

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3220129号
(P3220129)

(45)発行日 平成13年10月22日(2001.10.22)

(24)登録日 平成13年8月10日(2001.8.10)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

L

N

請求項の数 7 (全 4 数)

(21)出願番号 特願2000 - 391504(P2000 - 391504)

(22)出願日 平成12年12月22日(2000.12.22)

(65)公開番号 特開2001 - 249129(P2001 - 249129A)

(43)公開日 平成13年9月14日(2001.9.14)

審査請求日 平成13年2月16日(2001.2.16)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 372554

(32)優先日 平成11年12月28日(1999.12.28)

(33)優先権主張国 日本(JP)

早期審査対象出願

(73)特許権者 390037006

株式会社エスアールエル

東京都立川市曙町二丁目41番19号

(72)発明者 黒須 隆二

東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア

ールエル八王子ラボラトリー内

(74)代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開 昭64 - 47391(JP,A)

東京女子医科大学雑誌,63(1993),P.680 -
686

血液と脈管,19(1988),P.651 - 653

臨床病理,37:3(1989),266 - 271

(58)調査した分野 (I n t . C l . 7 , D B 名)

G01N 33/53

(54)【発明の名称】 流早産の可能性の判定方法及びそのための試薬

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液中のトロンプモジュリンを測定することを含む流早産の可能性の判定方法。

【請求項2】 トロンプモジュリンを経時的に複数回測定し、各測定値を比較する請求項1記載の方法。

【請求項3】 血中トロンプモジュリンを測定する請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 血清又は血漿中のトロンプモジュリンを測定する請求項3記載の方法。

【請求項5】 血中リン脂質抗体濃度を測定することをさらに含む請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 抗トロンプモジュリン抗体とトロンプモジュリンとの抗原抗体反応を利用した免疫測定方法によりトロンプモジュリンを測定する請求項1ないし5のい

2

ずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 抗トロンプモジュリン抗体を含む、流早産の可能性の判定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、流早産の可能性の判定方法及びそのための試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】流早産を起こす原因には多くの原因が知られているが、近年は抗リン脂質抗体(aPL)による習慣流産がその頻度が高く特に注目されている。

【0003】aPLは抗カルジオリピン抗体(aCL)や抗フォスファチジルセリン抗体(aPS)、ループスアンチコアグラント(LA)等のリン脂質に対する自己抗体の総称であるが、習慣流産のほか動静脈血栓症、血小板減

少症などの臨床症状を呈する抗リン脂質抗体症候群 (APS) の診断に欠かすことのできない検査である。しかし近年、aPL が認識する抗原はリン脂質そのものではなく、リン脂質と複合体を形成し構造変化を起こした α_2 -glycoprotein I (α_2 GPI) や protein C, protein S, annexin V などの (いずれも血液凝固を制御する蛋白) cofactor であると報告されてからは、この cofactor に関する研究が進められ、習慣流産や血栓症と cofactor 関与の aPL についての報告が多く出されるようになった。しかし aPL が生体にどのような機序をもって血栓を生じさせるのかについては未だ結論が出ていない。

【0004】北海道社会事業協会病院の島野らは 1993 年より感染症が起因する切迫流産、流産を防止するという観点から妊娠初診時に細菌性膣症 (bacterial vaginosis: BV), Chlamydia trachomatis 感染を診断し、治療してきた。しかし、感染症が起因ではない切迫流産が相当数存在することから、種々の検査を実施し、それらの多くが APS 類似であることを確認した。

【0005】このようなことから、島野らは改めて妊娠初診時に BV 治療を行い、さらに切迫徴候出現時に aPL の検査を行い、APS を疑う切迫流産症例に対してプレドニゾロン (PSL) および低用量アスピリン (low dose aspirin: LDA) 療法などの治療を施したところ、後期流産、早産の著しい減少を得る事ができた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかし、APS 疑いの流産は未だ若干例存在している。これらは妊娠中に aPL が産生され、この aPL により発症したと思われる acute type と、APS の治療中にもかかわらず急激に流産に至った acute change に区別できるが、いずれも切迫症状が急激に出現し、かつ短期間に進行したため、来院した時には流産が避けられない状態であった症例である。ちなみに acute type は、定期健診時の検査では予測することができず、流産後の原因調査で aPL による流産と判明している。

【0007】一方、aPL が陽性でありながら、全く症状を現わさずに経過し、正常産となった症例も多数存在する。よって、aPL 陽性ということだけで、治療に入ることは決して薦められるものではない。

【0008】このようなことから、一般的に行われていた APS の検査以外で、流産の可能性を予測できる方法が求められている。

【0009】従って、本発明の目的は、流産の可能性を従来法よりも的確に判定することが可能な、流産の可能性を判定する新規な方法、及び該方法に用いられる試薬を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本願発明者は、鋭意研究の結果、体液中トロンボモジュリン (TM) 濃度が切迫徴候を示す約 4 週間前ないし約 6 週間前から増加してい

ることを見出し、体液中 TM 濃度を測定することにより流産の可能性を的確に判定できることを見出して本発明を完成した。

【0011】すなわち、本発明は、体液中の TM を測定することを含む流産の可能性の判定方法を提供する。また、本発明は、抗トロンボモジュリン抗体を含む、流産の可能性の判定用試薬を提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】TM とは血管内皮細胞上に存在する凝固阻害因子で、血管などに炎症等の障害が生じると血中に放出される。血中に放出された TM はトロンピンと結合し、トロンピンの凝固活性を失わせるという抗凝固作用を有するほかに、このトロンピン・TM 複合体が protein C を活性化させ、さらに protein S を活性化、活性化凝固第 V 因子および第 VIII 因子を不活性化させるといった抗凝固作用を有する。血中 TM は、従来より、血管に炎症があるか否かのマーカーとして利用されている。しかしながら、流産の可能性を判定するためのマーカーとして血中 TM を用いることは知られておらず、示唆もされていない。

【0013】本発明の方法に供される体液としては、血液 (血清及び血漿を包含する)、尿、膣分泌液、子宮頸部分泌液等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。これらのうち、血液、とりわけ血清又は血漿を用いることが好ましい。

【0014】下記実施例において具体的に示すように、流産が起きる場合には、その数週間前 (特に約 4 ~ 6 週間前) に体液中 TM 濃度が上昇する。体液中 TM 濃度が正常妊婦 (切迫徴候及び妊娠中毒なしに正常産に至った妊婦) の平均 + 2SD (SD は標準偏差) 程度 (例えば、富士薬品工業社製「TM パナセラ」(商品名) を用いて測定した血清中 TM 濃度の場合には 3.8FU/ml) 以下であれば、流産の可能性はほとんどない。一方、この値 (以下、「閾値」) を超えると流産の可能性がかなりある。よって、体液中 TM 濃度を測定することにより、流産の可能性を判定することが可能である。また、流産が起きる場合には、その数週間前 (特に約 4 ~ 6 週間前) に体液中 TM 濃度が上昇するので、体液中 TM 濃度の測定は 4 週間毎位に経時的に行うことが好ましく、体液中 TM 濃度が急上昇した場合には、流産となる可能性が高い。流産になる可能性がある場合には、プレドニゾロンや低用量アスピリン投与等の治療ないし予防処置を採ることができ、流産の危険性を低減することができる。なお、閾値は、上記値又は上記した平均 + 2SD の値に必ずしも限定されるものではなく、判定の目的 (例えばスクリーニング目的か確定判定目的か等) に応じて適宜設定することができる。

【0015】下記実施例において具体的に示すように、初診時に aPL が陽性でも、体液中 TM 濃度が閾値以下で推移する場合には流産はほとんど起きない。一方、aP

Lが陽性か陰性かに関わらず、体液中T M濃度が急上昇している場合には、流早産となる可能性が高い。よって、本発明の方法は、従来のaPLに基づく診断方法よりも精度が高いと言える。

【0016】体液中T M濃度の測定方法自体は周知であり、例えば、血清又は血漿を検体として用いたサンドイッチE L I S A等の免疫測定法により容易に実施することができる。担体ビーズ上に、抗T Mモノクローナル抗体を感作したものを第1抗体とし、酵素標識抗T Mモノクローナル抗体を第2抗体とする、サンドイッチE L I S AによるT M測定用キットが市販されているので（例えば富士薬品工業社製「T Mパナセラ」（商品名））、このような市販のキットを用い、その添付文書に従って容易に体液中T M濃度を測定することができる。

【0017】なお、本発明の方法では、いずれかの方法により体液中のT M濃度を測定すればよいのであり、その測定方法は何ら限定されない。通常、T M濃度は、免疫測定法により測定することが好ましい。免疫測定法は、抗トロンプモジュリン抗体（ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい）と体液中のトロンプモジュリンとの抗原抗体反応を利用して、体液中のトロンプモジュリンの濃度を測定するものである。この場合、用いることができる免疫測定法は、上記したサンドイッチE L I S Aに限定されるものではなく、公知のいずれの免疫測定法をも採用することができる。すなわち、測定原理に基づいて分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法等があるがこれらのいずれをも採用することができる。また、用いる標識に基づいて分類すると、酵素免疫測定、放射免疫測定、蛍光免疫測定、ビオチン免疫測定等があるがこれらのいずれをも採用することができる。さらに、これらの各免疫測定は、さらに種々の測定方法に細分化されるが、それらのいずれをも採用することができる。

【0018】本発明の流早産の可能性の判定方法は、他の診断方法と組み合わせて行ってもよく、それによって、より精度を高めることが可能な場合がある。例えば、体液中T M濃度に加え、血中aPLが陽性か陰性かを調べ、血中aPLが陰性から陽性に変わり、かつ、体液中T M濃度が急上昇している場合には、流早産の危険性が非常に高いと判定できる。

【0019】本発明は、さらに、抗T M抗体を含む、流早産の可能性の判定用試薬をも提供する。この試薬は、上記した周知の各種免疫測定に、周知の方法により用いることができる。

【0020】

【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。

【0021】(1) 妊産婦の血中T M濃度の測定

4 3 3例の妊産婦の血中T M濃度を経時的に測定した。 50

測定は、各妊産婦から採取した血清50 μ lを検体とし、サンドイッチE L I S Aによる市販のT M測定用キットである富士薬品工業社製「T Mパナセラ」（商品名）を用い、その指示書に記載された常法に従って、サンドイッチE L I S Aにより行った。

【0022】(2) 妊産婦の血中aPLの測定
aPLとしては、抗カルジオリピン抗体(aCL)及び抗フォスファチジルセリン抗体(aPS)を測定し、少なくともいずれか一方が陽性の場合、aPL陽性とした。

【0023】aCL及びaPSは、マイクロプレートを用いたサンドイッチE L I S Aにより測定した。マイクロプレートの各ウェルに硫酸プロタミンを100 μ l分注し、室温で30分間静置した。PBSで3回洗浄後、ウシ心臓由来カルジオリピン液(SIGMA社製)(濃度20 μ g/ml)又はL- -フォスファチジル-L-セリン液(SIGMA社製)(濃度20 μ g/ml)を100 μ l分注し、4で一昼夜放置後、PBSTで3回洗浄した。次いで50倍希釈した被検血清又は標準血清を100 μ l分注し、室温で1.5時間静置後、PBSTで3回洗浄した。次いで適当な濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトI g G抗体(SIGMA社製)及びペルオキシダーゼ標識抗ヒトI g M抗体(SIGMA社製)を各100 μ l分注し、室温で1.5時間静置後、PBSTで3回洗浄した。次いで0.4 mM o-フェニレンジアミン100 μ lを分注し、室温で30分間静置後、2.5N硫酸を分注して反応を停止した。次いでイムノリーダーにて波長490 nmの吸光度を測定した。吸光度が標準血清の測定値以上の場合を陽性と判定した。

【0024】(3) 結果

4 3 3例中の代表的な15例の結果を図1及び図2に示す。図1には、初診時aPL陽性であった妊産婦についての結果を、図2には、初診時aPL陰性であった妊産婦についての結果を示す。なお、症例1、2、9、10が流早産に終わった症例であり、これら以外の症例は正期産であった。妊娠初診時にa P Lが陽性で、流早産となった症例1、2 および 切迫徴候を示した症例3、4はいずれも血中T M値の急速な上昇が見られるが、治療により症状が回復した症例3、4は、その後の上昇カーブが止まっている。治療中であるにもかかわらず、早産となった症例2はT M値が上昇し続けている。治療する間もなく流産に至った症例1のT M値上昇は急激である。a P Lが陽性であるにもかかわらず、何の症状もなく正期産となった症例5～8のT M値は、症例5の36W以降の上昇を除き、たえず3.8 FU/ml以内で推移していた。妊娠初診時の検査でa P L陰性であるにもかかわらず妊娠中にa P Lが産生され、早産になったり切迫徴候が見られた症例9～11も、T M値の急速な上昇が見られ、T M値上昇後にa P Lを検出、そして、切迫徴候が出現するという特徴が見られた。

【0025】このように、T M値は流早産や切迫流早産

を起こす以前からその値が上昇しており、正常妊婦には値の上昇がみられないため、T Mの測定は正常・異常の区別が付きやすい結果となった。

【 0 0 2 6 】

【発明の効果】本願発明により、流早産の可能性を従来法よりも的確に判定できる方法が提供された。流早産の可能性が的確に示されれば、予防処置を採ることができ*

*るので、流早産を減らすことができる。従って、本願発明は安全な出産に大いに寄与するものと期待される。

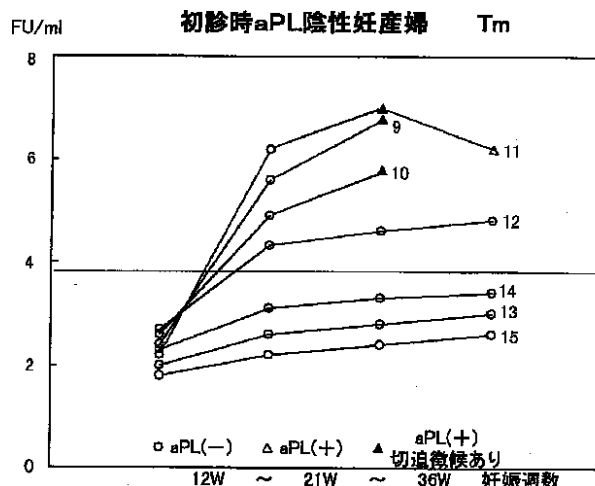
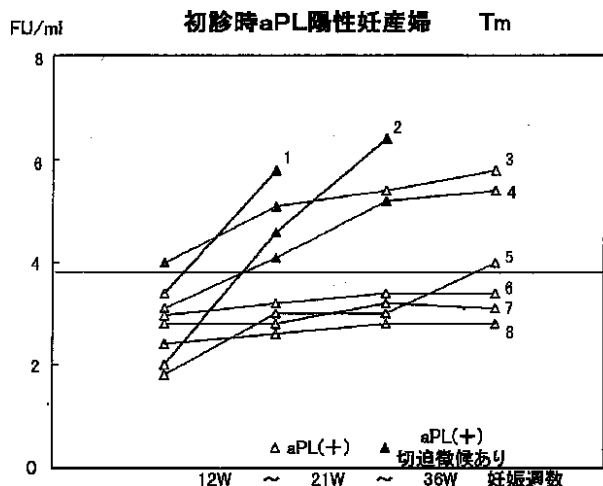
【図面の簡単な説明】

【図 1】初診時aPL陽性妊産婦の血清T M濃度の経時変化及びaPL陽性陰性の変化を示す図である。

【図 2】初診時aPL陰性妊産婦の血清T M濃度の経時変化及びaPL陽性陰性の変化を示す図である。

【図 1】

【図 2】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

G01N 33/53

专利名称(译)	判断过早流动可能性的方法及其试剂		
公开(公告)号	JP3220129B2	公开(公告)日	2001-10-22
申请号	JP2000391504	申请日	2000-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	SRL股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	株式会社工スアールエル		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社工スアールエル		
[标]发明人	黒須隆二		
发明人	黒須 隆二		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.L G01N33/53.N		
代理人(译)	谷川荣次郎		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	1999372554 1999-12-28 JP		
其他公开文献	JP2001249129A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够比传统方法更精确地确定过早流产可能性的新方法，以及与之一起使用的试剂。解决方案：确定过早流产可能性的方法包括测量体液中的血栓调节蛋白。用于确定过早流产可能性的试剂含有抗血栓调节蛋白抗体。如果体液中血栓调节蛋白的浓度高于其正常值，则过早流产的可能性更大。

【图2】

