

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4048293号  
(P4048293)

(45) 発行日 平成20年2月20日(2008.2.20)

(24) 登録日 平成19年12月7日(2007.12.7)

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

請求項の数 2 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2002-200630 (P2002-200630)	(73) 特許権者	591038945
(22) 出願日	平成14年6月5日(2002.6.5)		村松 喬
(65) 公開番号	特開2004-12447 (P2004-12447A)		愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒
(43) 公開日	平成16年1月15日(2004.1.15)		石2845-161
審査請求日	平成17年3月9日(2005.3.9)	(74) 代理人	100120293
前置審査			弁理士 長谷川 智子
		(72) 発明者	丸山 聖子
			愛知県名古屋市昭和区天神町1-18第5
			共栄ハイツ405号
		(72) 発明者	村松 壽子
			愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒
			石2845-161
		(72) 発明者	石黒 直樹
			愛知県名古屋市名東区上菅2-203

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リウマチの診断法及びリウマチ診断薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者から採取された血清中のミッドカインを免疫化学的に測定し、さらにリウマチ因子を測定することによる、リウマチの検査方法。

【請求項2】

被験者から採取された血清中のミッドカイン濃度が600pg/mL以上である場合にリウマチ陽性であると決定することを特徴とする請求項1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、リウマチの診断に関する。

【0002】

【従来の技術】

慢性関節リウマチ(RA)は多発性の関節痛と関節腫張を主症状とする原因不明の破壊性、進行性の炎症性疾患である。当初は滑膜炎であるが、炎症が軽快と増悪を繰り返して、関節軟骨や骨組織が破壊され、関節の変形と機能障害を生じる。RAは一般的に非常によく知られており、患者数も多い疾患にも関わらず、いまだに確定診断を行うには以下のアメリカリウマチ学会診断基準(1987年、アメリカリウマチ学会)を4つ以上満たす必要がある。1.朝のこわばり(朝のこわばりは少なくとも1時間以上持続)。2.3関節領域以上の関節炎(少なくとも3つの関節領域で、軟部組織の腫張または関節液の貯留)

。3．手の関節炎（手の1カ所の関節領域に腫脹がある）。4．対称性の関節炎。5．リウマトイド結節。6．血清リウマチ因子陽性。7．X線像の変化。しかし、診断基準の一つであるX線的な変化が現れるのは、関節に腫脹を伴う関節炎が現れてから成人で約半年かかるとされており、実際の早期診断の材料としては難しい。1 - 4の診断基準も症状が6週間以上続くなどの条件があり、関節炎が起きてから診断までは時間がかかるのが普通である。

RAは難治性で、関節の破壊、機能障害が著明なため、知名度が高く、RAを心配して整形外科を訪れる患者も多い。多くは、関節炎は示すもののRAであることは少ないため、X線検査、血液のリウマチ因子検査で陰性であることを示し、除外診断をしている。しかし、現在の診断基準から考えるとこれも完全に除外してよい条件ではない。また、実際RAであった場合、活動性のある症状には早期から積極的に抗リウマチ薬治療を行うべきだと、早期の診断・治療の重要性が主張されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本研究は、迅速にリウマチを診断することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

ミッドカインは細胞の増殖、移動、生存を促進する成長因子である（Muramatsu, T., Wiley Encyclopedia Mol. Med., pp 2086 - 2088, 2002）。ミッドカインの免疫化学的測定法は確立されている（Muramatsu, H., et al., J. Biochem., 119, 1171 - 1175, 1996）。また、リウマチ性関節炎と変形性関節症でいずれも関節液中のミッドカイン値が上昇することも報告されている（Takeda, T. et al., J. Biochem., 122, 453 - 458, 1997）。しかし、症例数が少なく、病態との関連が不明であり、再検討が必要となった。その結果、本研究は、意外にも高ミッドカイン値がリウマチを特徴づけるものであることを見出した。

【0005】

すなわち、本発明は、ミッドカイン値をもってリウマチのマーカーとするものである。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下、添付の図面に従ってこの発明を詳細に説明する。図1は慢性関節リウマチと変形性関節症の患者の関節液中のミッドカイン値を比較したものの、図2はRA患者の血清中のミッドカイン値を示したものである。

【0007】

1．ミッドカイン値の定量について説明する。ミッドカインに対する特異抗体を用いて酵素免疫学的に定量できる（Muramatsu, H. et al., J. Biochem., 119, 1171 - 1175, 1996）。また、ウェスタンブロット（Muramatsu, H. et al., Dev. Biol., 159, 392 - 402, 1993）後のデンストメーターによる定量（Takei, Y. et al., Cancer Res., 61, 8486 - 8491, 2001）。も可能である。

【0008】

2．リウマチ因子の判定について説明する。ヒトγ-グロブリンを吸着させたポリスチレンラテックス粒子がリウマチ因子（RF）と反応して凝集を示すかどうかで判定する。栄研化学株式会社から販売されているRA77栄研というキットを用いて測定することができる。

【実施例】

以下、実施例により、本発明を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0009】

（実施例1）慢性関節リウマチあるいは変形性関節症の患者の関節液のミッドカイン値

10

20

30

40

50

を測定した。このため、アフィニティー精製した抗ヒトミッドカイン抗体 (Muramatsu, H. et al., J. Biochem., 119, 1171-1175, 1996) 1  $\mu$ g を 50  $\mu$ l の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 に溶解し、Falcon 3915 のマイクロタイタープレートの穴に入れプレート面に吸着させた。溶液を除き、穴を二価イオンを含まぬリン酸緩衝液生理食塩水 [PBS (-)] で洗い、洗浄緩衝液 [100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5, 0.4 M NaCl, 0.1 % ウシ血清アルブミン、0.1 % NaN<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>] と 1 時間インキュベートした。洗浄緩衝液を除いた後、穴に PBS (-) で 2 倍希釈した 50 ml 関節液検体を加え、3 時間室温に保った。検体液を除いた後、50  $\mu$ l 洗浄緩衝液中の 0.7 ng ビオチン化抗ミッドカイン抗体 (Muramatsu, H. et al., J. Biochem., 119, 1171-1175) を加え、4 時間で一夜、反応させた。5 mU のストレプトアビジン - ガラクトシダーゼ複合体 (ベーリンガーマンハイム社) を 50  $\mu$ l の洗浄緩衝液に溶かし、穴に加え、室温で 1 時間反応させた。溶液を除き、穴を洗浄したのち、5  $\mu$ g の 4 - メチルウンベリフェリルー - D - ガラクトシドを 50  $\mu$ l の洗浄緩衝液に溶かして加え、室温で反応させた。酵素反応は 200  $\mu$ l の 0.1 M グリシン緩衝液 pH 10.3 で停止し、遊離した 4 - メチルウンベリフェロンをマイクロプレート蛍光リーダー (サイトフロー II、バイオサーチ社) で測定した。標準ミッドカインを用いた検量線から、この測定値に基づいて関節液中のミッドカイン値を求めた。リウマチ患者をリウマチ因子陽性者と陰性者に分けると、陽性者では、全例、陰性者でも 55 % でミッドカイン値は高かった (図 1)。また、変形性関節症患者では、ミッドカイン値は低かった (図 1)。関節液中のミッドカイン値が高いことをもってリウマチ診断の重要因子とすることができる。

10

20

#### 【0010】

(実施例 2) 血清 0.1 ml を用いて [0009] の方法で血清ミッドカイン値を測定した。正常人のカットオフ値を 300 pg / 0.5 ml (Muramatsu, H. et al., J. Biochem., 119, 1171-1175, 1996) とするとリウマチ因子陰性の患者でも 32 例中 8 例が陽性、リウマチ因子陽性の患者では 88 例中 85 例が陽性であった。血清中のリウマチ因子測定と組み合わせて、精度が高い (2 つの値が高い) あるいは網羅性が高い (どちらかの値が高い) 測定を行い得る。なお健常人でも約 5 % のリウマチ因子陽性者があるがミッドカイン値は健常人では低い。

30

#### 【0011】

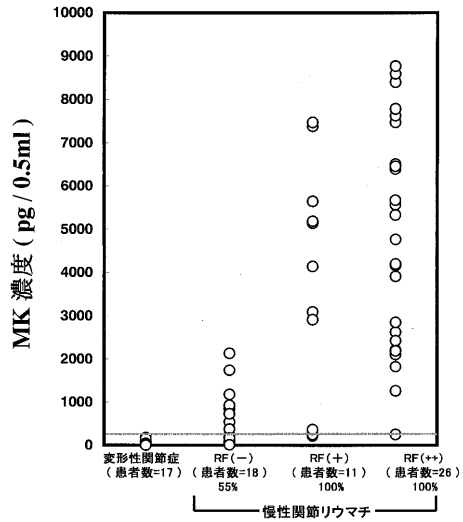
##### 【図面の簡単な説明】

【図 1】慢性関節リウマチの患者と変形性関節症の患者の関節液中のミッドカイン値の比較図である。% は変形性関節症でのミッドカイン値以上のケースのパーセントを示す。リウマチ因子 (RF) 陰性 (-)、陽性 (+)、強陽性 (++) の各群で図示してある。

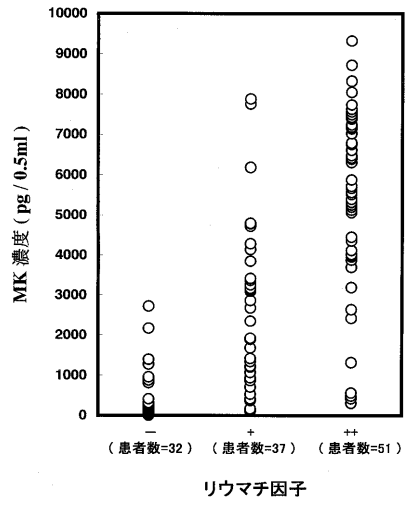
【図 2】血清中のミッドカイン値と血清中のリウマチ因子 (RF) の関連を示す図である。

。

【 図 1 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 村松 喬

愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石 2 8 4 5 - 1 6 1

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 2 0 3 3 3 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 2 - 5 2 0 9 8 0 ( J P , A )

Takada, T., et al., Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis, J. Biochem., 1997年, Vol.122, No.2, p.453-458

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/48-33/98

PubMed

专利名称(译)	风湿病的诊断方法和风湿病的诊断剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP4048293B2</a>	公开(公告)日	2008-02-20
申请号	JP2002200630	申请日	2002-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	村松 乔		
申请(专利权)人(译)	村松 孝		
当前申请(专利权)人(译)	村松 孝		
[标]发明人	丸山 聖子 村松 壽子 石黒 直樹 村松 喬		
发明人	丸山 聖子 村松 壽子 石黒 直樹 村松 喬		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/53.S		
代理人(译)	长谷川 智子		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2004012447A JP2004012447A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：快速诊断风湿病。 解决方案：量化滑液和血清中的Midkine。

【 図 1 】

