

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4011479号
(P4011479)

(45) 発行日 平成19年11月21日(2007.11.21)

(24) 登録日 平成19年9月14日(2007.9.14)

(51) Int.C1.

F 1

GO 1 N	33/573	(2006.01)	GO 1 N	33/573	A
GO 1 N	21/78	(2006.01)	GO 1 N	21/78	C
GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 4 5 Z
GO 1 N	33/545	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 7 5
GO 1 N	33/552	(2006.01)	GO 1 N	33/545	A

請求項の数 14 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-544659 (P2002-544659)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月1日 (2001.8.1)
 (65) 公表番号 特表2004-522942 (P2004-522942A)
 (43) 公表日 平成16年7月29日 (2004.7.29)
 (86) 國際出願番号 PCT/KR2001/001306
 (87) 國際公開番号 WO2002/042770
 (87) 國際公開日 平成14年5月30日 (2002.5.30)
 審査請求日 平成15年7月18日 (2003.7.18)
 (31) 優先権主張番号 2000/69283
 (32) 優先日 平成12年11月21日 (2000.11.21)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 503183673
 ソウル ナショナル ユニヴァーシティー
 インダストリー ファンデーション
 大韓民国 ソウル 151-818、クワ
 ナクターク、ボン-チュン ドン、サン 4
 -2
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 ヨーン, ボ ヒュン
 大韓民国 ソウル 137-950、セオ
 チョーク、チャムウォン-ドン、シン
 バンボ 8-チャ アパートメント #3
 05-603

審査官 竹中 靖典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断用診断試薬及びこれを含む診断キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1) 妊娠中期または妊娠中期以後に早産症状が見られない妊婦から採取した羊水のマトリックスメタロプロテアーゼ-8の濃度を測定する工程、及び
 2) 前記マトリックスメタロプロテアーゼ-8の濃度が基準値以上の場合に、早産の可能性が高いと判定する工程を含む、妊娠中期または妊娠中期以後に早産症状が見られない妊婦の早産の危険性を予測する方法。

【請求項 2】

基準値が 23 ng / ml である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

1種または2種以上の抗-マトリックスメタロプロテアーゼ-8抗体を含む請求項 1 または 2 に記載の方法に使用される診断試薬系。

【請求項 4】

1) 基材に抗-マトリックスメタロプロテアーゼ-8一次抗体を吸着させる工程、
 2) 基材に吸着した前記抗-マトリックスメタロプロテアーゼ-8一次抗体を、妊娠中期または妊娠中期以後に早産症状が見られない妊婦から採取した羊水の存在下にインキュベートした後、基材を洗浄して、結合していない抗原を除去する工程、
 3) 基材に吸着した前記一次抗体に結合したマトリックスメタロプロテアーゼ-8に、発色酵素または蛍光物質が結合された二次抗体を連結する工程、及び
 4) a) 発色酵素が結合した二次抗体が使用された場合には、発色剤を添加し、発色反

応を誘導してから吸光度を測定することにより、あるいは、b) 蛍光物質が結合した二次抗体が使用された場合には、蛍光を測定することにより、特異的な抗原抗体反応を定量分析する工程

を含む分析原理に基づく、請求項3に記載の診断試薬系。

【請求項5】

抗-マトリックスメタロプロテアーゼ-8一次抗体が、モノクローナルまたはポリクローナルである、請求項4に記載の診断試薬系。

【請求項6】

基材が、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製の96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製の96ウェルプレート及びスライドガラスからなる群から選択される、請求項4または5に記載の診断試薬系。

10

【請求項7】

発色酵素が、ペルオキシダーゼ及びアルカリフェオスファターゼからなる群から選択される、請求項4~6のいずれかに記載の診断試薬系。

【請求項8】

蛍光物質が、FITC及びTRITCからなる群から選択される、請求項4~6のいずれかに記載の診断試薬系。

【請求項9】

発色剤が、4-クロロ-1-ナフトール、ジアミノベンジジン、アミノエチルカルバゾール、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)、O-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンからなる群から選択される、請求項4~7のいずれかに記載の診断試薬系。

20

【請求項10】

請求項3~9のいずれかに記載の診断試薬系を含む、妊娠中期または妊娠中期以後に早産症状が見られない妊婦の早産危険性診断キット。

【請求項11】

基材、該基材に吸着した抗-マトリックスメタロプロテアーゼ-8一次抗体、分析用緩衝溶液、23ng/ml以上のマトリックスメタロプロテアーゼ-8の存在を検出するための発色剤または蛍光物質が結合した二次抗体、及び粘着性プレートカバーを含む、請求項10に記載の診断キット。

30

【請求項12】

発色剤が、金コロイド粒子である、請求項11に記載の診断キット。

【請求項13】

一次抗体及び二次抗体がモノクローナル抗体である、請求項11または12に記載の診断キット。

【請求項14】

蛍光物質が、FITCまたはTRITCである、請求項11~13のいずれかに記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断用診断試薬及び該診断試薬を利用する診断キットに関する。より詳細には、早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断マーカーとしての羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ-8(MMP-8)濃度の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

医学界では、今まで早産や早期破水を防止することが、その事後処理より好ましいと認識してきた。しかし、早産や早期破水は、多種多様な原因に因って誘発されるため、望まない症状の予防は困難であった。早産を防止するための従来のアプローチは、産婦人科、人口統計学及び色々な症候群の知識に基づいて特別な注意を払わなければならない高い

50

リスクの女性群を特定することであった(Main等, Am. J. Obstet. Gynecol., 1985年、第151巻、P.892-898)。しかし、このようなアプローチは、鋭敏でも特異的でもないという問題点がある。このような問題点を克服するために、突発的な早産や早期破水を予見するための生化学的なマーカーを発見するために多くの研究が続けられ、血漿エストラジオール-17ベータ、プログステロン、C-反応性蛋白質のような物質が候補に挙げられた。しかし、これらの候補は、その精度が低いことが分かった。

【0003】

このような生化学的な予見可能なマーカーの特定以外にも、早期破水の研究を通して判明した、絨毛膜が線維性結合組織で構成され、コラーゲンの含量が線維性結合組織の抗張力を決定するという事実を基に、コラーゲンの生化学的役割の研究に高い関心が集まった。一部の研究者らは、早期に破水した羊膜が正常羊膜と比較してコラーゲン含量が低いという発見に基づき、早期破水が正常羊膜より低い抗張力に起因し得ると結論づけた(Obstet. Gynecol., 1981年、第57巻、P.487-489)。他の研究によれば、早期に破水した羊膜と早産した女性の血清では、コラゲナーゼの活性が高いと報告されている(Obstet. Gynecol., 1990年、第75巻、P.84-88)。しかし、今までこのような生化学的な変化の正確な機序は明らかにされていない(FEBBs Letters, 1989年、第244(2)巻、P.315-318)。

【0004】

統計的には、妊娠37週以前に分娩する早産の発生頻度は、約8~10%と推算されている。韓国では、毎年約5万人の新生児が早産で生れている。早産は、敗血症、呼吸窮迫症候群、肺炎、気管支肺異形成症、脳室内出血、壊死性腸炎及び脳性麻痺等の深刻な新生児合併症を誘発する場合が多い。また、早産の時期が早ければ早いほど、このような後遺症(sequence)を残す可能性が高く、その程度も酷い。ゆえに、早産を予防できれば、かかる疾患により障害を受ける未熟児の発生率を顕著に減らすことができる。

【0005】

最近の報告では、早産の少なくとも30~40%が子宮内感染に関連するものであることが開示されている(Butler NR., Bonham DG., Prenatal mortality. The first report of the British perinatal mortality survey, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1963, P.115-145; Romero R., Avila C., Sepulveda W., Preterm birth. Cause, prevention, and management., McGraw-Hill社, 1993年、P.97-136 ; Romero R., Mazor M., Clin. Obstet. Gynecol., 1990年、第31巻、P.553 ; Gibbs RS., Romero R., Hiller SL., 等, Am. J. Obstet. Gynecol., 1992年、第166巻、P.1515)。

【0006】

子宮内感染は、次の過程で胎児損傷を誘発する。子宮内感染は、母体と胎児の免疫体系を活性化し、リンパ球からのサイトカイン、および好中球からのMMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)のような炎症性メディエーターが分泌される。このような炎症性メディエーターの濃度が一定レベルに到達すれば、子宮収縮を促進するプロスタグランジンが産生され、その結果分娩陣痛が誘発され早産が起きる。また、増加したレベルの炎症性メディエーターは、胎児に胎児炎症反応症候群(FIRS)を起す。成人においては、炎症性メディエーターが敗血症や急性呼吸窮迫症候群を誘発したり、自己免疫疾患の結果、臓器を損傷するのと同様に、胎児は炎症性メディエーターによって全身的に損傷を受け、脳白質病変及び気管支肺異形成症が発生する。したがって、産前に子宮内感染を診断することは、早産および胎児損傷を防止するために非常に重要である。

【0007】

一方、現在一般的に使用されている胎児の子宮内感染を産前に診断する方法としては、臍帯穿刺を行なって胎児の血中サイトカインレベルを測定する方法や臍帯の組織学的検査により臍帯炎を確認する方法が使用されている。しかし、臍帯穿刺は、侵襲的であるため利用に制限があり、臍帯炎の診断は、分娩後にだけ可能であるという問題点がある(Yoon BH., Romero R., Park JS., Kim CJ., Kim SH., Choi JH., Han TR., Am. J. Obstet. Gynecol., 2000年、第182巻、P.675-81 ; Yoon BH., Romero R., Kim KS., Park JS., Kim SH., Kim BI., Jun JK.. Am. J. Obstet. Gynecol., 1999年、第181巻、P.773-9 ; Rome 50

ro R., Gomez R., Ghezzi F., Yoon BH., Mazor M., Edwin SS., Berry SM., Am. J. Obstet. Gynecol., 1998年、第179卷、P.186-93)。

【 0 0 0 8 】

また、羊膜腔の感染や炎症のケースでは羊水内の白血球の数が増加する。羊水内の好中球は、胎児に由来すると考えられる(Knauper V., Kramer S., Reinke H., Tschesche H., Eur. J. Biochem., 1990年、第189巻、P.295-300；Blaser J., Triebel S., Maasjost husmann U., Romisch J., KrahI-Mateblowski U., Freudenberg W., Fricke R., Tschesc he H., Clinic. Chim. Acta., 1996年、第244巻、P.17-33；Segura-Valdez L., Pardo A., Gaxiola M., Uhal BD., Becerril C., Selman M., Chest., 2000年、第117巻、P.684 -94；Romanelli R., Mancini S., Laschinger C., Overall CM., Sodek J., McCulloch CA., Infect. Immun., 1999年、第67巻、P.2319-26；Maymon E., Romero R., Pacora P., Gomez R., Athayde N., Edwin S., Yoon BH., Am. J. Obstet. Gynecol., 2000年、第183巻、P.94-9)。従って、羊水内の好中球の分泌産物が、胎児の炎症反応を反映し得ると考えられる。本発明者では、羊水内MMP-8のレベルに注目した。羊水内MMP-8の定量は、現在、分娩後の臍帯の組織学的検査、または胎児の血中サイトカインを測定する臍帯穿刺によって診断可能な胎児炎症反応症候群のマーカーとなることができる。

〔 0 0 0 9 〕

集合的に、マトリキシンとしても知られているMMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)群は、細胞外基質蛋白質を分解する機能を有する亜鉛含有エンドペプチダーゼである。これらのプロテアーゼは、類似の構造及び酵素機能を持った蛋白質で構成される大きな一群を形成する。MMPは、大きく5群に区分される。MMP-8は、MMP-1、MMP-13と共に間質コラゲナーゼ群に属する。MMP-8は、他の間質コラゲナーゼと大きさは類似しているが、ずっと多くグルコシル化されている。完全にグルコシル化された場合、MMPのプロ酵素形態は、85 kDaの分子量を持っている。前記プロ酵素は、15~25kDaの断片が消失し60~70kDaの活性形態に転換される。プロMMP-8は、*in vitro*でトリプシン、キモトリプシン、カテプシンGのような多様な蛋白質分解酵素によって活性化される。また、有機水銀化合物がプロMMP-8を活性化させることが発見された。*in vivo*でのMMP-8の活性化機序は、いまだに完全に明らかにされてない。

【 0 0 1 0 】

MMP-8に対する先行技術としては、MMP-8に対するモノクローナル抗体に基づく、鋭敏かつ特異的に歯周疾患を診断できる方法および試験キットが、米国特許 第5,736,341号に開示されている。該特許には、MMP-8が歯周炎の進行する間、歯周結合組織の崩壊に直接関係し、歯肉溝液を含む歯肉ポケットを介して口腔内に拡散するため、口腔内のMMP-8の濃度を測定することによって部位特異的に歯周炎を診断できることが開示されている。進行中の歯周疾患を生化学的に特異的かつ鋭敏に検出するために、これらの方法は、プロ型のMMP-8の活性形態への変換を測定する。なぜなら、この変換が歯周感染の過程の最中に生じるからである。しかし、早産ならびに胎児感染及び損傷に関してMMP-8を使用した例は、まだ報告されたことがない。

【 0 0 1 1 】

一方、MMP-8とは異なる群に属する別のマトリックスコラゲナーゼ(matrix collagenase)であるMMP-9に基づいて、早期破水の発生を予見する方法が、米国特許第5,641,636号に示されている。MMP-9は、92kDaのIV型コラゲナーゼ/ゼラチナーゼまたはゼラチナーゼBであり、MMP中最も分子量が大きい。MMP-9のプロ酵素形態、即ちプロMMP-9は活性化するために、まず開裂し、約83kDaの中間活性形態及び9kDaの非活性開裂断片を同時に生成する。前記中間活性形態は蛋白質分解によってさらにプロセッシングされ、67kDaのMMP-9の活性型になる(J. Biol. Chem., 1992年、第267(30)巻、P.21712-21719)。MMP-9の活性化とは、83kDaの中間活性形態またはゼラチン分解活性を持った67kDaの完全活性型への変換を意味する。早期破水を診断するために、前記特許は、変性したコラーゲン、例えばゼラチンを分解するMMP-9の加水分解活性を測定する。しかし、MMP-9は、分娩開始前にすでに羊水中に存在するために、この方法は早期破水を予見するには、限界がある。

【0012】

早期陣痛または早期破水患者の約30~40%が早産を経験する。このような場合、インターロイキン-6、インターロイキン-8、TNF-、インターロイキン-1、GRO、RANTES、白血球、MIP-1、MCP-1、グルコース、PGE₂及びアンギオゲニン等の多様な物質が、羊水内に高濃度で存在することが知られている。しかし、これらの物質は、早期陣痛の臨床兆候がない妊婦の羊水中では変化しないか、検出されず、そして早期陣痛または早期破水の発生後にのみその濃度が増加するため、早産の予測には有用性が低い。

【0013】

【特許文献1】米国特許第5,736,341号

【特許文献2】米国特許第5,641,636号

10

【0014】

発明の要約

胎児の血中サイトカインを測定する臍帯穿刺の侵襲性の問題点および胎児臍帯の組織学的検査によって分娩後に臍帯炎を確認するという問題を解決するために、本発明者らは、早産、胎児感染及び胎児損傷を予測するための集中的かつ広範囲の研究を行ない、その結果、早産または早期破水の臨床兆候が見られない妊婦の羊水中においても、かかる兆候を示す妊婦と同様にMMP-8の活性が検出されることを発見し、これにより、早産、胎児感染及び胎児損傷を診断できる方法及びキットを開発した。

【0015】

ゆえに、本発明の目的は、新生児罹患(neonatal morbidity)及び脳性麻痺のような深刻な合併症および後遺症を予防できるように、早産または早期破水の臨床兆候を有する、または有しない妊婦において早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための方法及びキットを提供することである。

20

【0016】

本発明の要素の1つとして、早期陣痛または早期破水の臨床兆候が見られる、またはみられない妊婦の羊水中のMMP-8のレベルを測定することによって、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための方法を提供する。

【0017】

本発明の別の要素としては、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための診断試薬系及びキットが提供される。

30

【0018】

本発明の詳細な説明

一態様において、本発明は、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断するための羊水中MMP-8の活性測定に関する。

【0019】

MMP-8は、細胞外基質蛋白質を分解する活性を持っている亜鉛依存性のエンドペプチダーゼである。間質コラゲナーゼ群に属するMMP-8は、プロ酵素形態(プロMMP-8)で好中性白血球から精製され得る。プロMMP-8は、高度にグリコシル化されており、約85kDaの分子量を有する。プロ酵素の活性化は、プロ酵素分子の開裂によって起こり、活性化様式に依存して60~70kDaの分子量の活性コラゲナーゼが生成される。in vivoでのMMP-8の活性化機序には、水酸化ラジカルのような反応性酸素種及びオキシダントが関与すると考えられる。その結果として、プロコラゲナーゼのN-末端部分が除去され前記酵素の活性部分が生成され露出する。

40

【0020】

MMP-8は、好中性白血球によってプロ酵素形態として(プロMMP-8)產生される。プロMMP-8は、顆粒内に貯蔵された状態で存在し、刺激を受けると分泌される。分泌されたプロMMP-8は、細胞外間質で活性化され、I、IIおよびIII型コラーゲンを分解する。I型コラーゲンに対する特異性が高い。炎症に関連した組織損傷の主要なメディエーターとして知られているこの酵素は、歯周炎、慢性閉塞性肺疾患、リューマチ性関節炎等の炎症性疾患による組織損傷にも関与する。さらに、MMP-8は、子宮頸部の展退および開大を誘発して分娩

50

の進行に関与するものとして知られている。

【0021】

本発明者らは、早期陣痛または早期破水の症状が見られる女性およびみられない女性の両方で、妊娠中期のMMP-8の高い羊水内濃度が、早産する可能性が高いことを示すという発見に基づき、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断する方法を開発した。

【0022】

本発明の一態様にしたがって、
1) 妊婦から羊水を採取する工程、及び
2) 羊水試料中のMMP-8を定量する工程からなる、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に検査する方法が提供される。

【0023】

早期陣痛または早期破水等の早産症状が見られる女性だけではなく、このような症状が見られない女性について早産を診断できる。

【0024】

羊水の採取は、超音波ガイド下で経腹的羊水穿刺によって行うか、または他の採取方法によって行うことができる。羊水内MMP-8レベルを定量するために、抗原抗体結合を原理とする全ての分析方法を使用でき、ELISA(酵素結合免疫吸着法)が好ましい。

【0025】

MMP-8が妊娠中期において早産を予測するための強力な臨床的指標として作用するかどうかを確認するために、早産の兆候が何も見られない妊娠中期に羊水穿刺を受けた後、妊娠32週前に自然早産した妊婦または満月分娩した妊婦のMMP-8の羊水内濃度を、別の優れた炎症マーカーであるIL-6のものと比較した。早産した妊婦においてMMP-8およびIL-6の羊水内濃度は有意に高かった。羊水内MMP-8の濃度が、23ng/mlより高い患者は、図1に見られるとおり89%のケースで自然早産した。また、統計的に比較した場合に、早産を予測する敏感度および特異度において、MMP-8がIL-6より優秀だった。敏感度、特異度及びオッズ比を全体的に考慮し、早産予測のための羊水内MMP-8レベルの好適な基準値として23ng/mlを選択した。

【0026】

基準値より高い妊娠中期の羊水MMP-8濃度は、妊娠32週以内に早産する危険性が高いことを示す。したがって、妊娠中期に染色体検査のための羊水検査をする場合、羊水内MMP-8レベルを測定しておくことは早産が起り得る患者を特定するのに有用である。

【0027】

胎児感染及び胎児損傷を診断するための臨床的な予測指標としてのMMP-8の有用性を立証するために、妊娠週数が36週未満の単胎児を羊水検査の72時間以内に早産した妊婦から採取した羊水を、好気性菌、嫌気性菌及びマイコプラズマについて培養し、羊水内MMP-8濃度をELISAで測定した。出産後に、胎盤の組織学的検査を行なった。羊水培養が陽性の患者は、陰性の妊婦よりMMP-8の濃度が有意に高いことを観察した。また、胎盤に組織学的な絨毛膜炎がある場合は、それがない場合より羊水内MMP-8レベルが、有意に高かった(表1～表4参照)。

【0028】

前記結果から、羊水が菌に感染した場合には、羊水内MMP-8レベルが有意に増加するため、それを測定することによって子宮内感染を診断できることを確認した。組織学的な絨毛膜炎に關しても、やはり羊水内MMP-8レベルが有意に増加するため、羊水内MMP-8レベルを測定することによって子宮内感染を確認できる。結論として、MMP-8は早産だけではなく子宮内感染及び炎症を産前に診断するための効果的な臨床指標として使用できる。特に、羊水内MMP-8レベルの定量化により、さらに高い特異度と陽性予測値をもって子宮内炎症を診断できる。

【0029】

胎児感染を直接診断するために、臍帯炎の発生の有無に従ってMMP-8の羊水内濃度を比較した。

【0030】

胎児炎症反応症候群(FIRS)は、全身の色々な器官に影響を及ぼす疾患であり、早産が起きる可能性が高く、新生児にも色々な合併症や後遺症が発病する可能性が高い。臍帯の炎症(臍帯炎)は、このようなFIRSの組織学的証拠として考えられていて、脳性麻痺の発病とも関連性が高いものとして知られている。羊膜腔で発見される好中球は、胎児から由来する。このような事実に着眼して、好中球からの分泌産物がFIRSの指標になるだろうと推論されている。前記仮説を試験するために、羊水内マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-8)と臍帯炎の間の相関関係を調査した。

【0031】

臍帯炎がある場合には、臍帯炎が無い場合よりMMP-8の濃度が有意に高いことが観察された。臍帯炎に対するMMP-8の診断能力もまた、非常に高い特異度、敏感度及び陰性予測値を示すことを確認した(表5及び表6、図3及び図4参照)。

10

【0032】

このような結果から、羊水内MMP-8の濃度が胎児炎症(臍帯炎)と密接な関連を有することが見出された。したがって、本発明は、既存の侵襲的な胎児血液採取を行うことなく、羊水内MMP-8の濃度を測定することによって胎児感染の診断を補助し得ることを示している。

【0033】

羊水内MMP-8の濃度と胎児感染との間の相関関係についての証拠により、本発明者らは、羊水内MMP-8の濃度と新生児敗血症、呼吸窮迫症候群、肺炎、気管支肺異形成症、壊死性腸炎及び脳室内出血等の新生児罹患との関係を調査した。新生児罹患がある場合に、新生児罹患がない場合よりMMP-8の濃度が有意に高いことを確認した(表7参照)。MMP-8の新生児罹患の特定における診断能力もまた特異度、陽性及び陰性予測値において優れていた(表7及び表8参照)。また、新生児敗血症の新生児を出産した妊婦においては、新生児敗血症がない新生児を出産した妊婦より羊水内MMP-8の濃度が有意に高かった($p < 0.05$)(表9参照)。

20

【0034】

データは、総合すると、羊水内MMP-8の濃度が新生児敗血症及び周産期罹患(perinatal morbidity)を予測できる診断マーカーとして有用であり得ることを示している。

【0035】

30

子宮内感染または炎症は、脳性麻痺の主要原因として知られている。FIRSは、満月児および早産児で胎児の脳損傷を誘発するものと考えられている。好中球は、子宮内感染の場合に、羊水に最も頻繁に集まる細胞であり、胎児から由来すると考えられる。下記の例2及び3で示すように、活性化された好中球から分泌される酵素であるMMP-8の羊水内濃度は、子宮内感染または炎症の場合に有意に増加することが見出された。このような結果に基づいて、羊水内のマトリックスメタロプロテアーゼ-8(MMP-8)の増加した濃度と脳性麻痺と診断された生後3歳の患者との関連性の有無を決定するための調査を行なった。

【0036】

その結果、脳性麻痺が発生していない新生児を分娩した妊婦に比べて、脳性麻痺が誘発された新生児を分娩した妊婦から採取された羊水内のMMP-8濃度は、有意に高かった(図5参照)。これは、MMP-8が脳性麻痺の予測のための診断マーカーとして極めて有用であることを立証するものである(図5及び図6、表11参照)。

40

【0037】

このような結果から、羊水内の高いMMP-8濃度は、脳性麻痺を発症する可能性が6倍高いことと関連することが分かった。言い換えれば、羊水内MMP-8の濃度は、脳性麻痺を予測するための産前診断マーカーとして有用に使用できる。

【0038】

前記結果を通して、本発明では、早産、胎児感染及び胎児損傷を特定するための羊水内MMP-8の好ましい基準値を選択した。このような側面から、羊水内MMP-8の基準値が、5~100ng/ml以上の場合、好ましくは、10~50ng/ml以上の場合、妊婦は早産、新生児罹患、胎

50

児感染(臍帯炎)及び脳性麻痺の危険性があると診断された。

【0039】

早産、胎児感染及び胎児損傷を診断する診断マーカーとしての羊水内MMP-8濃度の有用性に基づいて、早産、胎児感染及び胎児損傷を診断できる診断試薬系を開発できる。

【0040】

従って、本発明の別の態様において、羊水内MMP-8濃度の測定に基づいて、早産、胎児感染及び胎児損傷を診断するための診断試薬系を提供する。

【0041】

詳細には、診断試薬系は、下記の工程を含む分析機序を利用して達成される。

- 1) 基材にMMP-8 1次抗体を吸着させる工程、
- 2) 基材に結合した前記MMP-8 抗体を羊水の存在下インキュベートし、基材を洗浄して結合していない抗原を除去する工程、
- 3) 基材に吸着した前記1次抗体に結合し、MMP-8と、発色酵素または蛍光物質が結合した2次抗体とを連結させる工程、及び
- 4) 抗体に結合したMMP-8の量を定量分析するために、発色剤を使用して基材内で発色反応を誘導する工程。

【0042】

工程1の有用な基材としては、ニトロセルロース膜、ポリビニル樹脂製の96ウェルプレート、ポリスチレン樹脂製の96ウェルプレート及びスライドガラス等が使用できる。

【0043】

定量分析のために、1次抗体に結合したMMP-8と結合する2次抗体は、ペルオキシダーゼ、アルカリフェオヌクターゼ及びビオチンのような発色酵素、またはFITC(フルオレセインイソチオシアネート)及びTRITCのような蛍光物質と連結する。

【0044】

前記発色剤は、4CN(4-クロロ-1-ナフトール)、DAB(ジアミノベンジジン)、AEC(アミノエチルカルバゾール)、ABTS(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))、OPD(o-フェニレンジアミン)及びTMB(テトラメチルベンジジン)からなる物質群から選択できる。

【0045】

原則として、前記診断は、MMP-8とその抗体との反応を利用した、羊水内MMP-8濃度の測定に基づいている。このために、モノクローナルまたはポリクローナル抗-MMP-8抗体を固体基材に固定化させて、試料内のMMP-8と反応させた後に、未結合抗体とMMP-8を除去するために基材を洗浄する。その後、酵素または蛍光体と連結したモノクローナルまたはポリクローナル2次抗体を固定化されたMMP-8に結合させる。西洋ワサビペルオキシダーゼポリクローナル抗体またはビオチン化ウサギポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が一般的に2次抗体に使用される。ここに過酸化水素及び発色剤を加えると発色反応が起き、視覚化される。酸を添加して発色反応を停止させた後、450nmで吸光度を測定する。

【0046】

前記診断機序に基づいて、同様の診断試薬系を使用する診断キットが構成できる。

【0047】

従って、本発明のさらに別の態様において、早産、胎児感染及び胎児損傷を確認および予測するための診断キットを提供する。該診断キットを利用すれば、早期陣痛、早期破水を都合よく定量的または定性的に診断できる。前記MMP-8抗原の分析のために、抗-MMP-8抗体に金またはコロイド粒子等を結合させてマーカー抗体を作製できる。MMP-8に対するマーカー抗体は、MMP-8と結合して免疫複合体を形成する。該免疫複合体を再びMMP-8抗体と反応させ、その後、一般的に尿素等でできた過剰のマーカー抗体洗浄液を添加する。MMP-8濃度がある水準以上の場合には、陽性結果を目視できる。このような診断キットには、抗-MMP-8抗体、標準MMP-8、基材、分析用緩衝溶液、発色酵素または蛍光物質で標識された2次抗体及び粘着性プレートカバー等が含まれ得る。

【0048】

10

20

30

40

50

あるいは、本発明の前記診断キットは、生物学的マイクロチップを利用した自動化された分析方法を利用できる。例えば、前記診断キットは、抗-MMP-8抗体をコーティングしたスライドガラス等を利用して免疫プロッティングを行なうように構成できる。このような診断キットは、抗-MMP-8抗体が表面に固定された生物学的マイクロチップ、適切な緩衝溶液、標準MMP-8及び2次抗体等を含み得る。

【0049】

例

下記の例を基に本発明をより詳細に説明する。但し、本発明の内容は下記の例に限定されるものではない。

【0050】

10

例 1：産前早産検査のための診断基準値の選定

慢性子宮内感染が早産の原因であることを種々の証拠が示している。本例では、MMP-8およびインターロイキン-6(IL-6)の羊水内濃度が早産の臨床兆候のない妊婦のうち、自然早産の危険性がある妊婦を特定するのに使用できるかどうかを調査した。

【0051】

そのために、染色体検査のために妊娠中期に羊水検査を行なった妊婦から得られた、羊水が保管されたケースを対象に患者対照研究を行なった。つまり、妊娠32週以前に自然早産した19例の患者と満月に正常新生児を分娩した95例の対照群でMMP-8とIL-6の羊水内レベルをELISAで測定した。この時、染色体検査結果が異常か、または胎児に主要な奇形が発見された場合は、分析対象から除外した。

20

【0052】

その結果、自然早産した患者の羊水内MMP-8の平均濃度は、3.1[0.3-1954.9]ng/mlである一方、対照群では1.3[<0.3-45.2]ng/mlだった。また、自然早産した患者の羊水内IL-6の平均濃度は、0.32[0.04-2.52]ng/mlである一方、対照群では0.18[0.01-1.81]ng/mlだった。図1に示すとおり、妊娠中期の羊水内MMP-8およびIL-6の濃度は、いずれも自然早産した患者の場合に満月分娩した対照群より有意に高かった($p < 0.01$)。

【0053】

また、早産した患者と対照群のMMP-8の濃度を比較した結果、妊娠中期の羊水内MMP-8の濃度が23ng/ml以上の場合には、前記患者の89%が自然早産した。

【0054】

30

さらに、図2に示すとおり、染色体検査のために羊水検査を行なった後に早期早産した患者を特定するに際して、妊娠中期の羊水内MMP-8の基準量を23ng/mlとした場合、早産を診断する敏感度は42%(8/19)、特異度は99%(94/95)であり、一方IL-6の基準値を0.6ng/mlとした場合、敏感度は42%(8/19)、特異度は92%(87/95)だった。よって、MMP-8がIL-6より早産の確認及び予測のための敏感度、特異度及びオッズ比について優れていた。結果的に、23ng/mlの羊水内MMP-8の濃度を未熟児の確認の為の基準値に選定した。

【0055】

例 2：MMP-8の羊水内濃度と子宮内感染及び炎症の関係

羊水内MMP-8の濃度を子宮内感染及び胎児損傷を予測するための診断マーカーとして使用できるかどうかを決定する為に、子宮内感染および炎症がある場合と無い場合について羊水内MMP-8濃度を調査した。

40

【0056】

そのために、ソウル大学病院(ソウル、韓国)で単胎児を早産し(妊娠週数 < 36週)、早産前72時間以内に羊水検査を受けた妊婦255名を対象に選定した。羊水を対象に好気性および嫌気性菌ならびにマイコプラズマの培養だけではなくMMP-8濃度を測定した。さらに、胎盤の組織学的検査を行なった。この時、超音波ガイド下で経腹部羊水穿刺により羊水を採取した。

【0057】

2-1：羊水培養

経腹部羊水穿刺による採取の直後、羊水をフタ付滅菌プラスチック容器に入れ、嫌気性

50

及び好気性菌の為の培地で培養する前まで保管した。好気性及び嫌気性菌培養に有用な培地は、血液寒天、マッコンキー寒天、バクテック6Aバイアル、チオグリコレート培地、ブルセラ血液寒天、新鮮肉抽出物ならびに馬血清ペニシリンポリミキシンB及びアンホテリシンB等を添加したPPLO培地である。また、マイコトリムGU等を使用してマイコプラズマを培養した。

【0058】

2-2：羊水内MMP-8濃度の測定

羊水試料を700 x gで10分間遠心分離した。重複しないエピトープに結合する二種のモノクローナル抗体を利用したELISA(Amersham pharmacia biotech, UK)で上清の羊水内MMP-8の濃度測定を行なった。

10

【0059】

2-3：胎盤の組織学的検査

分娩後胎盤が完全に取り出された後、臍帯、絨毛膜板及び胎盤膜から摘出した組織を10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋して、スライドを製作した。その後、組織切片をヘマトキシリンおよびエオジンで染色して顕微鏡で観察した。急性子宮内炎症は、羊膜、絨毛膜、脱落膜及び絨毛膜板中いずれかの組織に炎症性変化が観察された場合と定義した。

【0060】

羊水培養の結果、対象255名中45名が陽性と判別され、これは子宮内感染の頻度が18%であることを示している。胎盤の組織学的検査の結果、113名が絨毛羊膜炎と判別され、これは子宮内炎症の頻度が44%であることを示している。羊水内MMP-8の平均濃度は、羊水の菌培養が陽性だった患者の場合は、191.4ng/mlであるのに対し、結果が陰性の患者の場合は、2.7ng/mlだった。したがって、子宮内感染患者の羊水内MMP-8の平均濃度は、子宮内感染がない妊婦より有意に高かった($p < 0.001$)。その結果を下記表1に示す。

20

【0061】

【表1】

〈表1〉羊水培養の結果による羊水内MMP-8の濃度

羊水中の細菌	平均値(ng/ml)	範囲(ng/ml)
陽性	191.4	< 0.3-4202.7
陰性	2.7	< 0.3-3929.0

30

【0062】

23ng/mlを基準値にした場合、MMP-8の診断能力は、羊水培養の陽性結果について76%の敏感度および93%の陰性予測値と優れていた。その結果を下記表2に示す。

【0063】

【表2】

〈表2〉羊水培養の陰性結果についてのMMP-8の診断能力

40

敏感度	76%
特異度	70%
陽性 予測値	35%
陰性 予測値	93%

【0064】

胎盤の組織学的検査結果では、絨毛羊膜炎がある場合は、羊水内MMP-8の平均濃度が160.9ng/mlであり、絨毛羊膜炎がない場合には1.0ng/mlだった。絨毛羊膜炎を有する患者は、絨毛羊膜炎がない患者より羊水内MMP-8濃度が有意に高かった($p < 0.001$)。その結果を

50

下記表3に示す。

【0065】

【表3】

〈表3〉 子宮内炎症による MMP-8 の濃度

組織学的 紺毛羊膜炎	平均値(ng/ml)	範囲(ng/ml)
有	160.9	<0.3~4202.7
無	1.0	<0.3~766.2

10

【0066】

23ng/mlを基準値にした時、MMP-8の診断能力は、子宮内炎症(紺毛羊膜炎)に対し72%の敏感度、89%の特異度、84%の陽性予測値及び80%の陰性予測値と優れていた。その結果を下記表4に示す。

【0067】

【表4】

〈表4〉 子宮内炎症に対する MMP-8 の診断能力

敏感度	72%
特異度	89%
陽性 予測値	84%
陰性 予測値	80%

20

【0068】

例3: 羊水内 MMP-8 の濃度を利用した臍帯炎診断

羊水内 MMP-8 の濃度を測定することによってより直接的に胎児感染を診断できるかどうかを決定するために、臍帯炎発症に有無により羊水内 MMP-8 の濃度を比較した。

【0069】

ソウル大学病院(ソウル、韓国)で単胎児を早産し(妊娠週数 < 36週)、早産前72時間以内に羊水検査を受けた妊婦255名を対象に、臍帯炎の発症と MMP-8 の羊水内濃度との関係を調査した。臍帯血管壁またはワルトンゼリー(Wharton jelly)内の好中球浸潤により臍帯炎を診断した。MMP-8 の濃度測定は、例2と同様の方法で行なった。

30

【0070】

その結果、59名で臍帯炎が診断された(臍帯炎の頻度は23%)。これらの羊水内 MMP-8 の平均濃度は、臍帯炎がある場合には433.7ng/mlである一方、臍帯炎がない場合には1.9ng/mlであった。ゆえに、臍帯炎がある患者では、ない場合より羊水内 MMP-8 平均濃度が有意に高かった($p < 0.001$)。前記結果を下記表5及び図3に示す。

【0071】

【表5】

〈表5〉 臍帯炎の有無による MMP-8 の濃度

40

臍帯炎	平均値(ng/ml)	範囲(ng/ml)
有	433.7	1.5~3836.8
無	1.9	<0.3~4202.7

【0072】

羊水分析によって臍帯炎を診断するための羊水検体の基準値を決めるために、受診者動作特性曲線分析を行なった。その結果、図4に見られるとおり、臍帯炎診断の敏感度と陽性予測値を全て考慮して、MMP-8 の基準値に23ng/mlを選択した。これを基準(基準値23ng/

50

ml)に、MMP-8の臍帯炎に対する診断能力を確認した結果、敏感度90%、特異度78%及び陰性予測値96%と優れていた。その結果を下記表6に示す。

【0073】

【表6】

〈表6〉臍帯炎に対するMMP-8の診断能力

敏感度	90% (53/59)
特異度	78% (153/196)
陽性 予測値	55% (53/96)
陰性 予測値	96% (153/159)

10

【0074】

例4：羊水内MMP-8の濃度を利用した新生児罹患診断

本発明者らは、敗血症、肺炎、気管支肺異形成症、壊死性腸炎及び脳室内出血等の新生児の感染に関連した合併症の危険性の増加と臍帯炎とが関連すると推定して、前記の新生児罹患があるケースの羊水内MMP-8の濃度と正常なケースの羊水内MMP-8の濃度とを比較した。

【0075】

ソウル大学病院(ソウル、韓国)で単胎児を早産し(妊娠週数 < 36週)、早産前72時間以内に羊水検査を受けた妊婦239名を対象に選定して、前記新生児罹患の発生とMMP-8の羊水内濃度の関係を調査した。新生児罹患は、敗血症、肺炎、気管支肺異形成症、壊死性腸炎及び脳室内出血等の新生児合併症が一つでも観察される場合と定義した。分娩後72時間以内で血液培養が陽性である場合に、先天性新生児敗血症と診断した。呼吸時雜音及び胸隔収縮があり、酸素要求量が増加し($FiO_2 > 0.4$)、他の肺疾患の証拠なしに臨床病理検査上または放射線検査上に特徴的な所見がある場合を新生児呼吸困難症候群と診断した。肺炎は、生後7日以内の気管吸引物または胸腔チューブ試料からの培養が陽性であってもなくても、臨床的に、または放射線学的に明白な所見がある場合、これを肺炎と診断した。

20

【0076】

Bancalari等が定義したように(1)生後1週間の間、最少3日以上、間欠的陽圧換気が要求され、(2)生後28日以上頻呼吸、肋間または肋骨下陥没及び聴診上の呼吸性雜音を特徴とする、慢性呼吸疾患に進行する臨床症状があり、(3)生後28日以上、50mmHg以上の PaO_2 を維持するために追加の酸素の供給を必要とし、(4)胸部放射線所見で両側の肺に線状の陰影があり、正常なまたは増加した低吸収域が交互に現れる場合に気管支肺異形成症と診断した。

30

【0077】

幾つかのケースでは、剖検によって気管支肺異形成症を診断した。脳室内出血は、McNenamin等の定義にしたがい診断した。最少24時間以上、腹部膨満と摂食困難(feeding intolerance)があり、放射線学的に腸壁内空気、腸破裂、および胎便閉鎖症候群の所見があり、または手術もしくは剖検所見で壊死性腸破裂がある場合に、これを壊死性腸炎と診断した。羊水内MMP-8の濃度測定は、前記例2と同様な方法で測定した。

40

【0078】

その結果、対象239名中107名(頻度45%)で新生児罹患の発病が診断された。羊水内MMP-8の平均濃度は、主要な新生児罹患がない場合には2.35ng/mlと測定された一方、新生児罹患がある場合には17.0ng/mlと測定され、有意に高かった($p < 0.001$)。詳細な結果を下記表7に示す。

【0079】

【表 7】

〈表 7〉 新生児罹患の有無による MMP-8 の濃度

新生児 罹患	平均値(ng/ml)	範囲(ng/ml)
有	17.0	< 0.3-4202.7
無	2.35	< 0.3-1333.1

【0080】

羊水検体で新生児罹患を診断するための基準値を決めるために、受診者動作特性曲線分析を行なった。その結果、新生児罹患診断の敏感度と陽性予測値を全て考慮して、MMP-8 の基準値に23ng/mlを選択した。MMP-8(基準値23ng/ml)の新生児罹患に対する診断能力を確認した結果、特異度(77%)、陽性予測値(63%)及び陰性予測値(65%)と優れていた。その結果を下記表8に示す。

10

【0081】

【表 8】

〈表 8〉 新生児罹患に対する MMP-8 の診断能力

敏感度	50%
特異度	77%
陽性 予測値	63%
陰性 予測値	65%

20

【0082】

また、敗血症が発生しない場合の羊水内MMP-8の平均濃度は、4.4ng/mlである一方、敗血症が発生した場合には208.95ng/mlと測定され、有意に高かった($p < 0.05$)。詳細な結果を下記表9に示す。

【0083】

【表 9】

〈表 9〉 新生児敗血症の有無による MMP-8 の濃度

30

新生児 敗血症	平均値(ng/ml)	範囲(ng/ml)
有	208.95	2.4-1568.6
無	4.4	< 0.3-4202.7

【0084】

この時、23ng/mlを基準値にMMP-8の新生児罹患に対する診断能力を確認した結果、敏感度(67%)、特異度(66%)及び陰性予測値(99%)と、優れていた。その結果を下記表10に示す。

【0085】

【表 10】

40

〈表 10〉 MMP-8 の新生児敗血症の有無に対する診断能力

敏感度	67%
特異度	66%
陽性 予測値	5%
陰性 予測値	99%

【0086】

例 5： 羊水内MMP-8を利用した脳性麻痺の診断

羊水検査を行ない、妊娠35週以前に単胎児で早産された116名の新生児を対象にした。

50

これらを出生後3年間追跡観察して、羊水内MMP-8の濃度と脳性麻痺の発生との関係を調査した。神経発生学的検査での一定の異常(発達のマイルストーンの異常、ボイタ法による姿勢の異常または反射異常)及び筋緊張の持続的な異常がある場合にこれを脳性麻痺と診断した。

【0087】

その結果、脳性麻痺がない新生児を分娩した妊婦の羊水内MMP-8の平均濃度は平均6.4ng/ml[範囲、<0.3-3836.8]である一方、脳性麻痺が発生した新生児を分娩した妊婦では平均153.9ng/ml[範囲、<0.3-1535.9]と測定され、有意に高かった($p < 0.01$)。また、脳性麻痺が発生した新生児の出生週数は、そうでない場合よりさらに早かった。出生時の妊娠期間及び羊水培養の結果を補正した後にも、増加した羊水内MMP-8の濃度は、脳性麻痺発生の可能性を有意に増加させることを確認した(オッズ比、6.0; 95%信頼区間、1.1-33.0; $p < 0.05$)。

10

【0088】

羊水検体で脳性麻痺を診断するための基準値を決めるために、受診者動作特性曲線分析を行なった。その結果、図6に示すとおり、脳性麻痺診断の敏感度と陽性予測値を全て考慮して、MMP-8の基準値に23ng/mlを選択した。MMP-8(基準値23ng/ml)の脳性麻痺に対する診断能力を確認した結果、敏感度(85%)、特異度(69%)及び陰性予測値(97%)と優れていた。その結果を下記表11に示す。

【0089】

【表11】

20

〈表11〉脳性麻痺に対するMMP-8の診断能力

敏感度	85%
特異度	69%
陽性 予測 値	26%
陰性 予測 値	97%

【産業上の利用可能性】

【0090】

上記で詳しく見たように、本発明は羊水内MMP-8の濃度を測定することによって、早産、胎児感染及び胎児損傷を産前に診断できる診断試薬系と診断キットを提供する。発色反応と連結した抗原-抗体反応を利用して、本発明の診断試薬系及び診断キットは、抗-MMP-8抗体を1種または2種以上含むことを特徴とする。本発明の診断試薬系及び診断キットは早産症状や早期破水症状が見られる妊婦だけではなく、このような症状が全く見られない妊婦にも適用できる。胎児の血中サイトカインレベルを測定する従来の方法に比べて、本発明は優れた敏感度と特異度を示すため、早産、胎児感染及び胎児損傷の産前診断に非常に有用に使用できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】自然早産の患者及び自然満月分娩の患者の羊水内MMP-8及びIL-6の濃度分布を示したグラフである。

40

【図2】自然早産を予測できる基準値を決めるために、羊水内MMP-8の敏感度と特異度をプロットした受診者動作特性曲線を示したグラフである。

【図3】臍帯炎患者及び正常人の羊水内MMP-8の濃度分布を示したグラフである。

【図4】臍帯炎を予測できる基準値を決めるために、MMP-8の敏感度と特異度をプロットした受診者動作特性曲線を示したグラフである。

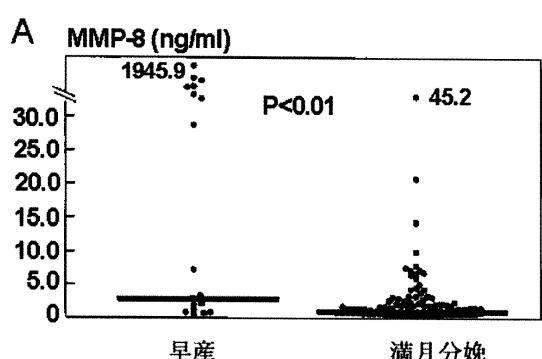
【図5】脳性麻痺を発症した新生児を分娩した患者と正常人の羊水内MMP-8の濃度分布を示したグラフである。

【図6】脳性麻痺の産前発症を予測できる基準値を決めるために、MMP-8の敏感度と特異度をプロットした受診者動作特性曲線を示したグラフである。

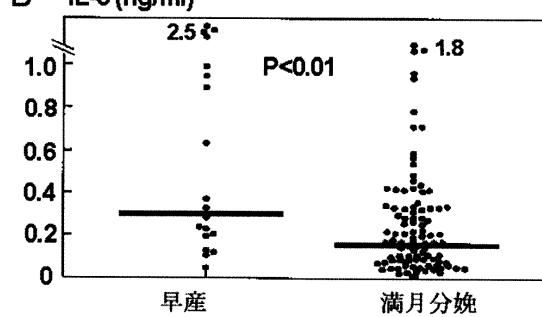
50

【図1】

【図1】

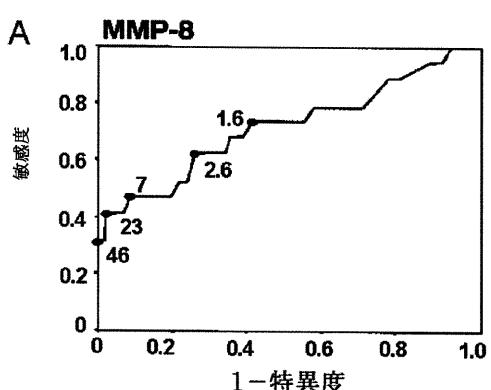


B IL-6 (ng/ml)

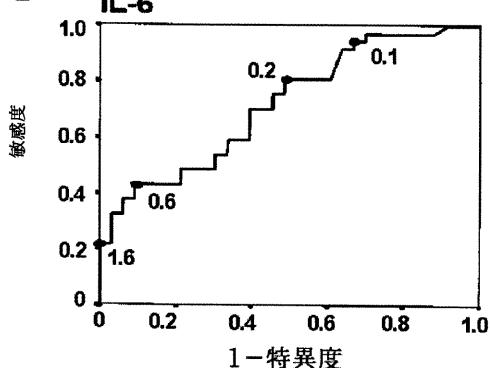


【図2】

【図2】

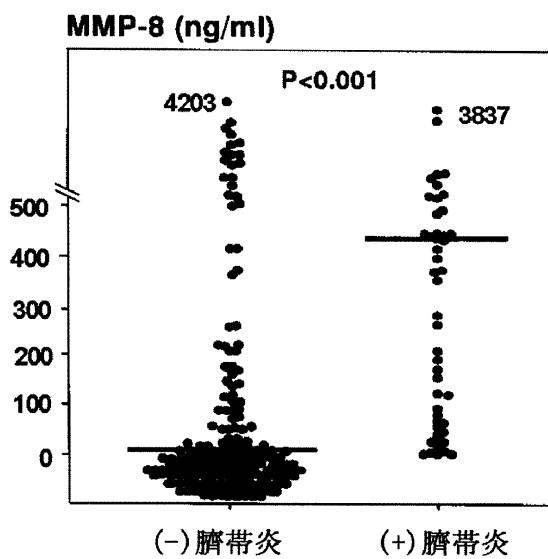


B IL-6



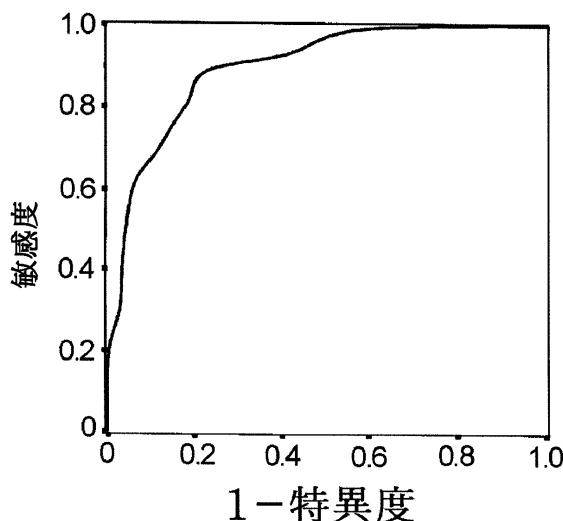
【図3】

【図3】



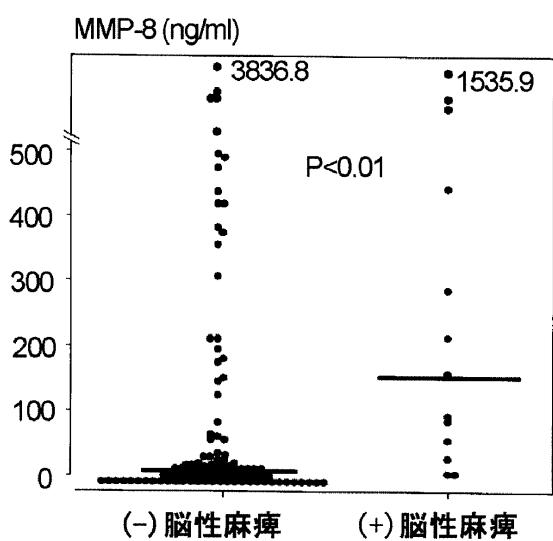
【図4】

【図4】



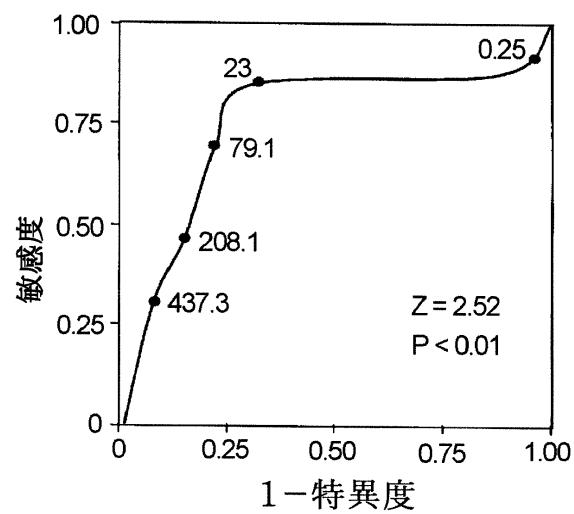
【図5】

【図5】



【図6】

【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 33/577 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/552

G 0 1 N 33/577

B

(56)参考文献 特開平08-201392 (JP, A)

Eli Maymon, et.al, Human neutrophil collagenase(matrix metalloproteinase 8) in parturition premature rupture of the mem, Am j Obstet Gynecol, 2000年, Vol.183, No.1, pp. 94-99