

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3869722号

(P3869722)

(45) 発行日 平成19年1月17日(2007.1.17)

(24) 登録日 平成18年10月20日(2006.10.20)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/68</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/68	

請求項の数 8 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2001-536573 (P2001-536573)	(73) 特許権者	506137147
(86) (22) 出願日	平成12年11月8日(2000.11.8)		エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/007838		ジメント株式会社
(87) 国際公開番号	W02001/035093		東京都文京区小石川四丁目6番10号
(87) 国際公開日	平成13年5月17日(2001.5.17)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成16年5月20日(2004.5.20)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	特願平11-316475	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成11年11月8日(1999.11.8)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100089244
(31) 優先権主張番号	特願2000-274257 (P2000-274257)		弁理士 遠山 勉
(32) 優先日	平成12年9月11日(2000.9.11)	(72) 発明者	遠藤 文夫
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		日本国熊本県熊本市出水7丁目733-1
		(72) 発明者	足立 尚登
			日本国熊本県熊本市京町1丁目7-35
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞死の検出方法及び検出試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体液中のチトクロムCを定量し、定量値に基づいてアポトーシスを検出することを含む、細胞死を検出する方法。

【請求項2】

チトクロムCを免疫化学的方法により定量する、請求項1に記載のアポトーシスを検出する方法。

【請求項3】

チトクロムCに対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量するための、アポトーシスの検出用チトクロムC測定試薬。

【請求項4】

移植片対宿主反応疾患の診断用である、請求項3に記載のチトクロムC測定試薬。

【請求項5】

血球貪食症候群の診断用である、請求項3に記載のチトクロムC測定試薬。

【請求項6】

急性リンパ性白血病の診断用である、請求項3に記載のチトクロムC測定試薬。

【請求項7】

ウイルス性脳炎・脳症の診断用である、請求項3に記載のチトクロムC測定試薬。

【請求項8】

ウイルス性脳炎・脳症がインフルエンザ脳炎・脳症である、請求項7に記載のチトクロム

10

20

C 測定試薬。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、細胞死の検出方法及び検出試薬に関する。

背景技術

骨髄移植後に起きる多臓器を傷害する疾患である移植片対宿主反応疾患 (GVHD) や、血球が貧食細胞に貧食される疾患である血球貧食症候群 (hemophagocytic syndrome; HPS) そのうち特にウイルス感染後に起こるウイルス関連血球貧食症候群 (Virus associated hemophagocytic syndrome; VAHS) などは、臓器不全を生じ最後に死に到る重篤な病気である。現在  
10

これらの疾患の診断は、生検などによる細胞学診断が一般的であるが、検査における患者の苦痛、診断までの時間や操作法において欠点を持っている。近年、GVHD及びHPSの主な原因が、生体内の細胞のアポトーシスによることが明らかになり、アポトーシスを検出することによりGVHD及びHPSを診断することが可能ではないかと考えられるようになった。

アポトーシスを検出する方法として、従来から1)形態学的方法、2)組織化学的方法、3)生化学的方法、及び、4)免疫化学的方法が用いられている。

1)形態学的方法：アポトーシスに特異的に生じるDNA断片化を染色法で検出するクロマチン凝縮判定法やアポトーシスに特有な形態的变化を電子顕微鏡観察や細胞サイズの測定により検出する方法が用いられている。  
20

2)組織化学的方法：DNA断片の末端に、標識したヌクレオチドを結合させ、蛍光顕微鏡で検出する方法が用いられており、別法として、細胞内物質の量を個々の細胞について測定するフローサイトメトリー法を用いることも行われている。

3)生化学的方法：アガロースゲル電気泳動によりDNAラダーを検出する方法が用いられており、現在アポトーシスの最も確かな証明法とされているが、組織あるいは細胞群全体からDNAを抽出するのでアポトーシス細胞の割合が多くなると感度及び定量性に問題があると言われている。

4)免疫化学的方法：ヒストン結合DNA断片(モノヌクレオソームあるいはオリゴヌクレオソーム)を検出する固相酵素免疫検定法(ELISA)(セルデテクションELISA:Boehringer Mannheim, 国産化学)が開発されている。  
30

しかしこれらの方法には、手技が複雑である、感度及び定量性が悪い等の問題点があり、GVHD及びHPSを診断する方法としては実用化に到っていないのが現状である。

発明の開示

本発明の課題は、生体内で起こっているアポトーシスを検出するための、簡便で感度及び定量性に優れた方法及び試薬を開発することにある。

チトクロムCは、ミトコンドリアにおける電子伝達系の重要な蛋白質として知られているが、細胞がアポトーシスの引き金となる刺激に曝され、アポトーシスの状態になると、ミトコンドリアにあったチトクロムCが急速にサイトゾルへと放出されることが報告されている(Dinsdale, D. et al., American J. Pathol. 155: 607-18, 1999)。そしてサイトゾルのチトクロムCは、アポトーシスの  
40

キーファクターであるカスパーゼ(caspase)-3の活性化に關与し、チトクロムCの増加が、アポトーシス進行と關係することが報告されている(Medina, V. et al., Cancer Research 57: 3697-707, 1999)。本発明者らは、生体内でアポトーシスが起これば、ミトコンドリアより放出されたチトクロムCが、血中でも測定できるのではないかと考えた。そして、チトクロムCを測定するELISAを確立し、血中のチトクロムCの量がGVHD、HPS、急性リンパ性白血病及びインフルエンザ脳症の進行と強く相關することを見出して、本発明を完成するに到った。

すなわち本発明は、下記のような、体液中のチトクロムCを定量することにより、生体内で起こっている細胞死を検出する方法、並びに、その方法に使用できるチトクロムCの測  
50

定方法及びチトクロムC測定試薬を提供する。

(1) 体液中のチトクロムCを定量し、定量値に基づいて細胞死を検出することを含む、細胞死を検出する方法。

(2) チトクロムCを免疫化学的方法により定量する、(1)の細胞死を検出する方法。

(3) 体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量することを含む、チトクロムCを測定する方法。

(4) チトクロムCに対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロムCのサンドイッチ法による定量用のチトクロムC測定試薬。

(5) 細胞死の検出用である、(4)のチトクロムC測定試薬。

(6) 移植片対宿主反応疾患(GVHD)の診断用である、(4)のチトクロムC測定試薬。 10

(7) 血球貧食症候群(HPS)の診断用である、(4)のチトクロムC測定試薬。

(8) 急性リンパ性白血病の診断用である、(4)のチトクロムC測定試薬。

(9) ウイルス性脳炎・脳症の診断用である、(4)に記載のチトクロムC測定試薬。

(10) ウイルス性脳炎・脳症がインフルエンザ脳炎・脳症である、(10)に記載のチトクロムC測定試薬。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施の形態について詳細に説明する。

アポトーシスシグナルを受けて、ミトコンドリアから細胞質に移行したチトクロムCは、細胞死の結果、細胞膜が崩壊することにより細胞外へ放出されると考えられる。本発明は、細胞死により細胞外へ放出されたチトクロムCが、体液中例えば血液中のチトクロムCの定量によって検出可能であり、体液中のチトクロムCを定量することによって生体内で起こっている細胞死を検出できることを見出したことに基づくものである。従って、体液中のチトクロムCを定量することにより、細胞死を検出する方法であれば、本発明に含まれるものである。 20

ここで細胞死とは、主にアポトーシスを指すものであるが、一般的に生体内で起こっている細胞死がアポトーシスであることを特定することは容易ではなく、体液中のチトクロムCの増加を伴う細胞死であれば、本発明における細胞死に含まれる。

また体液とは、生体より採取された血液、血漿、血清、脳脊髄液等を意味するものである。 30

チトクロムCを測定する方法としては、免疫化学的方法、電気泳動による方法、クロマトグラフィーによる方法等が考えられる。電気泳動による方法としては、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ってチトクロムCをバンドとして検出する方法、キャピラリー電気泳動でピークとして検出する方法等がある。また、クロマトグラフィーによる方法としては、高速液体クロマトグラフィーでピークとして検出する方法等がある。場合によっては感度を上げるために、蛍光標識することも許されるが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

チトクロムCを測定する方法としては、感度及び簡便性から免疫化学的方法が好ましい。ここで免疫化学的方法とは、チトクロムCに対する抗体を用いて、チトクロムCを定量する方法である。免疫化学的方法としては、チトクロムCを標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体コートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法等、様々な方法があるが、チトクロムCに対する抗体を用いた方法であれば、本発明の好ましい態様に含まれる。抗体はモノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また標識する方法にも、放射性同位元素による標識、電気化学発光する化合物による標識、蛍光標識、酵素標識、ビオチン標識等、様々な方法があるが、本発明はこれらの例に限られるものではない。 40

チトクロムCを測定する免疫化学的方法の例として、以下にサンドイッチ法についてステップを追って説明する。

1) チトクロムCに対する抗体をビーズ又はカップ上に固相化する。ビーズはマイクロビーズでもよく、その場合は磁性体のマイクロビーズが好ましい。固相化は、共有結合によ 50

り結合させても非共有結合により結合させても構わない。通常、ビーズ又はカップ上の非特異的な結合部位をふさぐため、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン等の蛋白質、又は、Tween 20等の界面活性剤でブロック操作を行う。

2) 検体を、必要であればBSA、カゼイン等の蛋白質、又は、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈し、ビーズ又はカップに加える。また、既知の量のチトクロムCも同様に希釈して加える。

3) ビーズ又はカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、できればBSA、カゼイン等の蛋白質、又は、Tween 20等の界面活性剤を含むバッファーで希釈された標識抗体を加える。

4) ビーズ又はカップを、できればTween 20等の界面活性剤を含むバッファーで洗浄後、標識に応じた方法で測定する。例えば、放射性標識であれば放射活性を、酵素標識であれば酵素活性を測定する。また、ビオチン化標識であれば更に標識アビジンを加えて、標識に応じた方法で測定する。

5) 既知量のチトクロムCから検量線を作成し、検体中に含まれるチトクロムC量を計算する。

以上のステップにより、検体中のチトクロムCが定量される。

チトクロムCの定量値が正常値よりも高い場合に、細胞死が検出されたとすることができる。

また本発明は、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量することを含むチトクロムCを測定する方法に関する。サンドイッチ法は、固定化抗体と標識抗体により抗原が

サンドイッチされた状態を利用する、ELISAなどの免疫化学的方法である。チトクロムCを免疫化学的方法により測定する方法としては、ドットプロット法が多く用いられている(Souichi A. et al., J. Biological Chem. 273: 19892-4, 1998)。しかしながら、この方法はチトクロムCの含有量が高く蛋白質濃度の低い細胞ホモジェネート中のチトクロムCは測定できても、チトクロムCの含有量が低く蛋白質濃度の高い体液中のチトクロムCを高感度に定量するには不向きであった。本発明は、蛋白質濃度の高い体液中のチトクロムCを高感度で定量するために、サンドイッチ法のELISAを適用し、生体内で起こった細胞死で放出される程度に微量の、体液中のチトクロムCをも検出できることを見出したものである。

更に本発明は、チトクロムCに対する抗体を構成成分とする、体液中のチトクロムCをサンドイッチ法により定量するチトクロムC測定試薬にも関する。測定試薬は、抗体として抗チトクロムC抗体を用いる以外は、通常のスンドイッチ法に用いられる試薬(キット)と同様の構成でよい。その一例としてサンドイッチ法によりチトクロムCを測定する測定試薬は、例えば1) 抗チトクロムC抗体コートカップ、抗チトクロムC抗体コートビーズなどの抗チトクロムC抗体コート固相、2) 標識抗チトクロムC抗体、3) 既知濃度のチトクロムC標準溶液、4) 希釈液、5) 洗浄液、を含有する試薬である。更に、酵素標識であれば、6) 発色基質、7) 反応停止液が含まれてもよい。

本発明で開示されるチトクロムCの測定方法及び測定試薬により、細胞死の検出が可能になる。従って、アポトーシスを伴う様々な疾患の、鑑別や経過観察などの診断のための指標を提供することが可能となる。従って、細胞死の検出やアポトーシスを伴う疾患の診断を目的とするチトクロムCの測定方法及び測定試薬が提供される。

ここでアポトーシスを伴う疾患とは、例えば以下の例があげられる。

1) 生体防御を担う免疫系の細胞が発するシグナルにより、アポトーシスが引き起こされる疾患、例えばGVHD、自己免疫性疾患(全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ(RA)、強皮症、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、潰瘍性大腸炎)。

2) ウイルス感染による細胞死、あるいはウイルスに感染した細胞に対して免疫系細胞が反応してアポトーシスが引き起こされる疾患、例えばウイルス関連血球貧食症候群(VAHS)、その他のウイルス感染(HCV、HIV、インフルエンザウイルス)。

3) 異常なアポトーシスシグナルによる細胞死が引き起こされる疾患、例えば神経変性疾

10

20

30

40

50

患（アルツハイマー病、パーキンソン病）。

4）白血病、例えば急性リンパ性白血病。

5）人為的にアポトーシスが引き起こされる疾患、例えば放射線照射、薬剤（抗ガン剤など）投与などに対するもの。

6）全身性炎症反応症候群（SIRS）：生体に対する侵襲に反応して非特異的に免疫系が活性化し、サイトカイン産生が制御不能になり臓器障害が発生する疾患（HPS、重症肺炎）。

ウイルス感染により引き起こされる疾患で、重篤でかつ後遺症として残りやすいのは、脳炎・脳症である。特にインフルエンザウイルスにより起こされる脳炎・脳症は、インフルエンザによる死亡原因の大きな割合を占めるにもかかわらず、熱性けいれんとの鑑別が難しく、的確な治療を行うための的確な早期診断の方法が求められている。本発明の測定方法及び測定試薬によれば的確な早期診断が可能になる。

10

体液中のチトクロムCを測定することにより、生体内で進行している細胞死を測定することが可能となり、これら疾患の進行をモニターすることができる。特にGVHD、血球貧食症候群（HPS）、中でもウイルス関連血球貧食症候群（VAHS）、急性リンパ性白血病、及びインフルエンザ脳炎・脳症では、病状を把握するためにチトクロムCを定量することは有用である。

発明者らによる更なる研究の結果、HPS及びインフルエンザ脳症において、血中チトクロムCの量が細胞死の指標とされるLDHと良く相関することが確かめられ、更にチトクロムCが、LDHに先行して増加及び減少することが明らかにされた。

20

体液中のチトクロムCは、生体内で起こっている細胞死の良い指標であり、病態を早く的確に知るための有用な指標となり得る。

#### 実施例

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。％は、特記しない限り質量％である。

[実施例1] チトクロムCのELISAによる測定

チトクロムCの測定法は、以下の手順で実施する。

##### 1）抗チトクロムC抗体の精製

ラットのチトクロムC（シグマ社）をウサギに免疫し、チトクロムCに対する抗血清を得る。その抗血清に最終濃度2Mになるように硫酸を添加し、室温（20～30）で5時間攪拌する。攪拌した溶液を10000回転で30分遠心し上清を捨て、沈殿物を0.1Mリン緩衝液pH7.2で溶解後、同一緩衝液に対して透析する。透析した溶液は、CNBr-Sepharose 4B（ファルマシア社）にウシのチトクロムCを結合させて得た担体のカラムに流す。0.15M NaClを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液pH7.5でカラムを洗浄後、0.1M塩酸グアニジンで抗チトクロムC抗体を溶出し、溶出液を、0.15M NaClを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液pH7.5に対して透析し抗体（IgG）精製物とする。

30

##### 2）抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>の調製

精製したIgGを0.1M酢酸緩衝液pH4.2に対して透析する。透析したIgG溶液にペプシン（シグマ社）を質量濃度比で20：1の割合になるように加え、37で16時間反応させる。反応後の溶液のpHを1N NaOHで7.5に調整した後、0.15M NaClを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液pH7.5で平衡化したSepharose 4B（ファルマシア社）カラムでゲル濾過を行う。ゲル濾過したフラクションの第一ピークを集め、濃縮し抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>液とする。

40

3）西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗チトクロムC抗体F(ab')<sub>2</sub>抗体の作製

4mg/mlに調整したHRP（東洋紡）溶液の1mlに0.1Mメタ過ヨウ素酸ナトリウムを60μl加え、室温（20～30）で20分攪拌後、0.001M酢酸緩衝液pH4.4に対して透析する。透析後、0.2M炭酸ナトリウム液でpH9.0～9.5に調整する。この溶液に0.1M炭酸緩衝液pH9.5に対して透析した抗チトクロムC抗

50

体 F ( a b ' )<sub>2</sub> 溶液 ( 4 m g / m l ) を 1 m l 加え、室温 ( 2 0 ~ 3 0 ) で 2 時間攪拌する。 4 m g / m l に調整した水素化ホウ素ナトリウム液を 5 0 μ l 加え、 4 で 2 時間攪拌後、 1 6 時間静置保存する。この溶液を 0 . 1 5 M N a C l を含むリン酸緩衝液 p H 7 . 2 に対して透析後、 S e p h a c r y l S - 2 0 0 ( フアルマシア社 ) カラムでゲル濾過を行う。ゲル濾過したフラクションの第一ピークを集め、 2 5 % ウサギ血清 ( 日本生物材料 ) を含む 0 . 2 M リン酸二ナトリウム緩衝液 p H 5 . 4 で希釈し、 H R P 標識抗チトクロム C 抗体 F ( a b ' )<sub>2</sub> 液 ( 標識抗体液 ) とする。

#### 4 ) 抗チトクロム C 抗体固相化カップの作製

1 ) で得られた I g G 精製物を、 0 . 0 1 M トリス塩酸緩衝液 p H 7 . 5 で吸光度 0 . 1 に調整する。この抗体溶液を、ポリスチレンカップに 1 0 0 μ l 注入し 4 で 1 6 時間反応させた後、 E I A 法専用洗浄機によって 0 . 1 5 M N a C l 及び 0 . 0 1 % T w e e n 2 0 を含む 0 . 0 1 M トリス塩酸緩衝液 p H 7 . 5 で 3 回 ( 各 4 秒間 ) 洗浄する。洗浄したカップに、 0 . 5 % ウシアルブミンを含む 0 . 0 1 M トリス塩酸緩衝液 p H 7 . 5 を 2 0 0 μ l 加え、再度 4 で 1 6 時間反応させ固相化カップとする。

#### 5 ) 標準抗原の調製

ラットのチトクロム C ( シグマ社 ) を、 2 % B S A 、 0 . 0 1 M E D T A 2 N a 、 0 . 1 % N a N<sub>3</sub> 、 0 . 0 1 % T w e e n 2 0 及び 0 . 1 5 M N a C l を含む 0 . 0 5 M トリス緩衝液 p H 7 . 5 で希釈し、 5 0 n g / m l ~ 0 . 0 5 n g / m l の希釈液を作製する。

#### 6 ) 測定

抗チトクロム C 抗体を固相化したカップ中のウシアルブミン液を吸い取り、全カップに、 2 % B S A 、 0 . 0 1 M E D T A 2 N a 、 0 . 1 % N a N<sub>3</sub> 、 0 . 0 1 % T w e e n 2 0 及び 0 . 1 5 M N a C l を含む 0 . 0 5 M トリス緩衝液 p H 7 . 5 を 5 0 μ l 注入する。そのカップに標準抗原希釈液及び検体を 5 0 μ l 加え、室温 ( 2 0 ~ 3 0 ) で 1 時間反応させる。反応後、 E I A 専用洗浄機を用い、 0 . 0 1 % T w e e n 2 0 、 0 . 0 0 1 5 M N a C l 、 0 . 0 0 1 5 % パラオキシ安息香酸メチル及び 0 . 0 0 5 % 2 - クロロアセトアミドを含む 0 . 0 0 5 M トリス緩衝液 p H 7 . 5 で 3 回 ( 各 4 秒間 ) 洗浄する。洗浄後、標識抗体液を 1 0 0 μ l 加え室温 ( 2 0 ~ 3 0 ) で 1 時間反応させる。反応後、 E I A 専用洗浄機を用い 0 . 0 1 % T w e e n 2 0 、 0 . 1 5 M N a C l 、 0 . 0 0 1 5 % パラオキシ安息香酸メチル及び 0 . 0 0 5 % 2 - クロロアセトアミドを含む 0 . 0 0 5 M トリス緩衝液 p H 7 . 5 で 3 回 ( 各 4 秒間 ) 洗浄する。洗浄後、 1 . 5 m g / m l の A B T S ( 2 , 2 - アジノ - ビス - ( 3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 ) ) を含む 0 . 1 M クエン酸緩衝液 p H 4 . 2 を 1 0 0 μ l 加え室温 ( 2 0 ~ 3 0 ) で 1 時間反応させ、次いで 0 . 0 1 3 % N a N<sub>3</sub> 液を 1 0 0 μ l 加え反応を停止する。発色した溶液の 4 0 5 n m の吸光度を分光光度計で測定する。

#### 7 ) 標準抗原曲線の特性

各濃度のチトクロム C 及び検体の吸光度値からブランクの吸光度値を引く。横軸に標準抗原濃度、縦軸は標準抗原の吸光度をプロットし、標準曲線を描く。その標準抗原曲線を基に、検体中に含まれるチトクロム C 量を計算する。

[ 実施例 2 ] G V H D 、 H P S 及び急性リンパ性白血病患者血清中のチトクロム C の定量  
実施例 1 に記載したチトクロム C の E L I S A 系を用いて、 G V H D 、 H P S 及び急性リンパ性白血病患者並びに健常人の血清中のチトクロム C 量を測定した。

その結果、表 1 に示すように、健常人 1 5 人では全て陰性 ( < 0 . 0 5 n g / m l ) であったが、 G V H D では 6 例中 4 例 ( 6 7 % ) 、 H P S では 4 例中 4 例 ( 1 0 0 % ) 、急性リンパ性白血病患者では 2 例中 2 例 ( 1 0 0 % ) が陽性であった。また H P S では、血中チトクロム C 濃度の高い患者で、予後が悪い傾向が見られた。

アポトーシスが起きていると考えられる患者の血清中では、明らかなチトクロム C 定量値の高値が認められた。

10

20

30

40

表 1

GVHD、HPS及び急性リンパ性白血病患者血清中チトクロムCの定量値

疾患名	血清中チトクロムCの定量値(ng/ml)	
GVHD	1.1	10
	<0.05	
	0.4	
	0.3	
	<0.05	
	0.3	
HPS (VAHSを含む)	3.1	
	22.0	
	38.0	
	2.9	
急性リンパ性白血病	0.4	20
	0.4	
健常人*	<0.05	

\*:健常人15人は全て検出限界以下(<0.05 ng/ml)であった。

また図1にはHPS患者血清中の、LDH、AST、ALT、フェリチン及びチトクロムCの値の推移を示した。チトクロムCはLDHの値とほぼ相関し、更にLDHに先行して推移して、病態の変化を鋭敏に捉える指標として有用であると考えられる。

[実施例3] インフルエンザ脳炎・脳症患者血清中のチトクロムCの定量

実施例1に記載したELISA系を用いて、インフルエンザ患者のうち、高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴った患者の血清中のチトクロムC量を測定した。

図2に、1症例で複数回測定した場合も含めて結果を示す。脳炎・脳症を伴った例では、全27検体(8例)が5ng/ml以上の高値を示し、その中でも17検体が30ng/ml以上の高値を示していた。また、血中チトクロムCの濃度が高い患者で、予後が悪い傾向が見られた。

熱性けいれんを繰り返していた患者の中にやや高値を示す患者がおり、これらの患者については、十分な注意が必要であろうと考えられた。高熱を伴う患者では、高値のチトクロムC定量値を示した患者がいなかった。

また図3には、インフルエンザ脳症を発症した患者の、血中GOT、LDH及びチトクロムCの値の推移を示す。チトクロムCはLDHに先行して上昇及び下降し、チトクロムCが脳症のインフルエンザ脳症の病態を反映する、先行指標として有用であることが示された。

[実施例4] インフルエンザ脳炎・脳症患者血清中の各種サイトカイン濃度

高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴ったインフルエンザ患者の血清中の、E-セレクトイン(selectin)、可溶性トロンボモジュリン(soluble thrombomodulin)(sTM)、腫瘍壊死因子(TNF)、Fas、FasL及びチトクロムCの濃度を定量した。E-セレクトインはsE-セレクトインELISAキット(version 2、Bender med systems社製)、sTMはTMテスト(Teijin Diagnostics社製)、TNFはヒトTNF- サイトスクリーン

10

20

30

40

50

イムノアッセイキット ( Bioscience International 社製 )、Fas は sFas ELISA キット、FasL は sFas リガンド ELISA キット ( 共に Medical and Biological Laboratories 社製 ) にて測定し、チトクロム C は実施例 1 に記載した ELISA 系を用いて測定した。

図 4 に示すように、どのサイトカインも脳炎・脳症患者血清中で高値を示す例が増加したが、チトクロム C が脳炎・脳症で最も顕著に増加し、脳炎・脳症の鑑別にはチトクロム C が最も適していることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明により、体液中のチトクロム C を定量するのに適した免疫化学的方法が提供される。また、チトクロム C は生体内で起こっている細胞死の良い指標であり、病態を早くと

10

【図面の簡単な説明】

図 1 は、HPS 患者血清中の LDH、AST、ALT、フェリチン及びチトクロム C ( Cyto - C ) の値の推移を示す。

図 2 は、高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴うインフルエンザ患者血清中のチトクロム C 量を示す。

図 3 は、インフルエンザ脳症を発症した患者血中の GOT、LDH 及びチトクロム C の値の推移を示す。

20

図 4 は、高熱、熱性けいれん及び脳炎・脳症を伴うインフルエンザ患者血清中の各種サイトカイン量を示す。

【 図 1 】

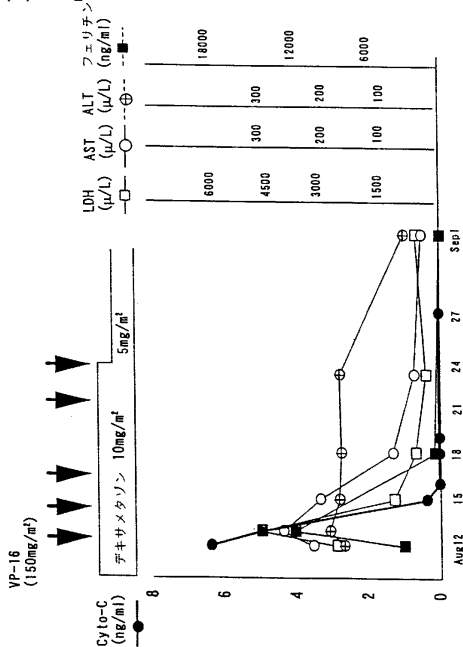


図 1

【 図 2 】

熱性痙攣と脳炎・脳症の鑑別

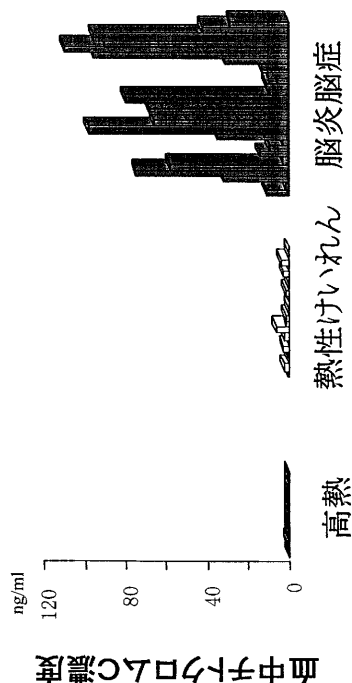


図 2

### 入院一週間の経過

【 図 3 】

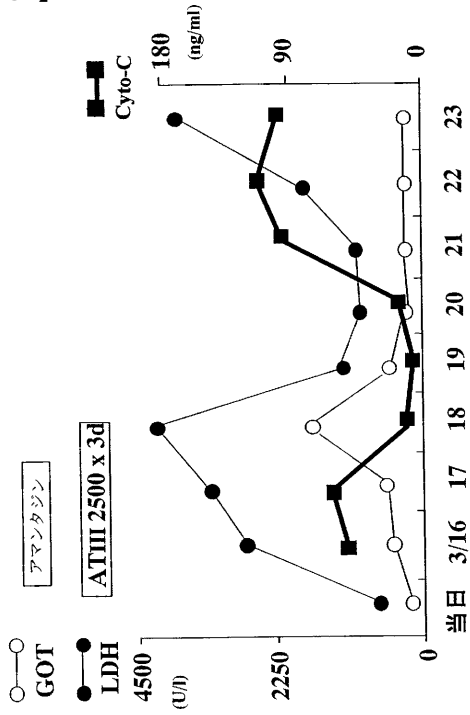


図 3

【 図 4 】

### インフルエンザ重症度と各サイトカイン濃度

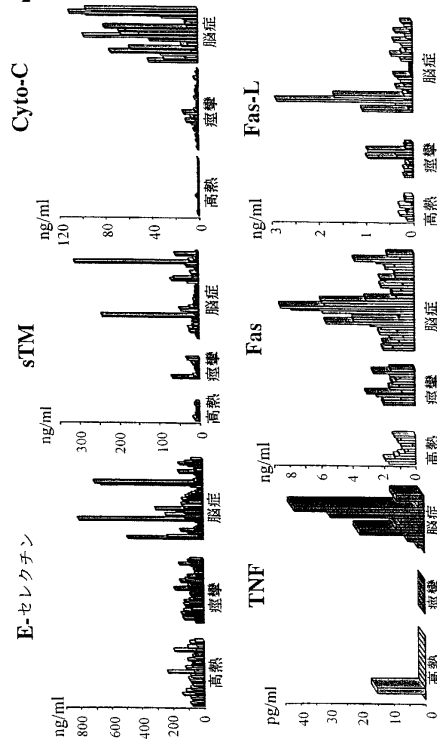


図 4

---

フロントページの続き

- (72)発明者 布井 博幸  
日本国宮崎県宮崎市学園木花台北2丁目5-2
- (72)発明者 渡辺 啓祐  
日本国茨城県つくば市吉沼3495-7

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特開平03-257367(JP,A)  
国際公開第98/002579(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	检测细胞死亡和检测试剂的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP3869722B2</a>	公开(公告)日	2007-01-17
申请号	JP2001536573	申请日	2000-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
[标]发明人	遠藤 文夫 足立 尚登 布井 博幸 渡辺 啓祐		
发明人	遠藤 文夫 足立 尚登 布井 博幸 渡辺 啓祐		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/26		
CPC分类号	G01N33/50 C12Q1/26 G01N33/68 G01N2333/795 G01N2510/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/68		
代理人(译)	川口 义行 远山 勉		
优先权	1999316475 1999-11-08 JP 2000274257 2000-09-11 JP		
其他公开文献	JPWO2001035093A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

定量体液中的细胞色素C，包括基于定量值检测细胞死亡，检测细胞死亡的方法，通过夹心法定量体液中细胞色素C的方法以及细胞色素C 细胞色素C测定试剂，通过抗体夹心抗体定量检测体液中的细胞色素C。

【 図 2 】

熱性痙攣と脳炎・脳症の鑑別

