

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-9889

(P2005-9889A)

(43) 公開日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int.Cl.⁷

G01N 33/53

F I

G01N 33/53

P

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-171089 (P2003-171089)	(71) 出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22) 出願日	平成15年6月16日 (2003.6.16)	(72) 発明者	小林 幸司 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	阿部 佳子 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	栗山 澄 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患治療薬の効果判定方法

(57) 【要約】

【課題】関節リウマチなどの自己免疫疾患治療薬の効果判定する方法であって、より早期にかつ正確に治療効果を判定することを可能とする方法を提供する。

【解決手段】自己免疫疾患治療薬の投薬前後に被験対象から採取された血液を用意する工程と、血液細胞から生理活性物質の産生を誘導する材料と上記各血液と接触させ、血液中に産生された生理活性物質量を定量し、治療薬投薬前後の生理活性物質産生量を比較する工程とを備える、自己免疫疾患治療薬の効果判定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己免疫疾患治療薬の投薬前後に被験対象から採取された血液を用意する工程と、血液細胞から生理活性物質の産生を誘導する材料と前記各血液と接触させ、該血液中に産生された生理活性物質量を測定する工程と、前記治療薬投薬前後の各血液における生理活性物質産生量を比較する工程とを備える自己免疫疾患治療薬の効果判定方法。

【請求項 2】

血液細胞から産生された生理活性物質が腫瘍壊死因子 - (T N F -) またはインターロイキン - 6 (I L - 6) である請求項 1 に記載の自己免疫疾患治療薬の効果判定方法。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、例えば関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療薬の効果判定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

リウマチとは、「骨、関節、筋肉、腱などの運動器官に痛みとこわばりを訴える疾患」である。特に、関節リウマチは、多発性関節炎を主症状とする。しかしながら、関節リウマチは内臓にも広範に病変を惹起する全身性の自己免疫疾患である。全人口に占める関節リウマチ患者の割合は、世界中で 0.5 ~ 1.0 % であり、日本では 70 ~ 100 万人の患者がいると推定されている。従って、関節リウマチの治療及び診断技術の大きな進歩が望まれている。 20

【0003】

関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療薬としては、非ステロイド系抗炎症剤、ステロイド剤、抗リウマチ剤、免疫抑制剤、サイトカイン療法剤などが知られており、患者の症状に合わせてこれらが用いられている（例えば、下記非特許文献 1 など）。治療薬の効果判定に際しては、患者の主観的な評価、すなわち、発熱、朝のこわばり、疲労、リウマトイド結節の有無、関節疼痛度、疼痛関節数と、客観的な評価、すなわち、腫脹関節数、放射線アイソトープの関節への集積、サーモグラフィーによる関節温度、CRP、赤沈、リウマトイド因子または関節液所見などの検査成績とから総合的に判断されている（下記非特許文献 2 など）。 30

【0004】

しかしながら、上記治療薬の効果判定には通常 3 ~ 6 ヶ月を要し、効果が認められない場合には、病状を悪化させがちであった。そのため、治療薬の効果をできるだけ早期に正しく判定し、適切な治療薬を投与することが望まれており、そのためにも治療薬の比較かつ早期な判定方法が強く求められている。

【0005】

【非特許文献 1】

Arthritis and Rheumatism、別冊、45 ページ、1987 年

【非特許文献 2】

メディカルテクノロジー、第 18 巻、第 7 号、609 ページ、1990 年 40

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、関節リウマチなどの自己免疫疾患治療薬の効果を早期にかつ高精度に判定することを可能とする自己免疫疾患治療薬の効果判定方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明に係る自己免疫疾患治療薬の効果判定方法は、自己免疫疾患治療薬の投薬前後に被験対象から採取された血液を用意する工程と、血液細胞から生理活性物質の産生を誘導する材料と前記各血液と接触させ、該血液中に産生された生理活性物質量を測定する工程と 50

、前記治療薬投薬前後の各血液における生理活性物質産生量を比較する工程とを備えることを特徴とする。

【0008】

上記血液細胞から産生される生理活性物質としては特に限定されないが、例えば、腫瘍壊死因子 - (TNF -) またはインターロイキン - 6 (IL - 6) などが挙げられる。

【0009】

以下、本発明の詳細を説明する。

本発明は、自己免疫疾患の効果判定方法に係るものであるが、本発明が適用される自己免疫疾患は特に限定されず、例えば、関節リウマチ、若年性関節炎、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、壊死性脈管炎とその他の血管障害、シェーグレン症候群、ベーチェット病、ライター症候群、サルコイドーシス、クローン病、潰瘍性大腸炎などが挙げられる。

10

【0010】

上記自己免疫疾患治療薬とは、例えば、関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療に用いられる薬剤を広く含む。このような薬剤としては、例えば、プレドニゾロンなどのステロイド剤、金チオリンゴ酸ナトリウム、オーラノフィンなどの金製剤、D - ペニシラミン、ブシラミンなどのSH製剤、サラゾスルファピリジン、アクタリット、ロペンザリットナトリウム等が挙げられる。また、ミゾリピン、メソトレキサート、サイクロファスファミド、アザチオプリン、FK - 506、レフルマノイドなどの免疫抑制剤、抗TNF - 抗体、可溶性TNF - レセプター、抗IL - 6抗体、IL - 6レセプター抗体などの抗サイトカイン療法剤などが挙げられる。

20

【0011】

本発明は、上記治療薬が、白血球などの血液細胞の生理活性物質の産生能力に大きく影響し、該産生能力に基づいて治療薬の効果を判定し得ることを見出し、該知見に基づいてなされたものである。

【0012】

本発明の効果判定方法では、上記治療薬の投薬前後に被験対象から採取された血液が用意される。血液の採取方法は特に限定されない。この場合、血液の凝固を防止するために、血液抗凝固剤を血液に添加してもよい。

【0013】

血液抗凝固剤としては、ヘパリン化合物、クエン酸化合物、シュウ酸化合物などが挙げられ、ヘパリンナトリウムなどが細胞の生物学的反応を阻害しないので好ましい。上記ヘパリンナトリウムの容器中の収容量としては、該容器に血液が収容されたときに、その血液中のヘパリンナトリウム濃度が低くなると血液凝固のおそれがあり、高くなると細胞に不測の活性化や不活性化を起こすおそれがあるので、好ましくは4 ~ 50 U / ml、より好ましくは8 ~ 20 U / ml とされる。

30

また、採取される血液量は、特に限定されず、後述の生理活性物質の産生を定量し得るのに十分な量であればよい。

【0014】

本発明の効果判定方法では、上記のようにして用意された血液に、血液細胞から生理活性物質の産生を誘導する材料が接触される。生理活性物質の産生を誘導する材料とは、血液細胞、特に顆粒球、単球、マクロファージ、リンパ球等の白血球や血小板と反応し、これらの細胞の活性化を促し、種々の生理活性物質の産生、遊離もしくは誘導を引き起こす材料をいい、従来、前記細胞の活性化物質として知られる種々の材料が挙げられる。例えば、結核菌、コリネバクテリウム菌、溶連菌などの種々の微生物、OK432、合成リピドA、ピランコポリマー、精製ツベルクリン、レクチン(フィットヘマグルチニン、コンカナバリンA、ポークウィードマイトゲン等)、ザイモザン、LPS(エンドトキシン)、スーパー抗原、PSK(クレスチン)、レンチナン、カルシウムイオノフォア、ホルボルエステル、免疫グロブリン固定化担体、ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン(FMLP)などのホルミルペプチド、種々のサイトカインなどが挙げられる。特に、LPS

40

50

が生理活性物質の誘導活性が高く好適である。

【0015】

また、本発明において血液細胞から産生される生理活性物質は、上記生理活性物質の産生を誘導する材料との反応により、血液細胞から誘導、産生される物質を広く含む。このような生理活性物質としては、IL-1~18等のインターロイキン、INF-、INF-、INF-等のインターフェロン、G-CSF、GM-CSF、M-CSF等のコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子(TNF-)、腫瘍壊死因子(TNF-)、RANTES等の種々のサイトカインやPGE-2、PGI-2等のプロスタグランジン、LTB4、LTC4等のロイコトリエン、一酸化窒素、活性酸素、ヒスタミン、血小板活性化因子(PAF)などの種々のケミカルメディエーターが挙げられる。また、可溶性ICAM-1などの接着因子、可溶性IL-2レセプターなどの可溶性サイトカインレセプターが挙げられる。特に、後述の実施例から明らかかなようにTNF-、IL-6が好適である。

10

【0016】

上記生理活性物質の産生を誘導する材料の必要量は、使用する材料によっても異なるため、一義的には定められない。もっとも、通常、用いられる材料ごとにその量を変化させ、指標とする生理活性物質の誘導活性を測定し、得られた用量反応曲線から最適量を設定すればよい。例えば、生理活性物質の産生を誘導する材料としてエンドトキシン(LPS)を用い、指標とする生理活性物質としてTNF-またはIL-6を用いる場合には、血液中のエンドトキシン濃度として0.6~10万EU/mlとするのが好ましく、より好ましくは20~1千EU/mlである。

20

【0017】

本発明に係る効果判定方法では、上記血液細胞から生理活性物質の産生を誘導する材料と血液とが接触されて、血液中に生理活性物質が産生される。そして、この産生された生理活性物質量を定量し、治療薬投与前後の生理活性物質産生量を比較することにより、自己免疫疾患治療薬の効果が判定される。上記生理活性物質の産生を誘導する材料と血液との接触は、任意の方法で行われ得る。すなわち、採血管内に血液を採取し、該採血管内に生理活性物質の産生を誘導する上記材料を添加してもよく、あるいは用意された血液と、生理活性物質の産生を誘導する材料とを適宜の容器内で混合することによって行ってもよい。

30

【0018】

また、上記血液と生理活性物質の産生を誘導する材料との接触に際しての温度は、生理活性物質の産生が効率的に行われ、過度の溶血を引き起こさない温度である15~42の範囲が好ましく、より好ましくは、溶血をより確実に抑制するために30~40の範囲が望ましい。

【0019】

接触時間は、生理活性物質の産生が効率的に行われ、過度の溶血を引き起こさない反応時間である1~48時間が好ましく、より好ましくは、2~24時間である。2~24時間の反応時間とすることにより、過度の溶血をより効果的に抑制することができると共に、十分な量の生理活性物質の産生が誘導される。

40

【0020】

また、生理活性物質の産生を誘導する材料と血液とを接触させる場合、上記温度範囲及び上記反応時間範囲が望ましいが、このような温度範囲で両者を接触させる方法としては、通常のインキュベート法などを用いることができる。

【0021】

反応後には、静置若しくは遠心分離により、血球と血漿とを分離し、血漿中のサイトカインなどの産生された生理活性物質濃度を測定すればよい。

また、上記血液と、生理活性物質の産生を誘導する材料とを接触させた後に産生された生理活性物質量は、様々な測定方法で測定され得る。すなわち、産生された生理活性物質量を定量し得る限り、測定方法は特に限定されない。例えば、定量しようとする生理活性物

50

質に対するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素及び各々の酵素の発色基質などを利用した酵素免疫測定方法が挙げられる。以下に、本発明の血液細胞から産生されたサイトカインなどの生理活性物質の血漿中濃度の定量方法の一例をさらに詳しく説明する。

【0022】

まず、血液と上記生理活性物質を誘導する材料とを測定容器の中で反応させ、生理活性物質を誘導し、誘導後の血液を1600Gで遠心して、血球成分と血漿成分を分離させる。次いで、分離された血漿を、上記生理活性物質に対するモノクローナル抗体を固定化したマイクロプレートのウェルに、ピペティングにより添加し、37℃で2時間反応させる。次いで、反応後の血漿液を吸引除去等の手段で廃棄し、さらに、未反応成分を除くため、Tween 20等のノニオン系界面活性剤を含有する中性pHの洗浄用緩衝液で上記ウェルを洗浄する。次いで、西洋わさびペルオキシダーゼを固定化した上記生理活性物質に対するポリクローナル抗体をピペティングにより添加し、37℃で1時間反応させる。次に、未反応の西洋わさびペルオキシダーゼ固定化抗体を除くため、上記ウェルを上記洗浄用緩衝液で洗浄した後、過酸化水素及びテトラメチルベンジジンを含む基質溶液を添加し、5～10分間反応させる。次に、1M硫酸溶液を添加し、反応を停止させて、酵素反応による基質の発色を450nmの吸光度で測定する。この測定値と既知濃度の上記生理活性物質を用いて作成した検量線から、上記生理活性物質の産生誘導量を測定する。

10

【0023】

なお、測定に用いられる血液量については特に限定されず、例えば関節リウマチなどの自己免疫疾患治療薬を投与する前後に、被験対象から2ml程度の血液を採取しておけばよい。

20

【0024】

なお、本発明における効果判定方法では、治療薬の投薬前後に採取された血液が用意され、各血液と生理活性物質の産生を誘導する上記材料と接触させ、投薬前後の生理活性物質産生量の比較により効果が判定されるが、より好ましくは、治療薬投与後に、複数回に渡って採取された血液を用い、各血液を上記生理活性物質の産生を有する材料と接触させて生理活性物質の産生量を測定し、比較してもよい。すなわち、投薬後の血液の生理活性物質産生能力を複数回評価し、投薬前の測定値とこれら複数の測定値を比較してもよく、それによって、より高精度に治療薬の効果を判定することができる。

30

【0025】

なお、治療薬の効果判定に際しては、投与前後の測定値を比較し、測定値が明らかに上昇した後、あるいは低下した場合に、その変動によって効果を判定することができる。この場合、疾患の種類及び治療薬の種類によって、測定値が上昇または下降した場合に、効果ありと判断されることになる。

【0026】

なお、採取された血液は、そのまま上記生理活性物質の産生を誘導する材料と接触されてもよく、あるいは複数の試験管に分注されてもよく、各試験管内で生理活性物質の産生を誘導する材料と接触されてもよい。後者の場合には、多数の測定資料を得ることができるため、測定をより高精度に行うことができる。

40

【0027】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の具体的な実施例を説明することにより、本発明を明らかにする。なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0028】

(実施例)

1週間の馴化飼育後に、ウイスター系ラット(日本SLC社製、雄、8週齢)の右後肢足せき皮下に、6mg/mlのMycobacterium tuberculosis H37RA/流動パラフィンのアジュバント液を0.1ml投与した。該アジュバント液は、Mycobacterium tuberculosis H37RA(Diffc

50

o社製)粉末を乳棒とめのう乳鉢により粉碎し、流動パラフィン(日本薬局方品)を少しずつ加えながらすり潰し、20mlの均一な懸濁液とした後、スクリー蓋付ガラス試験管に移し、121及び20分の条件でオートクレーブ滅菌し、十分ソニケーションした後、均一懸濁液としたものを用いた。

【0029】

上記アジュバント液を投与した後、左右足せきの腫脹をプレシスモメーター(Plethysmometer、Ugo Basile社製)にて測定し、関節炎症をモニターした。結果を図1に示す。

【0030】

自己免疫性の2治炎症による左足せきの腫脹を明らかに認めた時点で、リン酸プレドニゾロンナトリウム(萬有社製)を10mg/kgの濃度となるように静脈内に投与し、引き続き、足せきの腫脹をモニターした。結果を図1に示す。

【0031】

リン酸プレドニゾロンナトリウムを投与する前、すなわちアジュバント投与後22日目と、リン酸プレドニゾロンナトリウムを投与後1日目、及び投与後3日目に20Gの注射針を取り付けた10mlのシリンジ(テルモ社製)にて、4匹のラットから心搾針により、約8mlずつヘパリン採血した。なお、ヘパリンは、採取した血液中においてその濃度が15IU/mlとなるようにシリンジ内に収納しておいた。

【0032】

上記のようにして採取された各血液を、ポリエチレンテレフタレート製の試験管に1mlずつ分種し、エンドトキシンを100EU/mlの濃度となるように添加し、ブチルゴムで閉栓した。しかる後、37で4時間インキュベートを行った。次に、各試験管を、4及び1600Gの条件で10分間遠心し、血漿と固形分とに分離した。遠心分離後の血漿中のTNF-量及びIL-6量を、それぞれ、ラットTNF-ELISAキット(Genzyme/Techne社製)及びラットIL-6ELISAキット(Genzyme/Techne社製)を用いて測定した。

結果を図2及び図3に示す。

【0033】

(比較例)

実施例において、リン酸プレドニゾロンナトリウム投与前後に採取した血液に、エンドトキシンを添加することなく4時間インキュベートし、しかる後各試験管を4×1600Gで10分間遠心し、上澄みの血漿を分離した。このようにして得られた血漿中のTNF-量及びIL-6量を実施例と同様にして測定した。

【0034】

実施例及び比較例の結果を図2及び図3に示す。

リン酸プレドニゾロンナトリウム投与前後のTNF-及びIL-6産生量を、比較した結果、実施例ではTNF-とIL-6の産生量の有意な変化が、足せきの腫脹よりも早期に起こることがわかる。従って、上記実施例によれば、関節リウマチなどの自己免疫疾患治療薬の効果判定を早期に行ない得ることがわかる。

【0035】

【発明の効果】

本発明に係る自己免疫疾患治療薬の効果判定方法では、上記のように治療薬投与前後に採取された血液と、血液細胞から生理活性物質の産生を誘導する材料と接触させ、産生された生理活性物質量を定量し、投薬前後の生理活性物質産生量を比較するだけで、自己免疫疾患治療薬の効果判定を確実にかつ早期に行うことができる。従って、関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療効率を効果的に高めることができ、患者に対して適切な治療薬をより早期に適用することが可能となり、自己免疫疾患の治療効果を高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例において、ラットにアジュバントを投与した後の日数と、足せきの腫脹の変化との関係を示す図。

10

20

30

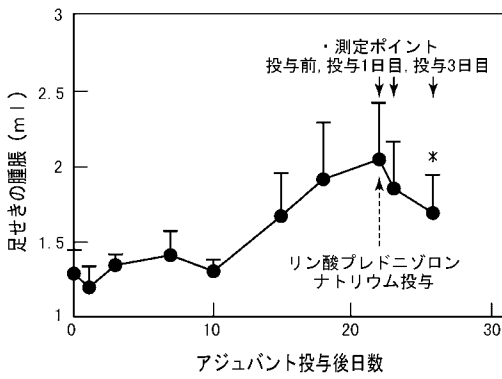
40

50

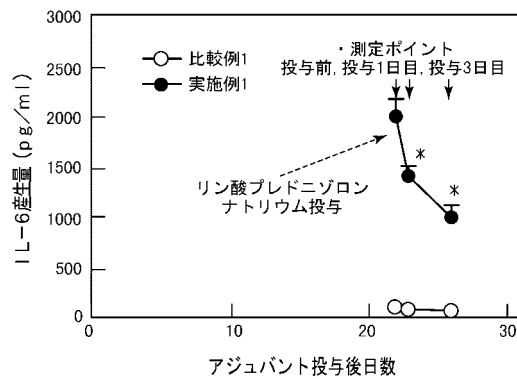
【図2】実施例及び比較例において、治療薬としてのアジュバント液を投与した後の日数と、TNF- α 産生量の変化を示す図。

【図3】実施例及び比較例において、治療薬としてのアジュバント液を投与した後の日数と、IL-6 産生量の変化を示す図。

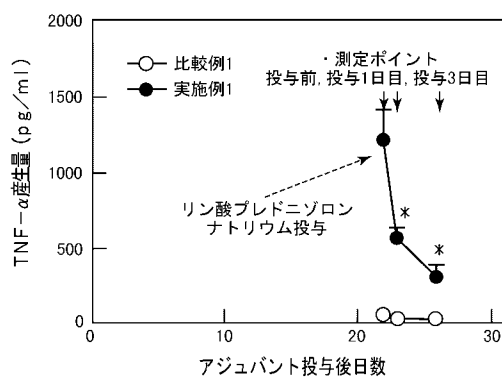
【図1】



【図3】



【図2】

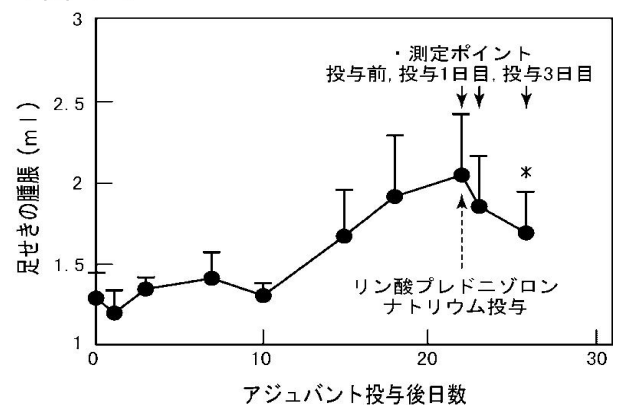


专利名称(译)	确定治疗剂对自身免疫疾病的作用的方法		
公开(公告)号	JP2005009889A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2003171089	申请日	2003-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	小林幸司 阿部佳子 栗山澄		
发明人	小林 幸司 阿部 佳子 栗山 澄		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.P		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，用于在早期准确地确定用于关节风湿病等的自身免疫疾病的药物的治疗效果。解决方案：确定药物对自身免疫疾病的影响的方法提供了一种制备从受试者收集的血液的过程，在施用自身免疫疾病药物之前和之后的过程以及产生诱导生理学产生的材料的过程。来自血细胞的活性物质与各血液接触，以确定在血液中产生的生理活性物质的量，并在施用自身免疫疾病药物之前和之后比较生理活性物质的量。Z

【 図 1 】



【 図 2 】