

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第4195492号  
(P4195492)

(45) 発行日 平成20年12月10日(2008.12.10)

(24) 登録日 平成20年10月3日(2008.10.3)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/573</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/573	A
<b>GO 1 N 33/577</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/577	B
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z N A A

請求項の数 7 (全 15 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2007-230190 (P2007-230190)</p> <p>(22) 出願日 平成19年9月5日(2007.9.5)</p> <p>審査請求日 平成20年1月31日(2008.1.31)</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号</p> <p>(74) 代理人 100080791 弁理士 高島 一</p> <p>(72) 発明者 廣畑 聡 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 国立 大学法人岡山大学 大学院医歯薬学総合 研究科内</p> <p>(72) 発明者 臼井 真一 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 国立 大学法人岡山大学 大学院保健学研究科内</p> <p>(72) 発明者 草地 省蔵 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 国立 大学法人岡山大学 大学院保健学研究科内 最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 急性虚血性疾患の診断薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の工程：

(1) 急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液と、ADAMTS-1を認識する抗体とを接触させる工程；および

(2) 上記工程(1)で形成された複合体を検出する工程；

を含むことを特徴とする、対象におけるADAMTS-1を検出する方法。

【請求項2】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

急性虚血性疾患が、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、虚血性肺疾患、腎梗塞、急性腸間膜動脈閉塞症、急性動脈閉塞症、網膜動脈閉塞症および網膜静脈閉塞症から選択される少なくとも一つの疾患である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

ADAMTS-1を認識する抗体を含む、急性虚血性疾患診断用キット。

【請求項5】

ADAMTS-1を認識する抗体を有効成分とする、急性虚血性疾患診断薬。

【請求項6】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項4記載のキットまたは請求項5記載の診断薬。

【請求項7】

急性虚血性疾患が、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、虚血性肺疾患、腎梗塞、急性腸間膜動脈閉塞症、急性動脈閉塞症、網膜動脈閉塞症および網膜静脈閉塞症から選択される少なくとも一つの疾患である、請求項4～6のいずれか一項に記載のキットまたは診断薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、急性虚血性疾患の診断薬に関する。詳しくは、急性虚血性疾患が疑われる対象の血液中のバイオマーカーを検出する方法、ならびに当該方法に供される急性虚血性疾患診断用キットおよび診断薬に関する。

10

【背景技術】

【0002】

急性虚血を的確に診断することは、初期段階でしか有効な治療法が存在しない、心筋梗塞や脳梗塞といった急性虚血性疾患を治療するために極めて重要なことである。従来、心筋梗塞の診断には、クレアチンキナーゼ（以下CKと記載）、トロポニン-T（以下TnTと記載）、および心臓由来脂肪酸結合蛋白質（以下H-FABPと記載）の発現の亢進が指標とされている（非特許文献1参照）。これらの蛋白質は心筋の収縮蛋白質や細胞膜蛋白質であって、急性虚血による心筋障害の結果として血中に逸脱する（以下これらをまとめて、心筋逸脱酵素と記載する）。

【0003】

20

上記のとおり、心筋逸脱酵素は心筋梗塞のバイオマーカーとして汎用されている。しかしながらCKやTnTは、心筋梗塞発症から6時間以降では感度も特異性も極めて高いが、急性期の診断においては陽性率が低い。一方、H-FABPは発症1.5時間で陽性を示すが、虚血性以外の心不全でも陽性を示すなど偽陽性が多く、疾患原因を早期に確定する目的には適用しにくい。

【0004】

急性心筋梗塞後の治癒過程において、細胞外マトリックス（ECM）が重要な役割を果たしていることが知られている。ECM分子が集積と分解の間で劇的に変化することで心筋梗塞後の心筋リモデリングがなされており、そしてプロテアーゼやそのインヒビター、増殖因子などの多様な生物学的物質がECM再構成に関与していることが報告されている。

30

【0005】

また心筋梗塞後の心筋リモデリングには、側副血管の形成および発生（血管新生）も影響を与えることから、急性心筋梗塞における血管新生増殖因子の役割も注目されている。血管内皮細胞増殖因子（VEGF）は、血管内皮ミトジェンであり、血管新生に関与すると考えられている。VEGFは冠状動脈の結紮後1時間以内に発現が亢進する。

【0006】

ADAMTS（A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs）は、近年発見されたMMPである。ADAMTSは通常の組織では発現が認められないが、LPS刺激により誘導され、MMPよりも広範な種々の基質を認識する。

40

【0007】

また、ADAMTSはECMを分解するだけでなく、血管新生阻害剤として機能することが報告されている。例えば、ADAMTS-1および8は抗血管新生作用を有することが報告されており（非特許文献2参照）、ADAMTS-1はFGF-2により誘導される血管形成を抑制し、かつVEGFにより誘導される血管新生を阻害することが報告されている。さらにADAMTS-1はVEGFに結合し、その受容体であるVEGFR2のリン酸化を阻害することが知られている（非特許文献2参照）。

【0008】

50

これらの知見に基づいて、本発明者らは、ADAMTSが急性心筋梗塞に関与しているとの仮説を立て、ラットの心筋梗塞モデルにおいて、ADAMTS-1が心筋梗塞部および辺縁部の主に血管内皮細胞や心筋細胞において高発現していることを見出した（非特許文献3および4参照）。

【非特許文献1】Circ. J. 2006 Apr; 70(4): 419-25.

【非特許文献2】J. Biol. Chem., 1999 Aug 13; 274(33): 23349-23357.

【非特許文献3】Connective Tissue, 34, 87(2002)

【非特許文献4】J. Biochem. 136, 439-446(2004)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、早期診断が疾患の治療や予後に大きく影響する心筋梗塞等の急性虚血性疾患を、発症の初期の段階で検出可能な手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討し、MMPの一種であるADAMTSが心筋梗塞患者の発症の初期において血液中に分泌されること、および急性虚血を伴わない患者の血液には分泌されないことを検証した。その結果、ADAMTSが急性虚血の新規バイオマーカーとなりうることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本発明は以下のとおりである。

[1] 下記の工程：

(1) 急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液と、ADAMTSを認識する抗体とを接触させる工程；および

(2) 上記工程(1)で形成された複合体を検出する工程；

を含むことを特徴とする、対象におけるADAMTSを検出する方法。

[2] ADAMTSがADAMTS-1である、[1]記載の方法。

[3] 抗体がモノクローナル抗体である、[1]または[2]記載の方法。

[4] 急性虚血性疾患が、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、虚血性肺疾患、腎梗塞、急性腸間膜動脈閉塞症、急性動脈閉塞症、網膜動脈閉塞症および網膜静脈閉塞症から選択される少なくとも一つの疾患である、[1]～[3]のいずれか一に記載の方法。

[5] ADAMTSを認識する抗体を含む、急性虚血性疾患診断用キット。

[6] ADAMTSがADAMTS-1である、[5]記載のキット。

[7] ADAMTSを認識する抗体を有効成分とする、急性虚血性疾患診断薬。

[8] ADAMTSがADAMTS-1である、[7]記載の診断薬。

[9] 抗体がモノクローナル抗体である、[5]～[8]のいずれか一に記載のキットまたは診断薬。

[10] 急性虚血性疾患が、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、虚血性肺疾患、腎梗塞、急性腸間膜動脈閉塞症、急性動脈閉塞症、網膜動脈閉塞症および網膜静脈閉塞症から選択される少なくとも一つの疾患である、[5]～[9]のいずれか一に記載のキットまたは診断薬。

【発明の効果】

【0012】

本発明の検出方法は、ADAMTSが急性虚血時にのみ一過的に血液中に分泌される急性虚血のバイオマーカーであり、慢性虚血などの他の虚血状態では分泌されないことの発見に基づくものである。本発明の検出方法によれば、対象が急性虚血性疾患に罹患しているか否かを発症の初期に判別することができる。またこの方法はこれまでに汎用されてきた心筋逸脱酵素による検出方法と異なり、偽陽性を示すことなく、急性期の段階で治療方針を定めることを可能にする強力な診断ツールとなり得る。

10

20

30

40

50

## 【0013】

本発明の検出方法によれば、検出対象をADAMTSとするため、心臓を始めとする様々な組織における急性虚血に伴って血液中に分泌されたADAMTSも簡便かつ迅速に検出可能である。従って、この検出結果を利用することにより、心筋梗塞のみならず、脳梗塞、肺梗塞等の緊急を要する疾患を急性期の段階で判定することができる。

## 【0014】

本発明の検出方法を利用することで、ADAMTSの血中濃度を測定することができる。そして、他の虚血性疾患マーカーとの組合せによって、急性虚血性疾患を発症してから時間や、疾患の重篤度などを予想することも可能となる。

## 【0015】

さらに、本発明の診断用キットおよび診断薬は、上記した本発明の検出方法に適するツールとなり得、急性虚血性疾患に罹患しているか否かを簡便、迅速かつ高精度に診断することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

1. ADAMTSを検出する方法

本発明のADAMTSの検出方法は、下記の工程：

(1) 急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液と、ADAMTSを認識する抗体とを接触させる工程；および

(2) 上記工程(1)で形成された複合体を検出する工程；を含むことを特徴とする。

## 【0017】

工程(1)

工程(1)は、急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液と、ADAMTSを認識する抗体とを接触させ、複合体を形成させる工程である。

## 【0018】

本明細書中、「急性虚血性疾患」とは、血管の閉塞、硬化、痙攣や、血液循環障害などによって急激に組織への血液供給が途絶え、低酸素状態になることで発生する疾患をいう。

「急性虚血性疾患」としては、具体的には、虚血性心疾患（不安定狭心症、心筋梗塞、急性冠症候群など）、虚血性脳疾患（脳梗塞、TIAなど）、虚血性肺疾患（肺梗塞など）、腎梗塞、急性腸間膜動脈閉塞症、急性動脈閉塞症、網膜動脈閉塞症、網膜静脈閉塞症、虚血性腸疾患（虚血性大腸炎など）などが挙げられる。

## 【0019】

工程(1)における対象は、急性虚血性疾患に罹患しているか否かを判別しようとする対象、具体的には動物を意味する。該動物としては急性虚血性疾患に罹患する可能性がある動物であれば特に限定されず、血管を有する全ての動物が挙げられるが、なかでも、マウス、ラット、モルモットおよびウサギ等の実験動物、イヌおよびネコ等のペット、ウシ、ブタおよびニワトリ等の家畜、ならびにヒトが好ましく、特にヒトが好ましい。

## 【0020】

本発明における「ADAMTS」とは、蛇毒メタロプロテアーゼおよびディスインテグリンの各ドメインを合わせもつ酵素(ADAM)であって、さらにトロンボスポンジンドメインを有することを特徴とする分泌型ADAMのことをいう。ADAMTSは、これまでの研究で19種類が同定されている。

本発明におけるADAMTSとしては特に限定されず、公知のADAMTSおよび将来発見されるADAMTSのいずれも対象とするが、なかでもADAMTS-1およびADAMTS-9が好ましく、ADAMTS-1がより好ましい。

## 【0021】

ADAMTS、特にADAMTS-1は、急性虚血の際、血管内皮細胞によって発症後

10

20

30

40

50

短時間で血液中に分泌されるため、対象が急性虚血性疾患に罹患しているか否かを速やかに判別するためのバイオマーカーとして適している。従って、本発明のADAMTSを検出する方法では、急性虚血性疾患が疑われる対象由来の「血液」を検出サンプルとして用いることを特徴とする。

【0022】

工程(1)で使用する「急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液」としては、いかなる組織由来の血液も想定することができる。このような組織としては、例えば、脳、心臓(循環器系器官)、肺(呼吸器系器官)、腸(消化器系器官)、肝臓、腎臓、脾臓等が挙げられ、その組織中に血管が存する限り特に限定されない。

【0023】

血液は、上記組織中、またはその近傍の組織由来の血管から採取することが好ましいが、急性虚血に陥った組織以外の組織において通常の血液循環が成されている限り、対象内に存在するいずれの血管から血液を採取しても構わない。血液の採取方法としては、自体公知の方法が適用できる。

また採取した血液はそのまま本工程に用いてもよいが、自体公知の方法、例えば遠心分離、濾過などを利用して細胞成分(赤血球、白血球、血小板など)を分離した液体成分(血漿)として本工程に用いることが好ましい。また血液を凝固させて血小板や凝固因子を分離した液体成分(血清)として本工程に用いることも好ましい。本明細書において、「血液」とは、上記操作で得られた血漿、血清なども含む概念である。

【0024】

このようにして得られた対象由来の血液と、ADAMTSを認識する抗体とを接触させて、複合体を形成させる。

【0025】

本明細書中、「ADAMTSを認識する抗体」としては、ADAMTSに結合する能力があればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。当該抗体としては、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、あるいは $Fab$ 画分などのフラグメントも含む。これらの抗体としては、免疫原としてADAMTS、好ましくはADAMTS-1を用いて自体公知の方法により調製した抗体を用いることができるし、市販の抗体を用いることもできる。抗原として組換えADAMTS-1を用いる場合、組換えADAMTS-1は、例えば以下の方法で作製することができる。

【0026】

ADAMTS-1をコードする遺伝子(GeneBank番号:NM\_006988)を適切なベクターに組み込み、これを適切な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換の培養上清から目的とする組換えADAMTS-1を得ることができる。上記宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、植物又は動物細胞などを用いることができる。

【0027】

また、これらの抗体は直接的または間接的に標識物質により標識されていてもよい。標識物質としては、蛍光物質(例、FITC、ローダミン)、放射性物質(例、 $^{14}C$ 、 $^3H$ )、酵素(例、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ)、着色粒子(例、金属コロイド粒子、着色ラテックス)が挙げられる。

【0028】

このような抗体であれば、本工程において1種だけの抗体を用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

【0029】

上記「ADAMTSを認識する抗体」は、他に何も結合していない可溶性の状態を用いることも可能であるが、固相に結合していることが好ましい。かかる「固相」としては、プレート(例、マイクロウェルプレート)、チューブ、ビーズ(例、プラスチックビーズ、磁気ビーズ)、クロマトグラフィー用担体(例、Sephrose(商標))、メン

10

20

30

40

50

ブレン（例、ニトロセルロースメンブレン、PVD F膜）、ゲル（例、ポリアクリルアミドゲル）、金属膜（例、金膜）などが挙げられる。なかでも、プレート、ビーズ、メンブレンおよび金属膜が好ましく用いられ、取り扱いの簡便性からプレートが最も好ましく用いられる。上記結合としては、共有結合、イオン結合、物理的吸着などが挙げられ、特に限定されないが、共有結合および/または物理的吸着が十分な結合強度を得られるため好ましい。また固相への結合は、固相に直接結合してもよいし、自体公知の物質を利用して間接的に固相に結合していてもよい。例えば、金膜に抗体を結合させる場合、4,4'-ジチオジブチル酸（DDA）のチオール基と金との特異的結合を利用し、金表面に自己組織化単分子膜を形成させ、次いで固定化されたDDA末端のカルボキシル基に水溶性カルボジイミドとN-ヒドロキシコハク酸イミドを添加することにより形成した活性エステル基を抗体のアミノ基と結合させることにより、金膜に抗体を結合させることができる。

10

さらに、非特異的吸着や非特異的反応を抑制するために牛血清アルブミン（BSA）や牛ミルク蛋白等のリン酸緩衝溶液を固相と接触させ、抗体によってコートされなかった固相表面部分を前記BSAや牛ミルク蛋白等でブロックすることが一般に行われる。

#### 【0030】

本工程における「ADAMTSを認識する抗体」と、急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液に含まれる「ADAMTS」との接触は、反応容器中において、当該血液と、ADAMTSを認識する抗体とを混合することでこれらが相互作用できる方法であれば、態様、順序、具体的方法などは特に限定されない。接触は、例えば「ADAMTSを認識する抗体」が固相化されたプレートに当該血液を添加することでなされる。

20

#### 【0031】

なお、かかる接触を保つ時間は、前記ADAMTSを認識する抗体と、急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液に含まれるADAMTSとが結合して複合体を形成するのに十分な時間であれば特に限定されないが、通常、数秒～十数時間であり、速やかに急性虚血性疾患であるか否かを判定する観点から、好ましくは1分～2時間であり、最も好ましくは2分～30分である。また、接触を行なう温度条件としては、通常4～50であり、4～37が好ましく、15～30程度の室温が最も好ましい。さらに、反応を行なうpH条件は、5.0～9.0が好ましく、特に6.0～8.0の中性域が好ましい。

#### 【0032】

30

#### 工程（2）

工程（2）は、上記工程（1）で形成された複合体を検出することで、上記血液中にADAMTSが存在するか否かを判定する工程である。

#### 【0033】

上記検出は、複合体に含まれる「ADAMTS」または「ADAMTSを認識する抗体」を検出することによりなされる。

この検出には、酵素免疫測定法（EIA法）、イムノクロマト法、ラテックス凝集法、放射免疫測定法（RIA法）、蛍光免疫測定法（FIA法）、ルミネッセンス免疫測定法、表面プラズモン共鳴測定法（SPR法）などを利用することができる。これらの中でも、EIA法、イムノクロマト法、FIA法およびSPR法が操作の容易性および迅速性の観点からして好適である。

40

#### 【0034】

工程（2）の検出方法としてEIA法を選択した場合は、EIA法が、2種類の「ADAMTSを認識する抗体」を用いたサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法（サンドイッチELISA法）であるのが好ましい。このようなサンドイッチELISA法は、2種類の抗体を用いることから抗原に対する特異性が優れている。

#### 【0035】

サンドイッチELISA法を実施するための2種類の「ADAMTSを認識する抗体」は、モノクローナル抗体同士の組合せ、ポリクローナル抗体同士の組合せ、またはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組合せのいずれであってもよい。

50

## 【0036】

サンドイッチELISA法的一种としてアビジン-ビオチン反応を利用した方法が適用可能である。この方法では、例えば血漿または血清中のADAMTSを、固相化した任意の「ADAMTSを認識する抗体」でもって捕捉し、捕捉されたADAMTSとビオチンで標識した「ADAMTSを認識する抗体」との間で抗原抗体反応を行わせる。かかる反応に要する時間は、迅速な測定が必要である観点から、好ましくは1分～2時間であり、より好ましくは2分～30分である。次に酵素標識ストレプトアビジンを加えて、アビジン-ビオチン反応を行わせる。かかる反応に要する時間は、迅速な測定が必要である観点から、好ましくは5分～1時間であり、より好ましくは15分～30分である。次いでこの酵素を検出することで、ADAMTSを検出する。

10

上記したビオチン標識「ADAMTSを認識する抗体」は、ビオチンと、「ADAMTSを認識する抗体」とを自体公知の方法により結合させることにより製造することができる。例えば、市販のビオチン標識化キットを使用して、ビオチンと「ADAMTSを認識する抗体」とを結合させることができる。酵素標識ストレプトアビジンは、市販のものを好ましく使用することができる。

## 【0037】

また、酵素標識抗体を利用したサンドイッチELISA法も適用可能である。この方法では、例えば血液中のADAMTSを、固相化した任意の「ADAMTSを認識する抗体」でもって捕捉し、捕捉されたADAMTSと酵素標識した「ADAMTSを認識する抗体」との間で抗原抗体反応を行わせる。かかる反応に要する時間は、迅速な測定が必要である観点から、好ましくは1分～2時間であり、より好ましくは2分～30分である。次いでこの酵素を検出することで、ADAMTSを検出する。

20

酵素標識抗体は、酵素と「ADAMTSを認識する抗体」とを自体公知の方法、例えば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより結合(標識)させることにより製造することができる。

## 【0038】

さらに、汎用性の観点から2次抗体を利用したサンドイッチELISA法も適用可能である。この方法では、例えば血液中のADAMTSを、固相化した任意の「ADAMTSを認識する抗体」でもって捕捉し、捕捉されたADAMTSと、固相化した抗体とは異なる動物種由来の「ADAMTSを認識する抗体」(この段落中、1次抗体と記載する)との間で抗原抗体反応を行わせる。かかる反応に要する時間は、迅速な測定が必要である観点から、好ましくは1分～2時間であり、より好ましくは2分～30分である。例えば、固相化した「ADAMTSを認識する抗体」がウサギ由来であれば、1次抗体としてはウサギ以外の動物種由来、例えばマウス由来の抗体で反応を行う。次いで1次抗体と、酵素標識した「1次抗体のIgドメインを認識する抗体」(この段落中、2次抗体と記載する)との間で抗原抗体反応を行わせる。かかる反応に要する時間は、迅速な測定が必要である観点から、好ましくは1分～2時間であり、より好ましくは2分～30分である。最後にこの酵素を検出することで、ADAMTSを検出する。酵素標識2次抗体は、市販のものを好ましく用いることができる。

30

## 【0039】

酵素標識ストレプトアビジンおよび酵素標識抗体における「酵素」としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼなどが例示される。

40

## 【0040】

酵素の検出に用いられる基質剤としては、選択した標識酵素に応じて適当なものが選ばれる。例えば、酵素としてペルオキシダーゼを選択した場合には、*o*-フェニレンジアミン(OPD)、テトラメチルベンジジン(TMB)などが使用され、アルカリホスファターゼを選択した場合には、*p*-ニトロフェニルホスフェート(PNPP)などが使用される。また、反応停止液、基質溶解液についても、選択した酵素に応じて、従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

50

## 【0041】

サンドイッチELISA法を用いない場合でも、通常のELISA法を適用することで、検出が可能である。例えば工程(1)において対象由来の血液中のADAMTSを上述の方法と同様に固相に結合せしめ、次いで標識した「ADAMTSを認識する抗体」との間で抗原抗体反応を行わせて複合体を形成させる。かかる反応に要する時間は、迅速な測定が必要である観点から、好ましくは1分～2時間であり、より好ましくは2分～30分である。次いで標識に応じた手法を用い、ADAMTSを検出することができる。

## 【0042】

工程(2)の検出方法としてイムノクロマト法を選択した場合、ニトロセルロースメンブレンなどの吸水性基材にライン状に固相化された「ADAMTSを認識する抗体」に対し、メンブレン下部より血液を展開することでADAMTSを捕捉させ、捕捉されたADAMTSと標識した「ADAMTSを認識する抗体」との間で抗原抗体反応を行わせる。かかる反応に要する時間は、迅速な測定が必要である観点から、好ましくは1分～2時間であり、より好ましくは2分～30分である。標識に応じた手法を用い、ADAMTSを検出することができる。

10

## 【0043】

イムノクロマト法を実施するための2種類の「ADAMTSを認識する抗体」も、モノクローナル抗体同士の組合せ、ポリクローナル抗体同士の組合せ、またはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組合せのいずれであってもよい。

## 【0044】

工程(2)の検出方法としてFIA法を選択した場合、上記EIA法で用いた「ADAMTSを認識する抗体」に結合した酵素を蛍光物質と置換した抗体を用い、上記した方法と同様のサンドイッチELISAを行う。次いで、蛍光物質を市販の測定機器や、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡などを用いて検出することで、ADAMTSを検出する。

20

蛍光物質としては、APC、PE、Cy2、Cy3、Cy5、ECD、FITC、PerCP、Alexa(登録商標)Fluor、フルオレセイン、ローダミンなどの化学物質を好ましく利用することができる。当該化学物質は、自体公知の方法で抗体に標識することができる。

## 【0045】

工程(2)の検出方法としてSPR法を選択した場合、あらかじめADAMTSを認識する抗体を固相化した金属膜(センサチップ)表面での、抗体と、金属膜表面にフローした血液中のADAMTSとの相互作用を、表面プラズモン共鳴の経時変化として検出する。SPR法を実施する場合は、センサチップとなる金属膜へ固相化する「ADAMTSを認識する抗体」は1種類でよく、モノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよい。また、SPRの検出に利用する測定機器としては、市販の測定機器を好ましく用いることができる。

30

## 【0046】

一具体例として、EIA法を適用する場合には、急性虚血性疾患が疑われる患者から採取した血液を室温で一定時間振盪した後、遠心分離して血漿を得る。次にこの血漿を、任意の「ADAMTSを認識する抗体」を固相化したマイクロプレートに分注し、室温で一定時間放置する。プレートを洗浄して未反応の抗原を除去した後、ビオチン化した上記抗体溶液をプレートに分注し、一定時間放置して複合体を形成する。更にプレートを洗浄して未反応の抗体を除去した後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液をプレートに分注し、室温で一定時間反応させる。プレートを洗浄した後、TMBなどの発色基質溶液と反応させて複合体の検出を行う。すなわちTMB溶液での反応後に発色が認められた場合、その血液中にはADAMTSが存在していると判断でき、またその血液を有する患者は急性虚血性疾患に罹患していると判断できる。

40

## 【0047】

別の具体例としてイムノクロマト法を適用する場合には、上記血漿または生理食塩水などで希釈した血漿を試験片に浸して展開させる。試験片は、短冊形状の抗体固相化支持体

50



の下端側に粒状標識物保持担体、及び、濾紙からなる液体試料吸収用担体が一端を介して積層され、一方、前記抗体固相化支持体の上端側に濾紙よりなる吸水性担体が一端を介して積層されてなるものである。上記抗体固相化支持体は、ニトロセルロースシート上にADAMTSと抗原抗体反応を行う「ADAMTSを認識する抗体」が固相化されているものである。固相化は、上記抗体溶液をニトロセルロースシート上に塗布し、乾燥することでなされる。固相化された抗体は、展開された血漿中のADAMTSを認識し、ADAMTSと粒状標識された上記抗体との複合体を捕捉することができる。従って、「ADAMTSを認識する抗体」が抗体固相化支持体上に線に固相化されていれば、そのラインが粒状標識により着色することとなり、当該血液にADAMTSが存在していると判断でき、またその血液を有する患者は急性虚血性疾患に罹患していると判断できる。

10

#### 【0048】

##### 2. 急性虚血性疾患診断用キット

本発明は、ADAMTSを認識する抗体を含む、急性虚血性疾患診断用キットを提供する。本発明における「ADAMTSを認識する抗体」は、前記「1. ADAMTSの検出方法」における「ADAMTSを認識する抗体」と同様の方法で調製することができる。

該キット中には、ADAMTSを認識する抗体以外に試薬等が含まれていてもよく、これらの試薬等は、予めADAMTSを認識する抗体と一緒にあっていてもよいし、別々の容器に格納されていてもよい。試薬等としては、処理液や抗体を希釈するための緩衝液、2次抗体、標識物質（例、蛍光色素、酵素）、反応容器、陽性対照（例、組換えADAMTS）、陰性対照、固相、検査プロトコルを記載した指示書などが挙げられる。これらの要素は、必要に応じて予め混合しておくこともできる。該キットを使用することにより、急性虚血性疾患の診断が簡便、迅速かつ高精度となる。

20

#### 【0049】

本発明のキットにおいて、ADAMTSを認識する抗体は、好ましくはADAMTS-1を認識する抗体である。

#### 【0050】

##### 3. 急性虚血性疾患診断薬

本発明は、ADAMTSを認識する抗体を含む、急性虚血性疾患診断薬を提供する。上記「ADAMTSを認識する抗体」は本発明の診断薬における有効成分であり、前記「1. ADAMTSの検出方法」における「ADAMTSを認識する抗体」と同様の方法で調製することができる。

30

#### 【0051】

本発明の診断薬は、ADAMTSを認識する抗体のみからなるものであってもよいし、医薬的に許容される担体を含んでいてもよい。医薬的に許容される担体としては、本発明の診断薬を液剤として調製する場合、製剤素材として慣用されている各種担体、例えば希釈剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤などを含んでいてもよい。さらに抗体の凝集を防ぐために、Tween 20（登録商標）などの界面活性剤を添加するのが好ましい。これらの配合比は、当業者が適宜決定することができる。

#### 【0052】

このようにして調製した診断薬を対象から採取した血液に添加し、ADAMTSを検出することによって、急性虚血性疾患に罹患しているか否かを診断することができる。該診断薬を使用することにより、急性虚血性疾患の診断が簡便、迅速かつ高精度となる。

40

#### 【0053】

本発明の診断薬において、ADAMTSを認識する抗体は、好ましくはADAMTS-1を認識する抗体である。

#### 【実施例】

#### 【0054】

以下、参考例および実施例を示してさらに具体的に本発明を説明する。以下は代表的な参考例および実施例を示すものでこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想

50

を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

【0055】

[参考例1] 低酸素状態の培養細胞におけるADAMTS-1 mRNAの検出

(1) 細胞培養

ヒト冠動脈内皮細胞株(HCAEC)は、10% FCSを含むEBM-2培地(タカラバイオ社製)で、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、10% FCSを含むEBM-2培地(ケンプレックス社製)で、サル腎臓細胞株(COS7)は、10% FCSを含むDMEM培地(シグマ社製)で、心筋細胞株(H9C2)は、10% FCSを含むDMEM培地(シグマ社製)で、ブタ大動脈平滑筋細胞株(SMC)は、10% FCSを含むDMEM培地(シグマ社製)で培養した。

10

【0056】

(2) 低酸素培養とADAMTS-1 mRNAの抽出

$3 \times 10^5$ 個の上記細胞を、サブコンフルエントな状態で炭酸ガス培養器の中で培養し、窒素ガスを充てんすることで低酸素状態(1%  $O_2$ )を作りだした。1時間、3時間、6時間および24時間ずつそれぞれ培養し、各細胞のRNAをAGPC法にて抽出した。

【0057】

(3) ADAMTS-1 mRNA発現量の測定

ADAMTS-1のmRNA発現量は、LightCycler rapid thermal cycler system(Roche社製)を用いたリアルタイムPCR法で測定した。詳細には、mRNAをテンプレートにして、逆転写酵素(Reverse transcriptase, SS-IIIインビトロジェン社)を用いてcDNAを合成した後に、ADAMTS-1特異的プライマーをデザインし、リアルタイムPCR反応を行った。内部標準として チュープリンを用いて、定量化した。

20

【0058】

結果を図1に示す。ADAMTS-1は、低酸素状態の血管内皮細胞で発現が亢進した。特に、HUVECを用いた場合は急性期(1時間~3時間)の低酸素状態において著しく発現が亢進することが分かった。一方、他の組織の細胞では、低酸素状態におけるADAMTS-1の発現量に著しい差異は生じなかった。

Upperプライマー: CACTCTGCGGAAC TTTTGC (配列番号1)

Lowerプライマー: GCATCATCATGTGGCATGTTA (配列番号2)

30

【0059】

[実施例1] ADAMTS-1の検出

(1) 抗体固相化プレートの作製

96ウェルマイクロプレート(ヌンク社製)に、ウサギ抗ADAMTS-1抗体(1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , シグマ社製)を100  $\mu\text{L}$ /ウェルに加え、4℃で一晩静置してプレート表面に抗体を結合させた。0.01% Tween 20含有リン酸緩衝液(PBST)でウェルを2回洗浄後、非特異的なプレートへの吸着や非特異的の反応を抑制するために、2% BSA(シグマ社製)含有リン酸緩衝液を150  $\mu\text{L}$ /ウェルに加え、室温で2時間静置してプレートのブロッキングを行った。次いでPBSTでウェルを3回洗浄して、ADAMTS-1抗体固相化プレートを作製した。

40

【0060】

(2) 組換えADAMTS-1の検出および検量線の作成

組換えADAMTS-1は、市販の組換えADAMTS-1を購入(R&D社)し使用した。(1)で作製したプレートに、前記組換えADAMTS-1溶液(1% BSA-PBST中、pH 7.4)を、濃度を変えて100  $\mu\text{L}$ /ウェルに加え、室温で2時間静置して抗ADAMTS-1抗体と組換えADAMTS-1とが結合した複合体を形成させた。PBSTでウェルを3回洗浄後、マウス抗ADAMTS-1抗体(2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , R&D社製)を100  $\mu\text{L}$ /ウェルに加え、室温で2時間静置して複合体中の組換えADAMTS-1にマウス抗ADAMTS-1抗体を結合させた。PBSTでウェルを3回洗浄後、POD標識した抗マウスIgG抗体(2000倍希釈, MBL社製)を100  $\mu\text{L}$

50

/ウェルで加え、室温で2.0時間静置した。PBSTでウェルを3回洗浄後、TMB溶液を100 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で15分静置して残ったPODを発色させた。

100 $\mu$ L/ウェルの1N塩酸を加えて反応を停止させ、450nmにおける吸光度を測定した。組換えADAMTS-1濃度に対するそれぞれの吸光度をプロットし、検量線を作成した。結果を図2に示す。

【0061】

[実施例2] ヒト血清を検体として用いた、ADAMTS-1の検出

組換えADAMTS-1溶液の代わりに種々の疾患に罹患している患者の血清を検体として用い、実施例1と同様の操作を行って吸光度を測定した。実施例1で作成した検量線に基づき、各患者の血清中のADAMTS-1濃度を算出した。結果を表1に示す。

【0062】

【表 1】

疾患	吸光度	血液	ADAMTS-1濃度 (ng/mL)
安定狭心症	-0.012	血清	-24.0
安定狭心症	-0.008	血清	-16.0
安定狭心症	-0.019	血清	-38.0
胸痛患者	-0.014	血清	-28.0
胸痛患者	-0.020	血清	-40.0
安定狭心症	-0.017	血清	-34.0
胸痛患者	-0.014	血清	-28.0
安定狭心症	-0.013	血清	-26.0
安定狭心症	-0.011	血清	-22.0
胸痛患者	-0.003	血清	-6.0
胸痛患者	-0.021	血清	-42.0
胸痛患者	-0.018	血清	-36.0
胸痛患者	-0.021	血清	-42.0
安定狭心症	-0.014	血清	-28.0
胸痛患者	-0.013	血清	-26.0
胸部不快感	-0.007	血清	-14.0
安定狭心症	-0.020	血清	-40.0
胸痛患者	-0.009	血清	-18.0
安定狭心症	-0.021	血清	-42.0
安定狭心症	-0.014	血清	-28.0
安定狭心症	-0.018	血清	-36.0
安定狭心症	-0.019	血清	-38.0
安定狭心症	-0.018	血清	-36.0
胸痛患者	-0.027	血清	-54.0
胸痛患者	-0.018	血清	-36.0
心筋梗塞	0.089	血清	178.0
心筋梗塞	0.108	血清	216.0
心筋梗塞	0.074	血清	148.0
心筋梗塞	0.095	血清	190.0
心筋梗塞	0.081	血清	162.0
健常者	-0.020	血清	-40.0
健常者	-0.021	血清	-42.0

## 【0063】

健常者、安定狭心症の患者、胸痛患者および胸部不快感を訴える患者におけるADAMTS-1濃度は検出感度以下であったが、心筋梗塞の患者では非常に高濃度のADAMTS-1を示した。従って、血液中のADAMTS-1濃度を指標に、患者が急性虚血性疾患の状態にあるか否かを診断することができる。

10

20

30

40

50

## 【産業上の利用可能性】

【0064】

本発明の検出方法によると、簡易かつ迅速に、急性虚血の新規バイオマーカーであるADAMTSを検出することができる。また、本発明の急性虚血診断用キットや急性虚血診断薬を用いることにより、急性虚血性疾患に罹患しているか否かを簡便、迅速かつ高精度に診断することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】低酸素状態における、各細胞のADAMTS-1 mRNA発現量を示す図である。縦軸は相対強度を示し、横軸は各細胞を低酸素状態においた時間を示す。

10

【図2】吸光度とADAMTS-1濃度との関係を示す検量線である。

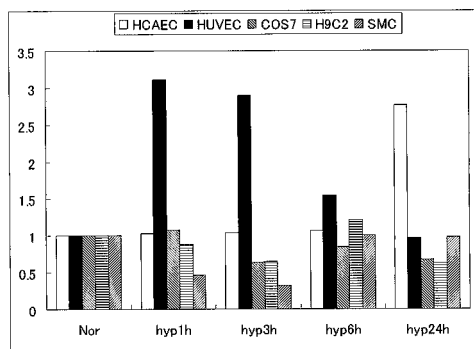
## 【要約】

【課題】簡易かつ迅速に、対象が急性虚血性疾患に罹患しているか否かを判別する方法を提供すること。

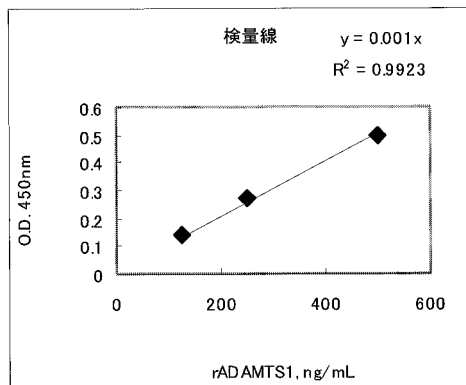
【解決手段】急性虚血性疾患が疑われる対象由来の血液と、ADAMTSを認識する抗体とを接触させ、形成された複合体を検出する。ADAMTSの血中濃度によって、急性虚血性疾患に罹患しているか否か、当該疾患を発症してからの時間、症状の重篤度などを判別することができる。

【選択図】なし

## 【図1】



## 【図2】



【配列表】

0004195492000001.app

---

フロントページの続き

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 国際公開第2005/062054(WO, A1)  
国際公開第2007/094394(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/573

G01N 33/577

C12Q 1/68