

(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2010-51445

(P2010-51445A)

(43) 公開日 平成22年3月11日 (2010.3.11)

(51) Int.Cl. F1 テーマコード (参考)
A61M 1/36 (2006.01) A61M 1/36 540 4C077

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2008-218033 (P2008-218033)	(71) 出願人	598041566
(22) 出願日	平成20年8月27日 (2008. 8. 27)		学校法人北里研究所 東京都港区白金5丁目9番1号
特許法第30条第1項適用申請有り 平成20年4月2日、ブラックウェルパブリッシング株式会社発行の「Therapeutic Apheresis and Dialysis」12巻2号に発表。 平成20年4月2日、 http://www3.interscience.wiley.com/journal/119425890/abstract を通じて発表。 平成20年4月15日、株式会社医学書院発行の「呼吸と循環」56巻4号に発表。 平成20年4月15日、 http://ej.islib.jp/ejournal/1404101014.html を通じて発表。		(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506 弁理士 小林 智彦
		(74) 代理人	100130845 弁理士 渡邊 伸一
		(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心不全アフエレーシス治療の効果の予測方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明の課題は、拡張型心筋症の治療においてアフエレーシス治療の効果を予測する方法を提供することにある。

【解決手段】

拡張型心筋症患者に対するアフエレーシス治療の効果を予測する方法であって、該患者から採取した血清等を、例えば、18日齢鶏有精卵に添加した時の同左室駆出率を測定するものである。鶏有精卵の麻醉薬にはウレタンを使用し、測定時には加温砂内40℃を保持し、周波数10MHz以上の超音波端子を使用することで、高い再現性を見出した。本左室駆出率が90%未満である場合には、アフエレーシス治療が有効である可能性が高く、実際に治療により本左室駆出率が90%以上に改善すれば、治療が奏功することが臨床的にも確認された。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

拡張型心筋症患者に対するアフエレーシス治療の効果を予測する方法であって、該患者から採取した被検試料を鶏有精卵に添加した時の左室駆出率が低下する場合に前記患者はアフエレーシス治療に奏功しうると予測する、アフエレーシス治療の効果の予測方法。

【請求項 2】

前記被検試料が血清、血漿もしくは精製免疫グロブリンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記鶏有精卵が 18 日齢である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記左室駆出率測定時の鶏有精卵の保持条件が 40℃である、請求項 1～3 のいずれかに記載のアフエレーシス治療の効果の予測方法。

【請求項 5】

前記鶏有精卵の左室駆出率測定時の超音波端子周波数が 10MHz 以上である、請求項 1～4 のいずれかに記載のアフエレーシス治療の効果の予測方法。

【請求項 6】

左室駆出率の測定前に麻酔薬を鶏有精卵へ投与する工程を含む、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記麻酔薬がウレタンである、請求項 6 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、拡張型心筋症治療においてアフエレーシス治療による治療効果を予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アフエレーシス治療は、末梢血中の自己抗体を体外循環によって除去することにより、自己免疫異常を制御して病態の改善を図る治療法であり、すでに欧米では独国を中心に、拡張型心筋症に対するアフエレーシス治療が実施されている。しかしながら、本アフエレーシス治療の効果が症例によって異なることも報告され、ラット培養心筋細胞を使用した治療前効果予測の試みが欧米で行われつつある（非特許文献 1）。

30

【0003】

しかし、欧米におけるラット培養心筋細胞を使用した試みでは、培養細胞の調達が手技的に複雑であり、経済性・再現性にも問題があった。この代替法となる鶏有精卵を使用した測定法も、治療効果の予測検討は未施行であった。

【0004】

【非特許文献 1】 Staudt A. J Am Coll Cardiol. 44(4): 829-, 2004

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、拡張型心筋症の治療において、アフエレーシス治療の効果を予測する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

アフエレーシス治療効果予測が臨床的に簡便に確立されれば、効率的に治療を行うことができる。本発明者は、本邦の拡張型心筋症患者における自己免疫異常を明らかにする研究のなかで、この簡易測定システム（simple screening assay）を開発することに成功した。

50

【0007】

即ち本発明者は、本邦における拡張型心筋症患者に対するアフエレーシス治療の臨床試験（大学病院医療情報ネットワーク(UMIN)、臨床試験登録システム(CTR)、623番）を通じて、鶏有精卵を使用した簡易測定システムが、本治療効果の予測方法となることを見出した。同時に本測定システムが金銭的・手技的にも容易に実施でき、かつ高い再現性を示すことを見出した。

【0008】

具体的には、拡張型心筋症患者から取得される被検試料（患者血清、血漿もしくは精製免疫グロブリン等）を鶏有精卵に添加して心エコー図検査によって鶏左室駆出率を測定することを特徴とする方法である。

10

【0009】

本発明は、拡張型心筋症の治療において、アフエレーシス治療の効果を予測する方法に関し、具体的には、

〔1〕 拡張型心筋症患者に対するアフエレーシス治療の効果を予測する方法であって、該患者から採取した被検試料を鶏有精卵に添加した時の左室駆出率が低下する場合に前記患者はアフエレーシス治療に奏功しうると予測する、アフエレーシス治療の効果の予測方法、

〔2〕 前記被検試料が血清、血漿もしくは精製免疫グロブリンである、〔1〕に記載の方法、

〔3〕 前記鶏有精卵が18日齢である、〔1〕に記載の方法、

20

〔4〕 前記左室駆出率測定時の鶏有精卵の保持条件が40℃である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のアフエレーシス治療の効果の予測方法、

〔5〕 前記鶏有精卵の左室駆出率測定時の超音波端子周波数が10MHz以上である、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のアフエレーシス治療の効果の予測方法、

〔6〕 左室駆出率の測定前に麻酔薬を鶏有精卵へ投与する工程を含む、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法、

〔7〕 前記麻酔薬がウレタンである、〔6〕に記載の方法、
を提供することにある。

【発明の効果】

【0010】

30

本発明によれば、拡張型心筋症におけるアフエレーシス治療において、治療効果の期待できる患者を治療開始前に判別することによって高額な医療器具の無駄使いを無くすことにより、患者の医療費負担を軽減することができる。また、本発明によれば、アフエレーシス治療が有効である患者状態を簡便に把握できるため、適切なアフエレーシス治療の治療時期を決定できるという効果がある。

【0011】

〔発明を実施するための形態〕

【0012】

本発明は、拡張型心筋症のアフエレーシス治療における効果の予測方法を提供する。

本発明の予測方法の好ましい態様としては、拡張型心筋症の患者から取得（採取）された試料（被検試料）を鶏有精卵へ添加し、該有精卵における左室駆出率に基づいて、アフエレーシス治療の奏功の可能性を予測する方法である。

40

【0013】

本発明の方法において患者から採取される試料（本明細書において「患者試料」と記載する場合あり）としては、例えば、血清、血漿、精製免疫グロブリン等を挙げることができる。本発明において患者試料として血清、血漿を利用する場合には、鶏有精卵への添加量は、例えば、50～400 μ l、好ましくは100～300 μ l、より好ましくは200 μ lである。患者試料として精製免疫グロブリンを利用する場合には、鶏有精卵への添加量は、例えば、0.2～3 mg、好ましくは0.5～2 mg、より好ましくは1 mgである。

【0014】

50

本発明の方法において利用する鶏有精卵は、心機能が形成されているものであれば特に制限されないが、例えば、15日齢以上、好ましくは17日齢以上、より好ましくは18日齢である。

【0015】

本発明において、患者試料は、鶏有精卵へ添加するが、より具体的には、卵の気嚢へ投与することが好ましい。

【0016】

本発明においては、拡張型心筋症患者から取得される被検試料（患者試料）を鶏有精卵に添加して該卵の鶏左室駆出率を測定することの特徴とする方法である。

本発明において左室駆出率は、当業者であれば公知の手法によって測定することが可能である。例えば、心エコー図検査によって適宜測定することができる。

前記鶏有精卵の左室駆出率測定時の超音波端子周波数は、好ましくは10MHz以上である。また、左室駆出率測定時の鶏有精卵の保持条件としては、例えば、38℃～42℃、好ましくは、39℃～41℃、より好ましくは40℃である。より具体的には、加温砂内40℃の条件を例示することができる。

【0017】

本発明の好ましい態様としては、測定された鶏左室駆出率が無添加時「平均値－2×標準偏差（％）」より低下する場合に、患者はアフレーシス治療に奏功しうるものと予測する。即ち、被検患者はアフレーシス治療が有効である可能性が高いものと判定される。具体的には、鶏有精卵の保持条件が40℃の時には鶏左室駆出率が90％より低下する場合に、本予測が行われる。

アフレーシス治療に奏功したか否かは、例えば、アフレーシス治療後の前記鶏有精卵の左室駆出率が無添加時「平均値－2×標準偏差（％）」以上である場合に患者のアフレーシス治療が成功したものと判断される。

【0018】

前記鶏有精卵の左室駆出率測定前においては、好ましくは、麻酔薬を鶏有精卵へ投与することが好ましい。本発明の方法において使用する麻酔薬としては、例えば、ウレタン(urethane)、あるいはウレタンとαクロラロース(alpha-chloralose)との混合液を挙げることができる。使用する麻酔薬がウレタンである場合には、卵1個あたり40～50 mg投与することが好ましい。

【0019】

本発明の好ましい具体的な態様としては、例えば、以下の工程（a）～（c）を含む方法である。

（a）患者から採取した血清を鶏有精卵に添加する工程

（b）前記鶏有精卵における左室駆出率を測定する工程

（c）前記左室駆出率が無添加時「平均値－2×標準偏差（％）」未満である場合に前記患者はアフレーシス治療に奏功するものと予測（判定）する工程

【0020】

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0021】

以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0022】

〔実施例1〕心抑制自己抗体の同定、およびこれらの抗体の簡便なスクリーニング法

（a）患者および方法

(i) 対象患者

世界保健機関/国際心臓連合による基準(Richardson P, McKenna W, Bristow MR et al. Circulation 1996;93:841-2.)に基づいてDCMと診断された患者104名について試験した。

試料取得時には、いずれの患者も、ジギタリス、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、または β 遮断薬を含む通常療法下で安定していた。放射性核種心室造影により、 $<45\%$ の左室駆出率(LVEF)が確認された。患者98名に対して冠動脈造影を行い、患者87名に対して心内膜心筋生検を行った。87試料すべてにおいて、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、二次性心筋疾患の存在を排除することができた。特に、慢性心筋炎がないことが全試料で確認された。心筋細胞の肥大が患者72名(83%)で認められ、顕著な間質性線維症が患者63名(72%)で認められた。しかし、特定の抗原およびリンパ球に関する免疫組織学的検査(IHC)は実施しなかった。主冠動脈の狭窄が $>75\%$ である患者もまた排除された。本発明者の本研究はヘルシンキ宣言に従った。研究手順は施設内審査委員会により認可されたものであり、患者全員から本研究に参加することについて書面によるインフォームドコンセントを得た。

10

【0023】

(ii) 抗体の検出

酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、免疫ブロット法、または標準的な間接的免疫蛍光法(IHC)により、患者血清中の目的の抗体を測定した。ELISA用に購入した抗原は、Na-K-ATPアーゼ(Sigma Chemical、米国、ミズーリ州、セントルイス)、心臓トロポニンI(和光純薬、日本、大阪)などの精製タンパク質、ならびに β 1受容体およびM2受容体などのヒトGタンパク質共役受容体の第2細胞外ループの推定配列に対応する合成ペプチドであった。そのような抗体を検出するELISAでは、0.1 M炭酸-重炭酸緩衝液(pH 9.6)および0.5%ゼラチンに溶解した50 mg/L抗原 50 μ Lをコーティングした96ウェルELISAプレート(岩城硝子、日本、千葉)を使用した。3%ウシ血清アルブミンおよび0.1% Tween-20(和光純薬)を添加したPBS(リン酸緩衝生理食塩水: 10 mmol/Lリン酸、140 mmol/L NaCl、pH 7.4)でブロッキングを行った。ブロッキングの後、患者血清または1:20から始まる精製免疫グロブリンG(IgG)希釈物 50 μ Lを、コーティングして飽和したマイクロタイタープレートに添加した。ウェルを3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG(H + L)抗体(1:1000希釈、Biosource、米国、カリフォルニア州、カマリロ)を添加し、1時間反応させた。洗浄後、プレートをオルトフェニレンジアミン二塩酸塩(Organon Teknika、米国、ペンシルベニア州、ウェストチェスター)と共に1時間インキュベートして、結合したペルオキシダーゼ結合抗体を検出した。2.5 M硫酸溶液を添加して反応を停止し、マイクロタイターリーダーで492 nmの吸光度を読み取り、バックグラウンド密度の2.5倍である吸光度を陽性とした。

20

30

【0024】

(iii) 心抑制抗体のエキスピボアッセイ

心機能に及ぼす抗体の影響を判定するために、鶏胚の超音波心エコー(UCG)を行った(図1)。文献(Sugiyama T, et. al., Toxicol Appl Pharmacol 1996;138:262-7.)に記載されている通りに、白色レグホーン鶏受精卵(大宮家禽研究所、日本、埼玉)を $37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ および相対湿度約65%でインキュベートし、1時間ごとに自動で回転させた(P-1型、昭和フランク研究所、日本、大宮)。IgGは、プロテインG-アガロース法により精製した。18日目に、麻酔薬を注入し、その10分後に、精製した患者IgGを卵の気嚢に添加した(1.0 mg/卵)。20分後、気嚢部分の周りに開けた小さな穴からエコープローブを挿入してUCGを行った。左室拡張末期径および左室収縮末期径、LVEF、ならびにRR間隔を、反復Mモード測定により決定した(少なくとも3回の測定を行った)。携帯型孵卵器を使用してUCGの開始まで温度を 37.5°C に保ち、ヒヨコの呼吸および試験中の温度を維持するために、卵は常に温めた砂の上に置いておいた。生理食塩水の存在下でLVEFの平均値 ± 2 SDを決定し($N = 10$)、DCM患者および特定病因の心不全患者(非DCM、 $N = 10$)から精製したIgGの存在下においてLVEFが平均-2SDよりも低かった場合に、これを心抑制抗体の陽性結果と定義した。非DCM患者はいずれも陳旧性心筋梗塞患者であり、年齢、性別、LVEF値はDCM患者と対応させた(年齢 56 ± 10 歳、女性8名、LVEF $32 \pm 11\%$)。なお、IgG画分には、インターロイキン6、腫瘍壊死因子 α 、ノルエピネフリン、またはナトリウム利尿ペプチドを含むサイトカインおよび神経ホルモンが混入していないことが示されている。

40

50

【0025】

(iv) 抗体陽性患者の臨床的特徴

心抑制抗体を有する患者と有さない患者との間で、年齢、性別、ニューヨーク心臓協会(NYHA)機能クラス、LVEFおよび左室径、血漿のノルエピネフリンおよび心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度、心室性期外収縮数、ならびに24時間の心電図ホルターモニタリングにおけるVTの存在を比較した。心臓抗体を判定するために血清を試料採取してから一月以内に、UCGおよびホルター心電図モニタリングによって測定した臨床的変数およびパラメータを収集した。UCGは、市販のプロープおよびシステムを用いて行った。ホルター心電図は、Marquetteシステム(SXP 8000またはMARS 8000)を使用して2つの標準チャンネルで解析し、基礎心拍リズム、上室性期外収縮および心室性期外収縮の総数、ならびに少なくとも1回の試験で認められたVTの存在(心拍数 > 100拍動/分での、3回またはそれ以上の連続した心室性期外収縮と定義する)を評価した。データは、2回またはそれ以上の記録セットから平均化した。

10

【0026】

(V) 抗体除去前後のLVEF

UCGを使用して鶏胚のLVEFを測定することにより、そのような抗体の除去が心機能に及ぼす効果を判定した。抗体を除去するために、すべての患者血清をトリプトファンカラム(旭化成メディカル、日本、東京)と共にインキュベートした。患者血清500 μ Lを等量のこのカラム材料と共に、37°Cで2時間インキュベートした。未精製患者血清の存在下(100 μ L/卵)におけるLVEFを、抗体除去後の患者血清の存在下におけるLVEFと比較した。DCM患者試料(N = 42)だけでなく非DCM患者試料(N = 12)もこの方法により評価した。DCM患者はいずれも β 1受容体および/またはM2受容体抗体を有したが、非DCM患者はこのような抗体を有さなかった。なお、この除去工程がIgG以外の薬物または液性因子濃度に影響しないことが示されている。

20

【0027】

(vi) 統計解析

データは平均値 $\pm$ SDとして表した。2群間の比較は、対応のないt検定を用いて行った。抗体陽性率の差は、 χ^2 検定を用いて評価した。多変量解析を行って、心抑制抗体の存在を予測する上での種々の抗体の有意性を決定した。統計的有意性は $P < 0.05$ に設定した。

【0028】

30

(b) 結果

生理食塩水の存在下の鶏胚心臓で、UCGにより測定されたLVEFは $83.6 \pm 2.3\%$ であった。非DCM患者から精製したIgGの存在下では、LVEFは $83.2 \pm 5.7\%$ であった。DCM患者39名で心抑制抗体が陰性であることが判明し、これらの患者のLVEFは $84.0 \pm 4.3\%$ であった。これら3群のLVEFに有意差は認められなかった。対照的に、DCM患者65名で心抑制抗体が陽性であることが判明し、これらの患者のLVEFは $53.5 \pm 5.1\%$ であり、非心抑制抗体の存在下で得られたLVEFよりも有意に低かった($P < 0.0001$ 、図2)。表1に、心抑制抗体を有するおよび有さない患者の臨床的特徴を示す。

【0029】

【表 1】

	心抑制抗体 (+)	心抑制抗体 (-)
患者数 (%)	65 (63%)	39 (37%)
年齢	58±13	53±15
性別 (男性 / 女性)	50/15	31/8
NYHA クラス (I/II/III + IV)	34/24/7	19/14/6
LVEF(%)	31±9	30±10
EDD(mm)	60±10	62±11
LA(mm)	40±8	42±7
持続性 AF(%)	21(32)	11(28)
NSVT(%)	27(42)	21(54)
PNE(pg/mL)	412±301	438±275
ANP(pg/mL)	89±95	84±67

【0030】

上記表中、AFは心房細動、ANPは心房性ナトリウム利尿ペプチド、EDDは左室拡張末期径、LAは左房径、LVEFは放射性核種心室造影により測定された左室駆出率、NSVTは非持続性心室頻拍、NYHAはニューヨーク心臓協会、PNEは血漿ノルエピネフリン濃度を表す。

【0031】

2群間で、年齢、性別、NYHA機能クラス、放射性核種心室造影により測定されたLVEF、左室拡張末期径、左房径、血漿の心房性ナトリウム利尿ペプチドもしくはノルエピネフリンレベル、または心房細動および非持続性VTを含む不整脈の発生率に差は認められなかった。

【0032】

心抑制抗体と、IHC、免疫プロット法により判定される他の抗体、ならびにβ1受容体、M2受容体、Na-K-ATPアーゼ、および心臓トロポニンIに対する抗体を含む、ELISAにより判定される特定の抗体を相互に関連付けることを試みた(図3)。免疫組織化学的に判定される抗体が陽性であった患者39名のうち25名において、心抑制抗体が認められた。一方、免疫組織化学的に判定される抗体が陰性であった患者65名のうち40名において、心抑制抗体が認められた。2群間に、心抑制抗体の発生率の差は認められなかった(64.1% 対 61.5%、NS)。心抑制抗体は、免疫プロット法により判定される抗体が陽性であった患者において、そのような抗体が陰性であった患者よりも多く認められた(81.6 % 対 51.5%、P < 0.05)。ELISAにより判定される自己抗体に関して、心抑制抗体は、β1受容体に対する抗体を有する患者において、そのような抗体を有さない患者よりも多く認められた(81.0% 対 51.6%、P < 0.05)。心抑制抗体はまた、M2受容体(83.3% 対 48.4%、P < 0.05)およびNa-K-ATPアーゼ(84.6 %対 55.1%、P < 0.05)に対する抗体を有する患者においてより多く見られた。トロポニンIに対する抗体が陽性であった患者と陰性であった患者の間で、心抑制抗体は同様に認められた(56.3% 対 63.6%、NS)。

【0033】

次に、多変量解析を用いて、心抑制抗体の存在を予測する上での、免疫プロット法により判定される抗体、ならびに $\beta 1$ 受容体、M2受容体、およびNa-K-ATPアーゼに関する、ELISAにより判定される抗体の有意性を決定することを試みた。 $\beta 1$ 受容体およびM2受容体に対する抗体は、心抑制抗体の存在を予測する上で有意であった。一方、免疫プロット法により判定される抗体およびNa-K-ATPアーゼに対する抗体は、有意な予測因子ではなかった(表2)。

【0034】

【表2】

	オッズ比	95%CI	p 値
免疫プロット法 (+)	3.1	0.8-11.9	0.09
$\beta 1$ AR に対する抗体 (+)	10.6	3.4-33.1	<0.01
M2 に対する抗体 (+)	13.8	4.3-43.8	<0.01
Na-K-ATPアーゼ に対する抗体 (+)	1.8	0.4-8.3	0.45

【0035】

上記表中、 $\beta 1$ ARは $\beta 1$ アドレナリン受容体、M2はムスカリン性M2アセチルコリン受容体を表す。

【0036】

LVEFは、心抑制抗体が陽性であったDCM患者の未精製血清の存在下よりも、抗体除去後の血清の存在下において有意に高かった($86.3 \pm 3.4\%$ 対 $65.5 \pm 7.8\%$, $P < 0.01$ 、図4)。非DCM患者では抗体除去前後でLVEFは変化しなかった。LVEFは、 $\beta 1$ 受容体に対する抗体($86.2 \pm 3.5\%$ 対 $65.6 \pm 8.4\%$, $P < 0.01$, $N = 26$)およびM2受容体に対する抗体($86.0 \pm 3.1\%$ 対 $65.7 \pm 7.8\%$, $P < 0.01$, $N = 20$)が陽性であった患者の未精製血清の存在下よりも、抗体除去後の血清の存在下において高かった。 $\beta 1$ 受容体およびM2受容体に対する抗体がいずれも陽性であった患者が4名存在した。LVEFは、トリプトファン含有ゲルにより抗体を除去した後に同様に改善された。

【0037】

〔実施例2〕アフレーシス治療の効果予測方法

(a) 実験手法

使用する鶏有精卵は、実験直前まで37.8度孵卵器内に保管し、心拍数300回/分以下のものは実験には使用しない。まず卵殻に電気研磨器にて径1~2 mmの小穴をあけ、同穴より麻酔薬(urethane 45 mg及びalpha-chloralose 4.5 mg 混合液)を添加した。10分後に同穴より患者血清200 μ Lを添加した(図5-1)。さらに20分後に、同穴をピンセットで径20~30 mmに拡大し、直ちに40°C恒温砂内に保持した(図5-2)。加温したゼリーを気室内に添加し、超音波端子にて鶏心臓の心エコー図Mモード像を描出した(図5-3)。左室収縮末期径および左室拡張末期径より計算された「左室駆出率」を記録した。測定時には必ず少なくとも2個以上の陰性対照(生理的食塩水200 μ L)をいれ、また実験者も2人以上とした。麻酔薬・サンプル添加者と心エコー図記録者は、互いに各添加サンプルの詳細を二重盲検化することとし、(1)すべての陰性対照群の計測値が90%であること、(2)陰性対照群計測値の標準偏差が5%未満であること、を確認した。患者サンプル添加時の鶏左室駆出率が90%未満である場合に、測定結果を「陽性」とした。

【0038】

(b) 結果

(1)平成20年5月までにアフレーシス治療を行った計17例の本邦拡張型心筋症患者の治

療成績を、治療3ヶ月後（～平成20年8月）に効果判定した。治療前の測定結果が「陽性」であったのは10例、かつ治療後の測定結果が「陰性」になった群（完全治療群）は8例であった。のこりの9例は不完全治療群として、2群比較した。

【0039】

(2)治療3ヶ月後の患者左室駆出率は、完全治療群は $20 \pm 8\%$ から $29 \pm 9\%$ へと改善したが、不完全治療群では $18 \pm 10\%$ から $17 \pm 7\%$ への差はなく、両者に有意差を認めた ($p < 0.001$, repeated measure ANOVA)。

【0040】

(3)3回のアフレーシス治療（第1クール）では不完全治療群となり、3か月後に5回のアフレーシス治療（第2クール）を行うことで完全治療群となった症例が1例存在した。患者の左室駆出率は、第1クール3か月後には 22% から 22% へと不変であったが、第2クール3か月後には 22% から 37% へと増加した。本発明が適切なアフレーシス治療の治療時期・回数を決定できることが証明された。

【0041】

(4)本発明において必要な費用は1サンプルあたり600円未満であり、測定に必要な時間（麻酔、サンプル投与、計測）も1サンプルあたり30分であった。生理的食塩水を使用した陰性対照実験において、鶏有精卵の左室駆出率の測定値は、10サンプルで標準偏差 2.3% と小さく、高い再現性を示すことが確認された。いずれの点においても、欧米における培養細胞を使用した試みよりも優れていることが示された。

【0042】

(5)本発明において重要な実験条件となる、麻酔薬の種類、投与量も前記のとおり初めて公表された。鶏有精卵の左室駆出率測定は、体動を麻酔によって止めなければ実施することができないものの、麻酔条件によって心拍数、心機能変動するため、その設定が必須であった。一般的麻酔薬（ペントバルビタール、ネンプタール、チオペンタール、ケタミン、キシラジン、ジアゼパム、プロポフォール）では安定した測定ができなかった。

【0043】

(6)本発明において重要な実験条件となる、加温砂の温度も前記のとおり初めて公表された。加温砂 $37 \sim 38^\circ\text{C}$ の加温砂下で血管血流を観察した論文報告はあるが、左室駆出率の測定においては不適切である。これは卵内の鶏温度が実際よりも低下するため、異種血清（患者血清）を添加した際に生じる陰性変力作用が、測定誤差を生じさせるためである。前記温度条件 40°C であれば、無効予測例添加時の左室駆出率の測定値は、10サンプルで標準偏差 4.2% であった。

【産業上の利用可能性】

【0044】

自己免疫、ならびにウイルス感染および遺伝的素因は、拡張型心筋症(DCM)の原因であることが示唆されている。中でも、いくつかの心臓特異的自己抗体は、うっ血性心不全の病態生理に関与する。 $\beta 1$ アドレナリン($\beta 1$)受容体の第2細胞外ループに対する抗体が周知であり、DCM患者の約40%に認められる。本発明者は、他の研究グループと同様に、これらの抗体の持続的な産生が、肥大および β アドレナリン受容体脱共役に関連した心機能不全、ならびに心臓イオンチャネルの発現変化を伴う電気的不安定性を誘導することを示した。ムスカリン性M2アセチルコリン(M2)受容体に対する抗体の存在は、持続性心房細動と関連があり、実際に鶏胚心臓において上室性不整脈を誘導した。本発明者は、筋細胞膜Na-K-ATPアーゼの触媒 α サブユニットに対する抗体が、一部のDCM患者に認められることを見出した。この抗体はNa-K-ATP活性を阻害するもので、この抗体により、DCM患者において心臓突然死に関連する心室頻拍(VT)が予測された。加えて、心臓トロポニンIに対する抗体が、DCMを呈するプログラム細胞死-1免疫調節受容体欠損マウスの血清中に認められた。心臓トロポニンIに対するモノクローナル抗体の投与により、心拡張および心機能不全が誘導され、L型カルシウム電流が増大した。

【0045】

そのような抗体を除去する免疫吸着(IA)は、DCMに起因する難治性心不全を治療する上

で有効な手段となり得る。しかし、DCM患者における抗体プロファイルは複雑であるため、そのような高価な治療でメリットを受ける患者を同定する方法を確立することが重要である。最近、Staudtら(Staudt A, Staudt Y, Dorr(oはウムラウト) M et al. J Am Coll Cardiol 2004;44:829-36.)は、成体ラット心室筋細胞におけるカルシウムトランジェントおよび細胞短縮の両方の減少と定義される「心抑制抗体」の存在が、心機能の改善に関連することを報告した。本発明者は、DCM患者の血清中のそのような心抑制抗体を同定するためのより慣用的なスクリーニング系を確立することを試みた。

【0046】

本願発明により、拡張型心筋症(DCM)患者における左室駆出率(LVEF)に直接影響し得る心抑制自己抗体を同定し、およびこれらの抗体の簡便なスクリーニング法が確立された。一部のDCM患者において、免疫吸着を行うことで、急性的な血行動態のみならず長期的な予後までもが改善されることが報告された。免疫組織学的検査、免疫プロット法、および酵素結合免疫吸着測定法(β 1アドレナリン[β 1]受容体、ムスカリン性M2アセチルコリン[M2]受容体、トロポニンI、またはNa-K-ATPアーゼ)により判定される種々の抗体を、DCM患者104名において測定した。心抑制自己抗体はまた、患者の精製免疫グロブリンGを加えた後に18日齢鶏胚の超音波心エコーを行うことで判定し、臨床的特徴(年齢、性別、ニューヨーク心臓協会クラス、LVEF、神経液性因子、不整脈、およびその他の抗体)を比較した。また、これらの心抑制抗体に対するインビトロ免疫吸着の効果も調べた。心抑制抗体はDCM患者104名のうち63%で認められ、他の臨床的パラメータとの関連はなく、抗 β 1受容体抗体(81% 対 52%、 $P < 0.01$)、抗M2受容体抗体(83% 対 48%、 $P < 0.01$)、または抗Na-K-ATPアーゼ抗体(85% 対 55%、 $P < 0.01$)などのいくつかの抗体とのみ関連していた。しかし、心抑制抗体は、トロポニンIに対する抗体を有するおよび有さない患者で同様に認められた(56% 対 64%)。患者血清の存在下においてUCGにより測定された鶏胚のLVEFは、インビトロ免疫吸着後に改善された。鶏胚を用いるエクスピボ系は、心抑制抗体を判定することができた。多変量解析によると、 β 1受容体またはM2受容体に対する抗体は、これらの自己抗体の予測因子であった。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】鶏胚心臓の心機能に及ぼす自己抗体の影響を判定するための超音波心エコー(UCG)検査を示す写真である。重要なスナップ写真を左から順に要約する。最初に、麻酔薬および患者IgGを加えるために、各卵に小さな穴を開ける。次いで、UCGを行うため、卵を温めた砂中に置き、UCGプローブ用により大きな穴を開けた。最後に、左室駆出率を測定するためにMモードを記録した。

【図2】鶏胚心臓における心抑制自己抗体の検出結果を示す図である。精製IgG($N = 114$)または生理食塩水($N = 10$)を添加した後、心エコーにより左室駆出率を測定した。DCM患者65名では心抑制自己抗体が陽性であるが(DCM+)、残りのDCM患者39名では陰性であることが(DCM-)判明した。非DCM心不全患者($N = 10$)から精製されたIgGを添加した場合、心機能は変化しなかった。

【図3】特定の抗体の有無により決定された心抑制自己抗体の頻度(%)を示す図である。心抑制抗体は、免疫プロット(IB)陽性抗体を示した、または β 1アドレナリン受容体(β 1AR)、ムスカリン性M2アセチルコリン受容体(M2)、およびNa-K-ATPアーゼに関してELISA陽性であった患者において、そのような自己抗体のない患者よりも多く見られた。 $*P < 0.01$ 自己抗体陽性患者 対 自己抗体陰性患者。IHC：免疫組織化学的検査、TnI：トロポニンI。

【図4】トリプトファン含有ゲルによる患者血清の自己抗体除去の効果を示す図である。トリプトファン含有ゲルによる自己抗体除去の前後で、心機能を比較した。対照対象($N = 10$)または非DCM心不全患者($N = 12$)の血清の存在下では、心機能は自己抗体の除去後に変化しなかった。しかし、心抑制自己抗体が陽性であったDCM患者($N = 43$)の血清の存在下では、心機能は除去手順により増大した。

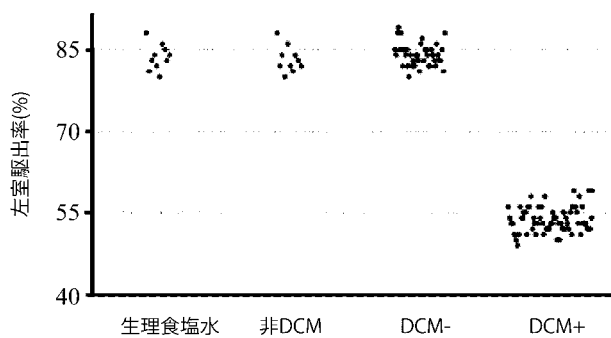
【図5-1】麻酔薬ならびに患者血清を鶏有精卵に添加する様式を模式的に示す図である

。白丸 1：恒温槽(37.8度空気)、白丸 2：18日齢鶏（卵内）、白丸 3：注射器。

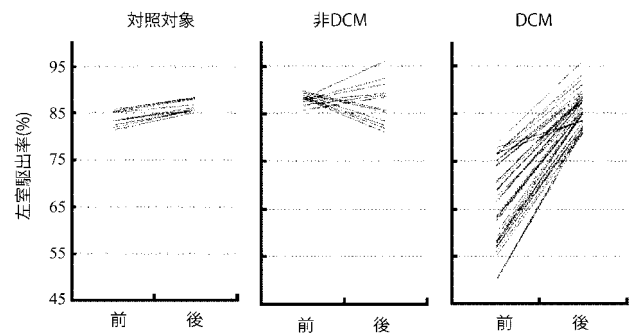
【図 5－2】鶏有精卵の心エコーを行う様式を模式的に示す図である。白丸 1：恒温槽(40℃砂)、白丸 2：18日齢鶏（卵内）、白丸 3：心エコー超音波端子。

【図 5－3】鶏有精卵の心エコーMモード像（左室駆出率の測定）の写真である。白丸 1：左室収縮末期径、白丸 2：左室拡張末期径。

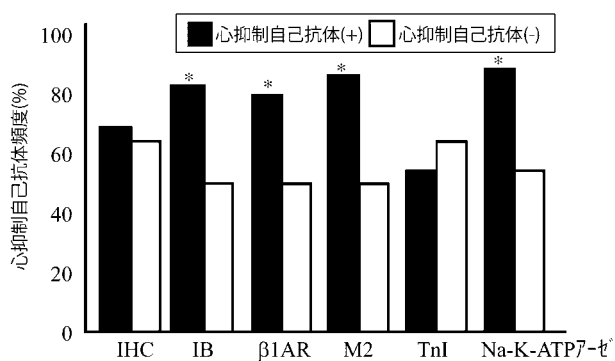
【図 2】



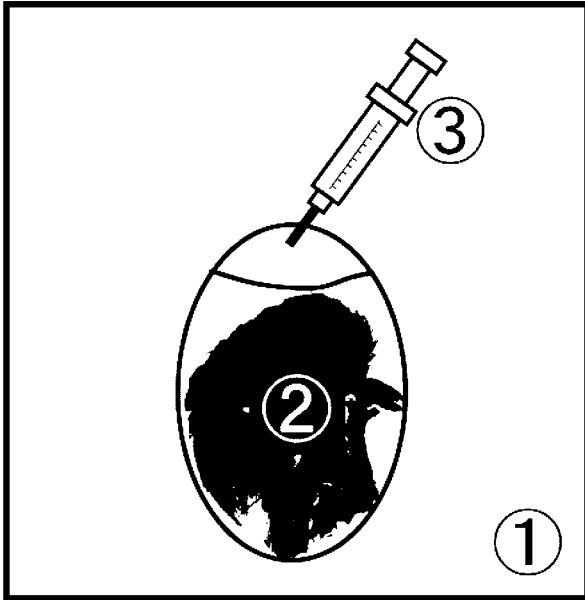
【図 4】



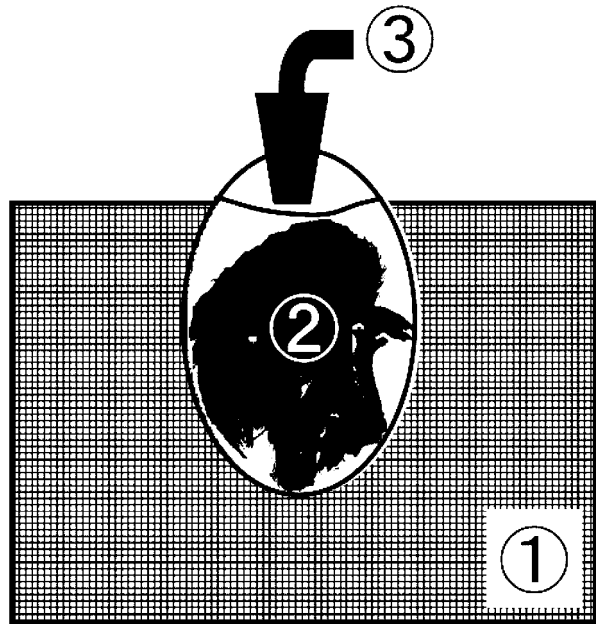
【図 3】



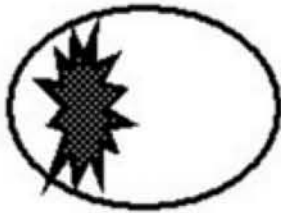
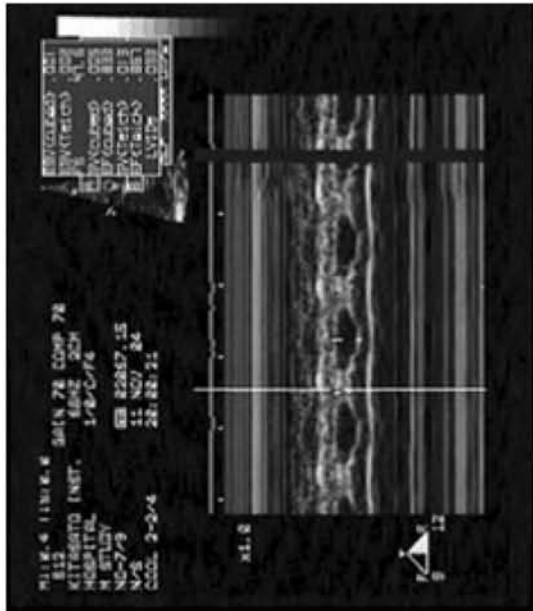
【図 5 - 1】



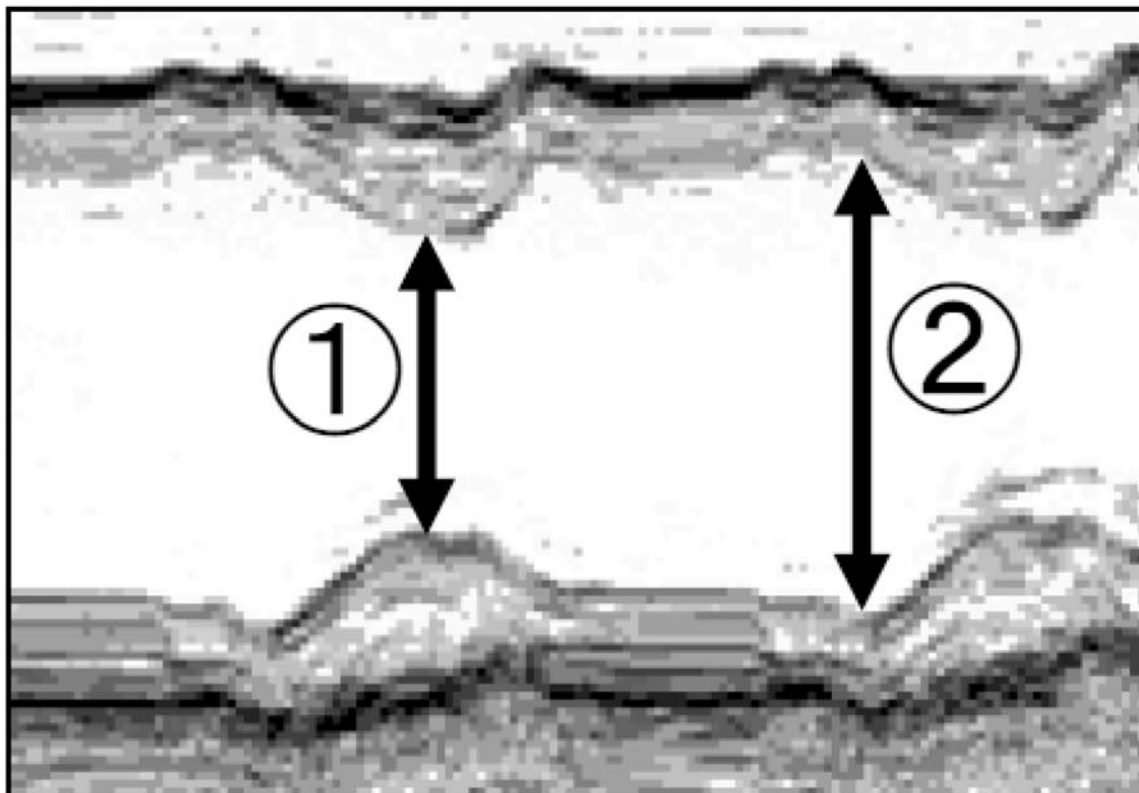
【図 5 - 2】



【図 1】



【図 5 - 3】



フロントページの続き

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 馬場 彰泰

東京都港区白金 3-3-4-401

Fターム(参考) 4C077 AA09 BB03 MM05 NN05 NN14