

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4269064号  
(P4269064)

(45) 発行日 平成21年5月27日(2009.5.27)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl. F1  
GO1N 33/53 (2006.01) GO1N 33/53 N

請求項の数 2 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2003-48862 (P2003-48862)	(73) 特許権者	304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(22) 出願日	平成15年2月26日(2003.2.26)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(65) 公開番号	特開2004-257862 (P2004-257862A)	(72) 発明者	矢野 明彦 千葉県千葉市若葉区千城台西1丁目26番13号
(43) 公開日	平成16年9月16日(2004.9.16)	(72) 発明者	青才 文江 千葉県千葉市中央区都町1-34-5-403
審査請求日	平成18年2月17日(2006.2.17)	審査官	海野 佳子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 重症筋無力症の検査方法及びそのための検査薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体から採取した血液、血清又は血漿中の抗HSC71抗体を測定することを含む、重症筋無力症の検査方法。

【請求項2】

抗HSC71抗体と抗原抗体反応する物質を含む、重症筋無力症の検査薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、重症筋無力症の検査方法及びそのための試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

重症筋無力症(以下、「MG」ということがある)は、神経筋接合部の後シナプス膜に存在するニコチン性アセチルコリン受容体(以下、「AChR」と記載することがある)に対する抗体が生じ、この抗体により神経筋伝達がブロックされる自己免疫疾患である。主な症状は、眼瞼下垂、複視などの眼症状、四肢、前頸筋の筋力低下、構音障害、嚥下障害、さらに呼吸障害である。

【0003】

従来、MGは、臨床徴候、血中抗AChR抗体の測定(非特許文献1)や、筋電図検査法等により診断されている。また、血中ティティン(titin)抗体濃度とMGとの関連も報告され

ている（非特許文献2）。しかしながら、これらの方法では、確定診断が困難であり、さらなる診断方法が見出されれば、診断の確度をより高めることができ有利である。特に、血中抗AChR抗体とは相関しない、新たな診断方法があれば、血液を用いた簡便な免疫測定法により診断の確度を補完的に高めることができ、有利である。

【0004】

【非特許文献1】

Willcox N. 1993, Myasthenia gravis. Curr. Opin. Immunol. 5:910-917

【非特許文献2】

Arali, J.A. et al., 1990, Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin.

10

Clin. Exp. Immunol. 82:284-288

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、血液等の体液を用いて実施できる新規なMGの検査方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、熱ショックタンパク質70ファミリーの一員であるHSC71(heat shock cognate protein 71)に対する血清中の抗体濃度が、MG患者では健常人や他の自己免疫疾患患者に比べて有意に高いことを見出し、本発明を完成した。

20

【0007】

すなわち、本発明は、生体から採取した体液中の、生体から採取した血液、血清又は血漿中の抗HSC71抗体を測定することを含む、重症筋無力症の検査方法を提供する。また、本発明は、抗HSC71抗体と抗原抗体反応する物質を含む、重症筋無力症の検査薬を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】

上記の通り、本発明の方法では、生体から採取した血液、血清又は血漿中の抗HSC71抗体を測定する。HSC71は、ヒトを含む広範囲の生物に存在する熱ショックタンパク質70(HSP70)の一員であり、そのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列が公知である。例えば、ヒトHSC71のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列は、Gen Bank accession No. Y00371に記載されている。

30

【0009】

本発明の検査方法は、通常、ヒトに対して適用され、下記実施例においてもヒト血清が用いられているが、HSC71のアミノ酸配列は、広範囲の生物においてよく保存されていることから、ヒト以外の動物にも適用可能である。本発明の検査方法で用いられる体液は、血液並びにその成分である血清及び血漿である。

【0010】

体液中の抗HSC71抗体の測定自体は、周知の免疫測定方法により行うことができる。免疫測定方法において抗HSC71抗体と抗原抗体反応する物質としては、天然のHSC71でもよいが、取得の容易性から、遺伝子工学的に作製した組換えHSC71が好ましい。抗HSC71抗体との抗原抗体反応が可能である限り、組換えHSC71の一部であってもよいし、HSC71以外の他の部分を含むものであってもよい。また、HSC71のアミノ酸配列中、少数、好ましくは数個以下のアミノ酸が置換、欠失又は挿入されたものであっても、抗HSC71抗体との抗原抗体反応が可能である限り許容することができる。なお、言うまでもなく、抗原として用いるHSC71は、検査の対象となる動物のHSC71を用いる（例えば、検査対象がヒトならば、ヒトHSC71を用いる）ことが好ましい。上記の通り、アミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列が公知であるので、組換えHSC71は常法により容易に調製することができる。下記実施例にも、大腸菌を宿主として用いた遺伝子工学的手法によりヒトHSC71を生産する方法が具体的に記載されている。

40

50

## 【0011】

免疫測定方法自体は、周知であり、周知の免疫測定方法のいずれをも用いることができる。すなわち、反応形式に基づき分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法等があり、標識に基づき分類すると、酵素免疫分析、放射免疫分析、蛍光免疫分析等があるがこれらのいずれをも用いることができる。これらのうち、操作が簡便で、正確な測定が可能であるサンドイッチ法が好ましく、とりわけ、安全で特殊な装置が不要である酵素免疫分析（ELISA）が好ましいが、これに限定されるものではない。

## 【0012】

本発明は、さらに、抗HSC71抗体と抗原抗体反応する物質を含む、重症筋無力症の検査薬をも提供する。抗HSC71抗体と抗原抗体反応する物質は、上記の通りであり、その使用方は、上記した免疫測定方法において、抗HSC71抗体と抗原抗体反応する抗原又はハプテンとして用いられる。

10

## 【0013】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

## 【0014】

## 材料及び方法

## 患者

病院で合計86人のMG患者（男性20人、女性66人）を治療した。表1に、この86人のMG患者の臨床的特徴と人数を示す。これらの患者は、臨床的、血清学的、薬理的及び筋電図検査法に基づいてMGであると診断された。全ての患者は、全身性MGであり、48人の患者は、治療前にはMGFA(米国重症筋無力症基金、Myathenia Gravis Foundation of America)分類でクラス2a~5に該当していた。他の38人は治療開始後の患者であり、何人かは無徴候又は純粹に眼科徴候(MGFAクラス1)のみを示していたが、臨床経過から明らかに全身性MGであった。発症時の平均年齢は42.3歳(4~84歳)であった。全ての患者は、抗コリンエステラーゼ剤による治療を受けていた。これらの患者のうち、74人は胸腺摘除を受けており、57人の患者がコルチコステロイド治療を受けており、39人の患者が二重濾過又は免疫吸着カラムを用いた血漿交換療法を受けていた。何人かの患者は、抗コリンエステラーゼ剤以外のこれらの3種類の治療を重複して受けていた。これらの治療の前及び/又は全コースの後にMGFA分類により患者を評価した。MGFA分類を用いてMGの重症度を分類し、患者を以下の通り5つのサブグループに分類した。(1)徴候なし、(2)クラス1：眼科徴候、(3)クラス2a/2b：四肢の筋力が少し弱い、(4)クラス3a/3b：四肢の筋力が中程度に弱い、(5)クラス4a/4b/5：四肢の筋力が非常に弱い又は挿管法及び人工呼吸機支持が必要な呼吸不全がある。抗HSC71抗体価は、上記3種類の治療の前に得た血清と、上記3種類の治療開始半年後の血清を比較した。プレドニゾロンの投与量を漸減することにより症状が悪化する患者及び治療後再発する患者には、免疫抑制剤であるFK-506を投与した。

20

30

## 【0015】

## 【表1】

表1 患者の基礎的臨床特徴及び人数

40

特徴	MG患者
数	86 (48)
男性：女性	20:66
胸腺	
摘除	74 (35)
正常又は萎縮	25 (15)
過形成	11 (6)
胸腺腫	25 (14)
不明	6
コルチコステロイド治療	57
血漿交換療法	39
平均年齢	42.4
平均罹患期間 (月)	46.7 (2-241)
治療前の重症度	IIa-V
クリーゼ	17
半年を超える観察	21
平均観察期間 (月)	28.4 (1-101)

10

20

30

( ) : 治療前に試料の調査が可能であった患者

【 0 0 1 6 】

対照

MGではない27人の日本人の血清を分析した。9人は、平均年齢34.8歳(28~43歳)の健康人であった。18人の血清は、MG以外の自己免疫疾患患者から選んだ。平均年齢36.3歳(21~58歳)の多発性硬化症患者からの血清のうち、11人が神経免疫不全、陽性対照としての原田病患者は7人であった。原田病は、自己免疫により引き起こされるブドウ膜炎であり、患者血清中の抗HSC70抗体が高値であることが報告されている。

【 0 0 1 7 】

血清試料

全血清試料数は157であり、一人の患者当たり1~5回採取した(表2)。全ての血清は-70℃で保存した。重症度は、採血の際にMGFA分類を用いて評価した。

【 0 0 1 8 】

【表2】

表2 MG患者からの血清試料

40

総患者数	86	
総試料数	157	
検査回数／患者	1-5	
治療前試料	48	
<b>MGFA 分類</b>		
徴候なし	19	10
クラス I	23	
クラス IIa/IIb	68	
クラス IIIa/IIIb	36	
クラス IVa/IVb/V	11	
抗 AchR 抗体	107	20
抗ティティン抗体	48	

## 【 0 0 1 9 】

抗アセチルコリンレセプター (AchR) 抗体価及び抗ティティン (titin) 抗体価の測定  
 抗AchR抗体試験のために 107 の血清試料が利用可能であった。抗AchR抗体の力価は、標準的な放射免疫測定により測定した。32例からの48の試料については抗ティティン抗体を測定した。抗ティティン抗体は、治療開始前に48人の患者から採取した血清について測定した。抗ティティン抗体の力価は、市販のELISAキット (Anti-Titin-Antibody ELISA kit (ドイツ国HumburgのDLD Limited) を用いて測定した。抗ティティン抗体の力価は、測定した吸光度を、標準の吸光度で除することにより算出した。得られた結果による抗ティティン抗体濃度の正常範囲は<1.0である。

30

## 【 0 0 2 0 】

ヒトHSC71のクローニング

P36細胞 (ヒトメラノーマセルライン) の全RNAを、単一工程グアニジウムイソチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出法 (TRIzol (商品名)、米国メリーランド州GaithersburgのGIBCO BRL社製) により調製した。オリゴヌクレオチドプライマーは、ゲノミックヒトHSC71 DNA 配列 (GenBank accession No. Y00371) 及び隣接する部分にクローニングのための制限酵素部位 (制限酵素名: XhoI 及び BamHI) を付加して設計した。cDNA の調製及びヒトHSC71を増幅するためのPCRは、Takara RNA kit with AMV RTase (宝酒造) を用いて行った。用いたPCRプライマーは次の通りであった。

40

センスプライマー: 5'-gggctcgagatgtccaaggacctgca-3'

アンチセンスプライマー: 5'-ggggatccggcttaatcaaccttcaat-3'

PCRは、94℃、1分間の変性工程; 55℃、2分間のアニーリング工程; 及び72℃、2分間の伸長工程から成るサイクルを36回繰り返すことにより行った。得られたPCR産物をpBluescript II SK (商品名) ファジミドベクターのクローニング部位に挿入してクローニングした。得られた組換えベクター中の挿入物の塩基配列を、ABI DNAシーケンサー (米国カリフォルニア州FosterのABI Applied Biosystems Division) を用い、二本鎖ジデオキシシーケンシング法により決定した。

## 【 0 0 2 1 】

組換えヒトHSC71の発現

50

組換えヒトHSC71の合成のために、HSC71 cDNAを組換えpBluescript II SK(商品名)から制限酵素XhoI及びBamHIにより切り出し、発現ベクターpET-15b(米国Novagen社)のクローニング部位にもう1箇所のXhoI切断部位を導入してN末端にXhoI部位をもちC末端にBamHI部位をもつインサートDNAの挿入を可能となる様に修飾したベクターに挿入した。得られた組換えベクターで大腸菌BL21(DE)を形質転換し、1 mMのイソプロピル -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)(片山化学)を添加して組換えタンパク質の合成を誘導した。組換え6 X His-HSC71タンパク質(N末端に発現ベクターpET-15b由来のアミノ酸配列であるMet Gly Ser Serに引き続き6個のヒスチジンが続き、更にSer Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Metが続き、その後引き続きHSC71のアミノ酸配列が続く)は、Novagen社の指示書に従い、ニッケルキレート親和性クロマトグラフィー(6個のヒスチジンがニッケルに結合する性質を利用)により、細胞抽出物から精製した。ニッケルキレート親和性クロマトグラフィーにより精製した組換えHSC71をSDS-PAGEで分析したところ、分子量は71kDaであった。

10

## 【0022】

E L I S Aによる抗HSC71抗体の測定

10  $\mu$ g/mlの組換えヒトHSC71溶液(PBS中)で、平底マイクロタイタープレートを被覆した。一夜インキュベートした後、0.05% Tween 20(商品名)、1 mM EDTA、0.25% BSA及び0.05%  $\text{NaN}_3$ を含むPBSで非特異結合部位をブロッキングした。各ウェルに患者血清又は対照血清の1:200希釈物を入れ、室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(Sigma-Aldrich社)の1:1000希釈物を加え、室温で2時間インキュベートした。発色のために、ウェルを洗浄し、p-ニトロフェニルフォスフェート基質溶液を加え、波長405 nmの吸光度を測定した。

20

## 【0023】

統計学的解析

異なるグループ、すなわち、(1)MG群と対照群、(2)臨床重症度のMGFA分類サブグループ、(3)胸腺病理、間の平均抗体価は、Welchのt検定により比較した。FK-506治療サブグループを含む、長期間に亘る治療前後の比較は、依存性の対t検定(paired t test of dependence)により比較した。また、各患者血清の抗HSC71抗体価と抗ティティン抗体価、抗HSC71抗体価と抗AChR抗体価を比較した。

30

## 【0024】

結果

1. MG患者の抗HSC71抗体価

1.1 抗HSC71抗体

抗HSC71抗体を48例の未治療のMG患者、対照(健常者)9人、他の自己免疫疾患である多発性硬化症(MS)患者11人について調べた。結果を図1に示す。MG症例では、健常者および多発性硬化症患者に比較して明らかな高値を示し、統計学的有意差がみられた。MG患者のうち28人では、抗HSC71抗体価が1.00を超えていた。

## 【0025】

1.2 MGの疾患重度別解析

MG患者86人の延べ血清数157検体について、血清採取時のMGFA分類と、抗HSC71抗体価との関係を検討した。結果を図2に示す。抗HSC71抗体価はMG患者の重症度とは統計学的に有意な関係はみられなかった。臨床症状増悪時に一致して抗体価が上昇することも、逆に症状軽快時に一致して低下することもなかった。

40

## 【0026】

1.3 胸腺組織学的所見と抗HSC71抗体価の関連

治療前に血清が得られた症例48例のうち、胸腺摘除を施行し、組織学的検索をし得た症例は35例であり、内訳は萎縮胸腺あるいは正常胸腺が15例、過形成が6例、浸潤を含めた胸腺腫が14例であった。図3に示す通り、胸腺の組織学的所見と治療前の抗HSC71抗体値に統計学的有意差は認められなかった。

## 【0027】

50

#### 1.4 AChR抗体値

抗HSC71抗体と抗AChR抗体の両者を測定した107例についての相関を検討した。結果を図4に示す。抗AChR抗体価と抗HSC71抗体価とは有意な相関関係はみられなかった。

【0028】

#### 1.5 抗ティティン抗体値

抗HSC71抗体と抗ティティン抗体を測定した48検体についての相関を検討した。結果を図5に示す。抗ティティン抗体価と抗HSC71抗体価とに有意な相関関係はみられなかった。

【0029】

#### 2. 抗HSC71抗体値と治療

治療開始後半年以上経過し、治療前後で血清中抗HSC71抗体値を測定した21症例の治療による抗HSC71抗体値変化を解析した。1例を除き20症例でMGFA分類で1段階以上の改善が認められた(ただし、経過中、治療に抵抗性の症例、術後のクレーゼを起こした症例、ステロイドの減量により症状の増悪した症例も見られた)。治療前後の抗体値を測定した結果を図6に示す。これらの21例は治療後、臨床症状の軽快とともに抗HSC71抗体の全般的な減少がみられ、統計学的に有意であった。抗体価の減少がみられないか、あるいは上昇した症例も数例いた。

【0030】

#### 3. 治療感受性と抗HSC71抗体値

##### (a) 治療抵抗性群の抗HSC71抗体値

胸腺摘除術、血漿交換療法、ステロイド療法に抵抗性を示す治療抵抗性症例が9例あり、図7のaに示す通り、これら治療抵抗群の症例では治療前後で抗HSC71抗体価の減少が見られなかった。

【0031】

##### (b) 治療感受性群の抗HSC71抗体値

治療によく反応した症例(MGを増悪させることなく、プレドニゾロンを順調に減量することができたか、術後再増悪をきたさなかった症例)は10症例あり、図7のbに示す通り、これら治療感受性群の症例では症状の改善と平行して抗HSC71抗体値が減少し、統計学的に有意であった。治療後抗体価の上昇した症例が1例あるが、慢性間接リウマチを合併している患者である。

【0032】

#### 4. 治療抵抗群のFK-506治療と抗HSC71抗体値

治療抵抗群のうち、7例に免疫抑制薬であるFK-506使用により臨床症状は改善し、プレドニゾロンも減量可能となった。図8に示す通り、FK-506投与後、MGの臨床症状改善と平衡して抗HSC71抗体価も有意な低下が認められた。

【0033】

#### 【発明の効果】

本発明により、血液等の体液を用いて実施できる新規なMGの検査方法が提供された。図4及び図5に示すように、本発明の方法は、抗AChR抗体の測定と同等かそれ以上、また抗ティティン抗体よりはるかに臨床的に有用である。さらに、本発明の方法は、MGの診断(図1)、治療効果、治療方法の決定、予後判定(図6、7、8、9)に極めて有用であることが示された。また、本発明の検査方法において測定される抗HSC71抗体の値は、従来の検査方法により測定される抗AChR抗体の値と相関関係は認められない。よって、血液を用いた簡便な免疫測定法により診断の確度を、抗AChR抗体の測定と補完的に高めることができる。

【0034】

#### 【配列表】

10

20

30

40

## SEQUENCE LISTING

<110>	YANO Akihiko et al.	
<120>	Method for iagnosing myasthenia gravis and reagent therefor	
<130>	03823	
<160>	2	
	[ 0 0 3 5 ]	
<210>	1	10
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Oligonucleotide forward primer used in RT-PCR for amplifying human HSC71	
<400>	1	20
	gggctcgaga tgtccaaggg acctgca	27
	[ 0 0 3 6 ]	
<210>	2	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		30
<223>	Oligonucleotide reverse primer used in RT-PCR for amplifying human HSC71	
<400>	2	
	ggggatccgg cttaatcaac ctttcaat	29

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】抗HSC71抗体を 4 8 例の未治療の MG 患者、対照（健常者）9 人、他の自己免疫疾患である多発性硬化症（MS）患者 1 1 人について調べた結果を示す図である。 40

【図 2】MG 患者 8 6 人の延べ血清数 1 5 7 検体について、血清採取時の MGFA 分類と、抗 HSC71 抗体価との関係を示す図である。

【図 3】胸腺の組織学的所見と治療前の抗 HSC71 抗体値との関係を示す図である。

【図 4】抗 HSC71 抗体と抗 AchR 抗体の両者を測定した 1 0 7 例についての相関を示す図である。

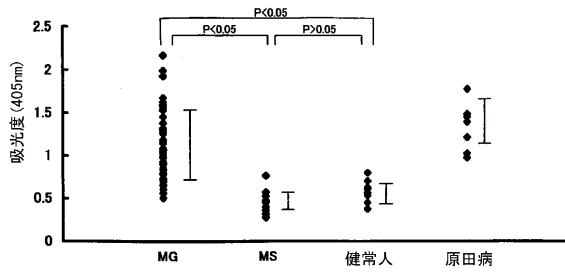
【図 5】抗 HSC71 抗体と抗 ティティン 抗体を測定した 4 8 検体についての相関を示す図である。

【図 6】治療開始後半年以上経過し、治療前後で血清中抗 HSC71 抗体値を測定した 2 1 症例の治療による抗 HSC71 抗体値変化を解析した結果を示す図である。 50

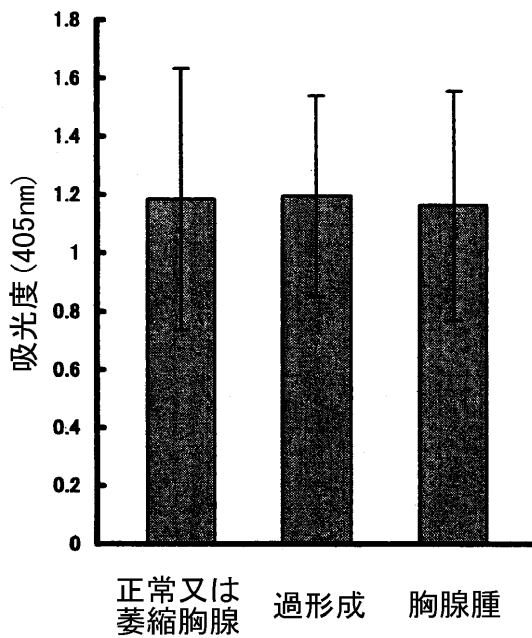
【図7】 aは、治療抵抗群の症例における治療前後の抗HSC71抗体値の変化を示す図である。bは、治療感受性群における、治療前後の抗HSC71抗体値の変化を示す図である。

【図8】 治療抵抗群のFK-506治療の前後における抗HSC71抗体値の変化を示す図である。

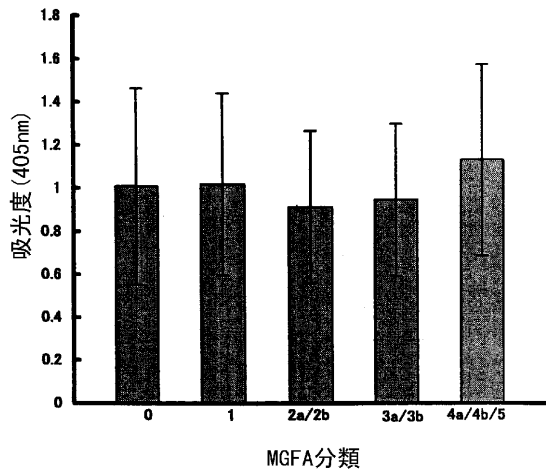
【図1】



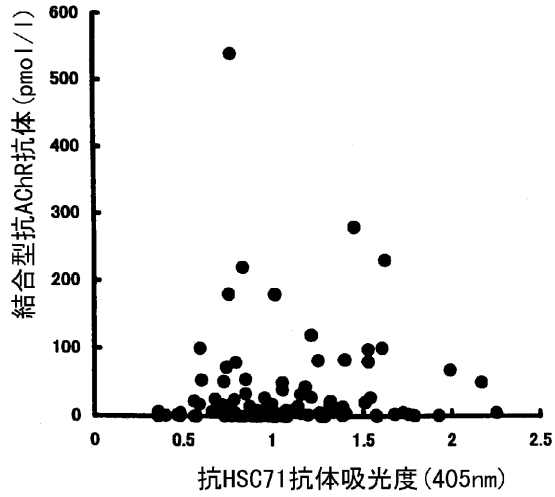
【図3】



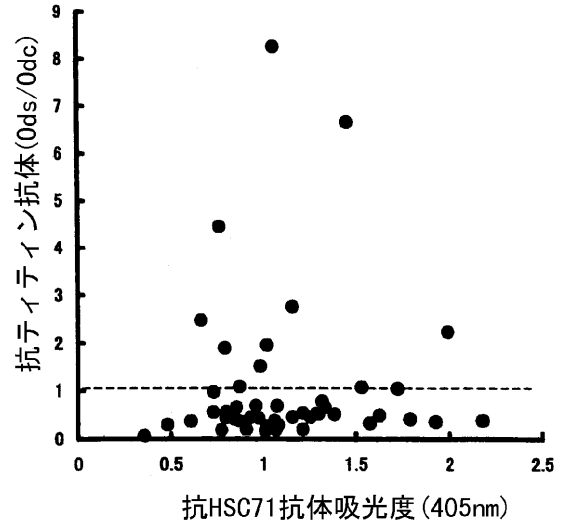
【図2】



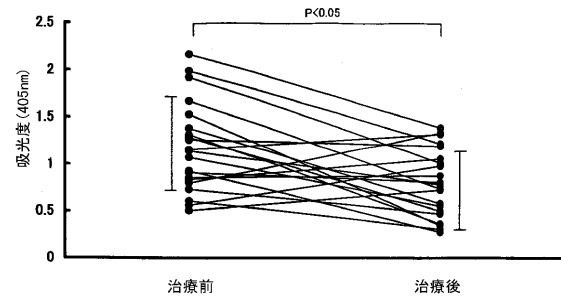
【 図 4 】



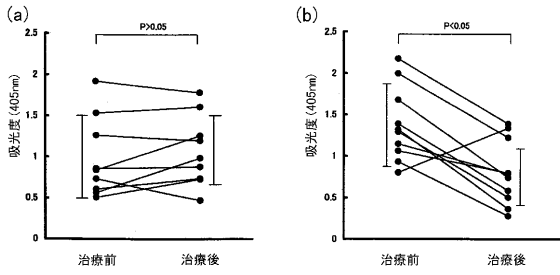
【 図 5 】



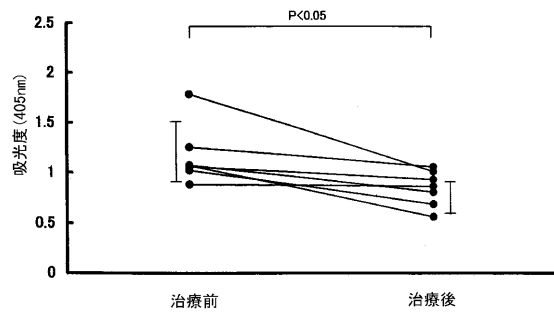
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2004-534213(JP,A)  
特表2003-535581(JP,A)  
特表2003-504533(JP,A)  
国際公開第02/084249(WO,A1)  
国際公開第01/084149(WO,A1)  
特開昭64-067199(JP,A)  
国際公開第01/003692(WO,A1)  
MAKIKO M. et al., "Heat-shock Cognate Protein (hsc71) and related proteins in mouse spermatogenic cells.", *Biology of Reproduction.*, 1989年, Vol.40, P.843-852  
吉川弘明, 「C. 神経難病の各論(診断と治療、福祉上の注意点) 重症筋無力症(MG)」, *モダンフィジシャン*, 2002年 5月15日, Vol.22, No5, P.563-571

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98  
JSTPlus(JDreamII)  
JMEDPlus(JDreamII)  
JST7580(JDreamII)  
CAplus(STN)

专利名称(译)	测试重症肌无力的方法及其测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP4269064B2</a>	公开(公告)日	2009-05-27
申请号	JP2003048862	申请日	2003-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	矢野明彦 蓝老文惠		
申请(专利权)人(译)	矢野明彦 蓝老文惠		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶		
[标]发明人	矢野明彦 青才文江		
发明人	矢野明彦 青才文江		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/531.A		
代理人(译)	谷川荣次郎		
其他公开文献	JP2004257862A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供重症肌无力的测试方法，其可以通过使用诸如血液等的体液来进行。ZSOLUTION：重症肌无力的测试方法包括测量从活体取样的体液中的抗HSC71抗体，从而通过使用血液或血液等体液进行重症肌无力(MG)的测试方法。喜欢。该测试方法在临床上是有用的，或者比测量抗AChR抗体更好，并且与抗-滴定蛋白抗体相比非常有用。此外，该方法可用于诊断MG，确定治疗方法和决定治疗效果和预后。此外，通过该测试方法测量的抗HSC71抗体的值与通过常规测试方法测量的抗AChR抗体的值之间未发现任何相关性。因此，通过使用这种易于使用的血液免疫测定方法，与抗AChR抗体的测量相辅相成，可以提高诊断的准确性。Z

【图3】

