

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4813736号  
(P4813736)

(45) 発行日 平成23年11月9日(2011.11.9)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/66 (2006.01)	GO 1 N 33/66	
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28	
C 1 2 Q 1/527 (2006.01)	C 1 2 Q 1/527	
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	D
請求項の数 15 (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-574480 (P2001-574480)	(73) 特許権者	502354672
(86) (22) 出願日	平成13年3月13日 (2001.3.13)		アーボガスト ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2004-500581 (P2004-500581A)		, インコーポレイティド
(43) 公表日	平成16年1月8日 (2004.1.8)		アメリカ合衆国, テネシー 37601,
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/007967		ジョンソン シティ, ウッドランド アベ
(87) 国際公開番号	W02001/077675		ニュ 1316
(87) 国際公開日	平成13年10月18日 (2001.10.18)	(74) 代理人	100077517
審査請求日	平成20年2月25日 (2008.2.25)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	09/540, 809	(74) 代理人	100092624
(32) 優先日	平成12年3月31日 (2000.3.31)		弁理士 鶴田 準一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 子かん前症及び他の疾患の予測方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血漿中の p I 5 . 6 アルブミン濃度の減少に関連を持つ疾患に対する血漿の毒性阻止能力の測定方法であって、以下のステップ：

( a ) 遊離アルブミン、6 ~ 2 0 炭素長のアシル鎖を持つ遊離非エステル化脂肪酸、6 ~ 2 0 炭素長のアシル鎖を持つトリグリセリド、超低密度リポタンパク質、低密度リポタンパク質、及び高密度リポタンパク質を含む血漿サンプルを準備し；

( b ) 上記遊離アルブミン濃度を測定し；

( c ) 上記遊離非エステル化脂肪酸濃度を測定し；そして

( d ) 上記遊離アルブミン濃度と上記遊離非エステル化脂肪酸濃度の比較により上記血漿の毒性阻止能力を示す値を計算する、  
を含み、ここで上記測定ステップ ( b ) 及び ( c ) が非細胞培養物を用いて実施する前記方法。

【請求項 2】

前記計算ステップが前記遊離アルブミン濃度を前記遊離非エステル化脂肪酸濃度で割り、それにより指示値として T x P A - S を示すことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記遊離アルブミン濃度測定ステップ及び前記遊離非エステル化脂肪酸濃度測定ステップを、前記血漿サンプルからの超低密度リポタンパク質の除去ステップの後に実施する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

トリグリセリド及びHDLの濃度測定ステップをさらに含み、さらにここで前記計算ステップ(d)が前記値の計算の中にトリグリセリド及びHDLの濃度のファクタリングを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記ステップ(d)で計算した値を前記疾患の存在又は発症について既知の診断を受けた患者から回収したそれぞれ多数の血漿サンプルを用いた、多数の血漿サンプルでの前記各ステップの実施により測定した基準と比較することを含む前記疾患に対する血漿の毒性阻害能力の評価であるステップ(e)をさらに含む、請求項1又は4に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記T x P A - S値を含む診断的要素を、アルブミン阻害性疾患に対する既知の毒性阻止能力を持つ複数の血漿サンプルでの請求項2に記載の方法を実施することにより決定された基準と比較することによる前記血漿の毒性阻止活性の測定をさらに含む、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記基準が1つの値、値の1つの範囲又は値の複数の範囲である、請求項6に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記複数の範囲が本質的に重複しない、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記疾患が、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、末梢血管疾患、糖尿病性血管疾患、ネフローゼ症候群、敗血症、ショック、癌、又は加齢である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記超低密度リポタンパク質の除去ステップを沈殿法により実施し、前記ステップ(b)を比色色素結合アッセイ、ELISA又は放射免疫アッセイを行うことにより実施し、前記ステップ(c)を滴定アッセイ、放射性同位体アッセイ又は酵素的比色分析を含む比色分析を行うことにより実施する、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記血漿サンプルがアスコルビン酸を含み、そして前記遊離非エステル化脂肪酸濃度測定ステップを前記血漿サンプルからのアスコルビン酸除去ステップの後に実施する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 12】

血漿中のpI 5.6アルブミン濃度の減少と関連を持つ疾患に対する血漿の毒性阻止能力の測定方法であって、以下のステップ：

(a) 遊離pI 5.6アルブミン濃度及び遊離pI 4.8アルブミン濃度を含む総遊離アルブミン濃度、6~20炭素の長さのアシル鎖を持つトリグリセリド、超低密度リポタンパク質、低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質、及び6~20炭素の長さのアシル鎖を持つ、総遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸を含む血漿サンプルを準備し；

(b) 上記遊離pI 5.6アルブミン濃度を示す値を測定し；そして

(c) 上記値と前記疾患についての既知の診断を受けた患者から回収した多数の各血漿サンプルを用いた、多数の血漿サンプルでの前記ステップ(a)及び(b)それぞれの実施により得られた基準値とを比較することにより前記疾患に対する前記血漿の毒性阻害能力を評価する、を含む前記方法。

## 【請求項 13】

前記測定ステップ(b)を総遊離アルブミン濃度の測定及び総遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸濃度の測定、並びに前記総遊離アルブミン濃度を前記総遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸濃度と比較することにより実施する、請求項12に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 1 4】

前記 (b) で測定された値が血漿中の遊離 p I 5 . 6 アルブミン濃度であり、ここで前記ステップ (b) が血漿から V L D L 及び p I 4 . 8 アルブミンを除去し、血漿上清を準備し、そしてその後前記上清中に残留するアルブミン濃度を測定することを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記疾患が、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、末梢血管疾患、糖尿病性血管疾患、ネフローゼ症候群、敗血症、ショック、又は癌である、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明の分野

本発明は病気を予防及び追跡するための方法に関する。より特に、本発明は子かん前症及び他の疾患の診断に関する。

【0002】

本発明の背景

血管疾患は多くの場合そこを通る血流の組成に関係する。特に、血中の高濃度の超低密度リポタンパク質 (V L D L) は血管の完全な状態に有害な影響を持つ。血中の超低密度リポタンパク質は、血管内壁を破壊する傾向にあり、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中 (s t r o k e)、末梢血管疾患、糖尿病性血管疾患等を含む血管疾患を引き起こす。血管疾患の早期検出を提供する方法、及び人生の晩年での血管疾患を患う方向に向かう患者の傾向を診断するための方法は、上記疾患をより良く制御し又はさらに回避することもできるため望ましい。子かん前症の早期検出は特に重要である。

20

【0003】

子かん前症は特に着目の中毒性血管疾患である。子かん前症は妊娠晩期に罹患し、そして血圧の急激な上昇、体重の極度な増加、全身性浮腫、蛋白尿、重い頭痛、及び視覚障害に特徴づけられる。彼女の胎盤及び胎児へ血液を供給する妊婦の子宮内の血管は子かん前症の間制限され、それにより上記胎児へ減少した量の血液及び酸素しかデリバリーされない。子かん前症は不十分な胎児の成長に関係し、その最も重い状態では、胎児と母親の両者の命を失いかねない。

30

【0004】

V L D L の破壊的な効果に対する内皮細胞及び白血球によるヒト血液の持つ天然の防御は血中の「毒性阻止活性」又は「T x P A」として知られる指標又は因子により定量化されている。(Arbogast, B.W., and Dreher, N.J. Coronary Disease Prediction Using a New Atherogenic Index. Atherosclerosis, Vol. 73 (1988) 259-267)。 (Chi, D.S., et al. Decreased Lymphocyte Response in Streptozotocin Induced Diabetic Rats : A Function of Very Low Density Lipoproteins. Diabetes 31 (1982) 1098-1104)。米国特許第 4, 6 9 9, 8 7 8 号は、血液サンプルの T x P A を、毒性を持つ量の V L D L により処理した細胞培養物と同じ毒性の量の V L D L により処理され無血液基準細胞培養物の「ゼロ」成長まで変更した量の血液サンプルにより処理した細胞培養物の増殖を比較することにより評価しうることを開示する。

40

【0005】

V L D L 対 T x P A の比はインビトロにおけるその血液の細胞毒性を決定する。V L D L 対 T x P A の比はインビトロにおける血管疾患の予測に有効でもある。子かん前症の存在又は将来的な発生を V L D L 対 T x P A の比を用いて 9 0 % の精度で予測しうる。(Arbogast, B.W., Leeper, S.C., Merrick, R.D., Olive, K.E. and Taylor, R.N Plasma Factors that Determine Endothelial Cell Lipid Toxicity in vitro Correctly Identify Women with Preeclampsia in Early and Late Pregnancy. Hypertension in Pregnancy Vol. 15 (1996) 263-279)。同様の精度をアテローム性動脈硬化症によっても達成した。(

50

Arbogast, B.W., Gill, L.R. and Schwertner, H.A. A New Protective Factor in Coronary Artery Disease : Very-Low-Density Lipoprotein Toxicity-Preventing Activity. *Atherosclerosis* Vol. 57 (1985) 75-86)。 (Arbogast, B.W. and Dreher, N.J. Coronary Disease Prediction Using a New Atherogenic Index. *Atherosclerosis* Vol. 66 (1977) 55-62)。この細胞培養法の欠点は、それが比較的高価なアッセイであること、及びそれが細胞育成時間を必要とすることである。また、不正確性のレベルが約10%であり、臨床アッセイとして望ましくない程に高い。

【0006】

血漿はアルブミン、非エステル化脂肪酸 (NEFA)、及びトリグリセリドを含む成分を含み、これらはさまざまな量で超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、及び高密度リポタンパク質 (HDL) により運搬される。ヒト血液アルブミンは2種類存在し、pH4.8とpH5.6の等電点へのそれらの電気泳動により分離される。(Basu, S.P., Rao, S.N. and Hartsuck, J.A. Influence of Fatty Acid and Time of Focusing on the Isoelectric Focusing of Human Plasma Albumin. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 533 (1978) 66)。ヒト血液の毒性阻止活性がpI5.6アルブミンにより主に提供されることが発見されている。Arbogastは、pI5.6アルブミン種が血管内皮細胞及び白血球へのVLDL損傷に対する保護効果を提供することを開示した。(Arbogast, B.W. Purification and Identification of Very Low Density Lipoprotein Toxicity Preventing Activity. *Atherosclerosis* Vol. 7 (1988) 259-267 and Chi, D.S., Berry, D.L., Dillon, K.A. and Arbogast, B.W. : Decreased Lymphocyte Response in Streptozotocin Induced Diabetic Rats : A Function of Very Low Density Lipoproteins. *Diabetes* 31 : 1098-1104, 1982)。従って、血中pI5.6アルブミン濃度の測定は血管及び白血球関連疾患の診断に大きな利益となるであろう。

【0007】

pI5.6とpI4.8アルブミン種はヒト血漿中に予測不可能な割合で存在するため、pI5.6アルブミンの濃度は総アルブミン濃度から決定できない。サンプルの血漿のT x PAを、等電点集束液体カラムを用いてpI5.6アルブミンからpI4.8アルブミンを分離し、そして吸光度分光分析を用いてpI5.6画分の濃度を測定することにより測定しうる。次に、血漿中のpI5.6アルブミン濃度を、動脈疾患と診断されている患者と動脈疾患と診断されなかったヒトの間の境界を示すことが知られている基準濃度と比較する。(Arbogast, B.W., Leeper, S.C., Merrick, R.D., Olive, K.E. and Taylor, R.N. : Plasma Factors that Determine Endothelial Cell Lipid Toxicity in vitro Correctly Identify Women with Preeclampsia in Early and Late Pregnancy. *Hypertension in Pregnancy* 15 : 263-279, 1996)。Arbogastにより開示された電気泳動法は相当扱いにくく、そして臨床運用には高価である。上記電気泳動法的不正確性の程度は約10%である。

【0008】

上記の観点から、血管及び非血管疾患及び症状を含むアルブミン阻害性VLDL感受性疾患の存在又はそれを患う方向に向かう傾向を診断するための簡単な方法を持つことが望ましいであろう。細胞培養物の育成又は等電点集束を必要としない方法がより有用であろう。このような新規診断方法に関して従来の方法よりも正確であることがさらに望まれるであろう。

【0009】

本発明の概要

本発明は、血漿中pI5.6アルブミン濃度の低下に関連を持つ疾患に対する血漿の毒性阻止能力を測定するための方法である。本法は以下のステップを含む：

- (a) 遊離アルブミン、遊離非エステル化脂肪酸、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質、低密度リポタンパク質、及び高密度リポタンパク質を含む血漿サンプルを準備し；
- (b) 上記遊離アルブミンの濃度を測定し；
- (c) 上記遊離非エステル化脂肪酸の濃度を測定し；そして
- (d) 遊離アルブミンの濃度対遊離非エステル化脂肪酸の濃度の比較により上記血漿の毒

10

20

30

40

50

性阻止能力を示す値を計算する。

より好ましい指標値は「 $T \times P A - S$ 比」であり、遊離アルブミンの濃度を遊離非エステル化脂肪酸の濃度により割ることで計算される。

【0010】

本発明は本法の実施に有用なアッセイ・キットをさらに含む。上記アッセイ・キットは以下の：

(a) 脂質沈殿剤；

(b) アルブミンとの結合により発色する試薬；及び

(c) 非エステル化脂肪酸との結合により発色する試薬、

を含む。

10

【0011】

本発明の詳細な説明

本出願人は血液毒素から、特にVLDL細胞毒性に対して有害な細胞損傷を防ぐ血漿の能力を予測する新規方法を発見した。本発明の方法は、血液の毒性阻害能力が特にVLDLに結合されないpI 5.6アルブミンにより示されることができるといふ本出願人の発見に基づく。VLDLに結合しないアルブミンを本明細書で「遊離アルブミン」と言及する。本出願人は遊離pI 5.6アルブミンの直接測定が本発明の下で毒性阻害活性の指標を提供することを発見したとはいえ、上記直接測定はpI 5.6アルブミンのpI 4.8アルブミンからの分離、並びに遊離アルブミンのVLDL結合アルブミンからの分離を必要とする。pI 5.6アルブミンのpI 4.8アルブミンからの分離のための扱いにくい電気泳動集束アッセイに対する代替アッセイを見つける試みの中で、本出願人は、遊離(総)アルブミン濃度と遊離アルブミンに結合した非エステル化脂肪酸(「NEFA」)の濃度を比較して、遊離pI 5.6アルブミンの濃度の非常に優れた概算を提供しうるといふことを発見した。これらの量の両方が簡単なインピットロにおける技術により計測可能であるため、これは容易な方法を提供する。本出願人は遊離アルブミンの濃度と遊離アルブミンに結合したNEFA(本明細書中では「遊離NEFA」と言及される)の濃度の比が血液毒素からの細胞損傷を防ぐ血漿の能力の改良された指標であることを発見した。しかしながら、主として遊離アルブミン及び遊離NEFA濃度に基づいて計算された他の診断値は本発明の改変であると考えられる。

20

【0012】

本法により測定される診断上の比は、米国特許第4,699,878号又はpI 5.6アルブミンの単離のために使用した等電点集束法において血液の毒性阻害能力を示すために以前に使用した $T \times P A$ 値と異なるパラメーターに基づいていることに留意すべきである。従って、上記の2種類の値は比較できない。本発明により測定される新しい毒性阻害能力の診断上の比を本技術分野で以前に使用されていた $T \times P A$ 値とはっきり区別するために、本発明により診断上の比を以下、アッセイされる血漿上清を示す「S」を伴う「 $T \times P A - S$ 比」と称する。本発明による上記 $T \times P A - S$ 比の決定及びそれらのベースとなる診断は、電気泳動及び細胞培養よりも簡単なアッセイ法を用いてアルブミン阻害性疾患罹患の可能性の正確な表示を提供する。

30

【0013】

本発明は血液について $T \times P A - S$ 比の測定方法、及びその結果測定される $T \times P A - S$ 比に基づく医療用診断を行う方法を含む。本法は血液、血清又は血漿のサンプルを試験することにより実施される。凝固のせいで血液は分析が困難であるため、全血から処理された血清及び血漿が好ましい。本発明の方法の実施のために使用される特定の種類のアッセイが血清又は血漿のいずれが最も好ましい血液の形態であるか決定するであろう。血漿が本法に関して最も好ましい血液の形態ではあるが、用語「血漿」は以下血液、血清、及び/又は血漿を示すために使用される。

40

【0014】

本発明においてアッセイされる血漿の最も関連のある成分は、遊離アルブミン、6~20炭素の長さのアシル鎖を持つNEFA、6~20炭素の長さのアシル鎖を持つトリグリセ

50

リド、低密度リポタンパク質（「LDL」）、超低密度リポタンパク質（「VLDL」）、及び高密度リポタンパク質（「HDL」）である。VLDLは約1.066 gm/ml未満の密度を有する。LDLは約1.006～約1.063 gm/mlの密度を有する。HDLは約1.063 gm/mlより高い密度を有する。上記NEFA成分はVLDL結合NEFAとVLDLに結合されないNEFAにより構成される。VLDLに結合されないNEFAの圧倒的多数が遊離NEFAであることが発見されているので、用語「遊離NEFA」は以下、別段の指示のない限り、両方の種類のNEFAの実体をも言及するために互換性を持って使用される。

#### 【0015】

本法は、血漿サンプル中の遊離アルブミン（pI 4.8及びpI 5.6アルブミンの両方）の濃度及び遊離NEFAの濃度の測定、並びに遊離アルブミン濃度を遊離NEFA濃度で割ることにより上記血漿のT x P A - S比の計算を含む。遊離NEFAの濃度はその血漿からのVLDLの除去の後に好ましくは測定される。上記アルブミン濃度はVLDLを除去する前に総血漿アルブミンとしてか又はVLDLの除去後に残存する遊離アルブミンとしてかのいずれかで計測される。しかしながら、より正確なT x P A - S比は上記遊離NEFA濃度と上記遊離アルブミン濃度を用いてT x P A - S比を計算することで得られる。

10

#### 【0016】

上記遊離アルブミン及び遊離NEFA濃度はLDLに結合されたアルブミン又はNEFAを含まずに計測することがより好ましい。従って、LDLはVLDLと一緒に血漿から除去されることが好ましい。LDLに結合された実体を含まずに遊離アルブミン及び遊離NEFAを計測した場合に、上記T x P A - S比が正確であることは知られている。

20

#### 【0017】

T x P A - S比の測定の後、このT x P A - Sは、特定の疾患についての基準T x P A - Sと上記T x P A - S比を比較することにより特にアルブミン阻害性疾患又は症状に対するその血漿の毒性阻止能力の分類に好ましくは使用される。上記基準T x P A - Sは、疑わしいアルブミン阻害性疾患又は症状の可能性が知られている統計的に有意な多数の血漿サンプルにおいて本発明の方法を実施することにより決定される。各血漿基準に対して決定されるT x P A - S比は、疑わしいアルブミン阻害性疾患について独立の医療用診断により分類される。上記疑わしいアルブミン阻害性疾患についての陽性診断は特定期間内のその疾患の実際の罹患に典型的には基づく。上記疑わしいアルブミン阻害性疾患についての陰性診断は特定期間内のその疾患の罹患のないことに典型的には基づく。上記基準はシングル・ベンチマークT x P A - S比又は好ましくは、アルブミン阻害性疾患に対する高い可能性を示すT x P A - S比の範囲である。最も好ましい基準は、T x P A - S比の範囲のペアであり、一方の範囲はアルブミン阻害性疾患について高い可能性を示すT x P A - S比を示し、そしてもう一方の範囲は同じ疾患について低い可能性を示す。

30

#### 【0018】

本発明の方法は、上述の高い又は低い可能性のT x P A - S比の基準範囲のペアの間に意外に大量の分類を提供する。上記T x P A - S基準比は基準血漿の十分に大きな集団から得られ、最も好ましくは、2の本質的に重複しない範囲に集まる、つまり、この2の範囲の間で統計的に少数の外れ値を除いて重複しない。

40

#### 【0019】

よって、本法を用いた診断における正確性は従来法よりも高い。上記高値基準範囲内に収まるサンプルT x P A - S比は、その患者が疑わしい疾患の罹患についての有意に低い可能性を有することを示す。上記低値基準範囲内に収まるサンプルT x P A - S比は、その患者が上記疾患の罹患について有意に高い可能性を有することを示す。2の基準範囲の間に収まる試験T x P A - S比は上記疾患の罹患の危険性が不確定である。

#### 【0020】

アルブミン阻害性疾患の罹患に向かう患者の傾向のさらにより正確な測定は、上記本法が血漿中の総トリグリセリド濃度の計測、及びに上記診断方程式にそのトリグリセリド濃度の組み込みのステップをさらに含む場合に成される。上記トリグリセリド濃度はT x P A

50

- S 比対トリグリセリド濃度のプロットの評価による患者の疾患の可能性の決定において考慮される。上述のプロットから、低い疾患可能性の血漿から高い疾患可能性の血漿を線引きする一次方程式を計算しうる。血漿サンプルの診断は  $T \times P A - S$  比とトリグリセリド濃度の両方を上記方程式内に入れることにより容易に成されうる。上記高い及び低い疾患可能性の基準範囲は、上記トリグリセリド濃度の結果を診断に含む時、さらに狭められ、そして互いから分離される。しかしながら、 $T \times P A$  値に代えて  $T \times P A - S$  比を用いた診断の正確性の明らかな改善は、トリグリセリド濃度が、 $T \times P A$  値の基準範囲へのその影響に比べて、 $T \times P A - S$  比に基づく診断基準範囲の線引きの量に明らかに小さい影響を有する事実よりさらに明らかである。

#### 【0021】

本法により診断される疾患は、その血漿中の  $pI 5.6$  アルブミンの濃度の減少に関連を持つ疾患である。上記方法は、 $VLDL$  の作用による内皮細胞の破壊により引き起こされた血管疾患の予測に特に有用である。用語「疾患」は疾患及び医学的に診断されうる症状を言及するために本明細書中で使用される。上述の疾患の例は、子かん前症、アテローム性動脈硬化症、脳卒中、ネフローゼ症候群（腎疾患）、末梢血管疾患、及び糖尿病性血管疾患である。血管疾患と認識されないがアルブミン濃度と関連を持つ非血管疾患の例は、癌、死亡、罹患、敗血症、ショック、及び加齢である。 $VLDL$  の除去、遊離  $NEFA$  の計測、及びアルブミンの計測に使用される特定の方法は重要ではない。本法の各ステップを実施するためのさまざまな方法が本技術分野で知られている。好適な方法及び試薬の例を以下に示すが、本発明の範囲を制限しない。

#### 【0022】

着目の  $NEFA$  濃度は遊離アルブミンに結合した  $NEFA$  ではあるが、非  $VLDL$  結合  $NEFA$  濃度の測定が、本法のために遊離アルブミンに結合した  $NEFA$  の概算に有用であることが知られている。よって、 $VLDL$  結合  $NEFA$  と非  $VLDL$  結合  $NEFA$  の分離を提供するあらゆる方法が遊離  $NEFA$  濃度の測定に好適である。 $VLDL$  結合  $NEFA$  は血漿からの  $VLDL$  の除去の後に遊離  $NEFA$  と区別されうる。

#### 【0023】

$VLDL$  は多くの技術により血漿サンプルから除去される。上述の分離手段の例は、超遠心分離、二価のカチオンの存在下での硫酸化グリカン又はリンタングステン酸による沈殿、免疫沈降、電気泳動、等電点集束、荷電分離技術、例えばイオン交換クロマトグラフィー、サイズ分離技術、例えばゲルろ過クロマトグラフィー等を含む  $LDL$  及び  $VLDL$  除去のためのあらゆる既知の技術を含む。 $VLDL$  は最も好ましくは沈殿、それに続く沈殿した固体からの上清のろ過、吸い上げ又はデカンテーションを手段としてサンプル血漿から除去される。

#### 【0024】

$VLDL$  を非アルブミン結合性の脂質沈殿剤の使用により沈殿させる。好ましい試薬は硫酸化グリカン、例えば硫酸デキストラン、及び二価のカチオン、例えば塩化マグネシウムを含む。 $VLDL$  の沈殿に有用な市販の沈殿剤の例は、 $HDL$ -コレステロール沈殿剤であり、これは硫酸デキストラン、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、及びポリエチレン・グリコールを含み、RefLab Medical Analysis Systems, Inc. から市販されている。この好ましい沈殿剤は硫酸デキストラン ( $0.2 \text{ mM}$ )、塩化マグネシウム ( $63.9 \text{ mM}$ )、塩化ナトリウム ( $63.3 \text{ mM}$ )、及びポリエチレン・グリコール ( $3.3 \text{ mM}$ ) の混合物である。 $LDL$  を  $VLDL$  と一緒に血漿サンプルから除去することは望ましい。 $LDL$  を典型的には  $VLDL$  と一緒に溶液から沈殿する。沈殿した  $VLDL$  及び  $LDL$  の固体は既知の方法、例えばその溶液の遠心分離に続いて血漿上清のデカンテーションにより除去される。代替の  $VLDL$  及び  $LDL$  沈殿剤は  $30.3 \text{ mM}$  リンタングステン酸、及び  $100 \text{ mM}$  塩化マグネシウムから成る。この溶液は  $1:5$  のサンプル対試薬比で混合され、そして沈殿した  $VLDL$  及び  $LDL$  固体をデキストラン・マグネシウム沈殿剤について先に定めたのと同様に除去する。

#### 【0025】

10

20

30

40

50

VLDLの除去後、遊離NEFA濃度を、脂肪酸濃度の測定のために知られるいずれかの方法により上記上清から測定する。上述の方法の例が米国特許第4,071,413号；同第4,360,591号；同第4,349,625号；同第4,301,244号；及び同第4,229,538号に開示されている。NEFA濃度計測の好適な方法は、滴定、比色分析、及び放射同位体法を含み、比色分析が好ましい。NEFAを抽出するための適当な溶媒系はDole, V.P.J. Clin. Invest Vol 35 (1956) 150 により開示されている。抽出されたNEFAは酸-塩基指示薬の終点への基準アルカリ性物質を用いた滴定により計測される。

#### 【0026】

NEFA濃度測定のための放射化学法はDove抽出物のヘプタン相にNEFAを抽出し、そしてそれからリン脂質を除くことを含む。次に上記抽出物を放射性硝酸ニッケルと混合することで放射性<sup>63</sup>Niにより標識する。ニッケル-脂肪酸複合体を含む上方の有機相をその後放射活性についてアッセイする。<sup>60</sup>Coを<sup>63</sup>Niと置き換えることができるが、ガンマ放射体であるためさらに危険である。

#### 【0027】

NEFA濃度の比色測定のままさまざまな方法が本技術分野で知られ、そして上記上清から抽出されたNEFA又はインビトロにおいて上記上清中に存在するNEFAに対して実施される。抽出法は典型的には銅又はコバルト塩の形成、及び非極性有機溶媒中へのその塩の抽出に基づき、ここで、比色計測のための色素体染料と複合体を形成する。あるいは、より好ましくは、NEFAはインビトロにおいて酵素的比色法を用いて計測される。ある上述の方法は、アシルCoAとして知られるCoAのチオール・エステルを形成するために加えたアデノシン三リン酸(ATP)、マグネシウム・カチオン、及びCoA、並びに副産物であるアデノシン一リン酸(AMP)及びピロリン酸塩(PPi)の存在下でアシル補酵素A合成酵素による上記上清の処理を含む。それにより産生されたアシルCoAを次に過酸化水素の産生を伴い、アシルCoAオキシダーゼにより酸化する。ペルオキシダーゼの存在下で、過酸化水素は3-メチル-N-エチル-N-ヒドロキシエチル-アニリンと4-アミノアンチピリンの酸化縮合をもたらし、その結果紫色の付加化合物を形成する。上記上清中のNEFA濃度は550nmの最大吸光度で計測される光学密度から測定される。

#### 【0028】

この比色分析を用いた場合、血漿中のアスコルビン酸(ビタミンC)の存在がNEFA濃度の測定 of 明らかな妨害の原因となることが多いことが知られている。これは、抗酸化剤としてのアスコルビン酸の生物学的役割及び過酸化水素と反応するその能力に大いに原因がある。このため、NEFA濃度測定のためにこの種の比色法を使用する場合、NEFA濃度の比色測定に先立ち、血漿又は血漿からアスコルビン酸を除去することが好ましい。アスコルビン酸オキシダーゼ(AOD)の添加はアスコルビン酸除去の便利な方法である。

#### 【0029】

アルブミン濃度の測定ステップにおいて、測定されるアルブミン濃度は遊離アルブミンの濃度であることが望ましい。従って、上記アルブミン濃度は好ましくはVLDLの除去後に、より好ましくはVLDL及びLDLの両方の除去後に残留した血漿上清から計測される。アルブミン濃度は既知の方法、例えば酵素連結免疫吸着法(ELISA)、免疫測定、放射免疫測定、色素結合比色分析、及び沈殿、電気泳動、焦点電気泳動、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィー等を用いたアルブミンの精製後のタンパク質又はアミノ酸の量の計測により計測される。色素結合比色分析はアルブミン濃度の測定のための好ましいアッセイ方法論である、なぜならばこれは他の手順よりも簡単でそして時間の浪費が少ないからである。一般的に、色素がアルブミン分子上の部位に結合する場合、アルブミン塊及び溶液中のpH環境の違いによりそれが検出可能となる。上述の比色色素結合アルブミン・アッセイの例は、米国特許出願第5,182,214号；同第4,568,647号；同第3,873,272号；同第3,884,6

10

20

30

40

50

37号；同第5，194，390号；同第4，337，064号；及び同第4，230，456号に開示されている。アルブミン濃度測定のための好ましい比色分析は、約1～約10 $\mu$ Lの上清又は血漿を約50～約200 $\mu$ Lの0.030mmol/リットル、ブロムクレゾール・グリーン（pH4.2）アルブミン試薬と混合することを含む。上記アルブミン濃度は628nmの最大吸収での光学密度の計測により測定される。

#### 【0030】

遊離pI5.6アルブミン濃度を示す値の代替の測定方法は、VLDLに結合されたアルブミン及びNEFAの濃度を測定し、そして血清中のアルブミン及びNEFAの合計濃度からそれらの濃度を引き、それにより遊離アルブミンの濃度及び遊離NEFAの濃度を得ることを含む。よって、これらの濃度を先に示したとおりTxPA-S値の計算に使用しう

10

#### 【0031】

与えられた血漿サンプルのTxPA-S比は遊離アルブミンの濃度を遊離NEFAの濃度によって割ることで本発明に従い計算される。使用される濃度単位は、基準TxPA-S比を得るために使用される同じ単位である限り重要ではない。例えば、TxPA-S値は、mgアルブミン/mgNEFA又は吸光度アルブミン/吸光度NEFAで表されるか、あるいは上記単位の組合せで表される。

#### 【0032】

TxPA-S比の測定を含む上記方法の好ましい態様を先に記載したが、本発明は、遊離pI5.6アルブミンの実際の濃度、あるいはそれらのその他の指標を測定し、そして特定の疾患に対する血液の毒性阻止能力の指標の値として使用する方法をも含む。本発明の上述の態様は、上記のとおり血漿サンプルを準備し、上記血漿中の遊離pI5.6アルブミンの濃度の指標を測定し、そしてその遊離pI5.6アルブミン濃度を、上記疾患の存在又は発生についての既知の診断を受けた患者から採取されたそれぞれ複数の血漿サンプルを用いて、複数の血漿サンプルで上記ステップ(a)及び(b)のそれぞれを実施することにより得られた基準と比較することにより上記疾患に対する上記血漿の毒性阻止能力を評価するステップを含む。遊離pI5.6アルブミン濃度の直接的な測定が、pI4.8アルブミンからpI5.6アルブミンを分離するための電気泳動集束の実施の組合せの結果遊離アルブミン及び遊離NEFAの計測ほど採算性はないであろう。

20

#### 【0033】

本発明の好ましい方法は、トリグリセリド濃度の計測、及びその診断で見られるレベルのファクタリングを含む。上記トリグリセリド濃度は酵素的比色終点アッセイの実施により測定される。

30

#### 【0034】

本発明は、本発明の好ましい方法を実施するために有用な試薬の特定の組合せであるアッセイ・キットをさらに含み、ここで、VLDLは沈殿により除去され、その後比色分析を用いて測定されるその上清に残留したNEFA及びアルブミンの濃度を測定される。本発明のアッセイ・キットはVLDL沈殿試薬、アルブミン結合pH感受性色素、及び酵素的脂肪酸比色試薬を含む。本発明のアッセイ・キットは、アスコルビン酸酸化剤、例えばアスコルビン酸オキシダーゼを好ましくは含む。

40

#### 【0035】

上記アッセイ・キットはトリグリセリドの酵素的比色終点試薬をも好ましくは含む。トリグリセリドとの結合及びトリグリセリドの表示に好適な比色試薬は、トリグリセリドをグリセロールと脂肪酸に加水分解するために一緒に働く成分及び酵素を含む。アデノシン三リン酸(ATP)及びグリセロールをグリセロキナーゼと反応させてグリセロール-1-リン酸及びアデノシン二リン酸を形成させる。グリセロール-1-リン酸(G-1-P)は過酸化水素に酸化され、この過酸化水素はNEFA試薬に簡単に計測されうる。あるいは、G-1-Pはニコチン・アデニン・ジ-ヌクレオチド(NAD)と反応し還元ニコチン・アデニン・ジ-ヌクレオチド(NADH)を産生しうる。次にNADHは、ホルムアザンを形成する還元で変色する色素を還元する。あるいは、先のアッセイにおいて、ビル

50

ピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼの存在下でNADHに添加し、そして得られたNADを紫外光を用いて測定する。代替法において、トリグリセリドをアルコールKOHにより加水分解しグリセロール及び脂肪酸を形成させる。次にグリセロール及びATPをグリセロキナーゼ存在下で反応させてグリセロール-1-リン酸及びADPを形成させる。次のステップにおいて、ピルビン酸キナーゼの存在下でADPをホスホエノール・ピルビン酸と結合させてピルビン酸とATPを形成させる。次にピルビン酸を乳酸デヒドロゲナーゼの存在下でNADHと反応させて乳酸とNADを形成させる。次にNADを紫外光により計測する。

【0036】

本診断試験キットのVLDL沈殿試薬は、硫酸化グリカンとして硫酸デキストラン及び二価のカチオンとして塩化マグネシウム、あるいはリンタングステン酸及び塩化マグネシウムの両方を好ましくは含む。

10

【0037】

上記pH感応性アルブミン結合色素はブロムクレゾール・グリーン、ブロムクレゾール・パープル等から成る群から好ましくは選ばれる。好ましい酵素的脂肪酸比色試薬は、アシル補酵素A合成酵素、アデノシン三リン酸、及び補酵素Aを含む混合物である。本発明のキット中のさまざまな試薬について、本明細書中において、上記試薬と血漿との接触の結果としてその血漿内容物で生じた化学反応により発色がいずれかの時点で示される場合、化合物が血漿内容物との結合で色を示していると考えられる。

【0038】

本願発明は、その好ましい態様を説明する以下の実施例によりさらに説明されうる。しかしながら、これらの実施例は説明の目的のために単に含まれるだけであるため、別段の指示がない限り本発明の範囲を制限しないことは理解されるであろう。

20

【0039】

実施例

以下の実施例において、血液サンプルをその時点で子かん前症を持たない妊婦から得た。これらの患者における子かん前症の発症又は子かん前症の発症のないことを診断の終わりに確認した。実施例1～6は、重度の子かん前症を持つ女性から得た血液サンプルを含む、上記重度の子かん前症は、晩期妊娠高血圧（最初の20週における少なくとも140/90トールの絶対血圧又は収縮期に少なくとも30トール若しくは拡張期に少なくとも15トールの上昇を上回る値）、蛋白尿（カテーテル挿入標本中、少なくとも30mgタンパク質/dL尿又は排泄尿中、少なくとも60mg/dL）、及び高尿酸血（血清尿酸>1標準偏差で妊娠期間中正常値を上回る）を有し、そして出産しなかった女性と定義された。実施例7～9は軽度の子かん前症を持つ女性から得た血液サンプルを含み、上記軽度の子かん前症は、彼女らが出産できたことを除いて重度子かん前症について定義されたのと同じ基準を持つと定義された。

30

【0040】

以下の試薬を上記実施例に使用した：

沈殿剤 -

Ref LabブランドのHDL-コレステロール沈殿剤はMedical Analysis System, Inc (USA) から入手でき、0.2mM硫酸デキストラン、63.9mM塩化マグネシウム、63.3mM塩化ナトリウム、及び3.3mMポリエチレン・グリコールを含む。

40

【0041】

アルブミン結合試薬 -

Wako chemicals USA, Inc、から入手可能なアルブミン・アッセイ・キットは50mmole/Lクエン酸バッファー中、pH3.8でブロムクレゾール・グリーンの0.2mmole/L溶液を含む。

【0042】

アスコルビン酸除去剤を伴うNEFA結合試薬 -

アッセイ・キットはWako Chemicals USA, Inc, Richmond, VA から入手できる。試薬Aを

50

、NEFAの測定のためのアスコルビン酸の酸化及び補酵素Aのアセチル化の目的のために調製した。試薬Bを、NEFAの測定のためのアシルCoAの酸化及び過酸化水素の産生の目的のために調製した。次に過酸化水素を3-メチル-N-エチル-N-ヒドロキシエチル-アニリン及び4-アミノアンチピリンと反応させて紫色を生じさせた。

【0043】

試薬A：

ACS (アシル補酵素Aシンターゼ)	3 U / バイアル
AOD (アスコルビン酸オキシダーゼ)	15 U / バイアル
CoA (補酵素A)	7 mg / バイアル
ATP (アデノシン三リン酸)	30 mg / バイアル
4-アミノアンチピリン	3 mg / バイアル

10

10mlの希釈液(0.05Mリン酸バッファー、pH6.9、3mM塩化マグネシウム、界面活性剤、及び安定化剤)を試薬Aの各バイアルに添加して実際に使用する溶液Aを作製した。

【0044】

試薬B：

ACOD (アシル補酵素Aオキシダーゼ)	132 U / バイアル
POD (ペルオキシダーゼ)	150 U / バイアル
MEHA (3-メチル-N-エチル-N-ヒドロキシエチル-アニリン)	4 mg / バイアル

20

実際に使用する溶液Bを20mlのフェノキシエタノール(0.3% v/v)及び界面活性剤により試薬Bを希釈することにより調製した。

【0045】

実施例1 - (比較)

図1は、11の子かん前症の女性及び11の対照対照からの血漿中の総アルブミン濃度の単純な計測によって生じる診断上の線引きがないことを明らかにする。

【0046】

実施例2 - (比較)

同様の(総)アルブミン計測方法を、アルブミン濃度の計測に先立ちVLDLをその血漿から除去したことを除き、同じ血漿サンプルについて実施例1と同様に実施した。遠沈管中で100µLの上記血漿と100µLの沈殿剤(1:1又は1:5のいずれかのサンプル対試薬比がその試薬濃度に依存して許容される)の組合せることによりVLDLを各血漿サンプルから沈殿させた。上記遠沈管を十分な混合を得るまでボルテックス・ミキサーにより振とうし、次に3,000rpmで10分間遠心分離した。その上清をピペティングにより新しい試験管に静かに移した。アルブミン濃度を得られた上清を用いて測定した。その結果を図2に示す。

30

【0047】

図1と2に示されたデータの比較は、アルブミンの計測に先立ちVLDL成分を除去した場合、子かん前症血液サンプルと対照血液サンプルの群の間のアルブミン濃度の線引きにいくらかの改善があることを示す。図1よりも図2の方が重複が少ない。上記対照患者の血液サンプルについての平均アルブミン濃度は、子かん前症患者の血液サンプルについての平均アルブミン濃度より高い。

40

【0048】

実施例3 - (比較)

この実施例は実施例1の11の子かん前症及び11の対照患者の血液サンプルの間のNEFA濃度の分離を明らかにする。上記血液サンプルから処理した血漿をNEFA濃度について試験した(VLDLの除去なし)。NEFA濃度の計測のために、5µLの血漿を平底マイクロタイター・プレートのウェルにピペットで移した。試験Aの実際に使用する溶液を添加し(70µL)、その溶液を十分に混合し、そして上記プレートを37で10分間インキュベートした。次に試薬Bの実際に用いる溶液を添加し(140µL)、その

50

プレート十分に混合し、そして37°Cでさらに10分間インキュベートした。光学密度をマイクロタイター・プレート・リーダーにより550nmの波長で計測した。水ブランクからの吸光度を差し引き、そしてNEFA濃度を既知の基準と比較して得られた吸光度に応じて記録した。

【0049】

この結果を図3に図式を用いて示す。

【0050】

実施例4

実施例4は本発明の方法を実施するために使用される方法を説明する。

【0051】

22の血漿サンプルを、NEFA濃度の計測前にVLDLを上記血漿から除去して結合アルブミンを含まない上清を準備したことを除いて、実施例3と同様に試験した。遠沈管中で100μLの血漿と100μLの沈殿試薬を組合せることによりVLDLを血漿サンプルから沈殿させた。この遠沈管をボルテックス・ミキサーにより十分な混合が得られるまで振とうし、次に3,000rpmで10分間遠心分離した。この上清をピペティングにより新しい試験管に静かに移した。この上清のNEFA濃度を実施例3で用いた方法により計測した。その結果を図4に示す。

【0052】

図3と図4の比較は、VLDLをその血漿から最初に除去した場合、患者サンプル中のNEFA濃度が子かん前症サンプルと対照サンプルの間で有意に線引きすることを明らかにする。これは血漿中の有意な量のNEFAがアルブミンに結合されていることに加え、VLDLに結合されていることを示唆している。このため、VLDL結合NEFA及びVLDL結合アルブミンの除去は血液の毒性阻止能力と強い関連がある遊離アルブミンに結合したNEFA濃度のより正確な計測をもたらす。

【0053】

実施例5

アルブミン対NEFA比を実施例1~4の結果を用いて上記22の患者のサンプルのそれぞれについて計算した。実施例1(血漿サンプル)において測定したアルブミン濃度を実施例3(血漿サンプル)において測定したNEFA濃度によって割ることで上記比をまず計算した。これらの結果を図5にプロットする。

【0054】

実施例2(上清を計測)において測定したアルブミン濃度を実施例4(上清を計測)において測定したNEFA濃度によって割ることで22の患者のサンプルのそれぞれについて本発明に従いT×PA-S比を計算した。これらの結果を図6にプロットする。

【0055】

図5と6の比較は、VLDLが除去された上でのみ、本法によるアルブミン濃度及びNEFAの両者の計測により得た有意な量の線引きを説明する。図6は子かん前症サンプルと対照サンプルの間の完全な線引きを示す。

【0056】

図6に示された結果の分析は、約1.17~約1.78に収まるT×PA-S比は約100%の確度で子かん前症の通常危険性を示すことを示唆した。約0.63~約0.9に収まるT×PA-S比は約100%の確度で子かん前症の高い危険性を示す。これら2つの範囲の間に収まるT×PA-S比は不確定である。

【0057】

図6に示したプロットは本法を用いた診断に有用なT×PA-S比基準の例である。例えば、必要に応じて、1.0の単独のT×PA-S比切り捨て値が診断目的のための分離試験T×PA-S比に対して使用されうる。しかしながら、特にT×PA-S基準範囲を導き出すための参照サンプルの大集団による、慎重な範囲の使用がよりの確である。

【0058】

実施例6

10

20

30

40

50

本実施例はカラム T x P A の以前使用されていた測定方法を説明し、そしてその結果を T x P A - S と比較する。重度の子かん前症と診断された 11 の妊婦患者、及び妊娠期間、母親の年齢、及び人種について対応した 11 の患者から得た血液サンプルの ( 総 ) アルブミン濃度を Hypertension in Pregnancy Vol. 15 中に A r b o g a s t により開示された方法に従い、等電点集束により上記血漿 ( V L D L の除去なし ) のアリコート ( 10 : 1 ) から直接的に計測した。10  $\mu$  l の血漿を p l 4 ~ 6 . 5 の 0 . 25 ml アンホラインを伴う 10 ml のショ糖密度 ( 5 % ~ 50 % ) 勾配中に移す。18 時間流し、そしてそのカラムをマイクロタイター・プレート内に溶出させた。1 滴づつ画分を回収した。200  $\mu$  L のアルブミン試薬を溶出サンプルと混合し、そして約 660 nm で発色を計測した。

【 0059 】

図 7 に示したプロットは、本発明による上清アリコートでの T x P A - S の比色測定についての図 6 に示した結果と Hypertension in Pregnancy Vol. 15 中に A r b o g a s t により開示された方法による同じ患者サンプルからの血漿アリコートでの T x P A のカラム法測定の間の高い相関関係を明らかにする。上記 2 セットの結果の間に見られる相関係数 (  $R^2$  ) は 0 . 66 であった。反復試験での変化はカラム T x P A 法により約 10 % であるのに対して上清を用いた本比色法では約 2 % の変化しかない。

【 0060 】

実施例 7 ~ 9 は後日軽度子かん前症を持つことが診断された女性における本法の使用を説明する。

【 0061 】

実施例 7 - ( 比較 )

図 8 は、実施例 1 で使用したのと同じ方法を実施することにより得られた妊娠の妊娠第 3 期にある 25 の子かん前症の及び 25 の対照の女性における総血清アルブミン・レベルを示す。図に示すように、多くの子かん前症の女性が上記対照の基準範囲より低い総アルブミン・レベル ( < 4 g / dl ) を有する。しかしながら、総血清アルブミン・レベルを子かん前症の診断に不十分にさせる上記の群の間の明らかな重複が存在する。

【 0062 】

実施例 8

実施例 7 でアッセイした同じ 50 の血液サンプルの T x P A - S を実施例 5 で用いたのと同じ方法を用いて測定した。図 9 は、これらの同じ 2 の群の女性について測定した T x P A - S が、実施例 7 での総血清アルブミン・レベルの測定よりも上記の群の優れた線引きをするという結果をもたらした。診断ベンチマークとして図 9 に示した水平線を用いて、76 % ( 25 の中の 19 ) の上記対照の女性を 68 % ( 25 の中の 17 ) の子かん前症の女性から分離しうる。これは実施例 7 を上回る著しい改善である。

【 0063 】

実施例 9

本実施例において、実施例 8 で測定した T x P A - S データを ( V L D L 及び L D L の除去後の ) 上清中の H D L 濃度を各 T x P A - S 比に掛けることによりさらに評価した。上記 H D L コレステロール濃度を Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol Determination in High Density Lipoproteins Separated by Three Different Methods. Clin Chem 23 : 882-6 (1977)、及び Allain CA, Poon LS, Chan CSG, Richmond W. Fu PC. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. Clin Chem 20 : 470-5 (1974) に開示のとおり、リントングステン酸を用いた V L D L 及び L D L の沈殿後の上清で計測し、上記文献を本明細書中に援用する。

【 0064 】

図 10 は、さらなる改善が上記方程式に H D L レベルを組み込むことにより得られたことを示す。この場合、76 % ( 25 の中の 19 ) の対照の女性が 88 % ( 25 の中の 22 ) の子かん前症の女性から線引きされる。

【 0065 】

本発明を明細書中及び実施例中の目下の好ましい態様に関して説明してきたが、上述の開

10

20

30

40

50

示は本明細書中に記載した発明を制限しないことは理解される。もちろん、本開示を読んだ後、本発明に関するさまざまな変更及び修飾が当業者にとって明らかになるであろう。添付した請求項が本発明の本質及び範囲の中にある全ての変更及び修飾に及ぶと解釈されることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 診断上の分離の欠落が重度子かん前症患者と対照患者の血漿アルブミン濃度の比較により生じることを示すプロットを表す。対照患者は、妊娠期間、母親の年齢、及び人種の観点から子かん前症患者と一致する。

【図 2】 そのアルブミン濃度が沈殿及び遠心分離による VLDL 及び LDL 除去後の血漿上清中に見られるアルブミンであることを除いて、図 1 と同様のプロットを表す。

【図 3】 いくらかの診断上の分離が重度子かん前症患者と対照患者の血漿 NEFA 濃度の比較により生じることを示すプロットを表す。

【図 4】 その NEFA 濃度が VLDL 及び LDL の沈殿後の血漿上清中に見られる NEFA であることを除いて、図 3 と同様のプロットを表す。

【図 5】 血漿アルブミン濃度対血漿 NEFA 濃度の比をプロットする場合に子かん前症患者と対照患者の間に改善された診断上の線引きを示すグラフを表す。

【図 6】 上清アルブミン濃度対上清 NEFA 濃度の比 (T x PA - S 比) をプロットする場合に重度子かん前症患者と対照患者の間にさらに改善された診断上の線引きを示すグラフを表す。

【図 7】 血液サンプルの同じセットで計測した T x PA - S 比 (上清) とカラム T x PA 値 (血漿から) の間の線形相関プロットを表す。

【図 8】 軽度子かん前症を持つ女性の異なるセット及び対照の女性のセットから得た血液サンプルについての図 1 と同様のプロットを表す。

【図 9】 図 8 で用いたのと同じ群の血液サンプルから得た血液サンプルについての図 6 と同様のプロットを表す。

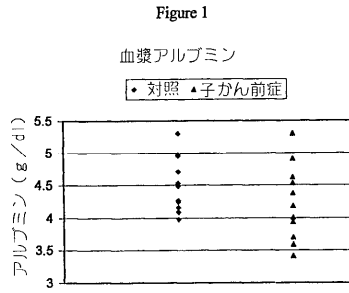
【図 10】 HDL 濃度を掛けた T x PA - S 比の商を T x PA - S 単独に代えてプロットしたことを除いて、図 9 と同様のプロットを表す。血液サンプルのこのセットは米国以外の女性の群由来であった。HDL がこれらの女性の分類に明らかな貢献をする上記観察は、上記サンプルを集めた世界の地域の作用か又は T x PA - S の計測についての新しい方法論のなくてはならない部分であるかのいずれかでありうる。

10

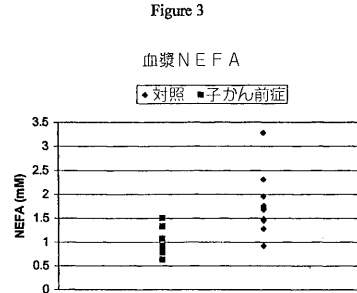
20

30

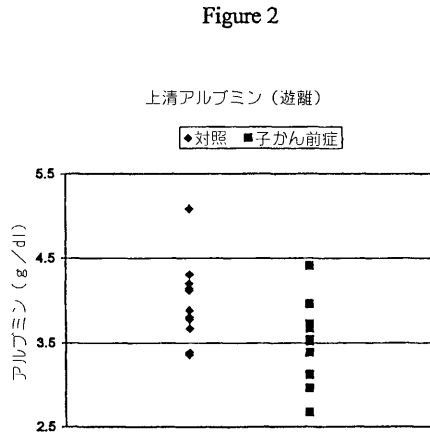
【 図 1 】



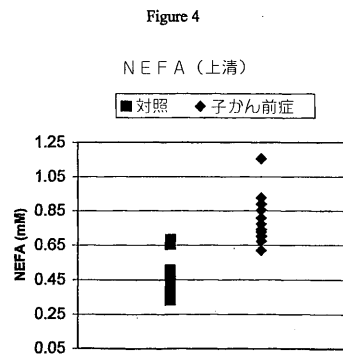
【 図 3 】



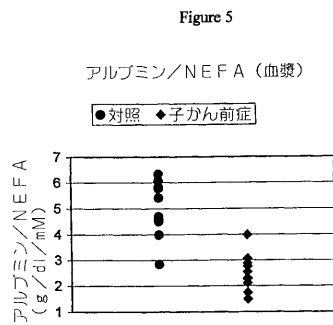
【 図 2 】



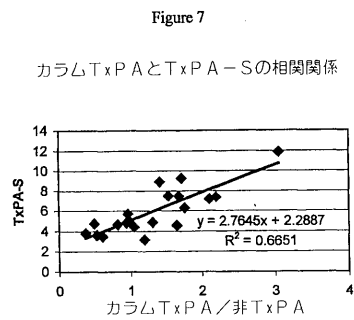
【 図 4 】



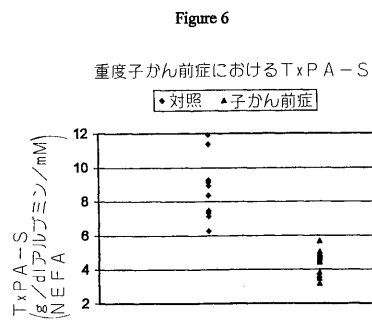
【 図 5 】



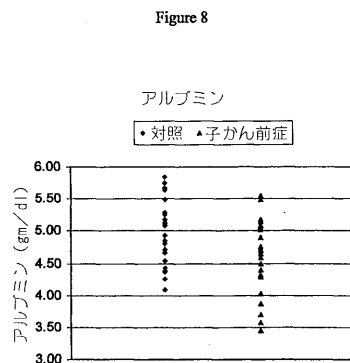
【 図 7 】



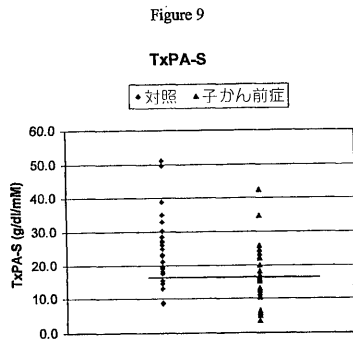
【 図 6 】



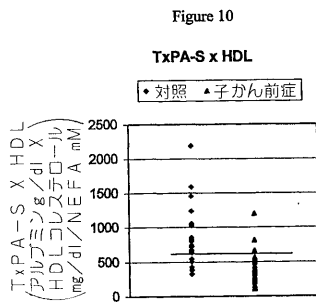
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>G 0 1 N 33/52</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/52	A
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
<b>G 0 1 N 33/92</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/92	C
		G 0 1 N 33/92	Z

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 アーボガスト, ブラッドリー ダブリュ .

アメリカ合衆国, テネシー 37601, ジョンソン シティ, ウッドランド アベニュー 1316

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開平04-084768(JP, A)

特開平02-222699(JP, A)

特開昭56-092456(JP, A)

特開昭60-058095(JP, A)

Jean-Louis Vigne, James T. Murai, Bradley W. Arbogast, Weiping JIA, Susan J. Fisher, and Robert N. Taylor, Elevated Nonesterified Fatty Acid Concentrations in Severe Preeclampsia Shift the Isoelectric Characteristics of Plasma Albumin, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 米国, The Endocrine Society, 1997年, Vol. 82 pp 3786 - 3792

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

C12Q 1/26

C12Q 1/28

C12Q 1/527

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	预测先兆子痫和其他疾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4813736B2</a>	公开(公告)日	2011-11-09
申请号	JP2001574480	申请日	2001-03-13
申请(专利权)人(译)	Abogasuto制药股份有限公司雷开球德		
当前申请(专利权)人(译)	Abogasuto制药股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	アーボガストブラッドリーダブリュ		
发明人	アーボガスト,ブラッドリー ダブリュ.		
IPC分类号	G01N33/66 C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/527 G01N33/50 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/92 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6842 G01N33/68 G01N33/92 G01N2333/76 Y10T436/106664		
FI分类号	G01N33/66 C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/527 G01N33/50.D G01N33/52.A G01N33/53.D G01N33/92.C G01N33/92.Z		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	09/540809 2000-03-31 US		
其他公开文献	JP2004500581A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

所公开的发明防止内皮细胞的破坏并防止血浆的细胞保护活性，其阻止许多疾病的发展，例如动脉粥样硬化，先兆子痫，水肿，肾病综合征和中风测量方法。在本发明中，通过测量表明患者血清中未与VLDL结合的pI5.6白蛋白（“游离pI5.6白蛋白”）浓度的值，可以降低血浆中pI5.6白蛋白浓度。包括诊断与相关疾病相关的患者趋势的方法。上述方法的优选实施方案用于体外方法以获得游离pI 5.6白蛋白的指示，而不是直接测量游离pI 5.6白蛋白浓度。

Figure 4

