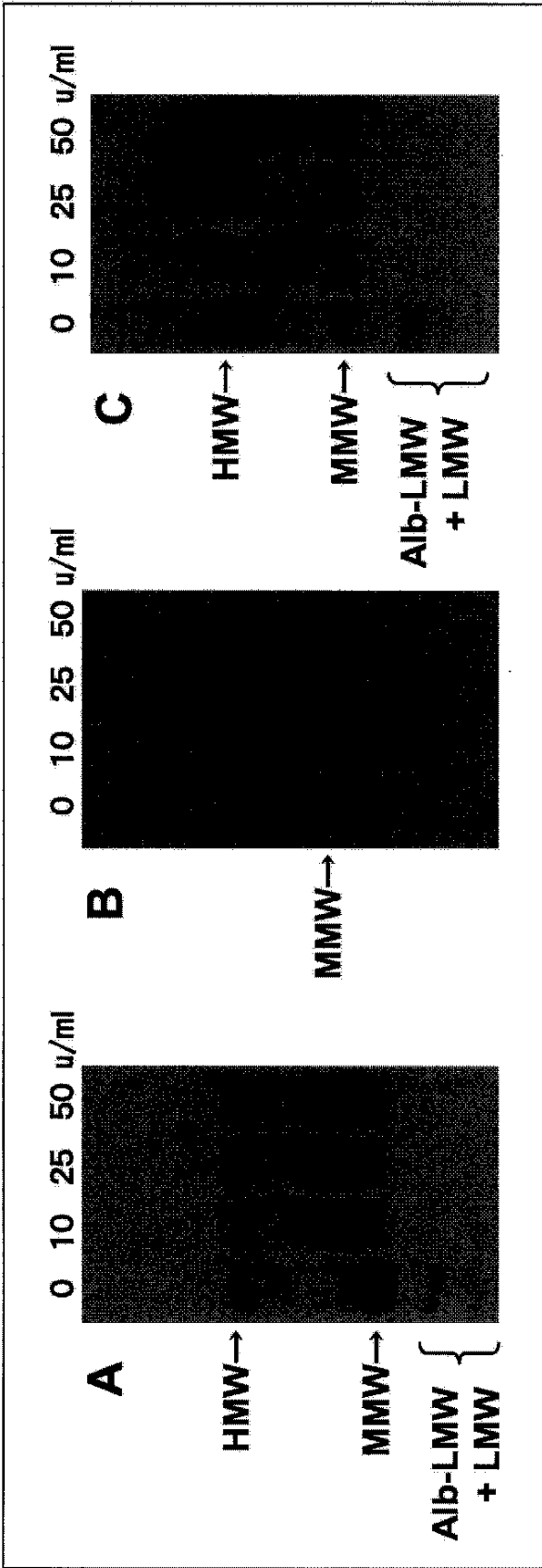
【図 7】



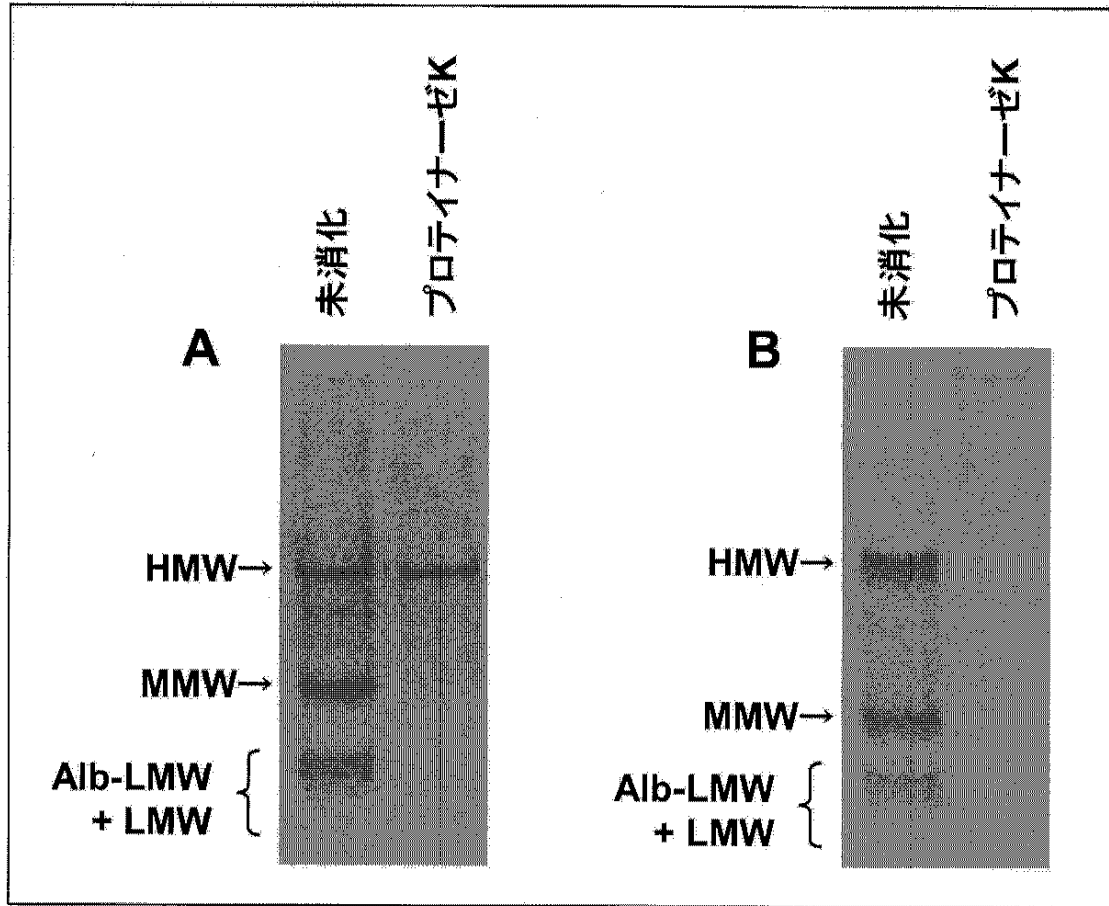
【図 8】



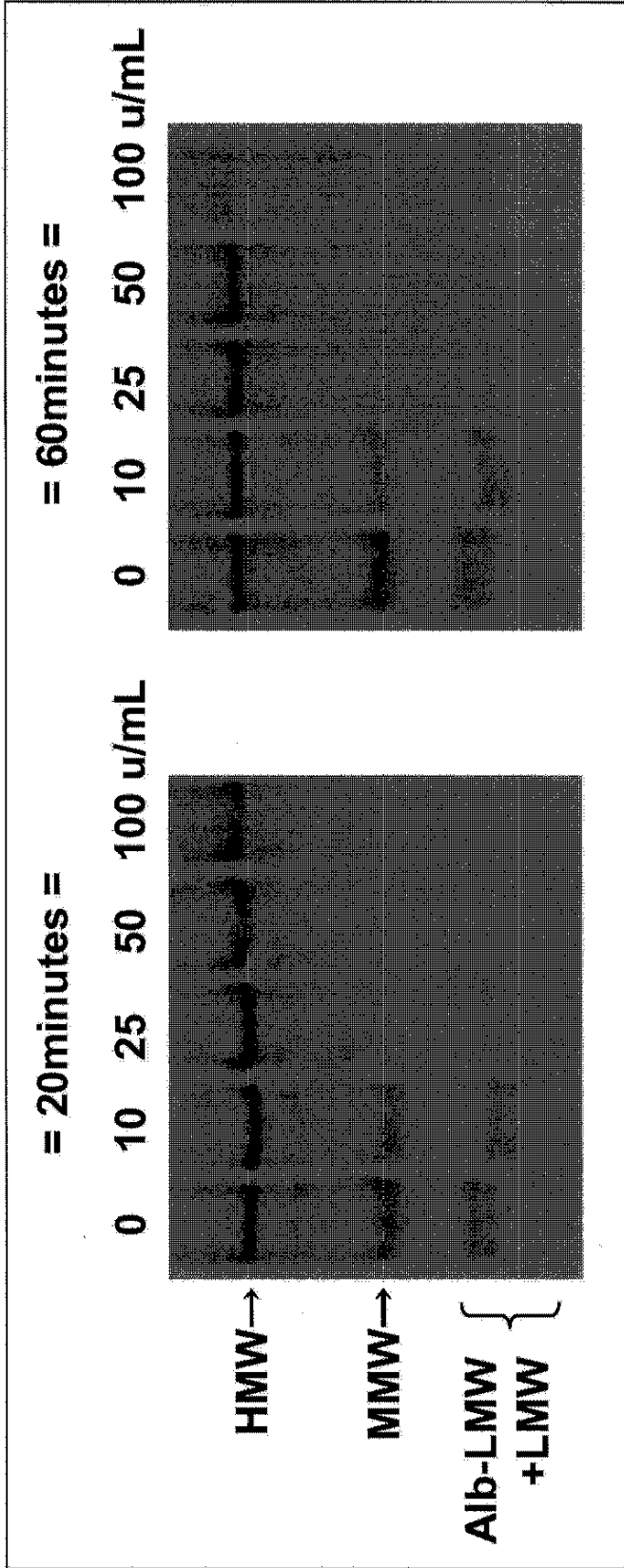
【図 3】



【図4】



【図5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/000903
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i 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, A61K38/22, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, C12Q1/37, G01N33/48 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 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CAplus (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/038457 A1 (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 28 April, 2005 (28.04.05), Claims; examples & US 2007/0042424 A1 & EP 1681566 A1 & CA 2542824 A & KR 10-2006-0132571 A & CN 1867828 A	1-2
X	PAJVANI U. B. et al., "Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone acrp30/adiponectin.", J. Biol. Chem., 2003, Vol.278, No.11, P.9073-9085, abstract, Fig.3	1-2
P,X	EBINUMA H. et al., "Protease-based ELISA for selective quantification of mouse high-molecular-weight adiponectin.", Clinica Chemica Acta, 2008.11.21, Vol.401, P.181-183	1-2
<input 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 27 March, 2009 (27.03.09)		Date of mailing of the international search report 07 April, 2009 (07.04.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 0 9 0 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)i, A61K38/22(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i											
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, A61K38/22, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, C12Q1/37, G01N33/48											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CAplus(STN)											
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									
X	WO 2005/038457 A1 (第一化学薬品株式会社) 2005.04.28, 特許請求の範囲、実施例 & US 2007/0042424 A1 & EP 1681566 A1 & CA 2542824 A & KR 10-2006-0132571 A & CN 1867828 A	1-2									
X	PAJVANI U. B. et al., "Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone acrp30/adiponectin.", J. Biol. Chem., 2003, Vol.278, No.11, P.9073-9085, abstract, Fig.3	1-2									
<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		の日に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 27.03.2009		国際調査報告の発送日 07.04.2009									
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) 海野 佳子	2 J 3906								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 0 9 0 3

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
P, X	EBINUMA H. et al., "Protease-based ELISA for selective quantification of mouse high-molecular-weight adiponectin.", <i>Clinica Chemica Acta</i> , 2008.11.21, Vol.401, P.181-183	1-2

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

特許法第30条第1項適用申請有り

(72)発明者 海老沼 宏幸

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA13 BA13 BB02 BB50 BB51 CA26 DA36 FA11 FB01 FB03

FB11 GC10

4B063 QQ36 QQ79 QR16 QR48 QS33

(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)	测量高分子量脂联素的方法		
公开(公告)号	JPWO2009107398A1	公开(公告)日	2011-06-30
申请号	JP2010500577	申请日	2009-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	海老沼宏幸		
发明人	海老沼 宏幸		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 C12Q1/37		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/976		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/48.A C12Q1/37		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BA13 2G045/BB02 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/GC10 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QS33		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2008049198 2008-02-29 JP		
其他公开文献	JP5398697B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种在多聚体脂联素中差异测量高活性形式HMW脂联素的方法。一种通过使用蛋白酶对多聚体脂联素进行免疫学测定的方法，其包括使胰凝乳蛋白酶作用于含有多聚体脂联素的样品上，这是一种测定样品中高分子量脂联素的方法。

