

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3944499号  
(P3944499)

(45) 発行日 平成19年7月11日(2007.7.11)

(24) 登録日 平成19年4月13日(2007.4.13)

(51) Int. Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

V

請求項の数 4 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2004-249523 (P2004-249523)	(73) 特許権者	390037006 株式会社エスアールエル 東京都立川市曙町二丁目41番19号
(22) 出願日	平成16年8月30日(2004.8.30)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(62) 分割の表示 原出願日	特願平8-304043の分割 平成8年10月30日(1996.10.30)	(72) 発明者	棚橋 香代子 東京都八王子市小宮町51 株式会社エス アールエル 八王子ラボラトリー内
(65) 公開番号	特開2005-3690 (P2005-3690A)	(72) 発明者	川野 克己 東京都八王子市小宮町51 株式会社エス アールエル 八王子ラボラトリー内
(43) 公開日 審査請求日	平成17年1月6日(2005.1.6) 平成16年9月27日(2004.9.27)	(72) 発明者	日比 望 東京都八王子市小宮町51 株式会社エス アールエル 八王子ラボラトリー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質に結合した糖化最終産物の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質に結合した糖化最終産物を含む検体に還元剤の非存在下で、pH10~12.5において、ドデシル硫酸ナトリウムとプロテインゼンKとを併用することなくタンパク変性剤を作用させ前記タンパク質を変性させ、次いで検体中の糖化最終産物を免疫測定することから成る、タンパク質に結合した糖化最終産物の測定方法。

【請求項2】

前記タンパク変性剤はドデシル硫酸ナトリウムである請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記タンパク変性剤を作用させる際に加熱する請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記タンパク質変性剤は、タンパク質分解酵素の非存在下で作用させる請求項1ないし3のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質に結合した糖化最終産物の測定方法に関する。本発明の方法は、糖尿病、動脈硬化、老化等の診断、治療効果の判定及び予後の予測に有用である。

【背景技術】

【0002】

10

20

メイラード反応は食品化学の領域では周知の反応で、グルコース等の還元性の糖とタンパク質が非酵素的に結合し、シッフ塩基を形成し、アマドリ転移生成物となる前期反応と、さらにそれらが複雑な反応過程を経て褐変、蛍光、分子間架橋を形成する後期反応とに分けることができる。この後期反応によって生成した物質を糖化最終産物 (Advanced glycation end products, AGE) と呼んでいる。このAGEは、ピラリン、ペントシジン、カルボキシメチルリジン、クロスリン等の各種構造物の総称であり、タンパク質に結合したAGEは、糖尿病、動脈硬化、老化等の各種病変部に多くなることが知られており、糖尿病性合併症の発症原因物質の1つとされ、このAGE生成を阻害する薬剤によって合併症の発症が抑えられるとの報告もある。そのため、タンパク質に結合したAGEを測定することにより、それら合併症の進展を捉えることが期待されている。

10

## 【0003】

従来、タンパク質に結合したAGEの免疫測定法は、何らの処理を行なうことなくそのまま測定されていた。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

タンパク質に結合したAGEは、従来法により測定可能であるが、その測定感度をより高めることができれば好ましいことは言うまでもない。

## 【0005】

従って、本発明の目的は、従来の方法よりも測定感度が高い、タンパク質に結合したAGEの測定方法を提供することである。

20

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

タンパク質は通常、三次元的に折り畳まれている。本願発明者らは、鋭意研究の結果、三次元的に折り畳まれたタンパク質の外側だけでなく、その内側にもAGEが結合していることを見出し、検体を先ずタンパク変性剤で処理してタンパク質を変性させてから測定することにより、測定されるAGEの量を増やすことができ、それによって測定感度を高めることができることを見出した。さらに、上記タンパク変性剤での処理を、還元剤の非存在下で、かつ、塩基性条件下で行なうことにより、タンパク質に結合した、AGE予備軍となる糖類を該処理中にAGEに転化させて測定することが可能であり、それによって今後AGEに転化される糖類をも測定して、AGEが関与するとされる動脈硬化症や各種糖尿病合併症等に罹患する可能性の大小を診断することが可能であることを見出し本発明を完成した。

30

## 【0007】

すなわち、本発明は、タンパク質に結合した糖化最終産物を含む検体に還元剤の非存在下で、pH10~12.5において、ドデシル硫酸ナトリウムとプロテイナーゼKとを併用することなくタンパク変性剤を作用させ前記タンパク質を変性させ、次いで検体中の糖化最終産物を免疫測定することから成る、タンパク質に結合した糖化最終産物の測定方法を提供する。

40

## 【発明の効果】

## 【0008】

本発明により、検体中のAGE結合タンパク質を高感度に測定できる方法が提供された。本発明の方法は、糖尿病、動脈硬化等の診断、治療効果の判定及び予後の予測の精度向上に大いに貢献するものと期待される。さらに、本発明によれば、タンパク質に結合した、AGE予備軍となる糖類を該処理中にAGEに転化させて測定することが可能であり、それによって今後AGEに転化される糖類をも測定して、AGEが関与するとされる動脈硬化症や各種糖尿病合併症等に罹患する可能性の大小を診断することが可能である

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0009】

50

本発明の方法に供される検体としては、血液、血清、尿、髄液等の体液及び生体内組織を挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

【0010】

A G E は種々のタンパク質に結合することが知られており、本発明の方法により測定される A G E 結合タンパク質は、生体内に存在するいずれのものであってもよく、複数種類の A G E 結合タンパク質の混合物であってもよい。A G E が結合するタンパク質の例として、血清アルブミン、ヘモグロビン、L D L、 $\alpha_2$ -ミクログロブリン、コラーゲン、水晶体クリスタリン、ミエリン等を挙げるができるがこれらに限定されるものではない。

【0011】

本発明の方法では、まず、検体にタンパク変性剤を作用させて A G E 結合タンパク質のタンパク質部分を変性させる。ここで、「変性」とは、該タンパク質の三次元構造を変化させてタンパク質の内側の少なくとも一部を露出させることを意味する。このようなタンパク変性剤の例として、ドデシル硫酸ナトリウム ( S D S ) 等の界面活性剤や、尿素、塩酸グアニジン等を挙げるができる。また、タンパク分解酵素も本発明で言う「タンパク変性剤」に含まれる。なぜなら、タンパク分解酵素で A G E 結合タンパク質を処理してそのタンパク質部分を切断することにより、タンパク質の内側の少なくとも一部が露出されるからである。もっとも、タンパク質を切断し過ぎると免疫測定の感度がかえって低下するので好ましくない。上記種々のタンパク変性剤は単独で用いてもよいし、複数のタンパク変性剤を併用してもよい。もっとも、S D S とプロテイナーゼ K を併用した場合には、免疫測定の感度の上昇が低いのでこれらの併用は望ましくない。上記タンパク変性剤のうち、S D S が特に好ましい。

【0012】

タンパク変性剤の使用量は、免疫測定による測定感度が向上する量を適宜選択することにより、各タンパク変性剤に応じて適宜設定することができるが、通常終濃度で 0 . 0 1 重量%以上が好ましく、免疫測定時の濃度で 0 . 1 重量%以下となることが好ましい。

【0014】

タンパク変性剤を作用させる際には、加熱することが好ましい。加熱により、A G E 結合タンパク質の変性及び可溶化を容易に促進させることができる。すなわち、処理条件としては、60 以上、より好ましくは約 100 で、5 秒 ~ 20 分、より好ましくは 5 分 ~ 15 分程度が好ましい。

【0016】

本発明の方法では、今後 A G E に転化される糖類をも測定して、A G E が関与するとされる動脈硬化症や各種糖尿病合併症等に罹患する可能性の大小を診断したりすることを可能にするべく、還元剤の非存在下でタンパク変性剤処理を行ない、タンパク質に結合した、A G E 予備軍となる糖類を該処理中に A G E に転化させて測定する。この場合、下記実施例で具体的に示されるように、タンパク変性剤による処理を p H 10 ~ 12 . 5 の塩基性条件下で行うことにより、感度が顕著に高くなるので、タンパク変性剤による処理を p H 10 ~ 12 . 5 の塩基性条件下で行う。

【0017】

上記タンパク変性剤処理後、直ちに氷冷し、冷却後、緩衝液で 5 ~ 10 倍程度に希釈することが好ましい。この希釈液に 0 . 1 重量%程度のウシ血清アルブミンが含まれていてもよい。また、塩基性条件下でタンパク変性剤処理を行なった場合には、この希釈に先立ち、又は希釈と同時に、リン酸等の酸で中和することが好ましい。

【0018】

上記のようにタンパク変性剤による処理を行なった後、検体を免疫測定に供し、検体中の A G E を測定する。免疫測定自体は、抗 A G E 抗体を用いた従来の方法により行なうことができる。

【0019】

すなわち、抗 A G E 抗体は、B S A、K L H 等のキャリアタンパク質とグルコースとを

10

20

30

40

50

緩衝液中で12～42週間インキュベートすることによりAGE結合タンパク質を調製し、これを抗原として用いて動物を免疫し、該動物から抗体を常法により回収することにより作製することができる。抗AGE抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。抗AGE抗体自体及びその作製方法は公知であり、例えば、Hidetaka Nakayama et al., BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.162, No.2, 1989, pp.740-745に記載されている。

#### 【0020】

免疫測定は、上記抗AGE抗体と、検体中のAGEとの抗原抗体反応を利用したいずれの方法によっても行なうことができる。すなわち、測定様式で分類すればサンドイッチ法、競合法、凝集法等のいずれの方法でもよく、また、用いる標識で分類すれば、酵素免疫測定法、放射免疫測定法、蛍光免疫測定法等のいずれであってもよい。これらの免疫測定方法自体はこの分野において周知である。

10

#### 【実施例】

#### 【0021】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0022】

#### 参考例1

#### (1) タンパク変性剤処理

検体としては、ラットの血清を用いた。マイクロチューブに検体0.01mlと0.1M PBS (pH 7.2) 0.09mlを加えた。さらに、0.6% SDSを含む0.01M Tris-HCl生理食塩水 (pH 7.4) を0.1ml加えた。このときのpHは7.2であった。次いで、この混合液を100で10分間加熱し、直ちに氷冷した。冷却後、0.1M PBS (pH 7.2) 0.8mlを加えて希釈した。

20

#### 【0023】

#### (2) 免疫測定

#### (i) 抗AGE抗体の調製

種々のタンパク質と、グルコースとを0.1M PBS (pH 7.2) 溶液中にて、12～42週間インキュベートし、各種AGE化タンパク質を調製した。この方法により作製したAGE化KLHを公知の方法 (H. Nakayama et al., 上掲) により家兔に免疫し、抗血清を回収し、これを抗AGE抗体とした。作製した抗AGE抗体は、前述の各種AGE化タンパク質と反応した。また、標準AGE化タンパク質として使用しているAGE化ウシ血清アルブミンをNaBH<sub>4</sub>にて室温30分間還元したのを用い、その処理の有無による作製した抗体との反応性を調べたところ、作製した抗体は両者ともに同程度反応した。このため、作製した抗体はAGEを認識していることが示された。

30

#### 【0024】

#### (ii) ELISA

標準AGE化ウシ血清アルブミンを280ng/mlの濃度で含む0.1M PBS (pH 7.2) をELISAプレートに0.1mlずつ分注し、4にて一晩固相化した。さらに、このプレートを洗浄し、次いで1%ウシ血清アルブミン含有0.1M PBS (pH 7.2) を0.1mlずつ分注し、室温にて4時間インキュベートし、プレートをブロッキングした。

40

#### 【0025】

(1) でタンパク変性剤処理した検体液0.1mlと、(i) で作製した抗AGE抗体 (1万倍希釈) 0.1mlとを先に調製したELISAプレートに分注し、4、一晩反応させた。

#### 【0026】

このように反応させたELISAプレートを洗浄し、必要濃度に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 (DAKO社製P0399) を分注し、室温、4時間反応させた。ELISAプレートを洗浄し、発色基質であるテトラメチルベンジジン

50

を反応させ、硫酸で反応を停止させた後、吸光度を測定した。

【0027】

既知濃度の標準AGE化タンパク質について上記操作を行なって検量線を作成し、これに基づいて血清検体中のAGE量を求めた。結果を図1に示す。本参考例の結果は、図1中、「中性SDS」のハッチングを付した棒グラフで示される。

【0028】

参考例2

検体をタンパク変性剤で処理する前に、最終濃度0.05MのNaBH<sub>4</sub>で室温で30分間検体を処理し、その後透析したことを除き、参考例1と同じ操作を行なった。結果を図1に示す。本実施例の結果は、図1中、「中性SDS」の黒塗りの棒グラフで示される。

10

【0029】

実施例1

検体としては、ラットの血清を用いた。マイクロチューブに検体0.01mlと0.1M PBS (pH7.2) 0.04mlを加えた。次に0.2M NaOHを0.05ml加えた。さらに、0.6% SDSを含む0.01M Tris-HCl生理食塩水 (pH7.4) を0.1ml加えた。このときのpHは11.7であった。次いで、この混合液を100で10分間加熱し、直ちに氷冷した。冷却後、0.2Mリン酸0.03mlを加え、中和した。次いで、0.1M PBS (pH7.2) 0.77mlを加えて希釈した。

20

【0030】

このように処理した検体について、参考例1と同様に免疫測定を行なった。結果を図1に示す。図1中、本実施例の結果は、「塩基性SDS」のハッチングを付した棒グラフで示されている。

【0031】

参考例3

検体をタンパク変性剤で処理する前に、最終濃度0.05MのNaBH<sub>4</sub>で室温で30分間検体を処理し、その後透析したことを除き、実施例1と同じ操作を行なった。結果を図1に示す。本参考例の結果は、図1中、「塩基性SDS」の黒塗りの棒グラフで示される。

30

【0032】

参考例4

検体としては、ラットの血清を用いた。マイクロチューブに検体0.01mlと0.1M PBS (pH7.2) 0.09mlを加えた。さらに、0.6% SDSを含む0.01M Tris-HCl生理食塩水 (pH7.4) を0.1ml加えた。さらに、2M NaBH<sub>4</sub> / 0.05M NaOH 0.005mlを加えた。このときのpHは7.5であった。次いで、この混合液を100で10分間加熱し、直ちに氷冷した。冷却後、0.1M PBS (pH7.2) 0.8mlを加えて希釈した。

【0033】

このように処理した検体について、参考例1と同様に免疫測定を行なった。結果を図1に示す。図1中、本参考例の結果は、「中性NaBH<sub>4</sub> SDS」のハッチングを付した棒グラフで示されている。

40

【0034】

参考例5

検体をタンパク変性剤で処理する前に、最終濃度0.05MのNaBH<sub>4</sub>で室温で30分間検体を処理し、その後透析したことを除き、参考例4と同じ操作を行なった。結果を図1に示す。本参考例の結果は、図1中、「中性NaBH<sub>4</sub> SDS」の黒塗りの棒グラフで示される。

【0035】

参考例6

50

検体としては、ラットの血清を用いた。マイクロチューブに検体 0.01 ml と 0.1 M PBS (pH 7.2) 0.04 ml を加えた。次に 0.2 M NaOH 0.05 ml を加えた。さらに、0.6% SDS を含む 0.01 M Tris-HCl 生理食塩水 (pH 7.4) を 0.1 ml 加えた。さらに、2 M NaBH<sub>4</sub> / 0.05 M NaOH 0.005 ml を加えた。このときの pH は 11.7 であった。次いで、この混合液を 100 で 10 分間加熱し、直ちに氷冷した。冷却後、0.1 M PBS (pH 7.2) 0.77 ml を加えて希釈した。

#### 【0036】

このように処理した検体について、参考例 1 と同様に免疫測定を行なった。結果を図 1 に示す。図 1 中、本参考例の結果は、「塩基性 NaBH<sub>4</sub> SDS」のハッチングを付した棒グラフに示されている。

10

#### 【0037】

##### 参考例 7

検体をタンパク変性剤で処理する前に、最終濃度 0.05 M の NaBH<sub>4</sub> で室温で 30 分間検体を処理し、その後透析したことを除き、参考例 6 と同じ操作を行なった。結果を図 1 に示す。本参考例の結果は、図 1 中、「塩基性 NaBH<sub>4</sub> SDS」の黒塗りの棒グラフで示される。

#### 【0038】

##### 比較例 1

検体をタンパク変性剤処理することなく、参考例 1 と同じ方法により免疫測定を行なった。結果を図 1 に示す。本比較例の結果は、図 1 中、「未処理」のハッチングを付した棒グラフで示される。

20

#### 【0039】

##### 比較例 2

検体を免疫測定に付する前に、最終濃度 0.05 M の NaBH<sub>4</sub> で室温で 30 分間検体を処理し、その後透析したことを除き、比較例 1 と同じ操作を行なった。結果を図 1 に示す。本比較例の結果は、図 1 中、「未処理」の黒塗りの棒グラフで示される。

#### 【0040】

##### 比較例 3

SDS 処理の際に 20 mg/ml のプロテイナー K 溶液 0.001 ml を加えたこと、前記 SDS 溶液中の SDS 濃度が最終濃度 0.3% であったこと、及びタンパク変性剤処理時の条件が 60、4 時間、その後 100、5 分間であったことを除き、参考例 1 と同じ操作を行なった。結果を図 1 に示す。本比較例の結果は、図 1 中「ProK / SDS」のハッチングを付した棒グラフで示される。

30

#### 【0041】

##### 比較例 4

検体を免疫測定に付する前に、最終濃度 0.05 M の NaBH<sub>4</sub> で室温で 30 分間検体を処理し、その後透析したことを除き、比較例 3 と同じ操作を行なった。結果を図 1 に示す。本比較例の結果は、図 1 中、「ProK / SDS」の黒塗りの棒グラフで示される。

#### 【0042】

図 1 で示されるように、本発明の方法によれば、比較例の方法に比べて、測定感度が高い。また、塩基性条件下で還元剤の非存在下でタンパク変性剤処理することにより、新生 AGE の生成量が非常に大きくなり、将来 AGE に転化される糖類をも含めて測定する場合には、この条件が非常に優れていることも示された。さらに、現在の AGE 量を測定する場合には、還元剤を含めた方が感度が高くなることも示された。

40

#### 【0043】

##### 実施例 2、参考例 8 ~ 10

参考例 1、実施例 1、参考例 4 及び 参考例 6 記載の方法により、糖尿病患者血清、腎臓透析患者の透析前後の血清及び健常人血清について AGE 量を測定した。実施例 1 の方法により行なった場合 (実施例 2) の結果を図 2 に、参考例 6 の方法により行なった場合 (

50

参考例 8 ) の結果を図 3 に、参考例 1 の方法により行なった場合 ( 参考例 9 ) の結果を図 4 に、参考例 4 の方法により行なった場合 ( 参考例 1 0 ) の結果を図 5 に記載する。図 2 ~ 5 により、本発明の方法が、臨床診断にも適用できることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 4 】

【図 1】本発明の実施例の方法及び比較例の方法により検体中の AGE 量を測定した結果を示す図である。

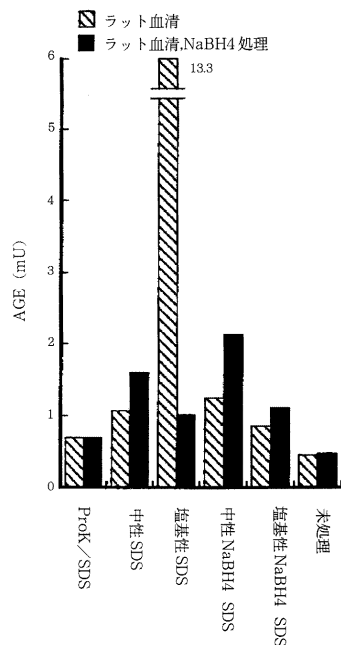
【図 2】本発明の 1 実施例の方法により、各種患者血清及び健常人血清について AGE 量を測定した結果を示す図である。

【図 3】本発明の 1 参考例の方法により、各種患者血清及び健常人血清について AGE 量を測定した結果を示す図である。 10

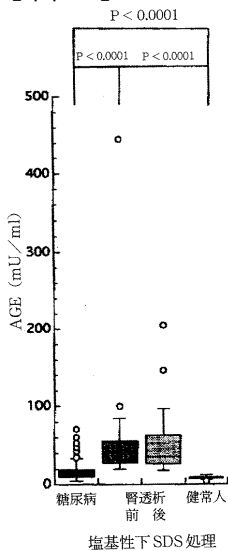
【図 4】本発明のさらに他の 1 参考例の方法により、各種患者血清及び健常人血清について AGE 量を測定した結果を示す図である。

【図 5】本発明のさらに他の 1 参考例の方法により、各種患者血清及び健常人血清について AGE 量を測定した結果を示す図である。

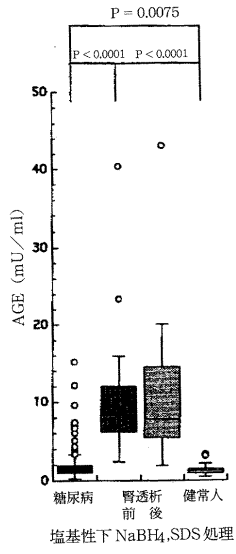
【 図 1 】



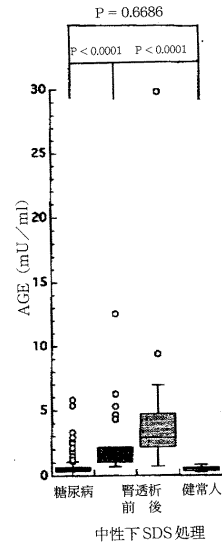
【 図 2 】



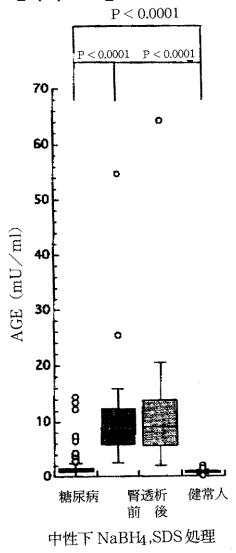
【 3 】



【 4 】



【 5 】



フロントページの続き

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平06 - 308122 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 98

专利名称(译)	测量蛋白质结合的糖基化终产物的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP3944499B2</a>	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	JP2004249523	申请日	2004-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	SRL股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	株式会社工スアールエル		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社工スアールエル		
[标]发明人	棚橋香代子 川野克己 日比望		
发明人	棚橋 香代子 川野 克己 日比 望		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/53.D		
代理人(译)	谷川荣次郎		
其他公开文献	JP2005003690A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测量与蛋白质结合的AGE的方法，该蛋白质的测量灵敏度高于传统方法。ZSOLUTION：在测量与蛋白质结合的晚期糖基化终产物的方法中，使蛋白质修饰剂作用于含有与蛋白质结合的晚期糖基化终产物的样品以修饰蛋白质（不包括十二烷基硫酸钠和蛋白酶的情况）K同时起作用），然后测量样品中晚期糖基化终产物的免疫力。Z

