

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5366987号
(P5366987)

(45) 発行日 平成25年12月11日(2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月20日(2013.9.20)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 N

請求項の数 10 (全 28 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2011-24073 (P2011-24073) (22) 出願日 平成23年2月7日(2011.2.7) (62) 分割の表示 特願2007-507849 (P2007-507849) の分割 原出願日 平成17年4月15日(2005.4.15) (65) 公開番号 特開2011-99871 (P2011-99871A) (43) 公開日 平成23年5月19日(2011.5.19) 審査請求日 平成23年2月28日(2011.2.28) (31) 優先権主張番号 60/521,384 (32) 優先日 平成16年4月15日(2004.4.15) (33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 506338881 アテラ バイオテクノロジーズ エービー スウェーデン ストックホルム S-17 177 ホグデベテン 2B (74) 代理人 100093894 弁理士 五十嵐 清 (72) 発明者 デファイア ウルフ スウェーデン タビー S-18733 ロバケン 22 (72) 発明者 フロストガード ヨハン スウェーデン ナッカ S-13147 トノサバジェン 9 審査官 吉田 将志</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

心臓血管疾患を発症または進行するヒト患者の危険性を評価するためにホスホリルコリン複合体と反応性の、患者の抗体のレベルを評価する方法であって、ここで該方法は、

(a) 患者から採取された生体外サンプルにおいて、ホスホリルコリン複合体と反応性の、患者の抗体のレベルを評価する工程、および

(b) 患者から採取された生体外サンプルにおいてのホスホリルコリン複合体と反応性の抗体の評価されたレベルに基づいて、心臓血管疾患を発症または進行する患者の危険性を決定する工程、を含み、

ここで患者から採取された生体外サンプルにおいての前記ホスホリルコリン複合体と反応性の抗体のレベルは、健常なヒト患者において心臓血管疾患を発症または進行する危険性とは逆相関するものである、ことを特徴とする心臓血管疾患を発症または進行するヒト患者の危険性を評価するためにホスホリルコリン複合体と反応性の、患者の抗体のレベルを評価する方法。

【請求項2】

心臓血管疾患を発症または進行するヒト患者の危険性を評価するための方法におけるホスホリルコリン複合体の使用であって、ここで前記方法は、

(a) 患者から採取された生体外サンプルにおいて、ホスホリルコリン複合体と反応性の、患者の抗体のレベルを評価する工程、および

(b) ホスホリルコリン複合体と反応性の抗体の評価されたレベルに基づいて、心臓血

10

20

管疾患を発症または進行する患者の危険性を決定する工程、を含み、

ここで患者から採取された生体外サンプルにおいての前記ホスホリルコリン複合体と反応性の抗体のレベルは、健常なヒト患者において心臓血管疾患を発症または進行する危険性とは逆相関するものである、ことを特徴とする心臓血管疾患を発症または進行するヒト患者の危険性を評価するための方法におけるホスホリルコリン複合体の使用。

【請求項 3】

心臓血管疾患が、虚血性心臓血管疾患である、請求項 1 に記載の方法または請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

心臓血管疾患が、アテローム性動脈硬化症である、請求項 1 に記載の方法または請求項 2 に記載の使用。

【請求項 5】

ホスホリルコリン複合体と反応性の、患者の I g M 抗体のレベルが評価される、請求項 1 または請求項 3 または請求項 4 に記載の方法、または請求項 2 乃至請求項 4 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 6】

ホスホリルコリン複合体と反応性の、患者の I g G 抗体のレベルが評価される、請求項 1 または請求項 3 または請求項 4 に記載の方法、または請求項 2 乃至請求項 4 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 7】

ホスホリルコリンがスパーサーを介して担体に結合されている、請求項 1 または請求項 3 乃至請求項 6 のいずれか 1 つに記載の方法、または請求項 2 乃至請求項 6 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 8】

ホスホリルコリン複合体が、選択的にスパーサーを介して、タンパク質担体に結合されているホスホリルコリンを含む、請求項 1 または請求項 3 乃至請求項 7 のいずれか 1 つに記載の方法、または請求項 2 乃至請求項 7 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 9】

タンパク質が K L H (キーホールリンペットヘモシアニン) またはヒト血清アルブミン (H S A) である、請求項 8 に記載の方法または使用。

【請求項 10】

評価が免疫評価である、請求項 1 または請求項 3 乃至請求項 9 のいずれか 1 つに記載の方法、または請求項 2 乃至請求項 9 のいずれか 1 つに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アテローム性動脈硬化症および虚血性心臓血管疾患の治療および危険評価の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

アテローム性動脈硬化症は、大動脈および中動脈の最内側層(内膜)の肥厚を引き起こす慢性疾患である。これは血流を減少させ、影響を受けた血管によって供給されている組織において虚血および組織破壊を引き起こし得る。アテローム性動脈硬化症は、心筋梗塞、卒中および末梢動脈疾患をはじめとする心臓血管疾患の主な原因である。これは西欧諸国における死亡の主な原因であり、20年以内に世界全体の主な死亡原因となると予測されている。

【0003】

この疾患は、血管の細胞外マトリックスにおけるリポタンパク質、主として低密度リポタンパク質(LDL)の蓄積によって始まる。こういったLDL粒子は凝集し、酸化修飾を受ける。酸化LDLは炎症性、毒性であり、血管損傷を引き起こす。アテローム性動

10

20

30

40

50

脈硬化症は、炎症および繊維症をはじめ、この損傷に対する応答を多くの点で表す。

【 0 0 0 4 】

1989年に、パリンスキ (Palinski) らは、ヒトにおいて酸化LDLに対する循環性自己抗体を同定した。この観察結果は、アテローム性動脈硬化症は酸化リポタンパク質に対する免疫応答によって引き起こされる自己免疫疾患であり得るということを示唆した。この時点でいくつかの研究所が酸化LDLに対する抗体力価と心臓血管疾患の間の関連性を捜し始めた。しかし、これらの研究から分かった状況は全く理解できないものであった。抗体は、酸化LDL中の多数の種々のエピトープに対して存在したが、これらのエピトープの構造は分からなかった。したがって、用語「酸化LDL抗体」とは、1種の特定の抗体ではなく種々の抗体の未知の混合物を指す。

10

【 0 0 0 5 】

アテローム性動脈硬化症病変には、免疫担当細胞の活性化および炎症性サイトカインの産生を特徴とする、進行中の炎症があることは十分に確証されている。高血圧症、血中脂質、糖尿病および喫煙のような確立された危険因子はこの炎症反応を促進する可能性が高いが、これが起こる機構は十分には特性決定されておらず、種々の互いに矛盾しない可能性が存在する。酸化された低密度リポタンパク質 (oxLDL) および熱ショックタンパク質 (HSP) をはじめ、この免疫反応を引き起こし得るいくつかの異なる自己抗原が提案されている^{2、3}。アテローム性動脈硬化症における免疫反応の役割に関する入手可能なデータは複雑な関係を示している。この一例として、動物モデルにおけるアテローム発生に影響を及ぼす免疫化がある。HSPを用いる場合には、アテローム性動脈硬化症は増加するが、oxLDLが抗原である場合には減少する^{4、5}。

20

【 0 0 0 6 】

ヒト疾患におけるaOxLDLの役割は複雑であるようである。ヒトでは、これまでに、aOxLDLは、境界域高血圧症、例えば初期心臓血管疾患の男性においてよりも、健全な対照において高いということが実証されている^{7、8}。最近の研究はこの観察結果と一致している⁶。他方、何人かの著者が、aOxLDLはヒト心臓血管疾患 (CVD)、とりわけ後期段階のヒト心臓血管疾患において高まるということを報告している^{2、3、9、10}。一例としては、CVDの極めて高い危険を伴う全身性紅斑性狼瘡 (SLE) および自己免疫疾患がある。CVDの病歴を有するSLE患者のaOxLDLレベルは明らかに上昇していた¹¹。これらのある程度矛盾する結果は、抗原性の相違をもたらす、種々の方法およびLDL酸化段階に応じて変わり得る。また、疾病段階および危険因子プロフィールが抗体レベルと関係していると思われる。

30

【 0 0 0 7 】

酸化された低密度リポタンパク質 (oxLDL) 自体が、T細胞^{12、13}、単球/マクロファージおよび内皮細胞¹⁴⁻¹⁶の活性化をはじめ、多数の炎症誘発性特性を有している。oxLDLは、アテローム性動脈硬化症病変に由来する免疫担当細胞においても炎症を促進する¹⁷。しかし、oxLDLはまた、アテローム性動脈硬化症において見られるように、急性炎症反応を寛解させ、代わりにより軽度の慢性炎症を促進する場合があるということは留意しなければならない¹⁸。興味深いことに、oxLDLの多数の生化学的作用はoxLDL中の血小板活性化因子 (PAF) 様脂質によって引き起こされる¹⁹⁻²¹。

40

【 0 0 0 8 】

ホスホリルコリン (PC) は、血小板活性化因子 PAF (これは PAF 受容体との相互作用に必須である) のような炎症性リン脂質や oxLDL において主要な成分であるだけでなく、肺炎連鎖球菌 (S. Pneumoniae) をはじめ多数の細菌の免疫原性成分としても主要な成分である。さらに、PCはアポトーシス細胞によって発現される^{2、23}。

【 0 0 0 9 】

US5455032では、肺炎連鎖球菌などの感染に対する免疫保護を誘導するためのワクチンにホスホコリン複合体を用いている。バインダー (Binder) らによるマウスにおける肺炎球菌ワクチンに関する最近の研究では²⁴、ワクチン接種はアテローム性動脈硬

50

化症病変形成を低減させるということも分かった。アテローム性動脈硬化症マウスから得た oxLDL に対する多数の自己抗体は、肺炎連鎖球菌をはじめとする一般的な感染性病原体に対して保護する抗体と構造上の同一性を共有しているということも分かった。ヒトではなくマウスにおけるこの研究からは特異性については何の情報も得られず、つまり、IgM 抗ホスホリルコリン抗体は、アテローム性動脈硬化症における保護因子として、対応する IgG 抗体よりも有意により重要である。さらに、ホスホリルコリン複合体は肺炎球菌ワクチンに用いられていない。

【0010】

別の研究では、抗ホスホリルコリン抗体レベルは歯周病を患うヒトでは上昇するということが分かった²⁻⁵。結論は、ホスホリルコリンは歯周細菌叢中の生物に関連する重要な経口抗原であり、抗PC抗体は歯周病の結果として高まるということである。アテローム性動脈硬化症の抗体および可能性ある保護またはアテローム性動脈硬化症の進行に関しては何の情報も示されていない。

10

【0011】

アテローム性動脈硬化症の免疫治療に関する2つの文書(例えば、WO2002080954およびWO0168119)が公開されているが、これらはアポリポタンパク質Bのペプチド断片またはT細胞受容体の鎖に対する抗体のいずれかの使用に基づくものである。リポタンパク質上の酸化特異的エピトープに対するモノクローナル抗体を用いてアテローム斑を検出する方法も記載されている(WO9908109)。これは、被験体サンプルにおいて、抗体、例えばIgMまたはIgG抗体を検出するためにホスホリルコリン複合体を用いる、本発明において提案される方法とは異なっている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第2002/080954号

【非特許文献1】Binder, ChristophJohannes, "Defining innate and adaptive immune mechanisms in the atheroprotective effect of immunization with oxidized low-density lipoproteins" DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL, 2002年, V63 N09-B, p4109, [online] Dialog accession no.01907366, Database accession no. AADAA-13064459

30

【非特許文献2】Binder, ChristophJ, NATURE MEDICINE, 2003年6月, V9 N6, p736-743

【非特許文献3】ROSE N, NATURE MEDICINE, 米国, 2003年6月1日, V9 N6, p641-642

【非特許文献4】BINDER C J, NATURE MEDICINE, 米国, 2002年11月1日, V8 N11, p1218-1226

【非特許文献5】SHAW P X, JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 米国, 2003年6月15日, V170 N12, p6151-6157

【非特許文献6】Binder, ChristophJ, CIRCULATION, 2000年10月31日, V102 N18, Supplement II, p114-115

40

【発明の概要】

【0013】

本発明はホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物の使用および、アテローム性動脈硬化症の治療または予防、例えばアテローム性動脈硬化症の治療、予防またはさらなる進行の低減における、これらの組成物の使用に関する。さらに、本発明はまた、適宜、アジュバントを含む薬剤組成物を製造するための、ホスホリルコリン複合体または前記抗体調製物、例えばモノクローナル抗体の使用に関する。さらに、本発明はまた、虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減に関連している抗体、例えばIgMまたはIgG抗体の有無を診断することに関する。

【0014】

50

本発明の第1の態様は、アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトをはじめとする哺乳類を免疫化および治療するための医薬の製造における、少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物の使用を提供する。この医薬は、アテローム性動脈硬化症に対する免疫原性特性または治療特性を有する免疫化を提供することを目的とするものである。

【0015】

本発明の第2の態様は、アテローム性動脈硬化症またはアテローム性動脈硬化症関連疾患に対して、ヒトをはじめとする哺乳類を免疫化および治療する方法を提供し、この方法は哺乳類に、少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を含む薬剤組成物を投与するステップを含む。この薬剤組成物は、アテローム性動脈硬化症に対する免疫原性特性または治療特性を有する免疫化を提供することを目的とするものである。

【0016】

ホスホリルコリン複合体とは、好ましくは、スパーサーを介して担体と結合しているホスホリルコリン部分を意味する。構造要素ホスホリルコリンはホスホリルコリンの誘導体を含み得る。上述のように、適したホスホリルコリン複合体の例は、US 5,455,032に記載されている。例えば、US 5,455,032は、ホスホリルコリン部分が直鎖アルキルおよび種々の免疫学的担体とのアミド結合によって結合されているホスホリルコリン複合体を提供している。ホスホリルコリン複合体は、例えばヒト血清アルブミン(HSA) - もしくはキーホールリンペット(limpet)ヘモシアニン(KLH) - ホスホリルコリン複合体またはウシ血清アルブミン(BSA) - ホスホリルコリン複合体(例えば、実施例に記載されるようなもの)であり得る。PC - BSA(ホスホリルコリン - ウシ血清アルブミン)はバイオサーチ・テクノロジーズ社(Biosearch Technologies, INC)(米国、カリフォルニア州)から購入できる。HSA - BSAは化学手順、例えば以下の手順によって、結合できる：

【0017】

O - (4 - アミノフェニルホスホリル) - コリン(I)は、チーズブロ(Chesebro), Bによってバイオケミストリー(Biochemistry) 11, (1972) 766頁に記載された手順にしたがって、O - (4 - ニトロフェニル - ホスホリル) - コリン(シグマ(Sigma) N5879)から、触媒として炭の10%パラジウムを用い、1 atmの水素ガスで還元することによって定量的収量で調製できる。

【0018】

(I)は、パディリヤ(Padilla), N. D. らによってジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソツツ(Journal of Immunological Methods) 293(2004) 1~11頁に記載された手順に本質的にしたがって、MESバッファープH4中、EDC(1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド)を用いてHSAとカップリングすることができる。結合されたHSAは、pH7.4の緩衝食塩水に対する透析によって単離できる。

【0019】

担体は、例えば、タンパク質、脂質またはポリマーであり得る。担体は、例えば、実施例に記載されるようなラテックスビーズであり得る。

【0020】

医薬は注射による投与を意図するものであり得る。

【0021】

本発明のさらなる態様は、虚血性心臓血管疾患の治療のための免疫療法または療法のための薬剤組成物の製造における、適宜、アジュバントと組合せた、本発明の前記の態様に関連して定義される、1種以上のホスホリルコリン複合体の使用を提供する。

【0022】

本発明のさらなる態様は、アテローム性動脈硬化症を患っているか、虚血性心臓血管疾

10

20

30

40

50

患を発症する危険に直面している、ヒトなどの哺乳類の予防的または治療的処置方法であって、治療上有効な量の少なくとも1種のホスホリルコリン複合体、または抗体調製物、例えばホスホリルコリン複合体に対して特異性を有するモノクローナル抗体を投与する方法を提供する。

【0023】

本発明はまた、虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減に関連しているホスホリルコリンに対する抗体、例えばIgMまたはIgG抗体の有無を調べる方法に関する。

【0024】

本発明のさらなる態様は、虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減に関連している抗体、例えばIgMまたはIgG抗体の有無を、ホスホリルコリン複合体を用いて診断する方法を提供する。

10

【0025】

したがって、本発明のさらなる態様は、患者の虚血性心臓血管疾患を発症するか、虚血性心臓血管疾患が進行する危険を評価するために、患者の、ホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体のレベルを評価する方法における、ホスホリルコリン複合体の使用を提供する。

【0026】

ホスホリルコリン複合体は、上記に記載されている。ホスホリルコリンはスパーサーを介して担体と結合できる。担体はタンパク質であり得、これはKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)またはヒト血清アルブミン(HSA)であり得る。担体はラテックス

20

【0027】

患者の、ホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体のレベルは、免疫分析評価を用いて評価できる。適した免疫分析評価の例を以下に記載するが、どんな場合も当業者には明らかであろう。

【0028】

oxLDLまたはMD-LDLと反応性の抗体を測定することと、ならびにホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体を測定することが望ましい場合がある。あるいはまたはさらに、(実施例に論じられるように)HSP70、HDL、TNFおよび/またはHSP60のレベルを測定することと、ならびにホスホリルコリン複合体に反応性の抗体、例えばIgMまたはIgG抗体を測定することが望ましい場合がある。

30

【図面の簡単な説明】

【0029】

[図1a] 2GPI、PSおよびCLによる、抗体(IgM)の、PCアルブミンでコーティングされたELISAプレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原によるPCアルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。aPCの特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価を実施した。結果は平均値±SDとして示されている。

[図1b] 2GPI、PSおよびCLによる、抗体(IgG)の、PCアルブミンでコーティングされたELISAプレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原によるPCアルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。aPCの特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価を実施した。結果は平均値±SDとして示されている。

40

[図2a] oxLDLおよびMDA-LDLによる、抗体(IgM)の、PCアルブミンでコーティングされたELISAプレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原によるPCアルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。aPCの特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価を実施した。結果は平均値±SDとして示されている。

[図2b] oxLDLおよびMDA-LDLによる、抗体(IgG)の、PCアルブ

50

ミンでコーティングされた E L I S A プレートとの結合の阻害を示す図である。種々の抗原による P C アルブミンコーティングされたプレートとの結合の阻害。a P C の特異性を調べるために、実験の項に記載されたように競合分析評価を実施した。結果は平均値 ± S D として示されている。

[図 3] I G I V から抽出した a P C による、マクロファージにおける o x L D L 取り込みに対する作用を示す図である。

本発明者らは 2 つのグループを試験した。： 1 つは、o x L D L とマクロファージを共にし、もう 1 つは、o x L D L とマクロファージを共にし、+ I G I V から抽出した a P C とともにプレインキュベーションした。

マクロファージ + o x L D L (全 1 0 7 細胞) : 弱い染色 3 7 / 1 0 7 = 3 4 . 5 8 %
、強い染色 1 0 / 1 0 7 = 9 . 3 5 % 全染色陽性 4 7 / 1 0 7 = 4 3 . 9 3 %

マクロファージ + D i l - o x L D L + a P C 群 (1 5 6 細胞を調査) : 弱い染色 3 7 / 1 5 6 = 2 3 . 7 2 %、強い染色 2 / 1 5 6 = 1 . 2 8 % 全染色陽性 3 9 / 1 5 6 = 2 5 %。

[図 3 A] D i l 標識 o x L D L での染色を示す図である。

[図 3 B] 未標識 o x L D L での染色を示す図である。

[図 4] 高抗リン脂質抗体 (a P L) 力価血清を、ヒトのプールされた免疫グロブリンガンマガード (Gammagard) (登録商標) とともにプレインキュベーションしたことのアネキシン V とヒト臍帯内皮細胞 (H U V E C) との結合に対する効果 : 2 4 時間培養後のフローサイトメトリー解析を示す図である。

I V I G を以下の血清とともに プレインキュベートした	アネキシン V 結合の蛍光強度中央値 (M F I)
0 m g / m l	6 4 9
2 . 5 m g / m l	9 1 3
5 m g / m l	1 2 6 9
1 0 m g / m l	1 3 8 2

[図 5] 内皮細胞における I C A M 誘導に対する a P C の作用を示す図である。内皮細胞の培養物に 1 μ g / m l の P A F を加え、a P C I g M とともにプレインキュベーションを行うか行わなかった。I C A M - 1 の発現を、F A C S c a n によって調べた。緑色の線は P A F 作用を表し、赤色は P A F + a P C I g M を表し、黒色は対照を表す。データは、a P C I g M を添加した場合のヒストグラムの左への移動を明確に示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 0 】

以下に開示する実施例は、単に本発明を例示する目的で提供されるものであって、添付の特許請求の範囲に概説される範囲の何らかの制限と考えるてはならない。本明細書において記載された文書は、参照により本明細書に組込まれる。

【 0 0 3 1 】

虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減と関連している、ホスホリルコリンに対する I g M 抗体の有無 (またはレベル) を調べる方法の一例を記載する。当技術分野で公知の他の方法も使用できる。同様の方法を用いてホスホリルコリンに対する I g G 抗体の有無 (またはレベル) を調べることができる。

【 0 0 3 2 】

ホスホリルコリンに対する I g M 抗体の有無を調べる方法

P C - B S A に対する I g M 抗体を、酵素結合免疫測定法によって調べた。

【0033】

マイクロタイタープレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に入れた PC - BSA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 例えばバイオサーチ・テクノロジー社 (Biosearch Technologies, INC) (米国、カリフォルニア州) 製) でコーティングした。

【0034】

PBS で洗浄した後、2% BSA 溶液でプレートをブロッキングした。血清サンプルは 0.2% BSA - PBS で希釈した (1:30)。プレートを 40 で一晩インキュベートし、洗浄した。アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgM (サンプルバッファーで 1:7000 希釈したものを) 100 μl / ウェル (well) で加え、40 で一晩インキュベートした。洗浄後、アルカリホスファターゼ基質を加え、プレートを室温、暗所で 60 分間インキュベートすることによって色を発現させた。吸光度は分光光度計において 405 nm で読み取った。

10

【0035】

ホスホリルコリンに対して種々の担体およびスパーサーを試験した。例示した担体はこれらに制限するものではない。その他のタンパク質、脂質またはポリマー、例えば当技術分野で公知であるラテックスビーズなどのその他の担体も使用できる。担体は、上述のように US 5,455,032 に開示されている。

【0036】

本発明の方法によって検出される IgM または IgG 抗体はまた、PC が露出している PC 含有化合物中、例えばリゾホスファチジルコリン (リゾ PC; 例えば、キム (Kim) ら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、2002 年 9 月 2 日、196 (5)、655 ~ 65 頁参照) 中に存在するホスホリルコリン (PC) と結合できる。したがって、本発明の方法は、リゾホスファチジルコリンと結合する IgM または IgG 抗体を検出できる。

20

【0037】

ホスホリルコリン複合体の合成および薬剤組成物の調製

ラテックスビーズ (0.20 μm または 0.81 μm) を PBS に懸濁し、ホスホリルコリン - BSA の 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液と一晩混合した。次いで、このビーズを遠心分離し、バッファーで数回洗浄し、BSA の 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液でブロッキングした。さらに洗浄を反復した後、ビーズを適したバッファーで適した濃度に再懸濁し、使用まで冷蔵保存した。

30

【0038】

リンカーアームを有するホスホリルコリンはまた、ジアゾフェニル基を介して K L H (キーホールリンペットヘモシアニン) に結合できる。チーズボロ (Chesebro), B およびメッツガー (Metzger), H, (1972) バイオケミストリー (Biochemistry) 11: 776 頁にしたがい、PC の p - ニトロフェニル - 6 - (O - ホスホコリン) ヒドロキシヘキサノエート誘導体を合成できることがより好ましい。p - ニトロフェニル - 6 - (O - ホスホコリン) ヒドロキシヘキサノエートは、これを K L H に添加する直前に乾燥アセトニトリルに溶解した (100 mg / ml)。誘導体および K L H を 4 で一晩混合し、次いで、結合していないスパーサーと脱離基である p - ニトロフェニレート透析して除去した。

40

【0039】

適したバッファーに懸濁した、調製したホスホリルコリン複合体の注射溶液は、免疫化に直接使用できる。

【0040】

ホスホリルコリン複合体での免疫化

200 μg [p - ニトロフェニル - 6 - (O - ホスホコリン) ヒドロキシヘキサノエート - K L H] 腹腔内で免疫化した後に BALB / c マウスから得た血漿において、提案された免疫分析評価法を用い、ホスホリルコリンを認識する高力価の IgM 抗体を調べた。

【0041】

50

ホスホリルコリン複合体に対するモノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のいずれかの標準的な方法を用いて作製できる。例えば、「ブリルス (Briles) DE、フォアマン (Forman) C、ヒュダック (Hudak) S、クラフリン (Clafilin) J L. T 15 インディオタイプ抗ホスホリルコリン抗体はストレプトコッカス肺炎に対し最適に保護する (Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idotype are optimally protective against Streptococcus pneumoniae)。ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン (Journal of Experimental Medicine)、1982、156、1177~85頁」または「モノクローナル抗体に結合している T 15 PC は、IgM から IgG に変換されたときに特異性を維持する (T15 PC binding monoclonal antibodies retain specificity when they switch from IgM to IgG)。スピラ、ギャド (Spira, Gad)、アギラ、ヘクター (Aguila, Hector) L、シャーフ、マシュー (Scharff, Matthew) D、テクニオン - イスラエル工科大学、医学部 (Fac. Med., Technion-Israel Inst. Technol.)、イスラエル、ハイファ、ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology) (1988)、140 (8)、2675~80頁。

【0042】

ホスホリルコリン複合体に対するその他の抗体は当業者に周知の方法を用いて調製できる。例えば、以下に記載のように、例えば、ホスホリルコリン複合体を用いるアフィニティー精製によって、ヒト免疫グロブリン製剤の a PC 活性を有するサブフラクションを調製できる。静脈内免疫グロブリン投与製剤 (例えば、IGIV; バクスター (Baxter) 他) は、市販されている IgG の高度に精製された製剤であり、抗体産生がないか、抗体産生レベルが極めて低い患者の治療に用いられている。免疫グロブリン製剤としては、以下の製造業者から入手できるものが挙げられる; バクスター (Baxter) (米国) 例えばガンマガード (Gammagard) (登録商標)、イシベン (Isiven) (イタリア、アンティモナプレス (Antimo Naples))、オムリックス (Omrix) (イスラエル、テルアショメル (Tel-Hashomer))、マイルス (Miles) (生化学製品部門 (Biological Products Division)、コネチカット州、ウェストヘブン)、スクラボ (Sclavo) (イタリア、ルッカ)、サンド (Sandoz) (スイス、パーゼル、ノバウティス (Novartis))、例えばサンドグロブリン (Sandoglobulin) (登録商標)、ピオテスト・ダイアグノスティック社 (Biotest Diagnostic Corporation) (ニュージャージー州、ダビール (Deville))。免疫グロブリン製剤の例としては、ガンマガード (Gammagard) S/D (登録商標)、ガンマー (Gamma) IV (登録商標)、ガンマー (Gamma) - PIV (登録商標)、ガムイミュン (Gammimmune) N (登録商標)、イベガム (Iveegam) (登録商標)、パングロブリン (Panglobulin) (登録商標)、ポリガム (Polygam) S/D (登録商標)、サンドグロブリン (Sandoglobulin) (登録商標)、ベノグロブリン (Venoglobulin) (登録商標) がある。免疫グロブリン製剤は、通常、数種の IgM ならびに IgG を含む。ガンマーガード (Gammagard) (登録商標) 中には微量の IgM が存在する。ペンタグロビン (ピオテスト (Biotest)) は、SARS の治療に用いられている濃縮 IgM 製剤である。a PC 活性を有するサブフラクションは IgG と IgM の双方を含む場合もあり、または主に IgG を含むよう選択することもでき (例えば、ガンマーガード (Gammagard) (登録商標) などの IgG が豊富な製剤で出発することによって、および/または IgG について選択することによって)、もしくは主に IgM を含むよう選択することもできる (例えば、ペンタグロビンなどの IgM が豊富な製剤で出発することによって、および/または IgM について選択することによって)。

【0043】

ホスホリルコリン複合体に対して特異性を有する抗体調製物は、結合していないホスホリルコリンと結合し、また、PC が露出している PC 含有化合物中に、例えば、リゾホスファチジルコリン (リゾ PC; 例えば、キム (Kim) ら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン (Journal of Experimental Medicine)、2002年9月2日、1

10

20

30

40

50

96(5)、655～65頁参照)中に存在するホスホリルコリン(PC)とも結合し得る。したがって、ホスホリルコリン複合体に対して特異性を有する抗体調製物は、また、リゾホスファチジルコリンと結合し得る。

【0044】

アテローム性動脈硬化症の被験体におけるIgM免疫グロブリンレベル

高血圧症の被験体(拡張期血圧>95mmHg)において、ホスホリルコリンに対するIgM自己抗体レベルを、ベースラインおよび4年後にアテローム性動脈硬化症の危険因子の相関研究において調べた。結果を以下に要約する。

【0045】

登録時に77人の被験体(35%)で、4年後の追跡調査では84人の被験体(38%)で頸動脈プラークが検出された。この研究には全部で218人のヒト被験体があった。追跡調査時の内膜-中膜肥厚(IMT)の増加は、登録の時点でPCに対するIgMの高血清レベルを有する被験体(75または90パーセントイル)ではあまり広まっていなかった。IMTが増加した個体とIMTが低下した個体間のIgM抗ホスホリルコリン抗体レベルの平均値間には有意な相違がある(638.8±219.6対734.8±266.9、p=.004)。

10

【0046】

PCに対するIgM自己抗体とIMTの変化の間関係は、年齢、喫煙習慣、アテノロールまたはラシジピン(Lacidipine)での治療および血中脂質とは無関係であった。IgM自己抗体はまたIgG値とも無関係であった。

20

【0047】

したがって、本発明の一実施形態は、アテローム性動脈硬化症の治療または予防に用いられる薬剤組成物の調製のために、ホスホリルコリン複合体を使用することである。複合体は、タンパク質またはポリマーに結合したホスホリルコリンであり得る。薬剤組成物は注射によって与えられることが好ましい。

【0048】

能動免疫化という提案される方法は、自己抗体力価を調節し、これが順にアテローム性動脈硬化症の発症に対して正の作用を有することとなる。

【0049】

本発明のもう1つの実施形態は、アテローム性動脈硬化症の治療または予防に用いられる薬剤組成物の調製のために、ホスホリルコリン複合体を認識する抗体調製物、例えば、モノクローナル抗体を使用することである。モノクローナル抗体は当技術分野で公知の方法を用いて作製できる。

30

【0050】

本発明のさらなる実施形態は、ホスホリルコリン複合体を用いて、ホスホリルコリンに対する抗体、例えばIgMまたはIgG抗体の有無を診断する方法を提供することであり、この因子は虚血性心臓血管疾患を発症する危険の増減と関連している。好ましい方法は免疫分析評価である。この方法は、患者の、虚血性心臓血管疾患を発症するか、虚血性心臓血管疾患が進行する危険の評価に使用できる。

【実施例】

40

【0051】

被験体

血清サンプルは、226人の確立した高血圧症の被験体(拡張期血圧>95mmHg)から得、その後、それらをアテローム性動脈硬化症に対する欧州のラシジピン研究(the European Lacidipine Study on Atherosclerosis)(ELSA)²⁵、²⁶のスウェーデン成分に登録した。サンプルは、測定されるパラメーターに対する治療の作用を最小にするために、投薬を全くしない4週間の休薬期間の後に集めた。血圧、コレステロールおよびトリグリセリドレベルを先に記載された通りに調べた²⁵、²⁶。その後、115人の被験体を遮断薬アテノロールでの処置に割り当て、111人の被験体をカルシウムアンタゴニストラシジピンでの処置に割り当てた。この研究はカロリンスカ病院(Karolinsk

50

a Hospital) の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言にしたがって実施した。すべての被験体にはインフォームドコンセントを与えた。

【0052】

頸動脈超音波

頸動脈超音波測定を実施し、他で詳細に記載された通りに分析した²⁵、²⁶。ベースラインおよび4年後追跡調査で全部で218人の患者が有効な超音波測定値を有していた。簡単に言えば、8.0MHz環状アレイトランスデューサーを用いるBio-sound 2000 IIAデュプレクス(duplex)スキャナーで、左右の頸動脈を調べた。奥の壁において、内膜-中膜(I-M)肥厚を、内腔-内膜エコーの前縁と中膜-外膜エコーの前縁間の距離として測定した。アテローム性動脈硬化症の代用指標としての結果判定は、4年後追跡調査での末梢側総頸動脈と頸動脈両側分岐部中の4箇所奥の壁の平均最大内膜-中膜肥厚(IMT)の変化(CBMmax)とした。研究に登録した時点でのPCに対する抗体レベルと、4年後追跡調査時のIMTの増減の間の関連を評価した。

10

【0053】

試薬

ポリソープ(Polysorp)F96マイクロタイターイムノプレートはヌンク(Nunc)(デンマーク、ロスキレ)から購入し、PC-BSA(ホスホリルコリン-ウシ血清アルブミン)はバイオサーチ・テクノロジーズ社(Biosearch Technologies, INC)(米国)から購入した。

【0054】

ウシ血清アルブミン(BSA)、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(r鎖特異的)、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgM(u鎖特異的)、PNPP(アルカリホスファターゼ基質)はシグマ(Sigma)(米国、ミズーリ州、セントルイス)から入手した。カルジオリピン(CL)はAVANTT(米国)から購入し、₂糖タンパク質(₂GP1)はカルバイオケム(Calbiochem)(米国)から入手した。

20

【0055】

総IgGおよびIgMレベルは、先に記載されているような慣例の技術によって求めた⁶。

【0056】

CRPは、血清において、粒子増感された免疫比濁分析(ベイリング・ネフェロメーター・アナライザー(Behring Nephelometer Analyzer)、BN II(デイドベイリング社(Dade Behring GmbH)、ドイツ、マールブルク))を用いる高感度法によって分析し、アンティア(antir)分析評価変動<4%であった。

30

【0057】

PC、oxLDLおよびMDA-LDLに対する自己抗体の測定

PC-BSAに対するIgGおよびIgM抗体を、酵素結合免疫測定法(ELISA)によって調べた。17人の抗リン脂質症候群の患者から得たプールした血清を、内部標準として使い、プレート毎に試験した。抗体結合のプラトーは10μg/mlという抗原濃度で到達した。したがって、F96マイクロタイターポリソープ(polysorp)プレートを、PBS中PC-BSA(10μg/ml)50μgウェルでコーティングした。コーティングしたプレートを4で一晚インキュベートした。PBSで5回洗浄した後、2%BSA-PBSを用い、室温で2時間プレートをブロッキングし、上記のように洗浄した。血清サンプルは0.2%BSA-PBSで希釈(1:30)し、50μl/ウェルで加えた。

40

【0058】

LDLは、記載されたように⁶、健常なドナーの血漿から連続分離超遠心によって単離し、銅イオンの使用によって酸化させるか(OxLDL)、MDAを用いて誘導体化した(MDA-LDL)。

【0059】

OxLDLおよびMDA-LDLは、本質的には記載されたように⁶ELISAによ

50

て測定した。OxLDLまたはMDA-LDLはコーティングバッファー（炭酸-重炭酸バッファー50mM pH9.7）で2μg/mlに希釈し、100μl/ウェルを用いてELISAプレート（コスター（Costar）2581）をコーティングした。このプレートを4℃で一晩維持し、PBSで4回洗浄し、次いで、PBS中20%成体ウシ血清（20%ABS-PBS）を用い、室温で2時間ブロックした。次いで、それらを、20%ABS-PBSで1:30希釈した100μlの血清とともに4℃で一晩インキュベートした。

【0060】

プレートを4℃で一晩インキュベートし、上記のように洗浄した。アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG（サンプルバッファーで1:9000希釈したもの）およびアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgM（サンプルバッファーで1:7000希釈したもの）を、100μl/ウェルに加え、4℃で一晩インキュベートした。5回洗浄した後、アルカリホスファターゼ基質（PNPP）を100μl/ウェルに加え、プレートを室温、暗所で60分間インキュベートすることによって色を発現させた。プレートは、ELISAマルチスキャンプラススペクトロフォトメーター（Multiskan Plus spectrophotometer）において405nmで読み取った。すべてのサンプルを単一の分析評価したところ、変動係数は10~15%より小さかった。

【0061】

抗ホスホリルコリン-BSA抗体の特異性

抗ホスホリルコリン-BSAの特異性を調べるために、プールした高力価血清を使用することによって吸収分析評価を実施した。PC-BSAとの最大結合の50%を生じる希釈で、高力価血清を、種々の濃度のPC-BSAとともにプレインキュベートした。ボルテックス処理した後、試験管を40℃で一晩インキュベートし、13000rpmで30分間（40℃）遠心分離した。上清を、記載したようにPC-BSAとの抗体結合について調べた。阻害のパーセンテージは以下のように算出した：

【0062】

阻害パーセント = (競合物のないOD - 競合物のあるOD) × 100 / 競合物のないOD

【0063】

統計分析

抗ホスホリルコリンレベルを75パーセントイルと90パーセントイルで二分した。示したように、ロジスティック回帰分析およびオッズ比（OR）の算出および95%信頼区間（CI）、またはスピアマン相関を用いる比較を用いて、IMTの増加（はいまたはいいえ）を評価することによって、抗ホスホリルコリン（またはその他の抗体）と4年間にわたるアテローム性動脈硬化症の進行の間の関連を調べた。年齢、喫煙習慣、血清コレステロール、血清トリグリセリドおよび抗高血圧治療の様式（ラシジピン、アテノロール）をはじめ、可能性ある交絡因子について調製を行った。両側p値<0.05を有意と考えた。

【0064】

結果

研究に登録した時点での被験体の基本特性は他で詳細に記載されており（ポックレー（Pockley）ら（2003）ハイパーテンション（Hypertension）42、235~238頁）、表1に示す。

【0065】

競合研究は、IgMおよびIgGサブクラスのアPCは、PC-BSAとともにプレインキュベーションすることによって競合されたが、カルジオリピンは弱い競合能しか有しておらず、ホスファチジルセリンは競合能を有していなかったことを示す（図1a、1b）。2-糖タンパク質IはPC-BSAとのIgG結合について、ある程度まで競合したが、IgMについてはそれほどではなかった（図1a、1b）。PC-BSAは、調べた他の抗原とは競合して結合する低い能力しか有していなかった（データは示していない）。OxLDLおよびMDA-LDLはPC-BSAとのIgM aPCの結合に

10

20

30

40

50

競合し得、また、I G G a P C の結合にも同程度までではないが競合し得た (図 2 a 、 2 b) 。

【 0 0 6 6 】

追跡調査時の I M T の増加は、登録の時点で P C (7 5 または 9 0 パーセントイル) 、 o x L D L および M D A - L D L (9 0 パーセントイル) に対する I g M の血清レベルが高い被験体ではあまり広まっていなかったが、C R P は I M T 変化と関連がなかった (表 2) 。

【 0 0 6 7 】

ロジスティック回帰分析により、P C 、 o x L D L および M D A - L D L に対する I g M 自己抗体と I M T の変化の関係は、年齢、喫煙習慣、アテノロールまたはラジピンでの治療および血中脂質とは無関係であったということが示された。a P C I g M はまた、7 5 パーセントイルと 9 0 パーセントイルの双方で I M T の変化と有意に関連していたが、I g M サブクラスの a O x L D L および a M D A - L D L は、9 0 パーセントイルでしか有意性を示さなかった (表 3 a ~ d) 。I g M 自己抗体は I g G 値とも無関係である (データは示していない) 。さらに、全 I g G および I g M レベルは I M T 測定値または変化と関連していなかった (データは示していない) 。

10

【 0 0 6 8 】

I M T が増加した被験体では P C に対する I g G 自己抗体は傾向的に低かったが、この相違は統計的な有意性には達しなかった。 (表 2) 。

【 0 0 6 9 】

男性と女性の a P C 、 a M D A - L D L および a O x L D L の I g M サブクラス間には著しい相違があり、男性においてよりも女性において有意に高かった (p ' s < 0 . 0 5) 。対照的に、これらの自己抗体の I g G レベルには男性と女性の間で相違はなかった。さらに、女性はベースラインおよび追跡調査時のブラークの発生が有意に低かった (p < 0 . 0 5) 。

20

【 0 0 7 0 】

a P C I g M レベルは I M T の増加と負に相関しており ($R h o$ 0 . 1 8 、 $p = 0 . 0 0 6$) 、対照的に 2 種の他の保護因子、H D L および H S P 7 0 は、連続測定時の I M T 変化と相関していなかった (データは示していない) 。a P C I g M とは異なり、これらの測定では a O x L D L および a M D A - L D L はこれらの有意性に到達しなかった (データは示していない) 。

30

【 0 0 7 1 】

a P C I g M レベルと a O C L D L I g M ($R h o$ 0 . 7 4 、 $p < 0 . 0 0 1$) および a M D A - L D L I g M ($r h o$ 0 . 5 1 、 $p < 0 . 0 0 1$) との間には有意な関連があった。同様に a P C は、H S P 6 0 ($R h o$ 0 . 2 8 、 $p < 0 . 0 0 1$) 、H S P 7 0 ($R h o$ 0 . 3 5 、 $p < 0 . 0 0 1$) と相関があり、これらは本発明者らがこのコホートにおけるヒトアテローム性動脈硬化症の新規保護因子として最近記載し (ポックレー (Pockley) ら (2 0 0 3) 前掲) 、また H D L と相関があった ($R h o$ 0 . 2 3 、 $p < 0 . 0 1$) 。a P C I g M 、 a O x L D L I g M または a O x L D L 、 M D A - L D L および L D L 、 C R P またはトリグリセリド間には関連はなかった (データは示していない) 。

40

【 0 0 7 2 】

年齢、総コレステロール、トリグリセリド、喫煙および治療について制御しつつ、男性および女性について別個のロジスティック回帰分析を行った場合、I g M a P C はそれぞれ、女性においては 9 0 パーセントイルを調べた場合にのみ有意な保護作用を示し ($E X P (B) = . 1 7$ 、 $9 5 \% C I = 0 . 0 5 \sim . 6 8$; $p = 0 . 0 1$) 、男性では 7 5 パーセントイルを調べた場合にのみ有意な保護効果を示した (それぞれ、 $E X P (B) = . 1 8$ 、 $9 5 \% C I = 0 . 0 4 \sim . 7 4$; $p = 0 . 0 1$) 。

【 0 0 7 3 】

M D A - L D L および o x L D L に対する I g M は、女性の値のみが独立に統計的有意

50

性に達したのでこの点において異なっている。したがって、年齢、総コレステロール、トリグリセリド、喫煙および治療について制御しつつ、男性および女性について別個のロジスティック回帰分析を行った場合に、MDA-LDLに対するIgMおよびoxLDLに対するIgMは女性では有意な保護作用を示したが（それぞれ、 $EXP(B) = 1.7$ 、 $95\%CI = .05 \sim .68$ 、 $p = 0.01$ および $EXP(B) = .18$ 、 $95\%CI = .04 \sim .74$ 、 $p = 0.01$ ）、男性の間では作用は有意性に達せず（それぞれ、 $EXP(B) = .60$ 、 $95\%CI = .15 \sim 2.2$ 、 $p = 0.44$ および $EXP(B) = .39$ 、 $95\%CI = .10 \sim 1.5$ 、 $p = 0.17$ ）、このことはoxLDLに対する、およびMDA-LDLに対する高いIgM力価は女性の間で特異的に保護的であり得るということを示す。

【0074】

【表1】

登録時の研究群の基本特性。結果は平均（SD）またはパーセンテージ（%）および脂質についてはmg/dLとして示されている。

	トータル (N=226)	アテノロール (N=115)	ラシジピン (N=111)
年齢（歳）	57.7(7.8)	57.6(7.6)	57.7(7.9)
性別（男性%）	50	46	53
BMI	26.7(3.7)	26.3(3.3)	27.1(3.9)
総コレステロール	232.4(37.8)	233.5(38.1)	231.4(37.4)
HDL	55.6(27.6)	56.5(25.8)	54.7(27.6)
LDL	149.4(37.8)	149.7(37.1)	149.2(38.6)
トリグリセリド	131.6(58.2)	128.6(57.0)	134.7(59.5)

【0075】

10

20

30

【表 2】

ホスホリルコリン (PC) に対する I g G および I g M 自己抗体のベースラインレベル
 についての、I M T の変化の未調製予測

変数	オッズ比	(95%CI) 下側	上側	P
	75 パーセントイル			
aPC (IgG)	.60	.32	1.1	.10
aPC (IgM)	.46	.25	.85	.01
aOxLDL (IgG)	1.2	.64	2.3	.57
aOxLDL (IgM)	.77	.41	1.4	.40
aMDA-LDL (IgG)	.80	.43	1.5	.48
aMDA-LDL (IgM)	.67	.36	1.2	.18
C-反応性タンパク質	.80	.43	1.5	.46
	90 パーセントイル			
aPC (IgG)	.60	.25	1.4	.24
aPC (IgM)	.36	.15	0.87	.024
aOxLDL (IgG)	.94	.38	2.31	.90
aOxLDL (IgM)	.27	.11	.69	.006
aMDA-LDL (IgG)	.63	.26	1.5	.30
aMDA-LDL (IgM)	.27	.11	.69	.006
C-反応性タンパク質	.60	.24	1.4	.24

10

20

30

【 0 0 7 6 】

【表 3 a】

確立された高血圧症の被験体における、ベースラインの a P C I g M 自己抗体の 75 パーセントイルを用いる 4 年間にわたる M T の変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 E x p (B)	P	9 5 % C I	
				下側	上側
喫煙	-0.1	.99	.95	.66	1.5
性別	-.05	.95	.87	.54	1.4
総コレステロール	.003	1.0	.45	.99	1.0
血漿トリグリセリド	-.001	.99	.63	.99	1.0
年齢 (歳)	.01	1.0	.59	.97	1.0
治療 (A/L)	-.23	.79	.40	.45	1.4
A P C I g M	-1.0	.37	.0027	.15	.89

10

20

【 0 0 7 7 】

【表 3 b】

確立した高血圧症の被験体における、a P C I g M 自己抗体の 90 パーセントイルを用いる 4 年間にわたる I M T の変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 E x p (B)	P	9 5 % C I	
				下側	上側
喫煙	-0.2	.97	.90	.65	1.5
性別	-.005	1.0	.98	.56	1.8
総コレステロール	.003	1.0	.42	.99	1.0
血漿トリグリセリド	-.001	0.99	.67	.99	1.0
年齢 (歳)	.003	1.0	.87	.97	1.0
治療 (A/L)	-.22	.80	.43	.46	1.4
a P C I g M	-.77	.46	.017	.24	.87

30

40

【 0 0 7 8 】

【表 3 c】

確立された高血圧症の被験体における、OxLDLに対するIgM自己抗体およびその他の危険因子に関して90パーセンタイルを用いる4年間にわたるIMTの変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 Exp (B)	P	95%CI	
				下側	上側
喫煙	-.01	.99	.95	.66	1.5
性別	.001	1.1	.98	.56	1.8
総コレステロール	.001	1.0	.72	.99	1.1
血漿トリグリセリド	-.001	1.0	.71	.99	1.0
年齢 (歳)	.01	1.0	.60	.97	1.1
治療 (A/L)	-.28	.77	.35	.44	1.3
aOxLDL IgM	-1.3	.26	.008	.11	.72

10

20

【0079】

【表 3 d】

確立された高血圧症の被験体における、MDA-LDLに対するIgM自己抗体およびその他の危険因子に関して90パーセンタイルを用いる4年間にわたるIMTの変化の予測

モデルにおける変数	係数 (B)	推定オッズ比 Exp (B)	P	95%CI	
				下側	上側
喫煙	-.07	0.93	.73	.62	1.4
性別	-0.01	.99	.99	.56	1.7
総コレステロール	0.001	1.0	.78	.99	1.0
血漿トリグリセリド	-.001	.99	.74	.99	1.1
年齢 (歳)	0.01	1.0	.54	.97	1.0
治療 (A/L)	-.27	.76	.34	.44	1.3
aMDM-LDL IgM	-1.1	.31	.01	.12	.79

30

40

【0080】

参照文献

1. フロストガード (Frostegard) J、ウルフグレン (Ulfgren) A K、ニーベリ (Nyberg) P、ヘディン (Hedin) U、スウェーデンボリ (Swedenborg) J、アンダーソン (Andersson) U、ハンソン (Hansson) G K. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. アテロスクレロシス (Atherosclerosis) 1999、145、33~43頁。

50

2 . バインダー (Binder) C J、チャン (Chang) M K、ショー (Shaw) P X、ミラー (Miller) Y I、ハートビグセン (Hartvigsen) K、デワン (Dewan) A、ウィツタム (Witztum) J L。Innate and acquired

immunity in atherogenesis . ネイチャー・メディシン (Nature Medicine) 2 0 0 2、8、1 2 1 8 ~ 2 6 頁。

3 . フロストガード (Frostegard) J。Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease . オートイミュニティー・レビューズ (Autoimmunity Reviews) 2 0 0 2、1、2 3 3 ~ 7 頁。

4 . パリンスキ (Palinski) W、ミラー (Miller) E、ウィツタム (Witztum) J L。Immunization of low

density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis . プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス・オブ・ユエスエー (Proceedings of National Academic Science of USA) 1 9 9 5、9 2、8 2 1 ~ 5 頁。

5 . スー (Xu) Q、ディートリッヒ (Dietrich) H、ステイナー (Steiner) H J、ゴーン (Gown) A M、シェル (Schoel) B、ミクツ (Mikuz) G、カウフィナン (Kaufmann) S H、ウィック (Wick) G。Induction of

arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. アルテリオスクレロシス・アンド・トロンボシス (Arteriosclerosis and Thrombosis)、1 9 9 2、1 2、7 8 9 ~ 9 9 頁。

6 . ウー (Wu) R、デ・フェア (de Faire) U、レムン (Lemne) C、ウィツタム (Witztum) J L、フロストガード (Frostegard) J。Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. ハイパーテンション (Hypertension)、1 9 9 9、3 3、5 3 ~ 9 頁。

7 . ヒュルテ (Hulthe) J、ウィクランド (Wiklund) O、ハート - カメジヨ (Hurt-Camejo) E、ボンジャーズ (Bondjers) G。Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules, and phospholipase A(2). アルテリオスクレロシス・トロンボシス・パスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology)、2 0 0 1、2 1、2 6 9 ~ 7 4 頁。

8 . カルボネン (Karvonen) J、パイバンサロ (Paivansalo) M、ケサニエミ (Kesaniemi) Y A、ホルコ (Horkko) S。Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. サーキュレーション (Circulation) 2 0 0 3、1 0 8、2 1 0 7 ~ 1 2 頁。

9 . ベルグマーク (Bergmark) C、ウー (Wu) R、デ・フェア (de Faire) U、レフバート (Lefvert) A K、スウェーデンボリ (Swedenborg) J。Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. アルテリオスクレロシス・トロンボシス・パスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology)、1 9 9 5、1 5、4 4 1 ~ 5 頁。

10

20

30

40

10. サロネン (Salonen) J T、イラーヘルツアラ (Ylä-Herttuala) S、ヤマモト R、バトラー (Butler) S、コルペラ (Korpela) H、サロネン (Salonen) R、ニソネン (Nyyssönen) K、パリンスキ (Palinski) W、ウィツタム (Witztum) J L. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *ランセット (Lancet)*、1992、339、883～887頁。 10
11. スベナングソン (Svenungsson) E、ジェンセン - ウルスタド (Jensen-Urstad) K、ヘイルンバーガー (Heilnburger) M、シルベイラ (Silveira) A、ハムステン (Hamsten) A、デ・フェア (de Faire) U、ウィツタム (Witztum) J L、フロストガード (Frostegard) J. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *サーキュレーション (Circulation)*、2001、104、1887～93頁。
12. フロストガード (Frostegard) J、ウー (Wu) R、ギスコンベ (Giscombe) R、ホルム (Holm) G、レフバート (Lefvert) A K、ニルソン (Nilsson) J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. *アルテリオスクレロシス・アンド・トロンボシス (Arteriosclerosis and Thrombosis)* 1992、12、461～7頁。 20
13. シュテメ (Stemme) S、ファーバー (Faber) B、ホルム (Holm) J、ウィクランド (Wiklund) O、ウィツタム (Witztum) J L、ハンソン (Hansson) G K. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス・オブ・ユーエスエー (Proceedings of National Academic Science of USA)* 1995、92、3893～7頁。
14. ベルリナー (Berliner) J A、テリト (Territo) M C、セバニアン (Sevanian) A、ラミン (Ramin) S、キム (Kim) J A、バムシャド (Bamshad) B、エスターソン (Esterson) M、フォーゲルマン (Fogelman) A M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)* 1990、85、1260～6頁。 30
15. フロストガード (Frostegard) J、ニルソン (Nilsson) J、ヘゲルストランド (Haegerstrand) A、ハムステン (Hamsten) A、ウィグゼル (Wigzell) H、ギドランド (Gidlund) M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス・オブ・ユーエスエー (Proceedings of National Academic Science of USA)* 1990、87、904～8頁。 40
16. フロストガード (Frostegard) J、ヘゲルストランド (Haegerstrand) A、ギドランド (Gidlund) M、ニルソン (Nilsson) J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *アテロクスレロシス (Atherosclerosis)* 1991、90、119～26頁。
17. フェイ (Fei) G Z、ファン (Huang) Y H、スウェーデンボリ (Swedenborg) J、フロストガード (Frostegard) J. Oxidised LDL modulates immune-activation by an IL-12 dependent mechanism. *アテロクスレロシス (Atherosclerosis)* 2003、169、77～85頁。 50

18. ボチコフ (Bochkov) V N、カドル (Kadl) A、ヒューバー (Huber) J、グルバー (Gruber) F、バインダー (Binder) B R、レイティンガー (Leitinger) N。Protective role of

phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *ネイチャー* 2002、419、77~81頁。

19. フロストガード (Frostegard) J、ファン (Huang) Y H、ロネリッド (Ronnellid) J、シェーファー - エリンダー (Schafer-Elinder) L。Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism. *アルテリオスクレロシス・トロンボシス・パスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology)* 1997、17、963~8頁。

10

20. ヒーリー (Heery) J M、コザック (Kozak) M、スタフォリニ (Stafforini) D M、ジョーンズ (Jones) D A、ジンマーマン (Zimmerman) G A、マッキンタイア (McIntyre) T M、プレスコット (Prescott) S M。Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth cells. *ジャーナル・オブ・クリニカル・インベストイゲーション (Journal of Clinical Investigation)* 1995、96、2322~30頁。

21. サバナグンダー (Subbanagounder) G、レイティンガー (Leitinger) N、シー (Shih) P T、ファウル (Faull) K F、ベルリナー (Berliner) J A。Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early

20

atherogenesis: in vitro and In vivo inhibition by WEB 2086. *サーキュレーション・リサーチ (Circulation Research)* 1999、85、311~8頁。

22. ハーネット (Harnett) W、ハーネット (Harnett) M M。Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *イムノロジー・トゥデイ (Immunology Today)* 1999、20、125~9頁。

23. ショー (Shaw) P X、ホルコ (Horkko) S、チャン (Chang) M K、カーティス (Curtiss) L K、パリンスキ (Palinski) W、シルバーマン (Silverman) G J、ウィツタム (Witztum) J L。Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity [注釈参照]。 *ジャーナル・オブ・クリニカル・インベストイゲーション (Journal of Clinical Investigation)* 2000、105、1731~40頁。

30

24. バインダー (Binder) C J、ホルコ (Horkko) S、デワン (Dewan) A、チャン (Chang) M K、キウ (Kieu) E P、グッドイヤー (Goodyear) C S、ショー (Shaw) P X、パリンスキ (Palinski) W、ウィツタム (Witztum) J L、シルバーマン (Silverman) G J。Pneumococcal

vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *ネイチャー・メディシン (Nature Medicine)* 2003、9、736~43頁。

40

25. ザンチェッティ (Zanchetti) A、ボンド (Bond) M G、ヘニング (Hennig) M、ネイス (Neiss) A、マンシア (Mancia) G、ダル・パル (Dal Palu) C、ハンソン (Hansson) L、マグナニ (Magnani) B、ラーン (Rahn) K H、レイド (Reid) J、ロディシオ (Rodicio) J、セイファー (Safar) M、エッケス (Eckes) L、ラビネット (Ravinetto) R。Risk factors associated

with alterations in carotid intima-media thickness in hypertension: baseline data from the European Lacidipine Study on Atherosclerosis. *ジャーナル・オブ・ハイパーテンション (Journal of Hypertension)* 1998、16、949~61頁。

26. ザンチェッティ (Zanchetti) A、ボンド (Bond) M G、ヘニング (Hennig) M、

50

ネイス (Neiss) A、マンシア (Mancia) G、ダル・パル (Dal Palu) C、ハンソン (Hansson) L、マグナニ (Magnani) B、ラーン (Rahn) K H、レイド (Reid) J L、ロディシオ (Rodicio) J、セイファー (Safar) M、エッケス (Eckes) L、リジニ (Rizzini) P。 Calcium antagonist

lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. サーキュレーション (Circulation) 2002、106、2422～7頁。

【0081】

PCの保護作用を示す研究

マルメ (Malmo) の観察研究 (ザ・マルメ・ダイエット・アンド・キャンサー・スタディー (the Malmo Diet and Cancer Study)) では、頸動脈の超音波測定による無症状アテローム性動脈硬化症の非侵襲評価を含む、大規模な心臓血管研究にコーホートからの30000人の被験体のうち約6000人が当てられた。さらに、さらなる心臓血管の危険因子をベースラインで測定した。これらの被験体を、心臓血管疾患の新規イベント (心筋梗塞、慢性冠動脈心疾患、アテローム血栓性卒中) の発生に関して10年間追跡調査した。95%信頼区間で (相対ハザードとして算出される) 相対危険度を評価するために、低レベルの、ホスホリルコリンに対する抗体 (aPC-IgM) について、コーホート内症例対照解析 (症例あたり3対照) を行った。全部で145CVD症例 (主に、心筋梗塞 (MI) および虚血性卒中) があり、400の年齢および性別がマッチした対照があった。aPCのカットオフレベルは、aPCレベルの10パーセンタイルの307とした。10パーセンタイルより低いaPCレベルにおいて20CVD症例 (14%) があり、34 (9%) の対照があり、これは1.9 (95%CI 1.1~4.3) という相対ハザードに相当していた。aPCの10パーセンタイルよりも低い男性CVD症例の対応する数は、16 (19%) であり、このレベルより低い25 (11%) の対照患者があり、これは1.9 (95%CI 1.1~3.5) という相対ハザードに相当していた。女性の症例の数は、相対危険度に関して確固たる情報を得るには少なすぎた (表1および2参照)。結果から、健全な被験体における低いaPCレベルは心臓血管疾患の発生の予測となり、心臓血管疾患のマーカーとして作用し得るということが示唆される。

【0082】

【表1】

aPC (<10パーセンタイル) の記述統計学

		性別				すべて	
		男性		女性			
		症例	対照	症例	対照	症例	対照
10パーセンタイルより低い							
いいえ	n	68	206	57	160	125	366
	%	81	89	93	95	86	92
はい	N	16	25	4	9	20	34
	%	19	11	7	5	14	9

【0083】

【表 2】

すべての患者、男性および女性それぞれについての従来のロジスティック回帰による、CVDに対する aPC (<10パーセントイル) の影響についての単変量解析

	変数	p 値	ハザード比	95%ハザード比信頼限界	
				下	上
すべての患者	aPC	0.0308	1.939	1.063	3.536
男性	aPC	0.0262	2.181	1.097	4.338
女性	aPC	0.6556	1.331	0.379	4.676

10

【0084】

aPCの作用
はじめに

本発明者らは、PC-BSA、PC-KLHまたは肺炎球菌ワクチン(スタテンズ・セーラム社(Statens Serum Institute)、デンマーク)を予め吸着させたカラムを用いることによって、これらの化合物に対して反応性を有する抗体を抽出した。aPC-IgGのレベルはこれらのうち少なくとも最初に2種では上がる。IVIgから少量のIgMも抽出し、次いで、前記の抗原を予め吸着させたカラムに流すこともできる。本発明者らは、この方法によってIgGおよびIgMサブクラスのポリクローナルヒトaPCを得ることができ、タンパク質測定値から、0.5mg/mlというaPC-IgMレベルを抽出できたことが示唆される。本発明者らはこれらの抗体を用い、in vitroモデルを用いて、その機能的特性を試験できる：

20

1. 漸増濃度のaPC-IgMを、酸化したLDLとともにプレインキュベーションすることによって、単球/マクロファージ細胞株、THP1における結合および取り込みを低減し得るか? 共焦点顕微鏡および/またはFACSを用いる試験系を使用できる。

2. 漸増濃度のaPC-IgMを対照として正常なIgMとともに、PAF、リゾホスファチジルコリン(LPC)とともにプレインキュベートすることによって、これらの脂質による内皮細胞での接着分子ICAMの誘導を阻害できるか? また、その他のサイトカインは市販のキットを用いて試験できる(数種の異なるサイトカイン; バイオソース(BioSource))。試験にはFACSscanを使用できる。

30

【0085】

細胞培養

2 継代の低温保存したプールしたHUVECを、カスケード・バイオロジックス社(Cascade Biologics Inc.) (米国、オレゴン州、ポートランド) から購入した。培養物は、2%ウシ胎児血清およびサプリメントを含有する、EGM(商標)フェノールレッド不含培地(クロネティックス(Clonetics)、米国、カリフォルニア州、サンディエゴ)で維持した。この細胞を、加湿した5%CO₂条件下、75cm²のフラスコ(TPP、AG、トラサディング(en) trasadingen)、スイス)中、37°Cでインキュベートした。

【0086】

すべての実験は3~4継代で実施した。細胞を、フローサイトメトリー分析のために2x10⁴個細胞/mlの密度で12ウェルプレート(ヌンク社(NUNC Inc.)、米国、イリノイ州、ネーパービル)に播種した。12~24時間付着させた後、細胞を処理の前に少なくとも12時間SFMで静止状態にした。

40

【0087】

単球細胞株THP-1はAT&T(米国)から入手した。細胞は10%FCSを含むRPMIで維持した。

【0088】

aPCの調製

IgMまたはIgGの総フラクションは、ハイトラップ(HiTrap)IgMまたはIgG

50

カラム (アマシャム・バイオサイエンス (Amersham Biosciences)) を用いて、50 mg/ml の市販のプールされたヒト免疫グロブリン (ガンマーガード (Gammagard) (登録商標)) から分離した。ホスホリルコリン (PC) に対する抗体は、IgM または IgG フラクシオンを、キーホールリンペットタンパク質 (KLH) (1 もしくは 5 mg/ml) またはウシ血清アルブミン (BSA) (1 mg/ml) のいずれかと結合している PC とカップリングしている NHS - セファロースカラムに装填した後、続いて BSA のみのカラムにより溶出した。PC - BSA (ホスホリルコリン - ウシ血清アルブミン) および PC - KLH は、バイオサーチ・テクノロジーズ社 (Biosearch Technologies, INC) (米国、カリフォルニア州) から購入した。溶出フラクションは、PD - 10 カラムでバッファー交換し、ミリポアセントリコン (Millipore Centricone) (登録商標) 装置で濃縮した。手順は、製造業者によって与えられた説明書にしたがって実施した。調製した IgM a PC の濃度は、通常、50 µg/ml であり、IgG a PC の濃度は、通常 30 µg/ml であった。

10

【0089】

THP - 1 由来マクロファージによる、oxLDL のスカベンジャー結合および取り込み酸化された LDL (oxLDL) は、記載されたように、銅イオンとともにインキュベーションすることによって調製する。第 1 に、oxLDL を Dil (Dil - (1, 1' - ジオクタデシル - 3, 3, 3', 3' - テトラメチルヨードカルボシアニンパーコレート; モレキュラー・プローブス社 (Molecular Probes, Inc)) で標識し、生理食塩水 - EDTA バッファーで 1 mg/ml に希釈する。その後、1 mg の oxLDL につき 2 ml のリポタンパク質欠乏血清を加え、次いで、濾過する (0.45 µm)。1 mg の oxLDL につき 50 µl の DMSO 中 Dil (3 mg/ml) を加え、混合物を 15 時間、37 °C でインキュベートし、次いで、数回交換する生理食塩水 - EDTA に対して 6 時間透析する。この後、混合物を再度、0.45 µm で濾過する。

20

【0090】

蛍光/共焦点顕微鏡を用いて oxLDL の取り込みを調べる。単球/マクロファージのモデルとして THP - 1 細胞を、スライドチャンバー上で一晩増殖させる (培地: DMEM / 10% FBS / Glu / PEST)。

FBS を含まない DMEM 培地で 3 回洗浄する。

oxLDL - DiO5 µg/ml (SFM 培地) とともに 6 時間インキュベートする。

細胞を 0.2% BSA - PBS で 5 回、PBS で 1 回洗浄する。

30

【0091】

マクロファージ核染色: 細胞を 1 µg/ml のビスベンジミドとともに 10 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。

【0092】

固定およびマウント: 次いで、細胞を PBS 中 4% パラホルムアルデヒドで 30 分、PBS で 3 回、最後に 1 滴のマウントゲルで固定した。スライドはカバースリップで覆った。

【0093】

内皮細胞とのアネキシン V 結合

アネキシン V 結合を阻害する高い能力を有する、ヘパリン保存した血漿を、SFM 中 10% という濃度で HUVEC 単層に加えた。24 時間後、細胞を細胞解離溶液 (Cell Dissociation Solution) (CDS; シグマ - アルドリッチ (Sigma - Aldrich)、米国、ミズーリ州、セントルイス) で回収し、上清を用い、はがれた浮遊細胞の選択的減少をなくすよう注意深くプールし、1200 rpm で 7 分の遠心分離を続けた。100 µl のアネキシン V 結合バッファー (モレキュラー・プローブス社 (Molecular Probes Inc)、米国、オレゴン州、ユージーン) に再懸濁した後、サンプルを 2 µl の 5 mg/ml アネキシン V - FITC (モレキュラー・プローブス (Molecular Probes)) で染色し、氷上で 15 分間インキュベートした。獲得の直前に、1 mg/ml のヨウ化プロピジウム (PI; 生体染色色素; R & D システムス・ヨーロッパ社 (R&D Systems Europe Ltd)、英国、アビ

40

50

ンドン)を加えた。分析は上記の通り実施した。

【0094】

統計分析

統計はstattビュー (Stat View) ソフトウェア、SASインスティテュートAB (SAS

Institute AB)、スウェーデン、エーテボリを用いてコンピュータで計算した。非対称の連続型変数を対数的に変形した。連続型変数についてANOVAおよびカテゴリ変数についてカイ二乗を用いて研究群を比較した。フィッシャーのPLSDを、ポストホックテストとして用いた。相関係数は単純回帰または正規分布変数についてはないスピアマンの順位相関を用いて算出した。有意レベルは $p < 0.05$ で設定した。

10

【0095】

結果

内皮細胞とのアネキシンV結合の測定

アネキシンV染色のHUEC陽性の頻度を、二変数ドットプロットでのアネキシンV⁺/PI⁻細胞のパーセンテージとしてか、ヒストグラムに基づくアネキシンV⁺細胞のパーセンテージのいずれかとして求めた。結合を低下させると知られている血清の存在下でのHUECとの、およびIVI GとプレインキュベートしたHUECとのアネキシンV結合を調べた。IVI Gとのプレインキュベーションはアネキシンの結合を回復させることができ、このことはIVI G中に存在する抗体が結合を中和できたということを示す(図4)。

20

【0096】

ECとのアネキシンV結合を有するCVDの病歴のあるSLE患者では、APC-BSAおよびaPC-KHLは双方とも有意に関連していた(それぞれ、 $r = 0.45$; $p = 0.02$ ならびに $r = 0.42$ および $p = 0.03$)。aPCは上記のように測定した。

【0097】

PCによる、マクロファージにおけるoxLDL取り込みに対する作用

指摘したようにIVI Gから抽出した、IgMおよびIgGサブクラスのaPCを必要性を示すoxLDLとともにプレインキュベートした(図3)。本発明者らは総IgMをaPC-IgMおよびマクロファージ取り込みに対する効果の対照として用いた(マクロファージ+Dil-oxLDL+IgM)。陽性染色細胞の全パーセンテージは46.62%であり、これはIgM自体はaPCが有する阻害作用を有していないということを示す。IgMはシグマ(SIGMA)から購入し、精製ヒトIgMは、通常のヒト血清を出発物質として用いて沈殿およびゲル濾過技術によって製造されている。免疫グロブリンは少なくとも95%純粋であると測定されている。

30

【0098】

内皮細胞におけるICAM誘導に対するaPCの作用

PAFを、必要性を示す濃度のECとともにインキュベートした。図5に示されるように、この脂質はICAM発現の有意な増加を誘導できた。指摘したようにIVI Gから抽出したIgMサブクラスのaPCを、必要性を示されるようにこれらの脂質とともにプレインキュベートした(図5)。

40

【0099】

先に記載したような(高血圧症の226個体の)ELSA研究におけるaPCとその他の危険マーカー間の相関

表4に示されるように、aPC-IgMは2つのその他の保護因子、HSP70およびHDLと関連していた。また、TNF、つまり、炎症のマーカーでありアテローム生成性サイトカインとも、弱くはあるが有意な関連があった。

【0100】

TNFは重要な炎症性サイトカインであり、TNFレベルはaPC-IgMレベルと負に関連していた。この関連は弱い有意である。

【0101】

50

HSP70は、本発明者等によって最近記載された新規保護因子である。明確な正の関連がある。また、HSP60は、弱い保護因子であるが、これも関連している。

【0102】

HDLはよく知られている「良性」コレステロールであり、抗炎症特性を有する。HDLは、aPC IgMと有意に関連している。

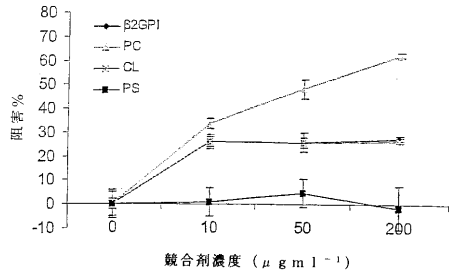
【0103】

			ANTPCIGG	ANTPCIGM	
スピアマンの rho	ANTPC1GG	相関係数	1,000	,245	10
		有意 (両側)	,	,000	
		N	220	220	
	ANTPCIGM	相関係数	,245	1,000	
		有意 (両側)	,000	,	
		N	220	220	
HDL		相関係数	,008	,233	20
		有意 (両側)	,906	,001	
		N	206	206	
TNFA		相関係数	-,012	-,136	
		有意 (両側)	,863	,044	
		N	220	220	
HSP60		相関係数	,138	,279	30
		有意 (両側)	,047	,000	
		N	209	209	
HSP70		相関係数	,157	,356	
		有意 (両側)	,022	,000	
		N	213	213	

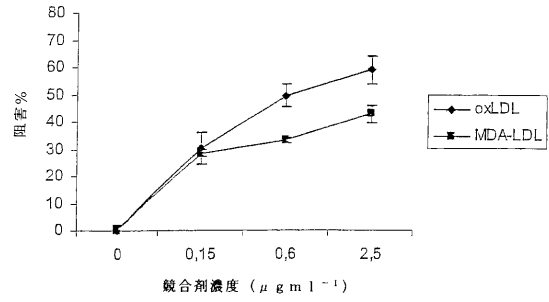
**相関は、.01レベルで有意である (両側)。

*相関は、.05レベルで有意である (両側)。

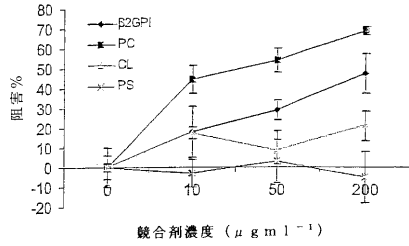
【図 1 A】



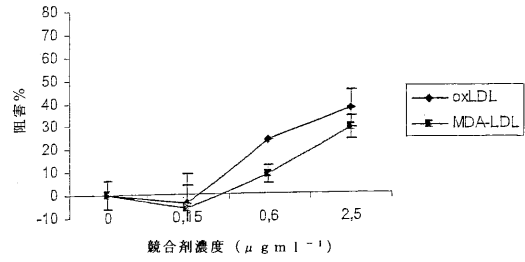
【図 2 A】



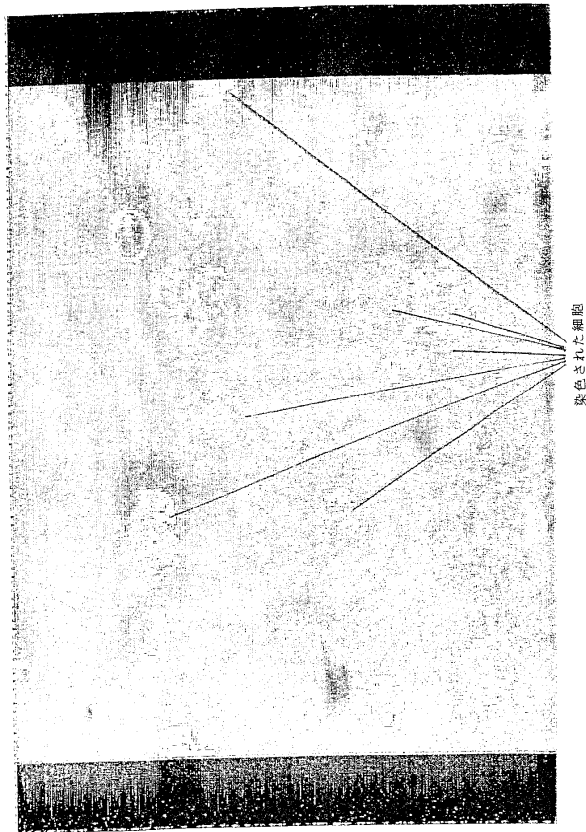
【図 1 B】



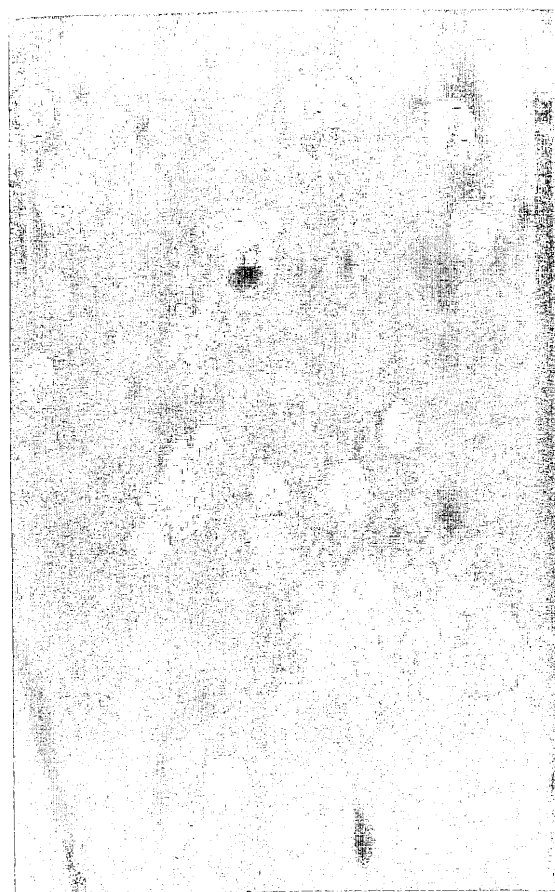
【図 2 B】



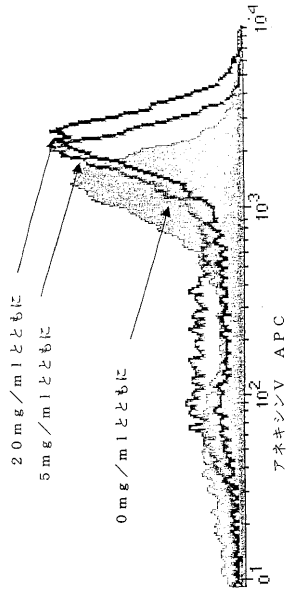
【図 3 A】



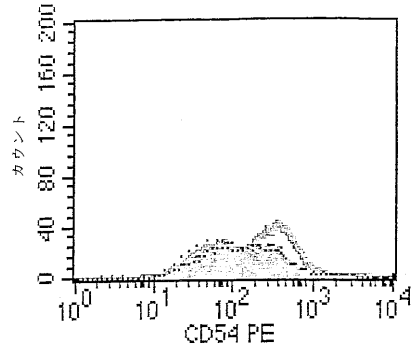
【図 3 B】



【 図 4 】



【 図 5 】



キー	名称	パラメーター	ゲート
—	paf 1.004	FL2-H	ゲートなし
■	CM.002	FL2-H	ゲートなし
...	P1-PC IgM.015	FL2-H	ゲートなし

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平06-087899(JP,A)
特開昭62-051699(JP,A)
特表2004-529143(JP,A)

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

专利名称(译)	新作文		
公开(公告)号	JP5366987B2	公开(公告)日	2013-12-11
申请号	JP2011024073	申请日	2011-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	阿瑟拉生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	ATERA生物技术AB		
当前申请(专利权)人(译)	ATERA生物技术AB		
[标]发明人	デファイアウルフ フロストガードヨハン		
发明人	デファイア ウルフ フロストガード ヨハン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K47/48 C07K16/18 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/92		
CPC分类号	A61K47/646 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/52 G01N33/6854 G01N33/92 A61K39/39583 G01N33/6893 G01N2800/323 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	五十嵐清		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	60/521384 2004-04-15 US		
其他公开文献	JP2011099871A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种评估抗磷酸胆碱抗体水平的方法，特别是IgM抗体，并通过使用磷酸胆碱结合物诊断IgM或IgG抗体的存在，以评估患者心肌缺血的发病风险。解决方案：存在针对磷酸胆碱的自身抗体，特别是IgM自身抗体，与缺血性心血管疾病的发病风险的增加/减少有关。动物实验表明，在用钥匙孔血蓝蛋白（KLH-磷酸胆碱缀合物）主动免疫后，可以在血浆中检测到中等至高水平的抗体，特别是IgM抗体。提出了包含磷酸胆碱缀合物（主动免疫）或抗体制剂的药物组合物，例如，对磷酸胆碱缀合物具有特异性的单克隆抗体（被动免疫），并且这些组合物作为主动或被动免疫原的用途是治疗或预防动脉粥样硬化

IVIgを以下の血清とともに プレインキュベートした	アネキシンV結合の蛍光強度中央値 (MFI)
0 mg/ml	649
2.5 mg/ml	913
5 mg/ml	1269
10 mg/ml	1382