

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4510942号
(P4510942)

(45) 発行日 平成22年7月28日 (2010. 7. 28)

(24) 登録日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 51/00 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

G O 1 N 33/15 (2006. 01)

G O 1 N 33/50 (2006. 01)

A 6 1 K 49/02

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68

G O 1 N 33/15

G O 1 N 33/50

C

Z

Z

K

請求項の数 35 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-549339
 (86) (22) 出願日 平成10年5月8日 (1998. 5. 8)
 (65) 公表番号 特表2001-527558 (P2001-527558A)
 (43) 公表日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/009479
 (87) 国際公開番号 WO1998/051820
 (87) 国際公開日 平成10年11月19日 (1998. 11. 19)
 審査請求日 平成17年5月9日 (2005. 5. 9)
 (31) 優先権主張番号 08/857, 007
 (32) 優先日 平成9年5月15日 (1997. 5. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 946
 07-5200, オークランド, フラン
 ク リン ストリート 1111, フィフス
 フロア, オフィス オブ テクノロジー
 トランスファー

(74) 代理人

弁理士 石田 敬

(74) 代理人

弁理士 鶴田 準一

(74) 代理人

弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 in vitro及びin vivoで細胞増殖速度及び分解速度を測定するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象又は細胞における細胞増殖又は細胞分解速度を決定するためのインビトロの方法であって、

DNAのプリンデオキシリボヌクレオシド又はその誘導体の中に組込まれた安定なアイソトープラベルの量をマスマスペクトルにより検出し、ここで当該DNAは、当該対象又は細胞であってde novoヌクレオチド経路を介して前記DNAの中に前記安定なアイソトープラベルが組込まれるのに十分な時間にわたり当該安定なアイソトープラベルを含んで成る組成物の投与された対象又は細胞から獲得され、そして、

当該対象又は細胞における細胞増殖又は細胞分解速度を決定するために前記プリンデオキシリボヌクレオシド又はその誘導体に由来するマスマスペクトル分率を分析すること、を含んで成る方法。

【請求項 2】

前記ラベルがデオキシリボースの前駆体に付加されており、当該前駆体がデオキシリボースの中に組込まれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記前駆体がグルコースであり、そして前記ラベルが当該グルコースに付加されている、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記DNAをデオキシリボヌクレオシドに加水分解してからそのDNA内のラベルを検出する、

10

20

請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記対象がヒトである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

DNAを癌細胞又は前記対象の癌細胞から抽出する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

DNAをリンパ球細胞又は前記対象のリンパ球から抽出する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記リンパ球細胞がCD 4⁺細胞を含んで成る、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記ヒトがヒト免疫不全ウイルス (HIV) で感染している、請求項 5 記載の方法。

【請求項 10】

前記安定なアイソトープラベルがT細胞のDNAのプリンデオキシリボヌクレオシドに組み込まれ、そして増殖又は分解速度がT細胞のそれである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記T細胞がCD 4⁺又はCD 8⁺細胞を含んで成る、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記方法を、前記ヒトのHIV感染症のための抗レトロウイルス処置の前に実施する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記方法を前記ヒトのHIV感染症のための抗レトロウイルス処置の後に実施する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

細胞増殖を誘導又は阻害する能力について薬剤をスクリーニングするインビトロの方法であって：

(a) 細胞を当該薬剤と接触させる；

(b) 当該細胞を安定なアイソトープラベルと、de novoヌクレオチド合成経路を介して当該細胞のDNAのプリンデオキシリボヌクレオシドの中に当該アイソトープラベルが組込まれるのに十分な時間にわたり、接触させる；

(c) 当該DNA内に組み込まれた安定なアイソトープラベルの量をマスペクトルにより検出する、そして

(d) 前記プリンデオキシリボヌクレオシド由来のマスペクトル分率を分析する、ここで当該薬剤に曝露していない細胞におけるコントロール適用と比べての当該ラベルの量は当該薬剤の細胞増殖を誘導又は阻害する能力を示唆する；

ことを含んで成る方法。

【請求項 15】

前記段階 (a) を段階 (b) の前に実施する、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

前記前駆体がグルコースであり、そして前記ラベルが当該グルコースに付加されている、請求項 14 又は 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記DNAをデオキシリボヌクレオシドに加水分解してからそのDNA内のラベルを検出する、請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

薬剤に曝露された対象において細胞増殖を誘導又は阻害する能力について当該薬剤をインビトロでスクリーニングする方法であって：

試料中の注目の細胞のDNAのプリンデオキシリボヌクレオシド内に組み込まれた安定なアイソトープラベルの量をマスペクトルにより検出し、ここで当該試料は、対象であって

10

20

30

40

50

前記薬剤に対し曝露した後にde novoヌクレオチド経路を介して当該対象のDNAの中に安定なアイソトープラベルが組込まれるのに十分な時間にわたり検出可能な量の当該安定なアイソトープラベルの投与された対象から獲得したものであり、ここで当該薬剤に曝露していない対象におけるコントロール適用と比べての当該ラベルの量は、プリンデオキシリボヌクレオシド由来のマススペクトル分率の分析により決定された細胞増殖の程度、それ故当該薬剤が当該対象における細胞集団を誘導又は阻害するかどうかを示唆する；
ことを含んで成る方法。

【請求項 19】

前記注目の細胞を前記薬剤に直接曝露する、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

前記前駆体がグルコースであり、そして前記ラベルが当該グルコースに付加されている、請求項18又は19に記載の方法。

【請求項 21】

前記DNAをデオキシリボヌクレオシドに加水分解してからそのDNA内のラベルを検出する、請求項18～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象がヒトである、請求項18～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

前記注目の細胞が癌のおそれにあり、そしてDNAを癌のおそれのある当該細胞から抽出する、請求項18～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 24】

前記注目の細胞が前記対象に由来するリンパ球であり、そしてDNAを前記リンパ球から抽出する、請求項18～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 25】

前記リンパ球が前記対象に由来するCD4⁺細胞であり、そしてDNAが前記CD4⁺細胞から抽出されたものである、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

増殖中の細胞集団における細胞増殖を決定するためのインビトロの方法であって：

(a) 増殖中の細胞集団を検出可能な量の第一ラベルと、当該第一ラベルがde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAのプリンデオキシリボヌクレオシドの中に組込まれるのに十分な時間にわたり接触させ、ここで当該第一ラベルは安定なアイソトープを含んで成り；

(b) 前記DNAの中に組込まれた前記第一ラベルの量をマススペクトルにより検出して細胞増殖を測定し；

(c) 前記増殖中の細胞集団のプリンデオキシリボヌクレオシド由来のマススペクトル分率を分析し、

(d) 前記増殖中の細胞集団をde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる放射性アイソトープラベルを含んで成る検出可能な量の第二ラベルと接触させ；そして

(e) このDNA内に組込まれた前記第二ラベルを検出し、この増殖中の細胞集団における細胞増殖を測定する；

ことを含んで成る方法。

【請求項 27】

段階(a)及び(b)を段階(c)及び(d)の前に実施する、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

前記安定なアイソトープラベル及び放射性アイソトープラベルがそれぞれde novoヌクレオチド合成経路においてデオキシリボースの前駆体に付加され、各々の当該前駆体がデオキシリボースに組込まれる、請求項26又は27に記載の方法。

【請求項 29】

前記安定なアイソトープ及び前記放射性アイソトープラベルが各々のラベル化グルコースを含んで成る、請求項26～28のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 0】

前記安定なアイソトープの組込まれたDNA又は前記放射性アイソトープラベルの組込まれたDNAをデオキシリボヌクレオチドに加水分解してから、前記増殖中の細胞集団における細胞増殖を測定するために当該DNA内のラベルを検出する、請求項26～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記放射性アイソトープラベルをアクセレータースペクトル、液体シンチレーションカウンティング又はガンマーカウンティングにより検出する、請求項26～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 2】

疾患に対する前記対象又は細胞の感受性をさらに決定するための請求項1記載の方法であって、ここで当該対象又は細胞は前記疾患を惹起し得、かつ当該対象又は細胞における細胞増殖速度の変化を誘導する条件又は薬剤に曝露され、ここで当該疾患は癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、白血球不全、貧血、骨髓増殖性障害、組織白血球浸潤障害、リンパ増殖障害、モノクローナルガンモパシー、アルコール性肝炎、ウィルス性肝炎、糖尿病ニューロパシー、筋栄養症状、早期性腺不全、骨粗しょう症、筋炎、糖尿病、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症、上皮小体機能亢進症、多嚢胞卵巣、結核、細菌感染症、膿瘍、ウィルス感染症；糖尿病足炎、壊疽、アテローム発生、心筋症、黒色肺及び日光又は化学薬品に関連する皮膚病からなる群から選択され、
前記細胞増殖を前記条件又は薬剤に曝露していない対象又は細胞のコントロール適用と比較することをさらに含んでなる方法。

【請求項 3 3】

疾患に対する前記対象又は細胞の感受性をさらに決定するための請求項1記載の方法であって、ここで当該対象又は細胞は前記疾患を惹起し得、かつ当該対象又は細胞における細胞分解速度の変化を誘導する条件又は薬剤に曝露され、ここで当該疾患は癌、後天性免疫不全症候群（AIDS）、白血球不全、貧血、骨髓増殖性障害、組織白血球浸潤障害、リンパ増殖障害、モノクローナルガンモパシー、アルコール性肝炎、ウィルス性肝炎、糖尿病ニューロパシー、筋栄養症状、早期性腺不全、骨粗しょう症、筋炎、糖尿病、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症、上皮小体機能亢進症、多嚢胞卵巣、結核、細菌感染症、膿瘍、ウィルス感染症；糖尿病足炎、壊疽、アテローム発生、心筋症、黒色肺及び日光又は化学薬品に関連する皮膚病からなる群から選択され、
前記細胞増殖を前記条件又は薬剤に曝露していない対象又は細胞のコントロール適用と比較することをさらに含んでなる方法。

【請求項 3 4】

前記プリンデオキシリボヌクレオシド由来のマススペクトル分率が規定値アバNdans差し引きのために用いた標準線との適合をさらに含んでなる、請求項1記載の方法。

【請求項 3 5】

前記対象が動物である、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】**1. 序 論**

本発明はデオキシリボ核酸（DNA）合成を測定することにより細胞の増殖及び分解速度を測定するための方法に関する。詳しくは、この方法は細胞におけるde novoヌクレオチド合成経路を介して合成されたDNAを内因性式にラベルするための非放射性安定アイソトープを利用する。DNAの中に組込まれたラベルの量を細胞増殖の指標として測定する。かかる方法は放射性又は潜在的に毒性な代謝物を必要とせず、そしてin vitro及びin vivoの双方において利用するために適当である。従って、本発明は細胞増殖又は分解が関与する様々な疾患又は症状の診断のため、ヒトにおける細胞増殖及び／又は細胞分解を測定するのに有用である。本発明は更に細胞増殖又は細胞分解を誘導又は阻害する能力について薬剤をスクリーニングする方法、及びヒト免疫不全ウィルス（HIV）で感染された被検体におけるT細胞の増殖又は分解を測定するための方法を提供する。

2. 発明の背景

細胞増殖の調節は多細胞生体において重要である。数多くの病理学的過程、例えば癌及び後天性免疫不全症候群（AIDS）（Hoら、1995, Nature 373 : 123-126 ; Weiら、1995, Nature 373 : 117-122 ; Adamiら、1995, Mutat. Res. 333 : 29-35）は細胞代謝回転の正常な調節不良を特徴とする。細胞のin vivo代謝回転の測定はそれ故、適当な方法が獲得できたとしたら、幅広い用途を有する。本発明に先行して、細胞増殖又は分解を測定するための直接及び間接的な技術が存在していたが、両タイプとも欠点を有していた。

細胞増殖の直接的測定は一般にゲノムDNAへのラベル化ヌクレオシドの組込みを包含する。その例にはトリチウム化チミジン（ ^3H -dT）及びプロモデオキシウリジン（BrdU）法（Waldmanら、1991, Modern Pathol. 4 : 718-722 ; Gratzner, 1982, Science 218 : 474-475）が挙げられる。しかしながら、このような技術は、前者では放射線誘導型DNA損傷（Asherら、1995, Leukemia and Lymphoma 19 : 107-119）を理由に、そして後者ではヌクレオシド類似体の毒性（Rochaら、1990, Eur. J. Immunol. 20 : 1697-1708）を理由にヒトへのその用途が制限されている。

間接的な方法は特殊なケースにおいても利用されている。例えば、AIDSにおけるCD4⁺Tリンパ球代謝回転における近年の関心は、有効な抗レトロウイルス治療の開始後の循環系におけるT細胞の累積速度に基づくT細胞増殖の間接的な評価により刺激されている（Hoら、1995, Nature 373 : 123-126 ; Weiら、1995, Nature 373 : 117-122）。残念ながら、かかる間接的な技術は、プールサイズの変化に依存し、決定的なものではない。血液T細胞のプールサイズの増大は真の増殖よりも、他のプールから血液に至る再分配を反映してしまうことがある（Sprent and Tough, 1995, Nature 375 : 194 ; Mosier, 1995, Nature 375 : 193-194）。細胞増殖の直接的測定の欠如において、これら及びその他の代替物を区別することは不可能である（Wolthersら、1996, Science 274 : 1543-1547）。

細胞増殖の測定は癌の如き疾患において重大な診断価値をもつ。抗癌療法の目的は腫瘍細胞増殖を抑制することであり、これは腫瘍DNAが合成されているか分解されているかにより決定できる。現在、化学療法、免疫療法又は放射線療法に関係なく、治療の効能は直接且つ不正確な方法、例えば腫瘍のX線による見かけ上のサイズにより評価されている。治療の効能及び治療の合理的な組合せの選択は様々な介入に対する個体の腫瘍生合成及び異化作用応答を基準にほとんどが直接決定されている。臨床医薬品における細菌感染症のために利用されるモデル（生体を培養し、そして抗生物質に対する感受性を決定し、次いでそれが感受性である抗生物質を選定する）が癌療法のために同様に利用できる。しかしながら、現状実施されている処置はどの程度治療剤が効いているかを直接測定することなく行われている。

癌学者の長期的な展望は、抗生物質が選定されるようにして（即ち、注目の被検体の腫瘍による各薬剤に対する測定感受性を基準に）化学療法剤を選定することにある。癌細胞の複製を測定する能力は化学療法及びリサーチを抗生物質の選定と同等の基準に置き、向上した結果の偉大なる能力が備わるであろう。

従って、有害でなく、且つ臨床業界に適用できる細胞増殖を測定するための汎用的方法についてのニーズが残っている。

3. 発明の概要

本発明はDNA合成による細胞増殖及び/又は分解速度を測定するための方法に関する。詳しくは、本発明は細胞におけるde novoヌクレオチド合成により合成されたDNAを内因性式にラベルするための非放射性安定アイソトープの利用に関連する。DNA合成の際にDNAに組込まれるラベルは当業界において周知の方法により容易に検出できる。組込まれたラベルの量は細胞増殖及び分解速度の指標として測定及び計算できうる。

本発明は、ある程度、DNA合成が、de novoヌクレオチド合成経路を介してデオキシリボース環を安定なアイソトープラベルでラベル化することにより測定されうるとの出願人の発見に基づく。細胞増殖はin vitroで、動物モデル及びヒトにおいて測定できる。in vitroで、対数増殖期にある2種類の細胞系を本発明の方法により測定し、そして細胞増殖の最もあいまいさの低い手段と考えられている直接細胞計測による細胞の増加数と非常に定量

10

20

30

40

50

的に一致することが示された。動物では、本発明の方法は独立の技術により予め評価した値とも一致することが示された。例えば、胸腺及び腸内上皮は迅速代謝回転組織であることが示され、一方肝細胞の代謝回転ははるかに遅い。ヒトでは、対数増殖期、それに続くラベル化顆粒球の集団の急速な出現の観察パターンも従来の観察と一致した。

この方法は慣用のラベル化技術とは3つの大きな点で異なる。第一に、慣用のアイソトープ方法はDNAを既知のヌクレオシドサルベージ経路を介してラベルするが、本発明の方法はDNA内のデオキシリボヌクレオチドを、プリン及びピリミジンヌクレオチドが形成される既知のde novoヌクレオチド生合成経路(図1)を介してラベルする。簡単には、de novoヌクレオチド合成経路においては、リボヌクレオチドはまず小さな前駆体分子(例えばグルコース、グルコース-6-リン酸、リボース-5-リン酸、プリン及びピリミジン塩基、等)から生成され、そしてその後リボヌクレオチドリダクターゼによりデオキシリボヌクレオチドへと還元される。例えば、図1: Reichard, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 349-374 (例えばFigs. 1及び2); THOMAS SCOTT & MARY EAGLESON, *CONCISE ENCYCLOPEDIA BIOCHEMISTRY* 406-409, 501-507 (2d ed. 1988); 及びTEXTBOOK OF BIOCHEMISTRY WITH CLINICAL CORRELATIONS (Thomas M. Devlin ed., 3d ed. 1992)を参照のこと。それぞれは引用することで本明細書に組入れる。リボヌクレオチドリダクターゼの作用を通じて、3つのデオキシリボヌクレオチド、dADP, dCDP及びdGDPが直接生成される。これらのデオキシリボヌクレオチドは次いでヌクレオシド二リン酸キナーゼによりリン酸化されて対応のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、dATP, dCTP及びdGTPとなる。第4のデオキシリボヌクレオチドdTTPも追加の再造形を経てリボヌクレオチドリダクターゼから生成される。4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、dATP, dCTP, dGTP及びdTTPはDNAの合成のために利用される。de novoヌクレオチド生合成経路を示している図1は安定なアイソトープラベル化グルコースからのDNAの内因性式ラベル化についての経路も示す。

de novoヌクレオチド生合成経路を介するラベル化が好都合であり、なぜなら細胞周期のS期に入る細胞のほとんどにおいて、デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)のde novo合成を調節する重要な酵素、特にリボヌクレオチドリダクターゼ(RR)は上昇調節され、一方ヌクレオシドサルベージ経路(プリン及びピリミジンヌクレオチドの生成のための別の経路)の酵素は抑制されるからである(Reichard, 1978, *Fed. Proc.* 37: 9-14; Reichard, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 349-374; Cohenら1983, *J. Biol. Chem.* 258: 12334-12340; THOMAS SCOTT & MARY EAGLESON, *CONCISE ENCYCLOPEDIA BIOCHEMISTRY* 543-544 (2d ed. 1988))。

第二に、ラベルは本発明の方法では、ピリミジンではなく、プリンデオキシリボヌクレオシドにおいて検出されうる(例えば、 ^3H -dT又はBrdU)。これは有利であり、なぜならde novo合成経路はピリミジンdNTPよりもプリンに対してより活性な傾向にあるからである(Reichard, 1978, *Fed. Proc.* 37: 9-14; Reichard, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 349-374; Cohenら1983, *J. Biol. Chem.* 258: 12334-12340)。事実、調節性デオキシリボヌクレオチドはリンパ球において、ピリミジンdNTPについてはRRに対してネガティブフィードバックを、しかしながらプリンdNTP合成に対してはポジティブフィードバックを発揮することが示されており(Reichard, 1978, *Fed. Proc.* 37: 9-14; Reichard, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 349-374)、de novo合成経路がプリンに対しては常に活性であるが、ピリミジンに対しては変動的であることが確認されている。

更に、不安定なラジオアイソトープの代わりに安定なアイソトープラベルを使用する本発明の方法はヒトへの利用に関して安全である。従って、本発明により多種多様な用途、例えば限定することなく、細胞増殖及び/又は分解の情報が診断価値を有する症状、例えば癌、AIDS、血液疾患、エンドクリン障害、骨障害及び器官不全における細胞増殖及び/又は分解の速度の測定を包括する。無毒な安定アイソトープを採用すると、かかる細胞増殖及び分解速度は対象においてin vivoで測定できる。

一の観点において、本発明は細胞増殖又は細胞分解速度を測定するための方法であって、細胞を、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定アイソトープラベルと接触させ、そしてDNA内のラベルを検出することを含んで成る方法

10

20

30

40

50

を提供する。

本発明は更に対象の細胞増殖及び／又は細胞分解の速度を測定するための方法も提供する。かかる方法は、細胞を、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定アイソトープラベルと接触させ、そして対象のDNA内のこのラベルを検出することを含んで成る。

本発明の別の観点において、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）で感染した対象のT細胞の増殖及び／又は分解速度を測定するための方法を提供する。かかる方法は、対象に検出可能な量の安定アイソトープラベルを投与することを含んで成り、ここでこのラベルはde novoヌクレオチド合成経路を介して対象のT細胞のDNAの中に組込まれる。対象のT細胞のDNA中のラベルは対象のT細胞の増殖及び／又は分解速度を測定するために検出する。

10

本発明は更に細胞増殖を誘導又は阻害する能力について薬剤をスクリーニングする方法も提供する。かかる方法は細胞を薬剤と接触させ、この細胞を、de novoヌクレオチド合成経路を介して当該細胞のDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定アイソトープラベルと接触させることを含んで成る。細胞を薬剤に対して曝露していないコントロール適用と比較したラベルの量は細胞増殖の程度を示唆し、それ故その薬剤が細胞増殖を誘導又は阻害するかを示唆する。

別の観点において、本発明は薬剤についての、その薬剤に曝露された対象における細胞増殖を誘導又は阻害する能力についてスクリーニングする方法を提供する。かかる方法は、当該薬剤に対象を曝露させる；検出可能な量の安定アイソトープラベルをこの対象に投与する（ここで、このラベルはde novoヌクレオチド合成経路を介してこの対象のDNAの中に組込まれる）；そしてこの対象の細胞増殖を示唆するこの対象における注目の細胞のDNA内のラベルを検出する；ことを含んで成る。対象を薬剤に曝露していないコントロール適用と比べたラベルの量は細胞増殖の程度を示唆し、それ故その薬剤が対象の細胞増殖を誘導又は阻害するかを示唆する。

20

本発明の更なる別の観点において、増殖中又は分裂中の細胞集団における細胞増殖を測定するための方法を提供する。これらの方法は：（a）増殖中の細胞集団を検出可能な量の第一ラベルと接触させる（ここでこの第一ラベルはde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる安定アイソトープラベルを含んで成る）；（b）DNAの中に組込まれた第一ラベルを検出して増殖中の細胞集団の細胞増殖を測定する；（c）この増殖中の細胞集団を検出可能な量の第二ラベルと接触させる（ここでこの第二ラベルはde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる放射性アイソトープラベルを含んで成る）；そして（d）DNAに組込まれた第二ラベルを検出し、増殖中の細胞集団の細胞増殖を測定する；ことを含んで成る。放射性及び非放射性アイソトープラベルの双方を採用するいくつかのかかる方法においては、段階（a）及び（b）を段階（c）及び（d）の前に実施する。放射性及び非放射性アイソトープラベルの双方を利用するその他のかかる方法においては、段階（c）及び（d）を段階（a）及び（b）の前に実施する。他方、かかる方法のいくつかにおいては、段階（a）及び（c）を同時に実施してよく、そして段階（b）及び（d）を同時に実施してよい。

30

本発明は更に対象の疾患又は障害（例えばそれ自体は疾患ではないが、疾患に対象をかかり易くする障害）を決定するための方法であって、対象の細胞増殖速度において変化を誘導する方法も含む。かかる方法は、対象をこの疾患又は障害を惹起する又は誘導することのできる条件又は薬剤に委ね、次いで検出可能な量の安定なアイソトープラベルをその対象に投与することを含んで成る。このラベルはde novoヌクレオチド合成経路を介して対象のDNAの中に組込まれる。対象のDNA内のラベルを検出する。上記条件又は薬剤に委ねていない対象のコントロール適用と比べての対象のDNAにおけるラベルの増加は、対象の細胞増殖の速度の上昇及び対象の疾患又は障害に対する感受性を示唆する。

40

本発明は更に、対象の細胞分解の速度において変化を誘導する疾患（それ自体は疾患ではないが、対象を疾患にかかり易くする障害を含む）に対する対象の感受性を決定するための方法も含む。このような方法は、対象を疾患を惹起しうる条件又は薬剤に委ね、検出可能な量の安定アイソトープラベルを対象に投与し（ここでこのラベルはde novoヌクレオ

50

チド合成経路を介して対象のDNAの中に組込まれる)、そして対象のDNA内のラベルを検出することを含んで成る。対象を上記条件又は薬剤に委ねていないコントロール適用と比べての対象のDNA内のラベルの損失は細胞分解速度の上昇及び疾患に対する対象の感受性を示唆する。

別の観点において、本発明は細胞内でDNAをラベル化する方法であって、細胞をde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定アイソトープラベルと接触させることを含んで成る方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

図1: DNA合成の生化学及びラベル侵入のルート。中間体全てを示しているのではない。
G 6 P、グルコース - 6 - リン酸; R 5 P、リボース - 5 - リン酸; PRPP、ホスホリボース
スピロリン酸; DNNS、de novoヌクレオチド合成経路; NDP、リボヌクレオシド - ニリン酸
; RR、リボヌクレオシドリダクターゼ; dN、デオキシリボヌクレオシド; dNTP、デオキシ
リボヌクレオシド - 三リン酸; ^3H - dT、トリチウム化チミジン; BrdU、ブロモデオキシ
ウリジン。

10

図2: [6 , 6 - $^2\text{H}_2$] グルコースの組込みによるDNA合成の測定のための特定の典型的な方法を概要図。

図3: DNA消化物のGC - MS (総イオン電流)。プリンデオキシリボヌクレオシドdA及びdGのマススペクトルピークを挿入図として示す。

図4 A - 4 D: in vitroでの対数増殖期の際の組織培養細胞のラベル化。[6 , 6 - $^2\text{H}_2$]
グルコースの富んだ培地中で増殖させた肝細胞 (HepG 2) (4 A) 及びリンパ球 (H 9
(4 B) 細胞系内の細胞DNA由来のdAの富化。リンパ球データは2種類のグルコース
富化での実験由来の結果を含む。図4 C 及び4 D は、dA / 培地グルコースの M_2 富化から
計算したHepG 2 細胞 (4 C) 及びH 9 細胞 (4 D) によるDNA合成率と、カウンティング
による細胞数の増加との対比である。

20

図5 A - 5 B: 反復継代培しながら長期間100%の [6 , 6 - $^2\text{H}_2$] グルコースを含む培地
中で増殖させた (図5 A) 肝細胞 (HepG 2) 及び (図5 B) リンパ球 (H 9) 細胞系の
DNA由来のdAの富化。

図6 A - 6 B: 図6 A は約20%の [U - $^{13}\text{C}_6$] グルコース中で増殖させた肝細胞系 (Hep
G 2) 細胞のDNA由来のデオキシアデノシンの M_5 イオンの富化を示す。図6 B は M_5 ラベル
化に由来するDNA合成率、対、直接カウンティングによる新細胞の比率の対比である。

30

図7: 0時から開始する、[6 , 6 - $^2\text{H}_2$] グルコースの2日間の点滴を経た4対象からの
末梢血液中の顆粒球の合成率。白抜き記号はコントロール対象; 黒記号はHIV感染対
象である。新細胞の分率は、dA富化、対、平均血漿グルコース富化の対比、その後の推定
35%の細胞内希釈で補正することにより計算した。

図8: 2日間の [6 , 6 - $^2\text{H}_2$] グルコース点滴を経たHIV感染被検体の末梢血液から得
た混合リンパ球 (B 及び T 細胞を含む) の合成率。

図9 A - 9 C: 図9 A は精製末梢血液CD 4⁺及びCD 8⁺Tリンパ球の蛍光活性化セル - ソー
ティング (FACS) 単離を示す。FACSによる分離のため、50 ~ 70mlの末梢血液をフィコール
- ヒパク勾配沈降により分画し、約50 ~ 100 × 10⁶個の末梢血液単核細胞 (PBMC) を得た。
これらの細胞をフィコエリトリン - チクローム 5 (PE-Cy₅) - 接合抗CD 4 及びアロフィコ
シアニン (APC) 接合抗CD 8 抗体で4時間以内で染色し、そして生きたHIV - 1 感染細胞を
伴う生体含有手順のために備った二重レーザー (アルゴン310nm、アルゴン488nm) FACS V
antage (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) 上でのソート精製に
かけた (上パネル) 。GC - MSによる動力分析のため、精製CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞サブ集団
それぞれ少なくとも数百万個得ることが最適であった。再ソート分析は > 98% のソート純
度を示した (CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞それぞれ中央パネル及び下パネル) 。図9 B は T 細胞
DNAから調製した誘導dAのGC - MSを示す。DNAはQuiamp blood kit (Quiagen, Valencia, CA
) により細胞から抽出した。DNAをヌクレアーゼ P 1、その後のヘビ毒ホスホジエステラ
ーゼ I 及びアルカリ性ホスファターゼを用いる酵素加水分解にかけた (MacAllanら、1998
, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 708) 。消化したDNAをHPLC (逆相 C - 18 Vydacカラム; バ

40

50

ッファー A、2.5%のメタノール；バッファー B、50%のメタノール；1 ml/minの流速で 0%の B から 8%の B に至る10分かけての勾配、その後の 8%の B から100%の B に至る10分かけての勾配、及び10%の B で最終的に10分間の維持；OD（光学密度）260nmをモニター）により分け、そしてdAピークを集めた（約20minにて）。N₂下でのメタノールのエバポレーション後、dAをアセトニトリル：無水酢酸：N - メチルイミダゾール（100：10：1）により室温で60分かけてアセチル化し、乾くまでエバポレーションし、そしてCH₃Clでメチル化することにより誘導化した。dAのGC - MSについて、5890 GC及びオートサンプラーの付いたHPモデル5971 MS（Hewlett-Packard, Palo Alto, CA）をDB - 5 MS又はRestek Rtx - 5 アミンカラムと共に用いた。インジェクター温度は320 とし、初期オープン温度は140 で20分とし、次いで300 に40°/分で上昇させ、そして300 で10分維持した。電子衝撃電離及び選定イオンモニターモードを利用した。モニターされたイオンはm/z 276及び278であり、アセチル化dAから 1 個の酢酸を差し引いた分子性イオンを意味する。図 9 C は²H - dAの標準曲線を示す。サンプル富化はアバンダンスに対する対比により計算した - [²H₂] dAを利用して標準曲線を補正。標準 [²H₂] dAの秤量済み混合物（Isotec, Miamisburg, OH）及び天然アバンダンスdAを様々な容量で注射し、サンプル中に潜在的に存在するdAのアバンダンスを目測した。次に標準曲線を各サンプルの測定されたアバンダンスと対合させた。

図10：²H - グルコースの48hrのiv点滴の後のCD 4⁺T細胞ラベル化の経時変化（示す結果はグループIIIから。このグループは最大の反復測定を実施した対象）。観察される最高の値を置換分率（存在する新細胞）を計算するために用いた。1 リットルの0.45%の食塩水中の [6, 6 - ²H₂] グルコース（60~100 g、Isotec Inc, Miamisburg, OH）を1.25~2.0 g/hの速度で48hr点滴i.v.投与した。対象をカロリーー良好（eucaloric）の炭水化物制限ダイエット（1日当り<50 gの炭水化物）で48hrの点滴期間維持して、最大血漿グルコース富化を得た。

図11 A - 11 B：図11 A は様々なグループにおける血液CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞の絶対増殖速度（細胞/μL/日）を示す。数値はグループ当りの対象の数を表わす。図11 B は様々なグループ内の血液CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞についてのk（d⁻¹）（測定定数）の値を示す。数値はグループ当りの対象の数を表わす。記号：a、p<0.05、対、正常；b、p<0.05、対、HIV+（HIV陽性）；c、p<0.05、対、短期間高活性抗レトロウイルス療法（HAART）；d、p<0.05、対、短期間HAART、ウイルス応答体。CD 4⁺、対、CD 8⁺T細胞の比較について、唯一の有意差は短期HAART及び短期間HAARTウイルス応答体における絶対増殖についてであった（p<0.05）。

図12：HAART療法を開始して最初の 6 週間（リトナビル/サキナビルの付加）にわたるCD 4⁺T細胞の正味の累積速度、対、HAARTの12週目でのCD 4⁺T細胞の定常絶対置換速度の比較。正味の累積速度は基底CD 4 カウント（2~3の値の平均）と6週目のCD 4 カウントとの差から計算した。これは6週間にわたる平均累積速度を表わし、未だ実測定常置換速度（19.2±15.4細胞/μL/日）よりも遅かった。別の記号（例えば、黒塗り四角、白抜きダイヤ、白抜き三角、白抜き丸、「x」記号）は個々の対象を示す。各個々の対象についての 2 通りの方法により得た値を線分でつなげた。2 本の中実水平棒は 2 通りの方法それぞれの平均値を表わす。

図13 A - 13 G：図13 A はHIV+、短期間HAART及び長期間HAART対象における血液CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞の絶対増殖速度間の相関を示す（r²=0.69、p<0.001）。HIV+対象（グループII）、黒塗りダイヤ記号；短期間HAART対象（グループIII）、白抜き四角記号；長期間HAART対象（グループIV）、黒塗り四角記号。図13 B はHIV+、短期間HAART及び長期間HAART対象における血液CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞についての相関を示す（r²=0.66、p<0.001）。記号は図13 A のものと同じである。図13 C はHIV+対象における血液CD 4⁺T細胞の絶対増殖速度とカウントとの相関を示す（グループII、r²=0.96、p<0.001）。図13 D は短期間HAART対象の血液CD 4⁺T細胞の絶対増殖速度とカウントとの相関を示す（グループIII、r²=0.55、p<0.001）。図13 E はHIV+（黒塗り四角）及び短期間HAARTグループ（黒塗りダイヤ）における血液CD 4⁺T細胞のk（速度定数（時間⁻¹））とカウントと

10

20

30

40

50

の相関を示す。有意義な相関はなかった。図13FはHIV+、短期間HAART及び長期間HAART対象（グループII、III及びIV、表4）の血液CD4⁺T細胞の血漿ウィルス負荷と絶対増殖速度との関係を示す。対象は3つのサブグループに分けた：ウィルス負荷<500、500~30,000、及び30,000コピー/ml）。サブグループ間での差はなかった。図13GはグループII、III及びIVにおけるCD4⁺T細胞の血漿ウィルス負荷とk（速度定数（時間⁻¹））との関係を示す。対象を上記13Fと同じように3つのサブグループにわけた。サブグループ間での差はなかった。

図14：HIV-1感染症におけるCD4⁺T細胞枯渇の「高代謝回転」（加速化分解）及び「低代謝回転」（再生不良）の動力学的予想。CD4⁺T細胞の置換速度（代謝回転）とカウントとの予測の関係、及びHAARTの効果を模式的に示す（その論点については本明細書を参照のこと）。

10

5. 発明の詳細な説明

新細胞生産の生化学的關係はDNA合成である。DNA合成は細胞分裂に比較的特異的でもあり、なぜなら「無計画」なDNA合成は量的に少ないからである（Sanadaら、1995、Mutat.Res. 344：109-116）。従って、新DNA合成の測定は細胞増殖の測定と本質的に同義である。

本発明の一の観点において、細胞増殖及び/又は細胞分解の速度を測定するための方法を提供する。かかる方法は細胞を、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定アイソトープラベルと接触させ、次いでDNAに組込まれたそのラベルを検出することを含んで成る。当業者により理解されている通り、安定なアイソトープラベルは非放射性アイソトープラベルである。放射性アイソトープラベルはラジオアイソトープを含んで成るラベルである。放射性アイソトープは放射能活性を示す元素（自然又は人工的）のアイソトープ形態である。いくつかの核の特性はガンマー線又は亜原子粒（例えばアルファ線及びベータ線）の自発的放射である。

20

いくつかのかかる方法により、増殖中の細胞集団の細胞増殖速度が測定できる。増殖中の細胞集団は分裂して子孫を供する細胞のグループである。DNA内に組込まれたラベルの量は細胞増殖の指標として測定される。経時的なラベル化DNAの衰弱の測定（即ち、DNA内に組込まれたラベルのシグナルの傾きの測定）は細胞分解の指標を担う。

DNA合成及び/又は分解、それ故本明細書に記載の細胞増殖及び/又は分解速度を測定するための方法は従来有用とされていた方法と比べいくつかの利点を有する。³H-チミジンは分裂中の細胞を殺すのに用いられている有能な抗代謝物である（Asherら、1995、Leukemie and Lymphoma 19：107-119）；DNAに放射性アイソトープを導入する毒性は非放射性な安定アイソトープを利用する本発明の方法により回避される。かくして、非放射性安定アイソトープを採用する本発明の方法は安全であり、且つ細胞増殖又は細胞分解を誘導又は阻害する疾患又は障害の診断、予防又は処置のため、ヒトにおける細胞増殖及び/又は細胞分解速度を測定するために極めて有用である。

30

ヌクレオシド類似体、例えばBrdUの毒性も、内因性合成経路を通じて無毒な生理基質によるラベル化（例えば安定ラベル）を可能にする本発明の方法を利用することにより回避される。

非S期DNA合成によるアイソトープ汚染は、S期の際に主として活性であるde novoヌクレオチド合成経路を介するラベル化によっても最少限とされる。ラベル化されたピリミジンヌクレオシドサルベージ取り込みの変動性はde novoヌクレオチド合成経路を介するプリンdNTPのラベル化により解決され、ピリミジンヌクレオチドサルベージ経路は事前に使用されたラベル、例えば³H-デオキシチミジン又はBrdUがDNAへと移行しなければならないルートとなり（図1）、従来の欠点（ヌクレオシドサルベージ経路に由来するプリンdNTPのラベルのしにくさ）を長所にする（de novo合成による高い、且つ一定なプリンdNTPラベル化）。このことは、デオキシリボヌクレオシドの超生理学的細胞外濃度の存在においてさえものDNAへの[6, 6-²H₂]グルコースの組込みの一定性により実証される（表1）。遊離プリン又はピリミジン塩基サルベージからの可能な流入はNTPのリボース成分は希釈せず、なぜなら遊離塩基のためのサルベージ経路は、塩基のde novo合成と同様、グルコースから合成されるPRPPとの組合せを包含するからである（図1）。

40

50

更に、異化作用されたDNAからのラベルの再利用はプリンデオキシリボヌクレオチドを分析することにより回避でき、なぜならデオキシリボヌクレオチドサルベージ経路はプリンに対しては弱いからである。従って、ラベル化の停止の後のDNA内のラベル化dA又はdGの弱った曲線はアイソトープ再利用により比較的妨害されず、そして細胞代謝回転は衰退曲線及び組込み曲線から測定可能であろう (Hellerstein and Neese, 1992, Am. J. Physiol. 263 : E988-E1001)。

更に、本発明の方法は、コントロールとの比較として細胞数の増加又は減少のみを検出する慣用の方法に反して、新細胞の増加数を測定する正確な定量的手段を提供する。

本発明は更にHIVで感染された対象のT細胞の増殖又は枯渇を測定するためのin vivo方法も提供する。このような方法は、HIVウィルスで感染した及び/又はAIDSに苦しむヒトを含む様々な対象におけるCD4⁺及びCD8⁺細胞を含むT細胞の増殖又は分解の速度を確認するうえで有利である。かかる方法は、本明細書及び下記の実施例において詳細するマスペクトル技術により非放射性(安定アイソトープ)を利用してDNA合成を測定するための内因性式ラベル化方法を含んで成る。詳しくは、かかる方法は検出可能な量の安定非放射性アイソトープラベルを対象に投与することを含んで成り、ここでこのラベルはde novoヌクレオチド合成経路を介して対象のDNAの中に組込まれる。このDNA内のラベルをT細胞の増殖又は分解の測定のために検出する。かかる方法はHIV感染症についての対象の抗レトロウィルス処置の前又は後に実施してよい。このようにして、T細胞増殖又は分解速度に対するかかる処置の効果が分析できる。

本発明は更に細胞増殖を誘導又は阻害する能力について薬剤又は化合物をスクリーニングするためのin vitro及びin vivo方法も提供する。かかるスクリーニング方法は細胞増殖を刺激又は阻害する特定の薬剤又は化合物を同定するうえで有用である。このような方法は更に細胞増殖又は新細胞生産を刺激又は強化する薬剤又は化合物である「プロリフェロゲン」を同定するうえでも有用である。更に、かかるスクリーニング方法は特定の薬剤、物質又は化合物が潜在的に発癌物質であるかを確認するのに役立ち、なぜなら細胞増殖を誘導する薬剤、物質又は化合物の能力は、DNAを損傷させるその能力とは別に又は独立して、それが発癌物質でありうることを示唆する重要な基準である(例えば、物質又は化合物の発癌性についてのAmes検査; Amesら、1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 2281)。かくして、このようなスクリーニング方法は薬剤又は化合物の発癌性の好適な指標を担う。本発明のスクリーニング方法は、本発明のその他の方法に関して概略したものを含む様々な理由のため、従来有用とされた方法よりも有利である。詳しくは、かかるスクリーニング方法は毒性な不安定放射性アイソトープの利用を必要としないことを理由に有用である; 対照的に、無毒で安定なアイソトープを本発明のスクリーニング方法に採用してよい。

更に、本発明は細胞内でDNAをラベル化する方法を提供する。かかる方法は細胞を、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAに組込まれる検出可能な量の安定アイソトープラベルと接触させることを含んで成る。DNAをラベル化するためのかかる方法は本発明のその他の方法について本明細書に記載の理由のために有用である。詳しくは、かかる方法はヒトを含む対象におけるDNA検出を必要とするin vivo用途にとって有用であり、なぜならこれらは毒性の不安定な放射性アイソトープラベルの利用を必要としないからである。かかるDNAラベル化方法は、in vitro及びin vivoで細胞増殖及び細胞分解速度を測定するための方法に関して本明細書で前述及び後述する技術及び手順を利用して実施する(例えば、細胞を検出可能な量の安定なアイソトープラベルと接触させ、当該ラベルをde novo合成経路を介してDNAの中に組込み、そして細胞のDNA内のラベルを検出する)。かかる方法により、投与の方式、安定なアイソトープラベルのタイプ(例えば[6, 6-²H₂]グルコース)、及びかかるラベルの検出のための技術(例えばマスペクトル)は細胞増殖及び分解速度の測定に関する本発明のその他の方法について記載のものと類似する。

本明細書に記載の特定の手順及び方法は前駆体としてラベル化グルコースを用い、そしてプリンデオキシリボヌクレオチドを分析することによりラベルを検出することで例示しているが、これらは本発明の実施の例示にすぎない。類似の手順及び技術、並びに機能的に均等なラベルが当業者に自明であり、そして本発明の範囲に含まれる。

5.1 ヌクオチドのde novo合成の際にDNAをラベル化するうえで利用するための安定アイソトープラベル

本発明は細胞増殖を測定する方法であって、細胞を、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれるように安定なアイソトープラベルを接触させることによる方法に関する。組込まれたラベルの検出はDNA合成の尺度として利用される。de novoヌクレオチド合成（内因性）経路を介するDNAのラベル化はヌクレオシドサルベージ（外因性）経路を介する慣用のラベル化方法よりもいくつかの長所を有する。それには無毒性、細胞周期のS期に対する特異性、及び異化作用されたDNAからのラベルの再組みのなさが挙げられる。非放射性ラベルの利用は更に突然変異のおそれを回避する。

後述の第6章で例示した特定の態様において、 $[6, 6 - ^2\text{H}_2]$ グルコース、 $[U - ^{13}\text{C}_6]$ グルコース及び $[2 - ^{13}\text{C}_2]$ グリセロールをDNAのデオキシリボース環をラベル化するために用いた。デオキシリボースのラベル化はDNA内の情報担持素塩基のラベル化よりも優れ、なぜならそれは様々な希釈化起源を回避するからである。この安定アイソトープラベルはマスマススペクトル技術により容易に検出可能である。

本発明の好適な態様において、安定なアイソトープラベルはグルコース由来のDNAのデオキシリボース環、グルコース - 6 - リン酸の前駆体又はリボース - 5 - リン酸の前駆体をラベル化するために用いる。グルコースを出発材料として用いた態様においては、適当なラベルには、限定することなく、重水素ラベル化グルコース、例えば $[6, 6 - ^2\text{H}_2]$ グルコース、 $[1 - ^2\text{H}_1]$ グルコース、 $[3 - ^2\text{H}_1]$ グルコース、 $[^2\text{H}_7]$ グルコース、等； ^{13}C - 1ラベル化グルコース、例えば $[1 - ^{13}\text{C}]$ グルコース、 $[U - ^{13}\text{C}_6]$ グルコース等；及び ^{18}O - ラベル化グルコース、例えば $[1 - ^{18}\text{O}_2]$ グルコース等が挙げられる。

グルコース - 6 - リン酸前駆体又はリボース - 5 - リン酸前駆体が所望される態様においては、糖新生系前駆体又はグルコース - 6 - リン酸もしくはリボース - 5 - リン酸へと変換できる代謝物が利用できうる。糖新生系前駆体には限定することなく、 ^{13}C - ラベル化グリセロール、例えば $[2 - ^{13}\text{C}_1]$ グリセロール等、 ^{13}C - ラベル化アミノ酸、亜水素水（ $^2\text{H}_2\text{O}$ ）及び ^{13}C - ラベル化ラクテート、アラニン、ピルベート、プロピオネート又はその他の糖新生用非アミノ酸前駆体が挙げられる。グルコース - 6 - リン酸又はリボース - 5 - リン酸へと変換される代謝物には、限定することなく、ラベル化（ ^2H 又は ^{13}C ）ヘキソース、例えば $[1 - ^2\text{H}_1]$ ガラクトース、 $[U - ^{13}\text{C}]$ フルクトース等；ラベル化（ ^2H 又は ^{13}C ）ペントース、例えば $[1 - ^{13}\text{C}_1]$ リボース、 $[1 - ^2\text{H}_1]$ キシリトール等、ラベル化（ ^2H 又は ^{13}C ）ペントースリン酸経路代謝物、例えば $[1 - ^2\text{H}_1]$ セドヘプタロース等、及びラベル化（ ^2H 又は ^{13}C ）アミノ糖、例えば $[U - ^{13}\text{C}]$ グルコミン、 $[1 - ^2\text{H}_1]$ N - アセチルグルコサミン等が挙げられる。

本発明は更に、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAのプリン及びピリミジン塩基をラベル化する安定なアイソトープラベルも包括する。内因性プリン合成のための様々な構成単位がプリンをラベルするのに利用でき、そしてそれらには、限定することなく、 ^{15}N - ラベル化アミノ酸、例えば $[^{15}\text{N}]$ グリシン、 $[^{15}\text{N}]$ グルタミン、 $[^{15}\text{N}]$ アスパルテート等、 ^{13}C - ラベル化前駆体、例えば $[1 - ^{13}\text{C}_1]$ グリコン、 $[3 - ^{13}\text{C}_1]$ ラクテート、 $[^{13}\text{C}]$ HCO_3^- 、 $[^{13}\text{C}]$ メチオニン等、及び ^2H - ラベル化前駆体、例えば $^2\text{H}_2\text{O}$ が挙げられる。内因性ピリミジン合成のための様々な構成単位がピリミジンをラベルするために利用でき、そしてそれらには特定することなく、 ^{15}N - ラベル化アミノ酸、例えば $[^{15}\text{N}]$ グルタミン等、 ^{13}C - ラベル化前駆体、例えば $[^{13}\text{C}]$ HCO_3^- 、 $[U - ^{13}\text{C}_4]$ アスパルテート等、及び ^2H - ラベル化前駆体（ $^2\text{H}_2\text{O}$ ）が挙げられる。

当業者は上記のリストに加えて、DNAの内因性ラベル化を供する任意の経路のための基質又は前駆体であるその他の安定なアイソトープラベルが本発明の範囲に包括されることを理解する。本発明において利用するのに適当なラベルは一般に商業的に入手でき、そして当業界周知の方法により合成できうる。

5.2 DNA内に組込まれたラベルの検出

細胞のDNAへの安定なアイソトープラベルの組み込みのレベルは注目の細胞集団からDNAを単

10

20

30

40

50

離し、そしてアイソトープ含有量について標準の分析技術、例えばマスペクトル、核磁気共鳴、等を利用して内因性ラベル化経路よりラベルを組込むことのできるDNA分子の化学部分を分析することにより決定される。サンプル調製の方法はアイソトープラベルの存在を検出するのに用いられている特定の分析技術に依存するが、それは当業者に自明であろう。

本発明の好適な態様において、ラベルの存在はマスペクトルにより検出される。この検出方法のため、注目の組織又は細胞を集め（例えば組織生検、採血、身体からの分泌液又は排泄物の回収、等を介して）、そしてDNAを当業者に周知の標準の技術を利用して抽出する。むしろ、DNA単離の実際の方法は特定の細胞タイプに依存するが、それは当業者にとって自明であろう。細胞は任意的にDNAの抽出の前に標準の技術、例えばイムノアフィニティークロマトグラフィー、蛍光活性化セルソーティング、溶出、磁気ビーズ分離、密度勾配遠心分離、等を利用して更に精製してよい。

10

所望するなら、DNAは当業界に周知の加水分解の標準技術を利用してデオキシリボヌクレオシドにまで加水分解してよい。例えば、DNAは例えばヌクレアーゼもしくはホスファターゼにより酵素的に、又は酸、塩基もしくはその他の化学加水分解により非酵素的に加水分解してよい。他方、DNA内のラベルを検出する前に、安定なアイソトープラベルの組込むDNAを検出し、そしてデオキシリボヌクレオシドへと加水分解せずにインタクトDNAポリマーにおいて測定する。

次いでデオキシリボヌクレオシドを標準の技術（例えばトリメチルシリル、メチル、アセチル等の誘導体の合成；液体クロマトグラフィーのための直接注入；直接プローブサンプル導入、等）を利用してマスペクトル分析のための用意をし、そしてデオキシリボヌクレオシドへのラベルの組込みのレベルを決定する。

20

マスペクトル分析は内因性ラベル化経路により導入された安定なアイソトープラベルを潜在的に含む分率（fraction）の分析である。例えば、デオキシアデノシンマスペクトルの m/z 467-469分率又はデオキシグアノシン m/z 557及び559分率（それはインタクトデオキシリボース環を含む）は電子衝撃電離及び選定のイオン記録モードのもとでガスクロマトグラフィー/マスペクトルを利用し、 $[6, 6-^2H_2]$ グルコース投与の後に分析できる。又は、デオキシアデノシンマスペクトルの m/z 103及び104分率（それはデオキシリボースのC-5位を含む）は $[6, 6-^2H]$ グルコース又は $[6-^{13}C_1]$ グルコースの投与を経て分析できる。好適な態様において、分析するマスペクトル分率はピリミジンデオキシリボヌクレオシドではなく、プリンデオキシリボヌクレオシドに由来する。

30

新たに合成されたDNA、それ故新たに分裂した細胞（細胞増殖又は流入（input）速度）又は除去されたばかりの細胞（細胞死又は流出（exit）速度）の分率が計算できる（表1）。

表 1

アバundance		アバundance			
	m/z	m/z	dA*	f (未補正)	f (補正済み)
日 #	457	459	富化	(%新細胞)	(%新細胞)
1 (基底)	2844049	518152	0.00000	0.00	0.00
2	1504711	260907	0.00000	0.00	0.00
3	2479618	453609	0.00298	2.50	3.84
4	3292974	624718	0.00586	4.91	7.55
5	2503144	461905	0.00451	3.77	5.81
6	1055618	186087	0.00318	2.66	4.09
7	2186009	394058	0.00193	1.61	2.48

アバundanceは3回の獲得の平均値である。[6 , 6 - ²H₂] グルコースを550 CD4⁺T細胞 / 血液mm³により健康なヒト対象に48hrかけて1.25 g / hrで静脈内点滴した。血漿グルコース富化 = 11.9% ; dA* = [5 , 5 - ²H₂] デオキシアデノシンのアバundance補正済み標準曲線との比較に基づくデオキシアデノシン富化 ; f 未補正 ; 血漿グルコース富化で除したdA富化として計算 ; f 補正済み : 0.65 × 血漿グルコース富化で除したdA富化として計算 (Macallanら、1998 Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95 : 708-713)。集団全体内の算定増殖速度 : 3.93% / 日 (1日当り21.6細胞 / 血液mm³)。分裂したばかりの細胞の算定除去 (分解) 速度 : 36.3% / 日 (半減期 = 2.2日)。

5.3 用途

5.3.1 in vitro用途

後述の第6章で例示する特定の態様において、デオキシアデノシン (dA) の富化は安定なアイソトープラベルとインキュベーションし、そして単層として増殖させた、懸濁液中の2種類の細胞タイプにおいて観察された。dA富化は直接カウンティングによる細胞数の増加と非常に相関していた。従って、本発明の方法は様々な増殖アッセイにおいて細胞増殖を測定するために利用できる。例えば、細胞増殖を成長因子、ホルモン、サイトカイン又は阻害因子に応答する測定値として利用するバイオアッセイはde novoヌクレオチド合成経路を標的とする安定なアイソトープラベルを利用することにより開発できうる。かかるアッセイの例には、抗原及び抗原提示細胞によるリンパ球活性化、腫瘍壊死因子により誘導される標的細胞のアポトシス、並びに細胞分解リンパ球による腫瘍細胞の細胞障害能が挙げられる。

5.3.2 in vivo用途

安定なアイソトープラベルを利用する本発明の方法は放射性及び潜在的な毒性代謝物を含まないため、かかる方法はヒトを含む対象のin vivoでの細胞増殖及び分解速度の測定の診断手段として極めて有用である。ヒトにおける慣用の方法と比較して、本発明の方法は安全であり、より幅広い用途を有し、より簡単に実施でき、より高感度であり、細胞又は組織解剖を必要とせず、そして放射能活性を包含せず、そしてより正確な結果を提供し、なぜならde novoヌクレオチド合成は一定であり、そして優先的であり、希釈されず、そしてDNAを潜在的に毒性な非生理学的代謝物ではなく生理学的基質を介してラベル化するからである。

細胞増殖及び分解が重要な役割を担う多種多様な医療用途が本発明により包括される。詳しくは、本発明の方法は癌、感染疾患、免疫及び血液症状、器官不全、並びに骨、筋肉及

びエンドクリン器官の障害における増殖及び分解速度を決定するために利用できる。

5.3.2.1 癌の処置

本発明の一の態様において、被検体にde novoヌクレオチド合成経路のための安定なアイソトープラベル化前駆体を化学療法の開始前、そして再び化学療法を開始してから1～2週間後に全身又は局部投与を施す（例えば、 $[6, 6 - ^2H_2]$ グルコースを24～48hrかけて1.25 g / hrで静脈内投与する）。腫瘍細胞分裂の阻害を反映するDNAの合成速度における安定なアイソトープ投与の各々の期間が任意の療法を選定するための処置終点として利用できるようになったら、代謝回転の小検体採取を実施する（例えば、細い針アスピレーションによる）。典型的には、アイソトープ前駆体の用量はデオキシリボヌクレオシドへの組込みがマスマス検出限界を超えるのに十分な量とする。サンプルはトレーサー希釈及び細胞の代謝回転速度に依存して採取する。

10

5.3.2.2 癌の予防

乳癌、結腸癌及びその他の癌のおそれは組織内の増殖性ストレスと強く関連し、即ち、細胞増殖を改変するホルモン、炎症又は食餌因子は癌の割合に影響を及ぼす。女性の根本的な乳腺細胞の増殖ストレス、及び例えば若年期における予防的介入（例えばタモキシフェン）に対するその応答を特性決定する能力は乳癌の予防を劇的に改変する。これは結腸癌、肺癌及びその他の癌にも適用される。

5.3.2.3 AIDS

AIDSにおける抗レトロウイルス剤はCD4⁺T細胞の死及び代謝回転を抑制するようウィルス複製（生合成過程）を阻止することを意図する。AIDS処置における近年の進歩はこのような動力過程をまさに焦点としていたが、直接的な動力測定はなかった。このような処置終点を直接測定する能力はHIV療法の本質を劇的に変えることができる。医師は各患者についての疾患において早期に積極的な抗レトロウイルス処置を開始するかどうかを迅速に決定できる。後述の第6章において例示する特定の態様において、本発明の方法はヒト免疫不全ウィルス（HIV）感染患者におけるCD4⁺細胞の増殖及び／又は分解速度を正確に測定するのに利用される。

20

後述の第6章において例示する別の特定の態様において、本発明の方法はヒト免疫不全ウィルス（HIV）で感染した対象においてin vivoでCD4⁺及びCD8⁺細胞等のT細胞の増殖又は分解速度を正確且つ直接的に測定するために用いている。かかる方法はHIV感染症についての対象の抗レトロウイルス処置の前、最中、又は後に実施してよい。

30

5.3.2.4 細胞増殖が関与する症状

多種多様な症状が改変された細胞増殖速度を特徴とすることで知られ、それ故本発明の方法によりモニターできる：

癌：任意のタイプの悪性腫瘍（例えば乳、肺、結腸、皮膚、リンパ腫、白血病、等）；前癌症状（例えばアデノ腫、ポリープ、前立腺肥大、潰瘍性大腸炎、等）；一般の癌についてのおそれを媒介する因子（例えばエストロゲンと乳上皮細胞；食餌脂肪と結腸細胞；喫煙又は酸化防止剤と気管支上皮細胞；ホルモンと前立腺細胞、等）。上記の特定の細胞並びに上記の特定の組織及び器官の細胞はとりわけ癌にかかるおそれのある細胞である。

免疫障害：AIDSにおけるCD4⁺及びCD8⁺Tリンパ球；ワクチン - 非応答性のT及びBリンパ球；自己免疫疾患におけるT細胞；低ガンマグロブリン血症におけるB細胞；一次免疫不全（胸腺細胞）；ストレス関連免疫不全（リンパ球）；等。

40

血液症状：白血球不全（例えば、顆粒球減少症）；任意のタイプの貧血；骨髓増殖性障害（例えば一次赤血球増加症）；組織白血球浸潤障害（例えば肺間隙性好酸球増加症、リンパ球性申状腺炎、等）；リンパ増殖障害；モノクローナルガンモパシー；等。

器官不全：アルコール性及びウィルス性肝炎（肝細胞）；糖尿病ニューロパシー（系球体又は系球体間質細胞）；筋栄養症状（筋細胞）；早期性腺不全（卵細胞、卵巣のストロマ細胞、精母細胞、ライジグ細胞、等）；等。

骨及び筋肉の症状：運動又は肉体治療に対する応答（筋細胞又は筋細胞内のミトコンドリア；骨粗しょう症（破骨細胞、骨芽細胞、上皮小体細胞）筋炎；等。

エンドクリン症状：糖尿病（半島 - 細胞）；甲状腺機能低下症及び甲状腺機能亢進症（

50

甲状腺細胞)；上皮小体機能亢進症(上皮小体細胞)；多嚢胞卵巣(卵巣のストロマ細胞)；等。

感染性疾患：結核(単球/マクロファージ)；細菌感染症(顆粒球)；膿瘍及びその他の局部組織感染症(顆粒球)；ウィルス感染症(リンパ球)；糖尿病足炎及び壊疽(白血球)；等。

血管障害：アテローム発生(動脈壁における平滑筋増殖)；心筋症(心筋細胞増殖)；等。

職業病及び曝露：黒色肺についてのコールダストに対する感受性(コール作業員じん肺症)及び茶色肺(繊維芽細胞増殖応答)；日光又は化学薬品に関連する皮膚病に対する感受性(皮膚細胞)；等。

in vivoで利用するために適当なアイソトープラベルは生理学的及び臨床学的に許容される溶液を利用して当業界に慣用の方法に従って調製される。適当な溶液は選定の投与ルートに依存する。適当な投与ルートは、例えば、経口、直腸、経粘膜、経皮、又は腸内投与；非経腸デリバリー、例えば筋肉内、皮下、骨髄内注射、並びに鞘内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻内又は眼内注射でありうる。

他方、ラベルは全身的ではなく、局部的に、例えば特定の組織へのラベルの直接注射を介して、往々にしてデポット又は持放製剤により投与してよい。検出可能な量のラベルの決定は当業者の能力の範囲内にある。

5.4 細胞増殖を誘導又は阻害する能力についての薬剤のスクリーニング方法

本発明は更に細胞増殖を誘導又は阻害する能力について薬剤又は化合物をスクリーニングするための方法も提供する。かかる方法は細胞を推定の毒性薬剤又は化合物と接触又はそれに曝露することを含んで成る。細胞を、細胞増殖及び分解速度を測定するための他の方法に関して本明細書において記載した通り、de novoヌクレオチド合成経路を介して細胞のDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定なアイソトープラベルと接触させる。いくつかのかかる方法において、細胞はアイソトープラベルと接触させる前に注目の薬剤又は化合物と接触又はそれに曝露させる。他方、この細胞はアイソトープラベルと接触させた後にかかる薬剤又は化合物と接触させてよい。薬剤に曝露していない細胞におけるコントロール適用と比べてのDNAの中に組込まれたラベルの量は細胞増殖の程度を示唆し、それ故この薬剤が細胞増殖を誘導又は阻害するかを示唆する。前述及び後述の本発明のその他の方法と同様、ラベルは典型的にはde novoヌクレオチド合成経路においてデオキシリボースの前駆体に付加し、その前駆体がデオキシリボースの中に組込まれる。いくつかのかかる方法において、本発明のその他の方法と同様に、前駆体はグルコースとし、そしてラベルをグルコースに付加する。かかる方法に利用できる安定なアイソトープラベルのタイプは細胞増殖及び分解速度を測定することに関する本発明のその他の方法について記載したものと類似する。

検出手順は当業界において周知のもの並びにマスペクトル等の細胞増殖及び分解速度を測定するための方法に関する本明細書に記載のものが挙げられる。本発明のその他の方法と同様に、DNAは典型的には(必須ではないが)、DNA内のラベルを検出する前にデオキシリボヌクレオシドへと加水分解する。このラベルはインタクトDNAポリマーの中で検出できる。

本発明は薬剤に曝露された対象の細胞増殖を誘導又は阻害する能力について薬剤をスクリーニングするin vivo方法も提供する。かかる方法は薬剤に対象(又は対象の細胞)を曝露し、そして対象に検出可能な量の安定なアイソトープラベルを投与することを含んで成る。ラベルは対象のDNAの中にde novoヌクレオチド合成経路を介して組込まれる。対象における注目の細胞のDNAの中に組込まれたラベルは対象の注目の細胞の細胞増殖の度合いを決定するために検出する。DNAの中で検出されたラベルの量(同対象が同薬剤に曝露されていないコントロール適用に対して、又は同薬剤に曝露していない同等の対象のコントロールグループと比べて)は細胞集団の程度、それ故同薬剤が対象の細胞増殖を誘導又は阻害するかどうかを示唆する。投与の方式、安定なアイソトープラベルのタイプ、及び検出の方法は細胞増殖及び分解速度の測定に関する本発明の他の方法に記載のものと類似す

10

20

30

40

50

る。

このようなスクリーニング方法により、細胞の細胞増殖を直接誘導又は阻害する薬剤の能力は、注目の細胞を同薬剤に直接曝露し、次いで細胞の増殖を測定することにより決定できる。

本発明は更に細胞増殖を間接的に誘導又は阻害する能力について薬剤をスクリーニングする方法も提供する。かかる方法は、対象の分裂細胞の1個の細胞又は集団を同薬剤に曝露し、次いでこの第一細胞とは別の第二細胞又は第二細胞集団の細胞増殖の速度をモニターすることを含んで成る。例えば、同薬剤に直接曝露した細胞は対象の一の組織に由来し得、一方注目の細胞は第二組織に由来し得る。他方、同薬剤に直接曝露した細胞は第一タイプの細胞系を含んで成ってよく、一方注目の細胞は第一の細胞系とは別の第二タイプの細胞系を含んで成る。注目の第二細胞において間接的に細胞増殖を誘導又は阻害する同薬剤の能力は第二細胞のDNAへのラベルの組込みを検出することにより決定される。かかる方法において、第二細胞の細胞増殖は典型的には同薬剤に曝露された第二細胞と第一細胞（又は第一細胞の生成物）との接触又は合体により媒介される。

本発明のスクリーニング方法により、細胞増殖は細胞増殖を測定するための本発明の方法について本明細書の中で詳細に説明した通りに動物及びヒトにおいてin vitro及びin vivoで測定できる。この化合物又は薬剤は例えばin vitroで細胞もしくは組織に、又はin vivoで生体に投与し、しかる後細胞増殖の測定を行ってよい。

本発明のいくつかのスクリーニング方法において、ラベルはデオキシリボースの前駆体の中に組込まれてよく、そしてこのラベルは本明細書を通じて説明した細胞増殖を測定する本発明のその他の方法と同様にラベル化グルコースを含んで成りうる。更に、いくつかのかかるスクリーニング方法において、DNAをデオキシリボヌクレオシドを加水分解し、そしてラベルをマスペクトルにより検出する。更に、前述及び後述の細胞増殖の測定のための他の方法と同様に、DNAは、様々な細胞、特に癌のおそれのある細胞（例えば、乳、結腸又は気管支上皮細胞）、リンパ球、CD4⁺T細胞、又はCD8⁺T細胞から抽出できる。本発明のスクリーニング方法は、細胞増殖を測定するための方法に採用される本明細書に記載のものを含む非放射能活性安定アイソトープラベル又は放射能活性ラベルのいずれを採用してもよい。非放射能活性安定アイソトープラベルは極めて有利であり、なぜならこれらは無毒であり、それ故本明細書に詳しく前述及び後述した通り動物及びヒトにおいて利用するのに安全である。

本発明のスクリーニング方法は多種多様な化合物をその細胞増殖を誘導する関連の能力について試験するために利用できる。かかる化合物及び薬剤には、限定することなく、例えば発癌物質、推定の毒性薬剤、化学化合物、突然変異誘発剤、医薬品、食品、吸入粒子、溶媒、粒子、気体、及び煙中の有害化合物（例えばタバコ及び葉巻の煙、並びに工業的過程により発生する煙）、食品添加剤、溶剤、生化学物質、ホルモン、薬剤、殺虫剤、土壌-水毒素、環境公害、細胞増殖を刺激するプロリフェロゲン、並びに癌のおそれを高めることで知られる又は推定される任意のその他の化合物又は薬剤が挙げられる。細胞増殖を及ぼす能力についてスクリーニングできる薬剤には、限定することなく、例えばラドン、マイクロ波線、電磁線、電磁場、セルラー電話により生ずる放射線、熱、並びに工業又は職務環境において発生又は存在する有害物質及び状況が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法により、注目の薬剤又は化合物に曝露されていない細胞の増殖速度は注目の薬剤又は化合物に曝露された細胞の増殖速度と比べることができる。更に、かかるスクリーニング方法は、本明細書に記載のものを含む注目の特定の薬剤又は化合物に曝露する前後の注目の特定の細胞における細胞増殖速度を比較するために用いることができる。

前述の通り、in vivoで利用するのに適当なアイソトープラベルは生理学的及び臨床学的に許容される溶液を利用して当業界慣用の方法に従って調製される。適当な溶液は選定の投与ルートに依存する。適当な投与ルートは、例えば経口、直腸、経粘膜、経皮、又は腸内投与；非経腸デリバリー、例えば筋肉内、皮下、骨髄内注射、並びに鞘内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻内又は眼内注射でありうる。

10

20

30

40

50

他方、ラベルは全身的ではなく、局部的に、例えば特定の組織へのラベルの直接注射を介して、往々にしてデポット又は持放製剤により投与してよい。

検出可能な量のラベルの決定は当業者の能力の範囲内にある。

5.5 細胞増殖を誘導又は阻害する疾患にかかる対象の感受性及びおそれを決定するための方法

本発明は更に、動物及びヒトを含む対象の、細胞増殖を誘導又は阻害する疾患に対する感受性を評価又は測定するための方法も提供する。かかる方法は、対象を疾患を惹起又は刺激する条件又は薬剤に委ね、次いで本明細書を通じて説明した通りに対象の注目の細胞における細胞増殖を測定するための *in vivo* 方法により対象の細胞増殖速度を測定することを含んで成る。対象の細胞増殖を測定するための方法は、例えば検出可能な量の安定なアイソトープラベルを対象に投与することを含んで成る。ラベルは *de novo* クレオチド合成経路を介して対象のDNAの中に組込まれる。対象の注目の細胞のDNAの中のラベルは注目の細胞の細胞増殖を決定するために検出される。本明細書を通じて詳しく説明してきた細胞増殖を測定する方法を参照のこと。

5.6 疾患についての医療危険性評価の個別化：個人の危険性評価

別の観点において、本発明は細胞増殖又は細胞分解が関与又は誘導する特定の疾患又は医療症状にかかる個々の個人的なおそれを決定するための方法を提供する。個体は疾患危険因子に対するその曝露のみならず、危険因子に対する感受性においても相違することがよく知られている。危険の低下に関する現行の公共健康推奨は真に個性化されているというよりは概して集約的である；即ち、個人は既知の流行病変異因子に従って分類され（例えば、軽い体重及び2回妊娠した閉経後の北欧州民族由来のコーカシア女性）、そして特定の症状（例えば乳癌、子宮癌、骨粗しょう症、等）が評価される。疾患のおその決定及び予防手段の潜在的有益性（例えば乳癌のおそれを下げるためのタモキシフェンの使用）は統計学のおそれを基準とするよりは個人的とするのが理想的であろう。

一の態様において、本発明は対象の細胞増殖及び／又は細胞分解の速度を改変又は変化させる（例えば、細胞増殖及び／又は細胞分解の速度を誘導又は阻害する）疾患又は障害に対する対象の感受性を決定するための方法を提供する。かかる方法は対象を、疾患又は障害を惹起しうる条件又は薬剤に委ね、検出可能な量の安定なアイソトープラベルをその対象に投与し（そのラベルは *de novo* クレオチド合成経路を介して対象のDNAの中に組込まれる）、そして対象のDNA内のラベルを検出することを含んで成る。対象は、その対象が一過性又は温和な形態の疾患のみにかかるようにかかる疾患又は障害を惹起する薬剤又は条件に委ねてよい。例えば、この薬剤は温和な形態の疾患又は障害のみを惹起するよう低用量で投与してよい。疾患又は障害が細胞増殖を誘導する場合、対象のDNA内のラベルの増加は（この条件もしくは薬剤に対象を委ねていないコントロール適用又はこの条件もしくは薬剤に委ねていない同等の対象のコントロールグループと比べ）は細胞増殖速度の上昇を示唆し、そして疾患又は障害に対する個々の対象の感受性を証明する。かかる情報は疾患又は障害に対する対象の感受性の予測を供与する。対応して、対象のDNA内のラベルの損失又は衰退速度は細胞分解の速度の変化を示唆する。疾患又は障害が細胞分解を誘導する場合、対象のDNA内のラベルの損失（例えば急速損失）（この条件もしくは薬剤に対象を委ねていないコントロール適用又はこの条件もしくは薬剤に委ねていない同等の対象のコントロールグループと比べ）は対象の細胞分解の速度の上昇又はその疾患に対する感受性を実証する。かかる情報は、細胞分解の速度を上昇させるかかる疾患又は障害についての対象の危険性の推定を供する。

かかる方法は、個々の対象における細胞増殖及び／又は分解の実際の速度の測定を介し、改変した細胞増殖又は分解速度に関与する疾患又は症状にかかる危険性の評価の個人化を可能にする。このような方法は有用であり、なぜならこれらは個人が彼ら又は彼女らの生活様式（例えば食事、職業、嗜好、医療処置、等）及び／又は医療介入（例えば医薬品、ホルモン、ビタミン、等）に関する重要な決定をできるようにするからである。細胞増殖又は分解の速度の改変に関与する疾患に対する個人の特異的な感受性を測定することにより、ある者の生活様式又は医療処置を維持する決定は、一般個人集団についての集約的危

険性推定統計学を基準とするのではなく、特定の疾患にかかる個々の対象の実際の危険性を基準としうる。かかる方法により、医療介入、生活様式介入、又はその他の個人における介入の効果も、推定ではなく、直接測定することができる（例えば、介入、例えばタモキシフェン療法が実際に、乳癌について高い危険性にある特定の女性対象における乳上皮細胞の増殖を有効に抑制するかを確認するため）。

前述の第5章及び後述の第6章に記載のものを含む多種多様な疾患及び症状についての医療危険性評価を行うことができる。例えば、本発明のかかる方法は黒色肺又は茶色肺炎（炭鉱の作業員についての職業病）にかかる特定の個体の危険性を評価するうえで有用である。炭鉱作業員じん肺症（黒色肺）に関する古典的な所見の一つは炭鉱作業員間にある感受性の個体間差にある（Balaanら1993, *Occup. Med.* 8 (1) : 19-34 ; Bormら1992, *Toxicol. Lett.* 64/65 : 767-772 ; Liddell and Miller, 1983, *Scand. J. Work Environ. Health.* 9 : 1-8 ; Katsnelsonら1986, *Environ. Health Perspect.* 68 : 175-185）。この疾患を起こさせる条件に曝露された個体における肺性変化の速度は著しく様々である。一部の者は10年間の塵曝露を経て軽いせき及びたんのみが発生するが、他の者は迅速に繊維症肺、深刻な短呼吸及び低血液酸素を発症する。

黒色肺病進行の速度に影響を及ぼすいくつかの要因が知られているが（例えば喫煙（Balaanら、1993, *Occup. Med.* 8 (1) : 19-341））、高度に感受性な個体を同定することは現状可能ではない。一部の研究者は肺機能が加速低下した作業員の早期同定及びかかる作業員の作業所の配置転換の重要性を強調している（Balaanら、1993, *Occup. Med.* 8 (1) : 19-341）。感受性個体の同定はあらゆる公共健康問題のための理想的な予防戦略であるが、刺激因子自体の除去はされない。黒色肺病又は関連の症状を惹起する薬剤に対する環境的曝露及び黒色肺疾患に対する個体の感受性（遺伝、栄養状態、補因子、等に基づく）が共に疾患を惹起するのに必要である。黒色肺病又は関連の症状は線維素形成（肺癆痕）を引き起こす。

全ての個体について線維症肺を招く最終的な一般経路は癆痕を分けて癆痕を構成するタンパク質（コラーゲン）を生み出す細胞の活性化である。かかる肺損傷は本発明の方法を利用して危険性のあるヒトにおいて直接測定できる。繊維芽細胞の増殖は細胞増殖過程であるため、この病原性は細胞増殖を測定するための本発明のin vivo方法を利用する観察に理想的に適合する。本発明の方法はこの点で極めて有用であり、なぜならこれは医師又は研究者が細胞増殖を個人（例えば炭鉱作業員）において正確且つ直接的に測定することを可能にするからである（線維症及び癆痕が発症する間接的なサインを探す並びに/又はX線により不可逆性癆痕を処置するまで又は機能的変化まで待つのは異なる）。

細胞増殖が関与する特定の疾患又は症状に対する対象の危険性又は感受性を決定するための方法は一般に対象を疾患を惹起、誘導又は刺激する薬剤又は条件に委ね、そして対象の細胞増殖速度を本明細書を通じて説明した細胞増殖を測定するためのin vivo方法により測定することを含んで成る。対象の黒色肺病に対する感受性又はおそれの評価は例えば対象にマーカー栄養溶液（即ち、本明細書に記載のその他の細胞増殖測定方法と同様、個体のDNAの中に最終的に組込まれるラベル化合物を含む溶液）を経口投与し、次いでだ液を集める（又は肺洗浄）ことにより決定できる。この手順は職業曝露に入る前（即ち、炭鉱で働き始める前）及び適当な期間にわたるかかる曝露の後（例えば6ヶ月）の双方にて対象に対して実施してよい。急速に増殖する繊維芽細胞の存在（Hellerstein and Neese, 1992, *Am. J. Physiol.* 263 : E988-E1001）又は合成されたばかりのコラーゲンの存在（Hellerstein and Neese, 1992, *Am. J. Physiol.* 263 : E988-E1001 ; Papageorgopoulos et al., 1993, *FASEB J.* 7 (3) : A177 ; Caldwellら1993, *Am. Soc. Mass Spectrom. Conf.* p.7）は線維症及び組織癆痕が、永久且つ不可逆的な損傷が発症する前に活発に生ずることを示唆する。個人の肺における繊維芽細胞の増殖を直接測定する能力は黒色肺病に対する個体の感受性を決定するのに有用である。かかる測定は黒色肺病の如き疾患に苦しむ患者における標準の処置療法の効果を追跡又は確認するうえで、又はかかる疾患のための新たな処置療法（例えば酸化防止剤、抗線維症因子、サイトカインブロッカー、等（Lapp and Castranova, 1993, *Occup. Med.* 8 (1) : 35-56））の評価のために極めて有用である。本発明のかかる

10

20

30

40

50

方法は往々にして現在採用されている方法よりも明らかな利点を供す；例えば、かかる方法により、個人の処置療法の調整を行うまでに不可逆性X線変化又は肺機能の損失を待つことを必要としない。事後応答ではなく初期先行段が決定でき、そして実行できる。

かかる方法から得られる情報は医療専門家が疾患又は症状に対して抵抗性である個体及び疾患に感受性である個体に指示を与えることを可能にするであろう。疾患又は症状に対して感受性ではない個体は疾患にかかるおそれなくその環境において作業し続けるようアドバイスされることができ、一方疾患感受性である個体は転職をするよう又は肺損傷を抑制もしくは予防しうる医療介入を試みるようカウンセリングを受けることができる（上記文献参照のこと）。

5.7 細胞増殖を測定するための方法において利用するための放射性アイソトープラベル

本発明は更に細胞内のde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAを内因性式にラベルするよう不安定な放射性アイソトープラベルを採用する細胞増殖及び分解速度を測定するための方法を提供する。かかる方法は、非放射性安定アイソトープを利用する方法について前述した通り、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の放射性アイソトープを細胞と接触させることを含んで成る。次いで放射性アイソトープラベルをDNAにおいて検出し、細胞増殖又は分解速度を測定する。

放射性アイソトープを利用する方法は特定の利点及び用途を供し、なぜならかかるラベル及びかかるラベルを検出するための技術は往々にして不安定なアイソトープラベル及び安定なアイソトープラベルを検出するための対応の技術よりも安価だからである。例えば、放射性ラベルを検出するための放射能活性測定技術は典型的には、安定なアイソトープラベルを検出するために利用される標準のマススペクトル技術を実施するよりもはるかに経済的である。本発明は更に、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAを内因性式にラベルする放射性アイソトープラベル及び安定なアイソトープの双方を採用する分裂中及び子孫を生産中の増殖中又は分裂中の細胞集団における細胞増殖を測定するための方法を提供する。かかる方法は、増殖中の細胞をde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定なアイソトープラベルと接触させることを含んで成る。DNAの中に組込まれた安定なアイソトープラベルを、マススペクトル技術を含む本明細書に記載の技術により細胞集団における細胞増殖の速度を決定するために検出する。増殖中の細胞集団を、de novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の放射性アイソトープラベルとも接触させる。DNAの中に組込まれた放射性アイソトープラベルは増殖中の細胞集団における細胞増殖を測定するために標準の放射性カウンティング技術により検出する。増殖中の細胞集団をまず安定なアイソトープラベル又は放射性アイソトープラベルのいずれかと接触させ、次いでかかるラベルをDNAに組込ませ、そのDNA内のかかるラベルの量を本明細書に記載の検出手順により測定して決定する。他方、いくつかのかかる方法において、細胞集団を安定及び放射性アイソトープラベルと同時に接触させ、そしてかかる双方のアイソトープの検出を同時に実施してよい。

非放射性の安定なアイソトープラベル及び放射性アイソトープラベルを利用する本発明の方法は二重ラベル化試験を実施するため、及び経時的（たとえ短期間、例えば数分又は数時間であっても）に細胞増殖速度を測定するために有用である。特に、放射性アイソトープラベル及び非放射性安定アイソトープラベルを検出するのに一般に様々な技術が利用されるため、DNAの中に組込まれる各タイプのラベルの量は、あるタイプのラベルの測定が他のタイプのラベルの測定を妨害しうるおそれなく、独立して測定されうる。

安定及び放射性アイソトープラベルの双方を利用する分裂中の細胞集団における細胞増殖速度を測定するためのいくつかの方法では、この安定ラベル及び放射性アイソトープラベルをde novoヌクレオチド合成経路においてデオキシリボースの前駆体にそれぞれ付加させる。次いで各前駆体はDNAのデオキシリボースの中に組込まれる。好適な態様において、この安定なアイソトープ及び放射性アイソトープラベルはそれぞれラベル化グルコースを含んで成る。

例えば、一の態様において、細胞増殖の基底測定は、まず細胞をde novoヌクレオチド合

10

20

30

40

50

成経路を介してDNAの中に組込まれる検出可能な量の安定なアイソトープラベルと接触させた後に実施する。次いで細胞増殖の測定を、細胞をこれもde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAの中に組込まれる放射性アイソトープラベルと接触させた後に繰り返す。このようにして、経時的な細胞増殖速度の変化が初期の安定なアイソトープラベル化物質による妨害又はキャリーオーバー抜きで決定される。更に、放射性アイソトープラベルを利用する第二細胞増殖測定は、第一細胞増殖測定のすぐ後に、この安定なアイソトープラベルがこのシステムから除去又は洗浄されるのを待つことなく実施でき、なぜならこの安定なアイソトープラベルは放射性ラベルの正確な測定による妨害のおそれがないからである。安定なアイソトープラベルの組込まれたDNA及び/又は放射性アイソトープラベルの組込まれたDNAは、DNA内のラベルを検出する前にデオキシリボヌクレオシドへと加水分解するか、又はインタクトDNAポリマーにおいて検出及び測定されうる。

増殖中の様々な細胞集団、例えば癌細胞及びリンパ球（例えばCD4⁺及びCD8⁺細胞）等の細胞増殖速度はこれらの方法により測定できる。

放射性アイソトープラベルを採用する本発明の方法において、細胞のDNAへの放射性ラベルの組込みは様々な周知の技術、例えば放射性測定技術、例えば液体シンチレーションカウンティング又はガンマーカウンティング、並びにアクセレーターマススペクトルにより測定できる。アクセレーターマススペクトルが細胞DNAへと所定の放射性ラベル（例えば¹⁴C）の組込みを測定するうえで極めて有用である。特に、アクセレーターマススペクトルは細胞DNAへの安定なアイソトープラベルの組込み（例えば¹³Cの組込み）を測定するには利用できない。アクセレーターマススペクトルは一般に高価であるが、これは細胞DNAへの極めて低レベルの放射性アイソトープの組込み（特に、¹⁴Cの組込み）の検出を可能にする。この技術によりDNA内の極端に少量の放射性ラベル（例えば¹⁴C）が検出できることで、ほんの少量の放射性ラベルの使用で足り、かくしてかかるラベルに関連する潜在的な毒性は少なくなる又はなくなる。放射性及び安定アイソトープラベルの双方を採用する方法において、この安定なアイソトープラベルは本発明のその他の方法について記載したのと同様に、マススペクトルを含む標準の周知の技術により検出できる。本発明の方法に利用するために適切な放射性アイソトープは当業者に公知のものである。その例には、トリチウム化チミジン（³H-dT）及びプロモデオキシウリジン（BrdU）が挙げられる（Waldmanら、1991, *Modern Pathol.* 4: 718-722; Gratzner, 1982, *Science* 218: 474-475）。かかる放射性アイソトープラベルは、生理学及び臨床学的に許容される溶液を用い、当業界の慣用の方法に従って安定なアイソトープラベルについて前述した通りに調製できる。適正な溶液は選定の投与ルートに依存する。

DNAの前駆体、例えばデオキシリボースを放射性アイソトープラベルでラベル化し、そしてかかる放射性アイソトープラベルをde novoヌクレオチド経路を介してDNAに組込む手順は、細胞増殖及び分解を測定するための方法に関して本明細書に記載のものと類似し、そして本明細書において提供する詳細な開示に基づき当業者に自明であろう。

放射性アイソトープ又は安定アイソトープラベルのいずれかの検出可能な量の決定は当業者の能力の範囲内にある。

本発明は下記の実施例により更に説明する。これらの実施例は本発明の単なる例示であり、本発明を限定するものではない。

6. 実施例：DNAを安定なアイソトープラベル化グルコースによりラベル化することによる細胞増殖の測定

6.1 材料と方法

6.1.1 DNAからのデオキシリボヌクレオシドの単離

DNAを細胞懸濁物又は組織ホモジネート物のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール抽出により細胞又は組織から調製した。収率及び純度は光学密度により確認した。熱変性後、DNAをCrainら（Crain, 1990, *Methods Enzymol.* 193: 782-790）に記載の通りにしてヌクレアーゼP1、ホスホジエステラーゼ及びアルカリホスファターゼによる順次の消化によりデオキシリボヌクレオシドへと酵素的に加水分解した。ヌクレオシドの収率及び純度はC-18カラム及び水-エタノール勾配（Shigenagaら、1994 *Methods Enzymol.*

234 : 16-33) を利用するHPLCにより確認した。

6 . 1 . 2 デオキシリボヌクレオシドの誘導化及びガスクロマトグラフィーマススペクトル (GC - MS) による分析

ヌクレオシドのトリメチルシリル誘導体を凍結乾燥した加水分解物とBSTFA : ピリミジン (4 : 1) の100 で1時間のインキュベーションにより合成した。サンプルをGC - MSにより分析した (DB - 17 HTカラム、J & W Scientific,Folsom CA : HP 5890 GC及び5971 MS ,Hewlett Packard,Palo Alto,CA) 。質量、対、電荷比 (m/z) 467及び469でのイオンのアバundanceをデオキシアデノシン (dA) についての選定のイオン記録モードのもとで定量し ; そして m/z 555及び557はデオキシグアノシン (dG) についてモニターした。採用する誘導化及びGC - MS条件下で、プリン (dA及びdG) はピリミジンよりも大きめのピークを供し (図 3) 、より高い感度及び高いシグナル、対、ノイズ比をもたらした。グルコースの富化を測定するため、血漿又は培養培地をパーコール酸で脱プロトン化し、そしてアニオン及びカチオン交換カラムに通した (Neeseら、1995,J.Biol.Chem. 270 : 14452-14463) 。グルコースペンター酢酸誘導体はピリジン中での無水酢酸とのインキュベーションにより生成した。GC - MS分析は前述の通り、選定のイオン記録のもとで m/z 331及び333をモニターすることで実施した (Neeseら、1995,J.Biol.Chem. 270 : 14552-14663) 。

10

6 . 1 . 3 in vitro試験

[6 , 6 - ²H₂] グルコースから細胞DNAへのラベルの組込みの初期の研究を組織培養細胞内で実施した。2系列の細胞系を利用した : 肝細胞系HepG 2 及びリンパ球細胞系 H 9 (これはCD 4⁺T細胞系である) 。HepG 2 細胞を10mlのディッシュの中でアルファー改良Dul becco最少必須培地 (MEM) で増殖させた。H 9 細胞をRPMI 1640の中で懸濁増殖させた。双方を10%の透析胎児牛血清及び抗生物質の存在下で増殖させた (試薬は全て何らかのことわりのない限りGibco-BRL,Gaithersburg,MDより入手した) 。双方のケースにおいて、存在する細胞の数はCoulter ZM0901細胞カウンターでアリコートのカウンティングすることにより測定した。HepG 2 細胞に関しては、プレーティング効率は各ラベル化段階の始めに同一のプレートのカウンティングすることにより補正した。細胞は、[6 , 6 - ²H₂] グルコース (Cambridge Isotope Laboratories,Andover,MA) をそのラベル化グルコースが存在する総グルコース重量の10 ~ 20%の占めるように添加することによってラベルした (MEM - a については100mg / L、そしてRPMI 1640については200mg / L) 。一部の試験においては、グルコースフリー培地を使用し、そして培地の中に100%ラベル化グルコースのみを存在させた。[U - ¹³C₆] グルコース及び [2 - ¹³C₁] グリセロールの存在下 (Cambridge Isotope Laboratories,Andover,MA) で別の試験を実施した。

20

30

6 . 1 . 4 動物試験

4匹のラット (約250g) にラベル化グルコースを点滴した。静脈カニューレを麻酔しながら装着した (Hellersteinら、1986,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83 : 7044-7048) 。24 ~ 48hrの回収期間の後、[6 , 6 - ²H₂] グルコースを無菌46mg / ml溶液として0.5ml / hrで約24時間点滴した。餌をアイソトープ点滴の始めに抜き取った。この用量は絶食ラットにおける予備試験に基づき (Neeseら、1995,J.Biol.Chem. 270 : 14452-14463) 、約10%の平均血漿グルコース富化が達成されるものと予測される。点滴期間の終了時に動物を殺した。血漿グルコース富化のための血液及びDNA抽出のための組織を集め、そして分析するまで凍結した。長さ約30cmの小腸の区画を各ラットの十二指腸の真下から切り取った。この小腸区画をめぐり返し、そして洗浄した。上皮細胞を粘膜下組織から、5 mMのEDTAを含むバッファーの中でTraberら (Traberら、1991,Am.J.Physiol. 260 : G895-G903) に記載の通りにして37 で10分振盪させながらインキュベーションすることにより遊離させた。DNAを細胞調製物から抽出し、次いでヌクレオシドへと加水分解し、そしてGC - MSにより分析した (図 2) 。

40

6 . 1 . 5 ヒト対象における顆粒球動態試験

臨床的条件における本発明の方法の適用を調べるため、サン・フランシスコのGeneral HospitalのGeneral Clinical Research Centerにおいて4人のボランティアに [6 , 6 - ²

50

H₂] グルコースの静脈点滴を与えた (60 g を 48 h かけて)。一人の対象は健全な正常ボランティアであり、そして他の 3 人は HIV 血清陽性男性であり、彼らはリンパ球動態試験に参加していた (血液 CD4 T 細胞カウント値は 215 - 377 / mm³ の範囲にある)。誰も点滴時には臨床的に明瞭な感染症を有していなかった。血漿グルコースの高い且つ比較的定常な富化を得るため及び細胞 DNA のラベル化を最大にするため、点滴の 2 日間の間は食餌炭水化物を制限した (平均摂取量 46 g / 日)。ヘパリン処理血液サンプルを基底において採血し、そして血漿グルコース富化の評価のために点滴の間に hr 毎に採血した。48hr の点滴の後、血液を 10 日間毎日集め、そして顆粒球及び単核細胞を勾配遠心分離 (Vacutainer CPT, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) により分離した。顆粒球 DNA を抽出し、ヌクレオシドへと加水分解し、そして前述の第 6 . 1 . 2 章に記載の通りにして GC - MS により分析した。手順は全て University of California, San Francisco Committee on Human Research 及び University of California, Berkeley Committee for the Protection of Human Subjects による事前承認を受けており、そして実施した全ての手順について対象から文書で告知した同意書を得ている。

6 . 2 結 果

6 . 2 . 1 分析方法の開発

誘導化は GC - MS 分析のためにデオキシリボヌクレオシドを揮発性にするために必要である (Blau and Halket, 1993, Handbook of Derivatives for Chromatography 第 2 版)。メチル化又はアセチル化と比べ、TMS 誘導化により最大のアバンダンスが観察された。電子衝撃電離化のもとで分析した典型的な TMS - 誘導化サンプルの GC - MS スキャンを示す (図 3)。GC カラムから溶出させた dA 及び dG ははっきりとしたピークを示した。既に発表の通り (McCloskey, 1990, Methods Enzymol. 193 : 825-841)、スペクトル中の主要イオンは [6 , 6 - ²H₂] グルコースでラベルされていない塩基成分に由来した。親イオン、即ち dA - TMS₃ 及び dG - TMS₄ のそれぞれについての m / z 467 及び 557 ははっきり示され、そしてわずかなバックグラウンドを伴ってマスペクトルの領域の中に存在していた。ラベル化サンプルは過剰の M + 2 イオン 469 及び 557 を含んだ ; 469、対、467 及び 557、対、559 を定量的のために利用した。

アイソトープ比のアバンダンス感度 (濃度依存性) が GC - MS について説明されている通り (Neese ら、1995, J. Biol. Chem. 270 : 14452-14463 ; Patterson and Wolfe, 1993, Biol. Mass Spectrom. 22 : 481-486)、dA 及び dG について観察された。従って、サンプルは、アイソトープ富化を計算するとき、常に基底値 (自然アバンダンス) を差し引くために用いた標準におけるものと合うアバンダンスにおいて分析した。富化サンプルにおいて、dA の実測富化は予想通り dG と有意差がなかった。dA からのデーターのみを下記に示す。

6 . 2 . 2 in vitro 細胞増殖試験

10 ~ 15 % の [6 , 6 - ²H₂] グルコースを含む培地の中で増殖させた細胞由来の dA の富化は時間と共に漸進的に上昇した (図 4 A 及び 4 B)。これはプレート上で単層として増殖させた肝細胞系 (HepG 2) 及び懸濁物中で増殖させた T - リンパ球細胞系 (H 9) の双方について実証された。直接カウンティングにより測定した細胞数と比べると、dA 富化は直接カウンティングによる細胞の増大と非常に相関していた (図 4 C 及び D)。新たな DNA の分率 (dA の M 2 富化、対、培地グルコースの比から計算) と直接カウンティングによる新細胞の比率との間での相関係数は HepG 2 細胞では 0.984、そして H 9 細胞では 0.972 であった。

増殖中の細胞を利用する DNA 合成のための真の細胞内 dATP 前駆体プールの富化は理論上 100 % の新細胞 (即ち、ラベル化 DNA のみが存在するとき) での DNA の dA 富化と等しかった。ラベル化経時実験の新細胞 100 % への外挿は、HepG 2 細胞についての培地グルコース富化では 0.725 の推定プラトー dA 富化、そして H 9 細胞については 0.525 を示した (図 4 A - 4 D)。

細胞外グルコースと細胞内 DNA 前駆体の富化と間の関係を直接試験するため、細胞を 100 % の [6 , 6 - ²H₂] グルコースを含む培地の中で長期にわたり、細胞の繰り返し再プレATING 又は継代培養をしながら、HepG 2 細胞については全部で 53 日、そして H 9 細胞に

ついては25日増殖させた。実験の終了時に、 $<0.1\%$ の存在DNAが初期末ラベル細胞により算定されうる。dAの最大富化はHepG 2 及び H 9 細胞の双方について約65%であった（図 5 A 及び B）。この細胞外ラベル化グルコースの希釈についての一の考えられる解釈は細胞内でのグルコースの合成、例えば糖新生（GNG）であり、なぜならGNGのための未ラベルのアミノ酸前駆体が培養培地の中に存在するからである。他方、ラベルの多少の変化がグルコースの細胞内代謝の間、即ち、解糖及びトリカルボン酸回路の通過の間、又はペントースリン酸経路の非酸化的部分の間のいずれかにて生ずる（Woodら、1963,Biochemische Zeitschrift 338 : 809-847）。

糖新生からの細胞内未ラベルグルコースが希釈の主だった起源であるなら、H 9 細胞由来のdAは培地グルコース富化がHepG 2 細胞よりも100%に近づくであろう。しかしながら、これは認められなかった（図 4 A - 4 D、図 5 A 及び 5 B）。より直接的な試験はHepG 2 細胞によるDNA内のdAへのGNG前駆体の組み込みであろう。この仮説を調べるため、HepG 2 及び H 9 の双方を $[2 - ^{13}\text{C}_1]$ グリセロールの存在下で培養した。組合せ確率の理論又はマスイソトポマー分布分析（MIDA）技術（Neeseら、1995,J.Biol.Chem. 270 : 14452-14463 ; Hellersteinら、1992,Am.J.Physiol. 263 : E988-E1001）の適用により、GNGに由来するdAのデオキシリボースの分率が計算できる。HepG 2 細胞を、 $[2 - ^{13}\text{C}_1]$ グリセロールが20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加された培地の中で増殖させると、dAへの ^{13}C の無視可能な組み込みが観察された。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の $[2 - ^{13}\text{C}_1]$ グリセロールの存在下では（血漿グリセロール濃度の約2 ~ 3 倍）、 M_{+1} 及び M_{+2} イオンの双方の富化がdAにおいて観察された。MIDAの適用は、dAペントース環合成の17.8%が、細胞外グルコースの利用ではなく、GNG に由来することが明らかとされた。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の $[2 - ^{13}\text{C}_1]$ グリセロールの存在下で増殖させたH 9 細胞は予想通り有意なGNGを示さなかった。

二重ペアの細胞培養物を10%の $[6, 6 - ^2\text{H}_2]$ グルコースの存在下で、未ラベルのグリセロール（100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を伴って又は伴わないで増殖させた。かかる未ラベルのグリセロールはH 9 細胞におけるラベル化に影響を与えなかった；HepG 2 細胞では、dAへの組み込みは7%減少した。かくして、GNG前駆体の有用性はGNG可能な細胞におけるDNAのラベル化にはわずかな作用しか及ぼさず、従ってGNGはdAの細胞内希釈の完璧な理由ではなかった。

細胞外グルコース及びDNA内のdA間での大まかに35%の希釈が細胞内グルコース回路における ^2H の ^1H による交換によるなら、 $[U - ^{13}\text{C}_6]$ グルコース中の炭素ラベルは転位を受けていることになる。従って、HepG 2 及び H 9 細胞を10%の $[U - ^{13}\text{C}_6]$ グルコースの存在下で増殖させた。ペントースリン酸経路の非酸化的部分の如き経路を通る代謝がないなら、この前駆体由来のdNTPは5個のラベル化炭素全てを保持し、そして M_5 の質量を有するであろう。 M_5 富化は、 $[6, 6 - ^2\text{H}_2]$ グルコース由来の M_2 イオンで観察されたものと似たようにして増大した。約80%の細胞外富化の漸近線がHepG 2 細胞において達成され（図 6 A 及び 6 B）、一方H 9 細胞においては漸近線は約60%の細胞外グルコース富化にあった。 $\text{M}_0 \sim \text{M}_5$ スペクトルを分析したとき、 M_2 、 M_3 及び M_4 イオンの富化が M_5 の予測の富化に加えて認められた。この現象はH 9 及びHepG 2 細胞の双方で観察されたが、これらのイオンの相対的なアバundanceはH 9 細胞よりも大きかった。

上記の細胞培養実験を培地中のデオキシリボヌクレオシドの非存在下で実施した。リンパ球細胞系による従来の研究（Reichard, 1978, Fed.Proc. 37 : 9-14 ; Reichard, 1988, Ann.Rev.Biochem. 57 : 349-374）は細胞外デオキシリボヌクレオシドの有用性を増大させることは、リボヌクレオシドリダクターゼの活性及びプリンdNTPについての内因性合成経路の活性を下げず、むしろ高めうることを示した（図 1）。細胞外デオキシリボヌクレオシドの高まった有用性の効果を直接試験するため、HepG 2 及び H 9 細胞を当モル量の混合物の存在下で増殖させた。2通りの濃度20及び100 μM をその組織内での広がりを再現又は超過するように選定した；血漿濃度は通常1 μM 程度であり、そして組織濃度は1 ~ 100 μM の範囲にありうる（Cohenら、1983,J.Biol.Chem. 258 : 12334-12340）。H 9 細胞のフラスコ6本を約10%の $[6, 6 - ^2\text{H}_2]$ グルコースでラベルした培地の中で平行に増殖させた（表 2）。

表 2

DNA 内の dA への $[6, 6 - ^2\text{H}_2]$ グルコースの組込みに対する細胞外デオキシリボヌクレオシドの効果

細胞外デオキシヌクレオシドの濃度 (μM)						
リンパ球 (H 9)	0	0	20	20	100	100
dA／グルコース比	0.527	0.522	0.535	0.528	0.534	0.514
新細胞分率 (カウンティングによる)	0.849	0.851	0.867	0.856	0.839	0.822
外挿dA／グルコース (100％新細胞)	0.620	0.613	0.617	0.617	0.637	0.626
肝細胞 (HepG 2)						
dA／グルコース比	0.386	0.385	0.381	0.370	0.339	0.344
新細胞分率 (カウンティングによる)	0.568	0.589	0.536	0.565	0.626	0.570
外挿dA／グルコース (100％新細胞)	0.680	0.653	0.711	0.655	0.541	0.603

2 本はデオキシリボヌクレオシドを添加せずに増殖させ、2 本はより低めの、そして 2 本はより高めのデオキシリボヌクレオシド濃度で増殖させた。90 時間後、85% の細胞がカウンティングにより新しいとされた。この実験を HepG 2 細胞でも実施し、新細胞約 58% を示す細胞数の平均増加が得られた。H 9 細胞において、20 又は 100 μM のいずれかでの細胞外デオキシリボヌクレオシドの存在は dA へのグルコースからのラベルの組込みを減少させず、それ故 de novo ヌクレオシド合成経路の活性を抑制しなかった。HepG 2 細胞においては、20 μM において組込みの有意な低下はなく、しかしながら 100 μM ではわずかな (約 12%) の低下があった。H 9 細胞においては、100% の新細胞での dA/グルコースの外挿比 (細胞カウンティングに基づく) は 62 ~ 64% で再現された。HepG 2 細胞については、比は 54 ~ 71% に範囲した。

6. 2. 3 DNA の in vivo ラベル化 : 動物試験

$[6, 6 - ^2\text{H}_2]$ グルコースの静脈点滴を受けたラット ($n = 4$) において、殺したときの血漿グルコース富化は $13.2 \pm 0.9\%$ であった。全 24 時間の点滴期間の平均血漿グルコース富化はこの値よりも低く、なぜなら血漿グルコース富化は絶食の間漸進的に増大し、Ra グルコースは漸進的に低下したからである (Rocha ら、1990, *Eur. J. Immunol.* 20: 1697-1708)。平均血漿グルコース富化は、ラベル化グルコース点滴を与え、そして反復して血液サンプルを動脈採血ラインを介して採取した 2 匹のラットから推定した。24hr の絶食期間にわたる平均富化は 0.70 の最終富化であった。従って、この値を 4 匹の実験ラットについての平均グルコース富化を計算するために用いた ($9.2 \pm 0.6\%$)。

様々な富化が試験した 3 つの組織由来の dA において認められた (表 3)。

表 3

ラットにおける様々な組織中のDNA 内のdAへの $[6, 6 - ^2H_2]$ グルコースのin vivo 組込み

組織	富化 (%)	%新細胞		代謝回転時間 (d)		速度定数K (d^{-1})		L (d)	
		未補正	補正済み	未補正	補正済み	未補正	補正済み	未補正	補正済み
小腸上皮	3.18 ± 0.24	34.6 ± 4.2	53.2 ± 6.5	2.83 ± 0.37	1.84 ± 0.24	--	--	--	--
胸腺	2.33 ± 0.08	25.3 ± 2.2	38.9 ± 3.1	--	--	0.302 ± 0.030	0.51 ± 0.058	2.31 ± 0.23	1.36 ± 0.15
肝臓	0.25 ± 0.06	2.7 ± 0.5	4.2 ± 0.9	--	--	0.0028 ± 0.005	0.044 ± 0.008	25.4 ± 4.9	16.2 ± 3.1

平均血漿グルコース富化は 9.2 ± 0.6 %であり、そして平均点滴時間は 23.2 ± 0.1 hr とした。未補正の計算はDNA 合成のための前駆体として血漿グルコース富化を利用する；補正済みの計算は細胞内前駆プールの希釈のため $0.65 \times$ 血漿グルコース富化の補正係数を利用する（明細書参照）。線形動態モデルを小腸上皮のために利用した；外挿モデルは胸腺及び肝臓のために利用した。

陰窩から絨毛端にかけての小腸上皮細胞の進行を表わす小腸上皮細胞に関して、ライフスパン（線形）動態モデルを、新細胞が分裂し、一定時間生存し、そして形成される順に死ぬとの仮定を基準に採用した（Lipkin, 1987, *Physiol. Gastrointest. Tract* pp 255-284, Johnson L.R. 編）。 2.8 ± 0.4 d（未補正、細胞内dATPを表わすために血漿グルコース富化を利用）又は 1.8 ± 0.2 d（補正済み、35%の細胞内希釈係数の血漿グルコースを利用）の代

10

20

30

40

50

謝回転時間が計算された。胸腺及び肝臓についてはランダム置換（対数期）モデルを適用した。胸腺は肝臓よりも10倍速く代謝回転した。

6.2.4 ヒト対象における顆粒球動態臨床試験

AIDSにおけるTリンパ球動態試験の一部として、3名のHIV応答性男性及び1名のHIV血清陰性男性に[6, 6-²H₂]グルコース(1.25 g/hrを48hr)の点滴を与えた。全員試験時では臨床的に安定であった。絶対顆粒球カウント数はHIV陽性対象においてはそれぞれ1.5、0.9及び2.4×10⁹/Lであり、そしてコントロール対象では2.4×10⁹/Lであった。点滴は十分に寛容であった。15.3±2.4モル%超過の平均血漿グルコース富化が達成された(約2 mg/kg/minのグルコース出現速度)。顆粒球を単離し、そしてDNA由来のdA富化を測定した。点滴してから最初の6日間ではごくわずかな比率のラベル化細胞が循環系において認められ(図7)、ラベル化細胞の出現は6~8日から始まった。8日目での富化は約25%の新細胞の存在(補正済み)を示唆した。

10

6.2.5 HIV感染症におけるT細胞増殖の測定

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)で感染した個体のT細胞増殖を本発明の方法により測定した。[6, 6-²H₂]グルコースの静脈内点滴をCD4⁺T細胞数の十分に維持された(>500/mm³)又は低いCD4⁺カウント数(<200/mm³)の男性で実施した。点滴は48hr 1.25 gの[6, 6-²H₂]グルコース/hrとし、血漿中で10~15%の比率のラベル化グルコース分子が達成された(10~15%の富化)。血液(20~30cc)を点滴の間及び10日後まで毎日集めた。

単核細胞をPT(登録商標)チューブを用いて単離した;そしてCD4⁺細胞は磁性ビーズ免疫分離(Dynabeads(登録商標))又は蛍光活性化セルソーティングのいずれかを利用して単離し、10⁶個の細胞が単離された。単離細胞由来のDNAを市販のキット(Quiagen(登録商標))を用いて回収した。DNAをヌクレアーゼP1、ホスホジエステラーゼ、及びアルカリホスファターゼにより酵素的に加水分解してデオキシリボヌクレオシドを遊離させた。加水分解物をFSTFAで誘導化してデオキシリボヌクレオシドのトリメチルシリル誘導体にし、それを卓上GC-MS装置にインジェクトした。GC溶出物からのdA及びdGピークを選定のイオン記録マススペクトルによりモニターし、そしてm/z 467及び469(dAのため)並びにm/z 555及び557(dGのため)を同時に分析する市販のラベル化物質の標準曲線(例えばCIL, Cambridge, MAより購入した[5, 5-²H₂]dA)との対比を通じて定量した。アイソトープ比の濃度感度を補正するため、標準曲線を標準品とセンデス(sendes)との間でアバundance対合させた。CD4⁺及びCD8⁺T細胞からのdA及びdGにおける富化は0.00~1.50%ラベル化物質の割合にあった。血漿グルコースアイソトープ富化(10~15%のラベル化物質)と35%の希釈補正との比較及び前駆体-生成物関係の適用(Hellerstein and Neese, 1992, *Am. J. Physiol.* 263: E988-1001)により、新たに合成されたDNA鎖の調製が定量された。ピーク値は[6, 6-²H₂]グルコース点滴を開始して2~3日後にあり、そして15~20%の新たに合成されたDNA鎖、それ故15~20%の新たに増殖中の細胞が達成された(図8)。4~10日目のdA又はdGラベル化の衰退曲線はラベルの分解速度、それ故分裂したばかりの細胞集団を示す(Hellerstein and Neese, 1992, *Am. J. Physiol.* 263: E988-1001)。ラベル化細胞の分解速度は一般の細胞集団よりも一般に高く、分裂したばかりの活性化細胞の選択死を意味する。抗レトロウイルス療法のCD4⁺T細胞増殖及び分解の効果を治療の8~12週後に[6, 6-²H₂]グルコース点滴を繰り返すことにより決定した。

20

30

40

まとめると、安定なアイソトープラベル及びマススペクトルを利用するDNA合成の測定方法が細胞増殖の測定のために開発された。この方法には放射活性を及び潜在的な毒性代謝物が関与せず、それ故ヒトにおいて利用するのに適当である。

6.3 ヒトにおけるTリンパ球動態測定: HIV感染症及び抗レトロウイルス療法の効果

全ての生化学及び細胞系と同様、Tリンパ球プールは動態状態で存在する: 細胞は死に、そして新たに分裂した細胞が置き代わる。CD4⁺T細胞プールの枯渇はHIV-1感染症において生ずるが、この変化の劇的な基準は不明のままである。

AIDSにおけるCD4枯渇の高度な代謝回転動態モデルが提唱されている(Hoら、1995, *Natur*

50

e 373 : 123-126 ; Weiら、1995,Nature 373 : 117-122)。このモデルの中心的な主張はHIV - 1 が高速のCD 4 + T細胞分解を引き起こすこと ($1 \sim 2 \times 10^9$ 細胞 / 日)、そしてCD 4 再生系に対する高い需要が何年もの後にリンパ球産生余力の消失及びCD 4 + T細胞プールの崩壊を招くとのことである。このモデルはその後の研究のための強力な刺激剤を担ったが、間接的な証拠に基づくものにすぎない：進行したHIV - 1 疾患における高度に活性な抗レトロウイルス療法 (HAART) の開始の後、CD 4 + T細胞は血液の中で $4 \sim 8$ 細胞 / μ L / 日の速度で蓄積する。この値の $1 \sim 2 \times 10^9$ 細胞 / 日の全身累積速度への外挿及び処置後のT細胞累積速度が処置前のT細胞分解の速度を反映するとの仮説 (即ち、抗レトロウイルス療法はT細胞分解を完璧に阻害し、そして増殖に対して全く効果を有さない) により、このモデルの著者は後期段階の疾患に非常に高速なT細胞代謝回転が伴うと結論づけた。

10

しかしながら、何人かの研究者は循環中のCD 4 + T細胞数の変化は「ウィルストラッピング」、サイトカイン、ストレスホルモン又はその他の因子に基づく組織と血液との間での分布の変化であり、T細胞の代謝回転 (増殖及び分解) の変化ではないと指摘している (Dimitrov and Martin,1995,Nature,375,194 ; Mosier,1995,Nature,375 : 193 ; Sprent and Tough,1995,Nature,375 ; 193)。もしそうなら、増殖及び分解についての推論は循環中の細胞数の測定のみからは正当化されないであろう。HAARTを経たリンパ組織のCD 4 + T細胞含量のその後の研究はT細胞分布が事実上抗レトロウイルス療法により改変され、そして血液CD 4 カウント値の初期の上昇が主に全身T細胞蓄積ではなく再分布を表わすことを確認した (Zhangら1998,Proc Natl.Acad.Sci.USA 95 : 1154 ; Gorochovら1998,Nature Med . 4 : 215 ; Bucyら1998,5th Conference on Retroviral and Opportunistic Infections, Abstr.519 : 177)。更に、他の研究者は、T細胞動態を評価するための別の間接的な方法を利用し (即ち、T細胞染色体の末端制限フラグメント (TRF) 長)、高い代謝回転状態がHIV - 感染症にはないことを結論づけた (Wolthersら、1996,Science 274 : 1543 ; Palmerら、1996 J.Exp.Med. 185 : 1381)。ところで、複製履歴の指数としてのTRFを短くする速度の利用も特にHIV感染において利用するために考えられている (Hellerstein and McCune,1997,Immunity 7 : 583)。

20

正常人におけるT細胞動態についての定量データの欠如はHIV - 1 感染症のT細胞動態結果についての不確実性に更に寄与する。例えばCD 4 + T細胞についての $1 \sim 2 \times 10^9$ 細胞 / 日 ($4 \sim 8$ 細胞 / μ L 血液 / 日) の増殖速度 (Hoら1995,Nature 373 : 123-126 ; Weiら1995,Nature 373 : 117-122 ; Perelsonら1996,Science 271 : 1582 ; Perelsonら1997,Nature 387 : 188 ; Wain-Hobson,1995,Nature 373 : 102) が、たとえそれが正しいとしても、正常値よりも高いかどうか、それ故Tリンパ細胞生産系に対する異常な増殖負担であるかどうか不明である。

30

T細胞動態についてのこのような不確実性は従来の方法論の制約により大きい。最近まで、ヒトにおいて使用するためのT細胞動態を直接且つ正確に測定するための技術は存在しなかった。本発明の方法により、ヒトに含む対象の細胞の増殖及び置換速度が測定できる。本発明の方法は安定なアイソトープによる内因性式ラベル化 (図 1)、しかる後の細胞DNAの単離、デオキシリボヌクレオシドの酵素的加水分解、及びガスクロマトグラフィー / マススペクトル (GC - MS) によるアイソトープ富化の分析による、放射性又は潜在的に毒性な代謝物を使用することのない、DNA複製及び細胞増殖の測定を可能にする。このような技術を蛍光活性化セルソーティング (FACS) と組合せて選定の細胞サブ集団を精製することにより (図 9 A)、T細胞の増殖速度及び生存期間をヒトにおいて測定できる。

40

本実施例において、我々は本発明の安定なアイソトープ / FACS / GC - MS法を利用し、HIV - 1 感染症を伴って及び伴わないでヒトにおける循環中のT細胞の動態 (増殖及び置換速度) を測定した。我々はT細胞動態に関する一定の基本的な疑問を焦点とした：HIV - 1 血清陰性人における循環中のCD 4 + 及びCD 8 + T細胞に関して何が正常増殖速度及び分率置換速度定数であるか？これらの値は有意な血漿ウイルス負荷をもつHIV - 1 感染患者において変動するか？短期間 (例えば3ヶ月) 又は長期間 (例えば > 12ヶ月) 療法のいずれかの後の高度に活性な抗レトロウイルス療法 (HAART) 養生法の効果は何か？このような条

50

件におけるCD4⁺及びCD8⁺T細胞動態の関係は何か？

6.3.1 方 法

6.3.1.1 ヒト対象

動態測定を4グループの対象で実施した(表4)。対象は全員ボランティアであり、広告又は口コミで募った。

(I) 正常。HIV-1血清陰性対象(n=9; 男性6人、女性3人)。対象は健康、体重安定、無熱性であり、そして任意の医薬品を摂取していない。

(II) HIV-1感染対象。プロテアーゼインヒビター療法は受けておらず、有意な血漿ウィルス負荷を示す(HIV+グループ、n=6; 男性5人、女性1人)。対象は今までにプロテアーゼインヒビターを摂取したことがなく、臨床的に安定であり、そして無熱性である。試験時のCD4カウント値を示す(表4)。

(III) ヌクレオシドと組合せた12週間のリトナビル/サキナビル療法を経て試験した対象(短期間HAARTグループ、n=男性8人)。登録のための入会基準はヌクレオシドもしくは非ヌクレオシド療法(n=6)に基づく有意なウィルス負荷又はヌクレオシドを伴うプロテアーゼインヒビターに基づく有意なウィルス負荷とした(n=2)。臨床的に安定; その他の医療条件なし; そしてリトナビル/サキナビル療法を始めて12週間にわたり追跡されることを歓迎。9人の対象が登録; 8人が12週間の試験を完了。基底及び12週目のT細胞カウント値を示す(表4)。

(IV) 12~24ヶ月のHAART養生法を受けた対象。ウィルス負荷は検出限界よりも一貫して低い(長期間HAARTグループ、n=男性5人)。これらの対象は臨床的に安定であり、そして12~24ヶ月のウィルス負荷の記録抑制を有した。各患者の沈滞期でのCDカウント値及び試験時での値を示す(表4)。

任意の手順の前に全ての対象から文書による告知同意書を得た。このプロトコールはUS San Francisco Committee on Human Researchにより承認されている。

10

20

表 4

個々の対象のT細胞動態

グループ／ 対象	CD 4 沈澱	VL ($\times 10^3$)	CD 4				CD 8				
			CD 4 カウント値	Δ CD 4	CD 8 カウント値	k (d^{-1})	Abs Prolif (細胞/ $\mu L/d$)	Abs Prolif (細胞/ $d \times 10^{-9}$)	k (d^{-1})	Abs Prolif (細胞/ $\mu L/d$)	Abs Prolif (細胞/ $d \times 10^{-9}$)
I) 正常コントロール											
#1.	--	--	1,792	--	403	0.0120	21.5	4.8	0.0080	3.2	0.81
#2.	--	--	1,875	--	375	0.0084	7.4	1.7	0.0011	0.4	0.10
#3.	--	--	1,509	--	574	0.0046	6.9	1.5	0.0039	0.2	0.56
#4.	--	--	1,576	--	989	0.0140	22.1	5.5	0.0110	10.9	2.73
#5.	--	--	1,317	--	594	0.0046	6.1	1.0	0.0422	25.1	6.32
#6.	--	--	1,891	--	226	0.0035	3.7	0.8	0.0035	0.3	0.23
#7.	--	--	1,142	--	664	0.0059	6.4	1.1	0.0080	5.3	1.33
#8.	--	--	1,971	--	902	0.0083	16.4	4.1	0.0034	3.1	0.8
#9.	--	--	629	--	833	0.0190	12.0	3.0	--	--	--
平均 \pm S.D.	--	--	1300 ± 452	--	618 ± 257	0.0089 ± 0.0052	11.4 ± 7.0	2.8 ± 1.8	0.0100 ± 0.0130	6.4 ± 8.3	1.6 ± 2.1
II) HIV-+											
#1.	--	2.0	183	--	361	0.032	5.9	1.5	0.023	8.3	3.1
#2.	--	21.5	740	--	1173	0.026	19.2	4.8	0.031	36.4	9.1
#3.	--	107.4	168	--	838	0.040	6.0	1.7	0.048	40.2	10.1
#4.	--	43.0	236	--	1859	0.034	8.0	2.0	--	--	--
#5.	--	10.0	636	--	1145	0.022	14.6	3.3	--	--	--
#6.	--	440	172	--	702	0.031	5.3	1.3	--	--	--
平均 \pm S.D.	--	102.4 ± 170.7	356 ± 261	--	1,031 ± 512	0.030 ± 0.006	9.9 ± 5.7	2.5 ± 1.4	0.034 ± 0.013	28.3 ± 17.4	7.1 ± 4.4
III) 短期間HAART											
A) ウイルス応答体											
#1.	135	<500	296	3.1	920	0.078	23.1	8.9	0.084	76.8	19.0
#2.	335	<500	629	4.6	1,058	0.044	27.6	6.9	0.062	65.6	16.4
#3.	77	<500	363	5.6	987	0.036	11.0	2.8	0.036	35.2	8.8
#4.	83	<500	135	0.6	776	0.032	4.4	1.1	0.042	32.7	8.2
#5.	289	<500	365	2.0	2,227	0.082	29.9	7.5	0.036	81.4	20.0

10

20

30

40

表 4 (続き)

個々の対象のT細胞動態

グループ / 対象	CD 4				CD 8			
	CD 4	VL	CD 4	ΔCD 4	CD 8	k	Abs Prolif (細胞/μL/d)	Abs Prolif (細胞/μL/d)
沈滞	沈滞	(×10 ³)	カウント値		カウント値	(d ⁻¹)	(細胞/d×10 ⁻⁹)	(細胞/d×10 ⁻⁹)
平均184 ± S.D.	<500 ±120	358	3.2 ±178	1.204 ±2.0	0.053 ±609	19.2 ±0.025	4.8 ±11.0	0.052 ±2.8
B) ウイルス学不全								
#6.	320	47.6	450	0	1,031	0.105	47.1	12.0
#7.	76	26.0	65	0	563	0.060	4.2	1.1
#8.	164	65.0	178	0	1,037	0.036	6.3	1.6
平均	187	46.2	231	0	877	0.067	19.2	4.9
± S.D.	±124	±19.5	±198	±0	±272	±0.035	±24.2	±6.2
グループ全体								
平均	185	--	310	2.0	1,081	0.058	19.2	4.9
± S.D.	±112	--	±183	±2.2	±512	±0.028	±15.4	±3.9
IV) 長期間HAART								
#1.	13	<500	608	--	1,976	0.0091	5.5	1.4
#2.	603	<500	1261	--	880	0.0018	2.3	0.6
#3.	7	<500	364	--	499	0.0103	3.7	0.9
#4.	87	<500	330	--	898	0.0160	5.3	1.3
#5.	381	<500	917	--	943	0.0078	7.2	1.8
平均	218	<500	696	--	1039	0.0090	4.8	1.2
	±264		±394		±553	±0.0051	±1.9	±0.5

備考: Abs prolifer: 絶対増殖速度; VL: ウイルス負荷。血漿 HIV-1 ウイルス負荷はChiron bDWA 法により測定。

CD 4⁺ 及びCD 8⁺ T細胞カウント値はFACSにより12週目に決定した。CD 4沈滞期は対象のメディカルチャートに記録してある最低のCD 4 カウント値。ΔCD 4 は6週間の第一短期間HAART の間での予備処置の値からの血液CD 4 カウント値の変化 (グループIIIのみ)。--は測定せず又は不適; 「d」は「日」を表わす。

6.3.1.2 T細胞動態の測定

本明細書に記載の細胞増殖及び代謝回転を測定するための安定アイソトープ/MS法に関する本発明の方法をこれらの試験のために採用した。まとめると、かかる方法は下記の4つの段階を包含する:

(1) in vivoでの[6 , 6 - $^2\text{H}_2$] グルコースの投与。ラベル化グルコースの48hrの定常静脈点滴を実施し、T細胞動態の代表的な時期のサンプルを確保した。血漿グルコースの富化を点滴の間12時間毎に測定した。点滴はGeneral Clinical Research Center of San Francisco General Hospitalで実施した。血漿[$^2\text{H}_2$] グルコース富化は不連続静脈点滴の1 ~ 2 hr以内に<10%の定常値にまで衰退した。

(2) 血液からのCD4⁺及びCD8⁺T細胞集団の単離。採血を一般に2回行った(50~70mlづつ)。1回目は[^2H] グルコース点滴の5~7日目の間、そして2回目は10~14日目の間とした。末梢血液単核細胞をまずCD4⁺及びCD8⁺T細胞サブ集団へとイムノアフィニティービーズ[Dynabeads (Dynal ; Oslo, Norway) 又はMACS分離カラム (Miltenyi Biotec , Auburn, CA)] により分けた。再分析により、これらの細胞調製物は平均して、純度がわ

10

ずか70~90%であり、そしてGC-MSにより不定の動態測定値を供することが見い出された。従って、マルチパラメーターフローサイトメトリーを利用してCD4⁺及びCD8⁺T細胞サブ集団を>98%の純度にまで単離する必要があった。

(3) T細胞DNAからのdAの調製。プリンデオキシリボヌクレオシド(dA及びdG) をその後のGC-MS分析のためにT細胞DNAから単離した(図9B)。一般に、大まかに10⁶個の細胞を占める5 µgのDNAがGC-MS測定のために十分なdAを回収するのに要した。

(4) dAの ^2H -富化のマススペクトル測定。dAのアイソトープ富化のGC-MS分析は[$^2\text{H}_2$] dAの標準曲線との対比により行った(図9C)。

6.3.1.3 T細胞動態パラメーターの計算

本明細書に記載のラベル化物質により未ラベル物質の交換又は置換を表わす動態計算は前駆体-生成物関係の数学、又はNewtonの冷却の法則に基づく(Macallanら1998 Proc.Natl .Acad.Sci.USA 95 : 708-713 ; Zilversmitら1974, J.Gen.Physiol. 26 : 325 ; Hellerstein and Neese, 1992, Am.J.Physiol. 263 : E988-E1001 ; WaterlowらPROTEIN TURNOVER IN MAMMALIAN TISSUES AND IN THE WHOLE BODY 216-219 (North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1978))。分率置換速度(k , d^{-1}) 又は流入速度定数及び存在の定常もしくは偽定常条件は、前駆体(血液グルコース ; デオキシリボヌクレオシドプール中の細胞内希釈について補正) と比較しての生成物(T細胞dA) へのラベル組込みの比から計算した : 式(1) : $\text{dB} / \text{dT} = k (A - B)$

20

式中、Aは前駆体のアイソトープ富化であり、そしてBは生成物のアイソトープ富化である。

30

Aが一定なら、積分は次の式をもたらす :

式(2) :

$$B / A = \frac{[^2\text{H}_2] \text{ dA富化}}{[^2\text{H}_2] \text{ グルコース富化} \times 0.65} = 1 - e^{-kt}$$

並び換えると

式(3) : $k = - \ln (1 - [B / A]) / t$

となる。ここでtは2日(アイソトープラベル化期間) であり、そして富化は存在する[$^2\text{H}_2$] ラベル化分子の分率を示す。絶対T細胞増殖速度を次いで($k \times$ プールサイズ) として計算し、ここでプールサイズは実測血液カウント値(T細胞 / μL) に等しい。全身T細胞絶対増殖速度への外挿は($10^6 \mu\text{L} / \text{L}$) \times (5 Lの血液容量) \times (50) を乗じることにより、発表の通り(Hoら、1995, Nature 373 : 123-126 ; Weiら、1995, Nature 373 : 117-122) 実施できうる。

40

これらの計算は下記に基づく : ラベル化期間の間循環中のT細胞カウント値は安定であり、従って分裂したばかりの細胞の循環への参入は他の細胞の流出によりバランスがとれている(定常仮定) ; 増殖中のT細胞及び非増殖中のT細胞は組織及び血液を似たように横行し、従って血液中の分裂したばかりの細胞の分率が組織内を占める ; そして細胞外グルコースからT細胞内のdATP成分への代謝的寄与(図1) は全てのリンパ増殖性組織において均一であり、そして本明細書におけるin vitroで予め計算した値であった(表2 ; またMacallanら、1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 : 708-713を参照)。T細胞分解の代表と

50

しての循環中のT細胞の置換速度の解釈は、組織T細胞プールサイズがラベル化期間中一定であり、従って分裂したばかりの細胞の生産が他の細胞の分解によりバランスどりされているものと仮定される。循環中のT細胞の絶対増殖速度の全身への外挿は、組織と血液との間での分布比が一定であり、そして推定された値である(50:1)と仮定する(Hoら、1995, Nature 373:123-126; Weiら、1995, Nature 373:117-122) 1)。

6.3.1.4 統計学的分析

グループを一方ANOVOにより、Dunn/Bonferroniフォローアップで、5%の手順誤差率において比較した。CD4⁺を対合し検定によりグループ内のCD8⁺T細胞と比較した。

6.3.2 結果

循環中のリンパ球の動態測定は、サンプリングした画分(血液)が、細胞増殖が起こるものと信じられている区画ではない点、若干異常なフィーチャーである。循環中のT細胞におけるラベルの組込みの判断はこの区分けを念頭に置かなくてはならない。図10における結果は、循環中のCD4⁺T細胞において測定されたラベル組込みの経時的な識見を供する

。短期間HAARTに基づく8人の対象のこのグループにおいて(グループIII)、ほとんど(6人)が5日及び14日目に同等のレベルのラベル組込みを示した。3人の対象も6又は7日目のサンプルでこの間隔の間ラベル組込みの安定性を示した。これらの観察は中心のサンプリングしていない区画におけるT細胞増殖、それに続く5~14日間にわたる循環プールへの急速交換(混合)モデルと一致する。血液CD4プールは1日何回も再循環するため(Gowansら、1998, Blood 91:1653)、循環中のT細胞中の富化の見かけ上の安定性(図10)は交換するプールが十分に混合されることを示唆する。ラベルを中断して2週間の間のCD4⁺T細胞富化の落下の欠如は、循環中のラベル化細胞の分解を相殺する組織由来のラベル化細胞の残留的なゆっくりとした流入を反映するようである。もし血液及び組織の混合が100%に満たないなら、又は一部のラベル化細胞が血流中で出現する前に破壊されるなら、血液中の実測置換速度は、たとえそれが血流中に存在する細胞の置換及び増殖を正確に反映していようと、組織T細胞増殖の真の速度を下まわって見積られてしまうであろう。実測の代謝回転速度はかくして、組織に外挿すると、最小値と見られうる。

グループIIIで試験した2人の対象において、たとえラベル投与を長い間中断したとしても、最初及び最後の時点の間で実測の組込みは増大した。このような状況において、増殖中の細胞(最初の2日間の間にラベル化)は他の6人の対象で観察されるよりも遅い速度で末梢循環へと交換されたにちがいない。以下に示すデーターの目的のため、このような個体由来の実測組込み値を、最高値をもつ日と解釈した。上記の通り、これらの結果は組織T細胞増殖速度の最小推定値である循環中のCD4⁺T細胞へのラベル組込みの似たような経過がグループI、II及びIV由来の対象で観察された(表4)。

6.3.2.1 CD4⁺及びCD8⁺T細胞動態

正常なHIV-1血清陰性対象におけるCD4⁺T細胞についての分率置換速度(k)は $0.0089 \pm 0.0052 \text{ d}^{-1}$ であった(表4、グループI)。CD8⁺T細胞についての k の値は $0.0100 \pm 0.0130 \text{ d}^{-1}$ であった。循環中の絶対増殖速度はCD4⁺及びCD8⁺T細胞それぞれについて 11.4 ± 7.0 及び 6.4 ± 8.3 細胞/ μL /日であった。組織:血液T細胞分布の標準推定値(50:1)を適用すると(Hoら1995, Nature 373:123-126; Weiら1995, Nature 373:117-122; Perelsonら1996, Science 271:1582; Perelsonら1997, Nature 387:188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373:102)、血液中のこれらの速度は全身においてそれぞれ $2.8 \pm 1.8 \times 10^9$ 及び $1.6 \pm 2.1 \times 10^9$ 細胞/日へと外挿される。このようなHIV-1血清陰性対象において、CD4⁺T細胞についての増殖速度はCD8⁺T細胞について認められた値よりも約2倍高い。特に、このようなHIV-1血清陰性対象におけるCD4⁺代謝回転速度は、間接手段を利用して後期HIV-1疾患の間に流出するものと従来推定されたものよりも高い(Hoら、1995, Nature 373:123-126; Weiら、1995, Nature 373:117-122)。

有意な血漿ウィルス負荷(平均 $10^{5.0 \pm 5.2}$; CD4カウント値 360 ± 267)をもつHIV-1血清陽性男性($n=6$)における動態結果を示す(表4、グループII)。CD4⁺T細胞についての k の値は正常コントロールと比べ、HIV-1感染対象において約3倍高かった($0.031 \pm 0.006 \text{ d}^{-1}$)(図11A及び11B)。循環プールへの分裂したばかりの細胞の流入を表わ

10

20

30

40

50

す循環中のCD4⁺T細胞の絶対増殖速度 9.9 ± 5.7 細胞 / μL / 日 (又は $2.5 \pm 1.4 \times 10^9$ 細胞 / 日の全身速度) は無秩序なHIV-1感染症において正常値よりも高くならなかった (図11A及び11B)。対照的に、循環中のCD8⁺T細胞増殖の絶対速度は正常コントロールと比べてHIV-1感染症において高まり (全身で 28.3 ± 17.4 細胞 / μL / 日又は $7.1 \pm 4.4 \times 10^9$ 細胞 / 日、図11A及び11B)、そしてCD4⁺T細胞について認められたものより、低いのではなく、高かった。

8人の対象を12週間のHAART養生法 (従前のヌクレオシド又は非ヌクレオシドに加えてリトナビル / サキナビル) を含む併合プロテアーゼインヒビターにかけた後、経時血液CD4カウント値が比較的安定なときに試験した。(表4; Hoら1995, *Nature* 373: 123-126; Weiら1995, *Nature* 373: 117-122; Perelsonら1996, *Science* 271: 1582; Perelsonら1997, *Nature* 387: 188; Wain-Hobson, 1995, *Nature* 373: 102; Zhangら1998, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1154)。この時期での血流中の実測T細胞置換速度を最初の6週間の非定常期中の血液内のCD4⁺T細胞の平均累積速度 (即ち、基底及び6週目の血液CD4カウント値との差から推定; 図12の備考参照) と比較した。初期非定常期の際の平均累積速度は定常時の真の置換速度より下まわって見積もられ、そして定量的にも実測値とよく相関しなかった (図12)。例えば一部の対象はHAARTによる血液CD4カウント値の任意の上昇を示さず、従って代謝回転は累積法によっては推定できなかったにもかかわらず、これらの対象は12週間の治療でCD4⁺T細胞の活発な代謝回転を示した (図12)。

プロテアーゼ-インヒビター含有養生法にかいていないHIV-1血清陰性コントロール及びHIV-1感染対象の両者と比べ、T細胞動態における数多くの有意差が短期間HAART養生法を経た患者において記録された (図11A及び11B)。ウィルス負荷が減少しようとしなかりと、kについての値並びにCD4⁺及びCD8⁺T細胞の絶対増殖速度は一般に高かった。グループIIIにおけるT細胞動態はウィルス学応答体 (ウィルス負荷 < 500コピー / ml) 及びウィルス不全体 (ウィルス負荷 > 500コピー / ml、表4、図11A及び11B) について有意に相違しなかった。長期HAART (グループIV、12~24ヶ月のウィルス負荷の持続抑制をもつ) は異なる動態を示し続けた (図11A及び11B)。この5人の個人のグループにおいて、kについての値並びにCD4⁺及びCD8⁺T細胞についての絶対増殖速度は本質的にHIV-1血清陰性対象において観察された正常値に逆もどりしていた。

CD4⁺及びCD8⁺T細胞絶対増殖速度 (図13A、 $r^2 = 0.69$ 、 $p < 0.001$) 並びにk (図13B、 $r^2 = 0.66$ 、 $p < 0.001$) 間の強い相関が観察された。HIV-1血清陽性 (図13C、 $r^2 = 0.96$ 、 $p < 0.0001$) 及び短期間HAARTグループ (図13D、 $r^2 = 0.55$ 、 $p < 0.01$) の双方におけるCD4⁺T細胞の絶対増殖速度及び血液カウント値との間での強い相関も認められ、一方kとCD4カウント値 (図13E) との間では相関はなかった。血漿ウィルス負荷とHIV-1感染グループにおける循環中のCD4⁺T細胞の絶対増殖速度 (図13F) 又はk (図13G) のいずれかとの間の相関もなく、即ち、高血漿ウィルス負荷には血流中の分率又は絶対のいずれもの高速CD4⁺T細胞代謝回転が伴わなかった。

6.3.3 分 析

Tリンパ球動態は本明細書に記載の安定なアイソトープ / FACS / GC-MS法を利用してヒト対象において直接測定できる。HIV-1免疫病原に関する数多くの問題がこれにより解決される。

疑問 (1) : 正常人における循環中のT細胞の代謝回転 (置換及び絶対増殖速度の速度定数) の動態は何であるか?

HIV-1 - 未感染正常コントロールにおける循環中のT細胞代謝回転速度についての情報がないため、かかる速度がHIV-1疾患の経過の間変化すると結論づけることは不可能である。間接的な方法が、放射線療法を経たT細胞における不安定な染色体損傷の持続の測定を含む正常な代謝回転速度を評価するために今まで利用されてきた (McLean and Michie, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3707; Michieら、1992, *Nature* 360: 264)。このアプローチにより得られた評価 (記憶T細胞については $k = 0.01 \text{ d}^{-1}$ 、そしてナイーブT細胞については 0.001 d^{-1}) は、本明細書に記載の混合T細胞プールについての約 0.009 d^{-1} の実測値と近いが、やや低い。このやや低い日常の代謝回転評価 (我々のアプローチによ

り測定された4～8細胞/μL/日、対、11細胞/μL/日)は、放射線療法を経たリンパ球減少症「正常」対象における長期T細胞生存を反映しうる(McLean and Michie, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3707; Michieら、1992, Nature 360: 264)。

HIV - 1 感染症との関係において、本明細書に記載の結果又は従来の結果(McLean and Michie, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3707; Michieら、1992, Nature 360: 264)は、AIDSにおける4～8細胞/μL/日(1～2×10⁹細胞/日)のCD4⁺T細胞再生速度が異常に高いという所見を裏付けする。この範囲において循環するCD4⁺T細胞プール中の増殖速度を擬態したモデルはリンパ球産生貯蔵体(reserve)上に慢性ストレインを負荷し(Hoら1995, Nature 373: 123-126; Weiら1995, Nature 373: 117-122; Perelsonら1996, Science 271: 1582; Perelsonら1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373: 102)、それ故正常人についての有用な対照データとは一致しなかった。

疑問(2): 進行したHIV - 1 疾患におけるCD4⁺T細胞枯渇が加速化分解(高代謝回転モデル)、再生不良(低代謝回転モデル)又は両方に原因するか?

「代謝回転」なる語をどのように使用しているかを明確に定義することは重要であり、なぜならこの語は往々にして細胞置換の過程の2通りの態様を意味するために利用されているからである。「代謝回転」とは:(i)細胞が形成及び死ぬ絶対速度(絶対増殖速度、細胞/日);又は(ii)1日当り置換される細胞のプールの分率(k, d^{-1})のいずれかを意味する。生化学システムにおいて、プールサイズは一般に絶対産生速度(一般に最終産物との関連で0次元)及び除去の定常速度(これは一般に最終産物との関連で一次元)により決定される(WaterlowらPROTEIN TURNOVER IN MAMMALIAN TISSUES AND IN THE WHOLE BODY 198-211 (North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1978); Schimke, MAMMALIAN PROTEIN METABOLISM 178-228 (H.N. Munro ed., Acad. Press, New York, 1970))。HIV - 1 感染症における関連の疑問はT細胞の加速化分解及び/又は損われた生産がCD4⁺T細胞枯渇を誘導するかどうかにある。2通りのモデルが対立した動態推測を供する: 加速化分解モデル(Hoら1995, Nature 373: 123-126; Weiら1995, Nature 373: 117-122; Perelsonら1996, Science 271: 1582; Perelsonら1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373: 102)は未処置のHIV - 1 疾患における高度なCD4⁺T細胞代謝回転、代謝回転とCD4カウント値との負の(inverse)相関、及びHAART後の代謝回転速度における低下を予測せしめる(図14、左側参照のこと)。対照的に、再生不良モデル(Wolthersら1996, Science 274: 1543; Palmerら1996, J. Exp. Med. 185: 1381; Hellerstein and McCune, 1997, Immunity 7: 583)は未処置のHIV - 1 疾患における低CD4⁺T細胞代謝回転、代謝回転とCD4カウント値との間での正の(direct)相関、及びHAARTの開始後の代謝回転の増大を予測せしめる(図14、右側参照)。

CD4⁺T細胞についてのkはHIV - 1 陰性対象におけるよりもHIV - 1 陽性において3倍高いが、所見はT細胞生産速度又は再生能力が、少なくとも本発明において研究した進行HIV - 1 集団において、循環中のCD4⁺T細胞カウント値を決定するうえで定量的により重要な役割を果たすことを示唆する:

(i) 短期間HAARTには循環CD4⁺T細胞についての分率及び絶対置換速度の双方の、低いのではなく、高い値が伴う(図11A及び11B)。これらのデータは短期間HAARTの後に観察されるCD4カウント値における定常増加が循環中のCD4⁺T細胞の長い生存に基づくのではなく(事実、生存時間又は半減期は短い)、その代わり循環プールへの新たに生産されたT細胞の流入速度の上昇を反映する。

(ii) 循環中のCD4⁺T細胞の絶対増殖速度は高ウィルス負荷されたHIV - 1 感染対象においては高くなく(図13F)、そして正常な血清陰性コントロールと比べ未処置のHIV - 1 血清陽性対象において高くなかった(表4、図11B)。これらの所見は、少なくとも進行したHIV - 1 疾患においては、ウィルス誘導リンパ球産生負担のモデルを支持しない。

(iii) 血液CD4⁺T細胞の絶対代謝回転速度が高いほど、CD4⁺カウント値は高いが、kとの相関はなかった(図13C - 13E)。この結果は、加速化分解モデルにより推定される動態とは対立しており(図14)、それによれば最も急速なCD4⁺T細胞代謝回転を有するHIV - 1 血清陽性個体は最低のCD4カウント値を有するはずである(図13C及び13Dを図14

と比較)。

(iv) 短期間HAARTはCD 8⁺T細胞の増殖をCD 4⁺T細胞と同程度に増大させ(図11A及び11B)、そして低CD 4増殖速度のHIV - 1感染対象も低いCD 8⁺増殖速度を有する(図13A)。かくして、CD 8⁺T細胞はCD 4⁺T細胞と進行したHIV - 1疾患における見かけ上の再生制限を有した。

これらの所見は、CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞の双方の再生がHIV - 1疾患に制限され、そしてかかる制限は抗ウイルス療法により軽減される。末梢リンパ組織についての近年の所見(Zhangら、1998, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:1154)は、T細胞再生系がHAARTの後に改善される見解と一致する。小胞樹状ネットワークの部分的修復はリンパ組織において急速に認められ、新生リンパ小胞及び細胞浸潤物の出現が伴った(Zhangら、1998, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:1154)。初期CD 4カウント値が低いほど、リンパ構造における変化がより劇的であった。本明細書において紹介する動態データは、末梢リンパ組織、そしておそらく胸腺におけるT細胞増殖のための微小環境が抗レトロウイルス療法により改善されうるとの知見を支持する。

疑問(3) : HIV - 1感染症におけるT細胞についての「目かくして(blind)ホメオスタシス」についての証拠があるか?

「目かくしホメオスタシス」モデルがHIV - 1疾患の進行の際の循環CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞カウント値における往復変化を説明するために提唱されている(Roederer, 1995, *Nature Med.* 1(7) : 621; Margolickら、1995, *Nature Med.* 1(7) : 674-680)。このモデルはCD 4⁺とCD 8⁺T細胞とを区別しないT細胞カウンターを要する: CD 4⁺T細胞が破壊されると、CD 8⁺T細胞が大量に生産され、有用なT細胞空間を充満する。環境的観点において、CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞再生は共有及び制限資源(例えば抗原提示細胞、補刺激因子、等)について競合するものと考えられている。

ここに示すデータはこのモデルとある程度一致する。このモデルと替同するのは、CD 8 : CD 4絶対増殖速度の比がHIV - 1による感染後に逆転することにある(表4、図11B)。正常な対象において、絶対増殖速度又は循環CD 4⁺T細胞は循環CD 8⁺T細胞の絶対増殖速度の2倍であり、HIV - 1感染グループにおいては、CD 8速度はCD 4速度の少なくとも2倍であり、血液中のCD 8⁺T細胞プールサイズにおける変化と平行している(表4)。他方、HAARTによる処置はCD 4⁺及びCD 8⁺T細胞絶対増殖速度の双方の同等上昇が伴う(図11A及び11B)。更に、HIV+グループ内で、CD 4⁺とCD 8⁺増殖速度との間での強い直接相関があった(図13A)。このような所見は、少なくとも後期HIV - 1疾患の状況において、CD 4⁺及びCD 8⁺T細胞の双方の生産は共有因子の欠如により制限される。

このような結果は、起源についての競合要素が進行したHIV - 1疾患に存在するが、共通の再生欠陥は重複していることを示唆する。HIV - 1感染症の自然履歴にわたるCD 4及びCD 8動態の縦軸研究がこの問題の解決に必要とされる。

疑問(4) : ほとんどのCD 4代謝回転が直接HIV - 1媒介殺傷によるのか?

HIV - 1がin vivoでCD 4⁺(そして可能としてはCD 8⁺T細胞)に直接感染してそれを破壊できることが明確であるが(Flamandら、1998, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:3111)、動態分析は循環CD 4⁺T細胞の死のほとんどが循環HIV - 1とは正に相関しない状況で起こることを示した。

i) 短期間HAARTに基づく5人の「ウイルス応答体」において(表4、グループIIIA)、CD 4⁺T細胞についてのkは、有意なウイルス負荷を有するHIV - 1感染対象(グループII)において認められるものよりも、低いのではなく、高かった。即ち、より高い分率のCD 4⁺T細胞が低級循環ウイルス負荷に直面して死滅した(図11B)。この結果は、短期間HAARTをCD 4⁺T細胞増殖のレベル増大、それ故活性化誘導細胞死(AICD)のレベル増大に結びつけるT細胞再生の脱抑制に反映しうる(Murali-Krishnaら、1998, *Immunity* 8:177)。低級ウイルス負荷はまずCD 4⁺T細胞死の全体レベルを上昇させることがあり、なぜならよく多くのCD 4⁺T細胞が産生されるからである。

ii) 似かよった見解がCD 8⁺T細胞の代謝回転を支持する。このような細胞は、活発なウイルス複製を有するHIV - 1感染対象者(グループII)においてよりも、「ウイルス応答

10

20

30

40

50

体」(グループIII)において高めの k 又は短めの生存期間を有する。 $CD4^+T$ 細胞の半減期($1/k$)は様々なHIV-1感染グループ間での $CD4^+T$ 細胞についてのそれと同じであり(図11A)、そしてグループ内では強く相関していた(図13B)。 $CD4^+T$ 細胞が*in vivo*で感染及び破壊されていなければ、その k についての高まった値及び絶対増殖速度がHIV-1の直接作用に原因するとすることは困難である。

iii)最後に、循環中のウイルス負荷と $CD4^+T$ 細胞増殖速度又は k との相関は認められなかった(図13F及び13G)。血漿ウイルス負荷は今まで身体における $CD4^+T$ 細胞分解速度の指数として解釈されていた(Perelsonら1996,Science 271:1582; Perelsonら1997,Nature 387:188; Wain-Hobson,1995,Nature 373:102; Mellorsら1996,Science 272:1167; Mellorsら1995,Ann.Int.Med. 122:573)。我々はT細胞分解がリンパ組織において起こる可能性を否定できないが、我々のデータは血漿ウイルス負荷が循環中の $CD4^+T$ 細胞の分解速度の反映であるとの認識を支持しない。

このような動態発見はウイルス媒介型 $CD4^+$ (又は $CD8^+$)T細胞殺傷の発生に対する反論とならない。むしろ、これらは循環プール中のほとんどの死滅する $CD4^+$ (及び $CD8^+$)T細胞が未感染でありうることを実証する(Oyaizu and Pahwa,1995,J.Clin.Immunol. 15:217; Casella and Finkel,1997,Curr.Op.Hematol. 4:24; Andersonら1998,J.AIDS Hum.Retrovirol. 17:245)。

疑問(5):何が進行したHIV-1疾患においてT細胞増殖を誘導するか?

3組のHIV-1感染グループにおけるT細胞増殖速度の対比(図11B)は、T細胞再生がこの条件において著しく抗原誘導性であることを示す。短期間HAARTを経た $CD4^+$ 及び $CD8^+T$ 細胞の双方の極端に高い増殖(HAARTを受けていないHIV-1感染対象及びHIV-1血清陰性コントロールと比べ)は12~24ヶ月のHAARTを経て、分率及び絶対の双方において、著しく低い代謝回転と相違する。後者の状況は抗原負担の標準化を反映し得、一方前者の状況は、HIV-1自体及び病原性生物を含む抗原刺激を満たす。この解釈は、T細胞増殖における早期増大がほとんどの記憶T細胞を反映し(即ち、抗原駆動細胞増殖)、そしてより多彩なT細胞レセプター(TCR)レパートリーが伴わないであろうことを予測せしめる(Connorsら、1997,Nature Med. 3:533)。対照的に、長期ウイルス抑制は、抗原駆動性でないなら、そして特に胸腺内成熟を包括しないなら(McCune,1997,Sem.Immunol. 9:397)、TCRレパートリー多彩性の拡大が付随したナイーブT細胞の構築を含みうる。AIDSにおける免疫細胞動態についてのパズル化した疑問の一つは、なぜ $CD4$ カウント値がHAARTを経て急上昇し、骨髓移植又は放射線療法誘導リンパ球減少症の後にはるかにゆっくりと回復するかにある(Mackallら1994,Blood 84:2221; Mackallら1997,Immunol.Today 18:245; Mackallら1997,Blood 89:3700)。HIV-1感染症がTリンパ球産生を何らかに刺激するという考えを生物学的に合理化するのは困難である。抗原駆動モデル(AIDSにおける損傷の少ない又はより可逆的に損傷を受けた微小環境との組合せ)はこのような条件間での相違の説明となりうる。12週間の併合プロテアーゼインヒビター処置(表4)を経た患者の大部分に5~47 $CD4^+T$ 細胞/ μL /日及び27~81 $CD8^+T$ 細胞/ μL /日の置換速度は、この条件における循環中のT細胞プールサイズの比較的急な変化を担うには、たとえ分率分解速度でさえもが高まったとしても、十分すぎる。12~24ヶ月のHAARTを経た患者における著しく低い置換速度(2~7 $CD4$ 細胞/ μL /日及び4~26 $CD8$ 細胞/ μL /日)は後骨髓移植又は放射線療法条件における動態に一層近似しうる。このような非HIV-関連リンパ球減少状態におけるリンパ球動態の測定は興味深い。

疑問(6):長期抗レトロウイルス療法は短期間療法とは異なるT細胞動態に対する効果を有するか?

最近の研究はT細胞集団の表現型が、初期の3~6ヶ月の処置の際よりも12~18ヶ月のプロテアーゼインヒビター含有養生法を経て異なった風に影響されることを示唆した(Autr anら1997,Science 277:112; Connickら1998,5th Conference on Retroviral and Opportunistic Infections,Abstr.LB14:225)。特に興味深いのは、ナイーブ表現型($CD45RA^+CD62L^+$)T細胞において遅い増大が報告されていることである。我々の結果(表4、図11A及び11B)は、短期間療法と比べ、長期間療法の後に非常に異なるT細胞動態を示し

10

20

30

40

50

た。12～24ヶ月後、CD4⁺T細胞の分率及び絶対代謝回転は、3ヶ月のHAART後に存在するはるかに高い値と比べ、正常コントロールのそれを下げた。HAART後最初の4～6週間の間の動態が組織と血液との間での分配を主に反映しうるとの報告と共に（Zhangら1998, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 1154 ; Gorochovaら1998, *Nature Med.* 4 : 215 ; Bucyら1998, *5th Conference on Retroviral and Opportunistic Infections*, Abstr. 519 : 177）、これらのデータは後HAART期間が少なくとも3つの動態期に分けられることを示した：最初の0～2ヶ月の間での初期非定常状態（又は分配）期、2～6ヶ月の間での加速化増殖及び分解期、並びにおそらくはナイーブT細胞再生及び免疫再構築を特徴とするその後の低代謝回転期。T細胞動態のこのモデルは本明細書に記載の方法を利用し、将来試験可能である。

10

疑問（7）：何がT細胞動態を評価するためのその他の技術についての暗示であるか？

T細胞代謝回転の直接測定値と初期非定常状態における循環T細胞の蓄積速度とを対比する本明細書において紹介する結果は、後者のアプローチが循環T細胞プールでさえも、真の代謝回転に関して情報性でないことを示唆する。評価中の定常状態代謝回転の他に、真の置換速度間での信頼できる相関はなく、そして早期蓄積に対する分配の効果は否定できない。更に、蓄積方法はT細胞カウント値が安定なら適用できず、そしてグループIIIにおける一部のより注目される対象がこのカテゴリーに属した（表4）。CD4⁺T細胞分解がウィルス複製の急性抑制の後にゼロにまで低下するとの仮説（Hoら1995, *Nature* 373 : 123-126 ; Weiら1995, *Nature* 373 : 117-122 ; Perelsonら1996, *Science* 271 : 1582 ; Perelsonら1997, *Nature* 387 : 188 ; Wain-Hobson, 1995, *Nature* 373 : 102）は本明細書において紹介するデータとは一致せず、なぜなら正常HIV-1陰性対象は約11.4細胞/μL/日（又は全身において 2.8×10^9 細胞/d）のCD4⁺T細胞代謝回転を有するからである。かくして、血流中の後HAART CD4蓄積は血液CD4⁺T細胞の前HAART又は後HAART増殖又は分解速度のいずれも示さなかった。

20

テロマーTRF短縮速度はHIV-1感染症におけるT細胞複製履歴指数としても利用されている（Wolthersら、1996, *Science* 274 : 1543 ; Palmerら、1996, *J. Exp. Med.* 185 : 1381）。この方法は増殖中の細胞集団に対する潜在的な選択バイアスを理由にHIV-1感染症において特に問題である（更には、Hellerstein and McCune, 1997, *Immunity* 7 : 583を参照のこと）。この問題はもしHIV-1が活性化細胞に優先的に侵入して殺傷するなら、生存細胞のTRF長は一般集団の複製履歴を反映しないことがあることにある。WolthersらもPalmerらも、HIV-1血清陰性コントロールと比べてHIV-1感染化患者におけるCD4⁺T細胞の高速TRF短縮を見い出していない（Wolthersら、1996, *Science* 274 : 1543 ; Palmerら、1996, *J. Exp. Med.* 185 : 1381）が、Wolthersらはそれ以来正常値よりも3倍高いCD4⁺T細胞分率代謝回転の上昇が、もしHIV-1が増殖中のCD4⁺T細胞の感染及び分解について30%の効率を有するなら、彼らのTRFデータと適用するであろうことを認識している（Wolthersら、1998, *Immunol. Today* 19 : 44）。この形態に従うと、HIV+対象における我々の約3倍高いkの発見はTRFデータと一致した。HIV-1血清陰性コントロールにおけるHIV-1感染対象における高めのCD8⁺T細胞代謝回転の報告（Wolthersら、1996, *Science* 274 : 1543 ; Palmerら、1996, *J. Exp. Med.* 185 : 1381）も、増殖中のCD8⁺T細胞がHIV-1により優先的に感染されて破壊されるなら、本明細書において紹介する結果と一致する。

30

40

疑問（8）：我々の発見はHIV-1感染患者の臨床処置と何らかの関連を有するか？

このような動態結果の重要な特徴は各グループにおける特にHAARTに対する動態応答の観点で著しく不均質であった（表4）。多くの要因、例えば疾患の段階、ウィルス複製の抑制、患者の年齢、抗原負担、胸腺機能、及び抗原依存性T細胞再生を支持するリンパ組織の能力がT細胞動態に影響を及ぼすようである。疾患集団内の不均質性は病源的に異なる臨床サブグループを同定する可能性を上昇させる。本発明において試験した一定の個体は臨床サブグループが存在し得、そして同定可能であることを示唆する。以下の2つの症例は短期間HAARTグループに由来する（グループIII、表4）：

患者#4（AIDSを患う年令43才の男性）。血漿ウィルス負荷はHAARTにより157,000から<500に落下したがCD4カウント値においてはわずかな上昇しかなかった（83から135のCD4

50

/ μL)。この対象における絶対増殖速度は全体として19.2細胞 / μL / dの平均と比べ、わずか4.4細胞 / μL / d (1.1×10^9 細胞 / d)であった。このタイプの患者はTリンパ産生系に対する一層進行した損傷を反映し得、そしてアジュバント免疫刺激療法の候補でありうる(例えば、インターロイキン - 2、胸腺組織又は始祖細胞の移植)。

患者 # 6 (AIDSを患う年令48才の男性)。この患者は今まで他のプロテアーゼインヒビターでは不良に終わり(インディナビル、ウィルス負荷 = 28,000)、そして不良となる前にリトナビル/サキナビルに対する一過性応答を有した(ウィルス負荷 = 47,000)。

にもかかわらず、彼はCDカウント値を450細胞 / μL 前後で維持し、そして47.1細胞 / μL / d (12.5×10^9 細胞 / d)の絶対増殖速度を有した。かくして、彼の血液CD4細胞の半減期はわずか6.5日 ($k = 0.105 \text{ d}^{-1}$) であり、循環中のCD4 プールは非常に高いT細胞再生速度により維持された。これらの発見は血漿ウィルス負荷の測定値から明らかでないT細胞再生系の能力を示し、そしてそれは「ウィルス学不全」に直面した抗レトロウィルス療法の有益な作用をも指摘しうる(例えば、おそらくはTリンパ球再生に対する局所作用に対して二次的に、ウィルスの病原性を改変させる)。

動態は抗レトロウィルス療法を開始する時間についての臨床学的に有用な情報も提供する。T細胞動態における改変(「ストレス」)がT細胞プールサイズにおける変化(「ストレイン」)に先行するなら、前者の測定は後者の予防を助長しうる。

まとめると、本発明はヒトにおけるT細胞動態を測定するための方法を提供する。かかる方法により、HIV - 1の免疫病原性についての基本的な問題は解決できる。本明細書に示す結果はHIV - 1疾患の病原における及び抗レトロウィルス療法に対する応答におけるT細胞再生系を焦点とする。これらの結果は直接HIV - 1 - 媒介CD4⁺T細胞殺傷以外のメカニズムが進行したHIV - 1疾患における最大のT細胞代謝回転の原因であり、そしてT細胞代謝回転は後HAART条件において抗原駆動性である。本明細書の開示に基づき当業者に明らかな通り、本発明の方法は他の観点のHIV - 1免疫病原性及びin vivo療法に幅広く適用できる。

以上から、多くの記載の方法は下記の通りに簡潔に表現できるいくつかの一般的特徴を有する：細胞のDNAをラベル化するための安定なアイソトープラベルのin vitro及びin vivo用途。de novoヌクレオチド合成経路を介して細胞のDNAをラベルするための安定なアイソトープラベルのin vitro及びin vivo用途。細胞増殖及び/又は細胞分解速度を測定するためのde novoヌクレオチド合成経路を介する細胞のDNAをラベルするための安定なアイソトープラベルのin vitro及びin vivo用途。de novoヌクレオチド合成系を介して細胞をラベルすることを含む、細胞のDNAをラベルするための安定なアイソトープラベル及び不安定な放射性アイソトープラベルの利用。細胞増殖及び/又は細胞分解速度を測定するためのde novoヌクレオチド合成経路を介する細胞のDNAをラベルするための安定なアイソトープラベル又は放射性アイソトープラベルの利用。細胞増殖を誘導又は阻害するための能力について薬剤をスクリーニングするためのde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAに組込まれた安定なアイソトープラベルの利用。細胞増殖もしくは細胞分解を誘導する又は細胞増殖もしくは細胞分解を変化させる疾患に対する対象の感受性を確認するためのde novoヌクレオチド合成経路を介してDNAに組込まれた安定なアイソトープラベルの利用。

10

20

30

【図 1】

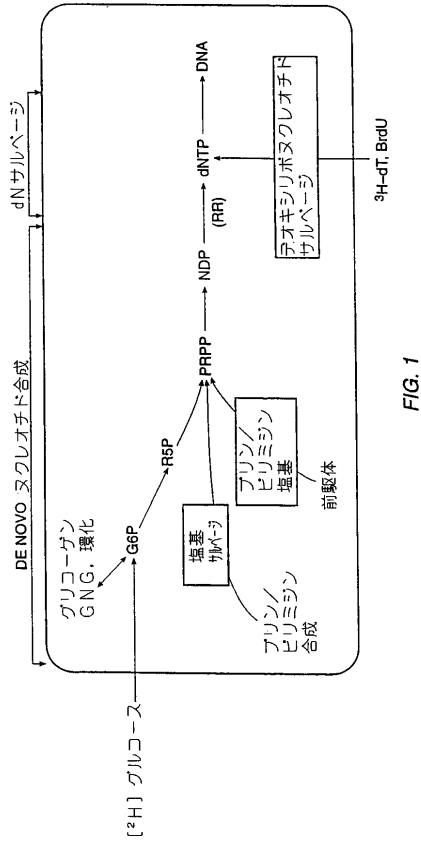


FIG. 1

【図 2】

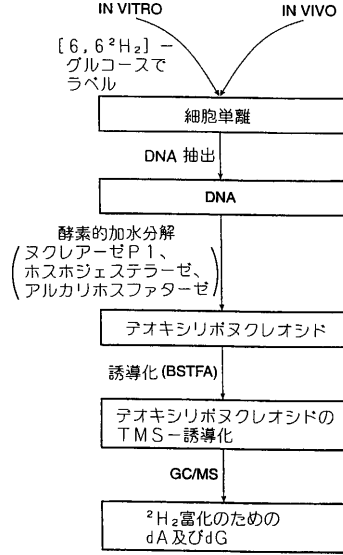
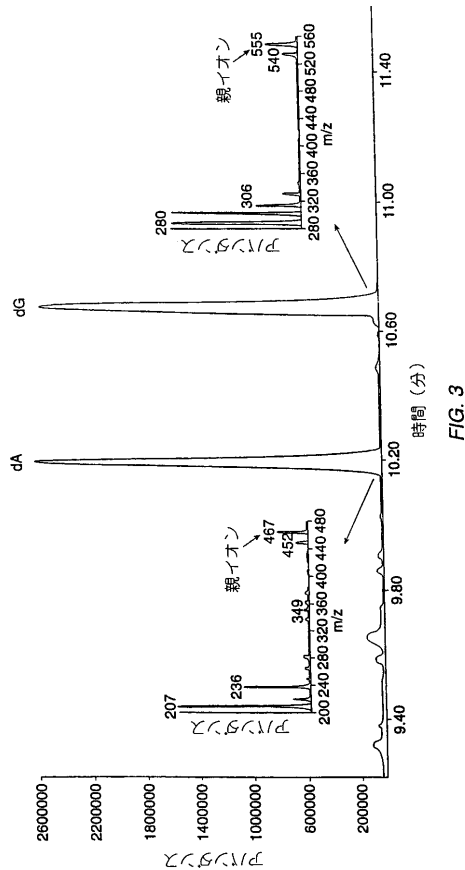
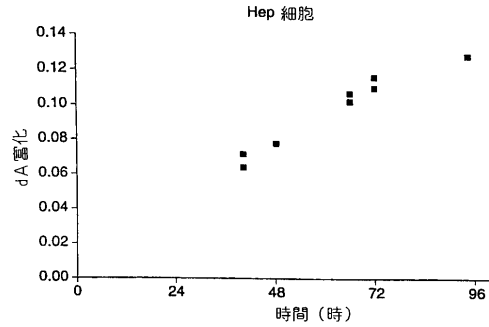


FIG. 2

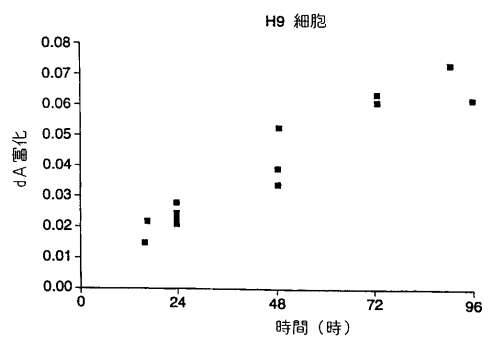
【図 3】



【図 4 A】



【図 4 B】



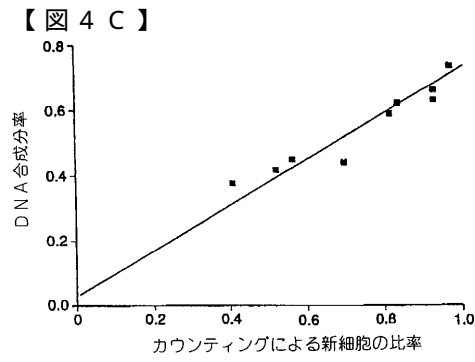


FIG. 4C

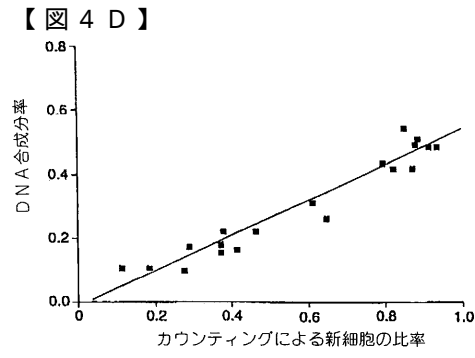


FIG. 4D

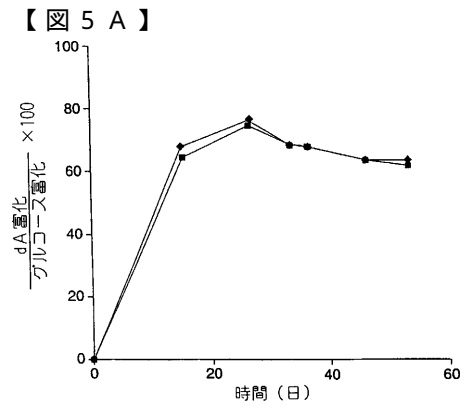


FIG. 5A

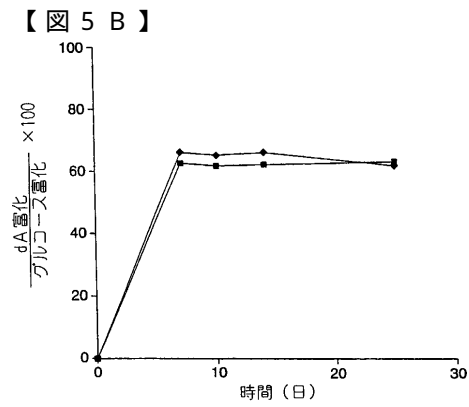


FIG. 5B

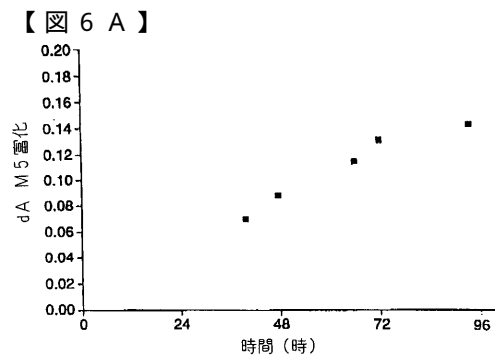


FIG. 6A

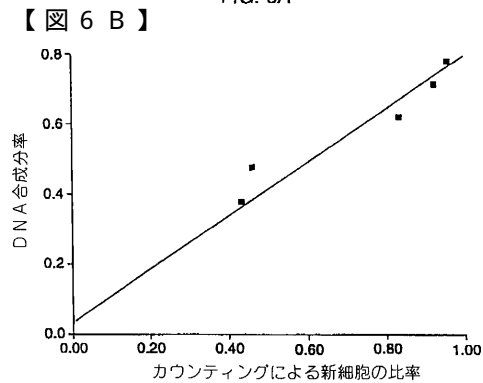


FIG. 6B

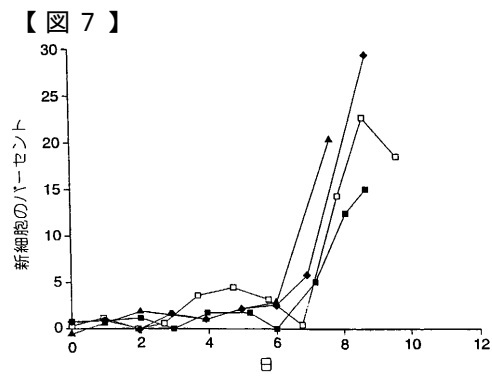


FIG. 7

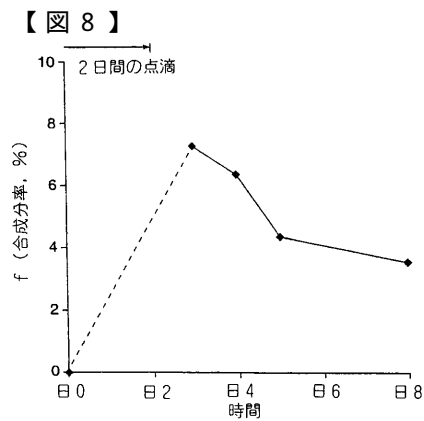


FIG. 8

【図 9 A】

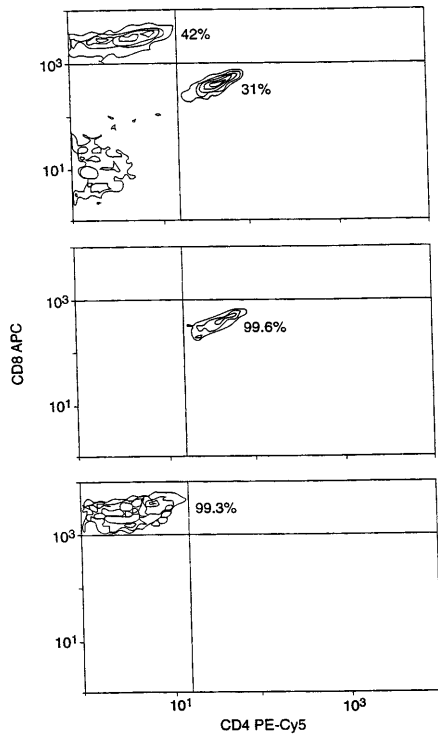


FIG. 9A

【図 9 B】

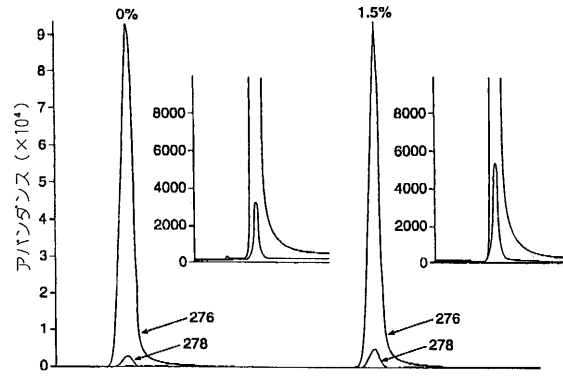


FIG. 9B

【図 9 C】

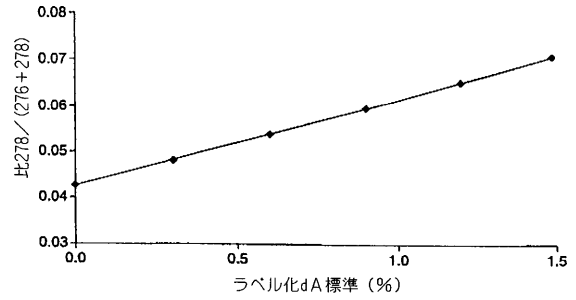


FIG. 9C

【図 10】

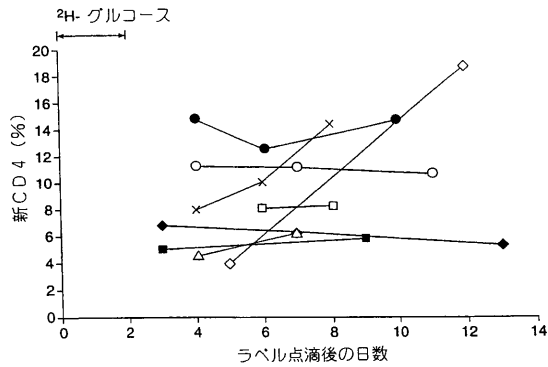


FIG. 10

【図 11 B】

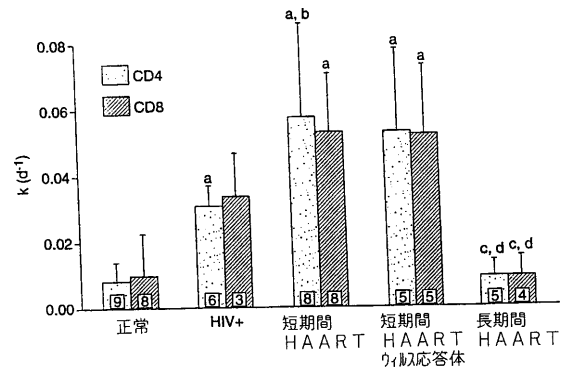


FIG. 11B

【図 11 A】

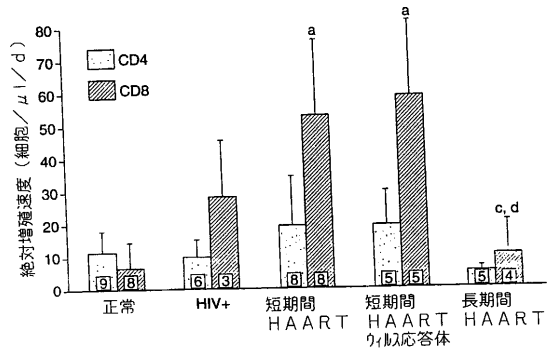


FIG. 11A

【図 12】

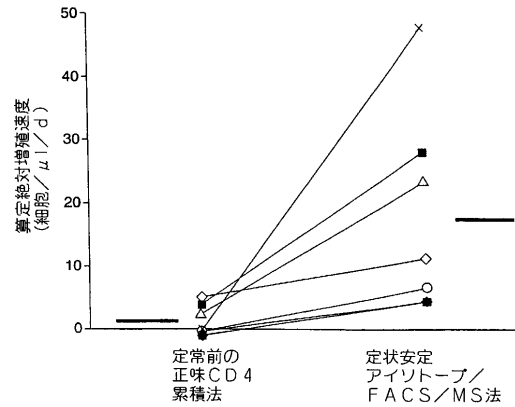


FIG. 12

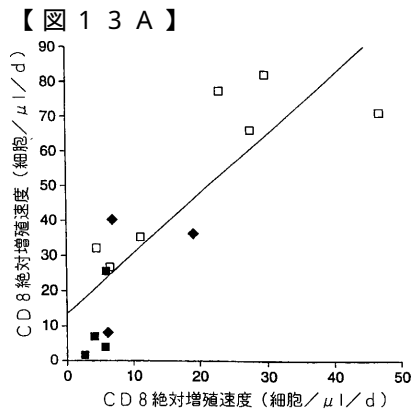


FIG. 13A

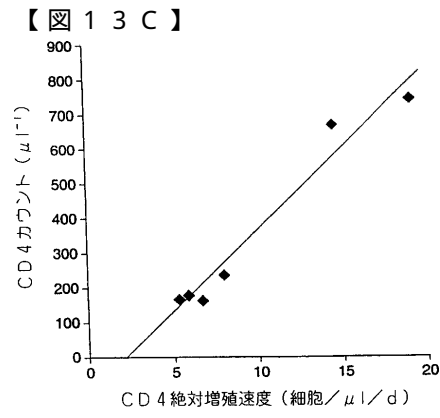


FIG. 13C

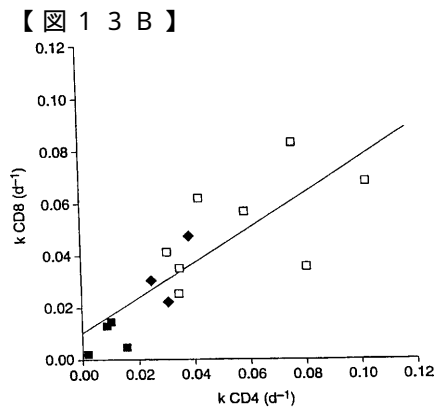


FIG. 13B

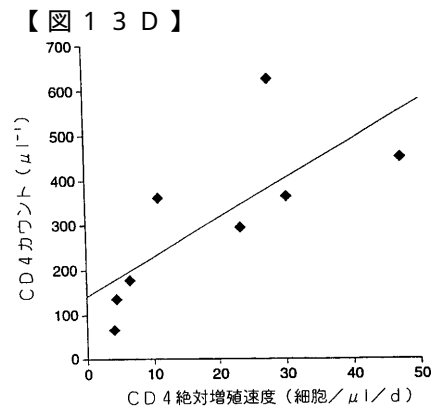


FIG. 13D

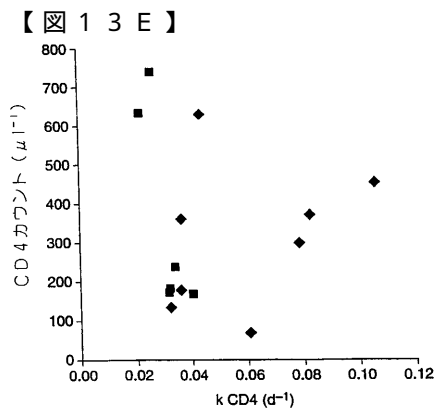


FIG. 13E

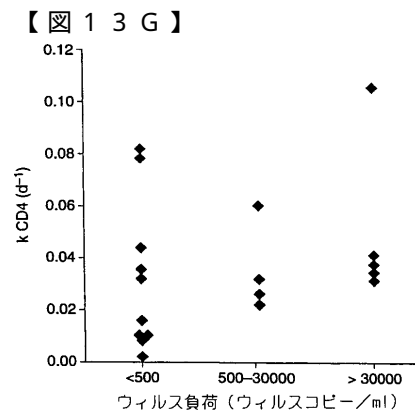


FIG. 13G

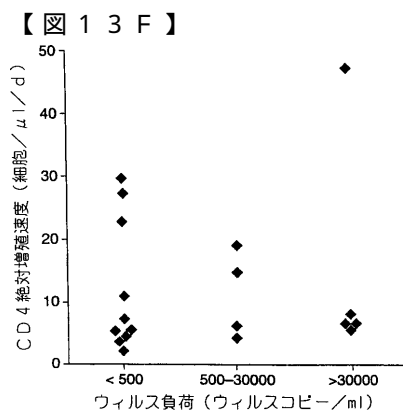
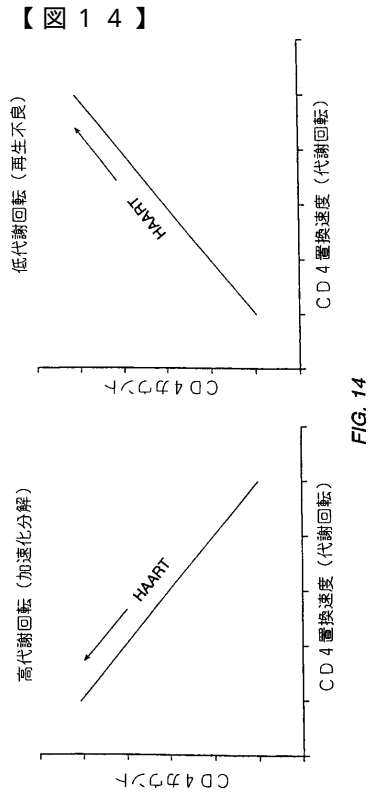


FIG. 13F



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/60 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z
 G 0 1 N 33/60 Z

(74)代理人
 弁理士 西山 雅也

(74)代理人
 弁理士 樋口 外治

(72)発明者 ヘラーステイン, マーク
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 6 1 2 , ケンジントン, アンソン ウェイ 4

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 A. Dunger, Acta histochemica Suppl. Band, 1 9 9 0年, Vol.39, Pages 297-302
 Von Silke Lucke, Acta histochemica, 1 9 8 6年, Vol.79, No.1, Pages 33-41
 M. Toth, Acta biochimica et Biophysica Academiae Scientiarum Hungaricae, 1 9 7 5年, V
 ol.10, No.3, Pages 161-169
 Ma Medina, Biochimie, 1 9 9 0年, Vol.72, Pages 291-293
 Park, Sunny S., Berkeley Sci., 1 9 9 7年, Vol.1, No.2, Pages 41-43
 DEREK C. MACALLAN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 8年 1月, Vol.95, Pages 708-713

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 A61K 51/00
 BIOSIS(STN)
 CAplus(STN)
 EMBASE(STN)
 MEDLINE(STN)
 JSTPlus(JDreamII)
 JMEDPlus(JDreamII)
 JST7580(JDreamII)