

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4944868号  
(P4944868)

(45) 発行日 平成24年6月6日(2012.6.6)

(24) 登録日 平成24年3月9日(2012.3.9)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/68 (2006.01)** GO 1 N 33/68  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 D

請求項の数 17 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2008-303491 (P2008-303491)	(73) 特許権者	591003013
(22) 出願日	平成20年11月28日(2008.11.28)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(62) 分割の表示	特願2005-72768 (P2005-72768) の分割		F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT
原出願日	平成17年3月15日(2005.3.15)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツァーヘルストラツセ124
(65) 公開番号	特開2009-80130 (P2009-80130A)	(74) 代理人	100091096
(43) 公開日	平成21年4月16日(2009.4.16)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成20年11月28日(2008.11.28)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	04006080.8		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成16年3月15日(2004.3.15)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 容量過負荷の結果として心血管合併症に罹患するリスクを評価するための心臓ホルモンの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

将来的な血管内容量の増大の結果として、NYHA分類による心血管疾患の兆候を示さない、あるいは心血管合併症の病歴がない患者が、心血管合併症に罹患するリスクを診断するための分析方法であって、以下のステップ：

- (a) ナトリウム利尿ペプチドのレベルを *in vitro* で測定するステップ、
  - (b) 測定したレベルを、患者の種々の程度のリスクに関連した少なくとも1つの既知レベルと比較することによって、患者のリスクを診断するための分析ステップ、
- を含む、上記方法。

【請求項2】

ナトリウム利尿ペプチドがANP型ペプチドもしくはその変異体、および/またはBNP型ペプチドもしくはその変異体である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

ナトリウム利尿ペプチドがBNP型ペプチドまたはその変異体である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

BNP型ペプチドがNT-proBNPまたはその変異体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

男性患者における60を超え1000pg/ml未満のNT-proBNP血漿レベル

は心血管合併症の罹患リスクの増大と関連しており、前記リスクの増大は治療を適用しうることを示すものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

女性患者における 120 を超え 1000 pg/ml 未満の NT-proBNP 血漿レベルは心血管合併症の罹患リスクの増大と関連しており、前記リスクの増大は治療を適用しうることを示すものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

1000 ~ 5000 pg/ml の NT-proBNP 血漿レベルは心血管合併症に罹患する高リスクと関連しており、前記高いリスクは血管内容量の増大が許容できるかどうかを再考しうることを示すものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8】

5000 pg/ml を超える NT-proBNP 血漿レベルは心血管合併症に罹患する非常に高いリスクと関連しており、前記非常に高いリスクは何らかの血管内容量の増大が許容できるかどうかを再考しうることを示し、かつ即時の入院および/または心臓の集中的な治療を考慮しうることを示すものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

血管内容量の増大が疾患により生じるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

血管内容量の増大が、液体の注入もしくは輸液により、または薬剤の投与により人工的に生じるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 11】

薬剤が、以下：

- (a) 非ステロイド系抗リウマチ剤、
- (b) コルチコステロイド、
- (c) 糖尿病薬、
- (d) エストロゲン、
- (e) TNF インヒビター、
- (f) 選択的 Cox-2 インヒビター

からなる群より選択される、請求項 10 記載の方法。

30

【請求項 12】

心血管合併症が冠状動脈性心臓病、安定狭心症、急性冠症候群、不安定狭心症、心筋梗塞、左心室機能障害、鬱血性心不全、または肺鬱血である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

心血管合併症が肺鬱血である、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

ナトリウム利尿ペプチドレベルが、特異的に結合するリガンド、アレイ、微小流体装置、化学発光分析器、またはロボット装置を用いて測定される、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 15】

特異的に結合するリガンドが抗体またはアプタマーである、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

特異的に結合するリガンドが標識されている、請求項 14 または 15 記載の方法。

【請求項 17】

将来の血管内容量の増大の結果として、NYHA 分類による心血管疾患の兆候を示さない、あるいは心血管合併症の病歴がない患者が心血管合併症に罹患するリスクを診断するための、患者のナトリウム利尿ペプチドレベルを *in vitro* で測定可能な診断手段の使用。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、血管内容量過負荷の結果として心血管合併症に罹患するリスクを評価するための心臓のホルモンの使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

現代医療における目標の1つは、個人または個別対応の治療法を提供することである。これらは、患者の個々の必要性またはリスクを考慮に入れる治療法である。特に重要なリスクが心血管合併症、とりわけ認識されない心血管合併症の存在である。

10

## 【0003】

心血管合併症、特に心疾患は、西半球における罹患および死亡の主因である。心血管合併症は、長期間、無症候を維持することがある。したがって、心血管合併症に関しては、信頼性のある診断が一般に考えられているより困難でありかつ誤りやすいものである (Svendstrup Nielsen, L.ら (2003)、N-terminal pro-brain natriuretic peptide for discriminating between cardiac and non-cardiac dyspnoea, The European Journal of Heart Failure)。

## 【0004】

血管内容量のわずかな増加(容量過負荷)によって、心血管合併症となることがあり、それに続いて、心臓代償不全、さらには死亡にさえ至る可能性のあることが最近判明した。所望の効果であれ、または望ましくない副作用であれ、それにより多くの医薬品は体液鬱滞を引き起こす。これによって血管内容量が増加することがあり、次いでこれによって心血管合併症または既存の心血管合併症の悪化を引き起こされることがある。例えば、糖尿病薬であるピオグリタゾン、腎臓機能および心臓機能が弱い6人の男性で心不全および肺中体液の増量を引き起こしている (Reuters Health E-line 09/09/2003)。

20

## 【0005】

内在するが認識されない心疾患または肺疾患に罹っている患者では、赤血球(赤血細胞)1単位の輸血が急性呼吸器ストレス(呼吸困難)を誘起するのに十分であったと報告されている。同様に、血小板または血漿の輸血も容量過負荷を引き起こすと報告されている (Kleinman, S., Chan, P., et al (2003)、Risks associated with transfusion of cellular blood components in Canada, Transfusion Medicine Reviews 17(2):120~162)。

30

## 【0006】

現在、血管内容量の増加をもたらす治療を行う場合には、心疾患または高血圧についての既知の病歴をもつ患者のみが綿密なモニタリングを受けている。具体的には、一般開業医および非心臓内科医は、認識されない心血管障害を事前に特定する手段をもたないのである。

## 【0007】

従来技術では、容量過負荷に関連した心血管合併症のリスクをいかにして診断できるかに関して何らの示唆もない。特に、心血管合併症のいかなる既知の病歴ももたない患者において、いかにしてそのような診断ができるかに関しては、何の言及もなされていない。

40

【非特許文献1】Svendstrup Nielsen, L.ら (2003)、N-terminal pro-brain natriuretic peptide for discriminating between cardiac and non-cardiac dyspnoea, The European Journal of Heart Failure

【非特許文献2】Reuters Health E-line 09/09/2003

【非特許文献3】Kleinman, S., Chan, P., et al (2003)、Risks associated with transfusion of cellular blood components in Canada, Transfusion Medicine Reviews 17(2): 120~162

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

50

したがって、容量過負荷をもたらす治療を患者が受ける前に、その患者のリスクを特定する方法または手段が必要である。特に、適切な診断手段を提供する必要がある。特に、心血管合併症の病歴をもたない患者のリスクの特定を可能にする診断手段が必要である。また、この診断手段は信頼性があり、かつ一般開業医および非心臓内科医による使用に適すべきものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の目的は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断する方法であって、

(a) 患者の心臓ホルモン、特にナトリウム利尿ペプチドのレベルを、好ましくは *in vitro* で測定するステップ、

(b) 測定したレベルを、患者の様々な程度のリスクに関連した少なくとも1つの既知レベルと比較することによって、患者のリスクを診断するステップ

を含む方法により達成される。

【0010】

この方法は、患者の体液または組織試料を採取するステップを含んでもよい。本発明の範囲内では、体液または組織試料の採取は、非医療要員（すなわち、医師の職業を遂行するのに必要な教育を受けていない）でも実施できることが好ましい。これは、とりわけ身体試料が血液である際に適用されるものである。

【0011】

本発明の目的は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断するために、患者における心臓ホルモン、特にナトリウム利尿ペプチドのレベルを、好ましくは *in vitro* で測定する診断手段を使用することにより達成される。心臓ホルモンのレベルは、患者の体液または組織試料中で測定されることが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明は、容量過負荷を示しているか、または容量過負荷をもたらす薬剤投与もしくは治療を受けようとしている患者を、これらの患者が上記容量過負荷の結果として心血管合併症を発症するリスクに関してスクリーニングする単純かつ安価な方法および手段を提供する。本発明は、心血管合併症の明白な症候を示す患者、またはそのような症候を示さない患者における心血管合併症の存在または重篤度を示す心臓ホルモンレベルも提供する。

【0013】

ナトリウム利尿ペプチドの、分子マーカーまたは生化学的マーカーとしての使用は、それ自体が公知である。国際公開第W002/089657号では、心筋梗塞を診断するために、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）を測定することが提案されている。国際公開第W002/083913号では、非ST上昇型急性冠症候群を患う患者における、短期間罹患率または死亡率を予測するのにBNPを用いることが提案されている。

【0014】

本発明は、特に、心臓内科医による大規模な心疾患学的試験を頻繁に利用する手段をもたない一般開業医、専門医師、および専門病棟、専門部局、または専門医院に有用である。本発明は、そのような非心臓内科医に、複数の患者の中から、血管内容量の増加の結果として心血管合併症を罹患するリスクにさらされている患者を見つけるための単純かつ信頼性のあるスクリーニング方法および手段を提供する。

【0015】

本発明は、特定の生化学マーカーまたは分子マーカーを利用する。「生化学マーカー」および「分子マーカー」という用語は、当業者にとって公知である。詳細には、生化学マーカーまたは分子マーカーとは、ある特定の状態、疾患、または合併症の存在下または非存在下に特異的に発現される（すなわち、アップレギュレートされるか、またはダウンレギュレートされる）遺伝子発現産物である。通常、分子マーカーは核酸（mRNAなど）と定義され、生化学マーカーは、タンパク質またはペプチドである。適当な生化学マーカー

10

20

30

40

50

—または分子マーカーは、そのレベルによって、状態、疾患、または合併症の存在または不在を指示でき、これによって診断を可能にする。

【0016】

詳細には、本発明は、生化学マーカーとして心臓ホルモンを利用し、より詳細にはナトリウム利尿ペプチドを利用する。また、本発明には任意の心臓ホルモンまたはナトリウム利尿ペプチドの組合せを生化学マーカーとして利用することも包含される。

【0017】

本発明において心臓ホルモンには、ナトリウム利尿ペプチドおよびウロテンシンが含まれる。特に、本発明において心臓ホルモンは、ナトリウム利尿ペプチドである。

【0018】

本発明において使用するナトリウム利尿ペプチドには、ANP型ペプチドおよびBNP型ペプチド、ならびにその変異体が含まれる(例えば、Bonow,R.O(1996)、New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93:1946~1950を参照)。

【0019】

ANP型ペプチドには、プレプロANP、プロANP、NT-proANP、およびANPが含まれる。BNP型ペプチドには、プレプロBNP、プロBNP、NT-proBNP、およびBNPが含まれる。

【0020】

プレプロペプチド(プレプロBNPの場合には134アミノ酸)は、短いシグナルペプチドを含み、このシグナルペプチドは、酵素により切断されて、プロペプチド(プロBNPの場合には108アミノ酸)を遊離する。このプロペプチドがさらにN端プロペプチド(NT-プロペプチド、NT-proBNPの場合には76アミノ酸)と、活性ホルモン(BNPの場合には32アミノ酸、ANPの場合には28アミノ酸)とに切断される。

【0021】

NT-proBNPを用いれば前分析がより着実なものとなり、中央試験室への試料の輸送が簡単になる(Mueller T、Gegenhuber A、Dieplinger B、Poelz W、Haltmayer M、Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples、Clin Chem Lab Med、2004年、42:942~4)。血液試料は室温で数日間保存することもできるし、または回収の損失なしに郵送もしくは出荷することもできる。対照的に、BNPを室温または4℃で48時間保存した場合には、少なくとも20%の濃度喪失が生じる(Mueller T、Gegenhuber A、et al、Clin Chem Lab Med 2004;42:942~4、前掲;Wu AH、Packer M、Smith A、Bijou R、Fink D、Mair J、Wallentin L、Johnston N、Feldcamp CS、Haverstick DM、Ahnadi CE、Grant A、Despres N、Bluestein B、Ghani F、Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study、Clin Chem 2004年、50:867~73)。

【0022】

本発明において好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT-proANP、ANP、NT-proBNP、BNP、およびこれらの変異体である。ANPおよびBNPは活性ホルモンであり、これらそれぞれの不活性対応物であるNT-proANPおよびNT-proBNPより短い半減期をもつ。したがって、目的の経過に応じて、活性形態における測定が有利となる場合と、不活性形態における測定が有利となる場合とがある。本発明において最も好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT-proBNPおよびその変異体である。

【0023】

本明細書においては、「変異体」という用語は、上記のペプチドに実質上類似したペプチドに関するものである。当業者にとって、「実質上類似」という用語は周知である。詳細には、変異体とは、ヒト集団における最も一般的なペプチドアイソフォームのアミノ酸配列と比較した際に、アミノ酸の交換を示すアイソフォームまたはアレルの場合がある。好ましくは、そのような実質上類似したペプチドは、そのペプチドの最も一般的なアイソ

10

20

30

40

50

フォームに対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列類似性を有する。本発明の診断手段によって、またはそれぞれの完全長ペプチドに対するリガンドによってなおも認識されるタンパク分解性分解産物も、実質上類似したペプチドである。

【0024】

「変異体」という用語は、グリコシル化されたペプチドなど、翻訳後修飾されたペプチドにも関する。試料採取後に、例えば標識の付加によって、詳細には放射性標識または蛍光標識の、ペプチドへの共有結合性または非共有結合性の付加によって修飾されたペプチドも、「変異体」の1つである。

【0025】

本発明の他の実施形態は、様々な心臓ホルモンを組み合わせ、同時または非同時に測定することを含む。例えば、様々な心臓ホルモンを測定することによって、例えば、血管内容量増加の経過に関する情報など、重要な追加情報を得ることができる。例えば、NT-proBNPのレベルは、NT-proANPのレベルよりゆっくり上昇する。他方で、容量増加後におけるNT-proBNPのレベルは、NT-proANPのレベルより長い期間、高いまま維持される（実施例2を参照）。したがって、本発明は、ANP型ペプチドまたはその変異体と、BNP型ペプチドまたはその変異体との両方を測定することにも関する。本発明は、血管内容量の増加が開始した少なくとも6時間後に、NT-proBNPのレベルを測定することにも関する。本発明は、血管内容量の増加が開始した2から5時間後に、NT-proANPのレベルを測定することにも関する。

【0026】

本発明による診断には、関連するリスク、疾患、または合併症の、判定、モニタリング、確認、細分類、および予測が含まれる。判定は、リスク、疾患、または合併症の存在を認識することに関する。モニタリングは、例えばリスク、疾患、または合併症の進行、あるいはリスク、疾患、または合併症の進行に対する特定の治療の効果を分析するために、既に診断されたリスク、疾患、または合併症の動向を把握することに関する。確認は、既に行われた診断を、他の指標またはマーカーを用いて強化または実証することに関する。細分類は、診断されたリスク、疾患、または合併症の種々のサブクラスに従って、診断をさらに詳しく特定すること、例えばリスク、疾患、または合併症の軽度な形態、および重度な形態に応じた特定を行うことに関する。予測は、他の症候もしくはマーカーが自明になるか、または有意に変化する前に、リスク、疾患、または合併症を予測することに関する。

【0027】

心血管疾患に罹患した個体は、安定狭心症(SAP)を罹患する個体である可能性があり、さらに急性冠症候群(ACS)を罹患する個体である可能性もある。ACS患者は、不安定狭心症(UAP)を示す可能性があり、そうでなければ、これらの個体は既に、心筋梗塞(MI)に罹っているかもしれない。MIは、ST上昇型MIである可能性も、非ST上昇型MIである可能性もある。MIの発症に続いて、左心室機能障害(LVD)が発症することがある。最後に、LVD患者は、約15%の死亡率で鬱血性心不全(CHF)を発症する。

【0028】

心血管疾患は、ニューヨーク心臓協会(New York Heart Association、NYHA)による機能的分類システムで分類されている。クラスIの患者は、心血管疾患のいかなる明白な症候も示さない。身体的活動が制限されず、通常の身体的活動によって過度の疲労、動悸、または呼吸困難(呼吸の短縮)が生じない。クラスIIの患者は、身体的活動にわずかな制限を受ける。患者は安静時には快適であるが、通常の身体的活動によって疲労、動悸、または呼吸困難がある。クラスIIIの患者は、身体的活動に著しい制限を受ける。患者は安静時には快適であるが、通常の活動より軽い身体的活動によって疲労、動悸、または呼吸困難が起こる。クラスIVの患者は、不快感なしにはいかなる身体的活動も実行できない。患者は安静時にも心不全の症候を示し、いかなる身体的活動が実行された場合にも

10

20

30

40

50

、不快感が増強する。

【0029】

これに従って、患者は、臨床的症候を示さない個体と、症候（例えば、呼吸困難）を示す患者とに分けることができる。

【0030】

「左心室駆出分画率」（LVEF）は、「駆出率」としても知られ、心血管疾患の別の特性となりうる。健康な心臓をもつ人々は、通常、健全なLVEFを有し、これは通常50%を越えると説明される。徴候的な収縮期性心疾患に罹る人々のほとんどが、通常40%以下のLVEFを有する。

【0031】

本発明は、血管内容量増加の結果として発症する「心血管合併症」に関する。

【0032】

本発明による「心血管合併症」は、いかなる心血管疾患、事象、または、いかなる二次合併症にも関するものであり、例えば、肺鬱血、すなわち鬱血肺（例えば、左心室不全の結果発症しうる）にも関する。

【0033】

詳細には、「心血管合併症」は、冠状動脈性心臓病、SAP、ACS、UAP、MI、ST上昇型MI、非ST上昇型MI、LVD、CHF、および肺鬱血に関する。

【0034】

より詳細には、「心血管合併症」は、ACS、UAP、MI、ST上昇型MI、非ST上昇型MI、LVD、CHF、および肺鬱血に関する。

【0035】

本発明において心血管合併症は、症候、特にNYHAクラスII～IVの症候、より詳細にはNYHAクラスIII～IVの症候を引き起こすものでもよい。

【0036】

心血管合併症は、40%以下のLVEFを伴うものであってもよい。

【0037】

心血管合併症は、「代償性」であっても、「非代償性」であってもよい。代償性とは、身体における通常の酸素需要を満たすことがまだできることを意味し、一方、非代償性とは、身体における通常の酸素需要が既に満たされていないことを意味する。

【0038】

本発明によれば、「心血管合併症に罹患する」ということには、既存の心血管合併症の悪化が含まれる。

【0039】

本発明によれば、「患者」という用語は、健康な個体、明らかに健康な個体、または、特に疾患に罹っている個体に関する。詳細には、患者は、糖尿病（糖尿病I型またはII型）、リウマチ、リウマチ関節炎、炎症性疾患、または癌に罹っているか、またはその治療を受けている。さらにより詳細には、患者は、心血管合併症のいかなる既知な病歴もなく、かつ/または心血管合併症の症候を示さないか、わずかに（NYHAクラスIまたはII）のみ示し、かつ/または心血管合併症の治療を受けていない。しかし、心血管合併症の徴候または病歴をまったくもたない健常ボランティアも、本発明において患者であるとみなされる。

【0040】

患者としては、血管内容量が増加しているか、または増加すると予想される患者であることが好ましい。血管内容量の増加は既に起こっていてもよく、または、将来起こることもよい。

【0041】

血管内容量とは、細胞性（例えば、赤血球）および非細胞性（血漿）血液成分の全容積に関する。成体個体の血管内容量は通常4から6リットルの範囲にある。

【0042】

10

20

30

40

50

本発明によれば、血管内容量の増加とは、患者の血管内容量の少なくとも5%、詳細には少なくとも10%、およびより詳細には少なくとも20%の血管内容量の増加に関する。例えば、血液1単位(500ml、これは血管内容量における約10%の増加に等しい)、特に少なくとも2単位、より特別には少なくとも3単位の増量は、本発明による血管内容量の増加であるとみなされる。

【0043】

「一時的」な血管内容量増加とは、所与の期間中に一度だけ存在する血管内容量増加である。これは、血管内容量の増加と、血管内容量増加の開始後短時間内、詳細には12時間以内、より詳細には6時間以内、および最も詳細には30分以内に、それに続いて起こる、ほぼ標準値までの減少とを特徴とする。

10

【0044】

血管内容量の増加は、「一時的」な血管内容量の増加よりゆっくり現れて、より長時間にわたって、例えば1日間、数日間、または何週間も存在している場合、「持続性」であるとみなされる。

【0045】

一時的な血管内容量増加の典型的な例には、液体の経口投与と、注入または輸液とが含まれる。例えば、飲水、スープの飲食、血漿の注入、栄養物の非経口投与、および輸血は、通常一時的な血管内容量増加を引き起こす。

【0046】

「注入」には、血液、血漿、赤血球、血小板、電解質、抗生物質もしくは他の薬剤、または栄養物の非経口または静脈内の注入が含まれるが、これらに限定されるものではない。「輸液」には、特に血液、血漿、赤血球、血小板、または電解質の輸液が含まれる。

20

【0047】

持続性増加の例には、液体の定常的静脈内投与と、とりわけ、水分貯留を引き起こす薬剤の投与とが含まれる。

【0048】

持続性の血管内容量増加は、少量でさえ、相当な緊張を心血管系にもたらしうる。したがって、持続性の血管内容量増加は、患者に対してとりわけ危険となりうる。持続性の血管内容量増加は、例えば、利尿剤の使用によって、終止または治療されることがある。治療の選択肢のさらに別の例を、以下に示す。

30

【0049】

どのような状況下で、心血管合併症が血管内容量増加の「結果」として発症したとみなされることがあるかは、当業者に公知である。詳細には、心血管合併症が一時的な血管内容量増加の開始後1日以内、詳細には12時間以内、より詳細には4時間以内に発症した場合に、それは血管内容量の増加の結果として発症したとみなされる。あるいは、心血管合併症が持続性血管内容量の増加の開始後1日以内、数日以内、または数週間以内に発症した場合にも、それは血管内容量増加の結果として発症したとみなされる。

【0050】

血管内容量の増加は、疾患によって引き起こされても、人工的に引き起こされてもよい。血管内容量の増加を引き起こす疾患の例には、敗血症と、血管内タンパク質濃度の増加を引き起こす疾患(例えば、免疫グロブリン血症)とが含まれる。

40

【0051】

敗血症、すなわち血液中毒は、水分平衡の重大な攪乱を導くことがある。血管内容量の減少に続いて血管内容量の増加が起きることがあり、およびその逆が起きることもあるが、これらはしばしば迅速に交替しながら起こりうるものである。さらに治療では、大量の液体(最大数リットル)を注入する必要があることでもある。本発明は、血管内容量の増加の結果として発症するいかなる心血管合併症のリスクも、詳細にモニターできるようにするものである。したがって、原疾患の治療をこのリスクに調整することも、それに付随して心血管薬を投与することもできる。本発明において心臓ホルモンのレベルを測定することによって、失った血管内容量の置換、または血管収縮薬の投与による影響を詳細にモ

50

ニターすることができる。

【 0 0 5 2 】

人工的な血管内容量の増加は、内科療法によるものでも、実験的治療によるものでもよい。

【 0 0 5 3 】

血管内容量増加をもたらす内科療法には、液体の経口投与、注入、輸液、および水分貯留を引き起こす薬剤の投与が含まれる。

【 0 0 5 4 】

薬剤の投与によって引き起こされる血管内容量増加の進行は、注入、輸液、または経口投与された液体によって引き起こされる増加より、通常、長時間を要する。すなわち、薬剤は通常ゆっくりだが持続性の容量増加を誘導し、一方、注入、輸液、または経口投与された液体は、急速ではあるが一時的な容量増加を引き起こす。

【 0 0 5 5 】

水分貯留を引き起こす薬剤は、当業者に公知である。詳細には、そのような薬剤には、抗炎症薬（非ステロイド系抗リウマチ剤、C o x - 2 インヒビター、特に選択的C o x - 2 インヒビター、コルチコステロイドを含む）、糖尿病薬、エストロゲン、およびT N F インヒビターが含まれる。

【 0 0 5 6 】

抗炎症薬の例（非ステロイド系抗リウマチ剤（非ステロイド系抗炎症薬とも呼ばれる）を含む）には、アルクロフェナック；ジプロピオン酸アルクロメタゾン；アルゲストンアセトニド；アルファアミラーゼ；アムシナファル（Amcinafal）；アムシナフィド（Amcinafide）；アンフェナクナトリウム；塩酸アミプリロース；アナキンラ；アニロラク（Anirolac）；アニトラザフェン（Anitrazafen）；アパゾン；バルサラジドニナトリウム；ベンダザック；ベノキサプロフェン；塩酸ベンジダミン；プロメライン；プロペラモール（Properamol）；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロフェン（Cicloprofen）；シントゾン（Cintazone）；クリプロフェン（Cliprofen）；プロピオン酸クロベタゾール；酪酸クロベタゾン；クロピラク（Clopirac）；プロピオン酸クロチカゾン（Cloticasone Propionate）；酢酸コルメタゾン（Cormethasone Acetate）；コルトドキソン；C o x - 2 インヒビター（特に特異的または「選択的」C o x - 2 インヒビター、より詳細にはセレコキシブ、ロフェコキシブ（バイオックス））；デフラザコルト；デソニド；デソキシメタゾン；ジプロピオン酸デキサメタゾン；ジクロフェナク；ジクロフェナクカリウム；ジクロフェナックナトリウム；酢酸ジフロラゾン；ジフルミドンナトリウム（Diflumidone Sodium）；ジフルニサル；ジフルブレドナート；ジフタロン；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド（Drocinnonide）；エンドリゾン（Endrysone）；エンリモマブ（Enlimomab）；エノリカムナトリウム（Enolicam Sodium）；エピリゾール；エトドラク；エトフェナメート（Etofenamate）；フェルピナク；フェナモール（Fenamole）；フェンブフェン；フェンクロフェナック；フェンクロラック（Fenclorac）；フェンドサル（Fendosal）；フェンピパロン（Fenpipalone）；フェンチアザク；フラザロン（Flazalone）；フルザコート（Fluazacort）；フルフェナム酸；フルミゾール；酢酸フルニソリド；フルニキシン；フルニキシメグルミン；フルオコルチンブチル（Fluocortin Butyl）；酢酸フルオロメトロン；フルカゾン（Fluquazone）；フルルビプロフェン；フルレトフェン（Fluretofen）；プロピオン酸フルチカゾン；フラプロフェン（Furaprofen）；フロブフェン；ハルシノニド；プロピオン酸ハロベタゾール；酢酸ハロブレドン；イブフェナック；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ（Ilonidap）；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン；インドキソール（Indoxole）；イントラゾール（Intrazole）；酢酸イソフルブレドン；イソクセパック（Isoxepac）；イソキシカム；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール（Lofemizole Hydrochloride）；ロルノキシカム；エタボン酸ロテプレドノール；メクロフェナム酸ナトリウム；メクロフェナム酸；ブチル酸メクロリゾン（Meclorison Dibutyrate）；メフェナム酸；メサラミン；メセクラゾン；スレプタン酸メチルブレドニゾロン；モルニフルメ

10

20

30

40

50

ート (Morniflumate) ; ナブメトン ; ナプロキセン ; ナプロキセンナトリウム ; ナプロキソール (Naproxol) ; ニマゾン (Nimazone) ; オルサラジンナトリウム ; オルゴテイン ; オルパノキシム (Orpanoxin) ; オキサプロジン ; オキシフェンブタゾン ; 塩酸パラニリン (Paranyline Hydrochloride) ; ペントサン多硫酸ナトリウム ; フェンブタゾンナトリウムグリセレート (Phenbutazone Sodium Glycerate) ; パーフェニドン ; ピロキシカム ; ケイ皮酸ピロキシカム ; ピロキシカムオラミン ; ピルプロフェン ; プレドナゼート (Prednazate) ; プリフェロン (Prifelone) ; プロドリックアシッド (Prodolic Acid) ; プロクアゾン (Proquazone) ; プロキサゾール (Proxazole) ; クエン酸プロキサゾール (Proxazole Citrate) ; リメキソロン (Rimexolone) ; ロマザリツ (Romazarit) ; サルコレックス (Salcolex) ; サルンアセジン (Salnacedin) ; サルサラート ; サリチル酸 ; 塩酸化サンギナリウム (Sanguinarium Chloride) ; セクラゾン (Seclazone) ; セルメタシン (Sermetacin) ; スドキシカム (Sudoxicam) ; スリンダク ; スプロフェン ; タルメタシン (Talmetacin) ; タルニフルメート (Talniflumate) ; タロサレート (Talosalate) ; テブフェロン (Tebufelone) ; テニダップ ; テニダップナトリウム ; テノキシカム ; テシカム (Tesicam) ; テシミド (Tesimide) ; テトリダミン (Tetrydamine) ; チオピナク (Tiopinac) ; ピバル酸チクソコルトール ; トルメチン ; トルメチンナトリウム ; トリクロナイド (Triclonide) ; トリフルミデート (Triflumidate) ; ジドメタシン (Zidometacin) ; およびゾメピラックナトリウムが含まれる。

10

## 【 0 0 5 7 】

コルチコステロイドの例には、コルチゾン ; フルオコルトロン ; ヒドロコルチゾン ; メチルプレドニゾロン ; プレドニゾロン ; プレドニソン ; およびプレドニリデンが含まれる。

20

## 【 0 0 5 8 】

糖尿病薬の例には、チアゾリジンジオン (thiazolidinedone) 、例えばグリタゾン ; メジオン (medione) ; ピオグリタゾン ; ロシグリタゾン ; およびトログリタゾンが含まれる。また、インスリン、スルホニル尿素、およびメトホルミンなどの薬剤の組合せも、本発明において使用する糖尿病薬である。

## 【 0 0 5 9 】

エストロゲンは、天然、合成、結合型、または非結合型でもよい。エストロゲンの例には、エストラジオール ; エストリオール ; 吉草酸エストラジオール ; エストロン ; エチニルエストラジオール ; およびメストラノールが含まれる。

30

## 【 0 0 6 0 】

TNF インヒビターの例には、エタネルセプトおよびインフリキシマブが含まれる。

## 【 0 0 6 1 】

選択的 Cox - 2 インヒビターによって心血管合併症を起こすことがあり、それに続いて、心臓代償不全、さらには死亡さえ起こりうるということが最近判明した。最近のある試験では (APPROVE 試験 (バイオックスによる腺腫性ポリープ予防))、25 mg のロフェコキシブを用いた場合、初期観察後フェーズにでさえ、プラセボより高い血圧レベルにあることが判明した。結腸腺腫の二次予防に関するこの試験には、認識可能な心血管リスクがない患者のみが含まれていた。

40

## 【 0 0 6 2 】

「非ステロイド系抗リウマチ剤」 (非ステロイド系抗炎症薬または NSAID と呼ばれる) という用語は、当業者に公知である。NSAID は、シクロオキシゲナーゼ (プロスタグランジン H シンテターゼとしても知られる) を阻害する。シクロオキシゲナーゼは、アラキドン酸からプロスタグランジン H<sub>2</sub> (環状エンドペルオキシド) への反応を触媒し、プロスタグランジン H<sub>2</sub> は、プロスタグランジン I<sub>2</sub> (プロスタサイクリンとしても知られる) 、トロンボキサン A<sub>2</sub>、および他のプロスタグランジンの前駆体である。プロスタグランジンは、痛覚、熱、および炎症反応で重要な役割を果たしている。シクロオキシゲナーゼには、Cox - 1 および Cox - 2 の 2 つのアイソフォームがある。Cox - 2 遺伝子は、即時型遺伝子であり、組織障害、疼痛反応、または炎症反応の状態下で誘導

50

される。したがって、NSAIDには、Cox-1インヒビターおよびCox-2インヒビターが含まれる。NSAIDは、両アイソフォームを阻害するものでも、または1つのアイソフォームに選択的な（すなわち、治療量において、それらは2つのアイソフォームのうち1つのみを阻害する）ものでもよい。

【0063】

非特異的なNSAIDの例には、イブプロフェン；フルルピプロフェン；ナプロキセン；フルフェナム酸；メフェナム酸；ピロキシカム；ジクロフェナク；フェンブタゾンナトリウムグリセレート（Phenbutazone Sodium Glycerate）；インドメタシン；テノキシカムが含まれる。

【0064】

本発明において使用する選択的Cox-2インヒビターは、治療条件下でCox-2の発現または、好ましくは、酵素機能を阻害するが、Cox-1の発現または、好ましくは、酵素機能を有意に阻害しない化合物である。

【0065】

選択的Cox-2インヒビターの例には、コキシブ（例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、エトリコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ（バルデコキシブのプロドラッグ）、ルミラコキシブ）、メクロフェナム酸、スリンダク硫化物、ジクロフェナク、ニメスリド、メロキシカム、エトドラク、NS398、L-745337、DFP（3-（2-プロピルオキシ）-4-（4-メチルスルホニルフェニル）-5,5ジメチルフラノン）が含まれる。最後の3つの化合物は、Warner,T.D.ら、1999年に記載されている。

【0066】

2つのシクロオキシゲナーゼの酵素機能は、適当な*in vivo*または*in vitro*試験を含めた、当技術分野で公知の方法で測定できる。Cox-1酵素機能の典型的なマーカーは、トロンボキサンA<sub>2</sub>の生成であり、一方、Cox-2酵素機能の典型的なマーカーは、プロスタグランジン（例えば、マクロファージからのプロスタグランジンE<sub>2</sub>）の生成である。

【0067】

適当な試験系の例は公表されている（例えば、Warner,T.D.、Giuliano,F.、Vojnovic,I.ら（1999）、Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity:A full *in vitro* analysis、Proceedings of the National Academy of Sciences USA、96巻、7563~7568頁、関連の訂正が96巻(17)、9966d頁に掲載）。このアッセイはWilliam Harvey修正アッセイと呼ぶことにする。このアッセイは、上記Warner,T.D.ら、7563~4頁に詳細に記載されており、その記載を参照により本明細書に明示的に組み込む。

【0068】

本発明による選択的Cox-2インヒビターは、好ましくは、William Harvey修正アッセイに従った場合に、5倍を越えるCox-2選択性を有し、より好ましくは、William Harvey修正アッセイに従った場合に、50倍を越えるCox-2選択性を有する（上記Warner,T.D.ら、7567頁の図3を参照）。

【0069】

あるいは、本発明による選択的Cox-2インヒビターは、好ましくはCox-2に対してジクロフェナクより選択的、より好ましくはCox-2に対してニメスリドより選択的、さらにより好ましくは、治療条件下でCox-2に対して少なくともセレコキシブと同程度に選択的な化合物である。

【0070】

別の好ましい実施形態では、本発明は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断する方法および手段であって、上記血管内容量増加が液体の注入もしくは輸液、または「コキシブ」類の投与によって人工的に引き起こされる方法および手段に関する。コキシブ類の例には、セレコキシブ（セレブレックス(商標)、Pfizer社）、ロフェコキシブ（バイオックス(商標)、Merck社）、エトリコキシブ、バルデコキ

10

20

30

40

50

シブ、パレコキシブ（バルデコキシブのプロドラッグ）、ルミラコキシブ（プレキシジ（商標）、Novartis社）が含まれる。他の同様の化合物も本発明の範囲に包含され、それらのうちいくつかは、開発および試験の過程にある。

【0071】

また、実験的治療が血管内容量の増加につながることもある。とりわけ、身体を傾斜させることは、血管内容量の増加をシミュレートし、心臓ホルモンの遊離を導くことができる。したがって、本発明は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断する方法であって、心臓ホルモン、好ましくはナトリウム利尿ペプチドを測定する前に患者を傾斜させる追加ステップを含む方法にも関する。傾斜させることは、本発明に係る診断方法と併せて、慎重に制御された医学環境における、心血管合併症に罹患するリスクの診断を可能にするものである。傾斜させることによって生じる心血管系の緊張は可逆的であるため、傾斜させる操作は、貴重な診断情報を安全な実験設定で提供することができる。

10

【0072】

傾斜させることは、健常ボランティアが心血管合併症に罹患するリスクを評価するのにも役立つ。詳細には、傾斜させる操作は、パイロット、スカイダイバー、バンジージャンパー、宇宙飛行士など、血圧または血中分布の急激な変化を経験する人々の身体試験に有用となりうる。

【0073】

本発明によれば、傾斜させるとは、立位または仰臥位での血液分布と比較して、血液を上半身に再分布させることができるいかなる手段にも関する。例には、身体を、頭を下にして傾斜させること、重力または遠心力の使用、および加圧服の使用が含まれる。

20

【0074】

詳細には、傾斜させることは、患者の身体を、頭を下にして、5～90°、好ましくは10～30°、より好ましくは10～20°、最も好ましくは15°傾斜させることに関する。対照として、傾斜プロトコールは、患者の身体を、足を下にしてそれぞれの傾斜角度で傾斜させることを含んでもよい。

【0075】

本発明に係る診断は、診断手段を用いて行うことが好ましい。診断手段とは、目的の物質、詳細には目的のペプチドまたはポリペプチド、より詳細には心臓ホルモンのレベル、量、または濃度の測定を可能にするいかなる手段でもよい。

30

【0076】

別の実施形態では、本発明は、容量過負荷を引き起こす注入、輸液、または薬剤の患者への投与を決定する方法であって、(a)患者の心臓ホルモンのレベルを、好ましくは *in vitro* で、測定するステップ、b)測定したレベルを、患者の様々な程度のリスクに関連した少なくとも1つの既知レベルと比較するステップ、(c)場合により、心臓内科医による患者の検査を開始するステップ、および(d)場合により心臓内科医による患者の検査の結果を考慮に入れて、注入、輸液、または薬剤の投与を推奨するまたは回避することを含む方法に関する。本明細書において前述したように、この方法が本発明のすべての実施形態に適合させるものであることは自明である。詳細には、この方法は、容量過負荷を引き起こす薬剤の患者への投与を決定するものであり、この薬剤は選択的Cox-2インヒビターである。さらに、好ましい心臓ホルモンは、BNP型ペプチド、特にBNPまたはNT-proBNPである。

40

【0077】

注入、輸液、または薬剤の投与を推奨または回避することは、測定したレベルを、少なくとも既知のレベルと比較することによって示されるリスクに基づくことが好ましい。前述したように、測定レベルによって、リスクの増加が示されない場合には、治療を推奨してもよい。注入、輸液、または薬剤の投与の推奨は、もう一方の心血管リスク因子（例えば、フラミンガムスコア、これは心臓内科医にとって周知である）も、心血管合併症に罹るリスクが低いことを示す場合に行われることが好ましい。測定レベルが増加したリスク

50

を示す場合に投与が推奨されることもあるが、この場合、本発明の心臓ホルモンのレベルをさらに測定し、心電図記録法、心エコー法、熟練した心臓内科医に公知の任意の他の適当な方法などの別の診断を次に行う（すなわち、「モニターする」）ことが好ましい。測定レベルが高度に、または極めて高度に増加したリスクを示す場合には、注入、輸液、または薬剤の投与を回避することが好ましい。

**【0078】**

場合により、患者は心臓内科医による検査を受ける。この検査は、測定レベルが高リスク、非常に高いリスク、または極めて非常に高いリスクを示す場合に、行われることが好ましい。心臓内科医は、公知でありかつ適切であると考えられるいかなる方法または手段によって患者を検査してもよい。本発明に従って示されるリスクと、心臓内科医による試験の結果とを考慮して、注入、輸液、または薬剤の投与を推奨するまたは回避してもよい。

10

**【0079】**

それぞれのペプチドレベルを測定するのに使用できる方法および診断手段は当業者に公知である。これらの方法には、マイクロプレート E L I S A に基づく方法、完全自動化イムノアッセイまたはロボットイムノアッセイ（例えば、Elecsys(商標)分析器が利用可能）、C B A（酵素コバルト結合アッセイ、例えば、Roche-Hitachi(商標)分析器が利用可能）、およびラテックス凝集反応（例えば、Roche社-Hitachi(商標)分析器が利用可能）が含まれる。

**【0080】**

さらに、当業者ならば、ペプチドまたはポリペプチドのレベルを測定する様々な方法に精通している。「レベル」という用語は、患者体内または患者から採取された試料中のペプチドまたはポリペプチドの量または濃度に関する。

20

**【0081】**

本発明による「測定」という用語は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、または他の目的の物質の量または濃度を、好ましくは半定量的または定量的に、決定することに関する。測定は、直接的にでも、間接的にでも行うことができる。間接的な測定には、細胞応答、結合リガンド、標識、または酵素反応生成物の測定が含まれる。

**【0082】**

本発明に関しては、量は濃度にも関する。既知のサイズの試料中における、目的の物質の総量から、その物質の濃度が計算できること、また、この逆も同様であることは自明である。

30

**【0083】**

測定は、当技術分野で公知のいかなる方法で行うこともできる。好ましい方法を以下に記載する。

**【0084】**

好ましい実施形態では、目的のペプチドまたはポリペプチド、詳細には心臓ホルモンのレベルを測定する方法は、（a）上記ペプチドまたはポリペプチドに対し細胞応答しうる細胞を、適当な時間、上記ペプチドまたはポリペプチドと接触させるステップと、（b）上記細胞応答を測定するステップとを含む。

40

**【0085】**

別の好ましい実施形態では、目的のペプチドまたはポリペプチド、詳細には心臓ホルモンのレベルを測定する方法は、（a）ペプチドまたはポリペプチドを、十分な時間、適当な基質と接触させるステップと、（b）産物の量を測定するステップとを含む。

**【0086】**

別の好ましい実施形態では、目的のペプチドまたはポリペプチド、特に心臓ホルモンのレベルを測定する方法は、（a）ペプチドまたはポリペプチドを、特異的な結合リガンドと接触させるステップと、（b）（場合により）非結合リガンドを除去するステップと、（c）結合したリガンドの量を測定するステップとを含む。

**【0087】**

50

このペプチドまたはポリペプチドは、試料中、特に体液または組織試料中に含有されて、試料中のペプチドまたはポリペプチドの量が測定されることが好ましい。

【0088】

ペプチドおよびポリペプチド（タンパク質）は、組織、細胞、および体液試料中、すなわち、好ましくは *in vitro* で、測定することができる。目的のペプチドまたはポリペプチドは、体液試料中で測定されることが好ましい。

【0089】

本発明において組織試料は、ヒトまたは動物の死体または生体から得られるいかなる種類の組織も指す。組織試料は、当業者に公知のいかなる方法でも、例えば生検または搔爬術によって得ることができる。

【0090】

本発明において体液には、血液、血清、血漿、リンパ液、脳液、唾液、および尿が含まれうる。詳細には、体液には、血液、血清、血漿、および尿が含まれる。体液試料は、当技術分野で公知のいかなる方法で入手することもできる。

【0091】

細胞試料を入手する方法には、単一細胞または小細胞群の直接的調製、組織の解離（例えば、トリプシンを用いる）、および、例えば濾過または遠心による、体液からの細胞の分離が含まれる。本発明による細胞には、血小板および他の非核細胞、例えば赤血球も含まれる。

【0092】

必要な場合、試料はさらに処理されてもよい。詳細には、核酸、ペプチド、またはポリペプチドは、濾過、遠心法、またはクロロホルム/フェノール抽出などの抽出法を含めた、当技術分野で公知の方法に従って、試料から精製してもよい。

【0093】

細胞応答を測定するには、試料または処理された試料を、細胞培養に添加し、細胞内外の応答を測定する。細胞応答には、リポーター遺伝子の発現、または物質、例えば、ペプチド、ポリペプチド、または小分子の分泌が含まれる。

【0094】

測定に適した多くの方法には、目的のペプチドまたはポリペプチドに特異的なリガンド結合の量を測定することが含まれうる。本発明による結合には、共有結合および非共有結合の両方が含まれる。

【0095】

本発明においてリガンドは、目的のペプチドまたはポリペプチドに結合するいかなるペプチド、ポリペプチド、核酸、または他の物質でもありうる。ペプチドまたはポリペプチドは、ヒトまたは動物の体から採取または精製した場合、例えばグリコシル化によって、修飾できることが周知である。本発明による適当なリガンドは、そのような部位を介してペプチドまたはポリペプチドに結合するものでもよい。

【0096】

リガンドは、測定対象のペプチドまたはポリペプチドに、好ましくは特異的に結合すべきである。本発明による「特異的結合」とは、リガンドが、試験対象の試料中に存在する別のペプチド、ポリペプチドまたは物質に実質上結合する（それと「交差反応する」）べきではないことを意味する。特異的に結合するタンパク質またはアイソフォームは、いかなる他の適切なペプチドまたはポリペプチドよりも、好ましくは少なくとも3倍以上高い親和性、より好ましくは少なくとも10倍以上高い親和性、およびさらにより好ましくは少なくとも50倍以上高い親和性で結合すべきである。

【0097】

試験対象のペプチドまたはポリペプチドが、例えばウェスタンブロット上の大きさによって、またはそれが試料中で比較的豊富にあることによって、識別可能であり、かつ明確に測定できる場合、非特異的結合も許容されることがある。

【0098】

10

20

30

40

50

リガンドの結合は、当技術分野で公知のいかなる方法で測定することもできる。この方法は、半定量的であるか、または定量的であることが好ましい。適切な方法を以下に記載する。

【0099】

第1に、リガンドの結合は、例えば、NMRまたは表面プラズモン共鳴法で直接測定することができる。

第2に、リガンドが目的のペプチドまたはポリペプチドのもつ酵素活性の基質として機能する場合には、酵素反応産物を測定することができる（例えば、プロテアーゼの量は、切断された基質の量を、例えば、ウェスタンブロットで測定することによって、測定することができる）。

10

【0100】

酵素反応産物を測定するためには、基質の量が飽和状態に近いことが好ましい。基質は、反応前に検出可能な標識で標識されてもよい。試料は適当な時間、基質に接触させることが好ましい。適当な時間とは、検出可能であり、かつ好ましくは測定可能な量の産物が生成されるのに必要な時間を指す。産物の量を測定する代わりに、所定（例えば、検出可能な）量の産物が生じるのに必要な時間を測定することもできる。

【0101】

第3に、リガンドは、リガンドの検出および測定を可能にする標識と、共有結合または非共有結合によって結合させることができる。

【0102】

標識は、直接的方法で行っても、間接的方法で行ってもよい。直接標識は、標識をリガンドに直接（共有結合または非共有結合によって）結合させるものである。間接標識は、二次リガンドを一次リガンドに結合させる（共有結合または非共有結合によって）ものである。二次リガンドは、一次リガンドに特異的に結合すべきものである。上記二次リガンドは、適当な標識と結合してもよく、および/または二次リガンドに結合する三次リガンドの標的（受容体）であってもよい。シグナルを増強するために、二次、三次、またはさらに高次のリガンドがしばしば用いられる。適当な二次リガンド、およびより高次のリガンドには、抗体、二次抗体、および周知のストレプトアビジンピオチン系（Vector Laboratories社）を含むことができる。

20

【0103】

リガンドまたは基質は、当技術分野で公知の、1つまたは複数のタグで「タグ標識」してもよい。そのようなタグは、その後、より高次のリガンドの標的となりうる。適当なタグには、ピオチン、ジゴキシゲニン、Hisタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ、FLAG、GFP、mycタグ、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン（HA）、マルトース結合タンパク質などが含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの場合、タグは、N末端および/またはC末端にあることが好ましい。

30

【0104】

適切な検出方法で検出可能ないかなる標識も、適当な標識である。典型的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素的に活性な標識、放射性標識、磁性標識（例えば、常磁性および超常磁性標識を含めた「磁性ビーズ」）、および蛍光標識が含まれる。

40

【0105】

酵素的に活性な標識には、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびこれらの誘導体が含まれる。検出用に適当な基質には、ジアミノベンジジン（DAB）、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT-BCIP（4-ニトロブルーテトラゾリウム塩化物および5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸、Roche Diagnostics社から既成の原液として購入可能）、CDP-Star(商標)(Amersham Biosciences社)、およびECF(商標)(Amersham Biosciences社)が含まれる。適当な酵素と基質との組合せは、有色の反応生成物、蛍光、または化学発光をもたらすことがあり、それらは、当技術分野で公知の方法で測定する

50

ことができる（例えば、感光性フィルムまたは適当なカメラシステムを用いて）。酵素反応を測定することに関しては、上記の規準が同様に適用される。

【0106】

典型的な蛍光標識には、蛍光タンパク質（GFPおよびその誘導体など）、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセイン、およびアレクシア色素（例えばアレクシア568）が含まれる。この他の蛍光標識は、例えば、Molecular Probes社（Oregon）から購入可能である。また、蛍光標識としての量子ドットの使用も考慮される。

【0107】

典型的な放射性標識には、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、および同様のものが含まれる。放射性標識は、例えば感光性フィルムまたは蛍光造影装置（phosphor imager）など、公知であり、かつ適切ないかなる方法でも検出できる。

【0108】

本発明において適切な測定方法には、沈殿（特に免疫沈降反応）、電気化学発光法（電氣的に発生する化学発光）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ（ECLIA）、解離増強ランタニド蛍光イムノアッセイ（DELFLIA）、シンチレーション近接アッセイ（SPA）、比濁分析、比ろう分析、ラテックス強化比濁分析もしくは比ろう分析、または固相免疫試験も含まれる。当技術分野で公知の他の方法（ゲル電気泳動、2次元ゲル電気泳動、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）、ウエスタンブロッティング、質量分析など）は、単独で使用することも、上述の標識化法または他の検出方法と組み合わせて使用することもできる。

【0109】

好ましいリガンドには、抗体、核酸、ペプチド、ポリペプチド、およびアプタマー、例えば核酸アプタマーまたはペプチドアプタマーが含まれる。そのようなリガンドに関する方法は、当技術分野で周知である。例えば、適当な抗体またはアプタマーの同定および製造は、供給業者によって提供される。当業者は、そのようなリガンドの、より高い親和性および特異性を有する誘導体を開発する方法に精通している。例えば、核酸、ペプチド、またはポリペプチドにランダム変異を導入することができる。これらの誘導体は、その後、当技術分野で公知のスクリーニング方法、例えばファージディスプレイによって、結合の有無を試験することができる。

【0110】

本明細書において、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方と、Fv、Fab、およびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントなど、抗原またはハプテンに結合可能なそれらのフラグメントとが含まれる。本発明には、「ヒト化された」ハイブリッド抗体も含まれるが、そのような抗体では、所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列がヒトアクセプター抗体の配列に結合される。

【0111】

ドナー配列は、通常、少なくともドナーの抗原結合性アミノ酸残基を含むが、さらに、構造上および/または機能上適切な、ドナー抗体の他のアミノ酸残基も含むことができる。そのようなハイブリッドは、当技術分野で周知のいくつかの方法で調製することができる。

【0112】

別の好ましい実施形態では、リガンドが、好ましくは、核酸、ペプチド、およびポリペプチドからなる群から、より好ましくは、核酸、抗体、およびアプタマーからなる群から選択され、アレイ上に提示される。

【0113】

上記アレイは、少なくとも1つの追加リガンドを含有し、これは、目的のペプチド、ポリペプチド、または核酸に対するリガンドでもよい。上記追加リガンドは、本発明に関しては、特に関心のないペプチド、ポリペプチド、または核酸に対するリガンドでもよい。アレイ上には、本発明との関連で目的の少なくとも3つ、好ましくは少なくとも5つ、よ

10

20

30

40

50

り好ましくは少なくとも8つのペプチドまたはポリペプチドに対するリガンドが含有されることが好ましい。

【0114】

本発明によれば、「アレイ」という用語は、その表面に少なくとも2つの化合物が一次元、二次元、または三次元配置で付着または結合されている固相またはゲル様担体を指す。そのようなアレイ（「遺伝子チップ」、「プロテインチップ」、抗体アレイなどを含む）は、当業者に公知であり、通常、顕微鏡用ガラススライド上、特に、ポリカチオン、ニトロセルロース、またはビオチンでコーティングされたガラススライドなどのコーティングされたガラススライド上、カバーガラス上、ならびに、例えば、ニトロセルロースまたはナイロンを主材とする膜などの膜上に作製される。

10

【0115】

アレイは、結合リガンド、またはそれぞれ少なくとも1つのリガンドを発現する少なくとも2つの細胞を含んでもよい。

【0116】

本発明において、アレイとして、「懸濁液アレイ」を用いることも考慮される（Sklar LA, Nolan JP(2002)、Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm, Trends Biotechnol, 20(1):9~12）。そのような懸濁液アレイでは、担体（例えば、マイクロビーズまたはマイクロスフェア）が懸濁液中に存在する。このアレイは、様々なリガンドを保持し、場合によっては標識された様々なマイクロビーズまたはマイクロスフェアからなる。

20

【0117】

本発明はさらに、上記に定義したようなアレイを生成する方法であって、少なくとも1つのリガンドが他のリガンドに加えて、担体物質にも結合する方法にも関する。

【0118】

そのようなアレイを生成する方法、例えば固相化学および感光性保護基に基づく方法は公知である（米国特許第5,744,305号）。そのようなアレイは、物質または物質ライブラリーと接触させて、相互作用、例えば、結合またはコンフォメーション変化の有無を試験することができる。したがって、上記に定義したようなペプチドまたはポリペプチドを含むアレイは、上記のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合するリガンドを特定するために使用してもよい。

30

【0119】

本発明に係る方法は、測定したレベルを、患者の様々な程度のリスクに関連した既知レベルと比較することによって、患者のリスクを診断するステップを含む。

【0120】

当業者ならば、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する様々な程度のリスクと関連した既知レベルの心臓ホルモンを決定することができる。

【0121】

本発明によれば、「リスク」という用語は、特定の事象、より詳細には心血管合併症が起こる確率に関する。リスクの程度は、高リスク、非常に高いリスク、極めて非常に高いリスクに分けることができる。リスクの程度は、高くない場合もある。「リスクが高くない」とは、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患するリスクが、明白には存在しないことを意味する。

40

【0122】

どのようなレベルの心臓ホルモンが、どの程度のリスクに関連しているかに関しては、心血管疾患の存在又は重篤度との関連が既知である心臓ホルモンレベルから、指針を得ることができる。例えば、年齢50歳未満の個体で得られた97.5百分位数に基づいた場合、NT-proBNPの血漿レベルにおいては125pg/mlが正常レベルであるとみなされた（実施例3を参照）。NT-proBNPのこれより高いレベルは、例えば、NYHA分類による症候レベル、およびLVEFにおける機能障害のレベルと相関する。「血漿レベル」という用語は、血漿中で測定されたNT-proBNPのレベルに関する

50

。

【0123】

以下では、NT-proBNPの血漿レベルが提示されるが、通常これは、血管内容量増加の結果として心血管合併症に罹患するリスクを示した程度に関連していると考えられる。

【0124】

下記に提示するレベルが、患者のリスクに関する第1分類としての役割しかもたないことは、明らかである。例えば、リスクは、特定の患者における心臓の予備ポンピング容量(spare pumping capacity)にも依存している。

【0125】

さらには、当業者ならば、以下にさらに示された実施例から、他の適当なレベル、特に、高齢患者または甲状腺機能(例えば、TSHまたはFT4)に関するマーカーのレベルが増加または減少している患者など、ある特定の患者集団で適当なレベルを決定することができる。

【0126】

典型的には、50 pg/ml未満のNT-proBNPの血漿レベルが、血管内容量増加の結果として心血管合併症に罹患するリスクが高くないことと関連づけられる。詳細には、男性患者では、約60~100 pg/ml未満の血漿レベルが、高くないリスクと関連づけられ、女性患者では、約120~150 pg/ml未満の血漿レベルが、高くないリスクと関連づけられる。平均値は125 pg/mlである。

【0127】

典型的には、NT-proBNPの血漿レベルが、高くないリスクの血漿レベルより高いが、1000 pg/ml未満である場合に、この血漿レベルは、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する高リスクと関連づけられる。

【0128】

典型的には、1000から5000 pg/mlのNT-proBNPの血漿レベルが、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する非常に高いリスクと関連づけられる。

【0129】

典型的には、5000 pg/mlを越えるNT-proBNPの血漿レベルが、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する極めて非常に高いリスクと関連づけられる。

【0130】

患者のリスクがいったん診断されれば、それは、以下に記載されるように、後続の治療に影響を与えることができる。下記のリスク程度は、特に、上記のNT-proBNPレベルに関連したリスク程度を指す。

【0131】

本発明に係る方法が、高リスクを示さない場合には、計画通りに治療を継続してもよい。

【0132】

本発明に係る方法が、高リスクを示す場合には、治療を調整することができる。治療は、本発明の心臓ホルモンのレベルをさらに測定し、心電図記録法、心エコー法、または熟練した心臓内科医に公知の任意の他の適当な方法などの別の診断を次に行うことが好ましい。

【0133】

本発明に係る方法が非常に高いリスクを示す場合には、高リスクに関して記載した通りに治療を調整してもよい。しかし、何らかの血管内容量の増加を許容できるかどうか、例えば、人工的な血管内容量の増加を誘起するものかどうかを再考してもよい。

【0134】

本発明に係る方法が極めて非常に高いリスクを示す場合には、高リスクの増加に関して

10

20

30

40

50

記載した通りに治療を調整してもよい。しかし、即時の入院および/または心臓の集中治療も考慮してもよい。

【0135】

治療を調整することには、既存または計画中の血管内容量増加の制限、塩摂取の制限、定期的かつ適度な運動、非ステロイド系抗炎症薬の回避、インフルエンザおよび肺炎球菌に対する免疫処置の提供、利尿剤（複数の利尿剤の併用投与を含める）、ACEインヒター、B-アドレナリン遮断薬、アンギオテンシン受容体遮断薬、およびジギタリスなどの薬剤の投与、ならびに当業者に公知で適切と考えられる他のいかなる処置も含まれる。したがって、本発明は、血管内容量が増加しているか、またはいずれ増加すると予想される患者を治療する方法も提供する。

10

【0136】

図の説明

図1 傾斜操作を受けた16人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。データは平均±標準偏差である。SABP、DABP、およびMAPは、収縮期血圧、弛緩期血圧、および平均血圧を示す。HR：心拍数、LAD：左心室直径、LADのデータは基線（BL）に対するパーセントとして示す。\*： $p < 0.05$ の群間変動、ANOVA反復測定による。

【0137】

図2  $n = 8$ の2群で、連続傾斜操作を受けた16人の健常ボランティアにおけるNT-proANP（上側パネル）、NT-proBNP（中央パネル）、およびリラキシン（RLX）の血漿レベルの経過を示す図である。円は、最初に足を下にした体位におかれ、続いて頭を下にした体位におかれた被験者を示し、正方形は、逆の傾斜プロトコルを受けた被験者を示す。データは、100%に設定した基線値に対するパーセントを、平均±SEMとして示す。\*： $p < 0.05$ の群間変動、ANOVA反復測定による。黒四角の白丸：基線値との比較における有意差（ $p < 0.05$ ）（対応のあるスチューデントのt検定）。

20

【0138】

図3 対照群およびナトリウム負荷（血管内容量増加、 $Na^+$ ）群における、10人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。データは平均±標準偏差（絶対データ）である。MAP：平均動脈圧、HR：心拍数、LAD：左心室直径、T：時間、\*： $p < 0.05$ の群間変動、フリードマン検定とそれに続いて行ったウィルコクソン符号順位和検定とによる。§：基線レベルとの比較における $p > 0.05$ の個体内変動。

30

【0139】

図4 対照プロトコル（円）中、およびナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコル（正方形）中の、10人の健常ボランティアにおける、NT-proANP（上側パネル）、NT-proBNP（中央パネル）、およびリラキシン（RLX）の血漿レベルの経過を示す図である。データは平均±SEMとして示す。\*： $p < 0.05$ の群間変動。黒四角の白丸：基線値との比較における有意差（ $p < 0.05$ ）（ウィルコクソン符号順位和検定）。

【0140】

図5 ナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコル中の、10人の健常ボランティアにおける、尿流量（UV）、ナトリウム排泄率（ $FE_{Na}$ ）、およびクレアチニンクリアランス（ $C_{crea}$ ）の経過を示す図である。データは平均±SEMとして示す。†：基線値との比較における有意差（ $p < 0.05$ ）。§：10:00の値（ナトリウム注入前）との比較における有意差（ $p < 0.05$ ）、ウィルコクソン符号順位和検定による。

40

【0141】

図6 ナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコル中の、10人の健常ボランティアにおける、NT-proBNP尿排泄（ $U_{NT-proBNP}$ ）、リラキシン尿排泄（ $U_{RLX}$ ）、およびウロジラチン尿排泄（ $U_{URO}$ ）の経過を示す図である。データは、クレアチニン $1 \mu mol$ あたりにおけるホルモン濃度相互の比率として計算し、平均±S

50

EMとして示す。†：基線値との比較における有意差 ( $p < 0.05$ )。§：10:00の値(ナトリウム注入前)との比較における有意差 ( $p < 0.05$ )、ウィルコクソン符号順位和検定による。

【0142】

図7 観測時間中の健常ボランティアにおける、NT-proANP、NT-proBNP、およびリラキシンの血漿中濃度および尿中ホルモン排出と、尿流量およびナトリウム排泄率との間の相関分析を示す図である。20 ml \* kg<sup>-1</sup> 等張食塩水の注入後10時間の観測時間中における、10人の健常ボランティアからプールされたデータに関して計算したスピアマンの順位相関検定による。UV：尿流量、FE<sub>Na</sub>：ナトリウム排泄率、pl.：血漿、ur.：尿。相関関係は「スピアマンのロー」として示す。m.s.：試料の喪失により分析できなかった。n.s.：有意でない。\*： $p < 0.05$ の群間変動。

10

【0143】

図8 年齢18～65歳(18～29歳、30～39歳、40～49歳、50～59歳、60～65歳)の献血者(n=2948)におけるNT-proBNPレベル(中央値)の度数分布を示す図である。M：男性、F：女性。

【0144】

図9 献血者における、年齢群別および性特異的NT-proBNPレベルを示す図である。N：献血者数。m：男性、f：女性。

【0145】

図10 NT-proBNPレベルが高いN=48の献血者の追跡試験(12カ月)を示す図である。

20

【0146】

図11 献血者におけるNT-proBNPレベルと、それらのヘモグロビンレベルに対する関係とを示す図である。m：男性(菱形)、f：女性(正方形)、t：合計(三角形)。

【0147】

図12 クレアチニンレベルに対する、献血者の年齢群特異的および性特異的NT-proBNPレベル(中央値)を示す図である。N：献血者の数。

【0148】

図13 心疾患の疑いで来診した患者の試験集団特性を示す図である。t：合計、m：男性、f：女性。

30

【0149】

図14 LVEFおよびNYHA分類に応じた、患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【0150】

図15 LVEFに応じた、男性のNT-proBNPレベルを示す図である。

【0151】

図16 LVEFに応じた、女性のNT-proBNPレベルを示す図である。

【0152】

図17 LVEFの減失を有し、かつNT-proBNPレベルがカットオフ(男性：84 pg/ml、女性：155 pg/ml)より低い患者に関する図である。

40

【0153】

図18 心房細動を示さない患者との比較における、心房細動を示す患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【0154】

図19 心筋梗塞の既往症(AMI)がない患者との比較における、AMI既往症がある患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【0155】

図20 狭心症を有しない患者との比較における、狭心症を有する患者のNT-pro

50

BNPレベルを示す図である。

【0156】

図21 クレアチニンがレベル高い患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【0157】

図22 甲状腺機能不全を有する患者との比較における、正常な甲状腺機能を有する患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【0158】

図23 敗血症性心筋梗塞およびそれに続く肺鬱血を有する患者のNT-proBNPおよびBNPレベルを示す図である。Hb：ヘモグロビン、Leukozyten：白血球。

10

【0159】

図24 実施例8の患者005におけるNT-proBNPレベルを示す図である。Pat.：患者。

【0160】

図25 実施例8の患者025におけるNT-proBNPレベルを示す図である。Pat.：患者。

【0161】

図26 実施例8の患者047におけるNT-proBNPレベルを示す図である。Pat.：患者。

【0162】

20

図27 実施例8の患者066におけるNT-proBNPレベルを示す図である。Pat.：患者。

【0163】

図28 実施例8の患者085におけるNT-proBNPレベルを示す図である。Pat.：患者。

【0164】

以下の実施例は、本発明を例示するものであり、いかなる意味においても本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0165】

30

#### NT-proBNPの測定

NT-proBNPは、Elecsys 2010を用いた電気化学発光イムノアッセイ(Elecsys proBNPサンドイッチイムノアッセイ;Roche Diagnostics社、Mannheim、独国)で測定した。このアッセイは電気化学発光サンドイッチイムノアッセイの原理に従って機能する。第1ステップでは、ピオチン標識されたIgG(1~21)捕獲抗体と、ルテニウム標識されたF(ab')<sub>2</sub>(39~50)シグナル抗体と、20μlの試料とを37℃で9分間インキュベートした。その後、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性微粒子を添加し、混合物をさらに9分間インキュベートした。第2のインキュベーションの後に、反応混合物を装置の測定セルに移した。ビーズは、そこで磁力により電極の表面に捕捉される。結合しなかった標識は、測定セルを緩衝液で洗浄することによって除去した。

40

【0166】

最終のステップでは、トリプロピルアミンを含む緩衝液の存在下で電極に電圧を印加し、この結果得られた電気化学発光シグナルを光電増倍管で記録した。すべての試薬および試料はElecsys(登録商標)測定器によって完全に自動的に操作された。結果は、2点校正と、試薬バーコードで得られるマスター曲線とで測定器に特有に生成された検量線を用いて決定した。試験は製造者の教示に従って行った。

【実施例2】

【0167】

施設内審査委員会による承認と書面によるインフォームドコンセントとの後、通常のナトリウム食を摂っている16人の健常男性非喫煙ボランティア(年齢：27±4歳、体重

50

:  $82 \pm 11$  kg、身長:  $184 \pm 6$  cm) を試験した。すべての被験者が傾斜プロトコールに参加し、これに加えて10人のボランティアがナトリウム負荷プロトコールに登録された。ナトリウム負荷プロトコールは、血管内容量の増加、すなわち容量過負荷を引き起こした。試験は、終夜の絶食後に温度制御実験室で行った。8:00に被験者が実験室に到着した後、被験者を仰臥位に配置し、16ゲージの静脈カニューレを装着して、鬱血することなく血液試料採取できるようにした。9:15にすべての被験者に標準的な朝食(2枚のトースト、マーマレード、 $3 \text{ ml} * \text{kg}^{-1}$ の水)を支給した。

【0168】

傾斜プロトコール:

16人のボランティアを、無作為に、 $n = 8$ の2群に分割し、以下の別々の体位にしてそれぞれ2時間試験した。すなわち、仰臥位での休養時間の後、被験者を、頭を下にした体位(HD)か、または足を下にした体位(FD)で $15^\circ$ に傾斜させ、仰臥位に戻し、その後、反対の方向に傾斜させた。

10

【0169】

血行動態(心拍数(HR)、心電図、平均動脈圧(MAP、自動振動血圧計))を15分毎に記録して、それぞれの時間に関して平均した。収縮末期左心室直径(LAD)は傍胸骨長軸断面における経胸壁心エコー検査(ATL Ultrasound、Apogee社、CX100-150)で測定した。LAD測定は、それぞれの体位で1時間後に行い、3つの測定値の平均として取得した。血液化学およびホルモンの測定用血液の採取は、9:00から開始して毎時間に行った。

20

【0170】

ナトリウム負荷プロトコール:

10人のボランティアに対して、仰臥位における10時間の観測時間中に無作為に試験する(対照群)か、または $15 \text{ ml} * \text{kg}^{-1}$ 量の0.9% NaClを、10:00から11:00までの60分間、注入ポンプで静脈注入した(容量群)。試験は、別々の日に少なくとも2週間の間をおいて行った。

【0171】

両群において、血液化学およびホルモンの測定用血液の採取と、心エコーによるLAD測定とを、9:00、10:00、11:00、12:00、14:00、16:00、および18:00に行った。容量群では、8:00、10:00、11:00、12:00、14:00、16:00、および18:00に、自発的排尿による尿試料の採取を行った。血行動態は、15分毎に測定し、それぞれの時間に関して平均した。

30

【0172】

分析:

ホルモン分析用の血液は、必要に応じて、5000Uのアプロチニン(トラジロール、Beyer社、独国)を含有するEDTAチューブ中と、リチウムヘパリンチューブ(臨床化学用)中とに採取した。血液および尿試料は、即座に4、3400rpmで10分間遠心し、上清を分析まで-80で保存した。

【0173】

NT-proANPの測定:

NT-proANPは、Sundsfjord, J.A., Thibault, G.ら(1988)、Identification and plasma concentrations of the N-terminal fragment of proatrial natriuretic factor in man, J Clin Endocrinol Metab 66:605~10の改変法による磁性固相技術を用いた競合的結合放射イムノアッセイで、同じウサギ抗ラットproANPポリクローナル血清と、標準試料としてPeninsula Lab (Bacherm社、St. Helene、英国)からのヒトproANP(1~30)と、放射標識用にHPLCで精製されたヨウ素化proANP 1~30とを用いて測定した。高い感度と良好な精度とを実現するために、固相として、ヒツジ抗ウサギIgG (Dynal Biotech社、Oslo、ノルウェー)を備えたDynabeads M280を用い、また二次抗体を使用した。425、1163、および2490 pmol \* l<sup>-1</sup>における分散係数は、それぞれ、7.5、3.7、および3.4%であった。検出限界は30 pmol

40

50

／1であった。

【0174】

NT-proBNPの測定：

NT-proBNPは、Elecsys 2010を用いた電気化学発光イムノアッセイ（Elecsys proBNPサンドイッチイムノアッセイ、Roche Diagnostics社、Basel、スイス）で測定した（Mueller, T., Gegenhuber, A. (2003), Comparison of the Biomedica NT-proBNP enzyme immuno assay and the Roche NT-proBNP chemiluminescence immuno assay: implications for the prediction of symptomatic and asymptomatic structural heart disease, Clin. Chem. 49:976~9; 実施例1も参照）。アッセイ内平均分散は4.3%であった（範囲：2.7~5.9%、濃度 $7.6 \sim 2732 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ にある血漿試料のアッセイ、アッセイ間分散は3.2%）。検出下限は $0.6 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。

10

【0175】

統計学的分析：

有意性は $p < 0.05$ に設定した。

【0176】

傾斜プロトコール：基線における分散に関して、ホルモンデータおよびLADデータを基線レベル（100%に設定）に応じて正規化し、反復測定のANOVA分析を行った。ボンフェローニ補正は用いなかった。正規化した基線値との比較における個体内変動は、対応のあるスチューデントのt検定で分析した。

【0177】

ナトリウム負荷プロトコール：対照群と容量群との間の個体内変動は、フリードマンの検定と、それに続くウィルコクソン符号順位和検定とで分析した。測定値の数および試料サイズに関して、ボンフェローニ補正は用いなかった。観測時間中の個体内変動はウィルコクソン符号順位和検定で決定した。相関分析には、スピアマンの順位相関検定を用いた。

20

【0178】

傾斜プロトコールの結果：

血行動態：心拍数も動脈圧も観測時間中に有意な個体内変化または個体間変化を示さなかった（図1）。LADにおける有意差は、第2の傾斜時間中に観測された（図1）。

【0179】

臨床化学：基線での血漿ナトリウム、カリウム、およびクレアチニンは、両傾斜群間で差はなかった（血漿ナトリウム：群I： $138 \pm 2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、群II： $139 \pm 2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ；血漿カリウム：群I： $3.8 \pm 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、群II： $3.6 \pm 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ；血漿クレアチニン：群I： $75 \pm 9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、群II： $81 \pm 8 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ）。これらのパラメータにおける、いかなる有意な群間変動も観測時間中に観測されなかった。

30

【0180】

正規化されたレベルのNT-proANPおよびNT-proBNPの経過を図2に示した。加えて、リラキシン（RLX）のレベルも示した。第2の傾斜時間におけるNT-proANPレベルは、HD中の方がFD中より高かった。NT-proBNPレベルは、時間の経過に従い、15:00まで増加したが、両群間では差はなかった。血漿RLXレベルにおける、いかなる有意な個体内変動も観測されなかった。このホルモンの個体内経過は、両群で同様なものであり、基線と比較すると、15:00に正規化されたRLXレベルの最底部（search）を示し、および15:00から16:00までに増加を示して、基線レベルまで戻った。

40

【0181】

容積負荷プロトコールの結果：

血行動態：HRおよびMAPにおけるいかなる有意な群内および群間変動も観測されなかった（図3）。流体負荷の後の11:00から12:00までに、LADの小さいが有意な増加が観測された。その後、LADは減少して、基線レベルまで戻った（図3）。

50

## 【0182】

臨床化学：基線での血漿ナトリウム、カリウム、クレアチニン、およびヘマトクリットは、対照とナトリウム負荷プロトコールとの間で差はなかった（血漿ナトリウム：対照： $139 \pm 2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、ナトリウム負荷： $140 \pm 2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ；血漿カリウム：対照： $3.6 \pm 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、ナトリウム負荷： $3.4 \pm 0.7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ；血漿クレアチニン：対照： $80 \pm 11 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、ナトリウム負荷： $76 \pm 9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ；ヘマトクリット：対照： $40.7 \pm 2.0\%$ 、ナトリウム負荷： $40.1 \pm 1.8\%$ ）。血漿ホルモン値：NT-proANP、NT-proBNP、およびRLXの血漿レベルを図4に示す。ナトリウム負荷群では、ナトリウム負荷直後にNT-proANPが増加し、注入の2時間後にピークに達した。対照群でも中程度の増加が観測された。しかし、12:00以降では、この群のNT-proANPレベルは基線レベルと差がなかった。NT-proBNPは、両群において、観測時間の最後まで遅延性の増加を示した。ナトリウム注入群におけるNT-proBNPレベルは、13:00以降では対照群より有意に高かった。RLXレベルにおける、いかなる有意な変動も、群間変動も観測されなかった。

10

## 【0183】

腎機能パラメータ：尿流量（UV）および分画ナトリウム排泄率（ $FE_{Na}$ ）は、8:00から10:00まで、中程度の増加を示した。ナトリウム注入後に、別のより顕著な増加が観測された（図5）。その後、UVは増加して注入前のレベルまで戻ったが、 $FE_{Na}$ は、観測時間の最後まで高いままに維持された。クレアチニンクリアランスは観測時間中に変化しなかった（図5）。ホルモンの尿排泄：NT-proBNP、RLX、およびウロジラチン（URO）の尿排泄（ $U_{NT-proBNP}$ 、 $U_{RLX}$ 、および $U_{URO}$ ）を図6に示す。NT-proANPの測定は、少数の尿試料でのみ可能であった。したがって、このパラメータの計算は行わなかった。 $U_{NT-proBNP}$ および $U_{RLX}$ は、8:00から10:00まで有意に増加し、さらに増加して12:00にピークに達した。その後、尿中ホルモン排泄は減少したが、基線レベルより上まで増加した状態に維持された。 $U_{URO}$ も、 $U_{NT-proBNP}$ および $U_{RLX}$ と同様な経過を示したが、分散が大きかったこと、およびツール被験者における $U_{URO}$ 濃度が検出限界未満であったという事実により、このペプチドにおける注入後の経過は統計的な有意性に達しなかった。しかし、14:00における $U_{URO}$ レベルは、基線レベルより有意に高いものであった。

20

30

## 【0184】

相関分析：対照群とナトリウム負荷群との間の、基線における血漿ホルモンレベルの相関分析を測定値の信頼性を判定するために行ったところ、次に示す有意な相関関係が明らかにされた。すなわち、NT-proANP： $\rho = 0.91$ ；NT-proBNP： $\rho = 0.82$ ；RLX： $\rho = 0.91$ である。腎機能パラメータと、ホルモン血漿レベルおよびこれらのホルモンの尿排泄との間の相関分析を図7に示す。これらの分析により、一方をNT-proANPおよびNT-proBNPの血漿レベルとして、他方を $FE_{Na}$ とする弱い相関関係が明らかになった。しかし、NT-proBNP、RLX、およびUROの尿排泄と、UVとの間、ならびにNT-proBNP、およびRLXと、 $FE_{Na}$ との間で、さらに良好な相関関係が観測された。

40

## 【実施例3】

## 【0185】

献血者におけるNT-proBNPレベルの試験

合計1981人の献血者を独国マインツ大学（the University of Mainz）の輸血サービスから募集した。献血者の大部分が反復ドナーであったが、反復ドナーは年に1回の間隔で身体試験を受けている。この試験に基づいて、この試験に包含されたすべての献血者は臨床的に健康であるとみなされた。献血時に、クレアチニンレベルおよびヘモグロビンレベルを測定した。すべての測定は、献血前に行われた。この試験は、ヘルシンキ宣言（the Declaration of Helsinki）に従って実施され、地域の倫理委員会によって承認され

50

た。

【0186】

図8に示すように、個体のNT-proBNP値は、年齢および性別に対してプロットした。図7から明らかであるように、NT-proBNPレベル(中央値)は、男性より女性で高かった。異常値は、高齢個体(年齢が50歳より上)でより高頻度に観測され、一方、若年個体(50歳未満)では個体の測定値が集中した。97.5百分位数に基づいて、年齢および性別に関連した参照値を計算したところ、それぞれ50歳未満の年齢で、男性では84.2pg/ml、および女性では146.2pg/mlであることが判明した(図9)。

【0187】

図10の表からわかるように、上記範囲外のすべての個体から、約12カ月の間隔を置いて第2の試料を採取したところ、試料の大部分がそれぞれの参照範囲外に留まっていた。これは、これらの高い値が一定した試験結果であったことを示唆するものである。初期値が、記載の範囲外の個体の小集団が、第2の試料では、特定された参照範囲内にあるとみなされる値を有していた。

【0188】

NT-proBNP値がヘモグロビンレベルに依存していないかどうかを評価するために、ヘモグロビン濃度を男性および女性で測定したところ、女性では、男性より平均して1.5g/ml低濃度であることが判明した(図10)。ヘモグロビンレベルは年齢に依存しなかった。

【0189】

同一ヘモグロビンレベルでおよび年齢別群でNT-proBNP値を男性と女性との間で比較したところ、男性と女性の間では、依然としてNT-proBNPレベルの差があった。これは、男性と女性との間で見いだされているNT-proBNP濃度の差異が、ヘモグロビンレベルによって説明されないことを示唆するものである。また、NT-proBNPレベルが事実上ヘモグロビンに依存しており、ヘモグロビン濃度の減少に伴ってNT-proBNPレベルが増加することも明らかになった(図11)。

【0190】

個体の小集団で、クレアチニンレベルをNT-proBNPレベルと比較した。試験した群では、試験したすべての個体のクレアチニンレベルが正常な範囲にあった。クレアチニンレベルは年齢と共に増加しなかったが、これと対照的に、NT-proBNPレベルは年齢と共に増加した(図12)。これは、年齢の増加によるNT-proBNPの増加が、腎臓機能によって引き起こされるものではない可能性を示唆するものである。

【0191】

この試験は、明らかに健康な集団でNT-proBNPの正常値および参照値を決定するために開始した。示したように、個体のNT-proBNPレベルは、年齢50歳までクラスターを形成し、異常値はわずかであった。この試験結果は、心疾患、特に心血管疾患がこの年齢群ではまれであるという前提と一致するものである。したがって、年齢50歳未満の個体で得られた値は、97.5百分位数に基づいて、正常値とみなされた。これらの値が男性と女性との間で相違していることも判明した。また、ヘモグロビンレベルが低い個体は、より高いNT-proBNPレベルを有したので、ヘモグロビンレベルが実際にNT-proBNPレベルに影響を与えることも示すことができた。同じヘモグロビンレベルで見た場合、男性と女性の間には、依然として差があった。したがって、ヘモグロビンレベルでは、両性間で見られたNT-proBNPレベルの差を説明できなかった。

【0192】

この試験は、NT-proBNPレベルが、かなりの数の個体で、年齢50歳未満の個体の97.5百分位数を超えていることを示した。これらの異常値の数は年齢と共に増加した。NT-proBNPレベルの測定は、実施例1に記載した通りに、Elecsys(登録商標)イムノアッセイによって行った。

10

20

30

40

50

## 【実施例 4】

## 【0193】

心疾患の疑いで来診した患者におけるNT-proBNPレベルの試験

18人の心臓内科医に来診した合計473人の患者を、この試験に動員した。患者は病歴問診、身体検査、および心エコー検査を受け、心エコー試験では左心室駆出分画率が記録された。さらに、血液10mlを採取し、遠心し、分析するまで-20℃で保存した。この試験に含まれた患者に関する人口統計学的変数の主要なものを、図13に示す。この試験は、地域の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言 (the Declaration of Helsinki) に従って実施された。

## 【0194】

すべての患者またはその大部分において、以下の試験を実施した。すなわち、クレアチニンレベル、TSH、FT4、およびNT-proBNPである。これらの試験は、製造者 (Roche Diagnostics社、Mannheim、独国) の教示に従って実施した。NT-proBNPは、Elecsys(登録商標)2010測定器を用いた新規に開発されたイムノアッセイ (Roche Diagnostics社、Mannheim、独国) を用いて分析した (実施例1を参照)。

## 【0195】

有意性はウィルコクソンスコア法およびピアソンカイ二乗検定に基づいて計算し、p値によって\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ として表した。誤差確率は5%を超えるべきではない。

## 【0196】

患者は、左心室駆出分画率 (LVEF) に応じて、すなわち、30%未満のLVEF、30~50%のLVEF、および50%を越えるLVEFの3つの群に分割した。また、患者の等級付けも行い、NYHA分類に従って程度I~IVに等級付けした。

## 【0197】

図14に示すように、NT-proBNPレベルは、左心室駆出分画率のレベルと、症候とに基づいて記録した。男性では84pg/ml、女性では146pg/mlのカットオフを用いた場合、個体の大部分でNT-proBNPレベルが増加していた。このカットオフ値は正常な心臓機能と、異常な心臓機能とを区別するものである (実施例3を参照)。平均NT-proBNPレベルは、NYHA分類で評価された症候レベル、およびエコーで測定された駆出分画率の減失レベルと共に増加した。NT-proBNPの左心室駆出分画率への依存は、男性および女性に関して、それぞれ図15および図16にもその概要を示す。図からわかるように、NT-proBNPレベル (中央値) は、駆出分画率が減少すると共に増加した。

## 【0198】

図17に示されるように、心臓内科センターにおける試験に編成された個体のうちごく少数のみが、年齢50歳未満の献血者の試験から導かれたカットオフ (実施例3を参照) に基づいた正常なNT-proBNPレベルを有した。正常なNT-proBNP値は、無傷の左室分画を有しかつ無症候の個体に集中し、わずかな異常値が同定されたのみである。

## 【0199】

心電図 (ECG) が示すように、合計32個体が心房細動を有し、一方、大多数の個体では心房細動の証跡が見られなかった。図18からわかるように、心房細動群における中央値は非心房細動群より高かった。これらの患者群に関する人口統計学的変数の主要なものを示す。心房細動を有していなかった個体は、しばしば、心筋梗塞および狭心症の病歴を有していた。これらのデータは、心房細動がNT-proBNPレベルの上昇に対する独立した寄与因子を表すものであることを示す ( $P: 0.0002$ )。

## 【0200】

合計78個体が心筋梗塞 (MI) の病歴を有し、一方大多数はMIの病歴を有しなかった。心筋梗塞の病歴をもつ個体は、MIの病歴をもたない個体より高いNT-proBNPレベルを有した (図19)。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 0 1 】

N T - p r o B N P 値は、狭心症の病歴をもたない個体より、狭心症の病歴をもつ個体でより高かった（図 2 0）。狭心症の病歴をもつ患者は、症候性であることはまれであり、より高頻度で心疾患に罹っており、より高頻度で心筋梗塞の病歴を有した（図 1 9）。

## 【 0 2 0 2 】

4 7 0 個体でクレアチニンを測定した。クレアチニンレベルが正常範囲にあったのは 1 5 2 個体のみであり、3 1 8 個体が正常範囲の外であった。クレアチニンレベルが高い個体は、クレアチニンレベルが正常な個体より高い N T - p r o B N P レベルを有した。人口統計学的変数は、クレアチニンレベルが高い個体が、より高頻度で心筋梗塞の病歴を有したことを示唆している。これらのデータは、M I ( A M I ) の病歴をもつ患者を評価から除外した場合、腎臓機能の障害がそれ自体で N T - p r o B N P レベルの上昇に寄与し得ることを示唆するものである（図 2 1）。

## 【 0 2 0 3 】

3 0 6 個体の小集団で甲状腺機能を測定した。これら患者を、T S H および F T 4 レベルに基づいて、正常な甲状腺機能をもつ個体と、異常な甲状腺機能をもつ個体とに分類した。異常な甲状腺機能をもつ個体の大多数で、T S H レベルが上昇していたが、F T 4 レベルは正常であった。これは、低下した甲状腺機能が代償されていることを示唆するものである。N T - p r o B N P レベルの中央値は、正常な甲状腺機能をもつ個体より、異常な甲状腺機能をもつ個体でより高かった。これは、甲状腺の機能不全が、N T - p r o B N P レベル上昇に対する寄与因子を表すものであることを示唆し、この N T - p r o B N P レベル上昇は、おそらく、甲状腺機能の障害を介した心機能の障害に伴うものであると考えられる（図 2 2）。

## 【 0 2 0 4 】

ここに示したデータは、献血者（実施例 3）で得られたデータと比較した際、心臓内科医に来診する患者の大多数で N T - p r o B N P レベルが上昇していることを示唆する。N T - p r o B N P レベルは症候レベルおよび左心室駆出分画率の減失と共に増加した。N T - p r o B N P レベルの上昇が、無症候の個体において、および駆出分画率に減失のない個体において記録されたという事実は、N T - p r o B N P が、心臓内科医によって用いられている現在の標準手法より早期に、心臓合併症を認識することを示す。この試験において、クレアチニンレベルに基づくと、心臓合併症の証跡を有する患者の群において、しばしば腎臓機能が損傷していることが判明した。これは、同程度の年齢の集団において、正常レベルおよび有意に低下したクレアチニンレベルが見いだされた、献血者での試験と対照的である（実施例 3 を参照）。この試験は、腎臓機能および心臓合併症の両要素を考慮する必要があることを示唆し、また、これらのデータは、軽度から中程度の腎臓機能障害が、心臓合併症の診断および評価において、N T - p r o B N P 値の解釈に影響を与えないことも示す。

## 【 0 2 0 5 】

これらのデータは、甲状腺機能不全が心臓機能障害に関連し得ること、および N T - p r o B N P レベルの上昇に寄与し得ることも示す。

## 【 実施例 5 】

## 【 0 2 0 6 】

急性敗血症事象を示す 7 6 歳の女性患者が入院した（図 2 3）。疾患の過程において、患者は発熱し、抗体療法と共に大容積の注入を必要とした。それにもかかわらず、患者は敗血症ショックを発症し、彼女は注入治療を受けたが、血圧が下がった。疾患の過程において、C R P および N T - p r o B N P が徐々に増加したが、N T - p r o B N P は、流体過負荷と進行性心不全の徴候として増加した。

## 【 実施例 6 】

## 【 0 2 0 7 】

I I 型糖尿病の既知の病歴と、既知の冠状動脈性心臓病を有する 7 0 歳の男性が、かかりつけの一般開業医に来診した。男性は、右ひざの領域における疼痛を訴えた。この疼痛

10

20

30

40

50

は階段を登る際にとりわけ不快感を引き起こした。呼吸困難は心不全の明白な徴候であるが、来診時には呼吸困難は明らかではなかった。ひざのレントゲン試験を行った後、一般開業医は非ステロイド系抗リウマチ剤の投与を考慮した。初診の際に測定したNT-proBNP値は1800 pg/mlに達し、無症候の心臓合併症を示すものであった。心臓薬の同時投与と、詳細な臨床監視との下に、非ステロイド系抗リウマチ剤による治療を開始し、それに続いてNT-proBNPの測定を行った。

【実施例7】

【0208】

他の疾患に関する有意な病歴がなく、手術可能な結腸癌腫を有する76歳の女性患者が外科病室に入院した。NT-proBNP値は1200 pg/mlであった。結腸癌腫は手術によって除去された。続いて、腸機能の回復まで、非経口的栄養法が開始された。液体の必要量は1日あたり3000 mlに達した。これに続く正の平衡化の間に平衡を慎重に保ちながら、平衡にある水分バランスを回復させるために、利尿剤による治療を開始した。

10

【実施例8】

【0209】

集中治療室の合計120人の患者を、標準的な規準に従って一定の間隔で診断した。NT-proBNPは遡及的に分析した。注入療法および/または利尿剤による治療の終了との関連において、NT-proBNPの増加を合計5人の患者で観測し、それに続き心不全の臨床診断を行った。NT-proBNPレベルの増加は、注入療法を開始する前にも観測されたが、これは心血管リスクを示すものである。

20

【0210】

患者005：既知の冠状動脈性心臓病および肺炎を患っている45歳の患者。4日目にNT-proBNPレベルが増加し始め、6日目に心不全が診断された。

【0211】

患者025：注入/輸液を受けている、入院まもない、心筋梗塞および貧血の後の状態にある66歳の患者。1日目および2日目の間にNT-proBNPレベルが増加し始めた。3日目に肺浮腫が観測され、患者は利尿剤による治療を受けた。

【0212】

患者047：既知の狭心症、既知の冠状動脈性心臓病、および入院時における脱水症(脱水)を患っている76歳の患者。脱水症は1日あたり約2リットルで治療した。NT-proBNPが継続的に増加し、入院後の5日目に心不全が診断された。

30

【0213】

患者066：既知の肝動脈三枝病変および確認済みの冠状動脈性心臓病を患い、高コレステロール血症、うつ病、および貧血に罹る64歳の女性患者。1日目の後に悪化し、5日目まで利尿剤で治療した。その後、8日目までNT-proBNPが増加し、容量過負荷による心不全の反跳徴候として心不全が発症した。

【0214】

患者085：心不全を患い、その後利尿剤による治療を受け、NT-proBNPレベルの減少(高いスタートレベルにおける)を示す78歳の患者。続いて、栄養(約2.5リットル/日)に関して注入治療を受けた。12日目にNT-proBNPレベルが増加し、18日目に心不全が診断された。

40

【図面の簡単な説明】

【0215】

【図1】傾斜操作を受けた16人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。

【図2】n = 8の2群で、連続傾斜操作を受けた16人の健常ボランティアにおけるNT-proANP(上側パネル)、NT-proBNP(中央パネル)、およびリラキシン(RLX)の血漿レベルの経過を示す図である。

【図3】対照群およびナトリウム負荷(血管内容量増加、Na<sup>+</sup>)群における、10人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。

50

【図4】対照プロトコール(円)中、およびナトリウム負荷(血管内容量増加)プロトコール(正方形)中の、10人の健常ボランティアにおける、NT-proANP(上側パネル)、NT-proBNP(中央パネル)、およびリラキシン(RLX)の血漿レベルの経過を示す図である。

【図5】ナトリウム負荷(血管内容量増加)プロトコール中の、10人の健常ボランティアにおける、尿流量(UV)、ナトリウム排泄率(FE<sub>Na</sub>)、およびクレアチニンクリアランス(C<sub>crea</sub>)の経過を示す図である。

【図6】ナトリウム負荷(血管内容量増加)プロトコール中の、10人の健常ボランティアにおける、NT-proBNP尿排泄(U<sub>NT-proBNP</sub>)、リラキシン尿排泄(U<sub>RLX</sub>)、およびウロジラチン尿排泄(U<sub>URO</sub>)の経過を示す図である。

【図7】観測時間中の健常ボランティアにおける、NT-proANP、NT-proBNP、およびリラキシンの血漿中濃度および尿中ホルモン排出と、尿流量およびナトリウム排泄率との間の相関分析を示す図である。

【図8】年齢18~65歳(18~29歳、30~39歳、40~49歳、50~59歳、60~65歳)の献血者(n=2948)におけるNT-proBNPレベル(中央値)の度数分布を示す図である。M, 男性; F, 女性。

【図9】献血者における、年齢群別および性特異的NT-proBNPレベルを示す図である。m, 男性; f, 女性。

【図10】NT-proBNPレベルが高いN=48の献血者の追跡試験(12カ月)を示す図である。

【図11】献血者におけるNT-proBNPレベルと、それらのヘモグロビンレベルに対する関係とを示す図である。m, 男性(菱形); f, 女性(四角); m, 男性(三角)。

【図12】クレアチニンレベルに対する、献血者の年齢群特異的および性特異的NT-proBNPレベル(中央値)を示す図である。N, 献血者数。

【図13】心疾患の疑いで来診した患者の試験集団特性を示す図である。t, 合計; m, 男性; f, 女性。

【図14】LVEFおよびNYHA分類に応じた、患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図15】LVEFに応じた、男性のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図16】LVEFに応じた、女性のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図17】LVEFの減失を有し、かつNT-proBNPレベルがカットオフ(男性: 84 pg/ml、女性: 155 pg/ml)より低い患者に関する図である。

【図18】心房細動を示さない患者との比較における、心房細動を示す患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図19】心筋梗塞の既往症(AMI)がない患者との比較における、AMI既往症がある患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図20】狭心症を有しない患者との比較における、狭心症を有する患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図21】クレアチニンがレベル高い患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図22】甲状腺機能不全を有する患者との比較における、正常な甲状腺機能を有する患者のNT-proBNPレベルを示す図である。

【図23】敗血症性心筋梗塞およびそれに続く肺鬱血を有する患者のNT-proBNPおよびBNPレベルを示す図である。

【図24】実施例8の患者005におけるNT-proBNPレベルを示す図である。

【図25】実施例8の患者025におけるNT-proBNPレベルを示す図である。

【図26】実施例8の患者047におけるNT-proBNPレベルを示す図である。

【図27】実施例8の患者066におけるNT-proBNPレベルを示す図である。

【図28】実施例8の患者085におけるNT-proBNPレベルを示す図である。

10

20

30

40

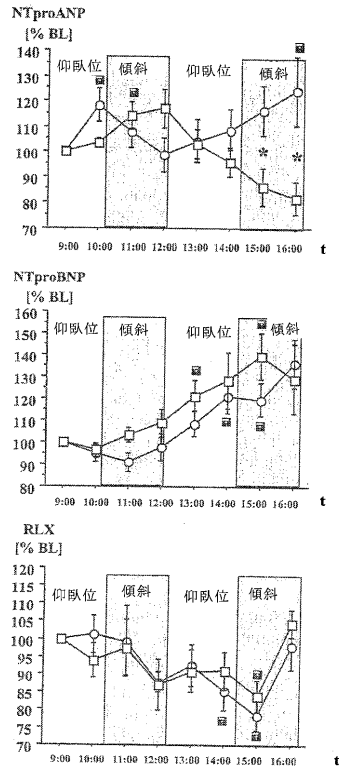
【図 1】

配置	群 1 (n=8)				群 2 (n=8)			
	SUP	FD	HD	MD	SUP	FD	SUP	MD
<b>T</b>	10:00	12:00	14:00	16:00	10:00	12:00	14:00	16:00
SABP [mmHg]	121±7	121±7	125±6	125±6	113±11	112±11	116±13	117±10
DAP [mmHg]	63±6	65±5	67±5	67±5	61±9	60±11	63±12	65±9
MAP [mmHg]	83±6	86±5	85±7	85±6	79±7	78±8	80±9	82±8
HR [bpm]	63±5	63±5	63±5	63±5	68±12	67±8	67±8	72±10
LAD [mm]	100	92±5	98±6	106±10*	100	112±16	98±8	88±4

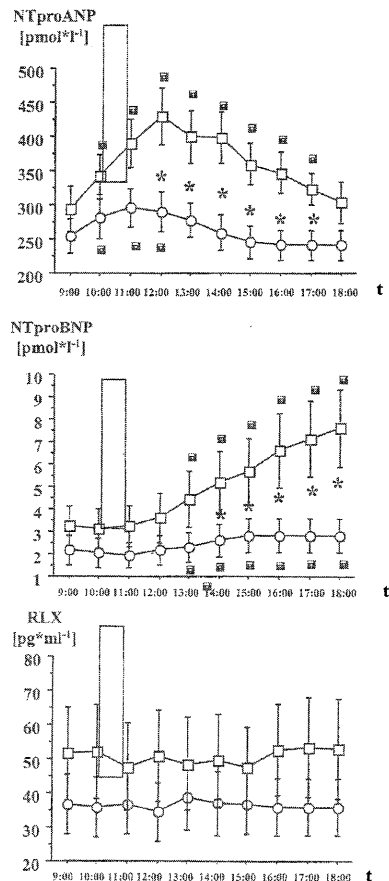
【図 3】

T:	9:00	10:00	11:00	12:00	14:00	16:00	18:00
MAP [mmHg]	83±6	83±5	81±6	79±8	85±7	85±2	85±7
Na <sup>+</sup>	83±5	83±7	81±6	82±3	80±6	80±6	86±4
HR [bpm]	67±10	64±8	68±8	63±8	66±7	68±11	60±22
Na <sup>+</sup>	67±8	65±5	67±5	68±6	64±8	66±6	66±6
LAD [mm]	3.7±0.4	3.9±0.4	3.8±0.4	3.7±0.4	3.6±0.3	3.6±0.3	3.6±0.4
Na <sup>+</sup>							

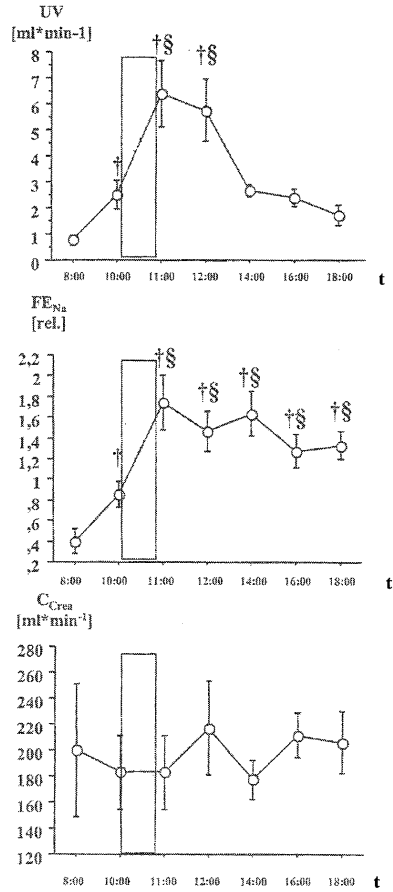
【図 2】



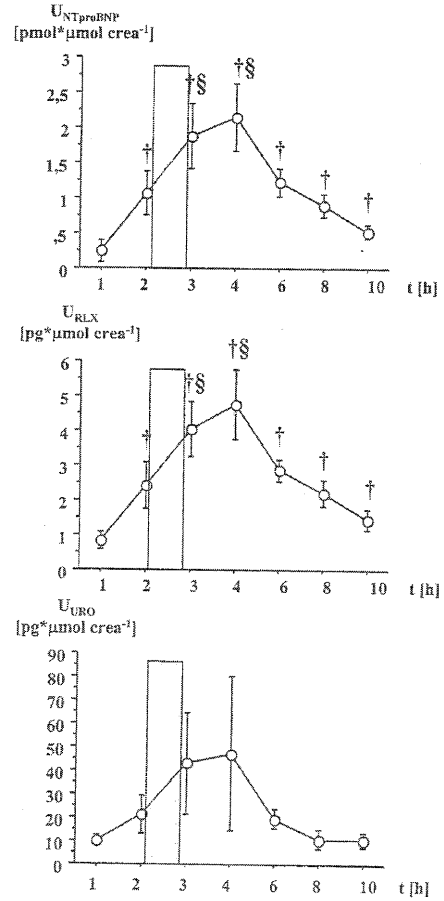
【図 4】



【 図 5 】



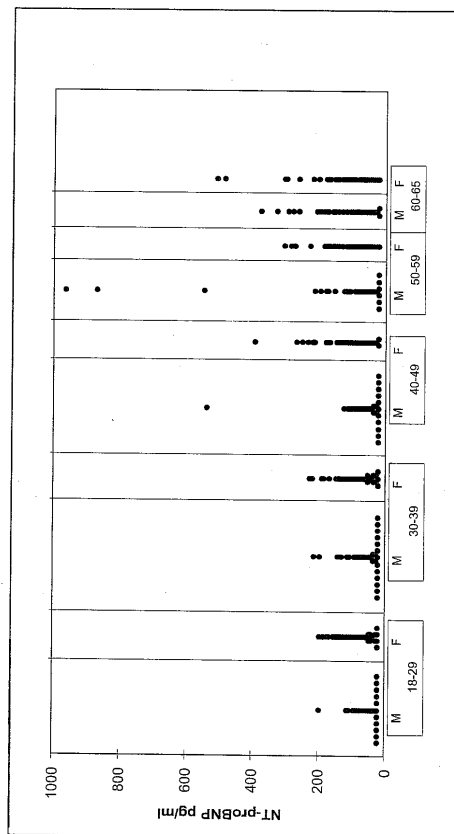
【 図 6 】



【 図 7 】

尿	m.s.	0.42*	0.5*	n.s.
FE <sub>Na</sub>				
血液	0.42*	0.27*	n.s.	m.s.
尿	m.s.	0.85*	0.80*	0.47*
UV				
血液	0.34*	n.s.	n.s.	m.s.
NTproANP				
NTproBNP				
RLX				
URO				

【 図 8 】



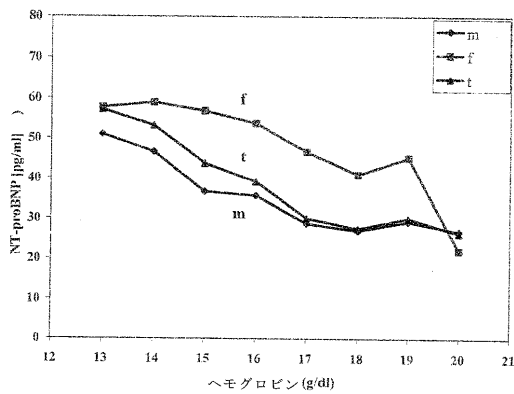
【図9】

年齢 (y)	18-49	18-49	18-29	18-29	30-39	30-39	40-49	40-49	50-59	50-59	>60	>60
性別	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
N	964	574	278	232	379	194	307	148	211	94	110	28
平均	20.0	39.3	20.0	37.0	20.0	36.9	20.0	49.8	27.4	65.8	42.0	61.4
97.5% 百分位数	84.2	146.2	64.7	129.7	88.1	132.2	94.6	230.7	178.5	270.3	278.0	261.7

【図10】

	NT-proBNP 正常範囲に戻る	NT-proBNP 高濃度の維持
男性数	7	14
女性数	7	20
合計数	14	34

【図11】



【図14】

	LVEF	≤30%	30-50%	>50%
NYHA	合計数	27	86	361
I	N	2	27	280
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	2848,8	506,4	302,1
II	N	6	36	70
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	1896,5	862,5	488,5
III	N	16	23	11
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	2467,9	1946,3	698,4
IV	N	3	0	0
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	16223,2	0	0

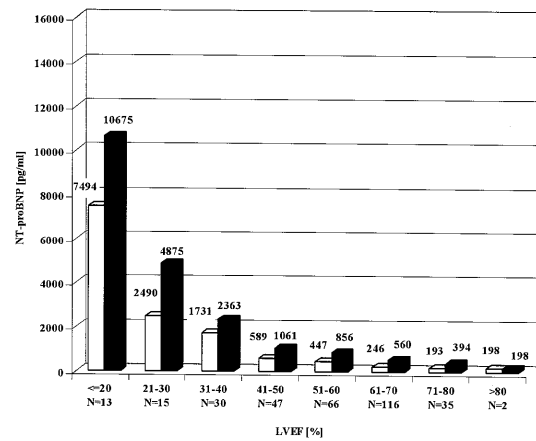
【図12】

年齢分布	N	合計		男性		女性	
		NT-proBNP [pg/ml] 中央値	N	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	N	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	N
合計	880	0,79	25,3	0,80	20,0	0,66	47,0
≤20	7	0,81	20,0	0,90	20,0	0,72	20,0
21-30	192	0,78	20,0	0,87	20,0	0,66	43,4
31-40	264	0,78	22,0	0,80	20,0	0,66	37,2
41-50	205	0,79	25,5	0,89	20,0	0,66	53,2
51-60	157	0,80	37,6	0,83	25,3	0,67	61,4
61-65	55	0,79	43,7	0,83	41,6	0,63	71,3

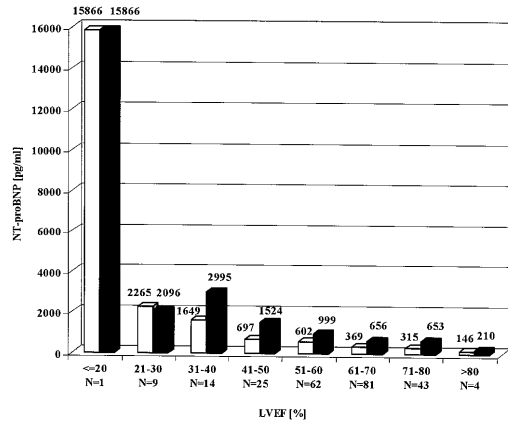
【図13】

患者	合計	男性	女性
N	473	258	215
年齢 [中央値]	66,0	64,5	68,0
症候及び既往症	N	N	N
動脈性高血圧	280	144	136
血圧、収縮期	182	96	86
血圧、拡張期	78	34	44
呼吸困難	208	102	106
浮腫	45	20	25
不整脈	32	16	16
狭心症	122	64	58
AMI 既往歴	165	59	106
等級	N	N	N
NYHA I	308	176	132
NYHA II	112	52	60
NYHA III	50	27	23
NYHA IV	3	3	0
NYHA II-IV	165	82	83
LVEF < 30%	27	18	9
LVEF 30-50%	86	56	30
LVEF > 50%	360	184	176

【図15】



【図16】



【図17】

	LVEF	≤30%		30-50%		>50%		
		合計数	男性	女性	男性	女性	男性	女性
		27			86			361
NYHA								
I	N	0	0	2	0	29	11	
II	N	0	0	0	3	1	5	
III	N	0	0	0	0	0	0	
IV	N	0	0	0	0	0	0	

【図19】

	AMI		AMIなし		p-値
	N	%	N	%	
合計数	78		381		
年齢 [中央値]	67,5		66,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	797,0		370,8		0.0001 ***
NYHA I	33	42,3 %	266	69,8 %	0.001 **
NYHA II	31	39,7 %	79	20,7 %	0.001 **
NYHA III	14	17,9 %	33	8,7 %	0.001 **
NYHA IV	0	0	3	0,8 %	0.001 **
LVEF < 30%	7	9,0 %	19	5,0 %	0.001 **
LVEF 30-50%	37	47,4 %	47	12,3 %	0.001 **
LVEF > 50%	34	43,6 %	315	82,7 %	0.001 **
動脈性高血圧	45	57,7 %	234	61,4 %	≥ 0.05
血圧、収縮期	21	26,9 %	154	40,4 %	≥ 0.05
血圧、拡張期	4	5,1 %	72	18,9 %	≥ 0.05
呼吸困難	51	65,4 %	156	40,9 %	0.0001 ***
浮腫	10	12,8 %	35	9,2 %	≥ 0.05
狭心症	32	41,0 %	89	23,4 %	0.0015 **
不整脈	0	0	27	7,1 %	0.0154*

【図18】

	心房細動		心房細動なし		p-値
	N	%	N	%	
合計数	32		442		
年齢 [中央値]	68,0		66,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	1055,0		401,7		0.0002 ***
NYHA I	22	68,8 %	287	64,9 %	≥ 0.05
NYHA II	6	18,8 %	106	24,0 %	≥ 0.05
NYHA III	4	12,5 %	46	10,4 %	≥ 0.05
NYHA IV	0	0	3	0,7 %	≥ 0.05
LVEF < 30%	0	0	27	6,1 %	≥ 0.05
LVEF 30-50%	6	18,8 %	80	18,1 %	≥ 0.05
LVEF > 50%	26	81,3 %	335	75,8 %	≥ 0.05
動脈性高血圧	13	40,6 %	267	60,4 %	≥ 0.05
血圧、収縮期	12	37,5 %	170	38,5 %	≥ 0.05
血圧、拡張期	7	21,9 %	71	16,1 %	≥ 0.05
呼吸困難	13	40,6 %	195	44,1 %	≥ 0.05
浮腫	3	9,4 %	42	9,5 %	≥ 0.05
狭心症	6	18,8 %	116	26,2 %	≥ 0.05
AMI既往症	0	0	78	17,6 %	0.0154*

【図20】

	狭心症		狭心症なし		p-値
	N	%	N	%	
N	122		335		
年齢 [中央値]	69,5		64,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	589,5		369,3		0.009 **
NYHA I	55	45,1 %	242	72,2 %	0.00001 ***
NYHA II	50	41,0 %	60	17,9 %	0.00001 ***
NYHA III	16	13,1 %	31	9,3 %	0.00001 ***
NYHA IV	1	0,8 %	2	0,6 %	0.00001 ***
LVEF < 30%	6	4,9 %	12	3,6 %	≥ 0.05
LVEF 30-50%	30	24,6 %	62	18,5 %	≥ 0.05
LVEF > 50%	86	70,5 %	261	77,9 %	≥ 0.05
動脈性高血圧	87	71,3 %	191	57,0 %	0.0056 **
血圧、収縮期	45	36,9 %	129	38,5 %	≥ 0.05
血圧、拡張期	18	14,8 %	57	17,0 %	≥ 0.05
呼吸困難	81	66,4 %	125	37,3 %	0.001 ***
浮腫	20	16,4 %	25	7,5 %	0.0042 **
AMI既往症	32	26,2 %	46	13,7 %	0.0015 **
不整脈	6	4,9 %	21	6,3 %	≥ 0.05

【図 2 1】

クレアチニン	正常		上昇		p-値
	0.66-1.1 mg/dl		> 1.1 mg/dl		
合計数	140		253		
年齢 [中央値]	66.0		65.0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	289.7		456.5		0.0003 ***
	N	%	N	%	
NYHA I	99	70.7 %	176	69.6 %	>=0.05
NYHA II	31	22.1 %	49	19.4 %	>=0.05
NYHA III	10	7.1 %	25	9.9 %	>=0.05
NYHA IV	0	0	3	1.2 %	>=0.05
LVEF ≤ 30%	5	3.6 %	15	5.9 %	>=0.05
LVEF 30-50% + > 50 %	135	96.4 %	238	94.1 %	>=0.05
動脈性高血圧	92	65.7 %	141	55.7 %	>=0.05
血圧、収縮期	66	47.1 %	94	37.2 %	>=0.05
血圧、拡張期	32	22.9 %	41	16.2 %	>=0.05
呼吸困難	57	40.7 %	97	38.3 %	>=0.05
浮腫	16	11.4 %	19	7.5 %	>=0.05
狭心症	31	22.1 %	58	22.9 %	>=0.05
不整脈	8	5.7 %	24	9.5 %	>=0.05

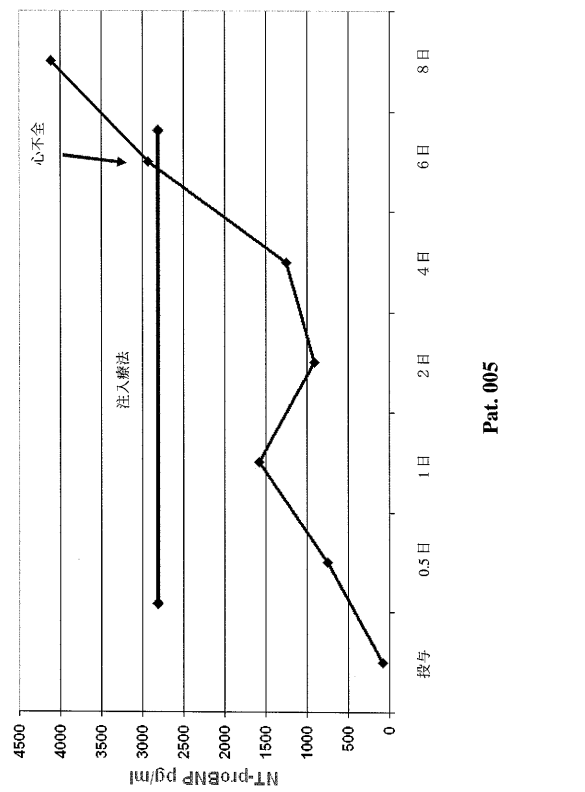
【図 2 2】

	甲状腺機能正常 (Euthyrose)		甲状腺機能異常		p-値
	139		167		
合計数	139		167		
年齢 [中央値]	66.0		66.0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	397.2		555.5		0.048*
	N	%	N	%	
NYHA I	97	69.8 %	109	65.3 %	>=0.05
NYHA II	30	21.6 %	38	22.8 %	>=0.05
NYHA III	12	8.6 %	19	11.4 %	>=0.05
NYHA IV	0	0	1	0.6 %	>=0.05
LVEF < 30%	6	4.3 %	8	4.8 %	>=0.05
LVEF 30-50%	24	17.3 %	37	22.2 %	>=0.05
LVEF > 50%	109	78.4 %	122	73.1 %	>=0.05
動脈性高血圧	83	59.7 %	96	57.5 %	>=0.05
血圧、収縮期	54	38.8 %	53	31.7 %	>=0.05
血圧、拡張期	24	17.3 %	23	13.8 %	>=0.05
呼吸困難	53	38.1 %	76	45.5 %	>=0.05
浮腫	13	9.4 %	18	10.8 %	>=0.05
狭心症	37	26.6 %	41	24.6 %	>=0.05
AMI 既往症	22	15.8 %	29	17.4 %	>=0.05
不整脈	6	4.3 %	12	7.2 %	>=0.05

【図 2 3】

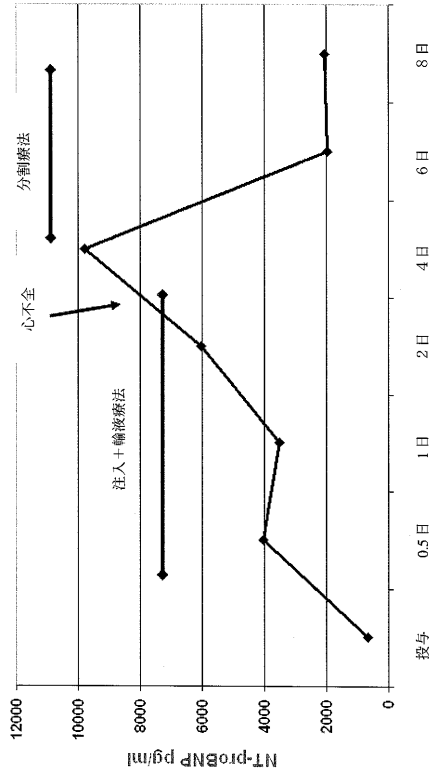
	0.5 日	1 日	2 日	4 日	6 日	8 日
アルゴース (mg/dl)	463.0	443.0	93.0	109.0	200.0	191.0
BUN (mg/dl)	0.9	1.2	1.3	1.3	2.4	2.5
U <sub>cr</sub> (μmol)	13.7	10.0	11.0	9.0	10.9	10.9
白血球 (×10 <sup>3</sup> /μl)	12.0	15.1	23.3	23.4	14.5	16.9
CRP (mg/l)	23.0	34.2	46.0	41.0	30.0	21.0
CRP (μg/l)	2.3	12.3	157.2	387.7	303.8	301.3
NT-proBNP (pg/ml)	125.0	2735.2	11351.3	33418.6	28867.9	31457.5
IL1β (pg/ml)	124.8	274.3	2013.9	4792.3	4511.4	3936.6
トロポニン T (ng/l)	1.18	11.63	6.72	7.49	9.36	11.34
TRT (pg/ml)	20.2	23.1	30.0	6.3	43.2	4.8
PAF-A (mMol)	0.67	3.18	4.8	4.67	4.65	6.65

【図 2 4】



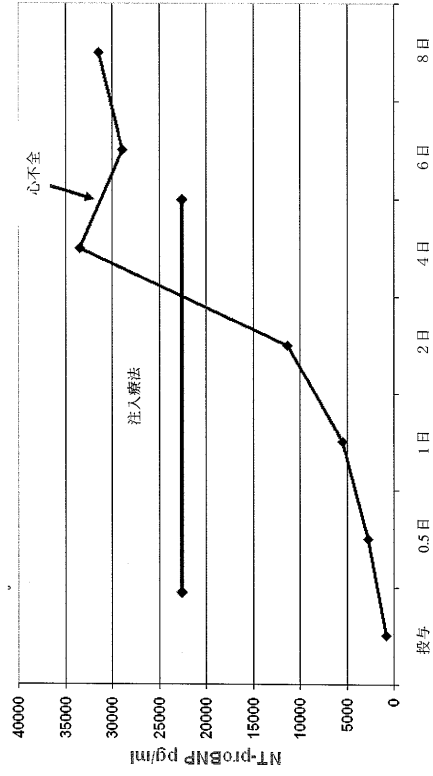
Pat. 005

【 図 2 5 】



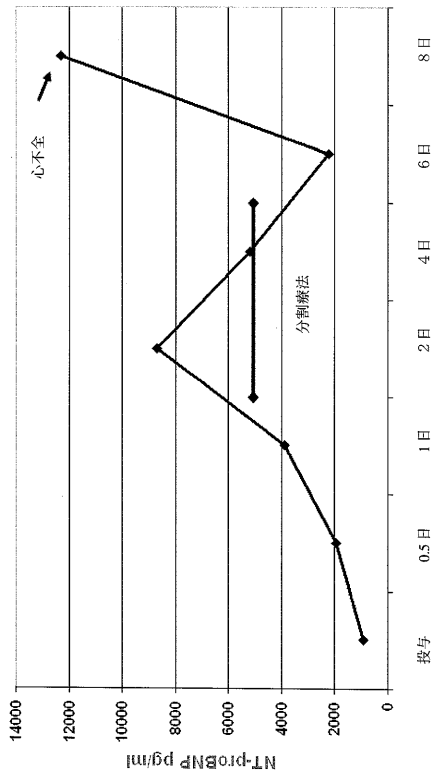
Pat. 025

【 図 2 6 】



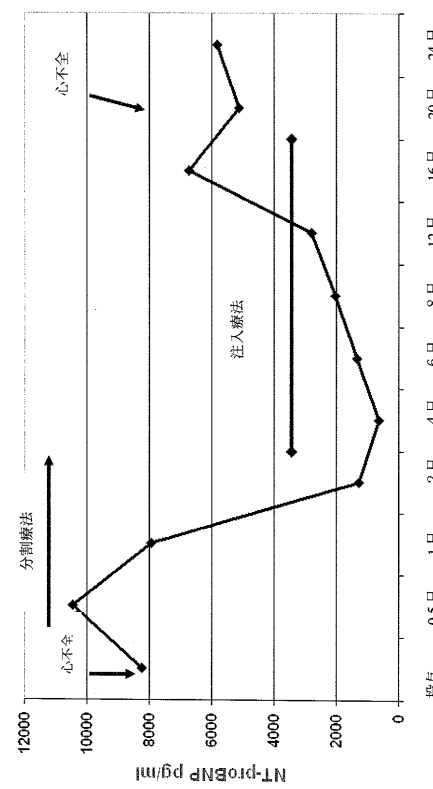
Pat. 047

【 図 2 7 】



Pat. 066

【 図 2 8 】



Pat. 085

---

フロントページの続き

(72)発明者 ゲオルグ ヘス

ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 0 マインツ, オッペンハイマー シュトラーセ 8 2

(72)発明者 アンドレア ホルシュ

ドイツ連邦共和国 6 8 2 5 9 マンハイム, クリスティアン - モルゲンシュターン シュトラー  
セ 1 1

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特開2004 - 037455 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 5 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )

C A p l u s ( S T N )

