

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3964286号
(P3964286)

(45) 発行日 平成19年8月22日(2007.8.22)

(24) 登録日 平成19年6月1日(2007.6.1)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	Z N A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 37/64	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

請求項の数 5 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-256013 (P2002-256013)	(73) 特許権者	000138277
(22) 出願日	平成14年8月30日(2002.8.30)		株式会社三菱化学ヤトロン
(65) 公開番号	特開2004-93414 (P2004-93414A)		東京都新宿区西五軒町13番1号
(43) 公開日	平成16年3月25日(2004.3.25)	(74) 代理人	100090251
審査請求日	平成17年2月1日(2005.2.1)		弁理士 森田 憲一
		(74) 代理人	100139594
			弁理士 山口 健次郎
		(72) 発明者	和田 英夫
			三重県松阪市本町2213
		(72) 発明者	澤井 時男
			東京都千代田区東神田1丁目11番4号
			株式会社ヤトロン内
		(72) 発明者	金子 守
			東京都千代田区東神田1丁目11番4号
			株式会社ヤトロン内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ阻害治療薬投与治療のモニタリング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロテアーゼ阻害治療薬の投与を停止した患者由来の生体液試料中の顆粒球由来のエラスターゼによるフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物の濃度を検出することを特徴とする、プロテアーゼ阻害治療薬投与治療後における重篤状態に陥る危険性のモニタリング方法。

【請求項2】

前記のフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物の濃度の変動経緯及び/又は変動幅を指標とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記のフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物を免疫学的手段により検出する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

患者が急性膵炎又は急性循環不全である請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記フィブリノーゲン又はフィブリン分解産物が配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを含む分解産物である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロテアーゼ阻害治療薬投与治療のモニタリング方法に関するものであり、顆粒球由来のエラスターゼにより消化・分解されたフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物の濃度を測定することで、プロテアーゼ阻害治療薬の投薬の効果や投薬の時期等を確認することができる。

【0002】

【従来の技術】

侵襲に対する生体防御機構のなかで、好中球はきわめて重要な位置を占めている。その主な役割は貪食であるが、その対象が大きすぎて貪食不可能な場合や防御機構に携わる様々な分子の発するシグナル刺激に対応して、好中球は細胞外へ中性プロテアーゼや活性酸素等、生体防御物質を放出する。その1つが好中球エラスターゼ(Granule Elastase: GE、EC 3.4.21.37)である。好中球エラスターゼは強力な蛋白分解酵素で、生体に侵入した異物の破壊、消化の一翼を担っている。しかし、生体内には大量にプロテアーゼインヒビターが存在することから、放出された好中球エラスターゼは特殊な状況を除いて作用していないと考えられていた。しかし、近年の研究により好中球エラスターゼの主要な抑制物質である1-プロテアーゼインヒビターが、好中球やマクロファージから放出される活性酸素により失活されることが判明している。緩やかな基質特異性のため、好中球エラスターゼは、生体に対して様々な障害を引き起こすことが報告されている。その顕著な例が肺気腫、成人呼吸促迫症候群(ARDS)、術後合併症、多臓器不全、敗血症、凝固異常(DIC等)、急性胃粘膜病変、炎症性腸疾患、重症膵炎、急性心筋梗塞、動脈硬化、慢性関節リュウマチ、白血病等、更には急性循環不全のような症候群である。そのため、上記の疾患患者に対しては、プロテアーゼインヒビターを投与してその障害に対処する方法が効果的である。プロテアーゼインヒビターとしては、ウリナスタチン、シベレスタットナトリウム塩等、様々な物質が開発検討され、医療の現場で治療効果が検討されている。

10

20

【0003】

上記の各疾患の内、膵炎は難治性の疾患で、膵臓の外分泌腺が産生する消化酵素の活性化による自己消化である急性炎症と、繊維化によって不可逆的な機能不全になる慢性炎症に分けられる。特に急性膵炎から続発する重症膵炎の場合、ショックや呼吸困難の症候のみならず、腎不全、播種性血管内凝固症候群(DIC)、肝不全等の合併症を併発し、死亡率も高い疾患である。そのため、重症化の程度及び転帰を早期に診断することはもとより、適切な治療を施すことが重要となる。

30

【0004】

一方、急性循環不全は、出血性ショック、細菌性ショック、熱傷性ショック、外傷性ショックや心臓自体の病変、あるいはアナフィラキシーや薬物反応により心機能が高度に抑制され、生体機能を維持するのに必要な心拍出量が減少し、組織循環の不全を起こして組織細胞の低酸素症を来し細胞代謝が傷害され、アシドーシスの発生や乳酸の蓄積などの諸症状を起こし、不可逆性の重要臓器不全に至る。早期の適切な治療を行わなければ悪循環に陥り、死亡に至る症候群である。そのため、早期診断はもとより、適切な治療を施すことが重要となる。

【0005】

従来、膵炎の診断は、血清や尿中に含まれるアミラーゼ、血清中のリパーゼ、エラスターゼ1、トリプシン、サイトカイン等を定量することで行われ、患者の病態に適した治療法(主に薬剤の投与)が施されている。重症化の判断は、厚生労働省診断基準に従い、膵炎発症から48時間以内に全身状態、臨床所見(BUN、LDH、BE等)及び画像所見(US、CT等)から重症化スコアにより判断されている。

40

【0006】

一方、急性循環不全は、ショック状態の把握が診断の手がかりとなり、意識状態、収縮期血圧、脈拍数、BE、尿量及び意識状態観察からなるショックスコアによる診断が行われている。

【0007】

50

これらの主な治療法は、抗酵素療法のプロテアーゼインヒビター)の投与である。これは、炎症の抑制及び炎症から誘発される生体の過剰な防御反応を抑制することが主目的で、その薬剤としては、アプロチニン、メシル酸ガベキサート、ウリナスタチン、メシル酸ナファモスタット等が多く使用されている。これらの抗酵素薬剤は、急性膵炎(急性循環不全も含む)の大部分に使用されている。例えば、ウリナスタチン製剤は、急性膵炎(外傷性、術後及びE R C P後の急性膵炎を含む)、慢性再発性膵炎の急性増悪期、及び急性循環不全(出血性ショック、細菌性ショック、外傷性ショック、熱傷性ショック)に投与することで、膵酵素や過剰防御に由来する好中球エラスターゼの働きを抑え、炎症や痛みを和らげる。

【0008】

しかし、ウリナスタチン製剤は、その投与量や期間が厳密に規定されており、患者病態を密に観察し、その使用に注意を払う必要がある。また、他の抗酵素薬剤の投与においても、例えば、アプロチニンは分子量が大きいため、反復投与によってアナフィラキシーショックを引き起こす危険性がある。更に、メシル酸ナファモスタットは、大量持続投与により、高カリウム血症を起こすため、重症膵炎や急性循環不全の病期に応じて適切な用法、用量で治療することが救命効果を高めるためには重要になる。

【0009】

これら薬剤投与後の患者病態を正確に把握するには、重症膵炎の診断時に定量されるBUN、LDH、BE等、循環不全の診断時に定量されていた収縮期血圧、脈拍数、BEでは不十分である。というのも、これらの物質は、重症膵炎や急性循環不全の病態を正確に示唆するものではなく、間接的に侵襲された臓器機能しか把握できず、また、侵襲臓器の代謝作用時間の遅延による状態把握のずれが生じる。

従って、薬剤投与の効果や投与時期をより正確に確認し得る炎症の範囲及び勢力を示す新しい指標が望まれている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、急性膵炎や急性循環不全治療において抗酵素薬剤投薬の効果や投薬の時期等を正確に確認することが可能な新しい指標を探索していたところ、顆粒球由来エラスターゼにより消化・分解されたフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物がその指標となることを見出した。

本発明は、こうした知見に基づくものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

従って、本発明は、プロテアーゼ阻害治療薬を投与した患者由来の生体液試料中の顆粒球由来のエラスターゼによるフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物の濃度を検出することを特徴とする、プロテアーゼ阻害治療薬投与治療のモニタリング方法に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明で指標として利用するのは、患者由来の生体液試料中の顆粒球由来エラスターゼにより消化・分解されたフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物、例えば、線維素分解産物(以下、GE-XDPともいう)である。そもそもフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物は、生体内局所において白血球、特に顆粒球が活性化されたときに放出されるエラスターゼによってフィブリノーゲン又はフィブリンが分解を受けて生じるもので、肺気腫若しくは敗血症、又は外科手術に伴う多臓器不全などの予知マーカーとして有用なものであることが知られていた。

しかしながら、驚くべきことに、本発明者は、急性膵炎又は急性循環不全の患者にエラスターゼ阻害治療薬を投与した後に、フィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物が病態を反映する指標となることを見出した。特に架橋フィブリンの顆粒球エラスターゼ

10

20

30

40

50

分解産物は、生体中での血栓の存在を示唆するものであることは周知であるが、これは凝固線溶系の過剰反応によるものであるのに対し、その存在が循環系への侵襲の程度をも計ることができるという全く新しい知見を得たのである。

【 0 0 1 3 】

本発明のモニタリング方法は、プロテアーゼ阻害治療薬を投与した患者に対して実施する。ここで「患者」は、プロテアーゼ阻害治療薬の投与が行われる疾患を罹病した患者であれば特に限定されないが、例えば、肺気腫、成人呼吸促迫症候群（ARDS）、術後合併症、多臓器不全、敗血症、凝固異常（DIC等）、急性胃粘膜病変、炎症性腸疾患、重症膵炎、急性心筋梗塞、動脈硬化、慢性関節リュウマチ、白血病等、更には急性循環不全のような症候群の患者である。特に、膵炎（特に、重症膵炎）、あるいは急性循環不全

10

【 0 0 1 4 】

本発明方法は、プロテアーゼ阻害治療薬を投与した治療のモニタリングに使用する。ここで、プロテアーゼ阻害治療薬としては、例えば、抗酵素療法に用いる蛋白分解酵素阻害剤（プロテアーゼインヒビター）である。すなわち、炎症の抑制及び炎症から誘発される生体の過剰な防御反応を抑制する目的で使用される蛋白分解酵素阻害剤である。具体的には、アプロチニン、メシル酸ガベキセート、ウリナスタチン、メシル酸ナファモスタット等を挙げることができる。

【 0 0 1 5 】

本発明のモニタリング方法では、指標（マーカー）として、顆粒球由来エラスターゼにより消化・分解されたフィブリノーゲン又はフィブリン分解産物を利用する。顆粒球エラスターゼは、顆粒球のアズール顆粒（一次顆粒）又は特殊顆粒（二次顆粒）に含まれ、炎症局所に誘導され活性化された顆粒球より放出されるセリンプロテアーゼであって、その生理的な基質である、細胞外マトリックスに含まれるエラスチン、コラーゲン、フィブロネクチン、若しくはプロテオグリカン、又は血漿中タンパク質のフィブリノーゲン、フィブリン、プラスミノゲン、若しくはアンチトロンビンIIIなどを、主に疎水性アミノ酸であるバリン、アラニン、ロイシン、又はイソロイシンなどのC末端側で加水分解する。

20

【 0 0 1 6 】

本発明のモニタリング方法では、顆粒球由来エラスターゼによるフィブリノーゲンやフィブリンの分解産物を利用する。顆粒球由来エラスターゼによる線維素分解産物としては、具体的には、フィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントX、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントY、及び顆粒球エラスターゼ分解フラグメントE、並びに安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物を挙げることができる。モニタリングとしては、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー、及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメインを捉える。

30

【 0 0 1 7 】

本発明のモニタリング方法で指標（マーカー）として好適なフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物は、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物に共通して存在するC末端領域のエピトープを有する抗体と反応するフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物である。特に、特開2000-41673号公報に記載されているとおり、前記の顆粒球エラスターゼ分解Dモノマーは、少なくとも4種類のポリペプチドの混合物で、アミノ酸残基A 112より始まるSer - Glu - Asp - Leu - Arg - Ser - 、アミノ酸残基A 100より始まるSer - Ala - Asn - Asn - Arg - Asp - 、アミノ酸残基A 102より始まるAsn - Asn - Arg - Asp - Asn - Thr - 、及びアミノ酸残基A 108より始まるTyr - Asn - Arg - Val - Ser - Glu - からなり、これらを捉える必要がある。

40

また、これらの顆粒球エラスターゼ分解DモノマーのC末端領域には、

Asp Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu

50

(配列表の配列番号1の配列に記載のアミノ酸配列)で表されるアミノ酸配列が共通して存在し、このアミノ酸配列は、フィブリノーゲンのアミノ酸残基A 192~204に相当するアミノ酸配列である。従って、本発明のモニタリング方法で指標(マーカー)として好適なフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物は、フィブリノーゲンの前記アミノ酸残基A 192~204に相当するアミノ酸配列を有するものが好ましい。

【0018】

重症の急性膵炎や急性循環不全の患者は、重症スコア、ショックスコアが高レベルを呈する。このとき、血中内のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物レベルが高値を示す。これらの患者にプロテアーゼ阻害治療薬の投薬を開始すると、重症スコア、ショックスコアも軽減され、同時にフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の血中レベルは低下する。ここで、投薬治療の効果が充分であれば、プロテアーゼ阻害治療薬の投薬を止めても、各スコアとフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物レベルは低値を維持する。しかしながら、投薬治療の効果が不十分の場合は、プロテアーゼ阻害治療薬の投薬を止めると、各スコアは低値を示したままか、あるいは急激な上昇は示さず、フィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物レベルのみが再度上昇するケースがある。このような場合は、重篤な状態に陥る危険性が高い。

この傾向は、急性膵炎や急性循環不全の双方とも顕著に表れる。従って、治療のモニタリングとしてフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物は十分活用することができる。

【0019】

本発明では、フィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物を免疫学的に検出することができる。詳細には、フィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物に特異的な抗体であればポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、特異抗体を用いて、それぞれを検出する。このような抗体は既に公知であり、例えば、フィブリノーゲンのe-Dモノマーを免疫して得られたポリクローナル抗体より、p-Dモノマー、p-Dダイマー、及びp-DD/E複合体、並びにフィブリノーゲンに反応する抗体を除去したポリクローナル抗体(J. Lab. Clin. Med., 第102巻, 858頁, 1983年)、顆粒球エラスターゼがフィブリノーゲンに作用した際にフィブリノーゲンのA鎖上に新たに生ずるN末端部位(A 22~)に反応するモノクローナル抗体(Blood Coagulation and Fibrinolysis, 第6巻, 259頁, 1995年)、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー、及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメインに特異的に反応するモノクローナル抗体(特開2000-41673号公報)等が利用できる。

特にフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物については正確に検出する必要があることから、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物と特異的に反応するが、フィブリノーゲン、並びにフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解フラグメントX、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントY、及び顆粒球エラスターゼ分解フラグメントEと反応しない抗体を用いることが好ましい。

【0020】

本発明の免疫学的分析方法に用いる被検試料は、フィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物を含む可能性のある試料であれば特に限定されるものでないが、例えば、生体液試料、特に血液、血漿、血清、又は尿、好ましくは血漿又は血清である。本発明の免疫学的分析方法においては、被検試料中にp-XDPが存在する場合であっても、フィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物に特異的な抗体を用いることで、それらの影響を受けることなく、フィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物を検出することができる。

【0021】

本発明のモニタリング方法では、プロテアーゼ阻害治療薬を投与した患者から生体試料を採取する。本発明のモニタリング方法では、プロテアーゼ阻害治療薬を投与した患者から

10

20

30

40

50

、定期的に生体試料を採取する。一般的には、プロテアーゼ阻害治療薬を投与した日から採取を開始し、毎日1回ないし数回の採取を続け、モニタリングが必要な期間に亘って継続する。例えば、投与日から1日1回の割合で隔日毎に採取して、モニタリングすることができる。

【0022】

サンドイッチ法を利用する本発明の免疫学的測定法では、具体的には、前記の抗体それぞれを適当な不溶性担体に固定化する(第1抗体)。次に、不溶性担体と被検試料との非特異的結合を避けるために、適当なブロッキング剤[例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)やゼラチン等]で不溶性担体の表面を被覆する。続いて、被検試料を加えて一定時間(例えば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(1次反応)。続いて、前記第1抗体とは異なるエピトープに反応する抗体に標識を付した第2抗体を加えて一定時間(例えば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(2次反応)。これを適当な洗浄液(例えば、界面活性剤を含む生理食塩水)で洗浄してから、不溶性担体上に存在する標識抗体の量を定量する。その値から、被検試料中のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の量を算出することができる。

10

【0023】

前記サンドイッチ法による免疫学的測定法に使用することのできる不溶性担体は特に限定されるものでなく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子、その他ニトロセルロース、紙、アガロース、及びこれらの組み合わせ等を例示することができる。

20

【0024】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、又は発光物質を使用するのが有利である。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ等、また、蛍光物質としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート等、また、発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステル、ルシフェリン等を使用することができる。

【0025】

凝集反応を利用する本発明の免疫測定法において、不溶性担体としては、一般に抗原抗体反応の凝集反応を利用する免疫学的分析方法において用いられる任意の不溶性担体を用いることができ、例えば、ラテックス粒子(特に、ポリスチレンラテックス粒子)を挙げることができる。前記抗体を不溶性担体に固定化させるには、公知の方法、例えば、化学結合法(架橋剤としてカルボジイミド、グルタルアルデヒド等を用いる)又は物理吸着法を用いることができる。スライド板を用いる場合には目視的に、又は反応セルを用いる場合には特定の波長を用いて分光学的に凝集反応を測定し、被検試料中のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の量を検出・定量することができる。

30

【0026】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

40

【実施例1】

《GE-XDPモノクローナル抗体の調製》

特開2000-41673号公報に記載の方法により取得した。詳細には以下の操作によった。

(1)免疫用抗原の調製

アミノ酸配列:

Cys Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu

(配列表の配列番号2の配列に記載のアミノ酸配列)で表されるペプチド(以下、ハプテンペプチドと称する)をアミノ酸合成機により合成した。得られたハプテンペプチドを、

50

以下に示す手順に従って、N末端のCysを介して、担体タンパク質であるスカシガイ (Keyhole limpet) ヘモシアニン (以下、KLHと称する) に結合させることにより、ハプテン化した。すなわち、KLH (Sigma社) 5 mgを0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 2.5 mLに溶解し、次いで、ジメチルホルムアミドに溶解した架橋剤スクシニミジル6-(N-マレイミド)-n-ヘキサノエート [succinimidyl 6-(N-maleimido)-n-hexanoate, 以下、MHSと称する] (濃度100 mg/mL, 同仁化学) 0.1 mLを添加した。攪拌しながら、25℃で30分間反応させた後に、2.5 mM-EDTA含有0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックスG-25カラム (直径1.6 cm × 長さ10.0 cm, ファルマシア・バイオテック) に充填し、ゲル濾過法にて未反応のMHSを除去した。

10

【0027】

続いて、MHSを付加したKLH 5 mgに対して、ハプテンペプチド 5 mg [2.5 mM-EDTA含有0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 2.5 mLに予め溶解したもの] を添加した。攪拌しながら、25℃で3時間反応させた後に、150 mM-NaCl含有10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に対して十分に透析し、未反応のハプテンペプチドを除去した。このようにして調製したハプテンペプチド-KLHコンジュゲートを抗体作製のための免疫用抗原として使用した。

【0028】

(2) ハイブリドーマの調製

20

(a) 免疫化した脾臓細胞の調製

上記(1)で得られたハプテンペプチド-KLHコンジュゲート免疫抗原溶液 (1.0 mg/mL) を、等量のフロインド氏完全アジュバンドと乳化するまで混和し、その混合液0.1 mLをマウス腹腔内に投与することにより免疫を行った (第1回免疫)。21日経過した後に、そのマウスに前記と同様の方法で調製した混合液0.1 mLを腹腔内に投与した (第2回免疫)。第2回免疫から21日経過した後に、ハプテンペプチド-KLHコンジュゲート溶液 (1.0 mg/mL) を等量の生理的食塩水で希釈し、その希釈液0.1 mLを、マウスの静脈内に投与した (最終免疫)。最終免疫から3日経過した後に、マウスから脾臓を無菌的に摘出し、以下の工程に使用した。

【0029】

30

(b) 細胞融合

無菌的に摘出した前記の脾臓を、15%ウシ胎児血清を含むDME培地5 mLを入れたシャーレーに入れた。次に、脾臓を15%ウシ胎児血清を含むDME培地約15 mLで還流して脾細胞を流出させた後、この脾細胞懸濁液をナイロンメッシュに通した。この脾細胞を50 mL遠心チューブに集めて500 × gで10分間遠心した。こうして得たペレットにヘモライジング溶液 (155 mM-NH₄Cl, 10 mM-KHCO₃, 及び1 mM-Na₂EDTA; pH 7.0) 5 mLを加え、懸濁させた。0℃で5分間放置すると、懸濁液中の赤血球が破壊された。15%ウシ胎児血清を含むDME培地15 mLを加えてから遠心分離した。このようにして得た細胞ペレットをDME培地で遠心法によって洗浄し、生きている脾細胞数を測定した。

40

【0030】

一方、予め培養しておいたマウス骨髄腫細胞 (ミエローマ細胞) SP2/0-Ag14 (約2 × 10⁷個) に前記脾臓細胞 (1 × 10⁸個) を加え、DME培地中でよく混合し、遠心分離を行った (500 × g, 10分間)。その上清を吸引し、ペレットをよく解きほぐし、38℃に保温しておいた40%ポリエチレングリコール4000溶液0.5 mLを滴下し、遠心チューブを手で、1分間穏やかに回転することによってポリエチレングリコール溶液と細胞ペレットとを混合させた。次に、38℃に保温しておいたDME培地を30秒毎に1 mLずつ加えてチューブを穏やかに回転させた。この操作を10回繰り返した後、15%ウシ胎児血清を含むDME培地20 mLを加えて、遠心分離 (500 × g, 10分間) を行った、上清を除去した後、細胞ペレットを15%ウシ胎児血清を含むHAT培

50

地（DME培地にアミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-5} M、及びヒポキサンチン 1×10^{-4} Mになるように添加したもの）で、遠心法によって2回洗浄した後、前記HAT培地40 mLに懸濁した。

【0031】

この細胞懸濁液を96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに200 μ Lずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37の炭酸ガス培養器で培養を開始した。培養中、2~3日間で各ウェルの培地約100 μ Lを除き、新たに前記のHAT培地100 μ Lを加えることによりHAT培地中で増殖するハイブリドーマを選択した。8日目頃から15%ウシ胎児血清を含むHT培地（DME培地にチミジン 1.6×10^{-5} M及びヒポキサンチン 1×10^{-4} Mになるように添加したもの）に交換し、ハイブリドーマの増殖を観察するとともに、約10日目に、ELISA法により、GE-XDPに特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングし、限界希釈法によりクローニングした。これらのクローンの中から、増殖性が良好で、抗体分泌能が高く、しかも安定なクローンを選んだ。

10

【0032】

(3)モノクローナル抗体の製造

(a)上記で選択したマウスハイブリドーマを、15%ウシ胎児血清を含むDME培地で37にて5%二酸化炭素雰囲気中において72~96時間培養した。培養物を遠心分離（10,000 \times g, 10分間）した後、上清に固形の硫酸アンモニウムを50%最終濃度となるように徐々に加えた。混合物を氷冷下で30分間攪拌した後、60分間放置し、遠心分離（10,000 \times g, 10分）した。得られた沈渣を少量の10 mMリン酸緩衝液（pH 8.0）に溶解し、1000倍量の10 mMリン酸緩衝液に対して透析した。透析物を、10 mMリン酸緩衝液で予め平衡化したDEAE-セルロースのカラムに充填した。モノクローナル抗体の溶出は、10 mMリン酸緩衝液（pH 8.0）と0.2 M-NaClを含む10 mMリン酸緩衝液（pH 8.0）との間で濃度勾配法により行った。溶出されたモノクローナル抗体を限外濾過法で濃縮し、0.1 Mリン酸緩衝液（pH 8.0）に対して透析した。ウシ血清IgGを除くために、透析物をヤギ抗ウシ血清IgG-セファロース4Bのカラムに通した。次に通過液を0.1 Mリン酸緩衝液（pH 8.0）で平衡化したプロテインA-セファロース4Bのカラムに充填した。カラムをpH 3.5の緩衝液で溶出して、精製した抗GE-XDPモノクローナル抗体を得た。得られた抗GE-XDPモノクローナル抗体は、顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー（e-Dモノマー）、ヒト安定化フィブリンのe-Dダイマー、及びヒト安定化フィブリンのe-DD/E複合体に特異的に反応した。

20

30

【0033】

【実施例2】

《抗GE-XDPモノクローナル抗体結合ラテックスの調製》

実施例1のモノクローナル抗体（2.0 mg/mL）を含有する50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）2 mLと、ラテックス溶液（2%ポリスチレンラテックス、日本合成ゴム、粒径0.310 μ m）2 mLとを混合し、マグネチックスターラーにて2時間攪拌し、抗体をラテックス粒子上に固定化した。遠心分離（20,000 \times g, 20分間）した後、沈殿を、0.1%BSAを含む50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁し、1時間攪拌した。遠心分離（20,000 \times g, 20分間）を繰り返すことにより、50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）で沈殿を3回洗浄した後、沈殿を、0.05%アジ化ナトリウムを含む50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁させ（1重量/容量%）、抗GE-XDPモノクローナル抗体結合ラテックス含有液を得た。前記モノクローナル抗体結合ラテックス含有液は、使用するまで4で保存した。

40

【0034】

【実施例3】

《患者生体液試料中のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の検出》

(1)測定操作

実施例2で得られた抗GE-XDPモノクローナル抗体結合ラテックス含有液と、患者

50

由来の生体液試料（血漿）とを混合し、全自動免疫血清検査システム（三菱化学株式会社製 L P I A - 2 0 0 ）を用いて、凝集の反応速度を測定することにより、定量を実施した。

【 0 0 3 5 】

（ 2 ）急性循環不全患者の回復例

急性循環不全（熱傷）患者にウリナスタチン製剤（持田製薬）を投与し、熱傷例の予後が順調に回復した 10 症例について、その投薬治療期間における生体試料（3.8%クエン酸血漿）中のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度（測定値を正常基準値で除した値）及びショックスコアについて平均値を求めた。急性循環不全のショックの診断についてはショックスコアに基づいて行った。結果を図 1 に示す。

10

図 1 に示すとおり、熱傷発症日（0日）においてはショックスコアは6となり、抗酵素阻害薬の投薬が開始された。投薬に従い、ショックスコアが低下してゆき、それに伴い、G E - X D P も低下している。ショックスコア及びフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の低下とともに患者の臨床状態も正常に回復した。

【 0 0 3 6 】

（ 3 ）急性循環不全患者の予後不良例

急性循環不全（熱傷）患者にウリナスタチン製剤（持田製薬）を投与し、熱傷例の予後が不良の 10 症例について、前述（2）の回復例と同様に投薬治療期間における 3.8%クエン酸血漿中のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度及びショックスコアについて平均値を求めた。診断基準は前述（2）と同様に行った。その結果を図 2 に示す。

20

熱傷発症日（0日）からショックスコアが8と高く、ショックスコアが低下するまで抗酵素阻害薬を投与した。その結果、ショックスコアは6日目において2まで低下したが、投薬期間の前半まで低値であったフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度が後半に亘って上昇してきた。これらの予後不良症例中には死亡例も含まれている。

【 0 0 3 7 】

（ 4 ）急性膵炎の軽症例

急性膵炎の軽症例（10例）についてウリナスタチン製剤（持田製薬）の投薬治療期間における生体試料（3.8%クエン酸血漿）中のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度及び重症度スコアについて平均値を求めた。急性膵炎の重症度については厚生労働省の重症度判定基準に基づいて判定を行った。結果を図 3 に示す。

30

急性膵炎発症日（0日）においては重症度スコアは3であり、投薬開始によりスコアは1まで低下した。スコア及びフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度の低下に従い、膵炎も治まり患者の臨床状態も正常に回復した。

【 0 0 3 8 】

（ 5 ）急性膵炎の重症例

急性膵炎の重症例（10例）についてウリナスタチン製剤（持田製薬）の投薬治療期間における 3.8%クエン酸血漿中のフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度及び重症度スコアについて平均値を求めた。診断基準は前述（4）と同様に行った。結果を図 4 に示す。

40

急性膵炎発症日（0日）に高値を示したフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度も投薬に従い、一度は低下傾向を示したが6日目より上昇し始めた。重症度スコアにおいても、10日目に高値を示し始め、14日目においては6と高値示していた。患者の臨床状態も重篤な症例が多く死亡例もあり、膵炎を回復した例でも長時間を要している。

【 0 0 3 9 】

【 発明の効果 】

本発明によれば、急性膵炎、急性循環不全治療において抗酵素薬剤投薬の効果、投薬の時期等を正確に確認することができる。特に急性膵炎から重症化へ進行する過程を正確に把握できるため、より適切な治療を施すことができるようになるという、格別なる効果を有

50

するものである。

【 0 0 4 0 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列表の配列番号 2 の配列に記載のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 の配列に記載のアミノ酸配列における N 末端の A s p を C y s に置換したアミノ酸配列である。

【 0 0 4 1 】

【 配列表 】

〈110〉 Iatron Laboratories, Inc.

〈120〉 A Method for Monitoring an Administration Therapy of a Proteinase Inhibitor

10

〈130〉 IAT02006P

〈160〉 2

20

〈210〉 1

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Homo sapiens

〈400〉 1

Asp Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu

30

1

5

10

〈210〉 2

〈211〉 13

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

40

〈220〉

〈223〉 配列表の配列番号 1 の配列に記載のアミノ酸配列における N 末端の A s p を C y s に置換したアミノ酸配列である。

〈400〉 2

Cys Leu Leu Pro Ser Arg Asp Arg Gln His Leu Pro Leu

50

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 急性循環不全患者の回復例におけるフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度及びショックスコアの変化を示すグラフである。

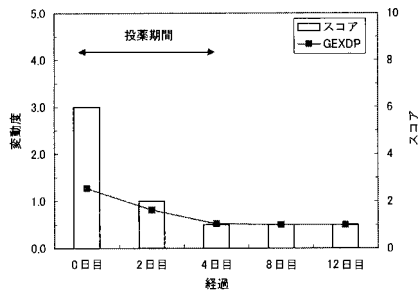
【図2】 急性循環不全患者の予後不良例におけるフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度及びショックスコアの変化を示すグラフである。

【図3】 急性膵炎の軽症例におけるフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度及びショックスコアの変化を示すグラフである。

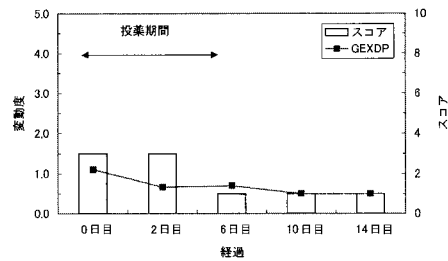
【図4】 急性膵炎の重症例におけるフィブリノーゲン分解産物又はフィブリン分解産物の変動度及びショックスコアの変化を示すグラフである。

10

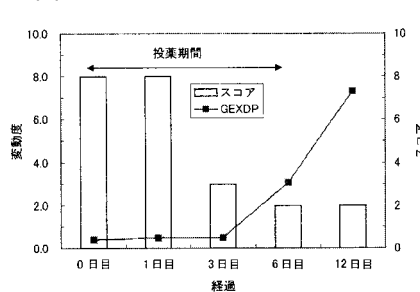
【図1】



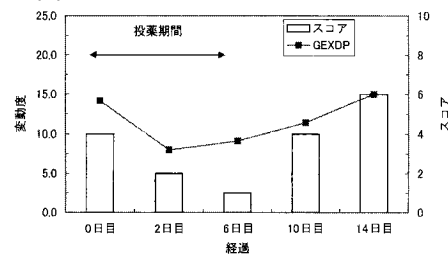
【図3】



【図2】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10 1 0 1
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
		C 1 2 P	21/08

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開平02 - 117699 (JP, A)
 特表平10 - 500210 (JP, A)
 特開2000 - 041673 (JP, A)

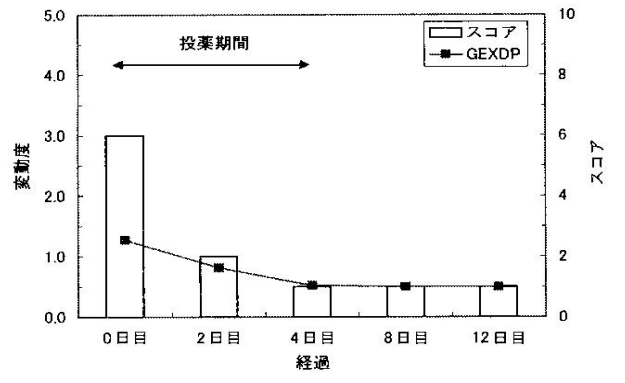
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G01N 33/48-G01N33/98

专利名称(译)	监测蛋白酶抑制性治疗药物给药疗法的方法		
公开(公告)号	JP3964286B2	公开(公告)日	2007-08-22
申请号	JP2002256013	申请日	2002-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	三菱化学Yatoron		
当前申请(专利权)人(译)	三菱化学Yatoron		
[标]发明人	和田英夫 澤井時男 金子守		
发明人	和田 英夫 澤井 時男 金子 守		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/37 G01N33/53 A61K38/55 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/02 A61P43/00 C12P21/08		
FI分类号	G01N33/68 C12Q1/37.ZNA G01N33/53.D A61K37/64 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P35/02 A61P43/00.111 C12P21/08 A61K38/16.200 A61K38/55		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB05 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB46 2G045/BB51 2G045/DA36 2G045 /FB03 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC32 4C084/ZA361 4C084/ZA451 4C084 /ZA531 4C084/ZA541 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA961 4C084 /ZB151 4C084/ZB271 4C084/ZB351 4C084/ZC202		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2004093414A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够准确地确认急性胰腺炎和急性循环衰竭治疗中抗药物给药效果，给药时间等的监测方法。解决方案：用于施用蛋白酶抑制治疗剂的治疗的监测方法检测源自施用蛋白酶抑制剂治疗剂的患者生物液体样品中的粒细胞衍生的弹性蛋白酶的纤维蛋白降解产物的浓度。点域1

【 図 1 】



【 図 2 】