(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4149512号
(P4149512)
(45)発行日　平成20年9月10日(2008.9.10)　(24)登録日　平成20年7月4日(2008.7.4)

(51)Int.Cl.　F I
A61K 38/00 (2006.01)　A61K 37/02

請求項の数 7　(全 11 頁)

(21)出願番号	特願平7-523570
(86)(22)出願日	平成7年3月10日(1995.3.10)
(65)公表番号	特表平9-510292
(43)公表日	平成9年10月14日(1997.10.14)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/002771
(87)国際公開番号	WO1995/024650
(87)国際公開日	平成7年9月14日(1995.9.14)
審査請求日	平成14年2月14日(2002.2.14)
審判番号	不服2004-16761(P2004-16761/J1)
審判請求日	平成16年8月11日(2004.8.11)
(31)優先権主張番号	08/212,446
(32)優先日	平成6年3月10日(1994.3.10)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　501418214
ジェネティクス　インスティテュート，エルエルシー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４０，　ケンブリッジ，　ケンブリッジ　パーク　ドライブ　８７
(73)特許権者　503304197
バージニア・ポリテクニック・インスティテュート・アンド・ステイト・ユニバーシティ
ＶＩＲＧＩＮＩＡ　ＰＯＬＹＴＥＣＨＮＩＣ　ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ　ＡＮＤ　ＳＴＡＴＥ　ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ
アメリカ合衆国２４０６０バージニア州ブラックスバーグ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】子かん前症の治療用組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
妊娠性高血圧または子かん前症の増大した危険性を有する患者の治療用医薬組成物であって、Ｍ－ＣＳＦを含んでなる医薬組成物。
【請求項２】
妊娠の最初の３カ月の後期から投与が開始されるか、または妊娠の第２の３カ月の期間に投与される請求項１記載の医薬組成物。
【請求項３】
妊娠約１４ないし１６週目から始まって約３０週目に終わる期間に投与される請求項２記載の医薬組成物。
【請求項４】
妊娠約１４ないし１６週目から投与が開始され、測定される血清Ｍ－ＣＳＦレベルが正常レベル範囲内となるまでの期間投与を継続される請求項１記載の医薬組成物。
【請求項５】
さらにＩＬ－１１を含んでなる請求項１記載の医薬組成物。
【請求項６】
ＩＬ－１１が後で含有される請求項５記載の医薬組成物。
【請求項７】
妊娠の最初の３カ月の期間に投与が開始され、測定される血清Ｍ－ＣＳＦレベルが正常レベル範囲内となるまで投与され、妊娠の第２の３カ月の期間においてさらにＩＬ－１１を

含有することとなる請求項６記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、サイトカインの使用、詳細には、子かん前症の診断および治療のためのＭ－ＳＣＦの使用に関する。

発明の背景

子かん前症は母親ならびに胎児の死亡および罹患の主な原因であり、妊娠中のヒトに独特の疾病である。最近の証拠は、子かん前症は胎盤の適合不良および全身的な内皮細胞傷害により特徴づけられることを示している。母親の螺旋状動脈の子宮筋層セグメント中への栄養膜の侵入不全および全身的な内皮のダメージを引き起こす細胞毒性メディエイタの産生も関与していると思われる。

正常組織および新生物組織の両方の特性を有するという点で、組織栄養膜は独特な細胞タイプである。新生物細胞のような通常の増殖の間、ヒト・栄養膜は細胞外マトリックスを通って螺旋状動脈の子宮筋層部分の中に侵入する。しかしながら、際限なく侵入し、ついには他の器官へと広がる新生物細胞とは異なり、栄養膜の侵入特性は最終的に調節下に置かれ、さらなる細胞分化が進行し、細胞老化が起こる。正常な妊娠においては、栄養膜は上記プロセスにより螺旋状動脈を子宮胎盤動脈に変える。（ピーネンボルグ（Pijnenborg）ら、「トロホブラスト・リサーチ（Trophoblast Research）」（デンカー（Denker）およびアプリン（Aplin）編）、プレナム・プレス、ニューヨーク（Plenum Press,New York）、３３頁（１９９０年））。次いで、子宮胎盤動脈は螺旋状動脈の約３０倍に膨張する。生じた血行動態の変化により、胎盤床が、妊娠後期の胎児からの増加した酸素要求を満足させることができる。しかしながら、子かん前症の女性においては、第２の３カ月間の開始における子宮筋層中への栄養膜移動の２回目の波動が不完全なので、螺旋状動脈は正しく子宮胎盤動脈へと変化しない（コング（Khong）ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・オブステトリクス・アンド・ジネコロジー（Br.J.Obstet.Gynecol.）、第９３巻：１０４９～１０５９頁（１９８６年））。結果として、子かん前症の女性は、典型的に、インタクトな拡張していない螺旋状動脈に関連した高い抵抗性、高い血圧および低流量の状態を示し（ロバートソン（Robertson）ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・オブステトリクス・アンド・ジネコロジー（Am.J.Obstet.Gynecol.）、第１５５巻：４０１～４１２頁（１９８６年））、広範な臨床的徴候を示す。それゆえ、胎児に由来する栄養膜の異常な挙動は当該疾病の主要な態様と思われる。

サイトカインは、免疫と炎症応答との調和における重要な伝達系を提供する。サイトカインには多くのコロニー刺激因子（ＣＳＦｓ）があり、それらは主要標的細胞に関して命名されており、顆粒球（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球－マクロファージ（ＧＭ－ＣＳＦ）およびマクロファージ（Ｍ－ＣＳＦ、さらにＣＳＦ－１としても知られる）コロニー刺激因子が包含される。他のサイトカインは、ＩＬ－１からＩＬ－１５までを包含するインターロイキンを包含し、それらは、造血に関連するものを包含する種々の活性を有することが知られており、病原体の感染に対する防御を提供している。

サイトカインは、正常な妊娠期間中、子宮および胎盤において産生される（タビブザデー（Tabibzadeh）、エンドクリン・レビューズ（Endocrine Reviews）、第１２巻：２７２～２９０頁（１９９１年））。ラットにおいて、Ｍ－ＣＳＦは子宮腺細胞により分泌され、侵入性栄養膜細胞上に存在する新規受容体とともに、そのレベルは妊娠の最初の２～３日のうちに約１０００倍にも上昇することが観察されている（ポラード（Pollard）ら、ネイチャー（Nature）、第３３０巻：４８４～４８６頁（１９８７年）；ウズマキ（Uzumaki）ら、ＰＮＡＳ,ＵＳＡ、第８６巻：９３２３～９３２６頁（１９８９年））。ヒトにおいて、Ｍ－ＣＳＦに関するｍＲＮＡの発現および局在化が絨毛膜の絨毛基質の間葉細胞において、詳細には、最初の３カ月における、絨毛コアに沿って並んでいる栄養膜細胞層および栄養膜細胞層のコアにおいて；そして第２の３カ月間における、絨毛間葉細胞において；さらに第３の３カ月間における、絨毛管に沿って並んでいる細胞において示された（カナザキ（Kanazaki）ら、ヒューマン・リプロダ（Human Reprod.）、第７巻：５６３

～５６７頁（１９９２年）；ダイター（Daiter）ら、ジャーナル・クリニカル・エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム（J.Clin.Endocrinol.Metab.）、第７４巻：８５０～８５８頁（１９９２年））。妊娠中のマクロファージＭ－ＣＳＦの循環レベルも妊娠していない女性に比べて高い（ヤング（Young）ら、ブラッド（Blood）、第１８０巻：２８９７～２９０２頁（１９９２年））。

他のサイトカインが胎盤および／または子宮において同定されている。ＴＮＦ－αはヒト・羊水中および胎盤ならびに脱落膜組織の上清中に存在する（ジャーテラ（Jaattela）ら、ラボラトリー・インベスティゲーション（Lab.Invest.）、第５８巻：４８～５２頁（１９８８年））。栄養膜由来のＴＮＦαは、正常なヒト・絨毛膜におけるＩＬ－６およびＩＬ－６受容体依存性の系を用いてヒト・絨毛ゴナドトロピン（ｈＣＧ）の放出を誘導する（イング（Ying）ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム（J.Clin.Endocrinol.Metab.）、第７４巻：１８４～１９１頁（１９９２年））。逆に、ｈＣＧおよびヒト・胎盤ラクトゲン（ｈＰＬ）はＴＮＦαの発現を増加させる（シャファー（Schafer）ら、ジャーナル・オブ・ペリナタル・メディシン（J.Perinat.Med.）、第２０巻：２３３～２４０頁（１９９２年））。

発明の概要

したがって、本発明は、通常には胎盤および／または子宮に存在するが、子かん前症の女性においては不存在であるかまたは低濃度で存在する生物学的因子のレベルを測定すること、必要ならば、該レベルを上昇させることによる、子かん前症の検出、予防および／または治療方法を提供する。好ましい生物学的因子は、循環サイトカイン、特に、Ｍ－ＣＳＦのごときＣＳＦｓ、ＩＬ－１１のごときインターロイキン、およびＴＮＦ－αのごとき増殖因子を包含する。本発明方法に関して最も好ましい増殖因子はＭ－ＣＳＦである。

１の特別な具体例において、本発明は、子かん前症または妊娠性高血圧（ＧＨ）にかかっている患者、あるいは感受性のありうる人の血清Ｍ－ＣＳＦレベルを測定することからなる、妊娠性高血圧または子かん前症の増大した危険性を診断する方法よりなる。好ましい具体例において、妊娠約１４ないし１６週の女性において血清Ｍ－ＣＳＦレベルを測定する。これらの血清Ｍ－ＳＣＦレベルを正常な妊娠をしている女性におけるＭ－ＣＳＦのレベルと比較する。本明細書において後述するように、血清Ｍ－ＣＳＦレベルは、最終的な妊娠の結果における子かん前症または妊娠性高血圧の発生と相関関係がある。それゆえ、本発明は、最終的な妊娠の結果における子かん前症および／またはＧＨの発生の増加した危険性の正確な予想を得るために有用である。この情報を用いて、Ｍ－ＣＳＦでの治療から利益を受けうる女性を同定してもよい。

発明者らは、子かん前症の妊娠の初期段階において血清ＴＮＦ－αレベルが低下することを見いだし、それゆえ、血清ＴＮＦ－αレベルは、妊娠性高血圧または子かん前症の初期段階の増加した危険性の診断および／または治療においてさらなる価値がありうることを見いだした。子かん前症の後期段階にいて、ＴＮＦ－αレベルは上昇する。

もう１つの具体例において、本発明は、子かん前症またはＧＨにかかっている女性、あるいは感受性のありうる女性を、Ｍ－ＣＳＦで治療することよりなる。１の具体例において、本発明は、患者に、通常は、子かん前症またはＧＨに感受性があると判断された女性、あるいは子かん前症またはＧＨにかかっている女性に治療上有効量のＭ－ＣＳＦのごときサイトカインを投与することからなる。Ｍ－ＣＳＦのほかに、ＩＬ－１１のごとき１種またはそれ以上の他の生物学的因子で患者を治療してもよい。

もう１つの具体例において、本発明は、１種またはそれ以上のサイトカイン、特別にはＣＳＦｓ、より特別にはＭ－ＣＳＦの発現をコードする遺伝子で処理またはトランスフェクションされた細胞の投与からなる。好ましい具体例において、用いる細胞は、栄養膜がより多量のサイトカインを発現できるようにするために、サイトカインをコードする遺伝子で処理またはトランスフェクションされた、患者から取ってきた栄養膜細胞であり、次いで、子かん前症に感受性があると判断された患者、あるいは子かん前症にかかっている患者に該細胞を投与する。トランスフェクションされた細胞を調製するのに有用なベクターおよび遺伝子は、米国特許第４,８６８,１１９号および４,８７９,２２７号に記載されて

おり、その開示を参照により本明細書に記載されているものと見なす。

発明の詳細な説明

本発明に有用な生物学的因子は、通常は、増殖している栄養膜の局部的な環境において産生される因子を包含する。本発明に有用な生物学的因子には、サイトカイン、特に、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦならびにＭ－ＣＳＦのごときコロニー刺激因子、およびＩＬ－１からＩＬ－１３までのごときインターロイキンが包含される。本発明方法における投与に有用な他のサイトカインは、腫瘍壊死因子、特別には、ＴＮＦ－α、インターフェロン、および形質転換増殖因子β、ＩＧＦならびにＦＧＦのごとき増殖因子を包含する。本発明における投与に有用な他の生物学的因子は、プロスタサイクリン、ロイコトリエンおよびＰＡＦのごとき脂肪酸代謝物を包含する。好ましい生物学的因子はＭ－ＣＳＦのみ、またはＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１１または他の生物学的因子と組み合わされたＭ－ＣＳＦである。

また、本発明は、患者への投与に最適な生物学的因子の決定方法を包含する。患者に投与する適当な生物学的因子を決定する際に、医師は、胎盤および／または子宮に存在する生物学的因子のレベルを測定することができる。正常な妊娠と比較して低下したレベルで存在するそれらの因子を、患者への投与に適する因子と見なすことができる。

本発明の特別な具体例において、妊娠の最初の３カ月［ほぼ１ないし１４週］の間に血清Ｍ－ＣＳＦレベルを測定することにより、妊娠性高血圧または子かん前症の増加した危険性に関して妊娠した女性を診断することができる。この期間において少なくとも２回、好ましくは約１４週から１６週までにおいてＭ－ＣＳＦレベルを測定することが好ましい。Ｍ－ＣＳＦレベルが正常よりも有意に低い場合、Ｍ－ＣＳＦの投与による治療コースを用いることができる。一般的には、５００ユニット／ｍｌのＭ－ＣＳＦまたはそれ以上のレベルを正常と見なす。しかしながら、約５００ないし６００ユニット／ｍｌのＭ－ＣＳＦのレベルは疑わしい可能性があり、ＴＮＦ－αに関するアッセイの形態でのさらなるモニタリングまたはＭ－ＣＳＦのさらなる測定が適切である。Ｍ－ＣＳＦの１ユニットは約１２ピコグラムのＭ－ＣＳＦと等価である。よって、存在するＭ－ＣＳＦの量の直接アッセイにより［血清中に存在するｍ－ＣＳＦの正確なｎｇ／ｍｌ数］、あるいはバイオアッセイにより［１２ピコグラムのＭ－ＣＳＦの活性と比較した血清中のＭ－ＣＳＦ活性のレベル］、ユニットを測定することができる。患者の血清Ｍ－ＣＳＦレベルが約５００ユニット／ｍｌよりも低い場合、妊娠性高血圧および／または子かん前症にかかっている危険性が増加していると患者を診断することができる。高血圧の管理に関する治療コースが適切である。

さらなるモニタリングが必要な場合、患者における血清のＴＮＦ－αの生物学的活性レベルを測定することにより行ってもよい。約４０ユニット／ｍｌまたはそれ以上のＴＮＦ－αの血清の生物学的活性レベルは、一般的には正常と見なされる（キース（Keith）ら、ジャーナル・オブ・ペリナトロジー（J.Perinatology）、第１３巻：４１７～４１８頁（１９９３年）およびキースら、ハイパーテンション・アンド・プレグナンシー（Hypertension and Pregnancy）（１９９５年）第１４巻：８１～９０頁、両文献の開示を参照により本明細書に記載しているものと見なす）。血清Ｍ－ＣＳＦレベルが正常より低い場合、または疑わしい場合、および血清ＴＮＦ－αレベルが正常より低い場合には、妊娠性高血圧および子かん前症にかかっている危険性が増加していると患者を診断することができる。

本発明のもう１つの具体例において、妊娠性高血圧または子かん前症の危険性の増大している患者をＭ－ＣＳＦ投与により治療する。好ましくは、Ｍ－ＣＳＦでの治療を最初の３カ月の後期、すなわち、約１４週ないし約１６週目に、あるいは第２の３カ月の初期、すなわち、約１６週ないし約１８週目に開始し、測定される血清Ｍ－ＣＳＦレベルが正常レベル範囲に上昇するまで継続してよい。好ましくは、Ｍ－ＣＳＦでの治療を妊娠約３０週目をこえて継続しない。本発明の目的からすれば、正常な血清Ｍ－ＣＳＦレベルは、妊娠した女性が子かん前症または妊娠性高血圧に苦しまない典型的なレベル、一般的には、少なくとも約５００ユニット／ｍｌであると定義される［５００ユニット／ｍｌ　６ナノグラム／ｍｌ］。好ましくは、Ｍ－ＣＳＦレベルが正常レベルの範囲内となった後であって、Ｍ－ＣＳＦ投与の悪影響が観察される前に、Ｍ－ＣＳＦでの治療を中止する。

好ましい具体例において、Ｍ－ＣＳＦをＩＬ－１１投与とともに、あるいはＩＬ－１１投与に先立って投与してもよい。最近、アイルランド（Ireland）ら（ブラッド（Blood）第８４巻：２６７ａ（１９９４年））は、インターロイキン－１１（ＩＬ－１１）が胎盤線維芽細胞により産生され、栄養膜の分化および胎盤形成に関与しているように思われることを報告している。正常な妊娠血漿体積は、典型的には、拡張された生理学的状態にあるが、子かん前症は血漿体積状態を減じる。ＩＬ－１１は血漿体積の増加を促進する可能性があり（アウルト（Ault）ら、ブラッド第８４巻：２７６ａ（１９９４年））、ＴＮＦ－αの産生を変化させる可能性があり、子かん前症の場合、妊娠後期においてＴＮＦ－αは上昇する。キース（Keith）ら（１９９３年）上記文献、およびキースら（１９９５年）上記文献）。それゆえ、ＩＬ－１１での治療に先行するＭ－ＣＳＦでの治療は相乗的であることがわかるかもしれない。Ｍ－ＣＳＦでの初期の治療［第２の３カ月、好ましくは、妊娠１８ないし２２週において開始し、妊娠約３６週まで継続］は最適な子かん前症の消散を生じる可能性がある。

本発明方法において、Ｍ－ＣＳＦおよび／または他の因子を既知手段により投与してもよい。投与は全身的、例えば、非経口的であるべきである。好ましい投与モードは皮下からであり、好ましくは、１日１回をこえない。治療上有効量は全身的な毒性反応を起こすには不十分であるが、所望の治療的応答を誘導するには十分な量であるべきである。かかる処方に関する実際の投与規則は、薬剤の作用に変化を及ぼす種々の因子、例えば、患者の症状、体重、性別ならびに食事、投与因時期、および疾病の徴候の程度を担当医が考慮することにより決定されるであろう。

一般的には、治療上有効量のＭ－ＣＳＦ、すなわち、血清Ｍ－ＣＳＦレベルを上昇させて正常範囲にするに十分な量は、約１～２００μｇ／ｋｇ／日の範囲、あるいはより好ましくは、約５～１５０μｇ／ｋｇ／日の範囲であると考えられる。本発明方法は医薬組成物の連続投与を包含しうる。かかる連続は、約７ないし約２１日にわたってもよい。１またはそれ以上の連続投与を行ってもよい。

ＩＬ－１１が投与される好ましい具体例において、治療上有効量のＩＬ－１１は約１～１００μｇ／ｋｇ／日の範囲、あるいはより好ましくは、約１～５０μｇ／ｋｇ／日の範囲であると考えられる。好ましくは、ＩＬ－１１を皮下投与する。

一般的には、まず、用量範囲の下端から開始し、次いで、正の効果が観察されるまで、前以て選択された治療コースの間、用量を増加させていく。その後、生じ得る悪影響を考慮に入れながら、効果の相応な上昇が得られるレベルまで用量を小刻みに増加させる。本発明方法を用いる静脈または皮下投与による治療の期間および回数は、疾病の重さ、または治療すべき増殖因子の欠乏および各患者の状態ならびに生じ得る特有の応答により変化させられるであろう。Ｍ－ＣＳＦの各静脈投与期間は１２ないし２４時間の範囲の連続投与であろう。最終的には、担当医が、本発明方法を用いる治療の適切な期間を決定するであろう。

遺伝子治療については、本発明におけるサイトカイン投与に適する好ましい細胞タイプは栄養膜である。上述のごとく、栄養膜は、妊娠期間における子宮および／または胎盤において活性のある独特の細胞タイプである。

実施例

実施例１．　栄養膜細胞の培養

承諾をしている正常な妊娠女性および子かん前症の女性から分娩時に胎盤標本を得る。クリマン（Kliman）ら、エンドクリノロジー（Endocrinilogy）、第１１８巻：１５６７～１５８２頁（１９８６年）の変法に従って、正常および子かん前症妊娠のヒト・胎盤から単離した栄養細胞の１次細胞培養を確立する。

（１日目）胎盤を得て、無菌的方法で維持し、冷ＰＢＳですすぐ。胎盤の母親側から数個の胎盤切片（２０グラム）を取り、滅菌済みペトリ皿に置き、冷滅菌済みＰＢＳですすぎ血餅を除去する。外科用メスを用いて栄養膜細胞を結合組織物質から分離する。ペトリ皿の蓋をして細胞を秤量し、５０ｍｌのトリプシン溶液を添加する。

（２日目）４℃で一晩置いた後、細胞を、トリプシンとともに０．０１％ＤＮａｓｅＩ（

乾燥粉末）と混合し、ウォーターバス中３７℃で１５分インキュベーションする。５０ｍｌ溶液あたり子ウシ胎児血清（ＦＣＳ）２０％を含有するＤＭＥＭ１０ｍｌを添加し、１分間放置する。溶液を濾過（２０ミクロン）し、次いで、滅菌済みギブコ（Gibco）社製フラスコ中に注ぐ。溶液を振盪することにより細胞を懸濁する。最後に、パーコール（Percoll）グラジエントにより細胞を遠心分離する。

フィブロネクチン被覆プラスチック上の２０％ＦＣＳ補足ＤＭＥＭ中で、または細胞接着を促進するためにビトロネクチン含有内皮細胞プレーティング培地（ギブコ（Gibco）社製）を用いた後、内皮細胞増殖培地（ギブコ社製）中で、栄養膜細胞を培養する。これらの細胞はほんのわずかしか増殖活性を示さないので、継代培養は実行できないが、新鮮な単離栄養細胞の凍結は可能である。いくつかの細胞の凍結により、同様の条件で得られた細胞に関する複数の実験が可能となる。

ＪＥＧ－３絨毛癌細胞系を、最初の３カ月の栄養膜効果のモデルとして用いてもよい。２０％ＦＣＳ補足ＤＭＥＭを用いて、ファルコン（Falcon）社製フラスコまたはヌンク（Nunc）社製マイクロタイタープレート中で、標準的な細胞培養法に従ってＪＥＧ－３絨毛癌細胞系を培養する。

ヌンク社製マイクロタイタープレートのウェルを最少必須培地で洗浄した後、培地を、Ｍ－ＣＳＦまたは適当な担体を補足した培地に変更する。細胞を２４、４８または７２時間インキュベーションし、その後、培地を取り、６００ｇで１０分間遠心分離して細胞残渣を除去する。サイトカインおよび脂肪酸代謝物に関してアッセイするまで上清を－７０℃で保存する。ＰＢＳ中４％パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、細胞形態および細胞数の評価のために染色する。

この組織学的観察結果を実施例３において報告する。

実施例２．　サイトカインおよび脂肪酸代謝物の測定

Ａ．　サイトカインに関するＥＬＩＳＡ：　市販の酵素結合免疫吸着アッセイキット（ＥＬＩＳＡ）（マサチューセッツ州ケンブリッジのジェンザイム・コーポレイション（Genzyme Corporation）製）を用いてサイトカインを測定する。アッセイは、ストレプトアビジン－ペルオキシダーゼ、および色素原としてのｏ－フェニレンジアミンとともにモノクローナル抗－ＧＭ－ＣＳＦ、－Ｇ－ＣＳＦ、－Ｍ－ＣＳＦ、または－ＴＮＦαビオチン化ヤギ・抗－ウサギ免疫グロブリンを用いる３重抗体サンドイッチである。

Ｂ．　ＴＮＦαに関するバイオアッセイ：　ＴＮＦα生物活性に関してのＬ９２９マウス・線維肉腫細胞細胞毒性アッセイを、以下のように９６ウェルマイクロタイタープレートにおいて、３系で行う。洗浄され、ＤＭＥＭ＋１０％ＦＣＳ中に再懸濁されたＬ９２９標的細胞を、密度１．０ｘ１０^{5}個／ｍｌかつ２５０μｌ／ウェルとして入れる。細胞をウェルの底に一晩付着させた後、培地を除去し、試験試料を含有する新鮮な同じ培地に置換する。３７℃で１６～１８時間インキュベーション後、ＰＢＳ中３－［４，５－ジメチルチアゾール－２－イル］－２，５－ジフェニル－テトラゾリウムブロミド（ＭＴＴ）（ミズーリ州セントルイスのシグマ・ケミカル社（Sigma Chemical Co.）製）の２．５ｍｇ／ｍｌ溶液４０μｌを各ウェルに添加する。ＭＴＴとともに３７℃で２時間インキュベーション後、上清を取り、フォルマザン結晶（反応生成物）を１００μｌのソレンソンのグリシンバッファー（Sorenson’s Glycine Buffer）で可溶化する。次いで、マイクロプレートリリーダーを用いて５５０ｎｍにおいて分光光度計でプレートを読む。ＦＣＳ対照は０．６５０～０．９００の適当な吸光度を生じるはずである。細胞毒性は、ＦＣＳ対照の％として表され、１から差し引くと細胞毒性インデックスが得られる。抗－ＴＮＦα抗体での細胞毒性の中和により該アッセイの特異性を確認する。

Ｃ．　ＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦに関するバイオアッセイ：　ＦＤＣＰ－Ｇ細胞およびアッセイ用試料の２倍系列希釈物または標準物質としての組み換えＧＭ－ＣＳＦならびにＭ－ＣＳＦを、マイクロタイタープレートにおいて、３系でインキュベーションする。２４時間のプレインキュベーション後、［^{3}Ｈ］メチルチミジンを添加する（０．５μＣｉ／ウェル）。１６～１８時間後、細胞を集め、放射活性の取り込みを１分あたりのカウント数（ｃｐｍ）として測定する。ＧＭ－ＣＳＦ活性を中和するために、栄養膜組織ととも

にインキュベーションすることにより馴化された５６３７ＣＭ培地１６０μｌとともに、あるいは対照としてＲＰＭＩ／ＢＳＡとともに、１６０μｌのＧＭ－ＣＳＦに対する中和抗体を３７℃で４時間インキュベーションする。組み換えＧＭ－ＣＳＦに関しては、１６０μｌの抗体（１０μｇ／ｍｌ）を１６０μｌの２.５ｎｇ／ｍｌ　ｒＧＭ－ＣＳＦとともにインキュベーションする。

実施例３．栄養膜細胞の評価

Ａ．細胞学的試験：　サイトカインまたは抗－サイトカイン抗体を添加して、あるいは添加せずに、細胞をプラスチック製カバースリップ（coverslips）上で増殖させる。２４、４８および７２時間のインキュベーション後、ＰＢＳ（ｐＨ７.４）中４％パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、トルイジンブルーで染色し、次いで、巨細胞形成の程度の評価をはじめとする試験を光学顕微鏡により行う。顕微鏡写真術を行って評価してもよい。

Ｂ．増殖のアッセイ：

１）ＭＴＴアッセイ［実施例２Ｂに記載］：　増殖をＦＣＳの％値として表す。

２）［^{3}Ｈ］チミジン取り込み：栄養細胞系をＰＢＳで２回洗浄し、培地を再構成する。選択されたサイトカインまたは抗体をウェルに添加する。ウェルあたり１μＣｉの濃度の［^{3}Ｈ］チミジンを試験化合物と同時に添加し、培養物を２４、４８または７２時間インキュベーションする。インキュベーション期間の終わりにセルハーベスター（cell harvester）で集めた細胞のベータカウント（bete count）から増殖応答を評価する。

Ｃ．ホルモン（ｈＣＧ）含量の分析：　β－サブユニット鎖に関する微粒子酵素免疫アッセイ（イリノイ州アボット・パークのアボット・ラボラトリーズ（Abbot Laboratories）社製）を用いて各培養物の培地中へのｈＣＧの分泌を確認する。簡単に説明すると、ならし培地の希釈試料をアルカリ性ホスファターゼに結合した抗－ｈＣＧ抗体で処理する。次いで、この酵素－抗体複合体を抗－ｈＣＧで被覆した微粒子とともにインキュベーションし、この混合物の一部をガラス線維マトリックスに移す。次いで、該マトリックスを洗浄して結合していない物質および基質を除去する。リン酸４－メチルウンベリフェリルを添加し、生じる蛍光を測定する。

Ｄ．Ｋｉ－６７／ＰＫＫＫ１での二重染色（栄養膜細胞タイプの確認）：　滅菌済みガラス製カバースリップを２４－ウェルカルチャープレート（ファルコン社製）のウェル中に置き、５００μｌの栄養膜培地または試験化合物含有培地でプレコートする。培養２４、４８または７２時間後、カバースリップをゆるやかに洗浄し、４℃で５分間アセトンで固定する。次いで、カバースリップを即座に以下のように染色する：　ＰＢＳ中でカバースリップを再水和し、ＰＫＫＫ１（細胞質中）およびＫｉ－６７（核中）（１／１０,ダコ（Dako）社製）に対するモノクローナル抗体とともに室温で３０分インキュベーションする。染色の残りをチェグリン（Chegrin）ら、「グロウス・ファクターズ・アンド・ジ・オバリー（Growth factors and the ovary）」（ハーシュフィールド（Hirshfield）編）、プレナム・プレス（Plenum Press）、ニューヨーク、２１３～２２０頁（１９８８年）記載の手順に従って行う。

Ｅ．統計学的分析：　サイトカインおよびエイコサノイドの基底レベルを表にまとめ、試験化合物によるサイトカインおよびエイコサノイドのレベルの変化を比較することにより異なる試験化合物の効果を評価する。各実験の平均値の間の相違の有意さをＡＮＯＶＡにより評価する。データを平均値±標準偏差として表す。ｐ値＜０.０５を有意と見なす。

Ｆ．インビトロ（In Vitro）およびエクスビボ（Ex Vivo）での栄養膜培養実験の結果

子かん前症の臨床的定義は妊娠の第３の３カ月における臨床的徴候および症状からなるので、最初の３カ月または第２の３カ月において得られた栄養膜を子かん前症的であるとして分類することは不可能である。それゆえ、最初の３カ月または第２の３カ月の自発流産標本を用いて、あるいは最初の３カ月の栄養膜細胞のモデルとしてＪＥＧ－３絨毛癌細胞を用いて、Ｍ－ＣＳＦおよびＧＭ－ＣＳＦとの培養実験を行った。２００Ｕ／ｍｌのＭ－ＣＳＦまたはＧＭ－ＣＳＦに応答して、７２時間のインキュベーション中において増殖が対照以上に増大した（ｐ＜０.０５）（表１）。最初の３カ月の栄養膜細胞（ｎ＝３　自

発流産標本）において増殖が用量依存的に増大した（表２）。
対照的に、第３の３カ月の正常および子かん前症妊娠由来の栄養膜は、Ｍ－ＣＳＦまたはＧＭ－ＣＳＦに対して応答を示さなかった（表３）。このことは、本願の背景のセクションにおいて引用した文献における以前の知見と矛盾しないようであった。
増殖の結果：　正常な妊娠由来の栄養膜細胞は、子かん前症妊娠由来のものよりもよく生存した（表１）。その相違は細胞培養５日目において最も顕著であった。

表１

ＪＥＧ－３絨毛癌細胞の増殖（最初の３カ月の栄養膜細胞のモデル）

	対照	Ｍ－ＣＳＦ（２００Ｕ／ＭＬ）	ＧＭ－ＣＳＦ（２００Ｕ／ＭＬ）
１日目	１００	１２４±１０．５	１２０±９．７
２日目	１４５±１０．３	１８７±１５．６	２０３±２０．１
３日目	１９７±２５．９	３４１±３７．１	３３７±４５．２

対照と比較した各値のパーセント比としてデータを表す

（１日目　増殖因子なし）

％＝値（光学密度）（１日目）ｘ１００

表２

最初の３カ月の栄養膜細胞の増殖

Ｍ－ＣＳＦ（Ｕ／ＭＬ）	対照からの変化％
２	１．７５±４．４５
２０	１１．６±４．３
２００	１６．３±５．５
２０００	３２．１±５．６

（Ｎ＝胎盤３個）

表３Ａ

正常栄養膜細胞の生存

	対照	Ｍ－ＣＳＦ（２０００Ｕ／ＭＬ）	ＧＭ－ＣＳＦ（２０００Ｕ／ＭＬ）
１日目	１００	１０４±１３．５	９５±７．２
２日目	９３±１０．７	９０±１２．３	９６±１１．２
５日目	８０±１２．８	８２±１６．０	８０±１２．９

表３Ｂ

子かん前症の栄養膜細胞の生存

	対照	Ｍ－ＣＳＦ（２０００Ｕ／ＭＬ）	ＧＭ－ＣＳＦ（２０００Ｕ／ＭＬ）
1日目	１００	９７±８.８	９７±９.０
3日目	８４±６.６	８７±１１.４	８０±１４.４
5日目	５８±１３.５	６０±１８.７	６６±１９.１

Ｇ．　Ｍ－ＣＳＦの胎盤床生検評価の結果

Ｍ－ＣＳＦ発現と子かん前症の胎盤の障害との間の関係を評価するために、正常（ｎ＝１１）および子かん前症（ＰＥ）（ｎ＝２０）妊娠由来の胎盤床生検においてＭ－ＣＳＦの分散を研究した。組み換えＭ－ＣＳＦ、α－アクチン（平滑筋のマーカー）およびマクロファージに対するモノクローナク抗体を用い、ストレプトアビジン－ペルオキシダーゼ法により、ホルマリンまたはブアン液で固定されパラフィンに埋没した標本において免疫組織学的染色を行った。正常な生検においては、栄養膜細胞層および栄養膜合胞体層の細胞はＭ－ＣＳＦ陽性であった。子宮胎盤動脈（ＵＰＡ）の壁内脈管内栄養膜細胞はかすかなＭ－ＣＳＦ染色を示し、血管はα－アクチン染色を示さなかった。ＵＰＡにおける筋肉内層増殖部位においては、Ｍ－ＣＳＦ陽性マクロファージおよび栄養膜細胞が存在した。アテローム性動脈硬化症を伴うＰＥ動脈はＭ－ＣＳＦに関しては染まらなかったが、α－アクチンに関して染まった。栄養膜細胞は血管壁には存在しなかったが、動脈周囲の栄養膜細胞層の細胞はＭ－ＣＳＦに関して陽性であった。

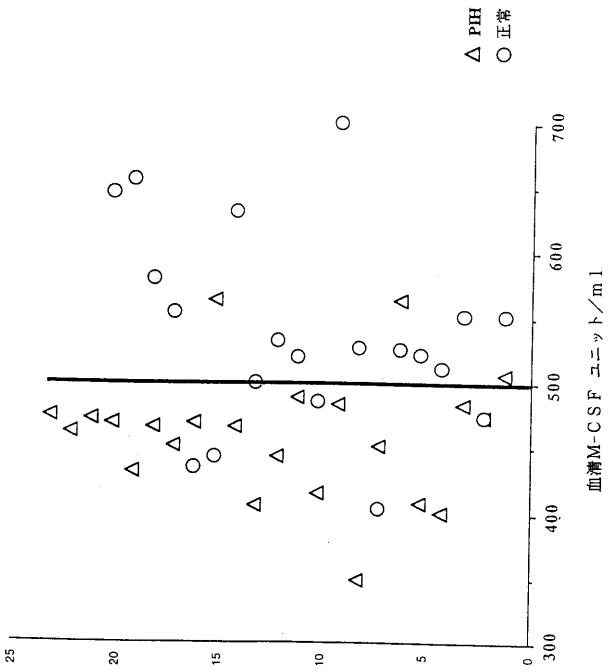
実施例４．　血清Ｍ－ＣＳＦレベルの測定、および子かん前症および／または妊娠性高血圧（ＧＨ）との相関関係

８６人の女性において、妊娠１６週目にＭ－ＣＳＦ血清レベルを測定した。最終的に、これらの患者のうち２２人はＧＨを発症し、４６人の患者は正常な妊娠であった。後にＧＨを発症した患者の平均血清Ｍ－ＣＳＦレベルは正常な妊娠の患者の平均値よりも有意に低かった。正常妊娠の患者についての平均血清Ｍ－ＣＳＦレベル５３６.１±２０.４ユニット／ｍｌと比較すると、後にＧＨまたは子かん前症を発症した患者についての平均血清Ｍ－ＣＳＦレベルは４５５.２±１０.５ユニット／ｍｌ（平均値±標準偏差）であった。この測定された相違についてのｐ値はｐ＜０.０１であり、よって、統計学的に有意であると見なす。

ＧＨを発症した２２人の患者および正常妊娠の２１人の患者についてさらなる測定値を得た。このマッチしたセットの患者に関しては、ＧＨ患者におけるＭ－ＣＳＦレベルはさらに低かった（５３０.３±１６.５ユニット／ｍｌに対して４５５.２±１０.５ユニット／ｍｌ　ｐ＜０.０００１）。血清Ｍ－ＣＳＦレベルは、妊娠期間中の最大拡張期血圧（Ｒ＝－０.４７２,ｐ＜０.０００５）および妊娠期間中の最大収縮期血圧（Ｒ＝－０.４７２,ｐ＜０.０００１）に対して逆の関係があった。２２人のＧＨ患者のうち６人は子かん前症と診断された。ＧＨでない患者はいずれも子かん前症と診断されなかった。４人の女性は最も重症の子かん前症の証拠であるＨＥＬＬＰ症候群［溶血、肝臓酵素上昇、血小板減少］にかかっていると診断された。これらの４人女性すべてが５００ユニット／ｍｌを下回る血清Ｍ－ＣＳＦレベルを有していた。図１は、妊娠１６週目に測定した血清Ｍ－ＣＳＦレベルと最終的な妊娠結果との間の関係のダイアグラムである（Δ＝ＧＨ患者（ＰＩＨ）；○＝正常妊娠患者）。

【図１】

FIGURE 1



フロントページの続き

(74)代理人 100062144
弁理士 青山 葆
(74)代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(72)発明者 キース, ジェイムズ・シー・ジュニア
アメリカ合衆国０１８１０マサチューセッツ州 アンドーバー、バイン・ストリート２８番

合議体
審判長 塚中 哲雄
審判官 弘實 謙二
審判官 星野 紹英

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K37/02