

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年10月19日 (19.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/109793 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/307631
- (22) 国際出願日: 2006年4月11日 (11.04.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-114350 2005年4月12日 (12.04.2005) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 松森 昭 (MATSUMORI, Akira) [JP/JP]; 〒5620045 大阪府箕面市瀬川5丁目16-22 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号共同ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BIOMARKER FOR DIAGNOSING HEART DISEASE AND THE USE THEREOF

(54) 発明の名称: 心疾患診断用バイオマーカー及びその利用

(57) Abstract: The invention relates to the following [1] to [3] methods and a kit for carrying out the methods. [1] A method for detecting heart disease, characterized by assaying kappa-chains and/or lambda-chains of free immunoglobulin light chains in an analyte and comparing at least any one of a value of the kappa-chains, a value of the lambda-chains and a kappa/lambda ratio to a corresponding value of a normal subject. [2] A method for detecting complications of viral infection in heart disease, characterized by assaying kappa-chains and/or lambda-chains of free immunoglobulin light chains in an analyte and comparing at least any one of a value of the kappa-chains, a value of the lambda-chains and a kappa/lambda ratio to a corresponding value of a normal subject. [3] A method for detecting the severity of heart disease, characterized by assaying kappa-chains and/or lambda-chains of free immunoglobulin light chains in an analyte and comparing at least any one of a value of the kappa-chains, a value of the lambda-chains and a kappa/lambda ratio to a corresponding value of a normal subject or a patient with mild heart disease.

(57) 要約: 以下の〔1〕～〔3〕の方法及びそれを実施するためのキットに関する。〔1〕検体中の遊離イムノグロブリン軽鎖のカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比のいずれか1つ以上の値と健常者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患を検出する方法。〔2〕検体中の遊離イムノグロブリン軽鎖のカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比のいずれか1つ以上の値と健常者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患におけるウイルス感染の合併を検出する方法。〔3〕検体中の遊離イムノグロブリン軽鎖のカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比のいずれか1つ以上の値と健常者もしくは心疾患の軽症者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患の重症度を検出する方法。

WO 2006/109793 A1

明 細 書

心疾患診断用バイオマーカー及びその利用

技術分野

- [0001] 本発明は、心疾患を診断するための新規なバイオマーカー及びその利用法に関するものである。

背景技術

- [0002] 心不全とは、一般に、心筋梗塞、狭心症などの虚血性心疾患、心筋症、高血圧症などの様々な原因により心機能が低下した病態を指す。現在、このような心不全を診断するためのバイオマーカーとしては、心房性利尿ペプチド(ANP)、脳性利尿ペプチド(BNP)、N末端proBNP(NT-proBNP)などが入手可能で、これらのマーカーを測定することで、患者が心不全であるか否か、あるいはその重症度はどの程度かを知ることができる。
- [0003] しかしながら、心不全に限らず、疾患の多くは原因が単一ではなく、現実の臨床の場においては、1つのバイオマーカーを測定するによって特定の疾患を確定的に診断することはできない。また、バイオマーカーといえども、種々病態が進行した結果、血中、尿中等に出現するものであり、病態の進行の過程が患者毎に変化した場合には、必ずしも特異的なマーカーとなり得ないこともあることから、多くの疾患において、種々のマーカーを組合せて総合的に判断することが、疾病診断の現状である。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] このように、心不全などの心疾患においても、ANP、BNP等の、公知マーカー以外の新規マーカーの開発が切望されていた。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者は、心疾患の新規なバイオマーカーを開発すべく、種々検討を行った結果、心疾患の診断に使用されたことのない、イムノグロブリン重鎖と解離した遊離のイムノグロブリン軽鎖(Free light chain:FLC)に注目した。
- [0006] 従来、FLCは、骨髄腫、アミロイドーシスなどの血液疾患の診断に使用されてきた。

すなわち、骨髄腫では腫瘍化する細胞の種類により、カッパー (κ) 鎖を産生する腫瘍ではカッパー鎖が増加し、カッパー／ラムダ比が上昇するのに対し、ラムダ (λ) 鎖を産生する腫瘍ではラムダ鎖が増加し、カッパー／ラムダ比は低下する。このような性質を利用し、骨髄腫の診断が行われていた。

- [0007] このようなFLCは、病態マーカーのひとつであり、Bリンパ球の活性化を示すマーカーでもありと考えられるため、心不全の診断に利用可能であれば、心不全でBリンパ球が活性化することも検出できる可能性があり、このような検出が可能であれば、たとえば、Bリンパ球の活性化を調整することにより心不全の新しい治療薬のスクリーニングや開発に利用できるという点で、従来の公知のマーカーとは異なる有用なマーカーとなり得ると考えられる。
- [0008] 本発明者は、FLCの心疾患診断への応用に関し、鋭意検討を重ねた結果、現在まで一度も心疾患の診断に利用されたことのないFLCが心不全等の心疾患の診断に応用できることを見出し、本発明を完成させた。従って、本発明は以下の通りである。
- [0009] [1] 検体中のFLCのカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比のいずれか1つ以上の値と健常者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患を検出する方法。
- [0010] [2] 検体中のFLCのカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比のいずれか1つ以上の値と健常者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患におけるウイルス感染の合併を検出する方法。
- [0011] [3] 検体中のFLCのカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比のいずれか1つ以上の値と健常者もしくは心疾患の軽症者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患の重症度を検出する方法。
- [0012] [4] 心疾患が、心不全、心筋症、心筋炎又は急性心筋梗塞である、上記[1]、[2]又は[3]記載の方法。
- [0013] [5] FLCの測定がイムノアッセイ法である、上記[1]、[2]又は[3]記載の方法。
- [0014] [6] 以下のa)～d)からなる群より選ばれる少なくとも1以上の試薬を含み、上記[1]、[2]又は[3]記載の方法を実施するための心疾患診断用キット。

- a) 固相化FLC特異抗体
- b) 標識化FLC特異抗体
- c) FLC特異抗体
- d) 上記c)記載の抗体に特異的に結合しうる二次抗体

[0015] [7]心疾患が、心不全、心筋症、心筋炎又は急性心筋梗塞である、上記[6]記載のキット。

[0016] [8]FLCの測定がイムノアッセイ法である、上記[6]記載のキット。

発明の効果

[0017] 本発明により、FLCが、心不全、心筋症、心筋炎、急性心筋梗塞等の、心疾患の診断に有用であることが初めて明らかとなった。さらに、心筋症、心筋炎において、C型肝炎ウイルス等のウイルス感染症の合併の診断に有用であることも本発明により初めて見出されたことである。従って、本発明の心疾患を検出する方法及び心疾患診断用キットは、心疾患の診断はもとより、心疾患におけるウイルス感染の合併を診断するのに極めて有用なものである。

[0018] また、カップー値、ラムダ値は心不全等の心疾患の重症度、予後測定に有用とされるNT-proBNP値と相関することから、FLCの測定は心不全等の心疾患の重症度、予後判定に有用である。

[0019] さらに、本発明方法により、心疾患の治療薬の効果の測定、抗ウイルス薬の効果の判定も可能であり、心疾患及びウイルス性感染症の治療薬の開発にも貢献をすることができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]心不全心筋組織内のカップー、ラムダ鎖の検出結果を示す図である(ヘマトキシリン・エオジン染色、FLCkappa(カップー鎖の検出)、FLClambda(ラムダ鎖の検出))。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 1. 心疾患の診断方法

FLCのカップー鎖値、ラムダ鎖値、カップー／ラムダ比のいずれか1つ以上の値が、心疾患病態や予後を反映する。従って、検体中のFLCのカップー鎖とラムダ鎖を

定量することにより、心疾患の診断に利用することができる。

使用する検体は、被験者や臨床献体等から単離された、血液、体液、組織又は排泄物等の試料を意味するが、特に血液、血清、血漿などの血液由来の検体および尿検体が好ましい。

[0022] FLCの測定は、公知のイムノアッセイ法(ELISA法、RIA法など)を採用することにより実施できる。

たとえば、イムノアッセイ法を具体的に説明すれば、検体中に微量に存在するFLCに対して十分な測定感度を有し、インタクトなイムノグロブリンに対する交差反応性をほとんど示さず(例えば1%以下)、検体中のFLC以外の成分の影響を受けない方法が好適であり、好ましくは中野らが開発した酵素免疫測定法を利用することができる(J. Immunol. Methods, 2003, 275, 9-17)。

[0023] また、より高感度にFLCを測定したい場合には、検体中のFLCを捕獲(トラップ)するための抗体としてFLCに特異的なポリクローナル抗体を使用し、トラップされたFLCを検出するための抗体としてFLCに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用するイムノアッセイ法を採用するのが好ましい。

[0024] 使用する抗体は、FLCに特異的に反応するモノクローナル抗体及びFLCに特異的に反応するポリクローナル抗体から選ばれる2種類の抗体である。このような抗体は、抗体自体あるいはそれらの活性フラグメント[F(ab')₂、Fab'など]であってもかまわない。

[0025] ここで、FLCに特異的に反応する抗体とは、インタクトイムノグロブリン中に存在する重鎖と結合した軽鎖に対する反応性が極めて弱い又は全く認識せず、重鎖に結合していない軽鎖には強く反応する抗体を意味する。

[0026] このようなFLCに特異的に反応するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、常法により作製することができる。たとえばFLCのカッパー鎖又はラムダ鎖を抗原とし、モノクローナル抗体を調製し、得られた抗体の中からインタクトイムノグロブリンとは結合せず、FLCと特異的に結合する抗体を選出すればよい。

[0027] また、FLCに特異的に反応するポリクローナル抗体は、常法により作製することができる。たとえばFLCのカッパー鎖又はラムダ鎖を抗原とし、ポリクローナル抗体を調

製し、得られた抗体成分のうちインタクトイムノグロブリンに結合する抗体を吸収、除去すればよい。さらに、このような抗体は既に市販されており、利用可能である。ただしFLCに対する特異性を確認する必要がある。

[0028] 免疫測定法自体は、従来行われている方法、手順など何等変わるものではない。すなわち、検体中のFLCを捕獲(トラップ)するための抗体としては、担体に結合した固相抗体を例示することができる。

[0029] 固相抗体を調製する際に使用する担体としては、通常使用されているもの、たとえば、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、スチレンー無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体(セファデックスなど)、アガロースゲル(セファロース、バイオゲルなど)、セルロース(ペーパーディスク、濾紙など)などの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコンなどの無機高分子化合物を例示することができ、これらはアミノ基、カルボキシル基、カルボニル基、水酸基、スルヒドリル基などの官能基が導入されたものであってもよい。

[0030] 担体の形状は、平板状(マイクロタイタープレート、ディスクなど)、粒子状(ビーズなど)、管状(試験管など)、繊維状、膜状、微粒子状(ラテックス粒子など)、カプセル状、小胞体状などいずれの形状であってもよく、測定法に応じて好適な形状の担体を適宜選択すればよい。

[0031] 担体と抗体の結合は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法[たとえば、「固定化酵素」(千畑一郎編、昭和50年3月20日、(株)講談社発行)参照]を採用することができ、とりわけ、物理的吸着法は簡便である点で好ましい。また、上記結合は直接行ってもよく、両物質の間に他の物質を介して行ってもよい。

このようにして得られた固相試薬は、非特異的結合を抑制するため、ゼラチン、BSAなどの通常のブロッキング剤を用いてブロッキング処理を施してもよい。

[0032] また、トラップされたFLCを検出するための抗体としては、標識剤で標識された抗体を例示することができる。標識剤としては、放射性同位体(たとえば ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I

など)、酵素(たとえば β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミノオキシダーゼなど)、補酵素・補欠分子族(たとえば、FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘムなど)、フルオレセイン誘導体(たとえば、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインチオフルバミルなど)、ローダミン誘導体(たとえば、テトラメチルローダミンBイソチオシアネートなど)、ウンベリフェロン及び1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸などの蛍光色素、ルミノール誘導体[たとえば、ルミノール、イソルミノール、N-(6-アミノヘキシル)-N-エチルイソルミノールなど]などを例示することができる。

[0033] 抗体と標識剤との結合は、成書[たとえば、「続生化学実験講座5免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、(1986年発行)第102~112頁]に記載されているような公知の方法から適宜選択して実施すればよい。

[0034] このような固相抗体と標識抗体を用いての測定手順は、通常の免疫測定法の手順をそのまま採用すればよい。すなわち、固相抗体と被検試料を反応させ、必要によりBF分離後、さらに標識抗体を反応させる(ツーステップ法)か、固相抗体、被検試料及び標識抗体を同時に反応させ(ワンステップ法)、以後のそれ自体公知の方法により試料中のFLCを検出又は定量することができる。

[0035] なお、免疫測定法の詳細については、たとえば以下の文献を参照すればよい。

- (1) 入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」((株)講談社、昭和54年5月1日発行)
- (2) 石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)((株)医学書院、1982年12月15日発行)
- (3) 臨床病理 臨時増刊 特集第53号「臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」(臨床病理刊行会、1983年発行)
- (4) 「バイオテクノロジー事典」((株)シーエムシー、1986年10月9日発行)

[0036] (5) 「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 70」(Immunochemical techniques(Part A))

(6) 「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 73」(Immunochemical techniques(Part B))

(7)「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 74」(Immunochemical techniques(Part C))

(8)「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 84」(Immunochemical techniques(Part D:Selected Immunoassay))

(9)「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 92」(Immunochemical techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))

[(5)～(9)はアカデミックプレス社発行]

[0037] このようにして測定したFLCのカッパー鎖値、ラムダ鎖値、カッパー／ラムダ比のいずれか1つ以上の値が、心疾患病態や予後を診断する。

対象とする心疾患としては、心不全、心筋症、心筋炎、急性心筋梗塞又はそれらのウイルス感染症が挙げられる。

[0038] 診断は、検体中のFLCのカッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比のいずれか1つ以上の値と健常者の対応する値を比較することにより、心疾患の存在の検出、心疾患におけるウイルス感染の合併の検出、あるいは心疾患の重症度の検出、急性心筋梗塞と心筋炎や心不全との鑑別等が可能である。

[0039] 検体中のカッパー鎖値、ラムダ鎖値、カッパー／ラムダ比は、後記実施例1に示すように、病態により変動し、かつ従来のマーカーや心機能を示す指標と相関する。

従って、これらの判定値にもとづき、心疾患の存在の検出、心疾患におけるウイルス感染の合併の検出、あるいは心疾患の重症度の検出が可能である。ここで心疾患の検出には、心不全、心筋症、心筋炎及び急性心筋梗塞のそれぞれの鑑別も含まれる。

[0040] 2. 心疾患診断用キット

本発明のキットは、上述の心疾患の診断方法を実施するためのものであり、たとえば、下記の試薬から構成される。

1) 固相化FLC特異抗体

2) 標識化FLC特異抗体

[0041] ここで固相化FLC特異抗体及び標識化FLC特異抗体に用いるFLC特異抗体は、

FLC特異モノクローナル抗体及びFLC特異ポリクローナル抗体のいずれでもよいが、2種のFLC特異モノクローナル抗体を組み合わせて用いてもよく、FLC特異ポリクローナル抗体とFLC特異モノクローナル抗体の組み合わせでもよい。このうち、固相化FLC特異ポリクローナル抗体と標識化FLC特異モノクローナル抗体とを組み合わせるのが、感度の点で好ましい。

[0042] また、標識化FLC特異抗体の代わりに標識化してないFLC特異抗体と二次抗体を使用してもよく、その場合には次の試薬から構成される。

1) 固相化FLC特異抗体

2) FLC特異抗体

3) 標識化抗イムノグロブリン抗体

[0043] ここで用いる固相化FLC特異抗体及びFLC特異抗体も、前記と同様にモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。このうち、固相化FLC特異ポリクローナル抗体とFLC特異モノクローナル抗体とを組み合わせるのが、感度の点で好ましい。

[0044] 上記各試薬のほか、必要により、発色試薬、反応停止用試薬、標準抗原試薬、試料前処理用試薬などの各試薬から測定法に応じた適当な試薬を適宜選択し、本発明のキットに添付すればよい。

実施例

[0045] 以下、実施例に基づき、詳細に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。

[0046] (1) 血清検体

本実験に使用した血清検体としては、健常ボランティア、心不全患者、心筋症患者及び心筋炎患者の血清を用いた。

[0047] (2) FLC特異モノクローナル抗体

FLC特異モノクローナル抗体はFLC (Bethyl laboratories 社, Montgomery, TX) をBALB/cマウスに免疫し、作製した(J. Immunol. Methods, 275, 9-17. (2003))。また、得られた抗体のF(ab')₂フラグメントをホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識した(J. Histochem. Cytochem., 22, 1084-91. (1974))。

[0048] (3) FLC測定法

FLC測定法については文献(J. Immunol. Methods, 2003, 275, 9-17)に従って行った。すなわち、FLC特異モノクローナル抗体をコートした96穴マイクロプレート(Nunc)に検体あるいは標準濃度溶液を100 μ l毎加え、室温で2時間反応させた。洗浄した後、二次抗体として抗カッパー軽鎖型抗体ならびに抗ラムダ軽鎖型抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識体を各100 μ l加え、37°C、30分反応させた。反応後、0.05% Tween20を含むPBSで洗浄し、発色液(OPD、Sigma)を100 μ l毎分注し発色させた。1N硫酸にて発色を停止後、492nmでの吸光度を測定した。なお、アッセイ用の緩衝液としては1%ウシ血清アルブミンを含む50mMトリス塩酸(pH7.5)を使用した。

[0049] 実施例1

心不全患者63例(2002年12月～2004年11月)について、以下の検討を行った。上記の患者のうちNT-proBNP、幹細胞因子(SCF)を測定した17例におけるFLCとの相関を表1に示す。

[0050] [表1]

X	NT-proBNP (y)			SCF (y)		
		r ²	p		r ²	p
Kappa	y=280x-4920	0.511	0.0013	y=12.9x+381	0.3518	0.012
Lambda	y=51.6x-455	0.806	<0.0001	y=1.72x+642	0.289	0.0259
Kappa/lambda	y=-32600x+18900	0.564	0.0005		0.0641	0.327

[0051] 実施例2

心筋炎多施設臨床試験(Myocarditis Treatment Trial)の血清中のFLCの測定結果を以下に示す。

(1)心筋炎全体の測定結果を表2に示す。

[0052] [表2]

	n	kappa (mg/L)	lambda (mg/L)	kappa/lambda
心筋炎	1,318	37.6 $\pm$ 19.2**	72.4 $\pm$ 124.2*	0.64 $\pm$ 0.32
正常者	17	27.9 $\pm$ 5.3	43.6 $\pm$ 8.8	0.66 $\pm$ 0.16

平均 $\pm$ 標準偏差、* p < 0.0005, ** p < 0.0001

[0053] (2) C型肝炎ウイルス(HCV)感染の有無との関係を表3に示す。

[0054] [表3]

	n	kappa (mg/L)	lambda (mg/L)	kappa/lambda
HCV (+)	42	30.6 ± 14.8*	173.1 ± 37.1*	0.27 ± 0.22*
HCV (-)	1,276	37.9 ± 19.3*	69.1 ± 81.7*	0.66 ± 0.31
正常者	17	27.9 ± 5.3	43.6 ± 8.8	0.66 ± 0.16

平均 ± 標準偏差、* $p < 0.0001$ 対正常者、HCV (+, -) $p < 0.0001$

[0055] (3) C型肝炎ウイルス抗体陽性の心筋症患者におけるFLC値を表4に示す。

[0056] [表4]

	n	kappa	lambda	kappa/lambda
C型肝炎ウイルス抗体(+)	5	42.5 ± 27.2*	79.9 ± 74.0*	0.558 ± 0.338
正常者	17	27.9 ± 5.3	43.6 ± 8.8	0.661 ± 0.162

* $p < 0.05$

[0057] (4) FLCと心不全重症度の関係

ニューヨーク心臓協会(NYHA)の自覚症状に基づく心不全の心機能分類によって軽症(I度+II度)と重症(III度+IV度)に分けて、重症度との関連について検討した結果を表5に示す。

[0058] [表5]

NYHA心機能分類			
	軽症(I度+II度)(n=17)	重症(III度+IV度)(n=63)	p
kappa	32.0 ± 15.4	40.8 ± 39.2	NS
lambda	55.0 ± 44.0	93.2 ± 67.9	0.03
kappa / lambda	0.67 ± 0.31	0.46 ± 0.14	0.0001

[0059] (5) 実施例1及び2の結果のまとめ

(5-1) 心不全におけるカッパー、ラムダ値は、心不全の重症度や予後と関係するNT-proBNPと正の相関を有し、特にラムダ値との相関が強く、一方カッパー／ラムダ比とは負の相関を示した。

- [0060] (5-2) 心不全におけるカッパー、ラムダ値は、SCF値と正の相関を有する。
- (5-3) 心筋炎において、カッパー、ラムダ値は上昇するが、カッパー／ラムダ比に変化はない。
- (5-4) 心筋炎において、カッパー、ラムダ値は、NT-proBNPと正の相関を示し、カッパー／ラムダ比はNT-proBNPと負の相関を示す。
- [0061] (5-5) 心筋炎において、C型肝炎ウイルス感染者ではカッパー、ラムダ値は上昇するが、特にラムダ値の上昇が著明で、カッパー／ラムダ比は著明に低下する。
- (5-6) C型肝炎ウイルス感染陽性の心筋症では、カッパー、ラムダ値とも増加し、カッパー／ラムダ比は低下傾向を示す。
- [0062] (5-7) 重症心不全では、軽症に比べラムダ値が高く、カッパー／ラムダ比は低下した。従って、心不全におけるラムダ値、カッパー／ラムダ比は心不全の重症度と関連する。
- (5-8) 心不全にC型肝炎ウイルス感染が加わると、ラムダ値が一層上昇し、カッパー／ラムダ比は逆に低下する。
- [0063] 実施例3
- 心不全患者48例において以下の検討を行った。
- (1) 心不全患者48例の正常者17例のFLCカッパー鎖、ラムダ鎖、カッパー／ラムダ比を比較した。
- その結果、心不全ではFLCラムダ鎖が増加し、カッパー／ラムダ比が低下することが明らかとなった。

[0064] [表6]

	n	kappa	lambda	kappa/lambda
心不全	48	32.7±0.5	80.2±57.5*	0.46±0.12**
正常者	17	27.9±5.3	43.6±8.8	0.66±0.16

平均±標準偏差、t検定、*p<0.05、**p<0.0001

[0065] (2) 心不全48例において生存期間とFLCとの関連を検討した。

その結果、生存期間とラムダ鎖には負の相関があることが明らかとなった。

[0066] [表7]

x		生存期間 (日) (y)		
		r	r ²	p
lambda	$y = -6.2x + 1010$	-0.48	0.23	$p < 0.05$

[0067] (3) FLC カッパー鎖、ラムダ鎖、カッパー／ラムダ比と心不全、心筋傷害の指標である NT-proBNP (Roche Diagnostics) との関連を検討した。

その結果、カッパー鎖、ラムダ鎖は NT-proBNP と正の相関を示し、カッパー／ラムダ比とは、負の相関を示し、心不全、心筋傷害の指標となることが明らかとなった。

[0068] [表8]

x		NT-proBNP (pg/ml) (y)		
		r	r ²	p
kappa	$y = 246x - 3290$	0.40	0.16	$p < 0.005$
lambda	$y = 54.7x + 341$	0.49	0.24	$p < 0.0005$
kappa/lambda	$y = -18800x + 13300$	-0.36	0.13	$p < 0.05$

[0069] (4) FLC カッパー、ラムダ、カッパー／ラムダ比と心臓カテーテル検査における肺動脈圧との関連を検討した。

その結果、カッパー鎖、ラムダ鎖は平均肺動脈圧と正の相関を示した。

[0070] [表9]

x		平均肺動脈圧 (mmHg) (y)		
		r	r ²	p
kappa	$0.71x + 8.7$	0.54	0.30	$p < 0.05$
lambda	$0.22x + 14$	0.48	0.23	$p < 0.05$

[0071] (5) FLC カッパー、ラムダ、カッパー／ラムダ比と心臓カテーテル検査における心拍出係数との関連を検討した。

その結果、カッパー鎖、ラムダ鎖は心拍出係数と有意な負の相関を示し、心機能と関連することが明らかとなった。

[0072] [表10]

x		心拍出係数(L/m ²) (y)		
		r	r ²	p
kappa	y=-0.4x+4.19	-0.78	0.61	p<0.0001
lambda	y=-0.1x+3.74	-0.59	0.35	p<0.005

[0073] (6)FLCカッパー鎖、ラムダ鎖、カッパー／ラムダ比と心エコー図による左室収縮末期経(LVDs)、拡張末期経(LVDd)、及び心収縮能の指標である左室駆出分画(EF)との関係を検討した。

その結果、ラムダ鎖はLVDd, LVDsと有意な正の相関を有し、左室腔の拡大と関連し、カッパー／ラムダ比はLVDd, LVDsと負の相関、EFとは正の相関を示し、左室腔の拡大、心臓の収縮能と関連することが明らかとなった。

[0074] [表11]

x		LVDd (mm) (y)		
		r	r ²	p
kappa	y=0.41x+62.8	0.25	0.06	p=0.24
lambda	y=0.33x+51.3	0.58	0.33	p<0.005
kappa/lambda	y=-98x+119	-0.72	0.51	p<0.0001

x		LVDs (mm) (y)		
		r	r ²	p
kappa	y=0.42x+52.1	0.25	0.06	p=0.24
lambda	y=0.33x+40.8	0.57	0.32	p<0.005
kappa/lambda	y=-102x+110	-0.73	0.53	p<0.0001

x		EF (%) (y)		
		r	r ²	p
kappa/lambda	y=67.4x-0.14	0.59	0.35	p<0.005

[0075] (7)FLCカッパー鎖、ラムダ鎖、カッパー／ラムダ比と炎症反応の指標であるCRPと相関を検討した。

その結果、カッパー鎖、ラムダ鎖はCRPと有意な正の相関を示し、カッパー鎖、ラムダ鎖は炎症反応を反映することが示された。

[0076] [表12]

x		CRP (mg/dl) (y)		
		r	r ²	p
kappa	y=0.3x-6.89	0.5	0.25	p<0.05
lambda	y=0.95x-4.54	0.46	0.21	p<0.05
kappa/lambda	y=-7.8+5.73	-0.16	0.02	p=0.46

[0077] (8) FLC カッパー鎖、ラムダ鎖、カッパー／ラムダ比と線維化の指標であるIV型コラーゲンとの相関を検討した。

その結果、カッパー鎖、ラムダ鎖はIV型コラーゲンと正の相関を示し、カッパー／ラムダ比はIV型コラーゲンと負の相関を示し、FLCは線維化のマーカーと関連することが明らかとなった。

[0078] [表13]

x		IV型コラーゲン (ng/ml) (y)		
		r	r ²	p
kappa	y=0.48x+20.5	0.62	0.39	p<0.0001
lambda	y=1.1x+89.3	0.78	0.61	p<0.0001
kappa/lambda	y=-250x+291	-0.38	0.14	p<0.01

[0079] (9) 心不全症例の心筋標本のパラフィン切片を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行い、心筋細胞径を測定し、FLCとの関連を検討した。

その結果、心筋細胞径はカッパー／ラムダ比と負の相関を示した。

[0080] [表14]

x		心筋細胞径 (μm) (y)		
		r	r ²	p
kappa/lambda	y=-31.8x+44.9	-0.63	0.39	p<0.005

[0081] (10) FLCとマスト細胞との関連を検討するため、心不全の手術時に採取された凍結保存された心筋組織を用いRNAを抽出し、リアルタイムPCR法により幹細胞因子(SCF)、メタロプロテアーゼ(MMP-9)、キマーゼ、トリプターゼのメッセンジャーRNA(mRNA)の発現を検討した。各mRNAはハウスキーピング遺伝子であるGAPDHで補正した。

その結果、カッパー／ラムダ比は、SCF、MMP-9、キマーゼ、トリプターゼの発現と正の相関を示し、マスト細胞の活性化との関連が考えられた。

[0082] [表15]

x		SCF/GAPDH (y)		
		r	r ²	p
kappa/lambda	y=12900x-4590	0.46	0.21	p<0.05

x		MMP-9/GAPDH (y)		
		r	r ²	p
kappa/lambda	y=651x-231	0.44	0.19	p<0.05

x		Chymase/GAPDH (y)		
		r	r ²	p
kappa/lambda	y=349x-124	0.43	0.19	p<0.05

x		Tryptase/GAPDH (y)		
		r	r ²	p
kappa/lambda	y=1050x-373	0.43	0.18	p<0.05

[0083] (11) 心不全例の心臓組織におけるカッパー鎖、ラムダ鎖原の分布を検討した。

心不全の心臓のホルマリン固定標本のパラフィンブロックより5ミクロンの切片を作製した。切片はキシレンにより脱パラフィンを行った後、アルコールにより脱水し、過酸化水素により内因ペルオキシダーゼを不活化した。

一次抗体としてカッパー鎖、ラムダ鎖に対するマウスモノクローナル抗体(ヤマサ醤油、千葉)を用い4℃で一夜インキュベートし、マウスIgG用にペクスタインABC kit(バーリンゲーム、CA、U. S. A.)により免疫染色を行い、DAB発色を行った。

その結果、図に示す如く心不全の心臓において、心筋組織内の白血球にカッパー鎖、ラムダ鎖が検出され、心不全の心筋内に浸潤した白血球がカッパー鎖、ラムダ鎖を産生することが明らかとなった。

[0084] (12) 心不全患者20例における尿中FLCを測定し、正常者の尿中FLCと比較検討した。

その結果、心不全では尿中カッパー鎖、ラムダ鎖は正常者に比し有意に高値を示

した。

[0085] [表16]

	n	kappa (mg/L)	lambda (mg/L)	kappa/lambda
正常者	29	2.14±2.34	2.79±3.49	0.82±0.29
心不全	20	5.74±7.56*	7.10±8.75*	0.82±0.29

*p<0.05 対正常者

[0086] (13) 心不全患者20例における尿中と血中のFLCの相関を調べた。

その結果、尿中の銅鎖、ラムダ鎖、銅鎖／ラムダ比と血中の銅鎖、ラムダ鎖、銅鎖／ラムダ比には有意な正の相関がみられた。

[0087] [表17]

	n	r	r ²	p
尿中kappa (y) : 血中kappa (x)	y=0.165x-6.28	0.45	0.20	p<0.05
尿中lambda (y) : 血中lambda (x)	y=0.0936-3.5	0.58	0.34	p<0.01
尿中kappa : 血中kappa /lambda (y) /lambda (x)	y=0.922x+0.156	0.65	0.42	p<0.005

[0088] (14) 実施例3の結果のまとめ

(14-1) 心不全ではラムダ鎖が増加し、銅鎖／ラムダ比が低下する。

(14-2) ラムダ鎖は心不全の生命予後と関連する。

(14-3) 銅鎖、ラムダ鎖は心不全、心筋傷害のマーカーNT-proBNPと関連し、炎症マーカーであるCRPとも関連する。

(14-4) 銅鎖、ラムダ鎖は心機能と関連し、ラムダ鎖、銅鎖／ラムダ比は心内腔の拡大と関連する。

(14-5) 銅鎖、ラムダ鎖、銅鎖／ラムダ比は線維化のマーカーと関連する。

(14-6) 銅鎖／ラムダ比は心筋細胞肥大と逆相関する。

(14-7) 銅鎖／ラムダ比は、マスト細胞関連メディエータと関連する。

(14-8) 心不全の心筋内に浸潤した白血球細胞から銅鎖、ラムダ鎖が産生される。

(14-9) 心不全患者尿中の銅鎖、ラムダ鎖は増加する。

(14-10) 心不全患者尿中の銅鎖、ラムダ鎖、銅鎖／ラムダ比は血中の銅鎖、ラムダ鎖、銅鎖／ラムダ比と相関する。

[0089] 実施例4

急性心筋梗塞発症当日、24時間後、4週後のFLCを測定し、正常者と比較検討した。

その結果、銅鎖は、心筋梗塞発症当日、24時間後は有意に減少したが、ラムダ鎖、銅鎖／ラムダ比には有意な差がみられなかった。

このことから、FLC銅鎖の測定は急性心筋梗塞の診断に有用であり、さらに急性心筋梗塞と心筋炎や心不全との鑑別にも有用であることがわかった。

[0090] [表18]

	n	kappa (mg/L)	lambda (mg/L)	kappa/lambda
正常者	17	27.9±5.3	43.6±8.8	0.66±0.16
急性心筋梗塞				
発症当日	70	23.6±8.3*	50.2±40.5	0.54±0.20
24時間後	65	22.5±6.8*	48.7±42.5	0.56±0.23
4週後	36	27.4±7.8	53.6±19.8	0.53±0.14

一元配置分散分析：F=5.0；p<0.005

各群比較：FisherのLDS法、*p<0.05（対 正常者及び4週後）

[0091] 以上の結果から、FLCの測定は、心不全、心筋症、心筋炎、急性心筋梗塞の診断に有用である。心筋症、心筋炎においてC型肝炎ウイルス感染者では、銅鎖、ラムダ値が増加し、銅鎖／ラムダ比は低下することから、C型肝炎ウイルス感染やその他のウイルス感染症の診断に有用である。

[0092] HCV感染のある心不全では、HCV感染のない心不全に比し、ラムダ値が一層高値となり、銅鎖／ラムダ比は逆に低下するため、感染症の合併を診断することができる。

従って、心不全の治療薬の効果、及び抗ウイルス薬の効果の判定ができ、心不全、心筋症、心筋炎、ウイルス性感染症の治療薬の開発に貢献できる。

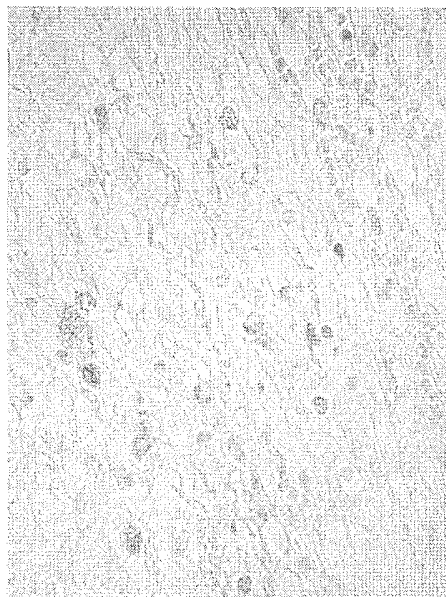
[0093] 重症心不全では、軽症に比べラムダ値がさらに高く、銅鎖／ラムダ比は低下し、心不全の重症度と関連した。また、銅鎖、ラムダ値は心不全の重症度、予後測定に有用とされるNT-proBNP値と相関することから、FLCの測定は心不全の重症度、予後判定に有用である。

請求の範囲

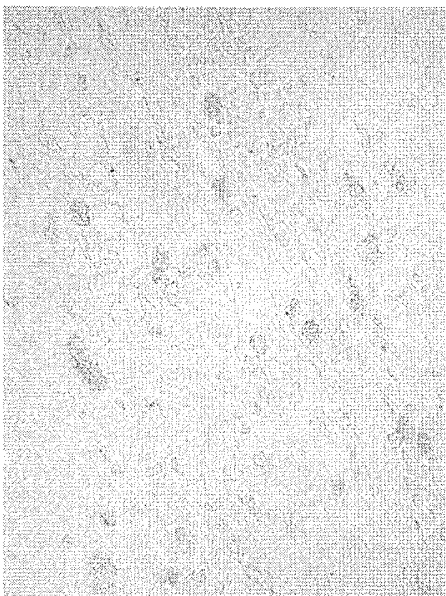
- [1] 検体中の遊離イムノグロブリン軽鎖のカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比の、いずれか1つ以上の値と健常者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患を検出する方法。
- [2] 検体中の遊離イムノグロブリン軽鎖のカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比の、いずれか1つ以上の値と健常者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患におけるウイルス感染の合併を検出する方法。
- [3] 検体中の遊離イムノグロブリン軽鎖のカッパー鎖及び／又はラムダ鎖を測定し、カッパー鎖値、ラムダ鎖値又はカッパー／ラムダの比の、いずれか1つ以上の値と健常者もしくは心疾患の軽症者の対応する値を比較することを特徴とする、心疾患の重症度を検出する方法。
- [4] 心疾患が、心不全、心筋症、心筋炎又は急性心筋梗塞である、請求項1、2又は3記載の方法。
- [5] 遊離イムノグロブリン軽鎖の測定がイムノアッセイ法である、請求項1、2又は3記載の方法。
- [6] 以下のa)～d)からなる群より選ばれる少なくとも1以上の試薬を含み、請求項1、2又は3記載の方法を実施するための心疾患診断用キット。
a) 固相化遊離イムノグロブリン軽鎖特異抗体
b) 標識化遊離イムノグロブリン軽鎖特異抗体
c) 遊離イムノグロブリン軽鎖特異抗体
d) 上記c)記載の抗体に特異的に結合しうる二次抗体
- [7] 心疾患が、心不全、心筋症、心筋炎又は急性心筋梗塞である、請求項6記載のキット。
- [8] 遊離イムノグロブリン軽鎖の測定がイムノアッセイ法である、請求項6記載のキット。

[図1]

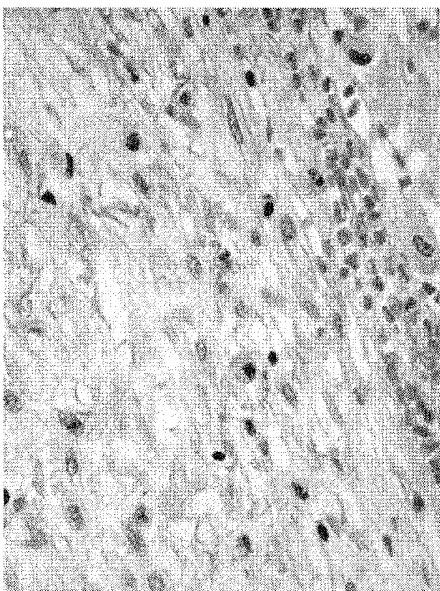
× 600



FLC lambda



FLC kappa



ヘマトキシリン・

エオジン染色

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/53 (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), JSTPLUS (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A/X	FISCHER, C. et al., "Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis", Clinical Chemistry, 2004, Vol.50, No.10, pages 1809 to 1813	1-5/6-8
A	KATZMANN, J.A. et al., "Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: Relative sensitivity for detection of monoclonal light chains", Clinical Chemistry, 2002, Vol.48, No.9, pages 1437 to 1444	1-8
A	BOLLENGIER, F., "Bound and free light chains in serum from patients affected with various neurological diseases", J.Clin.Chem.Clin. Biochem., 1979, Vol.17, pages 45 to 49	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
09 June, 2006 (09.06.06)

Date of mailing of the international search report
20 June, 2006 (20.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307631

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CONTINI, C. et al., "Evidence of cerebrospinal fluid free kappa light chains in AIDS patients with Toxoplasma gondii encephalitis", 2000, J. Neuroimmunology, Vol.108, pages 221 to 226	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53 (2006. 01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53 (2006. 01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus (STN)、JSTPlus (JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A/X	FISCHER, C., et al., "Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis", Clinical Chemistry, 2004, Vol. 50, No. 10, p.1809-1813	1 - 5 / 6 - 8
A	KATZMANN, J. A. et al., "Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: Relative sensitivity for detection of monoclonal light chains", Clinical Chemistry, 2002, Vol. 48, No. 9, p. 1437-1444	1 - 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 9 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

2 0 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

2 J

3 4 9 6

白形 由美子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BOLLENGIER, F., "Bound and free light chains in serum from patients affected with various neurological diseases", J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1979, Vol. 17, p. 45-49	1 - 8
A	CONTINI, C., et al., "Evidence of cerebrospinal fluid free kappa light chains in AIDS patients with Toxoplasma gondii encephalitis", 2000, J. Neuroimmunology, Vol. 108, p. 221-226	1 - 8