



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109953744 A

(43)申请公布日 2019.07.02

(21)申请号 201811528661.6

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.12.14

(30)优先权数据

2017-247153 2017.12.25 JP

(71)申请人 国立大学法人名古屋大学

地址 日本爱知县

申请人 希森美康株式会社

(72)发明人 菊地良介 原田一宏 柴田阳平

石井秀树 室原丰明

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51)Int.Cl.

A61B 5/00(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

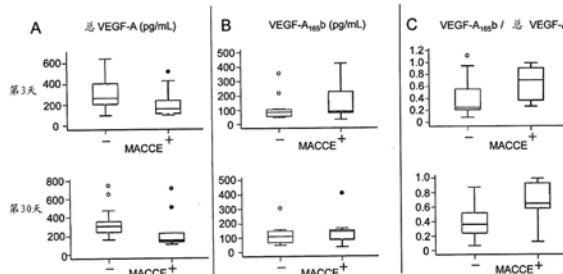
权利要求书2页 说明书18页 附图10页

(54)发明名称

用于取得关于VEGF-A的值的方法及装置

(57)摘要

本发明涉及使用受试体血中的关于VEGF-A的测定值进行心脏疾病的重症度及预后预测的方法、装置及计算机程序。本发明以提供成为心肌梗塞的预后或冠状动脉疾病的重症度的指标的血液标志物作为一课题。本发明提供含取得关于受试体的VEGF-A的值的方法。上述值是通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值或者血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A_{165b}的测定值而得到的值(VEGF-A_{165b}/总VEGF-A),上述值提示上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。



1. 含取得关于受试体的VEGF-A的值得方法,其中

上述值是通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值或者血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A_{165b}的测定值得到的值(VEGF-A_{165b}/总VEGF-A),

上述值提示上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。

2. 权利要求1所述的方法,其中上述受试体是心肌梗塞发病后的受试体,

在上述值是总VEGF-A测定值时,在上述总VEGF-A测定值比对应的基准值低时提示上述受试体的心肌梗塞的预后不良,和/或上述受试体是心肌梗塞发病后的受试体,

在上述值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,在上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值高时提示上述受试体的心肌梗塞的预后不良。

3. 权利要求1所述的方法,其中在上述值是总VEGF-A测定值时,上述基准值是基于心肌梗塞发病后的受试体且预后良好的组的血液试样中的总VEGF-A测定值得算出的值。

4. 权利要求1所述的方法,其中在上述值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,上述基准值是基于心肌梗塞发病后的受试体且预后良好的组的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A而算出的值。

5. 权利要求1所述的方法,其中

在上述值是总VEGF-A测定值时,在上述总VEGF-A测定值比对应的基准值高时提示上述受试体的心肌梗塞的预后良好,

在上述值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,在上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值低时提示上述受试体的心肌梗塞的预后良好。

6. 权利要求1所述的方法,其中上述预后的不良是指发生主要有害心脑血管事件的风险高。

7. 权利要求6所述的方法,其中上述主要有害心脑血管事件含选自心血管死、非致死性心肌梗塞的再发、冠状动脉血行再建术的再应用、及脑梗塞的一种或多种事件。

8. 权利要求1所述的方法,其中

在上述值是总VEGF-A测定值时,在上述总VEGF-A测定值比对应的基准值高时提示上述受试体属于冠状动脉疾病重症组,

在上述值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,在上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值低时提示上述受试体属于冠状动脉疾病重症组。

9. 权利要求7所述的方法,其中冠状动脉疾病重症组是SYNTAX评分比22大的受试体的组。

10. 权利要求1所述的方法,其中

在上述值是总VEGF-A测定值时,在上述总VEGF-A测定值比对应的基准值低时提示上述受试体属于冠状动脉疾病非重症组,

在上述值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,在上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值高时提示上述受试体属于冠状动脉疾病非重症组。

11. 权利要求1所述的方法,其中在上述值是总VEGF-A测定值时,上述基准值是基于冠状动脉疾病重症组的血液试样中的总VEGF-A测定值得算出的值。

12. 权利要求1所述的方法,其中在上述值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,上述基准值是基于冠状动脉疾病重症组的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A而算出的值。

13. 权利要求10所述的方法,其中冠状动脉疾病非重症组是SYNTAX评分在22以下的受

试体的组。

14. 取得关于受试体的VEGF-A的值的装置,其中

上述装置具备处理部,

上述处理部以通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值或者血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A_{165b}的测定值而得到的值 (VEGF-A_{165b}/总VEGF-A) 作为上述值取得,

上述值提示上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。

15. 使计算机执行用于取得关于受试体的VEGF-A的值的步骤的计算机程序,其中

上述值是通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值或者血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A_{165b}的测定值而得到的值 (VEGF-A_{165b}/总VEGF-A),

上述值提示上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。

16. 用于实施权利要求1所述的方法的为了提示心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度而使用的检查试剂,其含抗总VEGF-A抗体。

17. 用于实施权利要求1所述的方法的为了提示心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度而使用的检查试剂,其含抗VEGF-A_{165b}抗体。

18. 为了提示心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度而使用的试剂盒,其含:

权利要求16所述的检查试剂、和/或

权利要求17所述的检查试剂。

用于取得关于VEGF-A的值得方法及装置

【技术领域】

[0001] 本申请公开了用于取得受试体的关于VEGF-A的值得方法、装置及计算机程序。

【背景技术】

[0002] 心脏疾病是起因于心脏不全的疾病的总称,是作为主要的死因之一的重度的疾病组。

[0003] 在非专利文献1中,在ST升高型的急性心肌梗塞患者中测定VEGF-A165b而探讨利用核磁共振图像法(magnetic resonance imaging, MRI)的心肌梗塞的尺寸,在发病后24小时的时间点,在VEGF-A165b升高的患者中,显示梗塞范围宽,左心室射血分数降低。

[0004] 【现有技术文献】

[0005] 【非专利文献】

[0006] 【非专利文献1】Scientific Reports 7, Article number: 9962 (2017) doi: 10.1038/s41598-017-10505-9

[0007] 【发明的概要】

[0008] 【发明要解决的课题】

[0009] 心肌梗塞因治疗的提升而死亡率而有降低的倾向,但依然是预后不良的心脏疾病之一。

[0010] 另外,在给心脏提供营养的冠状动脉中的血管内腔的狭窄或闭塞是心肌梗塞的大的要因之一。作为从冠状动脉内的病变的解剖学特征算出冠状动脉疾病的复杂性的指标,已知SYNTAX (SYnergy between PCI with TAXUS™ and Cardiac Surgery) 评分。SYNTAX评分由于使用血管造影图像而进行评分,从而有施用血管造影剂,对于各患者而进行血管造影的必要。因此,由SYNTAX评分的冠状动脉疾病的重症度的评价非常地烦琐,对于患者的侵袭度也高。

[0011] 本发明以提供成为心肌梗塞的预后或冠状动脉疾病的重症度的指标的血液标志物作为一课题。

[0012] 【用于解决课题的手段】

[0013] 用于解决上述课题的第1实施方式涉及含取得受试体的关于VEGF-A的值得方法。上述值含血液试样中的总VEGF-A的测定值、或者通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A165b的测定值得到的值(VEGF-A165b/总VEGF-A)。

[0014] 用于解决上述课题的第2实施方式涉及取得受试体的关于VEGF-A的值得装置(10)。装置(10)具备处理部(101)。处理部(101)以血液试样中的总VEGF-A的测定值、或者通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A165b的测定值得到的值(VEGF-A165b/总VEGF-A)作为上述值得。

[0015] 用于解决上述课题的第3实施方式涉及使计算机执行用于取得关于受试体的VEGF-A的值得步骤的计算机程序。上述值是血液试样中的总VEGF-A的测定值、或通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A165b的测定值得到的值(VEGF-

A_{165b}/总VEGF-A)。

[0016] 在第1至第3实施方式中,上述值可提示上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。

[0017] 【发明的效果】

[0018] 根据本发明,可提供成为心肌梗塞的预后或冠状动脉疾病的重症度的指标的血液标志物。

[0019] 【附图的简单的说明】

[0020] 【图1】是显示装置的概略的图。

[0021] 【图2】是显示装置的硬件的概略的图。

[0022] 【图3】是显示装置的动作的流程图。

[0023] 【图4】是显示装置的动作的流程图。

[0024] 【图5】是显示装置的动作的流程图。

[0025] 【图6】是显示装置的动作的流程图。

[0026] 【图7】是显示装置的动作的流程图。

[0027] 【图8】是显示检查试剂的概略的图。

[0028] 【图9】是显示试剂盒的概略的图。

[0029] 【图10】A显示心肌梗塞发病后第3天、及第30天的总VEGF-A的测定值的箱形图。B显示心肌梗塞发病后第3天、及第30天的VEGF-A_{165b}的测定值的箱形图。C显示心肌梗塞发病后第3天、及第30天的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A的箱形图。+表示确认MACCE的组,-表示未确认MACCE的组。

[0030] 【图11】A显示在心肌梗塞发病后第30天的总VEGF-A的测定值比基准值低的组(低:实线)和高的组(高:虚线)中的MACCE的累积发生率。B显示在心肌梗塞发病后第30天的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比基准值低的组(低:虚线)和高的组(高:实线)中的MACCE的累积发生率。

[0031] 【图12】A显示对照组、SYNTAX评分在22以下的组(低SS)、及SYNTAX评分比22大的组(高SS)的总VEGF-A的测定值的箱形图。B显示对照组、SYNTAX评分在22以下的组(低SS)、及SYNTAX评分比22大的组(高SS)的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A的箱形图。

【具体实施方式】

[0032] [1.方法]

[0033] 方法含取得受试体的关于VEGF-A的值。关于VEGF-A的值含血液试样中的总VEGF-A的测定值、和/或通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A_{165b}的测定值而得到的值(VEGF-A_{165b}/总VEGF-A)。上述方法也可包括取得上述受试体的血液试样中的总VEGF-A的测定值、和/或VEGF-A_{165b}的测定值(以下,也称为“关于VEGF-A的测定值”)的工序。总VEGF-A的测定值、及VEGF-A_{165b}/总VEGF-A的取得可为同时,也可有时间差。总VEGF-A的测定值、及VEGF-A_{165b}的测定值的取得可为同时,也可有时间差。在上述方法中,上述值提示上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。优选为,在上述提示中,含预测上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度,辅助预测上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度,或者确定

上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。

[0034] 上述方法也可含得到关于VEGF-A的各值和对应的基准值的比较结果。上述提示也可基于上述比较结果而进行。

[0035] 上述方法可由人实施,也可由后述的装置10实现。

[0036] [1-1.关于VEGF-A的测定值的取得方法]

[0037] 上述受试体只要是有由上述方法提示心肌梗塞的预后或冠状动脉疾病的重症度的必要的个体,就不特别限制。在上述个体中,含人及人以外的哺乳动物。作为上述哺乳动物,可举出例如牛、马、绵羊、山羊、猪、狗、猫、兔、猴等。作为上述个体,优选为人。不问上述个体的年龄、性别。作为上述个体,优选是活的个体。作为受试体,缺血性心脏疾病或冠状动脉疾病虽也可为非疑的个体,但优选为疑似缺血性心脏疾病或冠状动脉疾病的个体、或患缺血性心脏疾病或冠状动脉疾病的个体。成为提示心肌梗塞的预后的对象的受试体优选为心肌梗塞发病后的个体。疑似冠状动脉疾病是指有选自胸部症状(胸痛、或者胸部压迫感等)、背部痛、上腹部痛、肩的疼痛,呼吸困难,及冷或汗等的至少一种自觉症状的情况,在运动装载试验中在心电图或自觉症状确认到异常的情况,和/或由心肌闪烁显像确认异常的情况等。

[0038] 上述缺血性疾病只要是伴随循环障碍而在心肌组织中发生的病变,就不限制。例如,含心绞痛、及心肌梗塞。优选为心肌梗塞。心肌梗塞的定义根据The third universal definition of myocardial infarction(Circulation 2012;126:2020-2035)。心肌梗塞的预后可以例如发生主要有害心脑血管事件(major adverse cardiac and cerebrovascular events:MACCE)与否进行评价。主要有害心脑血管事件可举例如从心肌梗塞发病远隔期的总死亡、心肌梗塞的再发、脑血管障碍、冠状动脉的血行再建术的再应用等。优选为,主要有害心脑血管事件含选自心血管死、非致死性心肌梗塞的再发、冠状动脉血行再建术的再应用、及脑梗塞的一种或多种事件。

[0039] 上述冠状动脉疾病只要是给心脏提供营养的冠状动脉系血管中发生的病变,就不限制。优选为,上述冠状动脉疾病伴随血管内腔的狭窄和/或闭塞。上述冠状动脉疾病的定义及复杂性的评价根据Sianos,et al.(Journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology 2005;1:219-227)。例如,可根据Sianos等人,由通过将冠状动脉疾病的复杂性由血管造影图像进行评分而得到的SYNTAX(SYnergy between PCI with TAXUS™ and Cardiac Surgery)评分评价冠状动脉疾病的重症度。例如,在受试体的SYNTAX评分比22大时,可评价为该受试体所患有的冠状动脉疾病是重症。另外,在受试体的SYNTAX评分是22以下时,可评价为该受试体所患有的冠状动脉疾病不是重症(非重症)。优选为,在受试体的SYNTAX评分在22以下,并且比0大时,可评价为该受试体所患有的冠状动脉疾病不是重症(非重症)。在受试体的SYNTAX评分比33大时,也可评价为该受试体所患有的冠状动脉疾病的重症度是高度。在受试体的SYNTAX评分是33以下,比22大时,也可评价为该受试体所患有的冠状动脉疾病的重症度是中度。冠状动脉疾病在血管造影检查中确认到冠状动脉内腔75%以上(在左冠状动脉主干部中是50%以上)的狭窄、和/或闭塞时,判断为显著狭窄。从而,也可以无显著狭窄的个体作为冠状动脉疾病的阴性对照组。也可将上述阴性对照组定义为SYNTAX评分是0的组。

[0040] 从上述受试体除去被预测为因心脏和/或脑的缺血性疾病、及冠状动脉疾病以外的原因而总VEGF-A的测定值、和/或VEGF-A_{165b}的测定值改变的个体。优选为除去受(或者受)血液透析的个体、前年有需要外科的治疗或化学疗法的恶性肿瘤的个体、有恶性肿瘤的个体、及有胶原病等的自身免疫疾病的个体等。

[0041] 上述总VEGF-A及VEGF-A_{165b}以存在于血液中(优选为循环血液中)的作为测定对象,优选为以存在于血浆中或血清中的作为测定对象。将自个体采集的全血、及从自个体采集的全血分离的血浆、或者血清称为血液试样。在采集血浆时使用的抗凝固剂优选使用肝素或其盐以外的。另外,在导管检查时采集血液试样时,优选在向个体施用肝素前进行。测定中使用的受试体的血液试样和确定指定的基准值的血液试样可为同种,也可为异种,优选为同种。另外,在作为血液试样使用血浆时,用于确定指定的基准值血浆优选由使用与受试体的血浆相同的抗凝固剂采血的血液调制。再者,血液试样可为新鲜的,也可为保存的。在保存血液试样时,可在室温环境、冷藏环境或冷冻环境中保存,优选为冷冻保存。作为血液试样,优选是血清。

[0042] VEGF-A是指血管内皮生长因子A,人的VEGF-A,例如,来源于以Gene ID:7422登录在National Center for Biotechnology Information的基因的产物。总VEGF-A是指含从VEGF-A基因经转录翻译的全部变体。VEGF-A_{165b}是从VEGF-A基因转录及翻译的变体之一,例如在Cancer research 2002;62:4123-4131中报告。VEGF-A_{165b}也称为VEGF_{165b}。

[0043] “测定值”是指反映总VEGF-A或VEGF-A_{165b}蛋白质(以下,称为目标蛋白质)的量或浓度的值。在将所述测定值用“量”标记时,可为摩尔,也可为质量,优选用质量标记。另外,在将值用“浓度”表述时,可为摩尔浓度,也可为相对于一定容量的血液试样的质量的比例(质量/容量),优选为质量/容量。作为反映量或浓度的值,除了上述之外,也可为荧光或发光等的信号的强度。

[0044] “对应的基准值”是指对应于各关于VEGF-A的值而确定的基准值。基准值优选预先确定。为了进行心肌梗塞的预后的提示而使用的基准值优选从自心肌梗塞发病后的受试体且预后良好的组采集的血液试样的关于VEGF-A的值确定。再优选为,从自心肌梗塞发病后的受试体且预后良好的组采集的血液试样中的关于VEGF-A的值和自是心肌梗塞发病后的受试体且预后不良的组采集的血液试样中的关于VEGF-A的值确定。为了进行冠状动脉疾病的重症度的提示而使用的基准值优选从自冠状动脉疾病重症组采集的血液试样中的关于VEGF-A的值确定。再优选为,从自冠状动脉疾病非重症组采集的血液试样中的关于VEGF-A的值和从冠状动脉疾病重症组采集的血液试样中的关于VEGF-A的值确定。

[0045] 例如,取得从心肌梗塞发病后的1或多个受试体且预后不良的组采集的关于VEGF-A的值(阳性对照值)和从心肌梗塞发病后的1或多个受试体且预后良好的组采集的血液试样中的关于VEGF-A的值(阴性对照值)。或者,取得从冠状动脉疾病重症组采集的关于VEGF-A的值(阳性对照值)和从冠状动脉疾病非重症组采集的关于VEGF-A的值(阴性对照值)。可以可基于这些多个值而最高精度地分类阳性对照值和对应的阴性对照值的值作为“基准值”。其中,“可最高精度地分类的值”可根据检查的目的,基于灵敏度、特异性、阳性的中率、阴性的中率等的指标而适宜设定。再者,也可由ROC曲线(Receiver Operatorating Characteristic curve、接收者动作特性曲线)、判别分析法、模式法、Kittler法、3 σ 法、p-tile法等确定基准值。

[0046] 取得上述关于VEGF-A的测定值的方法不限制。例如,为了取得目标蛋白质的测定值,可使用能与目标蛋白质特异性地结合的抗体、即抗目标蛋白质抗体。作为使用抗目标蛋白质抗体的目标蛋白质的测定值的取得方法,可举酶联免疫吸附测定法(ELISA)法或,蛋白印记法。

[0047] 对于使用抗目标蛋白质抗体的目标蛋白质的测定值的取得而举例说明ELISA法。

[0048] 首先,将用于捕获目标蛋白质的抗目标蛋白质抗体(捕获用抗目标蛋白质抗体)和血液试样混合。将血液试样和捕获用抗目标蛋白质抗体混合的顺序不特别限定,可将这些基本上同时混合,也可依次混合。

[0049] 具体而言,可首先使捕获用抗目标蛋白质抗体和血液试样中的目标蛋白质的复合物形成后将上述复合物固定化于固相上,或者预先将捕获用抗目标蛋白质抗体固定化于固相上,使固定化的捕获用抗目标蛋白质抗体和血液试样中的目标蛋白质的复合物形成。更优选为,首先使上述复合物形成后将上述复合物固定化于固相上的实施方式。进而,通过将固定化于固相上的上述复合物或形成在固相上的复合物用上述技术中公知的方法检测,可取得血液试样中所含的目标蛋白质的测定值。

[0050] 在首先使捕获用抗目标蛋白质抗体和血液试样中的目标蛋白质的复合物形成后将上述复合物固定化于固相上时,使经生物素等修饰的捕获用抗目标蛋白质抗体与血液试样中的目标蛋白质接触而使复合物形成。通过另行使固相预先结合亲和素或链霉亲和素(以下,也称为“亲和素类”),可经生物素和亲和素类的结合而将上述复合物固定化于固相。

[0051] 另外,在预先将捕获用抗目标蛋白质抗体固定于固相时,向固相固定捕获用抗目标蛋白质抗体的实施方式不特别限定。例如,可使捕获用抗目标蛋白质抗体和固相直接键合,也可使捕获用抗目标蛋白质抗体和固相之间经别的物质而间接结合。作为直接的结合,可举出例如物理吸附等。作为间接的结合,例如,可举出经与亲和素类的组合的结合。此时,通过将捕获用抗目标蛋白质抗体预先用生物素修饰,使固相预先结合亲和素类,可经生物素和亲和素类的结合而使捕获用抗目标蛋白质抗体和固相间接结合。在本实施方式中,捕获用抗目标蛋白质抗体和固相的结合优选为经生物素和亲和素类的间接的结合。

[0052] 固相的原料不特别限定,例如,可从有机高分子化合物、无机化合物、生物体高分子等选择。作为有机高分子化合物,可举出乳胶、聚苯乙烯、聚丙烯等。作为无机化合物,可举出磁性体(氧化铁、氧化铬及铁素体等)、氧化硅、氧化铝、玻璃等。作为生物体高分子,可举出不溶性琼脂糖、不溶性葡聚糖、明胶、纤维素等。也可组合使用这些中的2种以上。固相的形状不特别限定,例如,可举出粒子、膜、微平板、微管、试管等。在它们之中也优选粒子,特别优选磁性粒子。

[0053] 也可在复合物的形成后,优选为复合物形成后且标记物质的检测前,进行除去不形成复合物的未反应的游离成分的结合/游离(Bound/Free,B/F)分离。未反应的游离成分是指不构成复合物的成分。例如,可举出不与目标蛋白质结合的抗目标蛋白质抗体等。B/F分离的手段不特别限定,如果固相是粒子,可通过由离心分离仅回收捕获复合物的固相进行B/F分离。如果固相是微平板或微管等的容器,可通过除去含未反应的游离成分的液而进行B/F分离。另外,在固相是磁性粒子时,可通过在用磁铁磁约束磁性粒子的状态下由管嘴吸除含未反应的游离成分的液而进行B/F分离。上述方法在自动化的观点上优选。也可在除去未反应的游离成分之后,将捕获复合物的固相用磷酸缓冲生理盐水(PBS)等的适合的水

性介质清洗。

[0054] 上述复合物的检测可使用被标记物质标记的抗目标蛋白质抗体而进行,或使用未标记的抗目标蛋白质抗体和被可与上述未标记的抗目标蛋白质抗体结合的标记物质标记的抗免疫球蛋白抗体等而进行,优选使用被标记的抗目标蛋白质抗体。另外,被标记的抗目标蛋白质抗体的目标蛋白质上的表位和与固相结合抗目标蛋白质抗体的目标蛋白质上的表位优选不同。

[0055] 在标记抗目标蛋白质抗体或标记抗免疫球蛋白抗体中使用的标记物质只要是发生能检测的信号,就不特别限定。例如,可为其本身发生信号的物质(以下,也称为“信号发生物质”),也可为催化其他物质的反应而使信号发生的物质。作为信号发生物质,例如,可举出荧光物质、放射性同位素等。作为催化其他物质的反应而使发生能检测的信号的物质,例如,可举出酶。作为酶,可举出碱性磷酸酶(ALP)、过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶等。作为荧光物质,可举出异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明、Alexa Fluor(注册商标)等的荧光染料、增强的绿色荧光蛋白(EGFP)等的荧光蛋白质等。作为放射性同位素,可举出 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等。在它们之中,作为标记物质,也优选酶,特别优选ALP。

[0056] 标记抗目标蛋白质抗体由免疫测定技术领域中公知的标记方法,将抗目标蛋白质抗体用上述的标记物质标记而得到。另外,也可使用市售的标记试剂盒等而进行标记。另外,标记免疫球蛋白抗体可使用与抗目标蛋白质抗体的标记相同的方法,也可使用市售。

[0057] 通过检测由复合物中所含的标记抗目标蛋白质抗体的标记物质发生的信号来取得,可血液试样中所含的目标蛋白质的测定值。其中,“检测信号”含定性检测信号的有无,对信号强度进行定量、及半定量检测信号的强度。半定量的检测是指将信号的强度以如“信号不发生”、“弱”、“中”、“强”等一样阶段性地表示。

[0058] 检测信号的方法本身是在免疫测定技术领域中公知的。在本实施方式中,适宜选择对应于来源于上述的标记物质的信号的种类的测定方法即可。

[0059] 例如,在标记物质是酶时,可通过将通过使对于该酶的底物反应而发生的光、色等的信号使用光度计、分光光度计等的公知的装置而进行测定来进行。

[0060] 酶的底物可对应于该酶的种类而从公知的底物适宜选择。例如,在作为酶而使用ALP时,作为底物,可举出CDP-Star(注册商标)(4-氯-3-(甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2']-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基)苯基磷酸2钠)、CSPD(注册商标)(3-(4-甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2']-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基)苯基磷酸2钠)等的化学发光底物、5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸(BCIP)、5-溴-6-氯-吡啶基磷酸2钠、p-硝基苯基磷酸等的显色底物。特别优选为,CDP-Star(注册商标)。上述基质的发光优选使用光度计检测。

[0061] 在标记物质是放射性同位素时,可将作为信号的放射线使用闪烁计数器等公知的装置而进行测定。另外,在标记物质是荧光物质时,可将作为信号的荧光使用荧光酶标仪等的公知的装置而进行测定。再者,激发波长及荧光波长可对应于使用的荧光物质的种类而适宜确定。

[0062] 信号的检测结果可作为目标蛋白质的测定值使用。例如,在定量检测信号的强度时,可以信号强度的测定值本身或从该信号强度的测定值算出的值作为目标蛋白质的测定值使用。作为从信号强度的测定值算出的值,例如,可举出从该信号强度的测定值减去阴性对照试样的信号强度的测定值的值、将该信号强度的测定值用阳性对照试样的信号强度的

测定值除的值、及它们的组合等。作为阴性对照试样,可举出健康个体的血液试样等。作为阳性对照试样,可举出以指定的浓度含目标蛋白质的血液试样。

[0063] 另外,血液试样中的目标蛋白质的测定值可通过从含已知浓度的目标蛋白质的阳性对照的信号强度的测定值制成校准曲线,向该校准曲线适用来源于血液试样中的目标蛋白质的信号的强度的测定值来算出。另外,不制成校准曲线,通过从含已知浓度的目标蛋白质的阳性对照的信号强度的测定值求出回归式,向该回归式适用来源于血液试样中的目标蛋白质的信号的强度的测定值,可算出血液试样中的目标蛋白质的测定值。

[0064] “抗目标蛋白质抗体”只要是与目标蛋白质特异性地结合,就无限制,还可使用以目标蛋白质或其一部分作为抗原而对人以外的动物进行免疫而得到的多克隆抗体、单克隆抗体、及它们的片段(例如,Fab、F(ab)₂等)之任一者。另外,免疫球蛋白的类及亚类不特别限制。

[0065] 作为为了制作抗目标蛋白质抗体而使用的成为抗原的目标蛋白质,只要是可制作目标蛋白质的抗体,就不限制。作为抗原使用的目标蛋白质可从哺乳类细胞根据公知的方法提取,也可另外由重组基因工程技术得到的重组体蛋白质。在以目标蛋白质的一部分作为抗原时,可使用将目标蛋白质用酶等消化而得到的片段,另外,也可以有与目标蛋白质的一部分的氨基酸序列相同的序列的肽作为抗原。所述肽可由公知的方法合成。其中,由于为了取得总VEGF-A的测定值而使用的抗目标蛋白质抗体优选与VEGF-A全部变体反应,优选使用有VEGF-A全部变体共同的肽序列的抗原而制作。一方面,为了取得VEGF-A_{165b}的测定值而使用的抗目标蛋白质抗体、特别是捕获用抗目标蛋白质抗体优选使用有对VEGF-A_{165b}具有特异性的肽序列的抗原而制作。抗目标蛋白质抗体也可购入市售品。

[0066] 另外,目标蛋白质的测定值的取得也可使用人VEGF Quantikine ELISA试剂盒(DVE00、R&D)及人血管内皮生长因子-_{165b} ELISA试剂盒(MBS720132、MyBiosource)等的市售的试剂盒而取得。

[0067] [1-2. 心肌梗塞的预后的提示]

[0068] 由上述1-1.中所述的方法取得的血液试样中的关于VEGF-A的值为了提示心肌梗塞的预后而使用。

[0069] 在上述受试体是心肌梗塞发病后的受试体,上述关于VEGF-A的值是总VEGF-A测定值时,在上述关于VEGF-A的值和对应的基准值之间的比较中,在得到了上述总VEGF-A测定值比对应的基准值低的结果之时,提示上述受试体的心肌梗塞的预后不良。另外,也可在得到了上述总VEGF-A测定值比对应的基准值高的结果之时,提示上述受试体的心肌梗塞的预后良好。

[0070] 在上述受试体是心肌梗塞发病后的受试体,上述关于VEGF-A的值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,在上述关于VEGF-A的值和对应的基准值之间的比较中,在得到了上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值高的结果之时,提示上述受试体的心肌梗塞的预后不良。另外,也可在得到了上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值低的结果之时,提示上述受试体的心肌梗塞的预后良好。

[0071] 在上述受试体是心肌梗塞发病后的受试体时,血液试样优选以心肌梗塞的发病日作为第1天,在第1~40天、优选为第3~30天、更优选为第3天、和/或第30天从受试体采集。在本项中,对于与上述1-1.中说明的用语共同的用语而其中援用上述1-1.的说明。

[0072] [1-3.冠状动脉疾病的重症度的提示]

[0073] 由上述1-1.中所述的方法取得的血液试样中的关于VEGF-A的值为了提示冠状动脉疾病的重症度而使用。

[0074] 在上述关于VEGF-A的值是总VEGF-A测定值时,在上述关于VEGF-A的值和对应的基准值之间的比较中,得到了上述总VEGF-A测定值比对应的基准值高的结果之时,提示上述受试体属于冠状动脉疾病重症组。另外,也可在得到了上述总VEGF-A测定值比对应的基准值低的结果之时,提示上述受试体属于冠状动脉疾病非重症组。

[0075] 在上述关于VEGF-A的值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,在上述关于VEGF-A的值和对应的基准值之间的比较中,得到了上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值低的结果之时,提示上述受试体属于冠状动脉疾病重症组。另外,也可在上述VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比对应的基准值高时,提示上述受试体属于冠状动脉疾病非重症组。

[0076] 在本项中,对于与上述1-1.中说明的用语共同的用语而其中援用上述1-1.的说明。

[0077] [2.取得受试体的关于VEGF-A的测定值的装置]

[0078] [2-1.装置的构成]

[0079] 取得受试体的关于VEGF-A的测定值的装置10至少具备处理部101和存储部。存储部由主存储部102和/或辅助存储部104构成。装置10也可用于实现权利要求1~13所述的方法的装置。在装置10及装置10的动作涉及的说明中,对于与上述1-1.中说明的用语共同的用语而其中援用上述1-1.的说明。

[0080] 处理部101取得上述受试体的血液试样中的关于VEGF-A的值。

[0081] 图1及图2显示装置10的构成。装置10也可与输入部111、输出部112和存储介质113连接。另外,也可与进行ELISA测定等的测定部30连接。即,装置10也可构成与测定部30直接或经网络等连接的,取得受试体的关于VEGF-A的值的系统50。

[0082] 在装置10中,处理部101、主存储部102、ROM(read only memory)103、辅助存储部104、通信接口(I/F)105、输入接口(I/F)106,输出接口(I/F)107和介质接口(I/F)108能由总线109互相数据通信地连接。

[0083] 处理部101由CPU、MPU或GPU等构成。处理部101通过执行存储在辅助存储部104或ROM103的计算机程序,进行取得的数据的处理,装置10发挥功能。

[0084] ROM103由掩模型ROM、PROM、EPROM、EEPROM等构成,记录了由处理部101执行的计算机程序及在其中使用的数据。ROM103存储在装置10的启动时由处理部101执行的启动程序或与装置10的硬件的动作关联的程序或设定。

[0085] 主存储部102由SRAM或DRAM等的RAM(Random access memory)构成。主存储部102在记录在ROM103及辅助存储部104的计算机程序的读取中使用。另外,主存储部102作为处理部101执行这些计算机程序之时的作业区域利用。辅助存储部102暂时存储经网络而取得的基准值等。

[0086] 辅助存储部104由硬盘、闪存等的半导体存储器元件、光盘等构成。在辅助存储部104中,存储操作系统及应用程序等的用于使处理部101执行的各种计算机程序及在计算机程序的执行中使用的各种设定数据。具体而言,不易失性地存储基准值等。

[0087] 通信I/F105由USB、IEEE1394、RS-232C等的串行接口、SCSI、IDE、IEEE1284等的并

行接口、及由D/A变换器、A/D变换器等构成的模拟接口、网络接口控制器(Network interface controller:NIC)等构成。通信I/F105在处理部101的控制下,接收来自测定部30或其他外部机器的数据,根据需要将装置10保存或生成的信息发送到或显示在测定部30或外部。通信I/F105也可经网络而与测定部30或其他外部机器(未图示,例如其他计算机、或者云系统)进行通信。

[0088] 输入I/F106例如由USB、IEEE1394、RS-232C等的串行接口、SCSI、IDE、IEEE1284等的并行接口、及由D/A变换器、A/D变换器等构成的模拟接口等构成。输入I/F106从输入部111接受文字输入、点击、声音输入等。接受的输入内容存储在主存储部102或辅助存储部104。

[0089] 输入部111由触控面板、键盘、鼠标、手写板、话筒等构成,向装置10进行文字输入或声音输入。输入部111可从装置10的外部连接,也可与装置10成为一体。

[0090] 输出I/F107例如由与输入I/F106同样的接口构成。输出I/F107将处理部101生成的信息输出到输出部112。输出I/F107将处理部101生成,存储在辅助存储部104的信息输出到输出部112。

[0091] 输出部112例如由显示器、打印机等构成,显示从测定部30发送的测定结果及在装置10中的各种操作视窗、分析结果等。

[0092] 介质I/F108读取存储在存储介质113的例如应用软件等。读取的应用软件等存储在主存储部102或辅助存储部104。另外,介质I/F108向存储介质113写入处理部101生成的信息。介质I/F108将处理部101生成,存储在辅助存储部104的信息写入存储介质113。

[0093] 存储介质113由软盘、CD-ROM、或者DVD-ROM等构成。存储介质113由软盘驱动器、CD-ROM驱动器、或者DVD-ROM驱动器等与介质I/F108连接。在存储介质113中,也可储存用于计算机执行操作的应用程序等。

[0094] 处理部101也可代替从ROM103或辅助存储部104的读取对于装置10的控制必要的应用软件或各种设定而经网络取得。上述应用程序储存在网络上的服务器计算机的辅助存储部内,向此服务器计算机接入装置10,下载计算机程序,能将其存储到ROM103或辅助存储部104。

[0095] 另外,在ROM103或辅助存储部104中,安装例如美国微软公司制造销售的Windows(注册商标)等的提供图形用户界面环境的操作系统。第2实施方式涉及的应用程序作为在上述操作系统上运行的。即,装置10可为个人计算机等。

[0096] [2-2. 装置的动作]

[0097] 接下来,使用图3至图7而对于装置10的动作进行说明。装置10的处理部101根据使计算机执行用于取得后述的受试体的关于VEGF-A的值的步骤的计算机程序而控制装置10的动作。关于VEGF-A的值的取得可为处理部101以总VEGF-A测定值、和/或VEGF-A_{165b}/总VEGF-A作为值摄入到处理部101、主存储部102、或者辅助存储部104的动作。另外,关于VEGF-A的值的取得在关于VEGF-A的值是总VEGF-A测定值时,也可为向处理部101、主存储部102、或者辅助存储部104摄入由测定部30取得的吸光度等的测定原始数据、和/或测定值的动作。关于VEGF-A的值的取得在关于VEGF-A的值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,也可为由测定部30取得的关于总VEGF-A及VEGF-A_{165b}的吸光度等的测定原始数据、和/或将测定值提取到处理部101、主存储部102、或者辅助存储部104,处理部101算出VEGF-A_{165b}/总VEGF-A的动

作。关于VEGF-A的值的取得在关于VEGF-A的值是VEGF-A_{165b}/总VEGF-A时,也可为处理部101从存储在主存储部102、或者辅助存储部104的总VEGF-A测定值和VEGF-A_{165b}测定值算出VEGF-A_{165b}/总VEGF-A的动作。在系统50中,测定值的取得也可为在测定部30中的测定开始。

[0098] 首先,使用图3而说明用于取得关于VEGF-A的值的装置10的动作的概略。

[0099] 处理部101根据由检查者等从输入部111输入的用于取得关于VEGF-A的值的开始指令而取得由上述1.中所述的方法取得的上述受试体的血液试样中的关于VEGF-A的值(步骤S1)。

[0100] 处理部101将在步骤S1中取得的值与存储在主存储部102或辅助存储部104的对应的基准值比较(步骤S2)。

[0101] 接下来,处理部101基于步骤S2的比较结果而对于上述受试体提示心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度(步骤S3)。

[0102] 处理部101也可在步骤S3之前,与步骤S3同时,或者步骤S3之后,进行将对于受试体提示的结果存储在辅助存储部104,输出到输出部112,和/或发送到上述外部机器(未图示)。

[0103] 接下来,对用于作为关于VEGF-A的值而使用总VEGF-A的测定值而提示受试体的心肌梗塞的预后的装置10的动作进行说明(图4)。

[0104] 处理部101根据由检查者等从输入部111输入的用于取得关于VEGF-A的值的开始指令而取得由上述1.中所述的方法取得的上述受试体的血液试样中的总VEGF-A的测定值(步骤S11)。

[0105] 处理部101将在步骤S11中取得的测定值与存储在主存储部102或辅助存储部104的对应的基准值比较(步骤S12)。

[0106] 接下来处理部101在步骤S12的比较中判断受试体的总VEGF-A的测定值比基准值低与否(步骤S13),在总VEGF-A的测定值比基准值低时,进到步骤S14,提示上述受试体的心肌梗塞的预后不良。处理部101在总VEGF-A的测定值比基准值高时,进到步骤S15,提示上述受试体的心肌梗塞的预后良好。

[0107] 在步骤S14或步骤S15之前,与步骤S14或步骤S15同时,或者步骤S14或步骤S15之后,处理部101也可进行将对于受试体提示的结果存储在辅助存储部104,输出到输出部112,和/或发送到上述外部机器(未图示)。

[0108] 接下来,对用于作为关于VEGF-A的值而使用VEGF-A_{165b}/总VEGF-A而提示受试体的心肌梗塞的预后的装置10的动作进行说明(图5)。

[0109] 处理部101根据由检查者等从输入部111输入的用于取得关于VEGF-A的值的开始指令而取得由上述1.中所述的方法取得的上述受试体的血液试样中的总VEGF-A的测定值及VEGF-A_{165b}的测定值(步骤S21)。

[0110] 处理部101将步骤S21中取得的VEGF-A_{165b}的测定值用总VEGF-A的测定值除,求出VEGF-A_{165b}/总VEGF-A(步骤S22)。根据需要,处理部101也可将VEGF-A_{165b}/总VEGF-A存储在主存储部102、和/或辅助存储部104(未图示)。

[0111] 处理部101将在步骤S22中取得的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A与存储在主存储部102或辅助存储部104的对应的基准值比较(步骤S23)。

[0112] 接下来,处理部101在步骤S23的比较中判断受试体的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比基准

值高与否(步骤S24),在VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比基准值高时,进到步骤S25,提示上述受试体的心肌梗塞的预后不良。处理部101在VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比基准值低时,进到步骤S26,提示上述受试体的心肌梗塞的预后良好。

[0113] 在步骤S25或步骤S26之前,与步骤S25或步骤S26同时,或者步骤S25或步骤S26之后,处理部101也可进行将对于受试体提示的结果存储在辅助存储部104,输出到输出部112,和/或发送到上述外部机器(未图示)。

[0114] 接下来,对用于作为关于VEGF-A的值而使用总VEGF-A的测定值而提示受试体的冠状动脉疾病的重症度的装置10的动作进行说明(图6)。

[0115] 处理部101根据由检查者等从输入部111输入的用于取得关于VEGF-A的值的开始指令而取得由上述1.中所述的方法取得的上述受试体的血液试样中的总VEGF-A的测定值(步骤S31)。

[0116] 处理部101将在步骤S31中取得的测定值与存储在主存储部102或辅助存储部104的对应的基准值比较(步骤S32)。

[0117] 接下来,处理部101在步骤S32的比较中判断受试体的总VEGF-A的测定值比基准值高与否(步骤S33),在总VEGF-A的测定值比基准值高时,进到步骤S34,提示上述受试体属于冠状动脉疾病的重症组。处理部101在总VEGF-A的测定值比基准值低时,进到步骤S35,提示上述受试体属于冠状动脉疾病的非重症组。

[0118] 在步骤S34或步骤S35之前,与步骤S34或步骤S35同时,或者步骤S34或步骤S35之后,处理部101也可进行将对于受试体提示的结果存储在辅助存储部104,输出到输出部112,和/或发送到上述外部机器(未图示)。

[0119] 接下来,对用于作为关于VEGF-A的值而使用VEGF-A_{165b}/总VEGF-A而提示受试体的冠状动脉疾病的重症度的装置10的动作进行说明(图7)。

[0120] 处理部101根据由检查者等从输入部111输入的,用于取得关于VEGF-A的值的开始指令而取得由上述1.中所述的方法取得的上述受试体的血液试样中的总VEGF-A的测定值及VEGF-A_{165b}的测定值(步骤S41)。

[0121] 处理部101将步骤S41中取得的VEGF-A_{165b}的测定值用总VEGF-A的测定值除,求出VEGF-A_{165b}/总VEGF-A(步骤S42)。根据需要,处理部101也可将VEGF-A_{165b}/总VEGF-A存储在主存储部102、和/或辅助存储部104(未图示)。

[0122] 处理部101将在步骤S42中取得的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A与存储在主存储部102或辅助存储部104的对应的基准值比较(步骤S43)。

[0123] 接下来处理部101在步骤S43的比较中判断受试体的VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比基准值低与否(步骤S44),在VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比基准值低时,进到步骤S45,提示上述受试体属于冠状动脉疾病的重症组。处理部101在VEGF-A_{165b}/总VEGF-A比基准值高时,进到步骤S46,提示上述受试体属于冠状动脉疾病的非重症组。

[0124] 在步骤S45或步骤S46之前,与步骤S45或步骤S46同时,或者步骤S45或步骤S46之后,处理部101也可进行将对于受试体提示的结果存储在辅助存储部104,输出到输出部112,和/或发送到上述外部机器(未图示)。

[0125] [3.程序及存储上述计算机程序的存储介质]

[0126] 计算机程序使计算机执行取得关于VEGF-A的值的步骤。上述计算机程序以计算机

作为取得受试体的关于VEGF-A的值的装置10发挥功能。具体而言, 计算机程序是使计算机执行选自上述2-1. 中所述的步骤S1至S3、步骤S11至S15、步骤S21至S26、步骤S31至S35、及步骤S44至S46的至少一个程序。程序也可为了为了使权利要求1~12所述的方法实现而控制计算机的计算机程序。

[0127] 上述2-1. 中记载的各步骤的说明在这里援用。另外, 在装置10、装置10的动作、及计算机程序涉及的说明中, 对于与上述1-1. 中说明的用语共同的用语而其中援用上述1-1. 的说明。

[0128] 计算机程序也可存储在存储介质。即, 上述计算机程序存储在硬盘、闪存等的半导体存储器元件、光盘等的存储介质。另外上述计算机程序也可存储在能由云服务器等的网络连接存储的存储介质。计算机程序也可下载形式的, 或者存储在存储介质的程序制品。

[0129] 向上述存储介质存储程序的形式只要是上述提示装置能读取上述程序, 就不限制。向上述存储介质的存储优选为不易失性的。

[0130] [4. 检查试剂及试剂盒]

[0131] 检查试剂含抗总VEGF-A抗体、或者抗VEGF-A_{165b}抗体。上述抗体也可例如被生物素等标记。图8显示收容上述检查试剂的容器151的概略图。上述抗体以干燥品、或者溶解于缓冲液(例如PBS)等的溶剂的状态, 作为检查试剂收容在容器151中。

[0132] 试剂盒至少含上述检查试剂。图9显示试剂盒150的概略图。

[0133] 试剂盒150包括含检查试剂的容器151, 收容检测用标记的抗总VEGF-A抗体、或者抗VEGF-A_{165b}抗体的容器152, 及根据需要收容检测用试剂(发光底物等)的容器153。在试剂盒150中, 也可含记载处理说明书或可阅览处理说明书的URL的用纸154。再者, 在试剂盒150中, 也可含收纳这些容器的箱155。另外, 虽未图示, 试剂盒也可含用于使目标蛋白质和捕获用抗目标蛋白质抗体固定化的固相。

[0134] 检查试剂及试剂盒为了以提示受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度的目的而取得上述1. 中说明的关于VEGF-A的测定值而使用。

[0135] 以上, 对于装置10、装置10的动作、计算机程序、检查试剂、及试剂盒, 参照附带的附图而详细地进行说明, 本发明不限于上述说明的具体的实施方式。本发明的实施方式可基于本说明书的记载和本领域技术人员的技术常识而变形。

[0136] 【实施例】

[0137] 接下来, 显示实施例而对于本发明更详细地进行说明, 但本发明不限于实施例而进行解释。

[0138] 血液试样中的总VEGF-A浓度、及VEGF-A_{165b}浓度的测定受名古屋大学医学系研究科伦理委员会的承认, 根据赫尔辛基宣言的伦理原则而进行。

[0139] I. 实施例1: 心肌梗塞发病后的血液试样中的关于VEGF-A的测定值的取得

[0140] 1. 测定对象者

[0141] 2015年7月~2017年2月, 在名古屋大学医学部附属医院对从症状发病起24小时以内受经皮冠状动脉形成术(percutaneous coronary intervention: PCI)的66人的AMI患者进行评价。将受血液透析的患者(n=4)、有前年需要外科的治疗或化学疗法的活动性恶性肿瘤的患者(n=5)、及有胶原病(n=2)的患者除外。这些疾病由于有影响总VEGF-A浓度、及VEGF-A_{165b}浓度的可能性。可在从最终AMI发病后住院起第3天、及第30天采集血液试样, 可

对总VEGF-A浓度、及VEGF-A_{165b}浓度进行测定的患者是23名。23名的患者的明细、及其临床数据示于表1-1、及表1-2。

[0142] 【表1-1】

[0143]

变量	MACCE			p 值
	全部 (n=23)	否 (n=14)	是 (n=9)	
年龄 (岁)	67.0±10.8	64.3±11.3	71.2±9.0	0.14
男性, n (%)	17 (73.9)	11 (78.5)	6 (66.7)	0.44
体重指数 (kg/m ²)	22.9±2.9	23.2±3.0	22.4±3.0	0.54
目前吸烟, n (%)	7 (30.4)	4 (28.6)	3 (33.3)	0.58
高血压, n (%)	10 (43.5)	6 (42.9)	4 (44.4)	0.64
糖尿病, n (%)	7 (30.4)	5 (35.7)	2 (22.2)	0.42
脂质异常症, n (%)	16 (69.6)	10 (71.4)	6 (66.7)	0.58
eGFR (mL/min/1.73m ²)	60.9 (57.0-71.8)	62.1 (58.8-74.1)	59.5 (54.2-68.4)	0.40
LDL 胆固醇 (mg/dL)	133.3±28.7	136.5±29.6	128.3±28.1	0.52
HDL 胆固醇 (mg/dL)	50.1±11.4	49.0±10.2	51.9±13.4	0.56
三甘油酯 (mg/dL)	182.4±102.7	187.3±93.2	174.8±121.5	0.78
血红蛋白 A1c (%)	5.8 (5.7-6.8)	5.9 (5.8-6.9)	5.8 (5.6-6.6)	0.64
C-反应性蛋白质 (mg/L)	1.0 (0.7-2.5)	1.0 (0.7-4.8)	0.8 (0.7-3.0)	0.56
峰肌酸激酶 (IU/L)	2443 (1639-4694)	2874 (1874-5148)	2443 (1479-4491)	0.56
肌酸激酶 (AUC) (IU/L×h)	43142 (29788-88934)	51164 (31922-92034)	40748(18932-78411)	0.69
末梢动脉疾病, n (%)	2 (8.7)	1 (7.1)	1 (11.1)	0.66
住院期间 (日)	12 (8-16)	12 (9-17)	11 (8-20)	0.98
至再灌注的时间 (min)	90.9±31.9	85.6±24.9	98.4±40.4	0.37
责任病变 (LAD (%), LCX (%), RCA (%))	56.5, 13.0, 30.4	21.4, 57.1, 21.4	44.4, 55.6, 0	0.10
多血管疾病, n (%)	7 (30.4)	5 (35.7)	2 (22.2)	0.42
Killip 分级 (I (%), II (%), III (%), IV (%))	69.6, 4.3, 8.7, 17.4	78.6, 0, 0, 21.4	55.6, 11.1, 22.2, 11.1	0.40

[0144] 【表1-2】

[0145]

变量	MACCE			p 值
	全部 (n=23)	否 (n=14)	是 (n=9)	
PCI 前的 TIMI 流等级 (0 (%)、1 (%)、2 (%)、3 (%))	73.9、4.3、13、8.7	57.1、7.1、21.4、14.2	100、0、0、0	0.030
PCI 后的 TIMI 流等级 (0 (%)、1 (%)、2 (%)、3 (%))	0、4.3、4.3、91.3	0、0、7.1、92.9	0、11.1、0、88.9	0.39
PCI 后的 LVEF (%)	53.3±10.9	55.6±8.3	49.7±13.8	0.21
住院时的施用				
抗血小板剂, n (%)	2 (8.7)	1 (7.1)	1 (11.1)	0.64
ACE-I 或 ARB, n (%)	8 (34.8)	6 (42.9)	2 (22.2)	0.29
β-阻断剂, n (%)	2 (8.7)	1 (7.1)	1 (11.1)	0.64
钙通道阻断剂, n (%)	5 (21.7)	3 (21.4)	2 (22.2)	0.67
他汀, n (%)	5 (21.7)	4 (28.6)	1 (11.1)	0.33
出院时的施用				
抗血小板剂, n (%)	23 (100)	14 (100)	9 (100)	
ACE-I 或 ARB, n (%)	21 (91.3)	13 (92.9)	8 (88.9)	0.64
β-阻断剂, n (%)	14 (60.9)	10 (71.4)	4 (44.4)	0.20
钙通道阻断剂, n (%)	3 (13.0)	2 (14.3)	1 (11.1)	0.67
他汀, n (%)	22 (95.7)	13 (92.9)	9 (100)	0.61

[0146] 在表1-1及表1-2中,数据表示平均值±SD或中位值(四分钟位范围)、或者数(百分率)。在表1-1及表1-2中,MACCE是指主要的有害的心脏及脑血管事件(major adverse cardiac and cerebrovascular events)。在表1-1或表1-2中,略语是指:eGFR:推定肾小球过滤率;LDL:低比重脂蛋白质;HDL:低比重脂蛋白质;AUC:浓度对时间曲线下面积;LAD:左前下行枝动脉;LCX:左回旋冠状动脉;RCA:右冠状动脉;Culprit lesion:责任病变;TIMI:在心肌梗塞中的血栓溶解;LVEF:左心室射血分数;PCI:经皮冠状动脉介入;ACE-I:血管紧张素转化酶抑制剂;ARB:血管紧张素受体阻断药。

[0147] 2. 临床上定义及终点

[0148] AMI根据Third Universal Definition of Myocardial Infarction (Circulation 2012;126:2020-2035) 而进行诊断。主要终点作为心血管死、再发性非致死性心肌梗塞(MI)、冠状动脉血行重建术的再应用及AMI后的脑梗塞的复合。心血管死定义为发病后24小时以内的心血管系的原因导致的死亡。再发性非致死的MI使用The third universal definition of myocardial infarction的基准而进行诊断。冠状动脉血行重建术定义为伴随支架内再狭窄或非责任病变中的狭窄发展的PCI或冠状动脉旁路移植(CABG)。使用定量冠状动脉造影(QCA),非责任病变定义为原初PCI(最初的心肌梗塞发病时的PCI)时由QCA而狭窄直径(DS)是50%以下的病变。发展(progression)是指在最初的心肌梗塞后后日在非责任病变中新发展狭窄病变,定义为DS超50%的。使用心脏血管测定系统(QCA-CMS版本7.2、MEDIS、Leiden、荷兰)而进行QCA。脑梗塞定义为在磁共振成像上新患的神经学缺损。关于MACCE的信息从医院的医疗记录,或者由与患者或其家族的电话访问收集。MACCE的明细示于表2。高血压定义为基线血压≥140/90mmHg、和/或使用降压药的情况。脂质异常症使用三甘油酯≥150mg/dL、低比重脂蛋白质胆固醇≥140mg/dL、高比重脂蛋白

质胆甾醇 \leq 40mg/dL、和/或抗高脂血症药的定义。糖尿病定义为空腹时血浆葡萄糖浓度 $>$ 126mg/dL、糖基化血红蛋白浓度 \geq 6.5% (National Glycohemoglobin Standardization Program)、和/或使用抗糖尿病药的情况。目前吸烟定义为申告能动吸烟的者。末梢动脉疾病 (PAD) 定义为足首上臂指数 $<$ 0.9、PAD的跛行、和/或以前受血行再建术的情况。

[0149] 【表2】主要的有害的心脏及脑血管事件 (MACCE)

[0150]

心血管死, n (%)	0 (0)
再发性非致死性心肌梗塞, n (%)	1 (4.3)
冠状动脉血行再建术的再应用, n (%)	7 (30.4)
脑梗塞, n (%)	1 (4.3)

[0151] 3. 关于VEGF-A的测定值的取得

[0152] 在AMI发病后第3天、及第30天采集血液试样,对血清进行分离,至测定于 -80°C 保存。血清VEGF-A浓度使用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (人VEGF Quantikine ELISA 试剂盒、DVE00、R&D) 而根据试剂盒附带的流程而进行测定。检测界限是9pg/mL。另外,测定内、及测定间的变动系数各自是4.5%及7.0%。血清VEGF-A_{165b}浓度使用ELISA试剂盒 (人血管内皮生长因子_{-165b}ELISA试剂盒、MBS720132、MyBiosource) 而根据试剂盒附带的流程而进行测定。检测界限是1pg/mL。另外,测定内、及测定间的变动系数各自是 $<$ 10%及 $<$ 10%。

[0153] 4. 统计解析

[0154] 连续值的数据作为正态分布变量的平均 \pm 标准偏差或非正态分布数据的中位值 (四分钟位范围, IQR) 表示。类别变量作为数值 (百分率) 表示。使用Student的t检验而评价正态分布的连续值的差异,使用Mann-Whitney的U检验而评价非正态分布值。类别变量的差异使用Kruskal-Wallis检验或 χ^2 检验而进行评价。进行Kaplan-Meier分析而评价MACCE的累积发生率,使用日志-排序检验而评价比较。MACCE的截止值使用接收机动作特性曲线 (ROC) 解析而算出。在对于各患者发生多个事件时,仅对于最初的事件的日而进行Kaplan-Meier分析。以 p 值 $<$ 0.05作为统计学显著。全部统计分析使用SPSS版本23 (SPSS、Inc.、Chicago、IL、USA) 而进行。

[0155] 5. 结果

[0156] 将血液试样中的总VEGF-A浓度、VEGF-A_{165b}浓度及VEGF-A_{165b}和总VEGF-A的比 (VEGF-A_{165b}/总VEGF-A) 用MACCE的有无进行比较的结果示于图10。图10A显示总VEGF-A浓度、图10B显示VEGF-A_{165b}浓度、及图10C显示VEGF-A_{165b}/总VEGF-A。上段显示AMI发病后第3天的数据,下段显示AMI发病后第30天的数据。

[0157] 总VEGF-A浓度,在AMI发病后第3天、及第30天,相比确认不到MACCE的患者,在确认到MACCE的患者中显示高值。特别是在第30天其差异显著 (中位值:153.6、IQR:[130.6-371.4]对301.9[242.5-384.1]pg/mL、 $p=0.028$)。

[0158] 一方面,VEGF-A_{165b}浓度在AMI发病后第3天、及第30天在MACCE的有无上确认不到差异。

[0159] VEGF-A_{165b}/总VEGF-A,在AMI发病后第3天、及第30天,相比确认不到MACCE的患者,在确认到MACCE的患者中显示高值 (各自,0.70[0.34-0.93]对比0.25[0.21-0.62], $p=$

0.039;0.65[0.42-0.95]对比0.36[0.23-0.52], $p=0.023$ 。

[0160] 为了基于AMI发病后30天后的总VEGF-A浓度、及VEGF-A_{165b}/总VEGF-A的值而预测MACCE的发生的有无而暂定求出截止值。截止值从ROC曲线,对于总VEGF-A而设为233.1pg/mL (ROC曲线下面积[AURC]=0.78, $p=0.033$),对于VEGF-A_{165b}/总VEGF-A而设为0.57 (AURC=0.79, $p=0.015$)。以各值比截止值高的组作为高组、以各值比截止值高的组作为低组,制成MACCE的累积发生率的坐标图(图11A及B)。低组和高组之间的显著差异由Kaplan-Meier分析求出。

[0161] 总VEGF-A低组中的MACCE的发生率是92%,与此相对,在总VEGF-A高组中的MACCE的发生率是22%,在日志-排序检验中成为 $p=0.011$,确认显著差异。另外,在VEGF-A_{165b}/总VEGF-A高组中的MACCE的发生率是87%,与此相对,在VEGF-A_{165b}/总VEGF-A低组中的MACCE的发生率是25%,在日志-排序检验中成为 $p=0.0058$,确认显著差异。

[0162] 因此,总VEGF-A浓度、及VEGF-A_{165b}/总VEGF-A被认为是对于AMI的预后的预测有用的标志物。

[0163] II. 实施例2:冠状动脉疾病患者的血液试样中的关于VEGF-A的测定值的取得

[0164] 1. 测定对象者

[0165] 在名古屋大学医院在2015年2月~2016年6月,对于为了稳定心绞痛(AP)或急性冠状动脉综合征(ACS)而受经皮冠状动脉介入(PCI)的患者268人而进行评价。在这些患者中,含为了稳定心绞痛而受PCI的73人。除外基准如以下所示:(i)受血液透析(HD)治疗的患者;(ii)有活动性的恶性肿瘤或者不足1年以内受恶性肿瘤的手术、或者化学疗法的患者;(iii)由于缺血性心脏疾病而受PCI或冠状动脉旁路移植的人;(iv)有胶原病的者。观察者和心脏外科医对于全部患者确认探讨适合与否,与患者的期盼最一致与否。作为对照组,选择无恶性肿瘤,由于临床症状或心电图异常而受冠状动脉造影、但SS是0的32人的患者。对照组是有正常的左心室功能,并且未受心脏手术或透析的患者。在对照组中,设为不含有恶性肿瘤的患者。患者在评价之前从全部患者得到书面同意。

[0166] 患者的明细、其临床数据示于表3-1及表3-2。

[0167] 【表3-1】

[0168]

变量	对照	PCI	p 值	PCI 受试体 (n=73)		
				低 SS	高 SS	p 值
受试体数	32	73	-	63	10	-
男性 (%)	18 (56.3)	57 (78.1)	0.03	48 (76.2)	9 (90.0)	0.44
年龄 (岁)	70.4±9.8	69.9±9.3	0.77	69.0±9.2	75.4±8.2	0.04
BMI (kg/m ²)	23.7±4.1	24.5±3.4	0.34	24.6±3.5	23.7±3.5	0.48
HT (%)	29 (90.6)	48 (65.8)	< 0.01	43 (68.3)	5 (50.0)	0.30
DM (%)	12 (37.5)	32 (43.8)	0.67	28 (44.4)	4 (40.0)	0.79
目前/曾吸烟者 (%)	13 (40.6)	43 (58.9)	0.09	37 (58.7)	6 (60.0)	0.94
PAD (%)	2 (6.3)	7 (9.6)	0.72	7 (11.1)	0 (0)	0.58
eGFR (ml/min/1.73m ²)	65.8±22.4	67.1±21.1	0.77	67.5±21.0	64.4±22.6	0.67
LDL (mg/dl)	104.2±29.0	100.8±34.0	0.64	101.5±36.3	96.3±13.0	0.43
HDL (mg/dl)	48.6±10.8	46.8±10.4	0.43	47.3±9.9	43.2±13.4	0.28
TG (mg/dl)	108.0 (81.3-153.5)	117.5 (79.8-170.3)	0.68	119.5 (83.0-169.5)	103.5 (69.0-185.8)	0.49

[0169] 【表3-2】

[0170]

变量	对照	PCI	p 值	PCI 受试体 (n=73)		
				低 SS	高 SS	p 值
受试体数	32	73	-	63	10	-
HbA1c (%)	6.4±1.1	6.3±0.8	0.59	6.3±0.8	6.1±0.7	0.46
Plt (×10 ³ /μl)	211±55.9	225±92.6	0.43	229±9.8	200±4.8	0.37
CRP (mg/dl)	0.10 (0.04-0.19)	0.14(0.09-0.35)	< 0.05	0.14(0.10-0.30)	0.24 (0.08-1.26)	0.70
嗜中性粒细胞(个细胞/μl)	3894±1332.9	3858±1793.3	0.92	3854±1828.7	3880±1639.7	0.97
淋巴细胞(个细胞/μl)	1534±472.2	1751±749.8	0.14	1748±707.0	1770±1026.4	0.93
LVEF (%)	67.0±7.3	62.7±11.0	0.06	64.2±10.2	56.6±13.4	< 0.05
LV 重量指数 (g/m ²)	123.7±33.5	116.1±35.4	0.33	111.3±33.2	143.7±36.7	< 0.01

[0171] 在表3-1及表3-2中,值表示平均±SD、中位值(四分钟位范围)或数(%).在表3-1或表3-2中,略语是,PCI:经皮冠状动脉介入、BMI:体格指数、HT:高血压、DM:糖尿病、PAD:末梢动脉疾病、eGFR:推定肾小球过滤率、LDL:低比重脂蛋白质、HDL:高比重脂蛋白质、TG:三甘油酯、HbA1c:血红蛋白A1c、Plt:血小板、CRP:C-反应性蛋白质、LVEF:左心室射血分数。

[0172] 2. 血液试样的收集

[0173] 在12小时的一晚禁食后,及肝素注射前的PCI的日,从全部患者采集血液献体。

[0174] 3. 关于VEGF-A的测定值的取得

[0175] 基于实施例1而进行。

[0176] 4. 血管造影解析

[0177] 冠状动脉病变的复杂性使用SYNTAX评分(EuroInterv.2005,1:219-227)而进行

定量化。根据基线诊断血管造影图像而对使1.5mm以上的血管发生50%以上的直径的狭窄的冠状动脉病变逐个进行评分化,接下来合计而得到使用SYNTAX评分算法而算出的整体SYNTAX评分(SS)。冠状动脉造影图像由不知患者的来历和临床信息的2名经验丰富的术者进行解析。与SYNTAX试验一同,将受PCI的受试者分为低SS组($SS \leq 22$)和高SS组($SS > 22$)这2个组。在高SS组中,含 $22 < SS \leq 33$ 的冠状动脉疾病的重症度是中度的者和 $SS > 33$ 的冠状动脉疾病的重症度是高度的者。

[0178] 5. 在实施例2中使用的用语的说明

[0179] 高血压定义为140mmHg以上的收缩期血压、或者90mmHg以上的扩张期血压、和/或使用降压药的情况。血压是,在座位休息至少10分钟后,使用适合的臂袖和汞柱血压计而测定血压。糖尿病定义为现在被诊断为糖尿病,空腹时血浆葡萄糖浓度 $\geq 126\text{mg/dL}$ 或糖基化血红蛋白(HbA1c)浓度 $\geq 6.5\%$ (National Glycohemoglobin Standardization Program)、和/或使用任何的抗糖尿病药的情况。根据eGFR由以下的式而进行计算(女性的情况): $eGFR(\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2) = 194 \times \text{血清肌酐}^{-1.094} \times \text{年龄}^{-0.287} \times 0.739$ 。末梢动脉疾病(PAD)定义为足首上臂指数(ABI) < 0.9 、跛行、和/或以前受血行再建术的情况。全部超声心动参数根据美国超声心动检查学会的劝告而进行测定。超声心动图像在胸骨(长轴及短轴)及尖端的视图得到。在超声心动中,评价以下的参数的:左心室扩张末期径(LVEDD; (mm));左心室收缩末期径(LVESD; (mm));扩张末期的心室中隔直径(IVSd; (mm));心扩张末期的左心室后壁径(PWd; (mm));及LV质量(g)。LV质量基于体表面积(LV质量指数, g/m^2)而指标化。左心室射血分数(LVEF, %)基于双翼Simpson的方法及尖端4室及2室的视图而进行计算。

[0180] 6. 统计解析

[0181] 基于实施例1中记载的方法进行。

[0182] 7. 结果

[0183] 图12显示血液试样中的总VEGF-A浓度(图12A)、及VEGF-A_{165b}和总VEGF-A的比(VEGF-A_{165b}/总VEGF-A)(图12B)。对于总VEGF-A浓度,与对照组比较而低SS组的方显示测定值的平均值略高的倾向,高SS组显示与对照组、及低SS组比较,测定值的平均值非常地高的值(对照组194.4pg/ml;低SS组243.4pg/ml;高SS组377.9pg/ml;对照组对比低SS组是 $p = 0.044$;对照组对比高SS组是 $p = 0.005$;低SS组对比高SS组是 $p = 0.018$)。

[0184] 另外,对于VEGF-A_{165b}/总VEGF-A,与对照组比较而低SS组的方显示平均值略低的倾向,高SS组显示与对照组、及低SS组比较而平均值低的值(对照组48.2%;低SS组43.5%;高SS组18.2%;高SS组对比低SS组是 $p = 0.004$;高SS组对比对照组是 $p = 0.006$)。

[0185] 从以上的结果得知,总VEGF-A浓度及VEGF-A_{165b}/总VEGF-A成为冠状动脉病变的重症度的指标。另外,总VEGF-A浓度及VEGF-A_{165b}/总VEGF-A被认为可作为反映SYNTAX评分的标志物使用。

[0186] 【符号的说明】

[0187] 10:装置

[0188] 101:处理部

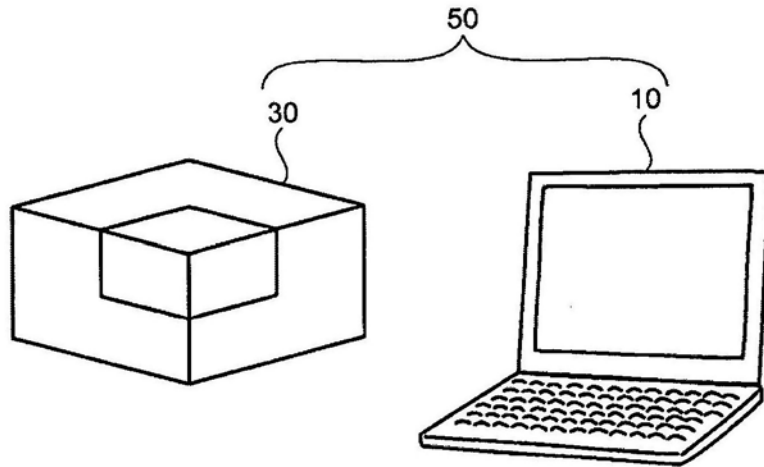


图1

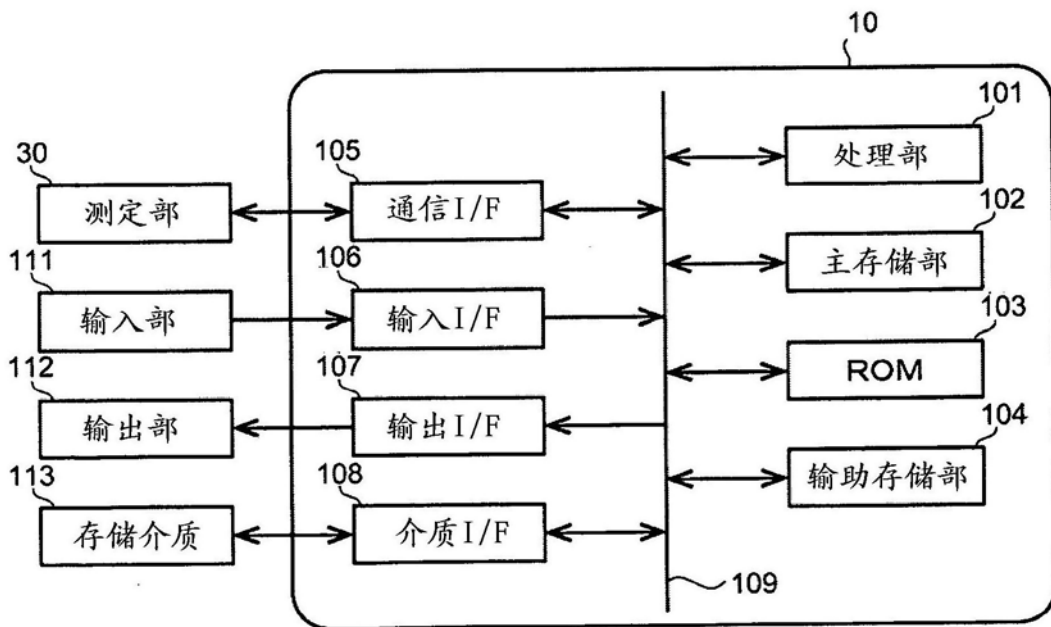


图2

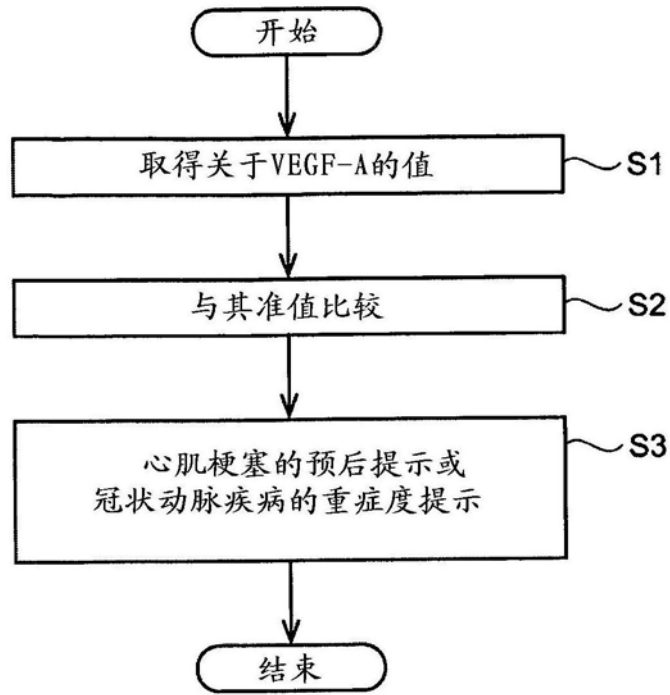


图3

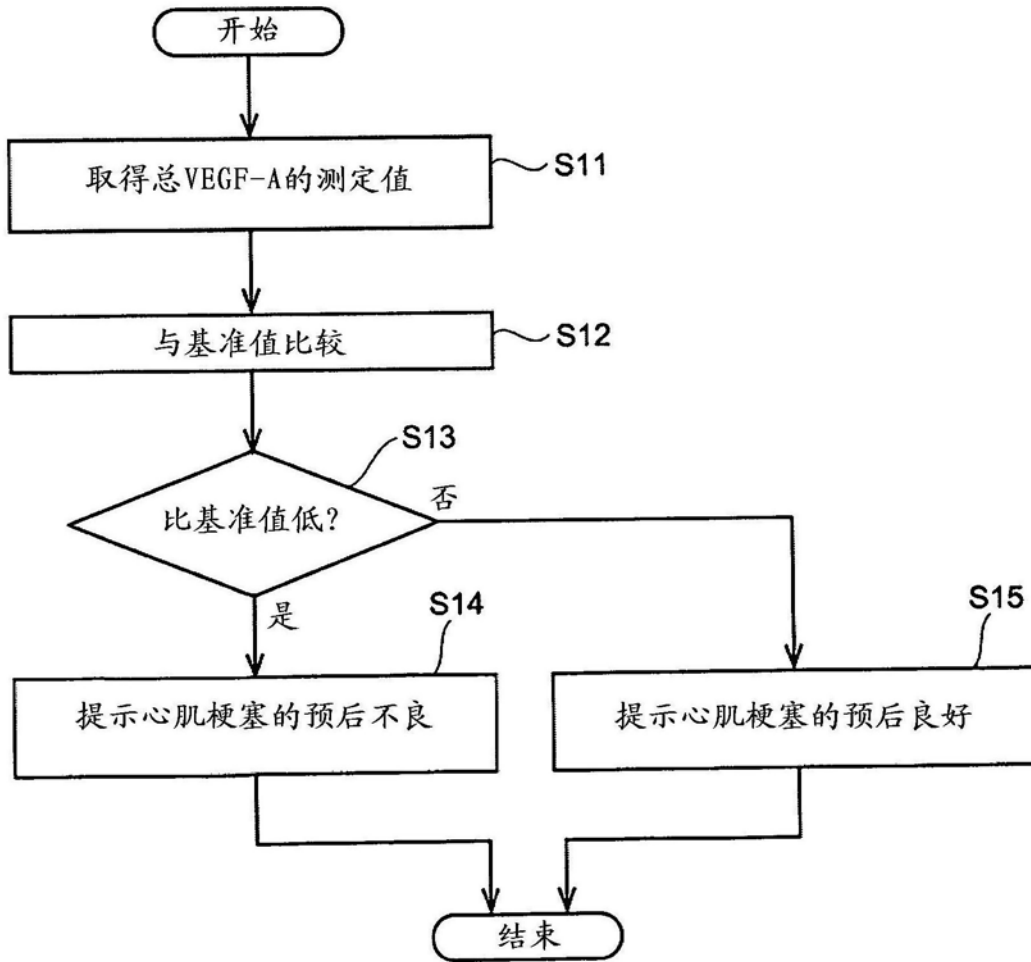


图4

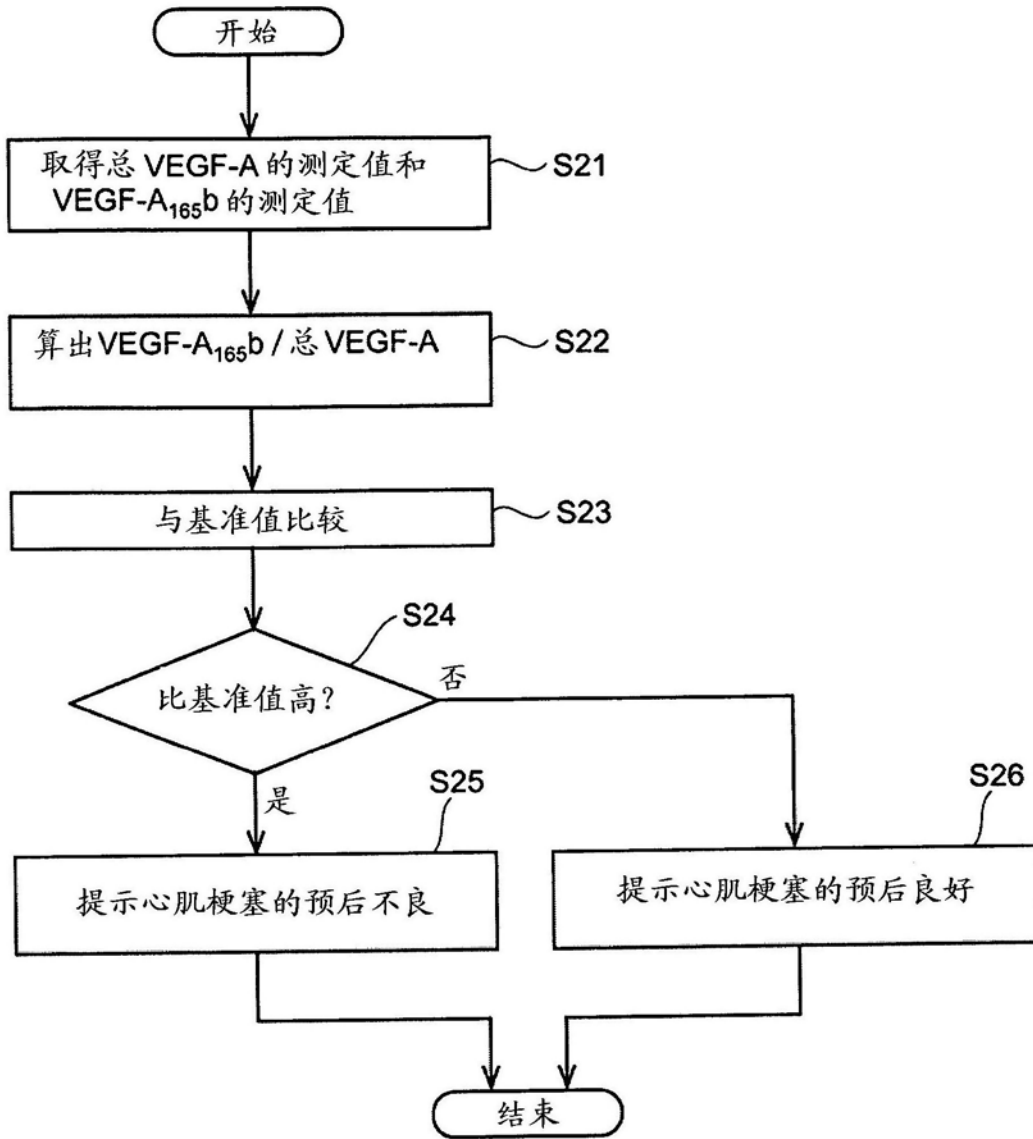


图5

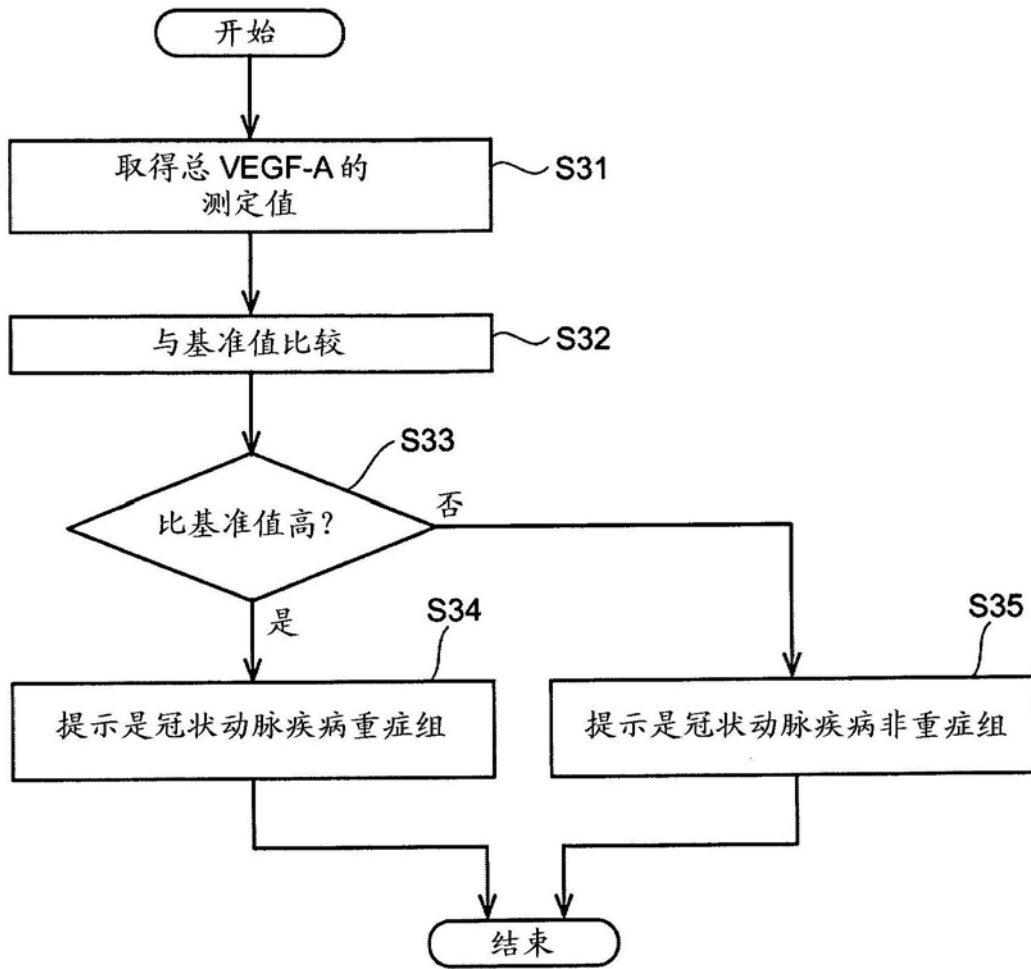


图6

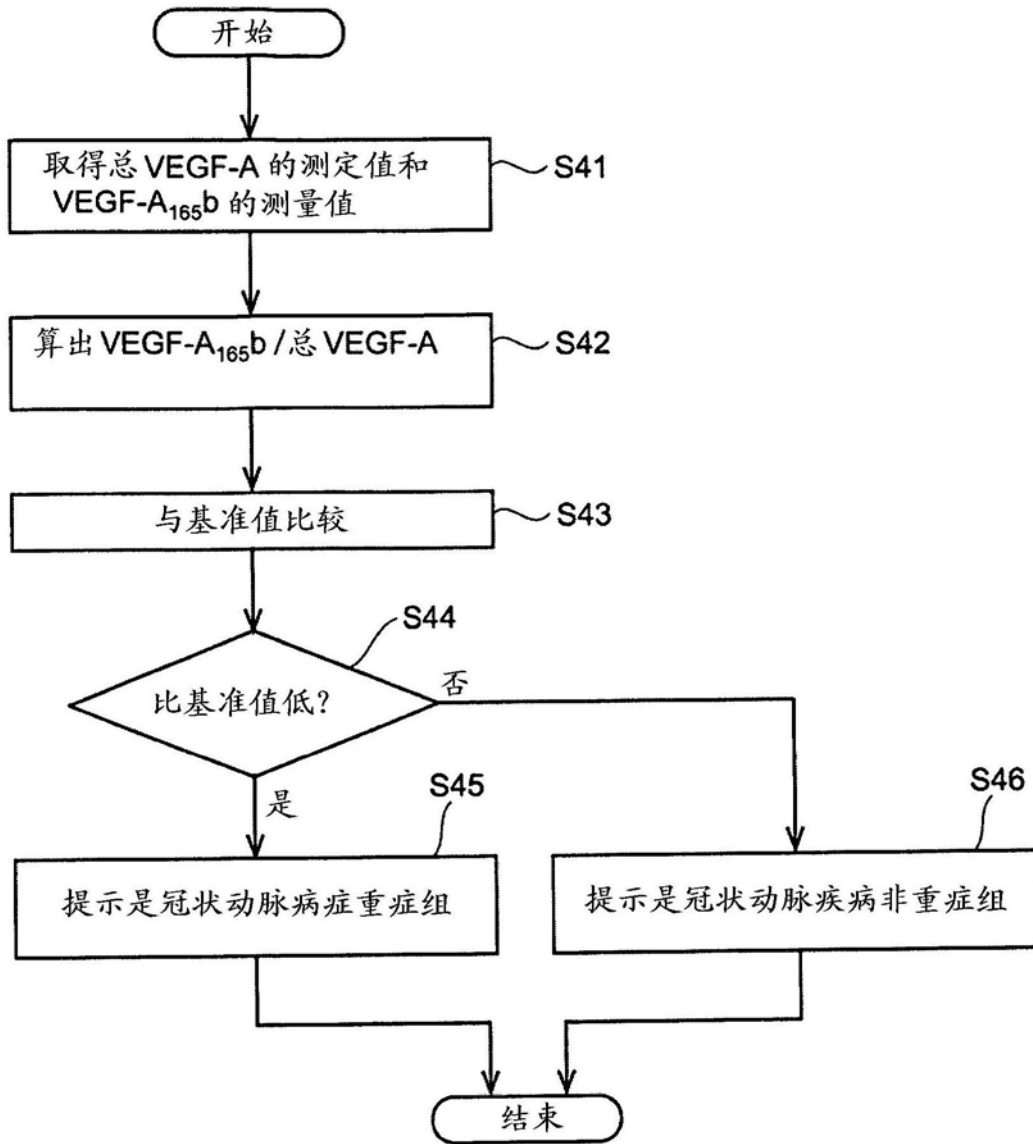


图7

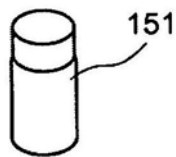


图8

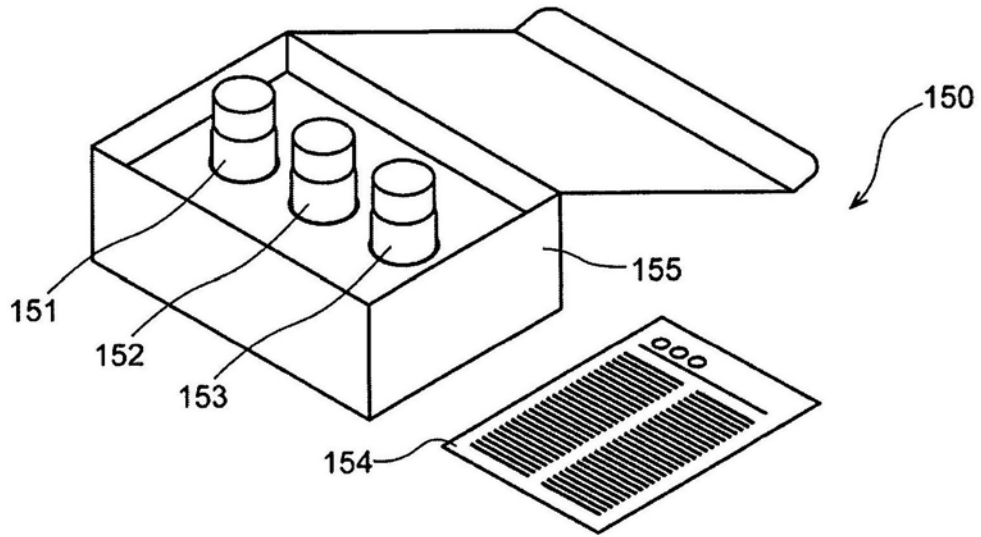


图9

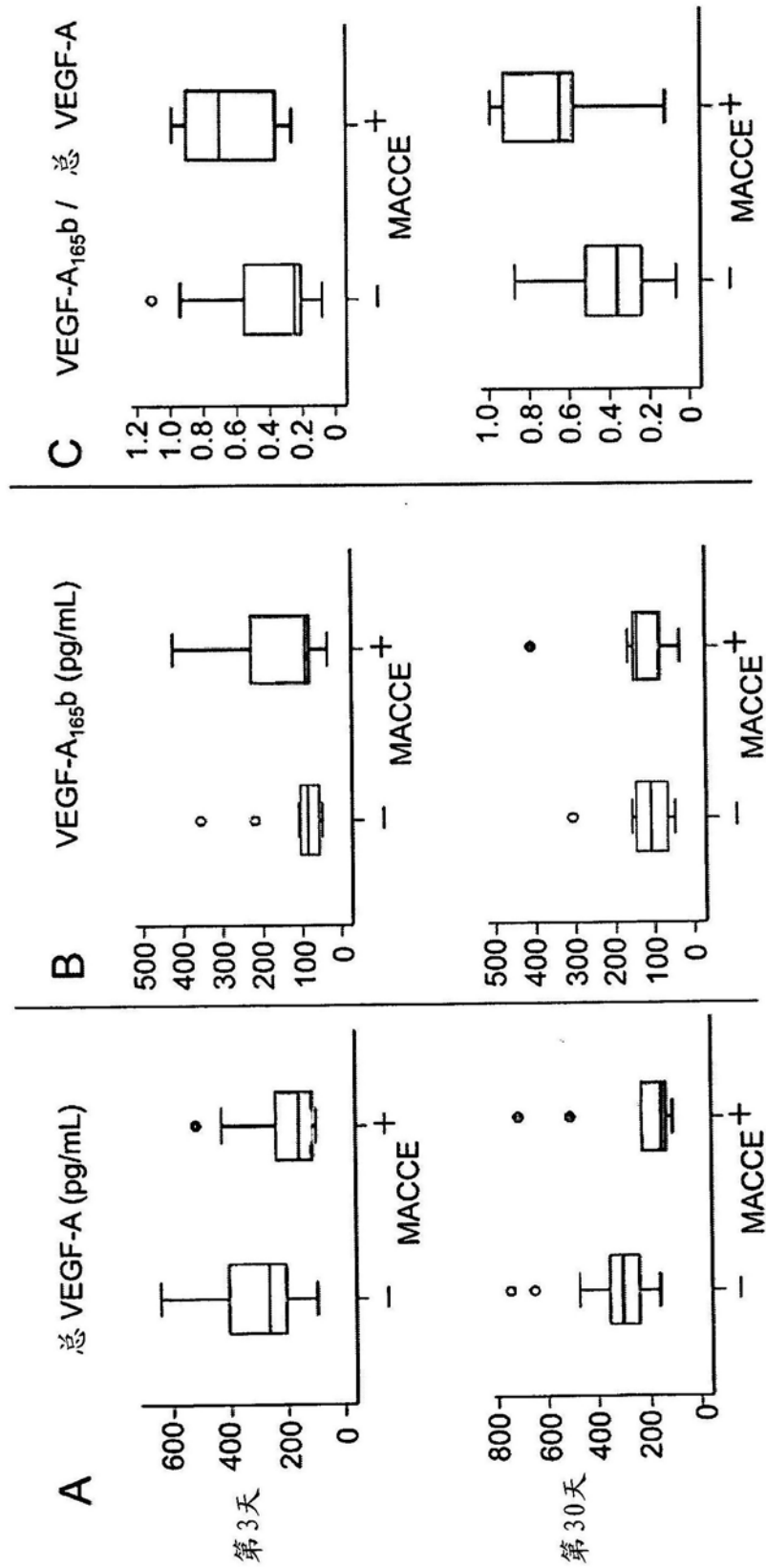


图10

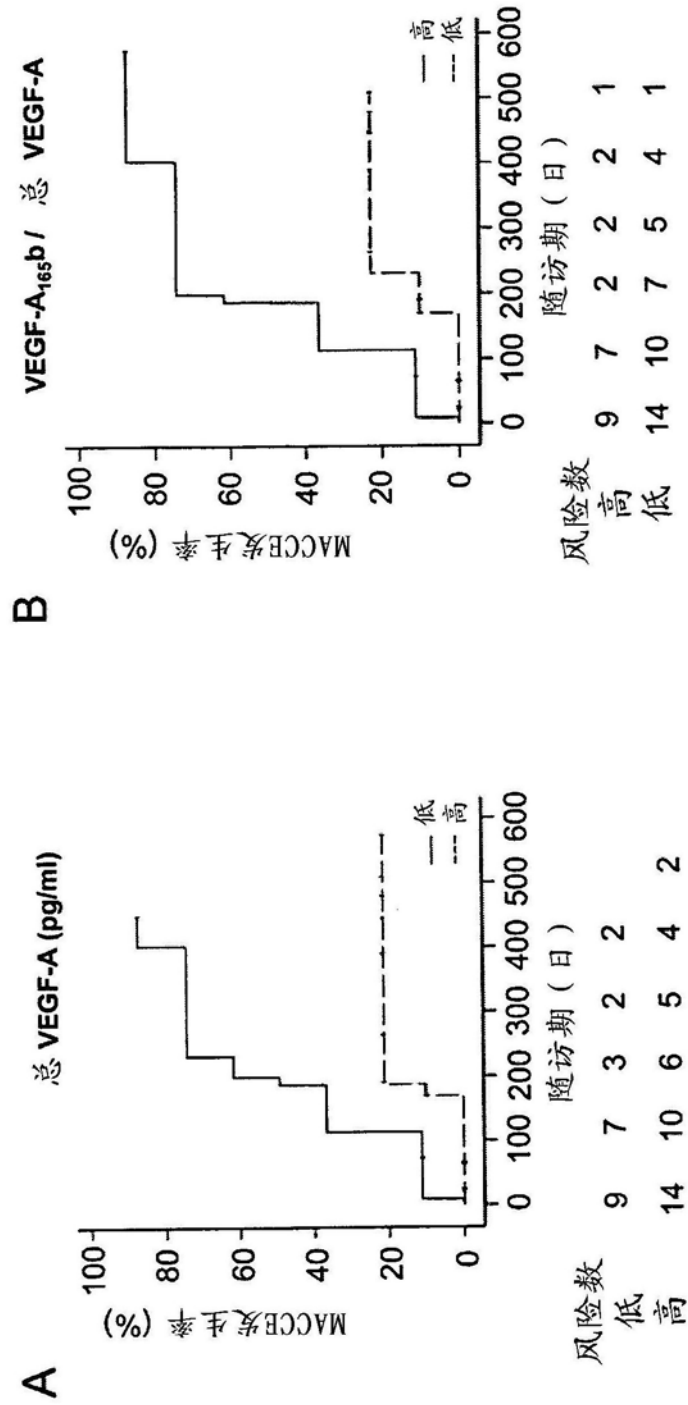


图11

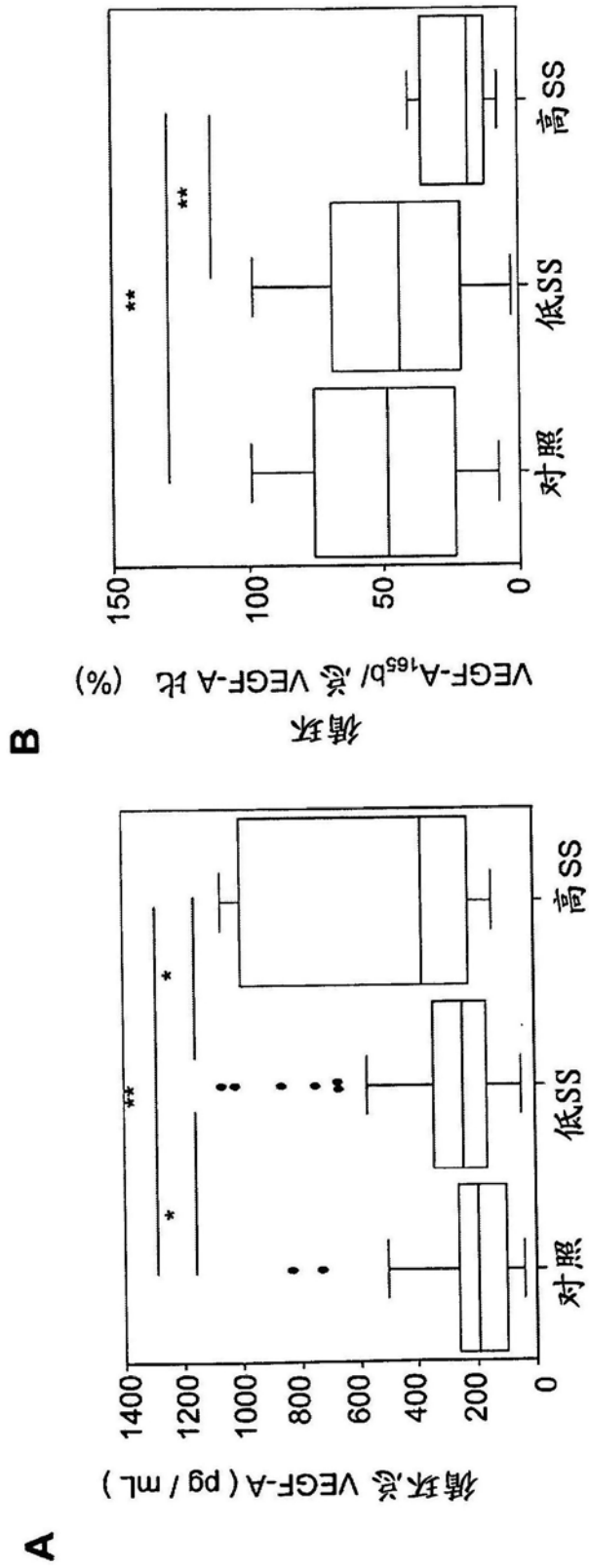


图12

专利名称(译)	用于取得关于VEGF-A的值得方法及装置		
公开(公告)号	CN109953744A	公开(公告)日	2019-07-02
申请号	CN201811528661.6	申请日	2018-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学 希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学 希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学 希森美康株式会社		
[标]发明人	菊地良介 石井秀树 室原丰明		
发明人	菊地良介 原田一宏 柴田阳平 石井秀树 室原丰明		
IPC分类号	A61B5/00 G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	A61B5/00 G01N33/535 G01N33/6872 G01N2800/324 G01N33/6863 G01N33/6893 G01N33/6827 G01N33/96 G01N2800/325 G16B20/20 G16H50/20 G16H50/30		
优先权	2017247153 2017-12-25 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及使用受试体血中的关于VEGF-A的测定值进行心脏疾病的重症度及预后预测的方法、装置及计算机程序。本发明以提供成为心肌梗塞的预后或冠状动脉疾病的重症度的指标的血液标志物作为一课题。本发明提供含取得关于受试体的VEGF-A的值得方法。上述值是通过用血液试样中的总VEGF-A的测定值或者血液试样中的总VEGF-A的测定值除以血液试样中的VEGF-A165b的测定值得到的值(VEGF-A165b/总VEGF-A)，上述值提示上述受试体的心肌梗塞的预后或上述受试体的冠状动脉疾病的重症度。

