

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4464298号
(P4464298)

(45) 発行日 平成22年5月19日(2010.5.19)

(24) 登録日 平成22年2月26日(2010.2.26)

(51) Int.Cl. F1
GO1N 33/493 (2006.01) GO1N 33/493 A

請求項の数 4 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2005-79719 (P2005-79719)	(73) 特許権者	000238201
(22) 出願日	平成17年3月18日 (2005.3.18)		扶桑薬品工業株式会社
(65) 公開番号	特開2006-258734 (P2006-258734A)		大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(43) 公開日	平成18年9月28日 (2006.9.28)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成20年1月25日 (2008.1.25)		弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100106231
			弁理士 矢野 正樹
		(72) 発明者	清水 一広
			奈良県桜井市朝倉台東7丁目596-27
		(72) 発明者	八木 成明
			奈良県大和郡山市小泉町1525-11
		(72) 発明者	丸山 哲潤
			大阪府東大阪市出雲井町4-20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 尿中のN2, N2-ジメチルグアノシン濃度測定による心疾患の診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ほ乳類における心疾患が発症する状態を検出する方法であって、

(a) 対象のほ乳類由来の尿中のN2, N2-ジメチルグアノシンのレベルを測定し;
次いで、

(b) 測定した尿中のN2, N2-ジメチルグアノシンのレベルと所定の基準レベルとを比較することを含み、ここに、測定した尿中のN2, N2-ジメチルグアノシンのレベルが所定の基準レベル以上の場合、対象のほ乳類において、心疾患が発症している状態または一定期間以内に心疾患が発症する状態であると決定されることを特徴とする方法。

【請求項2】

所定の基準レベルが、複数の健常ほ乳類を含む群由来の尿中のN2, N2-ジメチルグアノシンのレベルを測定した結果から得られた群の平均値および標準偏差を基にして、次式:

【数1】

$$\text{基準レベル} = \text{平均値} + \text{標準偏差} \times 1.64$$

を用いて決定された値である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

レベルがクレアチニン尿中濃度を用いて補正した濃度である請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

一定期間が 2 ヶ月である請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ほ乳類における心疾患の早期診断方法に関する。より詳しくは、本発明は、尿中の N₂, N₂ - ジメチルグアノシン濃度を測定することによって、ほ乳類、特に、ヒトにおける心筋梗塞および狭心症のごとき心疾患を発症前に検出する方法に関する。

また、本発明は、ほ乳類において、心疾患が発症していることを確認するための診断方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

心疾患は、日本において、悪性新生物に続き 2 番目に多い死亡原因であり、厚生労働省人口動態統計によれば、虚血性心疾患の割合が年々増加している。虚血性心疾患は、狭心症および心筋梗塞を含む。この疾患は、冠動脈血管中の血流が悪くなることによって心筋に必要な酸素や栄養が供給されず、心臓の働きが低下し、ひいては心筋が壊死する状態をいう。

【0003】

一般に、急性心筋梗塞が発症してから 15 分後には心筋細胞が死に始め、約 6 時間経過すると心筋細胞の約半数が壊死する。また、急性心筋梗塞の死亡率は 20% 程度であるが、死亡例の約 60% が発症後 2 時間以内、約 40% が発症後 1 時間以内に集中している。

20

したがって、心疾患の発症前に、心疾患が発症する状態を検出し、早期に適切な治療を行うことが必要である。

【0004】

狭心症および心筋梗塞のいずれの症状にも動脈硬化が大きく関連している。動脈硬化症は、動脈壁の肥厚、弾力性の低下、内腔の狭窄を呈する動脈疾患で、発症と進展に血清脂質が関与しており、心筋梗塞および狭心症などの冠動脈疾患における器質的狭窄を作る原因とされている。

特に、アテローム性動脈硬化症は、高い血清コレステロール値、低い血清 HDL コレステロール値、高い血清 LDL コレステロールおよび変性 LDL 値の状態によって引き起こされると考えられている。したがって、これらの脂質マーカーが高脂血症、冠動脈疾患の診断に利用されている。

30

【0005】

従来、動脈硬化の診断方法として、超音波検査、核磁気共鳴検査、脈波伝播速度測定（特許文献 1）などの機器を用いた方法、診断マーカーとして血漿中変性 LDL を測定する方法（特許文献 2）があり、心疾患の早期発見の方法（特許文献 3）としてスフィンゴ脂質およびその代謝物の測定がある。

【特許文献 1】特許第 3538409 号明細書

【特許文献 2】特許第 3491748 号明細書

【特許文献 3】特表 2002 - 504999 号公報

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記の従来技術によれば、高価な専用測定機器を新たに必要とし、血清中コレステロール値、変性 LDL 値、スフィンゴ脂質等の従来マーカーを測定する方法では、患者からの採血が必須であり、患者に苦痛を与えている。さらに、測定値が良くない値を示しても、必ずしも心疾患になるとは限らない。

【0007】

そこで、本発明では、高価な専用測定機器（エコー、CT、MRI、PWV 等）を必要とせず、尿中の物質を測定することによって、患者に苦痛を与えることなく、心疾患の発

50

症を早期に検出する方法および心疾患が発症している状態を検出する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意研究を行った結果、動脈硬化症患者および過去に動脈硬化症を罹患した患者のうち、尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシン濃度が高い患者ほど将来心筋梗塞および狭心症などの心疾患になる危険性が有意に高い(片側P<0.05)という知見を得た。

そこで、本発明者らは、患者の尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシン濃度を測定することで、心疾患となる可能性が高い患者を早期に診断する方法を開発した。本発明の方法により早期診断することができる心疾患には、心筋梗塞および狭心症を含む冠動脈疾患などがある。

【0009】

本発明によれば、1または複数の健常ほ乳類由来の尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンレベルおよび、対象のほ乳類由来の尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンレベルを一般的な手法で測定し、健常ほ乳類由来の尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンレベルを基にして決定された基準レベルと、対象のほ乳類由来の尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンレベルとを比較することによって、対象のほ乳類が、将来心疾患を発症する可能性が高い状態にあるかどうかを判断する。

【0010】

すなわち、本発明は、心疾患を発症していないほ乳類における心疾患の早期診断方法であって、

(a) 対象のほ乳類由来の尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンのレベルを測定し

;

(b) 測定した尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンのレベルと所定の基準レベルとを比較し; 次いで、

(c) 測定した尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンのレベルが所定の基準レベル以上の場合、対象のほ乳類において一定期間以内に心疾患が発症する状態であると決定することを特徴とする心疾患の早期診断方法を提供する。

【0011】

本発明において、一定期間以内に心疾患が発症する状態であると決定するための所定の基準レベルが、複数の健常ほ乳類を含む群由来の尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシンレベルを測定した結果から得られた群の平均値および標準偏差を基にして、次式:

【0012】

【数1】

基準レベル = 平均値 + 標準偏差 × 1.64

を用いて決定された値であることを特徴とする。

【0013】

本発明において、レベルが、クレアチニン尿中濃度を用いて補正したN₂,N₂-ジメチルグアノシンの尿中濃度である。

N₂,N₂-ジメチルグアノシンの尿中レベルの表し方は、一定量の尿中に存在するN₂,N₂-ジメチルグアノシン量をクレアチニン量で補正する方法、一定量の尿中に存在するN₂,N₂-ジメチルグアノシン量をナトリウム量で補正する方法、および24時間あたりの総尿量に含まれるN₂,N₂-ジメチルグアノシン量などで表すことができる。

尿中成分は、水分摂取や発汗などから大きく影響を受け、濃縮・希釈されるため、基準となる物質を用いて、目的成分の濃度を補正する必要がある。尿中クレアチニンは、腎臓からの排出過程において、尿細管での再吸収が少なく、比較的少量に存在するため、生理的変動因子の影響を受けず、その尿中の存在量は、他の尿中成分とは異なり、ほぼ一定である。

10

20

30

40

50

そこで、本発明においては、N₂, N₂-ジメチルグアノシンの尿中濃度をクレアチニン尿中濃度で補正した値(クレアチニン補正值)を用いて心疾患の診断を行う。

【0014】

本発明において、N₂, N₂-ジメチルグアノシンの尿中レベルを測定した後、心疾患が発症する状態であると決定することができる一定期間は、好ましくは2ヶ月、より好ましくは6ヶ月、最も好ましくは1年以上である。

本発明の早期診断方法によれば、心疾患が発症する少なくとも2ヶ月前に発症を予測できるので、予防処置を行うことによって、発症自体を回避できる可能性がある。

【0015】

また、本発明は、上記の早期診断方法と同一の手順により、対象のほ乳類において心疾患が発症している状態であると決定することを特徴とする心疾患の診断方法も提供する。

【発明の効果】

【0016】

本発明によって、高価な専用機器を必要とすることなく、一般的な手法でN₂, N₂-ジメチルグアノシンの尿中レベルを測定することにより、心筋梗塞および狭心症などの心疾患を発症していない対象のほ乳類において将来心疾患が発症する可能性を早期診断すること、および前記尿中レベルを追跡調査することによって心疾患患者の予後の推移を予測することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明において、N₂, N₂-ジメチルグアノシンの尿中濃度の測定方法として、従来から知られている方法、すなわち、HPLCによる分析、LC/MS/MSによる分析、比色定量法、RIA法および酵素免疫測定などを用いることができる。

【0018】

本発明において、「ほ乳類」は、好ましくはヒトである。

本発明において、「健常ほ乳類」とは、動脈硬化症および、冠動脈疾患(狭心症および心筋梗塞)等の心疾患のいずれにも罹患したことの無いほ乳類をいい、ほ乳類がヒトである場合、特に、「健常人」という。

本発明において、「対象のほ乳類」とは、本発明の方法を適用しようとするほ乳類をいう。本発明の方法を心疾患の早期診断方法として適用する場合、現在心疾患を発症していないほ乳類が対象であり、本発明の方法を心疾患が発症しているか否かを調べる通常の診断方法として適用する場合、心疾患の発症が不明であるほ乳類、例えば、ヒト以外の動物や、他の疾患と診断されたが心疾患の疑いがある患者などが対象である。また、心疾患の予後を予測するための調査に適用する場合、すでに心疾患が発症したほ乳類を対象とする。

【実施例】

【0019】

実施例1：健常人および心疾患患者におけるN₂, N₂-ジメチルグアノシン尿中濃度の比較

動脈硬化症由来の冠動脈疾患(心筋梗塞)を発症した患者(n=6)、および健常人(n=6)から同意を得て採取した尿200μLをウルトラフリー0.5(UFV5BGC00, Millipore Corporation)を用い、×9000gにて10分間限外濾過し(分子量10000)、その濾液をHPLCで測定した。

【0020】

HPLC条件：HPLCの装置はAlliance2690(Waters Corporation)を用い、カラムはNavic30-5(4.6×250mm、和光純薬工業株式会社)を用いた。カラム温度を40に設定し、移動相A：2mM酢酸アンモニウム(pH6.0)および移動相B：2mM酢酸アンモニウム(pH6.0)/メタノール=60/40を用いるグラジエント分析を行った。試料5μLを注入し、流速1.0mL/分で送液した。試料注入後10分間は移動相Aを流し、10分後から40分後まで1分間に移動相B

10

20

30

40

50

が1%上昇する割合で直線的に濃度勾配をつけて流した。40分後から50分後まで移動相Bが30%の状態を保つ条件で分析し、測定波長260nmにて検出した。

【0021】

HPLCピーク面積からN2,N2-ジメチルグアノシンおよびクレアチニンの含有量を決定し、それらの値から各化合物の尿中濃度を算出した。次いで、N2,N2-ジメチルグアノシン尿中濃度をクレアチニン尿中濃度で除してクレアチニン補正值を得た。

【0022】

健常人および患者の尿から検出されたN2,N2-ジメチルグアノシン尿中濃度およびクレアチニン尿中濃度、ならびにクレアチニン補正值を表1および表2に示す。また、健常人と患者との間でのクレアチニン補正值の比較を図1に示す。

【0023】

【表1】

健常人における尿中濃度

対象	DMG濃度* ¹ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CRT濃度* ² (mg/mL)	CRT補正值* ³ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
N1	4.92	0.880	5.59
N2	4.04	0.670	6.03
N3	3.13	0.616	5.09
N4	6.12	1.316	4.66
N5	8.10	1.752	4.63
N6	5.49	1.648	3.33
平均値			4.89
標準偏差			0.94
基準値* ⁴			6.43

*1: N2,N2-ジメチルグアノシン尿中濃度

*2: クレアチニン尿中濃度

*3: N2,N2-ジメチルグアノシン尿中濃度のクレアチニン補正值

*4: 平均値+標準偏差 $\times 1.64$ (片側 $P < 0.05$)

【0024】

【表2】

心筋梗塞患者における尿中濃度

対象	DMG濃度* ¹ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CRT濃度* ² (mg/mL)	CRT補正值* ³ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
A1	5.57	0.754	7.39
A2	7.45	1.074	6.94
A3	5.27	1.049	5.02
A4	1.85	0.152	12.13
A5	3.07	0.299	10.26
A6	5.35	0.662	8.08

*1: N2,N2-ジメチルグアノシン尿中濃度

*2: クレアチニン尿中濃度

*3: N2,N2-ジメチルグアノシン尿中濃度のクレアチニン補正值

【0025】

図1に示した通り、患者の尿中のN2,N2-ジメチルグアノシン濃度のクレアチニン補正值は健常人のそれよりも有意に高い値を示した。

このことから、心筋梗塞および狭心症などの心疾患患者の尿中N2,N2-ジメチルグアノシン濃度は健常人よりも高いことが確認された。

【0026】

10

20

30

40

50

実施例 2 : 動脈硬化症患者の尿中 N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン濃度測定による心疾患の早期診断

現在心疾患を発症していない動脈硬化症の患者 (n = 6) および健常人 (n = 2 8) から同意を得て採取した尿 2 0 0 μ L をウルトラフリー-0.5 (U F V 5 B G C 0 0 、 Millipore Corporation) を用い、× 9 0 0 0 g にて 1 0 分間限外濾過し (分子量 1 0 0 0 0) 、その濾液を L C / M S / M S で測定した。

【 0 0 2 7 】

L C / M S / M S 条件 : H P L C の装置は A l l i a n c e 2 6 9 5 (Waters Corporation) 、カラムは D e v e l o s i l U G - 5 (2 . 0 × 1 5 0 mm 、 野村化学株式会社) を用いた。カラムを温度 4 0 に設定し、移動相 : 0 . 1 % 酢酸 / メタノール = 9 / 1 を用いて分析を行った。試料 5 μ L を注入し、流速 0 . 2 mL / 分で送液した。

10

M S に用いる装置は T S Q Q U A N T U M (サーマエレクトロン株式会社) を用い、モニターイオンを、プリカーサーイオン (m / z 3 1 2 . 1 7) およびプロダクトイオン (m / z 1 8 0 . 1 7) と設定した。

【 0 0 2 8 】

H P L C ピーク面積から N 2 , N 2 - ジメチルグアノシンおよびクレアチニンの含有量を決定し、それらの値から各化合物の尿中濃度を算出した。次いで、N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン尿中濃度をクレアチニン尿中濃度で除してクレアチニン補正值を得た。

【 0 0 2 9 】

健常人および患者の尿から検出された N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン尿中濃度のクレアチニン補正值を表 3 および表 4 に示す。また、健常人と患者との間でのクレアチニン補正值の比較を図 2 に示す。

20

【 0 0 3 0 】

同じ動脈硬化症患者について測定日より 2 ヶ月以内の心筋梗塞または狭心症の発症状況を追跡調査した。調査結果を表 4 に示す。クレアチニン補正值が診断の基準ライン (健常人の平均値 + 標準偏差 × 1 . 6 4 : 片側 P < 0 . 0 5 の値) より低い患者 (B 8) は心筋梗塞も狭心症も発症しなかった。一方、N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン補正值が診断の基準ラインより高い患者は、高頻度 (7 例中 7 例) で心筋梗塞または狭心症を発症していた。

【 0 0 3 1 】

30

【表 3】

健常人における尿中濃度			
対象	CRT補正值* ¹ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	対象	CRT補正值* ¹ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
N 1	4. 5 1	N 1 5	4. 5 6
N 2	3. 6 1	N 1 6	4. 5 4
N 3	4. 9 4	N 1 7	4. 4 0
N 4	3. 7 9	N 1 8	4. 9 2
N 5	2. 7 2	N 1 9	4. 0 3
N 6	3. 9 8	N 2 0	4. 0 7
N 7	4. 4 1	N 2 1	3. 3 2
N 8	3. 4 0	N 2 2	2. 3 7
N 9	4. 2 2	N 2 3	3. 0 0
N 1 0	4. 8 0	N 2 4	2. 9 4
N 1 1	3. 7 2	N 2 5	3. 0 6
N 1 2	4. 8 1	N 2 6	3. 0 1
N 1 3	4. 8 6	N 2 7	3. 3 6
N 1 4	4. 4 6	N 2 8	3. 3 2
平均値			3. 9 0
標準偏差			0. 7 4
基準値* ²			5. 1 0

10

20

* 1 : N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン尿中濃度の
クレアチニン補正值

* 2 : 平均値 + 標準偏差 \times 1. 6 4 (片側 $P < 0. 0 5$)

【 0 0 3 2 】

【表 4】

動脈硬化症患者における尿中濃度		
対象	CRT補正值* ¹ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	心疾患発症状況* ² +または-
B 1	8. 4 1	+
B 2	7. 2 6	+
B 3	7. 3 9	+
B 4	6. 9 4	+
B 5	1 2. 1 3	+
B 6	1 0. 2 6	+
B 7	8. 0 8	+
B 8	3. 7 6	-

30

* 1 : N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン尿中濃度の
クレアチニン補正值

* 2 : + : 心疾患発症あり。 - : 心疾患発症なし。

40

【 0 0 3 3 】

このことから、N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン尿中濃度のクレアチニン補正值が高い動脈硬化症患者は、心筋梗塞および狭心症を発症する可能性が極めて高いことが分かった。

現実の臨床現場において、心疾患発症前の診断で、心疾患発症を50%的中させれば、優れた診断マーカーであるとされている。かくして、本発明の方法は優れた心疾患検出方法であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 3 4 】

50

本発明によって、狭心症や心筋梗塞等の心疾患を発症する状態にあるかどうかを心疾患発症前に簡便にかつ高い的中率で早期発見することが可能となった。

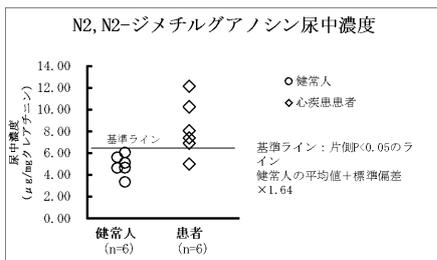
【図面の簡単な説明】

【0035】

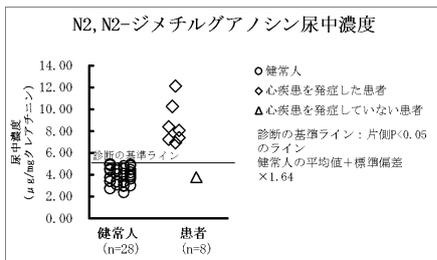
【図1】 健常人および心疾患患者における尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシン濃度の比較を示すグラフ。

【図2】 動脈硬化症患者における尿中のN₂,N₂-ジメチルグアノシン濃度と心疾患発症との相関を説明するグラフ。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

- (72)発明者 岩本 学
奈良県大和高田市田井123-6
- (72)発明者 松澤 秀俊
大阪府高槻市津之江北町2-26
- (72)発明者 荒木 宏昌
奈良県大和郡山市藤原町1-12

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特表2004-504605(JP,A)
国際公開第03/087819(WO,A1)
特開2002-014104(JP,A)
特開平03-010159(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-98