

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 14104

(P2002 - 14104A)

(43)公開日 平成14年1月18日(2002.1.18)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

テ-マ-ト* (参考)

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/68

2 G 0 4 5

33/53

33/53

V

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10数)

(21)出願番号 特願2000 - 199067(P2000 - 199067)

(71)出願人 000181147

持田製薬株式会社

(22)出願日 平成12年6月30日(2000.6.30)

東京都新宿区四谷1丁目7番地

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年2月28日

(72)発明者 垣下 榮三

大阪府池田市石橋4 - 8 - 20

(社)日本血液学会発行の「INTERNATIONAL JOURNAL

(72)発明者 岡本 隆弘

兵庫県西宮市愛宕山18 - 48

OF HEMATOLOGY 第71巻補冊1号」に発表

(72)発明者 高塚 広行

兵庫県川西市清和台東2 - 2 - 73

(74)代理人 100080159

弁理士 渡辺 望稔 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 G V H D の検出方法

(57)【要約】

【課題】 G V H D の早期検出に的確で有用な判断指標を提示し、当該指標に基づく G V H D の検出方法、薬物治療における G V H D の進展もしくは予防効果のモニタリング方法、並びに、これらの方法を効果的に実施するためのキットを提供すること。

【解決手段】 ヒトから採集された試料中の U T I の量を測定することを特徴とする G V H D の検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒトから採集された試料中のUTIの量を測定することを特徴とするGVHDの検出方法。

【請求項2】骨髄移植におけるGVHDの検出を目的とする請求項1に記載のGVHDの検出方法。

【請求項3】前記試料として、尿を用いることを特徴とする請求項1ないし2記載のGVHDの検出方法。

【請求項4】少なくとも前処置前、移植日、および移植後白血球回復期の3点で、試料中のUTIの存在を測定*

$$\{(c) - (b)\} / \{(b) - (a)\} > 0 \quad (1)$$

式中、

(a)：前処置前での試料中のUTI量の測定値

(b)：移植日での試料中のUTI量の測定値

(c)：移植後白血球回復期での試料中のUTI量の測定値。

【請求項6】UTIの定量を行なって急性GVHDを診断するために用いられるUTI測定キット。

【請求項7】免疫反応により試験試料中のUTIを測定する手段を有する急性GVHDの測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、GVHD（移植片対宿主疾患）の検出方法、並びに当該検出に用いられる測定キットに関する。詳細には、GVHDの患者から採取される試料中のUTI（尿中トリプシンインヒビター）を測定することを特徴とするGVHDの検出方法、並びに当該検出のためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】UTIは、ヒト由来の分子量約67000の酸性糖蛋白質であり、トリプシン、 α -キモトリプシン、ヒアルロニダーゼ、顆粒球エラスターゼ、プラスミン等の多種の酵素に対する阻害作用やライソゾーム膜安定化作用を有しこれらの作用に基づき、臨床的には急性循環不全症ならびに急性膵炎の治療薬として用いられている。

【0003】UTIの生物化学的性状は古くから知られており、ファールバングらの総説においてUTI活性が上昇する疾患として感染症、腎疾患以外に、心筋梗塞、外科手術、白血病、悪性腫瘍が記載され、また正常妊娠後期等においても、尿中排泄量が増加することが知られている（Faarvang, H. J. ら Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17(supp. 83)、1～78頁、1965年；桑島ら、炎症、9巻、3号、175～182頁、1989年）。しかしながら、これまでGVHDと生体中のUTIの濃度との関わりについては報告がなく、その病態と尿中排泄量との関係についても知られてはいなかった。

【0004】GVHDは、免疫担当細胞であるリンパ球が、移植片を拒絶し得ないような宿主に移植され生着し、宿主の組織抗原に対して移植免疫反応を起こす結果、ひきおこされる症状である。組織適合性の一致しな

*する工程を含んでなる、請求項1～3のいずれかに記載のGVHDの検出方法。

【請求項5】前処置前、移植日、および移植後白血球回復期の3点で、試料中のUTIの存在を測定する工程を含んでなり、試料中のUTI量の測定値が、下記関係式(1)を満たすことを、GVHDの発症の指標として判定することを特徴とする、請求項1～3の何れかに記載のGVHDの検出方法；

い他人からの骨髄移植や輸血あるいは、臓器移植を受けるときにしばしば発症する。

【0005】骨髄移植とは、レシピエント（受容者）の血液系を破壊した上で、健康なドナー（提供者）から骨髄、即ち血液系の基となる細胞集団（例えば幹細胞）を移植することによって、レシピエントの内々でドナー由来の血液系を再構成しようとする治療法である。レシピエントの血液系の破壊には、既に冒されている悪性疾患を排除することおよび/またはレシピエントの免疫系を抑制することを目的として放射線療法あるいは骨髄破壊性高用量化学療法等が行われる。骨髄移植は、移植片である骨髄細胞には造血幹細胞だけでなく免疫担当細胞も含まれているので、移植片拒絶（graft rejection）を免れてもGVHDが生じうる点で、他の臓器移植（腎、肝、心など）とは異なっている（原田実根ら、「新しい造血肝細胞移植」1～7頁、1998年、第2刷、南江堂）。

【0006】免疫不全の患者が免疫担当細胞の多い器官の移植を受けると、GVHDが発現する危険性は高い。従って、免疫系を再形成する目的で骨髄移植が行なわれる一時免疫不全の乳児および小児には重大な課題であり、また悪性疾患の治療のために骨髄移植を受ける患者にとっても重大な課題である。なお、白血病の治療に対する骨髄移植後の再発に対してドナーリンパ球輸注療法（DLT）が行われるが、その最大の副作用がGVHDであることも知られている（原田実根ら、「新しい造血肝細胞移植」177～182頁、前出）。また、臍帯血幹細胞移植においても臍帯血バンクを介した非血縁者間臍帯血幹細胞移植が行われつつあり、11度以上の急性GVHDの合併率は30～50%と報告されている（別冊・医学のあゆみ、「血液疾患」、Ver. 2436～439頁、1998年）。

【0007】GVHDには、急性（骨髄移植後数週間以内）もしくは慢性（移植後数ヶ月から数年続く）の両兆候が現れる。適当な総説としては、大野竜三ら「白血病治療マニュアル」177～184頁、1998年、第4刷、南紅堂が参照されよう。急性GVHDの主な標的臓器あるいは組織は皮膚、腸管、肝臓であり、症状としては、斑丘疹、紅斑性発疹、下痢および肝炎として現れ、また免疫再形成が、長時間の過酷な免疫抑制により

損なわれる。それぞれの臓器ごとに臨床的な重症度(stage)が決められ、臓器毎の重症度の組み合わせによって全身の重症度(grade)が決められている(Thomas EDら N Engl J Med 292巻: 832-843頁及び895-902頁, 1975年)。

【0008】急性GVHDの診断については、臨床的症状から以下のように行われる。まず、皮膚については、手掌や足底に紅斑が出現し、重症化するに従い、四肢、顔面、体幹へと広がり、斑状丘疹から紅皮症へと進展し、最終的には水泡を形成し落屑にいたることもある。鑑別すべき皮膚症状として、HHV-6による皮疹、薬疹、Stevens-Johnson症候群などがあり、確定診断は皮膚生検によっている。消化管症状としての下痢は、皮疹に数日遅れて出現する。1日の下痢量や血便、閉塞性イレウスなどの所見による判断がある。鑑別すべき消化管症状としては、前処置などの薬剤の副作用としての粘膜障害、サイトメガロウイルスによる腸炎、細菌性腸炎などがあり、直腸生検が確定診断となる。

【0009】肝障害の特徴は、AST(GOT)、ALT(GPT)、LDHなどの逸脱酵素の増加に比して、ALP、 γ -GTPなどの胆道系酵素や直接ビリルビンの増加が著しく、血清総ビリルビンのレベルによりstageが区別される。鑑別すべき肝合併症としては、肝中心静脈閉塞(VOD)、ウイルス性肝炎、シクロスポリン等による薬剤性肝障害などがある。確定診断は肝生検により、経皮的肝生検に代わって経静脈的肝生検が推奨されているが、我が国においてはまだ一般化していない。また、重症急性GVHDの際には、皮疹に数日先だって40度前後の高熱が出現することが多い。感染症との区別として、ステロイド投与に著名な反応が認められるときには、急性GVHDによる発熱の可能性が高い。その他急性膵炎、急性細気管支炎、食道炎、胃炎なども報告されている。

【0010】しかしながら、GVHDの検査所見に関しては、例えばIgE、インターフェロンやTNFが増加することが知られてはいるが、IgEは増加しない例もあり、インターフェロンやTNFではルーチンで測定することは困難でいずれも(早期)診断に役立てられることは少なく、現在までのところ急性GVHDに特有の検査所見はないとされている。

【0011】GVHDの予防は薬剤によるものと、骨髓中からT細胞を除去する方法とがある。薬剤による予防としては、例えば、移植後からメトトレキサートの静注または経口での投与、移植前日から移植後におけるシクロスポリンやタクロリムス(FK506)の点滴静注、或いは、前処置もしくは移植後の抗リンパ球細胞グロブリン(ALG)や抗胸腺腺細胞グロブリン(ATG)の投与などが挙げられる。T細胞除去法としては、T細胞特異的モノクローナル抗体を利用した除去や造血幹細胞の表面マーカーであるCD34抗原に対するモノクロー

ナル抗体を用いて幹細胞を選択的に分離する方法等が挙げられる。しかし、適切なGVHD予防を行っても、重症GVHDはある頻度で発症する。急性GVHDの治療は、患者ごとのリスクによって開始時期も治療内容も異なってくる。

【0012】軽症例ではプレドニン(1~2mg/kg)による治療を開始し、解熱、下痢量の減少が観られれば経過を観察し、漸減中止する。GVHDの重症例では、強力な免疫抑制療法を行わない限り救命は不可能である。例えばシクロスポリンによる予防を行っていた症例では、FK506に変更し、メチルプレドニゾロンの大量療法やALG或いはATGの投与を行うことが勧められるが、治療開始時期が多少でも遅れると救命は望み得ない。急性GVHDが重症化すれば、体液・蛋白の喪失、組織への体液貯留、臓器不全などの病態が進行し、やがて間質性肺炎などの感染症を合併して致死的経過をたどることになる。上記のGVHD治療が奏功するまでの期間の全身管理の良否も最終的な結果に影響する。

【0013】他方、慢性GVHDは、移植後100日以降に出現する自己免疫様病変と免疫不全を特徴とする病態である。慢性GVHDの進展形式は、1)急性GVHDからの移行(progressive type)、2)急性GVHDが一旦消失した後の発症(quiescent type)、3)慢性GVHDが初発するもの(de novo type)の3種類があり、急性GVHDからの移行は最も多く60%程度にも上る。慢性GVHDの治療には、薬物としてはシクロスポリンA、FK506、プレドニゾロン、アザチオプリン、サリドマイド等があるが、有効性のみならず副作用の観点においても現状では満足の行くものはない。先述のように、急性GVHDの存在が一番大きな慢性GVHDの発症要因であり、急性GVHDをいかに抑制するかによって慢性GVHDの予防と治療を考えるべきとされている。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、GVHDの診断を早期に的確に行うことは、GVHDの発症リスクを背負う患者とりわけ骨髓移植患者にとって、GVHDの予防や治療すなわち患者の救命や予後の管理に重要である。しかし、未だ適当な検査所見が確立されておらず、既存の診断方法にはそれぞれ鑑別されるべき諸症状が存在し、確定判断においても、患者に苦痛を与える生検や薬物の反応を観察することが必要である。

【0015】従って、本発明の目的は、GVHDの検出に的確で有用な判断指標を提示し、当該指標に基づくGVHDの検出方法、薬物治療におけるGVHDの進展もしくは予防効果のモニタリング方法、並びに、これらの方法を効果的に実施するためのキットを提供することである。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記の課題

を解決すべく鋭意検討した結果、骨髄移植患者のGVHDの重症化、患者の血液中もしくは尿中のUTI濃度の推移において、GVHDの重症化とUTI量の増加とに著明な相関を見出した。とりわけ急性GVHDの重症化と尿中へのUTI排泄量の増加とに強い相関を見出した。このことから本発明者らはGVHDの早期検出に的確で有用な指標として、尿中のUTIの排泄量を選択し急性GVHDの早期検出方法の提供、並びに当該検出のためのキットを提供することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0017】本発明の第一の態様は、ヒトから採取された試料中のUTIを測定することを特徴とするGVHDの検出方法である。好ましくは、GVHDが発症する恐れのある状態の患者から採取された試料中のUTI量を測定することを特徴とする急性GVHDの検出方法であ

$$\{(c) - (b)\} / \{(b) - (a)\} > 0 \quad (1)$$

を満たし、より好ましくは、

$$\{(c) - (b)\} / \{(b) - (a)\} > 1/3 \quad (2)$$

であることを、GVHD発症の判断の指標とする検出方法である。なお、上記関係式(1)、(2)において、

(a)：前処置前での試料中のUTI量の測定値

(b)：移植日での試料中のUTI量の測定値

(c)：移植後白血球回復期での試料中のUTI量の測定値

である。UTI量の測定値は後述するクレアチニン補正値を用いるのが好ましい。

【0022】試料は、例えば、患者から採取された尿もしくは血液であって、採取された新鮮な試料を用いることができるが、-80程度に冷凍保存された試料を適宜解凍して測定しても良い。また、尿に適当な保存剤もしくは安定化剤(例えばホルマリン、トルエン、フェノール、アジ化ナトリウム、或いは適当なプロテアーゼインヒビター(例えばベンザミン、トラネキサム酸等)等を添加して室温、好ましくは冷暗所にて保存した後測定に供しても良い。

【0023】なお、移植後白血球回復期のUTI測定のため、移植日以後毎日測定することも可能であるが、所定の間隔で測定することが好ましい。具体的には、1日～10日の任意の間隔で測定が可能であり、例えば2日毎、3日毎、5日毎、7日毎、10日毎の間隔が挙げられる。試料の採取は、尿の場合、例えば採尿時刻を1日の午前もしくは午後の何れかに設定するか、更に好ましくは、採尿時刻を特定時刻±1時間以内に設定し、同じ採尿時刻に採取された尿を用いる。採尿は、患者の自力による排尿を採取するか、経尿道的に膀胱から直接採取されたものであってもよい。

【0024】より早期の検出のためには、なるべく測定間隔を短くし、上記関係式を満たした時点でGVHDへの移行を疑う。測定間隔は、また、患者のUTI測定値の変化の個人差や容態等により、適宜変更される。以上

る。

【0018】本発明の第二の態様は、骨髄移植患者におけるGVHDの検出を目的とする第一の態様記載の検出方法である。

【0019】本発明の第三の態様は、試料として血液もしくは尿を用いることを特徴とする第一ないし第二の態様記載の診断方法である。

【0020】本発明の第四の態様は、少なくとも前処置前、移植日、および移植後白血球回復期の3点で、試料中のUTIの存在を測定する工程を含んでなる、本発明の第一ないし第三の態様に記載の検出方法である。

【0021】好ましくは、前処置前、移植日、および移植後白血球回復期の3点で測定した試料中のUTI量が、下記関係式(1)；

の第一～第四の態様において、より好ましい態様は、試料として尿を用いる当該GVHDの検出方法である。

【0025】本発明の第五の態様は、UTIの定量を行なって急性GVHDを診断するために用いられるUTI測定キットである。

【0026】本発明の第六の態様は、免疫反応により試験試料中のUTIを測定する手段を有する急性GVHD測定キットである。

【0027】本発明の第七の態様は、第五もしくは第六の態様記載のGVHD測定キットによる急性GVHDのモニター下に使用されることを特徴とする急性GVHDの予防および/または治療剤である。第七の態様において使用される薬物としては、メトトレキサート、シクロホスファミド、アザチオプリン、ミゾリピン、シクロスポリン、タクロリムス水和物、塩酸グスペリムス等の免疫抑制剤の他、プレドニンやメチルプレドニゾン等のステロイド剤、ALG、ATG等が例示される。

【0028】

【発明の実施の形態】次に本発明の実施の形態について説明する。本発明は、GVHDが発生する恐れのある状態のヒト、例えば造血幹細胞移植とりわけ骨髄移植を受けた患者から得られる試料中のUTIを測定することを特徴とするGVHDの発症の検出方法、並びに当該GVHD検出のための測定キットである。GVHDが発生する恐れのある状態にあるヒトとは、例えば造血幹細胞移植、ドナーリンパ球輸注療法(DLT)、輸血、臓器移植を受けた患者が挙げられる。

【0029】本発明にいう「GVHD」は、免疫担当細胞であるリンパ球が、移植片を拒絶し得ないような宿主に移植され生着し、宿主の組織抗原に対して移植免疫反応を起こす結果ひきおこされる急性もしくは慢性的の疾病をいう。本発明の検出方法により、早期に検出するG

VHDとして好適なものとしては、造血幹細胞移植とりわけ骨髄移植或いは（非縁者間）臍帯血幹細胞移植に起因するGVHD、ドナーリンパ球輸注療法（DLT）におけるGVHD、輸血に起因するGVHD、あるいは、臓器移植に起因するGVHDがあげられ、より好ましくは急性GVHDであり、更に好ましくは骨髄移植に起因する急性GVHDが挙げられる。

【0030】ここで、「骨髄移植」とは、レシピエント（受容者）の血液系を破壊した上で、健全なドナー（提供者）から骨髄、即ち血液系の基となる細胞集団（例えば幹細胞）を移植することによって、レシピエントの内々でドナー由来の血液系を再構成しようとする治療法である。レシピエントの血液系の破壊には、既に冒されている悪性疾患を排除することおよび/またはレシピエントの免疫系を抑制することを目的として放射線療法あるいは骨髄破壊性高用量化学療法等が行われる。

【0031】「前処置」とは、例えば白血病の治療における骨髄移植に先立って、レシピエントの体内に残存する白血病細胞の根絶と移植骨髄生着のための免疫抑制を目的として行われる、全身放射線照射および/または大

$$\{(c) - (b)\} / \{(b) - (a)\} > 0 \quad (1)$$

であることを、GVHD発症を予想する判断指標とす

$$\{(c) - (b)\} / \{(b) - (a)\} > 1/3 \quad (2)$$

である場合は、その後、施術日から約3～4週間後に重症の急性GVHD、例えば腸管、皮膚等においてIII度以上の急性GVHDを発生する可能性が極めて大きいと判断される。

【0035】本発明に使用されうるUTIの測定手法および測定キットとしては、UTI量または濃度を測定できる試薬またはキットであれば特に限定されないが、例えば、トリプシン活性の阻害作用を測定する酵素学的測定法、UTIと抗UTI抗体との反応に基づく様々な免疫学的測定方法およびかかる測定原理に基づくUTI測定キットが挙げられる。

【0036】酵素学的測定方法は、自動分析機の使用により迅速に測定できるが、トリプシン活性の阻害量をみるため、特異性の面でやや劣る。改善された技術として、試料中の1-アンチトリプシン（1-AT）を不活性化させる前処理を行なう技術、例えばWO99/49076号公報に開示された測定方法が利用され得る。他方、免疫学的測定方法は、抗原抗体反応に基づくためUTIのみを正確に測定できる特徴を持つ。具体的には、定量的検出方法として、ラジオイムノアッセイ法（RIA）、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、及び、酵素免疫測定法（EIA, ELISA）等が知られており、定性的検出方法としては、赤血球凝集法、ラテックス凝集反応比濁法（LIA）、時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）、イムノクロマトグラフィアッセイ（ICA）または電気化学的特異結合分析法（MEDIA）（特開平5-264552号公報参照）等が

*量の抗がん剤例えばシクロスポリン、シタラビン、ブスルファン、メルファラン或いはエトポシド等の単独もしくは併用投与等の処置である。通常移植手術のおよそ1週間前ごろから移植当日にかけて前処置が行われる。

【0032】従って、本発明において「前処置前」とは、その前処置の以前の期間を意味するが、通常、前処置の前2週間から前処置に入るまでの時期をいう。「移植日」とは、レシピエントに対して、骨髄等の移植の施術日もしくはその一両日である。

【0033】「移植後白血球回復期」とは、前処置により激減したレシピエントの白血球数が、骨髄等の移植によりおよそ $1000/mm^3$ 以上に回復した時期をいい、通常、骨髄等の移植の施術日から2～3週間後であるが、患者の回復状況により1週間程度前後しうる。

【0034】特に、本発明の第四の態様では、少なくとも前処置前、移動日、および移植後白血球回復期の3点での試料中のUTI量を測定し、その測定値より、GVHD発症を予想する判断指標とする。さらに好ましくは、それぞれの測定値を（a）、（b）、（c）とした場合に、試料中のUTI量が、下記関係式（1）；

$$\{(c) - (b)\} / \{(b) - (a)\} > 0 \quad (1)$$

る。さらに、尿中のUTI量が、

$$\{(c) - (b)\} / \{(b) - (a)\} > 1/3 \quad (2)$$

挙げられる。なお、LIAにおける凝集促進剤としてポリエチレングリコールを添加する改良技術として特開平11-64334号公報に開示された技術も利用され得る。

【0037】免疫学的測定方法に使用される抗UTI抗体は、UTIに対して特異的に反応し抗原抗体反応を生じ、各測定法に必要な性質を有していれば良い。例えばLIAにおいては凝集反応を有するものであれば特に制限されず、モノクロナール抗体、ポリクロナール抗体若しくはポリクロナール抗体を含む抗血清等の何れでも良い。抗体の種類も制限されず、各種免疫グロブリン例えばIgA, IgE, IgG, IgM, IgDが使用できる。抗原の種類も制限されず、ラット、ウサギ、ヤギ等由来の抗体が使用できる。これらの抗体は、免疫原としてUTIを使用すること以外は、通常行われる抗体作成方法により得られる（例えば、日本泌尿器学会74巻、9号（1983年）に記載の方法）。反応液中の抗UTI抗体の濃度は、測定感度と測定上限に影響するので、適量を実験によって求めることが望ましく、その際、抗UTI抗体の力価や精製の程度を考慮して適量を求めることができる。

【0038】これらの測定法に供される本発明の「キット」としては、酵素学的測定法用のキットとして、例えば、

トリプシン溶液+基質溶液+トリプシン以外のプロテアーゼ溶液から構成される測定キット、

トリプシン溶液+基質溶液+酸化剤溶液から構成され

る測定キット、

或いは、またはに更に緩衝液を加えた測定キットがあり、例えばW O 9 9 / 4 9 0 7 6 明細書記載の測定キットAおよびキットBが参照される。これらのキットには必要に応じU T I 標準品や希釈溶媒が添付される。

【0039】免疫学的測定方法のキットとしては、例えば抗体を用いたサンドイッチE I A法を用いた該手段の試薬としては、酵素標識抗U T I 抗体、非酵素標識抗U T I 抗体、酵素基質及び発色剤が挙げられる。ここに記載される酵素は例えばペルオキシダーゼ(H R P)が挙げられる。すなわち、酵素標識抗U T I 抗体がH R P 標識抗U T I 抗体、非酵素標識抗U T I 抗体が非標識抗U T I 抗体、酵素基質が過酸化水素水及び発色剤がテトラメチルベンジジン(T M B)発色剤となる。これら4試薬により臓器移植後の臓器移植患者(レシピエント)のU T I 量を測定する手段の一例は構成される。該試薬を含めたキットとしては、該試薬が含まれば、特に免疫反応または発色反応の検出を阻害するものを含まなければ、他に何が含まれていてもよい。例えば結合反応の場合であるプレート等含むことが好ましく、さらにプレート20が、非酵素標識抗U T I 抗体がプレートに結合された抗ウリナスタチン抗体結合プレートであればさらに好ましい。また、必要に応じてプレートシール、抗体希釈液、検体希釈液、洗浄液、発色停止剤または標準U T I 液等を含むことが好ましい。さらに測定するための機器として、ピペット類、恒温層、試験管類、吸光度測定計等を含んでいてもよい。

【0040】この試薬またはキットによる試料中のU T I 量の測定方法は、以下の通りである。まず非酵素標識抗U T I 抗体を固定したプレートに尿及び酵素標識抗U T I 抗体を添加し、非酵素標識抗U T I 抗体と資料中のU T I さらに酵素標識抗U T I 抗体を結合させる。プレートを洗浄して結合物を残渣と分離し、酵素基質と発色剤を添加して発色の吸光度を測定する。同時に行った標準U T I の測定値または予め求められている検量線より、試料中のU T I 濃度を求める。さらに尿中のU T I 量のクレアチニン補正値を求める場合は、公知の方法で尿中クレアチニン量を測定し、下記式により換算量を求める。

式

尿中U T I 量のクレアチニン補正値(U / m g · C r e) = 尿中U T I 濃度(U / m l) × 尿中クレアチニン濃度(m g / m l)

【0041】また別の例として、抗体を用いた該手段の試薬としては、酵素標識抗U T I 抗体、非酵素標識抗U T I 抗体及び酵素基質が組み込まれたM E D I A法を利用する試薬が挙げられる。ここに記載される酵素をH R Pとした場合の各具体例はサンドイッチE I A法における説明と同様である。これら3試薬により臓器移植後の臓器移植患者(レシピエント)の尿中U T I 量を測定す50

る手段の一例は構成される。該試薬を含めたキットとしては、該試薬が含まれば、特に免疫反応または電気化学反応の検出を阻害するものを含まなければ、他に何が含まれていてもよい。例えば、反応の場合(マトリクス)及び電極等を含む反応装置(特開平5-264552号公報参照)を含むことが好ましい。また、必要に応じて抗体希釈液、検体希釈液、電子メディエーターまたは標準U T I 液等を含んでいてもよい。さらに測定するための付属品として、ピペット類、試験管類、電流測定計等を含んでいてもよい。このM E D I A法による測定のための試薬またはキットによる尿中U T I 量の測定方法は、以下の通りである。反応装置に尿及び酵素標識抗U T I 抗体を添加し、またはマトリクスに予め酵素標識抗U T I 抗体が含浸されている場合は反応装置に尿を添加し、生じた電流の変化を測定する。同時に行った標準U T I の測定値または予め求められている検量線より、尿中のU T I 濃度を求める。尿中のU T I のクレアチニン補正値を求める場合は、上記に記載の方法で求める。

【0042】当該キットの具体例は、

1) 定量的測定キットとして、

U T I - R I Aキット：放射ラベルU T I (例えば¹²⁵I - U T I) + 固相化した抗U T I 抗体 + U T I 標準品から構成されるキット、或いは、固相化した抗U T I 抗体の代わりに抗U T I 抗体 + 第二抗体を加えたキットがあり、例えばBritt-Mariera(Bio1.Chem.Hopper-Seyler, Vol.370, pp1157-1161, Nov.(1989))が参照される。

U T I - E I Aキット：抗U T I 抗体 + 酵素(例えばペルオキシダーゼ)標識抗体 + 基質溶液から構成されるキットがあり、具体的には、Etsuo(ClinicaChimicaActa.167, pp.155-164(1987))、或いは、後述する本発明の実施例4が参照される。また、固相化抗体 + 酵素標識抗体の組み合わせとしては、ポリクロナール抗体同士、モノクロナールとポリクロナールの組み合わせ、モノクロナール同士の組み合わせの何れも利用可能である。これらのキットには適宜、U T I 標準品、試料希釈液、反応停止液等の付属品が添付される。

40 U T I - 蛍光免疫測定キット：の酵素標識抗体の代わりに、蛍光標識した抗体を用いて構成されるキットである。

U T I - 化学発光キット：の酵素標識抗体の代わりに、化学発光物質で標識した抗体を用いて構成されるキットである。

【0043】2) 定性的検出方法

U T I - 赤血球凝集法キット：赤血球に固相化した抗ヒトU T I 抗体 + U T I 標準品を構成とするキットである。

U T I - L A I Aキット：ラテックスに固相化抗ヒト

UTI抗体+UTI標準品を構成とするキット、例えば後述の測定方法の実施例1-bが挙げられる。

【0044】本発明の「UTI測定キットによるGVHDのモニター下に使用されることを特徴とするGVHDの予防および/または治療剤」とは、現在もしくは将来上市され若しくは開発が指向される全ての薬剤が該当するが、好ましくは、本発明の診断方法で患者の症状をモニターしつつ投薬されることにより、そのGVHDの予防もしくは治療効果がより優れて発揮される薬剤である。具体的には、メトトレキサート、シクロスポリン、タクロリムス、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、アザチオプリン、ミゾリピン、ALG、ATG等これらの塩、これらの水和物ないし塩の水和物等が挙げられる。これらは単独もしくは適宜併用されてもよい。併用する場合は、メトトレキサートとシクロスポリン、もしくは、メトトレキサートとタクロリムス水和物との併用が好ましく、あるいは、メトトレキサートとシクロスポリンとm-PSLの3剤併用、もしくは、メトトレキサートとタクロリムス水和物とm-PLSとの3剤併用も好ましい。投与方法としては、好ましくは経口投与もしくは静脈内投与である。必要に応じ血中濃度をモニターしながら点滴静注が好ましい。

【0045】本発明のGVHDの早期検出方法は、上記構成をとることにより、GVHD、特に急性GVHDの発症を、早期に的確に検出することが可能である。とりわけ骨髄移植患者におけるGVHDの早期検出に有用である。本発明においては、試料としては好ましくは採取された血液あるいは尿が使用される。とりわけ尿の使用は、採取に特別な器具や技術を必要とせず安全かつ簡便であり、患者への負担や検査担当者の安全確保等の観点からも望ましい。このため、臨床検査、診断分野において最も有用性の高い検出方法である。使用済み器具や試料の廃棄についても問題が無い。少なくとも前処置前、移植日、および移植後白血球回復期の3点で、試料中のUTI量を測定し、その測定値をGVHDの発症の判断指標とし、特に、試料中のUTI量が上記関係式(1)を満たすことをGVHDの発症の判断指標とする本発明の検出方法では、よりの確にGVHDの発症を検出することが可能である。また、本発明の検出方法により、GVHDの進展をモニターしつつ患者に対し薬物による的

確な予防および/または治療が可能となる。本発明のGVHDを早期検出するための測定キットは、上記構成を採ることにより、GVHD発症の可能性を早期に、的確かつ簡便に検出することができる。従って、本発明の検出方法および測定キットは、GVHDの診断に、好適に用いられる。

【0046】

【実施例】以下、本発明を実施例を挙げて、さらに具体的に説明する。

<GVHDの検出>

(実施例1)

(対象と方法) 骨髄移植症例7例について、EIA法(後述するキットの実施例4参照)を用いて、(a)前処置前(移植2~3週間前)、(b)移植日、(c)移植後白血球回復期(移植後2~3週間後)の3点で尿中のUTI濃度を測定した。なお、患者にはGVHDの予防のため通常量のサイクロスポリンAとメトトレキサートを投与した。

【0047】(判定方法) GVHD発症の傾向の有無を、次の式で現される数値(R)により判定した。

$$R = \{ (c) - (b) \} / \{ (b) - (a) \} > 0$$
式中、

(a) : 前処置前での試料中のUTI量の測定値

(b) : 移植日での試料中のUTI量の測定値

(c) : 移植後白血球回復期での試料中のUTI量の測定値

$R > 1/3$ のとき陽性(+ : 重症GVHD発症の恐れあり)、 $1/3 > R > 0$ のとき擬陽性(± : GVHDの傾向あり)とし、 $R = 0$ のときは陰性(- : 重症GVHD発症の恐れ無し)とした。

【0048】(結果) UTI濃度は、全症例で移植日に上昇した。白血球回復期において、2症例(A氏、B氏)はUTI値がさらに上昇し、他の5症例は低下した(C氏~G氏)。各測定値ならびに判定結果を下記第1表に示す。また、本測定における尿中のUTI量の変化を図1のグラフに示す。図1のグラフの縦軸は、尿中のUTIの濃度(同時に測定したクレアチン濃度により補正)を、横軸は、測定点(前処置前、移植日、移植後白血球回復期)を表わす。

【0049】

第 1 表

	前処置前 (a)	移植日 (b)	移植後白血球 回復期 (c)	$R = \{ (c) - (b) \} / \{ (b) - (a) \}$	判定
A氏	47.9	243	393	0.769	+
B氏	14.6	105	144	0.431	+
C氏	13.8	272	48.6	-34.8	-
D氏	17.3	207	89.8	-0.059	-
E氏	12.2	265	131	-0.530	-
F氏	7.43	119	52.0	-0.601	-
G氏	31.2	372	159	-0.625	-

((a) ~ (c) の測定値の単位: mg / L)

【0050】本発明の検出方法により、7名中2名がGVHD陽性と判定された。なお、GVHD陽性と判定された2名(A氏およびB氏)中、A氏は移植後21日目に、腸管および皮膚においてIII度の急性GVHDを引き起こした。B氏は移植後34日目に、腸管においてII度の急性GVHDを引き起こした。それぞれの患者に対してシクロスポリンAを概ね倍量とプレドニゾロンを投薬して管理を継続したところ予後は良好に回復しGVHDは寛解するに至った。また、GVHD陽性と判定されなかった患者はそのまま移植骨髄が生着を続け、病態として特に問題はなかった。

【0051】< UTI量の測定方法および測定キット>
実施例2: ラテックス凝集免疫比濁法

2-a) 測定方法

比濁計LA-2000 (Analytical instruments Co., LTD, 東京) を使用し、ラテックス凝集免疫比濁法を用いてUTI量を自動測定する。測定原理は、ポリスチレンラテックスビーズ(栄研化学、直径0.1μm)にウサギ抗ヒトUTI抗体をコーティングし、UTIを37で反応させ、結果生じるラテックス凝集体の濁度を測定波長585nmで測定する。標準物質は持田製薬(株)製のUTIを用い、反応時間は反応開始後100秒と500秒の間の400秒における濁度差から抗原量(UTI)を求める。なお、ウサギ抗ヒトUTI抗体は、ウリナスタチンをフロイントアジュバント(Difco, USA)と混合して油中水型エマルジョンをつくりこれをウサギに免疫して抗血清を得る。

【0052】2-b) 測定キット

<1> ウサギ抗ヒトUTI抗体をコーティングしたポリスチレンラテックスビーズ

<2> 標準物質

その他: 必要に応じ、比濁計(例: LA-2000)

【0053】実施例3: 酵素法

3-a) 測定方法

N-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリドを基質とし、ウシ膀胱トリプシン(シグマ社)によ

る分解を阻止しうる尿中UTI値をUTI等量として、COBAS FARA(ロッシュ社)を用いて自動測定する。

【0054】3-b) 測定キット

<1> 基質(N-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド)

<2> ウシ膀胱トリプシン(シグマ社)

<3> UTI標準品

【0055】実施例4: サンドイッチ法

4-A. 測定方法(ポリクロナール抗体使用)

4-A-1-a) 尿中のUTI測定方法

UTIに対するポリクロナール抗体を用いた1ステップサンドイッチEIA法により試料中のUTI量を定量する。具体的には、UTI抗体を固相化したプレート(96ウェル: NUNC社製)に、1000倍希釈した試料20μLを分注し、ペルオキシダーゼ標識UTI抗体溶液(0.25μg/mL)80μLを添加して37で30分間反応させる。反応後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水でプレートを洗浄し、基質溶液(テトラメチルベンジジン、BioFLaboratories社)を加えて反応させ(遮光下、室温10分)、0.5M硫酸100μLにて停止した後マイクロプレートリーダー(THERMOMax, Molecular Devices社)450nm(副波長630nm)の吸光度を測定する。UTI標準品を用いた同様の操作から得られた標準曲線に基づいて試料中のUTI量を算出する。

【0056】4-A-1-b) 測定キット構成

<1> UTI抗体(ポリクロナール抗体もしくはモノクロナール抗体)を固相化したプレート

<2> ペルオキシダーゼ標識UTI抗体溶液

<3> 基質溶液

その他付属品として、

<4> プレート洗浄液

<5> 試料希釈液

<6> 反応停止液

<7> マイクロプレートリーダー

<8> U T I 標準品

【0057】4-A-2-a) 血中のU T I の測定方法
血液50 μ Lを1.5mLのエピペンドルフチューブにとり、生理食塩水150 μ L、次いで40%過塩素酸水溶液50 μ Lを添加し、約5秒攪拌する。15000rpmで10分遠心し、上清100 μ Lを分取する。更に0.8MNaOH150 μ L、1MTris-HCl (pH8.0)50 μ Lを添加混合して300 μ Lの15倍希釈試料とする。この希釈試料に尿中U T I キット 希釈液を加え900倍希釈試料とする。この試料20 μ Lを用いて4-A-1-a)のプロトコールに従って血中のU T I 量を測定する。なお、この前処理方法を使用して、全血以外の血清、血漿(EDTA、クエン酸、ヘパリン採血)中のU T I を測定可能である。

【0058】4-A-2-b) 血中U T I の測定キット
4-A-1-b)の尿中U T I 測定キット<1> ~<8> に更に以下の構成を付加する。

<9> 40%過塩素酸水溶液

<10>生理食塩水

<11>0.8MNaOH水溶液

<12>1MTris-HCl (pH8.0)

その他：小型遠心機

【0059】4-B. 測定法(モノクロナール抗体)
4-B-a)

測定法4-A-1-a)もしくは4-A-2-a)においてポリクロナール抗体の代わりに後述のU T I モノクロナール抗体を使用して、試料(血液)中のU T I 量を算出する。

4-B-b)測定キット

4-A-1-b)もしくは4-A-2-b)の測定キットにおけるポリクロナール抗体に代え後述のU T I モノクロナール抗体を用いてキットを構成する。

【0060】(参考例)実施例4のサンドイッチ法で用いる各種プレートの調整方法を記す。

i) U T I 抗体固相化プレート

マイクロタイタープレート(Immuno module Maxisorp, Nalge Nunc International)にポリクロナール抗体溶液100 μ Lを分注し、室温で一晩放置して抗体を固相化し、洗浄後、0.1%Tween20 溶液および4%ラクトース 40 溶液でコーティングを行い、乾燥後、乾燥剤とともにチ*

*ヤック付きラミネート袋に保存したものを使用した。

【0061】ii a) U T I ポリクロナール抗体

日本白色家兔に2週間に1回、耳静脈に精製U T I 溶液(持田製薬(株)製U T I 500 μ g/mL)を投与した。採血した抗血清より、U T I との反応性を指標に反応性の高い抗血清を選択した。抗血清は50%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、Protein A Sepharose カラム(アマシャム・ファーマ・バイオテック)にて精製し、ポリクロナール抗体とした。

【0062】ii b) U T I モノクロナール抗体

精製U T I (100 μ g)をフロイント完全アジュバントと混合し雌BALB/cマウス(5-10週齢)の腹腔に投与した。最終投与3日後にマウス脾臓よりリンパ球を採集し、ポリエチレングリコールを用いてミエローマ(P3x63-Ag.8.U.1)と融合した。定法に従いHATセクションを行いハイブリドーマを作成し、精製U T I との結合を指標によりE L I S A 法にて、ヒトU T I と反応するモノクロナール抗体を得た。得られたハイブリドーマを無血清培地(PFHM-II、GIBCO)で培養し、上清中に産生した抗体をProtein-Aカラム(アマシャムファルマシアバイオテック)を用いて精製し、モノクロナール抗体とした。

【0063】iii) 酵素標識U T I 抗体の作成

中根らの方法(Peroxidase-labeled antibody : a new method of conjugation : 22巻、1084-1091頁、1974年)に従い、ペルオキシダーゼ(東洋紡社製)を過ヨウ素酸により活性化し、U T I ポリクロナール抗体と反応させた。反応後、透析を行い、ペルオキシダーゼ標識U T I 抗体を得た。使用した抗体量を液量で割ったものを濃度とした。

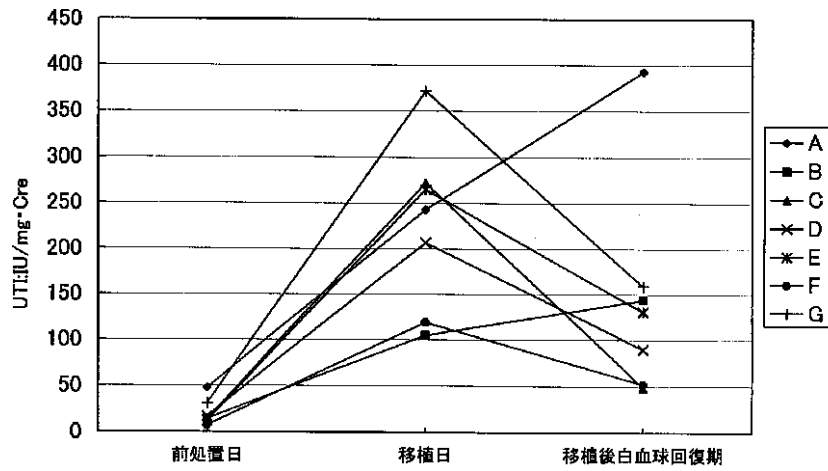
【0064】

【発明の効果】本発明のGVHDの検出方法ならびにキットにより、GVHD発症を早期に的確に検出することが可能になる。とりわけ骨髄移植患者におけるGVHDの早期検出に有用である。また、本発明の検出方法により、急性GVHDの進展をモニターしつつ患者に対し薬物による的確な予防および/または治療が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 移植前後の尿中U T I 量の変化を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 山田 真嗣
大阪府大阪市西区南堀江 1 - 14 - 28 ヤマ
ゴビル7F

(72)発明者 加藤 克明
東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬
株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA16 AA25 CA25 CA26 CB03
DA44 FA26 FA29 FB01 FB03
FB07 FB12 FB13 GC15

专利名称(译)	检测GVHD的方法		
公开(公告)号	JP2002014104A	公开(公告)日	2002-01-18
申请号	JP2000199067	申请日	2000-06-30
申请(专利权)人(译)	持田製薬株式会社		
[标]发明人	垣下 榮三 岡本 隆弘 高塚 広行 山田 真嗣 加藤 克明		
发明人	垣下 榮三 岡本 隆弘 高塚 広行 山田 真嗣 加藤 克明		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.V		
F-TERM分类号	2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA44 2G045/FA26 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/GC15		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：为GVHD早期检测提供准确且有用的确定指标，提供GVHD的检测方法，以及GVHD在药物治疗中的发展或预防效果的监测方法，基于指标，并提供有效执行方法的工具包。解决方案：在该GVHD检测方法中测量从人体采集的样品中的一定量的UTI。

【図1】

