

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5060966号  
(P5060966)

(45) 発行日 平成24年10月31日(2012.10.31)

(24) 登録日 平成24年8月10日(2012.8.10)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/56</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/56
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/37</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/37
<b>G O 1 N</b>	<b>33/573</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/573 A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 L

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2007-556866 (P2007-556866)	(73) 特許権者	591122956 三菱化学メディエンス株式会社 東京都港区芝浦四丁目2番8号
(86) (22) 出願日	平成19年1月30日(2007.1.30)	(73) 特許権者	000173555 一般財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/051489	(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
(87) 国際公開番号	W02007/088849	(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(87) 国際公開日	平成19年8月9日(2007.8.9)	(72) 発明者	小野 智子 東京都新宿区西五軒町13番1号 株式会社三菱化学ヤトロン内
審査請求日	平成21年5月1日(2009.5.1)		
(31) 優先権主張番号	特願2006-23596 (P2006-23596)		
(32) 優先日	平成18年1月31日(2006.1.31)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 播種性血管内凝固症候群の病態把握方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

播種性血管内凝固症候群と診断されている患者から採取した試料中のフォンヴィルブランド因子切断酵素の量(A ag)に対するフォンヴィルブランド因子の量(V ag)の比(V ag / A ag)、及び/又は、フォンヴィルブランド因子切断酵素の酵素活性(A act)に対するフォンヴィルブランド因子の量(V ag)の比(V ag / A act)を分析し、予め決定しておいた判定用閾値と比較することを特徴とする、前記患者から血栓性血小板減少性紫斑病と診断されるべき者を選択する方法。

【請求項2】

フォンヴィルブランド因子切断酵素又はフォンヴィルブランド因子の分析を免疫学的方法により実施する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

フォンヴィルブランド因子切断酵素に特異的に結合する抗体又はフォンヴィルブランド因子切断酵素に特異的に結合する抗体断片、及び、フォンヴィルブランド因子に特異的に結合する抗体又はフォンヴィルブランド因子に特異的に結合する抗体断片を含む、播種性血管内凝固症候群と診断されている患者から、血栓性血小板減少性紫斑病と診断されるべき患者を選択するためのキット。

【請求項4】

フォンヴィルブランド因子切断酵素に特異的に結合する抗体又はフォンヴィルブランド因子切断酵素に特異的に結合する抗体断片、及び、フォンヴィルブランド因子に特異的に

10

20

結合する抗体又はフォンヴィルブランド因子に特異的に結合する抗体断片の、播種性血管内凝固症候群と診断されている患者から、血栓性血小板減少性紫斑病と診断されるべき患者を選択するためのキットの製造への使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation; 以下、DICと称する) の病態把握方法に関する。

【背景技術】

【0002】

播種性血管内凝固症候群 (DIC) では、重篤な基礎疾患の存在下に、全身の細小血管内に微小血栓が形成される。そのため、微小循環が障害され、臓器の機能不全や出血傾向が見られる。DICでは、以下の3つの障害や反応が起こる。

(1) 微小血栓形成による微小循環障害が起こり、虚血の為に多数の臓器が機能不全に陥る。

(2) 微小血栓形成による消費性凝固障害、すなわち、組織因子が細胞表面に多く発現し、外因系血液凝固が促進される。また、血液凝固因子や血小板が消費され、出血傾向が現われる。

(3) 過剰線溶、すなわち、凝固の促進に応じて線溶系も活性化され、フィブリンを分解するプラスミンが生成される。プラスミンを阻害する<sub>2</sub> プラスミンインヒビター ( <sub>2</sub> PI ) が消費され、正常の60%未満に減少すると、プラスミンによってフィブリンが過剰に分解され、出血傾向が現われる。

【0003】

DICの本態は血液凝固系の病的かつ持続的な活性化による微小血栓の形成にあるが、それに伴って線溶系も活性化される。しかし、両者のバランスは基礎疾患あるいは症例ごとに差異があり、凝固活性化は著しいが線溶系は抑制される場合や、凝固・線溶両者の活性化が著しいケースなどが見られる。前者を凝固優位型、後者を線溶優位型と分類する。凝固優位型DICは感染症、特に敗血症に合併することが多く、臨床症状として臓器症状が見られやすい。一方、線溶優位型のDICでは線溶のマーカーであるFDP (Fibrin degradation product) やPIC (Plasmin/plasmin inhibitor complex) が著明に増加し、出血症状が見られやすい。基礎疾患としては急性前骨髄性白血病である。

【0004】

DICは治療が遅れると死に直結するため、早期診断及び早期治療が望まれる緊急性の高い病態である。現在、DICは厚生省のDIC診断基準に従い診断されている。この診断基準では、1) 臓器障害の有無、2) 血小板数、3) FDP、4) フィブリノゲン、5) PT比 (プロトロンビン時間比) の値をスコア化してDICを判定している。この診断基準はDICの確定診断には優れているが、DICの早期診断には難点があり、臨床的にこの診断基準に従い治療を行うと既にDICの病態が進みすぎていて手遅れになるケースも多い。また、臨床の場においても、特に血小板数の低下がDICによるものかどうか鑑別しがたいことが少なくない。具体的には、骨髄抑制を伴う病態 (薬物、ウイルス感染症、各種造血障害をきたす血液疾患など)、肝硬変、肝不全、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) / 溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome; HUS)、大量胸水・腹水などがあげられる。これらの病態においては、血小板数の低下のみならずFDPやDダイマーの上昇を伴うこともあり、更にDICの鑑別は困難となる。

【0005】

DICの治療法としては、血管内の血栓多発を抑制し、同時に消費性凝固障害の進行を阻止するために、低分子ヘパリンやアンチトロンビンIII製剤を投与する。線溶優位型DICでは、抗トロンビン作用及び抗線溶作用のあるメシル酸ガベキサート投与する。血

10

20

30

40

50

血小板産生の低下している血液疾患に合併したDICに対しては、濃厚血小板による血小板補充が不可欠である。血中フィブリノゲンが低下しているDICには、新鮮凍結血漿（FFP）輸注が施行される。

【0006】

一方、TTPは、DICやHUSなどと同様、細血管障害性溶血性貧血（microangiopathic hemolytic anemia；MAHA）と呼ばれる病態を示す。何らかの原因で血管内に病的微小血栓が多数形成されると細小血管内に狭くなった部位が多数生じ、ここを無理に通過した赤血球は機械的に破碎されるため溶血が起こる。これがMAHAの発症機序と考えられている。血管内径を小さくしてしまう微小血栓の主成分がフィブリンからなる場合がDICであり、血小板からなる場合がTTP又はHUSである。

10

【0007】

TTPは、1924年に米国のMoschowitzによって始めて報告された細小動脈に血小板の凝集塊（血小板血栓）が詰まり、以下のような5つの症状がみられる全身性重篤疾患である。症状は、1）血小板減少症（皮膚に紫斑ができる）、2）溶血性貧血（赤血球の崩壊による）、3）腎機能障害、4）発熱、5）動揺性精神神経症状である。

【0008】

TTPの病因として、止血因子である血漿中のvWFの特異的切断酵素（VWF-cleaving protease；VWF-CP）、別名ADAMTS13が同定された。ADAMTS13量が、健常人に比べ、TTPで有意に低下することは公知である（例えば、非特許文献1、非特許文献2、又は特許文献1）。ADAMTS13が欠損または低下すると、血管内皮細胞から放出されたUL-vWFM（unusually large vWF multimer）は分解されずに、微小血管などで生じる高ずり応力によって過剰な血小板凝集を起こし、血栓にて血管を閉塞する。

20

【0009】

例えば、特許文献2には、ADAMTS13を定量することを特徴とする、血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出方法が開示されており、前記血栓症として、急性若しくは慢性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、全身性エリトマトーデス、肺塞栓、脳硬塞、肝中心静脈閉塞症、急性リンパ球性白血病、血栓性微小血管障害、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、又は深部静脈血栓症が挙げられている。また、特許文献3には、ADAMTS13及び/又はその分解因子（例えば、エラスターゼ、プラスミン、又はトロンビン）を分析する、DIC又は全身性炎症反応症候群（systemic inflammatory response syndrome；SIRS）患者における血小板血栓症又は臓器障害の検出方法が開示されている。

30

【0010】

また、ADAMTS13活性が軽度低下ないし正常の非定型TTPも存在する。この場合の病因も多彩で、先天性と後天性要因があり、前者については補体調節作用を持つ血漿因子ファクターH（Factor H）や血管内皮細胞膜貫通型タンパク質CD46などの遺伝子異常によるものが報告されている。

【0011】

TTPは極めて稀な疾患で、後天性に生ずるものが一般的であるが、後述のように稀に先天性素因に基づいて起こるものがある。

40

【0012】

TTPの臨床症状としては、虚血性腸炎による下痢、腹痛、血便、神経症状として、痙攣や視力障害、更に腎障害等がみられる。検査所見としては、血栓形成による末梢血の破碎赤血球、貧血、血小板減少、血清LDH（乳酸脱水素酵素）、間接ビリルビンの上昇、ハプトグロビンの低下等溶血に伴う変化がみられる。腎障害により、血清クレアチニンの上昇もみられる。

【0013】

先天性TTPの治療法としては、現時点では新鮮凍結血漿（FFP）を2～3週毎に輸注してADAMTS13補充を行い、血小板数を維持し、発症予防治療が行われている場

50

合が多い。血小板輸血は禁忌である。後天性TTPの治療法としては、全体の約1/3の症例でADAMTS13活性は著減し、これらはほぼ全例ADAMTS13に対する自己抗体陽性である。それ故、FFP単独投与では不十分で、後天性・特発性TTPの治療は血漿交換(plasma exchange; PE)療法が第一選択である。この際ステロイド又はステロイドパルス療法が併用される事が多い。当然、PE実施前の血小板輸血は禁忌である。PEの効果は、1)ADAMTS13の補充、2)同インヒビターの除去、3)UL-vWFMの除去、4)止血に必要な正常vWFの補充の4点に集約される。難治・反復例に対してはピンクリスチン又はエンドキサンなどの免疫抑制剤の使用、脾摘なども考慮されるべきである。PE又はFFP輸注療法が導入される以前の死亡率は80%強と、非常に予後不良であった。しかし、これらの導入や抗血小板療法の併用により予後の改善は顕著で、現在、生存率はほぼ90%以上となっている。しかしながら、治療抵抗例あるいは再発例が多いことが知られ、今後解決されるべき問題と考えられる。また、TTPは病態が進行してしまえば、治療は困難であり、その予後は極めて不良であるので、早期診断と早期治療が必要である。

10

【非特許文献1】ゼン・エックス(Zheng X)ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J Biol Chem)」、(米国)、2001年、第276巻、41059-41063

【非特許文献2】エム・フルラン(Furlan M)ら、「ブラッド(Blood)」、(米国)、1997年、第89巻、3097-3103

【特許文献1】国際公開第00/50904号パンフレット

20

【特許文献2】国際公開第2005/062054号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2006/049300号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

前記のように、現在のところ、既存マーカー測定値を使用した診断基準及び臨床所見からDICと診断されている患者の中には、DICに対する治療を実施して、なかなか改善をみない例がたくさん報告されている。この中で特に血小板減少が認められる患者では、本来はTTPと診断されて、血漿交換などの適切な治療が実施されれば、予後改善の可能性が高いということが考えられる。DICでは血小板輸注が治療法として選択されるが、TTPの場合、血小板が著減していても、前述したように血小板輸注により更に病態を悪化させてしまうため、血小板輸注は禁忌である。よって、血小板減少は共通の所見ではあるが、両疾患群の相違を明確に差別化することで、適切な診断を下し、適切な治療法を行うことは医療の現場では非常に望まれている。

30

【0015】

本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、DIC患者においてADAMTS13量(濃度)とADAMTS13酵素活性の一方又はそれらの組み合わせによるDIC患者群の分類、更に、ADAMTS13量(濃度)及び/又はADAMTS13酵素活性とvWF量(濃度)との組み合わせを用いることにより、DICと診断された患者群中に、後天的なTTP患者の可能性のある検体群を見出した。このことは、臨床所見や従来のマーカーだけでは差別化できなかった「TTPと診断されるべきDIC」と「TTPとは無関係なDIC」との鑑別を行い、各疾患に特異的な治療法を行い、予後の改善を行う手段となることを見出し、ここに本発明を完成するに至った。

40

すなわち、本発明の課題は、臨床所見や従来のマーカーだけでは差別化できなかったDIC患者からTTP患者の鑑別診断を行うことのできる方法及びキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

前記課題は、本発明による、播種性血管内凝固症候群(DIC)患者において、フォンヴィルブランド因子切断酵素(ADAMTS13)の量(濃度)及び/又は酵素活性を分

50

析することを特徴とする、播種性血管内凝固症候群の病態の把握方法により解決することができる。

【0017】

本発明の病態把握方法の好ましい態様によれば、更にフォンヴィルブランド因子(vWF)の量(濃度)を分析する。

本発明の病態把握方法の別の好ましい態様によれば、フォンヴィルブランド因子切断酵素の分析を免疫学的方法により実施する。

また、本発明は、フォンヴィルブランド因子切断酵素に特異的に結合する抗体又はその断片を含む、播種性血管内凝固症候群の病態の把握用キットに関する。

【0018】

本明細書における用語「分析」には、分析対象物質(例えば、ADAMTS13又はvWF)の存在の有無を判定する「検出」と、分析対象物質の量(濃度)又は活性を定量的又は半定量的に決定する「測定」とが含まれる。

【発明の効果】

【0019】

DICとTTPはその病態の類似性のために明確に診断することが難しい。また、いずれの疾患の場合も、早期診断による適切な治療を早期に実施しないと致死に至るため、「TTPと診断されるべきDIC」と「TTPとは無関係なDIC」の鑑別は非常に重要である。本発明によれば、現診断基準でDICと診断されている患者において、「TTPと診断されるべきDIC」と「TTPとは無関係なDIC」の鑑別が可能となり、適切な治療が実施されることになり、救命率の上昇又は致死率の低下につながる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】ADAMTS13抗原量(Aag)に関する結果を示すグラフである。

【図2】DAMTS13酵素活性(Aact)に関する結果を示すグラフである。

【図3】vWF抗原量(Vag)に関する結果を示すグラフである。

【図4】Vag/Aagに関する結果を示すグラフである。

【図5】Vag/Aactに関する結果を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

[1]本発明の把握方法

本発明方法では、DIC患者における、ADAMTS13の量(濃度)及び/又は酵素活性の少なくとも一方(好ましくは両方)を分析することにより、あるいは、ADAMTS13の量(濃度)及び/又は酵素活性の少なくとも一方(好ましくは両方)とvWFの量(濃度)との組み合わせを用いることにより、DICの病態の把握を行うことができる。

【0022】

本明細書における「DICの病態把握」には、適切な治療方針又は治療法の決定に有用な情報となるDIC患者における各種病態の把握が含まれ、例えば、DICと診断されている患者の中から、本来はTTPと診断されて治療法が変わるべき患者の差別化、すなわち、「TTPと診断されるべきDIC」と「TTPとは無関係なDIC」との鑑別を挙げることができる。また、「DICの病態把握」には、前記病態把握に基づく各種判断及び予測、例えば、適切な治療方針又は治療法の決定、予後の予測、モニタリング等も含まれる。

【0023】

本発明方法では、例えば、DIC患者におけるADAMTS13量(濃度)及び/又は酵素活性の違いを指標にして、「TTPの疑いがあるDIC」と「TTPとは無関係なDIC」との鑑別診断を行うことができ、更には、DIC患者群でも診断に苦慮する患者において、ADAMTS13量(濃度)及び/又は酵素活性とvWF量(濃度)との組合せ、例えば、ADAMTS13量(濃度)及び/又はその活性に対するvWF量の比率の相

10

20

30

40

50

違を指標として、D I C患者群を、例えば、更に3つの群にカテゴライズして「T T Pと診断されるべきD I C」と「T T Pとは無関係なD I C」とに鑑別し、患者特異的な治療法を提案することができる。カテゴライズの指標として、A D A M T S 1 3量（濃度）及びA D A M T S 1 3活性の閾値を設定することが可能である。

【0024】

本明細書において「フォンヴィルブランド因子切断酵素（v W F切断酵素）」とは、フォンヴィルブランド因子（v W F）のA 2ドメインに存在するチロシン（842）とメチオニン（843）を特異的に切断し、A D A M T S 1 3とも称されるメタロプロテアーゼである。

【0025】

A D A M T S 1 3量が、健常人に比べ、T T Pで有意に低下することは公知である[例えば、ゼン・エックス(Zheng X)ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J Biol Chem)」、(米国)、2001年、第276巻、41059-41063；エム・フルラン(Furlan

M)ら、「ブラッド(Blood)」、(米国)、1997年、第89巻、3097-3103；W O O O / 5 0 9 0 4]。また、小野ら[小野(T.ono)ら、血栓止血学会、2004年(10/1に抄録発行)]により、健常人に比べ、基礎疾患は多様であるがD I Cスコアに照合して診断されたD I C患者群においてA D A M T S 1 3量が有意に低下すること、併せて、T T P患者群と診断された群のA D A M T S 1 3量は5~45%、一方、D I C患者群のA D A M T S 1 3量は10~95%と広範囲であることも報告されている。

また、近年、多種の疾患でA D A M T S 1 3に関する検討結果が報告されるようになり、以前は、前述のように、T T P患者ではA D A M T S 1 3活性は著減していると考えられていたものが、実はT T P患者の60%でA D A M T S 1 3活性は著減していないことが報告されている(松本雅則、血管医学、2005年、第6巻、65-72)。

しかしながら、D I Cと診断されている患者において、「T T Pと診断されるべきD I C」と「T T Pとは無関係なD I C」との鑑別が、A D A M T S 1 3単独で可能であるとの報告はない。

【0026】

本発明方法を適用することのできる対象(被験者)は、D I C患者である。被検試料としては、例えば、血漿または血清形態の血液が好ましいが、それ以外にも、例えば、細胞組織液、リンパ液、胸腺水、腹水、羊水、胃液、尿、脾臓液、骨髓液、又は唾液等の各種体液を用いることもできる。また、前記血漿は、クエン酸血漿又はヘパリン血漿であることが好ましい。

【0027】

本発明方法では、D I C及びT T P患者から、それぞれ検体を採取し、それぞれのA D A M T S 1 3濃度、A D A M T S 1 3活性、及び/又はv W F濃度を測定した後、測定値を比較することにより、D I Cの病態の把握、更には、その適切な治療方法の決定を行うことができる。T T Pが疑われるD I C患者を差別化するために、T T P患者から採取した検体を用いて、各種判定用閾値、例えば、A D A M T S 1 3濃度及びA D A M T S 1 3活性の判定用閾値、並びにA D A M T S 1 3濃度又はその活性とv W Fの比率の判定用閾値を予め決定しておくことが好ましい。

【0028】

後述の実施例に示すように、例えば、以下の分類が可能である。下記3項目：

- 1) A D A M T S 1 3量(以下、Aagと称する)が、例えば、30%以下
- 2) A D A M T S 1 3活性(以下、Aactと称する)が、例えば、15%以下
- 3) A D A M T S 1 3活性に対するA D A M T S 1 3量の比( $Aag / Aact$ )が、例えば、2.0以上

の内、2項目又は3項目に該当する患者群をまず「T T Pの疑いがあるD I C患者群(A群)に、それ以外の患者群を「T T Pの疑いがないD I C患者群」(B群)に分類する。これらの患者群(A群及びB群)に対して、更に、A D A M T S 1 3量(Aag)に対する

10

20

30

40

50

vWF量（以下、Vagと称する）の比（Vag/Aag）及びADAMTS13活性（Aact）に対するvWF量の比（Vag/Aact）に関して、

第1群：Vag/Aagが、例えば、8以上、且つ、Vag/Aactが、例えば、16以上

第2群：Vag/Aagが、例えば、8以下、且つ、Vag/Aactが、例えば、16以上

第3群：第1群及び第2群に該当しない群（すなわち、Vag/Aactが、例えば、16未満）

と分類することができる。後述の実施例に示すとおり、TTPと診断された患者2名は第1群に分類された。また、後述の実施例に示すとおり、第1群～第3群の内、第1群及び第2群は「TTPと診断されるべきDIC患者群」であり、第3群は「TTPとは無関係のDIC患者群」である。

なお、前記のAag、Aact、Vagは、それぞれ、正常値に対する相対値であり、前記の各比（Aact/Aag、Vag/Aag、Vag/Aact）は、前記相対値に基づく比である。

#### 【0029】

判定用閾値が予め決定されている場合には、予測対象である被験者に関して、Aag及び/若しくはAactの分析、又は、Aag及び/若しくはAact並びにVagの分析（例えば、Vag/Aag及び/又はVag/Aactの分析）を行うことにより、前記被験者における前記判定及び/又は予測を行うことができる。判定用閾値は、種々条件、例えば、基礎疾患、性別、年齢などにより変化することが予想されるが、当業者であれば、被験者に対応する適当な母集団を適宜選択して、その集団から得られたデータを統計学的処理を行うことにより、正常値範囲又は判定用閾値を決定することができる。

#### 【0030】

本発明方法において、ADAMTS13濃度を分析する方法としては、ADAMTS13量を定量的又は半定量的に決定することができるか、あるいは、ADAMTS13の存在の有無を判定することができる限り、特に限定されるものではなく、例えば、抗ADAMTS13抗体又はその断片を用いる免疫学的手法（例えば、酵素免疫測定法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、免疫組織染色、又はウエスタンブロット等）、生化学的手法（例えば、酵素学的測定法）、又はmRNA量を測定する分子生物学的手法などを挙げることができる。

ADAMTS13の分析方法として免疫学的手法を用いる場合には、抗ADAMTS13抗体は、公知の方法、例えば、国際公開第2004/029242号パンフレットに記載の方法に遵って調製することができ、前記免疫学的測定も、例えば、国際公開第2004/029242号パンフレットに記載の方法に従って実施することができる。

#### 【0031】

ADAMTS13濃度を測定する方法としては、感度及び簡便性から免疫学的方法が好ましい。ここで免疫学的方法とは、ADAMTS13に対する抗体を用いて、ADAMTS13を、例えば、ELISA法、ラテックス法、又はイムノクロマトグラフ法で分析する方法である。免疫学的方法としては、例えば、ADAMTS13を標識する競合法、抗体を標識するサンドイッチ法、抗体をコートしたビーズの凝集を観察するラテックスビーズ法、あるいは、金コロイドなどの着色粒子に結合した抗体を用いる方法等、様々な方法があるが、ADAMTS13に対する抗体を用いた方法であれば、本発明の好ましい態様に含まれる。抗体は、モノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でも良い。また、抗体断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、又はFvを用いることもできる。

#### 【0032】

ADAMTS13の酵素活性は、例えば、SDS-アガロース電気泳動法を用いた方法 [エム・フルラン (M.Furlan) ら, 「ブラッド (Blood)」, (米国), 1997年, 第89巻, p. 3097-3103]、vWF切断酵素の基質であるvWFのA2ドメインの組み換え抗原を使用したELISA法 [ホワイトロック・ジェーエル (Whitelock JL) ら, 「ジャーナル オプトロンポーシス アンド ヘモステシス」, (英国), 2004年, 第2巻, 485-491]、あるいは、vWF切断酵素の基質であるvWFのA2ドメインの中のAsp1596-Arg1668の73残基に相当する合成ペプチドに蛍光

10

20

30

40

50

基 [2-(N-methylamino)benzoyl, Nma] と消光基 (2,4-dinitrophenyl, Dnp) を導入した消光性蛍光基質 F R E T S - V W F 7 3 を使用した方法 [コカメ・ケー (Kokame K) ら「ブリティッシュ ジャーナル オブ ヘマトロジー」, (英国), 2005年, 第129巻, 93-100] により測定することができる。また、特願2005-148793号明細書に記載の方法、具体的には、(1) A D A M T S 1 3 を含有する可能性のある被検試料と、v W F 又はその断片を不溶性担体に結合させた固定化基質とを液中で接触させる工程、(2) 前記液と不溶性担体とを分離する工程、並びに(3) 不溶性担体に残存する v W F 又はその断片、及び/又は、不溶性担体から遊離した液中の v W F 断片を分析する工程を含む分析方法により測定することができる。

#### 【0033】

また、v W F 濃度の測定法に関しては、例えば、ヒト血小板とリストセチンコファクターの凝集活性による活性測定方法 [アライン・ジェーピー (Allain JP) ら、「ジャーナル オブ ラボラトリー アンド クリニカル メディシン (J Lab Clin Med.)」, (米国), 1975年, 第85巻, p. 318-328]、あるいは、抗 v W F 抗体を使用した免疫測定法 [ブラウン・ジェーイー (Brown JE) ら、「トロンボシス リサーチ (Thromb Res.)」, (米国), 1986年, 第43巻, p. 303-311]などを挙げることができ、感度及び簡便性から免疫学的方法が好ましい。

#### 【0034】

##### [2] 本発明の把握用キット

本発明のキットは、抗 A D A M T S 1 3 抗体又はその断片を少なくとも含み、異なる2種類以上の抗 A D A M T S 1 3 抗体を含むことが好ましい。前記抗 A D A M T S 1 3 抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであることもできる。また、異なる2種類以上の抗 A D A M T S 1 3 抗体を含む場合には、いずれか一方(第2抗体)を標識抗体とすることもできるし、あるいは、標識化の代わりに、第2抗体に対する抗体に標識を結合させた標識抗体を更にキットに追加することもできる。

#### 【実施例】

#### 【0035】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0036】

##### 《実施例1：D I C 患者及び T T P 患者における凝固線溶マーカー値の測定》

D I C 患者23名及び T T P 患者2名より、3.8%クエン酸加血漿を採取した。血小板数を除く各測定マーカーは、市販キット(L P I A シリーズ; 三菱化学ヤトロン)を用いて、L P I A - N V 7 (三菱化学ヤトロン)にて測定した。血小板数は3.2%クエン酸加血漿を採取し、K X - 2 1 (シスメックス社)を用いて測定した。

#### 【0037】

各測定結果を表1に示す。表1において、P A I - 1 はプラスミノゲン活性化因子抑制因子-1を意味し、D - D はDダイマーを意味し、F b g はフィブリノゲンを意味し、F D P - P は血漿 F D P を意味し、P L T は血小板を意味し、T A T はトロンビン/アンチトロンビンIII複合体を意味する。D I C と診断されている患者の中には血小板数が著減している患者がみられるが、従来の凝固線溶マーカーの値のみでは、T T P 患者と差別化することはできなかった。

#### 【0038】

10

20

30

40

【表 1】

	診断名	PIC	PAI-1	D-D	Fbg	FDP-P	PLT	TAT
		$\mu\text{g/mL}$	$\text{ng/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\text{mg/dL}$	$\text{ng/mL}$	$\text{X}10^4/\mu\text{L}$	$\text{ng/mL}$
患者1	TTP	1.1	39.7	3.6	204	2.5	2.0	—
患者2	TTP	4.2	10.7	6.7	—	—	0.9	—
患者3	DIC	4.9	924.5	>2000	197	261.5	1.2	48.1
患者4	DIC	2.0	55.7	1000-2000	445	64.1	—	5.6
患者5	DIC	2.4	220.7	>2000	838	49.2	0.5	12.9
患者6	DIC	1.3	70.4	500-1000	433	27.5	—	3.4
患者7	DIC	3.0	25.2	1000-2000	413	17.9	—	—
患者8	DIC	4.4	228.3	33.7	26	189.0	—	57.4
患者9	DIC	0.6	40.1	<200	703	4.5	—	1.2
患者10	DIC	1.0	28.1	12.1	165	24.8	—	7.6
患者11	DIC	0.5	69.4	<200	360	2.7	—	1.4
患者12	DIC	—	25.6	1.1	388	3.4	—	—
患者13	DIC	0.7	—	1.5	194	1.7	—	1.9
患者14	DIC	4.6	105.6	>2000	423	24.1	10.4	32.5
患者15	DIC	1.1	29.1	500-1000	401	6.7	—	1
患者16	DIC	4.1	178.0	>2000	176	—	13.4	7.6
患者17	DIC	1.3	16.2	2.1	680	9.8	—	2
患者18	DIC	6.7	31.6	>2000	342	59.9	3.5	4.4
患者19	DIC	0.7	23.8	<200	416	2.0	—	1.4
患者20	DIC	—	1091.2	15.0	432	13.7	0.2	—
患者21	DIC	3.4	53.5	1000-2000	260	15.7	1.8	9.6
患者22	DIC	—	162.2	200-500	307	5.7	22.9	—
患者23	DIC	—	—	>2000	632	51.0	25.4	—
患者24	DIC	31.6	17.9	22.1	126	55.9	1.1	—
患者25	DIC	7.6	22.4	33.8	340	28.9	5.2	—

## 【0039】

《実施例 2：DIC 患者及び TTP 患者における ADAMTS 13 抗原量及びその酵素活性並びに vWF 抗原量の分析》

健常人 12 名、DIC を発症した患者 23 名、TTP を発症した患者 2 名より、3.8 % クエン酸加血漿を採取した。なお、DIC は前述の DIC 診断基準により DIC と診断された患者、TTP は臨床所見より TTP と診断された患者を示す。ADAMTS 13 抗原量 (Aag) は、市販キット (ADAMTS-13 ELISA kit; 三菱化学ヤトロン) を使用して測定した。ADAMTS 13 酵素活性 (Aact) は、SDS - アガロースゲル電気泳動法 [エム・フルラン (M. Furlan) ら, 「ブラッド (Blood)」, (米国), 1997 年, 第 89 巻, p. 3097 - 3103] により測定した。vWF 抗原量 (Vag) は、市販キット (STA LIAtest: ロッシュダイアグノスティックス) を使用して測定した。測定結果を表 2 に示す。なお、Aag 又は Aact は、健常人 12 名の平均値を 100% とした場合の百分率で示し、Vag は、キットに含まれる STD (正常人) に対する百分率で示す。

## 【0040】

【表 2】

	診断名	Aag %	Aact %	Aag/Aact	Vag %	Vag/Aag	Vag/Aact	カテゴリー	
TTP 疑い群	患者1	TTP	14.3	3.0	4.8	125.5	8.7	41.8	TTP
	患者2	TTP	32.2	15.1	2.1	340.8	10.6	22.5	
	患者3	DIC	17.3	6.8	2.5	214.7	12.4	31.4	第一群
	患者4	DIC	12.3	7.9	1.6	195.2	15.9	24.7	
	患者5	DIC	8.9	9.4	1.0	170.0	19.0	18.1	
	患者6	DIC	8.3	3.0	2.8	175.5	21.1	58.5	
	患者7	DIC	21.9	3.0	7.3	237.0	10.8	79.0	
	患者8	DIC	24.4	8.8	2.8	210.8	8.6	23.9	
	患者9	DIC	56.0	3.0	18.7	271.8	4.9	90.7	第二群
	患者10	DIC	42.3	6.2	6.9	239.8	5.7	38.9	
	患者11	DIC	28.7	8.8	3.3	182.4	6.4	20.7	
	患者12	DIC	44.0	15.0	2.9	216.9	4.9	14.4	第三群
	患者13	DIC	35.7	12.8	2.8	180.7	5.1	14.1	
	患者14	DIC	24.6	10.8	2.3	140.8	5.7	13.1	
患者15	DIC	76.5	94.4	0.8	56.6	0.7	0.6		
患者16	DIC	59.0	107.1	0.6	124.7	2.1	1.2		
患者17	DIC	72.0	53.1	1.4	169.0	2.3	3.2		
患者18	DIC	41.7	20.9	2.0	111.4	2.7	5.3	TTP 疑いなし群	
患者19	DIC	61.7	59.4	1.0	218.4	3.5	3.7		
患者20	DIC	56.2	75.0	0.7	214.8	3.8	2.9		
患者21	DIC	35.2	20.9	1.7	161.2	4.6	7.7		
患者22	DIC	41.1	19.5	2.1	198.9	4.8	10.2		
患者23	DIC	23.7	33.3	0.7	186.8	7.9	5.6		
患者24	DIC	79.5	83.5	1.0	172.7	2.2	2.1		
患者25	DIC	77.3	67.9	1.1	226.0	2.9	3.3		
健常人1		102.1	100	1.0	80.2	0.8	0.8	健常人	
健常人2		96.3	90	1.1	101.5	1.1	1.1		
健常人3		110.5	100	1.1	83.8	0.8	0.8		
健常人4		78.1	100	0.8	46.4	0.6	0.5		
健常人5		89.5	100	0.9	102.2	1.1	1.0		
健常人6		96.4	115	0.8	90.6	0.9	0.8		
健常人7		134.2	100	1.3	87.5	0.7	0.9		
健常人8		90.9	100	0.9	111.3	1.2	1.1		
健常人9		90.1	100	0.9	126.5	1.4	1.3		
健常人10		111.2	100	1.1	115.6	1.0	1.2		
健常人11		110.7	120	0.9	118.2	1.1	1.0		
健常人12		106.5	135.5	0.8	78.7	0.7	0.6		

## 【0041】

TTP患者の測定値をもとに、DIC患者の測定値を下記の指標に従って分類を行った。まず、下記3項目：

- 1) ADAMTS13抗原量(Aag)が30%以下
- 2) ADAMTS13酵素活性(Aact)が15%以下
- 3) ADAMTS13活性に対するADAMTS13量の比(Aag/Aact)が2.0以上

の内、2項目又は3項目に該当する患者群をまず「TTPの疑いがあるDIC患者群」(A群)に、それ以外の患者群を「TTPの疑いがないDIC患者群」(B群)に分類した。これらの患者群(A群及びB群)に対して、更に、

第1群：Vag/Aagが8以上、且つ、Vag/Aactが16以上

10

20

30

40

50

第2群：Vag / Aagが8以下、且つ、Vag / Aactが16以上

第3群：第1群及び第2群に該当しない群（すなわち、「Vag / Aactが16未満」）に分類した。

【0042】

各群と健常者を比較したところ、図1～図3の結果を得た。ADAMTS13抗原量（Aag）、ADAMTS13酵素活性（Aact）、vWF抗原量（Vag）の結果から、いずれのマーカーでもTTPと健常人群は明らかに差を認めた。また、ADAMTS13抗原量及びADAMTS13酵素活性ではTTPと第3群の差を認め、両者の判別が可能であった。更に、第2群に関してはADAMTS13抗原量ではTTPとの差をみとめ、ADAMTS13酵素活性ではTTPとの差は認められなかった。一方、vWF抗原量ではTTPとDIC群（第1群～第3群）の差は認められなかった。

10

【0043】

そこで、Vag / Aag又はVag / AactでTTPと3群にカテゴライズしたDIC群とを比較したところ、図4～図5の結果を得た。

vWF抗原量とADAMTS13抗原量の比（Vag / Aag）及びvWF抗原量とADAMTS13活性の比（Vag / Aact）を使用した場合、第1群及び第2群の各値の中央値はTTPのそれに比べ2倍以内の値を示しているが、第3群の中央値はTTPのそれに比べ、2倍以上の差を示しており、第3群は明らかにTTPとは異なる病態であることが示された。

20

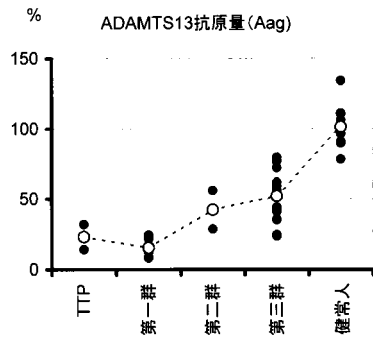
【産業上の利用可能性】

【0044】

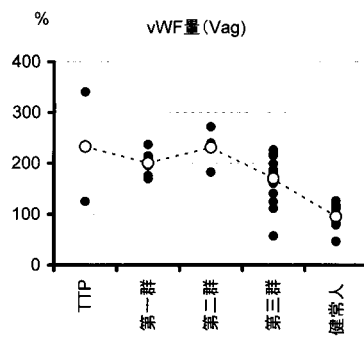
本発明は、DICの適切な治療の用途に適用することができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

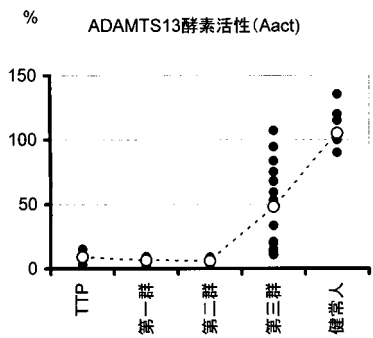
【図1】



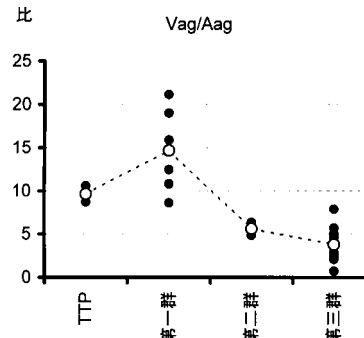
【図3】



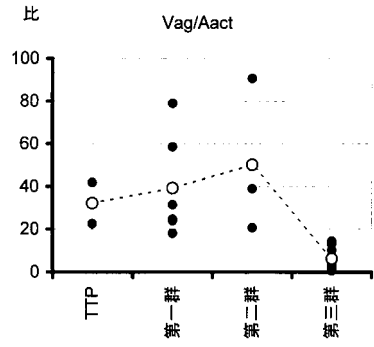
【図2】



【図4】



【 図 5 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 渡邊 眞一郎  
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内
- (72)発明者 古崎 文雄  
東京都新宿区西五軒町13番1号 株式会社三菱化学ヤトロン内
- (72)発明者 伊神 恒  
東京都新宿区西五軒町13番1号 株式会社三菱化学ヤトロン内

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 blood, 2006年 1月15日, Vol.107, No.2, p.528-534

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12Q 1/00-1/70  
G01N 33/48-33/98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	掌握弥散性血管内凝血综合症的病理学方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5060966B2</a>	公开(公告)日	2012-10-31
申请号	JP2007556866	申请日	2007-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	三菱化学Yatoron 财团法人化学及血清疗法研究所		
当前申请(专利权)人(译)	三菱化学有限公司Medience 一般财团法人化学及血清疗法研究所		
[标]发明人	小野智子 渡邊真一郎 古崎文雄 伊神恒		
发明人	小野 智子 渡邊 真一郎 古崎 文雄 伊神 恒		
IPC分类号	C12Q1/56 C12Q1/37 G01N33/573 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/37 G01N33/573 G01N33/6893 G01N2333/755 G01N2333/96486 G01N2800/32 Y10T436 /106664		
FI分类号	C12Q1/56 C12Q1/37 G01N33/573.A G01N33/53.L		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	2006023596 2006-01-31 JP		
其他公开文献	JPWO2007088849A1 JPWO2007088849A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种通过分析患有血管性血友病因子 ( vWF ) - 切割蛋白酶 ( ADAMTS13 ) ( 优选还有vWF的量 ) 的量和/或酶活性来确定弥散性血管内凝血 ( DIC ) 状况的方法。公开了DIC和用于确定DIC状况的试剂盒，其包含特异性结合ADAMTS13的抗体或其片段。根据本发明，可以从患有DIC的患者中进行血栓性血小板减少性紫癜 ( TTP ) 患者的鉴别诊断，其仅基于临床发现或已知标记物无法区分。

	診断名	PIG	PAI-1	D-D	Fbg	FDP-P	PLT	TAT
		$\mu\text{g/mL}$	$\text{ng/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\text{mg/dL}$	$\text{ng/mL}$	$\text{X10}^4/\mu\text{L}$	$\text{ng/mL}$
患者1	TTP	1.1	39.7	3.6	204	2.5	2.0	—
患者2	TTP	4.2	10.7	6.7	—	—	0.9	—
患者3	DIC	4.9	924.5	>2000	197	261.5	1.2	48.1
患者4	DIC	2.0	55.7	1000-2000	445	64.1	—	5.6
患者5	DIC	2.4	220.7	>2000	838	49.2	0.5	12.9
患者6	DIC	1.3	70.4	500-1000	433	27.5	—	3.4
患者7	DIC	3.0	25.2	1000-2000	413	17.9	—	—
患者8	DIC	4.4	228.3	33.7	26	189.0	—	57.4
患者9	DIC	0.6	40.1	<200	703	4.5	—	1.2
患者10	DIC	1.0	28.1	12.1	165	24.8	—	7.6
患者11	DIC	0.5	69.4	<200	360	2.7	—	1.4
患者12	DIC	—	25.6	1.1	388	3.4	—	—
患者13	DIC	0.7	—	1.5	194	1.7	—	1.9
患者14	DIC	4.6	105.6	>2000	423	24.1	10.4	32.5
患者15	DIC	1.1	29.1	500-1000	401	6.7	—	1
患者16	DIC	4.1	178.0	>2000	176	—	13.4	7.6
患者17	DIC	1.3	16.2	2.1	680	9.8	—	2
患者18	DIC	6.7	31.6	>2000	342	59.9	3.5	4.4
患者19	DIC	0.7	23.8	<200	416	2.0	—	1.4
患者20	DIC	—	1091.2	15.0	432	13.7	0.2	—
患者21	DIC	3.4	53.5	1000-2000	260	15.7	1.8	9.6
患者22	DIC	—	162.2	200-500	307	5.7	22.9	—
患者23	DIC	—	—	>2000	632	51.0	25.4	—
患者24	DIC	31.6	17.9	22.1	126	55.9	1.1	—
患者25	DIC	7.6	22.4	33.8	340	28.9	5.2	—