

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-525110

(P2008-525110A)

(43) 公表日 平成20年7月17日(2008.7.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 B 19/00 (2006.01)	A 6 1 B 19/00 5 0 2	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 92 頁)

(21) 出願番号 特願2007-548340 (P2007-548340)
 (86) (22) 出願日 平成17年12月16日 (2005.12.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年8月21日 (2007.8.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/045711
 (87) 国際公開番号 W02006/071583
 (87) 国際公開日 平成18年7月6日 (2006.7.6)
 (31) 優先権主張番号 11/022, 552
 (32) 優先日 平成16年12月23日 (2004.12.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

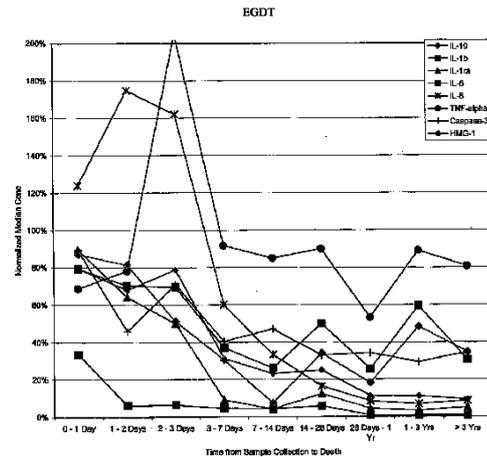
(71) 出願人 500204577
 バイオサイト インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア
 州サンディエゴ、サマーズ・リッジ・ロー
 ド9975番
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100106840
 弁理士 森田 耕司
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子
 (74) 代理人 100114465
 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全身性炎症反応症候群において治療計画を決定するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、被検体における、症状に基づく鑑別診断、予後予測および治療計画の決定のための方法および組成物に関する。詳しくは、本発明は、SIRSであると診断するか、そうではないと診断するために選択される方法および組成物、あるいは敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/もしくはMODSを互いに、および/または非感染性SIRSと識別するための方法および組成物に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックまたはMODSと診断されたか、または患っている疑いのある被検体に、治療計画を割り当てる方法および/または予後予測を割り当てる方法であって、

前記被検体から得たサンプルでアッセイ法を実施し、ここで、前記アッセイ法は、血圧調節と関連しているマーカー、炎症と関連しているマーカー、アポトーシスと関連しているマーカーならびに血液凝固および止血と関連しているマーカーからなる群から独立に選択される1種以上の被検体由来マーカーまたは前記の被検体由来マーカーと関連しているマーカーの存在もしくは量と関連している1種以上の検出可能なシグナルを提供し、場合により、組織損傷の1種以上の被検体由来マーカーの存在もしくは量と関連している1種以上の検出可能なシグナルをさらに含み；そして

前記アッセイ法から得られたシグナルを、前記被検体の治療計画を採用することまたは除外すること、および/または前記被検体に予後予測を割り当てることと関連付けることを含む方法。

【請求項 2】

早期目標指向療法への前記被検体の割り当てを採用するか、除外する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

関連付けるステップが、1種以上の被検体由来マーカー濃度を、注目する特定のマーカーの所定の閾値レベルと比較することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

関連付けるステップが、複数の被検体由来マーカー各々の濃度を調べ、前記の複数の被検体由来マーカー各々の濃度に基づいて、単一のパネル応答値を算出し、そして、パネル応答値を、前記パネル応答値についての1種以上の所定の閾値レベルと比較することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

関連付けるステップが、1種以上の被検体由来マーカーの濃度を、注目する特定のマーカーの所定の閾値レベルと比較し、複数の被検体由来マーカー各々の濃度を調べ、前記の複数の被検体由来マーカー各々の濃度に基づいて単一パネル応答値を算出し、そして、パネル応答値を前記パネル応答値の所定の閾値レベルと比較することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記の1種以上の被検体由来マーカーが、マトリックスメタロプロテイナーゼ9 (MMP - 9)、インターロイキン - 1 (IL - 1)、インターロイキン - 6 (IL - 6)、インターロイキン - 8 (IL - 8)、IL - 8₆₋₇₇、インターロイキン - 10 (IL - 10)、インターロイキン - 22 (IL - 22)、IL - 1 受容体アゴニスト (IL - 1ra)、CXCL6、CXCL13、CXCL16、CCL8、CCL20、CCL23、CCL26、D - 二量体、HMG - 1、腫瘍壊死因子 - (TNF)、B型ナトリウム利尿タンパク質 (BNP)、A型ナトリウム利尿タンパク質 (ANP)、C型ナトリウム利尿タンパク質 (CNP)、C反応性タンパク質 (CRP)、カスパーゼ - 3、カルシトニン、プロカルシトニン₃₋₁₁₆、可溶性DPP - IV、可溶性FASリガンド (sFasL)、クレアチンキナーゼ - BB (CK - BB)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) および可溶性細胞間接着分子 - 1 (sICAM - 1) からなる群から選択される少なくとも1種のマーカー、または前記被検体由来マーカーと関連している1種以上のマーカーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記の1種以上の被検体由来マーカーが、NT - プロBNP、プロBNP、BNP₇₉₋₁₀₈ およびBNP₃₋₁₀₈ からなる群から選択されるBNPと関連している少なくとも1種のマーカーを含む、請求項 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

関連付けるステップが、複数の被検体由来マーカー各々の濃度を調べることを含み、複数のマーカーが少なくとも1種のインターロイキンまたはこれらと関連している1種以上のマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

複数のマーカーが、炎症と関連している少なくとも1種のマーカー、および血液凝固および止血と関連している少なくとも1種のマーカー、またはこれらと関連している1種以上のマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

複数のマーカーが、炎症と関連している少なくとも1種のマーカー、および血圧調節と関連している少なくとも1種のマーカーまたは、これらと関連している1種以上のマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 11】

複数のマーカーが、血圧調節と関連している少なくとも1種のマーカー、炎症と関連している少なくとも1種のマーカー、および血液凝固および止血と関連している少なくとも1種のマーカー、またはこれらと関連している1種以上のマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

サンプルがヒト由来のものである、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

サンプルが血液、血清、尿、脳脊髄液および血漿からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 14】

アッセイ法が、イムノアッセイを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

アッセイ法が質量分析を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

前記の1種以上の被検体由来マーカーが、ANP、BNP、BNPと関連しているマーカー、CNP、ウロテンシンII、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIII、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメデュリン、カルシフォシン、エンドセリン-2、エンドセリン-3、レニンおよびウロジラチン、からなる群から選択される血圧調節と関連している1種以上のマーカーまたはこれらと関連している1種以上のマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記の1種以上の被検体由来マーカーが、急性期反応物質、血管細胞接着分子、細胞間接着分子-1、細胞間接着分子-2、細胞間接着分子-3、CRP、HMG-1、IL-1、IL-6、IL-8、IL-8₆₋₇₇、IL-1ra、MCP-1、カスパーゼ-3、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素、肥満細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性タンパク質、KL-6、ハプトグロビン、TNF、TNF-、TREM-1、フィブロネクチン、マクロファージ遊走阻止因子およびVEGFからなる群から選択される炎症と関連している1種以上のマーカー、またはこれらと関連している1種以上のマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記の1種以上の被検体由来マーカーが、ヘプシジン、HSP-60、HSP-65、HSP-70、sFasL、非対称ジメチルアルギニン、マトリックスメタロプロテイン11、3および9、デフェンシンHBD1、デフェンシンHBD2、血清アミロイドA、酸化LDL、インスリン様増殖因子、TNF-、インターインヒビター、e-セレクチン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、低酸素誘導因子-1、誘導型一酸化窒素合成酵素、細胞内接着分子、乳酸脱水素酵素、単球化学誘引物質ペプチド-1、n-ア

50

セチルアスパルテート、プロスタグランジン E₂、核内因子リガンドの受容体アクチベーター、TNF受容体スーパーファミリーメンバー 1 A およびシステイン C からなる群から選択される 1 種以上の急性期反応物質、またはこれらと関連している 1 種以上のマーカーを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記の 1 種以上の被検体由来マーカーが、プラスミン、フィブリノゲン、D - 二量体、トロンボグロブリン、血小板因子 4、線維素ペプチド A、血小板由来増殖因子、プロトロンビンフラグメント 1 + 2、プラスミン - 2 - 抗プラスミン複合体、トロンビン - 抗トロンビン III 複合体、P - セレクチン、トロンビン、フォンウィルブランド因子、組織因子および血栓前駆体タンパク質からなる群から選択される、血液凝固および止血と関連している 1 種以上のマーカー、またはこれらと関連している 1 種以上のマーカーを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記の 1 種以上の被検体由来マーカーが、CRP、HMG - 1、カスパーゼ - 3、クレアチンキナーゼ - BB、MMP - 9、IL - 1、IL - 1ra、IL - 6、IL - 8、TNF、MIF、MCP - 1、BNP、CNP、プロ - BNP、プロ - CNP、NT - プロ - BNP、組織因子、フォンウィルブランド因子、vWF - A1、vWF - インテグリン結合ドメインおよび vWF - A3 からなる群から選択される 1 種以上のマーカー、またはこれらと関連している 1 種以上のマーカーを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記の 1 種以上の被検体由来マーカーが BNP または BNP と関連しているマーカーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記の 1 種以上の被検体由来マーカーが、CRP、HMG - 1、HSP - 60、IL - 1ra、MMP - 9、インターロイキン、CK - BB、sICAM - 1、カスパーゼ - 3、組織因子、TNF、sFasL、MPO、VEGF、D - 二量体および MCP - 1 からなる群から選択される 1 種以上のマーカー、またはこれらと関連している 1 種以上のマーカーをさらに含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

静脈内抗生物質療法の投与、8 ~ 12 mmHg という中心静脈圧の維持、クリスタロイドおよび / またはコロイドの投与、65 mmHg という平均動脈圧の維持、1 種以上の昇圧剤の投与、1 種以上の血管拡張剤の投与、1 種以上の副腎皮質ステロイドの投与、組換え活性化プロテイン C の投与、70 % という中心静脈酸素飽和度の維持、少なくとも 30 % というヘマトクリットへの輸血赤血球の投与、1 種以上の変力薬の投与および機械的換気の投与からなる群から選択される、1 種以上の治療を治療計画に含めるよう採用するかまたは除外する、請求項 1 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、敗血症と関連している診断マーカーの同定および使用に関する。種々の態様において、本発明は、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび / または多臓器不全症候群を患っている被検体に治療経路を割り当てることにおいて使用するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景についての以下の考察は、単に読者が本発明を理解するのを補助するために提供されるものであって、本発明の先行技術を説明または構成すると認めるものではない。

50

【0003】

用語「敗血症」は、感染に付随して起こる炎症の全身状態と関連する種々の臨床状態を記載するために用いられている。非感染性病因に続発する炎症反応に対する臨床的類似性のために、敗血症を同定することは、特に困難な診断問題となっていた。最近、米国胸部疾患学会(the American College of Chest Physicians)および米国集中治療医学会(the American Society of Critical Care Medicine) (ボーン(Bone)ら、 Chest) 101、1644~53頁、1992)は、広く感染性または非感染性侵襲に対する重篤な全身応答を指す「全身性炎症反応症候群」(または「SIRS」)の、および多臓器不全症候群(「MODS」)にまで広げた関連症候群「敗血症」、「重篤な敗血症」および「敗血性ショック」の定義を公開した。以下に記載されるこれらの定義は、本願の目的のためのこれらの語句の各々を対象とする。

10

【0004】

「SIRS」とは、以下のうち2以上を示す状態を指す：

温度 > 38 または < 36、

> 90 拍/分という心拍数(頻脈)、

> 20 拍/分という呼吸数(頻呼吸)または $P_aCO_2 < 4.3 \text{ kPa}$ 、

白血球数 > 12,000/mm³、< 4,000/mm³ または > 10% 未成熟(バンド)型。

【0005】

「敗血症」とは、臨床的に明らかなまたは微生物学的に確認される感染をさらに伴う SIRS を指す。この感染は細菌性、真菌性、寄生性またはウイルス性のものであり得る。

20

【0006】

「重篤な敗血症」とは、臓器機能不全の少なくとも1つの徴候、例えば、低酸素血症、乏尿、代謝性アシドーシスまたは脳機能の変更によって明らかとなる臓器低灌流をさらに伴う敗血症を指す。

【0007】

「敗血性ショック」とは、収縮期血圧 < 90 mmHg または血圧を維持するための薬剤介入の必要によって明らかとなる低血圧症をさらに伴う重篤な敗血症を指す。

【0008】

MODS(多臓器不全症候群)は、介入なしではホメオスタシスが維持できないような急性疾患である患者における臓器機能の変更の存在である。一次性MODSは、臓器機能不全が早期に生じ、損傷自体に直接的に起因し得る明確な発作の直接の結果である。二次性MODSは、宿主応答の結果として発生し、SIRSの範囲内で同定される。

30

【0009】

SIRSという診断をもたらす全身性炎症反応は、感染と、多数の非感染性病因、例えば、熱傷、膵炎、外傷、熱中症および新生物の双方と関連しうる。概念的には、敗血症と非敗血症性SIRSの間を識別することは、比較的単純であり得るが、これらの関連状態を明白に識別する診断ツールは記載されていない。例えば、ルウェリン(Llewelyn)およびコヘン(Cohen)、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Medicine)、27、S10~S32頁、2001参照のこと。例えば、敗血症症例の90%より多くが細菌感染を含むので、感染確認のための「ゴールドスタンダード」は、血液、尿、胸腔液、脳脊髄液、腹水、滑液、痰またはその他の組織試料からの微生物増殖である。しかし、このような培養によっては、敗血症の強い臨床的証拠を示す患者の50%以上を確認できなかったと報告されている。例えば、2003年6月26日に電子的に公開されたジェイムス(James)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Medicine)29、1368~71頁参照のこと。

40

【0010】

敗血症において炎症という全身状態をもたらす生理学的反応は不明なままである。免疫細胞の活性化は、グラム陰性菌のLPSエンドトキシンおよびグラム陽性菌の外毒素に依りて起こる。この活性化は、炎症誘発性サイトカイン、接着分子、血管作動性メディエー

50

ターおよび反応性酸素種によって媒介される事象のカスケードをもたらす。このカスケードによって、種々の臓器、例えば、肝臓、肺、心臓および腎臓が直接的または間接的に影響を受ける。敗血症はまた、おそらくは、血液凝固のサイトカイン活性化によって媒介される、播種性血管内凝固(「DIC」)を伴う。液体および電解質バランスもまた、毛細血管灌流の増大および組織の酸素化の低減によって影響を受ける。生じた、野放しの、制御されていない炎症反応は、虚血、臓器機能の喪失および死亡をもたらし得る。

【0011】

敗血症は、抗生物質および支持療法を利用できるにもかかわらず、罹患および死亡の大きな原因である。最近の研究では、米国では毎年、重篤な敗血症の751,000の症例が生じ、死亡率は30~50%であると推定された。アンガス(Angus)ら、クリティカル・ケア・メディシン(Critical Care Medicine)、29、1303~10頁、2001。最近、「サバイビング・セプシス・キャンペーン(Surviving Sepsis Campaign)」と呼ばれる医療的ケアグループの組織が、重篤な敗血症および敗血性ショックを患っている被検体を管理するためのガイドラインを発表した。デリンジャー(Dellinger)ら、クリティカル・ケア・メディシン(Critical Care Medicine)32、858~873頁、2004。これらのガイドラインは、数ある供給源の中でも「早期目標指向療法」リバーズ(Rivers)らによって開発された治療計画を基に書かれた。例えば、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England Journal of Medicine)、345、1368~77頁、2001参照のこと。

【0012】

敗血症の診断および予後予測のための、被検体の完全な臨床試験と併せて使用するためのいくつかの実験室試験が検討され、提案されている。例えば、米国特許第5,639,617号および同6,303,321号ならびにシャルパンティエ(Charpentier)ら、クリティカル・ケア・メディシン(Critical Care Medicine)32、660~65頁、2004、カスティヨ(Castillo)ら、インターナショナル・ジャーナル・オブ・インフェクシャス・ディゼーズ(International Journal of Infectious Disease)8、271~74頁、2004、チュア(Chua)およびカン・ヘー(Kang-Hoe)、クリティカル・ケア(Critical Care)8、R248~R250頁、2004、ウィットオー(Witthaut)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Medicine)29、1696~1702頁、2003、ジョーンズ(Jones)およびクライン(Kline)、アナルズ・オブ・インターナル・メディシン(Annals of Internal Medicine)、42、714~15頁、2003、メーダー(Maeder)ら、スイス・メディカル・ウィークリー(Swiss Medical Weekly)133、515~18頁、2003、ギアマレロス・ブルブリス(Giamarellos-Bourboulis)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Medicine)28、1351~56頁、2002、ハルバーサス(Harbarth)ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・レスピラトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディシン(American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine)164、396~402頁、2001、マーティン(Martin)ら、ペディアトリクス(Pediatrics)108、URL: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/4/e61> , 2001およびボシnk(Bossink)ら、チェスト(Chest)113、1533~41頁、1998参照のこと。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、敗血症の検出、敗血症とSIRSの他の原因との識別のための、および敗血症患者の危険の層別化におけるマーカーの同定および使用に関する。本発明の方法および組成物を用いて、患者の治療ならびにさらなる診断および/または予後指標および療法の開発を手助けできる。

【0014】

種々の態様では、本発明は、被検体における直接治療に使用できるマーカーを同定するための、患者の治療においておよび/または治療計画の経過をモニターするためにこのよ

10

20

30

40

50

うなマーカーを使用するための、S I R Sと関連している1種以上の有害転帰の危険にある被検体を同定するためにこのようなマーカーを使用するための、このような状態の治療または予防において利益を提供できる化合物および薬剤組成物をスクリーニングするための材料および手順に関する。

【0015】

第1の態様では、本発明は、被検体、好ましくは、S I R S、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/またはMODSを患っているか、患っている疑いのあるものための適当な治療計画を決定するための方法に関する。これらの方法は、被検体から得られた試験サンプルを、1種以上の、血圧調節と関連しているマーカー、血液凝固および止血と関連しているマーカー、アポトーシスと関連しているマーカーおよび/または炎症と関連しているマーカーの存在または量について分析するステップを含む。測定されたマーカー(類)の存在または量は、1種以上の特定の治療を採用(rule in)するか除外(rule out)するために選択されるマーカーのレベルと個別にまたは群で比較できる。採用されるか除外される好ましい治療は、S I R S、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/またはMODSを治療するために用いられるものであり、以下に定義される早期敗血症治療計画が最も好ましい。

10

【0016】

関連態様では、本発明は、被検体の予後予測を決定する方法に関する。これらの方法は、被検体から得た試験サンプルを、1種以上の、血圧調節と関連しているマーカー、血液凝固および止血と関連しているマーカー、アポトーシスと関連しているマーカーおよび/または炎症と関連しているマーカーの存在または量について分析するステップを含む。測定されたマーカーの存在または量は、陽性(例えば、被検体が生存する可能性が高いという)または陰性(例えば、被検体が死亡の危険性が高いという)のいずれかのさらなる転帰を示すマーカーのレベルと個別に、または群で比較できる。

20

【0017】

ある実施形態では、マーカーパネル中に、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20種以上の個々のマーカーを含む複数のこのようなマーカーを組み合わせる。このようなパネルに含める例示的マーカーは以下に詳述する。

【0018】

ある実施形態では、個々のマーカーの濃度を、1種以上の特定の診断、予後予測および/または治療計画を採用または除外するために予備選択されたレベル(「閾値」と)と各々比較できる。被検体の選択されたマーカー各々のレベルを、注目される各マーカーの閾値と関連付けることによって、1種以上の特定の療法を、被検体に割り当てるか、除外することができる。同様に、被検体のマーカーレベルを、各マーカーの予後閾値と関連付けることによって、被検体が1種以上のさらなる有害転帰を起こす可能性を調べることができる。

30

【0019】

別の実施形態では、被検体から得られるマーカーレベルのプロフィールが、特定の療法または予後予測と相関しているかどうかを調べるためには、パネル中の1種以上のマーカーの特定の閾値に依存しない。そうではなく、本発明は、マーカーのプロフィール全体の評価を利用して単一の結果値を提供できる(例えば、数値スコアとしてか、または危険パーセンテージとしてのいずれかで表される「パネル応答」値)。このような実施形態では、マーカーのあるサブセットにおける増加、減少またはその他の変化(例えば、経時的な傾斜)が、ある患者における特定の転帰を示すのに十分であり得、一方で、マーカーの異なるサブセットの増加、減少またはその他の変化は別の患者では同一または異なる転帰を示すのに十分であり得る。このような分析を実施する方法を以下に記載する。

40

【0020】

さらに別の実施形態では、1種以上のマーカーの多重測定を行うことができ、マーカーの一時的な変化を用いて、1種以上の特定の療法および/または予後予測を採用または除外することができる。例えば、1種以上のマーカーを最初の時間および第2の時間に再度

50

調べ、経時的なマーカーレベルの変化（または変化がないこと）を調べることができる。このような実施形態では、最初の時間から第2の時間へのマーカーの増加が、特定の予後予測、特定の療法の採用または除外などを示し得る。同様に、最初の時間から第2の時間へのマーカーの減少も、特定の予後予測、特定の療法の採用または除外などを示し得る。このようなパネルでは、マーカーは互いに協調する変化を必要としない。また、マーカーパネルの識別力を高めるために、1種以上のマーカーの一時的な変化を、単一時点のマーカーレベルと一緒に用いることもできる。さらにもうひとつの別法では、「パネル応答」をマーカーとして扱うことができ、パネル応答の一時的な変化が、特定の予後予測、特定の療法の採用または除外などを示し得る。

【0021】

特に好ましい実施形態では、サンプル中の血圧調節と関連している1種以上のマーカーの存在または量を予後予測に用いて、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/またはMODSと関連する将来の合併症の危険を判定する。これらの実施形態では、血圧調節と関連している好ましいマーカーは、BNPもしくはNT-プロBNPまたはこれらと関連しているマーカーである。同様に、別の特に好ましい実施形態では、サンプル中の炎症と関連している1種以上のマーカーの存在または量を予後予測に用いて、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/またはMODSと関連する将来の合併症の危険を決定する。これらの実施形態では、血圧調節と関連している好ましいマーカーはBNPもしくはNT-プロBNPまたはこれらと関連しているマーカーである。以下に記載されるように、このような方法を用いて被検体における転帰リスクを調べ、このリスクを用いてその被検体の治療の決定を導くことができる。

【0022】

本明細書において詳細に論じられるように、複数のマーカーを組み合わせることにより、マーカーから個別に得られるものと比較して分析の予測値を高めることが好ましい。このようなパネルは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20種以上の個々のマーカーを含み得る。また、当業者ならば、単一のアッセイまたは装置において診断マーカー、鑑別診断マーカー、予後予測マーカー、発症時間マーカーなどを組み合わせることができるということは理解されよう。例えば、装置または機器によって測定されるある種のマーカーを用いて予後予測を提供することができ、他方、装置または機器によって測定される異なるセットのマーカーが特定の療法を採用および/または除外できる。これらのセットのマーカー各々は独特のマーカーを含んでいてもよく、または別のセットの一方もしくは双方と重複するマーカーを含んでいてもよい。また、例えば、異なる目的のために、異なるセットの分析パラメーター（例えば、異なる中点、直線範囲ウィンドウおよび/または重み係数）をマーカーに適用することによって、種々の目的のためにマーカーを広く用いることができる。

【0023】

ある実施形態では、単に指標の有無によって、1種以上のマーカーを療法、予後予測、状態または疾患と関連付ける。別の実施形態では、診断指標または予後指標の閾値レベルを定めることができ、患者サンプルにおける指標のレベルを閾値レベルと簡単に比較することができる。診断および/または予後予測試験の感度および特異度は、単に試験の分析上の「質」に応じて変わるだけでなく、異常な結果を構成するものの定義に応じて変わる。実際には、通常、「正常」および「疾患」集団において、変数の値をその相対度数に対してプロットすることによって、受信者動作特性曲線すなわち「ROC」曲線を算出する。いずれの特定のマーカーについても、疾患を有する被検体および疾患を有さない被検体のマーカーレベルの分布は重複する可能性がある。このような条件下では、正常と疾患が試験によって100%の精度で完全に識別されることはなく、重複する領域は、試験が正常と疾患を識別できない場合を示す。閾値は、試験が異常であると考えられるところより上（疾患でマーカーがどのように変化するかに応じて、または下）、および試験が正常であると考えられるところより下に選択する。ROC曲線下面積は、読みとられた測定値が状態の正しい同定を可能にする可能性の尺度である。ROC曲線は、試験結果が正確

10

20

30

40

50

な数値を必ずしも与えない場合でも用いることができる。結果をランク付けできる限り、ROC曲線を作製できる。例えば、「疾患」サンプルでの試験の結果を程度にしたがってランク付けすることができる(例えば、1 = 低、2 = 正常、3 = 高)。このランキングを、「正常」集団の結果と関連付け、ROC曲線を作製することができる。これらの方法は当技術分野では十分に知られている。例えば、ハンレー(Hanley)ら、ラジオロジー(Radiology) 143、29~36頁(1982)。

【0024】

ある実施形態では、マーカーおよび/またはマーカーパネルを、少なくとも約70%の感度、より好ましくは、少なくとも約80%の感度、いっそうより好ましくは、少なくとも約85%の感度、さらにいっそうより好ましくは、少なくとも約90%の感度、最も好ましくは、少なくとも約95%の感度を、少なくとも約70%の特異度、より好ましくは、少なくとも約80%の特異度、いっそうより好ましくは、少なくとも約85%の特異度、さらにいっそうより好ましくは、少なくとも約90%の特異度、最も好ましくは、少なくとも約95%の特異度と組み合わせて示すよう選択する。特に好ましい実施形態では、感度および特異度の双方が少なくとも約75%、より好ましくは、少なくとも約80%、いっそうより好ましくは、少なくとも約85%、さらにいっそうより好ましくは、少なくとも約90%、最も好ましくは、少なくとも約95%である。これに関連して、用語「約」とは、所与の測定値の+/-5%を指す。

10

【0025】

別の実施形態では、正の尤度比、負の尤度比、オッズ比または危険率を、試験の能力の尺度として用いて危険を予測するか、疾患を診断する。正の尤度比の場合には、1という値は、「罹患」および「対照」群双方の被検体間で正の結果が同程度であることを示し、1を超える値は、罹患群において正の結果がより可能性があることを示し、1未満の値は対照群において正の結果がより可能性があることを示す。負の尤度比の場合には、1という値は、「罹患」および「対照」群双方の被検体間で負の結果が同程度であることを示し、1を超える値は、試験群において負の結果がより可能性があることを示し、1未満の値は対照群において負の結果がより可能性があることを示す。ある好ましい実施形態では、マーカーおよび/またはマーカーパネルは、少なくとも約1.5以上または約0.67以下、より好ましくは、少なくとも約2以上または約0.5以下、さらにより好ましくは、少なくとも約5以上または約0.2以下、いっそうより好ましくは、少なくとも約10以上または約0.1以下、最も好ましくは、少なくとも約20以上または約0.05以下の正または負の尤度比を示すよう選択することが好ましい。これに関連して、用語「約」とは、所与の測定値の+/-5%を指す。

20

30

【0026】

オッズ比の場合には、1という値は、「罹患」および「対照」群双方の被検体間で正の結果が同程度であることを示し、1を超える値は、罹患群において正の結果がより可能性があることを示し、1未満の値は対照群において正の結果がより可能性があることを示す。ある好ましい実施形態では、マーカーおよび/またはマーカーパネルは、少なくとも約2以上または約0.5以下、より好ましくは、少なくとも約3以上または約0.33以下、さらにより好ましくは、少なくとも約4以上または約0.25以下、いっそうより好ましくは、少なくとも約5以上または約0.2以下、最も好ましくは、少なくとも約10以上または約0.1以下というオッズ比を示すよう選択することが好ましい。これに関連して、用語「約」とは、所与の測定値の+/-5%を指す。

40

【0027】

危険率の場合には、1という値は、「罹患」および「対照」群双方においてエンドポイント(例えば、死亡)の相対危険度が同等であることを示し、1を超える値は罹患群において危険度がより大きいことを示し、1未満の値は危険度が対照群においてより大きいことを示す。ある好ましい実施形態では、マーカーおよび/またはマーカーパネルは、少なくとも約1.1以上または約0.91以下、より好ましくは、少なくとも約1.25以上または約0.8以下、さらにより好ましくは、少なくとも約1.5以上または約0.67

50

以下、いっそうより好ましくは、少なくとも約 2 以上または約 0.5 以下、最も好ましくは、少なくとも約 2.5 以上または約 0.4 以下という危険率を示すよう選択することが好ましい。これに関連して、用語「約」とは、所与の測定値の + / - 5 % を指す。

【0028】

本明細書には例示的パネルが記載されているが、臨床上有用な結果を依然として提供しながら、これらの例示的パネルから 1 種以上のマーカーを置換、付加または差し引くことができる。パネルは、疾患の特異的マーカー（例えば、細菌感染において増加または低下するが、その他の疾患状態ではそうではないマーカー）および/または非特異的マーカー（例えば、原因にかかわらず炎症によって増加または減少するマーカー、原因にかかわらず、止血における変化によって増加または減少するマーカーなど）の両方を含み得る。本明細書に記載される方法において、ある種のマーカーが個別に決定的なものではないかもしれないが、変化の特定の「フィンガープリント」パターンが、実質的に、病状の特異的指標として働く場合がある。上記で論じたように、変化のそのパターンは単一サンプルから得られる場合もあるし、または場合により、パネルの 1 種以上のメンバーの一時的な変化（またはパネル応答値の一時的な変化）を考慮してもよい。

10

【0029】

特に好ましいマーカーパネルは、例えば、心房性ナトリウム利尿ペプチド（「ANP」）、NT-プロANP、プロ-ANP、B型ナトリウム利尿ペプチド（「BNP」）、NT-プロBNP、プロ-BNP、C型ナトリウム利尿ペプチド、NT-プロCNP、プロ-CNP、ウロテンシンII、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIII、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメデュリン、カルシフォシン、エンドセリン-2、エンドセリン-3、レニンおよびウロジラチン(urodilatin)からなる群から選択される 1 種以上の第 1 のマーカーまたはこれらと関連しているマーカー（まとめて「血圧調節と関連しているマーカー」と呼ばれる）、ならびに急性期反応物質、細胞接着分子、例えば、血管細胞接着分子（「VCAM」）、可溶性細胞間接着分子-1（「sICAM-1」）、可溶性細胞間接着分子-2（「sICAM-2」）および可溶性細胞間接着分子-3（「sICAM-3」）、C反応性タンパク質、HMG-1（HMG B1とも呼ばれる）、インターロイキン、例えば、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10 および IL-22、ケモカイン、例えば、CXCL および CCL ファミリー（例えば、CXCL6、CXCL13、CXCL16、CCL8、CCL20、CCL23 および CCL26）、インターロイキン-1 受容体アゴニスト、単球走化性タンパク質-1、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素、肥満細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性タンパク質、KL-6、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子、可溶性 Fas リガンド、可溶性 Fas (Apo-1)、TRAIL、TWEAK、TREM-1、フィブロネクチン、マクロファージ遊走阻止因子(MIF) および血管内皮増殖因子（「VEGF」）またはこれらと関連しているマーカー（まとめて「炎症と関連しているマーカー」と呼ばれる）からなる群から選択される 1 種以上の第 2 のマーカーを含む。用語「関連マーカー」は以下に定義する。

20

30

【0030】

プラスミン、フィブリノゲン、D-二量体、トロンボグロブリン、血小板因子 4、線維素ペプチド A、血小板由来増殖因子、プロトロンビンフラグメント 1 + 2、プラスミン-2-抗プラスミン複合体、トロンビン-抗トロンビンIII複合体、P-セレクチン、トロンビン、フォンウィルブランド因子、組織因子および血栓前駆体タンパク質またはこれらと関連しているマーカー（まとめて「血液凝固および止血と関連しているマーカー」と呼ばれる）からなる群から選択される、1 種以上の追加のマーカーも本発明のパネルに含まれ得る。

40

【0031】

本明細書に記載される方法において使用するための、アポトーシスと関連している好ましいマーカー、例えば、1 種以上の、スペクトリン、カテプシン D、カスパーゼ-3、シ

50

トクロム c、s - アセチルグルタチオンおよびユビキチン融合分解タンパク質 1 相同体またはこれらと関連しているマーカーからなる群から選択されるマーカーも、本明細書に記載される方法において使用できる。

【0032】

「炎症と関連しているマーカー」として上記で列挙された急性期反応物質の他に、1種以上の、炎症と関連しているマーカーも、ヘプシジン、HSP - 60、HSP - 65、HSP - 70、非対称ジメチルアルギニン（一酸化窒素合成酵素の内因性阻害剤）、マトリックスメタロプロテイン 11、3 および 9、デフェンシン HBD 1、デフェンシン HBD 2、血清アミロイド A、酸化 LDL、インスリン様増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インター - α - インヒビター、e - セレクチン、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、低酸素誘導因子 - 1、誘導型一酸化窒素合成酵素（「I - NOS」）、細胞内接着分子、乳酸脱水素酵素、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 9（「MMP - 9」）、単球化学誘引物質ペプチド - 1（「MCP - 1」）、n - アセチルアスパルテート、プロスタグランジン E2、核内因子の受容体アクチベーター（「RANK」）リガンド、TNF 受容体スーパーファミリーメンバー 1A およびシステイン C からなる急性期反応物質の群、またはこれらと関連しているマーカーから選択できる。血圧調節と、炎症と、血液凝固および止血と関連しているさらなるマーカーは以下に記載する。

10

【0033】

同様に、反応性酸素種と関連している 1 種以上のマーカーも、このようなパネルの一部として測定できる。マーカーは、スーパーオキシドジムスターゼ、グルタチオン、 α - トコフェロール、アスコルビン酸、誘導型一酸化窒素合成酵素、脂質過酸化産物、一酸化窒素、ミエロペルオキシダーゼおよび呼気炭化水素（好ましくは、エタン）またはこれらと関連しているマーカーからなる群から選択できる。

20

【0034】

疾患間を識別するさらなる能力を提供するために、このようなパネルにさらなるマーカーおよび/またはマーカーの種類を加えることができる。例えば、炎症反応および結果として生じる毛細血管に対する作用および組織の酸素化の低減は、虚血状態においてレベルが増加する、急性期反応と関連している 1 種以上のマーカー、血管組織と関連している 1 種以上のマーカーおよび 1 種以上の組織特異的マーカー（例えば、CK - BB などの神経特異的マーカー）を関係させる。したがって、 α - 2 アクチン、塩基性カルポニン 1、 α - 1 インテグリン、酸性カルポニン、カルデスモン、システインリッチタンパク質 2（「CRP 2」または「CSR P 2」）、エラスチン、フィブリリン 1、潜在型トランスフォーミング増殖因子結合タンパク質 4（「LTBP 4」）、平滑筋ミオシン、平滑筋ミオシン重鎖およびトランスゲリン (transgelin) またはこれらと関連しているマーカー（まとめて「血管組織と関連しているマーカー」と呼ばれる）からなる群から選択される 1 種以上のマーカーをこのようなパネルに含めることができる。さらなるマーカーおよびマーカーの種類は以下に記載する。

30

【0035】

これらのマーカーは、種々の組み合わせで組み合わせることができる。例えば、好ましいパネルは、CRP、カスパーゼ - 3、CK - BB、IL - 1、IL - 1ra、IL - 6、IL - 8、HMG - 1、TNF、MIF、MCP - 1、MMP - 9、Fas リガンド、可溶性 Fas (Apo - 1)、TRAIL、TWEAK、ANP、プロ - ANP、BNP、CNP、プロ - BNP、プロ - CNP、NT - プロ - BNP、組織因子、フォンウィルブランド因子、vWF - A1、vWF - インテグリン結合ドメインおよび vWF - A3、またはこれらと関連しているマーカーからなる群から選択される 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種以上のマーカーを含み得る。本明細書に論じるように、これらのマーカーは、単一時点で測定でき、かつ/またはマーカーレベルの変化を経時的に算出するために複数の時点で測定できる。

40

【0036】

関連態様では、本発明は、前記の方法において使用するためのマーカーパネルを同定す

50

る方法に関する。診断、予後予測および/または療法において有用なマーカーのパネルの開発では、ある種のマーカーの存在またはレベルについて試験することによって、被検体群からいくつかの可能性あるマーカーのデータを得ることができる。次いで、被検体群をセットに分けることができる。例えば、第1のセットは、疾患を有しているか、より一般的に、第1の状況状態にある被検体を含む。この状況状態の確認は、より正確なかつ/またはより費用のかかる試験、例えば、敗血症の生物の組織サンプルの培養によって行うことができる。以下、この第1のセット中の被検体は「罹患」と呼ぶ。第2のセットの被検体は、第1のセットに入らないものから選択する。この第2のセットの被検体は、以下、「非罹患」と呼ぶ。

【0037】

これらのセットの被検体から得られるデータは、複数のマーカーのレベルを含む。各患者について同一セットのマーカーのデータが利用可能であることが好ましい。例示的マーカーは本明細書に記載されている。マーカーの、注目する疾患との関連性が実際に知られていることは必要ではない。これらの被検体セットを、1種以上のマーカーの関連性について比較する方法は以下に記載する。本明細書に記載される方法およびシステムの実施形態を用いて、どの候補マーカーが、疾患もしくは状態の診断または所与の予後予測の診断と最も関連性があるかを調べることができる。

【0038】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載される1以上の方法を実施する装置に関する。このような装置は、各々が注目する特定のマーカーと関連している、複数の診断域を含むことが好ましい。このような装置は「アレイ」または「マイクロアレイ」と呼ばれることがある。装置を用いてサンプルを反応させた後、シグナルが診断域から生じ、次いで、これを注目するマーカーの存在または量と関連付けることができる。当業者には多数の適した装置が知られている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

本発明は、被検体における、症状に基づく鑑別診断、予後予測および治療計画の決定のための方法および組成物に関する。詳しくは、本発明は、SIRSであると診断するかそうではないと診断するために選択される方法および組成物、あるいは敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/もしくはMODSを互いに、および/または非感染性SIRSと識別するための方法および組成物に関する。

【0040】

医学的治療を続けている患者は、疾患を示す身体の特徴または機能において1つまたは複数の初期の観察可能な変化を示すことが多い。これらの「症状」は、いくつかの可能性ある疾患が同一の観察可能な症状または複数の症状を示し得るという点で非特異的であることが多い。SIRSの場合には、以下の症状のうち2以上が存在する場合はいつでも定義により状態が存在する：

温度 > 38 または < 36 、
 > 90 拍/分という心拍数(頻脈)、
 > 20 拍/分という呼吸数(頻呼吸)または $P_aCO_2 < 4.3$ kPa、
 白血球数 $> 12,000/mm^3$ 、 $< 4,000/mm^3$ または $> 10\%$ 未成熟(バンド)型。

【0041】

本発明は、観察される症状の1種の、好ましくは、複数の可能性ある病因を採用または除外するよう設計された診断マーカーを提供することによって、1以上の非特異的症状の鑑別診断を支援し得る方法および組成物を記載する。本明細書に記載される症状に基づく鑑別診断は、患者において観察される非特異的症状の根底にある、あり得る疾患間を識別するよう設計された診断マーカーのパネルを用いて達成できる。

【0042】

定義

10

20

30

40

50

用語「治療計画」とは、疾患または状態を治療することを願って介護者によってなされる1以上の介入を指す。用語「早期敗血症治療計画」とは、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショックまたはMODSという診断の割り当てから最初の24時間以内に、より好ましくは、最初の12時間以内に、最も好ましくは、最初の6時間以内またはより早く、被検体に投与された場合の死亡の危険を低下させるよう設計された支持療法のセットを指す。このような支持療法は、蘇生、液体送達、昇圧剤投与、変力物質投与、ステロイド投与、血液製剤投与および/または鎮静をはじめとする治療のスペクトラムを含む。例えば、デリンジャー(Dellinger)ら、クリティカル・ケア・メディシン(Critical Care Medicine) 32、858~873頁、2004およびリバーズ(Rivers)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England Journal of Medicine) 345、1368~1377頁、2001(「早期目標指向療法」の説明を、その用語が本明細書において用いられるように提供する)参照のこと。なお、その各々は参照により本明細書に組み込まれる。このような早期敗血症治療計画は、1種以上の、好ましくは、複数の以下の療法を含むことが好ましい:

好ましくは、必要に応じたクリスタロイドおよび/またはコロイドの投与による8~12 mmHgという中心静脈圧の維持、

好ましくは、必要に応じた昇圧剤および/または血管拡張薬の投与による65 mmHgという平均動脈圧の維持、

好ましくは、少なくとも30%というヘマトクリットへの輸血赤血球の投与および/または必要に応じたドブタミンの投与による70%という中心静脈酸素飽和度の維持、
必要に応じた機械的換気の投与。

【0043】

本明細書において用語「マーカー」とは、被検体から得た試験サンプルをスクリーニングするための標的として用いられる、タンパク質、ポリペプチド、糖タンパク質、プロテオグリカン、脂質、リポタンパク質、糖脂質、リン脂質、核酸、炭水化物などまたは小分子を指す。本発明においてマーカーとして用いられる「タンパク質またはポリペプチド」は、そのいずれかの断片、詳しくは、免疫学的に検出可能な断片を含むと考えられる。

【0044】

本明細書において「関連マーカー」とは、マーカー自体の代用としてまたは独立マーカーとして検出され得る特定のマーカーまたはその合成親の1種以上の断片を指す。例えば、ヒトBNPは、以下、BNP₁₋₁₀₈と呼ばれる108個のアミノ酸前駆体分子のタンパク質分解によって得られる。成熟BNPまたは「BNPナトリウム利尿ペプチド」または「BNP-32」は、この前駆体のアミノ酸77~108に相当する32アミノ酸の分子である。残りの残基1~76は、以下、BNP₁₋₇₆と呼ぶ。さらに、関連マーカーは、例えば、メチオニン残基の酸化、ユビキチン化、システイン化(cysteinylation)、ニトロシル化、グリコシル化、複合体形成、ディファレンシャルスプライシングなどによる親マーカーの共有結合修飾の結果であり得る。

【0045】

108アミノ酸のBNP前駆体プロ-BNP(BNP₁₋₁₀₈)の配列は以下のとおりであり、成熟BNP(BNP₇₇₋₁₀₈)には下線が引いてある:

HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSL LQVEQTSLEP LQESPRPTGV 50
WKSREVATEG IRGHRKMLVLY TLRAPRSPKM VQSGGCFGRK MDRISSSSGL 100
GCKVLRH 108

(配列番号1)。

【0046】

BNP₁₋₁₀₈は、以下の配列を有する大きな前駆体プレ-プロ-BNPとして合成される(「プレ」配列は太字(訳注:小文字)で示されている):

mdpqtapsra **lllllflhla** flggrsHPLG SPGSASDLET SGLQEQRNHL 50
QGKLSLQVE QTSLEPLQES PRPTGVWKS R EVATEGIRGHRKMLVLYTLRA 100
PRSPKMVQGS GCFGRKMDRI SSSSGLGCKV LRRH134

10

20

30

40

50

(配列番号 2)

【 0 0 4 7 】

本発明においては、成熟BNP自体をマーカーとして使用できるが、プレプロ-BNP、BNP₁₋₁₀₈およびBNP₁₋₇₆分子は、成熟BNPの代替物として、またはそれ自体マーカーとして測定され得るBNP関連マーカーである。さらに、これらの分子の1種以上の断片、例えば、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₇₆₋₁₀₇、BNP₆₉₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₀₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₃₉₋₈₆、BNP₅₃₋₈₅、BNP₆₆₋₉₈、BNP₃₀₋₁₀₃、BNP₁₁₋₁₀₇、BNP₉₋₁₀₆およびBNP₃₋₁₀₈からなる群から選択されるBNP関連ポリペプチドも循環中に存在し得る。さらに、ナトリウム利尿ペプチド断片、例えば、BNP断片は、1個以上の酸化可能なメチオニンを含んでいてもよく、メチオニンスルホキッドまたはメチオニンスルホンへのその酸化によってさらなるBNP関連マーカーが生じる。例えば、2003年4月17日に出願された米国特許第10/419,059号(参照により、すべての表、図および特許請求の範囲を含むその全文が本明細書に組み込まれる)参照のこと。

10

【 0 0 4 8 】

マーカー断片の生成は、とりわけ、マーカーの組織への放出の引き金となる事象の発生と、サンプルが採取されるか分析される時間の間の経過時間、サンプル獲得とサンプルが分析される時間の間の経過時間、問題の組織サンプルの種類、保存条件、存在するタンパク質分解酵素の量などの関数であり得る進行中の過程であるので、正確な予後予測または診断結果を提供するには、1種以上のマーカーのアッセイを設計する際およびこのようなアッセイを実施する際の両方で、この分解を考慮することが必要であろう。さらに、複数のマーカー断片間を識別する個々の抗体を個別に用いて、種々の断片の存在または量を別個に検出することができる。この個々の検出の結果は、単一アッセイで複数の断片を検出するよりも正確な予後予測または診断結果を提供し得る。例えば、異なる重み係数を種々の断片測定値に適用して、サンプル中にもともと存在するナトリウム利尿ペプチド量のより正確な推定値を提供することができる。

20

【 0 0 4 9 】

同様に、本明細書に記載される多数のマーカーは、大きな前駆体分子として合成され、次いで、これがプロセシングされて成熟マーカーを提供する、および/または、マーカーの断片の形で循環中に存在する。したがって、本明細書に記載されるマーカー各々の「関連マーカー」を、BNPについて上記に記載されるものと類似の様式で、同定し、用いることができる。

30

【 0 0 5 0 】

循環からのポリペプチドマーカーの除去には、しばしば分解経路が関与する。さらに、このような分解経路の阻害剤が、ある種の疾患の治療において期待できる場合がある。例えば、トリンダデ(Trindade)およびルーロー(Rouleau)、ハート・フェイリャー・モニター(Heart Failure Monitor) 2、2~7頁、2001参照のこと。しかし、ポリペプチドマーカーの測定は、概して、分子の分解状態を考慮せず、無傷の形の測定に焦点をあててきた。サンプル中の特定のポリペプチドマーカーの生物学的に活性な型を正確に測定するために、ポリペプチドマーカーの分解経路およびこの分解の間に形成される産物の理解を踏まえてアッセイを設計できる。注目する生物学的に活性なポリペプチドマーカーとそのマーカーに由来する不活性な断片双方の意図しない測定は、サンプル中の生物学的に活性な型の濃度の過大評価をもたらし得る。

40

【 0 0 5 1 】

臨床サンプル中に存在し得る分解断片を考慮できないことは、あらゆる診断または予後予測法の精度について深刻な結果をもたらし得る。例えば、BNPについてサンドイッチイムノアッセイが提供され、存在していた生物学的に活性なBNPのうち相当な量(例えば、50%)が今では不活性型に分解されてしまった単純な事例を考慮されたい。生物学的に活性なBNPと不活性な断片に共通する領域と結合する抗体を用いて策定されたイム

50

ノアッセイは、サンプル中に存在する生物学的に活性なBNPの量を2倍過大評価し、「偽陽性」結果をもたらす可能性がある。サンプル中に存在する生物学的に活性な型の過大評価はまた、患者の管理に対しても深刻な結果をもたらす得る。例えば、再度、BNPについて考えると、BNP濃度は、療法が有効であるかどうかを調べるために（例えば、BNPをモニターして、治療の際にレベルの上昇が正常に戻っているかどうか確かめることによって）使用できる。上記で論じた同様の「偽陽性」BNP結果が、現在の療法が有効ではないという誤った印象のために、医師が治療を継続、増加または改変することを導き得る。

【0052】

同様に、本明細書に記載される1種以上のマーカーの複合状態を考慮することが必要であり得る。例えば、トロポニン_Iは、3種のトロポニンポリペプチド（T、IおよびC）を含む「三成分複合体」として主に筋肉中に存在する。しかし、トロポニンIおよびトロポニンTは、血液中をI/T/C三成分複合体以外の型で循環する。それどころか、(i)遊離心臓特異的トロポニンI、(ii)二成分複合体（例えば、トロポニンI/C複合体）および(iii)三成分複合体は各々すべて血液中を循環する。さらに、トロポニンIおよびTの「複合状態」は、患者において、例えば、遊離トロポニンポリペプチドのその他の循環トロポニンポリペプチドとの結合のために経時的に変化し得る。トロポニンの「複合状態」を考慮できないイムノアッセイは、すべての注目する心臓特異的イソ型を検出しえない可能性がある。

10

【0053】

以下に記載する方法は、被検体に由来する1種以上のマーカーを用いることが好ましい。本明細書において用語「被検体由来マーカー」とは、被検体の1以上の細胞によって発現され、産生される、タンパク質、ポリペプチド、リン脂質、核酸、プリオン、糖タンパク質、プロテオグリカン、糖脂質、脂質、リボタンパク質、炭水化物または小分子マーカーを指す。1種以上のマーカーの存在、不在、量または量の変化は、特定の疾患が存在することを示す場合もあるし、特定の疾患がないことを示す場合もある。被検体に由来しないが、病原体または感染性生物によって発現され、特定の疾患と相関するさらなるマーカーを使用できる。このようなマーカーは、上記の感染性疾患を同定する、タンパク質、ポリペプチド、リン脂質、核酸、プリオンまたは小分子マーカーであることが好ましい。

20

【0054】

本明細書において、用語「試験サンプル」とは、患者などの注目する被検体の診断、予後予測または評価の目的で得られた体液のサンプルを指す。ある実施形態では、このようなサンプルは、進行中の状態の転帰または状態に対する治療計画の効果を調べる目的で得ることができる。好ましい試験サンプルとしては、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、痰および胸腔浸出液が挙げられる。さらに、当業者ならば、試験サンプルの中には、分画または精製手順、例えば、全血の血清または血漿成分への分離後に、より容易に分析されるものがあることは理解するであろう。

30

【0055】

本明細書において「複数」とは、少なくとも2を指す。複数とは、少なくとも3、より好ましくは、少なくとも5、いっそうより好ましくは、少なくとも10、いっそうより好ましくは、少なくとも15、最も好ましくは、少なくとも20を指すことが好ましい。特に好ましい実施形態では、複数とは多数、すなわち、少なくとも100である。

40

【0056】

本明細書において用語「被検体」とは、ヒトまたは非ヒト生物を指す。したがって、本明細書に記載される方法および組成物は、ヒト疾患および獣医学的疾患の双方に適用可能である。さらに、被検体は生体であることが好ましいが、本明細書に記載される発明は、死後分析において同様に使用できる。好ましい被検体は「患者」、すなわち、疾患または状態に対する医療を受けている生存しているヒトである。これには、病理学の徴候について調べられている明確な病気のない人が含まれる。

【0057】

50

本明細書において用語「診断」とは、当業者が、患者が所与の疾患または状態を患っているかどうかを推定および/または決定できる方法を指す。当業者は、状態の存在、重篤度または不在を示す1以上の診断上の指標、すなわち、マーカー、存在、不在、量または量の変化に基づいて診断を下すことが多い。

【0058】

同様に、予後予測は、1以上の「予後指標」を調べることによって決定されることが多い。これらは所与の経過または転帰が起こる可能性を示唆する、患者（または患者から得たサンプル）におけるマーカー、存在または量である。例えば、このような患者から得たサンプルにおいて1以上の予後指標が相当な高レベルに達する場合には、そのレベルは、その患者が、より低いマーカーレベルを示す同様の患者と比較して、将来卒中を起こす高い可能性にあることを示唆する可能性がある。予後指標のレベルまたはレベルの変化は、順に、罹患または死亡の可能性の増大と関連し、患者における「有害転帰の素因の増大と関連」していると呼ばれる。好ましい予後予測マーカーは、卒中後の患者における遅発性神経障害の発症または将来の卒中の機会を予測できる。

10

【0059】

本明細書において、マーカーの使用に関連して、用語「関連している」とは、患者におけるマーカーの存在または量を、所与の状態を患っているとわかっているか、所与の状態の危険にあるとわかっている人における、または所与の状態がないとわかっている人における存在または量と比較することを指す。上記で論じたように、患者サンプルにおけるマーカーレベルは、具体的な診断と関連していることがわかっているレベルと比較できる。サンプルのマーカーレベルは、診断と関連しているといわれている。すなわち、当業者はマーカーレベルを用いて患者が具体的な種類の診断を患っているかどうか決定し、それに応じて対応することができる。あるいは、サンプルのマーカーレベルを、良好な転帰（例えば、疾患がないことなど）と関連しているとわかっているマーカーレベルと比較することができる。好ましい実施形態では、マーカーレベルのプロファイルは、ROC曲線を用いる、全体的な可能性または特定の転帰と関連している。

20

【0060】

本明細書において、用語「別個の」とは、連続していない表面の領域を指す。すなわち、いずれかの領域の一部ではない境界が2つの領域の各々を取り囲んでいる場合に2つの領域は互いに別個である。

30

【0061】

本明細書において用語「独立にアドレス可能な」とは、特異的なシグナルが得られる表面の別個の領域を指す。

【0062】

本明細書において用語「抗体」とは、抗原またはエピトープと特異的に結合できる、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子類、またはその断片に由来する、それらをモデルとする、それらによって実質的にコードされるペプチドまたはポリペプチドを指す。例えば、ファンダメンタル・イムノロジー、第3版(Fundamental Immunology, 3rd Edition)、W. E. ポール(Paul)編、ラーベン・プレス(Raven Press)、N. Y. (1993); ウィルソン(Wilson) (1994) ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソツツ(Journal of Immunological Methods) 175、267~273頁; ヤームッシュ(Yarmush) (1992) ジャーナル・オブ・バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・メソツツ(Journal of Biochemical and Biophysical Methods) 25、85~97頁参照のこと。用語抗体は、抗原結合部分、すなわち、「抗原結合部位」（例えば、抗原と結合する能力を保持する、断片、部分配列、相補性決定領域(CDR)、例えば、(i) Fab断片、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片、(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結している2つのFab断片を含む二価断片、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片(ワード(Ward)ら、(1989)ネイチャー(Nature) 341、544~546頁)、(vi) 単離相

40

50

補性決定領域 (C D R) を含む。一本鎖抗体も用語「抗体」により表されるものに含まれる。

【 0 0 6 3 】

用語「特異的に結合する」とは、抗体が全くその意図される標的とだけ結合することを示すよう意図されるものではない。むしろ、抗体は、その意図される標的に対するその親和性が、非標的分子に対するその親和性と比較した場合に約 5 倍大きい場合に「特異的に結合する」。標的分子に対する抗体の親和性は、非標的分子に対するその親和性より、少なくとも約 5 倍、好ましくは 10 倍、より好ましくは 25 倍、いっそうより好ましくは 50 倍、最も好ましくは 100 倍以上大きいことが好ましい。好ましい実施形態では、抗体またはその他の結合剤と抗原間の特異的結合とは、少なくとも 10^6 M^{-1} という結合親和性を意味する。好ましい抗体は、少なくとも約 10^7 M^{-1} 、好ましくは、約 10^8 M^{-1} ~ 約 10^9 M^{-1} 、約 10^9 M^{-1} ~ 約 10^{10} M^{-1} または約 10^{10} M^{-1} ~ 約 10^{11} M^{-1} の間の親和性で結合する。

10

【 0 0 6 4 】

親和性は、 $K_d = k_{off} / k_{on}$ (k_{off} は解離速度定数であり、 k_{on} は結合速度定数であり、 K_d は平衡定数である) として算出する。親和性は、平衡で、種々の濃度 (c) で標識されたりガンドの結合している画分 (r) を測定することによって求めることができる。データを、スキャッチャード方程式: $r / c = K (n - r)$ を用いてグラフにする:

20

[式中、

- r = 平衡での結合しているリガンドのモル / 受容体のモル、
- c = 平衡での遊離リガンド濃度、
- K = 平衡結合定数、
- n = 受容体分子あたりのリガンド結合部位の数]。

【 0 0 6 5 】

図解法によって、X 軸の r に対して、 r / c を Y 軸にプロットし、そのようにしてスキャッチャードプロットが得られる。親和性は直線の負の傾きである。 k_{off} は、結合している標識されたりガンドが標識されていない過剰のリガンドと競合することによって決定できる (例えば、米国特許第 6, 316, 409 号参照のこと)。標的化剤の、その標的分子に対する親和性は、少なくとも約 1×10^{-6} モル / リットルであることが好ましく、少なくとも約 1×10^{-7} モル / リットルであることがより好ましく、少なくとも約 1×10^{-8} モル / リットルであることがいっそうより好ましく、少なくとも約 1×10^{-9} モル / リットルであることがなおいっそうより好ましく、少なくとも約 1×10^{-10} モル / リットルであることが最も好ましい。スキャッチャード解析法によって測定される抗体親和性は、当技術分野では周知である。例えば、ファン・エルプ (van Erp) ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ (Journal of Immunoassay) 12、425 ~ 43 頁、1991; ネルソン (Nelson) およびグリズウォルド (Griswold)、コンピューター・メソッド・アンド・プログラム・イン・バイオメディシン (Computer Methods and Programs in Biomedicine) 27、65 ~ 8 頁、1988 参照のこと。

30

【 0 0 6 6 】

40

マーカーパネルの同定

本発明に従って、診断、予後予測および / または適当な治療単位の決定において有用な 1 種以上のマーカーを同定するための方法およびシステムが提供される。このような目的に有用なマーカーを同定するのに適した方法は、2002 年 12 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 60 / 436, 392 号、2003 年 12 月 23 日に出願された PCT 出願番号 US 03 / 41426、2002 年 12 月 27 日に出願された米国特許出願第 10 / 331, 127 号および PCT 出願番号 US 03 / 41453 に詳細に記載されており、その各々は参照により、すべての表、図および特許請求の範囲を含むその全文が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 7 】

50

当業者ならば、マーカーの単変量解析を実施でき、マルチプルマーカーの単変量解析から得られたデータを組み合わせ、種々の病状を鑑別するマーカーのパネルを形成することができることを認識するであろう。このような方法は、多重線形回帰、相互作用項の決定、段階的回帰などを含む。

【0068】

マーカーのパネルの開発では、ある種のマーカーの存在またはレベルについて試験することによって、いくつかの可能性あるマーカーのデータを被検体の群から得ることができる。被検体の群を2セットに分ける。第1のセットは、疾患、転帰またはより通常は、第1の状況状態にあると確認されている被検体を含む。例えば、第1のセットの患者は、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/またはMODSと診断され、その疾患の結果として死亡したものであり得る。以下、この第1のセット中の被検体は「罹患」と呼ぶ。

10

【0069】

第2のセットの被検体は単に第1のセットに入らないものである。この第2のセット中の被検体は、以下、「非罹患」と呼ぶ。第1のセットおよび第2のセットは各々ほぼ同数の被検体を有することが好ましい。このセットは正常な患者でもよく、および/または、SIRSの別の原因を患っている患者であってもよく、および/または、注目する特定のエンドポイントまで生存した患者であってもよい。

【0070】

これらのセット中の被検体から得られたデータは、複数のマーカーのレベルを含むことが好ましい。各患者について同一セットのマーカーのデータが利用可能であることが好ましい。このセットのマーカーは、特定の疾患または状態の検出と関連性があると疑われ得るすべての候補マーカーを含み得る。実際に既知の関連性は必要ではない。本明細書に記載される方法およびシステムの実施形態を用いて、どの候補マーカーが、疾患もしくは状態の診断と最も関連性があるかを調べることができる。2セットの被検体における各マーカーのレベルは、例えば、ガウス分布として広い範囲にわたって分布し得る。しかし、分布の適合は必要ではない。

20

【0071】

上記に記載したように、単一マーカーは、前向き様式では、被検体を第1または第2の群に入ると決定的に同定できないことが多い。例えば、患者が、罹患および非罹患被検体の分布において重複領域に入るマーカーレベルを有すると測定される場合は、患者の診断において試験の結果が役に立たないかもしれない。理論上存在するカットオフを用いて、疾患または状態の検出の陽性試験結果と陰性試験結果の間を区別することができる。カットオフをどこで選択するかにかかわらず、診断ツールとしての単一マーカーの有効性は影響を受けない。カットオフを変更することは、単に、単一マーカーの使用に起因する偽陽性の数と偽陰性の数の間で交換するに過ぎない。このような重複を有する試験の有効性は、ROC(受信者動作特性)曲線を用いて表されることが多い。ROC曲線は当業者には周知である。

30

【0072】

ROC曲線の水平軸は、(1 - 特異度)を表し、偽陽性の率とともに増大する。曲線の垂直軸は、感度を表し、これは真の陽性の率とともに増大する。したがって、選択された特定のカットオフについて、(1 - 特異度)の値を求めることができ、対応する感度を求めることができる。ROC曲線下面積は、測定されたマーカーレベルが疾患または状態の正しい同定を可能にする可能性の尺度である。したがって、ROC曲線下面積を用いて試験の有効性を調べることができる。

40

【0073】

上記で論じたように、単一マーカーのレベルの測定は限定された実用性しかない場合があり、例えば、炎症によって非特異的に増大し得る。さらなるマーカーの測定はさらなる情報を提供するが、2種の、関係がない可能性がある測定値のレベルを適切に組み合わせることには困難がある。本発明の実施形態による方法およびシステムでは、罹患および非

50

罹患患者のセットの、種々のマーカーのレベルと関連しているデータを用いて、有用なパネル応答を提供するマーカーのパネルを開発することができる。データは、マイクロソフトアクセス、オラクル、その他のSQLデータベースなどのデータベースで、または簡単にデータファイルで提供できる。データベースまたはデータファイルは、例えば、患者識別子、例えば、名前または番号、存在する種々のマーカーのレベルおよび患者が罹患であるか非罹患であるか否かを含み得る。

【0074】

次いで、まず、各マーカーの理論上存在するカットオフ領域を選択することができる。まず、カットオフ領域の位置はどの点にも選択できるが、選択は以下に記載する最適化プロセスに影響を及ぼし得る。この関連では、最適位置の候補近くの選択は、オブティマイザの高速収束を促進し得る。好ましい方法では、カットオフ領域を、2セットの患者の重複領域のほぼ中心を最初に中心とする。一実施形態では、カットオフ領域は単にカットオフ点であり得る。別の実施形態では、カットオフ領域はゼロより大きい長さを有し得る。これに関しては、カットオフ領域を、中心値と長さの大きさによって定義することができる。実際、カットオフ領域の限界の初期選択は、被検体の各セットの予め選択したパーセンタイルにしたがって決定することができる。例えば、それより上で罹患患者の予め選択したパーセンタイルが測定される点を、カットオフ範囲の右(上)端として用いることができる。

10

【0075】

次いで、各患者の各マーカー値を、指標に対してマッピングすることができる。指標には、カットオフ領域より下の1つの値と、カットオフ領域より上の別の値を割り当てる。例えば、マーカーが通常、非罹患患者に対してより低い値を、罹患患者に対してより高い値を有する場合には、ゼロ指標を特定のマーカーに対して低い値に割り当てるが、このことは陽性診断の可能性が低くなる可能性を示す。別の実施形態では、指標は多項式に基づいて算出することができる。多項式の係数は、罹患と非罹患被検体間のマーカー値の分布に基づいて決定することができる。

20

【0076】

種々のマーカーの相対的な重要性は重み係数によって示され得る。重み係数は、まず、各マーカーの係数として割り当てることができる。カットオフ領域と同様、重み係数の初期選択は、許容範囲にあるどんな値にでも選択することができるが、この選択は最適化プロセスに影響を及ぼす可能性がある。この点に関しては、最適位置の候補近くの選択は、オブティマイザの高速収束を促進し得る。好ましい方法では、許容範囲の重み係数はゼロと1の間に及び、各マーカーの初期重み係数は0.5として割り当てることができる。好ましい実施形態では、各マーカーの初期重み係数はそのマーカー自身の有効性と関連があり得る。例えば、ROC曲線は単一マーカーについて作製することができ、ROC曲線下面積をそのマーカーの初期重み係数として用いることができる。

30

【0077】

次いで、2セットの各々において各被検体のパネル応答を算出することができる。パネル応答は、それに対して各マーカーレベルがマッピングされる指標と各マーカーの重み係数の関数である。好ましい実施形態では、各被検体(j)のパネル応答(R)は以下のように表される：

40

$$R_j = \sum_i w_i I_{i,j}$$

式中、 i はマーカー指数であり、 j は被検体指数であり、 w_i はマーカー i の重み係数であり、 I は被検体 j の、それに対してマーカー i のマーカーレベルがマッピングされる指標値であり、 \sum_i はすべての候補マーカー i にわたる合計である。このパネル応答値は「パネル指標」と呼ばれることもある。

【0078】

マーカー値ではなく指標値を用いることの利点の1つは、特別に高いまたは低いマーカーレベルが、その特定のマーカーについて罹患または非罹患の診断の可能性を変更しないということである。通常、あるレベルを上回るマーカー値は、概ねある特定の状況状態を

50

示す。そのレベルを上回るマーカー値は、同じ確かさで状況状態を示す。したがって、特別に高いマーカー値がその状況状態の特別に高い可能性を示さないかもしれない。カットオフ領域の片側で一定である指標の使用により、この懸念が排除される。

【0079】

パネル応答はまた、マーカーレベルおよびその他の因子、例えば、患者の家系および性別をはじめとするいくつかのパラメータの全般的な関数であり得る。パネル応答に寄与するその他の因子としては、特定のマーカーの値の経時的な傾斜が挙げられる。例えば、まず病院に到着した時点で、特定のマーカーについて患者を測定することができる。同じマーカーを、1時間後再度測定することができ、変化レベルをパネル応答に反映させることができる。さらに、さらなるマーカーをその他のマーカーから導くことができ、これはパネル応答の値に寄与し得る。例えば、2種のマーカーの値の比率がパネル応答を算出する際の因子となり得る。

10

【0080】

被検体の各セット中の各被検体についてパネル応答を得、そこで各セットのパネル応答の分布を解析することができる。目的関数は有効なパネルの選択を容易にするよう定義できる。通常、目的関数は、例えば、被検体の罹患セットのパネル応答と被検体の非罹患セットのパネル応答の重複によって表され得るような、パネルの有効性の指標となるものでなければならない。このように、例えば、重複を最小化することによって、目的関数を最適化してパネルの有効性を最大化することができる。

20

【0081】

好ましい実施形態では、2セットの被検体のパネル応答を表すROC曲線を用いて目的関数を定義することができる。例えば、目的関数はROC曲線下面積を反映し得る。曲線下面積を最大にすることによって、マーカーのパネルの有効性を最大にすることができる。別の実施形態では、ROC曲線のその他の特徴を用いて目的関数を定義できる。例えば、ROC曲線の傾斜が1に等しい点は有用な特徴であり得る。別の実施形態では、「ひざ」と呼ばれることもある、感度と特異度の産物が最大である点を使用してもよい。一実施形態では、ひざでの感度を最大にすることができる。さらなる実施形態では、所定の特異度レベルの感度を用いて目的関数を定義することができる。別の実施形態では、使用できる所定の感度レベルの特異度を用いることができる。さらに別の実施形態では、これらROC曲線の特徴の2以上の組合せを用いることができる。

30

【0082】

パネルのマーカーの1つが、診断されている疾患または状態に特異的であることがあり得る。このようなマーカーがある閾値より上または下に存在する場合には、パネル応答を「陽性」試験結果に戻すよう設定することができる。しかし、閾値を満たさない場合であっても、マーカーのレベルを目的関数に寄与する可能性のあるものとして用いることができる。

【0083】

最適化アルゴリズムを用いて目的関数を最大または最小にすることができる。最適化アルゴリズムは当業者に周知であり、これとしてはシプレックス法およびその他の条件付き最適化技術をはじめ、いくつかの一般に入手可能な最小化または最大化関数が挙げられる。当業者ならば、最小化関数の中には、局所的極小ではなく大域的極小の検索において、その他のものより良好であるものがあることは理解されよう。最適化プロセスでは、各マーカーのカットオフ領域の位置および大きさを、マーカーあたり少なくとも2の自由度を提供するよう変更することが可能である。このような可変パラメータは本明細書では独立変数と呼ぶ。好ましい実施形態では、各マーカーの重み係数も、最適化アルゴリズムの反復にわたって変更することができる。種々の実施形態では、これらのパラメータの順列はいずれも、独立変数として使用することができる。

40

【0084】

前記のパラメータに加えて、各マーカーの意味も独立変数として用いることができる。例えば、多くの場合、あるマーカーの高レベルが一般的に罹患状態を示すものであるのか

50

非罹患状態を示すものであるのかどうか不明であるかもしれない。このような場合には、最適化プロセスを両側で検索できることが有用であり得る。実際、これはいくつかの方法で実施できる。例えば、一実施形態では、意味が、最適化プロセスによって陽性と陰性の間で反転され得る、真に分離した独立変数であり得る。あるいは、重み係数が負であることを可能にすることによって意味が提供され得る。

【0085】

同様に、最適化アルゴリズムはある種の制限付で提供され得る。例えば、得られたROC曲線は、特定の値より大きい曲線下面積を提供するよう制限できる。曲線下面積が0.5であるROC曲線が完全な乱数度を示すのに対し、1.0という曲線下面積は2セットの完全分離を反映する。したがって、特に目的関数が曲線下面積を組み込んでいない場合には、最小許容範囲値、例えば、0.75を制限として用いることができる。その他の制限としては、特定のマーカーの重み係数に対する制限が挙げられる。さらなる制限によって、すべての重み係数の合計を、特定の値、例えば1.0に制限することができる。

10

【0086】

最適化アルゴリズムの反復は、通常、目的関数を最小化または最大化しながら、独立パラメータを制限を満たすよう変更する。最適化プロセスにおける反復数は制限することができる。さらに、2つの連続反復間の目的関数の相違が所定の閾値より小さい場合には最適化プロセスを終了することができ、それによって、最適化アルゴリズムが局所性最小または最大の領域に達したことが示される。

20

【0087】

したがって、最適化プロセスにより、各マーカーの重み係数およびマーカー値を指標に対してマッピングするためのカットオフ領域を含むマーカーのパネルを提供できる。次いで、ある種のマーカーを、パネルから変更またはさらには排除することができ、プロセスは満足できる結果が得られるまで反復する。パネルにおける各マーカーの有効な寄与を求めて、マーカーの相対的重要度を同定することができる。一実施形態では、最適化プロセスから得られた重み係数を用いて、各マーカーの相対的重要度を決定することができる。最も低い係数のマーカーを排除または置換できる。

【0088】

ある場合には、より小さい重み係数が低い重要度を示すものではないかもしれない。同様に、より大きい重み係数が高い重要度を示すものではないかもしれない。例えば、最適化プロセスは、関連マーカーが診断と無関係である場合に高い係数をもたらし得る。この場合には、係数を低下させる利点は全くない。この係数を変更することでは、目的関数の値に影響を及ぼすことはできない。

30

【0089】

試験精度を求めることができるように、前述の方法による比較のための2以上の群中の被検体の選択を可能にする「ゴールドスタンダード」試験基準を選択することができる。敗血症の場合には、このゴールドスタンダードは、血液、尿、胸腔液、脳脊髄液、腹水、滑液、痰の培養物またはその他の組織試料の培養物からの生物の回収であり得る。これは、ゴールドスタンダードに対するそれらの陰性が敗血症がないことを意味するが、上記で論じたように、敗血症の強い臨床上的証拠を示す患者の50%以上が培養物では陰性である。この場合には、敗血症の臨床上的証拠を示すが、陰性ゴールドスタンダード結果の患者は、比較群から省くことができる。あるいは、確認された敗血症被検体の初期比較を、正常な健常対照被検体に対して比較することができる。予後予測の場合には、死亡率が一般的な試験基準である。

40

【0090】

試験精度の尺度は、フィッシャー(Fischer)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Medicine) 29、1043~51頁、2003に記載されるように得ることができ、これを用いて所与のマーカーまたはマーカーのパネルの有効性を求めることができる。これらの尺度としては、感度および特異度、予測値、尤度比、診断オッズ比およびROC曲線面積が挙げられる。上記で論じたように、適した試験は、これらの種々の尺度に

50

関する以下の結果のうち1以上を示し得る：

少なくとも75%の特異度と組み合わせた、少なくとも75%の感度、

少なくとも0.6、より好ましくは0.7、いっそうより好ましくは少なくとも0.8、いっそうより好ましくは少なくとも0.9、最も好ましくは少なくとも0.95というROC曲線面積および/または

少なくとも5、より好ましくは少なくとも10、最も好ましくは少なくとも20という正の尤度比(感度/(1-特異度))として算出される)および0.3以下、より好ましくは0.2以下、最も好ましくは、0.1以下という負の尤度比((1-感度)/特異度として算出される)。

【0091】

例示的マーカーパネル

好ましい実施形態では、以下の考察は、本明細書に記載される方法において使用するためのマーカーパネルに含めるための、血圧調節と関連している1種以上のマーカーを代表するBNP、炎症と関連している1種以上のマーカーを代表するC反応性タンパク質を考慮する。含めることができるさらなるマーカーとしては、血液凝固および止血と関連している1種以上のマーカーならびに/またはアポトーシスと関連している1種以上のマーカーならびに/または血管組織と関連している1種以上のマーカーならびに/または1種以上の急性期反応物質がある。さらなる適したマーカーの種類は以下に記載する。

【0092】

BNP

B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は、脳型ナトリウム利尿ペプチドとも呼ばれ、ナトリウム利尿系に關与して血圧および体液バランスを調節する、32アミノ酸の、4kDaのペプチドである。ボノウ(Bonow), R.O., サークュレーション(Circulation) 93、1946~1950頁(1996)。BNPの前駆体は、「プロBNP」と呼ばれる108アミノ酸分子として合成され、これがタンパク質分解的にプロセシングされて、「NT-プロBNP」と呼ばれる76アミノ酸のN末端ペプチド(アミノ酸1~76)と、BNPまたはBNP32と呼ばれる32アミノ酸の成熟ホルモン(アミノ酸77~108)となる。プロBNP自体は、より大きな前駆体として合成される。これらの種の各々-NT-プロBNP、BNP-32およびプロBNP-はヒト血漿中を循環できるということが示唆されている。タテヤマ(Tateyama)ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical Biophysical Research Communications) 185、760~7頁(1992)、ハント(Hunt)ら、バイオケミカル・バイオフィジオロジー・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical Biophysical Research Communications) 214、1175~83頁、(1995)。2つの型、プロBNPおよびNT-プロBNPならびにBNPおよび/またはその生合成前駆体に由来するペプチドは、まとめてBNPと関連しているマーカーまたはBNP連携マーカーと記載される。BNPと関連している好ましいマーカーとしては、プロBNP、NT-プロBNPおよびBNP₃₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₈およびBNP₇₉₋₁₀₆などの断片が挙げられる。

【0093】

BNPの上昇は、心房圧および肺動脈楔入圧の上昇、心室収縮および拡張機能の低下、左心室肥大および心筋梗塞と関連している。サグネラ(Sagnella), G.A., クリニカル・サイエンス(Clinical Science) 95、519~29頁(1998)。さらに、鬱血性心不全および腎不全と関連するBNP濃度の上昇の多数の報告がある。したがって、患者のBNPレベルは、呼吸困難のいくつかの可能性ある根本的原因を示し得る。

【0094】

C反応性タンパク質

C反応性タンパク質(CRP)はホモ五量体のCa²⁺結合性急性期タンパク質であり、宿主防御に關与する21kDaのサブユニットを含む。CRPは、ホスホリルコリン、微生物の膜の共通成分と優先的に結合する。ホスホリルコリンはまた、哺乳類細胞膜にお

10

20

30

40

50

いても見出されるが、CRPと反応性である形では存在しない。CRPとホスホリルコリンの相互作用は、細菌の凝集およびオプソニン化ならびに補体カスケードの活性化を促進し、そのすべてが細菌クリアランスに関与している。さらに、CRPはDNAおよびヒストンと相互作用でき、CRPは損傷を受けた細胞から循環へ放出される核物質のスカーベンジャーであると示唆されている(ロベイ(Robey), F. A. ら、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 259、7311~7316頁、1984)。IL-1が肝臓におけるクップファー細胞によるIL-6の合成の引き金となり得るので、CRP合成はIL-6によって、IL-1によって間接的に誘導される。CRPの正常な血漿濃度は、健常な集団の90%で $< 3 \mu\text{g}/\text{mL}$ (30 nM)であり、健常な個体の99%で $< 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ (100 nM)である。血漿CRP濃度は、レートネフェロメトリーまたはELISAによって測定できる。急性期反応、例えば、感染、手術、外傷、心筋梗塞および卒中を誘発し得るいずれかの状態を有する個体から得た血漿では、CRPの濃度は上昇する。CRPは、合成後すぐに血流中に放出される分泌タンパク質である。CRP合成は、IL-6によってアップレギュレートされ、血漿CRP濃度は刺激の6時間以内に大幅に上昇する(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology) 77、85~87頁、1996)。血漿CRP濃度は刺激の約50時間後にピークに達し、血流では約19時間の半減期で低下し始める(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology) 77、85~87頁、1996)。

10

20

【0095】

この例示的マーカーパネルの詳細な分析は以下の実施例において提供する。当業者ならば、このマーカーパネルに、その他のマーカーを置換または付加し、本明細書に記載される同定方法および診断マーカーの使用に従って、SIRSの原因をさらに識別できることを容易に認識するであろう。さらなる適したマーカーは以下の節に記載する。

【0096】

本明細書において言及されるマーカーからなるパネルは、注目する診断に関連する関連情報を提供できるよう構築することができる。このようなパネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種以上の個々のマーカーを用いて構築することができる。当業者ならば、単一マーカーまたはマーカーのより大きなパネルを含むマーカーのサブセットの分析を実施し、種々の臨床設定における臨床感度または特異度を最適化することができる。これらとしては、それだけには限らないが、外来、応急手当、救命医療、集中治療、モニタリングユニット、入院患者、外来患者、医師の診療室、診療所および集団検診設定が挙げられる。さらに、当業者ならば単一マーカーまたはマーカーのより大きなパネルを含むマーカーのサブセットを、前記の設定の各々における診断閾値の調整と組み合わせて使用し、臨床感度および特異度を最適化することができる。以下は、本明細書に記載される方法による、適したマーカーパネルの同定において用いるためのさらなる例示的マーカーについての簡単な考察を提供する。

30

【0097】

(i) 血圧調節と関連している例示的マーカー

A型ナトリウム利尿ペプチド(ANP)は、心房性ナトリウム利尿ペプチドまたはカルジオジラチンとも呼ばれ(フォルスマン(Forssmann)らヒストケミストリー・アンド・セル・バイオリジ(Histochemistry and Cell Biology) 110、335~357頁、1998、28アミノ酸のペプチドであり、心房膨満、アンジオテンシンII刺激、エンドセリンおよび交感神経刺激(アドレナリン受容体媒介性)に応じて、心房筋細胞において合成され、保存され、放出される。ANPは、前駆体分子(プロ-ANP)として合成され、これがタンパク質分解切断によって活性型ANPに変換され、またN末端ANP(1~98)が形成される。N末端ANPおよびANPは、心房細動および心不全を示す患者において増加することが報告されている(ロッシ(Rossi)ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・

40

50

カン・カレッジ・オブ・カルディオロジー(Journal of the American College of Cardiology) 35、1256～62頁、2000)。心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP 99-126)自体の他、そのN末端プロホルモンセグメントに由来する直鎖ペプチド断片も、生物活性を有すると報告されている。しかし、当業者ならば認識するであろうが、ANPとの関連のために、N末端ANP分子の濃度もまた、患者における診断または予後予測情報を提供し得る。語句「ANPと関連しているマーカーまたはANP関連ペプチド」とは、28アミノ酸のANP分子自体以外の、プロ-ANP分子(1～126)を起源とするいずれかのポリペプチドを指す。ANPおよびANPに関連しているペプチドのタンパク質分解による分解も文献に記載されており、これらのタンパク質分解断片も、用語「ANP関連ペプチド」に包含される。

10

【0098】

血液量増加症、心房細動および鬱血性心不全の際には、高レベルのANPが見出される。ANPはナトリウムと水のバランス、血液量および動脈圧の長期調節に参与している。このホルモンは副腎皮質によるアルドステロン放出を減少させ、糸球体濾過速度(GFR)を高め、ナトリウム利尿および利尿(カリウム保持性)を実現させ、レニン放出を減少させ、それによってアンジオテンシンIIを減少させる。これらの作用は、血液量、ひいては、中心静脈圧(CVP)、心拍出量および動脈圧の減少に寄与する。ANPのいくつかのイソ型が同定されており、卒中罹患率とのそれらの関係が研究された。例えば、ルバツ(Rubatu)ら、サーキュレーション(Circulation)100、1722～6頁、1999；エストラダ(Estrada)ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・ハイパーテンション(American Journal of Hypertension)7、1085～9頁、1994参照のこと。

20

【0099】

ANPの慢性上昇は、主として、全身の血管抵抗の低下によって動脈圧を減少させるようである。全身の血管拡張の機構は、血管平滑筋cGMPのANP受容体媒介性の上昇と関連している場合があり、ならびに交感神経性血管緊張の減弱によるものである場合もある。この後者の機構は、中枢神経系内の部位でのANP作用と関連している場合があり、ならびに交感神経末端によるノルエピネフリン放出の阻害によるものであり得る。ANPは、レニン-アンジオテンシン系の逆調節系と考えることができる。

【0100】

C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は22アミノ酸のペプチドであり、ヒト脳における主要な活性ナトリウム利尿ペプチドである。CNPはまた、一酸化窒素(NO)と同じ方法で作用する内皮由来弛緩因子であると考えられている(デイビッドソン(Davidson)ら、サーキュレーション(Circulation)93、1155～9頁、1996)。CNPは心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)およびB型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)と構造的に関連しているが、心筋では、ANPとBNPが主に合成される。CNPは血管内皮において前駆体(プロ-CNP)として合成される(プリケット(Prickett)ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジオロジー・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysiology Research Communications)286、513～7頁、2001)。CNPは、動脈および静脈の双方に対して血管拡張作用を有すると考えられており、血管平滑筋細胞において細胞内cGMP濃度を高めることによって主に静脈に作用すると報告されている。

30

40

【0101】

ウロテンシンIIは、配列Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Valを有し、Cys6とCys11の間にジスルフィド架橋を有するペプチドである。ヒトウロテンシン2(UTN)は、プレプロ型で合成される。プロセシングされたウロテンシン2は、Gタンパク質共役受容体GPR14に対して強力な血管作動性作用および心臓刺激性作用を有する。

【0102】

バソプレシン(アルギニンバソプレシン、AVP、抗利尿ホルモン、ADH)は、下垂体後葉から放出されるペプチドホルモンである。身体におけるその第1の機能は、水の腎

50

排泄挙動に影響を及ぼすことによって細胞外液量を調節することである。A V Pの放出を調節するいくつかの機構がある。出血の際に起こるように、血液量減少は、心房圧の低下をもたらす。心房壁内の固有伸張受容器および心房に入る大静脈内の固有伸張受容器(心肺圧受容器)は、心房圧の低下がある場合にその発火頻度が低下する。これらの受容器からの求心性神経は視床下部内でシナプス接合し、心房受容器発火は通常、下垂体後葉によるA V Pの放出を阻害する。血液量減少または中心静脈圧の低下にともなう、心房伸張受容器の発火の減少がA V P放出の増加をもたらす。視床下部浸透圧受容器は細胞外浸透圧を感知し、脱水症によって起こるように、重量オスモル濃度が上昇するとA V P放出を刺激する。最後に、視床下部の領域に位置するアンジオテンシンII受容器が、A V P放出を調節する - アンジオテンシンIIの増大がA V P放出を刺激する。

10

【0103】

A V Pには2つの主要な作用部位がある:腎臓および血管。A V Pの最も重要な生理学的作用は、集合管における水の透過性を増大させることによって腎臓による水の再吸収を増大させ、それによってより濃縮された尿の形成を可能にすることである。これはA V Pの抗利尿効果である。このホルモンはまた、動脈血管を収縮させるが、A V Pの正常な生理学的濃度はその血管作動性範囲よりも低い。

【0104】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、前駆体mRNAの選択的スプライシングによって導かれるカルシトニン遺伝子の産物である、37アミノ酸のポリペプチドである。カルシトニン遺伝子(CALC-I)一次RNA転写物は、一次転写物の一部としての種々のエキソンを含むか排除することによってプロセシングされ、種々のmRNAセグメントとなる。カルシトニンをコードするmRNAは、甲状腺のC細胞におけるCALC-I転写の主産物であるが、CGRP-I mRNA(CGRP=カルシトニン遺伝子関連ペプチド)は、中枢および末梢神経系の神経組織において産生される(図2.2.1)(9)。第3のmRNA配列では、カルシトニン配列は失われ、代わりに、mRNA中にCGRPの配列がコードされる。CGRPは、血管拡張性を有する顕著な血管作動性ペプチドである。CGRPはカルシウムおよびリン酸代謝に対しては何の効果もなく、血管の平滑筋細胞と関連している神経細胞において主に合成される(149)。プロCGRP、CGRPの前駆体とPCTは部分的に同一のN末端アミノ酸配列を有する。

20

【0105】

プロカルシトニンは、染色体11p15.4上に位置するCalc-1遺伝子によってコードされる116アミノ酸(14.5kDa)のタンパク質である。Calc-I遺伝子からは、選択的スプライシング事象の結果である2種の転写物が生じる。プレ-プロカルシトニンは、25アミノ酸のシグナルペプチドを含み、これが甲状腺のC細胞によってプロセシングされて57アミノ酸のN末端断片と、32アミノ酸のカルシトニン断片と、21アミノ酸のカタカルシン断片とになる。プロカルシトニンは、その他の体細胞によってグリコシル化産物としてそのまま分泌される。ウィッチャー(Whicher)ら、アナルズ・オブ・クリティカル・バイオケミストリー(Annals of Clinical Biochemistry)38、483~93頁(2001)。血漿プロカルシトニンは、敗血症およびその重篤度のマーカーとして同定されており(ユキオカら、アナルズ・オブ・ジ・アカデミー・オブ・メディシン・シンガポール(Annals of the Academy of Medicine, Singapore)30、528~31頁(2001))、2日目のプロカルシトニンレベルが死亡の予測となる(ペティーラ(Pettila)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care medicine)28、1220~25頁(2002))。プロカルシトニン₃₋₁₁₆、本明細書においてその用語が定義されるようなプロカルシトニンと関連している分子もまた、循環において見出される。例えば、米国特許第6,756,483号参照のこと。

30

40

【0106】

アンジオテンシンIIは、循環基質、アンジオテンシノーゲンに対するレニン作用によって形成されるオクタペプチドホルモンであり、アンジオテンシノーゲンはタンパク質分解切断を受けてデカペプチドアンジオテンシンIを形成する。血管内皮は、特に肺では、酵

50

素、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) を有し、これが2個のアミノ酸を切断除去して、オクタペプチド、アンジオテンシンII (Angiotensin II) を形成する。

【0107】

Angiotensin IIはいくつかの極めて重要な機能を有する：抵抗血管を収縮させ (Angiotensin II受容体を介して)、それによって全身の血管抵抗および動脈圧を上昇させ、副腎皮質に対して作用して、アルドステロン放出させ、これが、次いで、腎臓に対して作用しナトリウムおよび体液貯留を増加させる；下垂体後葉からのバソプレシン (抗利尿ホルモン、ADH) の放出を刺激し、これが腎臓に作用して体液貯留を増加させる；脳内の渴中枢を刺激する；交感神経終末からのノルエピネフリン放出を促進し、神経終末によるノルエピネフリン再取り込みを阻害し、それによって交感神経性アドレナリン作動性機能を増強する；心臓肥大および血管肥大を刺激する。

10

【0108】

アドレノメデュリン (AM) は、副腎髄質、肺、腎臓および心臓をはじめ多数の組織で産生される52アミノ酸のペプチドである (ヨシトミら、クリニカル・サイエンス (Clinical Science) (Colch) 94、135~9頁、1998)。実験動物では、AMの静脈内投与は、心拍出量の増加を伴う、長時間の降圧効果を引き起こす。AMは、右心房からのANPの伸張誘導性放出を増強するが、心室性BNP発現には影響を及ぼさないと報告されている。AMは前駆体分子 (プロ-AM) として合成される。AM前駆体からプロセシングされるN末端ペプチドもまた、降圧性ペプチドとして作用すると報告されている (クワサコら、アナルズ・オブ・クリティカル・バイオケミストリー (Annals of Clinical Biochemistry) 36、622~8頁、1999)。

20

【0109】

エンドセリンは、血管内皮によって産生される別個の遺伝子によってコードされる3種の関連ペプチド (エンドセリン-1、エンドセリン-2およびエンドセリン-3) であり、その各々が強力な血管収縮活性を示す。エンドセリン-1 (ET-1) は、21アミノ酸残基のペプチドであり、17残基のシグナル配列を含む212残基の前駆体 (プレプロET-1) として合成され、シグナル配列が除去されて大きなET-1として知られるペプチドを提供する。この分子が、エンドセリン変換酵素によってtrp21とval22の間で加水分解によってさらにプロセシングされる。大きなET-1およびET-1の双方とも生物活性を示すが、成熟ET-1型はより大きな血管収縮活性を示す (ブルックス (Brooks) およびエルギュール (Ergul)、ジャーナル・オブ・エンドクリノロジー (Journal of Endocrinology) 21、307~15頁、1998)。同様に、エンドセリン-2およびエンドセリン-3も21アミノ酸残基の長さであり、それぞれ、大きなエンドセリン-2および大きなエンドセリン-3の加水分解によって生じる (ヤップ (Yap) ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ファルマコロジー (British Journal of Pharmacology) 129、170~6頁、2000; リー (Lee) ら、ブラッド (blood) 94、1440~50頁、1999)。

30

【0110】

(ii) 血液凝固および止血と関連している例示的マーカー

D-二量体は、架橋したフィブリン分解産物であり、200kDaというおよその分子量を有する。D-二量体の正常な血漿濃度は $< 150 \text{ ng/ml}$ (750 pM) である。急性心筋梗塞および不安定狭心症の患者ではD-二量体の血漿濃度は上昇するが、安定狭心症では上昇しない。ホフマイスター (Hoffmeister), H. M. ら、サーキュレーション (Circulation) 91、2520~27頁 (1995)、ベイズ-ゲニス (Bayes-Genis), A. ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thrombosis and Haemostasis) 81、865~68頁 (1999); ガーフィンケル (Gurfinkel), E. ら、ブリティッシュ・ハート・ジャーナル (British Heart Journal) 71、151~55頁 (1994); クラスカル (Kruskal), J. B. ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (New England Journal of medicine) 317、1361~65頁 (1987); タナカ, M. およびスズキ, A., スロンボシス・リサーチ (Thrombosis Research) 76、289~98頁

40

50

(1994)。

【0111】

D-二量体の血漿濃度は、血液凝固および繊維素溶解活性化と関連しているいずれかの状態、例えば、敗血症、卒中、手術、アテローム性動脈硬化症、外傷および血栓性血小板減少性紫斑病の際にも上昇する。D-二量体は、プラスミンによるタンパク質分解性血餅溶解の直後に血流中に放出される。D-二量体の血漿濃度は、不安定狭心症の患者では $2\mu\text{g}/\text{ml}$ を超える場合がある。ガーフィンケル(Gurfinkel), E.ら、ブリティッシュ・ハート・ジャーナル(British Heart Journal) 71、151~55頁(1994)。血漿D-二量体は、繊維素溶解の特異的マーカーであり、急性心筋梗塞および不安定狭心症と関連しているプロトロンビン状態の存在を示す。D-二量体の血漿濃度は、急性肺塞栓の患者でもほとんど上昇しており、したがって、正常レベルのD-二量体により肺塞栓を排除することができる。エガーマイヤー(Egermayer)ら、ソラクス(Thorax) 53、830~34頁(1998)。

10

【0112】

プラスミンは、架橋されたフィブリンをタンパク質分解的に消化し、その結果、血餅溶解をもたらす、 78kDa のセリンプロテアーゼである。 70kDa のセリンプロテアーゼ阻害剤 2-抗プラスミン(2AP)は、プラスミンと共有結合1:1化学量論複合体を形成してプラスミン活性を調節する。2APが、繊維素溶解の際に活性化されるプラスミンと接触すると直後に、プラスミン阻害性複合体(PIC)とも呼ばれる、結果として生じる約 150kDa のプラスミン-2AP複合体(PAP)が形成される。PAPの正常な血清濃度は $<1\mu\text{g}/\text{ml}$ (6.9nM)である。PAPの血清濃度の上昇は、繊維素溶解の活性化によって起こり得る。PAPの血清濃度の上昇は血餅の存在または繊維素溶解活性化を引き起こすか、繊維素溶解活性化の結果であるいずれかの状態と関連している場合がある。これらの状態としては、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、急性心筋梗塞、手術、外傷、不安定狭心症、卒中および血栓性血小板減少性紫斑病が挙げられる。PAPは、プラスミンのタンパク質分解性活性化の直後に形成される。PAPは、繊維素溶解活性化および最近のまたは継続的な凝固性亢進状態の存在の特異的マーカーである。

20

【0113】

- トロンボグロブリン(TG)は、 36kDa の血小板顆粒成分であり、血小板活性化の際に放出される。TGの正常な血漿濃度は $<40\text{ng}/\text{ml}$ (1.1nM)である。TGの血漿レベルは、不安定狭心症および急性心筋梗塞の患者では上昇するが、安定狭心症では上昇しないようである(デ・カテリーナ(De Caterina), R.ら、ヨーロッパ心臓・ジャーナル(Europien Heart Journal) 9、913~922頁、1988; パッツァン(Bazzan), M.ら、カルディオロギア(Cardiologia) 34、217~220頁、1989)。血漿TG上昇はまた、不安定狭心症の患者における虚血のエピソードと関連しているようである(ソベル(Sobel), M.ら、サーキュレーション(Circulation) 63、300~306頁、1981)。TGの血漿濃度の上昇は、血餅の存在または血小板活性化を引き起こすいずれかの状態と関連している可能性がある。これらの状態としては、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、手術、外傷および血栓性血小板減少性紫斑病および卒中が挙げられる(ランディ(Landi), G.ら、ニューロロジ- (Neurology) 37、1667~1671頁、1987)。TGは、血小板活性化および凝集の直後に循環中に放出される。血漿において10分とそれに続く長時間の1時間の半減期という二相性の半減期を有する(スウィタルスカ(Switalska), H. I.ら、ジャーナル・オブ・ラボラトリー・アンド・クリニカル・メディスン(Journal of Laboratory and Clinical Medicine) 106、690~700頁、1985)。血漿TG濃度は、不安定狭心症および急性心筋梗塞の際に上昇すると報告されている。血液サンプリングプロセスの際の血小板活性化を避けるために特別な予防措置をとらなければならない。血小板活性化は、通常の血液サンプリングの際によく見られ、血漿TG濃度の人為的な上昇をもたらし得る。さらに、血流中に放出されるTGの量は、個体の血小板含量に応じて変わり、

30

40

50

個体の血小板含量はかなりばらつきがあり得る。ACSと関連しているTGの血漿濃度は、70 ng/ml (2 nM) に達する場合もあるが、この値はサンプリング手順の際の血小板活性化によって影響を受け得る。

【0114】

血小板因子4 (PF4) は、血小板活性化の際に放出される、40 kDaの血小板顆粒成分である。PF4は、血小板活性化のマーカーであり、ヘパリンと結合し、中和する能力を有する。PF4の正常な血漿濃度は、< 7 ng/ml (175 pM) である。PF4の血漿濃度は急性心筋梗塞および不安定狭心症の患者では上昇するが、安定狭心症の患者では上昇しないようである (ガリーノ(Gallino), A.ら、アメリカン・ハート・ジャーナル(American Heart Journal) 112、285~290頁、1986; サカタ, K.ら、ジャパニーズ・サーキュレーション・ジャーナル(Japanese Circulation Journal) 60、277~284頁、1996; バッザン(Bazzan), M.ら、カルディオロギア(Cardiology) 34、217~220頁、1989)。血漿PF4上昇はまた、不安定狭心症の患者における虚血のエピソードと関連しているようである (ソベル(Sobel), M.ら、サーキュレーション(Circulation) 63、300~306頁、1981)。PF4の血漿濃度の上昇は、血餅の存在または血小板活性化を引き起こすいずれかの状態と関連している場合がある。これらの状態としては、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病および急性卒中が挙げられる (カーター(Carter), A. M.ら、アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology) 18、1124~1131頁、1998)。PF4は、血小板活性化および凝集の直後に循環中に放出される。血漿において、1分と、それに続く長時間の20分の半減期という二相性の半減期を有する。血漿におけるPF4の半減期は、ヘパリンの存在によって20~40分に延長され得る (ルチンスキ(Rucinski), B.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロギア(American Journal of Physiology) 251、800~H807頁、1986)。血漿PF4濃度は、不安定狭心症および急性心筋梗塞の際に上昇すると報告されているが、これらの研究は完全に信頼できるものではない場合がある。血液サンプリングプロセスの際の血小板活性化を避けるため特別な予防措置をとらなければならない。血小板活性化は、通常の血液サンプリングの際によく見られ、血漿PF4濃度の人為的な上昇をもたらし得る。さらに、血流中に放出されるPF4の量は、個体の血小板含量に応じて変わり、個体の血小板含量はかなりばらつきがあり得る。疾患と関連しているPF4の血漿濃度は、100 ng/ml (2.5 nM) を超える場合もあるが、この値はサンプリング手順の際の血小板活性化によって影響を受け得る可能性が高い。

【0115】

線維素ペプチドA (FPA) は、トロンビンの作用によってフィブリノゲンのアミノ末端から遊離される、16アミノ酸の、1.5 kDaのペプチドである。フィブリノゲンは、肝臓によって合成され、分泌される。FPAの正常な血漿濃度は、< 5 ng/ml (3.3 nM) である。血漿FPA濃度は、急性心筋梗塞、不安定狭心症および異型狭心症の患者では上昇するが、安定狭心症の患者では上昇しない (ゲンシーニ(Gensini), G. F.ら、スロンボシス・リサーチ(Thrombosis Research) 50、517~525頁、1988; ガリーノ(Gallino), A.ら、アメリカン・ハート・ジャーナル(American Heart Journal) 112、285~290頁、1986; サカタ, K.ら、ジャパニーズ・サーキュレーション・ジャーナル(Japanese Circulation Journal) 60、277~284頁、1996; セルー(Theroux), P.ら、サーキュレーション(Circulation) 75、156~162頁、1987; マーリニ(Merlini), P. A.ら、サーキュレーション(Circulation) 90、61~68頁、1994; マンテン(Manten), A.ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 40、389~395頁、1998)。さらに、血漿FPAは狭心症の重篤度を示し得る (ゲンシーニ(Gensini), G. F.ら、スロンボシス・リサーチ(Thrombosis Research) 50、517~525頁、1988)。FPAの血漿濃度の上昇は、血液凝固経路の活性化を含むいずれかの状態、例えば、卒中、手術、癌、

10

20

30

40

50

播種性血管内凝固、ネフローゼ、敗血症および血栓性血小板減少性紫斑病と関連している。FPAは、トロンビン活性化およびフィブリノゲンの切断後に循環中に放出される。FPAは小さなポリペプチドであるので、迅速に血流から除去される可能性が高い。FPAは血餅形成後1ヶ月より長期間上昇することが実証されており、活性な狭心症では最大血漿FPA濃度は40ng/mlを超える場合がある(ゲンシーニ(Gensini), G.F.ら、スロンボシス・リサーチ(Thrombosis Research)50、517~525頁、1988; トーギ(Tohgi), H.ら、ストローク(Stroke)21、1663~1667頁、1990)。

【0116】

血小板由来増殖因子(PDGF)は、28kDaの、相同サブユニットAおよび/またはBからなる分泌ホモまたはヘテロ二量体タンパク質である(マハーデーヴァン(Mahadevan), D.ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)270、27595~27600頁、1995)。PDGFは間葉細胞の強力な分裂促進因子であり、アテローム性動脈硬化症の病因に関与してきた。PDGFは、血管傷害部位付近に血小板および単球を凝集させることによって放出される。PDGFの正常な血漿濃度は、 $< 0.4 \text{ ng/ml}$ (15 pM)である。血漿PDGF濃度は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の個体では、健常な対照または安定狭心症の個体よりも高い(オガワ(Ogawa), H.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology)69、453~456頁、1992; ウォリス(Wallace), J.M.ら、アナルズ・オブ・クリティカル・バイオケミストリー(Annals of Clinical Biochemistry)35、236~241頁、1998; オガワ, H.ら、コロナリー・アーテリー・ディゼイズ(Coronary Artery Disease)4:437~442頁、1993)。これらの個体における血漿PDGF濃度の変化は、大概、血小板および単球活性化の増大によるものである。血漿PDGFは、脳腫瘍、乳癌および高血圧症の個体では上昇する(クリモト(Kurimoto), M.ら、アクタ・ニューロチルルジカ(Acta Neurochirurgica)(ウィーン)137、182~187頁、1995; シーモア(Seymour), L.ら、ブリスト・キャンサー・リサーチ・アンド・トリートメント(Breast Cancer Research and Treatment)26、247~252頁、1993; ロッシ(Rossi), E.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・ハイパーテンション(American Journal of Hypertension)11、1239~1243頁、1998)。血漿PDGFはまた、いずれかの炎症誘発性状態または血小板活性化を引き起こすいずれかの状態、例えば、手術、外傷、敗血症、播種性血管内凝固および血栓性血小板減少性紫斑病においても上昇し得る。PDGFは、活性化の際に血小板および単球の分泌顆粒から放出される。PDGFは、動物では、約5分および1時間という二相性の半減期を有する(コヘン(Cohen), A.M.ら、ジャーナル・オブ・サージカル・リサーチ(Journal of Surgical Research)49、447~452頁、1990; ボーウェン・ポプ(Bowen-Pope), D.F.ら、ブラッド(Blood)64、458~469頁、1984)。ACSにおける血漿PDGF濃度は、 0.6 ng/ml (22 pM)を超える場合もある(オガワ, H.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology)69、453~456頁、1992)。PDGFは血小板活性化の高感度で特異的なマーカーであり得る。さらに、血管傷害および付随的な単球および血小板の活性化の高感度マーカーであり得る。

【0117】

プロトロンビンフラグメント1+2は、トロンビン活性化の際にトロンビンのアミノ末端から遊離される、32kDaのポリペプチドである。F1+2の正常な血漿濃度は、 $< 32 \text{ ng/ml}$ (1 nM)である。F1+2の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の患者では上昇するが、安定狭心症の患者では上昇しないと報告されているものの、変化は確固たるものではなかった(マーリニ(Merlini), P.A.ら、サーキュレーション(Circulation)90、61~68頁、1994)。その他の報告は、心血管疾患では血漿F1+2濃度の有意な変化はないと示している(ピアスチー(Biasucci), L.M.ら、サーキュレーション(Circulation)93、2121~2127頁、1996; マンテン(Ma

10

20

30

40

50

nten), A.ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 40、389~395頁、1998)。血漿中のF1+2の濃度は、血液凝固活性化と関連しているいずれかの状態、例えば、卒中、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病および播種性血管内凝固の際に上昇し得る。F1+2は、トロンピン活性化の際に直ちに血流中に放出される。F1+2は、血漿において約90分という半減期を有し、この長い半減期によってトロンピン形成の突発をマスクできるということが示唆されている(ピアスチー(Biasucci), L.M.ら、サーキュレーション(Circulation) 93、2121~2127頁、1996)。

【0118】

P-セレクチンは、顆粒膜タンパク質-140、GMP-140、PADGEMおよびCD-62Pとも呼ばれ、血小板および内皮細胞において発現される約140kDaの接着分子である。P-セレクチンは血小板の顆粒において、および内皮細胞のバイベル・パラデ小体において保存される。P-セレクチンは、活性化されると、内皮細胞および血小板の表面に迅速に移動され、好中球および単球との「ローリング」細胞表面相互作用を促進する。膜結合型および可溶性型のP-セレクチンが同定されている。可溶性P-セレクチンは、膜結合P-セレクチンの脱落によって、細胞外P-セレクチン分子のタンパク質分解によってか、表面結合型P-セレクチン分子と近接近している細胞内細胞骨格の成分のタンパク質分解のいずれかによって生成し得る(フォックス(Fox), J.E.、ブラッド・コアギュレーション・アンド・フィブリノリシス(Blood Coagulation and Fibrinolysis) 5、291~304頁、1994)。さらに、可溶性P-セレクチンは、N末端膜貫通ドメインをコードしないmRNAから翻訳され得る(ダンロップ(Dunlop), L.C.ら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン(Journal of Experimental Medicine) 175、1147~1150頁、1992; ジョンストン(Johnston), G.I.ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 265、21381~21385頁、1990)。

【0119】

活性化された血小板は、膜結合型P-セレクチンを脱落させ、循環中にとどまらせることができ、P-セレクチンの脱落は、血漿P-セレクチン濃度を約70ng/mlまで上昇させ得る(マイケルソン(Michelson), A.D.ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 93、11877~11882頁、1996)。可溶性P-セレクチンはまた、膜結合型P-セレクチンとは異なるコンホメーションをとり得る。可溶性P-セレクチンは、一方の末端に球状ドメインを含む単量体の棒様構造を有し、膜結合型分子はロゼット構造を形成し、球状ドメインが外側を向く(ウシヤマ, S.ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 268、15229~15237頁、1993)。可溶性P-セレクチンは、白血球と活性化された血小板と内皮細胞の間の相互作用を遮断することによって、炎症および血栓症の調節において重要な役割を果たし得る(ガンブル(Gamble), J.R.ら、サイエンス(Science) 249、414~417頁、1990)。可溶性P-セレクチンの正常な血漿濃度は<200ng/mlである。血液は、通常、抗凝固薬としてクエン酸塩を用いて回収されるが、いくつかの研究では、血小板活性化を防ぐために、プロスタグランジンEなどの添加剤とともにEDTA血漿を用いている。EDTAは、クエン酸塩を用いて得られるものに匹敵する結果をもたらす適した抗凝固薬であり得る。さらに、可溶性P-セレクチンの血漿濃度はサンプリング手順の際の起こり得る血小板活性化によって影響を受けることはない。血漿可溶性P-セレクチン濃度は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の患者では大幅に上昇したが、安定狭心症の患者では、運動負荷テスト後であっても上昇しなかった(イケダ(Ikeda), H.ら、サーキュレーション(Circulation) 92、1693~1696頁、1995; トモダ, H.およびアオキ, N.、アンジオロジー(Angiology) 49、807~813頁、1998; ホランダー(Hollander), J.E.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン

10

20

30

40

50

・カレッジ・オブ・カルディオロジ- (Journal of the American College Cardiology) 34、95～105頁、1999；カイキタ(Kaikita), K.ら、サーキュレーション(Circulation) 92、1726～1730頁、1995；イケダ, H.ら、コロナリー・アーテリー・ディーズ(Coronary Artery Disease) 5、515～518頁、1994)。急性心筋梗塞に対する膜結合型P-セレクチン対可溶性P-セレクチンの感度および特異度は、71%対76%および32%対45%である(ホルンダー(Hollander), J. E.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ- (Journal of the American College Cardiology) 34、95～105頁、1999)。不安定狭心症+急性心筋梗塞に対する膜結合型P-セレクチン対可溶性P-セレクチンの感度および特異度は、71%対79%および30%対35%である(ホルンダー(Hollander), J. E.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ- (Journal of the American College Cardiology) 34、95～105頁、1999)。P-セレクチン発現は、安定狭心症よりも不安定狭心症の個体から得た冠動脈粥腫切除試料において多い(テナグリア(Tenaglia), A. N.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジ- (American Journal of Cardiology) 79、742～747頁、1997)。さらに、血漿可溶性P-セレクチンは、急性心筋梗塞の患者では、不安定狭心症の患者よりもより高い程度に上昇し得る。血漿可溶性および膜結合P-セレクチンはまた、非インスリン依存性真性糖尿病および鬱血性心不全の個体では上昇している(ノムラ, S.ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosis and Haemostasis) 80、388～392頁、1998；オコナー(O'Connor), C. M.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジ- (American Journal of Cardiology) 83、1345～1349頁、1999)。可溶性P-セレクチン濃度は、特発性血小板減少性紫斑病、関節リウマチ、高コレステロール血症、急性卒中、アテローム性動脈硬化症、高血圧症、急性肺傷害、結合組織疾患、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、播種性血管内凝固および慢性腎不全の個体の血漿では上昇している(カタヤマ, M.ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジ- (British Journal Haematology) 84、702～710頁、1993；ハズネダログル(Haznedaroglu), I. C.ら、アクタ・ヘマトロジカ(Acta Haematologica) 101、16～20頁、1999；エルテンリ(Ertenli), I.ら、ジャーナル・オブ・リュマトロジ- (Journal of Rheumatology) 25、1054～1058頁、1998；ダビ(Davi), G.ら、サーキュレーション(Circulation) 97、953～957頁、1998；フラインス(Frijns), C. J.ら、ストローク(Stroke) 28、2214～2218頁、1997；ブラン(Blann), A. D.ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosis and Haemostasis) 77、1077～1080頁、1997；ブラン(Blann), A. D.ら、ジャーナル・オブ・ヒューマン・ハイパーテンション(Journal of Human Hypertension) 11、607～609頁、1997；サカマキ, F.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・レスピラトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディシン(American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine) 151、1821～1826頁、1995；タケダ, I.ら、インターナショナル・アーカイブス・オブ・アレルギー・アンド・イムノロジ- (International Archives Allergy and Immunology) 105、128～134頁、1994；チョン(Chong), B. H.ら、ブラッド(Blood) 83、1535～1541頁、1994；ボノミニ(Bonomini), M.ら、ネフロン(Nephron) 79、399～407頁、1998)。さらに、血小板活性化を含むいずれの状態も、P-セレクチンの血漿上昇の供給源であり得る可能性がある。P-セレクチンは、血小板または内皮細胞の活性化後に細胞表面に迅速に提示される。膜貫通ドメインを欠く別のmRNAから翻訳された可溶性P-セレクチンも、この活性化後に細胞外間隙中に放出される。可溶性P-セレクチンはまた、膜結合型P-セレクチンが直接的にまたは間接的に関与するタンパク質分解によっても形成され得る。

【0120】

血漿可溶性P-セレクチンは、tPAまたは冠動脈血管形成術で治療された急性心筋梗塞の患者では入院時に上昇しており、ピーク上昇は発症の4時間後に起こる(シモムラ,

H.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジ- (American Journal of Cardiology) 81、397~400頁、1998)。血漿可溶性P-セレクチンは、不安定狭心症の患者では狭心症発作後1時間未満で上昇し、濃度は時間とともに低下し、発作の発症の5時間より後にベースラインに近づいた(イケダ, H.ら、サーキュレーション(Circulation) 92、1693~1696頁、1995)。可溶性P-セレクチンの血漿濃度は、ACSでは $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に近づき得る(イケダ, H.ら、コ罗纳リー・アーテリー・ディーズ(Coronary Artery Disease) 5、515~518頁、1994)。可溶性P-セレクチンの血流への放出および血流からのその除去についてのさらなる研究を実施する必要がある。P-セレクチンは、血小板および内皮細胞活性化、血栓形成および炎症を裏付ける状態の高感度で特異的なマーカーであり得る。しかし、ACSの特異的なマーカーではない。P-セレクチンは、心臓組織傷害に特異的である別のマーカーとともに用いる場合には、不安定狭心症および急性心筋梗塞と安定狭心症を識別するのに有用であり得る。さらに、可溶性P-セレクチンは、急性心筋梗塞では、不安定狭心症においてよりも高い程度に上昇し得る。P-セレクチンは、通常、2つの型、膜結合型および可溶性で存在する。公開された研究の指摘によれば、P-セレクチンの可溶性型は血小板および内皮細胞によって、またタンパク質分解機構によってである可能性がある膜結合型P-セレクチンの脱落によって生成される。可溶性P-セレクチンは、その血漿濃度が、血小板活性化のその他のマーカー、例えば、PF4および-TGと同程度には血液サンプルリング手順によって影響を受けない可能性があるので、血小板活性化の最も有用な現在同定されているマーカーであるとわかる。

10

20

【0121】

トロンピンは、フィブリノゲンをタンパク質分解的に切断してフィブリンを形成する、 37kDa のセリンプロテアーゼであり、フィブリンは最終的には血餅形成の際に架橋ネットワークに組み込まれる。抗トロンピンIII(ATIII)は、トロンピン、第XIa因子、第XIIa因子および第IXa因子タンパク質分解活性の生理学的レギュレーターである、 65kDa のセリンプロテアーゼ阻害剤である。ATIIIの阻害活性は、ヘパリンの結合に応じて変わる。ヘパリンは、ATIIIの阻害活性を2~3桁規模で増強し、ATIIIによって阻害されるプロテアーゼのほぼ即時的な不活性化をもたらす。ATIIIは、共有結合1:1化学量論複合体の形成によってその標的プロテアーゼを阻害する。約 100kDa のトロンピン-ATIII複合体(TAT)の正常な血漿濃度は $<5\text{ng}/\text{mL}$ (50pM)である。TAT濃度は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の患者では、特に、特発性虚血エピソードの際に上昇する(ピアスチー(Biasucci), L.M.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジ- (American Journal of Cardiology) 77、85~87頁、1996); キーナスト(Kienast), J.ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosis and Haemostasis) 70、550~553頁、1993)。さらに、TATは、安定狭心症の個体の血漿において上昇している場合がある(マンテン(Manten), A.ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 40、389~395頁、1998)。その他の公開された報告は、ACSの患者の血漿中のTAT濃度の有意な相違を全く見出していない(マンテン(Manten), A.ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 40、389~395頁、1998; ホフマイスター(Hoffmeister), H.M.ら、アテロスクレロシス(Atherosclerosis) 144、151~157頁、1999)。ACSと関連している血漿TAT濃度変化を調べるにはさらなる研究が必要である。血漿TAT濃度の上昇は、血液凝固活性化を伴ういずれかの状態、例えば、卒中、手術、外傷、播種性血管内凝固および血栓性血小板減少性紫斑病と関連している。TATは、ヘパリンの存在下でトロンピン活性化の直後に形成され、ヘパリンはこの相互作用の制限因子である。TATは、血流中では約5分という半減期を有する(ピアスチー(Biasucci), L.M.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジ- (American Journal of Cardiology) 77、85~87頁、1996)。TAT濃度は上昇し、15分後に急落を示し、血液凝固活性化後の1時間未満でベースラインに戻る。TATの血漿濃度はACSでは $50\text{ng}/\text{mL}$ に近づく場合もある(ピアスチー(Biasucci), L.M.ら、サーキ

30

40

50

ュレーション(Circulation) 93、2121~2127頁、1996)。TATは、血液凝固活性化、具体的には、トロンピン活性化の特異的マーカーである。

【0122】

フォンウィルブランド因子(vWF)は、会合して、一連の高分子量多量体を形成する、220kDaの単量体からなる、血小板、巨核球および内皮細胞によって産生される血漿タンパク質である。これらの多量体は、通常、分子量600~20,000kDaの範囲である。vWFは、循環血液凝固因子VIIIを安定化することによって、また露出した内皮下層への、ならびにその他の血小板への血小板接着を媒介することによって血液凝固プロセスに関与している。vWFのA1ドメインは血小板糖タンパク質Ib-IX-V複合体および非繊維性コラーゲンVI型と結合し、A3ドメインは繊維性コラーゲンI型およびIII型と結合する(エムズリー(Emsley), J.ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 273、10396~10401頁、1998)。vWF分子中に存在するその他のドメインとして、血小板-血小板相互作用を媒介するインテグリン結合ドメイン、11A型フォンウィルブランド病の病因と関係していると思われるプロテアーゼ切断ドメインが挙げられる。vWFの血小板との相互作用は、正常な生理学的状態におけるvWFと血小板間の相互作用を避けるために厳重に制御されている。vWFは、通常、球状状態で存在し、高せん断応力という条件下で、血管傷害部位でよく見られる、伸ばされた鎖構造にコンホメーション転移を受ける。このコンホメーションの変化が、分子の分子内ドメインを露出させ、vWFが血小板と相互作用するのを可能にする。さらに、せん断応力は、内皮細胞からのvWFの放出を引き起こすことができ、これによって多数のvWF分子が血小板との相互作用を利用できるようになる。vWFにおけるコンホメーション変化は、リストセチンおよびボトロセチンのような非生理学的モジュレーターを添加することによってインビトロで誘導できる(ミヤタ, S.ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 271、9046~9053頁、1996)。血管傷害部位では、vWFは、内皮下マトリックス中のコラーゲンと迅速に会合し、血小板と事実上不可逆的に結合し、傷害部位で血小板と血管の内皮下層の間に架橋を効果的に形成する。また、証拠により、vWFのコンホメーション変化は、内皮下マトリックスとのその相互作用には必要でない可能性があること示唆されている(シクスマ(Sixma), J.J.およびデ・グロット(de Groot), P.G.、メイヨー・クリニック・プロシーディングス(Mayo Clinic Proceedings) 66、628~633頁、1991)。これは、vWFは、血管傷害部位で露出された内皮下マトリックスと結合でき、高度の局在するせん断応力のためにコンホメーション変化を受け、循環血小板と迅速に結合することができ、これが新しく形成される血栓に組み込まれるということを示唆する。

【0123】

vWFの総量の測定により、当業者が総vWF濃度の変化を同定することが可能となる。この測定は、種々の型のvWF分子の測定によって実施できる。A1ドメインの測定により、循環中の活性vWFの測定が可能となり、これはA1ドメインが血小板結合を利用するために凝血促進状態が存在することを示す。この関連では、また、露出されたA1ドメインと、インテグリン結合ドメインまたはA3ドメインのいずれかの双方を含むvWF分子を特異的に測定するアッセイによって、それぞれ、血小板-血小板相互作用の媒介を利用可能であるか、血小板と血管の内皮下層との架橋を媒介する活性vWFの同定が可能となる。これらのvWF型のいずれかの測定により、プロテアーゼ切断ドメインに特異的な抗体を用いるアッセイに用いた場合に、フォンウィルブランド病の存在にかかわらず、いずれかの個体における種々のvWF型の循環濃度を調べるためにアッセイを用いることが可能となる。vWFの正常な血漿濃度は、5~10 μ g/ml、または血小板凝集によって測定される60~110%活性である。vWFの特定の型の測定は、卒中および心血管疾患をはじめ、いずれの種類も血管疾患においても重要であり得る。血漿vWF濃度は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の個体では上昇するが、安定狭心症の個体では上昇しないと報告されている(ゴトー, S.ら、サーキュレーション(Circulation) 99、60

10

20

30

40

50

8 ~ 6 1 3 頁、1 9 9 9 ; トウソウリス(Tousoulis), D . ら、インターナショナル・ジャーナル・オブ・カルディオロジ- (International Journal of Cardiology) 5 6、2 5 9 ~ 2 6 2 頁、1 9 9 6 ; ヤズダーニ(Yazdani), S . ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ- (Journal of the American College Cardiology) 3 0、1 2 8 4 ~ 1 2 8 7 頁、1 9 9 7 ; モンタレスコット(Montalescot), G . ら、サーキュレーション(Circulation) 9 8、2 9 4 ~ 2 9 9 頁)。

【 0 1 2 4 】

v W F の血漿濃度は、内皮細胞損傷または血小板活性化と関連している事象に連動して上昇する場合がある。v W F は血流中に高濃度で存在し、活性化の際に血小板および内皮細胞から放出される。v W F は血小板活性化、具体的には、血小板活性化および血管傷害部位への接着に有利に働く状態のマーカーとして最大の有用性を有する可能性がある。V W F のコンホメーションもまた、部分狭窄した血管と関連しているような高せん断応力によって変更されることがわかっている。血液が狭窄した管を流れる時に、罹患していない個体の循環中で出会うものよりも相当に高いせん断応力を受ける。

【 0 1 2 5 】

組織因子(T F)は、脳、腎臓および心臓において、転写制御された方法で血管周囲の細胞および単球上に発現される、4 5 k D a の細胞表面タンパク質である。T F は、 $C a^{2+}$ イオンの存在下で第VII a 因子と複合体を形成し、膜結合型である場合に生理学的に活性である。この複合体は第X 因子をタンパク質分解的に切断して第X a 因子を形成する。通常、血流から隔離されている。組織因子は血流中では、第VII a 因子と結合している可溶性型、または第VII a 因子との複合体および第X a 因子も含み得る組織因子経路インヒビターで検出され得る。T F はまた、マクロファージの表面で発現され、これはアテローム斑ではよく見られる。T F の正常な血清濃度は、 $< 0.2 \text{ ng/ml}$ (4.5 pM) である。血漿T F 濃度は、虚血性心疾患の患者では上昇している(ファルチアニ(Falciani), M . ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosis and Haemostasis) 7 9、4 9 5 ~ 4 9 9 頁、1 9 9 8)。T F は、不安定狭心症および急性心筋梗塞の患者では上昇するが、安定狭心症の患者では上昇しない(ファルチアニ(Falciani), M . ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosis and Haemostasis) 7 9、4 9 5 ~ 4 9 9 頁、1 9 9 8 ; スエフジ(Suefuji), H . ら、アメリカン・ハート・ジャーナル(American Heart Journal) 1 3 4、2 5 3 ~ 2 5 9 頁、1 9 9 7 ; ミスミ(Misumi), K . ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジ- (American Journal of Cardiology) 8 1、2 2 ~ 2 6 頁、1 9 9 8)。さらに、マクロファージ上でのT F 発現およびアテローム斑におけるT F 活性は、安定狭心症よりも不安定狭心症においてより多く見られる(ソエジマ, H . ら、サーキュレーション(Circulation) 9 9、2 9 0 8 ~ 2 9 1 3 頁、1 9 9 9 ; カイキタ(Kaikita), K . ら、アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジ- (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology) 1 7、2 2 3 2 ~ 2 2 3 7 頁、1 9 9 7 ; アルディッシノ(Ardissino), D . ら、ランセット(Lancet) 3 4 9、7 6 9 ~ 7 7 1 頁、1 9 9 7)。

【 0 1 2 6 】

安定狭心症対不安定狭心症における血漿T F 濃度の差は、統計的に有意でない場合がある。T F の血清濃度の上昇は、外因経路による血液凝固活性化を引き起こす、または外因経路による血液凝固活性化の結果であるいずれの状態とも関連している。これらの状態としては、くも膜下出血、播種性血管内凝固、腎不全、脈管炎および鎌形赤血球病(ヒラシマ, Y . ら、ストローク(Stroke) 2 8、1 6 6 6 ~ 1 6 7 0 頁、1 9 9 7 ; タカハシ, H . ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・ヘマトロジ- (American Journal of Hematology) 4 6、3 3 3 ~ 3 3 7 頁、1 9 9 4 ; コヤマ, T . ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジ- (British Journal Haematology) 8 7、3 4 3 ~ 3 4 7 頁、1 9 9 4)。T F は、血管傷害が血管外細胞傷害と一体となった場合にはすぐに放出される。虚血性心疾患患者におけるT F レベルは、発症の2 日以内に 800 pg/ml を超える場合もある(ファルチアニ(Falciani), M . ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosi

10

20

30

40

50

s and Haemostasis) 79、495～499頁、1998。TFレベルは、慢性期と比較して、急性心筋梗塞の慢性期において低下した(スエフジ(Suefuji), H.ら、アメリカン・ハート・ジャーナル(American Heart Journal) 134、253～259頁、1997)。TFは、外因性血液凝固経路の活性化および全身性凝固性亢進状態の存在の特異的マーカーである。粥腫崩壊に起因する血管傷害の高感度マーカーであり得る。

【0127】

血液凝固カスケードは、外因経路または内因経路のいずれかによって活性化され得る。これらの酵素経路は、1つの最終共通経路を共有する。共通経路の第1のステップは、第Xa因子/第Va因子プロトロンビナーゼ複合体によってプロトロンピンをタンパク質分解切断して活性トロンピンが生じることを含む。トロンピンは、フィブリノゲンをタンパク質分解的に切断するセリンプロテアーゼである。トロンピンはまず、フィブリノゲンから線維素ペプチドAを除去し、その結果、desAAフィブリンモノマーが生じ、これはすべてのその他のフィブリノゲン由来タンパク質、例えば、フィブリン分解産物、フィブリノゲン分解産物、desAAフィブリンおよびフィブリノゲンと複合体を形成できる。desAAフィブリンモノマーは、通常、可溶性フィブリンと呼ばれるが、これは、フィブリノゲン切断の第1の産物であるが、まだ第XIIIa因子を介して不溶性フィブリン血餅中に架橋されていないためである。desAAフィブリンモノマーはまた、トロンピンによるさらなるタンパク質分解切断を受けて線維素ペプチドBを除去することができ、その結果、desAABBフィブリンモノマーが生じる。このモノマーはその他のdesAABBフィブリンモノマーと重合して、可溶性フィブリンまたは血栓前駆体タンパク質(TpP(商標))とも呼ばれる、可溶性desAABBフィブリンポリマーを形成することができる。TpP(商標)は、不溶性フィブリンの直接前駆体であり、これは「メッシュ様」構造を形成して新規に形成される血栓に構造的硬直性を提供する。この関連では、血漿中TpP(商標)の測定は活性血餅形成の直接測定である。

【0128】

TpP(商標)の正常な血漿濃度は、 $< 6 \text{ ng/ml}$ (ラウリーノ(Laurino), J. P.ら、アナルズ・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス(Annals Clinical Laboratory Science) 27、338～345頁、1997)。アメリカン・バイオジェネティック・サイエンスズ(American Biogenetic Sciences)がTpP(商標)のアッセイを開発し(米国特許第5453359号および同5843690号)、そのTpP(商標)アッセイは急性心筋梗塞の初期診断、胸痛患者における急性心筋梗塞の排除および急性心筋梗塞に進行する不安定狭心症の患者の同定において役立つと記載している。その他の研究により、急性心筋梗塞の患者では、ほとんどの場合発症の6時間以内にTpP(商標)が上昇することが確認されている(ラウリーノ(Laurino), J. P.ら、アナルズ・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス(Annals Clinical Laboratory Science) 27、338～345頁、1997; カービル(Carville), D. G.ら、クリニカル・ケミストリー(Clinical Chemistry) 42、1537～1541頁、1996)。TpP(商標)の血漿濃度はまた、不安定狭心症の患者でも上昇しているが、これらの上昇は狭心症の重篤度および結果として起こる急性心筋梗塞への進行を示すものであり得る(ラウリーノ(Laurino), J. P.ら、アナルズ・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス(Annals Clinical Laboratory Science) 27、338～345頁、1997)。血漿中TpP(商標)の濃度は、理論上は、血液凝固活性化を引き起こすか、血液凝固活性化の結果であるいずれの状態、例えば、播種性血管内凝固、深部静脈血栓症、鬱血性心不全、手術、癌、胃腸炎およびコカイン過剰摂取の際にも上昇する(ラウリーノ(Laurino), J. P.ら、アナルズ・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス(Annals Clinical Laboratory Science) 27、338～345頁、1997)。TpP(商標)は、トロンピン活性化の直後に血流中に放出される。TpP(商標)は、血流中では短い半減期を有する可能性が高いが、これはTpP(商標)が血餅形成部位で不溶性フィブリンに迅速に変換されるからである。血漿TpP(商標)濃度は、急性心筋梗塞発症の3時間以内にピークに達し、発症から12時間後に正常に戻る。TpP(商標)の血漿濃度は、CVDでは

10

20

30

40

50

30 ng/ml を超える場合もある (ラウリーノ (Laurino), J. P. ら、アナルズ・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス (Annals Clinical Laboratory Science) 27、338~345 頁、1997)。TpP (商標) は、血液凝固活性化の高感度で特異的なマーカーである。TpP (商標) は急性心筋梗塞の診断において有用であるが、心臓組織傷害の特異的なマーカーと併用される場合のみであるということが実証されている。

【0129】

(iii) 急性期反応と関連している例示的なマーカー

ヒト好中球エラスターゼ (HNE) は、通常、好中球のアズール顆粒内に含まれる 30 kDa のセリンプロテアーゼである。HNE は、好中球活性化の際に放出され、その活性は循環 1 - プロテアーゼ阻害剤によって調節される。活性化された好中球は、アテローム斑ではよく見られ、これらの粥腫の崩壊は HNE の放出をもたらす。血漿 HNE 濃度は、通常、HNE - α_1 - PI 複合体を検出することによって測定される。これらの複合体の正常な濃度は、50 ng/ml であり、これは HNE について約 25 ng/ml (0.8 nM) という正常な濃度を示す。HNE 放出はまた、血漿中の線維素ペプチド B₃₀₋₄₃、特異的な HNE 由来線維素ペプチドの特異的な検出によっても測定できる。血漿 HNE は冠動脈狭窄の患者では上昇しており、その上昇は、単一粥腫を有する患者よりも複合粥腫を有する患者で高い (コーサー (Kosar), F. ら、アンギオロジー (Angiology) 49、193~201 頁、1998; アマロ (Amaro), A. ら、ヨーロピアン・ハート・ジャーナル (European Heart Journal) 16、615~622 頁、1995)。血漿 HNE は、安定狭心症の患者では大幅には上昇していないが、不安定狭心症および急性心筋梗塞の患者では上昇していることが、線維素ペプチド B₃₀₋₄₃ の測定によって調べられ、不安定狭心症における濃度は、急性心筋梗塞と関連している濃度よりも 2.5 倍高い (ダイナーマン (Dinerman), J. L. ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジー (Journal of the American College Cardiology) 15、1559~1563 頁、1990; メータ (Mehta), J. ら、サーキュレーション (Circulation) 79、549~556 頁、1989)。血清 HNE は、心臓手術、運動誘導性筋肉損傷、巨細胞性動脈炎、急性呼吸窮迫症候群、虫垂炎、膵炎、敗血症、喫煙関連肺気腫および嚢胞性繊維症で上昇している (ゲネロー (Genereau), T. ら、ジャーナル・オブ・リウマトロジー (Journal of Rheumatology) 25、710~713 頁、1998; モーゼル (Mooser), V. ら、アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology) 19、1060~1065 頁、1999; グレソン (Gleeson), M. ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・アプライド・フィジオロジー・アンド・オキュペイショナル・フィジオロジー (European Journal of Applied Physiology and occupational physiology) 77、543~546 頁、1998; ガンド (Gando), S. ら、ジャーナル・オブ・トラウマ (Journal of Trauma) 42、1068~1072 頁、1997; エリクソン (Eriksson), S. ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・サージェリー (European Journal of Surgery) 161、901~905 頁、1995; リラス (Liras), G. ら、レビスタ・エスパノラ・デ・エンフェルメダデス・ダイジェスティバス (Revista Espanola de Enfermedades Digestivas) 87、641~652 頁、1995; エンドー, S. ら、ジャーナル・オブ・インフラメーション (Journal of Inflammation) 45、136~142 頁、1995; ジャノフ (Janoff), A.、アニュアル・レビュー・オブ・メディシン (Annual Review of Medicine) 36、207~216 頁、1985)。HNE はまた、血液凝固の際にも放出され得る (プラウ (Plow), E. F. およびプレシア (Plescia), J.、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thrombosis and Haemostasis) 59、360~363 頁、1988; プラウ (Plow), E. F.、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation) 69、564~572 頁、1982)。HNE の血清上昇はまた、好中球補充および活性化を含む、いずれかの非特異的な感染または炎症状態と関連している場合がある。活性化された好中球がアテローム斑中に存在するので、粥腫崩壊の際に放出される可能性が最も高い。HNE は、 α_1 - PI と複合体を形成した後、恐らく肝臓によって除去される。

10

20

30

40

50

【0130】

誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は、上皮細胞マクロファージ中の 130 kDa の細胞質タンパク質であり、その発現はサイトカイン、例えば、インターフェロン- γ 、インターロイキン-1、インターロイキン-6 および腫瘍壊死因子 およびリポ多糖類によって調節される。iNOS は、L-アルギニンからの一酸化窒素 (NO) の合成を触媒し、その誘導は NO の持続的な多量の産生をもたらす。NO は抗菌活性を有し、種々の生理学的小および炎症事象のメディエーターである。iNOS による NO 産生は、構成的に発現される NOS によって産生される量より約 100 倍多い (デプレ (DePre), C. ら、カルディオバスキュラー・リサーチ (Cardiovascular Research) 41、465 ~ 472 頁、1999)。ACS と関連している、血漿 iNOS 濃度変化についての公開された研究はない。iNOS は、冠動脈アテローム斑において発現され、NO とスーパーオキシドの産物であり、血小板接着および凝集を増強する、ペルオキシナイトレートの生成によって粥腫安定性を干渉し得る (デプレ (DePre), C. ら、カルディオバスキュラー・リサーチ (Cardiovascular Research) 41、465 ~ 472 頁、1999)。心筋虚血の際に iNOS 発現は上昇しない場合があり、このことは、iNOS は急性心筋梗塞と狭心症の識別において有用であり得るということを示唆する (ハンマーマン (Hammerman), S. I. ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (American Journal of Physiology) 277、1579 ~ H1592 頁、1999; ケイ (Kaye), D. M. ら、ライフ・サイエンス (Life Science) 62、883 ~ 887 頁、1998)。血漿 iNOS 濃度の上昇は、硬変、鉄欠乏症貧血またはマクロファージ活性化をもたらすいずれかのその他の状態、例えば、細菌感染と関連している場合がある (ヒメネス (Jimenez), W. ら、ヘパトロジー (Hepatology) 30、670 ~ 676 頁、1999; ニー (Ni), Z. ら、キドニー・インターナショナル (Kidney International) 52、195 ~ 201 頁、1997)。iNOS は、アテローム斑崩壊の結果として血流中放出され得るが、血流中の iNOS の増加した量の存在は、粥腫崩壊が起こったということだけでなく、血小板接着を促進するために理想的環境が作られたということも示し得る。しかし、iNOS はアテローム斑崩壊に特異的ではなく、その発現は非特異的炎症状態の際に誘導され得る。

10

20

【0131】

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、ホスホグリセリドおよびトリアシルグリセロールの合成において形成されるリゾリン脂質中間体である。低密度リポタンパク質 (LDL) の軽度の酸化の際に、アシル-補酵素 A によって、グリセロール-3リン酸のアシル化によって形成される。LPA は、血管作動特性を有する脂質セカンドメッセンジャーであり、血小板アクチベーターとして機能し得る。LPA は、動脈硬化病変、特に、最も崩壊しやすい芯中の成分である (シース (Siess), W.、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 96、6931 ~ 6936 頁、1999)。正常な血漿 LPA 濃度は、540 nM である。血清 LPA は、腎不全および卵巣癌およびその他の婦人科癌で上昇している (ササガワ, T. ら、ジャーナル・オブ・ニュートリショナル・サイエンス・アンド・ビタミンロジー (東京) (Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo) 44、809 ~ 818 頁、1998; スー (Xu), Y. ら、JAMA 280、719 ~ 723 頁、1998)。LPA は、不安定狭心症の関連では、粥腫崩壊の直接結果として放出される可能性が最も高い。血漿 LPA 濃度は、婦人科癌の患者では 60 μ M を超える場合もある (スー (Xu), Y. ら、JAMA 280、719 ~ 723 頁、1998)。血清 LPA は、アテローム斑崩壊の有用なマーカーであり得る。

30

40

【0132】

マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質 (MDA 修飾 LDL) は、ホスホリパーゼ活性、プロスタグランジン合成または血小板活性化の結果として、LDL のアポ B-100 部分の酸化の際に形成される。MDA 修飾 LDL は酸化 LDL と識別できるが、これは、LDL の MDA 修飾が脂質過酸化の不在下で起こるからである (ホルボエット (Holvo

50

et), P., アクタ・カルディオロジカ(Acta Cardiologica) 53, 253~260頁, 1998)。MDA修飾LDLの正常な血漿濃度は、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満(約 $10\mu\text{M}$)である。酸化LDLの血漿濃度は安定狭心症、不安定狭心症および急性心筋梗塞では上昇し、これは、酸化LDLがアテローム性動脈硬化症のマーカーであり得るということを示す(ホルボエット(Holvoet), P., アクタ・カルディオロジカ(Acta Cardiologica) 53, 253~260頁, 1998); ホルボエット(Holvoet), P.ら、サーキュレーション(Circulation) 98, 1487~1494頁, 1998)。血漿MDA修飾LDLは、安定狭心症では上昇しないが、不安定狭心症および急性心筋梗塞では大幅に上昇する(ホルボエット(Holvoet), P., アクタ・カルディオロジカ(Acta Cardiologica) 53, 253~260頁, 1998; ホルボエット(Holvoet), P.ら、サーキュレーション(Circulation) 98, 1487~1494頁, 1998; ホルボエット(Holvoet), P.ら、JAMA 281, 1718~1721頁, 1999)。血漿MDA修飾LDLは、サラセミアの個体では、また腎臓移植患者では上昇している(リブレーア(Livrea), M.A.ら、ブラッド(Blood) 92, 3936~3942頁, 1998; ガーネム(Ghanem), H.ら、キドニー・インターナショナル(Kidney International) 49, 488~493頁, 1996; パン・デン・ドーペル(van den Dorpel), M.A.ら、トランスプラント・インターナショナル(Transplant International) 9付録1, S54~S57頁, 1996)。さらに、血清MDA修飾LDLは低酸素症の際に上昇する場合がある(パラゴパラクリシュナ(Balagopalakrishna), C.ら、アドバンセズ・イン・エクスペリメンタル・メディシン・アンド・バイオロジー(Advances in Experimental Medicine and Biology) 411, 337~345頁, 1997)。MDA修飾LDLの血漿濃度は、胸痛の発症から6~8時間以内に上昇する。MDA修飾LDLの血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者では $20\mu\text{g}/\text{ml}$ (約 $50\mu\text{M}$)に、また不安定狭心症の患者では $15\mu\text{g}/\text{ml}$ (約 $40\mu\text{M}$)に達する場合がある(ホルボエット(Holvoet), P.ら、サーキュレーション(Circulation) 98, 1487~1494頁, 1998)。血漿MDA修飾LDLは、マウスでは5分未満という半減期を有する(リング(Ling), W.ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(Journal of Clinical Investigation) 100, 244~252頁, 1997)。MDA修飾LDLは、急性冠動脈症状ではアテローム斑崩壊の特異的マーカーであると思われる。しかし、MDA修飾LDLの血漿濃度の上昇が、粥腫崩壊または血小板活性化の結果であるかどうかは明らかではない。最も妥当な説明は、増加した量のMDA修飾LDLの存在は両事象を示すということである。MDA修飾LDLは、不安定狭心症および急性心筋梗塞と安定狭心症を識別するのに有用であり得る。

【0133】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MMP-1)は、コラゲナーゼ-1とも呼ばれ、I型コラーゲンを主に切断するが、II型、III型、VII型およびX型コラーゲンも切断できる、 $41/44\text{kDa}$ の亜鉛およびカルシウム結合性プロテイナーゼである。活性 $41/44\text{kDa}$ 酵素は、自己融解を受けて、依然として活性の $22/27\text{kDa}$ 型となり得る。MMP-1は、平滑筋細胞、肥満細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、Tリンパ球および内皮細胞をはじめとする種々の細胞によって合成される(ジョンソン(Johnson), J.L.ら、アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology) 18, 1707~1715頁, 1998)。MMP-1は、その他のMMPと同様に、傷害後または脈管間細胞遊走の際に起こり得る、細胞外マトリックスリモデリングに関与している。MMP-1は、遊離型またはTIMP-1、その天然阻害剤との複合体のいずれかで、血流中に見出され得る。MMP-1は、通常、血漿中では $<25\text{ng}/\text{ml}$ という濃度で見られる。MMP-1は、最も崩壊しやすく、アテローム斑不安定化に関与している可能性がある肩領域のアテローム斑中に見られる(ジョンソン(Johnson), J.L.ら、アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology) 18, 1707~1715頁, 1998)。さらに、MMP-

1 は、心筋再灌流傷害の病因に結びつけられている(シバタ, M. ら、アンジオロジー(Angiology) 50、573~582頁、1999)。血清 MMP-1 は、肥満細胞脱顆粒を誘導する炎症状態において上昇する場合がある。血清 MMP-1 濃度は、関節炎および全身性紅斑性狼瘡の患者で上昇している(ケイザー(Keyszer), G. ら、ゼイツクリフト・フュール・リウマトロジー(Zeitschrift für Rheumatologie) 57、392~398頁、1998; ケイザー(Keyszer), G. ジャーナル・オブ・リウマトロジー(Journal of Rheumatology) 26、251~258頁、1999)。血清 MMP-1 はまた、前立腺癌の患者でも上昇し、上昇度は腫瘍の転移能に対応している(ベイカー(Baker), T. ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー(British Journal of Cancer) 70、506~512頁、1994)。MMP-1 の血清濃度はまた、その他の種類の癌の患者でも上昇する場合がある。血清 MMP-1 は、ヘモクロマトーシスの患者では、また、慢性ウイルス性肝炎の患者では低下し、それでは、濃度は重篤度に対して反比例する(ジョージ(George), D. K. ら、ガット(Gut) 42、715~720頁、1998; ムラワキ, Y. ら、ジャーナル・オブ・ガストロエンテロロジー・アンド・ヘパトロジー(Journal of Gastroenterology and Hepatology) 14、138~145頁、1999)。血清 MMP-1 は、急性心筋梗塞後の最初の4日は低下し、その後増加し、急性心筋梗塞の発症後2週間でピークレベルに達した(ジョージ(George), D. K. ら、ガット(Gut) 42、715~720頁、1998)。

【0134】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-2 (MMP-2) は、ゼラチナーゼ A と呼ばれ、不活性の72 kDa の前駆体として合成される、66 kDa の亜鉛およびカルシウム結合性プロテアーゼである。成熟 MMP-3 は、I 型ゼラチンおよび IV、V、VII および X 型のコラーゲンを切断する。MMP-2 は、血管平滑筋細胞、肥満細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、T リンパ球および内皮細胞をはじめとする種々の細胞によって合成される(ジョンソン(Johnson), J. L. ら、アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology) 18、1707~1715頁、1998)。MMP-2 は、通常、血漿中で TIMP-2、その生理学的レギュレーターとの複合体で見られる(ムラワキ, Y. ら、ジャーナル・オブ・ヘパトロジー(Journal of Hepatology) 30、1090~1098頁、1999)。MMP-2 の正常な血漿濃度は、 $< 約 550 \text{ ng/ml} (8 \text{ nM})$ である。MMP-2 発現は、動脈硬化病変内の血管平滑筋細胞で上昇しており、粥腫不安定性の場合には血流中に放出され得る(カイ(Kai), H. ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジー(Journal of the American College Cardiology) 32、368~372頁、1998)。さらに、MMP-2 は、粥腫不安定性および崩壊の寄与体として意味づけられている(シャー(Shah), P. K. ら、サーキュレーション(Circulation) 92、1565~1569頁、1995)。血清 MMP-2 濃度は、安定狭心症、不安定狭心症および急性心筋梗塞の患者で上昇し、上昇は安定狭心症においてよりも不安定狭心症および急性心筋梗塞において有意に大きかった(カイ(Kai), H. ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジー(Journal of the American College Cardiology) 32、368~372頁、1998)。トレッドミル運動試験後の安定狭心症の個体では血清 MMP-2 濃度の変化はなかった(カイ(Kai), H. ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジー(Journal of the American College Cardiology) 32、368~372頁、1998)。血清および血漿 MMP-2 は、胃癌、肝細胞癌、肝硬変、尿路上皮癌、関節リウマチおよび肺癌の患者で上昇している(ムラワキ, Y. ら、ジャーナル・オブ・ヘパトロジー(Journal of Hepatology) 30、1090~1098頁、1999); エンドー, K. ら、アンチキャンサー・リサーチ(Anticancer Research) 17、2253~2258頁、1997; ゴージ(Gohji), K. ら、キャンサー(Cancer) 78、2379~2387頁、1996; グルバー(Gruber), B. L. ら、クリニカル・イムノロジー・アンド・イムノパソロジー(Clinical Immunology and Immunopathology) 78、161~171頁、1996; ガルピサ(Garbis), S.

10

20

30

40

50

ら、*Cancer Research* 52、4548~4549頁、1992)。さらに、MMP-2はまた、血小板凝集の際に血小板細胞質から細胞外間隙へ移動され得る(Sawicki, G.ら、*Thrombosis and Hemostasis* 80:836~839頁、1998)。MMP-2は、不安定狭心症および急性心筋梗塞の個体の血清では入院時は上昇しており、最大レベルは約 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ (25 nM)に達した(Kai, H.ら、*Journal of the American College Cardiology* 32、368~372頁、1998)。血清MMP-2濃度は、不安定狭心症および急性心筋梗塞双方の発症後1~3日でピークに達し、1週間後に正常に戻り始めた(Kai, H.ら、*Journal of the American College Cardiology* 32、368~372頁、1998)。

10

【0135】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-3(MMP-3)は、ストロメライシン(生体内物質)-1とも呼ばれ、不活性の 60 kDa の前駆体として合成される、 45 kDa の亜鉛およびカルシウム結合性プロテアーゼである。成熟MMP-3は、プロテオグリカン、フィブリネクチン、ラミニンおよびIV型コラーゲンを切断するが、I型コラーゲンは切断しない。MMP-3は平滑筋細胞、肥満細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、Tリンパ球および内皮細胞をはじめとする種々の細胞によって合成される(Johnson, J. L.ら、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18、1707~1715頁、1998)。MMP-3は、その他のMMPと同様に、傷害後または脈管間細胞遊走の際に起こり得る、細胞外マトリックスリモデリングに関与している。MMP-3は、通常、血漿中では $< 125 \text{ ng}/\text{mL}$ という濃度で見られる。血清MMP-3濃度はまた、年齢とともに上昇することがわかっており、濃度は男性では、女性においてよりも約2倍高い(Manicourt, D. H.ら、*Arthritis Rheumatism* 37、1774~1783頁、1994)。MMP-3は、最も崩壊しやすく、アテローム斑不安定化に関与している可能性がある肩領域のアテローム斑中に見られる(Johnson, J. L.ら、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18、1707~1715頁、1998)。したがって、MMP-3濃度は、不安定狭心症では、アテローム斑崩壊の結果として上昇している可能性がある。血清MMP-3は、肥満細胞脱顆粒を誘導する炎症状態において上昇する場合がある。血清MMP-3濃度は、関節炎および全身性紅斑性狼瘡の患者では上昇している(Zucker, S.ら、*Journal of Rheumatology* 26、78~80頁、1999; Keyszer, G.ら、*Zeitschrift für Rheumatologie* 57、392~398頁、1998; Keyszer, G.ら、*Journal of Rheumatology* 26、251~258頁、1999)。血清MMP-3はまた、前立腺癌および尿路上皮癌の患者、また糸球体腎炎の患者でも上昇している(Lein, M.ら、*Urology* A 37、377~381頁、1998; Gohji, K.ら、*Cancer* 78、2379~2387頁、1996; Akiyama, K.ら、*Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 95、115~128頁、1997)。MMP-3の血清濃度はまた、その他の種類の癌の患者でも上昇する場合がある。血清MMP-3は、ヘモクロマトーシスの患者では低下する(George, D. K.ら、*Gut* 42、715~720頁、1998)。

20

30

40

【0136】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)は、ゼラチナーゼBとも呼ばれ、不活性の 92 kDa の前駆体として合成される、 84 kDa の亜鉛およびカルシウム結合性プロテアーゼである。成熟MMP-9は、IおよびV型ゼラチン、およびIVおよびV

50

型コラーゲンを切断する。MMP-9は、モノマー、ホモ二量体および25kDaの₂-ミクログロブリン関連タンパク質を含むヘテロ二量体として存在する(トリーベル(Triebel), S.ら、FEB Sレターズ(Letters)314、386~388頁、1992)。MMP-9は、種々の細胞種によって、最も顕著には好中球によって合成される。MMP-9の正常な血漿濃度は、 $< 35 \text{ ng/ml}$ (400 pM)である。MMP-9発現は、動脈硬化病変内の血管平滑筋細胞において上昇しており、粥腫不安定性の場合には血流中に放出され得る(カイ(Kai), H.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ(Journal of the American College Cardiology)32、368~372頁、1998)。さらに、MMP-9は、ACSの発生において病原性役割を有している可能性がある(ブラウン(Brown), D.L.ら、サーキュレーション(Circulation)91、2125~2131頁、1995)。血漿MMP-9濃度は、不安定狭心症および急性心筋梗塞の患者では大幅に上昇するが、安定狭心症の患者ではそうではない(カイ(Kai), H.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ(Journal of the American College Cardiology)32、368~372頁、1998)。急性心筋梗塞の患者における上昇はまた、それらの個体が不安定狭心症を患っていたことも示し得る。MMP-9の血漿濃度の上昇はまた、急性心筋梗塞においてよりも不安定狭心症においてより大きいものであり得る。トレッドミル運動試験後の安定狭心症の個体では、血漿MMP-9レベルには有意な変化はなかった(カイ(Kai), H.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ(Journal of the American College Cardiology)32、368~372頁、1998)。血漿MMP-9は、関節リウマチ、敗血性ショック、巨細胞性動脈炎および種々の癌の個体で上昇している(グルバー(Gruber), B.L.ら、クリニカル・イムノロジー・アンド・イムノパソロジー(Clinical Immunology and Immunopathology)78、161~171頁、1996; ナカムラ, T.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・ザ・メディカル・サイエンスズ(American Journal of the Medical Sciences)316、355~360頁、1998; ブランカート(Blankaert), D.ら、ジャーナル・オブ・アクワイアード・イミュン・デフィシエンシー・シンドロームズ・アンド・ヒューマン・レトロウイルス学(Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology)18、203~209頁、1998; エンドー, K.ら、アンチキャンサー・リサーチ(Anticancer Research)17、2253~2258頁、1997; ハヤサカ, A.ら、ヘマトロジー(Hematology)24、1058~1062頁、1996; ムーア(Moore), D.H.ら、ジネコロジー・オンコロジー(Gynecology Oncology)65、78~82頁、1997; ソルビ(Sorbi), D.ら、アースレイティス・リウマチズム(Arthritis Rheumatism)39、1747~1753頁、1996; イイザサ(Iizasa), T.ら、クリニカル・キャンサー・リサーチ(Clinical Cancer Research)5、149~153頁、1999)。さらに、血漿MMP-9濃度は卒中および脳出血において上昇する場合がある(マンブライス(Mun-Bryce), S.およびローゼンバーグ(Rosenberg), G.A., ジャーナル・オブ・セレブラル・ブラッド・フロー・アンド・メタボリズム(Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism)18、1163~1172頁、1998; ロマニック(Romanic), A.M.ら、ストローク(Stroke)29、1020~1030頁、1998; ローゼンバーグ(Rosenberg), G.A., ジャーナル・オブ・ニューロトラウマ(Journal of Neurotrauma)12、833~842頁、1995)。MMP-9は、不安定狭心症および急性心筋梗塞の個体の血清では、入院時に上昇し、最大レベルは 150 ng/ml (1.7 nM)に達した(カイ(Kai), H.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ(Journal of the American College Cardiology)32、368~372頁、1998)。血清MMP-9濃度は、不安定狭心症の患者では、入院時に最高であり、濃度は治療後に徐々に低下し、発症後1週間より長い間でベースラインに達した(カイ(Kai), H.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジ(Journal of the American College Cardiology)32、368~372頁、1998)。

【0137】

10

20

30

40

50

マトリックスメタロプロテイナーゼとその阻害剤の間の平衡は、腫瘍浸潤および転移に影響を及ぼす重要な要素である。TIMPファミリーは、メタロプロテイナーゼを阻害する、一群の小さな(21~28 kDa)関連タンパク質である。メタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤(TIMP1)は、正常に発達しているヒトの骨における骨モデリングおよびリモデリングの調節に関与し、浸潤性の表現型の急性骨髄性白血病に関与すると報告されており、このことは、多型X染色体不活性化を実証する。TIMP1は、mmp-1、mmp-2、mmp-3、mmp-7、mmp-8、mmp-9、mmp-10、mmp-11、mmp-12、mmp-13およびmmp-16に作用することがわかっている。メタロプロテイナーゼ2の組織阻害剤(TIMP2)は、メタロプロテイナーゼ(例えば、コラゲナーゼ)と複合体を形成し、それらを不可逆的に不活化する。TIMP2は、mmp-1、mmp-2、mmp-3、mmp-7、mmp-8、mmp-9、mmp-10、mmp-13、mmp-14、mmp-15、mmp-16およびmmp-19に作用することがわかっている。2つの代替スプライシングされた型がSYN4と関連している可能性があり、浸潤性の表現型の急性骨髄性白血病に関与している。いくつかのその他のTIMP遺伝子ファミリーメンバーの誘導可能な発現とは異なり、この遺伝子の発現は大部分が構成的である。メタロプロテイナーゼ3の組織阻害剤(TIMP3)は、マトリックスメタロプロテイナーゼ活性をアンタゴナイズし、腫瘍増殖、脈管形成、浸潤および転移を抑制できる。TIMP-3の喪失は腫瘍発生の獲得と関連している。

10

【0138】

インター-インヒビター(I-I)ファミリーは、4種の血漿タンパク質を包含する(遊離ピクニン、I-I(またはインター-トリプシンインヒビター)、プレ-インヒビター(P-I)およびインター-様インヒビター(I-L1)。最後の3種のタンパク質は各々、1つのピクニン鎖と、H1、H2およびH3と表される1以上の独特の重(H)鎖からなる別個の組み立てである。3種のH鎖およびピクニン鎖は、4種の別個のmRNAによってコードされている。これらの分子および鎖、ならびに、対応するmRNAが、軽度または重篤な急性感染を患うか、患っていない患者の血清において定量化されている。急性炎症では、H2およびピクニン鎖がダウンレギュレートされ、関連分子(I-IおよびI-LI)は負の急性期タンパク質として挙動するのに対し、H3鎖はアップレギュレートされ、対応するP-I分子は正の急性期タンパク質であると報告されている。H1遺伝子は炎症状態によって影響を受けないようである。例えば、サリエ(Salier)ら、バイオケミカル・ジャーナル(Biochemical Journal)315、1~9頁、1996参照、また、国際公開番号WO01/63280も参照のこと。

20

30

【0139】

(iv) 炎症と関連している例示的マーカー

肺サーファクタントタンパク質D(SP-D)は、呼吸上皮によって合成され、肺の気腔中に分泌される43 kDaのタンパク質である。SP-Dは、肺胞レベルでは、肺胞II型細胞によって構成的に合成され、分泌される。SP-D、コラーゲン性カルシウム依存性レクチン(またはコレクチン)は、多種多様な微生物によって発現される表面複合糖質と、また種々の複合有機抗原の表面と結合しているオリゴ糖と結合する。SP-Dはまた、複合糖質ならびにマクロファージ、好中球およびリンパ球の表面に発現されるその他の分子と特異的に相互作用する。さらに、SP-Dは、インビトロで特定のサーファクタントと関連する脂質と結合し、ホスファチジルイノシトールを含む脂質混合物の組織化に影響を及ぼし得る。SP-D-欠乏トランスジェニックマウスはサーファクタント脂質の異常な蓄積を示し、呼吸器系ウイルスおよび細菌リポ多糖でのチャレンジに対して異常に反応するという知見は、これらの多様なインビトロ活性と一致している。SP-D欠乏マウスの肺から単離されたマクロファージの表現型は変更しており、異常なオキシダント代謝および/またはメタロプロテイナーゼ発現の増加が肺気腫の発生に寄与するという状況証拠がある。SP-Dの発現は、多数の形の肺傷害に応じて増加し、適当にオリゴマー形成されたSP-Dの不十分な蓄積が、種々のヒト肺疾患の病因の一因となっている可能性

40

50

がある。例えば、クラウチ(Crouch)、レスピラトリー・リサーチ(Respirory Research) 1、93～108頁(2000)参照のこと。

【0140】

インターロイキン(IL)は、サイトカインとして知られる、大きな一群のポリペプチドの一部である。これらは、免疫系の種々の細胞間にシグナルを伝達するメッセンジャー分子である。それらは大部分はマクロファージおよびリンパ球によって分泌され、その産生は傷害または感染に応じて誘導される。それらの作用は、免疫系のその他の細胞、ならびに肝臓および脳をはじめとするその他の組織および臓器に影響を及ぼす。少なくとも18種のILが記載されている。本発明においてマーカーとして用いるには、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-18、IL-22、IL-23およびIL-25が好ましい。以下の表は、代表的なインターロイキンの選択された機能を示す。

10

【0141】

【表1】

表1 代表的なインターロイキンの選択された機能*

機能	IL-1	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10
免疫応答を増強する	+	+	+	+	-	+
免疫応答を抑制する	-	-	-	-	-	+
炎症を増強する	+	+	+	+	+	-
炎症を抑制する	-	-	-	-	-	+
細胞増殖を促進する	+	+	-	-	-	-
走化作用(ケモカイン)	-	-	-	-	+	-
発熱性	+	-	-	-	-	-

20

【0142】

インターロイキン-1(IL-1)は、急性期反応に関与し、多数の疾患の病原性媒介物質である、17kDaの分泌炎症誘発性サイトカインである。IL-1は、通常、マクロファージおよび上皮細胞によって産生される。IL-1はまた、アポトーシスを受けている細胞からも放出される。IL-1の正常な血清濃度は、 $< 30 \text{ pg/ml}$ (1.8 pM)である。理論上は、IL-1は、不安定狭心症および急性心筋梗塞では、その他の急性期タンパク質、例えば、CRPよりもより早く上昇するが、これはIL-1が急性期反応における早期参加者であるためである。さらに、IL-1はアポトーシスを受けている細胞からも放出されるが、これは虚血の初期に活性化され得る。この関連では、ACSと関連している血漿IL-1濃度の上昇には、高感度アッセイを用いるさらなる研究が必要である。血漿IL-1濃度の上昇は、炎症誘発性状態、例えば、外傷および感染における急性期反応の活性化と関連している。IL-1は、5分とそれに続く4時間という二相性の生理学的半減期を有する(クドー(Kudo), S.ら、Cancer Research) 50、5751～5755頁、1990)。IL-1は、炎症反応またはアポトーシスの活性化の際に細胞外環境中に放出される。

30

40

【0143】

インターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL-1ra)は、主に肝細胞、上皮細胞、単球、マクロファージおよび好中球において発現される、IL-1ファミリーの17kDaのメンバーである。IL-1raは、代替スプライシングによって生成される細胞内型および細胞外型の両方を有する。IL-1raは、生理学的IL-1活性の調節に関与していると考えられている。IL-1raは、IL-1様生理学的活性を有さないが、T細胞および線維芽細胞上のIL-1受容体と、IL-1およびIL-1の結合を遮

50

断する、およびその生物活性を阻害する I L - 1 のものと同様の親和性で結合できる (ストックマン(Stockman), B. J. ら、バイオケミストリー(Biochemistry) 31、5237~5245頁、1992; アイゼンバーグ(Eisenberg), S. P. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 88、5232~5236頁、1991; カーター(Carter), D. B. ら、ネイチャー 344、633~638頁、1990)。I L - 1 r a は、通常、血漿中に I L - 1 よりも高濃度で存在し、I L - 1 r a レベルは、疾患重篤度と、I L - 1 よりも良好に相関している示唆されている(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 99、2079~2084頁、1999)。さらに、I L - 1 r a は急性期タンパク質であるという証拠がある(ギャビー(Gabay), C. ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(Journal of Clinical Investigation) 99、2930~2940頁、1997)。I L - 1 r a の正常な血漿濃度は < 200 pg/ml (12 pM) である。I L - 1 r a の血漿濃度は、急性心筋梗塞および急性心筋梗塞、死亡または治療抵抗性狭心症に進行する不安定狭心症の患者で上昇している(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 99、2079~2084頁、1999; ラチニ(Latini), R. ら、ジャーナル・オブ・カルディオバスキュラー・ファルマコロジー(Journal of Cardiovascular Pharmacology) 23、1~6頁、1994)。さらに、I L - 1 r a は、重篤な急性心筋梗塞では、無併発性急性心筋梗塞と比較して大幅に上昇していた(ラチニ(Latini), R. ら、ジャーナル・オブ・カルディオバスキュラー・ファルマコロジー(Journal of Cardiovascular Pharmacology) 23、1~6頁、1994)。I L - 1 r a の血漿濃度の上昇は、炎症または急性期反応の活性化を含むいずれかの状態、例えば、感染、外傷および関節炎と関連している。I L - 1 r a は、炎症誘発性状態において血流中に放出され、急性期反応への関与として放出される場合もある。血流からの I L - 1 r a のクリアランスの主要な供給源は、腎臓および肝臓であると思われる(キム(Kim), D. C. ら、ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス(Journal of Pharmaceutical Sciences) 84、575~580頁、1995)。I L - 1 r a 濃度は、不安定狭心症の個体の血漿において、発症の24時間以内に上昇し、これらの上昇は、発症の2時間以内には明らかであり得た(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 99、2079~2084頁、1999)。不安定狭心症の重篤な進行を示す患者では、I L - 1 r a の血漿濃度は、入院時のレベルよりも発症後48時間で高かったが、無事な進行を示す患者ではこの濃度は低下した(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 99、2079~2084頁、1999)。さらに、不安定狭心症と関連している I L - 1 r a の血漿濃度は、1.4 ng/ml (80 pM) に達する場合がある。I L - 1 r a の血漿濃度の変化は、疾患重篤度と関連しているようである。さらに、炎症誘発性状態では、I L - 1 放出とともに、またはその直後に放出される可能性が高く、I L - 1 よりも高濃度で見られる。このことは、I L - 1 r a は、I L - 6 の産生を誘発する I L - 1 活性の有用な間接マーカーであり得るということを示す。

【0144】

インターロイキン - 6 (I L - 6) は、ヘマトポエチンファミリー炎症誘発性サイトカインである、20 kDa の分泌タンパク質である。I L - 6 は急性期反応物であり、種々のタンパク質、例えば、接着分子の合成を刺激する。その主要な機能は、肝タンパク質の急性期産生を媒介することであり、その合成はサイトカイン I L - 1 によって誘導される。I L - 6 は、通常、マクロファージおよびTリンパ球によって産生される。I L - 6 の正常な血清濃度は、< 3 pg/ml (0.15 pM) である。I L - 6 の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の患者では上昇し、急性心筋梗塞において、より高い程度まで上昇している(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 94、874~877頁、1996; マンテン(Manten), A. ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 40、389~395頁、1998; (ピア

10

20

30

40

50

スチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 99、2079~2084頁、1999)。IL-6は、安定狭心症の患者の血漿中では有意には上昇しない(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 94、874~877頁、1996; マンテン(Manten), A. ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 40、389~395頁、1998)。さらに、IL-6濃度は、重篤な進行を示す不安定狭心症の患者の血漿中では、発症から48時間にわたって増加するが、無事な進行を示すものでは低下する(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 99、2079~2084頁、1999)。このことは、IL-6は疾患進行の有用な指標であり得るということを示す。IL-6の血漿上昇は、いずれかの非特異的炎症誘発性状態、例えば、外傷、感染または急性期反応を誘発するその他の疾患と関連している。IL-6は、血流において4.2時間という半減期を有し、急性心筋梗塞および不安定狭心症後に上昇する(マンテン(Manten), A. ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 40、389~395頁、1998)。IL-6の血漿濃度は、急性心筋梗塞発症の8~12時間以内に上昇し、100 pg/mlに達し得る。IL-6の血漿濃度は、不安定狭心症の患者では、おそらくは、発作の重篤度のために発症の72時間後にピークレベルに上昇した(ピアスチー(Biasucci), L. M. ら、サーキュレーション(Circulation) 94、874~877頁、1996)。

10

【0145】

インターロイキン-8(IL-8)は、単球、内皮細胞、肺胞マクロファージおよび線維芽細胞によって産生される6.5 kDaのケモカインである。IL-8は、好中球およびT細胞の走化性および活性化を誘導する。既知のIL-8関連分子としては、IL-8₆₋₇₇、IL-8₇₋₇₇、IL-8₈₋₇₇およびIL-8₉₋₇₇が挙げられる。

20

【0146】

インターロイキン10(「IL-10」)は、4つの α -ヘリックス束ファミリーのサイトカインのメンバーである、160アミノ酸(18.5 kDaの予測質量)のサイトカインである。溶液中では、IL-10は、39 kDaという見かけの分子量を有するホモ二量体を形成する。ヒトIL-10遺伝子は染色体1上に位置している。ビエラ(Viera)ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 88、1172~76頁(1991); キム(Kim)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology) 148、3618~23頁(1992)。IL-10の過剰産生は、敗血症におけるマーカーとして同定されており、重篤度および死亡の予測となる。ゴゴス(Gogos)ら、ジャーナル・オブ・インフェクシャス・ディジーズ(Journal of Infectious Diseases) 181、176~80頁(2000)。

30

【0147】

インターロイキンの他にも、「小さな誘導可能サイトカイン」ファミリーの多数の分子、例えば、CXCL6(ヒト: スイスプロット(Swiss-Prot) P80162)、CXCL13(ヒト: スイスプロット(Swiss-Prot) O43927)、CXCL16(ヒト: スイスプロット(Swiss-Prot) Q9H2A7)、CCL8(ヒト: スイスプロット(Swiss-Prot) P80075)、CCL20(ヒト: スイスプロット(Swiss-Prot) P78556)、CCL23(ヒト: スイスプロット(Swiss-Prot) P55773)およびCCL26(ヒト: スイスプロット(Swiss-Prot) Q9Y258)が存在する。

40

【0148】

腫瘍壊死因子(TNF)は、急性期反応に関与し、多数の疾患の病原性媒介物質である、17 kDaの分泌炎症誘発性サイトカインである。TNFは、通常、マクロファージおよびナチュラルキラー細胞によって産生される。TNFは、位置73および172でグリコシル化された185アミノ酸のタンパク質である。212アミノ酸の前駆体タンパク質として合成される。単球は、分子量21.5~28 kDaである少なくとも5種

50

の異なる分子の形のTNFを発現する。それらは主に翻訳後変更、例えば、グリコシル化およびリン酸化によって異なっている。TNFの正常な血清濃度は、 $< 40 \text{ pg/ml}$ (2 pM)である。TNFの血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者では上昇しており、不安定狭心症の患者ではわずかに上昇している(リー(Li), D.ら、アメリカン・ハート・ジャーナル(American Heart Journal) 137、1145~1152頁、1999;スクアドリト(Squadrito), F.ら、インフラメーション・リサーチ(Inflammation Research) 45、14~19頁、1996;ラチニ(Latini), R.ら、ジャーナル・オブ・カルディオバスキュラー・ファルマコロジー(Journal of Cardiovascular Pharmacology) 23、1~6頁、1994;カールステット(Carlstedt), F.ら、ジャーナル・オブ・インターン・メディシン(Journal of Internal Medicine) 242、361~365頁、1997)。

TNFの血漿濃度の上昇は、いずれかの炎症誘発性状態、例えば、外傷、卒中および感染と関連している。TNFは、血流において約1時間という半減期を有し、このことは、TNFは症状発症の直後に循環から除去される可能性があるということを示す。急性心筋梗塞の患者では、TNFは胸痛の発症の4時間後に上昇し、発症の48時間以内に正常なレベルまで徐々に低下した(リー(Li), D.ら、アメリカン・ハート・ジャーナル(American Heart Journal) 137、1145~1152頁、1999)。急性心筋梗塞患者の血漿中のTNFの濃度は、 300 pg/ml (15 pM)を超えた(スクアドリト(Squadrito), F.ら、インフラメーション・リサーチ(Inflammation Research) 45、14~19頁、1996)。

単球によるTNFの放出はまた、炭鉱労働者における塵肺症の進行とも関連している。スチン(Schins)およびボーム(Borm)、オキュペイショナル・アンド・エンバイロメント・メディシン(Occupational and Environmental Medicine) 52、441~50頁(1995)。

【0149】

可溶性細胞間接着分子(sICAM-1)は、CD54とも呼ばれ、白血球補充および遊走の際に、白血球の抗原提示細胞および内皮細胞との結合を促進する、 $85 \sim 110 \text{ kDa}$ の細胞表面結合型免疫グロブリン様インテグリンリガンドである。sICAM-1は、通常、血管内皮、造血幹細胞ならびに腸および表皮に見出され得る非造血幹細胞によって産生される。sICAM-1は、細胞死の際、またはタンパク質分解活性の結果として細胞表面から放出される場合もある。sICAM-1の正常な血漿濃度は、約 250 ng/ml (2.9 nM)である。sICAM-1の血漿濃度は急性心筋梗塞および不安定狭心症の患者では大幅に上昇するが、安定狭心症の患者ではそうではない(ペレガッタ(Pellegatta), F.ら、ジャーナル・オブ・カルディオバスキュラー・ファルマコロジー(Journal of Cardiovascular Pharmacology) 30、455~460頁、1997;ミワ(Miwa), K.ら、カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovascular Research) 36:37~44頁、1997;ガイザス(Ghaisas), N.K.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology) 80、617~619頁、1997;オガワ, H.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology) 83、38~42頁、1999)。さらに、ICAM-Iは、動脈硬化病変において、また病変形成しやすい領域において発現され、その結果、粥腫崩壊の際に血流中に放出され得る(イヤマ(Iiyama), K.ら、サーキュレーション・リサーチ(Circulation Research) 85、199~207頁、1999;テナグリア(Tenaglia), A.N.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology) 79、742~747頁、1997)。

sICAM-1の血漿濃度の上昇は、虚血性卒中、頭部外傷、アテローム性動脈硬化症、癌、子癇前症、多発性硬化症、嚢胞性繊維症およびその他の非特異的炎症状態と関連している(キム(Kim), J.S., ジャーナル・オブ・ニューロロジカル・サイエンスズ(Journal of Neurological Sciences) 137、69~78頁、1996;ラスコウィッツ(Laskowitz), D.T.ら、ジャーナル・オブ・ストローク・アンド・セレブロボスキュラー・ディジーゼス(Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases) 7、234~241頁、1998)。

sICAM-1の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の急性期の際に上昇する。血漿sICAM-1の

10

20

30

40

50

上昇は、急性心筋梗塞発症の9～12時間以内にそのピークに達し、24時間以内に正常レベルに戻る(ペレガッタ(Pellegatta), F.ら、ジャーナル・オブ・カルディオバスキュラー・ファルマコロジー(Journal of Cardiovascular Pharmacology) 30、455～460頁、1997)。s I C A Mの血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者では700 ng/ml(8 nM)に達する場合もある(ペレガッタ(Pellegatta), F.ら、ジャーナル・オブ・カルディオバスキュラー・ファルマコロジー(Journal of Cardiovascular Pharmacology) 30、455～460頁、1997)。s I C A M - 1は、急性心筋梗塞および不安定狭心症の個体の血漿において上昇しているが、それはこれらの疾患に特異的なものではない。しかし、血漿上昇は安定狭心症とは関連していないので、急性心筋梗塞および不安定狭心症を安定狭心症と識別するには有用なマーカーであり得る。驚くべきことに、I C A M - Iはアテローム斑中に存在し、粥腫崩壊の際に血流中に放出され得る。血液中に同様に存在し得るさらなるI C A M分子は当技術分野では周知であり、例えば、I C A M - 2(C D 1 0 2とも呼ばれる)およびI C A M - 3(C D 5 0とも呼ばれる)がある。

【0150】

T R E M - 1は、細菌に感染したヒト組織に浸潤する好中球および単球で高レベルで発現される活性化受容体である。微生物による敗血症の患者および実験的リポポリサッカライド(L P S)誘導性ショックを起こしたマウスの腹腔好中球でアップレギュレートされる。敗血症の診断マーカーであると示唆されている。例えば、ギボット(Gibot)ら、アナルズ・オブ・インターナル・メディシン(Annals of Internnal Medicine) 141、9～15頁、2004を参照。

【0151】

血管細胞接着分子(V C A M)は、C D 1 0 6とも呼ばれ、リンパ球補充の際のBリンパ球および発達中Tリンパ球の、抗原提示細胞との結合を促進する、100～110 k D aの細胞表面結合型免疫グロブリン様インテグリンリガンドである。V C A Mは、通常、血管およびリンパ管、心臓およびその他の体腔の内側を覆う内皮細胞によって産生される。V C A M - 1は、細胞死の際、またはタンパク質分解活性の結果として細胞表面から放出される場合もある。s V C A Mの正常な血清濃度は、約650 ng/ml(6.5 nM)である。s V C A M - 1の血漿濃度は、急性心筋梗塞、不安定狭心症および安定狭心症の患者でわずかに上昇している(マルビヒル(Mulvihill), N.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology) 83、1265～7頁、A 9、1999; ガイザス(Ghaisas), N. K.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー(American Journal of Cardiology) 80、617～619頁、1997)。しかし、s V C A M - 1は動脈硬化病変において発現され、その血漿濃度はアテローム性動脈硬化症の程度と相関している可能性がある(イヤマ(Iiyama), K.ら、サーキュレーション・リサーチ(Circulation Research) 85、199～207頁、1999; ピーター(Peter), K.ら、アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology) 17、505～512頁、1997)。s V C A M - 1の血漿濃度の上昇は、虚血性卒中、癌、糖尿病、子癇前症、血管傷害およびその他の非特異的炎症状態と関連している(ビットチ(Bitsch), A.ら、ストローク(Stroke) 29、2129～2135頁、1998; オーツキ(Otsuki), M.ら、ダイアベテス(Diabetes) 46、2096～2101頁、1997; バンクス(Banks), R. E.ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー(British Journal of Cancer) 68、122～124頁、1993; スтейナー(Steiner), M.ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosis and Haemostasis) 72、979～984頁、1994; オーストグレン(Austgulen), R.ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・オブステトリクス・ジネコロジー・アンド・レプロダクティブ・バイオロジー(European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology) 71、53～58頁、1997)。

【0152】

「プロリル特異的ジペプチジルペプチダーゼ」または「プロリル特異的D P P」とは、

10

20

30

40

50

基質ポリペプチドのN末端からジペプチドを切断するセリンプロテアーゼであり、第2位のプロリンに対する選択(すなわちNH₂-X-プロ-ペプチド-COOH、式中、Xはアミノ酸であり、プロと残りのペプチドの間の結合が切断される)を示すセリンプロテアーゼを指す。このようなプロテアーゼは、通常、E.C.3.4.14.X、例えば、E.C.3.4.14.5および3.4.14.11下に分類される。DPPは、DPP-IIおよびDPP-IVなどの種類に分類されることが多い。DPP-IVは、CD26とも呼ばれ、II型膜タンパク質であり、膜結合型同等物とは実質的に異なる可溶性型でも存在する。例えば、米国特許第6,265,551号参照のこと。

【0153】

単球走化性タンパク質-1(MCP-1)は、単球および好塩基球を誘引するが、好中球または好酸球は誘引しない、10kDaの走化性因子である。MCP-1は、通常、単量体型とホモ二量体型の間の平衡で見られ、通常、単球および血管内皮細胞によって産生され、分泌される(ヨシムラ(Yoshimura), T.ら、FEBSレターズ(Letters)244、487~493頁、1989;リー(Li), Y.S.ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオケミストリー(Molecular and Cellular Biochemistry)126、61~68頁、1993)。MCP-1は、乾癬、関節リウマチをはじめとする単球浸潤およびアテローム性動脈硬化症を含む種々の疾患の病因に結びつけられている。血漿中のMCP-1の正常な濃度は、 $< 0.1 \text{ ng/ml}$ である。MCP-1の血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者では上昇し、不安定狭心症の患者の血漿において上昇している場合もあるが、上昇は安定狭心症とは関連していない(ソエジマ, H.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジー(Journal of the American College Cardiology)34、983~988頁、1999;ニシヤマ, K.ら、ジャパニーズ・サーキュレーション・ジャーナル(Japanese Circulation Journal)62、710~712頁、1998;マツモリ, A.ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・セルラー・カルディオロジー(Journal of Molecular Cell Cardiology)29、419~423頁、1997)。驚くべきことに、MCP-1はまた、アテローム性動脈硬化症の際の動脈壁への単球の補充にも関与している可能性がある。MCP-1の血清濃度の上昇は、炎症を伴う種々の状態、例えば、アルコール性肝臓疾患、間質性肺疾患、敗血症および全身性紅斑性狼瘡と関連している(フィッシャー(Fisher), N.C.ら、ガット(Gut)45、416~420頁、1999;スガ(Suga), M.ら、ヨーロピアン・レスピラトリー・ジャーナル(European Respiratory Journal)14、376~382頁、1999;ボシンク(Bossink), A.W.ら、ブラッド(Blood)86、3841~3847頁、1995;カネコ, H.ら、ジャーナル・オブ・リウマトロジー(Journal of Rheumatology)26、568~573頁、1999)。MCP-1は、単球および内皮細胞の活性化の際に血流中に放出される。急性心筋梗塞の患者から得た血漿中のMCP-1の濃度は、 1 ng/ml (100 pM)に達し、1ヶ月間上昇したままである場合があると報告されている(ソエジマ, H.ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カルディオロジー(Journal of the American College Cardiology)34、983~988頁、1999)。MCP-1は、単球遊走を含む炎症誘発性状態の存在の特異的マーカーである。

【0154】

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、細胞性免疫、免疫調節および炎症に関与しているリンホカインである。グルコシルチコイドの抗炎症作用の抑制によって、宿主防御におけるマクロファージ機能の調節において役割を果たす。単球およびマクロファージは、エンドトキシン(リポ多糖類すなわちLPS)で、またはサイトカイン腫瘍壊死因子(TNF)およびインターフェロン-(IFN)で刺激した後のMIFの重要な供給源であると報告されている。MIFはまた、ある種の炎症誘発性作用を媒介することが記載されており、IFNと併用された場合に、マクロファージがTNFおよび一酸化窒素を産生するのを刺激する(8、9)。TNFおよびIL-1同様、MIFは内毒素血症に対する宿主応答において中心的な役割を果たす。組換えMIFとLPSの同時注入はLPS致死性を増悪させるが、中和抗MIF抗体はマウスをエンドトキシンショック

10

20

30

40

50

から十分に保護する。

【0155】

ヘモグロビン(Hb)は、赤血球中に見られる酸素運搬性鉄含有球状タンパク質である。2種のグロビンサブユニットのヘテロ二量体である。 $\alpha_2\beta_2$ は、胎児Hbと呼ばれ、 $\alpha_2\beta_2$ は成人HbAと呼ばれ、 $\alpha_2\beta_2\delta_2$ は成人HbA₂と呼ばれる。ヘモグロビンの90~95%はHbAであり、 $\alpha_2\beta_2$ グロビン鎖はすべてHb型、さらに鎌形細胞ヘモグロビンで見られる。Hbは、体中の細胞への酸素の運搬に関与している。Hb $\alpha_2\beta_2$ は通常、血清中では検出されない。

【0156】

ヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(hPDGS)は、 α -トレースとも呼ばれ、プロスタグランジンHからのプロスタグランジンD₂の形成を触媒する、30kDaの糖タンパク質である。明らかに健常な個体におけるhPDGS濃度の上限は、約420ng/mlであると報告されている(特許番号EP0999447A1)。不安定狭心症および脳梗塞の患者から得た血液中でhPDGSの上昇が同定されている(特許番号EP0999447A1)。さらに、hPDGSは虚血性エピソードの有用なマーカーであると思われ、hPDGSの濃度は、経皮経管冠動脈形成術(PTCA)後の狭心症の患者では経時的に低下することがわかり、このことは虚血が回復するにつれてhPDGS濃度が低下することを示唆する(特許番号EP0999447A1)。

10

【0157】

肥満細胞トリプターゼは、トリプターゼとしても知られ、肥満細胞中に存在する主要中性プロテアーゼである、275アミノ酸(30.7kDa)のタンパク質である。肥満細胞トリプターゼは肥満細胞活性化の特異的マーカーであり、喘息における、またさまざまなアレルゲンセットに対するアレルギー反応におけるアレルギー性気道炎症のマーカーである。例えば、タイラ(Taira)ら、ジャーナル・オブ・アゼマ(Journal of Asthma)39、315~22頁(2002);シュワルツ(Schwartz)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England Journal of Medicine)316、1622~26頁(1987)。事象後1~6時間の間の上昇した血清トリプターゼレベル(>1ng/ml)は、肥満細胞脱顆粒の特異的指標を提供する。

20

【0158】

好酸球カチオン性タンパク質(ECP)は、16~24kDaの分子量の異なるものを含み、pIがpH10.8である異種タンパク質である。ECPは高度に細胞傷害性であり、活性化好酸球によって放出される。ベンジ(Venge)、クリニカル・アンド・エクスペリメンタル・アレルギー(Clinical and experimental allergy)、23(付録2)3~7頁(1993)。喘息患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)中のECPの濃度は、その疾患の重篤度によって異なり、痰中のECP濃度も疾患の病態生理を反映することがわかっている。ブーケ(Bousquet)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England Journal of Medicine)323、1033~9頁(1990)。ビルコウ(Vircow)ら、アメリカン・レビュー・オブ・レスピラトリー・ディゼイズ(American Review of Respiratory Diseases)146、604~6頁(1992)。血清ECPの評価は気管支喘息における肺の炎症を反映すると考えられる。コラー(Koller)ら、アーカイブズ・オブ・ディゼイズ・イン・チャイルドフッド(Archives of Disease in Childhood)73、413~7頁(1995);ソークネス(Sorkness)ら、クリニカル・アンド・エクスペリメンタル・アレルギー(Clinical and Experimental Allergy)32、1355~59頁(2002);バドル・エルディン(Badr-elDin)ら、イースタン・メディテラネアン・ヘルス・ジャーナル(Eastern Mediterranean Health Journal)5、664~75頁(1999)も参照のこと。

30

40

【0159】

KL-6(MUC1とも呼ばれる)は、肺胞細胞上で発現される高分子量(>300kDa)粘液性糖タンパク質である。KL-6の血清レベルは、労作性呼吸困難を特徴とする間質性肺疾患において上昇していると報告されている。KL-6は種々の間質性肺疾患

50

、例えば、肺繊維症、間質性肺炎(interstitial pneumonia)、サルコイドーシスおよび間質性肺炎(interstitial pneumonitis)のマーカーであることがわかっている。例えば、コバヤシおよびキタムラ、チェスト(Chest) 108、311~15頁(1995)；コーノ(Kohno)、ジャーナル・オブ・メディカル・インベストイゲーション(Journal of Medical Investigation) 46、151~58頁(1999)；バンドー(Bandoh)ら、アナルズ・オブ・ザ・リウマチック・ディゼーズ(Annals of the Rheumatic Diseases) 59、257~62頁(2000)およびヤマネら、ジャーナル・オブ・リウマトロジー(Journal of Rheumatology) 27、930~4頁(2000)。

【0160】

(v) 神経組織傷害の例示的特異的マーカー

10

臓器機能不全が疾患の悪化または疾患末期の顕著な特徴であり得るので、組織傷害マーカー、例えば、心筋傷害、血管組織傷害、コラーゲン合成および分解、肺傷害および神経組織傷害のマーカーは、SIRS関連病と特に関連している可能性がある。以下は、神経組織傷害のマーカーの例示的一覧を提供する。その他の例示的組織傷害マーカーは本明細書に記載される。

【0161】

アデニレートキナーゼ(AK)は、ATPおよびAMPとADPの相互変換を触媒する、遍在する22kDaの細胞質酵素である。哺乳類組織では、アデニレートキナーゼの4種のイソ型が同定されている(ヨネダ, T.ら、ブレイン・リサーチ・モレキュラー・ブレイン・リサーチ(Brain Research, molecular Brain Research) 62、187~195頁、1998)。AK1イソ型は脳、骨格筋、心臓および大動脈において見られる。AKIの正常な血清質量濃度は現在わかっていないが、これは、総AK濃度を測定するためには、通常、機能的アッセイが用いられるためである。正常な血清AK濃度は、<5ユニット/リットルであり、AK上昇は、CSFを用いて行われている(ボーレンセン(Bollensen), E.ら、アクタ・ニューロチルルジカ・スカンジナビカ(Acta Neurochirurgica Scandinavica) 79、53~582頁、1989)。血清AK1は、脳傷害のマーカーとして、AKイソ型のうち最大の特異度を有すると思われる。AKは、脳虚血の脳脊髄液マーカーとして最適であり得、この場合にはその主要な供給源は神経組織である。

20

【0162】

ニューロトロフィンは、哺乳類神経系において発現される、増殖因子のファミリーである。いくつかの例として、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)およびニューロトロフィン-4/5(NT-4/5)が挙げられる。ニューロトロフィンは、主に、標的由来傍分泌または自己分泌神経栄養因子としてその作用を発揮する。ニューロンの生存、分化および維持におけるニューロトロフィンの役割はよく知られている。それらは一部重複するが、別個の発現パターンおよび細胞内標的を示す。ニューロトロフィンはまだ、中枢神経系における作用に加え、末梢の求心性および遠心性ニューロンにも影響を及ぼす。

30

【0163】

BDNFは、神経および/またはグリア細胞の増殖および生存性を支援する強力な神経栄養因子である。BDNFは、32kDaの前駆体「プロ-BDNF」分子として発現され、これが切断されて成熟BDNF型となる。モウラ(Mowla)ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 276、12660~6頁(2001)。ヒトBDNFの最も豊富な活性型は、2つの同一の119アミノ酸サブユニットによって形成される27kDaのホモ二量体であり、これは強力な疎水性相互作用によってまとまっている。しかし、プロ-BDNFもまた、細胞外に放出され、生物学的に活性である。BDNFは、CNS中に広く分布しており、広範な神経細胞、例えば、海馬の、小脳のおよび皮質のニューロンに対してインビトロ栄養作用を示す。インビボでは、BDNFは外傷性および中毒性脳傷害から神経細胞を救出することがわかっている。例えば、研究により、一時的な中大脳動脈閉塞後に、皮質のニューロンにおいてBDNF mRNAがアップレギュレートされるということが示されている(シャビッツ(Schab

40

50

iltz)ら、ジャーナル・オブ・セレブラル・ブラッド・フロー・アンド・メタボリズム(*Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*) 14、500～506頁、1997)。実験的に誘導された限局的な、片側性の脳血栓では、BDNF mRNAは、卒中後2～18時間増加した。このような結果は、BDNFは、限局的な脳虚血において神経保護的役割を果たす可能性があるということを示唆する。

【0164】

NT-3はまた、2つの119アミノ酸サブユニットからなる27kDaのホモ二量体である。一次皮質細胞培養物へのNT-3の添加は、酸素フリーラジカル機構を介する可能性がある、酸素-グルコース欠乏によって引き起こされる神経細胞死を悪化させることがわかっている(ベイツ(Bates)ら、ニューロバイオロジー・オブ・ディゼーズ(*Neurobiology of Disease*) 9、24～37頁、2002)。NT-3は、不活性のプロ-NT-3分子として発現され、これが切断されて成熟生物活性型となる。

【0165】

カルビンジン-Dは、細胞内カルシウムレベルを安定化することによって細胞性保護機能を果たし得る、28kDaの細胞質ビタミンD依存性Ca²⁺結合性タンパク質である。カルビンジン-Dは中枢神経系において、主にグリア細胞において、および遠位腎尿管の細胞において見られる(ハセガワ,S.ら、ジャーナル・オブ・ウロロジー(*Journal of Urology*) 149、1414～1418頁、1993)。カルビンジン-Dの正常な血清濃度は、<20pg/ml(0.7pM)である。血清カルビンジン-D濃度は、心停止後上昇すると報告されており、この上昇は脳虚血によるCNS損傷の結果であると考えられる(ウスイ(Usui), A.ら、ジャーナル・オブ・ニューロロジカル・サイエンス(*Journal of Neurological Sciences*) 123、134～139頁、1994)。血清カルビンジン-Dの上昇は、虚血後再灌流の直後に上昇し頭打ちになる。最大血清カルビンジン-D濃度は700pg/ml(25pM)ほど高いものであり得る。

【0166】

クレアチンキナーゼ(CK)は、ATPとクレアチンからのADPとホスホクレアチンの可逆的形成を触媒する細胞質酵素である。脳特異的CKイソ型(CK-BB)は、総CK活性の約95%を占める、85kDaの細胞質タンパク質である。心臓組織、腸、前立腺、直腸、胃、平滑筋、甲状腺子宮、膀胱および静脈においても相当な量で存在し得る(ジョンソン(Johnsson), P.J., カルディオソラック・アンド・バスキュラー・アナesthesia(*Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*) 10、120～126頁、1996)。CK-BBの正常な血清濃度は、<10ng/ml(120pM)である。血清CK-BBは、低酸素性および虚血性脳傷害後に上昇するが、特定の卒中の種類における血清上昇を同定するにはさらなる研究が必要である(ラスコウィッツ(Laskowitz), D.T.ら、ジャーナル・オブ・ストローク・アンド・セレブロボスキュラー・ディゼーズ(*Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*) 7、234～241頁、1998)。血清中のCK-BBの上昇は、血液脳関門の透過性の増大を伴う虚血による脳傷害に起因するものであり得る。CK-BBの血清濃度と損傷の程度(梗塞容積)または神経学的転帰の相関は確立されていない。CK-BBは、血清中で1～5時間という半減期を有し、通常、血清中では、<10ng/ml(120pM)という濃度で検出される。重篤な卒中では、CK-BBの血清濃度は上昇し、卒中の発症の直後(24時間以内)にピークに達し、3～7日後に徐々に正常に戻る(4)。頭部傷害を受けた個体における血清中のCK-BB濃度は、傷害の直後にピークに達し、傷害の重篤度に応じて傷害後3.5～12時間で正常に戻る(スコグセイド(Skogseid), I.M.ら、アクタ・ニューロチルルジカ(*Acta Neurochirurgica* (ウィーン)) 115、106～111頁、1992)。最大血清CK-BB濃度は、250ng/ml(3nM)を超える場合もある。CK-BBは脳虚血のCSFマーカーとして最適であり得、この場合にはその主要な供給源は神経組織である。CK-BBは頭部傷害後のCNS損傷の血清マーカーとしてより適している可能性があるが、これはこれらの個体では短時間上昇し、その除去は明らかに損傷の重篤度に応じているからである。

10

20

30

40

50

【0167】

グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) は、アストログリアフィラメントの主要な構成成分であり、星状細胞における主要な中間体フィラメントタンパク質である、55 kDa の細胞質タンパク質である。GFAP は星状細胞に特異的であり、CNS に局在する間質性細胞であり、血液脳関門近くに見られる場合もある。GFAP は、通常、血清では検出されない。血清 GFAP は虚血性卒中後上昇する (ニェブロ - ドボス (Niebroj-Dobosz)、I. ら、フォリア・ニューロパソロジカ (Folia Neuropathologica) 32、129 ~ 137 頁、1994)。卒中と関連している血清 GFAP 上昇を研究している現在の報告は非常に限られており、GFAP を、すべての卒中の種類の血清マーカーとして確立するにはさらに多くの研究が必要である。卒中マーカーとしての GFAP を研究するほとんどの研究は、脳脊髄液を用いて実施されてきた。血清中の GFAP の上昇は、血液脳関門の透過性の増大を伴う虚血による脳傷害に起因し得る。GFAP の血清濃度と損傷の程度 (梗塞容積) または神経学的転帰の相関は確立されていない。GFAP は CNS に影響を及ぼす種々の神経障害を有する個体の脳脊髄液において上昇しているが、GFAP の、卒中以外の疾患を有する個体の血清中への放出を説明する現在入手可能な報告はない (アルブレッチェン (Albrechtsen), M. およびボック (Bock), E. J., ニューロイムノロジー (Neuroimmunology)、8、301 ~ 309 頁、1985)。血清濃度 GFAP は、卒中発症の直後に上昇し、継続的に増加し、損傷の重篤度と相関し得る一定時間 (週) 持続するようである。GFAP は、重篤な CNS 傷害、具体的には、虚血または物理的損傷によって引き起こされた細胞死による星状細胞に対する傷害の極めて特異的なマーカーであると思われる。

10

20

【0168】

乳酸脱水素酵素 (LDH) は、遍在する 135 kDa の細胞質酵素である。NADH によるピルビン酸の乳酸への還元を触媒する、A および B 鎖からなる四量体である。哺乳類組織では、LDH の 5 種のイソ型が同定されており、組織特異的イソ型は、A および B 鎖の異なる組み合わせからできている。LDH の正常な血清質量濃度は現在わかっていないが、これは、総 LDH 濃度を測定するためには、通常、機能的アッセイが用いられるためである。正常な血清 LDH 濃度は、 < 600 ユニット / リットル (レイ (Ray), P. ら、キャンサー・ディテクション・アンド・プリベンション (Cancer Detection and Prevention) 22、293 ~ 304 頁、1998)。卒中との関連での LDH 上昇の研究のうち大多数は、脳脊髄液を用いて実施されており、上昇は傷害の重篤度と相関がある。虚血性および出血性卒中の双方に続く血清 LDH 活性の上昇が報告されているが、血清においては、この知見を確認し、傷害の重篤度および神経学的転帰との相関を調べるためにはさらなる研究が必要である (アガルワル (Aggarwal), S. P. ら、ジャーナル・オブ・ジ・インディアン・メディカル・アソシエーション (Journal of Indian Medical Association) 93、331 ~ 332 頁、1995; マイウリ (Maiuri), F. ら、ニューロロジカル・リサーチ (Neurological Research) 11、6 ~ 8 頁、1989)。LDH は、脳虚血の脳脊髄液マーカーとして最適であり得、この場合には主要な供給源は神経組織である。

30

【0169】

ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) は、ミエリン形成プロセスの際の軸索の周囲のミエリンコンパクションに関与している可能性が高い、単一の MBP 遺伝子の選択的スプライシングによって生じる、実際には 14 ~ 21 kDa の細胞質タンパク質のファミリーである。MBP は、CNS 中のオリゴデンドロサイトおよび末梢神経系 (PNS) のシュワン細胞に特異的である。CNS において総ミエリンタンパク質の約 30% を、PNS において総ミエリンタンパク質の約 10% を占める。MBP の正常な血清濃度は、 < 7 ng / ml (400 pM) である。血清 MBP は、すべての種類の重篤な卒中、具体的には、脳血栓、塞栓性卒中、脳内出血およびくも膜下出血後に上昇するが、ラクナ梗塞または一過性脳虚血発作を含む軽微 ~ 中程度の重篤度の卒中を有する個体の血清では、MBP 濃度の上昇は報告されていない (パルフレイマン (Palfreyman), J. W. ら、クリニカ・キミカ・アクタ (Clinica Chimica Acta) 92、403 ~ 409 頁、1979)。血清における

40

50

M B Pの上昇は、血液脳関門の透過性の増大を伴う物理的損傷または梗塞もしくは脳出血によって引き起こされる虚血による脳傷害に起因するものであり得る。M B Pの血清濃度は、損傷の程度(梗塞容積)と相関していると報告されており、また、神経学的転帰とも相関している可能性がある。ほとんどの研究は脳脊髄液を用いて実施されているので、卒中と関連している血清M B P上昇に関する入手可能な情報の量は限られている。M B Pは、血清では、通常、7 n g / m l (4 0 0 p M) という上限で検出され、重篤な卒中および脳傷害後に上昇する。血清M B Pは卒中発症の数時間内に上昇し、濃度は発症後2 ~ 5日以内に最大レベルに増加すると考えられている。血清濃度が、1 2 0 n g / m l (6 . 9 n M) を超える場合もあるその最大に達した後、正常濃度に徐々に低下するのに1週間より長くかかる場合もある。損傷の重篤度はM B Pの放出に対して直接的な効果を有するので、血清においてM B Pが上昇する時間の長さに影響を及ぼすことによって放出速度論に影響を及ぼす。M B Pは、傷害の重篤度が高まるにつれ、より長期間血清中に存在する。頭部傷害を有する患者の血清中へのM B Pの放出は、血清M B P濃度が頭部傷害を有する個体の神経学的転帰と相関していると報告されている点を除き、卒中について記載されるものと同様の速度論に従うと考えられる(トーマス(Thomas), D . G . ら、アクタ・ニューロチルルジカ・サプリメンタム(Acta Neurochirurgica Supplementum) (ウィーン) 28、93 ~ 95頁、1979)。頭蓋内腫瘍を有する患者の血清中へのM B Pの放出は、持続性であると考えられるが、研究がさらに必要である。最後に、血清M B P濃度は、脱髄疾患の個体において上昇することもあるが、決定的な研究は報告されていない。多発性硬化症の個体において報告されるように、M B Pは脳脊髄液において上昇することが多いが、血清における対応する上昇は存在しないことが多い(ジャック(Jacque), C . ら、アーカイブズ・オブ・ニューロロジー(Archives of Neurology) 39、557 ~ 560頁、1982)。これは、脳損傷は、血清M B P濃度の上昇をもたらす血液脳関門の透過性の増大を伴うはずであるということを示し得る。しかし、M B Pはまた頭蓋内腫瘍を有する個体の集団においても上昇し得る。卒中に対してこのマーカーを用いるアッセイの候補である個体の大きな集団中では、これらの個体の存在は稀である。それにもかかわらず、脳外科的処置を受けた個体または脱髄疾患の個体と組み合わせた、これらの個体は、脳傷害についてのM B Pの特異度を調べることにに対して影響を与える。さらに、血清M B Pは重篤な卒中のマーカーとして有用であり得、卒中療法および治療、例えば、t P A投与から利益を受けない個体を同定する可能性がある。

10

20

30

40

50

【0170】

神経細胞接着分子(N C A M)は、C D 5 6とも呼ばれ、神経系における神経細胞とグリア細胞の相互作用の維持に関与し、この場合には、星状細胞、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞、ニューロンおよび軸索の表面に発現される、170 k D aの細胞表面結合型免疫グロブリン様インテグリンリガンドである。N C A Mはまた、発達中の骨格筋筋管にも局在し、骨格筋におけるその発現は、発達、脱神経および再神経の際にアップレギュレートされる。N C A Mの正常な血清質量濃度は報告されていない。N C A Mは、機能性酵素イムノアッセイによって測定されることが多く、< 20 ユニット / m l という正常な血清濃度を有すると報告されている。卒中と特異的に関連する血清N C A M濃度の変化は、報告されていない。N C A Mは、脳虚血のC S Fマーカーとして最適であり得、この場合には主要な供給源は神経組織である。

【0171】

エノラーゼは、およびサブユニットから生成される、78 k D aのホモまたはヘテロ二量体細胞質タンパク質である。解糖系において2 - ホスホグリセリン酸およびホスホエノールピルビン酸の相互変換を触媒する。エノラーゼは、およびイソ型として存在し得る。サブユニットはグリア細胞およびほとんどのその他の組織において見られ、サブユニットは筋肉組織において見られ、サブユニットは、主に神経細胞および神経内分泌細胞において見られる(クイン(Quinn), G . B . ら、クリニカル・ケミストリー(Clinical Chemistry) 40、790 ~ 795頁、1994)。エノラーゼイソ型はニューロンに最も特異的であり、ニューロン特異的エノラーゼ(N S E

と呼ばれる。NSEは大部分はニューロンおよび神経内分泌細胞において見られるが、血小板および赤血球にも存在する。NSEの正常な血清濃度は $< 12.5 \text{ ng/ml}$ (160 pM)である。

【0172】

NSEは2つのサブユニットで構成されているので、NSE濃度を検出するために用いられる最も実現可能な免疫学的アッセイは、サブユニットの一方を対象とするものである。この場合には、サブユニットは理想的な選択である。しかし、サブユニット単独は、サブユニット単独の測定がおよびイソ型の双方を検出するので、脳組織に対して、イソ型と同程度には特異的ではない。この関連では、NSEの最良のイムノアッセイは、イソ型を特異的に検出できる2部位アッセイである。血清NSEは、起源は脳であり、個体に後日、より重篤な卒中を起こす傾向を与えられている、TIAを含むすべての種類の卒中の後に上昇すると報告されている(イスグロ(Isgro), F.ら、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・カルディオ・ソラシック・サージェリー(European Journal of Cardiothoracic Surgery) 11、640~644頁、1997)。血清中のNSEの上昇は、血液脳関門の透過性の増大を伴う物理的損傷または梗塞もしくは脳出血によって引き起こされる虚血による脳傷害に起因するものであり得、NSEの血清濃度は、損傷の程度(梗塞容積)および神経学的転帰と相関していると報告されている(マーテンス(Martens), P.ら、ストローク(Stroke) 29、2363~2366頁、1998)。さらに、血清NSE濃度の続発性の上昇は、脳血管攣縮に起因する遅延型ニューロン傷害の指標であり得る(ラスコウィッツ(Laskowitz), D. T.ら、ジャーナル・オブ・ストローク・アンド・セレブロボスキュラー・ディゼーズ(Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease) 7、234~241頁、1998)。NSEは48時間という生物学的半減期を有し、血清中では、通常、 12.5 ng/ml (160 pM)という上限で検出され、卒中および脳傷害後に上昇する。血清NSEは、卒中発症の4時間後に上昇し、濃度は発症後1~3日で最大に達する(ミスラー(Missler), U.ら、ストローク(Stroke) 28、1956~1960頁、1997)。血清濃度が、 300 ng/ml (3.9 nM)を超える場合もあるその最大に達した後に、約1週間かけて正常濃度に徐々に低下する。損傷の重篤度はNSEの放出に対して直接的な効果を有するので、血清においてNSEが上昇する時間の長さに影響を及ぼすことによって放出速度論に影響を及ぼす。NSEは、傷害の重篤度が高まるにつれ、より長期間血清中に存在する。

【0173】

頭部傷害を有する患者の血清中へのNSEの放出は、卒中についてわかっているものとは異なる速度論に従い、傷害後、最大血清濃度は1~6時間以内に到達され、24時間以内にベースラインに戻ることが多い(スコグセイド(Skogseid), I. M.ら、アクタ・ニューロチルルジカ(Acta Neurochirurgica (ウィーン)) 115、106~111頁、1992)。NSEは、脳傷害、具体的には、虚血または物理的損傷によって引き起こされる細胞死による神経細胞に対する傷害の特異的マーカーである。脳では、ニューロンはグリア細胞よりも約10倍少なく、その結果、血液脳関門の透過性の増大を伴う脳傷害は、ニューロンの相当な局所集団を有する領域において起こり、血清NSE濃度を大幅に増加するはずである。さらに、NSEの血清濃度の上昇はまた、AMIおよび心臓手術後の脳傷害と関連する合併症を示し得る。NSEの血清濃度の上昇は、損傷の重篤度および個体の神経学的転帰と相関している。NSEは、TIAを含むすべての種類の卒中のマーカーとして使用できる。

【0174】

プロテオリピドタンパク質(PLP)は、CNSミエリンの主要構成成分である、30 kDaの内在性膜タンパク質である。PLPはCNSにおいてオリゴデンドロサイトに特異的であり、中枢の鞘における総CNSミエリンタンパク質の約50%を占めるが、末梢神経系(PNS)ミエリンでは極めて低いレベルのPLPしか見られていない($< 1\%$)。PLPの正常な血清濃度は、 $< 9 \text{ ng/ml}$ (300 pM)である。血清PLPは脳梗塞後に上昇するが、一時的な虚血性発作後には上昇しない(トロッター(Trotter), J. L.

ら、アナルズ・オブ・ニューロロジー(Annals of Neurology) 14、554～558頁、1983)。卒中と関連している血清PLP上昇を研究する現在の報告は極めて限られている。血清におけるPLPの上昇は、血液脳関門の透過性の増大を伴う物理的損傷または梗塞もしくは脳出血によって引き起こされる虚血による脳傷害に起因するものであり得る。PLPの血清濃度と損傷の程度(梗塞容積)または神経学的転帰との相関は確立されていない。PLPの血清への放出およびその後の除去の速度論を調べる研究は報告されていないが、脳炎患者において60 ng/ml(2 nM)に達する最大濃度が報告されており、これは卒中後に見られる濃度のほぼ2倍である。PLPは重篤なCNS傷害、具体的には、オリゴデンドロサイトに対する傷害に極めて特異的なマーカーであると思われる。PLP血清上昇および卒中に関連する入手可能な情報は極めて限られている。PLPはまた、CNSに影響を及ぼす種々の神経障害を示す個体の血清においても上昇している。卒中に対するこのマーカーを用いるアッセイの候補である個体の大きな集団中では、これらの診断未確定の個体の存在は稀である。

【0175】

S-100は、およびサブユニットから生成される、21 kDaのホモまたはヘテロ二量体細胞質Ca²⁺結合性タンパク質である。Ca²⁺依存性シグナル変換経路に沿った細胞内プロセスの活性化に関与すると考えられている(ボンフレール(Bonfrer), J. M.ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー(British Journal of Cancer) 77、2210～2214頁、1998)。S-100a(β-イソ型)は横紋筋、心臓および腎臓において見られ、S-100b(γ-イソ型)はグリア細胞において見られるが、シュワン細胞では見られず、S-100c(α-イソ型)は、グリア細胞およびシュワン細胞において高濃度で見られ、ここでは主要な細胞質成分である。サブユニットは、正常な生理学的条件下では、神経系、主にCNSに特異的であり、実際、脳において見られる総S-100タンパク質の約96%を占める(ジェンセン(Jensen), R.ら、ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー(Journal of Neurochemistry) 45、700～705頁、1985)。さらに、S-100は神経内分泌起源の腫瘍、例えば、グリオーマ、メラノーマ、シュワン腫、神経線維腫および高度に分化した神経芽細胞腫、同様の神経節芽細胞腫および神経節腫において見られる場合がある(ペーソン(Persson), L.ら、ストローク(Stroke) 18、911～918頁、1987)。S-100の正常な血清濃度は、用いた免疫学的検出アッセイの検出限界である<0.2 ng/ml(19 pM)である。血清S-100は、TIAを含むすべての種類の卒中後上昇する。血清におけるS-100の上昇は、血液脳関門の透過性の増大を伴う物理的損傷または梗塞もしくは脳出血によって引き起こされる虚血による脳傷害に起因するものであり得、S-100bの血清濃度は損傷の程度(梗塞容積)および神経学的転帰と相関することがわかっている(マーテンス(Martens), P.ら、ストローク(Stroke) 29、2363～2366頁、1998; ミスラー(Missler), U.ら、ストローク(Stroke) 28、1956～1960頁、1997)。

【0176】

S-100bは、2時間という生物学的半減期を有し、血清では、通常、検出されないが、卒中および脳傷害後に上昇する。血清S-100bは卒中発症の4時間後に上昇し、濃度は発症後2～3日で最大に達する。血清濃度が、20 ng/ml(1.9 nM)に達する場合もあるその最大に達した後、約1週間かけて正常に徐々に低下する。損傷の重篤度はS-100bの放出に対して直接的な効果を有するので、血清においてS-100bが上昇する時間の長さに影響を及ぼすことによって放出速度論に影響を及ぼす。S-100bは傷害の重篤度が高まるにつれ、より長期間血清中に存在する。頭部傷害を有する患者の血清中へのS-100bの放出は、血清S-100bは発症の2.5時間以内に検出でき、最大血清濃度は発症後約1日で到達されるという点を除いて、卒中について報告されたものと幾分か同様の速度論に従う(ウエルトゲン(Woertgen), C.ら、アクタ・ニューロチルルジカ(Acta Neurochirurgica Supplementum) (ウィーン) 139、1161～1164頁、1997)。S-100は、脳傷害、具体的には、虚血または物理的損傷

10

20

30

40

50

によって引き起こされる細胞死によるグリア細胞の傷害の特異的マーカーである。脳では、グリア細胞はニューロンよりも約10倍多く、その結果、血液脳関門の透過性の増大を伴う脳傷害はいずれも、S-100の上昇を起こす可能性がある。さらに、S-100bの血清濃度の上昇は、AMIおよび心臓手術後の脳傷害と関連する合併症を示し得る。S-100bは正常な抗体では事実上検出できず、血清濃度の上昇は、損傷の重篤度および個体の神経学的転帰と相関している。S-100bは、TIAを含むすべての種類の卒中のマーカーとして使用できる。

【0177】

トロンボモジュリン(TM)は、血管内皮細胞の表面に見られる、70kDaの一本鎖内在性膜糖タンパク質である。TMはトロンビンの基質特異性を変更することによる抗凝固活性を示す。トロンピンとTM間の1:1化学量論複合体の形成は、トロンピン機能を凝血促進性から抗凝固性へ変更する。この変化は、トロンピンにプロテインC(第Va因子および第VIIIa因子の失活剤)を活性化させるが、フィブリノゲンは切断しないか、その他の血液凝固因子は活性化しないトロンピン基質特異性の変化によって促進される(デービー(Davie), E. W. ら、バイオケミストリー(Biochemistry) 30、10363~10370頁、1991)。TMの正常な血清濃度は、25~60ng/ml(350~850pM)である。虚血性卒中後の血清TM濃度変更を記載する現在の報告は入り混じっており、変化または有意な増加がないと報告している(セキ(Seki), Y. ら、ブラッド・コアギュレーション・フィブリノリシス(Blood Coagulation Fibrinolysis) 8、391~396頁、1997)。血清TM濃度上昇は内皮細胞傷害を反映し、血液凝固または繊維素溶解活性化を示さない。

【0178】

プロテインキナーゼCのイソ型(PKC γ)は、CNS組織に特異的であり、通常、循環には見られない。PKC γ は脳虚血の際に活性化され、虚血性ペナンプラ中に、対照組織中よりも2~24倍高いレベルで存在するが、梗塞組織では上昇しない(クルピンスキ(Krupinski), J. ら、アクタ・ニューロバイオロジエ・エクスペリメンタリス(Acta Neurobiologiae Experimentalis) 58、13~21頁、1998)。さらに、動物モデルによって、中大脳動脈閉塞後にラットの末梢循環において増加したレベルのPKC γ が同定された(コーネル-ベル(Cornell-Bell), A. ら、特許番号WO 01/16599 A1)。PKCのさらなるイソ型、IおよびIIは、脳虚血の患者から得た脳組織の梗塞コアにおいて増加したレベルで見出された(クルピンスキ(Krupinski), J. ら、アクタ・ニューロバイオロジエ・エクスペリメンタリス(Acta Neurobiologiae Experimentalis) 58、13~21頁、1998)。さらに、PKCのIおよびIIイソ型(それぞれ、PKCaおよびPKCd)は、出血についてのイヌモデルを用いても膜下出血後の血管攣縮の発生に結びつけられている。PKCd発現は、血管攣縮の初期段階の際に脳底動脈において大幅に上昇し、PKCaは、血管攣縮が進行するにつれ大幅に上昇した(ニシザワ, S. ら、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・ファルマコロジー(European Journal of Pharmacology) 398、113~119頁、2000)。したがって、脳損傷、虚血性ペナンプラの存在、ならびにくも膜下出血後の脳血管攣縮の発生および進行の同定にとって、PKCの種々のイソ型を、個別にか、またはそれらの種々の組み合わせのいずれかで、測定することは役に立ち得る。PKCイソ型、例えば、PKC γ と、PKCbI、PKCbIIのいずれかまたは両方の割合もまた、虚血性ペナンプラが不可逆的に損傷を受けた梗塞組織に変換される進行中の卒中の同定において役に立ち得る。この関連では、PKC γ を用いて、虚血性ペナンプラの存在および容積を同定でき、PKCbI、PKCbIIのいずれか、または両方を用いて、卒中の際に不可逆的に損傷を受けた組織の梗塞コアの存在および容積を同定できる。PKCd、PKCaおよびPKCdとPKCaの割合は、くも膜下出血後の脳血管攣縮の存在および進行の同定において有用であり得る。

【0179】

(vi) 組織傷害のその他の非特異的マーカー

ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)は、二量体タンパク質であり、その報告された活性

10

20

30

40

50

としては、内皮細胞増殖の刺激、脈管形成および毛細血管透過性が挙げられる。VEGFは種々の血管組織によって分泌される。酸素欠乏環境では、血管内皮細胞は損傷を受ける可能性があり、最終的に、生存できないこともある。しかし、このような内皮の損傷は、血管平滑筋細胞によるVEGF産生を刺激する。血管内皮細胞はVEGF、Bcl-2の発現によって媒介されると考えられる効果の存在下で生存の増加を示すことができる。VEGFは、VEGF(189)、VEGF(165)、VEGF(164)、VEGF B(155)、VEGF(148)、VEGF(145)およびVEGF(121)として知られる種々のスプライシング変異体として存在し得る。関連分子としては、プロキネチン(EG-VEGF)が挙げられる。

【0180】

インスリン様成長因子-1(IGF-1)は、発達の際に成長ホルモンの同化作用および身体因性の作用を媒介する、遍在する7.5kDaの分泌タンパク質である(1、2)。循環では、IGF-1は通常、IGF活性を調節するIGF-結合性タンパク質と結合している。IGF-1の正常な血清濃度は、約160ng/ml(21.3nM)である。血清IGF-1濃度は、虚血性卒中の個体では大幅に低下しており、低下の規模は傷害の重篤度と相関しているようであると報告されている(シュワブ(Schwab), S.ら、ストローク(Stroke)28、1744~1748頁、1997)。外傷および免疫系の広範な活性化を受けた個体においてIGF-1血清濃度の低下が報告されている。その遍在する発現のために、血清IGF-1濃度はまた脳虚血でない場合にも低下することがある。興味深いことに、IGF-1血清濃度は、虚血性卒中後に、梗塞領域においてその細胞内発現がアップレギュレートされているにもかかわらず低下する(リー(Lee), W.H.およびボンディー(Bondy), C、アナルズ・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンスズ(Annals of the New York Academy Sciences)679、418~422頁、1993)。血清濃度の低下は増殖因子の需要の増大または代謝クリアランス速度の増大を反映し得る。血清レベルは、卒中発症後24時間で大幅に低下し、10日間にわたって低下したままであった(シュワブ(Schwab), S.ら、ストローク(Stroke)28、1744~1748頁、1997)。血清IGF-1は、脳傷害の高感度の指標であり得る。しかし、IGF-1の遍在する発現パターンは、すべての組織はIGF-1の血清濃度に影響を及ぼす可能性があり、これは、IGF-1を卒中のマーカーとして用いるあらゆるアッセイの特異性を危険にさらすということを示す。この関連では、IGF-1は、脳虚血の脳脊髄液マーカーとして最適であり得、この場合には主要な供給源は神経組織である。

【0181】

接着分子は炎症反応に関与するが、発作の結果としてその発現レベルが変更されるので急性期反応物質としても考えることができる。このような接着分子の例として、E-セレクトリン、細胞間接着分子-1、血管細胞接着分子などが挙げられる。

【0182】

E-セレクトリンはELAM-1およびCD62Eとも呼ばれ、IL-1およびTNFに応じて内皮細胞上に発現され、好中球補充の際に好中球と内皮細胞の「ローリング」相互作用を媒介する、140kDaの細胞表面C型レクチンである。E-セレクトリンの正常な血清濃度は、約50ng/ml(2.9nM)である。卒中後の血清E-セレクトリン濃度の変化への研究は、入り混じった結果を報告している。ある研究は、虚血性卒中後の血清E-セレクトリン濃度の増大を報告するのに対し、変化しないと見るものもある(ビットチ(Bitsch), A.ら、ストローク(Stroke)29、2129~2135頁、1998;キム(Kim), J.S.、ジャーナル・オブ・ニューロロジカル・サイエンスズ(Journal of Neurological Sciences)137、69~78頁、1996;シュー(Shyu), K.G.ら、ジャーナル・オブ・ニューロロジー(Journal of Neurology)244、90~93頁、1997)。E-セレクトリン濃度はくも膜下出血の個体のCSFにおいて上昇しており、血管攣縮を予測できる(ポリン(Polin), R.S.ら、ジャーナル・オブ・ニューロサージェリー(Journal of Neurosurgery)89、559~567頁、1998)。E-セレクトリンの血清濃度の上昇は、免疫系活性化を示す。血清E-セレクトリン濃度は、アテローム性動脈硬化症

10

20

30

40

50

、種々の型の癌、子癩前症、糖尿病、嚢胞性繊維症、AMIおよびその他の非特異的炎症状態の個体では上昇している（ウォン(Hwang), S J.ら、サーキュレーション(Circulation) 96、4219~4225頁、1997；バンクス(Banks), R. E.ら、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー(British Journal of Cancer) 68、122~124頁、1993；オーストグレン(Austgulen), R.ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・オブステトリクス・ジネコロジー・アンド・レプロダクティブ・バイオロジー(European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology) 71、53~58頁、1997)；ステイナー(Steiner), M.ら、スロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thrombosis and Haemostasis) 72、979~984頁、1994；デ・ローズ(De Rose), V.ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・レスピラトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディシン(American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine) 157、1234~1239頁、1998)。E-セレクトインの血清濃度は虚血性卒中後に上昇している場合があるが、これらの変化が一時的であるか、現時点では同定されていない機構によって調節されているのかは明らかではない。血清E-セレクトインは内皮細胞傷害の特異的マーカーであり得る。しかし、炎症状態の発生を引き起こす種々の状態を示す個体の血清において上昇するので、卒中または脳傷害の特異的マーカーではない。さらに、血清E-セレクトイン濃度の上昇は、卒中と関連しているいくつかの危険因子と関連している。

10

【0183】

ヘッドアクチベーター(HA)は、視床下部および腸において見られる、11アミノ酸の、1.1kDaのニューロペプチドである。最初は淡水腔腸動物ヒドラにおいて見出され、ここでは頭部特異的成長および分化因子として作用する。ヒトでは、脳の発達の際の成長調節剤であると考えられている。正常な血清HA濃度は、 $< 0.1 \text{ ng/ml}$ (100 pM)である。血清HA濃度は、神経または神経内分泌起源の腫瘍を有する個体では一貫して上昇する(スカラー(Schaller), H. C.ら、ジャーナル・オブ・ニューロオンコロジー(Journal of Neurooncology) 6、251~258頁、1988；ウィニクス(Winnikes), M.ら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・キャンサー(European Journal of Cancer) 28、421~424頁、1992)。卒中と関連しているHA血清上昇に関する研究は報告されていない。HAは、神経または神経内分泌起源の腫瘍によって継続的に分泌されると推定され、血清濃度は腫瘍を除去した後に正常に戻る。血清HA濃度は、神経内
分泌由来腫瘍を有する個体では、 6.8 ng/ml (6.8 nM)を超える場合もある。卒中パネルとしてのHAの実用性は、神経または神経内分泌起源の腫瘍を有する個体を同定することである。これらの個体は、卒中と関連している脳傷害ではなく、癌の結果としての脳傷害と関連しているマーカーの血清上昇を有し得る。これらの個体は、脳傷害の迅速な診断から恩恵を受ける個体群の小さな小集合であり得るが、HAのマーカーとしての使用は、その同定に役立つ。最後に、アンジオテンシン変換酵素、血清酵素はHAを分解する能力を有し、血液サンプルはこの活性を阻害するための抗凝固剤としてEDTAを用いて採取しなくてはならない。

20

30

【0184】

糖化ヘモグロビンHbA1c測定は、長時間にわたって血糖が上昇し、そのように患者において糖尿病が制御される程度と関連していた程度の評価を提供する。グルコースはヘモグロビンAとゆっくりと結合し、A1cサブタイプを形成する。逆反応または分解は、比較的ゆっくりと進行し、その結果、いずれの集結もおよそ4週間持続する。正常な血糖レベルでは、糖化ヘモグロビンは4.5%~6.7%であると予想される。しかし、血糖濃度が上昇するにつれ、より多くの結合が生じる。糖化ヘモグロビン尺度が8.0%を超える場合には、長期にわたって血糖制御が悪いことが示唆される。

40

【0185】

(vii) アポトーシスと関連しているマーカー

カスパーゼ-3は、CPP-32、YAMAおよびアポパインとも呼ばれ、細胞アポトーシスの際に活性化される、インターロイキン-1変換酵素(ICE)様細胞内システ

50

インプロテアーゼである。カスパーゼ - 3 は、不活性の 32 kDa の前駆体として存在し、これが、アポトーシス誘導の際にタンパク質分解的に活性化されて 20 kDa と 11 kDa サブユニットのヘテロ二量体となる (フェマンデス - アルネミリ (Femandes-Alnemri), T. ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 269、30761 ~ 30764 頁、1994)。細胞基質としては、ポリ (ADP - リボース) ポリメラーゼ (PARP) およびステロール調節エレメント結合性タンパク質 (SRBP) が挙げられる (リユー (Liu), X. ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 271、13371 ~ 13376 頁、1996)。カスパーゼ - 3 の正常な血漿濃度はわかっていない。ACS と関連している、カスパーゼ - 3 の血漿濃度の変化についての公開された研究はない。虚血および低酸素症と関連している心筋細胞におけるアポトーシス誘導の仮説を支持する、漸増量の証拠がある (サラステ (Saraste), A., ヘルツ (Herz) 24、189 ~ 195 頁、1999; オーツカ, T. ら、コナリー・アーテリー・ディゼイズ (Coronary Artery Disease) 10、221 ~ 225 頁、1999; ジェームズ (James), T. N., コナリー・アーテリー・ディゼイズ (Coronary Artery Disease) 9、291 ~ 307 頁、1998; ビアリック (Bialik), S. ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation) 100、1363 ~ 1372 頁、1997; ロング (Long), X. ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation) 99、2635 ~ 2643 頁、1997)。血漿カスパーゼ - 3 濃度の上昇は、アポトーシスを含むいずれかの生理学的現象と関連している可能性がある。運動の間および後ならびに脳虚血において骨格筋においてアポトーシスが誘導されることを示唆する証拠がある (カラロ (Carraro), U. およびフランチェスキ (Franceschi), C., エージング (Aging) (ミラノ) 9、19 ~ 34 頁、1997; マクマナス (Mac Manus), J. P. ら、ジャーナル・オブ・セラブレラル・ブラッド・フロー・アンド・メタボリズム (Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism) 19、502 ~ 510 頁、1999)。

10

20

30

40

【0186】

カテプシン D (E. C. 3.4.23.5) は、可溶性リソソームアスパラギン酸プロテイナーゼである。プロカテプシン D として小胞体において合成される。プロカテプシン D は、マンノース - 6 - リン酸タグを有し、マンノース - 6 - リン酸受容体によって認識される。酸性リソソームに入る際に、一本鎖プロカテプシン D (52 kDa) が活性化されてカテプシン D となり、その後、成熟二本鎖カテプシン D となる (それぞれ、31 および 14 kDa)。プロカテプシン D のリソソームターゲティングに關与する 2 種のマンノース - 6 - リン酸受容体が、細胞内および外細胞膜上に発現される。正常な細胞内輸送にはグリコシル化が不可欠であると考えられている。カテプシン D の基本的な役割は、細胞内およびインターナライズされたタンパク質を分解することである。カテプシン D は、抗原プロセッシングおよびペプチドホルモンの酵素的生成に關与すると示唆されている。カテプシン D の組織特異的機能は、プロラクチンのプロセッシングと関係があるようである。ラット乳腺は、プロラクチンの生物学的に活性な断片の形成のためにこの酵素を用いる。カテプシン D は、多種多様な組織において、そのリモデリングまたは退化の際、およびアポトーシスにおいて機能的である。

【0187】

脳スペクトリン (ホドリンとも呼ばれる) は、カルシウム依存的にカルモジュリンと相互作用する、約 284 kDa の細胞骨格タンパク質である。脳スペクトリンは、赤血球スペクトリン同様、オリゴマー (詳しくは、二量体および三量体) を形成する。脳スペクトリンは、2 つの EF ハンドドメインと 23 スペクトリンリピートを含む。アポトーシス細胞死の際のスペクトリンのカスパーゼ 3 媒介性切断は、膜安定性の変更およびアポトーシス小体の形成において重要な役割を果たし得る。

【0188】

その他の好ましいマーカー

50

以下の表は、各マーカーが鑑別診断のための有用な情報を提供できる疾患または状態と関連している、さらなる好ましいマーカーの一覧を提供する。当業者には理解され、本明細書に記載されるように、マーカーは、パネル中のさらなるマーカーとともに考慮された場合に異なる状態を示し得る。あるいは、マーカーは、患者の全臨床状況において考慮された場合に異なる状態を示し得る。

【 0 1 8 9 】

【表 2 - 1】

マーカー	分類
ミオグロビン	組織傷害
E-セレクトイン	組織傷害
VEGF	組織傷害
EG-VEGF	組織傷害
トロポニン I および複合体	心筋傷害
トロポニン T および複合体	心筋傷害
アネキシン V	心筋傷害
B-エノラーゼ	心筋傷害
CK-MB	心筋傷害
グリコーゲンホスホリラーゼ-BB	心筋傷害
心臓型脂肪酸結合タンパク質	心筋傷害
ホスホグリセリン酸ムターゼ	心筋傷害
S-100a0	心筋傷害
ANP	血圧調節
CNP	血圧調節
キニノーゲン	血圧調節
CGRP II	血圧調節
ウロテンシン II	血圧調節
BNP	血圧調節
カルシトニン遺伝子関連ペプチド	血圧調節
Arg-バソプレッシン	血圧調節
エンドセリン-1 (および/またはビッグ ET-1)	血圧調節
エンドセリン-2 (および/またはビッグ ET-2)	血圧調節
エンドセリン-3 (および/またはビッグ ET-3)	血圧調節
プロカルシトニン	血圧調節
カルシフォシン	血圧調節
アドレノメデュリン	血圧調節
アルドステロン	血圧調節
アンギオテンシン 1	血圧調節
アンギオテンシン 2	血圧調節
アンギオテンシン 3	血圧調節
ブラジキニン	血圧調節
タキキニン-3	血圧調節
カルシトニン	血圧調節
エンドセリン-2	血圧調節
エンドセリン-3	血圧調節
レニン	血圧調節
ウロジラチン(Urodilatin)	血圧調節
グレリン	血圧調節
プラスミン	凝固および止血
トロンピン	凝固および止血
抗トロンピン III	凝固および止血
フィブリノゲン	凝固および止血
フォンウィルブランド因子	凝固および止血
D-二量体	凝固および止血
PAI-1	凝固および止血

10

20

30

40

【表 2 - 2】

プロテイン C	凝固および止血
可溶性内皮プロテイン C 受容体 (EPCR)	凝固および止血
TAFI	凝固および止血
フィブリノペプチド A	凝固および止血
プラスミン $\alpha 2$ 抗プラスミン複合体	凝固および止血
血小板因子 4	凝固および止血
血小板由来増殖因子	凝固および止血
P-セレクチン	凝固および止血
プロトロンビンフラグメント 1+2	凝固および止血
B-トロンボグロブリン	凝固および止血
トロンピン抗トロンピン III 複合体	凝固および止血
トロンボモジュリン	凝固および止血
血栓前駆体タンパク質	凝固および止血
組織因子	凝固および止血
組織因子経路インヒビター- α	凝固および止血
組織因子経路インヒビター- β	凝固および止血
塩基性カルポニン 1	血管組織
β 様 I インテグリン	血管組織
カルポニン	血管組織
CSRP2	血管組織
エラスチン	血管組織
内皮細胞選択的接着分子 (ESAM)	血管組織
フィブリリン 1	血管組織
接合部接着分子-2	血管組織
LTBP4	血管組織
平滑筋ミオシン	血管組織
トランスゲリン	血管組織
I 型プロコラーゲンのカルボキシ末端プロペプチド (PICP)	コラーゲン合成
コラーゲンカルボキシ末端テロペプチド (ICIP)	コラーゲン合成
APRIL (TNF リガンドスーパーファミリーメンバー13)	炎症
補体 C3a	炎症
CCL-5 (RANTES)	炎症
CCL-8 (MCP-2)	炎症
CCL-19 (マクロファージ炎症タンパク質-3 β)	炎症
CCL-20 (MIP-3 α)	炎症
CCL-23 (MIP-3)	炎症
CXCL-13 (小さな誘導可能サイトカイン B13)	炎症
CXCL-16 (小さな誘導可能サイトカイン B16)	炎症
グルタチオン S トランスフェラーゼ	炎症
HIF1ALPHA	炎症
IL-25	炎症
IL-23	炎症
IL-22	炎症
IL-18	炎症
IL-13	炎症
IL-12	炎症

10

20

30

40

【表 2 - 3】

IL-10	炎症
IL-1- β	炎症
Il-1ra	炎症
IL-4	炎症
IL-6	炎症
IL-8	炎症
リゾホスファチジン酸	炎症
MDA 修飾 LDL	炎症
ヒト好中球エラスターゼ	炎症
C 反応性タンパク質	炎症
インスリン様成長因子	炎症
誘導可能一酸化窒素合成酵素	炎症
細胞内接着分子	炎症
リポカリン-2	炎症
乳酸脱水素酵素	炎症
MCP-1	炎症
MDA-LDL	炎症
MMP-1	炎症
MMP-2	炎症
MMP-3	炎症
MMP-9	炎症
TIMP-1	炎症
TIMP-2	炎症
TIMP-3	炎症
n-アセチルアスパラギン酸	炎症
PTEN	炎症
ホスホリパーゼ A2	炎症
TNF 受容体スーパーファミリーメンバー1A	炎症
トランスフォーミング増殖因子 β	炎症
TREM-1	炎症
TL-1 (TNF リガンド関連分子-1)	炎症
TL-1a	炎症
腫瘍壊死因子 α	炎症
血管細胞接着分子	炎症
血管内皮増殖因子	炎症
シスタチンC	炎症
サブスタンスP	炎症
ミエロペルオキシダーゼ (MPO)	炎症
マクロファージ抑制因子	炎症
フィブロネクチン	炎症
カルディオトロフィン1	炎症
ハプトグロビン	炎症
PAPPA	炎症
s-CD40 リガンド	炎症
HMG-1 (または HMGB1)	炎症
IL-2	炎症
IL-4	炎症

10

20

30

40

【表 2 - 4】

IL-11	炎症
IL-13	炎症
IL-18	炎症
好酸球カチオン性タンパク質	炎症
肥満細胞トリプターゼ	炎症
VCAM	炎症
sICAM-1	炎症
TNF α	炎症
オステオプロテジェリン	炎症
プロスタグランジン D 合成酵素	炎症
プロスタグランジン E2	炎症
RANK リガンド	炎症
HSP-60	炎症
血清アミロイド A	炎症
s-iL18 受容体	炎症
S-iL-1 受容体	炎症
s-TNF P55	炎症
s-TNF P75	炎症
sTLR-1 (可溶性 トール様受容体-1)	炎症
sTLR-2	炎症
sTLR-4	炎症
TGF- β	炎症
MMP-11	炎症
β NGF	炎症
CD44	炎症
EGF	炎症
E-セレクトリン	炎症
フィブロネクチン	炎症
RAGE	炎症
好中球エラスターゼ	肺傷害
KL-6	肺傷害
LAMP3	肺傷害
LAMP3	肺傷害
肺サーファクタントタンパク質 A	肺傷害
肺サーファクタントタンパク質 B	肺傷害
肺サーファクタントタンパク質 C	肺傷害
肺サーファクタントタンパク質 D	肺傷害
ホスホリパーゼ D	肺傷害
PLA2G5	肺傷害
SFTPC	肺傷害
MAPK10	神経組織傷害
KCNK4	神経組織傷害
KCNK9	神経組織傷害
KCNQ5	神経組織傷害
14-3-3	神経組織傷害
4.1B	神経組織傷害
APO E4-1	神経組織傷害

10

20

30

40

【 0 1 9 3 】

【表 2 - 5】

ミエリン塩基性タンパク質	神経組織傷害
アトロフィン1	神経組織傷害
脳由来神経栄養因子	神経組織傷害
脳脂肪酸結合タンパク質	神経組織傷害
脳チューブリン	神経組織傷害
CACNA1A	神経組織傷害
カルピンジンD	神経組織傷害
カルブレイン	神経組織傷害
炭酸脱水酵素×1	神経組織傷害
CBLN1	神経組織傷害
セレベリン1	神経組織傷害
キメリン(Chimerin)1	神経組織傷害
キメリン(Chimerin)2	神経組織傷害
CHN1	神経組織傷害
CHN2	神経組織傷害
毛様体神経栄養因子	神経組織傷害
CK-BB	神経組織傷害
CRHR1	神経組織傷害
C-タウ	神経組織傷害
DRPLA	神経組織傷害
GFAP	神経組織傷害
GPM6B	神経組織傷害
GPR7	神経組織傷害
GPR8	神経組織傷害
GRIN2C	神経組織傷害
GRM7	神経組織傷害
HAP1P	神経組織傷害
HIP2	神経組織傷害
LDH	神経組織傷害
ミエリン塩基性タンパク質	神経組織傷害
NCAM	神経組織傷害
NT-3	神経組織傷害
NDPKA	神経組織傷害
神経細胞接着分子	神経組織傷害
NEUROD2	神経組織傷害
神経フィラメントL	神経組織傷害
ニューログロビン	神経組織傷害
ニューロモジュリン	神経組織傷害
ニューロン特異的エノラーゼ	神経組織傷害
ニューロペプチドY	神経組織傷害
ニューロテンシン	神経組織傷害
ニューロトロフィン1,2,3,4	神経組織傷害
NRG2	神経組織傷害
PACE4	神経組織傷害
ホスホグリセレートムターゼ	神経組織傷害
PKC γ	神経組織傷害
プロテオリピドタンパク質	神経組織傷害

10

20

30

40

【表 2 - 6】

PTEN	神経組織傷害
PTPRZ1	神経組織傷害
RGS9	神経組織傷害
RNA 結合タンパク質調節サブユニット	神経組織傷害
S-100β	神経組織傷害
SCA7	神経組織傷害
セクレタゴジン(secretagogin)	神経組織傷害
SLC1A3	神経組織傷害
SORL1	神経組織傷害
SREB3	神経組織傷害
STAC	神経組織傷害
STXIA	神経組織傷害
STXBP1	神経組織傷害
シタキシン	神経組織傷害
トロンボモジュリン	神経組織傷害
トランスサイレチン	神経組織傷害
アデニレートキナーゼ-1	神経組織傷害
BDNF	神経組織傷害
ニューロキニン A	神経組織傷害
ニューロキニン B	神経組織傷害
s-アセチルグルタチオン	アポトーシス
シトクロン C	アポトーシス
カスパーゼ 3	アポトーシス
カテプシン D	アポトーシス
α-スベクトリン	アポトーシス

10

20

【0195】

ユビキチン化および敗血症

タンパク質のユビキチン媒介性分解は、多数のプロセス、例えば、細胞外物質が細胞中に組み込まれる方法、細胞膜からの生化学シグナルの移動、転写オン-オフスイッチなどの細胞機能の調節の制御において重要な役割を果たす。ユビキチンシステムは免疫応答および発達に結びつけられている。ユビキチンは、分解の標的とされるタンパク質と結合している、76アミノ酸のポリペプチドである。ユビキチン-タンパク質結合体は、ユビキチンをタンパク質から分割する26Sタンパク質分解性複合体によって認識され、このタンパク質がその後分解される。

30

【0196】

敗血症は、非リソソームエネルギー依存性タンパク質分解経路による骨格筋におけるタンパク質分解を刺激し、ユビキチンmRNAの筋肉レベルも増大されるので、結果は、敗血症誘導性筋肉タンパク質分解は、エネルギーユビキチン依存性タンパク質分解経路のアップレギュレートされた活性によって引き起こされるということを示すと解釈されたと報告されている。同じタンパク質分解経路は、脱神経、絶食、アシドーシス、癌および熱傷によって引き起こされる筋肉分解に結びつけられている。したがって、通常ユビキチン化タンパク質、または特定のユビキチン-タンパク質結合体またはその断片のレベルは、本発明のさらなるマーカーとして測定できる。チャオ(Tiao)ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(Journal of Clinical Investigation)99、163~168頁、1997参照のこと。さらに、ユビキチンの循環レベル自体が、本明細書に記載される方法における有用なマーカーであり得る。例えば、マジエツツチャク(Majetschak)ら、ブラッド(Blood)101、1882~90頁、2003参照のこと。

40

【0197】

50

興味深いことに、タンパク質またはタンパク質断片のユビキチン化は、敗血症非特異的マーカーをより特異的なマーカーに変換できる。例えば、筋肉損傷は循環中の筋肉タンパク質の濃度を高めることができる。しかし、敗血症は、ユビキチン化経路を特異的にアップレギュレートすることによって、ユビキチン化筋肉タンパク質の増加をもたらし、ひいては、非特異的筋肉損傷を敗血症誘導性筋肉損傷と識別することができる。

【0198】

当業者には認識されるであろうが、ユビキチン自体、ユビキチン-タンパク質結合体またはユビキチンとユビキチン-タンパク質結合体の双方を認識するユビキチンのアッセイを設計することができる。例えば、サンドイッチイムノアッセイに用いる抗体は、固相抗体と標識された抗体の双方が、結合されていないユビキチンとユビキチン結合体の双方における結合に利用可能なユビキチンの一部を認識するよう選択できる。あるいは、筋肉タンパク質トロポニンのユビキチン結合体に特異的なアッセイは、ユビキチンを認識する1種の抗体（固相または標識上）、およびトロポニンを認識する二次抗体（ほかの固相または標識）を使用できる。

10

【0199】

本発明は、本明細書に記載されるいずれかのマーカーのユビキチン結合体を測定することを考慮する。マーカーとして検出するのに好ましいユビキチン-筋肉タンパク質結合体としては、それだけには限らないが、トロポニンI-ユビキチン、トロポニンT-ユビキチン、トロポニンC-ユビキチン、二成分および三成分トロポニン複合体-ユビキチン、アクチン-ユビキチン、ミオシン-ユビキチン、トロポミオシン-ユビキチンおよび -

20

【0200】

例示的SIRSマーカーおよびマーカーパネル

例示的マーカーおよびマーカーパネルは、敗血症を診断するよう、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよび/またはMODSを、SIRSのその他の原因と識別するよう、敗血症患者における危険の層別化に役立つよう、設計されることが好ましく、被検体を直接治療するよう設計されることが最も好ましい。特に好ましいマーカーとしては、マトリックスメタロプロテイナーゼ9 (MMP-9)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-22 (IL-22)、IL-1受容体アゴニスト (IL-1ra)、CXCL6、CXCL13、CXCL16、CCL8、CCL20、CCL23、CCL26、D-二量体、HMG-1、腫瘍壊死因子- (TNF-)、B型ナトリウム利尿タンパク質 (BNP)、A型ナトリウム利尿タンパク質 (ANP)、C型ナトリウム利尿タンパク質 (BNP)、C反応性タンパク質 (CRP)、カスパーゼ-3、カルシトニン、プロカルシトニン₃₋₁₁₆、可溶性DPP-IV、可溶性FASリガンド (sFasL)、クレアチンキナーゼ-BB (CK-BB)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) および可溶性細胞間接着分子-1 (sICAM-1) またはこれらのタンパク質の免疫学的に検出可能な断片またはこれらの生合成前駆体がある。

30

【0201】

これらの個々のマーカーはまた、マーカーパネルにグループ分けすることができる。好ましいパネルは、炎症と関連している1種以上のマーカーおよび血圧調節と関連している1種以上のマーカー、炎症と関連している1種以上のマーカーならびに血液凝固および止血と関連している1種以上のマーカーまたは炎症と関連している1種以上のマーカー、血液凝固および止血と関連している1種以上のマーカーおよび血圧調節と関連している1種以上のマーカーを含む。

40

【0202】

特に好ましいマーカーパネルは複数のマーカーを含み、マトリックスメタロプロテイナーゼ9 (MMP-9)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-10 (IL-1

50

0)、インターロイキン-22(IL-22)、IL-1受容体アゴニスト(IL-1ra)、CXCL6、CXCL13、CXCL16、CCL8、CCL20、CCL23、CCL26、D-二量体、HMG-1、腫瘍壊死因子(TNF)、B型ナトリウム利尿タンパク質(BNP)、A型ナトリウム利尿タンパク質(ANP)、C型ナトリウム利尿タンパク質(BNP)、C反応性タンパク質(CRP)、カスパーゼ-3、カルシトニン、プロカルシトニン₃₋₁₁₆、可溶性DPP-IV、可溶性FASリガンド(sFasL)、クレアチンキナーゼ-BB(CK-BB)、血管内皮増殖因子(VEGF)、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)および可溶性細胞間接着分子-1(sICAM-1)および免疫学的に検出可能なその断片からなる群から選択される3、4、5、6、7、8、9、10種以上のマーカーを含むことが最も好ましい。

10

【0203】

アッセイ測定戦略

本発明のマーカーを検出および分析するための多数の方法および装置が、当業者にはよく知られている。患者試験サンプル中のポリペプチドまたはタンパク質に関しては、イムノアッセイ装置および方法が用いられることが多い。例えば、米国特許第6,143,576号、同6,113,855号、同6,019,944号、同5,985,579号、同5,947,124号、同5,939,272号、同5,922,615号、同5,885,527号、同5,851,776号、同5,824,799号、同5,679,526号、同5,525,524号および同5,480,792号参照のこと、なお、これらの各々は参照によりすべての表、図および特許請求の範囲を含むその全文が本明細書に組み込まれる。これらの装置および方法は、種々のサンドイッチ、競合または非競合アッセイ形式において標識された分子を利用し、注目する分析物の存在または量と関連しているシグナルを発生させることができる。さらに、ある種の方法および装置、例えば、バイオセンサーおよび光学イムノアッセイを用い、標識した分子を必要とすることなく、分析物の存在または量を調べることができる。例えば、米国特許第5,631,171号および同5,955,377号を参照のこと、なお、これらの各々は参照によりすべての表、図および特許請求の範囲を含むその全文が本明細書に組み込まれる。当業者ならば、ロボット計測手段、例えば、それだけには限らないが、ベックマン・アクセス(Beckman Access)、アボット・アキシム(Abbott AxSym)、ロシェ・エレクシス(Roche ElecSys)、デード・ベアリング・ストラタス・システム(Dade Behring Stratus systems)が、本明細書において教示されるイムノアッセイを実施できるイムノアッセイアナライザーに含まれることを認識する。

20

30

【0204】

マーカーは、他の方法も当業者にはよく知られているが(例えば、マーカーRNAレベルの測定)、イムノアッセイを用いて分析することが好ましい。マーカーの存在または量は、通常、各マーカーに特異的な抗体を用い、特異的結合を検出して測定する。例えば、酵素結合免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、競合結合実験など、適したイムノアッセイはいずれも利用できる。抗体の、マーカーとの特異的免疫学的結合は、直接的にまたは間接的に検出できる。直接標識としては、抗体と結合している、蛍光または発光タグ、金属、色素、放射性核種などが挙げられる。間接標識としては、当技術分野で公知の種々の酵素、例えば、アルカリ性ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼなどが挙げられる。

40

【0205】

マーカーに特異的な固定化抗体の使用も、本発明によって考慮される。抗体は、種々の固体支持体、例えば、磁性またはクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイ場所の表面(例えば、マイクロタイターウェル)、固体基板物質またはメンブランの小片(例えば、プラスチック、ナイロン、ペーパー)などの上に固定化できる。アッセイストリップは、固体支持体上のアレイ中に抗体または複数の抗体をコーティングすることによって調製できる。次いで、このストリップを試験サンプル中に浸漬し、次いで、洗浄および検出ステップによって迅速に処理し、測定可能なシグナル、例えば、着色スポットを生成させ

50

る。

【0206】

複数のマーカーの分析は、1つの試験サンプルを用いて別々にまたは同時に実施できる。マーカーの、別々のアッセイまたは逐次アッセイのための適した装置として、臨床検査室分析機器、例えば、エレクシス(ElecSys) (ロシュ(Roche))、アキシム(AxSym) (アボット(Abbott))、アクセス(Access) (ベックマン(Beckman))、(アドビア(ADVIA) (登録商標) センタウル(CENTAUR) (登録商標) (バイヤー(Bayer) イムノアッセイシステム、ニコルス・アドバンテージ(NICHOLS ADVANTAGE) (登録商標) (ニコルス・インスティテュート(Nichols Institute)) イムノアッセイシステムなどが挙げられる。好ましい装置またはタンパク質チップは、単一表面で複数のマーカーの同時アッセイを実施する。特に有用な物理的形式は、複数の異なる分析物を検出するための、複数の、別個の、アドレス可能な位置を有する表面を含む。このような形式としては、タンパク質マイクロアレイまたは「タンパク質チップ」(例えば、ング(Ng)およびイラグ(Illag)、ジャーナル・オブ・セルラー・アンド・モレキュラー・メディシン(Journal of Cellular and Molecular Medicine) 6、329~340頁、(2002) 参照のこと) およびある種のキャピラリー装置(例えば、米国特許第6,019,944号参照のこと) が挙げられる。これらの実施形態では、各々別個の表面位置が、各々の位置で検出するために1種以上の分析物(例えば、マーカー)を固定化するための抗体を含み得る。あるいは、表面が、表面の別個の位置に固定化された1種以上の別個の粒子(例えば、微小粒子またはナノ粒子)を含んでいてもよく、この場合、微小粒子は、検出のために1種の分析物(例えば、マーカー)を固定化するための抗体を含む。

10

20

【0207】

複数のサンプルの効率的な処理のために、1つの試験に、いくつかのマーカーを組み合わせることができる。さらに、当業者ならば、同一個体から(例えば、連続する時点で)得た複数のサンプルを試験することの価値を承知しているであろう。このように連続するサンプルを試験することによって、マーカーレベルの経時変化を同定することが可能となる。マーカーレベルの増大または減少、ならびにマーカーレベルの変化がないことは、それだけには限らないが、事象の発症からのおよその時間、救済可能な組織の存在および量、薬物治療の妥当性、再灌流または症状の回復によって示されるような種々の治療の有効性を同定すること、種々の種類のACSの識別、事象の重篤度の同定、疾患重症度の同定および患者の転帰、例えば、将来の事象の危険性の同定をはじめとする疾患状態についての有用な情報を提供する。

30

【0208】

種々の診断に関連する関連情報を提供するように、上記に言及されるマーカーからなるパネルを構築することができる。このようなパネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20種以上の個々のマーカーを用いて構築することができる。当業者ならば、単一マーカー、またはマーカーのより大きなパネルを含むマーカーのサブセットの分析を、種々の臨床設定において臨床感度または特異度を最適にするよう実施できる。これらとしては、それだけには限らないが、外来、応急手当、救命医療、集中治療、モニタリングユニット、入院患者、外来患者、医師の診療室、診療所および集団検診設定が挙げられる。さらに、当業者ならば、前記の設定の各々において単一マーカー、またはマーカーのより大きなパネルを含むマーカーのサブセットを、臨床的感度および特異度を最適化するよう診断基準点の調節と組み合わせて使用できる。アッセイの臨床的感度は、アッセイが正しく予測する疾患を有するもののパーセンテージとして定義され、アッセイの特異度は、アッセイが正しく予測する疾患を有さないもののパーセンテージとして定義される(ティーツェ・テキストブック・オブ・クリニカル・ケミストリー(Tietz Textbook of Clinical Chemistry)、第2版、カール・バーティス(Carl Burtis)およびエドワード・アッシュウッド(Edward Ashwood)編、W. B. サウンダース(Saunders)他、496頁)。

40

【0209】

マーカーの分析は、同様に種々の物理的形式で実施できる。例えば、多数の試験サン

50

ルの処理を容易にするために、マイクロタイタープレートまたは自動化の使用を用いることができる。あるいは、例えば、外来搬送または救急外来設定において時宜に即して迅速な治療および診断を容易にするために、単一サンプル形式を開発できる。

【0210】

別の実施形態では、本発明は、マーカーの分析用のキットを提供する。このようなキットは、少なくとも1試験サンプルを分析するための装置および試薬と、アッセイを実施するための使用説明書とを含むことが好ましい。場合により、キットは、マーカーパネルに対して実施したイムノアッセイから得られる情報を用いて、ある診断を採用または除外するための1以上の手段を含み得る。本明細書に記載される方法に適用可能なその他の測定戦略としては、クロマトグラフィー（例えば、HPLC）、質量分析、受容体ベースのアッセイおよび前記のものの組み合わせが挙げられる。

10

【0211】

抗体の選択

抗体の作製および選択はいくつかの方法で達成することができる。例えば、一方法としては、注目するポリペプチドを精製すること、または例えば、当技術分野で周知の固相ペプチド合成法を用いて注目するポリペプチドを合成することがある。例えば、ガイド・トゥー・プロテイン・プリフィケーション(Guide to Purification)、マリーP・ドッチャー(Murray P. Deutcher)編、メソツツ・イン・エンジモロジー(Methods in Enzymology)第182巻(1990)；ソリッド・フェーズ・ペプチド・シンセシス(Solid Phase Peptide Synthesis)、グレッグB・フィールズ(Greg B.Fields)編、メソツツ・イン・エンジモロジー第289巻(1997)、キソら、ケミカル・ファーマシー・ブレチン(Chemical Pharmacy Bulletin)(東京)38、1192~99頁、1990；モスタファビ(Mostafavi)ら、バイオメディカル・ペプチデス、プロテインズ、アンド・ヌクレイック・アシツツ(Biomedical peptides, Proteins and Nucleic Acids)1、255~60頁、1995、フジワラら、ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブレチン(Chemical and Pharmaceutical Bulletin)(東京)44、1326~31頁、1996参照のこと。次いで、選択したポリペプチドを、例えば、マウスまたはウサギに注射してポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作製することができる。当業者ならば、抗体の作製には、例えば、アンチボディーズ、ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)、ハーロー(Harlow)およびデヴィッド・レーン(David Lane)編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1988)、コールド・スプリング・ハーバー、N.Y.に記載されるような多数の手順を利用できることは認識されよう。また、当業者ならば、種々の手順による遺伝情報から、抗体を模倣する結合断片またはFab断片も調製できるということは理解されよう(アンチボディー・エンジニアリング(Antibody Engineering):ア・プラクティカル・アプローチ(A Practical Approach)(ボレベック(Borrebaeck)C.編)1995、オックスフォード大学出版、オックスフォード、ジャーナル・オブ・イムノロジー149、3914~3920頁、(1992))。

20

30

【0212】

さらに、多数の出版物によって、選択した標的との結合について、ポリペプチドのライブラリーを作製し、スクリーニングするためのファージディスプレイ技術の使用が報告されている。例えば、クウィルラ(Cwirlla)ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)87、6378~82頁、1990；デブリン(Devlin)ら、サイエンス(Science)249、404~6頁、1990、スコット(Scott)およびスミス(Smith)、サイエンス、249、386~88頁、1990およびラドナー(Ladner)ら、米国特許第5,571,698号参照。ファージディスプレイ法の基本概念は、スクリーニングされるポリペプチドをコードするDNAとポリペプチドの間の物理的結合の確立である。この物理的結合はポリペプチドを、ポリペプチドをコードするファージゲノムを封入しているキャプシドの一部

40

50

として提示するファージ粒子によって提供される。ポリペプチドとその遺伝物質間の物理的結合の確立により、種々のポリペプチドを保持する極めて多数のファージの同時マスキングが可能となる。標的に対して親和性のあるポリペプチドを提示するファージは標的と結合し、これらのファージは標的に対するアフィニティスクリーニングによって濃縮される。これらのファージから提示されるポリペプチドの正体は、それらのそれぞれのゲノムから決定することができる。次いで、これらの方法を用いて、所望の標的に対して結合親和性を有すると同定されたポリペプチドを、従来法を用いて大量に合成することができる。例えば、すべての表、図および特許請求の範囲をはじめとするその全文が本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,057,098号参照のこと。

【0213】

次いで、これらの方法によって作製される抗体を、精製された注目するポリペプチドとの親和性および特異性についての一次スクリーニング、および必要に応じて、抗体の、結合から除外されることが望まれるポリペプチドとの親和性および特異性についての結果との比較によって選択することができる。スクリーニング手順は、精製されたポリペプチドのマイクロタイタープレートの個別のウェルへの固定化を含み得る。次いで、可能性ある抗体または抗体群を含有する溶液をそれぞれのマイクロタイターウェルに入れ、約30分間～2時間インキュベートする。次いで、マイクロタイターウェルを洗浄し、ウェルに標識した二次抗体（例えば、産生された抗体がマウス抗体である場合には、アルカリホスファターゼと結合している抗マウス抗体）を加え、約30分間インキュベートし、次いで洗浄する。ウェルに基質を加えると、固定化されたポリペプチドに対する抗体が存在する場合には呈色反応が現れる。

【0214】

次いで、このように同定した抗体を、選択したアッセイ設計における親和性および特異性についてさらに分析することができる。標的タンパク質に対するイムノアッセイの開発では、精製した標的タンパク質が、選択されている抗体を用いるイムノアッセイの感度および特異性を判断する標準の役割を果たす。種々の抗体の結合親和性は異なり得るので、ある種の抗体ペア（例えば、サンドイッチアッセイにおける）は互いに立体障害などによって干渉する可能性があり、抗体の分析性能は、抗体の絶対的な親和性および特異性より重要な尺度であり得る。

【0215】

当業者ならば、抗体または結合断片を作製し、種々のポリペプチドに対する親和性および特異性についてスクリーニングおよび選択するのに、多数のアプローチを取ることができるが、これらのアプローチは本発明の範囲を変更するものではないということは認識されよう。

【0216】

治療計画の選択

いずれかの特定の非特異的症状の可能性ある原因が、大きくかつ多様な状態の集合であり得るように、これらの可能性ある原因の適当な治療も同様に大きく多かつ様なものであり得る。しかし、いったん診断が得られると、臨床医学者は、診断に適合する治療計画を容易に選択することができる。当業者は、本明細書に記載される診断方法と関連して論じられる多数の疾患のための適当な治療を承知している。例えば、メルク・マニュアル・オブ・ダイアグノシス・アンド・セラピー(Merck Manual of Diagnosis and Therapy)、17版、メルク・リサーチ・ラボラトリーズ(Merck Research Laboratories)、ニュージャージー州、ホワイトハウス・ステーション(Whitehouse Station)、1999。SIRS、敗血症、重篤な敗血症および敗血性ショックに関しては、最近のガイドラインが、臨床医学者のためにさらなる情報を提供している。例えば、参照によりその前文が本明細書に組み込まれる、デリンジャー(Dellinger)ら、クリティカル・ケア・メディシン(Critical Care Medicine) 32、858～73頁、2004を参照のこと。

【0217】

本発明を用いて、あらゆるSIRS関連（すなわち、SIRS、敗血症、重篤な敗血症

10

20

30

40

50

、敗血性ショックおよびMODSに適用できる)治療をすべて受けるべきであるかどうかを決定することができるが、本発明を用いて、SIRS関連治療計画の2以上の可能性ある選択の中から特定の治療計画を指定することが好ましい。例えば、例示的实施形態では、本発明を用いて、被検体が標準療法または早期目標指向療法を受けるべきであるかどうかを決定する。したがって、本明細書に記載される本方法および組成物を用いて、治療計画に含めるために1以上の以下の治療を選択することができる：

静脈内抗生物質の投与療法、

8 ~ 12 mmHg という中心静脈圧の維持、

好ましくは、前記中心静脈圧を維持するための、クリスタロイドおよび/またはコロイドの投与、

65 mmHg という平均動脈圧の維持、

1種以上の昇圧剤(例えば、ノルエピネフリン、ドーパミンおよび/またはバソプレシン)ならびに/または血管拡張薬(例えば、プロスタサイクリン、ペントキシフィリン、N-アセチル-システイン)の投与、

1種以上の副腎皮質ステロイド(例えば、ヒドロコルチゾン)の投与、

組換え活性化プロテインCの投与、

70%という中心静脈酸素飽和度の維持、

少なくとも30%というヘマトクリットへの輸血赤血球の投与、

1種以上の変力薬(例えば、ドブタミン)の投与および

機械的換気の投与。

【0218】

この一覧は制限しようとするものではない。さらに、本明細書に記載される方法および組成物は、予後予測情報を提供し、本発明のパネルおよびマーカーを用いて治療の経過をモニターできる。例えば、改善されたまたは悪化した予後状態は、特定の治療が有効であるまたは有効でないことを示し得る。

【実施例】

【0219】

以下の実施例は本発明を例示するのに役立つ。これらの実施例は、決して本発明の範囲を制限しようとするものではない。

【0220】

実施例1．被検体集団

以下の実施例における被検体は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、リバーズ(Rivers)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England Journal of Medicine) 345、1368~77頁、2001において報告されるものの下位集団である。サンプルは入院時に採取し、次いで、被検体を2つの無作為群に細分割し、その一方には標準敗血症療法を与え、もう一方には、本発明者らによって発明された早期目標指向療法(「EGDT」)計画を与えた。一般に、血液試料は、熟練した研究員によって、抗凝固剤としてEDTAを用いて採取し、10分以上遠心分離する。血漿成分を、滅菌クリオバイアル中に移し、-20以下で凍結する。各患者の病歴が入手可能であり、アッセイデータの統計解析において役立つことができる。

【0221】

実施例2．生化学的解析

マーカーは標準イムノアッセイ技術を用いて測定する。これらの技術は、タンパク質標的と特異的に結合する抗体の使用を含んでいた。選択したマーカーに対するモノクローナル抗体を、N-ヒドロキシスクシンイミドピオチン(NHS-ピオチン)を、抗体あたり約5のNHS-ピオチン部分という比で用いてピオチン化する。次いで、抗体-ピオチン結合体を、標準アビジン384ウェルマイクロタイタープレートのウェルに加え、プレートと結合していない抗体結合体を除去する。これによってマイクロタイタープレート中に「抗マーカー」が形成される。スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)およびN-スクシンイミジル3-[2-ピ

10

20

30

40

50

リジルジチオ]プロピオネート (SPDP) (ピアス(Pierce)、イリノイ州、ロックフォード)を用いて、同一マーカーに対する別のモノクローナル抗体をアルカリホスファターゼと結合させる。

【0222】

イムノアッセイは、TECANジェネシス(Genesis)RSP200/8ワークステーションで実施する。ビオチン化抗体を、アビジンで予めコーティングされたマイクロタイタープレートのウェル中にピペットで入れ、60分間インキュベートする。結合していない抗体を含有する溶液を除去し、150mM NaCl、0.1%ナトリウムアジドおよび0.02%Tween-20を含む20mM ホウ酸塩(pH7.42)からなる洗浄バッファーでウェルを洗浄する。血漿サンプル(10μL)をマイクロタイタープレートのウェルにピペットで入れ、60分間インキュベートする。次いで、サンプルを除去し、洗浄バッファーでウェルを洗浄する。次いで、抗体-アルカリホスファターゼ結合体をウェルに加え、さらに60分間インキュベートし、その時点で抗体結合体を除去し、洗浄バッファーでウェルを洗浄する。ウェルに、基質、(アットフォス(登録商標)、プロメガ(Promega)、ウィスコンシン州、マディソン)を加え、蛍光産物の形成度を、患者サンプル中のマーカー濃度と関連付ける。

10

【0223】

分析されるマーカーは、以下の実施例において以下の単位を用いて報告されている: BNP - pg/ml; BNP₃₋₁₀₈ - pg/ml; BNP₇₉₋₁₀₈ - pg/ml; カルシトニン - pg/ml; カスパーゼ-3 - ng/ml; CK-BB - ng/ml; CRP - μg/ml; D-二量体 - μg/ml; sFasL - ng/ml; sICAM-1 - ng/ml; HMG-1 - ng/ml; IL-10 - pg/ml; IL-1 - pg/ml; IL-1ra - pg/ml; IL-6 - pg/ml; IL-8 - pg/ml; MMP-9 - ng/ml; MPO - ng/ml; TNF - pg/ml; VEGF - pg/ml。

20

【0224】

実施例3. SIRSにおける治療の割り当てのためのマーカーパネル

2003年12月23日に出願されたPCT出願US03/41426に記載される方法を用いて、SIRSのリスク層別化のための例示的パネルを同定した。多数の可能性あるマーカーで開始し、反復手順を適用した。この手順では、マーカーの個々の閾値濃度を、カットオフ自体としては用いず、それに対して各患者のアッセイ値を比較し、標準化する値として用いる。むしろ、最小と最大マーカー濃度の間のアッセイ値の「ウィンドウ」(以下の表中の中点±中点×リニアレンジとして算出される)を求める。最大を超える測定マーカー濃度には1という値を割り当て、最小を下回って測定されたマーカー濃度には0という値を割り当て、測定されたマーカー濃度がウィンドウ内であれば、0と1の間の値に直線的に挿入する。次いで、値に重み係数(以下の表における重み平均)を乗じる。個々のマーカーのすべての重みの絶対値を最大1まで加える。マーカーの負の重みは、対照群のアッセイ値が罹患群のものよりも高いという意味を含む。「パネル応答」は中点、リニアレンジ「ウィンドウ」および重み係数を用いて算出する。「罹患群」および「対照」の全集団のパネル応答は、ROCおよび/または相関解析に付し、パネル応答カットオフを、「罹患」と「非罹患」集団を分離するための所望の感度および特異度が得られるよう選択する。各セットの反復の後、方程式に対して最も弱い寄与体を排除し、減少した数のマーカーを用いて反復プロセスを再開することができる。このプロセスを、依然として許容可能な感度および特異度のパネルをもたらす最小数のマーカーが得られるまで続ける。

30

40

【0225】

これらの方法を用いて、選択したマーカーの同一性、最終パネルのマーカーの数、最適化を実施するための「罹患」および「非罹患」集団の選択に応じて、種々のパネルを定義することができる。以下の例示的パネルは、示される群を分析するために用いられるパネル応答閾値を提供する。これらは、研究下の2つの群を最良に分離するために用いられる

50

パネル応答値を表す。以下に報告される、100の別々に算出された「アニール(anneals)」（それらの平均の標準偏差と一緒に）から算出された、平均ROC面積、感度および特異度を用いて特定のパネルパラメーターを決定する。

【0226】

【表3】

1. 28日より長く生存しているEGDT被検体と28日より長く生存している標準療法被検体とを分離するよう最適化された、20種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	1184.28	0.48	0.09
IL-6	3939.45	0.43	0.10
IL-1ra	3856.23	0.40	0.09
D-二量体	11.75	0.38	0.06
IL-10	182.47	0.35	0.07
CK-BB	1.98	0.59	0.06
sFasL	2.62	0.44	0.08
MPO	136.25	0.46	0.09
CRP	139.58	0.53	0.04
VEGF	2.03	0.42	0.07
sICAM-1	493.67	0.34	0.06
カルシトニン	88.68	0.40	0.05
カスパーゼ-3	3.44	0.26	0.06
BNP _{3~108}	2437.01	0.45	0.04
BNP	1324.72	0.49	0.05
IL-8	312.54	0.42	0.06
IL-1β	84.52	0.76	0.05
HMG-1	4.18	0.56	0.03
TNF-α	226.92	0.93	0.06
BNP _{79~108}	96.53	0.72	0.06

10

20

【0227】

【表4】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28日までに死亡	標準療法生存対標準療法28日までに死亡
N(罹患)/N(非罹患)	16/16	9/8	32/17	16/8	16/9
パネル応答カットオフ	0.205	0.314	0.259	0.237	0.294
ROC 面積	0.804	0.506	0.738	0.832	0.639
標準偏差	0.034	0.090	0.043	0.043	0.076
92.5%特異度における感度	50.3%	6.1%	29.4%	56.8%	28.4%
標準偏差	15.10%	8.40%	14.60%	18.00%	15.00%
92.5%特異度における感度	58.6%	8.3%	40.4%	54.0%	19.1%
標準偏差	10.5%	10.2%	11.5%	16.8%	14.3%

40

【0228】

【表 5】

2. 28日より長く生存しているEGDT被検体と28日より長く生存している標準療法被検体とを分離するよう最適化された、15種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	966.53	0.56	0.13
IL-6	3920.09	0.56	0.12
IL-1ra	10681.38	0.45	0.08
D-二量体	23.37	0.48	0.06
IL-10	310.21	0.51	0.07
CK-BB	2.01	0.67	0.06
sFasL	3.56	0.40	0.10
MPO	85.21	0.53	0.11
CRP	148.45	0.46	0.07
VEGF	2.71	0.38	0.11
sICAM-1	554.57	0.55	0.08
カルシトニン	102.73	0.47	0.04
カスパーゼ-3	3.63	0.35	0.06
BNP _{3~108}	3895.88	0.74	0.05
BNP	1732.06	0.62	0.03

10

20

【0229】

【表 6】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28日までに死亡	標準療法生存対標準療法28日までに死亡
N(罹患)/N(非罹患)	29/27	20/14	56/34	29/14	27/20
パネル応答カットオフ	0.223	0.323	0.269	0.253	0.299
ROC 面積	0.796	0.590	0.652	0.818	0.489
標準偏差	0.026	0.056	0.036	0.033	0.056
92.5%特異度における感度	46.3%	12.9%	12.6%	48.6%	9.0%
標準偏差	8.50%	9.90%	7.30%	12.90%	7.20%
92.5%特異度における感度	65.2%	23.4%	20.7%	59.6%	4.0%
標準偏差	7.9%	9.0%	6.1%	11.8%	2.4%

30

【0230】

40

【表 7】

3. 28日より長く生存しているEGDT被検体と28日より長く生存している標準療法被検体とを分離するよう最適化された、11種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	1142.79	0.52	0.12
IL-6	4296.18	0.47	0.18
IL-1ra	13801.80	0.40	0.12
D-二量体	31.03	0.39	0.07
IL-10	357.48	0.54	0.05
CK-BB	2.73	0.69	0.08
sFasL	3.96	0.51	0.10
MPO	125.75	0.54	0.13
CRP	118.28	0.51	0.07
VEGF	3.11	0.49	0.13
sICAM-1	568.31	0.57	0.08

10

【0231】

【表 8】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28日までに死亡	標準療法生存対標準療法28日までに死亡
N(罹患)/N(非罹患)	30/31	21/14	61/35	30/14	31/21
パネル応答カットオフ	0.230	0.351	0.274	0.247	0.308
ROC 面積	0.813	0.578	0.620	0.813	0.449
標準偏差	0.024	0.055	0.030	0.031	0.045
92.5%特異度における感度	47.7%	15.2%	4.9%	43.1%	2.2%
標準偏差	9.60%	9.00%	4.60%	12.00%	3.30%
92.5%特異度における感度	65.1%	21.8%	18.1%	56.8%	3.6%
標準偏差	7.8%	7.8%	5.7%	12.8%	2.4%

20

30

【0232】

【表 9】

4. 28日より長く生存しているEGDT被検体と28日より長く生存している標準療法被検体とを分離するよう最適化された、8種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	1142.79	0.52	0.12
IL-6	4296.18	0.47	0.18
IL-1ra	13801.80	0.40	0.12
D-二量体	31.03	0.39	0.07
CK-BB	2.73	0.69	0.08
sFasL	3.96	0.51	0.10
MPO	125.75	0.54	0.13
VEGF	3.11	0.49	0.13

40

50

【 0 2 3 3 】

【 表 1 0 】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28 日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28 日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28 日までに死亡	標準療法生存対標準療法 28 日までに死亡
N(罹患)/ N(非罹患)	42/38	27/22	80/49	42/22	38/27
パネル応答 カットオフ	0.179	0.281	0.197	0.188	0.224
ROC 面積	0.719	0.598	0.629	0.771	0.478
標準偏差	0.024	0.040	0.033	0.034	0.042
92.5%特異度 における感度	32.9%	19.5%	8.8%	34.0%	2.3%
標準偏差	5.10%	8.30%	4.40%	9.60%	2.80%
92.5%特異度 における感度	37.4%	17.8%	19.4%	42.1%	6.2%
標準偏差	6.2%	7.5%	6.7%	7.5%	3.4%

10

【 0 2 3 4 】

【 表 1 1 】

5. 28 日より長く生存している EGDT と 28 日までに死亡した EGDT とを分離するよう最適化された、20 種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	923.92	0.43	0.07
IL-6	2441.65	0.40	0.09
IL-1ra	3632.46	0.38	0.08
D-二量体	8.75	0.44	0.10
IL-10	270.88	0.38	0.07
CK-BB	1.49	0.52	0.07
sFasL	1.93	0.47	0.07
MPO	52.17	0.35	0.06
CRP	136.58	0.49	0.08
VEGF	0.98	0.52	0.07
sICAM-1	717.17	0.32	0.08
カルシトニン	93.96	0.50	0.06
カスパーゼ-3	3.86	0.24	0.10
BNP _{3~108}	5696.30	0.52	0.06
BNP	2557.61	0.55	0.06
IL-8	279.36	0.41	0.12
IL-1 β	74.48	0.39	0.06
HMG-1	7.18	0.50	0.04
TNF- α	447.42	0.86	0.07
BNP _{79~108}	111.26	0.53	0.05

30

40

【 0 2 3 5 】

【表 1 2】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28 日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28 日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28 日までに死亡	標準療法生存対標準療法 28 日までに死亡
N(罹患) /N(非罹患)	16/16	9/8	32/17	16/8	16/9
パネル応答 カットオフ	0.257	0.399	0.363	0.377	0.329
ROC 面積	0.563	0.742	0.847	0.964	0.748
標準偏差	0.058	0.129	0.034	0.022	0.073
92.5%特異度 における感度	18.3%	19.3%	55.4%	99.4%	38.2%
標準偏差	9.60%	19.30%	14.40%	3.70%	17.10%
92.5%特異度 における感度	27.1%	55.6%	51.2%	93.8%	32.7%
標準偏差	8.8%	17.1%	13.6%	3.1%	16.1%

10

【 0 2 3 6】

【表 1 3】

20

6. 28 日より長く生存している EGDT と 28 日までに死亡した EGDT とを分離するよう最適化された、15 種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	749.42	0.46	0.09
IL-6	2316.43	0.51	0.10
IL-1ra	9607.05	0.45	0.07
D-二量体	11.80	0.52	0.12
IL-10	236.38	0.51	0.10
CK-BB	1.75	0.52	0.08
sFasL	1.48	0.35	0.08
MPO	175.24	0.41	0.07
CRP	145.78	0.35	0.07
VEGF	1.04	0.61	0.07
sICAM-1	539.18	0.27	0.09
IL-1 β	71.65	0.38	0.08
IL-8	232.14	0.34	0.16
BNP _{3~108}	7551.77	0.29	0.07
BNP	3436.47	0.48	0.06

30

【 0 2 3 7】

40

【表 1 4】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28 日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28 日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28 日までに死亡	標準療法生存対標準療法 28 日までに死亡
N(罹患)/N(非罹患)	30/28	21/14	58/35	30/14	28/21
パネル応答カットオフ	0.292	0.389	0.350	0.357	0.336
ROC 面積	0.627	0.729	0.762	0.943	0.615
標準偏差	0.044	0.054	0.026	0.012	0.046
92.5%特異度における感度	29.0%	19.1%	26.7%	92.6%	17.8%
標準偏差	9.30%	10.80%	8.50%	10.60%	6.90%
92.5%特異度における感度	17.9%	50.8%	25.4%	92.3%	10.8%
標準偏差	10.1%	9.9%	10.0%	2.1%	5.9%

10

【 0 2 3 8】

【表 1 5】

20

7. 28 日より長く生存している EGDT と 28 日までに死亡した EGDT とを分離するよう最適化された、11 種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	817.00	0.38	0.09
IL-6	2527.65	0.55	0.11
IL-1ra	11207.14	0.54	0.10
D-二量体	12.22	0.47	0.14
IL-10	247.84	0.50	0.12
CK-BB	1.97	0.47	0.10
sFasL	1.36	0.59	0.09
IL-1 β	79.85	0.37	0.09
CRP	163.02	0.32	0.11
IL-8	215.64	0.26	0.20
sICAM-1	528.65	0.23	0.10

30

【 0 2 3 9】

【表 1 6】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28 日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28 日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28 日までに死亡	標準療法生存対標準療法 28 日までに死亡
N(罹患)/ N(非罹患)	31/31	21/16	62/37	31/16	31/21
パネル応答 カットオフ	0.296	0.412	0.349	0.357	0.337
ROC 面積	0.635	0.723	0.760	0.947	0.602
標準偏差	0.046	0.047	0.026	0.012	0.047
92.5%特異度 における感度	32.6%	18.8%	20.8%	93.5%	10.1%
標準偏差	7.40%	10.50%	8.00%	6.10%	8.40%
92.5%特異度 における感度	14.9%	46.7%	26.8%	92.1%	12.2%
標準偏差	8.7%	9.6%	11.0%	3.0%	7.7%

10

【 0 2 4 0】

【表 1 7】

20

8. 28 日より長く生存している EGDT と 28 日までに死亡した EGDT とを分離するよう最適化された、8 種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
MMP-9	1014.25	0.46	0.06
IL-8	433.62	0.55	0.32
IL-1ra	15163.51	0.46	0.06
D-二量体	21.45	0.57	0.17
CK-BB	3.94	0.51	0.14
sFasL	2.32	0.45	0.10
CRP	157.98	0.40	0.10
sICAM-1	608.27	0.52	0.13

30

【 0 2 4 1】

【表 1 8】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28 日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28 日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28 日までに死亡	標準療法生存対標準療法 28 日までに死亡
N(罹患)/ N(非罹患)	50/45	29/28	95/57	50/28	45/29
パネル応答 カットオフ	0.235	0.360	0.279	0.297	0.277
ROC 面積	0.590	0.719	0.719	0.867	0.574
標準偏差	0.031	0.029	0.015	0.013	0.027
92.5%特異度 における感度	20.8%	19.9%	17.0%	62.5%	7.9%
標準偏差	5.50%	8.60%	8.30%	10.10%	5.90%
92.5%特異度 における感度	12.1%	43.8%	30.2%	74.4%	14.7%
標準偏差	5.0%	9.0%	7.4%	7.2%	5.3%

10

【 0 2 4 2】

【表 1 9】

20

9. 28 日より長く生存しているすべての治療法と 28 日までに死亡したすべての治療法とに対して最適化された、8 種のマーカー

マーカーID	中点	リニアレンジ	重み
BNP	1772.08	0.46	0.10
IL-8	752.64	0.58	0.27
IL-1ra	23192.41	0.39	0.11
D-二量体	27.29	0.56	0.08
CK-BB	5.92	0.69	0.10
sFasL	3.13	0.62	0.13
CRP	139.34	0.51	0.10
カスパーゼ-3	4.73	0.26	0.18

30

【 0 2 4 3】

【表 2 0】

種々の被検体群への適用：

	EGDT 生存対標準療法、28 日より長く生存	EGDT 生存対標準療法、28 日までに死亡	生存対死亡、全集団	EGDT 生存対EGDT28 日までに死亡	標準療法生存対標準療法 28 日までに死亡
N(罹患)/N(非罹患)	55/45	32/28	100/60	55/28	45/32
パネル応答カットオフ	0.131	0.222	0.159	0.158	0.164
ROC 面積	0.565	0.586	0.765	0.826	0.702
標準偏差	0.030	0.042	0.018	0.027	0.032
92.5%特異度における感度	9.3%	13.8%	41.5%	46.4%	35.1%
標準偏差	3.20%	6.20%	6.60%	8.80%	10.10%
92.5%特異度における感度	9.9%	20.1%	45.6%	57.9%	22.8%
標準偏差	5.6%	7.3%	5.7%	9.9%	8.8%

10

【 0 2 4 4】

前記の表によって実証されるように、予後予測パネルはいくつかの異なるマーカーの組み合わせを用いて定義することができる。「罹患」および「非罹患」集団の選択に応じて得られたパネルは、治療計画に応じてさらなる予後予測情報を提供できる。本明細書に記載されるように、平均ROC面積は、特定のパネル(マーカーおよびその関連パラメータによって定義される)を用いて研究下の2つの群がどの程度うまく識別され得るかという指標を提供する。同一パネルから(または同一パネル中のマーカーの異なるサブセットから)複数のパネル応答閾値を算出でき、各閾値は異なる情報を提供する。例えば、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血性ショックおよびMODSは異なっているが関連している臨床状態を表すので、閾値を確立して各臨床状態の死亡率データを提供することができる。あるいは、1つの閾値が予後予測情報を提供でき、別の閾値が診断情報を提供でき、かつ/または別の閾値が治療の割り当てを提供できる。

20

30

【 0 2 4 5】

実施例 4 . 治療計画の採用および除外

リバーズ(Rivers)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England Journal of Medicine) 345、1368~1377頁、2001、1376頁に論じられるように、ある種の敗血症患者において非常に有益であり得るある種の治療は、その他のものでは有害である場合がある。このような治療が、被検体に対して可変性のリスクを有し得る場合には、本発明のパネルを用いて、特定の治療群に割り当てるために被検体を識別し、選択できる。この関連では、以下のマーカーを用いて、パネルを、28日より長く生存しているEGDTと、28日までに死亡したEGDTとを分離するよう最適化した：IL-8、D-二量体、カスパーゼ-3、sICAM-1、IL-1ra、IL-6およびCRP。カットオフは、このパネルによって提供されるROC曲線のひざに定めた。ひざ値に対するそれらの個々のパネル応答値に基づいて、EGDT被検体と従来療法を受けている被検体とを分離することにより、以下のデータが提供される。

40

【 0 2 4 6】

【表 2 1】

療法	パネル応答<ひざ		パネル応答≥ひざ	
	従来	EGDT	従来	EGDT
生存(28日目)	28	46	22	8
死亡(28日目)	11	3	17	28
生存%	72%	94%	56%	22%

【0247】

この表から、EGDTはパネル応答よりひざ値が高い被検体では有益であり（メンタル - ヘンツェル(Mental-Haenszel)カイ二乗 $p = 0.005$ ）、ひざ値よりもパネル応答が高いか同じである被検体では有害である（メンタル - ヘンツェル(Mental-Haenszel)カイ二乗 $p = 0.0027$ ）ということが明らかである。被検体を、その被検体の個々のパネル応答に基づいて特定の療法（例えば、従来またはEGDT）に割り当てることによって改善された転帰（例えば、改善された生存）が得られるはずである。

10

【0248】

対照的に、第2のパネルは、同一マーカーを用いて28日より長く生存している従来療法被検体と、28日までに死亡した従来療法被検体とを分離するよう最適化し、カットオフは、このパネルによって提供されるROC曲線のひざに定めた。ひざ値に対するそれらの個々のパネル応答値に基づいて、EGDT被検体と従来療法を受けている被検体とを分離することにより、以下のデータが提供される。

20

【0249】

【表 2 2】

療法	パネル応答<ひざ		パネル応答≥ひざ	
	従来	EGDT	従来	EGDT
生存(28日目)	46	49	4	5
死亡(28日目)	14	21	14	10
生存%	77%	70%	22%	33%

【0250】

このパネルは、両集団に関する予後予測情報を提供するが、被検体を特定の療法に割り当てるための統計的に有意な根拠は提供しない。

30

【0251】

実施例 5 . 個々のマーカーの使用

本明細書に記載される種々のマーカー、特に、上記の実施例で用いられるマーカーは、パネルにおけるそれらの使用に加え、予後予測情報および治療の経過情報を提供するためにも個別に使用できる。図1および2は、被検体における種々のマーカーのレベル（一緒にプロットできるように、個々のマーカーの中央値濃度に対して標準化した）を、死亡時間に対して示す。図に示すように、これらのマーカーは、特に、死亡前0~7日、より特に、0~3日において予後予測データを個々に提供する。しかし、予測値は、より長期間の水平軸で得られる。例えば、IL-6を考慮すると、以下のデータが得られる。

40

【0252】

【表 2 3】

	n	平均 IL-6	中央値 IL-6	標準偏差
死亡≤28日				
従来療法	41	3994.81	1194.35	4501.93
EGDT	37	3301.80	890.09	3959.09
生存>28日				
従来療法	64	2750.15	398.10	3817.64
EGDT	73	1344.14	157.11	2636.39

50

【0253】

少なくとも28日間生存していた患者については、EGDTを受けている被検体では、従来療法と比較して平均IL-6データが有意に低く、また、両治療群において、少なくとも28日間生存していた患者では、死亡した患者と比較して有意に低い(ウィルコソン検定)。

【0254】

当業者ならば、本発明は記載した目的を実施し、記載した結果および利点、ならびにそれらに内在するものを得るのに十分に適応していることを容易に理解するであろう。本明細書に提供される実施例は、好ましい実施形態の代表であり、例示的なものであり、本発明の範囲を制限しようとするものではない。

10

【0255】

当業者ならば、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、本明細書に開示された本発明に、さまざまな置換および改変をなすことが可能であることは容易に理解できるであろう。

【0256】

本明細書に記載したすべての特許および出版物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示すものである。すべての特許および出版物は、各個々の出版物を具体的、かつ、個別に参照により組み入れられるよう示すのと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【0257】

本明細書に例示的に記載した本発明は、本明細書に具体的に開示されていない、いずれかの要素または要素類、制限または制限類がなくとも、適切に実施できる。したがって、例えば、本明細書の各場合において、用語「含んでいる」、「本質的にからなる」、および「からなる」のいずれかを、他の2つの用語のいずれかと置き換えることができる。用いてきた用語および表現は、説明用語として用いるものであって制限するものではなく、このような用語および表現の使用には、示され、説明される特徴またはその一部の何らかの等価物を排除する意図は全くなく、特許請求される本発明の範囲内で種々の改変が可能であるということは理解されよう。したがって、本発明が、好ましい実施形態および任意の特徴によって具体的に開示されていたとしても、当業者によって、本明細書に開示された考え方の改変および変法をとることができるということ、ならびにこのような改変および変法は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内にあると考えられるということは理解されなくてはならない。

20

30

【0258】

別の実施形態は特許請求の範囲内に示される。

【図面の簡単な説明】

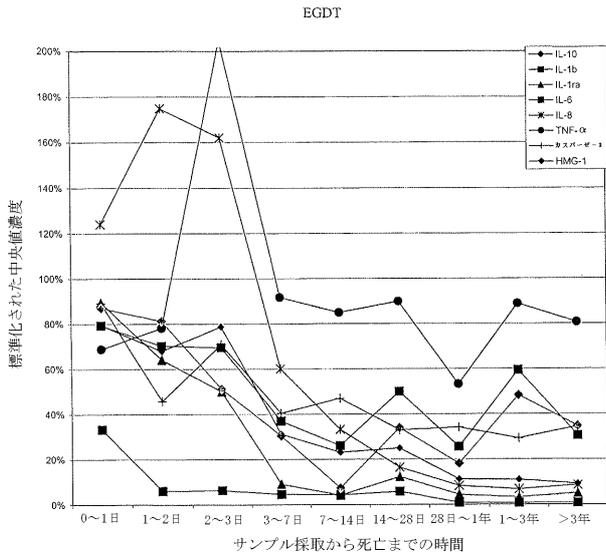
【0259】

【図1】図1は、早期目標指向療法を受けている被験者における、敗血症患者から得たサンプルにおいて測定される種々のマーカーのレベルの経時変化を、それらの患者の死亡時間に対して示す図である。

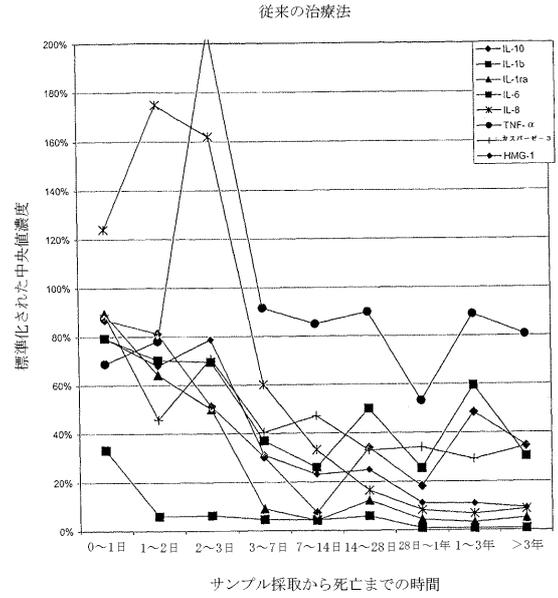
【図2】図2は、従来敗血症療法を受けている被験者における、敗血症患者から得たサンプルにおいて測定される種々のマーカーのレベルの経時変化を、それらの患者の死亡時間に対して示す図である。

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

60700760001



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/45711
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-6, 8-9, 12-15, 17, 20, 23 (in part)
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input checked="" type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(2)) (April 2005)

15.11.2007

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/45711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01),33/543(2006.01) USPC: 435/7.1;436/518,173 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																															
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1;436/518,173; Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																															
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>MACIAS. W.L. Severe protein C deficiency predicts early death in severe sepsis. Crit Care Med May 2004, Vol. 32, No. 5 (Suppl.), S223-S228, the entire document.</td> <td>1-6, 8-9, 12-14, 17, 20 — 15, 23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,344,197 B2 (FISHER et al) 5 February 2002 (05.02.2002), the entire document.</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>KINASEWITZ. G.T. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. Critical Care April 2004 (online 10 February 2004), Vol. 8 No. 2, p. R82-R90, the entire document.</td> <td>1-6, 8-9, 12-14, 17, 20 — 15, 23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2001/0019829 A1 (NELSON et al) 6 September 2001 (06.09.2001), the entire document.</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>A,P</td> <td>US 2005/0069958 A1 (MILLS et al), 31 March 2005 (31.03.2005), especially at paragraph [0121] and claim 30.</td> <td>1-6, 8-9, 12-15, 17, 20, 23</td> </tr> </tbody> </table>	Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	MACIAS. W.L. Severe protein C deficiency predicts early death in severe sepsis. Crit Care Med May 2004, Vol. 32, No. 5 (Suppl.), S223-S228, the entire document.	1-6, 8-9, 12-14, 17, 20 — 15, 23	Y	US 6,344,197 B2 (FISHER et al) 5 February 2002 (05.02.2002), the entire document.	23	X — Y	KINASEWITZ. G.T. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. Critical Care April 2004 (online 10 February 2004), Vol. 8 No. 2, p. R82-R90, the entire document.	1-6, 8-9, 12-14, 17, 20 — 15, 23	Y	US 2001/0019829 A1 (NELSON et al) 6 September 2001 (06.09.2001), the entire document.	15	A,P	US 2005/0069958 A1 (MILLS et al), 31 March 2005 (31.03.2005), especially at paragraph [0121] and claim 30.	1-6, 8-9, 12-15, 17, 20, 23	<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Special categories of cited documents:</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Special categories of cited documents:		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																													
X — Y	MACIAS. W.L. Severe protein C deficiency predicts early death in severe sepsis. Crit Care Med May 2004, Vol. 32, No. 5 (Suppl.), S223-S228, the entire document.	1-6, 8-9, 12-14, 17, 20 — 15, 23																													
Y	US 6,344,197 B2 (FISHER et al) 5 February 2002 (05.02.2002), the entire document.	23																													
X — Y	KINASEWITZ. G.T. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. Critical Care April 2004 (online 10 February 2004), Vol. 8 No. 2, p. R82-R90, the entire document.	1-6, 8-9, 12-14, 17, 20 — 15, 23																													
Y	US 2001/0019829 A1 (NELSON et al) 6 September 2001 (06.09.2001), the entire document.	15																													
A,P	US 2005/0069958 A1 (MILLS et al), 31 March 2005 (31.03.2005), especially at paragraph [0121] and claim 30.	1-6, 8-9, 12-15, 17, 20, 23																													
Special categories of cited documents:																															
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																														
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																														
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																														
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family																														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																															
Date of the actual completion of the international search 26 September 2006 (26.09.2006)	Date of mailing of the international search report 17 AUG 2007																														
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer Christine Foster Telephone No. (571) 272-1600																														

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/45711

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US 2005/0196817 (KINGSMORE et al) 8 September 2005 (08.09.2005), especially at paragraphs 83 and 112	1-6, 8-9, 12-15, 17, 20, and 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/45711

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

Subject-derived markers:

1. MMP-9 (see claims 6, 20, 22)
2. IL-1b (see claims 6, 17, 20)
3. IL-6 (see claims 6, 17, 20)
4. IL-8 (see claims 6, 17, 20)
5. IL-86-77 (see claims 6 and 17)
6. IL-10 (see claim 6)
7. IL-22 (see claim 6)
8. IL-1ra (see claims 6, 17, 20, 22)
9. CXCL6 (see claim 6)
10. CXCL13 (see claim 6)
11. CXCL16 (see claim 6)
12. CCL8 (see claim 6)
13. CCL20 (see claim 6)
14. CCL23 (see claim 6)
15. CCL26 (see claim 6)
16. D-dimer (see claims 6, 19, 22)
17. HMG-1 (see claims 6, 17, 20, 22)
18. TNF-a (see claims 6, 17, 20, 22)
19. BNP (see claims 6, 16, 20)
20. ANP (see claims 6 and 16)
21. CNP (see claims 6, 16, 20)
22. CRP (see claims 6, 17, 20, 22)
23. Caspase-3 (see claims 6, 17, 20, 22)
24. Calcitonin (see claim 6)
25. Procalcitonin3-116 (see claim 6)
26. Soluble DPP-IV (see claim 6)
27. sFasL (see claims 6, 22)
28. CK-BB (see claims 6, 20, 22)
29. VEGF (see claims 6 and 17)
30. MPO (see claims 6, 22)
31. sICAM-1 (see claims 6, 22)
32. NT-proBNP (see claims 7, 20)
33. ProBNP (see claims 7, 20)
34. BNP79-108 (see claim 7)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/45711

35. BNP3-108 (see claim 7)
36. A marker related to BNP (note: a specific marker must be specified) (see claim 16)
37. Urotensin II (see claim 16)
38. Arginine Vasopressin (see claim 16)
39. Aldosterone (see claim 16)
40. Angiotensin I (see claim 16)
41. Angiotensin II (see claim 16)
42. Angiotensin III (see claim 16)
43. Bradykinin (see claim 16)
44. Calcitonin gene related peptide (see claim 16)
45. Adrenomedullin (see claim 16)
46. Calcyphosine (see claim 16)
47. Endothelin-2 (see claim 16)
48. Endothelin-3 (see claim 16)
49. Renin (see claim 16)
50. Urotilatin (see claim 16)
51. vascular cell adhesion molecule (see claim 17)
52. ICAM-1 (see claim 17)
53. ICAM-2 (see claim 17)
54. ICAM-3 (see claim 17)
55. MCP-1 (see claims 17, 18, 20, 22)
56. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (see claim 17)
57. mast cell tryptase (see claim 17)
58. eosinophil cationic protein (see claim 17)
59. KL-6 (see claim 17)
60. haptoglobin (see claim 17)
61. TNF-b (see claims 17 and 18)
62. TREM-1 (see claim 17)
63. fibronectin (see claim 17)
64. macrophage migration inhibitory factor (see claim 17)
65. hepcidin (see claim 18)
66. HSP-60 (see claims 18, 22)
67. HSP-65 (see claim 18)
68. HSP-70 (see claim 18)
69. sFasL (see claim 18)
70. asymmetric dimethylarginine (see claim 18)
71. matrix metalloprotein 11 (see claim 18)
72. matrix metalloprotein 3 (see claim 18)
73. matrix metalloprotein 9 (see claim 18)
74. defensin HBD 1 (see claim 18)
75. defensin HBD 2 (see claim 18)
76. serum amyloid A (see claim 18)
77. oxidized LDL (see claim 18)
78. insulin-like growth factor (see claim 18)
79. an inter- α -inhibitor (note: a specific inhibitor must be specified) (see claim 18)
80. e-selectin (see claim 18)
81. glutathione-S-transferase (see claim 18)
82. HIF-1 α (see claim 18)
83. inducible nitric oxide synthase α (see claim 18)
84. ICAM (see claim 18)
85. lactate dehydrogenase (see claim 18)
86. TNF receptor superfamily member 1A (see claim 18)
87. cystatin C (see claim 18)
88. n-acetyl aspartate (see claim 18)
89. prostaglandin E2 (see claim 18)
90. receptor activator of nuclear factor ligand (see claim 18)
91. plasmin (see claim 19)
92. fibrinogen (see claim 19)
93. b-thromboglobulin (see claim 19)
94. platelet factor 4 (see claim 19)
95. fibrinopeptide A (see claim 19)
96. platelet-derived growth factor (see claim 19)
97. prothrombin fragment 1+2 (see claim 19)

61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/45711

98. plasmin-a2-antiplasmin complex (see claim 19)
 99. thrombin-antithrombin III complex (see claim 19)
 100. P-selectin (see claim 19)
 101. thrombin (see claim 19)
102. von Willebrand factor (see claims 19, 20)
 103. tissue factor (see claims 19, 20, 22)
 104. thrombus precursor protein (see claim 19)
 105. MIF (see claim 20)
 106. pro-CNP (see claim 20)
 107. vWF-A1 (see claim 20)
 108. vWF-integrin binding domain (see claim 20)
 109. vWF-A3 (see claim 20)
 110. an interleukin (note: a specific interleukin must be specified) (see claim 22)
 111. A marker related to one of the above (note: a specific marker must be specified)

The claims are deemed to correspond to the species listed above as indicated. The following claim(s) are generic: claims 1-5, 12-15, and 23. Claims 6-11 and 16-22 are subject to species election. Note that examination of claims requiring more than one marker (for example claim 22) would require the election of multiple species from the list above (with payment of the appropriate additional examination fees).

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

According to PCT Rule 13.2 and to the guidelines in Section (f)(i)(A) of Annex B of the PCT Administrative Instructions, all alternatives of a Markush Group must have a common property or activity and a common structure that is a significant structural element. The subject-derived are not regarded as being of similar nature because they do not possess a common property or activity and do not share a common structure that is a significant structural element. Each marker represents a distinct protein that possesses a unique amino acid sequence and which is structurally and functionally distinct from the other markers. The markers differ with respect to patterns of expression and biological function. Furthermore, assay methods to detect the different subject-derived markers would involve different reagents in order to specifically detect the different markers; for example, antibodies specific for one marker would not recognize detect the other markers.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

EAST (USPAT, USPGPUB, EPO, JPO, DERWENT), search terms: (il-6 (il adj "6") il6 interleukin-6 (interleukin adj "6")), ((protein adj c) protein-c), (sepsis (severe adj inflammat.53) septic mods (multiple adj organ)). PubMed, search terms: sepsis OR septic OR mods OR sirs OR "systemic inflammatory" OR "multiple organ"; (il-6 OR "interleukin-6" OR "interleukin 6") AND "protein c".

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ビュークラー, ケネス, エフ.
アメリカ合衆国 92067 カリフォルニア州 ランチョ サンタ フェ, ピーオー ボックス
77

(72)発明者 アンダーバーグ, ジョセフ, マイケル
アメリカ合衆国 92024 カリフォルニア州 エンシニタス, ドラージュ コート 470

(72)発明者 マクファーソン, ポール, エイチ.
アメリカ合衆国 92024 カリフォルニア州 エンシニタス, エルヴァ コート 1449

