

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/123069

発行日 平成24年10月25日 (2012.10.25)

(43) 国際公開日 **平成22年10月28日 (2010.10.28)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 30 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2011-510362 (P2011-510362)	(71) 出願人	000101215 アサマ化成株式会社 東京都中央区日本橋小伝馬町20番3号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/057156	(74) 代理人	110000590 特許業務法人 小野国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成22年4月22日 (2010.4.22)	(72) 発明者	寺戸 国昭 東京都中央区日本橋小伝馬町20番3号 アサマ化成株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2009-105776 (P2009-105776)	(72) 発明者	片山 耕 北海道旭川市豊岡13条4丁目5番17号
(32) 優先日	平成21年4月24日 (2009.4.24)	(72) 発明者	岩附 聡 東京都中央区日本橋小伝馬町20番3号 アサマ化成株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患患者の診断方法、体外診断薬及びその治療剤

(57) 【要約】

本発明は、抗体治療及び/又はエンドトキシン吸収剤治療が効果的に作用する患者の診断方法と、かかる診断に用いる体外診断薬を提供し、このような自己免疫疾患患者のために特に有効な治療剤と治療方法を提供することを目的とするものであり、患者の免疫系細胞に表現されるHLA型のDR座のDR15が陰性の患者を選抜することを特徴とする、抗体治療及び/又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法と、HLA型のDR遺伝子の標識プライマーと、DR15遺伝子に相補な固定相プローブを必須の要素として含んでなるかかる自己免疫疾患の患者の体外診断薬、更には、免疫グロブリン及び/又はエンドトキシン吸収剤を含有する、免疫系細胞に表現されるHLA-DR15が陰性である自己免疫疾患患者用治療剤、およびかかる自己免疫疾患患者に対して該治療剤を経口投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法に関するものである。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者の免疫系細胞に表現される H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性の患者を選抜することを特徴とする、抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法。

【請求項 2】

H L A 型の D R 遺伝子の標識プライマーと、D R 1 5 遺伝子に相補な固定相プローブを用いて D R 1 5 が陰性の患者を選抜することを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法。

【請求項 3】

自己免疫疾患が関節リウマチである、請求項 1 又は 2 に記載の診断方法。

【請求項 4】

H L A 型の D R 遺伝子の標識プライマーと、D R 1 5 遺伝子に相補な固定相プローブを必須の要素として含んでなることを特徴とする抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の体外診断薬。

【請求項 5】

H L A 型の D R 遺伝子の標識プライマーと、D R 1 5 遺伝子に相補な固定相プローブ、および、D R 遺伝子に共通して含まれる遺伝子配列に相補な固定相プローブを必須の要素として含んでなることを特徴とする抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の体外診断薬。

【請求項 6】

自己免疫疾患が関節リウマチである、請求項 4 又は 5 に記載の体外診断薬。

【請求項 7】

免疫グロブリン及び / 又はエンドトキシン吸収剤を含有する、免疫系細胞に表現される H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性である自己免疫疾患患者用治療剤。

【請求項 8】

自己免疫疾患が関節リウマチである、請求項 7 記載の自己免疫疾患用治療剤。

【請求項 9】

免疫グロブリンが抗細菌毒素抗体由来のものである、請求項 7 又は 8 に記載の自己免疫疾患用治療剤。

【請求項 10】

抗細菌毒素抗体が、抗エンドトキシン抗体、抗リピッド A 抗体またはスーパー抗原性を有する細菌毒素に対する抗体のいずれか1種またはそれ以上を含有するものである、請求項 7 乃至 9 のいずれかに記載の自己免疫疾患用治療剤。

【請求項 11】

抗細菌毒素抗体が乳由来の抗体である、請求項 7 乃至 10 のいずれかに記載の自己免疫疾患用治療剤。

【請求項 12】

免疫系細胞に表現される H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性である自己免疫疾患患者に対して、免疫グロブリン及び / 又はエンドトキシン吸収剤を含有する治療剤を経口投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

【請求項 13】

自己免疫疾患が関節リウマチである、請求項 12 記載の自己免疫疾患の治療方法。

【請求項 14】

治療剤の投与量が、1日一人当たりヒト免疫グロブリンとして 10 m g ~ 10 g、乳清蛋白として 1 g ~ 100 g、又はエンドトキシン吸収剤として 10 m g ~ 10 g である、請求項 12 又は 13 記載の自己免疫疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

10

20

30

40

50

本発明は、リウマチなどの自己免疫疾患患者のうち抗体治療等の処置が有効に作用する患者を判別するための自己免疫疾患患者の診断方法とこの診断に用いる体外診断薬、及びかかる患者のために使用する自己免疫疾患治療剤及びその治療法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫機構は、外来微生物はもとより、ガンなどの異常細胞も含めて正常な自己成分とは異なる異物性を識別し、免疫反応してこれらを攻撃・排除することにより、生体の恒常性を維持する機構である。したがって、自己の成分に対しては免疫が成立しないのが正常と考えられている。しかし、正常な免疫機構がバランスを失って失調をきたし、自己成分に対して攻撃・排除するに至ると、多種の難治性疾患を発症する。これらの疾患は総称して、自己免疫疾患といわれ、関節リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性胃炎、自己免疫性腎炎、内耳自己免疫病、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性甲状腺炎、1型糖尿病、全身性エリテマトーデス、多発性皮膚筋炎、乾癬、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、ギランバレー症候群などが知られている。

10

【0003】

また、自己免疫病は、自己に対する免疫応答のほかに、腸内細菌由来の毒素であるエンドトキシンやエンテロトキシンが消化管のバリアーを通過して体内に移行することによって病気の発症や増悪が引き起こされるとも言われている。

【0004】

関節リウマチは、自己免疫病の中でも最も患者数が多い疾患である。本発明者らは、関節リウマチの予防・治療に資するため、病因の解明をおこなった。関節リウマチの病因は、内的要因として、患者の遺伝的要因が、外的要因として、食物中の異種動物由来のII型コラーゲン、およびエンドトキシン、エンテロトキシンの消化管からの吸収が原因となっているという考えのもとに研究を行なった。

20

【0005】

II型コラーゲンは関節軟骨を構成するコラーゲンで、皮膚、骨、血管のI型コラーゲンとは免疫学的にも抗原性が異なり、関節リウマチ患者においてはII型コラーゲンに対する抗体が多く見出されることから、関節リウマチにおける自己免疫の抗原であると考えられている（非特許文献1参照）。鶏、ウシなどのII型コラーゲンとヒトII型コラーゲンの間には、それぞれの抗体による交差反応が見られることから免疫学的に構造が類似している。

30

【0006】

この仮説の検証のために、マウスにおけるコラーゲン関節炎に関して、類似抗原およびエンドトキシンの関節炎誘発活性について、マウスを用いて検討した。DBA/1系マウスはII型コラーゲン関節炎を容易に発症する遺伝形質を有するマウスである。このマウスに、ニワトリ由来II型コラーゲン、あるいは熱変性させたものを経口的に与えると、マウスの血液中にはマウスのII型コラーゲンに対する抗体が産生されるとともに、関節炎が発症した。この関節炎はエンドトキシン（別称「リポポリサッカライド」または「LPS」という。）の併用で増悪した。またニワトリ由来II型コラーゲンを除いた、エンドトキシンのみの長期投与でも関節炎を発症した（非特許文献2参照）。

40

【0007】

エンドトキシンが関節リウマチ以外の自己免疫病にも、発症に関わっていることに関しては、自己免疫性溶血性貧血（例えば、非特許文献3参照）、自己免疫性胆管炎（例えば、非特許文献4参照）などに報告されている。即ち、エンドトキシンが関節リウマチ以外の自己免疫疾患に共通して疾患の発症に係っていることは、文献的にも支持されている。

【0008】

エンドトキシン、すなわち消化管内細菌毒素はグラム陰性菌の菌体外膜の構成成分の一つであり、科学的にはリピッドAと多糖体部分より構成され、LPSと略称される。LPSはエンドトキシンショックとして知られる全身性の反応を引き起こす因子としても知ら

50

れる。LPSの毒性はリピッドA部分にあることが知られている。グラム陰性菌で主として消化管に寄生する細菌としては、大腸菌、サルモネラ菌、エンテロバクター菌、セラチア菌、シゲラ菌、クレブシエラ菌、緑膿菌、プロテウス菌、エルシニア菌、ハフニア菌、モルガネラ菌、バクテロイデス菌、プレボテラ菌、フソバクテリア菌、ポルフィロモナス菌、レプトトリキア菌、パイロフィラ菌、ベーヨネラ菌、メガスフェラ菌、アシダミノコッカス菌、カンピロバクター菌、ヘリコバクター菌などがある。

【0009】

マクロファージは細胞表面にLPSの受容体を持ち、LPSの結合により活性化され、生体防禦機能の一環として、TNFやIL-6をはじめとする炎症性のサイトカインを放出し、エンドトキシンショックの病態の大きな要因となっている。

10

また、LPSと同様な活性を示す他の細菌毒素として、ブドウ球菌のエンテロトキシン類に代表されるスーパー抗原が知られている。エンドトキシンがグラム陰性菌の菌体の構成成分であるのに対し、エンテロトキシンは、菌が分泌する細菌毒素で、化学的にはたんぱく質である。黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシンは食中毒の原因毒素としてよく知られている。

【0010】

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの毒作用機序の研究から、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンはリンパ球とマクロファージを結び付けて結合する構造を有し、そのために数多くのリンパ球とマクロファージが同時に活性化され、TNFなどのサイトカインが一斉に産生されることが中毒死亡に至る毒性発現の原因となっていることが知られている。

20

【0011】

一般に、すべての抗原は、免疫の成立過程において、マクロファージに取り込まれ、抗原の構造情報をリンパ球に提示する過程で、マクロファージとリンパ球は結合し、リンパ球・マクロファージともに活性化し、両者から各種のサイトカインが産生され、リンパ球の細胞分裂・増殖が起こり、免疫が成立する。この場合に、免疫反応に係わるリンパ球は極めて少数であるので、産生されるサイトカイン量は少なく、生理的な異常が起こることはない。ところが、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンは、抗原の場合とは異なり、そのまま多くのリンパ球集団をマクロファージ集団に結びつけて活性化する性質があることから、スーパー抗原ともいわれる。黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシンとしてはSEA、SEB、その他20種のスーパー抗原が知られている（例えば、非特許文献5参照）。このようなスーパー抗原としては、黄色ブドウ球菌以外では、スタフィロコッカスインターメディウス（*Staphylococcus intermedius*）の産生するエンテロトキシン（SEC）、A群レンサ球菌が産生する複数の発熱毒素（SEPs）、エルシニア菌の産生するエルシニア・マイトジェン（YPEM）や、マイコプラズマの産生するマイコプラズマ・マイトジェン（MAM）などが挙げられる。

30

このようにスーパー抗原もエンドトキシンと同様にサイトカインの産生を促すことから、関節リウマチその他の自己免疫疾患への関与が研究されている（非特許文献6参照）。

【0012】

本発明者らは、関節リウマチの動物モデルを用いた研究において、消化管内のエンドトキシン、エンテロトキシンの作用は免疫グロブリンを経口摂取させることにより抑制することができることを見出し、関節リウマチの予防、治療および再発予防機能を有することを開示した（特許文献1参照）。本明細書において、いわゆる抗体治療法とは、この特許文献1に記載したように、エンドトキシンやエンテロトキシンなどの細菌毒素に対する抗体、及びこれらの細菌毒素を産生する細菌に対する免疫グロブリンを経口摂取させる治療法である。また、消化管内のエンドトキシンに対してはエンドトキシン特異的吸収剤を経口摂取させることによりマウス関節リウマチモデルにおいて発症を抑制させることに成功し、新規な自己免疫疾患予防治療エンドトキシン吸収剤を開発した（特許文献2参照）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

50

- 【特許文献1】特開2006-151914号公報
- 【特許文献2】特願2009-533206号明細書
- 【特許文献3】特開平11-335396号公報
- 【特許文献4】特開2002-263486号公報
- 【特許文献5】特開2002-311029号公報
- 【特許文献6】特開2004-292357号公報
- 【特許文献7】特表2001-512140号公報
- 【特許文献8】特開平5-192198号公報
- 【特許文献9】特開平8-308596号公報

【非特許文献】

10

【0014】

- 【非特許文献1】Terato K. "Clin Immunol Immunopath" 79 142-154 1996
- 【非特許文献2】Terato K et al. "Br. J. Rheum." 35,828-838, 1996
- 【非特許文献3】Murakami M et al. "J Exp Med." 180, 111-21,1994
- 【非特許文献4】Ballot E "J Autoimmunity" 22 153-158 2004
- 【非特許文献5】重茂克彦「食品衛生」51巻81-90頁2005年
- 【非特許文献6】Wooley PH et al. "Ann Rh"
- 【非特許文献7】Kawai S et al. Anal Biochem, 209 63-69 1993
- 【非特許文献8】Kawai S et al. Euro J Immunogenetics, (1996) 23 471-486

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明者らは、以上のような関節リウマチに代表される自己免疫疾患の発症メカニズムおよびその治療方法に関する研究を踏まえて、臨床治験を実施したところ、このような抗体治療法が有効である患者と、奏効が見られない患者が、患者の遺伝形質を判別することにより可能であることを見出した。

本発明は、このような新たな知見に基づき、自己免疫疾患患者のより適切で効果的な治療を達成するための、患者の診断方法の確立と、かかる診断に用いる体外診断薬、更にはかかる自己免疫疾患の治療剤と治療方法を提供することを目的とするものである。

【0016】

30

即ち、本発明は、抗体治療及び/又はエンドトキシン吸収剤治療が効果的に作用する患者を判別するための診断方法と、かかる診断に用いる新規な体外診断薬を提供し、更には、このような自己免疫疾患患者、その中でも特に関節リウマチ患者のために特に有効な治療剤と治療方法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者らは、抗体の経口投与が関節リウマチの改善に有効に作用する患者と無効な患者について、その属性、臨床検査値等を網羅的に探索し、種々の検討を行なった。その結果、驚くべきことに、HLA型のDR遺伝子においてDR15陰性の患者に抗体の有効例が多いのに対し、DR15陽性の患者は無効であるか、有効例が非常に少ないことを見出し、これらの知見を基にして本発明を完成したものである。

40

【0018】

即ち、本発明は、以下の内容をその要旨とする発明である。

(1) 患者の免疫系細胞に表現されるHLA型のDR遺伝子のDR15が陰性の患者を選抜することを特徴とする、抗体治療及び/又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法。

(2) HLA型のDR遺伝子の標識プライマーと、DR15遺伝子に相補な固定相プローブを用いてDR15が陰性の患者を選抜することを特徴とする、前記(1)に記載の抗体治療及び/又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法。

(3) 自己免疫疾患が関節リウマチである、前記(1)又は(2)に記載の診断方法。

50

(4) H L A 型の D R 遺伝子の標識プライマーと、D R 1 5 遺伝子に相補な固定相プローブを必須の要素として含んでなることを特徴とする抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の体外診断薬。

(5) H L A 型の D R 遺伝子の標識プライマーと、D R 1 5 遺伝子に相補な固定相プローブ、および、D R 遺伝子に共通して含まれる遺伝子配列に相補な固定相プローブを必須の要素として含んでなることを特徴とする抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の体外診断薬。

(6) 自己免疫疾患が関節リウマチである、前記(4)又は(5)に記載の体外診断薬。

(7) 免疫グロブリン及び / 又はエンドトキシン吸収剤を含有する、免疫系細胞に表現される H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性である自己免疫疾患患者用治療剤。

(8) 自己免疫疾患が関節リウマチである、前記(7)記載の自己免疫疾患用治療剤。

(9) 免疫グロブリンが抗細菌毒素抗体由来のものである、前記(7)又は(8)に記載の自己免疫疾患用治療剤。

(10) 抗細菌毒素抗体が、抗エンドトキシン抗体、抗リピッド A 抗体またはスーパー抗原性を有する細菌毒素に対する抗体のいずれか1種またはそれ以上を含有するものである、前記(7)乃至(9)のいずれかに記載の自己免疫疾患用治療剤。

(11) 抗細菌毒素抗体が乳由来の抗体である、前記(7)乃至(10)のいずれかに記載の自己免疫疾患用治療剤。

(12) 免疫系細胞に表現される H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性である自己免疫疾患患者に対して、免疫グロブリン及び / 又はエンドトキシン吸収剤を含有する治療剤を経口投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

(13) 自己免疫疾患が関節リウマチである、前記(12)記載の自己免疫疾患の治療方法。

(14) 治療剤の投与量が、1日一人当たりヒト免疫グロブリンとして10mg ~ 10g、乳清蛋白として1g ~ 100g、又はエンドトキシン吸収剤として10mg ~ 10gである、前記(12)又は(13)記載の自己免疫疾患の治療方法。

【発明の効果】

【0019】

本発明の抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法と体外診断薬を用いることによって、関節リウマチに代表される自己免疫疾患患者の H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性か陽性かを予め診断することにより、本発明による抗体治療及び / 又はエンドトキシン吸収剤治療のための治療剤を用いてこれらの患者をより効果的に治療することができる。

【発明を実施するための形態】

【0020】

次に、本発明をさらに詳しく説明する。

既に述べたように、関節リウマチに代表される自己免疫疾患がII型コラーゲンやエンドトキシン、エンテロトキシンの消化管からの吸収が原因になっているという発症メカニズムに基づき、本発明者らは、上記抗体を含有する乳清タンパク濃縮物を主原料とする治療剤を関節リウマチ患者に経口投与し、治療効果を調べるとともに、患者の H L A - D R 分析を行なった。その結果、意外なことに H L A - D R 1 5 を有する患者、即ち D R 1 5 陽性の患者には効果が見られないことが多く、H L A - D R 1 5 を有さない患者、即ち D R 1 5 の陰性の患者に有効例が多いということが見出された。

【0021】

本発明はこの知見に基づき、自己免疫疾患の患者において、D R 1 5 遺伝子の有無を診断することにより、治療の有効性の確度を飛躍的に高めることが出来る診断方法と体外診断薬に関する発明を確立するに至った。更に、患者の免疫系細胞に表現される H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性である自己免疫疾患の患者に対して、免疫グロブリン及び / 又はエンドトキシン吸収剤を治療剤として経口投与する治療剤及び治療方法を提供するものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

ヒト白血球型抗原 (Human Leukocyte Antigen ; H L A) とは最も重要な組織適合性抗原 (M H C) の一つである。一般的に血液型というと A 、 B 、 O 、 A B 型といった赤血球の抗原型を指すが、H L A 型は白血球の抗原型を示している。ただし、白血球以外にも H L A は存在するため、現在ではヒト白血球型抗原の名称で呼ばれることはほとんどなく、H L A と略して呼ばれる。

【 0 0 2 3 】

H L A は、第 6 染色体に存在する主要組織適合複合体領域、略して M H C 領域によりコードされた遺伝子群により支配される遺伝子産物である。この M H C 領域は、すべての真核細胞膜表面上に表現されている H L A - A 、 B 、 C 抗原系を支配する M H C クラス I (または「 H L A - 1 」と記載される) 遺伝子領域と、リンパ球やマクロファージなどの免疫応答を行う細胞において機能する遺伝子で、免疫系細胞にしか表現されていない H L A - D P 、 D Q 、 D R 抗原系を支配する M H C クラス II 遺伝子 (または「 H L A - 2 」と記載される) 領域等で構成されている。H L A 型は、各人固有の遺伝性の抗原で、その組み合わせは数万通りもある。

H L A 検査は、臓器移植における臓器提供者、即ちドナーと臓器受容者即ちレシピエントとの適合性、H L A 適合血小板輸血、輸血後 G V H 病の予防、各種疾患の診断の補助や親子鑑定などの際に実施されている。

【 0 0 2 4 】

H L A - 2 の免疫応答における機能については、次の通りである。即ち、病原体または異物が侵入すると、マクロファージ、抗原提示細胞に取り込まれ、分解される。分解物の中から異物由来のペプチドが H L A - 2 分子の異物由来ペプチド収納溝に結合した状態で、細胞表面に現われる。一方、リンパ球の中で、異物由来ペプチドが結合した H L A - 2 結合物の形にフィットする受容体、即ち T 細胞受容体を介してマクロファージに結合し、このリンパ球が増殖することにより獲得免疫が成立する。

【 0 0 2 5 】

H L A - 2 遺伝子領域に含まれる H L A - D R 遺伝子産物は、白血球の抗原分析から、現在のところ血清学的に抗原性の異なる H L A - D R 1 から H L A - D R 1 8 の血清型に分類されている。H L A - D R 遺伝子は各種疾患に罹り易さ、または罹り難さとの関連があり、例えば、関節リウマチは H L A - D R 4 を有する人に、潰瘍性大腸炎は H L A - D R 1 に、全身性エリテマトーデスは H L A - D R 3 に多いことが知られている。結核菌感染症は H L A - D R 2 に多いなどである。

特定の自己免疫病や特定の感染性疾患が、特定の H L A - D R の血清型に多いことは、免疫異常や免疫抵抗性の獲得が H L A - 2 遺伝子により支配されていることを示している。

【 0 0 2 6 】

本発明者らは、このような H L A - D R 遺伝子と各種疾患との関連性を参考にして鋭意検討した結果、関節リウマチに代表される自己免疫疾患の患者の抗体治療又はエンドトキシン吸収剤による治療に際して、患者の H L A - D R 1 5 を有しない患者、即ち H L A - D R 1 5 が陰性の患者に対してのみかかる治療法が有効に作用することを見出したものである。

【 0 0 2 7 】

従って、本発明は、患者自身の H L A - D R 遺伝子の D R 1 5 を判定することによって、抗体治療又はエンドトキシン吸収剤治療が有効に作用する自己免疫疾患の患者を簡便に診断することのできる、抗体治療又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法とかかる患者を判別するための体外診断薬である。

【 0 0 2 8 】

また、本発明は、このような H L A 型の D R 遺伝子の D R 1 5 が陰性であるために抗体治療又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者に対して使用する、免疫グロブリン及び / 又はエンドトキシン吸収剤を含有する H L A - D R 1 5 が陰性の自己免疫

10

20

30

40

50

疾患用治療剤である。

【0029】

また、本発明は、このようなHLA型のDR遺伝子のDR15が陰性であるために抗体治療又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者に対して、免疫グロブリン及び/又はエンドトキシン吸収剤を含有する治療剤を経口投与するHLA-DR15が陰性の自己免疫疾患患者の治療方法である。

【0030】

本発明において、HLA型の検査方法は一般的に用いられる方法で行うことができ、その方法は特に限定されない。

HLA型の検査方法は、大別して抗血清法とDNAタイピング法がある。DNAタイピング法は、まず、検査対照とするHLA遺伝子のプライマーを加えてPCR法により増殖する。増殖させたHLA遺伝子の抗原型を決める方法は、大別してDNA塩基配列を決めて判別する方法(特開2004-283165号公報)と、相補DNAをプローブとしてプローブの結合性により判定する方法の2つがある(特許文献9及び非特許文献7参照)。DNAタイピング法、中でも相補プローブを固定相として抗原型を判別する方法は、多数検体を低コストで実施出来る利点があり、HLAタイピング試薬のキットも市販されている。

【0031】

HLAタイピング試薬のキットでは、血液や口腔内粘膜、毛根から採取した細胞のDNAを抽出し、これにHLA-DR遺伝子のプライマーを加えてPCR法で遺伝子を増幅する。このプライマーには、あらかじめ、ビオチンや蛍光色素を結合させるなどの化学修飾を行なって、標識プライマーとしておくことにより、これを各DR遺伝子に相補的な配列を持つプローブを固定相として反応させると、標識物質の固定相との結合の有無からDR遺伝子の判別を行なうことができる。

【0032】

本発明の抗体治療及び/又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の診断方法及びその体外診断薬は、以下のプロセスを含む方法であり、ここで使用する診断薬である。

(イ)患者のDNAに標識したHLA遺伝子のプライマーを加えて、PCR法で標識された患者のHLA遺伝子を増殖させる、

(ロ)HLA遺伝子が増幅されていることを確認する、

(ハ)別に用意したHLA15に特異的な相補プローブを固定相としたものに加え、固定相とハイブリダイズするもの、即ちHLA-DR15陽性のものと、ハイブリダイズしないもの、即ち、HLA-DR15陰性のものとを標識化合物を利用して識別する、という3段階のプロセスを含むものである。このうち、(ロ)のプロセスは、通常PCR生成物の検出において実施されるように、DNAのアガロースゲル電気泳動によるチェックの他に、HLA-DR遺伝子に共通するDNA塩基配列を相補プローブとして固定化したものを用意し、これとのハイブリダイズの有無を、(ハ)のHLA-DR15の場合と同様な操作を行うことにより目的が達成される。

従って、DR15遺伝子の陽性、陰性は、PCR反応によるHLA-DR遺伝子増幅が確認された条件のもとで、DR-15プローブにおける標識化合物の反応が陽性の場合がHLA-DR遺伝子が陽性、標識化合物の反応が陰性の場合にHLA-DR15遺伝子が陰性と判定される。

【0033】

市販のHLAタイピングキットは13種HLA-DR抗原型を識別するために24のプローブを用いるが、本発明はDR15のみで目的が達成できる。

本発明において、体外診断薬キットに使用するDR15のプローブとなる配列は、Kawaiらの文献に報告されているものである(非特許文献8参照)。即ち、次の表1に示すように、配列名DRB7011J、配列名DRB8601、および配列名DRB8603Jの3種とそれぞれの相補配列が知られている(配列表の配列番号1~6参照)。表1にはこれらのプローブの反応

特異性も示した。

【 0 0 3 4 】

【 表 1 】

HLA-DR15を検出するプローブ

配列名	配 列	反応特異性
DRB7011J	GACATCCTGGAGCAGGCG	1501~1504
DRB8601	AACTACGGGGTTGGTGAG	1502、0101、0103、16
DRB8603J	TACGGGGTTGTGGAGAGC	1501、1503、1504

10

【 0 0 3 5 】

DR15のプローブの選択には、DRB7011J単独でもよいが、これに、DRB8603Jを併用し2つのプローブとする場合、さらに、これにDRB8601の3種とすることも可能である。DRB8601を含める場合には、表1に示した如くDR1、DR16とも反応するため、反応がDR15との反応特異性を決めるためには、次の表2に示した配列名のプローブ、またはこれらの相補性配列をプローブとして、反応がDR1またはDR16ではないことを確認する必要がある。

【 0 0 3 6 】

【 表 2 】

配列名	配 列	反応特異性
DRB2801J	CGGTTGCTGGAAAGATGCATC	01
DRB7003	GACCTCCTGGAAGACAGG	1602、1108、1320、1403、1412
DRB7007	ACATCCGGAAGACGAGC	0103、0402、0414、0102、1114、1120、1320
DRB7012J	GCAGAGGCGGGCCGCGGT	0101、0102
DRB70J	AGACAGGCGGGCCCT	08、0412、0418、1403、1412、1415、1604
DRB7002	GACTTCCTGGAAGACAGG	1601、1603、1604、
DRB7010	GGACATCCTGGAAGACAG	1605、1606

20

30

【 0 0 3 7 】

この体外診断薬は、DR遺伝子をPCR法により増幅して遺伝子検査を行うので、遺伝子が増幅されていることが前提である。PCR生成物の検出は通常、DNAのアガロースゲル電気泳動によるチェックが行われるが、DR遺伝子の共通配列をプローブとしたDNAの検出をキットに加えることも可能である。共通配列プローブとしては、TGCAGACACAAC TACGGGおよびその相補配列がある（配列表の配列番号7~8参照）。

【 0 0 3 8 】

本発明の診断方法および体外診断薬に必要とされる固定相は、特許文献8に記載された方法によって、固定相、例えばマイクロプレートに一本鎖核酸として固定化することが好ましい。表1または表2に示したそれぞれの配列を、1つまたはそれ以上を直列に繰り返して含む配列を作り、これをM13ファージとプラスミドの複合ベクターに組み込み、一本鎖核酸を得る。配列の繰り返しは5~200コピーを導入したものであることが好ましい。

40

【 0 0 3 9 】

本発明の診断方法および体外診断薬にあつては、DR15の有無が判別できればその目的が達成されるので、表1に示したDR15のプローブ3種の任意の1種またはそれ以上の混合物とDR1、DR16の7種のプローブの任意の1種またはそれ以上の混合物を固

50

定相として用いることも可能である。3種のDR15プローブのうち、DR1またはDR16と交差反応するDRB8601を用いない体外診断薬とする場合には、DR1、DR16の検出プローブは不要となる。

【0040】

固定化する担体としては、核酸が非特異的に結合しうる素材、官能基が導入でき、官能基を通じて担体に結合させる素材のいずれでもよい。実際には、合成樹脂製のマイクロプレート、ビーズ、チューブなどを用いることができる。

【0041】

担体に固定する方法としては、化学結合を介する方法が挙げられる(Nucleic Acids Res., 15, 5373-5390(1987))。例えば、アミノ基を導入した樹脂と核酸のアミノ基をグルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いて両者を固定化する方法が挙げられる。

10

【0042】

非特異的吸着による方法としては、核酸を直接担体に接触させて固定することもできる。例えば、マイクロプレートに核酸溶液を入れ、紫外線照射により効率よく固定することが知られている(特開昭61-219400号公報参照)。

【0043】

本発明において、固定化されたプローブと試料DNAとのハイブリダイゼーションの反応条件は、基本的には、従来膜を用いる公知のハイブリダイゼーションと同様である(Hames BD, Higgins SJ, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press 1985)。

20

【0044】

本発明の診断方法および体外診断薬に使用する試料DNAは、ヒト白血球由来のDNAであることが好ましい。もし、DR15遺伝子が含まれているのであれば、検出されるように標識されていることが必要である。標識化の方法としては、(イ)目的核酸に標識物を直接導入する方法、(ロ)標識化されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用して目的核酸と相補的な核酸を合成する方法、(ハ)標識化された単位核酸の存在下、オリゴヌクレオチドプライマーを使用して目的核酸と相補的な核酸を合成などがあげられる。これらの方法の中で、特許文献9に記載されているような上記の(ロ)の方法が、標識したプライマーをPCR法によって増幅生成物として得ることができるので好ましい。

【0045】

ここで使用する標識物質とは、ハイブリダイゼーション操作後にプローブに結合したDNAを検出できるものであれば放射性、非放射性のいずれでもよい。取り扱いの容易さ、保存性、廃棄処理などの点から、非放射性物質であることが好ましい。非放射性物質としては、たとえば、ビオチン、2,4-ジニトロフェニル基、ジゴキシゲニン基、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、4-フルオレセインイソチオシアネート、ダンシル、アクリジンなどがある。これらによりオリゴヌクレオチドを標識する場合には、いずれも公知手段(特開昭59-93098号公報参照)により、標識化することができる。

30

【0046】

本発明の診断方法および体外診断薬に使用する試料DNAの標識は、標識化されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、PCR法によって増幅と同時に行われるのが好ましい。プライマーとしては配列TCGTGTCCCCACAGCACGTとCCGTGCACTGTGAAGCTCTがDR遺伝子のPCR増幅のプライマーであり、それぞれをビオチン化したプライマーが配列名DRAM-C、およびDRAM-Bとして報告されている(非特許文献8参照)。

40

【0047】

本発明の診断方法および体外診断薬において、標識プライマーを用いて試料DNAよりPCR法により増幅した核酸と、プローブとのハイブリダイズの有無を検出する操作は、プライマーに結合させた標識に応じて適宜選択し、決定することができる。標識がラジオアイソトープ、蛍光物質、色素などの場合には、標識核酸が固相に結合した状態で検出操作を行うか、または、標識物を核酸と結合したまま、あるいは、標識物を核酸から切り離

50

した状態で溶液中に遊離させた後、標識物質に応じた方法により検出操作をおこなう。例えば、標識物がビオチンである場合、通常よく行われている方法として、酵素標識アビジンを反応させることにより、ハイブリダイズ核酸に酵素を結合させたことになり、酵素反応により発色する基質を用いることにより、比色定量により検出が可能となる。

【0048】

本発明において自己免疫疾患の治療に使用する免疫グロブリン抗体としては、鶏、アヒルなどの卵由来のもの、牛、馬、ヤギ、ヒツジなどの動物の血清由来のもの、牛、ヤギ、ヒツジ、馬、水牛、ラクダなどのいずれの哺乳類の乳由来のものなどを使用することができるが、容易にかつ安全に入手することができる乳由来の免疫グロブリンが好ましい。乳由来のものの場合、その乳はワクチン接種を受けた哺乳動物から採取された乳でも、ワクチン接種を受けていない哺乳動物から採取された乳でもよい。

10

【0049】

例えば、ウシが生乳中に分泌する抗体は、チーズ製造の残留液であるチーズホエー、又はカゼイン製造の残留物である酸ホエーなどの乳清タンパクの中から回収することができる。即ち、乳清タンパクには乳由来の免疫グロブリンが高濃度で含有されるので、これをそのまま本発明における免疫グロブリンとして使用することができる。更には、乳清タンパクは一般の市販品としても販売されており、乳清タンパク濃縮物(WPC)、乳清タンパク単離物(WPI)、脱塩ホエー粉などの形で使用できる。一般的にこれらの乳清タンパクのなかで免疫グロブリンの含有量の高いものが好ましい。乳清タンパクの中でも乳清タンパク濃縮物(WPC)が免疫グロブリンの含有量の高いものが多く見られるので特に好ましい。

20

【0050】

本発明においては、免疫グロブリンの中に、抗細菌毒素抗体、即ち、抗エンドトキシン抗体、抗リピッドA抗体、及びスーパー抗原活性に対する抗体から選ばれる一種以上の抗体が含まれていることが好ましい。前述したように、細菌内毒素であるエンドトキシン、リピッドA、スーパー抗原は微量で免疫系に異常を来し、関節リウマチの発症に関与するとされており、これらの細菌毒素に対する抗体が含まれていることで、自己免疫疾患に対してより優れた治療効果を発揮することができる。

【0051】

一般的に、各種の動物には大腸菌を初めとする多種の常在細菌が生息し、もしくは、しばしば感染を繰り返すことにより、自然に免疫されて、これらの菌体や、菌の産生する毒素に対する抗体を有している。これらの抗体は、ワクチンなどの人為的な免疫によらずに産生された抗体という意味で、自然抗体と呼ばれている。エンドトキシン、リピッドA、スーパー抗原、エンテロトキシンなどの細菌毒素に対する自然抗体として、抗エンドトキシン抗体、抗リピッドA抗体、スーパー抗原活性に対する抗体、抗エンテロトキシン抗体なども血液や乳汁中に検出されるので、これらの自然抗体が本発明の抗細菌毒素抗体として利用することができる。これらの抗体が、対応する毒素に結合すると、毒素の毒作用は失われる。これらの抗体の量を測定するために今日通常行われる方法として、実施例1に記載したごとく酵素抗体法(ELISA)がある。

30

【0052】

本発明において、HLA-DR15が陰性である自己免疫疾患患者用の治療剤を製剤設計するに際しては、エンドトキシンに対する抗体を指標として設計する場合は、大腸菌O-111由来エンドトキシンに対する抗体が、1日分の摂取量中に4 μ g以上含まれるように、スーパー抗原に対する抗体を指標に設計する場合には、ブドウ球菌エンテロトキシンBが同様に4 μ g以上、リピッドAに対する抗体を指標に設計する場合には、同様に2 μ g以上になるように製造することが、治療効果を得るために好ましい。

40

【0053】

本発明において、HLA-DR15が陰性である自己免疫疾患患者に対して免疫グロブリンを含有する治療剤を経口投与することによって治療する。その投与量は、有効成分の免疫グロブリンとして10mg~10gである。免疫グロブリンを含有する治療剤として

50

乳清タンパク濃縮物を投与する場合には、その一日の投与量は1gないし100gであり、より好ましくは1gないし50gである。一日の投与量が1gより少ないと十分な効果が得られず、また、100gより多いと摂取するときの負担が大きくなる。

【0054】

本発明の方法によりHLA-D R15が陰性であると判別された自己免疫疾患患者に対しては、免疫グロブリンおよびこの抗体を含有する乳清タンパク濃縮物をそのまま摂取しても良いが、他の食品原料、食品添加物と混合、加工された食品として摂取しても良い。食品としては、様々な形態の食品があるが、例えば加工乳、乳飲料、ヨーグルト、乳酸菌飲料等の乳製品、果汁飲料、野菜汁飲料、清涼飲料等の嗜好飲料、錠菓、キャンディ、チョコレート、シリアル、チューインガム等の菓子類、アイスクリーム、プリン、ゼリー、

10

【0055】

本発明の方法によって判別されたHLA-D R15が陰性である自己免疫疾患患者用の治療剤として、免疫グロブリンのほかに、人体に安全に服用でき、消化管内のエンドトキシンを除去できるエンドトキシン吸収剤も有効である。

【0056】

抗体は医薬品として用いるためには、大量生産が困難で、高額な生産コストがかかる。さらに、抗体は熱により活性が失われやすく物性が不安定で、たんぱく質であるために、経口摂取では消化酵素による抗体活性の失活などの問題点があり、経済的のみならず物性的に問題点が多い。そこで、抗体に代わるものとして、物性が安定で大量生産可能、かつ低価格であるとともに、安全性の問題のない除去剤として、本発明のエンドトキシン吸収剤が有用である。

20

【0057】

注射剤などの製造にあたっては、微量であってもエンドトキシンの存在は発熱などの副作用の原因となるので、エンドトキシンを十分に除去する必要がある。そのために、エンドトキシンの特異的な除去剤が工業的に使用されている。これは、エンドトキシンに高い親和性を有する分子基を結合させた合成繊維や布、粒子による形成物であり、エンドトキシンを除きたい溶液にこれを接触させることによりエンドトキシンのみを特異的に吸収させ、エンドトキシンを除くことができる。

30

【0058】

本発明に使用するエンドトキシン吸収剤も原理としては同じで、消化管内のエンドトキシンの除去を同様のメカニズムで作用するが、更に、経口摂取に適した物性ととも摂取して人体に安全であることが必要である。また、消化管に生息する細菌は100兆個といわれ、LPS保有腸内細菌も膨大な量があるので、LPS除去活性が高いものであることが要求される。本発明に使用するエンドトキシン吸収剤は、これらの問題点にも対応し、エンドトキシン吸収活性と安全性の両面から、人体使用に適した新規エンドトキシン吸収剤である。

40

【0059】

エンドトキシンの毒性活性は分子中のリピッドAと呼ばれる脂質部分である。本発明に使用するエンドトキシン吸収剤は、エンドトキシンのリピッドAと結合することのできるリピッドA結合分子とこれを担持する細粒子によって構成されている。このエンドトキシン吸収剤を摂取して、消化管内のエンドトキシンを吸着し便中に排泄させ、リウマチをはじめとする自己免疫疾患を予防、治療することができるものである。

【0060】

本発明のエンドトキシン吸収剤におけるリピッドA結合物質としては、ペプチド抗生物質であるポリミキシンBやLPS結合性を有する各種のペプチドが知られている。ポリミ

50

キシニンBとは、バチルス ポリミキサ菌が産生する分子量1200の塩基性ポリペプチド抗菌抗生物質で、これに類似した多くの化合物が報告されている。詳しくは、前記特許文献3~7に記載されている。これらのいずれも本発明の目的のリピッドA結合物質として使用できる。

【0061】

リピッドA結合物質を担持する担体としては、形状は服用に適した粒子または微粉末で、担体の素材としては、セルロース、アガロース、マンナン、グルカン、キチンなどの多糖体とそれらの誘導體、アクリル系、ポリスチレン系、ポリプロピレン系、ポリアミド系、ポリビニール系、などが挙げられる。

【0062】

担体にリピッドA結合物質を共有結合させる方法は特に限定されるものではなく、固定化酵素の一般的な架橋試薬、例えば水溶性カルボジイミド試薬であるECDI、ヘキサメチレンジイソシアネート、2個のエポキシ基を有するプロピレングリコールジグリシジルエーテル、エピクロルヒドリンを用いることができる。

【0063】

リピッドA結合物質と担体の結合物は無害であること、体内移行がないこと、胃酸や胆汁酸が分泌する消化酵素のみならず、消化管内の微生物により分解、変性を受けないものであることが望ましい。

【0064】

LPSは分子量1万を上回る高分子で、LPSの吸着は主として担体粒子の表面であると考えられ、表面積が大きいことが要求される。そのためには、粒子粉末は小さい径であるほど活性が高くなる。しかし、粒子径が一定以下に小さくなると、消化管リンパ組織に貪食される安全性上の不都合が生ずる。そのため粒子径の下限は5 μ mである。さらに、服用に際しては、服用しやすい粒子であることが望ましく、上限は50 μ m程度のものが好ましい。そのための担体の粉碎は一般的な樹脂の粉碎技術を用いればよく、例えば、衝撃式、スクリーン式、摩砕式等の乾式法、媒体攪拌式等の湿式法が利用できる。

【0065】

リピッドA結合物質と担体の結合物は、人が服用して用いるために、経口摂取で用いる一般の医薬品としての製剤、例えば、末剤、散剤、カプセル剤、錠剤、液剤として用いられる。これらの製剤は、通常の方法で、薬学的に許容される賦形剤、添加剤と共に各種製剤にすることができる。

また、治療予防の投与量、投与回数は通常は成人に対し、1日当たり約10mg~1gを1回~3回に分けて投与することができる。

【0066】

次に、本発明を実施例によって更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0067】

以下の実施例において、免疫グロブリンの定量とELISAによる抗細菌毒素(LPS、SEB、リピッドA)抗体の測定は次の方法によった。

免疫グロブリンの定量は、The Binding Site社(Birmingham, U.K.)のBovine IgG-NL RIDキットを用い、一元平板免疫拡散法により総ウシIgG抗体含有量を測定した。

【0068】

ELISAプレート(Nunc 439454)に、LPS、SEBはそれぞれ0.1mol/L炭酸緩衝液(pH9.5)で、リピッドAはクロロホルムとメタノールが4:1混合液に溶解後、メタノールで希釈し、ウェルに加え抗原をコートした。抗原なしのウェルには炭酸緩衝液またはメタノールを添加した。トリスアミノメタン、塩化ナトリウムを含むヤギ血清でブロックを行った。次に検量線作成のための精製抗大腸菌(E. coli O111)LPS抗体、検体としたWPC溶液をブロック液で希釈し、ウェルに加え反応させた。第二抗

10

20

30

40

50

体にはビオチン標識抗ウシ Ig G ヤギ抗体 (Jackson ImmunoResearch) を使用した。次に、アビジン結合パーオキシダーゼ (ExtrAvidin-Peroxidase、SIGMA社製) を反応させ、酵素基質として 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 溶液を添加し室温で 10 分反応させた。その後、3% (v/v) 塩酸で酵素反応を停止し、マイクロプレートリーダー (Bio Rad 社製、Model 550) で 450 nm における吸光度を測定した。抗体量は計量ソフト Microplate Manager III (Bio-Rad社製) により算出した。抗原をコートしたウェルと抗原をコートしないウェルにおける計測値の差をその検体濃度における抗体の濃度とした。抗体含有量は検体希釈倍数を乗じて WPC 1 g 中の含有量として表した。

【0069】

(1) 免疫グロブリン標準品の調製

抗体の定量的測定のための標準品として、大腸菌 E. coli O111: B 4 株の加熱菌を油性アジュバント処理して妊娠ウシに免疫し、その初乳より LPS 抗原カラムとプロテイン G カラム (HiTrap Protein G HP, Amersham Bioscience 製、Sweden) を用いて抗 E. coli O111 LPS 抗体を精製した。精製する抗体溶液をカラムに流し、抗体のみカラムに吸着させ、カラムに吸着しない免疫グロブリンなどを中性バッファーで洗い出した。カラムに結合した抗 LPS 抗体は pH 2.7 の 0.1 M グリシン塩酸緩衝液で溶出した。溶出液を中和し、さらにプロテイン G カラムにかけた。精製品を得るため、LPS 抗原カラムとプロテイン G カラムによる精製を 3 回繰り返した。タンパク当たりの ELISA における LPS 抗体活性は 3 回以上の精製で比活性の上昇は見られなかった。この標品はアクリルアミドディスク電気泳動で単バンドであった。この精製抗体を免疫グロブリンの標準品とした。

【0070】

(2) 粉末状乳清タンパク濃縮物含有粉末組成物の調製

乳清タンパク濃縮物 (WPC) である Proliant 8000 (登録商標、James Farrell & Co. 製) の 6 質量部に対して、フラクトオリゴ糖であるメイオリゴ P (登録商標、明治製菓製) 3 質量部、乳清カルシウム (森永乳業製) 0.8 質量部、粉末セルロースである KC フロック W-300G (登録商標、日本製紙ケミカル製) 0.2 質量部を混合し、1 包 10 g の粉末状の自己免疫疾患治療剤の組成物を作製した。この組成物は 1 包あたり 243 mg のウシ Ig G 免疫グロブリンを含み、細菌毒素に対する抗体については、上記の方法によって調べたところ、大腸菌 O-26 由来エンドトキシンに対する抗体が 77 μg、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B に対する抗体が 11 μg、リピッド A に対する抗体が 6 μg 含有されていた。

【0071】

(3) 錠剤型組成物の調製

表 3 に示した組成の乳清タンパク濃縮物を含む原料と、全組成物質量の 10% 程度の水を V 型ブレンダー中で混合し、ペレッターで造粒後、棚式乾燥機を用い水分量が 6% となるまで乾燥した。ロータリー式打錠機により 1.5 トン/cm² の圧力をかけて、一錠あたり 2 g となるように円形 (直径 20 mm、厚さ 5 mm) に打錠成形し、錠剤型の関節リウマチ治療剤組成物とした。この錠剤型の関節リウマチ治療剤の 3 錠中には、乳清タンパク濃縮物が 4.5 g、大腸菌 O-26 由来エンドトキシンに対する抗体は 6 μg 含まれていた。

【0072】

10

20

30

40

【表 3】

成 分	質量%
乳清タンパク濃縮物 (Proliant 8000)	75.0
還元麦芽糖	20.0
ショ糖脂肪酸エステル	3.3
微粒二酸化ケイ素	1.7

【0073】

10

(4) 関節リウマチ患者のHLA型DR15の判定による診断

リウマチ科クリニックにおいて、表4に示す治療中の関節リウマチ患者17名(男1名、女16名、年齢31~80才、平均60才、病歴0.2年~30年、平均9.7年)を対象として、次のようにしてまず各患者のHLA型DR15の判定を行った。

即ち、EDTAを加えたチューブに患者の血液を約5mL採血した。この1mLをGen TLE solution I(タカラハ[®]イオ製)5mLを入れた10mLプラスチック容器に加え、直ちにボルテックスした後10分静置した。毎分12000回で10分間遠心し、上澄みを除き、沈殿にGen TLE solution IIの10mLを加え3回転倒混和し、毎分12000回で5分間遠心した。上澄みを除きGen TLE solution IIIの5mLを加え、20秒間ボルテックスし、上澄みを新しい10mL容器に移した。これにイソプロパノール5mLを加え、転倒混和した。毎分12000回転で10分間遠心し、上澄みを除き、DNAの沈殿を得た。このDNAはさらに70%エタノール、次いで100%エタノール各10mLで遠心洗浄した。PCRバッファー(20mMのKCl、10mM pH8.8のTris-HCl、1.5mMのMgCl₂、0.01% Triton X-100)1mLに溶解し、260nmの吸光度は約1であった。

20

【0074】

次に、PCRによるHLA抗原遺伝子の増幅は、市販キット(湧永製薬製、MPH-2 HLAタイピング試薬 HLA-DR)を用いて、以下のようにして行った。抽出したDNAの5μLを、デオキシヌクレオシド三リン酸である増幅液(クラスII)85μL、ピオチン標識DR抗原プライマー液9.5μL、DNAポリメラーゼ液0.5μLの混合液計95μLを含むPCR用チューブに加え、PCR装置(Takara PCR Thermal Cycler モデル TP100)にセットし、96℃、5分の加熱後、1サイクルが96℃で30秒、62℃で1分、次に72℃で1分として、計40サイクル繰り返し、最後に4℃に冷却し、PCR反応を終了し、増幅DNA液を得た。

30

【0075】

増殖させたHLA-DR遺伝子のプローブとのハイブリダイゼーションと検出は以下のごとくに行った。

増殖させたDNAを1本鎖に変性するために、内容積1.5mLの変性用チューブにキット添付のアルカリ変性液300μLを入れた。次いで、PCR反応終了後の増幅DNA液90μLを加えて混和し、常温で5分間放置した。これに、氷上で冷やしたキット添付の中和液900μLを加え混和し、氷上に放置した。キットは1検体あたり、24穴にHLA-DR抗原DNAのプローブが2枚の96穴プレート、HLA-DRプレート1、およびHLA-DRプレート2の各No.1ウエルからNo.12ウエルの24穴に50μLずつ分注し、液の蒸発を防ぐためにシールした後、37℃のインキュベーターに60分放置し、プローブとの反応を待った。各ウエルを常温の洗浄液300μLで3回洗浄した。ピオチン標識にストレプトアビジン結合HRP酵素を結合させるために、あらかじめ37℃に温めておいた酵素溶液50μLを加え、37℃のインキュベーター内に15分放置した。各ウエルを洗浄液300μLで3回洗浄した後、あらかじめ37℃に温めておいた発色基質ABTS液の50μLを各ウエルに分注し、37℃のインキュベーター内に15分置いた。次いで、キット付属の反応停止液50μLを加え、ELISAプレートリーダー

40

50

BioRad モデル550により415nmでの吸光度を測定した。キット用の判定ソフトにより、各プローブにおける発色吸光度のカットオフ値を元に判定し、HLA-D R抗原型を決めた。その結果を表5に示した。

【0076】

(5) 関節リウマチ患者への薬物投与試験

このDR15が陰性の患者9名、DR15が陽性の患者8名の計17名の患者に対して、上記(2)で作製した関節リウマチ治療剤組成物を1日10g(乳清タンパクとして6g)、3ヶ月間摂取させた。1ヶ月ごとに圧痛関節数(TJC)、腫脹関節数(SJC)、急性期蛋白(CRP)、赤血球沈降速度(赤沈、ESR)、リウマチ因子、メタロプロテナーゼ-3(MMP3)、身体機能評価(mHAQ)、患者による疼痛評価(VAS-1)、患者による全般的活動性評価(VAS-2)、医師による全般的活動性評価(VAS-3)、を行い、ヨーロッパリウマチ会議基準疾患活動性DAS28(ESR)、DAS28(CRP)を測定するとともに、患者の愁訴を加え、医師の臨床総合臨床評価を行って、乳清タンパク抗体の関節リウマチ患者における有用性の評価を行った。また、摂取開始前に血液を採取し、白血球HLA型の検査、血清TNF値、血清IL-6値、関節軟骨コラーゲン抗体、抗大腸菌LPS抗体の測定を行った。

10

【0077】

なお、このリウマチ治療剤組成物を投与する前の各患者の病状は表4の通りであり、DR15が陰性の患者のほうがDR15が陽性の患者に比べて病状が重く、各患者のサイトカインレベル、抗コラーゲン抗体レベル、抗大腸菌抗体レベルは表5の通りであり、DR15が陰性の患者のほうがDR15が陽性の患者に比べて大腸菌に対する抗体が多かった。

20

【0078】

【表 4】

HLA-DR15陽性患者と陰性患者の関節リウマチ患者の病状

白血球型	患者 番号	年齢	性	罹患期間 年	重症度 (越智分類)	EULAR基準疾患活動性 DAS28 (CRP)	DAS28 (ESR)	身体機能評価 mHAQ	関節以外の病変	リウマチ因子 (単位/ml)	骨破壊	合併症 その他
DR15陰性	1	80	男	4	LES	5.27	6.01	10	リウマチ肺	800	(+)	間質性肺炎
	2	61	女	6	MES	5.42	6.3	5	(-)	40.4	(+)	ひざ関節屈曲障害
	3	60	女	6	MES	7.20	8.02	15	(-)	5.7	(+)	癌化学療法中
	4	31	女	5	LES	4.22	4.61	1	(-)	201	(+)	
	5	68	女	5	MES	5.78	6.12	5	(-)	3	(+)	
	6	79	女	13	MES	4.12	5.29	17	(-)	34.2	(2+)	慢性心不全
	7	66	女	15	MUD	4.48	5.26	17	(-)	292	(2+)	
	8	61	女	30	MES	7.64	8.15	20	(-)	714	(2+)	抗リウマチ薬に抵抗 肺炎罹患
	9	53	女	22	MUD	7.41	8	20	リウマチ結節	170	(2+)	
	平均	62.1		11.8	5.73	6.42	12.2		251.1			
	標準偏差	14.6		9.1	1.39	1.33	7.2		304.0			
DR15陽性	10	32	女	0.2	LES	4.16	4.32	0	(-)	28	(+)	授乳中
	11	78	女	19	LES	3.58	4.7	10	(-)	138.3	(+)	重い骨粗鬆
	12	46	女	7	MES	4.43	4.44	0	(-)	55.8	(+)	薬物アレルギー
	13	72	女	9	MES	5.75	6.22	17	(-)	935	(+)	シエーグレン症候群
	14	46	女	12	LES	5.4	6.42	4	シエーグレン症候群	10.5	(+)	抗リウマチ薬に抵抗
	15	57	女	7	MES	4.11	Nd	NT	(-)	69.8	(+)	
	16	73	女	2	LES	4.11	4.01	12	(-)	131.6	(+)	
	17	47	女	4	LES	3.86	4.45	2	(-)	11.4	(+)	薬物アレルギー
	平均	56.4		7.5	4.47	4.94	6.4		172.6			
	標準偏差	16.4		6.0	0.81	0.97	6.6		312.0			
	T-test*	0.462		0.271	0.041	0.022	0.117		0.608			

* P値: 白血球型DR15陰性群 対 DR15陽性群

越智分類LES=小関節破壊型 10~20年で68関節のうち10以下の関節が侵される
 MES=多関節破壊型 15年で68関節のうち30~40関節が侵される
 MUD=ムチランス型 離断型 最も重症で急激に進行し5年で50関節が侵される
 全リウマチ患者数の70%がLES、残る30%がMESとMUD

【表 5】

HLA-DR15陽性患者と陰性患者のサイトカインレベルと抗コラーゲン抗体、抗大腸菌抗体レベル

白血球型	患者番号	年齢	性別	サイトカイン		抗コラーゲン抗体			抗大腸菌抗体(O26株,O55株,O111株)			白血球DR型		
				TNF-a pg/ml	IL-6 pg/ml	抗ヒト2型 units/ml	抗ヒト2型抗 units/ml	抗ヒト2型抗 units/ml	IgG ug/ml	IgA ug/ml	IgG+IgA			
DR-15陰性	1	80	男	2.84	66.20	1	105	0	0	nt	nt	nt	DR1	
	2	61	女	2.26	4.70	0	0	0	0	nt	nt	nt	DR4.1	
	3	60	女	3.16	47.80	709	342	580	31	2.10	4.10	6.20	DR4.2	
	4	31	女	1.56	30.50	9	65	7	1768	6.80	2.30	9.10	DR8.1	
	5	68	女	2.63	7.00	1636	1663	1664	743	2.20	1.90	4.10	DR9	
	6	79	女	1.56	3.70	947	719	1057	3	3.10	1.10	4.20	DR13	
	7	66	女	1.09	74.00	0	0	92	13	4.06	2.80	6.86	DR12	
	8	61	女	1.67	31.30	33	44	34	0	2.00	1.50	3.50	DR9	
	9	53	女	3.28	31.20	0	0	4	0	nt	nt	nt	DR4.1	
	平均	62.1		2.23	32.93	370.56	326.44	382.00	284.22	3.38	2.28	5.66	DR4 4/9	
	標準偏差	14.6		0.79	25.86	595.96	554.25	604.04	607.45	1.85	1.07	2.14	DR15: 0/9	
DR-15陽性	10	32	女	3.23	0.30	0	0	0	0	3.40	0.80	4.20	DR4.1	
	11	78	女	2.93	3.50	25	18	26	1644	0.00	0.00	0.00	DR8.1	
	12	46	女	1.40	26.30	0	206	290	1135	3.00	1.20	4.20	DR11	
	13	72	女	3.32	71.90	0	0	0	159	1.60	1.00	2.60	DR9	
	14	46	女	2.98	5.40	19	60	47	3	nt	nt	nt	DR4.1	
	15	57	女	0.77	5.50	32	2	48	0	1.00	0.00	1.00	DR15	
	16	73	女	0.72	5.90	78	47	78	610	1.60	1.30	2.90	DR15	
	17	47	女	1.56	0.70	110	160	0	0	3.10	1.10	4.20	DR15	
		平均	56.4		2.11	14.94	33.00	61.63	61.13	443.88	1.96	0.77	3.90	DR4 4/8
		標準偏差	16.4		1.11	24.45	40.50	79.09	96.72	633.83	1.26	0.55	1.68	DR15: 8/8
		T-test*	##		0.814	0.161	0.128	0.193	0.153	0.605	0.148	0.016	0.023	

*P値:白血球型DR15陰性対DR15陽性患者

【0080】

(6) 試験結果およびその評価

この薬物投与試験の効果の判定は、次の基準により評価した。即ち、関節リウマチの病態評価に通常実施される8つのカテゴリーの検査項目、即ち、腫脹関節数(SJC)、疼痛関節数(TJC)、急性期反応物質(CRP)、赤血球沈降速度(ESR)、関節破壊

マーカー（MMP3）、患者全般活動性評価（VAS-2）、医師による全般活動性評価（VAS-3）、身体機能評価（mHAQ）の各項目において20%以上の改善が3ヶ月間継続している場合をポイント1とし、ポイント1が3検査項目回以上ある場合、即ちポイント3以上のものを有効と判断した。これらの結果をまとめて表6に示す。

【0081】

また、ポイント3以下であっても、医師の総合判定（VAS-3）において20%ないしそれ以上の改善が得られ、且つ、一般健康指標、貧血、疲労感、薬剤の減量を可能にしたなどの条件を総合的に勘案して、やや有効としたものに患者7と患者8の2つの症例があった。（表6、症例7、8）

【0082】

これらの17名の患者を白血球型HLA-DR15の有無で2群に分け、乳清タンパク抗体を含む治療剤摂取前の患者暦を表4、表5に示した。

治療開始前の2群を比較すると、患者年齢、罹患期間、リウマチ因子には有意な差は認められないが、関節リウマチの重症度（越智分類）において、HLA15陰性群に多関節型やムチランス型が多く、重い病状であった。疾患活動性の指標となるDAS28の値は、DAS28（CRP）、DAS28（ESR）ともに白血球型HLA-DR15が陽性の患者に比べて、HLA-DR15が陰性の患者群では有意に高く、病状が悪いことを示していた。mHAQは患者の日常生活のmHAQ（身体機能）の評価値では、統計的に有意ではない、（DR15陰性群 12.2 ± 7.2 対DR15陽性群 6.4 ± 6.6 、 $p = 0.117$ ）が、DR15陰性群の患者で大きく、骨破壊の程度についてもDR15陰性群において2+がみられるなど、病状が悪いことを示していた。

【0083】

次に、この17例の患者における乳清タンパク抗体を3ヶ月投与後の効果を、HLA-DR15の有無により2群に分け、それぞれの評価結果を表6に示した。

関節リウマチ薬物療法剤による治療効果の評価は、通常、各検査項目について、薬物使用前後における各検査の測定値より、その変化率%{(前値-後値/前値)×100}をしらべ、20%以上の改善が認められる場合を、其の検査について改善があったと認めることが通常実施されている。表6には、20%以上の改善が得られた場合を太字で示した。

【0084】

10

20

30

【表 6】

HLA-DR15の有無とミルク抗体の関節リウマチ治療効果

患者番号	HLA型	臨床検査数値の3ヶ月後の改善率(%) (1)										評価点(11)	代表的な改善点		最終評価 (12)
		TJC(2)	SJC(3)	CRP(4)	ESR(5)	MMP3(6)	mHAQ(7)	VAS-1(8)	VAS-2(9)	VAS-3(10)	胃腸障害		全身症状		
1	陰性	100	40.0	72.4	43.5	-39.4	100	76	63	60	7	便秘改善	疲労, 貧血, 体重増加 (3kg)	有効	
2	陰性	40	50.0	61.7	56.3	-17.2	40	38	38	30	7	便秘改善	日常生活動作	有効	
3	陰性	8	57.6	75.9	32.0	66.9	40	24	18	30	7	便秘改善	疲労, 貧血, 体重増加 (3kg)	有効	
4	陰性	100	61.1	-4.3	8.6	54.6	100	62	77	50	6	-	身体軽快感	有効	
5	陰性	24	52.9	73.5	7.5	-42.9	0	15	-16	20	4	便秘改善	食欲, 睡眠	有効	
6	陰性	67	41.7	0.0	10.0	-6.2	0	-80	-11	20	3	下痢改善	健康感	有効	
7	陰性	-29	-66.7	-300.0	-53.3	7.0	-11.76	2	-4	20	1	-	少	やや有効	
8	陰性	10	3.7	-4.1	12.0	4.9	0.00	-9	-7	20	1	下痢改善	身体軽快感, ステロイドと酸性消炎鎮痛剤投与量減少	やや有効	
9	陰性	-18	20.0	-48.9	15.2	-344.5	5	6	-5	0	0	-	-	無効	
平均		33.48	28.93	-8.19	14.64	-35.20	30.36	14.80	16.99	27.78	4.00			8/9	
標準偏差		47.19	40.34	118.34	30.84	121.86	43.40	45.30	34.52	17.87	2.87				
10	陽性	-80	55.6	0.0	71.4	59.3	0	44	27	20	5	-	健康感	有効	
11	陽性	10	22.2	-233.3	25.0	-4.5	-30	15.0	12	10	2	便秘改善	便秘解消	無効	
12	陽性	-41	22.2	-91.7	-13.6	-10.2	0	0.0	0	0	1	-	-	無効	
13	陽性	-13	-26.3	-185.0	-175.7	-146.7	12	11.0	20	0	1	-	-	無効	
14	陽性	-33	0.0	-63.6	-29.7	NT	0	-2.0	-2	0	0	便秘改善	便秘改善	無効	
15	陽性	NT	NT	NT	-20.0	-9.4	NT	-51.0	NT	0	0	-	-	無効	
16	陽性	-92	-157.1	-1300.0	-316.7	-8.1	-50	-33.0	17	0	0	-	-	無効	
17	陽性	-90	0.0	-150.0	-31.3	-62.1	-50	-22.0	-27	0	0	-	-	無効	
平均		-48	-12	-289	-61	-26	-17	-5	7	4	1			1/8	
標準偏差		39.9	68.9	452.5	124.9	63.8	26.0	30.0	18.2	7.4	1.7				
T-test*		0.002	0.196	0.156	0.134	0.848	0.018	0.307	0.457	0.004	0.025			p=0.0034**	

** : X²乗検定

(1) ミルク抗体投与前後にお各臨床マーカーの変化率を%で表した。変化(改善)率20%以上を有効とした。太字は有効を示す。

(2) TJC圧痛関節数:スコア-49、

(5) ESR赤沈:mm/hr、

(8) VAS-1: 患者による全般的活動性評価 0~100mm、

(10) VAS-3: 医師による全般的活動性評価 0~100mm、5%以下の改善は改善なし、5~20%:やや改善、20%以上:改善

(11) 8検査項目(TJC,SJC,CRP,ESR,MMP,mHAQ,VAS-1,VAS-3)の1項目で改善が見られた場合をスコア-1と数え、スコア-3以上を有効、3未満を無効と判定した。

(12) 患者7,8においては途中薬剤の減量があり、その影響を勘案してミルク抗体の効果をやや有効と判定した。

(4) CRP急性期反応蛋白: mg/dl、

(7) mHAQ:身体機能評価 スコア-28、

【0085】

表6の結果から、20%以上の改善を示す変化率(太字で示した)はDR15陰性群に多いことが一見してわかる。すなわち、HLA-DR15陰性群において乳清タンパク抗

体の効果は、9患者10検査項目計90評価ポイントにおいて、変化率20%以上のポイントは44(=44/90)であったのに対し、HLA-DR15陽性群のそれは11/80で、 $p < 0.01$ で有意であった。また、変化奏功する結果が得られた検査8項目すなわちTJC、SJC、CRP、ESR、MMP-3、mHAQ、VAS-2、VAS-3の和を表6の評価点スコアの欄に示した。評価点のDR15陰性群の平均±評価点スコアが 4.0 ± 2.87 であったのに対し、DR15陽性群のそれは 1.1 ± 1.7 で、統計検定の結果を最下段に示したごとく、 $p = 0.025$ と有意な差であった。さらに、表6の代表的な改善点の欄に示した全身症状を加味した最終評価により、DR15陽性群が1/8例にて有効であったのに対し、DR15陰性群では8/9例にて有効であった。

10

【0086】

以上の結果は関節リウマチ患者に乳清タンパク抗体を用いるにあたっては、まず患者のHLA型DR15の判定による関節リウマチ患者の診断を行い、DR15が陰性の患者を選ぶことにより、このような患者に対して乳清タンパク抗体が効果的に作用し、関節リウマチ患者をより効果的に治療できることが分かった。

【実施例2】

【0087】

HLA-DR15鑑別用の体外診断薬の作成

特許文献8(特開平5-192198号公報)に開示された方法に基づき、DR15遺伝子のプローブとして、表1のDRB7011J及びDRB8603Jの配列について、また共通プローブ(Common)としてはTGCA GACACA ACTAGGG配列について、それぞれの配列が約50回繰り返された配列を含む一本鎖DNAを調製した。得られた一本鎖DNAをマイクロタイタープレートに次のようにして固定した。まず、0.75M塩化ナトリウム、0.15Mトリス-塩酸、および0.15M塩化マグネシウム(pH8.0)溶液にDRB7011J及びDRB8603J由来の一本鎖DNAがそれぞれの濃度が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように、この2プローブの混合溶液とした。また、共通プローブ由来の一本鎖DNAは、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液とした。これらの一本鎖DNA溶液を、マイクロタイタープレートに1ウエル当たり $100 \mu\text{L}$ ずつ加えた。プレートにふたをして37で16時間放置した後、ウエル内の液を除き、30分間37に放置し乾燥した。乾燥プレートは $5 \times 10^5 \mu\text{J}$ の紫外線照射をUV照射装置(Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA))を用いて行った後、洗浄緩衝液0.2mL(1M塩化ナトリウム、0.1Mトリス-塩酸、2mM塩化マグネシウム、0.1%ツイーン20(pH9.3))で3回洗浄し、使用時まで4の温度で放置した。

20

30

このようにしてウエル内の固定相にDR15遺伝子のプローブと共通プローブが固定された本発明の抗体治療及び/又はエンドトキシン吸収剤治療に有効な自己免疫疾患患者の体外診断薬を得た。

【0088】

次に、ヒト白血球より抽出したDNAをサンプルとして、段落番号[0046]に記載した配列名DRBAM-C及びDRBAM-Bの配列をビオチン標識プライマーとして、PCR法により30サイクルの増殖を行った。得られた増幅物を96で10分加熱し、急速氷冷により熱変性した後、その $5 \mu\text{L}$ をハイブリダイゼーション溶液(0.75M食塩、0.075Mクエン酸ナトリウム、塩酸添加によりpH7.0溶液としたもの)の $100 \mu\text{L}$ が入れられた、本発明の体外診断薬である上記の一本鎖DNAが固定されたウエルに添加し、58で1時間放置してハイブリダイズした。ウエル液を捨てた後、マイクロプレート洗浄機を用いて、65に加温したTMAC溶液(3M塩化テトラメチルアンモニウム、50mMトリス-塩酸、2mMEDTA、pH7.5)300 μL で3回洗浄した。さらにウエルを300 μL の酵素希釈液(0.1M食塩、0.1Mトリス-塩酸、2mMMgCl₂、0.05%ツイーン20、pH7.5液)により3回洗浄した。次いで、酵素希釈液で5000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジンを100 μL 加え、室温にて15分間放置した。液を除いた後、酵素希釈液300 μL で3回洗浄した。発

40

50

色基質(A B T S)液(1.5 mM 2,2'-アジノ-ビス-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホニックアシッド)ジアンモニウム、0.015%過酸化水素水、0.2 M 酒石酸緩衝液 pH 4.4)を加え、15分室温で反応させた後、415 nmの吸光度を測定した。

【0089】

表4に示した17例の患者について、ここで得られた本発明による体外診断薬キットによる診断を行い、DR15の陰性(-)及び陽性(+)の診断を行った。その結果は表7に示したとおりであり、各患者のDR15陰性・陽性の判定がなされ、これは実施例1によるDR型診断に基づき結果と同じであり、抗体治療又はエンドトキシン吸収剤治療が奏功する自己免疫疾患患者を診断することができた。

【0090】

【表7】

HLA-DR15体外診断結果

患者番号	白血球DR型	DR15プローブ吸光度	共通プローブ吸光度	HLA型DR15判定
1	DR1、DR4.1	0.13	2.15	-
2	DR4.1、DR4.2	0.11	2.50	-
3	DR8.1、DR14	0.09	2.35	-
4	DR9、DR14	0.26	2.03	-
5	DR13、DR14	0.20	1.74	-
6	DR4.1、DR12	0.09	2.05	-
7	DR9	0.19	2.22	-
8	DR4.1、DR11	0.28	2.30	-
9	DR4.1	0.09	2.11	-
10	DR4.1、DR15	1.10	2.00	+
11	DR8.1、DR15	1.75	2.03	+
12	DR11、DR15	1.51	1.95	+
13	DR11、DR15	2.30	1.66	+
14	DR9、DR15	1.19	1.57	+
15	DR4.1、DR15	0.75	2.36	+
16	DR4.1、DR15	1.52	2.65	+
17	DR4.1、DR15	0.88	2.05	+

【実施例3】

【0091】

エンドトキシン吸収剤の調製例

(1) エポキシアクリル樹脂ポリミキシンB結合体RPMB

硫酸ポリミキシン300万単位(ファイザー株式会社製)を0.1M NaCl溶液200 mLに溶かし、水酸化ナトリウムを加えてpHを8に調整し、ビーカーに入れた。これにエポキシ活性基を有するポリアクリル樹脂(アンバーザイム; 米国ロームアンドハース社製)4gを加え、攪拌プロペラで72時間攪拌した。樹脂を5μmメンブレンフィルター上で精製水1000 mLで洗浄し、あらかじめ水酸化ナトリウムを加えてpH 8.0に調整した1Mグリシン溶液50 mLを含むビーカーに入れ、一夜置き、ろ過した後、精製水2リットルを流して洗浄した。樹脂に残留する水分はデシケータ内に置いて乾燥させ、エポキシアクリル樹脂ポリミキシンB結合体であるポリミキシン結合樹脂(以下球状RPMBとする)3.9gを得た。

【0092】

(2) エポキシアクリル樹脂ポリミキシンB結合体RPMB - 1

エポキシ活性基を有するポリアクリル樹脂（商品名：アンバーザイム、米国ロームアンドハース社製）4 gを乳鉢にいれた。硫酸ポリミキシンB 300万単位を0.1 MのNaCl溶液200 mLに溶かし、水酸化ナトリウムを加えてpHを8に調整した。調整したポリミキシン溶液を少量ずつ加え、乳棒を用いて樹脂を搗り潰した。すべてのポリミキシン溶液を加え、72時間マグネチックスターで攪拌した。樹脂を5 μmメンブレンフィルター上で精製水100 mLを注いで洗浄し、これをあらかじめ水酸化ナトリウムを加えてpH 8.0に調整した1 Mグリシン溶液50 mLを含むビーカーに入れ、一夜放置し、ろ過した後、精製水2リットルを流して洗浄した。樹脂に残留する水分はデシケータ内に置いて乾燥させ、エポキシアクリル樹脂ポリミキシンB結合体であるポリミキシン結合樹脂（RPM B-1）3.2 gを得た。

【産業上の利用可能性】

【0093】

関節リウマチ患者などの自己免疫疾患の患者について、本発明の体外診断薬によって患者の診断を行ない、予め患者のHLA型DR15が陰性か陽性かを判定し、DR15が陰性の患者に対して本発明の抗体治療剤またはエンドトキシン吸収剤を投与することによって、より効果的に自己免疫疾患の患者の治療を行うことができ、この分野での自己免疫疾患の患者の効果的な治療に有用である。

【配列表】

2010123069000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/057156
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(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) C12Q1/68, A61K39/395, A61K45/00, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, C12N15/09, C12Q1/02 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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2006-151914 A (Asama Chemical Co., Ltd.), 15 June 2006 (15.06.2006), paragraph [0010] & US 2007/0207187 A1 & EP 2177229 A	7-11/4-11
Y	Takashi HOSOYAMADA et al., "Kawasakibyō no Kioreki ga ari Anaphylactoid Purpura o Hassho shita 3 Shorei", Gekkan Rinsho to Kenkyu, 1999, vol.76, no.10, pages 172 to 175	4-11
Y	HAMEED, K., et al., "The association of HLA-DRB genes and the shared epitope with rheumatoid arthritis in Pakistan", Br. J. Rheumatol., 1997, Vol. 36, pp.1184-1188	4-11
<input checked="" 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 09 July, 2010 (09.07.10)		Date of mailing of the international search report 20 July, 2010 (20.07.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057156

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KERLAN-CANDON, S., et al., "Specific Overexpression of Rheumatoid Arthritis? Associated HLA?DR Alleles and Presentation of Low-Affinity Peptides", Arthritis Rheum., 2001, Vol. 44, No. 6, pp.1281-1292	4-11
Y	MARCHINI, M., et al., "HLA Class IIa Antigens Associated With Lupus Nephritis in Italian SLE Patients", Hum. Immunol., 2003, Vol. 64, pp.462-468	4-11
Y	STICKLER, M., et al., "The HLA-DR2 haplotype is associated with an increased proliferative response to the immunodominant CD4+ T-cell epitope in human interferon-beta", Genes Immun., 2004, Vol. 5, pp.1-7	4-11
Y	JP 2007-186508 A (President and Fellows of Harvard College), 26 July 2007 (26.07.2007), paragraph [0003] & JP 10-500705 A & US 5874531 A & US 7255861 B1 & US 2008/0089900 A1 & EP 759771 A1 & WO 1996/027387 A1 & CA 2189738 A	4-11
A	PHELPS, R., G., et al., "Properties of HLA class II molecules divergently associated with Goodpasture's disease", Int. Immunol., 2000, Vol. 12, No. 8, pp.1135-1143	4-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057156

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1-3, 12-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The above claims pertain to diagnostic methods or methods for treatment of the human body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/057156	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(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. C12Q1/68, A61K39/395, A61K45/00, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/02, C12N15/09, C12Q1/02			
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010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、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), PubMed			
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 請求項の番号	
X/Y	JP 2006-151914 A (アサマ化成株式会社) 2006.06.15, 段落【0010】 & US 2007/0207187 A1 & EP 2177229 A	7-11/4-11	
Y	細山田隆 他, 川崎病の既往歴がありアナフィラクトイド紫斑病を発症した3症 例, 月刊 臨床と研究, 1999, 第76巻第10号, 第172-175頁	4-11	
<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		の日の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 09.07.2010		国際調査報告の発送日 20.07.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 高山 敏充	4B 4153
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 7 1 5 6
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 請求項の番号
Y	HAMEED, K., et al., "The association of HLA-DRB genes and the shared epitope with rheumatoid arthritis in Pakistan", Br. J. Rheumatol., 1997, Vol. 36, pp.1184-1188	4-11
Y	KERLAN-CANDON, S., et al., "Specific Overexpression of Rheumatoid Arthritis?Associated HLA?DR Alleles and Presentation of Low-Affinity Peptides", Arthritis Rheum., 2001, Vol. 44, No. 6, pp.1281-1292	4-11
Y	MARCHINI, M., et al., "HLA Class IIa Antigens Associated With Lupus Nephritis in Italian SLE Patients", Hum. Immunol., 2003, Vol. 64, pp.462-468	4-11
Y	STICKLER, M., et al., "The HLA-DR2 haplotype is associated with an increased proliferative response to the immunodominant CD4+ T-cell epitope in human interferon-beta", Genes Immun., 2004, Vol. 5, pp.1-7	4-11
Y	JP 2007-186508 A (プレジデント アンド フェローズ オブ ハーバード カレッジ) 2007.07.26, 段落【0003】 & JP 10-500705 A & US 5874531 A & US 7255861 B1 & US 2008/0089900 A1 & EP 759771 A1 & WO 1996/027387 A1 & CA 2189738 A	4-11
A	PHELPS, R., G., et al., "Properties of HLA class II molecules divergently associated with Goodpasture's disease", Int. Immunol., 2000, Vol. 12, No. 8, pp.1135-1143	4-11

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 7 1 5 6

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1-3, 12-14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、人体の診断方法または治療による人体の処置方法である。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, 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, SM, 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 塩野谷 博

東京都中央区日本橋小伝馬町 2 0 番 3 号 アサマ化成株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 DA13 FB02
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA09
 4B063 QA19 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS33 QS34 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZA96 ZB08 ZB15 ZB35 ZC37
 4C085 AA13 AA14 AA33 BA07 BA41 BA42 CC07 CC16 CC24 EE01
 GG08

(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)	用于诊断患有自身免疫疾病的患者的方法，体外诊断剂及其治疗剂		
公开(公告)号	JPWO2010123069A1	公开(公告)日	2012-10-25
申请号	JP2011510362	申请日	2010-04-22
申请(专利权)人(译)	アサマ化成株式会社		
[标]发明人	寺戸国昭 片山耕 岩附聡 塩野谷博		
发明人	寺戸 国昭 片山 耕 岩附 聡 塩野谷 博		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K39/395 A61K45/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 C07K16/12 C07K2317/12 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N2800/102 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K39/395.Y A61K45/00 A61P37/02 A61P29/00.101 A61P19/02 G01N33/50.Z G01N33/53.M C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA13 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA09 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA96 4C084/ZB08 4C084/ZB15 4C084/ZB35 4C084/ZC37 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA33 4C085/BA07 4C085/BA41 4C085/BA42 4C085/CC07 4C085/CC16 4C085/CC24 4C085/EE01 4C085/GG08		
优先权	2009105776 2009-04-24 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于诊断其中抗体治疗和/或内毒素吸收剂治疗有效地起作用的患者的方法，以及用于这种诊断的体外诊断剂，以及对患有这种自身免疫疾病的患者的特别有效的治疗。本发明旨在提供一种试剂和治疗方法，其特征在于选择对患者的免疫系统细胞中表达的HLA型DR基因座的DR15阴性的患者，并进行抗体治疗和/或诊断对内毒素吸收剂治疗有效的自身免疫疾病患者的方法，以及患有这种自身免疫疾病的患者的体外方法，其包含HLA型DR基因标记的引物和与DR15基因互补的固定相探针作为必需成分。诊断剂，自身免疫病患者的另一种治疗剂，其包含免疫球蛋白和/或内毒素吸收剂，并且对免疫系统细胞中表达的HLA-DR15呈阴性，以及这种自身免疫病治疗自身免疫疾病，该方法包括口服给予所述治疗剂给用户的方法。

配列名	配列	反应特异性
DRB2801J	CGGTTGCTGGAAGATGCATC	01
DRB7003	GACCTCCTGGAAGACAGG	1602、1108、1320、1403、1412
DRB7007	ACATCCGGAAGACGAGC	0103、0402、0414、0102、1114、1120、1320
DRB7012J	GCAGAGCCGGCCCGCGT	0101、0102
DRB70J	AGACAGCCGGCCCT	08、0412、0418、1403、1412、1415、1604
DRB7002	GACTTCCTGGAAGACAGG	1601、1603、1604、
DRB7010	GGACATCCTGGAAGACAG	1605、1606