

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-292661**(P2007-292661A)**(43) 公開日 **平成19年11月8日(2007.11.8)**

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

N

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2006-122293 (P2006-122293)

(22) 出願日 平成18年4月26日 (2006. 4. 26)

(71) 出願人 593038974

松森 昭

大阪府箕面市瀬川5丁目16-22

(71) 出願人 591083336

株式会社ビー・エム・エル

東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

(74) 代理人 100076510

弁理士 掛樋 悠路

(74) 代理人 100108084

弁理士 中野 睦子

(72) 発明者 松森 昭

大阪府箕面市瀬川5丁目16-22

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活動性心筋炎の検出方法および検出試薬

(57) 【要約】

【課題】活動性心筋炎の検出方法および検出試薬を提供する。特に活動性心筋炎の中でもウイルス感染が原因となるウイルス性の活動性心筋炎を特異的に検出することができる方法およびその検出試薬を提供する。

【解決手段】被験者の抗心筋型トロポニンI抗体価を指標とすることを特徴とする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者の抗心筋型トロポニン I 抗体価を指標とすることを特徴とする、活動性心筋炎の検出方法。

【請求項 2】

被験者の抗心筋型トロポニン I 抗体価が、正常者の抗心筋型トロポニン I 抗体価より有意に高いことをもって、当該被験者を活動性心筋炎と判断する請求項 1 記載の活動性心筋炎の検出方法。

【請求項 3】

被験者について、抗心筋型トロポニン I 抗体価を測定する工程と、遊離免疫グロブリン軽鎖のカッパ鎖量を測定する工程を有することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載する活動性心筋炎の検出方法。

【請求項 4】

活動性心筋炎がウイルス性の活動性心筋炎である請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載する活動性心筋炎の検出方法。

【請求項 5】

心筋型トロポニン I またはその部分ポリペプチドを、抗心筋型トロポニン I 抗体価の測定試薬として含む、活動性心筋炎の検出試薬または当該試薬を含むキット。

【請求項 6】

心筋型トロポニン I の部分ポリペプチドが、ヒト心筋型トロポニン I の少なくとも 41 ~ 110 番目のアミノ酸領域を有するヒト心筋型トロポニン I の部分ポリペプチドである請求項 5 に記載する活動性心筋炎の検出試薬または当該試薬を含むキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、活動性心筋炎の検出方法および検出試薬に関する。特に本発明は、活動性心筋炎の中でもウイルス感染が原因となるウイルス性の活動性心筋炎を検出するための方法およびその検出試薬に関する。

【背景技術】**【0002】**

心筋炎は心筋の炎症性病変に基づく心筋障害である。病理所見的には、心筋細胞壊死を伴う炎症細胞湿潤を認める活動性心筋炎とそれ以外の非活動性心筋炎に分類することができる。また、病因的にはウイルス感染によるウイルス性心筋炎、細菌等による細菌感染性心筋炎、および膠原病やサルコイドーシス等による非感染性心筋炎に分類される。日常遭遇する心筋炎の殆どは、コクサッキーウイルス、エコーウイルス（以上、ピコルナウイルス科に属する RNA ウイルス）、インフルエンザウイルス（オルソミクソウイルス科に属する RNA ウイルス）、HIV ウイルス（レトロウイルス科に属する RNA ウイルス）、SARS ウイルス（コロナウイルス科に属する RNA ウイルス）；A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス（以上、肝炎ウイルス）；アデノウイルス、パルボウイルス、およびヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス、EB ウイルス、サイトメガロウイルス）などの DNA ウイルス等のウイルスによるものであり（非特許文献 1 ~ 16 など参照）、原因不明の特発性心筋炎もそれらの殆どがウイルス性であると考えられている。一般に、心筋炎は急性に発症し、ほぼ完全に治癒するものが多いが、心機能障害が長期にわたり持続するものもある。

【0003】

心筋炎の臨床症状は、炎症症状と心症状とからなり、殆ど無症状のものから、心不全や不整脈により急速に死に至るものまで種々である。特にウイルス性心筋炎においては、感染初期に発熱、咳嗽、頭痛、咽頭痛、全身倦怠感などの風邪様症状や吐き気、嘔吐、下痢、腹痛等の消化器症状が出現し、その後に動悸、胸痛、不整脈、息切れ、心不全、アダムス・ストークス症候群、夜間の呼吸困難、脚のむくみ、顔面蒼白、チアノーゼ、四肢末梢

10

20

30

40

50

の冷感、関節痛、筋肉痛、発疹などの多彩な症状が出現する。このようにウイルス性心筋炎は風邪様症状を示すため、風邪と誤診されやすい疾患である一方、誤診による鎮痛解熱剤（非ステロイド系消炎剤）の投薬は心筋の破壊を悪化させる危険性があるため注意が必要である。またウイルス性心筋炎は、しばしば心異常を後遺する。急性期を乗り越えれば約43%は完全治癒するが、約40%は後遺症を残し、約3.2%は再発あるいは再燃をきたす（非特許文献17）。更に、その後の追跡調査でも、後遺症をきたした一部が拡張型心筋症様病像を呈することが明らかにされている。拡張型心筋症の予後は極めて不良で、発症後5年および10年の生存率は、それぞれ54%および36%である（非特許文献18）。

【0004】

活動性心筋炎については抗炎症療法が、またウイルス性心筋炎についてはインターフェロンなどの抗ウイルス薬による抗ウイルス療法が有効であることが知られている。ゆえに、心筋炎においても、活動性心筋炎、またはウイルス感染が成因のひとつと考えられる症例については、早期に診断して上記の治療を始めることが拡張型心筋症などへの移行や後遺症を防止し、その結果良好な予後をもたらすものと期待できる。

【0005】

このため、心筋炎の簡便で確実な診断法の開発が急務の課題となっており、その検査法の開発の意義は極めて大きい。

【非特許文献1】Grist NR et al. J Hyg 73:162-172, 1964

【非特許文献2】Bell EJ et al. J Hyg 93:197-203, 1984

【非特許文献3】Arch Virol 145: 2575-2600, 2000

【非特許文献4】Bowles NE et al. J Am Coll Cardiol 42:466-472, 2003

【非特許文献5】Onitsuka H et al. J Cardiol 37:315-323, 2001

【非特許文献6】Barbaro G. Herz 30:486-492, 2005

【非特許文献7】Felker GM. N Engl J Med 342:1120-1122, 2000

【非特許文献8】Chen J et al. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 32: 516-520, 2003

【非特許文献9】Yazu et al. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi 85:1304-1307, 1988

【非特許文献10】Ursell PC et al., Hum Pathol 15:481-484, 1984

【非特許文献11】Matsumori A et al. Lab Inv 80:1137-1142, 2000

【非特許文献12】Pauschinger M et al. Circulation 99: 1348-1354, 1999

【非特許文献13】Kohl et al. Circulation 108: 945-950, 2003

【非特許文献14】Bowles NE et al. J Am Coll Cardiol 42:466-472, 2003

【非特許文献15】Bowles NE et al. J Am Coll Cardiol 42:466-472, 2003

【非特許文献16】Kyto V et al. Clin Infect Dis 40: 683-688, 2005

【非特許文献17】河村慧四郎他、昭和57年度厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班報告書、p. 16、1983

【非特許文献18】河合忠一ら、昭和57年度厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班研究報告書、p. 63、1983

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、心疾患が疑われる被験者について、活動性心筋炎、特にウイルス性の活動性心筋炎の罹患を高い精度でしかも非侵襲的に検出するための方法、および当該方法に使用される試薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねていたところ、活動性心筋炎の患者、特にウイルス感染が原因の活動性心筋炎の患者は、正常者、並びに非活動性心筋炎の患者や心筋炎を伴わない心不全の患者に比べて、抗心筋型トロポニンI抗体価が有意に高いことを見出し、当該心筋型トロポニンI抗体価が活動性心筋炎の診断、特にウイルス性の活動性心筋炎診断の指標となることを確信した。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

本発明は、かかる知見に基づいて完成したものである。即ち、本発明は、抗心筋型トロポニン I 抗体価を指標とする活動性心筋炎の検出方法、およびそれに使用する検出試薬を提供するものである。

【 0 0 0 9 】

本発明には、下記の態様が含まれる：

(1) 活動性心筋炎の検出方法

(1-1) . 被験者の抗心筋型トロポニン I 抗体価を指標とすることを特徴とする、活動性心筋炎の検出方法。当該検出方法は、(a)被験者の生体試料中の抗心筋型トロポニン I 抗体価を測定する工程を有する。

10

【 0 0 1 0 】

(1-2) . 被験者の抗心筋型トロポニン I 抗体価が、正常者の抗心筋型トロポニン I 抗体価より有意に高いことをもって、当該被験者を活動性心筋炎と判断する (1-1) 記載の活動性心筋炎の検出方法。当該検出方法は、(a)被験者の生体試料中の抗心筋型トロポニン I 抗体価を測定する工程、(b)当該被験者の測定結果と正常者の抗心筋型トロポニン I 抗体価 (対照抗体価) とを対比する工程を有する。そして、(b)の結果から、被験者の抗心筋型トロポニン I 抗体価が対照抗体価より有意に高い場合に当該被験者を活動性心筋炎と判断する方法である。

【 0 0 1 1 】

(1-3) . 被験者について、抗心筋型トロポニン I 抗体価を測定する工程と、遊離免疫グロブリン軽鎖のカッパ鎖量を測定する工程を有することを特徴とする (1-1) または (1-2) に記載する活動性心筋炎の検出方法。当該検出方法は、具体的には (a) 被験者の生体試料中の抗心筋型トロポニン I 抗体価を測定する工程、と (c) 被験者の生体試料中の F L C のカッパ鎖量を測定する工程を有する。

20

【 0 0 1 2 】

(1-4) . 被験者の中から、遊離免疫グロブリン軽鎖 (F L C) のカッパ鎖量が、正常者の F L C のカッパ鎖量より有意に高い人を選択する工程を有する (1-3) 記載の活動性心筋炎の検出方法。当該検出方法は、上記 (a) 工程、(b) 工程、および (c) 工程に加えて、(d) 被験者の F L C カッパ鎖量の測定結果と正常者の F L C カッパ鎖量 (対照カッパ鎖量) とを対比する工程を有する。そして、(b) において、被験者の抗心筋型トロポニン I 抗体価が対照抗体価より有意に高く、かつ (d) において、被験者の F L C カッパ鎖量が対照カッパ鎖量より有意に高い場合には、当該被験者について B 細胞活性抑制という療法を選択することが可能となる。

30

【 0 0 1 3 】

(1-5) . 活動性心筋炎がウイルス性の活動性心筋炎である (1-1) 乃至 (1-4) のいずれかに記載する活動性心筋炎の検出方法。

【 0 0 1 4 】

(2) 活動性心筋炎の検出試薬および試薬キット

(2-1) . 心筋型トロポニン I またはその部分ポリペプチドを、抗心筋型トロポニン I 抗体価の測定試薬として含む、活動性心筋炎の検出試薬または当該試薬を含むキット。

40

(2-2) . 心筋型トロポニン I の部分ポリペプチドが、ヒト心筋型トロポニン I の少なくとも 4 1 ~ 1 1 0 番目のアミノ酸領域を有するヒト心筋型トロポニン I の部分ポリペプチドである (2-1) に記載する活動性心筋炎の検出試薬または当該試薬を含むキット。

(2-3) . ウイルス感染を原因とする活動性心筋炎の検出試薬または当該試薬を含むキット。

【 0 0 1 5 】

なお、本発明において「正常者」とは、心疾患に罹患しておらず、かつ心疾患履歴のない人、すなわち少なくとも心臓に関して正常である人を意味する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 6 】

50

本発明によれば、心疾患が疑われる患者について、活動性心筋炎の罹患を、非活動性心筋炎や心筋炎を伴わない心不全と区別して検出することができるため、活動性心筋炎の特異的また高精度な診断方法として有効に利用することができる。活動性心筋炎は、心筋細胞壊死を伴う炎症細胞湿潤を認めるものであり、抗炎症療法が有効と考えられている。このため、本発明の方法により活動性心筋炎と判断された患者には、抗炎症療法を施すことによって早期に的確且つ有効な治療効果を得ることができる。

【0017】

また本発明によれば、活動性心筋炎の中でも特にウイルス感染を原因とする活動性心筋炎を特異的に検出することができるため、ウイルス性の活動性心筋炎の特異的また高精度な診断方法として有効に利用することができる。本発明の方法によりウイルス性の活動性心筋炎と判断された患者には、抗ウイルス療法を施すことによって早期に的確且つ有効な治療効果を得ることができる。

10

【0018】

また本発明の方法は、心筋生検によらず、被験者の血液や尿試料を使用して、非侵襲的な方法で活動性心筋炎の有無を簡便に判定することができる点で有用な方法である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明が対象とする活動性心筋炎は、心筋細胞壊死を伴い、炎症細胞湿潤が存在する心筋炎である。このような病理的所見が認められる活動性心筋炎の治療方法には、他の心疾患（例えば、非活動性心筋炎、心筋炎を伴わない心疾患）と異なり、抗炎症療法が有効である。

20

【0020】

特に本発明が対象とする活動性心筋炎は、ウイルス感染を原因とするウイルス性の活動性心筋炎である。かかるウイルス性心筋炎の治療方法には、非ウイルス性心筋炎と異なり、抗ウイルス療法が有効である。

【0021】

ウイルス性心筋炎は、ウイルス抗体に対する抗体価または心筋組織からのウイルスの検出の有無により、膠原病やサルコイドーシス等による「非ウイルス性心筋炎」とは明確に区別することができる。また本発明が対象とする「ウイルス性心筋炎」は、ウイルス抗体に対する抗体価および細菌に対する抗体価、または心筋組織からのウイルスまたは細菌の検出の有無により、ウイルス以外の細菌等による「細菌感染性心筋炎」とは明確に区別することができる。かかる「ウイルス性心筋炎」と「非ウイルス性心筋炎」および「細菌感染性心筋炎」との区別に関しては、例えば、文献Viral infection of the heart, J. E. Banatvala編集、Edward Arnold社出版、ロンドン1993、pp.1-257を参照することができる。

30

【0022】

本発明において、ウイルス性心筋炎を引き起こすウイルスは、その限りにおいて特に制限されない。かかるウイルス性心筋炎を引き起こすウイルスには、DNAウイルスまたはRNAウイルスに属する病原ウイルスが含まれる。そのような病原ウイルスのうち、DNAウイルスとしては、例えば、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス等）、アデノウイルス、パルボウイルス、B型肝炎ウイルス等を挙げることができる。また上記病原ウイルスのうち、RNAウイルスとしては、例えば、ピコルナウイルス科に属するウイルス（例えば、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、脳心筋炎ウイルス、A型肝炎ウイルス）、オルソミクソウイルス科に属するウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、レトロウイルス科に属するウイルス（例えば、HIVウイルス）、コロナウイルス科に属するウイルス（例えば、SARSウイルス）、その他、レオウイルス、トガウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ブンヤウイルス、アレナウイルス、カリシウイルスを挙げることができる。また、ウイルス性心筋炎を引き起こすDNAウイルスまたはRNAウイルスに属する病原ウイルスには、肝炎ウイルス、特にA型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスが含まれる。好適

40

50

なウイルスとしては、上記ピコルナウイルス科に属するウイルス（例えば、コクサッキーウイルスおよびエコーウイルス）、各種の肝炎ウイルス（特にA型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルス）を挙げることができる。より好ましくは肝炎ウイルス、特にC型肝炎ウイルスである。

【0023】

本発明の活動性心筋炎の検出方法は、被験者の生体試料中の抗心筋型トロポニンI抗体価を指標とすることを特徴とする。すなわち、本発明の方法は、被験者の生体試料を対象として、当該生体試料の抗心筋型トロポニンI抗体価を測定することによって実施することができる。

【0024】

対象となる生体試料は、測定対象となる抗心筋型トロポニンI抗体の存在が認められる生体（ヒト、その他の動物を含む）に由来する試料であれば特に限定されることなく、一般の臨床検査において検体とされる試料を広く挙げることができる。具体的には血液（血清や血漿を含む）、尿、脊髄液、羊水、唾液等の体液を例示することができる。好ましくは血液および尿、より好ましくは血液であり、なかでも特に好ましくは血清である。

【0025】

抗心筋型トロポニンI抗体の測定に使用される抗原としては、検出すべき測定対象の抗心筋型トロポニンI抗体と免疫反応（抗原-抗体反応）する抗原であれば特に制限はされない。好ましくはヒト抗心筋型トロポニンI抗体と免疫反応（抗原-抗体反応）する抗原である。かかる抗原としては心筋型トロポニンIを挙げることができる。上記要件を満たす限りにおいて、心筋型トロポニンIは全長であってもよいし、その部分断片（部分ペプチド）であってもよい。好適なものとしてヒト心筋型トロポニンIまたはその部分ペプチドを挙げることができるが、心筋型トロポニンIは一般に種間の相同性が高いことを鑑みれば（例えば、ヒト心筋型トロポニンIとマウスまたはラットの心筋型トロポニンIは、アミノ酸配列において92.4%の同一性を有することが知られている）、ヒト由来に限らず、ヒト心筋型トロポニンIとアミノ酸配列において同一性が高いマウスやラットなどのヒト以外の哺乳類に由来する心筋型トロポニンIまたはその部分ペプチドを使用することもできる。

【0026】

なお、心筋型トロポニンIは、心筋の収縮単位サルコメアを構成するthin filamentの成分の一つであり、心筋細胞の収縮に関わることが知られている。例えばヒト心筋型トロポニンIは、配列表：配列番号1に示すように210個のアミノ酸配列からなる蛋白質であり（GenBank accession No.NP_000364）、また、その遺伝子も既にクローニングされ塩基配列も公知になっている（GenBank accession No.NM_000363）（例えば、Vallius WJ et al., FEBS Lett. 270; 57-61, 1990など）。配列番号2にその塩基配列を示す。うち塩基番号90~722の領域がコード領域である。

【0027】

またマウスおよびラットに由来する心筋型トロポニンIもクローニングされており、その遺伝子およびアミノ酸配列もいずれも公知になっている（マウス：文献Ausoni S et al., J Biol Chem. 269: 339-346, 1994、アミノ酸配列；GenBank accession No.NP_033432、塩基配列；GenBank accession No.NM_009406）（ラット：文献Murphy AM et al., Biochemistry 30:707-712, 1991、アミノ酸配列；GenBank accession No.NP_058840、塩基配列；GenBank accession No.NM_017144）。

【0028】

心筋型トロポニンIの部分ペプチドとしては、抗心筋型トロポニンI抗体と特異的に抗原-抗体反応する抗原性を有するものであれば、特に制限されない。一般にIgG（自己抗体）を認識するアミノ酸残基数は3~4残基といわれることから、心筋型トロポニンIのアミノ酸配列において連続する4残基以上のアミノ酸配列を有する部分ペプチドであればよい。例えば、ヒト心筋型トロポニンIの部分ペプチドの例として、41~110番目のアミノ酸領域を含むペプチドを好適に挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0029】

尚、採用しようとする部分ペプチドが本発明の検出方法において良好に使用し得るかは、抗心筋型トロポニンI抗体との反応性（抗原 - 抗体反応性）を常法に従って試験することにより、容易に確認することができる。

【0030】

これらの心筋型トロポニンIまたはその部分ペプチド（以下、これらを総じて「抗原」ともいう）は、本発明の抗心筋型トロポニンI抗体の検出方法において、所望により、常法に従って任意の固相に固定化して用いることができる。当該固相としては、この技術分野において慣用の各種の固相が利用でき、例えばガラス、セルロース粉末、セファデックス、セファロース、ポリスチレン、濾紙、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂、デキストラン、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ナイロン、ガラスビーズ、絹、ポリアミン - メチルビニルエーテル - マレイン酸共重合体、アミノ酸共重合体、エチレン - マレイン酸共重合体等の種々の素材からなるスティック、ビーズ、プレート（マイクロプレートを含む）、試験管等を広く例示できる。

10

【0031】

固定化方法についても特に制限はなく、物理的結合及び化学的結合のいずれをも使用できる。例えば、共有結合法としてジアゾ法、ペプチド法（酸アミド誘導体法、カルボキシルクロライド樹脂法、カルボジイミド樹脂法、無水マレイン酸誘導体法、イソシアナート誘導体法、臭化シアン活性化多糖体法、セルロースカルボナート誘導体法、縮合試薬を使用する方法等）、アルキル化法、架橋試薬による担体結合法（例えば架橋試薬としてグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンイソシアナート等を用いるもの）、Ugi反応による担体結合法等の化学的反応：或いはイオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法：ガラスビーズ等の多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法等が例示できる。

20

【0032】

なお、測定系に使用される抗原の量は、特に制限されず、採用する測定系において慣用の抗原量に応じて任意に決定することができる。例えば、サンドイッチ法を採用する場合には、通常、測定対象である抗心筋型トロポニンI抗体に対して過剰の抗原が使用され、例えば100 μ l 容量で反応させる場合を例に挙げると、通常0.1 ~ 100 μ g / ml 程度、好ましくは1 ~ 10 μ g / ml 程度の使用を例示することができる。

【0033】

上記抗原と被験者の生体試料中の測定対象抗体（抗心筋型トロポニンI抗体）との免疫反応（抗原 - 抗体反応）は、特に制限されず、通常の免疫反応における条件が採用される。一般には45 以下、好ましくは約4 ~ 40 、より好ましくは25 ~ 40 程度の温度条件下で、抗原と測定対象抗体を含み得る生体試料とを共存させ、約0.5 ~ 40 時間、好ましくは1 ~ 20 時間程度、放置もしくはインキュベーションする方法を挙げることができる。また、反応に使用される溶媒及びそのpHも、当該反応に悪影響を与えないものであれば特に制限されず、常法に従って若しくはそれに準じて、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩緩衝液、酢酸緩衝液等のpHが約5 ~ 9 程度の緩衝液を例示することができる。

30

【0034】

本発明の検出方法は、基本的には、生体試料中に存在する測定対象の抗体（抗心筋型トロポニンI抗体）と当該抗体に対する固定化されていてもよい抗原との免疫反応（抗原 - 抗体反応）工程を有するものであればよく、他の工程は特に制限されないが、更に、当該抗原に捕捉された測定対象抗体と抗体検出試薬との反応工程を含むことが好ましい。また、検出特異性を上げる方法として、抗原 - 抗体反応工程で得られた免疫複合体（抗原 - 抗体結合物）から、一旦慣用のIgG解離法を用いて抗心筋型トロポニンI抗体を単離し、これを再度抗原との免疫反応（抗原 - 抗体反応）に供して、次いで抗体検出試薬と反応させる方法を用いることもできる。

40

【0035】

抗原 - 抗体反応工程で得られる免疫複合体（抗原 - 抗体結合物）を検出・測定する方法

50

並びにそれらの条件は、特に制限されることなく、通常の免疫測定法で用いられるものと同じか、若しくはそれに準じた方法及び条件を採用することができる。

【0036】

本発明の方法は、好適にはサンドイッチ法に従って実施することができる。例えば、固相化サンドイッチ法によれば、測定対象である生体試料中の抗体（抗心筋型トロポニンI抗体）は例えば次のようにして測定することができる。

【0037】

まず、測定対象である抗心筋型トロポニンI抗体と特異的に抗原-抗体反応する抗原を固相化してなる固相化抗原に、測定対象抗体を含み得る検体としての生体試料（例えば、血清試料）を加えて、抗原-抗体反応を行わせる。次いで、未結合物質を、例えば洗浄により除去し、次いで抗体検出試薬を加えて、抗原-抗体結合物における測定対象抗体と反応させ、当該試薬に応じた検出手段によって抗原-抗体結合物の存在を検出するか、又はその量を測定する。上記において、より簡便には、金コロイド着色ラテックス粒子等を標識してなる抗体検出試薬を用いたイムノクロマト法の採用を例示することができる。

【0038】

これら測定手法における各種手段の選択やそれらの改変等はいずれも当業者のよく知るところであり、本発明においてはそれら各手法のいずれによることもできる（「臨床検査法提要」、金原出版、1995年等参照）。

【0039】

ここで抗体検出試薬としては、特に制限されることなく、一般に当業界で用いられている各種の試薬を広く用いることができる。例えば、測定対象である抗体（イムノグロブリン）と結合し得る抗ヒトイムノグロブリン抗体等を挙げることができる。なお、該抗ヒトイムノグロブリン抗体には、測定対象である各クラスのイムノグロブリンを免疫源として免疫された任意の被免疫動物から得られる抗血清又はその精製物（ポリクローナル抗体）或いはモノクローナル抗体が包含される。

【0040】

これらの抗体検出試薬は、常法に従い調製することができ、また市販品としても入手することができる。

【0041】

当該抗体検出試薬は、その検出の為に、通常の標識剤によって、直接的に修飾されていてもよいし、また付加的な検出手段により間接的に修飾することもできる。この標識剤としては、特に制限はされず、従来公知のもの又は将来使用され得るいずれのものをも用いることができるが、具体的には¹²⁵I、³H、¹⁴C等の放射性同位元素類；アルカリホスファターゼ（ALP）、ペルオキシダーゼ（HRP）等の酵素類；フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（RITC）等の蛍光物質類；及び1N-（2,2,6,6-テトラメチル-1-オキシル-4-ピペリジル）-5N-（アスパルテート）-2,4-ジニトロベンゼン（TOPA）等が例示され、これらを標識剤として使用する免疫測定法は、それぞれラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ及びスピニムノアッセイと称されている。好ましくは、標識剤として、アルカリホスファターゼ（ALP）やペルオキシダーゼ（HRP）等の酵素を使用したエンザイムイムノアッセイである。

【0042】

尚、これらの標識剤による標識方法や間接的な標識化による修飾方法、並びにそれらの検出方法等は、自体公知の方法に従って行うことができる（「単クローン抗体」岩崎辰夫 他著、講談社サイエンティフィク、1984；「酵素免疫測定法」第2版、石川栄治 他著、医学書院、1982等）。

【0043】

本発明の検出方法は、抗体検出のための抗原として、抗心筋型トロポニンI抗体に特異的に反応する抗原を使用することを必須とするものであって、その限りにおいて、他の基本的操作等は特に制限されることなく、通常の免疫測定法における方法及び慣用の方法等

10

20

30

40

50

を広く採用することができる。故に、抗原 - 抗体結合物と上記の抗体検出試薬との反応条件も特に制限されず、通常の免疫反応における条件が採用される。通常、前述する抗原 - 抗体反応の条件と同様な条件、例えば通常 45 以下、好ましくは約 4 ~ 40、より好ましくは 25 ~ 40 程度の温度条件下、pH が約 5 ~ 9 程度の下で、約 0.5 ~ 40 時間、好ましくは 1 ~ 20 時間程度放置するもしくはインキュベーションする方法を挙げることができる。

【0044】

生体試料における抗心筋型トロポニン I 抗体の存在有無、或いはその含有量は、常法に従って、抗体検出試薬の標識に用いた標識剤（或はその間接的な標識）の種類に応じた標識活性を測定することにより、或いはその測定値から換算した抗体力価に基づいて評価することができる。

10

【0045】

本発明の検出方法において、被験者の生体試料について測定された抗心筋型トロポニン I 抗体価が、正常者（心筋炎に罹患していない被験者）の生体試料について同様に測定された抗心筋型トロポニン I 抗体価（対照抗体価）に比して有意に高い場合、当該被験者を活動性心筋炎に罹患している可能性が高いと判断することができる。ここで「有意に高い」とは、統計学的な処理において有効水準が 5 % 以下である場合、好ましくは有意差 $P < 0.05$ である場合を意味する。また、抗心筋型トロポニン I 抗体価の絶対値が 0.1 AU (Arbitrary Units) 以上である場合は、対照抗体価と対比しなくても、活動性心筋炎に罹患している可能性が高いと判断することができる。

20

【0046】

また、本発明の活動性心筋炎の検出方法は、上記抗心筋型トロポニン I 抗体価の測定工程に加えて、遊離免疫グロブリン軽鎖（FLC）のカッパ鎖量を測定する工程を有していてもよい。FLC のカッパ鎖の量は血液（血清または血漿を含む）または尿を試料として、Nakano, T. et al., J Immunological Method, 293, 183-189, 2004 の記載に従って測定することができる。一般に遊離免疫グロブリン軽鎖（FLC）のカッパ鎖の高値は、カッパ鎖を産生する B 細胞が活性化していることを示す。よって、被験者の生体試料について測定された FLC のカッパ鎖量が、正常者（心筋炎に罹患していない被験者）の生体試料について同様に測定された FLC のカッパ鎖量（対照カッパ鎖量）に比して有意に高い場合、もしくは FLC のカッパ鎖の絶対値が 34 mg / L（正常者の平均 + 標準偏差）程度以上である場合には、活動性心筋炎の原因の一つとして、ある種の B 型リンパ球の活性化を考えることができる。すなわち、本発明の検出方法において、抗心筋型トロポニン I 抗体価の測定と遊離免疫グロブリン軽鎖（FLC）量の測定を組み合わせを行い、両者の測定値がいずれも高い場合には、活動性心筋炎の成因の一つが B 型リンパ球の活性化にあると判断することができる。この場合、カッパ鎖を産生する B 細胞の活性抑制という療法を選択することにより、的確且つ有効な治療効果を得ることができる。

30

【0047】

なお、上記において「有意に高い」か否かは、前述する有効水準または有意差を指標に判断することができる。

【0048】

上記本発明の検出方法は、この測定の為の試薬または試薬キットを利用することにより簡便に実施することができる。

40

【0049】

ゆえに本発明は、活動性心筋炎の検出方法を簡便に行うために有用な活動性心筋炎の検出試薬および試薬キットを提供する。当該試薬は、生体試料中に含まれる抗心筋型トロポニン I 抗体を、抗原 - 抗体反応を利用して検出測定するための試薬であり、ゆえに抗心筋型トロポニン I 抗体と特異的に反応する抗原として、心筋型トロポニン I またはその部分ペプチドを試薬として含むことを特徴とする。

【0050】

心筋型トロポニン I として、好ましくはヒト由来の心筋型トロポニン I であるが、前述す

50

るようにヒト心筋型トロポニンIに代えて、ヒト心筋型トロポニンIのアミノ酸配列と同一性が高い、例えばマウス由来またはラット由来の心筋型トロポニンIも同様に使用することができる。心筋型トロポニンIの部分ペプチドも抗心筋型トロポニンI抗体と特異的に反応する限りにおいて特に制限されない。例えばヒト心筋型トロポニンIの部分ペプチドとしては、好適にはヒト心筋型トロポニンIの41～110番目のアミノ酸領域を含むペプチドを挙げることができる。

【0051】

当該抗原は、前述する任意の固相に固定化されていてもよい。本発明の試薬は、上記の抗原のほか、抗原-抗体結合物を特異的に結合する抗体検出試薬を含有するキットの形態を有していてもよい。抗体検出試薬としては、前述のものを挙げることができる。当該試薬キットには、実施の便益のために、更に適当な反応液、希釈液、洗浄液、反応基質、IgG解離法に使用する中和液、反応停止液、標識活性測定試薬等、が含まれていてもよい。

10

【実施例】

【0052】

以下に、試験例によって本発明の効果を明らかにするが、これらは単なる例示であり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0053】

実施例1 抗原の作製

(1) リコンビナント・全長ヒト心筋型トロポニンI (rh cTnI-full)の作製

20

ヒト心臓のTotal RNA (CLONTECH社製)を鋳型として、下記のプライマー:

・full-FW: 5'-GACGGATCCATGGCCGATGGTAGCAGCGATGCGG-3' (配列番号3)

・full-RW: 5'-GACGAGCTCTCAGCTCTCAAACCTTTTCTTGCGG-3' (配列番号4)

を用いてRT-PCRを行い、全長ヒト心筋型トロポニンI (アミノ酸1-210)をコードするDNAに相当するcDNAを増幅取得した。取得したcDNAの塩基配列をシーケンスにより確認したところ、GenBankに登録されている全長ヒト心筋型トロポニンIをコードする塩基配列(コード領域)(Accession No. NM_000363)(配列番号2)と相違ないことを確認した。

【0054】

上記で調製した全長ヒト心筋型トロポニンI (rh cTnI-full)のcDNAを大腸菌発現ベクターpQE-30 (QIAGEN製)に挿入し、融合蛋白を発現するベクターpQE-30/cTnIを得た。このベクターpQE-30/cTnIを大腸菌細胞株XL1-Blue (Stratagene製)に導入し、rh cTnIを発現する大腸菌細胞株XL1-Blue/cTnIを得た。この組換え大腸菌細胞株XL1-Blue/cTnIを50 µg/mlアンピシリン含有TB培地にて培養し、1 mM IPTGにより誘導し、rh cTnIを発現させた。次いで、rh cTnIを発現させた培養液を遠心分離(5000 rpm、5 min、4℃)して、大腸菌を沈殿させ、回収した菌体を500 mM NaCl含有25 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)に懸濁した後、氷中にて超音波破碎した。さらに得られた菌体液を遠心分離(15,000 rpm、30 min、4℃)し、rh cTnIを含む沈殿物を回収した。回収した沈殿物は500mM NaCl及び6M グアニジン塩酸含有25 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)に懸濁した後、氷中にて超音波破碎し、遠心(15,000 rpm、30 min、4℃)して、rh cTnIを含む上清を回収した。

30

【0055】

回収した上清をNi-NTA agaroseと混合し、rh cTnIをNi-NTA agaroseと結合させた後、7 M尿素含有20 mM トリス緩衝液(pH 7.5)にてアガロースを洗浄し、次いで200 mM イミダゾール及び7 M尿素含有20 mM トリス緩衝液(pH 7.5)でrh cTnIを溶出した(Ni-NTA agarose溶出画分)。さらに、当該Ni-NTA agarose溶出画分をDEAE sepharose カラムに供して、rh cTnIを含む非結合画分を回収した(DEAE sepharose非結合画分)。当該DEAE sepharose非結合画分をCM sepharose カラムに通液して、CM sepharoseに結合させた後、0 - 500 mM NaCl濃度勾配の7 M尿素含有20 mM トリス緩衝液(pH 7.5)により溶出させて、rh cTnIを含む画分を回収し、これを精製リコンビナント・全長ヒト心筋型トロポニンI (精製rh cTnI-full)とした。

40

【0056】

50

(2) リコンビナント・部分ヒト心筋型トロポニンI (rh cTnI-middle)の作製

ヒト心臓のTotal RNA (CLONTECH社製)を鋳型として、下記のプライマー：

・middle-FW： 5' -GACGGATCCATCTCCGCCTCGAGAAAATTGCAGC-3' (配列番号5)

・middle-RW： 5' -GACGAATTCTCAGTGATGGTGATGGTGATGCTCTTCATCCACCTTGTCCACACGG-3' (配列番号6)

を用いてRT-PCRを行い、部分ヒト心筋型トロポニンI (アミノ酸41-110) をコードするDNAに相当するcDNAを増幅取得した。なお、上記プライマーmiddle-RWは、ヒト心筋型トロポニンIの110番目のアミノ酸をコードするコドンの直後に6個のヒスチジン(6×His)をコードする塩基配列と停止コドン(tag)を組み込んで設計したものである。取得したcDNAの塩基配列をシーケンスにより確認したところ、GenBankに登録されているヒト心筋型トロポニンIのアミノ酸41-110番目の領域をコードする塩基配列の3' 端に、6×His-tagの配列が組み込まれた配列と相違ないことを確認した。

10

【0057】

斯くして調製されたcDNAを大腸菌発現ベクターpGEX-2T (ファルマシア製) に挿入し、GST及び6xHis-tagをもつ融合蛋白を発現するベクターpGEX-2T/cTnI-middleを得た。このベクターを大腸菌細胞株JM-109 (東洋紡製) に導入し、大腸菌JM109/cTnI-middleを得た。この組換え大腸菌株を50 µg/mlアンピシリンを含むTB培地にて培養し、1mM IPTGによりrh cTnI-middleの発現を誘導した。rh cTnI-middleを含む培養液を遠心分離(5,000 rpm、5 min、4℃)し、大腸菌を沈殿させ、沈殿させた菌体を500 mM NaCl、1% Triton X-100及び20 mMイミダゾール含有 25 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)に懸濁した後、氷中にて超音波破碎し、遠心分離(15,000 rpm、30 min、4℃)してrh cTnI-middleを含む上清を回収した。

20

【0058】

この上清をNi-NTA agaroseと混合して、rh cTnI-middleをNi-NTA agaroseに結合させて、500 mM NaCl、1% Triton X-100及び20 mMイミダゾール含有25 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)で洗浄し、さらに1% Triton X-100含有25 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)で洗浄した後、1% Triton X-100及び200 mMイミダゾール含有25 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)を用いて、rh cTnI-middleを溶出した(Ni-NTA agarose 溶出画分)。当該Ni-NTA agarose 溶出画分をGlutathione sepharose カラムに通液した後、1% Triton X-100 含有リン酸緩衝液、次いでリン酸緩衝液で洗浄した後、10 mM Glutathione含有50 mM トリス緩衝液(pH 8.0)を通液して、Glutathione sepharose カラムに結合させたrh cTnI-middleを溶出した(Glutathione sepharose溶出画分)。当該Glutathione sepharose溶出画分をリン酸緩衝液に対して透析し、回収した透析物を精製リコンビナント・部分ヒト心筋型トロポニンI (精製rh cTnI-middle)とした。

30

【0059】

実施例 2 抗トロポニンI(cTnI)抗体の測定方法

(1) 前処理用抗原固相化プレートの調製

96穴プレート(Immunoplate II, Nunc)の各ウェルに、実施例1の(1)で調製した抗原(精製rh cTnI-full)を0.5 µg/wellの割合で加え、4℃で一晩放置した。次いで、上清を捨てた後、200 µlの1% BSA含有PBSを各ウェルに加え、室温で2時間放置し、抗原固相化プレートを作製した。

40

【0060】

(2) 一次反応

(1)の前処理用抗原固相化プレートの各ウェルを200 µlの洗浄液(0.1% Tween 20含有PBS)で5回洗浄し、洗浄後、予め希釈液(0.1% BSAおよび0.1% Tween 20含有PBS)にて10倍希釈した血清サンプルを100 µlをウェルに加え、4℃で一晩反応させた。反応後、プレートを洗浄液で5回洗浄し、100 µlの回収液(10 mM glycine-HCl、pH 2.7)を各ウェルに加え、次いで、各ウェルから50 µlづつ分取し、50 µlの中和液(0.2% BSA及び0.2% Tween 20含有50 mM リン酸緩衝液、pH 8.0)にて中和し、IgG (抗心筋型トロポニンI抗体)回収サンプルとした。

【0061】

50

(3) 反应用抗原固相化プレート

96穴プレート(Immunoplate II, Nunc)の各ウェルに、抗原(精製 rh cTnI- middle)を 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ の濃度に加え、4 で一晩放置した。上清を捨てた後、200 μl の 1% BSA 含有 PBS を各ウェルに加え、室温で 2 時間放置し、反应用抗原固相化プレートを作製した。

【0062】

反応後、プレートを洗浄液で 5 回洗浄し、各ウェルに(2)で回収した IgG (抗心筋型トロポニン I 抗体)回収サンプル(100 μl)を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後各ウェルを洗浄液で 5 回洗浄し、各ウェルに 2 万倍希釈した HRP 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を 100 μl づつ加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルに基質溶液(OPD)を 100 μl づつ加え、室温で 30 分間反応させた。反応後、各ウェルに 2N H_2SO_4 を 100 μl づつ加え発色反応を停止し、プレートリーダーで比色($\lambda = 492 \text{ nm}$)した。 10

【0063】

実施例 3

(1) 心筋炎 1,315 例を、心筋生検による病理組織診断において活動性心筋炎との診断が確定した 88 例(活動性心筋炎)と、活動性心筋炎との診断が確定しなかった 1,227 例(非活動性心筋炎)とに分け、これらの各患者の血清サンプルを被験試料として、実施例 2 の方法に従って抗心筋型トロポニン抗体価を測定した。また、同様にして心筋炎を伴わない心不全例 157 例、および正常者 61 例についても同様に実施例 2 の方法に従って抗心筋型トロポニン抗体価を測定した。結果を図 1 に示す。

【0064】

図 1 に示すように、活動性心筋炎の患者の抗心筋型トロポニン抗体価は、非活動性心筋炎の患者、心不全の患者、および正常者のいずれの抗心筋型トロポニン抗体価よりも顕著に高かった。一方、同時に測定した血中心筋型トロポニン I 値、トロポニン T 値、および proBNP 値には、症例間で差異は認められなかった。 20

【0065】

このことから、抗心筋型トロポニン抗体価を指標とすることで、活動性心筋炎を、非活動性心筋炎や心不全などの他の心疾患と区別して診断することができると考えられる。

【0066】

(2) (1) で活動性心筋炎と判断された 88 例、および非活動性心筋炎と判断された 1227 例のうち 143 例を、各々 C 型肝炎ウイルス感染(HCV 感染)の有無によって分類した。なお、C 型肝炎ウイルス感染の有無は、患者の血清を試料として、アボット社の検査試薬「アーキテクト(登録商標) HVC」を用いて C 型肝炎ウイルスの抗体価を測定することによって行い、抗体価が 1.0 以上の場合を C 型肝炎ウイルス感染していると判断した。 30

【0067】

活動性心筋炎 88 例のうち、HCV 感染者は 5 例、HCV 非感染者は 83 例であり、非活動性心筋炎 143 例のうち、HCV 感染者は 34 例、HCV 非感染者は 119 例であった。図 2 に、各症例群に抗トロポニン抗体価の平均値を纏めた結果を示す。図 2 に示すように、活動性心筋炎患者の中でも HCV 感染者の抗トロポニン抗体価は顕著に高かった。一方、非活動性心筋炎患者の場合、HCV 感染者と非 HCV 感染者間で抗トロポニン抗体価に殆ど差異はなかった。このことから、抗心筋型トロポニン抗体価を指標とすることで、活動性心筋炎の中でもウイルス性心筋炎を、非ウイルス性活動性心筋炎、心筋炎非活動性心筋炎および心不全などの他の心疾患と区別して診断することができるとわかる。 40

【0068】

実施例 4

心筋炎 88 例を対象として、抗心筋型トロポニン抗体価と FLC カップパ鎖量を測定した。抗心筋型トロポニン抗体価は、実施例 2 に記載の方法に従って測定した。また FLC の測定は文献(J. Immunol. Methods, 2003, 275, 9-17)に従って行った。具体的には、まず、FLC 特異モノクローナル抗体(ヤマサ醤油(株)製)をコートした 96 穴マイクロプレート(Nunc 社製)に、被験者の血清試料または標準溶液を 100 μl 毎加え、室温で 2 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として抗カップパ軽鎖型抗体(ヤマサ醤油(株)製)の西洋 50

ワサビペルオキシダーゼ標識体を100 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。反応後、0.05% Tween20を含むPBSで洗浄し、発色液(OPD、Sigma)を100 μ l分注し、発色させた。1 N 硫酸にて発色を停止後、492nmでの吸光度を測定した。なお、アッセイ用の緩衝液としては1%ウシ血清アルブミンを含む50mM トリス塩酸(pH7.5)を用いた。

【0069】

その結果、心筋炎88例のうち、抗心筋型トロポニン抗体価高例(>0.1)は22例(25%)であり、そのうち(22例中)FLCカップパ値が高値(正常者の平均 $\pm$ 標準偏差が34mg/Lを越える)を示した例は21例(95.54%)であった。

【0070】

このことから、この21例に対しては、カップ鎖を産生するB細胞の活性抑制という療法を選択することにより、活動性心筋炎を的確に治療することができるものと考えられる。

10

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】実施例3(1)の結果を示す図である。心筋炎1,315例のうち活動性心筋炎88例および非活動性心筋炎1,227例、心筋炎を伴わない心不全例157例、および正常者61例の抗心筋型トロポニン抗体価(AU:Arbitrary Unit)を示す結果である。

【図2】実施例3(2)の結果を示す図である。活動性心筋炎88例のうちHCV感染者5例および非感染者83例、非活動性感染者143例のうちHCV感染者34例および非感染者119例、心筋炎を伴わない心不全例157例、並びに正常者61例の抗心筋型トロポニン抗体価(AU:Arbitrary Unit)を示す結果である。

20

【配列表フリーテキスト】

【0072】

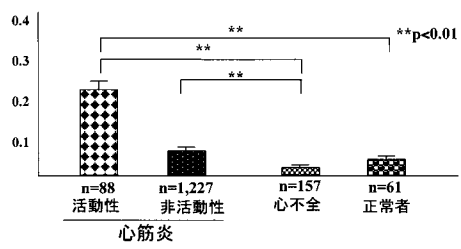
配列番号3はfull-FWのプライマーの塩基配列を示す。

配列番号4はfull-RWのプライマーの塩基配列を示す。

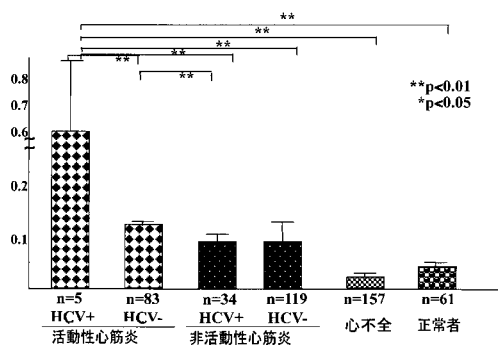
配列番号5はmiddle-FWのプライマーの塩基配列を示す。

配列番号6はmiddle-RWのプライマーの塩基配列を示す。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

2007292661000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 服部 浩明
東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 - 2 1 - 3 株式会社ビー・エム・エル内
- (72)発明者 石原 光昭
東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 - 2 1 - 3 株式会社ビー・エム・エル内
- (72)発明者 岩崎 忠雄
東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 - 2 1 - 3 株式会社ビー・エム・エル内

专利名称(译)	检测活动性心肌炎和检测试剂的方法		
公开(公告)号	JP2007292661A	公开(公告)日	2007-11-08
申请号	JP2006122293	申请日	2006-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	晃松森 BM萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	晃松森 BML有限公司		
[标]发明人	松森昭 服部浩明 石原光昭 岩崎忠雄		
发明人	松森 昭 服部 浩明 石原 光昭 岩崎 忠雄		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	睦野		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供检测活动性心肌炎和检测试剂的方法。本发明旨在提供一种能够特异性检测由病毒感染引起的病毒性活动性心肌炎的方法及其检测试剂，即使在活动性心肌炎中也是如此。 解决方案：抗体的特征在于使用受试者的抗心肌肌钙蛋白I抗体滴度作为指标。 【选择图】无

