

(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2005-519271**(P2005-519271A)**

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 N	2 GO 4 5
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/53 S	
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/543 5 4 5 D	
GO 1 N 33/573	GO 1 N 33/569 L	
GO 1 N 33/96	GO 1 N 33/573 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-572358 (P2003-572358)	(71) 出願人	502007815
(86) (22) 出願日	平成15年2月28日 (2003. 2. 28)		プロミシアス ラボラトリーズ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月25日 (2004. 10. 25)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/006038		2 1 - 4 2 0 3, サンディエゴ, パシ
(87) 国際公開番号	W02003/073822		フィック センター ブールバード 5 7
(87) 国際公開日	平成15年9月12日 (2003. 9. 12)		3 9
(31) 優先権主張番号	10/087, 188	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成14年2月28日 (2002. 2. 28)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肝線維症の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、個体から得た試料中のアルファ 2 - マクログロブリン ($\alpha 2$ - M G) を検出し、該個体から得た試料中のヒアルロン酸 (H A) を検出し、個体から得た試料中のメタロプロテイナーゼ 1 (T I M P - 1) の組織阻害剤を検出し、さらに $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 の有無またはレベルに基づいてその個体における肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供する。本発明の方法は、例えば、中程度線維症ないし重度肝線維症 (F 2 ~ F 4) と非肝線維症ないし軽度肝線維症 (F 0 ~ F 1) とを区別するのに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体における肝線維症の存在または重症度を診断する方法であって、

(a) 個体から得た試料中の $\alpha 2$ - マクログロブリンを検出する工程と

(b) 該個体から得た試料中のヒアルロン酸 (HA) を検出する工程と、

(c) 該個体から得た試料中のメタロプロテイナーゼ 1 (TIMP - 1) の組織阻害剤を検出する工程と、

(d) $\alpha 2$ - MG、HA、および TIMP - 1 の存在またはレベルに基づいて該個体における肝線維症の存在または重症度を診断する工程と、を包含する、方法。

【請求項 2】

多くても 3 つの線維症マーカーを検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記個体から得た試料中で、PIINP、ラミニン、テネシン、IV型コラーゲン、VI型コラーゲン、YKL - 40、MMP - 3、MMP - 2、MMP - 9 / TIMP - 1 複合体、sFasリガンド、TGF - β 1、IL - 10、アポ A 1、アポ A 2、およびアポ B からなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを検出する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記マーカーが YKL - 40 である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記個体から得た試料中で、PIINP、ラミニン、テネシン、IV型コラーゲン、VI型コラーゲン、YKL - 40、MMP - 3、MMP - 2、MMP - 9 / TIMP - 1 複合体、sFasリガンド、TGF - β 1、IL - 10、アポ A 1、アポ A 2、およびアポ B からなる群から選択される 2 つ以上のマーカーを検出する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記個体がウイルス性肝炎を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記個体が C 型肝炎ウイルスに感染している、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 8】

前記個体が B 型肝炎ウイルスに感染している、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記個体が自己免疫性肝疾患を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記個体がアルコール性肝疾患を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記個体が脂肪性肝疾患を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記個体が薬物誘発性肝疾患を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記工程 (c) が、前記試料中の $\alpha 2$ - MG タンパク質のレベルを決定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記 $\alpha 2$ - MG タンパク質のレベルを、1 種類以上の $\alpha 2$ - MG 特異的結合剤を用いて決定する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 $\alpha 2$ - MG タンパク質のレベルを、1 種類以上の抗 $\alpha 2$ - MG 抗体を用いて決定する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記工程 (a) が、 $\alpha 2$ - MG 活性のレベルを決定することを包含する、請求項 1 に記載

50

の方法。

【請求項 17】

前記工程 (b) が、前記試料中の H A のレベルを決定することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 H A のレベルが、1 種類以上の H A 特異的結合剤を用いて決定される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 H A のレベルが、1 種類以上の H A 結合タンパク質を用いて決定される、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記 H A のレベルが、1 種類以上の抗 H A 抗体を用いて決定される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記工程 (c) が、前記試料中の T I M P - 1 タンパク質のレベルを決定することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 T I M P - 1 タンパク質のレベルが、1 種類以上の T I M P - 1 特異的結合剤を用いて決定される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 T I M P - 1 タンパク質のレベルが、1 種類以上の抗 T I M P - 1 抗体を用いて決定される、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記工程 (c) が、T I M P - 1 活性のレベルを決定することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記工程 (a) が $\alpha 2$ - M G タンパク質のレベルを決定することを包含し、

前記工程 (b) が前記 H A のレベルを決定することを包含し、そして

前記工程 (c) が前記 T I M P - 1 タンパク質のレベルを決定することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 26】

$\alpha 2$ - M G タンパク質、H A、および T I M P - 1 タンパク質の各々のレベルが、酵素結合アッセイを用いて決定される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記個体から単一の試料が得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記試料が血液、血清、血漿、尿、唾液、および肝臓組織からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記試料が血清試料である、請求項 28 に記載の方法。

40

【請求項 30】

非肝線維症または軽度肝線維症を、中程度の肝線維症ないし重度の肝線維症と区別することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

個体における非肝線維症または軽度肝線維症を中程度の肝線維症ないし重度の肝線維症と区別する方法であって、

(a1) $\alpha 2$ - M G と抗 $\alpha 2$ - M G 抗体との第 1 の複合体を形成するために適切な条件下で、該個体から得た試料の適当な希釈物を抗 $\alpha 2$ - M G 抗体と接触させる工程と、

(b) 未結合の分子を除去するため該第 1 の複合体を洗浄する工程と、

(c) $\alpha 2$ - M G を含有する第 1 の複合体の量を決定する工程と、

50

(d) H A と H A 結合タンパク質 (H A B P) との第 2 の複合体を形成するために適切な条件下で、該個体から得た試料の適切な希釈物を H A B P と接触させる工程と、

(e) 未結合の分子を除去するために該第 2 の複合体を洗浄する工程と、

(f) H A を含有する第 2 の複合体の量を決定する工程と、

(g) T I M P - 1 と抗 T I M P - 1 抗体との第 3 の複合体を形成するために適切な条件下で、該個体から得た試料の適切な希釈物を抗 T I M P - 1 抗体と接触させる工程と

(h) 未結合の分子を除去するために該第 3 の複合体を洗浄する工程と、

(i) T I M P - 1 を含有する第 3 の複合体の量を決定する工程と、

(j) $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 含有複合体の量に基づいて、該個体中の非 / 軽度の肝線維症を中程度 / 重度の肝線維症と区別する工程と、

10

を包含する、方法。

【請求項 3 2】

患者における抗線維症療法の有効性をモニターする方法であって、

(a) 抗線維症療法が施された患者から得た試料に含まれる $\alpha 2$ - マクログロブリンを検出する工程と、

(b) 該患者から得た試料に含まれるヒアルロン酸 (H A) を検出する工程と、

(c) 該患者から得た試料に含まれるメタロプロテイナーゼ 1 (T I M P - 1) の組織阻害剤を検出する工程と、

(d) $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 の存在またはレベルに基づいて該患者での肝線維症の存在または重症度を決定し、それによって抗線維症療法の有効性をモニターする工程と、を包含する、方法。

20

【請求項 3 3】

前記工程 (d) で決定された肝線維症の存在または重症度を、それよりも先の前記患者における肝線維症の存在または重症度と比較する工程をさらに含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

多くても 3 種類の線維症マーカーを検出することを包含する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記患者から得た試料中に、P I I I N P、ラミニン、テネイシン、I V 型コラーゲン、V I 型コラーゲン、Y K L - 4 0、M M P - 3、M M P - 2、M M P - 9 / T I M P - 1 複合体、s F a s リガンド、T G F - β 1、I L - 1 0、アポ A 1、アポ A 2、およびアポ B からなる群から選択される少なくとも 1 種類のマーカーを検出する工程をさらに包含する、請求項 3 2 に記載の方法。

30

【請求項 3 6】

工程 (a) が、前記試料中の $\alpha 2$ - M G タンパク質を決定することを包含する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記 $\alpha 2$ - M G タンパク質のレベルが、1 種類以上の抗 $\alpha 2$ - M G 抗体を用いて決定される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

40

前記工程 (b) が、前記試料中の H A のレベルを決定することを包含する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 H A のレベルが、1 種類以上の H A 結合タンパク質を用いて決定される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記工程 (c) が、前記試料中の T I M P - 1 タンパク質のレベルを決定することを包含する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 1】

T I M P - 1 タンパク質のレベルが、1 種類以上の抗 T I M P - 1 抗体を用いて決定され

50

る、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

個体の非 / 軽度肝線維症を中程度 / 重度肝線維症と区別する方法であって、

(a) 該個体から得た試料中の $\alpha 2$ - MG レベルを決定する工程と、

(b) 該個体から得た試料中の HA のレベルを決定する工程と、

(c) 該個体から得た試料中の TIMP - 1 レベルを決定する工程と、

(d) 該 $\alpha 2$ - MG のレベルが $\alpha 2$ - MG カットオフ値 X_1 よりも低いか、該 HA のレベルが HA カットオフ値 Y_1 よりも低いか、あるいは該 TIMP - 1 のレベルが TIMP - 1 カットオフ値 Z_1 よりも低い場合は、非 / 軽度肝線維症を有するものとして該個体を診断する工程であって、該 $\alpha 2$ - MG のレベルが $\alpha 2$ - MG カットオフ値 X_2 よりも高く、該 HA のレベルが HA カットオフ値 Y_2 よりも高く、および前記 TIMP - 1 のレベルが TIMP - 1 カットオフ値 Z_2 よりも高い場合は、中程度 / 重度肝線維症を有するものとして該個体を診断し、残りの個体を、不確定状態を有するものとして判断する工程と、を有する方法。

10

【請求項 43】

前記個体が、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、脂肪性肝疾患、および薬物誘発性肝疾患からなる群から選択される疾患を有する、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記個体が C 型肝炎ウイルスに感染している、請求項 43 に記載の方法。

20

【請求項 45】

前記試料が、血液、血清、血漿、尿、唾液、および肝臓組織からなる群から選択される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 46】

前記 $\alpha 2$ - MG のレベル、HA のレベル、および TIMP - 1 レベルそれぞれが血清試料中で決定される、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

X_1 が 1.8 mg / ml ないし 2.2 mg / ml の値であり、

Y_1 が 31 ng / ml ないし 39 ng / ml の値であり、

Z_1 が 900 ng / ml ないし $1,100 \text{ ng / ml}$ の値であり、

30

X_2 が 1.8 mg / ml ないし 2.2 mg / ml の値であり、

Y_2 が 54 ng / ml ないし 66 ng / ml であり、そして

Z_2 が $1,415 \text{ ng / ml}$ ないし $1,735 \text{ ng / ml}$ である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

$X_1 = 2.0 \text{ mg / ml}$ 、

$Y_1 = 35 \text{ ng / ml}$ 、

$Z_1 = 1,000 \text{ ng / ml}$ 、

$X_2 = 2.0 \text{ mg / ml}$ 、

$Y_2 = 60 \text{ ng / ml}$ 、そして

40

$Z_2 = 1,575 \text{ ng / ml}$ である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

$X_1 = 2.0 \text{ mg / ml}$ 、

$Y_1 = 37 \text{ ng / ml}$ 、

$Z_1 = 1,100 \text{ ng / ml}$ 、

$X_2 = 2.0 \text{ mg / ml}$ 、

$Y_2 = 60 \text{ ng / ml}$ 、そして

$Z_2 = 1,575 \text{ ng / ml}$ である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

肝線維症罹患率が 30 % までである集団で、該集団中の個体の少なくとも 65 % が、少な

50

くとも 80 % の正確度で、非 / 軽度線維症または中程度 / 重度線維症を有すると診断される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 51】

肝線維症罹患率が 30 % までである集団で、該集団中の個体の少なくとも 65 % が、少なくとも 90 % の正確度で、非 / 軽度線維症または中程度 / 重度線維症を有すると診断される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 52】

肝線維症罹患率が 30 % までである集団で、該集団中の個体の少なくとも 65 % が、少なくとも 90 % の陽性予測値および少なくとも 90 % の陰性予測値で、非 / 軽度線維症または中程度 / 重度線維症を有すると診断される、請求項 42 に記載の方法。

10

【請求項 53】

肝線維症罹患率が 10 % までである集団で、該集団中の個体の少なくとも 70 % が、少なくとも 90 % の正確度で非 / 軽度線維症または中程度 / 重度線維症を有すると診断される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 54】

個体の肝線維症の存在または重症度を診断する方法であって、

(a) 該個体の第 1 の肝線維症マーカー X のレベルをカットオフ値 X1 と比較し、該第 1 の肝線維症マーカー X に対して該個体が陽性であるかどうかを決定する工程と、

(b) 該個体の第 2 の肝線維症マーカー Y のレベルをカットオフ値 Y1 と比較し、前記第 2 の肝線維症マーカー Y に対して該個体が陽性であるかどうかを判断する工程と、

20

(c) X および Y に対して陽性または陰性であることに基づいて、該個体の肝線維症の存在または重症度を診断する工程と、

を包含し、肝線維症罹患率が 40 % までである集団で、該母集団の少なくとも 65 % の個体が少なくとも 90 % の正確度で診断される、方法。

【請求項 55】

さらに、(d) 前記個体の第 3 の肝線維症マーカー Z のレベルをカットオフ値 Z1 と比較して、該第 3 の肝線維症マーカー Z に対して該個体が陽性であるかどうかを判断する工程と、

(e) X、Y、および Z に対して陽性または陰性であることに基づいて、該個体の肝線維症の存在または重症度を診断する工程と、

30

をさらに包含する、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記第 1 の肝線維症マーカーが $\alpha 2$ - MG であり、前記第 2 の肝線維症マーカーが HA であり、そして前記第 3 の肝線維症マーカーが TIMP - 1 である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

少なくとも 3 種類の肝線維症マーカーのレベルが比較される、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 58】

3 種類の肝線維症マーカーのレベルが比較される、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 59】

少なくとも 4 種類の肝線維症マーカーのレベルが比較される、請求項 55 に記載の方法。

40

【請求項 60】

少なくとも 5 種類の肝線維症マーカーのレベルが比較される請求項 55 に記載の方法。

【請求項 61】

前記診断が、非または軽度肝線維症を、中程度の肝線維症ないし重度の肝線維症と区別する、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 62】

肝線維症罹患率が 30 % までの集団で、該母集団の少なくとも 65 % の個体が、少なくとも 93 % の正確度で診断される、請求項 54 または請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

50

肝線維症罹患率が20%までの集団で、該母集団の少なくとも70%の個体が、少なくとも94%の正確度で診断される、請求項54または請求項61に記載の方法。

【請求項64】

肝線維症罹患率が10%までの集団で、該集団の少なくとも70%の個体が、少なくとも96%の正確度で診断される、請求項54または請求項61に記載の方法。

【請求項65】

個体の肝線維症の存在または重症度を診断する方法であって、

(a) 該個体の第1の肝線維症マーカーXのレベルをカットオフ値X1と比較して、該第1の肝線維症マーカーXに対して該個体が陽性であるかどうかを決定する工程と、

(b) 該個体の第2の肝線維症マーカーYのレベルをカットオフ値Y1と比較し、該第2の肝線維症マーカーYに対して該個体が陽性であるかどうかを決定する工程と、 10

(c) XおよびYに対する陽性または陰性に基づいて該個体の肝線維症の存在または重症度を診断する工程と、

を包含し、ここで、該カットオフ値X1およびY1を個々に最適化して所望の性能特性を得る、方法。

【請求項66】

さらに、(d) 前記個体の第3の肝線維症マーカーZのレベルをカットオフ値Z1と比較し、該第3の肝線維症マーカーZに対して該個体が陽性であるかどうかを決定する工程と、

(e) X、Y、およびZに対する陽性または陰性に基づいて前記個体の肝線維症の存在または重症度を診断する工程と、 20

を包含し、ここで、前記カットオフ値X1、Y1、およびZ1を個々に最適化して所望の性能特性を得る、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記第1の肝線維症マーカーが $\alpha 2$ -MGであり、前記第2の肝線維症マーカーがHAであり、さらに前記第3の肝線維症マーカーがTIMP-1である、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記カットオフ値が、実験計画法(DOE)分析を用いて最適化される、請求項65に記載の方法。 30

【請求項69】

少なくとも3種類の肝線維症マーカーのレベルが比較される、請求項66に記載の方法。

【請求項70】

3種類の肝線維症マーカーのレベルを比較される、請求項66に記載の方法。

【請求項71】

前記診断が非または軽度の肝線維症を中程度ないし重度の肝線維症と区別する、請求項65に記載の方法。

【請求項72】

個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法であって、

(a) 該個体中の第1の肝線維症マーカーXのレベルを2つのカットオフ値X1およびX2と比較し、該第1の肝線維症マーカーXに対して該個体が陽性であるかどうかを判断する工程と、 40

(b) 該個体の第2の肝線維症マーカーYのレベルを2つのカットオフ値Y1およびY2と比較し、該第2の肝線維症マーカーYに対して該個体が陽性であるかどうかを判断する工程と、

(c) XおよびYに対する陽性または陰性に基づいて、該個体の肝線維症の存在または重症度を診断する工程と、

を包含し、ここで、該カットオフ値X1、Y1、X2、およびY2を個々に最適化して所望の性能特性を得る、方法。

【請求項73】

さらに、(d) 前記個体における第3の肝線維症マーカーZのレベルを2つのカットオフ値Z1およびZ1と比較し、該第3の肝線維症マーカーZに対して該個体が陽性であるかどうかを判断する工程と、

(e) X、Y、およびZに対する陽性または陰性に基づいて該個体の肝線維症の存在または重症度を診断する工程と、

を包含し、ここで、該カットオフ値X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2が個々に最適化されて所望の性能特性を与える、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

前記カットオフ値が、実験計画法(DOE)分析を用いて最適化される、請求項73に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、概ね肝臓病学および線維症の分野に関し、より詳しくは肝線維症の診断に一緒に用いられる複数の血清学的マーカーのパネルに関する。

【背景技術】

【0002】

肝臓、腎臓、肺、および他の器官の進行性線維症は、しばしば臓器移植または死に至る器官の機能不全を生じ、米国および世界中で何百万もの人々が罹患している。例えば肝線維症は、米国では非悪性の胃腸管系の主な死亡原因であり、線維症の進行は、慢性肝疾患の患者において罹患率および死亡率を決定する唯一最大の要因である。さらに、線維形成の過程は、多様な病因による複数の肝疾患に共通したものであり、該肝疾患として慢性のウイルス性B型およびC型肝炎、自己免疫性肝炎等の自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、脂肪肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、ならびに薬物誘導性肝疾患が挙げられる。これらの障害に見られる線維症は、ウイルス感染、アルコール、または薬物等による肝臓に対する慢性的な侵襲が原因である。

20

例えばC型肝炎は、米国では慢性肝疾患の主な原因の1つであり、390万の人々が慢性的にC型肝炎ウイルス(HCV)に感染していると推定され、毎年、新たに約30,000件の急性HCV症例が報告されている(Alter、Semin. Liver Dis. 15:5-14(1995))。C型肝炎の罹患率は、米国で1.8%であると推定され、慢性C型肝炎感染による死亡は年間10,000件にまでおよぶと考えられている(Alter、上掲、1995)。

30

肝線維症が細胞外マトリックスの蓄積を生じる可逆的な過程である一方で、肝硬変は、完全に実質を囲んで結節を形成するマトリックスの厚いバンドが特徴である不可逆的な過程である。治療がなされなければ、肝線維症は硬変に至り、最終的には末期の肝疾患または癌に至る。肝硬変の一般症状は、しばしば気づかれない。例えば、デンマークの一般人口から得た多数の試料では、肝硬変の罹患率は4.5%であり、そのうち三分の一が死亡時まで診断を受けていなかった(Graudal、J. Intern. Med. 230:165-171(1991))。

40

【0003】

肝線維症を適時正確に診断することが効果的に治療をおこなう上で重要である。例として、C型肝炎および硬変の患者は、それほど進行していな疾患の患者と比べて、 α -インターフェロンによる治療効果を示しにくい(Davis、Hepatology 26(Supp. 1):122-127S)。同様に、慢性HCV感染の治療は、組織学的に進行した非代償性疾患の患者では禁忌となる(NIH Consensus Development Conference Panel Statement、Hepatology 26(Suppl. 1):25-105S(1997))。早期診断の重要性は、硬変に関連した静脈瘤破裂等の重度の早期合併症によってその重要性がさらに強調

50

されている。すなわち、これらの合併症は、硬変を早期に検出することによって予防することができる (C a l e s および P a s q u a l、G a s t r o e n t e r o l . C l i n . B i o l . 12:245-254 (1988))。

【0004】

線維症肝の有無または重症度の診断は困難であり、肝生検が現在利用できる最も信頼された方法である。残念ながら、肝生検を制限するものが複数ある。すなわち、約30%の患者で痛みがあること、出血または感染のような重度の合併症の危険性があること、死亡率が10,000件あたり3件あること、さらに入院費用がかかることである (N o r d、G a s t r o i n t e s t . E n d o s c . 28:102-104 (1982); C a d r a n e l ら、H e p a t o l o g y 32:47-481 (2000); および P o y n a r d ら、C a n . J . G a s t r o e n t e r o l . 14:543-548 (2000))。さらに、C型肝炎のような緩慢に進行する疾患では、疾患の進行を連続的に評価するために生検を繰り返すことが必要となるため、処置の危険性および費用がさらに増すことになる。最終的には、肝臓での病理学的変化が不均一に広がるために、生検では疾患が検出されない可能性がある。すなわち、生検を受けた症例のうち、あとで偽陰性とされる例がかなりの割合であることは、驚くことではない (N o r d、上掲、1982)。

10

【0005】

何年もの間、肝疾患での線維症過程を反映し、かつ肝生検の代わりとしての役割を果たすことができる生化学的または血清学的マーカーが捜し求められてきた。しかし、どのような単一マーカーであっても、線維症を検出または段階を評価する際の生検処置の代わりとなりうるような十分に優れたものではなかった。したがって、肝線維症の有無または重症度を診断する非侵襲的方法が求められている。本発明は、連続試験に適し、かつ肝線維症を検出するための簡便で信頼できる方法を提供することにより、このような要望に応える。関連する利点もまた提供する。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、個体から得た試料中の $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2$ -M G)を検出することと、個体から得た試料中のヒアルロン酸(H A)を検出することと、個体から得た試料中のメタロプロテアーゼ-1の組織阻害剤(T I M P - 1)を検出することと、 $\alpha 2$ -M G、H A、およびT I M P - 1の存在またはレベルにもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することとにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供する。本発明の方法は、例えば、中程度線維症ないし重度肝線維症(F 2 ~ F 4)と非肝線維症ないし軽度肝線維症(F 0 ~ F 1)とを区別するのに有用である。

30

【0007】

肝線維症の有無または重症度を診断するための本発明の方法は、限定はされないが、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎等の自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、脂肪肝疾患、および薬物誘導性肝疾患等の多様な患者母集団で有用である。一実施形態では、本発明の方法を用いて、C型肝炎ウイルスに感染された個体で、肝線維症の有無または重症度を診断する。

40

【0008】

試料中の $\alpha 2$ -M G、H A、およびT I M P - 1を検出するために、多様な手段が有用である。一実施形態では、例えば、抗 $\alpha 2$ -M G抗体等、1種類以上の $\alpha 2$ -M G特異的結合因子を用いて、診断される個体から得た試料中の $\alpha 2$ -M Gタンパク質のレベルを測定することにより、本発明を実施する。別の実施形態では、個体から得た試料中の $\alpha 2$ -M G活性のレベルを測定することによって、本発明を実施する。

【0009】

本発明の方法では、多様な手段を用いて、試料中のヒアルロン酸を検出することもでき

50

る。一実施形態では、例えば、H A 結合タンパク質 (H A B P) または抗 H A 抗体等の 1 種類以上の H A 特異的結合因子を用いて試料中の H A のレベルを測定することによって、本発明を実施する。

【 0 0 1 0 】

同様に、本発明の方法では、多様な手段を用いて、試料中の T I M P - 1 を検出することができる。一実施形態では、診断される個体から得た試料中の T I M P - 1 タンパク質のレベルを測定することにより本発明を実施する。T I M P - 1 タンパク質のレベルを、例えば、抗 T I M P - 1 抗体等の 1 種類以上の T I M P - 1 特異的結合因子を用いて測定することができる。別の実施形態では、診断される個体から得た試料中の T I M P - 1 活性をアッセイすることにより本発明を実施する。

10

本発明は、例えば、個体から得た試料中の $\alpha 2$ - M G タンパク質のレベルを測定することと、個体から得た試料中の H A のレベルを測定することと、個体から得た試料中の T I M P - 1 タンパク質のレベルを測定することと、ならびに $\alpha 2$ - M G タンパク質、H A、および T I M P - 1 タンパク質のレベルにもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することとにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供する。必要に応じて、 $\alpha 2$ - M G タンパク質、H A、および T I M P - 1 タンパク質のレベルを、それぞれ酵素結合アッセイを用いて測定することができる。

【 0 0 1 1 】

本発明の方法を実施する上で多様な試料が有用であり、該試料として血液、血清、血漿、尿、唾液、および肝組織が挙げられる。一実施形態では、診断される個体から単一の試料を入手する。このような試料は、例えば、血清試料であり得る。また該試料としては、例えば、組織試料 (例えば、肝生検試料) であり得る。

20

【 0 0 1 2 】

本発明はさらに、個体での中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する方法を提供する。この方法は、 $\alpha 2$ - M G と抗 $\alpha 2$ - M G 抗体とからなる第 1 の複合体を形成するのに適した条件下で、個体から得た試料の適当な希釈物を、抗 $\alpha 2$ - M G 抗体と接触させる工程と、第 1 の複合体を洗浄して、未結合分子を除去する工程と、 $\alpha 2$ - M G を含有する第 1 の複合体の量を測定する工程と、H A と H A 結合タンパク質とからなる第 2 の複合体を形成するのに適した条件下で、個体から得た試料の適当な希釈物を、H A 結合タンパク質と接触させる工程と、第 2 の複合体を洗浄して、未結合分子を除去する工程と、H A を含有する第 2 の複合体の量を測定する工程と、T I M P - 1 と抗 T I M P - 1 抗体とからなる第 3 の複合体を形成するのに適した条件下で、個体から得た試料の適当な希釈物を、抗 T I M P - 1 抗体と接触させる工程と、第 3 の複合体を洗浄して、未結合分子を除去する工程と、T I M P - 1 を含有する第 3 の複合体の量を測定する工程と、 $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 を含有する複合体の量にもとづいて、個体での中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する工程とを含む。

30

【 0 0 1 3 】

付加的な血清学的マーカーを検出することなく、3 種類のマーカー、すなわち $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 を検出することにより本発明の方法を実施でき、また本発明の方法を 1 種類以上の付加的マーカーを検出する方法と組み合わせることもできる。したがって、一実施形態では、 $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 を検出し、さらに以下の線維症マーカーの少なくとも 1 つを検出することにより本発明を実施する。すなわち、N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (P I I I N P)、ラミニン、テネシン、I V 型コラーゲン、V I 型コラーゲン、Y K L - 4 0、M M P - 3、M M P - 2、M M P - 9 / T I M P - 1 複合体、s F a s リガンド、T G F - β 1、I L - 1 0、アポ A 1、アポ A 2、またはアポ B である。さらに別の実施形態では、肝線維症の有無または重症度を、個体から得た試料中の $\alpha 2$ - M G、H A、T I M P - 1、および Y K L - 4 0 を検出することによって診断する。

40

【 0 0 1 4 】

50

本発明は、抗線維症療法を施された患者から得た試料中の $\alpha 2$ -マクログロブリンを検出することと、患者から得た試料中のヒアルロン酸(HA)を検出することと、患者から得た試料中のメタロプロテアーゼ-1の組織阻害剤(TIMP-1)を検出することと、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1の存在またはレベルにもとづいて、患者の肝線維症の有無または重症度を測定することとにより抗線維症療法の効果をモニターすることによって、患者で抗線維症療法の効果をモニターする方法も提供する。このような方法はさらに、必要に応じて、工程(d)で測定された肝線維症の有無または重症度を、それより早い時期での患者の肝線維症の有無または重症度と比較することを含むことができる。本発明の方法を用いて、例えば、1つ以上の抗線維症療法を処置された患者で、期間中の線維症の進行または軽減をモニターすることができ、また、例えば、2通り以上の抗線維症療法の効果を比較することができる。

10

【0015】

一実施形態では、多くとも3種類の線維症マーカーを検出する。別の実施形態では、本方法は、PIIPNP、ラミニン、テネイシン、IV型コラーゲン、VI型コラーゲン、YKL-40、MMP-3、MMP-2、MMP-9/TIMP-1複合体、sFasリガンド、TGF- β 1、IL-10、アポA1、アポA2、およびアポBからなる群より選択される少なくとも1つのマーカーを、患者から得た試料中で検出する工程を含む。

【0016】

本発明の方法では、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1を検出するために、多様な手段が有用である。例えば試料中の $\alpha 2$ -MGタンパク質のレベルを測定することにより工程(a)を実施できる。一実施形態では、1つ以上の抗 $\alpha 2$ -MG抗体を用いて、 $\alpha 2$ -MGタンパク質のレベルを測定する。例えば試料中のHAのレベルを測定することにより工程(b)を実施できる。一実施形態では、1つ以上のHA結合タンパク質を用いて、HAのレベルを測定する。例えば該試料中のTIMP-1タンパク質のレベルを測定することにより工程(c)を実施できる。一実施形態では、1つ以上の抗TIMP-1抗体を用いて、TIMP-1タンパク質のレベルを測定する。

20

【0017】

さらに本明細書中では、個体から得た試料中の $\alpha 2$ -MGレベルを測定することと、個体から得た試料中のHAレベルを測定することと、個体から得た試料中のTIMP-1レベルを測定することと、さらに $\alpha 2$ -MGレベルが $\alpha 2$ -MGカットオフ値X1を下回る場合、HAレベルがHAカットオフ値Y1を下回る場合、またはTIMP-1レベルがTIMP-1カットオフ値Z1を下回る場合に、非肝線維症または軽度肝線維症であるとして個体を診断することと、 $\alpha 2$ -MGレベルが $\alpha 2$ -MGカットオフ値X2を上回り、HAレベルがHAカットオフ値Y2を上回り、かつTIMP-1レベルがTIMP-1カットオフ値Z2を上回る場合に、中程度または重度の肝線維症であるとして個体を診断することと、それ以外の個体は確定していない状態であると診断することとにより、個体での中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する方法を提供する。

30

【0018】

$\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1マーカーのレベルに対する二重(デュアル)カットオフ値にもとづく本発明の方法は、多様な患者母集団で、中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別するのに有用である。本発明の方法は、例えば、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎等の自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、脂肪肝疾患、または薬物誘導性肝疾患等の肝疾患を患う個体を診断するのに有用である。一実施形態では、本発明の方法を用いて、C型肝炎ウイルスに感染された患者で、中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する。本発明の方法に有用な試料としては、限定されないが、血液、血清、血漿、尿、唾液、および肝組織が挙げられる。一実施形態では、診断される個体から得た1つ以上の血清試料中の $\alpha 2$ -MGレベル、HAレベル、およびTIMP-1レベルを測定することにより本発明の方法を実施する。

40

50

【0019】

したがって、本発明は、例えば、個体での中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する方法を提供し、その中で、区別は、 1.8 mg/ml ないし 2.2 mg/ml のX1カットオフ値と、 31 ng/ml ないし 39 ng/ml のY1カットオフ値と、 900 ng/ml ないし $1,100 \text{ ng/ml}$ のZ1カットオフ値と、 1.8 mg/ml ないし 2.2 mg/ml のX2カットオフ値と、 54 ng/ml ないし 66 ng/ml のY2カットオフ値と、 $1,415 \text{ ng/ml}$ ないし $1,735 \text{ ng/ml}$ のZ2カットオフ値とにもとづく。特定の実施形態では、区別は、 2.0 mg/ml のX1カットオフ値と、 35 ng/ml のY1カットオフ値と、 $1,000 \text{ ng/ml}$ のZ1カットオフ値と、 2.0 mg/ml のX2カットオフ値と、 60 ng/ml のY2カットオフ値と、 $1,575 \text{ ng/ml}$ のZ2カットオフ値とにもとづく。別の実施形態では、区別は、 2.0 mg/ml のX1カットオフ値と、 37 ng/ml のY1カットオフ値と、 $1,100 \text{ ng/ml}$ のZ1カットオフ値と、 2.0 mg/ml のX2カットオフ値と、 60 ng/ml のY2カットオフ値と、 $1,575 \text{ ng/ml}$ のZ2カットオフ値とにもとづく。さらに別の実施形態では、最大で30%の肝線維症罹患率を有する母集団で、少なくとも90%の正確度で、この母集団で個体の少なくとも65%を、非/軽度の線維症または中程度/重度の線維症であるとして診断するように、X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2を選択する。別の実施形態では、最大で30%の肝線維症罹患率を有する母集団で、少なくとも90%の陽性予測値および少なくとも90%の陰性予測値で、該母集団の個体の少なくとも65%を、非/軽度の線維症または中程度/重度の線維症であるとして診断するように、X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2を選択する。さらに別の実施形態では、最大で10%の線維症罹患率を有する母集団で、少なくとも90%の正確度で、この母集団の個体の少なくとも70%を、非/軽度の線維症または中程度/重度の線維症であるとして診断するように、X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2を選択する。

【0020】

本発明はまた、個体の第1の線維症マーカーXのレベルを、カットオフ値X1と比較して、個体が第1の線維症マーカーXに対して陽性であるかを測定することと、個体の第2の線維症マーカーYのレベルを、カットオフ値Y1と比較して、個体が第2の線維症マーカーYに対して陽性であるかを測定することと、XおよびYに対する陽性または陰性にもとづいて個体の肝線維症の有無または重症度を診断することとにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法も提供し、最大で40%の線維症罹患率を有する母集団で、少なくとも90%の正確度で、この母集団の個体の少なくとも65%を診断する。

【0021】

本発明の方法は、必要に応じて、個体の第3の線維症マーカーZのレベルを、カットオフ値Z1と比較して、個体が第3の線維症マーカーZに対して陽性であるかを測定することと、X、Y、およびZに対する陽性または陰性にもとづいて個体の肝線維症の有無または重症度を診断することを包含することができる。一実施形態では、第1の線維症マーカーは $\alpha 2\text{-MG}$ であり、第2の線維症マーカーはHAであり、第3の線維症マーカーはTIMP-1である。

【0022】

別の実施形態では、少なくとも3つの線維症マーカーのレベルを比較し、さらに別の実施形態では、厳密に3つの線維症マーカーのレベルを比較する。付加的な実施形態では、少なくとも4つのまたは少なくとも5つの線維症マーカーのレベルを比較する。本発明の方法は、例えば、中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症または軽度肝線維症とを区別するのに有用であり得る。

【0023】

具体的な実施形態では、本発明の方法は、最大で30%の線維症罹患率を有する母集団で、個体の少なくとも65%を、少なくとも93%の正確度で診断をおこなう。さらに別の実施形態では、本発明の方法は、最大で20%の線維症罹患率を有する母集団で、個体

の少なくとも70%を、少なくとも94%の正確度で診断するのに役立つ。さらに別の実施形態では、本発明の方法は、最大で10%の線維症罹患率を有する集団で、個体の少なくとも70%を、少なくとも96%の正確度で診断を行なうのに役立つ。

【0024】

本発明はさらに、個体の第1の線維症マーカーXのレベルを、カットオフ値X1と比較して、個体が第1の線維症マーカーXに対して陽性であるかを測定することと、個体の第2の線維症マーカーYのレベルを、カットオフ値Y1と比較して、個体が第2の線維症マーカーYに対して陽性であるかを測定することと、XおよびYに対する陽性または陰性にもとづいて個体の肝線維症の有無または重症度を診断することにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供し、カットオフ値X1およびY1を個々に最適化して所望の性能特性を与える。

10

【0025】

必要に応じて、本発明の方法は、個体の第3の線維症マーカーZのレベルを、カットオフ値Z1と比較して、個体が第3の線維症マーカーZに対して陽性であるかを測定する工程と、X、Y、およびZに対する陽性または陰性にもとづいて個体の肝線維症の有無または重症度を診断する工程とを包含することができ、カットオフ値X1、Y1、およびZ1を個々に最適化して所望の性能特性を与える。一実施形態では、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1のレベルを比較する。別の実施形態では、実験計画法(DOE)分析を用いて、カットオフ値を最適化する。さらに別の実施形態では、厳密に3種類、少なくとも3種類、少なくとも4種類、または少なくとも5種類の線維症マーカーのレベルを比較する。本発明の方法は、例えば中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症または軽度肝線維症とを区別するのに有用であり得る。

20

【0026】

本発明により、さらに、個体の第1の線維症マーカーXのレベルを、2つのカットオフ値X1およびX2と比較して、個体が第1の線維症マーカーXに対して陽性であるかを測定することと、個体の第2の線維症マーカーYのレベルを、2つのカットオフ値Y1およびY2と比較して、個体が第2の線維症マーカーYに対して陽性であるかを測定することと、XおよびYに対する陽性または陰性にもとづいて個体の肝線維症の有無または重症度を診断することにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供し、カットオフ値X1、Y1、X2、およびY2を個々に最適化して所望の性能特性を与える。本発明の方法はさらに、個体の第3の線維症マーカーZのレベルを、2つのカットオフ値Z1およびZ2と比較して、個体が第3の線維症マーカーZに対して陽性であるかを測定する工程と、X、Y、およびZに対する陽性または陰性にもとづいて個体の肝線維症の有無または重症度を診断する工程とを包含し得、カットオフ値X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2を個々に最適化して所望の性能特性を与える。例えばDOE分析を用いて、カットオフ値を簡便に最適化できる。

30

【0027】

(発明の詳細な説明)

本明細書中に開示するように、慢性C型肝炎であり、かつF0ないしF4の既知のMetavir段階(線維症スコア)を有する患者母集団で、多数の生化学的マーカーの血清レベルを解析した。F0は非常に低度の線維症または線維症が存在しないことを表し、F1、F2、およびF3は、中程度の線維症段階を表し、F4は、重度の線維症を表す(Knodellら、Hepatology 1:431-435 (1981))。表2および3を参照せよ。複数のカットオフ値の同時変化に対する実験計画法(DOE)分析を用いて、ヒアルロン酸(HA)、PIIINP、IV型コラーゲン、および $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2$ -MG)で構成される4マーカーパネルを同定し、60%の線維症罹患率を有する患者母集団で、F2~F4(中程度ないし重度)の線維症から、F0~F1(非または軽度)の線維症を約77%の正確度で区別することが可能になった。

40

【0028】

さらに本明細書中実施例Iで開示するように、DOE分析を用いてカットオフを最適化

50

した際、F 2 ~ F 4 線維症から F 0 ~ F 1 線維症を区別する際に、2 種類の 3 マーカーパネル ($\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{TIMP} - 1$ および $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{YKL} - 40$) がまた適切に働いた。特に、 $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{TIMP} - 1$ パネルおよび $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{YKL} - 40$ パネルはそれぞれ、4 マーカーパネルより優れた能力を示し、調査母集団で、F 2 ~ F 4 線維症から F 0 ~ F 1 線維症を約 80 % の正確度で区別することができた。例えば、表 6 の 15 行目に見られるように、 $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{TIMP} - 1$ パネルは、60 % の線維症罹患率を有する調査母集団で、感度 83.48 % および特異度 75.95 % で作用した。これらの結果により、 $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{TIMP} - 1$ である 3 マーカーパネルは、中程度から重度の線維症から、非または軽度の線維症を区別するのに有用であり得ることが証明される。

10

【0029】

これらの知見にもとづいて、本発明は、個体から得た試料中の $\alpha 2 - \text{MG}$ を検出することと、個体から得た試料中の HA を検出することと、個体から得た試料中の $\text{TIMP} - 1$ を検出することと、 $\alpha 2 - \text{MG}$ 、 HA 、および $\text{TIMP} - 1$ の有無またはレベルにもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供する。本発明の方法は、例えば、中程度から重度 (F 2 ~ F 4) の肝線維症から非または軽度 (F 0 ~ F 1) の肝線維症を区別するのに有用であり得る。

【0030】

(肝障害および他の線維症障害)

本発明の方法は、線維症が特徴である肝障害の危険性があるか、またはその 1 つ以上の症状を有する個体を含む多様な個体で、肝線維症の有無または重症度を診断するのに有用であり得る。本発明の方法を用いて、例えば、A 型、B 型、もしくは C 型肝炎ウイルス等のようなウイルス性肝炎または $\text{HIV} - 1$ 等のヒト免疫不全ウイルス (HIV)、慢性持続性肝炎または慢性活動性肝炎、自己免疫性肝炎等の自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、脂肪肝疾患、非アルコール性脂肪肝疾患および非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を含む非アルコール性肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、胆管閉鎖症、医療処置が原因の肝疾患 (薬物誘導性肝疾患)、あるいは先天性肝疾患を有する個体で、肝線維症を診断することができる。本発明の方法は、例えばメトトレキサート療法が原因の潜在的な肝障害の懸念を緩和するのに非常に有用であり得る。本発明の非侵襲的方法を用いて、肝障害のリスクを伴うメトトレキサートまたは他の薬物で処置される個体の肝線維症を定期的にモニターすることを、肝生検に伴うリスクなしに、簡便に実施することができる。

20

30

【0031】

一実施形態では、本発明の方法は、F 2、F 3、または F 4 の Metavir スコアを有する個体から、F 0 または F 1 の Metavir スコアを有する個体を区別するのに有用である。 Metavir スコアリングは、肝生検標本を段階評価するために十分に受け入れられているシステムであり、 $\text{Knodel} 1$ (上掲、1981) に記載されている。F 0 は線維症していないことに相当し、F 1 は隔壁を持たない門脈の線維症を示す。F 2 は少数の隔壁を持つ門脈の線維症を示す。F 3 は硬変のない多数の隔壁を示す。F 4 は硬変を示す。

40

【0032】

本発明の方法は、肝線維症、肺線維症、腎線維症、前立腺線維症、乳腺線維症を含むが、これらに限定されない多様な線維症障害に関連する線維症の有無または重症度を診断するのに有用であることが理解される。本発明の方法を適用して、制限なく、例えば特発性肺線維症または肺気腫のような肺線維症、腎線維症、膀胱線維症、尿管周囲線維症または後腹膜線維症、心内膜心筋線維症、大動脈瘤線維症、リウマチ関節炎等のリウマチ様疾患または全身性エリテマトーデス、あるいはアルツハイマー症等の他の線維症障害の有無または重症度を診断することができる。肝線維症の有無または重症度を診断するのに有用な $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{TIMP} - 1$ 、 $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{YKL} - 40$ 、または $\alpha 2 - \text{MG} / \text{HA} / \text{TIMP} - 1 / \text{YKL} - 40$ パネル、あるいは本明細書に開示するマーカーの他

50

の組み合わせを用いて、別の障害での線維症の有無または重症度を診断することも可能であることが理解される。

【0033】

本発明の診断方法は、慢性または活動性疾患を有する個体、線維症疾患の1つ以上の症状を有する個体、無症状または健康な個体、および1つ以上の線維症疾患の危険にさらされている個体を含む多様な個体に適用可能であることが理解される。さらに、本発明の方法は、例えば、疾患の初期診断を裏づけするために、または線維症疾患の従来の一の診断を用いて個体の線維症の進行を測定する上で有用であり得ることが当業者にとって明確である。本発明の方法を用いて、一定期間にわたり線維症疾患の状態をモニターすることができ、必要に応じて、さらに治療処置の効果をモニターすることができる。必要に応じて、治療を受けた個体の試料から得た結果を、例えば治療以前の個体のベースライン結果、治療中のそれより早い時期の結果、または過去の値もしくは参考の値と比較することができる。

10

【0034】

本発明の方法は、個体の肝線維症または他の線維症の重症度を診断するのに有用である。したがって、本発明の方法は、肝線維症または他の線維症の「段階」または程度を測定するのに有用であり得る。一実施形態では、本発明の方法を用いて、例えばウイルス性C型肝炎を有する個体のような個体のMetavirスコアを測定する。上記に示したように、Metavirスコアリングは、F0（非存在）、F1（隔壁を持たない門脈の線維症）、F2（少数の隔壁を持つ門脈の線維症）、F3（硬変は存在せずに、多数の隔壁を持つ門脈の線維症）、およびF4（硬変）の値を用いた適切に確立された線維症スコアリングシステムである。他の実施形態では、本発明の方法を用いて、例えばウイルス性C型肝炎を有する個体のような個体のKnodelスコア（組織活性指標）、Ishakスコア（改良組織活性指標）、またはSchaeuer分類を測定する。さらに別の実施形態では、本発明の方法を用いて、例えばBruntの提言（Bruntら、Am. J. Gastroenterol. 94: 2467-2474 (1999)）にしたがって重症度を測定することによって、NASHを有する個体の肝線維症の重症度を測定する。本発明の方法にしたがって肝線維症または他の線維症の重症度を測定する際、線維症の重症度を示す結果を報告する上で、上記のまたは当該技術分野で受け入れられているかもしくは明確に定義されているスコアリングシステムのいずれも有用であり得ることが理解される。

20

30

【0035】

（試料）

本発明の方法を実施する際、様々な試料が有用であり得、例えば、血液、血清、血漿、尿、唾液、および肝組織が挙げられる。一実施形態では、診断される個体から単一の試料を入手する。このような試料は、例えば血清試料であり得る。

【0036】

本明細書で使用されるように、用語「試料」とは、 $\alpha 2$ -MG、HA、またはTIMP-1等の線維症マーカーを1種類以上含む生物学的標本を意味する。試料としては、例えば、全血、血漿、唾液、尿、滑液、または他の体液等の液状試料、あるいは肺、肝臓、腎臓、前立腺、または胸部組織試料等の組織試料が可能である。当業者は、必要に応じて、分析前に、液状試料を希釈できることを理解している。

40

【0037】

当業者は、診断される個体から単一の試料を入手でき、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1の検出前に細分できることを理解している。当業者はまた、必要に応じて、診断される個体から2つ以上の試料を入手することができ、試料が同一または異なる種類であってもよいことを理解している。一実施形態では、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1をそれぞれ血清試料で検出する。別の実施形態では、単一の血清試料を個体から入手し、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1を検出する前に細分する。

【0038】

50

($\alpha 2$ - マクログロブリン)

本発明の方法は、部分的に、試料中の $\alpha 2$ - マクログロブリンを検出することに依拠する。 $\alpha 2$ - MGは、血漿の保存された非常に多量の成分であり、広範なプロテアーゼ結合タンパク質として機能して、組織液から活性プロテアーゼを除去する。活性部位プロテアーゼ阻害剤とは異なり、 $\alpha 2$ - マクログロブリンファミリーのメンバーは、それらのプロテアーゼ基質の触媒作用的活性を不活性化することはないが、 $\alpha 2$ - MGファミリーメンバーのフォールド内への標的プロテアーゼの物理的な取り込みにより作用する。 $\alpha 2$ - MG自体は、標的プロテアーゼにより切断され、 $\alpha 2$ - MG分子の再編成により、 $\alpha 2$ - MG分子の内部ポケット内に標的プロテアーゼを隔離する (Starkleyら、Biochem. J. 131: 823 - 831 (1973))。10 $\alpha 2$ - MGに取り込まれたプロテアーゼは、タンパク質等の巨大分子基質と相互作用することを立体的に妨げられる一方で、アミドおよびエステル化合物等の低分子質量基質に対して依然活性があり、 $\alpha 2$ - MGケージ中に拡散して酵素部位に行き着くことができる。したがって、 $\alpha 2$ - MG活性は、タンパク質分解活性を阻害するがプロテアーゼ基質のアミド分解活性を阻害しない能力により部分的に特徴付けられる。 $\alpha 2$ - MGは、取り込まれたプロテアーゼを抗体および高分子質量活性部位阻害剤から防護する能力によっても特徴付けられる。例えば、 $\alpha 2$ - MGに結合したトリプシンは、大豆トリプシン阻害剤 (STI) による阻害から防御される。

【0039】

活性部位プロテアーゼ阻害剤の限定的な特異性と比べて、 $\alpha 2$ - MGは多様な基質特異性および触媒作用活性により、広範なプロテアーゼに作用する。このような標的プロテアーゼとしては、トリプシン、スブチリシン、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、サーモライシン、およびパパインが挙げられる。基質の多様性は、部分的に、 $\alpha 2$ - MG「ベイト」領域により測定される。この「ベイト」領域は、非常に柔軟性のある溶媒に露出される30 ~ 40の残基の配列であり、タンパク質分解酵素の主要なクラスの各々によって切断されやすい少なくとも1つの部位を含む。20

【0040】

本明細書で使用されるように、用語「 $\alpha 2$ - マクログロブリン」とは、「 $\alpha 2$ - MG」と同義であり、ヒト $\alpha 2$ - MG (配列番号2) とかなりの構造的相同性を有し、かつ広範なプロテアーゼ阻害活性を有するタンパク質を意味する。 $\alpha 2$ - MGは、メチルアミン等の小第1級アミンにより不活性化される特有のチオールエステル結合を含む。したがって、 $\alpha 2$ - MG活性は、メチルアミン感受性プロテアーゼ阻害活性により部分的に特徴付けられ得る。必要に応じて、関連するプロテアーゼ結合タンパク質ならびに補体系のC3、C4およびC5等の $\alpha 2$ - マクログロブリンファミリーの他のメンバーから、 $\alpha 2$ - MGを区別することができる (Sottrup-Jensen, " $\alpha 2$ - Macroglobulin and Related Thiol Ester Plasma Proteins, " Putnam (編), The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control Second edition, Orlando: Academic Press (1987), 191 - 291ページ)。30 $\alpha 2$ - MGを検出するためのアッセイは、 $\alpha 2$ - MGに対して特異的であることが可能であるか、または $\alpha 2$ - マクログロブリンファミリーの1つ以上の他のメンバーを付加的に検出可能であることが理解される。40

【0041】

本発明の方法は、部分的に、試料中の $\alpha 2$ - マクログロブリンを検出することに依拠する。本明細書で使用するように、フレーズ「 $\alpha 2$ - MGを検出する」とは、 $\alpha 2$ - MGの存在を測定するための任意の定量的または定性的アッセイを意味する。本明細書で使用するように、フレーズ「 $\alpha 2$ - MGのレベルを測定する」とは、 $\alpha 2$ - MGに対する任意の直接または間接的な定量的アッセイを意味する。

【0042】

同様に、試料中の任意の特異的な繊維症マーカーを検出することとは、試料中にマーカーが存在するか否かを測定して、該繊維症マーカーが肝繊維症または本明細書中で上述し 50

たような別の繊維症障害に対して陽性または陰性の相関性を有することを意味する。検出とは、例えば特定の形質あるいは可変基質、生化学的基質、または血清学的基質の存在または非存在のような非定量的分析を意味することが可能であることが理解される。

【0043】

診断は、繊維症マーカーまたは他の特色の存在またはレベルに関して試料を分析し、それを参考値と比較することに基づき、参考値は、他の個体から、繊維症障害の人々を区別することを補助する役割を果たす。繊維症マーカーが生化学的または血清学的マーカーである際、試料中の「レベル」を測定することとは、例えば、繊維症マーカーのRNA、タンパク質、または活性の相対量または絶対量を測定することにより繊維症マーカーを定量することを意味する。したがって、試料中のレベルを測定することとは、相対的および絶対的なRNA、タンパク質、および活性レベルの分析と、以下にさらに論じるような繊維症マーカーの他の直接的および間接的測定とを包含するがこれらに限定されない。繊維症マーカーの「レベル」を測定するのに有用な任意のアッセイは、マーカーを「検出する」のにも有用であることが理解される。

10

【0044】

$\alpha 2$ -MGを検出する様々なアッセイが当該技術分野で公知であり、 $\alpha 2$ -MG RNA、 $\alpha 2$ -MGタンパク質、および $\alpha 2$ -MG活性に関する直接的および間接的アッセイを含む。例えばノーザン分析またはRT-PCR、あるいは $\alpha 2$ -MGコード配列の一部分に相補的な核酸配列へのハイブリダイゼーションにもとづく他の方法のような通常の技術を用いて、 $\alpha 2$ -MG mRNAレベルを分析することにより、 $\alpha 2$ -MGを検出することができ、または $\alpha 2$ -MGレベルを測定することができる。例えば、ヒト試料中の $\alpha 2$ -MG RNAのノーザン分析およびRNAスロットブロットハイブリダイゼーションに対する条件およびプローブについては、Ortegoら(Exp. Eye Res. 65: 289-299 (1997))およびSimonら(Cancer Res. 56: 3112-3117 (1996))にそれぞれ記載されている。

20

【0045】

様々な方法で $\alpha 2$ -MGタンパク質をアッセイすることによっても、 $\alpha 2$ -MGを検出することができ、または $\alpha 2$ -MGレベルを測定することができる。さらに以下に記載するように、ラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノアッセイ、および二抗体サンドイッチアッセイを含むイムノアッセイが本発明の方法で有用である。例えば、比濁分析アッセイでは、 $\alpha 2$ -MGと抗 $\alpha 2$ -MG抗体との複合体により、ピークレートシグナルに変換される光散乱の増加が生じており、これは試料 $\alpha 2$ -MG濃度の関数である。例えば、ベアリングネフェロメーターアナライザー(Behring Nephelometer Analyzer)(Finkら、J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem. 27: 261-276 (1989))およびNaveauら(Dig. Diseases Sci. 39: 2426-2432 (1994))に記載されるウサギ抗ヒト $\alpha 2$ -MG抗血清を用いて、またはベックマンコーター(Beckman Coulter)(Brea、Ca; キット番号449430)より市販されている比濁分析アッセイを用いたレーザー免疫比濁分析によっても、 $\alpha 2$ -MGを検出することができる。さらに、イムノアッセイに有用なモノクローナルおよび多クローン抗 $\alpha 2$ -MG抗体は、多様な供給源から容易に入手することができる。例として、ELISAアッセイおよびウエスタンブロッティング等のイムノアッセイに好適な親和性精製ヤギ抗ヒト $\alpha 2$ -MG抗体およびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト $\alpha 2$ -MG抗体は、シーダーレーンラボラトリー社(Cedarlane Laboratories Limited)(Ontario、Canada; CL20010APおよびCL20010APHP)ならびにアフィニティーバイオロジカルズ社(Affinity Biologicals Incorporated)(Ontario、Canada; GAA2M-APおよびGAA2M-APHP)から入手可能である。精製した $\alpha 2$ -MGタンパク質の量を定量することによっても、 $\alpha 2$ -MGタンパク質のレベルを測定することができる。例えば、HPLCを単独で、または質量分光測光法と組み合わせることによって、あるいは、例えば、Hallお

30

40

50

よび Roberts (Biochem. J. 171: 27-38 (1978)) または Imber および Pezzo (J. Biol. Chem. 256: 8134-8139 (1981)) に記載されているように、 $\alpha 2$ -マクログロブリンの精製を実施することができる。ブラッドフォードアッセイ、クーマシーブルー染色法、および放射線標識タンパク質に対するアッセイを含む周知の方法により、定量化を測定することができる。

【0046】

$\alpha 2$ -MG 活性に対する多様なアッセイは、本発明の方法に係る試料中の $\alpha 2$ -MG の検出または $\alpha 2$ -MG のレベルの測定にも有用であり得る。例えば、アミド分解活性の対応する阻害なしに、標的プロテアーゼ活性の阻害の関数として、間接的に、 $\alpha 2$ -MG を検出することができ、または $\alpha 2$ -MG のレベルを測定することができる。上記に論じたように、タンパク質等の高分子質量基質は加水分解され得ない一方で、 $\alpha 2$ -MG 結合プロテアーゼは少量の基質のアミドおよびエステル結合を加水分解する能力を保有する（例えば Armstrong ら、Develop. Compar. Immunol. 23: 375-390 (1999) を参照せよ）。例として、アミド分解活性の阻害なしに、トリプシン、スブチリシン、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、サーモライシン、またはパパイン活性の阻害をアッセイすることにより、 $\alpha 2$ -MG を検出することができ、または $\alpha 2$ -MG のレベルを測定することができる。分析するために都合のよい基質としては、¹⁴C で標識したカゼインおよび ¹²⁵I - フィブリンが挙げられる。

10

【0047】

広範なプロテアーゼ基質特異性の特性により、プロテアーゼ活性部位の阻害剤から $\alpha 2$ -MG が区別される。この特性にもとづいて、異なる活性部位特異性を有する 2 つ以上のプロテアーゼの活性の阻害をアッセイすることにより、 $\alpha 2$ -MG を検出することができ、または $\alpha 2$ -MG のレベルを測定することができる。例えば、2 種類以上の標的プロテアーゼ（例えばトリプシン、スブチリシン、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、サーモライシン、およびパパインのうちの 2 種類以上のプロテアーゼ）のプロテアーゼ活性の減少を分析することによって、試料中の $\alpha 2$ -MG を検出することができ、または $\alpha 2$ -MG のレベルを測定することができる。そのような方法では、¹⁴C - カゼインまたは ¹²⁵I - フィブリン等の標識プロテアーゼ基質が有用であり得る（Armstrong ら、上掲、1999）。

20

【0048】

抗体または高分子量阻害剤から、結合プロテアーゼを防護する $\alpha 2$ -MG の能力にもとづいても、 $\alpha 2$ -MG を検出することができ、また $\alpha 2$ -MG のレベルを測定することができる。トリプシン、スブチリシン、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、サーモライシン、またはパパイン等の標的プロテアーゼを血漿試料に添加することができる。例えば抗プロテアーゼ抗体を用いた免疫沈降により未結合のプロテアーゼを除去した後、低分子質量アミドまたはエステル基質を用いて、 $\alpha 2$ -MG に結合されたプロテアーゼの量を測定することができる。加水分解された低分子質量基質の量は、防御された $\alpha 2$ -MG 結合のプロテアーゼの量、および $\alpha 2$ -MG の濃度の量の指標となる。同様に、アミド BAPNA (N^α-ベンゾイル-DL-アルギニン p-ニトロアニリド) 等の低分子質量基質を用いて残存するトリプシン活性をアッセイする前に、まず試料をトリプシンのようなプロテアーゼと反応させ、その後大豆トリプシン阻害剤のような過剰なプロテアーゼ阻害剤と反応させることができる（Ganrot、Clin. Chem. Acta 14: 493-501 (1966)；Armstrong ら、J. Exp. Zool. 236: 1-9 (1985)）。 $\alpha 2$ -MG に隔離されなかったトリプシンをトリプシン阻害剤により不活性化すると、残っている $\alpha 2$ -MG に防御されたトリプシンのみが基質の加水分解をできる。したがって、大豆トリプシン阻害剤アッセイでの陽性反応は、 $\alpha 2$ -MG を検出し、かつ $\alpha 2$ -MG 量の定量的測定である（Armstrong ら、上掲、1999）。当業者には、 $\alpha 2$ -MG 結合酵素を不活性化することができる低分子質量プロテアーゼ阻害剤の存在が該アッセイを用いて得た結果に影響及ぼすことが可能であることが理解される。さらに、 $\alpha 2$ -MG RNA またはタンパク質レベルと同様に、 $\alpha 2$ -MG 活性

30

40

50

に対するこれらのアッセイおよび他の通常のアッセイは、本発明の方法で、 $\alpha 2 - \text{MG}$ の検出または $\alpha 2 - \text{MG}$ のレベルの測定に有用であり得ることが理解される。

【0049】

(ヒアルロン酸)

本発明の方法はさらに、部分的に、試料中のヒアルロン酸の検出またはヒアルロン酸のレベルの測定に依拠する。ヒアルロン酸は、ヒアルロネートまたはヒアルロナンとしても知られており、グルクロン酸と、 $\beta - 1, 4$ 結合により結合される $\beta (1, 3) - \text{N} - \text{アセチルグルコサミン}$ 部分とが交互になる構造をもつ分岐していない主鎖を有する高分子量の多糖である。ヒアルロン酸の長さは、少数から1,000の二量体単位以上であり、各二量体単位の分子量は、約450Dである。ヒアルロン酸は、主に線維芽細胞および他の特定の結合組織細胞により産生され、結合組織マトリックスで、構造的役割を果たす。さらに、ヒアルロン酸は、体中に広く分布し、例えば血漿、滑液、および尿中で遊離分子として見出されることができる。血漿中では、ヒアルロン酸は、相対的に短い半減期を有する。

10

【0050】

血清HAレベルは、肝硬変を含む肝疾患で増加する(Bramleyら、J. Hepatol. 13: 8 - 13 (1991); Uenoら、Gastroenterol. 105: 475 - 481 (1993); Obertiら、Gastroenterol. 113: 1609 - 1616 (1997); およびMcHutchisonら、J. Gastroenterol. Hepatol. 15: 945 - 951 (2000))。血清HAレベルは、リウマチ関節炎で見られる滑膜炎および軟骨破壊中でも増加する。これらのレベルは、疾患活動性および滑膜が関与する度合いに相関することが知られている(Konttinenら、Clin. Chimica Acta 193: 39 - 48 (1990); Pooleら、Arthritis Rheum. 37: 1030 - 1038 (1994); Goldbergら、Arthritis Rheum. 34: 799 - 807 (1991); およびEmlemら、J. Rheum. 23: 974 - 978 (1996))。HAの血清レベルの増加は、例えば骨関節炎(OA)、進行性全身硬化症(PSS)、および全身性エリテマトーデス(SLE)の患者にも存在する可能性がある。

20

【0051】

本明細書で使用するように、用語「ヒアルロン酸」とは、「HA」と同義であり、グルクロン酸と、 $\beta - 1, 4$ 結合により結合される $\beta (1, 3) - \text{N} - \text{アセチルグルコサミン}$ 部分とが交互になる2つ以上の二量体単位のポリマーを意味する。本明細書で使用するように、「HAを検出する」というフレーズは、HAの存在を測定するための任意の定量的または定性的アッセイを意味し、「HAのレベルを測定する」というフレーズは、HAに対する任意の直接または間接の定量的アッセイを意味する。上記の観点から、「HAを検出する」というフレーズは、「HAのレベルを測定する」ことを包含することが理解される。

30

【0052】

HA結合タンパク質または抗HA抗体にもとづく様々な公知のアッセイの1つを用いて、あるいは精製されたHAの定量により、HAを検出でき、またHAのレベルを測定できる。HA結合タンパク質は、例えばHAを検出する際有用である。¹²⁵I標識HA結合タンパク質に基づいたHAに対する放射アッセイは、ファルマシア(Pharmacia)(Guechoら、Clin. Chem. 42: 558 - 563 (1996))から入手可能である。HA結合タンパク質にもとづく他の商業用アッセイは、例えばコルゲニックス(Corgenix)(Westminster, Co; キット029001)から入手可能である。さらに、MaingonnatおよびDelpech(Ann. Clin. Biochem. 28: 305 - 306 (1991))に記載されるようにヒアルロネクチンを用いて、またはナルジェナンクインターナショナル(Nalgenunc International)(Rochester, NY; DelpechおよびBertrand, Anal. Biochem. 149: 555 - 565 (1985))から入

40

50

手可能なキットを用いて、H Aを検出でき、またH Aのレベルを測定できる。H Aの検出またはH Aのレベルの測定のためのアッセイとしては、様々な競合および非競合結合アッセイが挙げられ、例えば、とりわけ、¹²⁵I 標識H A結合タンパク質を用いた競合結合アッセイ、アルカリ性ホスファターゼ標識ヒアルロネクチン(H N)にもとづく競合結合アッセイ、およびペルオキシダーゼ標識プロテオグリカンまたはペルオキシダーゼ標識H A結合タンパク質にもとづく非競合結合アッセイが挙げられる(Lindquistら、Clin. Chem. 38:127-132(1992))。DelpechおよびBertrand、上掲、1985; Engstrom-Laurentら、Scand. J. Clin. Lab. Invest. 45:497-504(1985); Brandtら、Acta Otolaryn. 442(Suppl.):31-35(1987); Goldberg、Anal. Biochem. 174:448-458(1988); Chichibuら、Clin. Chim. Acta 181:317-324(1989); Liら、Conn. Tissue Res. 19:243-254(1989); Poolleら、Arth. Rheum. 33:790-799(1990); Poolleら、J. Biol. Chem. 260:6020-6025(1985); ならびにLaurentおよびTengblad、Anal. Biochem. 109:386-394(1980))も参照せよ。ラジオイムノアッセイおよび酵素結合イムノアッセイを含む様々なイムノアッセイフォーマットを用いて、試料中のH Aの検出またはH Aのレベルの測定のためのアッセイを実施できる。イムノアッセイに有用な抗H A抗血清としては、例えばバイオトレンド(Biotrend)(Cologne、Germany; #5029-9990)から入手可能な親和性精製ヒツジ抗H A抗血清が可能である。

【0053】

試料からH Aを精製し、精製した多糖の量を定量することによってもH Aのレベルを測定できる。高速液体クロマトグラフィーを、単独または質量分光測光と組み合わせて用いることができる。例として、HPLCを用いて、内部標準物質を含む試料のヒアルロニダーゼでの消化、逆相オクタデシルシリルカラムによる分離、およびpH7.35での0.01Mテトラブチルアンモニウム・リン酸アセトニトリルによる溶出(83:17、v/v)後に、H Aレベルを測定することができる(Payanら、J. Chromatogr. 566:9-18(1991))。

【0054】

H Aレベルは、ヒアルロニダーゼレベルと相関することが示されている(Brayら、Am. Rev. Respir. Dis. 3:284-288(1991))。したがって、ヒアルロニダーゼ活性をアッセイすることによって、間接的に、H Aを検出することができ、またはH Aのレベルを測定することができる。Brayら(上掲、1991)に記載されているように、ヒアルロニダーゼ活性に対するアッセイは当該技術分野で公知である。当業者には、ヒアルロニダーゼまたはH Aレベルを測定するためのこれらのアッセイおよび他の通常のアッセイは、「H Aを検出する」および「H Aのレベルを測定する」というフレーズに包含され、本発明の方法にしたがって肝繊維症の有無または重症度を診断するのに有用であることが理解される。

【0055】

(TIMP-1)

本発明の方法はまた、試料中のTIMP-1の検出にも基づいており、特定の実施形態では、試料中のTIMP-1のレベルの測定に基づいている。メタロプロテアーゼの組織阻害剤(TIMP)は、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の活性を調節するものであり、このマトリックスメタロプロテアーゼは、ゼラチナーゼA(MMP-2)およびゼラチナーゼB(MMP-9)を含むECM分解酵素の重要なグループである。正常肝臓では、コラーゲン、フィブロンectin、ラミニン、テネイシン、ウンジュリン、およびエンタクチン等のマトリックス成分は、マトリックス分解酵素により定常的に再構築されて、細胞外マトリックスの沈着を抑制する。TIMPレベルの増加は、MMP活性の阻害をもたらす、細胞外マトリックスの蓄積を支持する。TIMPは、TIMP-1、TIMP

P - 2、TIMP - 3、およびTIMP - 4を含み、マトリックスメタロプロテアーゼと1 : 1の化学量論で相互作用し、かつ可逆的非共有結合を介して、メタロプロテアーゼ活性を阻害する。TIMP - 1、TIMP - 2、およびTIMP - 3は、それらの局在化および調節は異なるが、同様のMMP阻害活性を有し、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメライシン、プロテオグリカナーゼ、およびメタロエラスターゼのタンパク質分解活性を阻害する (Cawstonら、「Protein Inhibitors of Metalloproteinases」Barrett and Salvesen (編)、Proteinase Inhibitors Amsterdam Elsevier 589 - 610ページ (1986))。

【0056】

ヒトTIMP - 1は、分子量が28.5 kDaであり184個のアミノ酸からなるシアル糖タンパク質である (Murphyら、Biochem. J. 195 : 167 - 170 (1981) ; Dockertyら、Nature 318 : 66 - 69 (1985) ; およびBoddenら、J. Biol. Chem. 269 : 18943 - 18952 (1994))。TIMP - 1は、例えば、間質コラゲナーゼMMP - 1、さらにストロメライシンおよびゼラチナーゼB (MMP - 9) 等の全ての活性メタロプロテアーゼを阻害する。ヒトTIMP - 1の核酸配列 (配列番号3) および対応するアミノ酸配列 (配列番号4) を図2に示す。

【0057】

本明細書で使用するように、用語「メタロプロテアーゼ - 1の組織阻害剤」とは、「TIMP - 1」と同義であり、ヒトTIMP - 1と同様の特異性を有するメタロプロテアーゼのタンパク質分解活性を阻害するヒトTIMP - 1 (配列番号4) に対しかなりの構造的相同性を有するタンパク質を意味する。7 - 6 C1または7 - 23 G9のような既知の特異的抗TIMP - 1抗体と反応するエピトープの存在により、ヒトTIMP - 1の存在を簡便に検出することができる。

【0058】

本明細書で使用するように、「TIMP - 1を検出する」という表現とは、TIMP - 1の存在を測定するための任意の定量的または定性的アッセイを意味し、「TIMP - 1のレベルを測定する」という表現は、TIMP - 1に対する任意の直接または間接の定量的アッセイを意味する。上記の観点から、「TIMP - 1を検出する」という表現は、「TIMP - 1のレベルを測定する」ことを包含するものであると理解される。

【0059】

TIMP - 1の検出およびTIMP - 1のレベルの測定のためのアッセイとして、TIMP - 1 RNA、タンパク質、および酵素活性に対する周知のアッセイが挙げられる。ノーザン分析またはRT - PCRによりTIMP - 1 RNAレベルを測定する方法は、以下に詳しく説明するように、当該分野で周知である (Yoshijiら、Int. J. Cancer 69 : 131 - 134 (1996) ; Janowska - Wiecekら、Exp. Hematol. 28 : 1274 - 1285 (2000) ; およびGroftら、Br. J. Cancer 85 : 55 - 63 (2001))。例えば、Brophyら (Biochem. Biophys. Res. Comm. 167 : 898 - 903 (1990)) に記載されるラジオイムノアッセイにより、またはMurawakiら (Clinica Chimica Acta 218 : 47 - 58 (1993)) に記載される二抗体サンドイッチアッセイにより、TIMP - 1タンパク質を検出でき、またTIMP - 1タンパク質のレベルを簡便に測定できる。アマシャムファルマシア (Amersham Pharmacia) (実施例IIIも参照せよ) から市販されるキットを用いたELISAにより、TIMP - 1タンパク質の血漿濃度をアッセイできる。精製されたTIMP - 1タンパク質の量を定量することによっても、TIMP - 1タンパク質のレベルを測定できる。例えばHPLCを単独で、または質量分光測光と組み合わせることにより、あるいは例えばMurphyら (Biochem. J. 195 : 167 - 170 (1981)) またはStricklinおよびWelgus

10

20

30

40

50

(J. Biol. Chem. 258:12252-12258(1983))に記載されるように、TIMP-1の精製を実施することができる。例えばKossakowskiら(Amer. J. Pathology 153:1895-1902(1998))に記載されるように逆ゼラチン電気泳動像(reverse gelatin zymography)を用いて、1つ以上のメタロプロテアーゼの活性の阻害をアッセイすることによっても、TIMP-1を検出することができ、またTIMP-1のレベルを測定することができる。TIMP-1 RNA、タンパク質、または活性に対するアッセイについては、明細書中で後述するとともに、当業者には、TIMP-1を検出するためのこれらのアッセイおよび他の慣用のアッセイが本発明の方法により包含されることが理解される。

10

【0060】

(包括/除外(Rule-in/Rule-out)分析)

本明細書に開示するように、2セットのカットオフ値を用いて、 $\alpha 2$ -MG/H A/TIMP-1の3マーカーパネルに基づくアッセイの正確度を向上することができる。実施例IIで説明するように、初めに線維症を除外(rule out)するために、感度に対する最適化に基づいて、 $\alpha 2$ -MG、H A、およびTIMP-1に対するカットオフ値の第1のセットを選択し、次に、特異度に対して最適化されたカットオフ値の第2のセットを用いて「陽性」母集団の分析を行って、重度の線維症の存在を測定した。表7は、194人のHCV患者調査母集団に関する二重最適化戦略の結果を示す。 $\alpha 2$ -MG、H A、およびTIMP-1に対して、第1のカットオフをそれぞれ2.0mg/ml、35ng/ml、および1,000ng/mlに設定し、第1の分析での高い感度を達成した。第1のカットオフ値を上回る $\alpha 2$ -MG、H A、およびTIMP-1の3通りのレベル全てを有する任意の試料を、F2~F4の線維症に対して陽性であると暫定的に示し、 $\alpha 2$ -MG、H A、およびTIMP-1に対するカットオフ値をそれぞれ、特異度に対して最適化することにより得られた2.0mg/ml、60ng/ml、および1,575ng/mlとした第2のセットを用いてさらに評価した。

20

【0061】

高い特異度に対して最適化したカットオフ値の第2のセットを用いて、初めにF2~F4の線維症に対して陽性であると示された122人の患者のうち54人が陽性であると確認され、そのうち1人のみが偽陽性であった。要約すると、調査母集団中の194人のHCV患者のうち、72人が陰性(F0~F1の線維症を有する)として分類され、54人が陽性(F2~F4の線維症を有する)として分類された一方で、68個の試料は未確定結果であり、分類されなかった。未確定試料を除外すると、 $\alpha 2$ -MG/H A/TIMP-1パネルは、約98%の陽性予測値および約79%の陰性予測値で機能した。さらに、30%の線維症罹患率であるより典型的な患者母集団では、同パネルは、93%に近い陽性および陰性予測値で機能する。これらの結果により、第1および第2のカットオフレベルを使用して、感度を初めに最適化し、次に特異度を最適化することによって、3つのマーカー試験の全体的な正確度を向上することができ、試験された試料の約70%を占める未確定ではない試料に対して、約93%の正確度を有するパネル試験に至ることが示される。

30

40

【0062】

したがって、本発明は、個体から得た試料中の $\alpha 2$ -MGレベルを測定することと、個体から得た試料中のH Aレベルを測定することと、個体から得た試料中のTIMP-1レベルを測定することと、 $\alpha 2$ -MGレベルが $\alpha 2$ -MGカットオフ値X1を下まわるか、H AレベルがH Aカットオフ値Y1を下まわるか、またはTIMP-1レベルがTIMP-1カットオフ値Z1を下まわる場合に、個体を肝線維症を有さないか、または軽度の肝線維症を有すると診断することと、 $\alpha 2$ -MGレベルが $\alpha 2$ -MGカットオフ値X2を上回り、H AレベルがH Aカットオフ値Y2を上回り、かつTIMP-1レベルがTIMP-1カットオフ値Z2を上回る場合に、中程度または重度の肝線維症を有するとして個体を診断することと、残りの個体は未確定状態であると診断することとにより、個体の中

50

程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する方法を提供する。

【0063】

$\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1マーカーのレベルに対する二重カットオフ値に基づく本発明の方法は、多様な患者母集団で、中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する際、有用であり得る。このような方法は、例えば、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎等の自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、脂肪肝疾患、または薬物誘導性肝疾患のような肝疾患を有する個体を診断する際、有用であり得る。一実施形態では、本発明の方法を用いて、C型肝炎ウイルスに感染された個体での中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する。二重カットオフ値に基づく本発明の方法に有用な試料としては、限定はされないが、血液、血清、血漿、尿、唾液、および肝組織が挙げられる。一実施形態では、1つ以上の血清試料中の $\alpha 2$ -MGレベル、HAレベル、およびTIMP-1レベルを測定することによって、本発明の方法を実施する。

10

【0064】

さらに別の実施形態では、本発明は、個体での中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症ないし軽度肝線維症とを区別する方法を提供し、区別は、 1.8 mg/ml ないし 2.2 mg/ml のX1カットオフ値と、 31 ng/ml ないし 39 ng/ml のY1カットオフ値と、 900 ng/ml ないし $1,100\text{ ng/ml}$ のZ1カットオフ値と、 1.8 mg/ml ないし 2.2 mg/ml のX2カットオフ値と、 54 ng/ml ないし 66 ng/ml のY2カットオフ値と、 $1,415\text{ ng/ml}$ ないし $1,735\text{ ng/ml}$ のZ2カットオフ値とに基づく。別の実施形態では、区別は、 2.0 mg/ml のX1カットオフ値と、 35 ng/ml のY1カットオフ値と、 $1,000\text{ ng/ml}$ のZ1カットオフ値と、 2.0 mg/ml のX2カットオフ値と、 60 ng/ml のY2カットオフ値と、 $1,575\text{ ng/ml}$ のZ2カットオフ値とに基づく。さらに別の実施形態では、区別は、 2.0 mg/ml のX1カットオフ値と、 37 ng/ml のY1カットオフ値と、 $1,100\text{ ng/ml}$ のZ1カットオフ値と、 2.0 mg/ml のX2カットオフ値と、 60 ng/ml のY2カットオフ値と、 $1,575\text{ ng/ml}$ のZ2カットオフ値とに基づく。さらなる実施形態では、30%までの肝線維症罹患率を有する母集団で、少なくとも90%の正確度で、この母集団での個体の少なくとも65%を、非線維症または軽度の線維症あるいは中程度の線維症ないし重度の線維症であるとして診断するように、X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2を選択する。さらに別の実施形態では、最大で10%の肝線維症罹患率を有する母集団で、少なくとも90%の正確度で、この母集団での個体の少なくとも70%を、非線維症または軽度の線維症あるいは中程度ないし重度の線維症であるとして診断するように、X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2を選択する。

20

30

【0065】

上記に説明したように、本発明の方法は、アッセイされる全患者母集団のサブグループで、線維症の有無または重症度を測定するのに非常に正確である。例えば、表7に示すように、本発明の方法は、30%の肝線維症罹患率を有する患者母集団の約70%で、F0~F1またはF2~F4線維症状態を測定する際、93%より大きい正確度で機能する。患者母集団の残りの30%は、未確定状態であることが示される。本明細書で使用するように、用語「未確定状態」とは、個体を十分な予測値で確信的に診断できないことを意味する。

40

【0066】

本明細書で使用するように、用語「X1」または「X2」とは、 $\alpha 2$ -MGカットオフ値を意味し、それに対して実験用 $\alpha 2$ -MG試料レベルが比較される。同様に、本明細書で使用するように、用語「Y1」または「Y2」とは、HAカットオフ値を意味し、それに対して実験用HAレベルが比較される。本明細書で使用するように、用語「Z1」または「Z2」とは、TIMP-1カットオフ値を意味し、それに対して実験用TIMP-1

50

レベルが比較される。X 1、Y 1、および Z 1 カットオフを組み合わせて、試料中の線維症の有無または重症度を測定する。同様に、X 2、Y 2、および Z 1 カットオフ値を組み合わせて、試料中の線維症の有無または重症度を測定する。X 1 より小さい $\alpha 2$ - M G レベル、Y 1 より小さい H A レベル、または Z 1 より小さい T I M P - 1 レベルを有する試料は、F 0 ~ F 1 の線維症であるとして分類される。X 1 を超える $\alpha 2$ - M G レベル、Y 1 を超える H A レベル、および Z 1 を超える T I M P - 1 レベルを有する試料は、F 2 ~ F 4 線維症に対して陽性である可能性があり、さらに分析を要する根拠となる。さらに、X 2 を超える $\alpha 2$ - M G レベル、Y 2 を超える H A レベル、および Z 2 を超える T I M P - 1 レベルを有する試料は、F 2 ~ F 4 の線維症であるとして分類される。X 1 を超える $\alpha 2$ - M G レベル、Y 1 を超える H A レベル、および Z 1 を超える T I M P - 1 レベルを有しているが、1 つ以上のレベルが X 2、Y 2、または Z 2 より下である試料は、「未確定状態」として分類される。X 2 は一般に X 1 と等しいかそれより大きく、Y 2 は一般に Y 1 と等しいかそれより大きく、Z 2 は一般に Z 1 と等しいかそれより大きいことが理解される。

10

20

30

40

50

【0067】

当業者は、 $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 カットオフ値の X 1、Y 1、Z 1、X 2、Y 2、および Z 2 を選択して、特定の線維症罹患率を有する患者母集団に対して、所望の感度または特異度、あるいは所望の陰性予測値、陽性予測値、または正確度のような 1 つ以上の臨床的に有効なパラメータを達成できる。実験計画としても知られる要因計画最適化の方法論を用いて、例えば、適当なカットオフ値を選択できる。実施例 I I で本明細書に記載するように、中心複合計画実験で最適化ソフトウェア (A i r A c a d e m y A s s o c i a t e s (C o l o r a d o S p r i n g s, C O.) から得られる D O E K e e p I t S i m p l e S t a t i s t i c a l l y) を用いて、3 つのカットオフ X 1、Y 1、および Z 1 を同時に変化させ、その後 3 つのカットオフ X 2、Y 2、および Z 2 を同時に変化させた。具体的には、 $\alpha 2$ - M G カットオフを 2.0 から 5.0 m g / m l に変化させ；H A カットオフを 25 から 75 n g / m l に変化させ；T I M P - 1 カットオフを 1,000 から 1,700 n g / m l に変化させた。指定された X 1、Y 1、および Z 1 カットオフを用いて、データベースで、194 人の患者に対して測定された試験結果を比較することによって (表 4 参照)、194 の試料それぞれを真陽性、真陰性、偽陽性、または偽陰性であると測定し、調査患者母集団に関して、感度、特異度、陰性予測値、陽性予測値、および正確度の臨床パラメータを測定した。 $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 カットオフ値の測定は、D O E K I S S プログラムを用いて本明細書で説明されているが、当業者には、複数の変数間の協調的相互作用を特定するため、かつ連立方程式算出を実行するための他のコンピュータープログラムも使用できることが理解される。例えば、E C H I P 社 (E C H I P, I n c o r p o r a t e d) (H o c k e s s i n, D E) から入手できる E C H I P 最適化ソフトウェア (E C H I P o p t i m i z a t i o n s o f t w a r e)、または S T S C 社 (S T S C, I n c o r p o r a t e d) (R o c k v i l l e, M D) から入手できるステータグラフィック最適化ソフトウェア (S t a t g r a p h i c s o p t i m i z a t i o n s o f t w a r e) も、本発明の方法で有効な $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 カットオフ値を測定するのに有用である。

【0068】

真陽性、偽陽性、真陰性、および偽陰性を用いて、感度、特異度、陰性予測値、陽性予測値、および正確度の臨床パラメータを算出する。「真陽性」試料とは、臨床生検に準じた線維症の指示段階に対して陽性の試料であり、本発明の方法によっても陽性であると診断される。「偽陽性」試料とは、生検による線維症の指示段階に対して陰性の試料であり、本発明の方法によっても陽性であると診断される。同様に、「偽陰性」とは、生検による線維症の指示段階に対して陽性の試料であり、本発明の方法によっても陰性であると診断される。「真陰性」とは、生検による線維症の指示段階に対して陰性の試料であり、本発明の方法によっても線維症に対して陰性である。例えば M o t u l s k y (編)、I n t

u i t i v e B i o s t a t i s t i c s N e w Y o r k : O x f o r d U n i
v e r s i t y P r e s s (1 9 9 5) を参照せよ。

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用するように、用語「感度」とは、試料が陽性であるとき（例えば F 2 ~ F 4 の M e t a v i r スコアを有する線維症であるとき）、本発明の診断方法により、陽性結果が与えられる可能性を意味する。感度は、真陽性および偽陰性の合計で割った真陽性の結果の数値として算出される。感度は、本質的に、線維症疾患にかかっている人々をどの程度正確に方法が特定するかについての尺度である。本発明の方法では、アッセイされる患者母集団の少なくとも 6 0 % において、あるいはアッセイされる患者母集団の少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、または 8 0 % において、個体を診断する感度は、少なく

10

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用するように、用語「特異度」とは、試料が陽性ではない（例えば F 2 ~ F 4 の M e t a v i r 線維症段階ではない）場合に、本発明の診断方法により、陰性結果が与えられる確率を意味する。特異度は、真陰性および偽陽性の合計で割った真陰性の結果の数値として算出される。特異度は、本質的に、線維症に患っていない個体を、どの程度うまく方法が除外するかについての尺度である。本発明の方法では、アッセイされる患者母集団の少なくとも 6 0 % で、あるいはアッセイされる患者母集団の少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、または 8 0 % で、感度が少なくとも約 7 0 % であるとき、個体を診断

20

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用するように、用語「陰性予測値」とは、「N P V」と同義であり、線維症ではないと診断された個体が、実際に疾患にかかっている確率を意味する。陰性予測値は、真陰性および偽陰性の合計で割った真陰性の数値として算出することができる。分析される母集団での線維症の罹患率とともに診断方法の特性により陰性予測値を測定する

。本発明の方法では、1 0 % までの肝線維症罹患率を有する母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも 6 0 % で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、または 8 0 % で、陰性予測値は 7 5 ~ 9 9 % の範囲であり、さらに例えば少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % となるように、 $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 カットオフ値を選択できる。また、2 0 % までの肝線維症罹患率を有する母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも 6 0 % で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、または 8 0 % で、陰性予測値は 7 5 ~ 9 9 % の範囲であり、さらに例えば少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % となるように、 $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 カットオフ値を選択できる。さらに、3 0 % までの肝

30

40

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用するように、用語「陽性予測値」とは、「P P V」と同義であり、線維症であると診断された個体が、実際にその病状を有している確率を意味する。陽性予測値は、真陽性および偽陽性の合計で割った真陽性の数値として算出することができる。分析される母集団での線維症の罹患率とともに診断方法の特性により陽性予測値を測定する。

50

本発明の方法では、１０％までの肝線維症罹患率を有する患者母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも６０％で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも６５％、７０％、７５％、または８０％で、本方法の陽性予測値は、少なくとも約７５％であり、さらに少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％となるように、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1カットオフ値を選択できる。また、２０％までの肝線維症罹患率を有する患者母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも６０％で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも６５％、７０％、７５％、または８０％で、本方法の陽性予測値は、少なくとも約７５％であり、さらに少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％となるように、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1カットオフ値を選択できる。同様に、３０％までの肝線維症罹患率を有する患者母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも６０％で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも６５％、７０％、７５％、または８０％で、本方法の陽性予測値は、少なくとも約７５％であり、さらに少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％となるように、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1カットオフ値を選択できる。

10

【００７３】

陰性および陽性予測値を含む予測値は、分析される母集団での疾患の罹患率に影響される。本発明の方法では、カットオフ値 X_1 、 Y_1 、 Z_1 、 X_2 、 Y_2 、および Z_2 を選択して、特定の肝線維症罹患率を有する臨床母集団に関する所望の臨床パラメーターを発生させることができる。例えば肝臓病学者の研究室で見られる１０％、１２％、１５％、１８％、２０％、２５％、または３０％までの肝線維症罹患率に対してカットオフ値を選択できる。一般開業医の診察室で見られる線維症罹患率の代表的なものであり得る１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、または８％までの肝線維症罹患率に対してもカットオフ値を選択できる。

20

【００７４】

本明細書で使用するように、用語「正確度」とは、診断方法と疾患状態との間の包含的な一致を意味する。正確度は、試料結果の総数で割った真陽性および真陰性の合計として算出され、分析される母集団での線維症の罹患率に影響される。１０％までの肝線維症罹患率を有する患者母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも６０％で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも６５％、７０％、７５％、または８０％で、本発明の方法の正確度は、少なくとも約８０％であり、さらに例えば少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％となるように、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1カットオフ値を選択できる。また、２０％までの肝線維症罹患率を有する患者母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも６０％で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも６５％、７０％、７５％、または８０％で、本発明の方法の正確度は、少なくとも約８０％であり、さらに例えば少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％となるように、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1カットオフ値を選択できる。同様に、３０％までの肝線維症罹患率を有する患者母集団中で、アッセイされる患者母集団の少なくとも６０％で、例えばアッセイされる患者母集団の少なくとも６５％、７０％、７５％、または８０％で、本発明の方法の正確度は、少なくとも約８０％であり、さらに例えば少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％となるように、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1カットオフ値を選択できる。

30

40

【００７５】

（特異的マーカーに限定されない方法）

本発明は、個体の第１の線維症マーカー X のレベルを、カットオフ値 X_1 と比較して、個体が第１の線維症マーカー X に対して陽性であるかを測定することと、個体の第２の線維症マーカー Y のレベルを、カットオフ値 Y_1 と比較して、個体が第２の線維症マーカー Y に対して陽性であるかを測定することと、 X および Y に対する陽性または陰性にもとづ

50

いて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法も提供し、40%までの線維症罹患率を有する母集団で、少なくとも90%の正確度で、この母集団の個体の少なくとも65%を診断する。

【0076】

本発明の方法は、所望される場合、個体の第3の線維症マーカーZのレベルを、カットオフ値Z1と比較して、個体が第3の線維症マーカーZに対して陽性であるかを測定することと、X、Y、およびZに対する陽性または陰性にもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することを含むことができる。一実施形態では、第1の線維症マーカーは $\alpha 2$ -MGであり、第2の線維症マーカーはHAであり、第3の線維症マーカーはTIMP-1である。

10

【0077】

別の実施形態では、少なくとも3つの線維症マーカーのレベルを比較し、さらなる実施形態では、厳密に3つの線維症マーカーのレベルを、それらのそれぞれのカットオフ値と比較する。付加的な実施形態では、少なくとも4つのまたは少なくとも5つの線維症マーカーのレベルを比較する。本発明の方法は、例えば、中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症または軽度肝線維症とを区別するのに有用であり得る。

【0078】

具体的な実施形態では、本発明の方法は、30%までの線維症罹患率を有する母集団で、個体の少なくとも65%を、少なくとも93%の正確度で診断をおこなう。さらなる実施形態では、本発明の方法は、20%までの線維症罹患率を有する母集団で、個体の少なくとも70%を、少なくとも94%の正確度で診断をおこなう。なおさらなる実施形態では、本発明の方法は、10%までの線維症罹患率を有する母集団で、個体の少なくとも70%を、少なくとも96%の正確度で診断をおこなう。

20

【0079】

本発明の方法は、肝線維症の有無または重症度を診断する際、比類の無い成果を提供する。全ての患者が診断を受けているわけではないが、大多数が非常に優れた正確度で診断されている。例として、約40%の線維症罹患率を有する患者母集団で、この母集団のほぼ70%は、91%を超える正確度と、96%を超える陽性予測値および89%を超える陰性予測値とで診断される。この優れた成果を、Poynardら(Lancet 357:1069(2001))の方法等の別の方法と対比させる。6つのマーカー $\alpha 2$ -MG、 $\alpha 2$ -グロブリン、総ビリルビン、 γ -グロブリン、アポA1、およびGGTの分析に基づいたPoynardらの方法を用いて、約89%の正確度のみで、約40%の線維症罹患率を有する母集団の約50%のみを診断する(表8を参照のこと)。したがって、本発明の方法によって、患者母集団の著しくより大きな%値(約50%と比べて約70%)を、89%付近の正確度と比べて91%を超える正確度で診断するという点で改良がなされる(表8を参照のこと)。本発明の方法の新規の成果特性により、代表的に、患者母集団の少なくとも65%で生検が不必要になり、診断される患者は、90%を超える正確度である診断を信頼できるようになる。

30

【0080】

本発明の他の方法と同様に、少なくとも2つの線維症マーカーの比較にもとづく本発明の方法を用いて、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎のような自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、脂肪肝疾患、または薬物誘導性肝疾患を含む任意の肝障害、あるいは本明細書中上記に記載した任意の他の肝疾患に罹っているか、または罹っている疑いのある個体で、肝線維症の有無または重症度を診断する。同様に、少なくとも2つの線維症マーカーの比較にもとづく本発明の方法を用いて、肺線維症、腎線維症、前立腺線維症、乳腺線維症、またはリウマチ様疾患、あるいは本明細書中で記載のまたは当該技術分野で公知の別の線維症障害を含む線維症障害の有無または重症度を診断できる。

40

【0081】

本発明の方法は、所定のカットオフ値に対する線維症マーカーのレベルの比較に依存する。線維症と陽性に相関するマーカーに対して、陽性は、所定のカットオフ値より大きい

50

レベルで示される。線維症と陰性に相関するマーカーに対して、陽性は、所定のカットオフ値より小さいレベルで示される。本明細書に記載するように、例えば実験計画法(DOE)分析を用いて、本発明の方法に有効なカットオフ値を測定し得る。

【0082】

本発明の他の診断方法に関しては、当該技術分野で公知であるか、または本明細書中に記載される種々の線維症マーカーを用いて、これらの方法を実施することができる。このような線維症マーカーとしては、 $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、PIIINP、ラミニン、テネイシン、IV型コラーゲン、VI型コラーゲン、YKL-40、MMP-3、MMP-2、MMP-9/TIMP-1複合体、sFasリガンド、TGF- β 1、IL-10、アポA1、アポA2、またはアポBが挙げられるが、これらに限定されない。付加的な血清学的、生化学的、臨床的、および超音波検査の線維症マーカーは、本明細書で

10

上述したもの、または当該技術分野で公知のものであり、本発明の方法において任意の組み合わせで含ませることができる。さらに、第1および第2の線維症マーカーと、任意の付加的な線維症マーカーとの比較を、同時に、または任意の順番で、かつアッセイフォーマットの任意の組み合わせを用いて、実行することが可能であると理解される。上述のように、線維症マーカーの「レベル」とは、例えばRNA、タンパク質、または活性の相対量または絶対量であり得、線維症マーカーの直接的または間接的測定値となり得る。さらに、医師または診断研究所のような二次的供給源からレベル値を得ることができ、また、本明細書中上記で記載したものを含むが、これらに限定されない任意の都合のよい試料およびアッセイを用いて測定することができる。本発明の方法に含まれる比較を実行するために、線維症マーカーのレベルを測定するのに有用な方法は、例えば、RT-PCRおよびRNAプロット分析等のハイブリダイゼーション法、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)およびラジオイムノアッセイ(RIA)を含むイムノアッセイ、サンドイッチイムノアッセイ、定量的ウエスタンブロッティング、ならびにタンパク質レベルを測定するための他の標準的アッセイを包含し、適用可能であれば、線維症マーカーの活性に対するアッセイを包含する。このようなアッセイは、当該技術分野で常用されており、また本明細書中で上述されている。

20

【0083】

本発明はさらに、個体の第1の線維症マーカーXのレベルを、カットオフ値X1と比較して、個体が第1の線維症マーカーXに対して陽性であるかを測定すること；個体の第2の線維症マーカーYのレベルを、カットオフ値Y1と比較して、個体が第2の線維症マーカーYに対して陽性であるかを測定すること；XおよびYに対する陽性または陰性にもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することとにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供し、カットオフ値X1およびY1を個々に最適化して所望の性能特性を与える。

30

【0084】

所望される場合、本発明の方法は、個体の第3の線維症マーカーZのレベルを、カットオフ値Z1と比較して、個体が第3の線維症マーカーZに対して陽性であるかを測定するステップと、X、Y、およびZに対する陽性または陰性にもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断するステップとを含むことができ、カットオフ値X1、Y1、およびZ1を個々に最適化して所望の性能特性を与える。一実施形態では、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1のレベルを比較する。別の実施形態では、厳密に3つか、少なくとも3つか、少なくとも4つか、または少なくとも5つの線維症マーカーのレベルを比較する。本発明の方法は、例えば中程度肝線維症ないし重度肝線維症と非肝線維症または軽度肝線維症とを区別するのに有用であり得る。本明細書に記載するように、例えばDOE分析を用いて、カットオフ値を最適化することができる。

40

本発明により、さらに、個体の第1の線維症マーカーXのレベルを、2つのカットオフ値X1およびX2と比較して、個体が第1の線維症マーカーXに対して陽性であるかを測定することと、個体の第2の線維症マーカーYのレベルを、2つのカットオフ値Y1およびY2と比較して、個体が第2の線維症マーカーYに対して陽性であるかを測定することと

50

、XおよびYに対する陽性または陰性にもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供し、ここでカットオフ値X1、Y1、X2、およびY2は個々に最適化されて所望の性能特性を得る。このような成果特性としては、本明細書中上述したように、特定の感度、特異度、PPV、NPV、および正確度が挙げられる。

【0085】

本発明の方法はさらに、個体の第3の線維症マーカーZのレベルを、2つのカットオフ値Z1およびZ2と比較して、個体が第3の線維症マーカーZに対して陽性であるかを測定するステップと、X、Y、およびZに対する陽性または陰性にもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断するステップとを包含することができ、ここでカットオフ値X1、Y1、Z1、X2、Y2、およびZ2を個々に最適化して所望の性能特性を与える。本発明の方法では、例えばDOE分析を用いて、カットオフ値を簡便に最適化できる。

10

【0086】

(方法論)

試料中の $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1を検出するため、かつ $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMPのレベルを測定するために、多様な手段が有用であり得る。一実施形態では、例えば抗 $\alpha 2$ -MG抗体等の1種類以上の $\alpha 2$ -MG特異的結合因子を用いて、診断される個体から得た試料中の $\alpha 2$ -MGタンパク質のレベルを測定することにより本発明を実施する。別の実施形態では、個体から得た試料中の $\alpha 2$ -MG活性をアッセイすることにより本発明の方法を実施する。

20

【0087】

本発明の方法では、多様な手段を用いて、試料中のHAを検出すること、またはHAのレベルを測定することもできる。一実施形態では、HA結合タンパク質または抗HA抗体等の1種類以上のHA特異的結合因子を用いて、試料中のHAのレベルを測定することにより本発明を実施する。

【0088】

同様に、本発明の方法では、多様な手段を用いて、試料中のTIMP-1を検出すること、またはTIMP-1のレベルを測定することができ。一実施形態では、診断される個体から得た試料中のTIMP-1タンパク質のレベルを測定することにより本発明を実施する。TIMP-1タンパク質のレベルを、例えば抗TIMP-1抗体等の1種類以上のTIMP-1特異的結合因子を用いて測定することができ。別の実施形態では、診断される個体から得た試料中のTIMP-1活性をアッセイすることにより本発明を実施する。

30

【0089】

特定の実施形態では、本発明は、個体から得た試料中の $\alpha 2$ -MGタンパク質のレベルを測定することと、個体から得た試料中のHAのレベルを測定することと、個体から得た試料中のTIMP-1タンパク質のレベルを測定することと、 $\alpha 2$ -MGタンパク質、HA、およびTIMP-1タンパク質のレベルにもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することとにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供する。必要に応じて、酵素結合アッセイを用いて、 $\alpha 2$ -MGタンパク質、HA、およびTIMP-1タンパク質のレベルをそれぞれ測定することができ。

40

【0090】

さらに別の実施形態では、本発明は、 $\alpha 2$ -MGと抗 $\alpha 2$ -MG抗体との第1の複合体を形成するのに適した条件下で、個体から得た試料の適当な希釈物を、抗 $\alpha 2$ -MG抗体と接触させることと、第1の複合体を洗浄して、未結合分子を除去することと、 $\alpha 2$ -MGを含有する第1の複合体の量を測定することと、HAとHA結合タンパク質との第2の複合体を形成するのに適した条件下で、個体から得た試料の適当な希釈物を、HA結合タンパク質と接触させることと、第2の複合体を洗浄して、未結合分子を除去することと、HAを含有する第2の複合体の量を測定することと、TIMP-1と抗TIMP-1抗体

50

との第3の複合体を形成するのに適した条件下で、個体から得た試料の適当な希釈物を、抗TIMP-1抗体と接触させることと、第3の複合体を洗浄して、未結合分子を除去することと、TIMP-1を含有する第3の複合体の量を測定することと、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1を含有する複合体の量にもとづいて、個体での中程度肝繊維症ないし重度肝繊維症と非肝繊維症ないし軽度肝繊維症とを区別することとにより、個体での中程度肝繊維症ないし重度肝繊維症と非肝繊維症ないし軽度肝繊維症とを区別する方法を提供する。

【0091】

以下でさらに論じるように、タンパク質または多糖の量を直接アッセイすることによって、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1の検出または $\alpha 2$ -MG、HA、およびYKL-40の検出を実行でき、 $\alpha 2$ -MGおよびTIMP-1の場合は、RNAレベルをアッセイするか、あるいは $\alpha 2$ -MGまたはTIMP-1によって制御されるプロテアーゼの酵素活性をアッセイすることによって測定できることが理解される。同様に、本発明の方法で、1つ以上の付加的な繊維症マーカーを検出する際、マーカーを直接アッセイすることができ、あるいはマーカーのレベルと相関するRNAのような前駆体、分解産物、タンパク質分解産物、または活性をアッセイすることができる。 $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、およびYKL-40のレベル、または任意の付加的な繊維症マーカーのレベルの測定を、例えばRNAレベル、タンパク質レベル、または酵素活性に対する絶対値を用いて実行することができ、あるいは1つ以上の参照値との比較で相対値として測定できることが理解される。

10

20

【0092】

3つの繊維症マーカーアッセイ($\alpha 2$ -MG/HA/TIMP-1または $\alpha 2$ -MG/HA/YKL-40)のそれぞれならびに任意のさらなるアッセイを、任意の順番で他のものから独立して実行すること、およびアッセイフォーマットの任意の組み合わせは本発明により包含されることがさらに理解される。例として、TIMP-1酵素活性をアッセイすることによりTIMP-1のレベルを測定する一方で、 $\alpha 2$ -MGおよびHAの濃度をアッセイすることによって、 $\alpha 2$ -MGおよびHAのレベルを測定できる。別の例としては、酵素結合アッセイを用いてHAおよびTIMP-1のレベルを測定する一方で、ラジオイムノアッセイを用いて $\alpha 2$ -MGのレベルを測定できる。当業者には、3つの繊維症マーカー($\alpha 2$ -MG/HA/TIMP-1または $\alpha 2$ -MG/HA/YKL-40)の検出および任意のさらなるマーカーの検出を、同時に、または任意の順番で実行できることが理解される。さらに、血清試料のような単一の試料を個体から得て、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1、または $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1の検出用の3つの部分に細分でき、あるいは異なる試料を用いてマーカーを検出することができる。この試料は、同一もしくは異なるタイプであることも可能であるとともに、未希釈であるか、または同程度もしくは異なる程度に希釈されていることも可能である。2つ以上の試料を用いる際、通常、例えば数日から数週間の比較的短期間で試料を個体から得る。

30

【0093】

(RNA方法)

ハイブリダイゼーション法を用いて、 $\alpha 2$ -MGまたはTIMP-1 mRNAを検出でき、あるいは $\alpha 2$ -MGもしくはTIMP-1 mRNAのレベル、またはYKL-40のような本発明で有用な別の繊維症マーカーのmRNAのレベルを測定できる。相補的な核酸プローブを用いた特異的または選択的ハイブリダイゼーションによって、mRNAレベルを測定するための多数の方法が当該技術分野で周知である。このようは方法としては、溶液ハイブリダイゼーション法と、プローブまたは試料を固相支持体に固定する固相ハイブリダイゼーション法とが挙げられる。有用な方法の具体的な例としては、標的およびシグナル増幅法のような増幅法が挙げられ、さらにPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)および逆転写酵素PCR(RT-PCR)と、転写媒介増幅(transcription mediated amplification、Gen-Probe Incorporated; San Diego, CA)と、分岐鎖DNA(bDNA)増幅(branch

40

50

hed chain DNA amplification、Bayer Diagnostics; Emeryville, CA)と、鎖置換増幅(strand displacement amplification (SDA)、Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ)と、リガーゼ連鎖反応(LCR)増幅(ligase chain reaction amplification、Abbott Laboratories; Abbott Park, IL)とが挙げられる。本発明で有用なさらなる方法としては、RNアーゼプロテクションと、ノーザン分析、または他のRNAプロット、ドットプロット、もしくは膜を利用した技術と、ディップスティックと、ピンと、チップに固定される2次元アレイとが挙げられる。溶液および固相ハイブリダイゼーション法の両方を用いたmRNAレベルの定量的測定のための条件は、当該技術分野で周知であり、例えばAusubelら(Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47)、John Wiley & Sons, New York (1999))に記載されている。 10

【0094】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)RT-PCRは、本発明の方法で有用である。単離されたRNA、未精製試料、または例えば全血試料からペレットにした細胞のような部分的に分画された試料を用いて、PCRまたはRT-PCRを実行することができる。PCR法は当該技術分野で周知であり、例えばDieffenbachおよびDveksler(PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York (1995))に記載されている。二次元アレイのようなマルチ試料フォーマットでは、1度のアッセイで、多数の異なる試料を分析するという利点がある。固相ディップスティックを利用した方法も本発明で有用であり得、液体試料を迅速に分析し、素早く結果を得ることができるという利点を持つ。 20

【0095】

$\alpha 2$ -MGおよびTIMP-1 mRNAの検出用または $\alpha 2$ -MGおよびTIMP-1 mRNAレベルの測定用プローブは当該技術分野で周知である。当業者は、例えば図1に示すヒト $\alpha 2$ -MG核酸配列(配列番号1)のいくつかまたは全て、あるいは図3に示すヒトTIMP-1核酸配列のいくつかまたは全てにそれぞれ対応するプローブを使用することができる。 $\alpha 2$ -MGおよびTIMP-1 mRNAを検出するための、または $\alpha 2$ -MGおよびTIMP-1 mRNAレベルを測定するための様々なアッセイフォーマットに関する適当な条件は当該技術分野で周知であるか、また通常の方法を用いて確立することができる。例としては、ヒト試料中の $\alpha 2$ -MG RNAのノーザン分析用の条件およびプローブについては、例えばOrtegoら(上掲、1997)に記載されている。別の例としては、ヒト試料中の $\alpha 2$ -MG RNA発現を測定するためのRNAスロットプロットハイブリダイゼーション用の条件およびプローブについては、Simonら(上掲、1996)に記載されている。同様に、例えばYoshijiら(上掲、1996)に記載されているように、ヒト試料中のTIMP-1 RNAのノーザン分析を実行できる。ヒト試料中のTIMP-1に対するRT-PCRアッセイも当該技術分野で周知であり、例えばJanowska-Wieczorekら(上掲、2000)およびGroftら(上掲、2001)に記載されている。当業者には、 $\alpha 2$ -MG、TIMP-1、またはYKL-40のRNAを検出するために、あるいは $\alpha 2$ -MG、TIMP-1、もしくはYKL-40のRNAレベルまたは本発明の方法に有用な他の繊維症マーカーのレベルを測定するために、これらのアッセイおよび他のアッセイが有用であり得ることが理解される。 30 40

【0096】

(イムノアッセイ)

競合的および非競合的イムノアッセイフォーマット、抗原捕獲アッセイ、ならびに二抗体サンドイッチアッセイを含む様々なイムノアッセイフォーマットも本発明の方法で有用である(SelfおよびCook、Curr. Opin. Biotechnol. 7: 6 50

0 - 65 (1996))。一実施形態では、本発明の方法は、1つ以上の抗原捕獲アッセイに依拠する。抗原捕獲アッセイでは、抗体を固相に結合させ、 $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、YKL-40、または別の繊維症マーカー抗原が抗体に結合されるように試料を付加する。未結合タンパク質を洗浄により除去した後、例えばラジオアッセイを用いて(必要に応じて)、結合している抗原の量を定量できる(HarlowおよびLane、Antibodies A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory: New York、1988))。当業者には、抗体過剰の条件下で、または抗原の競合として、本発明に有用なイムノアッセイを実行し、抗原量を定量することによって、 $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、またはYKL-40のレベルを測定することが理解される。

10

【0097】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)は、本発明の方法に有用であり得る。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)、 β -ガラクトシダーゼ、またはウレアーゼのような酵素は、例えば抗 $\alpha 2$ -MG抗体、抗HA抗体、抗TIMP-1抗体、抗YKL-40抗体、または本発明の方法で使用される2次抗体に結合することができる。例えば発色基質テトラメチルベンジジン(TMB)とともに、西洋わさびペルオキシダーゼ検出系を用いることができ、これにより、過酸化水素の存在下で、450nmで検出可能な可溶性産物が生成される。他の都合のよい酵素結合系としては、例えばアルカリホスファターゼ検出系が挙げられ、発色基質のp-ニトロフェニルホスフェートとともに使用して、405nmで容易に検出できる可溶性産物を生成することができる。同様に、発色基質o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド(ONPG)とともに、 β -ガラクトシダーゼ検出系を用いて、410nmで検出可能な可溶性産物を発生させることができ、または尿素-プロモクレゾールパープル(Sigma Immunochemicals、St. Louis、MO)のような基質とともに、ウレアーゼ検出系を用いることができる。有用な酵素結合1次抗体および2次抗体を、下記にさらに記載するように、ジャクソンイムノ・リサーチ(Jackson Immuno-Research)(West Grove、PA)等の多数の商業的供給元から得ることができる。

20

【0098】

$\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、またはYKL-40を検出するために、あるいは $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、もしくはYKL-40のレベル、または本発明の方法に準じた別の繊維症マーカーのレベルを測定するために、化学発光検出も有用である。Amersham等、様々な供給元から化学発光2次抗体が市販されている。

30

【0099】

$\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、またはYKL-40を検出するために、あるいは $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、もしくはYKL-40のレベル、または本発明の方法での別の繊維症マーカーのレベルを測定するために、蛍光検出も有用である。有用な蛍光色素としては、制限はなく、DAPI、フルオレセイン、ヘキスト33258、R-フィコシアニン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、およびリサミンが挙げられる。抗 $\alpha 2$ -MG抗体、抗HA抗体、抗TIMP-1抗体、または抗YKL-40抗体のような、フルオレセイン標識またはローダミン標識された $\alpha 2$ -MG特異的結合因子、HA特異的結合因子、TIMP-1特異的結合因子、またはYKL-40特異的結合因子、あるいはフルオレセイン標識またはローダミン標識2次抗体が本発明で有用であり得る。下記にさらに記載するように、例えばTago Immunologicals(Burlingame、CA)から、有用な蛍光抗体が市販されている。

40

【0100】

ラジオイムノアッセイ(RIA)も本発明の方法で有用であり得る。このようなアッセイは当該技術分野で周知である。例えばBrophyら(Biochem. Biophys. Res. Comm. 167: 898-903(1990))がTIMP-1の検出に

50

対するラジオイムノアッセイについて記載しており、ファルマシア (Pharmacia) により、¹²⁵I 標識 HA 結合タンパク質を用いた HA の定量 (Guechot ら、Clin. Chem. 42: 558 - 563 (1996)) のためのラジオメトリックアッセイが製造されている。例えば ¹²⁵I 標識 1 次抗体または 2 次抗体を用いて、ラジオイムノアッセイを実行することができる (Harlow および Lane、上掲、1988)。

【0101】

例えば、発光基質からの色を検出するための分光光度計、¹²⁵I 検出用のガンマカウンターのような放射線を検出するための放射線測定器、または特定の波長の光の存在下で蛍光発光を検出するための蛍光光度計を用いて、検出可能な試薬からのシグナルを分析することができる。酵素結合アッセイを利用する際、EMAX Microplate Reader (Molecular Devices、Menlo Park、CA) のような分光光度計を用いて、製造元の指示に従い $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、もしくは YKL-40 の量、または別の繊維症マーカーの量の定量的分析を実行できる。必要に応じて、本発明のアッセイを自動化することができ、またはロボットの的に実行することができるとともに、複数の試料からのシグナルを同時に検出できることが理解される。

10

【0102】

本発明の方法は、キャピラリー電気泳動イムノアッセイ (CEIA) の使用も包含し、必要に応じて自動化することができる。例えば Schmalzing および Nashabeh (Electrophoresis 18: 2184 - 93 (1997)) ならびに Bao (J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. 699: 463 - 80 (1997)) に記載されているように、レーザー誘導蛍光と組み合わせて、イムノアッセイを用いることもできる。フローインジェクションリポソームイムノアッセイおよびリポソーム免疫センサーのようリポソームイムノアッセイを用いても、 $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、または YKL-40 を検出することができ、あるいは $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、もしくは YKL-40 のレベル、または本発明の方法に準じた別の繊維症マーカーのレベルを測定することができる (Rongen ら、J. Immunol. Methods 204: 105 - 133 (1997))。

20

【0103】

サンドイッチ酵素イムノアッセイも本発明の方法で有用である。二抗体サンドイッチアッセイでは、第 1 の抗体を固相支持体に結合させ、抗原が第 1 の抗体に結合するのを可能にする。 $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、YKL-40、または別の繊維症マーカー抗原の量を、繊維症マーカーに結合している第 2 の抗体の量を測定することによって定量する。

30

【0104】

例として、Murawaki ら (前出、1993) に記載されるように、TIMP-1 のレベルを測定するために、二抗体サンドイッチイムノアッセイが有用であり得る。簡略すると、血清 (25 μ l) を、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (1.0 ml、pH 7.0) を用いて 41 倍で希釈する。希釈した試料 (20 μ l) を、西洋わさびペルオキシダーゼで標識した 50 ng/ml モノクローナル抗体 (クローン 7-6C1 の Fab)、1 % ウシ血清アルブミン、0.1 % Tween 20、0.1 M NaCl、および 0.005 % チメロサルを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 0.3 ml (pH 7.0) と混和する。混和した溶液の 0.1 ml アリコートをし、異なるエピトープ特異性を有する第 2 のモノクローナル抗体 (クローン 7-23G9) で予め被覆した各マイクロプレートウェルに移し、室温で 30 分間、振とうせずにプレートをインキュベートする。0.1 % Tween 20 および 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 0.3 ml (pH 7.0) で、プレートを 3 回洗浄する。0.5 mg/ml o-フェニレンジアミン および 0.02 % H_2O_2 を含む 0.15 M クエン酸リン酸ナトリウム緩衝液 0.1 ml (pH 4.9) を用いた室温での 15 分間のインキュベーションにより、プレートに結合したペルオキシダーゼ活性をアッセイする。2 N H_2SO_4 を 0.1 ml 加えて反応を

40

50

停止させた後、ヒト血清 T I M P - 1 の標準品を用いて、マイクロプレートリーダーで 492 nm での吸光度を測定する。対数目盛でグラフ化することによって、T I M P - 1 の量および 492 nm での吸光度間の直線性が示され、1 ウエルに対して約 1.5 から 300 μ g の測定範囲を生ずる。

【0105】

定量的ウエスタンブロッティングを用いても、 $\alpha 2$ - M G、H A、T I M P - 1、または Y K L - 40 を検出することができ、あるいは $\alpha 2$ - M G、H A、T I M P - 1、もしくは Y K L - 40 のレベル、または本発明の方法での別の線維症マーカー抗原のレベルを測定することができる。スキャニングデンシトメトリーのような周知の方法により、ウエスタンブロットを定量することができる。例としては、10% S D S - P A G E L a e m m l i ゲル上で、タンパク質試料を電気泳動する。例えばヒト $\alpha 2$ - M G、H A、T I M P - 1、または Y K L - 40 に対して、1 次マウスモノクローナル抗体をブロットで反応させ、事前のスロットブロット実験を用いて、抗体結合が直線性であるかを確認する。ヤギ抗マウス西洋わさびペルオキシダーゼ結合抗体 (B i o R a d) を 2 次抗体として用いて、シグナル検出を、例えば R e n a i s s a n c e c h e m i l u m i n e s c e n c e k i t (N e w E n g l a n d N u c l e a r ; B o s t o n , M A) で、製造元の指示に従い化学発光を用いて実行する。スキャニングデンシトメーター (M o l e c u l a r D y n a m i c s ; S u n n y v a l e , C A) を用いて、ブロットのオートラジオグラフを分析し、陽性対照に標準化する。例えば実測値と陽性対照間の比率 (デンシトメトリーの指数) として値がレポートされる。このような方法は当該技術分野で周知であり、例えば P a r r a ら (J . V a s c . S u r g . 28 : 669 - 675 (1998)) に記載されている。

【0106】

(抗体の供給源)

本明細書中で上述したように、限定はされないが、酵素結合免疫吸着アッセイ、ラジオイムノアッセイ、および定量的ウエスタン分析を含むイムノアッセイは、本発明の診断方法で有用である。このようなアッセイは、1 種類以上の抗体、例えば抗 $\alpha 2$ - M G 抗体、抗 H A 抗体、抗 T I M P - 1 抗体、または抗 Y K L - 40 抗体に依拠する。本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、その最も広義の意味で用いられ、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体とともに、 $\alpha 2$ - M G、H A、T I M P - 1、Y K L - 40、または関連する線維症マーカー抗原に対して、少なくとも約 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ の結合活性を保有する抗体のポリペプチドフラグメントを含む。当業者には、抗 $\alpha 2$ - M G 抗体、抗 H A 抗体、抗 T I M P - 1 抗体、および抗 Y K L - 40 抗体フラグメントのような抗体フラグメント、ならびに F a b、F (a b ')₂、および F v フラグメントを含む抗体フラグメントは、関連する線維症マーカー抗原に対する結合活性を保有することができるので、本明細書で使用する場合に、抗体という用語の定義内に含まれることが理解される。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を調製する方法は、当該技術分野でルーチンであり、例えば H a r l o w および L a n e (上掲、1988) に記載されている。

【0107】

本明細書で使用する場合、抗体という用語は、 $\alpha 2$ - M G、H A、T I M P - 1、Y K L - 40、または関連する線維症マーカー抗原と特異的に結合するキメラ抗体、ヒト化抗体、および一本鎖 F v フラグメント (s c F v) のような、1 つの V_H および 1 つの V_L ドメインを最低限含む非天然に生じる抗体およびフラグメントも包含する。B o r r e b a e c k (編) (A n t i b o d y E n g i n e e r i n g (S e c o n d e d i t i o n) N e w Y o r k : O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s (1995)) に記載されているように、このような非天然に生じる抗体を、固相ペプチド合成を用いて構築するか、組換え的に生産するか、または例えば可変重鎖および可変軽鎖からなるコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。

【0108】

10

20

30

40

50

様々な有用な抗 $\alpha 2$ -MG、抗HA、抗TIMP-1、および抗YKL-40モノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体が当該技術分野で周知であり、多くの場合、市販されている。例えば、 $\alpha 2$ -マクログロブリンに対する比濁分析アッセイは、Beckman Coulter (キット番号449430) から入手可能であり、ELISAおよびウエスタンブロッティングに適した親和性精製ヤギ抗ヒト $\alpha 2$ -MG抗体およびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト $\alpha 2$ -MG抗体は、例えばCedarlane Laboratories Limited (CL20010APおよびCL20010APHP) ならびにAffinity Biologicals Incorporated (GAA2M-APおよびGAA2M-APHRP) から入手可能である。同様に、親和性精製ヒツジ抗HA抗血清をBiotrend (番号5029-9990) から得ることができる。

10

【0109】

抗ヒトTIMP-1抗体も、様々な商業的供給源から容易に入手できる。例えば、抗ヒトTIMP-1モノクローナル抗体147-6D11は、ELISAまたはウエスタンブロッティング分析に適しており、Medicorp, Inc. (Montreal, Canada) から得ることができ、さらに例えばウエスタンブロッティングまたはサンドイッチELISAアッセイで使用するための抗ヒトTIMP-1モノクローナル抗体MAB970は、R&D Systems, Inc. から入手できる。サンドイッチELISAによってTIMP-1を検出するために、例えばR&D Systems, Inc. のピオチン標識抗ヒトTIMP-1抗体 (BAF970) とMAB970を組み合わせること

20

【0110】

(活性に対するアッセイ)

上記で論じたように、 $\alpha 2$ -MG、HA、またはTIMP-1を検出するために、あるいは $\alpha 2$ -MG、HA、もしくはTIMP-1のレベル、または別の線維症マーカーのレベルを測定するために、線維症マーカーの活性にもとづくアッセイが有用であることから、本発明の方法でも有用である。例えば、本発明の方法では、試料中の $\alpha 2$ -MGの検出

または $\alpha 2$ -MGのレベルの測定のために、 $\alpha 2$ -MG活性に対する様々なアッセイが有用である。 $\alpha 2$ -MG結合プロテアーゼは、阻害されたタンパク質分解活性を示すが、少量の基質のアミドおよびエステル結合を加水分解する能力を保有するので、アミド分解活性を阻害することなしに、トリプシン、スプチリシン、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、サーモライシン、もしくはパパイン活性、または別の標的プロテアーゼの活性の阻害をアッセイすることによって、 $\alpha 2$ -MGを検出することができ、またレベルを測定することができる。標的プロテアーゼ活性の阻害をアッセイするために、標識カゼインまたは標識フィブリンのような基質が有用である。さらに、その広範なプロテアーゼ基質特異性にもとづいて、例えば^{1 4} C-カゼインおよび^{1 2 5} I-フィブリンを用いて、2つ以上の標的プロテアーゼの活性の阻害をアッセイすることによって、 $\alpha 2$ -MGのレ

30

40

【0111】

同様に、TIMP-1活性に対するアッセイが当該技術分野で周知である。具体的には

50

、例えばリバーゼラチンザイモグラフィーを用いて、マトリックスメタロプロテアーゼのプロテアーゼ活性を阻害する能力をアッセイする。ゼラチナーゼA等のゼラチナーゼを、ゼラチン基質を有するゲルミックスに含ませることによって、リバーゼラチンザイモグラフィーを実行する。ゼラチナーゼの簡便な供給源として、仔ハムスター腎臓細胞由来の馴化培地等、馴化培地を用いることができる。血漿試料を電気泳動し、得られたパターンを、例えばヒューレットパッカード (Hewlett Packard) のスキャナーを用いた走査による計数化により分析する。TIMP-1活性は、ゼラチン分解の減少として観測される。例えばKossakowskaら(上掲、1998)を参照せよ。当業者には、TIMP-1活性に対するこれらのアッセイおよび他のルーチンのアッセイが本発明の方法で有用であることが認識される。

10

【0112】

(付加的なマーカー)

必要に応じて、任意の付加的なマーカーをアッセイせずに、または任意の他の臨床もしくは超音波検査特性を評価せずに、3種類のマーカー $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1を検出することによって、本発明の方法を実施できることは明瞭である。さらに、1つ以上の付加的な線維症マーカーアッセイまたは1つ以上の臨床もしくは超音波検査の変数の評価と組み合わせ、これらの3種類のアッセイを1つのパネルとして用いることができる。特定の実施形態では、本発明は、試料中の $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1を検出することと、少なくとも1つの以下のマーカー：PIIINP、ラミニン、テネイシン、IV型コラーゲン、VI型コラーゲン、YKL-40、MMP-3、MMP-2、MMP-9/TIMP-1複合体、sFasリガンド、TGF- β 1、IL-10、アポA1、アポA2、またはアポBも検出することによって、個体の肝線維症の存在または重症度を診断する方法を提供する。一実施形態では、肝線維症の存在または重症度を診断するための本発明の方法は、試料中の $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、およびYKL-40を検出する工程を含む。さらなる実施形態では、本発明の方法は、 $\alpha 2$ -MG、HA、TIMP-1、およびYKL-40を検出することによって、付加的な線維症マーカーは検出されない。

20

【0113】

上記の観点から、線維症の1つ以上の付加的な生化学的または血清学的マーカーに対するアッセイあるいは線維症に関連する1つ以上の臨床変数または超音波検査変数の評価は、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1の検出と組み合わせ、肝線維症の存在または重症度を診断できることは明瞭である。付加的な生化学的および血清学的マーカーの例としては、限定はされないが、PIIINP、ラミニン、テネイシン、IV型コラーゲン、VI型コラーゲン、YKL-40、MMP-3、MMP-2、MMP-9/TIMP-1複合体、sFasリガンド、TGF- β 1、IL-10、アポA1、アポA2、およびアポBが挙げられる。本発明で有用な付加的な生化学的および血清学的マーカーとしては、制限はなく、コラーゲンタイプIのようなコラーゲンと、フィブロンectinと、ピトロネクチンと、エンドセリンと、ウンジュリンと、セレクチン、血管細胞接着分子(VCAM)、および細胞間接着分子(ICAM)のような接着分子と、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)のような炎症誘発性サイトカインと、偽コリンエステラーゼと、マンガンスーパーオキシドジスムターゼと、N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ(β -NAG)と、グルタチオンペルオキシダーゼと、結合組織成長因子(CTGF)と、血小板由来成長因子(PDGF)と、PDGF受容体と、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)と、誘導型一酸化窒素合成酵素と、ニトロチロシンと、ビリルビンと、フェリチンおよび α -フェトプロテインと、 γ -グルタミルトランスベプチダーゼ(GGT)と、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)と、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)と、ASAT/ALT比と、アルブミンと、 γ -グロブリンと、 β γ -ブロックと、プロトロンビン指数と、Child-Pughスコアと、PGA指数(プロトロンビン時間、GGT濃度、およびアポA1濃度)と、PGA指数($\alpha 2$ -マクロブリンレベルを用いたPGAスコア)と、ヘモグロビンと、平均赤血球容積と、リンパ球数と、コレステロールと

30

40

50

、尿と、クレアチニンと、ナトリウムと、血小板数とが挙げられる。

【0114】

臨床または超音波検査変数も本発明の方法で有用な線維症「マーカー」であり得る。したがって、1つ以上の臨床または超音波検査変数の分析を、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1の検出と組み合わせて、肝線維症の存在または重症度、あるいは本明細書中上述したような別の線維症障害を診断できる。例としては、このような臨床変数は、患者年齢または性別、手掌紅斑の存在、デュピュイトラン拘縮、ばち状指、クモ状母斑、硬化した肝臓、脾腫、あるいは側副循環とすることができる。本発明の方法で有用な超音波検査変数としては、例えば肝臓の長さ(右腎)、不均整な肝臓表面、肝臓の不均質性、脾臓の長さ、腹水、または側副循環が挙げられる。例えばOberettiら(Gastroenterol. 113: 1609-1616 (1997))を参照せよ。これらの、かつ他の周知の臨床または超音波検査変数の分析が本発明の方法で有用であることが理解される。さらに、本発明の方法は、例えば肝臓の触診のような臨床または超音波検査変数の測定を包含し、あるいは1つ以上の歴史的な、または従来測定された臨床もしくは超音波検査変数に依拠することができる。

10

【0115】

本発明で有用な生化学的または血清学的マーカーを検出するためのアッセイは、当該技術分野で周知であり、多くの場合市販されている。このようなアッセイとしては、限定はされないが、RT-PCRのような増幅を利用した方法およびRNAレベルの定量分析に対する他の方法と、ラジオイムノアッセイ、酵素結合アッセイ、二抗体サンドイッチアッセイ、および定量的ウエスタン分析のようなイムノアッセイと、酵素活性のような生物学的活性に対するアッセイとが挙げられる。PIIINP、ラミニン、テネシン、IV型コラーゲン、VI型コラーゲン、YKL-40、MMP-3、MMP-2、MMP-9/TIMP-1複合体、sFasリガンド、TGF- β 1、IL-10、アポA1、アポA2、およびアポBに対するアッセイは、表1に概説するように様々な供給源から市販されている。

20

【0116】

本発明の方法で、 $\alpha 2$ -MG、HA、およびTIMP-1の検出と組み合わせることができる付加的な生化学的または血清学的マーカーに対するアッセイも当該技術分野で周知である。例えば、Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)から入手できる比濁分析アッセイにより、フィブロネクチンを簡便にアッセイできる。ベーリンガー(Boehringer)から入手できる標準的手法を用いて、偽コリンエステラーゼ(PCHE)をアッセイできる。Cortecs診断から入手できるキットを用いて、酵素活性をアッセイすることによって、N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ(β -NAG)のレベルを測定できる。例えばBender MedSystemから入手できるキットを用いたELISAによって、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ(Mn-SOD)レベルを簡便に測定できる。例えばRandox Laboratories Ltd (Oceanside, CA)から入手できるキットを用いて、酵素活性をアッセイすることによって、グルタチオンペルオキシダーゼレベルを測定できる。

30

【0117】

40

【表 1】

表 1 線維症マーカーアッセイにかかわる市販元			
マーカー	企業	アッセイ	カタログ番号
PIIINP	Orion Diagnostica (Espoo, Finland)	RIA	05903
ラミニン	Chemicon Intl. (Temecula, CA)	ELISA	ECM310
テネイシン	Chemicon Intl. (Temecula, CA)	ELISA	ECM320
コラーゲン IV	Iatron Laboratories (Tokyo, Japan)	RIA	KCAD1
YKL-40	Metra Biosystems (Mountain View, CA)	ELISA	8020
MMP-3	Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ)	ELISA	RPN 2613
MMP-2	Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ)	ELISA	RPN 2617
MMP-9/TIMP-1 複合体	SBA Sciences (Turku, Finland)	ELISA	MP2215
sFas リガンド	Bender MedSystems Diagnostics (Vienna, Austria)	ELISA	BMS260/2
TGF- β 1	R&D Systems (Minneapolis, MN)	ELISA	DB100
IL-10	R&D Systems (Minneapolis, MN)	ELISA	HS100B
アポ A1	AlerChek, Inc. (Portland, ME)	ELISA	A70101
アポ A2	AlerChek, Inc. (Portland, ME)	ELISA	A70102
アポ B	Sigma Diagnostics (St. Louis, MO)	IT*	357-A
* 免疫比濁法 (immunoturbidimetric) を示す			

10

20

30

40

Roche Diagnostics 試薬とともに、Hitachi 917 Automate (Mannheim, Germany) 等の自動分析装置を用いて、総ビリルビンまたは直接ビリルビン、GGT、AST、およびALTレベルを測定することができる。Doumasら (Clin. Chim. Acta 31: 87-96 (1971)) に記載されているように、例えばプロモクレゾールグリーン法によって、アルブミンレベルを測定でき、例えばBoehringerから入手できるイムノアッセイを用いて、フェリチンおよび α -フェトプロテインレベルを簡便に測定できる。さらに、例えばオー

50

トマティックシステム (Hydrasys and Hyrys, Sebia; Issy-les-Moulineaux, France) での血清タンパク質の電気泳動によって、 α_1 グロブリン、 α_2 グロブリン、 β グロブリン、および γ グロブリンのレベルを測定することができる。プロトンピン活性を測定する方法も当該技術分野で周知であり、Organon Technika (West Orange, NJ) から入手できる凝固方法を含む。Poynardら (Gastroenterol. 100:1397-1402 (1991)) に記載されているようにPGA指数を測定でき、Naveauら (Dig. Dis. Sci. 39:2426-2432 (1994)) に記載されているような周知の方法により、PGA指数も測定できる。

【0118】

10

様々な手法により、例えばBayer-Technicon H2分析器 (Bayer-Technicon Instruments; Tarrytown, NY) を用いて、血小板数、リンパ球数、平均赤血球容積、および関連する変数を測定できる。例えばBoehringerから入手できる標準的手法によりコレステロールレベルを測定できる。したがって、上記のものを含むが、限定はされない様々な手法が当該分野で周知であり、本発明の診断方法で有用であることが当業者には明瞭である。

【0119】

(α_2 -MG/H A/YKL-40パネル)

本発明は、試料中の α_2 -MGを検出することと、試料中のH Aを検出することと、試料中のYKL-40を検出することと、 α_2 -MG、H A、およびYKL-40の有無またはレベルにもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することとにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法も提供する。本発明の方法は、例えば中程度から重度 (F2~F4) の肝線維症から、非または軽度 (F0~F1) の肝線維症を区別するのに有用であり得る。

20

【0120】

一実施形態では、本発明は、個体から得た試料中の α_2 -MGタンパク質のレベルを測定することと、個体から得た試料中のH Aのレベルを測定することと、個体から得た試料中のYKL-40タンパク質のレベルを測定することと、 α_2 -MGタンパク質、H A、およびYKL-40タンパク質のレベルにもとづいて、個体の肝線維症の有無または重症度を診断することとにより、個体の肝線維症の有無または重症度を診断する方法を提供する。必要に応じて、酵素結合アッセイを用いて、 α_2 -MGタンパク質、H A、およびYKL-40タンパク質のレベルをそれぞれ測定することができる。

30

【0121】

したがって、特定の実施形態では、本発明は、試料中の線維症マーカーYKL-40のレベルを測定することに部分的に依拠する診断方法を提供する。YKL-40は、ヒト軟骨糖タンパク質39 (HC gp-39) としても知られており、40 kDaの分子量と、タンパク質のアミノ末端配列チロシン・リシン・ロイシン (YKL) にちなんで名づけられている。キチナーゼファミリー (18-糖質加水分解酵素) の哺乳類メンバーであるこの糖たんぱく質は、ヘパリンおよびキチンに結合するレクチンであり、軟骨細胞、滑膜細胞、活性化されたマクロファージ、好中球、およびMG-63骨肉腫細胞により産生される (Hakalaら、J. Biol. Chem. 268:25803-25810 (1993); NyirkosおよびGolds、Biochem. J. 268:265-268 (1990); Renkemaら、Eur. J. Biochem. 251:504-509 (1998); Volckら、Proc. Assoc. Am. Physicians 110:351-360 (1998); ならびにJohansenら、J. Bone Miner. Res. 7:501-511 (1992)。正常組織および患部組織中のYKL-40の発現パターンは、この糖タンパク質が細胞外マトリックスリモデリングまたは組織炎症で機能することができることを示している (NyirkosおよびGolds、上掲、1990; Renkemaら、上掲、1998; ならびにVerheijdenら、Arthritis Rheum. 40:1115-1125 (1997))

40

50

。さらに、YKL-40 mRNAを肝臓中で発現されており、初期の研究により、YKL-40の発現は、慢性的な肝疾患の患者中で増加することと、増加した血清YKL-40は、線維症および繊維形成に関連する可能性があることが示された(Johansenら、Scand. J. Gastroenterol. 32:582-590(1997)；およびJohansen、J. Hepatol. 32:911-920(2000))。

【0122】

血清および関節液のような試料中のYKL-40のレベルを測定する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、YKL-40に対して作製したウサギ抗体に基づいたYKL-40に対するラジオイムノアッセイについては、Johansenら(Br. J. Rheumatology 32:949-955(1993))に記載されている。さらに、マイクロリットルストリップウエルフォーマットでのサンドイッチ酵素イムノアッセイは、Metra Biosystemsから市販されている。Metra Biosystemsアッセイでは、ビオチン結合モノクローナル抗YKL-40抗体のFabフラグメントは、ストリップ上のストレプトアビジンに結合し、試料中のYKL-40を捕獲する。アルカリホスファターゼ結合ポリクローナル抗YKL-40抗血清を、捕獲されたYKL-40抗原に結合させ、YKL-40濃度の指標としてp-ニトロフェニルリン酸基質を用いて、アルカリホスファターゼの活性を検出する。YKL-40 RNAまたはタンパク質のレベルを検出または測定するために、これらのアッセイまたは他の通常のアッセイを用いて、本発明の方法を実施できることが理解される。

10

20

【0123】

以下の実施例は、説明を目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0124】

(実施例I)

(肝線維症の非侵襲性診断用マーカーパネル)

この実施例により、HCVに感染された患者で、線維症段階F2、F3、およびF4を段階F0およびF1から区別するのに有用なパネルとしていくつかの血清学的マーカーを組み合わせることができることを証明する。

【0125】

RNAおよび免疫分析によりC型肝炎ウイルスに対して陽性であり、かつアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)レベルの増加を有する194人のHCV患者から得た血清試料を既存の血清ライブラリーから無作為に選択した。各患者は、治療の一環として肝生検を受けた。患者試料を選択して、他の通常の血液マーカーの比較およびHCVウイルス量を含む通常の医療に伴う身体的検査結果の比較を可能した。

30

【0126】

研究の組み入れ基準(inclusion criteria)は、患者が1)肝生検および血清抽出時に確認したC型肝炎感染を有すること、2)研究から独立した医療の一環として肝生検を受けたこと、および3)あらかじめインフォームドコンセントを行ったことである。インフォームドコンセントを行わなかった患者または拘留されていた患者は研究から除外した。

40

【0127】

フランスのメタビル(Metavir)共同研究グループ(The French Metavir Cooperative Study Group)(Hepatol. 20:15-20(1994))に説明される基準にしたがって、治療に先立って、針生検標本の組織病理学的検査により194人の患者に関する線維症スコア(Metavir段階)を確立した。全てのMetavir線維症スコアは、同病理学者により確立された。全ての分析に関して、F0およびF1のMetavirスコアを「非/軽度」の線維症としてまとめて分類し、F2、F3、およびF4のスコアを「中程度/重度」の線維症としてまとめて分類した。表2に示すように、グループ中のF2~F4スコアの比率にも

50

とづいて、194名の患者グループでの線維症罹患率の測定結果は60%であった。

【0128】

【表2】

表 2 線維症段階によるHCV患者研究母集団（194人）の構成		
線維症段階	人数	F0-F1総人数またはF2-F4総人数
F0	38	F0-F1 = 78
F1	40	
F2	40	F2-F4 = 116
F3	39	
F4	37	
合計	194	罹患率 = 59.8%

10

上記の表に示すように、HCV患者試料のパネルは、非常に高度の線維症段階（F4）を有する37の試料と、非常に低度または全く無い線維症段階（F0）を有する患者から得た39の試料と、線維症段階F1、F2、またはF3を有する患者から得た158の試料とを含む。

20

【0129】

ラミニン、YKL-40、HA、TIMP-1、PIIINP、IV型コラーゲン、およびα2-MGを含む複数の推定線維症マーカーの存在に関して血清試料をアッセイした。市販のキットを用いて、製造元の指示に従いアッセイを実行した（表3を参照せよ）。ラミニン、YKL-40、HA、TIMP-1、PIIINP、IV型コラーゲン、およびα2-MGに対して分析された194の試料に関して得られた結果を表4に示す。

【0130】

30

【表 3】

表 3 市販されている線維症マーカー検出用キット			
マーカー	製造元	アッセイの種類	カタログ番号
ラミニン	Chemicon Intl. (Temecula, CA)	ELISA	ECM310
YKL-40	Metra Biosystems (Mountain View, CA)	ELISA	8020
HA	Corgenix (Westminster, CO)	ELISA	029001
TIMP-1	Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ)	ELISA	RPN 2611
PIIINP	Orion Diagnostica (Espoo, Finland)	RIA	05903
コラーゲン IV	Iatron Laboratories (Tokyo, Japan)	RIA	KCAD1
α 2-MG	Beckman Coulter	比濁法	449430

10

20

【 0 1 3 1 】

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100010	B-A	175.244	81.608	15.730	1308.802	2.288	1.737	3.03
100038	P-B	151.888	67.220	9.288	917.104	2.049	2.617	2.01
100044	C-B	187.811	60.757	44.127	1610.690	3.883	3.408	5.03
100059	T-B	232.082	51.002	22.583	1077.343	2.297	1.901	2.29
100069	N-C	285.269	131.726	73.851	2381.222	8.034	2.954	4.05
100077	H-C	268.685	47.709	18.066	1122.818	2.260	3.159	1.75
100090	B-C	263.426	26.370	47.339	1380.182	3.526	2.561	3.30
100127	D-D	279.580	166.113	105.505	1180.879	3.343	2.804	3.54
100167	G-F	274.533	482.708	341.132	2523.637	9.745	5.110	3.98
100175	B-G	266.903	95.808	27.721	1178.105	4.345	3.911	2.67
100178	M-G	211.613	159.040	25.669	1176.718	2.357	3.795	1.93
100182	T-G	246.686	55.391	8.889	1308.815	2.924	2.468	2.86
100198	A-G	226.372	48.441	13.901	1126.962	2.595	0.819	3.03
100209	J-G	288.524	83.925	5.051	1081.470	5.173	0.801	2.73

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100229	S-H	253.561	110.020	46.568	1391.433	4.905	4.410	3.12
100238	T-J	229.781	38.076	29.516	1190.567	2.626	3.141	2.68
100245	D-K	279.768	270.250	171.481	2310.561	5.876	4.713	4.01
100247	C-K	244.559	131.482	10.219	1405.454	2.297	1.089	2.50
100250	J-K	262.136	101.729	54.821	1155.963	4.192	2.655	4.04
100252	J-K	260.998	61.366	57.275	1560.856	3.498	7.040	3.24
100253	E-K	292.189	173.917	168.768	1652.033	9.252	7.336	3.59
100254	W-K	288.551	477.560	102.775	1580.756	5.300	4.188	4.01
100271	M-L	278.201	89.900	69.651	1140.761	4.092	4.066	2.94
100276	V-L	257.309	176.112	12.196	1088.369	1.985	4.147	3.57
100284	M-L	224.339	130.263	31.822	1104.885	3.653	2.542	3.14
100290	D-L	199.542	541.552	50.429	1550.943	4.399	6.368	3.40
100294	TRL	281.501	217.328	200.436	2340.630	11.006	7.016	4.20
100301	P-M	285.543	430.475	29.772	1884.061	4.453	3.524	4.26

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100313	J-M	301.751	188.062	45.539	1852.125	3.610	4.773	4.22
100323	M-M	223.002	626.140	144.334	2382.232	8.873	8.042	4.09
100334	K-R	173.320	63.317	38.516	1290.231	4.327	4.753	2.46
100339	S-M	184.085	36.125	12.049	1268.153	1.865	2.211	2.39
100340	K-M	206.582	57.496	22.015	974.475	2.315	0.819	2.80
100341	T-M	257.580	76.834	91.748	1492.882	3.976	4.793	3.00
100343	D-M	334.202	140.629	49.322	1098.199	4.092	2.412	3.12
100357	P-M	419.291	27.368	14.971	784.932	4.225	0.801	2.01
100374	K-N	300.366	28.231	36.608	1697.678	5.478	6.690	3.16
100379	T-O	233.496	75.711	26.906	1437.939	2.086	2.437	3.70
100382	C-P	206.796	44.461	6.034	989.007	2.214	4.409	2.14
100397	R-R	223.006	66.474	13.912	981.736	4.091	3.814	3.53
100410	R-S	224.775	36.605	37.499	1152.258	4.592	6.466	3.43
100438	D-Q	228.008	149.349	75.452	1682.636	7.734	7.039	3.89

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100451	H-R	248.528	526.840	226.386	1961.029	10.505	7.113	3.36
100453	A-R	225.862	65.956	33.169	1421.632	2.786	3.465	3.79
100454	O-R	220.481	56.892	32.531	1125.960	3.003	7.014	3.68
100456	S-S	241.591	46.274	30.745	1337.355	5.182	2.411	2.81
100466	S-S	210.562	48.605	34.443	1482.475	4.286	4.754	3.27
100470	D-S	229.912	162.039	55.053	1684.159	6.806	3.640	3.10
100485	C-T	229.811	113.523	38.389	1247.547	3.901	3.291	4.11
100486	M-T	265.326	281.257	706.557	2716.589	15.362	11.975	2.82
100505	L-W	229.363	33.843	23.305	1149.367	3.397	2.889	3.29
100519	R-W	204.646	68.632	10.431	845.571	3.852	6.815	2.52
100547	S-G	223.959	75.711	8.257	1000.623	4.286	3.090	2.92
100638	J-P	265.819	264.250	68.361	2095.698	15.945	7.418	4.67
100640	M-V	170.293	43.770	17.728	1200.584	4.755	5.561	3.50
100006	L-A	135.628	75.349	79.430	1354.782	6.612	3.477	3.14

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, IV型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100009	R-A	157.239	72.429	21.947	932.635	2.080	3.050	1.96
100011	A-B	136.197	251.237	149.932	2004.294	7.600	4.853	3.57
100016	E-A	161.133	272.434	186.536	1900.341	9.341	9.071	3.08
100021	E-AV	184.000	537.630	102.420	2456.883	4.863	6.157	3.97
100023	C-B	126.346	194.523	47.976	1540.914	7.000	4.488	3.21
100027	D-B	133.660	75.820	33.912	1519.528	2.966	3.286	3.51
100030	R-B	140.584	50.007	153.135	1219.549	3.237	5.200	1.89
100035	K-B	124.645	37.383	60.934	1214.060	3.582	3.620	2.41
100036	G-B	152.864	87.596	369.681	1305.790	3.163	4.391	2.71
100041	M-B	168.422	42.376	143.372	1502.562	6.667	3.692	3.10
100042	M-B	138.754	211.387	266.568	2899.870	8.233	8.559	3.98
100043	C-B	111.743	30.883	17.447	1168.327	5.488	2.343	2.76
100045	V-B	164.940	241.063	221.249	2010.088	9.097	4.512	3.76
100051	K-B	154.743	222.409	131.122	1600.554	4.863	4.075	3.43

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, IV型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100055	D-B	146.817	110.018	84.447	1827.668	3.188	4.439	5.72
100065	G-B	134.349	72.429	112.148	1455.905	3.353	3.002	4.02
100071	R-C	135.011	74.407	30.352	1485.573	2.820	3.120	3.29
100073	G-C	146.785	63.761	43.312	1530.873	3.027	2.040	< 0.75
100074	L-C	151.514	80.248	49.917	1647.700	5.036	3.286	3.11
100078	R-C	163.144	213.365	45.839	1399.880	3.393	2.297	2.61
100081	A-C	147.915	45.862	56.686	1346.315	4.056	4.707	2.37
100084	G-C	144.665	43.130	116.238	1736.670	5.337	6.702	< 0.75
100091	P-C	171.782	215.249	33.321	1999.807	5.096	3.835	3.75
100093	M-C	133.786	35.499	105.726	1499.707	5.983	5.876	2.85
100099	S-C	174.239	49.159	28.163	1392.574	4.381	5.876	3.18
100100	D-C	181.284	68.095	82.324	1613.489	5.552	5.547	3.71
100103	J-C	151.396	74.849	55.720	1666.282	4.771	3.955	3.57
100104	C-C	128.182	38.890	13.719	1100.784	3.798	5.324	2.21

表 4

ラニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100106	S-C	170.685	41.811	37.449	1280.697	5.096	4.464	2.52
100107	J-C	103.835	27.397	32.334	1416.481	2.910	3.740	2.57
100108	J-C	148.294	145.629	52.822	1884.389	4.484	3.597	4.62
100115	S-DLT	134.784	108.134	96.415	1597.696	8.860	5.225	3.48
100121	R-D	149.335	74.878	34.109	1759.752	5.912	3.716	4.36
100124	R-D	134.766	130.367	35.486	1569.219	2.489	4.877	1.21
100125	B-D	170.790	67.078	97.770	2245.776	7.261	5.876	3.63
100126	D-D	134.313	117.116	65.560	1970.476	2.775	3.788	3.04
100129	E-D	159.707	60.388	28.962	1651.995	5.195	4.902	3.41
100131	J-D	155.166	119.774	31.852	1579.186	3.015	3.405	2.73
100133	M-D	146.280	24.371	75.729	2098.560	3.225	3.788	1.74
100135	H-E	167.472	41.600	66.767	1369.735	3.200	3.429	4.20
100137	D-E	158.406	25.104	68.740	1346.906	3.828	3.405	2.69
100139	S-E	139.877	38.484	42.708	1388.605	4.215	2.814	4.05

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100140	L-E	158.942	30.695	181.056	1585.482	7.476	4.977	3.32
100141	W-E	136.761	185.300	179.774	2045.873	9.097	9.872	2.89
100142	R-E	119.383	62.037	16.170	888.744	3.286	2.673	2.07
100143	D-E	131.717	33.779	29.179	1072.170	2.978	3.144	1.91
100147	D-E	132.426	77.159	35.912	1285.138	3.515	2.696	2.12
100150	D-E	120.207	19.056	155.043	1488.729	2.298	4.196	3.66
100151	D-F	125.885	35.735	51.625	1243.711	3.447	3.525	3.05
100155	C-H	146.728	29.137	54.330	1242.340	4.733	3.573	3.15
100159	M-H	136.303	31.336	106.675	1567.716	4.151	3.525	3.51
100161	JF-F	155.052	1710.890	572.598	1966.460	6.226	4.634	4.27
100163	M-F	153.221	785.420	211.173	2167.501	8.269	5.698	3.57
100175a	B-G	148.403	55.347	130.093	1282.502	5.296	4.537	2.79
100181	M-G	137.986	69.735	31.119	1384.651	2.813	3.097	1.89
100183	D-G	168.842	181.909	58.358	1499.596	3.101	3.405	3.86

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, IV型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100186	M-G	184.148	2258.120	347.854	5271.196	11.670	7.756	3.82
100200	R-G	148.660	158.906	143.510	1939.499	5.530	6.080	4.02
100208	R-G	156.210	94.021	36.624	1379.174	5.339	4.366	< 0.75
100221	ND-H	117.196	38.393	88.913	1375.112	2.610	5.274	3.76
100222	J-H	106.131	34.544	31.603	1054.973	2.580	2.955	3.40
100229a	S-H	125.123	53.139	73.989	1567.731	3.828	3.788	2.78
100237	J-J	140.718	397.625	578.952	1824.407	11.836	6.675	2.46
100268	C-L	155.864	76.151	86.977	2060.140	10.963	6.310	3.66
100270	T-L	176.060	24.738	38.749	1579.990	2.549	2.625	3.35
100278	S-L	153.789	48.840	52.524	1367.051	3.039	3.167	1.91
100279	L-LG	163.352	139.202	34.492	1223.652	2.921	4.099	2.37
100287	R-L	164.414	636.110	232.253	3285.078	14.450	9.448	4.19
100291	MS-L	152.863	197.500	42.925	2144.445	2.180	1.993	3.78
100293	D-L	147.479	104.509	27.209	1559.538	3.151	2.696	1.83

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100302	A-M	201.715	1021.070	159.330	3317.515	12.498	8.383	4.83
100306	JT-M	125.203	115.289	83.960	1722.987	3.842	2.413	4.16
100307	D-M	128.095	23.612	10.882	1378.118	3.339	3.382	1.42
100313a	J-McA	164.201	192.417	76.599	1966.287	3.828	5.523	3.89
100315	K-MF	153.427	113.449	112.430	2118.580	3.515	4.561	4.46
100317	M-McM	165.245	94.693	144.632	1611.495	4.588	3.215	1.84
100320	D-M	159.724	782.150	106.161	1581.345	13.215	5.597	2.33
100322	R-M	120.098	39.914	51.444	1443.789	2.809	3.644	3.21
100327	K-R	168.143	194.521	101.231	1738.827	4.295	3.835	4.35
100336	ES -M	165.374	135.711	36.329	1556.071	2.932	2.508	3.49
100347	E-M	173.070	69.889	16.945	1710.951	4.808	3.859	3.29
100348	A-M	207.186	75.06	301.583	1334.475	3.299	4.585	3.36
100350	J-M	154.867	4.418	22.250	1388.371	4.087	3.238	1.60
100358	A-M	140.022	15.549	88.786	1247.147	4.502	4.682	1.57

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, IV型コラーゲンおよびα2-MG

のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100365	A-M	96.324	26.329	43.344	1170.887	5.381	2.040	2.12
100367	B-M	161.274	30.273	46.174	1469.088	3.089	2.790	3.59
100388	A-P	230.782	275.681	938.015	4245.175	20.496	9.669	5.98
100395	D-R	125.908	24.226	15.309	1299.599	2.478	4.415	3.52
100397a	R-R	179.186	56.479	100.853	1455.947	9.769	4.172	3.62
100398	C-R	151.391	29.397	11.833	1100.156	2.652	2.932	2.28
100403	L-P	179.146	321.607	350.713	2061.218	8.938	4.977	2.28
100404	ML-P	179.163	1060.240	141.902	2248.495	5.959	4.123	4.07
100414	S-S	184.451	70.941	40.126	1048.761	2.549	3.026	3.18
100424	A-P	158.538	62.439	167.519	1320.841	5.509	5.448	3.88
100443	J-R	112.348	40.703	21.470	1045.054	2.663	5.647	4.34
100450	M-R	186.892	200.744	203.399	1287.107	2.586	4.040	3.77
100472	T-S	127.877	119.759	21.867	797.753	2.787	3.962	1.97
100474	J-S	118.319	55.427	19.699	939.914	2.287	3.524	3.15

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100482	J-T	125.011	33.428	39.749	1099.832	5.159	4.386	2.56
100483	J-T	136.978	18.006	33.467	1003.831	2.586	4.485	2.06
100488	M-T	178.106	51.908	123.723	1345.743	4.464	6.053	3.84
100495	J-V	180.283	219.322	93.680	1734.925	8.387	4.064	3.82
100502	D-V	114.380	153.296	22.649	1136.728	2.774	4.757	4.47
100503	J-W	149.928	453.095	92.918	1422.332	5.581	4.114	3.15
100513	M-W	117.649	53.027	100.853	1335.730	5.092	4.757	3.74
100528	D-W	189.040	37.248	26.158	1103.495	4.642	3.215	2.90
100530	M-W	106.100	40.234	20.490	924.291	3.297	3.988	2.29
100534	D-A	135.702	37.357	91.410	1421.072	3.374	3.135	3.26
100539	M-DB	167.910	474.960	104.470	2158.238	4.957	5.566	3.99
100540	A-B	135.980	54.815	183.589	1881.935	3.068	4.485	3.34
100546	D-F	113.363	75.942	47.682	1207.833	2.633	3.055	1.57
100557	T-L	121.746	58.286	27.704	1297.060	3.842	2.060	1.83

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
100560	C-N	194.265	142.696	91.041	2338.303	6.332	3.267	4.25
100564	D-R	169.241	250.713	65.865	2407.901	5.502	4.534	3.52
100569	J-DC	160.145	64.634	43.744	1349.485	5.962	3.421	3.78
100572	K-K	162.517	260.632	209.581	1729.746	9.292	6.191	2.70
100585	K-Z	171.277	162.336	126.433	2030.404	8.907	4.881	4.71
100594	R-M	114.193	216.295	42.261	1678.540	3.545	3.602	3.26
100603	M-S	114.071	61.460	34.332	1693.071	4.464	4.188	2.92
100611	P-F	178.856	269.956	92.721	896.077	3.960	3.524	3.96
100614	J-McA	204.794	245.159	322.970	3470.966	11.393	6.814	5.32
100617	C-W	159.292	51.343	38.850	1504.544	5.859	4.974	3.60
100630	E-AV	140.072	34.778	59.454	1091.420	1.969	3.161	3.34
100637	R-B	179.987	59.477	137.723	2077.095	4.726	3.002	4.24
101013	T-H	177.189	507.415	237.499	1556.336	9.381	8.910	3.36
101118	G-S	163.553	282.057	150.713	2348.845	6.231	7.161	3.93

【表 4 - 1 4】

表 4

ラミニン, YKL-40, HA, TIMP-1, PIIINP, N型コラーゲンおよびα2-MG
のレベルについて分析したHCV患者(194人)から得た生データ

サンプル 番号	患者	ラミニン (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	HA (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	コラーゲンIV (ng/ml)	α2-MG (mg/ml)
101137	S-S	175.291	2049.970	715.601	3318.137	11.450	8.458	3.71
101257	M-F	155.324	40.730	49.441	1082.686	3.240	3.421	1.71
101275	J-C	121.598	143.292	45.227	1454.509	1.915	2.788	4.69
101284	R-F	123.312	16.825	42.048	1072.891	4.386	3.679	1.64
101321	H-P	180.159	180.091	367.681	2235.931	11.450	10.045	3.37
101322	A-P	133.640	269.262	244.520	2015.508	9.119	8.458	4.01
101335	L-S	164.947	64.238	208.719	2545.531	11.018	6.930	3.90
101336	L-S	156.847	741.300	72.664	1387.281	6.097	4.683	3.73
101351	P-F	128.701	12.461	99.050	1557.519	5.486	4.161	4.01
101441	R-H	104.993	176.909	354.512	1338.637	5.271	6.445	3.50
101478	G-S	142.642	63.543	149.266	1296.972	3.859	4.411	2.64
101565	D-A	132.117	74.355	187.250	1206.734	5.962	4.782	2.92

非ノ軽度の線維症(F0~F1)から著明な線維症(F2~F4)の存在を区別することができる最善のマーカーの組み合わせに関して、様々な統系学的アルゴリズムを用いて臨床成果のパラメーターを分析した。分析した統計学的アルゴリズムとしては、一変量分析、受信者動作特性曲線(ROC)、ロジスティック回帰、判別関数分析、および要因配

10

20

30

40

50

置実験最適化が挙げられる。

【0145】

ROC分析の結果を表5に示す。曲線下面積(AUC)値は、指定されたカットオフでの単一マーカーの相対的な診断値を表す。AUC値の減少により見出されるように、指定されたカットオフで単独で用いられるとき、HAは、最高の診断値を持つことが示され、PIIINP、TIMP-1、 $\alpha 2$ -MG、およびIV型コラーゲンがそれに続いた。

【0146】

【表5】

表 5				
ROC 分析				
	AUC	感度	特異性	カットオフ
HA	0.821	90.0%	62.0%	35.5 ng/ml
PIIINP	0.777	90.8%	39.2%	3.0 ng/ml
TIMP-1	0.773	90.8%	43.0%	1190.6 ng/ml
$\alpha 2$ -マクログロブリン	0.722	90.5%	34.6%	2.4 mg/ml
IV型コラーゲン-7S	0.726	90.8%	24.1%	2.79 ng/ml
YKL-40	0.696	90.8%	19.0%	34.5 ng/ml
ラミニン	0.524	90.7%	16.5%	125.2 ng/ml

線維症マーカーの様々な組み合わせに関する臨床成果のパラメーターを表6に示す。F2～F4からF0～F1を区別するための2から4つのマーカーとアルゴリズムの組み合わせと同様に、単一マーカーを含む最善のサブセットがロジスティック回帰により生じた。マーカーには、PIIINP、 $\alpha 2$ -MG、ラミニン、およびIV型コラーゲンが含まれた。図5に示すように、診断成果パラメーター(感度、特異度、PPV、およびNPV)は、約60%の線維症罹患率を有する調査母集団でのロジスティック回帰により同定された2つ、3つ、および4つのマーカーの組み合わせに関して同様であった(2～4行目および6～9行目を参照せよ)。

【0147】

表6の5行目に示すように、ステップワイズ判別関数分析(SAS)により、3つのマーカーサブセット(PIIINP、 $\alpha 2$ -MG、およびラミニン)が同定された。この組み合わせの臨床成果は、ロジスティック回帰を用いて同定されたマーカーの組み合わせと同様であった。

【0148】

実験計画ソフトウェア(DOE KISS、Build 8、Air Academy Associates)を用いて、複数の変数のカットオフを同時に最適化し、線維症を予測する際の試験パネルの最善成果を得た。DOE KISSを用いて、マーカーの組み合わせに関してコンピューター支援の中心複合計画が生じた。この計画行列は、組み合わせでのマーカーのそれぞれに対するカットオフの一連の組み合わせからなる。F2～F4線維症からF0～F1を区別するためのこれらの実験から得た結果(感度、特異度、および正確度)がDOEの計画用紙に記録された。パラメーター(感度、特異度、および正確度)のそれぞれに対して回帰分析を実行し、組み合わせでの各変数に関するカットオフ値が得られ、パラメーターに対する最大成果を達成した。

【0149】

ROC分析で最善の診断成果を有する5つのマーカー(最大AUC)は、HA、PIIINP、TIMP-1、 $\alpha 2$ -MG、およびIV型コラーゲンであった(表5を参照せよ)。この5つのマーカーパネルでの各マーカーのカットオフを最大正確度に対して最適化

した。表 6 の 10 行目に示す結果により、最適正確度 (69.6%) では、特異度 (32.9%) は低すぎるため有効ではなかった一方で、感度 (94.8%) は高かったことが示される。感度または特異度に対してマーカーを最適化した際、同様の結果が得られた。回帰分析により、TIMP-1 は、この 5 つのマーカーパネルでの正確度、感度、または特異度に関して十分な効果を持たないことが示された。

【0150】

表 6 の 11 行目に示すように、DOE により類似の 4 つのマーカーパネルを同様に分析した。TIMP-1 を除外して、正確度 (77.8%) に対して 4 つのマーカーパネルを最適化して、感度および特異度は、それぞれ 79.1% および 79.5% で得られた。これらの結果により、F2 ~ F4 線維症から F0 ~ F1 線維症を区別する際、HA、PIIINP、 $\alpha 2$ -MG、コラーゲン IV、および TIMP-1 で構成される 5 つのマーカーパネルよりも HA、PIIINP、 $\alpha 2$ -MG、およびコラーゲン IV の 4 つのマーカーパネルのほうが有効であることが実証された。

10

【0151】

4 つのマーカーパネルのうちのいくつかの 3 つのマーカーサブセットについても DOE によって分析した。12 行目は、HA、コラーゲン、および $\alpha 2$ -MG の組み合わせに関して得られた結果を示しており、この結果は正確度に対して最適化したものである。この 3 つのマーカーパネルにより、30% に満たない非常に低い特異度が与えられた。それに対して、HA、PIIINP、および $\alpha 2$ -MG で構成される 3 つのマーカーパネルを正確度に対して最適化すると、成果は 4 つのマーカーパネルと同様であった (表 6 の 13 行目と 11 行目とを比較せよ)。

20

【0152】

HA および $\alpha 2$ -MG の 2 つのマーカーパネルの同様の分析によって、表 6 の 14 行目に示す結果が得られた。この組み合わせでは、HA、PIIINP、および $\alpha 2$ -MG の 3 つのマーカーパネルを超える特異度の向上が得られた (78.3% と比べて 84.4%)。

【0153】

表 6
種々のマーカーパネルの性能

マーカー	方法/モデル	感度	特異性	罹患率		罹患率	
				PPV	NPV	PPV	NPV
				59.3%		20%	
				精度		精度	
1	HA						
	N/A	64.96%	82.05%	84.44%	60.95%	47.50%	90.35%
	カットオフ 60ug/ml						
2	PIIINP						
	ロジスティック	74.36%	58.97%	73.11%	60.53%	31.18%	90.20%
	1つからなる最適サブセット						
3	PIIINP, AMG						
	ロジスティック	80.53%	63.63%	76.86%	68.54%	31.18%	90.20%
	2つからなる最適サブセット						
4	PIIINP, AMG, ラミニン						
	ロジスティック	78.76%	67.53%	78.44%	67.95%	37.75%	92.71%
	3つからなる最適サブセット						
5	PIIINP, AMG, ラミニン						
	判別 ステップワイズ選択	78.76%	67.53%	78.44%	67.95%	37.75%	92.71%
6	PIIINP, AMG, ラミニン, コラーゲンIV						
	ロジスティック	78.76%	64.94%	77.11%	67.09%	35.96%	92.44%
	4つからなる最適サブセット						
7	PIIINP, AMG, ラミニン, YKL-40						
	ロジスティック	77.87%	67.53%	78.25%	67.05%	37.48%	92.43%
	4つからなる 第2最適サブセット						
8	PIIINP, AMG, コラーゲンIV, YKL-40						
	ロジスティック	78.76%	70.13%	79.82%	68.76%	39.73%	92.96%
	4つからなる 第3最適サブセット						
9	PIIINP, AMG, TIMP-1						
	ロジスティック	78.76%	64.94%	77.11%	67.09%	35.96%	92.44%
	「強制」選択						

【表 6 - 2】

表 6
種々のマーカーパネルの性能

マーカー	方法/モデル	感度	特異性	罹患率				罹患率			
				PPV	NPV	精度		PPV	NPV	精度	
10 HA, PIIINP, AMG コラーゲンIV, TIMP-1	DOE (精度について) N/A	94.78%	32.91%	67.28%	81.25%	69.59%		26.1%	96.2%	45.3%	
11 HA, PIIINP, コラーゲンIV, AMG	DOE (精度について) N/A	79.13%	75.95%	82.73%	71.43%	77.84%		45.13%	93.57%	76.59%	
12 HA,コラーゲンIV, AMG	DOE (精度について) N/A	95.65%	29.11%	66.27%	82.14%	68.56%		25.2%	96.4%	42.4%	
13 HA, PIIINP, AMG	DOE (精度について) N/A	78.26%	75.95%	82.57%	70.59%	77.32%		44.86%	93.32%	76.41%	
14 HA, AMG (B)	DOE (精度について) N/A	84.35%	73.42%	82.20%	76.32%	79.90%		44.24%	94.94%	75.60%	
15 TIMP-1, HA, AMG	DOE (精度について)	83.48%	75.95%	83.48%	75.95%	80.41%		46.46%	94.84%	77.46%	
16 YKL-40, HA, AMG	DOE (精度について)	82.61%	75.95%	83.33%	75.00%	79.90%		46.20%	94.59%	77.28%	
17 HA,コラーゲンIVおよび AMGによる反転	ロジスティック 反転した陽性群	86.32%	70.51%	81.45%	77.46%	80.00%		42.26%	95.38%	73.68%	

10

20

30

40

一変量分析で線維症の良好な判別子となることが観察されたTIMP-1を2つのマーカーパネルに付加した。15行目に示すように、HA、 $\alpha 2$ -MG、およびTIMP-1の3つマーカーパネルの成果は、2つのマーカーパネルを用いて得られたものと同様であり、3つのマーカーパネルのHA/PIIINP/ $\alpha 2$ -MGパネルと比べて、感度が向上された(78.3%と比べて83.5%の感度)。さらに、予備的回帰試験では、TI

50

M P - 1 は、重度の線維症の高罹患率を有する調査母集団で、線維症の判別に著しく寄与した。

【 0 1 5 5 】

F 2 ~ F 4 の線維症から F 0 ~ F 1 を区別する際の正確度に対して、H A、 α 2 - M G、および Y K L - 4 0 で構成される別の 3 つのマーカーパネルも最適化した。表 6 の 1 6 行目に示すように、この 3 つのマーカーパネルは、 α 2 - M G / H A / T I M P - 1 パネルと同様の成果を有していた。

【 0 1 5 6 】

以上のことから、これらの結果は、 α 2 - M G / H A / T I M P - 1 または α 2 - M G / H A / Y K L - 4 0 パネルが F 2 ~ F 4 線維症から F 0 ~ F 1 を区別するのに有用であり得ることを示している。

【 0 1 5 7 】

(実施例 I I)

(α 2 - M G / H A / T I M P の 3 つのマーカーパネルの分析に対する二重最適化戦略)

この実施例により、 α 2 - M G -、H A -、および T I M P - 1 に関する複数のカットオフを使用して、アッセイされた全患者母集団のサブセットで、相対的に高度の正確度が達成されることを説明する。

【 0 1 5 8 】

α 2 - M G、H A -、および T I M P - 1 セットのカットオフがそれぞれ 3 5 n g / m l、2 m g / m l、および 1 , 0 0 0 n g / m l である 3 つのマーカーパネル α 2 - M G / H A / T I M P - 1 を用いて、試料は、それらの変数の 3 つ全てがカットオフ値を超えると陽性であり、 α 2 - M G、H A、または T I M P - 1 レベルの 1 つ以上が指定カットオフ値より下であると陰性であるということが確定された。表 7 に示すように、1 9 4 人の患者母集団で、総数で 7 2 の陰性結果があり、そのうち 1 5 は偽陰性であった。このことから、約 6 0 % の線維症 % 値の研究罹患率で、7 9 % の陰性予測値 (N P V) が与えられた。肝臓学臨床で典型的な罹患率である 3 0 % の罹患率では、陰性予測値は 9 2 % を超えており、これは F 2 ~ F 4 の線維症の存在を除外するのに有効である (尤度比 0 . 2 2)。

【 0 1 5 9 】

さらに、3 5 n g / m l、2 m g / m l、および 1 , 0 0 0 n g / m l カットオフを用いた 1 2 2 の試験陽性のうち、試験陽性の 2 1 は偽であり、8 2 . 8 % の陽性予測値 (P P V) が与えられた。しかし、より典型的な罹患率である 3 0 % の線維症では、陽性予測値は約 5 8 % に落ちる (表 7 を参照せよ)。したがって、典型的な罹患率を有する母集団では、陽性結果は、診断として有効である十分な予測値を有してはいないことになるだろう。

【 0 1 6 0 】

全患者母集団の少なくとも 1 つのサブセットに関して陽性予測値を高めるために、第 1 のセットより高いカットオフ値である第 2 のセットを用いて、第 1 分析により陽性であった試料を 3 つのマーカーの陽性に関してさらに評価した。第 1 分析後に陽性であったそれらの試料をより高いカットオフで評価することによって、このグループ内の重度の線維症試料は、相対的に高い中率で陽性であると確定され得る。第 2 の評価により試験陰性であったそれらの試料は、それらの線維症状態が良好な中率で測定されえなかったという点で「未確定」とみなされる。

【 0 1 6 1 】

【表 7 - 1】

表 7																
種々の疾患罹患率を持つ母集団での二重最適化戦略による α2-MG/HA/TIMP-1パネルの性能																
除外 (rule out) 線維症に対する感度の最適化																
α2-MGについてX1 = 2.0 mg/ml			HAについてY1 = 35.00 ng/ml			TIMP-1についてZ1 = 1000.00 ng/ml										
試験	罹患率		0.598		罹患率		0.300		罹患率		0.200		罹患率		0.100	
	線維症 +	線維症 -			線維症 +	線維症 -	線維症 +	線維症 -	線維症 +	線維症 -	線維症 +	線維症 -	線維症 +	線維症 -	線維症 +	線維症 -
試験 +	101	21	122		261	188	450		174	215	390		87	242	329	
試験 -	15	57	72		39	512	550		26	585	610		13	658	671	
感度	116	78	194		300	700	1000		200	800	1000		100	900	1000	
特異性	87.07%	LR +	3.23		87.07%	LR +	3.23		87.07%	LR +	3.23		87.07%	LR +	3.23	
PPV	73.08%	LR -	0.18		73.08%	LR -	0.18		73.08%	LR -	0.18		73.08%	LR -	0.18	
NPV	82.79%				58.09%				44.71%				26.43%			
精度	79.17%				92.95%				95.76%				98.07%			
	81.44%				77.27%				75.88%				74.48%			

【表 7 - 2】

表 7																	
種々の疾患罹患率を持つ母集団での二重最適化戦略による α2-MG/HA/TIMP-1パネルの性能																	
60.00																	
確定 (rule in) 線維症に対する感度の最適化																	
α2-MGについてX1 = 2.0 mg/ml				HAについてY1 = 35.00 ng/ml				TIMP-1についてZ1 = 1575.00 ng/ml									
試験 +		罹患率		0.598		罹患率		0.300		罹患率		0.200		罹患率		0.100	
		Fib + Fib -				Fib + Fib -				Fib + Fib -				Fib + Fib -			
		53	1	54	137	9	146	91	10	102	46	12	57				
試験等価		48	20	68	124	179	304	83	205	288	41	231	272				
		101	21	122	261	188	450	174	215	390	87	242	329				
感度		52.48%	LR +	11.02	52.48%	LR +	11.02	52.48%	LR +	11.02	52.48%	LR +	11.02	52.48%	LR +	11.02	
特異性		95.24%	LR -	0.50	95.24%	LR -	0.50	95.24%	LR -	0.50	95.24%	LR -	0.50	95.24%	LR -	0.50	
PPV		98.15%			93.86%			89.91%			79.84%						
NPV		29.41%			59.11%			71.25%			84.80%						
精度		59.84%			70.40%			76.12%			83.93%						

【表 7 - 3】

表 7	
種々の疾患罹患率を持つ母集団での二重最適化戦略による α2-MG/HA/TIMP-1パネルの性能	
二重最適化後の最終性能	
罹患率 線維症 + 線維症 -	0.598 線維症 + 線維症 -
罹患率 線維症 + 線維症 -	0.300 線維症 + 線維症 -
罹患率 線維症 + 線維症 -	0.200 線維症 + 線維症 -
罹患率 線維症 + 線維症 -	0.100 線維症 + 線維症 -
53 1 54	91 10 102
63 77 140	109 790 898
116 78 194	200 800 1000
45.69% LR + 35.64	45.69% LR + 35.64
98.72% LR - 0.55	98.72% LR - 0.55
98.15%	89.91%
55.00%	87.91%
67.01%	88.11%
137 9 146	46 12 57
163 691 854	54 888 943
300 700 1000	100 900 1000
45.69% LR + 35.64	45.69% LR + 35.64
98.72% LR - 0.55	98.72% LR - 0.55
93.86%	79.84%
80.92%	94.24%
82.81%	93.42%
感度	
特異性	
PPV	
NPV	
精度	

【 0 1 6 4 】

10

20

30

40

【表 7 - 4】

表 7						
種々の疾患罹患率を持つ母集団での二重最適化戦略による α2-MG/HA/TIMP-1パネルの性能						
母集団 罹患率	194 0.598	母集団 罹患率	1000 0.300	母集団 罹患率	1000 0.200	母集団 罹患率 1000 0.100
偽陰性	15	偽陰性	39	偽陰性	26	偽陰性 13
偽陽性	1	偽陽性	9	偽陽性	10	偽陽性 12
不正確な合計	16	不正確な合計	48	不正確な合計	36	不正確な合計 24
正確な合計	110	正確な合計	649	正確な合計	676	正確な合計 703
第2ラウンド						
曖昧な 線維症+	48	曖昧な 線維症+	124	曖昧な 線維症+	83	曖昧な 線維症+ 41
曖昧な 線維症-	20	曖昧な 線維症-	179	曖昧な 線維症-	205	曖昧な 線維症- 231
曖昧な合計	68	曖昧な合計	304	曖昧な合計	288	曖昧な合計 272

【 0 1 6 5 】

10

20

30

40

【表 7 - 5】

表 7									
種々の疾患罹患率を持つ母集団での二重最適化戦略による α2-MG/HA/TIMP-1パネルの性能									
曖昧なものを除いた二重最適化後の最終性能									
罹患率 線維症 + 線維症 -		0.598		罹患率 線維症 + 線維症 -		0.300		罹患率 線維症 + 線維症 -	
試験 +	53	1	54	137	9	146	91	10	102
試験 -	15	57	72	39	512	550	26	585	610
	68	58	126	176	521	696	117	595	712
感度	77.94%	LR +	45.21	77.94%	LR +	45.21	77.94%	LR +	45.21
特異性	98.28%	LR -	0.22	98.28%	LR -	0.22	98.28%	LR -	0.22
PPV	98.15%			93.86%			89.91%		
NPV	79.17%			92.95%			95.76%		
精度	87.30%			93.14%			94.93%		
母集団に占める%		母集団に占める%		母集団に占める%		母集団に占める%		母集団に占める%	
試験 +	27.8%			試験 +	14.6%		試験 +	10.2%	
試験 -	37.1%			試験 -	55.0%		試験 -	61.0%	
曖昧	35.1%			曖昧	30.4%		曖昧	28.8%	
				試験 +			試験 +		
				試験 -			試験 -		
				曖昧			曖昧		

表 7 は、二重最適化戦略を用いた α 2 - M G / H A / T I M P - 1 パネルアッセイの成果を示す。第 1 のカットオフを 2 . 0 m g / m l 、 3 5 n g / m l 、 および 1 , 0 0 0 n

10

20

30

40

50

g / m l に設定して、第 1 の分析で相対的に高い感度を達成した。指定カットオフ値を超える $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 レベルの 3 つ全てを有する任意の試料は、陽性であると示された。 $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 カットオフとして 2 . 0 m g / m l、6 0 n g / m l、および 1 , 5 7 5 n g / m l を用い、かつ試料が陽性であるためには指定カットオフ値を超える $\alpha 2$ - M G、H A、および T I M P - 1 値を有していなければならないという基準を用いて、第 1 の分析により得た 1 2 2 の試験陽性を再評価した。

【 0 1 6 6 】

カットオフ値の第 2 のセットを用いて、1 2 2 人の患者のうち 5 4 人が陽性であると確定され、そのうち 1 人のみが偽陽性であった。5 9 . 8 % の線維症罹患率では、陽性予測値は 9 8 . 2 % であり、より典型的な 3 0 % の線維症罹患率では 9 3 . 9 % であった。以上のことから、1 9 4 人の患者のうち、7 2 人が陰性として分類され、5 4 人が陽性として分類された一方で、6 8 の試料は未確定の結果であり、確定的に分類され得なかった。さらに、未確定試料を除外すると、3 つのマーカーアッセイは、3 0 % の線維症罹患率を有する典型的な母集団で、9 3 % を超える陽性予測値と、9 3 % に近い陰性予測値とを有する。

10

【 0 1 6 7 】

表 8 は、 $\alpha 2$ - M G / H A / T I M P - 1 の 3 つのマーカーパネルと、P o y n a r d ら (L a n c e t 3 5 7 : 1 0 6 9 (2 0 0 1)) に記載される 6 つのマーカーパネルとの成果の比較を示す。

20

【 0 1 6 8 】

【表 8】

表 8									
α2-MG/HA/TIMP-1パネルとPoynardらの6つのマーカーパネルとの性能比較									
Promethheus					Poynard ら				
生 検					生 検				
線維症 +	53	線維症 -	1	54	線維症 +	45	線維症 -	5	50
試験 +	15	試験 -	57	72	試験 + (>.08)	13	試験 - (<0.20)	106	119
曖昧	48	曖昧	20	68	曖昧	80	曖昧	90	170
母集団合計	116	母集団合計	78	194	母集団合計	138	母集団合計	201	339
罹患率	.05979	罹患率			罹患率	0.4071	罹患率		
感度	0.7794	感度			感度	0.7759	感度		
特異性	0.9828	特異性			特異性	0.9550	特異性		
PPV	0.9815	PPV			PPV	0.900	PPV		
NPV	0.7917	NPV			NPV	0.8908	NPV		
精度	0.8730	精度			精度	0.8935	精度		
曖昧%	.03505	曖昧%	68/194		曖昧%	.0515	曖昧%	170/339	
偽陽性	1	偽陽性	試験+の54人の	1.85%	偽陽性	5	偽陽性	試験+の50人の	10.00%
偽陰性	15	偽陰性	試験-の72人の	20.83%	偽陰性	13	偽陰性	試験-の119人の	10.92%
Promethheus					Poynard ら				
生 検					生 検				
線維症 +	186	線維症 -	8	194	線維症 +	133	線維症 -	15	147
試験 +	53	試験 -	433	486	試験 + (>.08)	38	試験 - (<0.20)	313	351
曖昧	168	曖昧	152	320	曖昧	236	曖昧	265	501
母集団合計	407	母集団合計	593	1000	母集団合計	407	母集団合計	593	1000
罹患率	0.4071	罹患率			罹患率	0.4071	罹患率		
感度	0.7794	感度			感度	0.7759	感度		
特異性	0.9828	特異性			特異性	0.9550	特異性		
PPV	.9607	PPV			PPV	0.9000	PPV		
NPV	.8917	NPV			NPV	0.8907	NPV		
精度	.09113	精度			精度	0.8935	精度		
試験陽性%	19.4%	試験陽性%			試験陽性%	14.7%	試験陽性%		
試験陰性%	48.6%	試験陰性%			試験陰性%	35.1%	試験陰性%		
曖昧%	32.0	曖昧%			曖昧%	50.1%	曖昧%		
偽陽性	8	偽陽性	試験+の194人の	3.93%	偽陽性	15	偽陽性	試験+の147人の	10.00%
偽陰性	53	偽陰性	試験-の486人の	10.83%	偽陰性	38	偽陰性	試験-の35人の	10.93%

* α2-マクログロブリン、α2-グロブリン、総ビリルビン、γ-グロブリン、アポA1、およびGGT

これらの結果により、α2-MG/HA/TIMP-1の3つのマーカーパネルは、非常に優れた正確度で、F2～F4の線維症からF0～F1の線維症を区別するのに有用であり得ることが示される。これらの結果によりさらに、組み合わせ線維症マーカーアッセイは、非常に優れた正確度で試験された患者の一部の線維症状態を測定するのに有用であ

10

20

30

40

50

り得る一方で、残りの患者は生検の候補者であることが示される。

【0169】

(実施例III)

($\alpha 2$ -マクログロブリン、ヒアルロン酸、およびメタロプロテイナーゼ-1組織阻害剤に対するアッセイ)

A. ヒト $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2$ -MG)の定量

Beckman Array (登録商標) 360 Systemを用いて、以下のよう
にヒト $\alpha 2$ -マクログロブリンの血清レベルを定量し、0.75~270 mg/mlの範
囲の $\alpha 2$ -MGレベルを測定した。

【0170】

$\alpha 2$ -MG濃度の測定用にBeckman Array (登録商標) 360 systemを用いた。このシステムは、ヒト $\alpha 2$ -MGに対する抗体と、試料中の $\alpha 2$ -MG抗原との間の免疫沈降反応により生じる光散乱形成速度を測定する比濁計を利用する。フローセル中の溶液に光線が透過された後、溶液中に懸濁された不溶性複合体の形成された巨大分子粒子により散乱された光の強度が比濁計により検出および測定される。抗原-抗体反応より生じた光散乱の増加は、試料中の $\alpha 2$ -MG濃度に比例してピーク速度シグナルに変換される。得られた複合体形成および結果として生じた散乱光の強度の変化は、初めは緩慢に、その後急激に増加し、最終的には分析される成分に対する変化のピーク速度まで進行する割合で生じる。

10

【0171】

NCCLSの出版物H 18-Aに示されるように、絶食している個体から血清試料を抽出し、回収時間から2時間以内に細胞から概ね物理的に分離した。72時間以内にアッセイされなかった試料は、-15ないし-20で冷凍保存した。冷凍された試料は、多くて1度解凍した。著しく溶血しているか、非常に脂肪血性であるか、または濁っている標本を、この後の分析用には不合格とした。

20

【0172】

4で、貯蔵から試薬を取り出して直ちに使用した。緩衝液および希釈液を完全に転倒混和した後、機器に添加した。1:36に希釈された試料を用いて、製造元の指示に従いセットアップ、ブライミング、およびキャリブレーションを実行した。該して、希釈していない試料または1:6の希釈度のような比較的濃厚な試料を避けた。アッセイをする前に、著しく脂肪血性の試料を、希釈剤を用いて1:2で希釈した。反応溶液中の無関係な光散乱シグナルを引き起こす塵埃粒子または他の粒子物質を避けた。試料をアッセイする前に、使い捨てホールピペットまたはピペットチップを用いて泡を吸引することによって、試料カップおよび試薬びん中の全ての気泡または泡を除去した。作業領域中のDTTを避けた。

30

【0173】

以下のように、 $\alpha 2$ -MG濃度に関して試料を分析した。機器上の試薬ホイール(Reagent Wheel)(左側ホイール)のスペース番号2中にAMG抗血清を装填した。希釈セグメントに、扇形セグメントの広い側のウエル中の対照または試料の150 μ Lを装填した。セグメントおよび初期希釈対照/試料カップに、特定のため、印をつけた。対照および血清試料を装填する間、泡を避けた。

40

【0174】

VigilTM Protein Control Level 1および3(3滴)をカップ1および3にそれぞれ入れた。Biorad LiquichekTM Immunology Control Level 2(150 μ L)をカップ2に入れた。患者試料(150 μ L)を一連のカップに添加した。セグメントをポジション番号1で始まる右側ホイール上に配置した。蒸発防止用カバーを試薬および試料ホイール上に配置した。

【0175】

Master Screenメニュー上で、RESULTS RECALL(F3)を

50

選択した後に、(F4) CLR CUR RUNを選択した。MASTER SCREENに戻った後、SAMPLE PROGRAM (F1)を選択した。試薬ホイール (Reagent wheel) 番号1が現れたら、各カップ番号で、ENTERを選択した。対照IDまたは試料登録番号を入力した。テスト「2」を選択し、各カップに対してSAVE CUP (F1)を選択した。STARTを選択し、分析を開始した。プログラム実行の最後で、CLEAR CURRENT RUN & START NEXT RUNに応じて(Y)を選択した。

【0176】

Beckman Array (登録商標) 360により、Pros Systemで、整数を用いたmg/dlで、結果がレポートされた。機器により試料を慣用どおりに1:36に希釈した。750mg/dlより大きい試料を、機器により1:216希釈度でアッセイした。1:36希釈度で75mg/dlより小さい濃度を有する試料は、<75mg/dlとしてレポートされる。初期希釈で、Beckman分析範囲は75~750mg/dlであった一方で、拡大範囲は75~27,000mg/dlであった。Prometheus Laboratoriesで証明されたように、正常個体に対する範囲は103~274mg/dlであった。

10

【0177】

品質管理を以下のように実行した。3つの対照レベルを用いた。すなわち低度、中度、および高度である。プログラム実行が2の標準偏差内の2つの対照と、2および3の標準偏差間の第3の対照とで許容された以外は、対照は2の標準偏差内であった。使用した対照は、Beckman Vigil IおよびIIIならびにBiorad Level IIであった。各試料プログラム実行で、対照をアッセイした。

20

【0178】

14日ごとと、試薬ロットに変化が生じるときまたは機器で大幅な変化が生じたときに、アッセイをキャリブレーションする。適当な直線性物質を用いて、6ヶ月ごとに直線性を確認する。これは、期間中の一定した性能を確保するためおよび米国国家規格 (State and National standards) に従うために行われる。

【0179】

期間中の一貫性を確保するために、アッセイキャリブレーション検証を6ヶ月ごとに実行する。最小、中間、最大濃度を含む5つの検証試料の最小値を6ヶ月ごとに評価する。患者試料結果のレポートを出すためには、検証試料結果の変動係数 (%CV) は15%より少なくなければならない。

30

【0180】

B. ヒアルロン酸 (HA) の定量

Corgenixのヒアルロン酸 (HA) 定量試験キット (カタログ番号029001) を用いて、本質的に以下のようにHAの血清レベルを測定した。

【0181】

血清試料を-70 で保存した。多数回の冷凍/解凍サイクルを避け、試料ごとの冷凍/解凍サイクルは最大で4回までとした。キットを2~8 で保存した。

【0182】

使用前に、キットおよび患者試料を室温 (18~28) に平衡にした。被覆されたストリップの袋も開封前に室温に平衡にした。33×PBS洗浄濃縮物を蒸留水で希釈し、最終溶液のpHをpH7.35+/-0.1に調整することによって、洗浄溶液 (0.01M PBS、pH7.35+/-0.1) を調製した。

40

【0183】

ブランク、標準品、対照、および試料全てを二連でアッセイした。各プレートには分光光度計のキャリブレーション用の水ブランクを備えておき、読み取りの直前に水を200μl添加するまで空にしておいた。血清試料を含まない反応緩衝液を、0ng/mlのHA参照溶液を表す試薬ブランクとして用い、後のアッセイステップで、患者試料および参照溶液と同様に処理した。3つの既知の患者試料 (低度、中度、および高度) に対して各

50

アッセイを実行した。さらに、各キットで補充された 50 ng/ml HA、100 ng/ml HA、200 ng/ml HA、500 ng/ml HA、および 800 ng/ml HA の参照溶液を下記に記載するようにアッセイした。

【0184】

反応緩衝液 250 μ l に参照溶液または試料を 25 μ l 添加して、HA 参照溶液および患者試料を 1:11 で希釈し、穏やかにボルテックスして混和した。希釈した参照液、試料、および対照を各ウェルに添加した (100 μ l ずつ)。水ブランクは空のままにしておいた。プレートを覆い、室温で 60 分間インキュベートした。インキュベーションが完了した後、ウェルの内容物を吸引によって除去した。プレートを 1 $\times$ 洗浄溶液で 4 回洗浄し、洗浄の間プレートを乾かないようにした。最後の洗浄の後に、ペーパータオル上で、プレートを激しくプロットして、残存している緩衝液を除去した。

10

【0185】

HRP と結合させた HA 結合タンパク質溶液 (100 μ l) を水ブランク以外の全てのウェルに添加し、その後プレートを覆い、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベーションが完了した後に、プレートを上述のように 4 回洗浄した。その後、基質溶液 (100 μ l 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素、安定化) を水ブランク以外の各ウェルに添加した。覆ったプレートを、その後室温で 30 分間インキュベートした。プレートを暗所に放置した。

【0186】

800 ng/ml の HA 標準品の OD₆₅₀ を測定した。0.500 より少ない OD に関しては、基質のインキュベーションを続行し、OD をモニターして OD が 0.500 に達したかどうかを測定した。0.500 より大きい OD または基質インキュベーションの 1 時間後の OD に関しては、OD が 0.500 に達していなかったとしても、停止液 (0.36 N 硫酸) 100 μ l を水ブランク以外の各ウェルに加えて反応を停止させた。基質溶液の添加と同様の順番で、かつほぼ同様の割合で停止液を添加した。光学密度を読み取る前に、蒸留水 200 μ l を水ブランクに添加した。水ブランクに対してプレートリーダーを「ゼロにして」から 1 時間以内に各ウェルの OD を 450 nm (650 nm 参照) で読み取った。

20

【0187】

以下の基準を用いて、アッセイが信頼できるかどうかを判断した。試薬ブランク (ゼロ標準) の平均 OD 値は 0.10 より下であった。0.10 より大きい読み取り値は、基質または試薬汚染の可能性を示唆しているものとして、これらの条件下で結果はレポートされなかった。500 ng/ml の HA 参照液の平均 OD 値は 0.800 以上であった。3 つの既知の患者試料に対する対照は以下の範囲内であった。すなわち、低度対照は 78.6 ~ 117.2 ng/ml であり、中度対照は 148.5 ~ 214.1 ng/ml であり、高度対照は 297.8 ~ 460.7 ng/ml であった。800 ng/ml より大きい HA 濃度を有する試料をさらに希釈し、2 回目のアッセイを行いより正確な結果を得た。

30

【0188】

Softmax を用いて生じた 4 パラメーターの標準曲線から、既知の患者対照および試料が決定され、ng/ml でレポートされた。患者値は、濃度が最も高い標準品の濃度を超えた場合レポートされなかった。1:11 希釈度での最も高い標準品の濃度より大きい患者値に対して、試料を 1:55 希釈度でアッセイし、必要に応じて、より高い希釈度で行った。

40

【0189】

HA ELISA アッセイを 6 ヶ月ごとに評価し、期間中の一定した性能を確保する。操作者に対する盲検法で、従来の既知の HA 値を有する 5 つの試料の最小値を評価する。アッセイ性能を許容可能なものにするため、陰性試料の結果は陰性と、陽性試料の結果は陽性とされなければならない。収率は、先に得られた値の 15% 以内となる。20% より多い検証試料が性能基準に達していない場合、トラブルシューティングを実行し、許容可能なアッセイ性能が再確立されるまで、患者データをレポートするためにはこのアッセイを

50

使用しない。

【0190】

C．メタロプロテイナーゼ - 1 の組織阻害剤 (TIMP - 1) の定量

Amer sham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) の BiotrakTM 試験キット (カタログ番号 RPN2611) を用いて、本質的に以下のように TIMP - 1 の血清レベルを測定した。

【0191】

キット内容物を解凍し、20 ~ 25℃ に平衡にした。血清試料を - 70℃ で冷凍保存した。試料の冷凍 / 解凍サイクルの繰り返しは最小にし、最大で 6 回の冷凍 / 解凍サイクルとした。

10

【0192】

アッセイ試薬を以下のように調製し、最大で 7 日間、2 ~ 8℃ で保存した。アッセイ緩衝液濃縮物に蒸留水を添加し、最終容積を 100 ml に調整して、アッセイ緩衝液 1 (0.9% (w/v) 塩化ナトリウム、0.1% (w/v) BSA、および 0.1% Tween - 20 を含むリン酸緩衝液 0.1 M、pH 7.5) を調製した。

【0193】

本質的に以下のように、抗 TIMP - 1 西洋わさびペルオキシダーゼ結合体をアッセイ緩衝液 1 中で調製した。凍結乾燥された結合体を含む保存びんに、希釈したアッセイ緩衝液 1 を 11 ml 添加した。激しく攪拌せずに、泡立たないようにしながら、完全に溶解するまで内容物を穏やかに混和した。洗浄緩衝液濃縮物に蒸留水を添加し、最終容積が 500 ml になるようにして、洗浄緩衝液 (0.05% Tween - 20 を含むリン酸緩衝液 0.1 M、pH 7.5) を調製し、その後完全に混和した。

20

【0194】

100 ng / ml の TIMP - 1 保存溶液を以下のように調製し、2 ~ 8℃ で保存した。0.9% (w/v) 塩化ナトリウム、0.1% (w/v) ウシ血清アルブミン、および 0.1% Tween - 20 を含むリン酸緩衝液 0.1 M (pH 7.5) 中で、凍結乾燥された TIMP - 1 標準品を再構築し、100 ng / ml の標準 TIMP - 1 保存溶液を作製した。激しく攪拌せずに、また泡立たないようにして、完全に溶解するまで内容物を穏やかに混和した。各アッセイ前に、100 ng / ml 保存溶液の 2 倍連続希釈液を 1.2 ml 希釈チューブ中のアッセイ緩衝液 1 に添加して、標準曲線用のさらなる標準品 (1.565、3.13、6.25、12.5、25、および 50 ng / ml) を新たに調製した。ゼロ標準品 (ブランク) も調製した。

30

【0195】

マイクロタイタープレートを含む袋を、室温に平衡にした後開封した。全ての試料および標準品を二連でアッセイし、標準曲線用の標準品が各プレート上に存在した。各プレート上に、7 つの標準品、2 つの対照、および最大で異なる 39 の試料が二連で存在した。

【0196】

595 µl アッセイ緩衝液 1 と 5 µl 血清とを混和して、チューブ中で試料を 1 : 120 で希釈した。希釈液をボルテックスして混和した。マルチチャンネルピペッターを用いて、100 µl のブランク、標準品、および希釈試料をマイクロタイタープレート上の個々のウェルに添加した。プレートを所定の蓋で覆い、厳密に 2 時間室温でインキュベートした。2 時間インキュベーションした後、ウェルの内容物を吸引し、各ウェルを洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。各洗浄後に、ウェルを完全に満たしてから吸引した。最終の洗浄後に、プレートをペーパータオル上でプロットして、残存する洗浄緩衝液を除去した。

40

【0197】

マルチチャンネルピペッターを用いて、ペルオキシダーゼ結合体 (100 µl) を各ウェルに添加し、覆われたプレートを厳密に 2 時間室温でインキュベートした。インキュベーション後に、ウェルを吸引し、前と同様に洗浄した。インキュベーションを終了してすぐに、室温に平衡にした TMB 基質 (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン / 過酸化水素を含む 20% (v/v) ジメチルホルムアミド) 100 µl を各ウェルに添加し

50

た。プレートを覆い、厳密に30分間室温でインキュベートした。一部の例では、反応を630nmでモニターした。1M硫酸100 μ lを全てのウェルに添加して、反応を停止した。30分以内に450nmで吸光度を測定した。

【0198】

Softmaxを用いて得られた標準曲線(4パラメーターの曲線フィット)を用いて、対照および患者試料値を決定した。標準曲線から得られた濃度値に希釈係数(120)をかけると実際の濃度が得られ、ng/mlでレポートされた。既知の血清試料を用いて、アッセイの品質を確認した。低度対照は、668.1~979.9ng/mlの範囲であった。高度対照は、2677.9~3300.2ng/mlの範囲であった。患者値は、概ね、最も高い標準品のng/mlでの濃度を超えなかった。1:120の希釈度で、患者値が最も高い標準品の濃度より大きい場合、結果は、最も高い標準品の120倍濃度より大きいとしてレポートされた。

10

【0199】

TIMP-1 ELISAアッセイを6ヶ月ごとに検証し、期間中の一定した性能を確保する。操作者に対する盲検法で、従来の既知値を有する5つの試料の最小値を評価する。陰性試料に関する結果は陰性でなければならない。陽性試料に関する結果は陽性でなければならない。収率は、先に得られた値の15%以内にならなければならない。20%を超える検証試料が性能基準に達していないときは、トラブルシューティングを実行する。許容可能なアッセイ性能が再確立されるまでは、さらなる患者データをレポートしない。

【0200】

20

括弧または他の方法で上記に提示される全ての刊行物の論文、参考文献、および特許引用は、先述されているかどうかに関らず、全文が本明細書中に参考として援用される。

【0201】

上記に提示した実施例を参照して本発明を説明したが、本発明の要旨から逸脱しない範囲で種々の変更が可能であることが理解されるべきである。したがって、本発明は請求項のみにより限定される。

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図1】図1は、ジーンバンク(Genbank)寄託番号M36501から入手可能な成熟ヒト α 2-マクログロブリンの核酸配列(配列番号1)および対応するアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

30

【図2】図2は、ジーンバンク(Genbank)寄託番号NM_003254から入手可能なヒトメタロプロテアーゼ-1組織阻害因子(TIMP-1)の核酸配列(配列番号3)および対応するアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Prometheus Laboratories, Inc.
 Rose, Steven L.
 Oh, Esther H.
 Walsh, Michael J.

<120> Methods of Diagnosing Liver Fibrosis

<130> FP-PM 5505

<150> US 10/087,188

<151> 2002-02-28

10

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2041

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1932)

20

<400> 1

ccc gcc ttc cta gct gtc cca gtg gag aag gaa caa gcg cct cac tgc 48
 Pro Ala Phe Leu Ala Val Pro Val Glu Lys Glu Gln Ala Pro His Cys
 1 5 10 15

atc tgt gca aac ggg cgg caa act gtg tcc tgg gca gta acc cca aag 96
 Ile Cys Ala Asn Gly Arg Gln Thr Val Ser Trp Ala Val Thr Pro Lys
 20 25 30

tca tta gga aat gtg aat ttc act gtg agc gca gag gca cta gag tct 144
 Ser Leu Gly Asn Val Asn Phe Thr Val Ser Ala Glu Ala Leu Glu Ser
 35 40 45

caa gag ctg tgt ggg act gag gtg cct tca gtt cct gaa cac gga agg 192
 Gln Glu Leu Cys Gly Thr Glu Val Pro Ser Val Pro Glu His Gly Arg
 50 55 60

30

aaa gac aca gtc atc aag cct ctg ttg gtt gaa cct gaa gga cta gag 240
 Lys Asp Thr Val Ile Lys Pro Leu Leu Val Glu Pro Glu Gly Leu Glu
 65 70 75 80

aag gaa aca aca ttc aac tcc cta ctt tgt cca tca ggt ggt gag gtt 288
 Lys Glu Thr Thr Phe Asn Ser Leu Leu Cys Pro Ser Gly Gly Glu Val
 85 90 95

tct gaa gaa tta tcc ctg aaa ctg cca cca aat gtg gta gaa gaa tct 336

Ser Glu Glu Leu Ser Leu Lys Leu Pro Pro Asn Val Val Val Glu Glu Ser
 100 105 110
 gcc cga gct tct gtc tca gtt ttg gga gac ata tta ggc tct gcc atg 384
 Ala Arg Ala Ser Val Ser Val Leu Gly Asp Ile Leu Gly Ser Ala Met
 115 120 125
 caa aac aca caa aat ctt ctc cag atg ccc tat ggc tgt gga gag cag 432
 Gln Asn Thr Gln Asn Leu Leu Gln Met Pro Tyr Gly Cys Gly Glu Gln
 130 135 140
 aat atg gtc ctc ttt gct cct aac atc tat gta ctg gat tat cta aat 480
 Asn Met Val Leu Phe Ala Pro Asn Ile Tyr Val Leu Asp Tyr Leu Asn
 145 150 155 160
 gaa aca cag cag ctt act cca gag atc aag tcc aag gcc att ggc tat 528
 Glu Thr Gln Gln Leu Thr Pro Glu Ile Lys Ser Lys Ala Ile Gly Tyr
 165 170 175
 ctc aac act ggt tac cag aga cag ttg aac tac aaa cac tat gat ggc 576
 Leu Asn Thr Gly Tyr Gln Arg Gln Leu Asn Tyr Lys His Tyr Asp Gly
 180 185 190
 tcc tac agc acc ttt ggg gag cga tat ggc agg aac cag ggc aac acc 624
 Ser Tyr Ser Thr Phe Gly Glu Arg Tyr Gly Arg Asn Gln Gly Asn Thr
 195 200 205
 tgg ctc aca gcc ttt gtt ctg aag act ttt gcc caa gct cga gcc tac 672
 Trp Leu Thr Ala Phe Val Leu Lys Thr Phe Ala Gln Ala Arg Ala Tyr
 210 215 220
 atc ttc atc gat gaa gca cac att acc caa gcc ctc ata tgg ctc tcc 720
 Ile Phe Ile Asp Glu Ala His Ile Thr Gln Ala Leu Ile Trp Leu Ser
 225 230 235 240
 cag agg cag aag gac aat ggc tgt ttc agg agc tct ggg tca ctg ctc 768
 Gln Arg Gln Lys Asp Asn Gly Cys Phe Arg Ser Ser Gly Ser Leu Leu
 245 250 255
 aac aat gcc ata aag gga gga gta gaa gat gaa gtg acc ctc tcc gcc 816
 Asn Asn Ala Ile Lys Gly Gly Val Glu Asp Glu Val Thr Leu Ser Ala
 260 265 270
 tat atc acc atc gcc ctt ctg gag att cct ctc aca gtc act cac cct 864
 Tyr Ile Thr Ile Ala Leu Leu Glu Ile Pro Leu Thr Val Thr His Pro
 275 280 285
 gtt gtc cgc aat gcc ctg ttt tgc ctg gag tca gcc tgg aag aca gca 912
 Val Val Arg Asn Ala Leu Phe Cys Leu Glu Ser Ala Trp Lys Thr Ala
 290 295 300
 caa gaa ggg gac cat ggc agc cat gta tat acc aaa gac ctg ctg gcc 960
 Gln Glu Gly Asp His Gly Ser His Val Tyr Thr Lys Asp Leu Leu Ala
 305 310 315 320

10

20

30

40

tcc aac atg gcg atc gtt gat gtg aag atg gtc tct ggc ttc att ccc 1680
 Ser Asn Met Ala Ile Val Asp Val Lys Met Val Ser Gly Phe Ile Pro
 545 550 555 560
 ctg aag cca aca gtg aaa atg ctt gaa aga tct aac cat gtg agc cgg 1728
 Leu Lys Pro Thr Val Lys Met Leu Glu Arg Ser Asn His Val Ser Arg
 565 570 575
 aca gaa gtc agc agc aac cat gtc ttg att tac ctt gat aag gtg tca 1776
 Thr Glu Val Ser Ser Asn His Val Leu Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser
 580 585 590
 aat cag aca ctg agc ttg ttc ttc acg gtt ctg caa gat gtc cca gta 1824
 Asn Gln Thr Leu Ser Leu Phe Phe Thr Val Leu Gln Asp Val Pro Val
 595 600 605
 aga gat ctg aaa cca gcc ata gtg aaa gtc tat gat tac tac gag acg 1872
 Arg Asp Leu Lys Pro Ala Ile Val Lys Val Tyr Asp Tyr Tyr Glu Thr
 610 615 620
 gat gag ttt gca att gct gag tac aat gct cct tgc agc aaa gat ctt 1920
 Asp Glu Phe Ala Ile Ala Glu Tyr Asn Ala Pro Cys Ser Lys Asp Leu
 625 630 635 640
 gga aat gct tga agaccacaag gctgaaaagt gctttgctgg agtctctgttc 1972
 Gly Asn Ala *

10

tcagagctcc acagaagaca cgtgttttttg tctcttttaa gacttgatga ataaacactt 2032
 tttctggtc 2041

20

<210> 2
 <211> 643
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Pro Ala Phe Leu Ala Val Pro Val Glu Lys Glu Gln Ala Pro His Cys
 1 5 10 15
 Ile Cys Ala Asn Gly Arg Gln Thr Val Ser Trp Ala Val Thr Pro Lys
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asn Val Asn Phe Thr Val Ser Ala Glu Ala Leu Glu Ser
 35 40 45
 Gln Glu Leu Cys Gly Thr Glu Val Pro Ser Val Pro Glu His Gly Arg
 50 55 60
 Lys Asp Thr Val Ile Lys Pro Leu Leu Val Glu Pro Glu Gly Leu Glu
 65 70 75 80
 Lys Glu Thr Thr Phe Asn Ser Leu Leu Cys Pro Ser Gly Gly Glu Val
 85 90 95
 Ser Glu Glu Leu Ser Leu Lys Leu Pro Pro Asn Val Val Glu Glu Ser
 100 105 110
 Ala Arg Ala Ser Val Ser Val Leu Gly Asp Ile Leu Gly Ser Ala Met
 115 120 125
 Gln Asn Thr Gln Asn Leu Leu Gln Met Pro Tyr Gly Cys Gly Glu Gln

30

130	135	140
Asn Met Val Leu Phe Ala Pro Asn Ile Tyr Val Leu Asp Tyr Leu Asn		
145	150	155
Glu Thr Gln Gln Leu Thr Pro Glu Ile Lys Ser Lys Ala Ile Gly Tyr		160
	165	170
		175
Leu Asn Thr Gly Tyr Gln Arg Gln Leu Asn Tyr Lys His Tyr Asp Gly		
	180	185
		190
Ser Tyr Ser Thr Phe Gly Glu Arg Tyr Gly Arg Asn Gln Gly Asn Thr		
	195	200
		205
Trp Leu Thr Ala Phe Val Leu Lys Thr Phe Ala Gln Ala Arg Ala Tyr		
	210	215
		220
Ile Phe Ile Asp Glu Ala His Ile Thr Gln Ala Leu Ile Trp Leu Ser		
225	230	235
		240
Gln Arg Gln Lys Asp Asn Gly Cys Phe Arg Ser Ser Gly Ser Leu Leu		
	245	250
		255
Asn Asn Ala Ile Lys Gly Gly Val Glu Asp Glu Val Thr Leu Ser Ala		
	260	265
		270
Tyr Ile Thr Ile Ala Leu Leu Glu Ile Pro Leu Thr Val Thr His Pro		
	275	280
		285
Val Val Arg Asn Ala Leu Phe Cys Leu Glu Ser Ala Trp Lys Thr Ala		
	290	295
		300
Gln Glu Gly Asp His Gly Ser His Val Tyr Thr Lys Asp Leu Leu Ala		
305	310	315
		320
Tyr Ala Phe Ala Leu Ala Gly Asn Gln Asp Lys Arg Lys Glu Val Leu		
	325	330
		335
Lys Ser Leu Asn Glu Glu Ala Val Lys Lys Asp Asn Ser Val His Trp		
	340	345
		350
Glu Arg Pro Gln Lys Pro Lys Ala Pro Val Gly Asp Phe Tyr Glu Pro		
	355	360
		365
Gln Ala Pro Ser Ala Glu Val Glu Met Thr Ser Tyr Val Leu Leu Ala		
	370	375
		380
Tyr Leu Thr Ala Gln Pro Ala Pro Thr Ser Glu Asp Leu Thr Ser Ala		
385	390	395
		400
Thr Asn Ile Val Lys Trp Ile Thr Lys Gln Gln Asn Ala Gln Gly Gly		
	405	410
		415
Phe Ser Ser Thr Gln Asp Thr Val Val Ala Leu His Ala Leu Ser Lys		
	420	425
		430
Tyr Gly Ala Ala Thr Phe Thr Arg Thr Gly Lys Ala Ala Gln Val Thr		
	435	440
		445
Ile Gln Ser Ser Gly Thr Phe Ser Ser Lys Phe Gln Val Asp Asn Asn		
	450	455
		460
Asn Arg Leu Leu Leu Gln Val Ser Leu Pro Glu Leu Pro Gly Glu		
465	470	475
		480
Tyr Ser Met Lys Val Thr Gly Glu Gly Cys Val Tyr Leu Gln Thr Ser		
	485	490
		495
Leu Lys Tyr Asn Ile Leu Pro Glu Lys Glu Glu Phe Pro Phe Ala Leu		
	500	505
		510
Gly Val Gln Thr Leu Pro Gln Thr Cys Asp Glu Pro Lys Ala His Thr		
	515	520
		525
Ser Phe Gln Ile Ser Leu Ser Val Ser Tyr Thr Gly Ser Arg Ser Ala		
	530	535
		540
Ser Asn Met Ala Ile Val Asp Val Lys Met Val Ser Gly Phe Ile Pro		
545	550	555
		560
Leu Lys Pro Thr Val Lys Met Leu Glu Arg Ser Asn His Val Ser Arg		
	565	570
		575

10

20

30

40

Thr Glu Val Ser Ser Asn His Val Leu Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser
 580 585 590
 Asn Gln Thr Leu Ser Leu Phe Phe Thr Val Leu Gln Asp Val Pro Val
 595 600 605
 Arg Asp Leu Lys Pro Ala Ile Val Lys Val Tyr Asp Tyr Tyr Glu Thr
 610 615 620
 Asp Glu Phe Ala Ile Ala Glu Tyr Asn Ala Pro Cys Ser Lys Asp Leu
 625 630 635 640
 Gly Asn Ala

<210> 3
 <211> 782
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (63)...(683)

<400> 3
 aggggcctta gcgtagcgca tcgccgagat ccagcgccca gagagacacc agagaaccca 60
 cc atg gcc ccc ttt gag ccc ctg gct tct gcc atc ctg ttg ttg ctg 107
 Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 tgg ctg ata gcc ccc agc agg gcc tgc acc tgt gtc cca ccc cac cca 155
 Trp Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro 20
 20 25 30
 cag acg gcc ttc tgc aat tcc gac ctc gtc atc agg gcc aag ttc gtg 203
 Gln Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val 35
 40 45
 ggg aca cca gaa gtc aac cag acc acc tta tac cag cgt tat gag atc 251
 Gly Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile 50
 55 60
 aag atg acc aag atg tat aaa ggg ttc caa gcc tta ggg gat gcc gct 299
 Lys Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala 65
 70 75
 gac atc cgg ttc gtc tac acc ccc gcc atg gag agt gtc tgc gga tac 347
 Asp Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr 80
 85 90 95
 ttc cac agg tcc cac aac cgc agc gag gag ttt ctc att gct gga aaa 395
 Phe His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys 100
 105 110
 ctg cag gat gga ctc ttg cac atc act acc tgc agt ttc gtg gct ccc 443
 Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro 115
 120 125

20

30

tgg aac agc ctg agc tta gct cag cgc cgg ggc ttc acc aag acc tac 491
 Trp Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr
 130 135 140
 act gtt ggc tgt gag gaa tgc aca gtg ttt ccc tgt tta tcc atc ccc 539
 Thr Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro
 145 150 155
 tgc aaa ctg cag agt ggc act cat tgc ttg tgg acg gac cag ctc ctc 587
 Cys Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu
 160 165 170 175
 caa ggc tct gaa aag ggc ttc cag tcc cgt cac ctt gcc tgc ctg cct 635
 Gln Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro
 180 185 190
 cgg gag cca ggg ctg tgc acc tgg cag tcc ctg cgg tcc cag ata gcc 683
 Arg Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala
 195 200 205
 tgaatcctgc ccggagtggg actgaagcct gcacagtgtc caccctgttc ccactcccat 743
 attttcttcg gacaatgaaa taaagagtta ccaccagc 782

<210> 4
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro Gln
 20 25 30
 Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val Gly
 35 40 45
 Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile Lys
 50 55 60
 Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr Phe
 85 90 95
 His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Leu
 100 105 110
 Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro Trp
 115 120 125
 Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr Thr
 130 135 140
 Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro Cys
 145 150 155 160
 Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu Gln
 165 170 175
 Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro Arg
 180 185 190
 Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala
 195 200 205

10

20

30

40

1	ccacccctct	tactgctgct	agcgagccg	gaacacagcc	ccctggagcc	ctctggagcc
4	ggcgagccac	gctgctcgct	cgctctacc	ccacagctct	taggaacgtg	gaatctacc
12	gtcgctcgac	ccacacacac	gctctcagag	ctctggagcc	ctctggagcc	ctctctctct
15	gaacacagcc	ggagacacac	agttacacg	ccctctctgg	ctgacctctg	agacatccag
24	agggagccac	ctctctctct	ctctctctct	ccctcagctg	gagagctctg	cgacacacat
30	ctctctgac	taccacacac	gctctgagcc	ggagacagcc	gagctctctg	ctctctctct
36	agggctctct	tgggtctg	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
42	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
48	gacacacac	agctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
54	taccacacac	agctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
60	taccacacac	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
66	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
72	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
78	agggagccac	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
84	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
90	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
96	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
102	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
108	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
114	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
120	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
126	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
132	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
138	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
144	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
150	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
156	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
162	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
168	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
174	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
180	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
186	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
192	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
198	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
204	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct

FIGURE 1

1	aggagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
2	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
121	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
185	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
241	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
304	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
361	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
421	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
481	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
542	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
601	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
661	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
721	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagcttgc	agagagagagag	agagagagagag
781	gc				

FIGURE 2

MAPPELASSILMANNIAPSRACQVPPNPQTAFONSLVERAKFVOTPEVNTQTLQYREIHTKMY
KGFQALGDRADIRFTVITTFMBSTVCTYFERSERSEBFLAGKQDTLLNHTTCBFPVFNLSLQRRG
RMTCTVTCSEPCVPEPLSNGKLSGTHCLATDCLQSEKCFOSRHLACLPRGIGCTQSLSCIA

B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/06038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12Q 1/00, 1/37, 1/70; G01N 33/50, 33/536, 33/543, 33/573, 33/576, 33/66, 33/68, 33/86, 33/92
 US CL : 435/4, 5, 7.1, 7.21, 7.4, 23, 24; 436/63, 69, 71, 86, 87, 94, 518, 536, 811, 820; 702/19; 706/924

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. : 435/4, 5, 7.1, 7.21, 7.4, 23, 24; 436/63, 69, 71, 86, 87, 94, 518, 536, 811, 820; 702/19; 706/924

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

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,E	US 6,631,330 B1 (FOYNARD) 07 October 2003. See column 2, line 58-column 3, line 64.	1-74
X	AFDHAL, N.H. et al. Urinary assays for desmosine and hydroxylysylpyridinoline in the detection of cirrhosis. Journal of Hepatology. 1997, Vol. 27, pages 993-1002. See abstract.	65-66,68-71
X	IMBERT-BISMUT, F. et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. The Lancet. 07 April 2001, Vol. 357, pages 1069-1075. See Summary.	54-55, 57-66,68-69,71
X	MURAWAKI, Y. et al. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. Journal of Gastroenterology. 2001, Vol. 36, pages 399-406. See abstract; page 402, column 1, first full paragraph; page 403, paragraph spanning columns 1-2.	65,71
X	XUHUAI, J. et al. Clinical significance of serum 7S collagen and type VI collagen levels for the diagnosis of hepatic fibrosis. Chinese Medical Journal. 1997, Vol. 110, No. 3, pages 198-201. See abstract.	65-66,69,71



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2004 (28.04.2004)

Date of mailing of the international search report

21 JUL 2004

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. (703) 305-3230

Authorized official

David A. Saunders, Filt

Telephone No. 571-272-0507

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06038

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WALSH, K.M. et al. Basement membrane peptides as markers of liver disease in chronic hepatitis C. Journal of Hepatology. 2000, Vol. 32, pages 325-330., See abstract; page 329, column 1, second full paragraph.	65,71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06038

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CAS, BIOSIS, MEDLINE:

(HEPATIC OR LIVER OR BILIARY)(2A)(FIBROT? OR FIBROS? OR FIBROL? OR FIBROG?) AND
(MARKER OR INDICATOR)(5A)(MULTIVARIANT OR MULTI(W)VARIANT OR MULTIPLE OR COMBIN?) AND
(DETECT? OR MONITOR? OR DIAGNOS? OR PROGNOS?)

CAS, BIOSIS, MEDLINE:

(ALPHA(W)2(W)MACROGLOB? OR A2M OR A2MG OR A(W)SUB(W)2(W)M) AND
(HYALURONIC(W)ACID OR HYALURONAN OR HYALURONATE) AND
((TISSUE(W)INHIBITOR(W)METALLOPROTEINASE(W)1) OR TIMP1 OR TIMP(W)1)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/96

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,PT,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ローズ, スティーブン エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 9 , エスコンディード, アベニダ レポソ 3 2
0 7

(72)発明者 オー, エスサー エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 9 , サン ディエゴ, サイプレス ウッズ ドラ
イブ 1 1 4 6 2

(72)発明者 ウォルシュ, マイケル ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 6 , サン ディエゴ, ウィロー レーン 1 9 4
5

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA20 DA37 FA11 FB01 FB03 FB05 FB13 GC15

专利名称(译)	诊断肝纤维化的方法		
公开(公告)号	JP2005519271A	公开(公告)日	2005-06-30
申请号	JP2003572358	申请日	2003-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	专业缝纫我们实验室公司		
申请(专利权)人(译)	Puromishiasu Laboratories公司		
[标]发明人	ローズステイーブンエル オーエスサーエイチ ウォルシュマイケルジェイ		
发明人	ローズ, ステイーブン エル. オー, エスサー エイチ. ウォルシュ, マイケル ジェイ.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/68 G01N33/96		
CPC分类号	G01N33/5767 G01N33/6893 G01N2333/4713 G01N2333/8107 G01N2333/8146 G01N2800/085 G01N2800/52 Y02A90/24 Y02A90/26 Y10S436/811 Y10S436/82 Y10S706/924 Y10T436/143333		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.S G01N33/543.545.D G01N33/569.L G01N33/573.A G01N33/96		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA20 2G045/DA37 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/ /FB05 2G045/FB13 2G045/GC15		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	10/087188 2002-02-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过检测来自个体的样品中的α2-巨球蛋白 (α2-MG) 来诊断个体肝纤维化的存在或严重性的方法。检测来自个体的样品中的透明质酸 (HA) ;检测个体样品中金属蛋白酶-1 (TIMP-1) 的组织抑制剂;并基于α2-MG , HA和TIMP-1的存在或水平诊断个体中肝纤维化的存在或严重性。

特表2005-51 (P2005-515 (43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)			
(51) Int. Cl. ⁷ G01N 33/53 G01N 33/543 G01N 33/569 G01N 33/573 G01N 33/96	FI G01N 33/53 N G01N 33/53 S G01N 33/543 545D G01N 33/569 L G01N 33/573 A	テーマコード (参考) 2G045	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 85 頁) 最終頁1			
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2003-572358 (P2003-572358) 平成15年2月28日 (2003.2.28) 平成16年10月25日 (2004.10.25) PCT/US2003/006038 W02003/073822 平成15年9月12日 (2003.9.12) 10/087,188 平成14年2月28日 (2002.2.28) 米国 (US)	(71) 出願人 502007815 プロミシアス ラボラトリーズ、 ーボレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 21-4203、サンディエゴ、 フィック センター プールバード 39 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 (74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹	最終頁に続