

(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2006-526140

(P2006-526140A)

(43) 公表日 平成18年11月16日(2006.11.16)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

D

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 142 頁)

(21) 出願番号 特願2005-510072 (P2005-510072)
 (86) (22) 出願日 平成15年12月23日 (2003.12.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年8月24日 (2005.8.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/041453
 (87) 国際公開番号 W02004/059293
 (87) 国際公開日 平成16年7月15日 (2004.7.15)
 (31) 優先権主張番号 60/436,301
 (32) 優先日 平成14年12月24日 (2002.12.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/330,696
 (32) 優先日 平成14年12月27日 (2002.12.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/371,149
 (32) 優先日 平成15年2月20日 (2003.2.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500204577
 バイオサイト インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア
 州サン・ディエゴ、ローゼル・ストリート
 11030番 スウィート・ディ
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100106840
 弁理士 森田 耕司
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子
 (74) 代理人 100114465
 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鑑別診断のためのマーカーおよびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、疾病および/または症状の鑑別診断のための診断マーカーの同定および使用の方法を提供する。種々の観点で、本発明は1つ以上の類似または同一症状を示す一つ（および、好ましくは複数）の疾病または症状の存在または不在を確認できる方法および組成物に関する。それらの方法および組成物を使用して、臨床の場で発現する1つ以上の非特異的症状の根底にある疾病または症状の確認に使用するアッセイおよびアッセイ装置を提供できる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

症状に基づく被験者の診断の方法であって、

前記被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカーの存在または量について分析し、ここで、前記マーカーは、前記被験者により示される症状の鑑別診断において前記被験者における複数の状態の存在または不存在を識別するために選択されておりそして前記試験試料中の前記マーカーの存在または量を前記複数の状態のそれぞれの存在または不存在と関連づける、
ことを含む方法。

【請求項 2】

前記症状が、呼吸困難、発熱、胸の痛み、腹痛、代謝状態の障害、神経機能不全、高血圧、めまい感、および頭痛からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記症状が呼吸困難であり、および前記複数の状態が、ぜん息、慢性閉塞性肺疾病 ("COPD"), 気管狭窄、閉塞性気管支内腫瘍、肺線維症、じん肺症、癌性リンパ管炎、脊柱後側弯症、胸水、筋萎縮性側索硬化症、うっ血性心不全、冠状動脈疾病、心筋梗塞、心房性細動、心筋症、弁機能不全、左心室肥大、心膜炎、不整脈、肺塞栓症、代謝性アシドーシス、慢性気管支炎、肺炎、不安、敗血症、および動脈瘤切開からなる群より選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記複数の状態が、心筋梗塞および肺塞栓症、心筋梗塞およびうっ血性心不全、肺塞栓症およびうっ血性心不全、または心筋梗塞、肺塞栓症、およびうっ血性心不全を含む、請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 5】

前記症状が呼吸困難であり、および前記複数のマーカーが、心臓障害の特異的マーカー、神経組織の障害の特異的マーカー、組織障害の非特異的マーカー、血圧制御に関連するマーカー、肺障害に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、凝固およびうっ血に関連するマーカー、およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される複数のマーカーを含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

前記症状が呼吸困難であり、および前記複数のマーカーが、遊離型心臓トロポニン I、遊離型心臓トロポニン T、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T、総心臓トロポニン I、総心臓トロポニン T、クレアチンキナーゼ - MB、S 100 a o、A 型ナトリウム利尿ペプチド、B 型ナトリウム利尿ペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニン、ウロテンシン 1、ウロジラチン、アドレノメジュリン、ミオグロビン、平滑筋ミオシン重鎖、血栓前駆体蛋白質、D - ダイマー、好中球エラスターゼ、7 s コラーゲンフラグメント、肺サーファクタント蛋白質、ジパルミトイルホスファチジルコリン、KL - 6、平滑筋ミオシン軽鎖、IL - 1 r a、ミエロペルオキシダーゼ、C 反応性蛋白質、単球遊走促進ペプチド - 1、および MMP - 9、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される少なくとも 1 つの被験者に由来するマーカーを含む、請求項 5 記載の方法。

30

【請求項 7】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、少なくとも 1 つの型の心臓トロポニン、B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、および D - ダイマーを含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記症状が胸の痛みであり、および前記複数の状態が、安定性アンギナ、不安定性アンギナ、心筋虚血、心臓壊死、心房性細動、心筋梗塞、筋骨格の創傷、胆嚢炎、胃食道逆流、肺塞栓症、心膜炎、動脈解離、肺炎、不安からなる群より選択される、請求項 2 記載の方

50

法。

【請求項 9】

前記複数の状態が、動脈解離、心筋虚血、心筋壊死、心筋梗塞、および心房性細動を含む、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記症状が胸の痛みであり、および前記複数のマーカーが、心臓障害の特異的マーカー、神経組織の障害の特異的マーカー、組織障害の非特異的マーカー、血圧制御に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、凝固およびうっ血に関連するマーカー、およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される複数のマーカーである、請求項 2 記載の方法。

10

【請求項 11】

前記症状が胸の痛みであり、および前記複数のマーカーが、遊離型心臓トロポニン I、遊離型心臓トロポニン T、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T、総心臓トロポニン I、総心臓トロポニン T、クレアチンキナーゼ - MB、S 100 a o、A 型ナトリウム利尿ペプチド、B 型ナトリウム利尿ペプチド、NT - pro BNP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニン、ウロテンシン 1、ミオグロビン、平滑筋ミオシン重鎖、血栓前駆体蛋白質、D - ダイマー、平滑筋ミオシン重鎖、IL - 1 r a、ミエロペルオキシダーゼ、C 反応性蛋白質、単球遊走促進ペプチド - 1、および MMP - 9、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される少なくとも 1 つの被験者に由来するマーカーを含む、請求項 10 記載の方法。

20

【請求項 12】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、少なくとも 1 つの型の心臓トロポニン、B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカーおよび平滑筋ミオシン重鎖を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、少なくとも 1 つの型の心臓トロポニンおよび平滑筋ミオシン重鎖を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、少なくとも 1 つの型の心臓トロポニン、B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、心房性ナトリウム利尿ペプチドまたは心房性ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、クレアチンキナーゼ MB、および平滑筋ミオシン重鎖を含む、請求項 11 記載の方法。

30

【請求項 15】

前記症状が腹痛であり、および前記複数の状態が、動脈解離、腸間膜塞栓症、脾炎、虫垂炎、心筋虚血、心筋梗塞、感染性疾患、インフルエンザ、食道癌、胃腺癌、結腸直腸腺癌、膵臓管腺癌、嚢胞腺癌、およびインスリノーマからなる群より選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 16】

前記複数の状態が、動脈解離、心筋虚血、および心筋梗塞を含む、請求項 15 記載の方法。

40

【請求項 17】

前記症状が腹痛であり、および前記複数のマーカーが、遊離型心臓トロポニン I、遊離型心臓トロポニン T、トロポニン T およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T、総心臓トロポニン I、総心臓トロポニン T、B 型ナトリウム利尿ペプチド、B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、平滑筋ミオシン重鎖、およびミオグロビンからなる群より選択される少なくとも 1 つの被験者に由来するマーカーを含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

50

被験者に由来する前記複数のマーカーが、少なくとも1つの型の心臓トロポニン、B型ナトリウム利尿ペプチドまたはB型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、および平滑筋ミオシン重鎖を含む、請求項16記載の方法。

【請求項19】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、少なくとも1つの型の心臓トロポニンおよび平滑筋ミオシン重鎖を含む、請求項16記載の方法。

【請求項20】

前記症状が神経機能不全であり、および前記複数の状態が、発作、虚血性発作、クモ膜下出血、一過性虚血性発作、脳内出血、出血性発作、脳腫瘍、脳低酸素症、低血糖症、片頭痛、心房性細動、心筋梗塞、心臓虚血、末梢血管疾病、片頭痛、およびてんかんからなる群より選択される、請求項2記載の方法。

10

【請求項21】

前記複数の状態が、虚血性発作、出血性発作、一過性虚血性発作、心房性細動、心筋虚血、および心筋梗塞を含む、請求項20記載の方法。

【請求項22】

前記症状が神経機能不全であり、および前記複数のマーカーが、心臓障害の特異的マーカー、神経組織の障害の特異的マーカー、組織障害の非特異的マーカー、血圧制御に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、凝固およびうっ血に関連するマーカー、およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される複数のマーカーを含む、請求項20記載の方法。

20

【請求項23】

前記症状が神経機能不全であり、および前記複数のマーカーが、遊離型心臓トロポニンI、遊離型心臓トロポニンT、トロポニンIおよびトロポニンCの一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニンI、トロポニンIおよびトロポニンCの一方または両方心臓トロポニンT、総心臓トロポニンI、総心臓トロポニンT、C反応性蛋白質、クレアチンキナーゼ-BB、クレアチンキナーゼ-MB、IL-1ra、D-ダイマー、ニューロトロフィン-3、c-Tau、血管内皮成長因子、血栓前駆体蛋白質、B型ナトリウム利尿ペプチド、心房性ナトリウム利尿ペプチド、インターロイキン-6、マトリクスメタロプロテイナーゼ-9、S-100β、トロンプイン-アンチトロンプインIII複合体、カススペース-3、シトクロムc、およびある型のフォン・ビルブランド因子、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つの被験者に由来するマーカーを含む、請求項20記載の方法。

30

【請求項24】

前記試験試料が、血液試料、血清試料、血漿試料、脳脊髄液試料、尿試料、唾液試料、痰試料、および胸水試料からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項25】

前記複数のマーカーが、遊離型心臓トロポニンI、遊離型心臓トロポニンT、トロポニンIおよびトロポニンCの一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニンI、トロポニンIおよびトロポニンCの一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニンT、総心臓トロポニンI、総心臓トロポニンT、B型ナトリウム利尿ペプチド、心房性ナトリウム利尿ペプチド、肺サーファクタントプロテインD、D-ダイマー、アネキシンV、エノラーゼ、クレアチンキナーゼ-BB、クレアチンキナーゼ-MB、グリコゲンホスホリラーゼ、心臓型脂肪酸結合蛋白質、ホスホグリセリン酸ムターゼ、S-100β、S-100aο、プラスミン-α2-アンチプラスミン複合体、β-トロンプグロブリン、血小板因子4、フィブリノペプチドA、血小板由来成長因子、プロトロンプインフラグメント1+2、P-セレクチン、トロンプイン-アンチトロンプインIII複合体、フォン・ビルブランド因子、組織因子、血栓前駆体蛋白質、ヒト好中球エラスターゼ、誘導性一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファチド酸、マロンジアルデヒド修飾低密度リポ蛋白質、マトリクスメタロプロテイナーゼ-1、マトリクスメタロプロテイナーゼ-2、マトリクスメタロプロテイナーゼ-3、マトリクスメタロプロテイナーゼ-9、TIMP1、TIMP2、TIMP3、

40

50

C 反応性蛋白質，インターロイキン - 1 β ，インターロイキン - 1 レセプターアンタゴニスト，インターロイキン - 6，腫瘍壊死因子 α ，可溶性細胞間接着分子 - 1，血管細胞接着分子，単球遊走促進蛋白質 - 1，カススペース - 3，シトクロム c，ヒトリポカリン型プロスタグランジン D シンターゼ，マスト細胞トリプターゼ，好酸球カチオン性蛋白質，KL - 6，プロカルシトニン，ハプトグロビン，s - CD 40 リガンド，S - FAS リガンド，アルファ 2 アクチン，塩基性カルボニン 1，CSRP 2 エラスチン，LTBP 4，平滑筋ミオシン，平滑筋ミオシン重鎖，トランスジェリン，アルドステロン，アンジオテンシン I，アンジオテンシン II，アンジオテンシン III，ブラジキニン，カルシトニンカルシトニン遺伝子関連ペプチド，エンドセリン 1，エンドセリン 2，エンドセリン 3，レニン，バソプレシン，APOB 48，膵臓エラスターゼ 1，膵臓リパーゼ，sPLA 2，トリプシノーゲン活性化ペプチド，アルファエノラーゼ，LAMP 3，ホスホリパーゼ D，PLA 2 G 5，プロテイン D，SFTPC，ディフェンシン HBD 1，ディフェンシン HBD 2，CXCL - 1，CXCL - 2，CXCL - 3，CCL 2，CCL 3，CCL 4，CCL 8，プロカルシトニン，プロテイン C，血清アミロイド A，s - グルタチオン，s - TNFP 55，s - TNFP 75，TAFI，TGF β ，MMP - 11，脳脂肪酸結合蛋白質，CA 11，CABP 1，CACNA 1A，CBLN 1，CHN 2，切断された Tau，CRHR 1，DRPLA，EGF，GPM 6B，GPR 7，GPR 8，GRIN 2C，GRM 7，HAPIP，HIF 1 アルファ，HIP 2 KCNK 4，KCNK 9，KCNQ 5，MAPK 10，n - アセチルアスパラギン酸，NEUROD 2，NRG 2，PACE 4，ホスホグリセレートムターゼ，PKC ガンマ，c - Tau，プロスタグランジン E 2，PTEN，PTPRZ 1，RGS 9，SCA 7，セクレタゴギン，SLC 1A 3，SORL 1，SREB 3，STAC，STX 1A，STXBP 1，BDNF，シスタチン C，ニューロキニン A，サブスタンス P，IL - 1 α ，インターロイキン - 1，インターロイキン - 11，インターロイキン - 13，インターロイキン - 18，インターロイキン - 4，およびインターロイキン - 10，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される，請求項 1 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

前記分析する工程が，前記試験試料を，それぞれが前記複数のマーカーの 1 つを検出するために結合するよう適合されている複数の別々のアドレス可能な位置を含む試験表面と接触させることを含む，請求項 1 記載の方法。

【請求項 27】

前記複数のマーカーが，サンドウィッチイムノアッセイにおいて検出される，請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

前記試験表面が多孔質膜である，請求項 26 記載の方法。

【請求項 29】

前記試験表面が非多孔質表面である，請求項 26 記載の方法。

【請求項 30】

前記試験表面が毛細空間中にある，請求項 26 記載の方法。

【請求項 31】

前記試験表面が，前記複数の別々のアドレス可能な位置に固定化された別々の粒子を含み，前記別々の粒子は，それに結合した抗体を含む，請求項 26 記載の方法。

【請求項 32】

症状に基づく診断方法を実施するための試験デバイスであって，前記方法は，被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカーの存在または量について分析し，ここで，前記マーカーは，前記被験者により示される症状の鑑別診断中で前記被験者における複数の状態の存在または不存在を識別するよう選択されており；そして前記試験試料における前記マーカーの存在または量を前記複数の状態のそれぞれの存在または不存在と関連づけることを含み，前記試験デバイスは，

複数の別々のアドレス可能な位置を含む試験表面であって、前記位置のそれぞれは、前記複数のマーカーの1つを検出するために結合するよう選択され前記位置に固定化された抗体を含むことを特徴とするデバイス。

【請求項33】

前記試験表面が、前記複数の別々のアドレス可能な位置に固定化された別々の粒子を含み、前記別々の粒子は前記抗体を含む、請求項32記載の試験デバイス。

【請求項34】

前記症状が、呼吸困難、発熱、胸の痛み、腹痛、代謝状態の障害、神経機能不全、高血圧、めまい感、および頭痛からなる群より選択される、請求項32記載の試験デバイス。

【請求項35】

症状に基づく診断方法を実施するためのマーカーパネルを同定する方法であって、被験者に由来する複数のマーカーを含む1またはそれ以上の候補パネルが前記被験者集団中の個々の被験者により示される症状の鑑別診断中の、被験者集団における複数の状態の存在または不存在を識別する能力を判定することを含み、ここで、前記複数の状態の存在または不存在を正しく識別する候補パネルをマーカーパネルとして同定する、ことを特徴とする方法。

10

【請求項36】

前記症状が、呼吸困難、発熱、胸の痛み、腹痛、代謝状態の障害、神経機能不全、高血圧、めまい感、および頭痛からなる群より選択される、請求項35記載の方法。

20

【請求項37】

被験者において収縮期心不全と拡張期心不全とを区別する方法であって、前記被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカーの存在または量について分析し、ここで前記マーカーは、収縮期心不全と拡張期心不全とを区別するよう選択されており；そして前記試験試料における前記マーカーの存在または量を前記被験者における収縮期心不全および拡張期心不全の存在と関連づけることを含む方法。

【請求項38】

前記方法が、B型ナトリウム利尿ペプチド、B型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、心房性ナトリウム利尿ペプチド、心房性ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、バソプレシン、エンドセリン-2、ウロジラチン、アドレノメジュリン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニン、ウロテンシン2、およびアンジオテンシン2からなる群より選択されるマーカーの存在または量についてアッセイすることを含む、請求項37記載の方法。

30

【請求項39】

前記方法が、B型ナトリウム利尿ペプチド、B型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、心房性ナトリウム利尿ペプチド、心房性ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、およびウロテンシン2からなる群より選択されるマーカーの存在または量についてアッセイすることを含む、請求項37記載の方法。

40

【請求項40】

診断方法を実施するための試験デバイスであって、前記方法は、被験者から得た試験試料を、被験者に由来する複数のマーカーの存在または量について分析することを含み、ここで、前記マーカーは、被験者における収縮期心不全と拡張期心不全とを区別するよう選択されていることを特徴とする試験デバイス。

【請求項41】

被験者において心房性細動とうっ血性心不全とを区別する方法であって、前記被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカーの存在または量について分析し、ここで、前記マーカーは、心房性細動とうっ血性心不全とを区別するよう選択されており；そして

50

前記試験試料中の前記マーカの存在または量を前記被験者における心房性細動およびうっ血性心不全の存在と関連づける，
ことを含む方法。

【請求項 4 2】

前記方法が，心房性ナトリウム利尿ペプチド，心房性ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカ， B 型ナトリウム利尿ペプチド，および B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカからなる群より選択されるマーカの存在または量についてアッセイすることを含む，請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 3】

診断方法を実施するための試験デバイスであって，前記方法は，被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカの存在または量について分析することを含み，ここで，前記マーカは，被験者における心房性細動とうっ血性心不全とを区別するように選択されていることを特徴とする試験デバイス。

10

【請求項 4 4】

被験者において心房性細動と筋梗塞とを区別する方法であって，
前記被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカの存在または量について分析し，ここで，前記マーカは，心房性細動と心筋梗塞とを区別するように選択されており；そして

前記試験試料中の前記マーカの存在または量を前記被験者における心房性細動および心筋梗塞の存在と関連づける

20

ことを含む方法。

【請求項 4 5】

前記方法が，心房性ナトリウム利尿ペプチド，心房性ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカ，遊離型心臓トロポニン I，遊離型心臓トロポニン T，トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I，トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T，総心臓トロポニン I，総心臓トロポニン T，およびミオグロビンからなる群より選択されるマーカの存在または量についてアッセイすることを含む，請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 6】

診断方法を実施するための試験デバイスであって，前記方法は，被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカの存在または量について分析することを含み，ここで，前記マーカは，被験者における心房性細動と心筋梗塞とを区別するように選択されていることを特徴とする試験デバイス。

30

【請求項 4 7】

被験者における動脈解離，心筋虚血，および心筋梗塞を区別する方法であって，
前記被験者から得た試験試料を被験者に由来する複数のマーカの存在または量について分析することを含み，ここで，前記マーカは，動脈解離，心筋虚血，および心筋梗塞を区別するように選択されており；そして

前記試験試料中の前記マーカの存在または量を前記被験者における動脈解離，心筋虚血，および心筋梗塞の存在と関連づける

40

ことを含む方法。

【請求項 4 8】

前記方法が， B 型ナトリウム利尿ペプチド， B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカ，遊離型心臓トロポニン I，遊離型心臓トロポニン T，トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I，トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T，総心臓トロポニン I，総心臓トロポニン T，平滑筋ミオシン重鎖，およびミオグロビンからなる群より選択されるマーカの存在または量についてアッセイすることを含む，請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

診断方法を実施するための試験デバイスであって，前記方法は，被験者から得た試験試料

50

を被験者に由来する複数のマーカーの存在または量について分析することを含み、ここで、前記マーカーは、被験者における動脈解離、心筋虚血、および心筋梗塞を区別するよう選択されていることを特徴とする試験デバイス。

【請求項 50】

被験者に由来する複数の心血管疾患を区別するよう選択された複数のマーカーについて被験者試料を分析する方法であって、

被験者に由来する血圧制御に関連する 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量、および被験者に由来する心筋の障害に関連する 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイし、そして

前記マーカーの存在または量に基づいて、前記被験者が前記複数の心血管疾患のそれぞれを発症しているかまたは発症しつつあるリスクを特徴づけ、ここで、前記マーカーの 1 またはそれ以上の量を予め決定された閾値量と比較しない、ことを特徴とする方法。 10

【請求項 51】

前記特徴づける工程が、前記マーカーのいずれかの量を予め決定された閾値量と比較せずに行われる、請求項 50 記載の方法。

【請求項 52】

前記被験者に由来する血圧制御に関連するマーカーが、A 型ナトリウム利尿ペプチド、B 型ナトリウム利尿ペプチド、C 型ナトリウム利尿因子、ウロテンシン II、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシン I、アンジオテンシン II、アンジオテンシン III、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメジュリン、カルシホシン、エンドセリン - 2、エンドセリン - 3、レニン、およびウロジラチン、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択され、および前記被験者に由来する心筋の障害に関連するマーカーが、遊離型心臓トロポニン I、遊離型心臓トロポニン T、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T、遊離型および複合体型心臓トロポニン I、遊離型および複合体型心臓トロポニン T、アネキシン V、 β -エノラーゼ、クレアチンキナーゼ - MB、グリコゲンホスホリラーゼ - BB、心臓型脂肪酸結合蛋白質、ホスホグリセリン酸ムターゼ - MB、および S - 100 a o、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、請求項 50 記載の方法。 20 30

【請求項 53】

前記方法が、B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、クレアチンキナーゼ - MB、および総心臓トロポニン I または総心臓トロポニン T の存在または量について前記試料をアッセイすることを含む、請求項 52 記載の方法。

【請求項 54】

前記方法が、被験者に由来する炎症に関連する 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることをさらに含む、請求項 50 記載の方法。

【請求項 55】

被験者に由来する炎症に関連する前記 1 またはそれ以上のマーカーが、急性期反応物質、細胞接着分子、例えば血管細胞接着分子 ("VCAM")、細胞間接着分子 - 1 ("ICAM - 1")、細胞間接着分子 - 2 ("ICAM - 2")、および細胞間接着分子 - 3 ("ICAM - 3")、ミエロペルオキシダーゼ (MPO)、C 反応性蛋白質、インターロイキン、例えば IL - 1 β 、IL - 6、および IL - 8、インターロイキン - 1 レセプターアゴニスト、単球遊走促進因子 - 1、リポカリン型プロスタグランジン D シンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β 、Fas リガンド、可溶性 Fas (Apo - 1)、TRAIL、TWEAK、フィブロネクチン、マクロファージ移動阻害因子 (MIF)、および血管内皮成長因子 ("VEGF")、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、請求 40 50

項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

前記方法が、被験者に由来する 1 またはそれ以上の組織障害の非特異的マーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることをさらに含む、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 7】

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の組織障害の非特異的マーカーが、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ミオグロビン、アクチン、ミオシン、および乳酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択される、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

前記方法が、クレアチンキナーゼ - MB、総心臓トロポニン I、ミオグロビン、および B 型ナトリウム利尿ペプチド、またはこれらに関連するマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることを含み、ここで、D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼの存在または量が、前記方法における前記マーカーに任意に加えられるかまたはその 1 つの代わりに用いられる、請求項 5 0 記載の方法。

10

【請求項 5 9】

前記方法が、総心臓トロポニン I、C 反応性蛋白質、および B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、またはこれらに関連するマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることを含み、ここで、D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼの存在または量が、前記方法における前記マーカーに任意に加えられるかまたはその 1 つの代わりに用いられる、請求項 5 0 記載の方法。

20

【請求項 6 0】

前記方法が、クレアチンキナーゼ - MB、総心臓トロポニン I、ミオグロビン、C 反応性蛋白質、および B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、またはこれらに関連するマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることを含み、ここで、D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼの存在または量が、前記方法における前記マーカーに任意に加えられるかまたはその 1 つの代わりに用いられる、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 6 1】

前記方法が、ミオグロビン、C 反応性蛋白質、および B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、またはこれらに関連するマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることを含み、ここで、D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼの存在または量が、前記方法における前記マーカーに任意に加えられるかまたはその 1 つの代わりに用いられる、請求項 5 0 記載の方法。

30

【請求項 6 2】

前記方法が、クレアチンキナーゼ - MB、総心臓トロポニン I、およびミオグロビン；クレアチンキナーゼ - MB、総心臓トロポニン I、C 反応性蛋白質およびミオグロビン、またはこれらに関連するマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることを含み、ここで、D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼの存在または量が、前記方法における前記マーカーに任意に加えられるかまたはその 1 つの代わりに用いられる、請求項 5 0 記載の方法。

40

【請求項 6 3】

前記方法が、B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、クレアチンキナーゼ - MB、総心臓トロポニン I、ミオグロビン、および C 反応性蛋白質、またはこれらに関連するマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることを含み、ここで、D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼの存在または量が、前記方法における前記マーカーに任意に加えられるかまたはその 1 つの代わりに用いられる、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 6 4】

前記方法が、被験者に由来する凝固および / または血液に関連する 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることをさらに含む、請求項 5 0 記載の方

50

法。

【請求項 6 5】

被験者に由来する凝固およびうっ血に関与する前記マーカーが、プラスミン、フィブリノーゲン、D-ダイマー、 β -トロポグロブリン、血小板因子4、フィブリノペプチドA、血小板由来成長因子、プロトロンビンフラグメント1+2、プラスミン- α 2-アンチプラスミン複合体、トロポビン-アンチトロポビンIII複合体、P-セレクチン、トロポビン、フォン・ビルブランド因子、組織因子、および血栓前駆体蛋白質からなる群より選択される、請求項64記載の方法。

【請求項 6 6】

前記複数の心血管疾患が、心筋梗塞、うっ血性心不全、急性心血管症候群、不安定性アンギナ、および肺塞栓症からなる群より選択される、請求項50記載の方法。

10

【請求項 6 7】

請求項50記載の方法を実施するための試験デバイスであって、被験者に由来する前記複数のマーカーと対応する複数の別々のアドレス可能な位置を含む試験表面を含み、前記位置のそれぞれは被験者に由来する前記複数のマーカーの1つを検出するために結合するよう選択され前記位置に固定化された抗体を含むことを特徴とするデバイス。

【請求項 6 8】

被験者試料を、複数の脳血管疾患を区別するよう選択された被験者に由来する複数のマーカーについて分析する方法であって、
被験者に由来する血圧制御に関連する1またはそれ以上のマーカーの存在または量、および被験者に由来する神経組織の障害に関連する1またはそれ以上のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイし、そして
前記マーカーの存在または量に基づいて前記被験者が前記複数の脳血管疾患のそれぞれを発症したかまたは発症しつつあるリスクを特徴づける
ことを含み、前記マーカーの1またはそれ以上の量を予め決定された閾値量と比較しないことを特徴とする方法。

20

【請求項 6 9】

前記特徴づける工程が、前記マーカーの量を予め決定された閾値量と比較せずに行われる、請求項68記載の方法。

30

【請求項 7 0】

前記被験者に由来する血圧制御に関連するマーカーが、A型ナトリウム利尿ペプチド、B型ナトリウム利尿ペプチド、C型ナトリウム利尿因子、ウロテンシンII、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIII、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメジュリン、カルシホシン、エンドセリン-2、エンドセリン-3、レニン、およびウロジラチン、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択され、および前記被験者に由来する心筋の障害に関連するマーカーが、遊離型心臓トロポニンI、遊離型心臓トロポニンT、トロポニンIおよびトロポニンCの一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニンI、トロポニンIおよびトロポニンCの一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニンT、遊離型および複合体型心臓トロポニンI、遊離型および複合体型心臓トロポニンT、アネキシンV、 β -エノラーゼ、クレアチンキナーゼ-MB、グリコゲンホスホリラーゼ-BB、心臓型脂肪酸結合蛋白質、ホスホグリセリン酸ムターゼ-MB、およびS-100a0、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択され、および前記被験者に由来する神経組織の障害に関連するマーカーが、プレセレリン1、セレベリン1、セレベリン3、キメリン1、キメリン2、カルプレイン、カルビンジンD、脳チューブリン、脳脂肪酸結合蛋白質(“B-FABP”)、脳由来神経栄養因子(“BDNF”)、カルボニックアンヒドラーゼXI、CACNA1Aカルシウムチャネル遺伝子、神経成長因子 β 、アトロフィン1、アポリポ蛋白質E4-1、蛋白質4.1B、14-3-3蛋白質、毛様体神経栄養因子、クレアチンキナーゼ-BB、C-ta

40

50

u , グリア細胞繊維性酸性蛋白質 (“ G F A P ”) , 神経細胞接着分子 (“ N C A M ”) , ニューロン特異的エノラーゼ , S - 1 0 0 b , プロスタグランジン D シンターゼ , ニューロキニン A , ニューロテンシン , およびセクレタゴギン , またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される , 請求項 6 8 記載の方法。

【請求項 7 1】

前記方法が , 被験者に由来する炎症に関連する 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることをさらに含む , 請求項 6 8 記載の方法。

【請求項 7 2】

前記方法が , 被験者に由来する凝固およびうっ血に関連する 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることをさらに含む , 請求項 6 8 記載の方法。

10

【請求項 7 3】

前記方法が , 被験者に由来するアポトーシスに関連する 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイすることをさらに含む , 請求項 6 8 記載の方法。

【請求項 7 4】

前記特徴づける工程が , 前記被験者に由来するマーカーの量を予め決定された閾値量と比較せずに行われる , 請求項 6 8 記載の方法。

【請求項 7 5】

前記複数の脳血管疾患が , 虚血性発作 , 出血性発作 , 一過性虚血性発作 , およびクモ膜下出血からなる群より選択される , 請求項 6 8 記載の方法。

20

【請求項 7 6】

請求項 6 8 記載の方法を実施するための試験デバイスであって , 被験者に由来する前記複数のマーカーに対応した複数の別々のアドレス可能な位置を含む試験表面を含み , 前記位置のそれぞれは , 被験者に由来する前記複数のマーカーの 1 つを検出するために結合するよう選択された , 前記位置に固定化された抗体を含むことを特徴とする試験デバイス。

【請求項 7 7】

心筋梗塞に罹患している被験者を識別するよう選択された被験者に由来する複数のマーカーについて被験者試料を分析する方法であって ,

B 型ナトリウム利尿ペプチド , 遊離型心臓トロポニン I , 遊離型心臓トロポニン T , トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I , トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T , 遊離型および複合体型心臓トロポニン I , 遊離型および複合体型心臓トロポニン T , 総心臓トロポニン I , 総心臓トロポニン T , クレアチンキナーゼ - M B , ミオグロビン , カスパーズ - 3 , シトクロム c , グリコゲンホスホリラーゼ - M B , アネキシン B , β - エノラーゼ , 心臓型脂肪酸結合蛋白質 , C 反応性蛋白質 , および S - 1 0 0 β , またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される , 被験者に由来する心筋の障害に関連する複数のマーカーの存在または量について前記試料をアッセイし , そして

30

前記マーカーの存在または量に基づいて , 前記被験者が心筋梗塞に罹患するリスクを特徴づけることを含む ,

ここで , 前記マーカーのそれぞれの量を予め決定された閾値量と比較しない , ことを特徴とする方法。

40

【請求項 7 8】

被験者において発作を診断する方法であって ,

前記被験者から得た試料中の被験者に由来する複数のマーカーの存在または量を測定し , ここで , 前記複数のマーカーは , 神経組織の障害の特異的マーカー , 血圧制御に関連するマーカー , 凝固およびうっ血に関連するマーカー , および炎症に関連するマーカー , およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群の 2 またはそれ以上のメンバーより独立して選択され ; そして

前記複数のマーカーの存在または量を前記被験者における発作の発生と関連づける , ことを特徴とする方法。

50

【請求項 79】

前記複数のマーカーが、アデニレートキナーゼ、脳由来神経栄養因子、カルビンジン - D、クレアチンキナーゼ - BB、グリア細胞繊維性酸性蛋白質、乳酸デヒドロゲナーゼ、ミエリン塩基性蛋白質、神経細胞接着分子 (NCAM)、c - tau、神経ペプチド Y、ニューロン特異的エノラーゼ、ニューロトロフィン - 3、プロテオリピド蛋白質、S - 100β、トロポモジュリン、蛋白質キナーゼ Cγ、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、pro - ANP、B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、NT - proBNP、pro - BNP C 型ナトリウム利尿ペプチド、ウロテンシン II、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシン I、アンジオテンシン II、アンジオテンシン III、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメジュリン、カルシホシン、エンドセリン - 2、エンドセリン - 3、レニン、ウロジラチン、急性期反応物質、細胞接着分子、C 反応性蛋白質、インターロイキン、インターロイキン - 1 レセプターアゴニスト、単球遊走促進蛋白質 - 1、カスパーズ - 3、リボカリン型プロスタグランジン D シンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子 α、腫瘍壊死因子 β、Fas リガンド、可溶性 Fas (Apo - 1)、TRAIL、TWEAK、フィブロネクチン、マクロファージ移動阻害因子 (MIF)、血管内皮成長因子 (VEGF)、カスパーズ - 3、カテプシン D、α - スペクトリン、プラスミン、フィブリノーゲン、D - ダイマー、β - トロポグロブリン、血小板因子 4、フィブリノペプチド A、血小板由来成長因子、プロトロンビンフラグメント 1 + 2、プラスミン - α2 - アンチプラスミン複合体、トロンビン - アンチトロンビン III 複合体、P - セレクチン、トロンビン、フォン・ビルブラント因子、組織因子、および血栓前駆体蛋白質、またはこれらに関連するマーカーからなる群より独立して選択される、請求項 78 記載の方法。

【請求項 80】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、アデニレートキナーゼ、脳由来神経栄養因子、c - tau、カルビンジン - D、クレアチンキナーゼ - BB、グリア細胞繊維性酸性蛋白質、乳酸デヒドロゲナーゼ、ミエリン塩基性蛋白質、神経細胞接着分子 (NCAM)、ニューロン特異的エノラーゼ、ニューロトロフィン - 3、プロテオリピド蛋白質、S - 100β、トロポモジュリン、および蛋白質キナーゼ Cγ、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される少なくとも 1 つの神経組織の障害の特異的マーカーを含む、請求項 78 記載の方法。

【請求項 81】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、NCAM、クレアチンキナーゼ - BB、c - tau、および S - 100β、またはこれらに関連するマーカーの少なくとも 1 つを含む、請求項 80 記載の方法。

【請求項 82】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、NCAM、クレアチンキナーゼ - BB、c - tau、および S - 100β、またはこれらに関連するマーカーの少なくとも 2 つを含む、請求項 80 記載の方法。

【請求項 83】

被験者に由来する前記複数のマーカーがアポトーシスに関連する少なくとも 1 つのマーカーを含む、請求項 78 記載の方法。

【請求項 84】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、カスパーズ - 3、カテプシン D、および α - スペクトリン、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択されるアポトーシスに関連する少なくとも 1 つのマーカーを含む、請求項 83 記載の方法。

【請求項 85】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、炎症に関連する少なくとも 1 つのマーカーを含む、請求項 78 記載の方法。

【請求項 86】

10

20

30

40

50

被験者に由来する前記複数のマーカーが、急性期反応物質、細胞接着分子、C反応性蛋白質、インターロイキン、インターロイキン-1レセプターアゴニスト、単球遊走促進蛋白質-1、カスパー-3、リポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β 、Fasリガンド、可溶性Fas(Apo-1)、TRAIL、TWEAK、フィブロネクチン、マクロファージ移動阻害因子(MIF)、および血管内皮成長因子(VEGF)、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、炎症に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項85記載の方法。

【請求項87】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、マトリクスメタロプロテアーゼ-9、VEGF、C反応性蛋白質、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、炎症に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項85記載の方法。

【請求項88】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、血圧制御に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項78記載の方法。

【請求項89】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、pro-ANP、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、NT-proBNP、pro-BNP、C型ナトリウム利尿ペプチド、ウロテンシンII、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIII、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメジュリン、カルシホシン、エンドセリン-2、エンドセリン-3、レニン、およびウロジラチン、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、血圧制御に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項88記載の方法。

【請求項90】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、BNPまたはこれに関連するマーカーを含む、請求項89記載の方法。

【請求項91】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、少なくとも1つの神経組織の障害の特異的マーカー、炎症に関連する少なくとも1つのマーカー、およびアポトーシスに関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項78記載の方法。

【請求項92】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、血圧制御に関連する少なくとも1つのマーカーおよび/または凝固およびうっ血に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項91記載の方法。

【請求項93】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、IL-1ra、C反応性蛋白質、フォン・ビルブラント因子(vWF)、クレアチンキナーゼ-BB、c-Tau、D-ダイマー、血管内皮成長因子(VEGF)、マトリクスメタロプロテアーゼ-9(MMP-9)、神経細胞接着分子(NCAM)、BNP、S100 β 、シトクロムc、およびカスパー-3からなる群より選択される少なくとも4つのマーカーを含む、請求項78記載の方法。

【請求項94】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、BNP、クレアチンキナーゼ-BB、c-tau、D-ダイマー、C反応性蛋白質、S100 β 、NCAM、およびカスパー-3を含み、被験者に由来する前記複数のマーカーの1-3種類は任意に、IL-1ra、MMP-9、シトクロムc、およびVEGFからなる群より選択される同じ数のマーカーで置き換えられていてもよい、請求項78記載の方法。

【請求項95】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、クレアチンキナーゼ-BB、D-ダイマー、C反応性蛋白質、およびS100 β を含む、請求項78記載の方法。

【請求項 9 6】

アッセイ方法がイムノアッセイ方法である，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 9 7】

関連づける工程が，被験者に由来する前記複数のマーカーのそれぞれの濃度を測定し，そして各マーカー濃度を独立して閾値レベルと比較することを含む，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 9 8】

関連づける工程が，被験者に由来する前記複数のマーカーのそれぞれの濃度を測定し，被験者に由来する前記複数のマーカーのそれぞれの濃度に基づいて単一の指標値を計算し，そして指標値を閾値レベルと比較することを含む，請求項 7 8 記載の方法。

10

【請求項 9 9】

方法が，前記被験者に由来するマーカーの少なくとも 1 つの経時的変化を測定することを含み，前記経時的変化を前記関連づける工程において用いる，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記方法が，正常な被験者と比較したときに，少なくとも 7 0 % の感度で，少なくとも 8 5 % の特異度で発作を区別する，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記方法が，正常な被験者と比較したときに，少なくとも 8 0 % の感度で，少なくとも 9 0 % の特異度で発作を区別する，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記方法が，正常な被験者と比較したときに，少なくとも 9 0 % の感度で，少なくとも 9 0 % の特異度で発作を区別する，請求項 7 8 記載の方法。

20

【請求項 1 0 3】

前記方法が，発作症状を模倣する症状を示す被験者と比較したときに，少なくとも 7 0 % の感度で，少なくとも 8 5 % の特異度で発作を区別する，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 0 4】

請求項 7 8 記載の方法を実施するためのデバイスであって，複数の別々の位置を含み，各々は被験者に由来する前記複数のマーカーの 1 つを検出するために固定化されているような形状および配置とされていることを特徴とするデバイス。

【請求項 1 0 5】

クモ膜下出血に罹患した被験者において将来の脳血管痙攣のリスクを特徴づける方法であって，

30

前記被験者から得た試料中の被験者に由来する複数のマーカーの存在または量を測定し，ここで，前記複数のマーカーは，神経組織の障害の特異的マーカー，血圧制御に関連するマーカー，炎症に関連するマーカー，およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択され；そして

前記複数のマーカーの存在または量を前記被験者における将来の脳血管痙攣のリスクと関連づける，

ことを含む方法。

【請求項 1 0 6】

40

前記複数のマーカーが，アデニレートキナーゼ，脳由来神経栄養因子，カルビンジン - D，クレアチンキナーゼ - B B，グリア細胞繊維性酸性蛋白質，乳酸デヒドロゲナーゼ，ミエリン塩基性蛋白質，神経細胞接着分子（N C A M），c - t a u，神経ペプチド Y，ニューロン特異的エノラーゼ，ニューロトロフィン - 3，プロテオリピド蛋白質，S - 1 0 0 β，トロンプモジュリン，蛋白質キナーゼ C γ，心房性ナトリウム利尿ペプチド（A N P），p r o - A N P，B 型ナトリウム利尿ペプチド（B N P），N T - p r o B N P，p r o - B N P C 型ナトリウム利尿ペプチド，ウロテンシン I I，アルギニンバソプレシン，アルドステロン，アンジオテンシン I，アンジオテンシン I I，アンジオテンシン I I I，ブラジキニン，カルシトニン，プロカルシトニン，カルシトニン遺伝子関連ペプチド，アドレノメジュリン，カルシホシン，エンドセリン - 2，エンドセリン - 3，レニン

50

、ウロジラチン、急性期反応物質、細胞接着分子、C反応性蛋白質、インターロイキン、インターロイキン-1レセプターアゴニスト、単球遊走促進蛋白質-1、カスパー-3、シトクロムc、リポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β 、Fasリガンド、可溶性Fas(Apo-1)、TRAAIL、TWEAK、フィブロンネクチン、マクロファージ移動阻害因子(MIF)、血管内皮成長因子(VEGF)、カスパー-3、カテプシンD、および α -スベクトリン、またはこれらに関連するマーカーからなる群より独立して選択される、請求項105記載の方法。

【請求項107】

被験者に由来する前記複数のマーカーが少なくとも1つの神経組織の障害の特異的マーカーを含む、請求項105記載の方法。

10

【請求項108】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、アデニレートキナーゼ、脳由来神経栄養因子、カルビンジン-D、クレアチンキナーゼ-BB、グリア細胞繊維性酸性蛋白質、乳酸デヒドロゲナーゼ、ミエリン塩基性蛋白質、神経細胞接着分子(NCAM)、ニューロン特異的エノラーゼ、ニューロトロフィン-3、プロテオリピド蛋白質、S-100 β 、トロノボモジュリン、および蛋白質キナーゼC γ 、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される少なくとも1つの神経組織の障害の特異的マーカーを含む、請求項3記載の方法。

【請求項109】

20

被験者に由来する前記複数のマーカーが、アポトーシスに関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項105記載の方法。

【請求項110】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、カスパー-3、シトクロムc、カテプシンD、および α -スベクトリン、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、アポトーシスに関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項109記載の方法。

【請求項111】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、カスパー-3またはこれに関連するマーカーを含む、請求項109記載の方法。

【請求項112】

30

被験者に由来する前記複数のマーカーが、炎症に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項105記載の方法。

【請求項113】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、急性期反応物質、細胞接着分子、C反応性蛋白質、インターロイキン、インターロイキン-1レセプターアゴニスト、単球遊走促進蛋白質-1、カスパー-3、リポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β 、Fasリガンド、可溶性Fas(Apo-1)、TRAAIL、TWEAK、フィブロンネクチン、マクロファージ移動阻害因子(MIF)、および血管内皮成長因子(VEGF)、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、炎症に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項112記載の方法。

40

【請求項114】

被験者に由来する前記複数のマーカーが血圧制御に関連する少なくとも1つのマーカーを含む、請求項105記載の方法。

【請求項115】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、pro-ANP、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、NT-proBNP、pro-BNP C型ナトリウム利尿ペプチド、ウロテンシンII、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIII、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アド

50

レノメジュリン，カルシホシン，エンドセリン - 2，エンドセリン - 3，レニン，およびウロジラチン，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される，血圧制御に関連する少なくとも1つのマーカーを含む，請求項114記載の方法。

【請求項116】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，BNP，NT-proBNP，pro-BNPまたはこれらに関連するマーカーを含む，請求項115記載の方法。

【請求項117】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，少なくとも1つの神経組織の障害の特異的マーカー，炎症に関連する少なくとも1つのマーカー，およびアポトーシスに関連する少なくとも1つのマーカーを含む，請求項105記載の方法。

10

【請求項118】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，IL-1ra，C反応性蛋白質，フォン・ビルブランド因子（vWF），血管内皮成長因子（VEGF），マトリクスメタロプロテアーゼ-9（MMP-9），神経細胞接着分子（NCAM），BNP，およびカスパーズ-3からなる群より選択される1またはそれ以上のマーカーを含む，請求項105記載の方法。

【請求項119】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，VEGF，NCAM，およびカスパーズ-3を含む，請求項118記載の方法。

【請求項120】

アッセイ方法がイムノアッセイ方法である，請求項105記載の方法。

20

【請求項121】

関連づける工程が，被験者に由来する前記複数のマーカーのそれぞれの濃度を測定し，そして各マーカー濃度を閾値レベルと個々に比較することを含む，請求項105記載の方法。

【請求項122】

関連づける工程が，被験者に由来する前記複数のマーカーのそれぞれの濃度を測定し，被験者に由来する前記複数のマーカーのそれぞれの濃度に基づいて単一の指標値を計算し，そして指標値を閾値レベルと比較することを含む，請求項105記載の方法。

【請求項123】

前記被験者に由来するマーカーの少なくとも1つの経時的変化を測定することを含み，前記経時的変化を前記関連づける工程において用いる，請求項105記載の方法。

30

【請求項124】

前記方法がさらに，発作を脳腫瘍，動脈瘤，感電，火傷，感染，脳低酸素症，頭部創傷，ストレス，脱水，神経麻痺，低血糖症，片頭痛，多発性硬化症，末梢血管疾病，末梢ニューロパシー，てんかん，硬膜下血腫，失神，および一過性片側虚弱からなる群より選択される1またはそれ以上の発作模倣状態と区別する，請求項78記載の方法。

【請求項125】

前記方法がさらに，血栓性発作，塞栓性発作，ラクナ型発作，低灌流，大脳内出血，クモ膜下出血，虚血性発作，出血性発作，一過性虚血性発作，急性発作，および非急性発作からなる群より選択される型の発作を区別する，請求項78記載の方法。

40

【請求項126】

前記1またはそれ以上のマーカーが，前記被験者における発作の開始の時間を選択的に識別するよう選択される，請求項78記載の方法。

【請求項127】

前記1またはそれ以上のマーカーが，前記発作の開始が12時間以内であるか否かを判定するよう選択される，請求項126記載の方法。

【請求項128】

前記1またはそれ以上のマーカーが，前記発作の開始が6時間以内であるか否かを判定するよう選択される，請求項126記載の方法。

50

【請求項 1 2 9】

前記 1 またはそれ以上のマーカーが，前記発作の開始が 3 時間以内であるか否かを判定するよう選択される，請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記 1 またはそれ以上のマーカーが，前記発作の開始が 1 2 - 4 8 時間のウィンドウ内であるか否かを判定するよう選択される，請求項 1 2 6 記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記 1 またはそれ以上のマーカーが，急性発作を非急性発作から区別するよう選択される，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 3 2】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，マトリクスメタロプロテイナーゼ - 9，1 またはそれ以上の型のフォン・ビルブランド因子，血管細胞接着分子，C 反応性蛋白質および S - 1 0 0 β ，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される複数のマーカーを含む，請求項 7 8 記載の方法。

10

【請求項 1 3 3】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，B 型ナトリウム利尿ペプチド，グリア細胞繊維性酸性蛋白質，インターロイキン - 8， β - 神経成長因子，フォン・ビルブランド因子 - A 1，および C 反応性蛋白質，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される複数のマーカーを含む，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 3 4】

少なくとも 1 つのマーカーが B N P またはこれに関連するマーカーである，請求項 7 8 記載の方法。

20

【請求項 1 3 5】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，B 型ナトリウム利尿ペプチド，グリア細胞繊維性酸性蛋白質，インターロイキン - 8，クレアチンキナーゼ - B B，単球遊走促進蛋白質 - 1，およびインターロイキン - 1 レセプターアンタゴニスト，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される複数のマーカーを含む，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 3 6】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，B 型ナトリウム利尿ペプチド，グリア細胞繊維性酸性蛋白質，C 反応性蛋白質，クレアチンキナーゼ - B B，マトリクスメタロプロテイナーゼ - 9，インターロイキン - 8，および β - 神経成長因子，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される複数のマーカーを含む，請求項 7 8 記載の方法。

30

【請求項 1 3 7】

被験者に由来する前記複数のマーカーが，B 型ナトリウム利尿ペプチド，グリア細胞繊維性酸性蛋白質，C 反応性蛋白質，クレアチンキナーゼ - B B，カススペース - 3，単球遊走促進蛋白質 - 1，およびフォン・ビルブランド因子 - インテグリン，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される複数のマーカーを含む，請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 1 3 8】

発作の診断と関連する 1 またはそれ以上の症状を示す被験者において発作の発症または非発症を選択的に識別するよう選択された複数のマーカーを含むパネルであって，前記マーカーは，前記被験者における発作の発症を 1 またはそれ以上の発作模倣状態から区別するよう選択されることを特徴とするパネル。

40

【請求項 1 3 9】

前記マーカーが，発作の発症または非発症を少なくとも 8 0 % の特異度および少なくとも 8 0 % の感度で識別するよう選択される，請求項 1 3 8 記載のパネル。

【請求項 1 4 0】

前記マーカーが，発作の発症または非発症を少なくとも 9 0 % の特異度および少なくとも 9 0 % の感度で識別するよう選択される，請求項 1 3 8 記載のパネル。

【請求項 1 4 1】

発作の診断に関連する 1 またはそれ以上の症状を示す被験者における発作の発症または非

50

発症を選択的に識別するよう選択された複数のマーカーの1つに対するレセプターを複数の別々のアドレス可能な位置に含むデバイスであって、前記マーカーは、前記被験者における発作の発症を1またはそれ以上の発作模倣状態から区別するよう選択されることを特徴とするデバイス。

【請求項142】

血管疾病に罹患した被験者について1またはそれ以上の将来の臨床的帰結のリスクを予測する方法であって、
前記被験者からの試料中の血栓前駆体蛋白質の存在または量を測定し；そして
血栓前駆体蛋白質の存在または量を被験者についての1またはそれ以上の臨床的帰結の前記リスクと関連づける
ことを含む方法。

10

【請求項143】

前記血管疾病が、急性心血管症候群、アテローム性動脈硬化症、虚血性発作、脳内出血、クモ膜下出血、一過性虚血性発作、収縮期機能不全、拡張期機能不全、動脈瘤、動脈解離、心筋虚血、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、拡張型うっ血性心筋症、肥大性心筋症、拘束型心筋症、肺性心、不整脈、心臓弁疾病、心内膜炎、肺塞栓症、静脈血栓症、および末梢血管疾病からなる群より選択される、請求項142記載の方法。

【請求項144】

前記血管疾病が急性心血管症候群である、請求項143記載の方法。

【請求項145】

前記1またはそれ以上の追加の臨床的帰結が、死亡、非致命性心筋梗塞、再入院を必要とする再発虚血、緊急血管再生を必要とする再発虚血、およびうっ血性心不全からなる群より選択される、請求項144記載の方法。

20

【請求項146】

関連づける工程が、前記試料中の血栓前駆体蛋白質の濃度を測定し、そして前記濃度を閾値濃度と比較することを含み、ここで、血栓前駆体蛋白質の濃度が前記閾値濃度より低いことは前記1またはそれ以上の臨床的帰結の第1のリスクを示し、かつ、血栓前駆体蛋白質の濃度が前記閾値濃度より高いことは1またはそれ以上の臨床的帰結の第2のリスクを示す、請求項145記載の方法。

【請求項147】

前記閾値濃度が、少なくとも約0.6のROC曲線下面積を与える、請求項146記載の方法。

30

【請求項148】

前記閾値濃度が、約4またはそれ以上または約0.25またはそれ以下のオッズ比を与える、請求項146記載の方法。

【請求項149】

前記閾値濃度が、約1.25またはそれ以上または約0.8またはそれ以下のハザード比を与える、請求項146記載の方法。

【請求項150】

前記閾値濃度が、急性心血管症候群に罹患した被験者からの試料中で測定された血栓前駆体蛋白質濃度中央値である、請求項146記載の方法。

40

【請求項151】

前記血栓前駆体蛋白質濃度中央値が約8.9 $\mu\text{g/mL}$ である、請求項150記載の方法。

【請求項152】

前記試料中の被験者に由来する1またはそれ以上の他のマーカーの存在または量を決定することをさらに含み、および前記関連づける工程が、血栓前駆体蛋白質および被験者に由来する前記1またはそれ以上の他のマーカーの存在または量を被験者についての1またはそれ以上の臨床的帰結の前記リスクと関連づけることを含む、請求項142記載の方法。

【請求項153】

50

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーが、心筋の障害の特異的マーカー、神経組織の障害の特異的マーカー、血圧制御に関連するマーカー、凝固およびうっ血に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される、請求項 1 5 2 記載の方法。

【請求項 1 5 4】

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーが、1 またはそれ以上の心筋の障害の特異的マーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 5 5】

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーが、1 またはそれ以上の神経組織の障害の特異的マーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

10

【請求項 1 5 6】

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーが、血圧制御に関連する 1 またはそれ以上のマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 5 7】

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーが、凝固およびうっ血に関連する 1 またはそれ以上のマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 5 8】

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーが、アポトーシスに関連する 1 またはそれ以上のマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 5 9】

20

被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーが、アネキシン V、B 型ナトリウム利尿ペプチド、 β -エノラーゼ、遊離型心臓トロポニン I、複合体型心臓トロポニン I、遊離型および複合体型心臓トロポニン I、遊離型心臓トロポニン T、複合体型心臓トロポニン T、遊離型および複合体型心臓トロポニン T、クレアチンキナーゼ-MB、グリコゲンホスホリラーゼ-BB、心臓型脂肪酸結合蛋白質、ホスホグリセリン酸ムターゼ-MB、S-100a0、アデニレートキナーゼ、脳由来神経栄養因子、カルビンジン-D、クレアチンキナーゼ-BB、グリア細胞繊維性酸性蛋白質、乳酸デヒドロゲナーゼ、ミエリン塩基性蛋白質、神経細胞接着分子(NCAM)、c-tau、神経ペプチド Y、ニューロン特異的エノラーゼ、ニューロトロフィン-3、プロテオリピド蛋白質、S-100 β 、トロポモジュリン、蛋白質キナーゼ C γ 、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、pro-ANP、B 型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、NT-proBNP、pro-BNP C 型ナトリウム利尿ペプチド、ウロテンシン II、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシン I、アンジオテンシン II、アンジオテンシン III、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメジュリン、カルシホシン、エンドセリン-2、エンドセリン-3、レニン、ウロジラチン、急性期反応物質、細胞接着分子、C 反応性蛋白質、インターロイキン、インターロイキン-1 レセプターアゴニスト、単球遊走促進因子-1、カスベース-3、リボカリン型プロスタグランジン D シンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β 、Fas リガンド、可溶性 Fas (Apo-1)、TRAIL、TWEAK、フィブロネクチン、マクロファージ移動阻害因子(MIF)、血管内皮成長因子(VEGF)、ミエロペルオキシダーゼ、カスベース-3、カテプシン D、 α -スペクトリン、プラスミン、フィブリノーゲン、D-ダイマー、 β -トロポグロブリン、血小板因子 4、フィブリノペプチド A、血小板由来成長因子、プロトロンビンフラグメント 1+2、プラスミン- α 2-アンチプラスミン複合体、トロンビン-アンチトロンビン III 複合体、P-セレクチン、トロンビン、フォン・ビルブランド因子、および組織因子、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される、請求項 1 5 3 記載の方法。

30

40

【請求項 1 6 0】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、BNP またはこれに関連するマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

50

【請求項 1 6 1】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、遊離型心臓トロポニン I、複合体型心臓トロポニン I、遊離型および複合体型心臓トロポニン I、遊離型心臓トロポニン T、複合体型心臓トロポニン T、遊離型および複合体型心臓トロポニン T、またはこれらに関連するマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 6 2】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、C 反応性蛋白質またはこれに関連するマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 6 3】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、カスベース - 3 またはこれに関連するマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

10

【請求項 1 6 4】

被験者に由来する前記複数のマーカーが、ミエロペルオキシダーゼまたはこれに関連するマーカーを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 6 5】

試料がヒトに由来する、請求項 1 4 2 記載の方法。

【請求項 1 6 6】

試料が、血液、血清、および血漿からなる群より選択される、請求項 1 4 2 記載の方法。

【請求項 1 6 7】

アッセイ方法がイムノアッセイ方法である、請求項 1 4 2 記載の方法。

20

【請求項 1 6 8】

関連づける工程が、血栓前駆体蛋白質および被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーの濃度を測定し、そして各濃度を対応する閾値レベルと別々に比較することを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 6 9】

関連づける工程が、血栓前駆体蛋白質および被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーの濃度を測定し、各濃度に基づいて単一の指標値を計算し、そして指標値を閾値レベルと比較することを含む、請求項 1 5 3 記載の方法。

【請求項 1 7 0】

血栓前駆体蛋白質濃度の経時的変化を測定することを含み、かつ、前記経時的変化を前記関連づける工程において用いる、請求項 1 4 2 記載の方法。

30

【請求項 1 7 1】

請求項 5 3 に記載の方法を実施するための装置であって、複数の別々の位置を含み、別々の位置のそれぞれは、血栓前駆体蛋白質または被験者に由来する前記 1 またはそれ以上の他のマーカーの 1 つを検出するために固定化するような形状および配置とされていることを特徴とする装置。

【請求項 1 7 2】

被験者においてアテローム性動脈硬化症を診断する方法であって、前記被験者からの試料中の単球遊走促進因子 - 1 またはこれに関連するマーカーの存在または量を測定し；そして

40

単球遊走促進因子 - 1 の存在または量を被験者におけるアテローム性動脈硬化症の存在または不存在と関連づける、
ことを含む方法。

【請求項 1 7 3】

関連づける工程が、前記試料中の単球遊走促進因子 - 1 またはこれに関連するマーカーの濃度を決定すること、および前記濃度を閾値濃度と比較することを含み、ここで、単球遊走促進因子 - 1 またはこれに関連するマーカーの濃度が前記閾値濃度より低いことは、アテローム性動脈硬化症の第 1 のリスクを示し、単球遊走促進因子 - 1 またはこれに関連するマーカーの濃度が前記閾値濃度より高いことは、アテローム性動脈硬化症の第 2 のリスクを示す、請求項 1 7 2 記載の方法。

50

【請求項 174】

前記関連づける工程が、前記被験者の性別、年齢、糖尿病の診断、高血圧の診断、喫煙歴、コレステロール濃度、およびアテローム性動脈硬化症の家族歴からなる群より選択される1またはそれ以上のリスク因子の存在または量を判定することをさらに含み、ここで、前記リスク因子の1またはそれ以上の存在または不存在および単球遊走促進因子-1またはこれに関連するマーカーの存在または量は、被験者におけるアテローム性動脈硬化症の存在または不存在と相関している、請求項172記載の方法。

【請求項 175】

前記閾値濃度が約1.3またはそれ以上または約0.77またはそれ以下のオッズ比を与える、請求項173記載の方法。

10

【請求項 176】

前記閾値濃度が、約2またはそれ以上または約0.5またはそれ以下のオッズ比を与えるように選択される、請求項173記載の方法。

【請求項 177】

前記血栓前駆体蛋白質濃度中央値が約120 pg/mLより高い、請求項173記載の方法。

【請求項 178】

前記血栓前駆体蛋白質濃度中央値が約150 pg/mLより高い、請求項173記載の方法。

【請求項 179】

前記血栓前駆体蛋白質濃度中央値が約200 pg/mLより高い、請求項173記載の方法。

20

【請求項 180】

前記試料における被験者に由来する1またはそれ以上の他のマーカーの存在または量を測定することをさらに含み、および前記関連づける工程が、単球遊走促進因子-1またはこれに関連するマーカーおよび被験者に由来する前記1またはそれ以上の他のマーカーの存在または量を被験者におけるアテローム性動脈硬化症の存在または不存在と関連づけることを含む、請求項172記載の方法。

【請求項 181】

被験者に由来する前記1またはそれ以上の他のマーカーが、心筋の障害の特異的マーカー、神経組織の障害の特異的マーカー、血圧制御に関連するマーカー、凝固およびうっ血に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される、請求項180記載の方法。

30

【請求項 182】

アッセイ方法がイムノアッセイ方法である、請求項172記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾病および状態の鑑別診断のための診断マーカーの同定および使用に関する。種々の観点において、本発明は、1またはそれ以上の類似のまたは同一の症状を示す1つの、および好ましくは複数の疾病および/または状態の存在または不存在を判定することができる方法および組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

以下の本発明の背景の説明は、単に読者が本発明を理解することを助けるために提供され、本発明に対する先行技術を記載または構成すると認めるものではない。

【0003】

ある種の疾病および状態の臨床的提示は、根底にある疾病および種々の疾病に罹患した

50

者に与えるべき適当な治療が全く異なりうるにもかかわらず、しばしば非常に類似している。例えば、被験者は、緊急治療施設において、種々の無関係の状態の特徴であるかもしれない、人を誤らせやすい単純な一群の見かけの症状（例えば、発熱、息切れ、めまい感、頭痛）を示すかもしれない。鑑別診断方法は、被験者中に存在する根底にある疾病または状態を識別するために、類似の臨床的兆候を示す1またはそれ以上の疾病と関連することが知られている症状および/または診断試験結果を、被験者により示される症状および/または診断結果と比較することを含む。

【0004】

例えば、息切れ（臨床的には“呼吸困難”と称される）を例にとると、患者はしばしばこの症状の病態を最初の臨床的提示として示す。この症状は、分離して考慮すると、ぜん息、慢性閉塞性肺疾病（“COPD”）、気管狭窄、閉塞性気管支内腫瘍、肺線維症、じん肺症、癌性リンパ管炎、脊柱後側弯症、胸水、筋萎縮性側索硬化症、うっ血性心不全、冠状動脈疾病、心筋梗塞、心筋症、弁機能不全、左心室肥大、心膜炎、不整脈、肺塞栓症、代謝性アシドーシス、慢性気管支炎、肺炎、不安、敗血症、急性心血管症候群、動脈瘤切開等の多様な状態を示しているかもしれない。例えば、Kelley's Textbook of Internal Medicine, 4th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000, pp. 2349 - 2354, "Approach to the Patient With Dyspnea"; Mulrow et al., J. Gen. Int. Med. 8: 383 - 92 (1993)を参照。

10

20

【0005】

呼吸困難の場合の鑑別診断は、多くの可能な原因の中から、所定の被験者において息切れの原因となる特定の状態を同定することを含む。これらの方法は、しばしば、一連の試験から得られた情報を臨床医が統合して、症状の範囲および/または被験者について得られた診断試験結果を最も密接に表す臨床診断につなげることを必要とする。必要とされる試験には、X線撮影、心電図、踏み輪運動試験、血液化学分析、心エコー検査、気管支刺激試験、肺活量測定、脈酸素測定、食道pHモニタリング、喉頭鏡検査、コンピュータ連動断層撮影、組織学、細胞学、磁気共鳴画像法等が含まれる。例えば、Morgan and Hodge, Am. Fam. Physician 57: 711 - 16 (1998)を参照。実施する必要がある種々の試験のため、診断に到達するのに十分な情報を得るには、数時間ないし数日間を要する。

30

【0006】

胸の痛みの鑑別診断は、臨床医が多くの可能な原因を考慮することを必要とし、これには、呼吸器の痛みとアングナに伴う痛みとを、または心筋梗塞と胸膜および胸壁の痛みとを区別することが含まれる。

【0007】

心不全に罹患している患者における拡張期および収縮期機能不全の鑑別診断は重要である。これは、それぞれの機能不全に対する治療法が異なるためである。さらに、心房性細動を心不全から弁別することは、適切な治療のために重要である。

【0008】

感染の分野においては、ウイルスと細菌の鑑別診断は、適切な治療を与える臨床医にとって重要である。

40

【0009】

症状が急性または重篤であることは、しばしばいかに迅速に診断を確立させて治療を開始しなければならないかを示す。呼吸困難および胸の痛みを伴う種々の急性状態を示している患者の迅速な診断およびケアは重要でありうる。例えば、Harris, Aust. Fam. Physician 31: 802 - 06 (2002) (ぜん息); Goldhaber, Eur. Respir. J. Suppl. 35: 22s - 27s (2002) (肺塞栓症); Lundergan et al., Am. Heart J. 144: 456 - 62 (2002) (心筋梗塞)を参照。しかし、見かけ上の症状が比較的安定なよ

50

うである場合においてさえも，迅速な診断，および治療の迅速な開始は，不快感の迅速な軽減および予後の有利な改良の両方を与えることができる。

【 0 0 1 0 】

上述の節で引用した各参考文献は，すべての表，図面および特許請求の範囲を含め，その全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【 発明の開示 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

発明の概要

本発明は，疾病および状態および臨床的帰結の予測の鑑別診断のための診断マーカーの同定および使用に関する。本明細書に記載される方法および組成物は，1またはそれ以上の臨床的特徴の点に関連する種々の疾病の診断および弁別において用いるべき迅速な，感度の高い特異的な診断および予後アッセイに対する当該技術分野の要求を満たすことができる。

10

【 0 0 1 2 】

種々の観点においては，本発明は，分離して考慮したときに，複数の可能性のある根底にある疾病または状態に関連しうる，1またはそれ以上の症状の根底にある原因を同定するための材料および方法；患者の診断および治療におけるそのようなマーカーの使用，および/または，治療の経過のモニター；根底にある疾病または状態の1またはそれ以上の有害な帰結のリスクを有する被験者の同定におけるそのようなマーカーの使用；およびそのような疾病または状態を治療または予防する上で利点を提供するであろう化合物および医薬組成物のスクリーニングに関する。

20

【 0 0 1 3 】

疾病の診断または予後においてマーカーレベルを評価する伝統的な方法においては，典型的には，目的とするマーカーの"閾値"を確立し，試料中のそのマーカーの濃度をその閾値量と比較する。予め確立された閾値より高い量は，一つの状態（例えば疾病）を示し，予め確立された閾値より低い量は別の状態（例えば正常）を示す。例えば，the American Heart Associationは，正常な集団における百分位数濃度の99番目より高い心臓トロポニンI濃度を，心筋梗塞であるという診断に用いるべきであると述べている。本明細書に記載される方法においては，1またはそれ以上のマーカーについてそのような閾値濃度を確立することができ，これらの閾値を同様の様式で被験者の診断/予後の判定に用いることができる。しかし，パネル中のマーカーの数が増加するにしたがって，個々の閾値を各マーカーに適用することは，非実際的となりうる。すなわち，複数のマーカーを評価するある好ましい態様においては，特定の診断および/または予後の判定は，マーカーパネル中の1またはそれ以上のマーカーについての特定の閾値に依存しない。そうではなく，本発明は，複数のマーカーの全体を単一として評価することを利用することができる。簡単な例においては，マーカーの絶対的な量ではなく2つまたはそれ以上のマーカーの比率を用いて診断/予後を判定することができる。しかし，さらにより好ましくは，そのようなマーカーのパネルの変化の特定の"フィンガープリント"パターンは，実質的に，特異的な診断または予後指標として働くことができる。複数のマーカー濃度を単一の結果に統合した"パネル応答値"を決定する方法は以下に説明される。これらの方法においては，試料中で測定される各マーカー濃度は，このパネル応答値に寄与し，これを単に単一のマーカーの濃度であるかのように閾値パネル応答と比較することができる。これは1またはそれ以上のマーカーの量を予め決定された閾値レベルと比較しない診断方法の一例である。

30

40

【 0 0 1 4 】

第1の観点においては，本発明は，観察される症状の根底にある複数の可能性のある病因を示す1またはそれ以上の物理学的特性（すなわち，1またはそれ以上の"症状"）の認知しうる変化を示す被験者において，疾病または状態の存在または不存在を判定する方法（"診断"）を開示する。これらの方法は，被験者から得た試験試料を，観察される症状

50

の可能性のある病因の1またはそれ以上についての1またはそれ以上のマーカーの存在または量について分析することを含む。被験者から得た試料中のそのようなマーカーの存在または量を用いて、可能性のある病因の1またはそれ以上であると判定するかそうではないと判定することができ、このことにより、診断 (r u l e - i n) および / または1またはそれ以上の診断の除外 (r u l e - o u t) のいずれかが与えられる。

【 0 0 1 5 】

ある態様においては、これらのマーカーを用いて、息切れまたは"呼吸困難"の1またはそれ以上の可能性のある病因であると判定するかそうではないと判定することができる。以下に呼吸困難に関連する疾病および状態の鑑別診断に関して本発明を一般的に説明するが、当業者には、本明細書に記載される症状に基づく鑑別診断の概念は、複数の可能性のある病因を示す任意の物理学的特徴、例えば、発熱、胸の痛み（または"アングナ"）、腹痛、神経機能不全、代謝状態の障害、例えば、異常な水分、電解質、無機物、または酸塩基代謝、高血圧、めまい感、頭痛等に一般的に適用しうることが理解されるであろう。

10

【 0 0 1 6 】

好ましい態様においては、本発明は、試験試料を複数の可能性のある病因に関連する複数のマーカーの存在または量について分析する方法に関し、したがって、この方法を適用して、単一の試料の分析に基づいて複数の可能性のある根底にある原因であると判定するかそうではないと判定することができる。

【 0 0 1 7 】

呼吸困難の場合、複数のマーカーは、好ましくは、以下の診断の1またはそれ以上、好ましくは複数であると判定するかそうではないと判定するよう選択される：ぜん息、心房性細動、慢性閉塞性肺疾病 (" C O P D ")、気管狭窄、閉塞性気管支内腫瘍、肺線維症、じん肺症、癌性リンパ管炎、脊柱後側弯症、胸水、筋萎縮性側索硬化症、うっ血性心不全、冠状動脈疾病、心筋梗塞、急性心血管症候群、心筋症、弁機能不全、左心室肥大、心膜炎、不整脈、肺塞栓症、代謝性アシドーシス、慢性気管支炎、肺炎、不安、敗血症、または動脈瘤切開。特に好ましい態様においては、本発明の方法は、呼吸困難の原因を明らかにして、心筋虚血および心臓壊死、心不全および肺塞栓症であると判定するかそうではないと判定することに関する。さらに別の特に好ましい態様においては、本発明の方法は、呼吸困難の原因を明らかにして、心筋虚血および心臓壊死、心不全、肺塞栓症および心房性細動であると判定するかそうではないと判定することに関する。また、複数のマーカーを用いて、被験者が将来の臨床的帰結、例えば、死亡または1またはそれ以上の非致命的な合併症にかかるリスク、例えば再入院を必要とするリスクを予測することができる。当業者には、同じ複数のマーカーが診断情報および予後情報の両方を提供しうることが理解されるであろう。診断に用いられるマーカーは、予後に用いられるマーカーと同じであってもよく、これらの目的の一方に用いられる1またはそれ以上のマーカーが他方の目的には用いられないという点において異なってもよい。

20

30

【 0 0 1 8 】

腹痛の場合、複数のマーカーは、好ましくは、以下の複数であると判定するかそうではないと判定するよう選択される：大動脈動脈瘤、腸間膜塞栓症、脾炎、虫垂炎、心筋梗塞、上述した1またはそれ以上の感染性疾患、インフルエンザ、食道癌、胃腺癌、結腸直腸腺癌、膵臓腫瘍、例えば、膵管癌、嚢胞腺癌、およびインスリノーマ。

40

【 0 0 1 9 】

代謝状態の障害の場合には、複数のマーカーは、好ましくは、以下の複数であると判定するかそうではないと判定するよう選択される：真性糖尿病、糖尿病性ケトアシドーシス、アルコール性ケトアシドーシス、呼吸器アシドーシス、呼吸器アルカローシス、非ケトン体生成性高血糖症、低血糖症、腎不全、間質性腎臓疾病、C O P D、肺炎、肺および浮腫、ぜん息。

【 0 0 2 0 】

本明細書に詳細に記載されるように、複数のマーカーを以下に説明されるパネルの一部として用いて、診断および / または予後を被験者と関連づける。そのようなパネルは、2

50

、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20個またはそれ以上の個々のマーカーを含むことができる。呼吸困難の原因の診断のための好ましいパネルは、心臓障害の特異的マーカー、神経組織の障害の特異的マーカー、組織障害の非特異的マーカー、血圧制御に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、凝固およびうっ血に関連するマーカー、肺障害に関連するマーカー、およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される複数のマーカーを含む。これらの群のそれぞれの例示的マーカーは以下に説明される。好ましくは、そのようなパネルは、この群の2、3、4、5、またはそれ以上の異なるメンバーからのマーカーを含む。すなわち、呼吸困難の原因の診断に特に好ましいパネルは、1またはそれ以上の心臓障害の特異的マーカーおよび1またはそれ以上の血圧制御に関連するマーカー；1またはそれ以上の心臓障害の特異的マーカーおよび1またはそれ以上の凝固およびうっ血に関連するマーカー；1またはそれ以上の血圧制御に関連するマーカーおよび1またはそれ以上の凝固およびうっ血に関連するマーカー；または1またはそれ以上の心臓障害の特異的マーカー、1またはそれ以上の血圧制御に関連するマーカー、および1またはそれ以上の凝固およびうっ血に関連するマーカーを含み、ここで、これらの特に好ましいパネルのそれぞれは、任意に、1またはそれ以上の組織障害の非特異的マーカー、炎症に関連するマーカー、肺障害に関連するマーカー、および/またはアポトーシスに関連するマーカーを含んでいてもよい。1またはそれ以上のマーカーは、単独で考慮したときには診断または予後の価値を有しないかもしれないが、パネルの一部として用いた場合には、そのようなマーカーは特定の診断および/または予後を判定するうえで大きな価値を有するであろう。

10

20

【0021】

本明細書に記載される方法において用いるための好ましい心臓障害の特異的マーカーは、例えば、アネキシンV、 β -エノラーゼ、心臓トロポニンI（遊離型および/または複合体型）、心臓トロポニンT（遊離型および/または複合体型）、クレアチンキナーゼ-MB、グリコゲンホスホリラーゼ-BB、心臓型脂肪酸結合蛋白質、ホスホグリセリン酸ムターゼ-MB、およびS-100a_oを含む。本明細書に記載される方法において用いるための好ましい組織障害の非特異的マーカーは、例えば、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ミオグロビン、アクチン、ミオシン、および乳酸デヒドロゲナーゼを含む。

30

【0022】

本明細書に記載される方法において用いるための血圧制御に関連する好ましいマーカーは、例えば、心房性ナトリウム利尿ペプチド（“ANP”）、pro-ANP、B型ナトリウム利尿ペプチド（“BNP”）、NT-proBNP、pro-BNP C型ナトリウム利尿ペプチド、ウロテンシンII、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIII、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメジュリン、カルシホシン、エンドセリン-2、エンドセリン-3、レニン、およびウロジラチン、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される1またはそれ以上のマーカーを含む。

40

【0023】

本明細書に記載される方法において用いるための炎症に関連する好ましいマーカーは、例えば、急性期反応物質、細胞接着分子、例えば、血管細胞接着分子（“VCAM”）、細胞間接着分子-1（“ICAM-1”）、細胞間接着分子-2（“ICAM-2”）、および細胞間接着分子-3（“ICAM-3”）、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）、C反応性蛋白質、インターロイキン例えば、IL-1 β 、IL-6、およびIL-8、インターロイキン-1レセプターアゴニスト、単球遊走促進因子-1、リポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β 、Fasリガンド、可溶性Fas（Apo-1）、TRAIL、TWEAK、フィブロネクチン、マクロファージ移動阻害因子（MIF）、および血管内皮成長因子（“VEGF”）、またはこれらに関連するマーカーから

50

なる群より選択される１またはそれ以上のマーカーを含む。本明細書において用いる場合，“急性期反応物質”との用語は，種々の障害の間に起こるストレスの多い状態または炎症状態，例えば，感染，創傷，手術，外傷，組織壊死等に応答してその濃度が上昇する蛋白質を表す。急性期反応物の発現および血清濃度の上昇は，傷害のタイプに特異的ではなく，傷害に対する恒常性応答の一部として現れる。

【 0 0 2 4 】

“炎症に関連するマーカー”として上に挙げたこれらの急性期反応物質に加えて，１またはそれ以上の炎症に関連するマーカーは，ヘプシジン，HSP - 60，HSP - 65，HSP - 70，非対称ジメチルアルギニン（一酸化窒素シンターゼの内因性阻害剤），マトリクスメタロプロテイン 11，3，および 9，ディフェンシン HBD 1，ディフェンシン HBD 2，血清アミロイド A，酸化 LDL，インスリン様成長因子，トランスフォーミング成長因子 β ，e - セレクチン，グルタチオン - S - トランスフェラーゼ，低酸素症誘導性因子 - 1 α ，誘導性一酸化窒素シンターゼ（“I - NOS”），細胞内接着分子，乳酸デヒドロゲナーゼ，単球遊走促進ペプチド - 1（“MCP - 1”），n - アセチルアスパラギン酸，プロスタグランジン E 2，核因子のレセプターアクチベータ（“RANK”）リガンド，TNFレセプタースーパーファミリーメンバー 1 A，リポ多糖類結合蛋白質（“LBP”），およびシスタチン C，またはこれらに関連するマーカーからなる急性期反応物質の群より選択することができる。

10

【 0 0 2 5 】

本明細書に記載される方法において用いるための凝固およびうっ血に関連する好ましいマーカーには，例えば，プラスミン，フィブリノーゲン，血栓前駆体蛋白質，D - ダイマー， β - トロンボグロブリン，血小板因子 4，フィブリノペプチド A，血小板由来成長因子，プロトンピンフラグメント 1 + 2，プラスミン - α 2 - アンチプラスミン複合体，トロンピン - アンチトロンピン III 複合体，P - セレクチン，トロンピン，およびフォン・ビルブランド因子，組織因子，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される１またはそれ以上のマーカーが含まれる。

20

【 0 0 2 6 】

本明細書に記載される方法において用いるための肺障害に関連する好ましいマーカーには，例えば，好中球エラストラーゼ，7 s コラーゲンフラグメント，肺サーファクタント蛋白質，ジパルミトイルホスファチジルコリン，KL - 6，およびユビキチン - コンジュゲート化肺蛋白質，またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される１またはそれ以上のマーカーが含まれる。

30

【 0 0 2 7 】

本明細書に記載される方法において使用するためのアポトーシスに関連する好ましいマーカーは，例えば，スペクトリン，カテプシン D，カススペース 3，シトクロム c，s - アセチルグルタチオン，およびユビキチン融合分解蛋白質 1 ホモログからなる群より選択される１またはそれ以上のマーカーを含む。

【 0 0 2 8 】

下記に詳細に説明されるように，本発明の方法および組成物は，被験者から得た試験試料を，その存在または量が収縮期心不全および／または拡張期心不全であると判定するかまたはそうではないと判定するために用いることができるか，またはうっ血性心不全のこれらの２つの原因を区別するために用いることができる，１またはそれ以上のマーカーの存在または量について分析することにより，収縮期心不全と拡張期心不全とを区別することにより，うっ血性心不全をさらに分けるよう選択することができる。同様に，本明細書に記載される方法および組成物は，被験者から得た試験試料を，その存在または量を用いて心不全または心房性細動であると判定するかまたはそうではないと判定することができる１またはそれ以上のマーカーの存在または量について分析することにより，心房性細動と心不全とを区別することができる。同様に，本発明の方法を用いて，収縮期および拡張期機能不全および心房性細動を区別することができ，および／または収縮期および拡張期機能不全，心房性細動，心筋虚血および心臓壊死を区別することができる。

40

50

【 0 0 2 9 】

例えば、呼吸困難の根底にある種々の疾病の鑑別診断は、心不全と心房性細動との識別を必要とするであろう。そのような識別を実施するための好ましいマーカーパネルは、好ましくは、血圧制御に関連する複数のマーカー、好ましくはBNPまたはBNP関連ペプチド、およびANPまたはANP関連ペプチドを含む。そのようなパネルに追加のマーカーを加えて、収縮期および拡張期機能不全および心房性細動を区別することができる。そのような識別を行うための好ましいマーカーパネルは、好ましくは血圧制御に関連する複数のマーカーを含む。最も好ましくは、そのようなパネルは、BNP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニン、ウロテンシン1、およびANP、または関連するペプチドを含む。同様に、マーカーは、収縮期および拡張期機能不全、心房性細動、心筋虚血および心臓壊死を区別するよう規定することができる。この場合の好ましいマーカーパネルは、血圧制御に関連する複数のマーカー、心臓壊死の1またはそれ以上のマーカー、および任意に組織障害の1またはそれ以上の非特異的マーカーを含む。最も好ましくは、そのようなパネルは、BNP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニン、ウロテンシン1、ANP、および心臓トロポニンIまたはT（遊離型および/または複合体型）、または関連するペプチド、および任意にミオグロビン、クレアチンキナーゼ-MBおよび/またはS100a0、または関連するペプチドを含む。

10

【 0 0 3 0 】

さらに、凝固およびうっ血の1またはそれ以上のマーカー、最も好ましくはD-ダイマーおよび/または血栓前駆体蛋白質または関連するペプチドを、そのようなパネルが肺塞栓症であると判定するかまたはそうではないと判定することを助けるために加えることができる。同様に、血管組織障害の1またはそれ以上のマーカー、好ましくは平滑筋ミオシン、最も好ましくは平滑筋ミオシン重鎖または関連するペプチドを、そのようなパネルが動脈解離であると判定するかまたはそうではないと判定することを助けるためにそのようなパネルに加えることができる。最後に、1またはそれ以上の炎症に関連するマーカー、好ましくはIL-1ra、ミエロペルオキシダーゼ、MMP-9、および/またはC反応性蛋白質もまた、そのようなパネルに追加の情報を提供し、疾病をさらに識別することができる。

20

【 0 0 3 1 】

呼吸困難の原因を区別するのに特に好ましいマーカーは、心臓障害の特異的マーカー、組織障害の非特異的マーカー、炎症に関連するマーカー、血圧制御に関連するマーカー、および凝固およびうっ血に関連するマーカーからなる群より選択される2またはそれ以上のマーカーを含む。最も好ましいものは、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上のそのようなマーカーを含むパネルであり、マーカーは、最も好ましくは心臓特異的トロポニンI（遊離型および/または複合体型）、心臓特異的トロポニンT（遊離型および/または複合体型）、クレアチンキナーゼ-MB、S100a0、A型ナトリウム利尿ペプチド、B型ナトリウム利尿ペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニン、ウロテンシン1、ミオグロビン、平滑筋ミオシン軽鎖、血栓前駆体蛋白質、D-ダイマー、平滑筋ミオシン重鎖、IL-1ra、ミエロペルオキシダーゼ、カスパーズ-3、シトクロムC、C反応性蛋白質、単球遊走促進ペプチド-1、およびMMP-9、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される。この特に好ましいマーカーのリストから1またはそれ以上のマーカーを、置き換え、加え、または差し引いてもよく、なお臨床的に有用な結果が得られる。

30

40

【 0 0 3 2 】

これらのマーカーは、種々の組み合わせで組み合わせることができる。例えば、好ましいパネルは、以下のマーカーの2、3、4、5、またはそれ以上を含むことができる：B型ナトリウム利尿ペプチドまたはB型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー、クレアチンキナーゼ-MB、総心臓トロポニンI、総心臓トロポニンT、C反応性蛋白質、D-ダイマー、およびミオグロビン。

【 0 0 3 3 】

50

特に好ましいパネルは、クレアチンキナーゼ - M B , 総心臓トロポニン I , ミオグロビン , および B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー ; 総心臓トロポニン I , C 反応性蛋白質 , および B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー ; クレアチンキナーゼ - M B , 総心臓トロポニン I , ミオグロビン , C 反応性蛋白質 , および B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー ; ミオグロビン , C 反応性蛋白質 , および B 型ナトリウム利尿ペプチドまたは B 型ナトリウム利尿ペプチドに関連するマーカー ; クレアチンキナーゼ - M B , 総心臓トロポニン I , およびミオグロビン ; またはクレアチンキナーゼ - M B , 総心臓トロポニン I , C 反応性蛋白質およびミオグロビンを含む。これらの特に好ましいパネルは、さらに、D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼを含んでいてもよく ; および D - ダイマーおよび / またはミエロペルオキシダーゼを用いてこれらの特に好ましいパネル中の 1 または 2 つのマーカーを置き換えてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

そのようなパネルは、心筋梗塞、うっ血性心不全、急性心血管症候群、S T 上昇 A C S , 非 S T 上昇 A C S , 不安定性アンギナ、および / または肺塞栓症からなる群より選択される 1 またはそれ以上の心血管疾患を診断することができ、好ましくは複数を区別することができる ; および / または被験者がさらなる臨床的帰結、例えば、死亡、非致命性心筋梗塞、緊急血管再生を必要とする再発虚血、および / または再入院を必要とする再発虚血にかかるリスクを予測することができる ; および / またはそのような疾病にかかる将来のリスクを予測することができる。類似の症状を表すがうっ血性心不全ではない疾病または状態 (“ C H F 模倣 ”) からうっ血性心不全を弁別することができるマーカーは、本明細書において “ C H F 鑑別診断マーカー ” と称され、類似の症状を表すが心筋梗塞ではない疾病または状態 (“ M I 模倣 ”) から心筋梗塞を弁別することができるマーカーは、本明細書において “ M I 鑑別診断マーカー ” と称される。

【 0 0 3 5 】

同様にして、パネルは、複数の脳血管疾患の中から診断および / または区別するよう選択される複数のマーカーを含む。好ましい態様においては、本発明は、発作に関連する診断または予後を判定する方法、または発作のタイプおよび / または T I A を弁別するための方法を開示する。これらの方法は、被験者から得た試験試料を脳障害の 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について分析することを含む。これらの方法は、その存在または量が発作および / または T I A の診断、予後、または弁別と関連する 1 またはそれ以上のマーカーを同定することを含むことができる。いったんそのようなマーカーを同定した後、目的とする被験者から得た試料中のそのようなマーカーのレベルを測定することができる。ある態様においては、これらのマーカーは、発作および / または T I A の診断、予後、または弁別と関連するレベルと比較することができる。被験者のマーカーレベルを診断マーカーレベルと関連づけることにより、患者における発作の存在または不存在、将来の有害な帰結の可能性等を迅速にかつ正確に判定することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、観察される症状の根底にある複数の可能な病因を示す 1 またはそれ以上の症状 (その 1 つは発作である) の認知しうる変化を示す被験者において、疾病または状態の存在または不存在を判定する方法を開示する。これらの方法は、被験者から得た試験試料を、観察される症状の可能性のある病因が、発作、または 1 またはそれ以上のタイプの発作であると判定するかまたはそうではないと判定するよう選択された 1 またはそれ以上のマーカーの存在または量について分析することを含む。観察される症状の鑑別診断に含まれる発作以外の病因は本明細書において “ 発作模倣 ” と称され、および 1 またはそれ以上のタイプの発作を発作模倣から弁別することができるマーカーは、本明細書において “ 発作鑑別診断マーカー ” と称される。被験者から得た試料中のそのようなマーカーの存在または量を用いて、以下の 1 またはそれ以上 : 発作、血栓性発作、塞栓性発作、ラクナ型発作、低灌流、無症状 (潜在性) 脳虚血、脳内出血、およびクモ膜下出血であると判定

するかまたはそうではないと判定することができ、このことにより、診断を与えるか、および/または診断から除外することができる。

【0037】

脳血管疾病に関連するこれらの観点においては、好ましいマーカーパネルは、神経組織の障害の特異的マーカー、血圧制御に関連するマーカー、凝固およびうっ血に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される複数のマーカーを含む。好ましくは、そのようなパネルは、この群の2, 3, 4, または5個のメンバーからのマーカーを含む。

【0038】

血圧制御、炎症、および凝固およびうっ血に関連する例示的マーカーは上に記載される。神経組織の障害に関連する1またはそれ以上のマーカーは、プレセレベリン1、セレベリン1、セレベリン3、キメリン1、キメリン2、カルプレイン、カルピンジンD、脳チュープリン、脳脂肪酸結合蛋白質(“B-FABP”), 脳由来神経栄養因子(“BDNF”), カルボニックアンヒドラーゼXI, CACNA1Aカルシウムチャンネル遺伝子、神経成長因子β、アトロフィン1、アポリポ蛋白質E4-1、蛋白質4.1B、14-3-3蛋白質、毛様体神経栄養因子、クレアチンキナーゼ-BB、C-tau、グリア細胞繊維性酸性蛋白質(“GFAP”), 神経細胞接着分子(“NCAM”), ニューロン特異的エノラーゼ、S-100β、プロスタグランジンDシンターゼ、ニューロキニンA、ニューロテンシン、およびセクレタゴギンからなる群より選択されるマーカーを含む。神経組織の障害に関連する追加の例示的マーカーは以下に記載される。

【0039】

複数の脳血管疾患を診断および/または区別するよう選択される好ましいマーカーパネルは、アデニレートキナーゼ、脳由来神経栄養因子、カルピンジン-D、クレアチンキナーゼ-BB、グリア細胞繊維性酸性蛋白質、乳酸デヒドロゲナーゼ、ミエリン塩基性蛋白質、神経細胞接着分子(NCAM), c-tau、神経ペプチドY、ニューロン特異的エノラーゼ、ニューロトロフィン-3、プロテオリピド蛋白質、S-100β、トロノボモジュリン、蛋白質キナーゼCy、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、pro-ANP、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、NT-proBNP、pro-BNP C型ナトリウム利尿ペプチド、ウロテンシンII、アルギニンバソプレシン、アルドステロン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシンIII、ブラジキニン、カルシトニン、プロカルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメジュリン、カルシホシン、エンドセリン-2、エンドセリン-3、レニン、ウロジラチン、急性期反応物質、MMP-9、細胞接着分子、C反応性蛋白質、インターロイキン、インターロイキン-1レセプターアゴニスト、単球遊走促進蛋白質-1、カススペース-3、リポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、マスト細胞トリプターゼ、好酸球カチオン性蛋白質、KL-6、ハプトグロビン、腫瘍壊死因子α、腫瘍壊死因子β、Fasリガンド、可溶性Fas(Apo-1)、TRAIL、TWEAK、フィブロンネクチン、マクロファージ移動阻害因子(MIF)、血管内皮成長因子(VEGF)、カススペース-3、カテプシンD、α-スペクトリン、プラスミン、フィブリノーゲン、D-ダイマー、β-トロノボグロブリン、血小板因子4、フィブリノペプチドA、血小板由来成長因子、プロトロンビンフラグメント1+2、プラスミン-α2-アンチプラスミン複合体、トロノビン-アンチトロノビンIII複合体、P-セレクチン、トロノビン、フォン・ビルブランド因子、組織因子、および血栓前駆体蛋白質、またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択される複数のマーカーを含む。

【0040】

最も好ましいマーカーパネルは、神経組織の障害に関連する少なくとも1つのマーカーおよび炎症の少なくとも1つのマーカーを含み、好ましくは、IL-1ra、C反応性蛋白質、フォン・ビルブランド因子(vWF)、クレアチンキナーゼ-BB、クレアチンキナーゼ-MB、c-Tau、D-ダイマー、血栓前駆体蛋白質、血管内皮成長因子(VEGF)、マトリクスメタロプロテアーゼ-9(MMP-9)、神経細胞接着分子(NCA

10

20

30

40

50

M), BNP, S100 β , シトクロム c, およびカススペース - 3 からなる群より選択される 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, またはそれ以上のマーカーを含む。

【0041】

本発明の好ましいマーカーは、虚血性発作、出血性発作、およびTIAを弁別することができる。そのようなマーカーは、本明細書において、“発作鑑別マーカー”と称される。特に好ましいものは、血栓性、塞栓性、ラクナ、低灌流、脳内出血、およびクモ膜下出血タイプの発作を弁別するマーカーである。以下の説明の目的のためには、発作の診断および予後に適用可能であると記載される方法は、一般にTIAの診断および予後に適用可能であると考えることができる。

【0042】

本発明のさらに別の好ましいマーカーは、発作を起こし、後の有害な帰結のリスクを有する被験者を識別することができる。例えば、脳内出血またはクモ膜下出血タイプの発作を示している被験者の亜集団は、脳血管痙攣により引き起こされる後の血管創傷にかかりやすいであろう。別の例においては、有害な帰結のリスクを識別するために、臨床的に正常な被験者をスクリーニングすることができる。好ましいマーカーには、カススペース - 3, NCAM, MCP - 1, S100b, MMP - 9, vWF, BNP, CRP, NT - 3, VEGF, CKBB, MCP - 1カルピンジン, トロンビン - アンチトロンビンIII複合体, IL - 6, IL - 8, ミエリン塩基性蛋白質, 組織因子, GFAP, およびCNPが含まれる。これらの用語のそれぞれは以下に定義される。特に好ましいマーカーは、クモ膜下出血を示している患者において後に生ずる脳血管痙攣を予測しうるもの、例えば、フォン・ビルブラント因子、血管内皮成長因子、マトリクスメタロプロテイン - 9, またはこれらのマーカーの組み合わせである。他の特に好ましいマーカーは、虚血性発作を出血性発作から区別するマーカーである。

【0043】

さらに別の特に好ましいマーカーは、クモ膜下出血を示している患者において後に生ずる脳血管痙攣を予測しうるもの、例えば、1またはそれ以上の血圧制御に関連するマーカー、炎症に関連するマーカー、アポトーシスに関連するマーカー、および/または神経組織の障害の特異的マーカーである。この場合も、そのようなパネルは、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, またはそれ以上の個々のマーカーを含むことができる。個々にまたはパネルにおいて用いるのに好ましいマーカーは、IL - 1ra, C反応性蛋白質, フォン・ビルブラント因子(vWF), 血管内皮成長因子(VEGF), マトリクスメタロプロテアーゼ - 9(MMP - 9), 神経細胞接着分子(NCAM), BNP, およびカススペース - 3, またはこれらに関連するマーカーからなる群より選択することができる。

【0044】

適切な治療のためには初期の治療が重要であることが報告されているため、開始の正確な時間の情報を得ることは重要である。この開始時間情報を得ることは困難である場合があり、しばしば発作の犠牲者の伴侶への聞き取りに基づく。すなわち、種々の態様において、マーカーおよびマーカーパネルは、発作の開始からのおよその時間を区別するよう選択される。本発明の目的のためには、“急性発作”との用語は、過去12時間以内、より好ましくは過去6時間以内、最も好ましくは過去3時間以内に起こった発作を表す。一方、“非急性発作”との用語は、12時間以上前に、好ましくは12 - 48時間前に、最も好ましくは12 - 24時間前に起こった発作を表す。急性発作と非急性発作とを弁別するのに好ましいマーカーは、本明細書において発作“開始時間マーカー”と称され、以下に説明される。

【0045】

好ましいパネルは、以下の目的のためのマーカーを含む：発作の診断；発作の診断および急性発作が起こったかどうかの兆候；発作の診断および非急性発作が起こったかどうかの兆候；発作の診断、急性発作が起こったかどうかの兆候、および非急性発作が起こったかどうかの兆候；発作の診断および虚血性発作が起こったかどうかの兆候；発作の診断お

10

20

30

40

50

よび出血性発作が起こったかどうかの兆候；発作の診断，虚血性発作が起こったかどうかの兆候，および出血性発作が起こったかどうかの兆候；発作の診断および後の有害な帰結の予後予測；発作の診断および後の脳血管痙攣の予後予測；および発作の診断，出血性発作が起こったかどうかの兆候および後の脳血管痙攣の予後予測。

【0046】

上述したように，パネルはまた，発作の鑑別診断；発作の鑑別診断および急性発作が起こったかどうかの兆候；発作の鑑別診断および非急性発作が起こったかどうかの兆候；発作の鑑別診断，急性発作が起こったかどうかの兆候，および非急性発作が起こったかどうかの兆候；発作の鑑別診断および虚血性発作が起こったかどうかの兆候；発作の鑑別診断および出血性発作が起こったかどうかの兆候；発作の鑑別診断，虚血性発作が起こったか
10
どうかの兆候，および出血性発作が起こったかどうかの兆候；発作の鑑別診断および後の有害な帰結の予後予測；発作の鑑別診断および後の脳血管痙攣の予後予測；発作の鑑別診断，出血性発作が起こったかどうかの兆候，および後の脳血管痙攣の予後予測を含むことができる。

【0047】

そのようなパネル中のマーカーの存在または量を，複数の脳血管疾患の存在または不存在と関連づけることができる。以下に追加のマーカーが説明される。以下に説明するように，本明細書に記載されるマーカーは，パネル中の他のマーカーの状態に応じて，複数の疾病を示すことができる。例えば，ある種のマーカーは，一般に種々の原因による炎症において上昇する。すなわち，単一のマーカーは単独ではそれ自体診断的ではありえないが
20
，マーカーはパネルの一部として重要な診断および／または予後情報を与えることができる。

【0048】

関連する観点においては，将来の脳血管疾患の発症のリスクを有する患者を識別するために，複数の脳血管疾患を診断および／または区別しうるよう選択されたマーカーの存在または量を予後予測に用いることもできる。そのような用途は，そのような発症のリスクが増加していることが知られている患者をモニターするうえで特に興味深い。例えば，頸動脈血管内膜切除術を受けている患者は，脳虚血のリスクを有することが知られている。そのような虚血の帰結には，術中および周術期発作，神経欠損，および死亡が含まれる。脳虚血はまた，低体温循環停止，大動脈弁の交換，僧帽弁の交換，冠状動脈手術，大動脈
30
動脈瘤の内部移植修復，冠状動脈バイパス移植手術，喉頭マスク挿入，および先天性心臓血管の修復などの処置のリスクでもある。すなわち，本発明はまた，そのような処置を受けている患者の状態をモニターしてリスクを有する患者を識別するための方法および組成物に関する。

【0049】

さらに別の観点においては，本発明は，血管疾病に罹患している患者のリスク階層化および診断において用いるための代表的な独立マーカーとして血栓前駆体蛋白質（“TpP（商標）”）および単球遊走促進因子-1（MCP-1）に記載する。例えば，ACSの場合，TpP（商標）および／またはMCP-1は，被験者が将来の臨床的帰結，例えば，死亡，非致命性心筋梗塞，緊急血管再生を必要とする再発虚血，および／または再入院
40
を必要とする再発虚血に罹患するリスクを判定することを可能とするであろう。リスク階層化を適用することができる計画対象期間（すなわち，予後リスクを予測する期間）は，1日から5年，より好ましくは1週間から2年，最も好ましくは1か月から1年でありうる。急性心血管症候群（“ACS”）患者に関して下記に説明するが，TpP（商標）およびMCP-1はまた，本明細書に記載される方法にしたがって種々の観点において使用して，凝固およびうっ血および／または炎症の関与が示唆される種々の血管疾患の診断および予後情報を提供することができる。

【0050】

本明細書に記載される種々の観点を適用しうる好ましい疾病としては，敗血症，急性心血管症候群，アテローム性動脈硬化症，虚血性発作，脳内出血，クモ膜下出血，一過性虚
50

血性発作，収縮期機能不全，拡張期機能不全，動脈瘤，動脈解離，心筋虚血，狭心症，心筋梗塞，うっ血性心不全，拡張型うっ血性心筋症，肥大性心筋症，拘束型心筋症，肺性心，不整脈，弁心臓疾病，心内膜炎，肺塞栓症，静脈血栓症，および末梢血管疾病からなる群より選択される1またはそれ以上の疾病が挙げられる。

【0051】

この観点の好ましい態様においては，本発明は，被験者から得た試験試料をTpP（商標）および／またはMCP-1の存在または量について分析し，試料中で測定したTpP（商標）および／またはMCP-1の存在または量を用いて被験者についての1またはそれ以上の臨床的帰結リスクと関連づけることにより，血管疾病に罹患した被験者についての1またはそれ以上の臨床的帰結のリスクを予測する方法を特徴とする。

10

【0052】

以下に説明するように，TpP（商標）および／またはMCP-1は，他のマーカーを考慮しなくても，1またはそれ以上の臨床的帰結の所定のリスクと関連しうる。すなわち，ある態様においては，単に，その濃度より低い場合には被験者は第1のリスクレベルを有し，高い場合には被験者は第2のリスクレベルを有するという，1またはそれ以上の予め決定された閾値濃度を提供することにより，そのような関連づけを行うことができる。その患者のTpP（商標）および／またはMCP-1濃度が測定され，後の臨床的帰結が数日，数ヶ月または数年の期間にわたり追跡された血管疾病患者の集団に基づいて，被験者を相対的予後リスクに割り当てることができる。集団のTpP（商標）および／またはMCP-1（関連するものとして）の濃度を3つ，4つ，または5つ等に分割し，当該技術分野に知られる方法により各亜集団について関連するリスクレベルを決定する。次に，測定されたTpP（商標）および／またはMCP-1濃度にしたがって，患者をこれらの予後リスク亜集団の1つに割り当てる。

20

【0053】

別の態様においては，TpP（商標）および／またはMCP-1を本明細書に記載されるパネルの一部として用いて，被験者についての1またはそれ以上の臨床的帰結のリスクと関連づける。そのようなパネルは，2，3，4，5，6，7，8，9，10，15，20，またはそれ以上の独立したマーカーを含むことができ，その少なくとも1つは，TpP（商標）またはMCP-1である。好ましいパネルは，TpP（商標），MCP-1からなる群より独立して選択される複数のマーカー，および，心臓障害の特異的マーカー，神経組織の障害の特異的マーカー，血圧制御に関連するマーカー，炎症に関連するマーカー，凝固およびうっ血に関連するマーカー，およびアポトーシスに関連するマーカーからなる群より独立して選択される1またはそれ以上の追加のマーカーを含む。これらのそれぞれの群における例示的マーカーは本明細書に記載される。TpP（商標）および／またはMCP-1とともに考慮される1またはそれ以上のマーカーは，単独で考慮した場合には診断または予後の価値はないかもしれないが，パネルの一部として用いた場合には，そのようなマーカーは，特定の診断および／または予後の判定に大きな価値を有するのである。

30

【0054】

そのようなパネルに含めるのに適した追加のマーカーは以下に詳細に説明される。そのようなパネルにおいてTpP（商標）に加えて用いるための特に好ましいマーカーとしては，BNP，心臓トロポニンI（遊離および／または複合体），心臓トロポニンT（遊離および／または複合体），CRP，クレアチンキナーゼ-MB，MMP-9，カススペース-3，ミオグロビン，ミエロペルオキシダーゼ，sCD40L，またはこれらに関連するマーカーが挙げられる。臨床的に有用な結果を与えながら，この特に好ましいマーカーのリストから，1またはそれ以上のマーカーを置き換え，加えまたは差し引くことができる。

40

【0055】

本発明の別の観点においては，血管疾病を診断する方法が記載される。そのような方法は，被験者から得た試験試料をTpP（商標）および／またはMCP-1および1または

50

それ以上の追加のマーカの存在または量について分析し、T p P (商標) および / または M C P - 1 および追加のマーカの存在または量を用いて、被験者における血管疾病の存在または不存在を判定することを含む。この観点においては、次に、T p P (商標) および / または M C P - 1 を診断パネルの一部として用いる。上述したように、そのようなパネルは、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, またはそれ以上の独立したマーカを含んでいてもよく、その少なくとも1つはT p P (商標) またはM C P - 1 である。好ましいパネルは、T p P (商標) および / またはM C P - 1 および心臓障害の特異的マーカ、神経組織の障害の特異的マーカ、血圧制御に関連するマーカ、炎症に関連するマーカ、凝固およびうっ血に関連するマーカ、およびアポトーシスに関連するマーカからなる群より独立して選択される1またはそれ以上の追加のマーカを含む。

10

【0056】

本発明の関連する観点においては、アテローム性動脈硬化症を診断する方法が開示される。そのような方法は、被験者から得た試験試料をM C P - 1 (および任意に1またはそれ以上の追加のマーカ) の存在または量について分析し、M C P - 1 (および測定した場合には追加のマーカ) の存在または量を用いて被験者におけるアテローム性動脈硬化症の存在または不存在を判定することを含む。この観点においてはM C P - 1 を診断パネルの一部として用いる場合には、そのようなパネルは、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, またはそれ以上の独立したマーカを含んでいてもよく、その少なくとも1つはM C P - 1 である。好ましいパネルは、M C P - 1 および心臓障害の特異的マーカ、神経組織の障害の特異的マーカ、血圧制御に関連するマーカ、炎症に関連するマーカ、凝固およびうっ血に関連するマーカ、およびアポトーシスに関連するマーカからなる群より独立して選択される1またはそれ以上の追加のマーカを含む。

20

【0057】

本発明のマーカパネルは、当業者によく知られる多くの様式で分析することができる。例えば、パネルの各メンバーを、“正常”値、または特定の疾病または帰結を示す値と比較することができる。特定の診断/予後は、各マーカをそのような値と比較することに基づいてもよく、あるいは、マーカのサブセットのみが正常な範囲の外である場合には、このサブセットは特定の診断/予後を示すことができるであろう。例えば、パネル中のあるマーカは心筋梗塞であると判定するかまたはそうではないと判定するために用いることができ、一方、パネルの他のメンバーはうっ血性心不全であると判定するかまたはそうではないと判定することができる、さらにパネルの別のメンバーは、動脈解離であると判定するかまたはそうではないと判定することができる。マーカはまた、例えば、マーカに異なる目的のための異なる閾値または異なる重み係数を適用することにより、一般的に複数の目的のために使用することができる。例えば、マーカを1つの濃度または重み付けで、単独でまたはより大きいパネルの一部として用いて、心筋梗塞であると判定するかまたはそうではないと判定することができ、同じマーカを異なる濃度または重み付けで、単独でまたはより大きいパネルの一部として用いて、うっ血性心不全等であると判定するかまたはそうではないと判定することができる。

30

【0058】

ある態様においては、1またはそれ以上の診断または予後指標を、単に指標の存在または不存在により状態または疾病と関連づける。例えば、アッセイは、あるマーカについてのポジティブシグナルが目的とする特定の閾値濃度より上であるときにのみ生じ、その濃度より下の場合にはアッセイはバックグラウンドより上のシグナルを与えないように設計することができる。別の態様においては、診断または予後指標の閾値濃度を確立し、単に患者試料における指標のレベルを閾値レベルと比較することができる。

40

【0059】

診断および / または予後試験の感度および特異度は、単なる試験の分析の“質”を超えるものによって異なり、すなわち、これらは何が異常な結果を構成するかの定義にも依存する。実用的には、受信者動作特性 (Receiver Operating Characteristic)

50

c t e r i s t i c) 曲線 , すなわち " R O C " 曲線 , は , 典型的には , " 正常 " および " 疾病 " 集団においてある変数の値をその相対的頻度に対してプロットすることにより計算される。任意の特定のマーカーについて , 疾病を有する被験者および有しない被験者についてのマーカーレベルの分布はおそらく重複するであろう。そのような条件下では , 試験は 100 % の正確性をもって正常を疾病から絶対的に区別せず , 重複する面積は , 試験が正常を疾病から区別することができない場合を示す。閾値は , それより高い (またはそれより低い , マーカーが疾病にともなってどのように変化するかによる) 場合に試験は異常であると考えられ , それより低い場合に試験は正常であると考えられるように選択する。R O C 曲線の下面積は , 知覚される測定値が状態の正しい同定を可能とする確率の尺度である。R O C 曲線は , 試験結果が必ずしも正確な数値を与えない場合であっても使用することができる。結果を等級付けすることができる限り , R O C 曲線を作成することができる。例えば , " 疾病 " 試料についての試験の結果を , 程度 (例えば , 1 = 低 , 2 = 正常 , 3 = 高) にしたがって等級付けすることができる。この等級付けは , " 正常な " 集団における結果と相関させることができ , R O C 曲線を作成することができる。これらの方法は当該技術分野においてよく知られている。例えば , H a n l e y e t a l . , R a d i o l o g y 143 : 29 - 36 (1982) を参照。好ましくは , 閾値は , 約 0.5 より大きい , より好ましくは約 0.7 より大きい , さらにより好ましくは約 0.8 より大きい , さらにより好ましくは約 0.85 より大きい , 最も好ましくは約 0.9 より大きい R O C 曲線下面積を与えるように選択される。この文脈において , " 約 " との用語は , 所定の測定値の $\pm 5\%$ を表す。

10

20

【 0 0 6 0 】

本明細書に記載されるように , " パネル応答値 " は , 好ましくは , マーカーの特定のパネルの感度対パネルの 1 - (特異度) を種々のカットオフで R O C 曲線をプロットすることにより決定するこれらの方法においては , 被験者からのマーカーの測定値のプロファイルを統合して単一の値を与え , これはパネルの " 結果 " であると考えられる。すなわち , パネル中の複数のマーカーを一緒に考慮して , 診断または予後の全体的な確率 (数値スコアで表してもよく , パーセンテージリスクで表してもよい) を与えることができる。そのような態様においては , マーカーのあるサブセットにおける増加は , 1 人の患者において特定の診断 / 予後を示すのに十分であるかもしれず , 一方 , マーカーの異なるサブセットは , 別の患者においては同じまたは異なる診断 / 予後を示すのに十分であるかもしれない。また , パネル中の 1 またはそれ以上のマーカーに重み係数を適用することができる。例えば , あるマーカーが特定の診断 / 予後の識別に特に高い有用性を有するものである場合 , 所定のレベルではこれが単独で陽性の結果のシグナルを与えるのに十分であるように重み付けすることができる。同様に , 重み係数は , 特定のマーカーの所定のレベルがなくても陽性の結果のシグナルを与えるのには十分であるが , 別のマーカーもまた分析に寄与する場合にのみ , 結果のシグナルを与えるように提供することができる。

30

【 0 0 6 1 】

ある態様においては , マーカーおよび / またはマーカーパネルは , 少なくとも約 70 % の特異度 , より好ましくは少なくとも約 80 % の特異度 , さらにより好ましくは少なくとも約 85 % の特異度 , さらにより好ましくは少なくとも約 90 % の特異度 , 最も好ましくは少なくとも約 95 % の特異度と組み合わせ , 少なくとも約 70 % の感度 , より好ましくは少なくとも約 80 % の感度 , さらにより好ましくは少なくとも約 85 % の感度 , さらにより好ましくは少なくとも約 90 % の感度 , 最も好ましくは少なくとも約 95 % の感度を示すよう選択する。特に好ましい態様においては , 感度および特異度のいずれも , 少なくとも約 75 % , より好ましくは少なくとも約 80 % , さらにより好ましくは少なくとも約 85 % , さらにより好ましくは少なくとも約 90 % , 最も好ましくは少なくとも約 95 % である。この文脈において , " 約 " との用語は , 所定の測定値 $\pm 5\%$ を表す。

40

【 0 0 6 2 】

別の態様においては , 試験がリスクを予測するかまたは疾病を診断する能力の尺度として , ポジティブ尤度比 , ネガティブ尤度比 , オッズ比 , またはハザード比を用いる。ポジ

50

ティブ尤度比の場合，1の値は，“疾病を有する”および“対照”群の被験者の間でポジティブの結果が等しく起こりそうであることを示し；1より大きい値は，疾病群においてポジティブの結果がより起こりそうであることを示し；1より小さい値は，対照群においてポジティブの結果がより起こりそうであることを示す。ネガティブ尤度比の場合，1の値は，ネガティブの結果が“疾病を有する”および“対照”群の被験者の間で等しく起こりそうであることを示し；1より大きい値は，試験群においてネガティブの結果がより起こりそうであることを示し；1より小さい値は，対照群においてネガティブの結果がより起こりそうであることを示す。ある好ましい態様においては，マーカーおよび/またはマーカーパネルは，好ましくは，少なくとも約1.5またはそれ以上または約0.67またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約2またはそれ以上または約0.5またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約5またはそれ以上または約0.2またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約10またはそれ以上または約0.1またはそれ以下，最も好ましくは少なくとも約20またはそれ以上または約0.05またはそれ以下のポジティブまたはネガティブ尤度比を示すよう選択される。この文脈において，“約”との用語は，所定の測定値の+/-5%を表す。

【0063】

オッズ比の場合，1の値は，“疾病を有する”および“対照”群の両方の被験者においてポジティブの結果が同等に起こりそうであることを示し；1より大きい値は，疾病群においてポジティブの結果がより起こりそうであることを示し；1より小さい値は，対照群においてポジティブの結果がより起こりそうであることを示す。ある好ましい態様においては，マーカーおよび/またはマーカーパネルは，好ましくは，少なくとも約2またはそれ以上または約0.5またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約3またはそれ以上または約0.33またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約4またはそれ以上または約0.25またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約5またはそれ以上または約0.2またはそれ以下，最も好ましくは少なくとも約10またはそれ以上または約0.1またはそれ以下のオッズ比を示すよう選択される。この文脈において，“約”との用語は，所定の測定値の+/-5%を表す。

【0064】

ハザード比の場合，1の値は“疾病を有する”および“対照”群の両方でエンドポイント（例えば死亡）の相対的リスクが等しいことを示し；1より大きい値は疾病群においてリスクがより高いことを示し；1より小さい値は対照群においてリスクがより高いことを示す。ある好ましい態様においては，マーカーおよび/またはマーカーパネルは，好ましくは，少なくとも約1.1またはそれ以上または約0.91またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約1.25またはそれ以上または約0.8またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約1.5またはそれ以上または約0.67またはそれ以下，さらに好ましくは少なくとも約2またはそれ以上または約0.5またはそれ以下，および最も好ましくは少なくとも約2.5またはそれ以上または約0.4またはそれ以下のハザード比を示すよう選択される。この文脈において，“約”との用語は，所与の測定値の+/-5%を表す。

【0065】

当業者には，診断または予後指標を，診断と，または将来の臨床的帰結のリスクの予後と関連づけることは統計学的な分析であることが理解されるであろう。例えば，統計学的に有意なレベルにより判定して，Xより大きいマーカーレベルは，患者が，Xと同じかそれより低いレベルを有する患者よりも有害な帰結によりかかりやすいことを示すことができる。さらに，ベースラインレベルからのマーカー濃度の変化は，患者の予後を反映することができ，マーカーレベルの変化の程度は，有害事象の重篤性と関連しうる。統計学的有意性は，しばしば，2またはそれ以上の集団を比較し，信頼区間および/またはp値を決定することにより判定される。例えば，Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983を参照。本発明の好ましい信頼区間は，90%，95%，97.5

%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% および 99.99% であり, 一方, 好ましい p 値は, 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, および 0.0001 である。

【0066】

さらに別の態様においては, 本明細書に記載される 1 またはそれ以上の診断または予後マーカーを多数回測定することができ, マーカーの経時的变化を用いて診断または予後を判定することができる。例えば, 被験者試料中のマーカー濃度を最初の時点に測定し, 第 2 の時点で第 2 の被験者試料から再び測定することができる。そのような態様においては, 最初の時点から第 2 の時点へのマーカーの増加は特定の診断, または特定の予後を示すことができる。同様に, 最初の時点から第 2 の時点へのマーカーの減少は, 特定の診断, または特定の予後を示すことができる。この“経時的变化”のパラメータは, 本発明のマーカーパネルにおけるマーカーとして含めることができる。関連する態様においては, 1 またはそれ以上の診断または予後マーカーを多数回測定することができ, マーカーの経時的变化を用いて, 適切な治療法の効力をモニターすることができる。そのような態様においては, 有効な治療の経過の間にわたるマーカーの減少または増加が見られると予測することができる。

10

【0067】

ある態様においては, 複数の時点における同じ診断マーカーの比較測定を行うが, 当業者には, 所定のマーカーを 1 つの時点で測定し, 第 2 のマーカーを第 2 の時点で測定し, これらのマーカーの比較が診断情報を提供することが理解されるであろう。同様に, 当業者には, 一連の測定およびマーカーの変化またはある期間にわたる組み合わせた結果もまた診断および/または予後の価値があることが理解されるであろう。

20

【0068】

別の態様においては, 予後または診断指標のレベルの変化の閾値の値を確立することができ, 患者試料における指標のレベルの変化の程度を単純にレベルの変化の閾値の値と比較することができる。本発明のマーカーのレベルにおける好ましい閾値変化は, 約 5%, 約 10%, 約 15%, 約 20%, 約 25%, 約 30%, 約 50%, 約 75%, 約 100%, および約 150% である。この文脈においては, “約” との用語は, + / - 10% を表す。さらに別の態様においては, 予後または診断指標のレベルを直接関連する所定の帰結に向かう素因と関連づけることができる“ノモグラム”を確立することができる。当業者は, 集団の平均ではなく個々の試料の測定値を参照するため, この測定値の不確定性はマーカー濃度の不確定性と同じであることを理解したうえで, そのようなノモグラムを用いて 2 つの数値を関連づけることを熟知している。

30

【0069】

さらに別の観点においては, 本発明は, 被験者において用いるための治療計画を決定する方法に関する。この方法は, 好ましくは, 本明細書に記載されるようにして診断または予後を判定すること, およびその診断に適当な 1 またはそれ以上の治療計画を選択することを含む。好ましい態様においては, 治療計画は, 診断に関連する有害な帰結の素因を低下させることにより, 被験者の予後が改善されるように選択される。そのような方法はまた, 上述のように患者の予後を改良することができる薬剤について医薬化合物をスクリーニングするためにも用いることができる。

40

【0070】

さらに別の観点においては, 本発明は, 患者の診断または予後を判定するためのキットおよびデバイスに関する。キットは, 好ましくは, 本明細書に記載されるアッセイを行うためのデバイスおよび試薬, および, アッセイを行うための指針を含む。そのようなデバイスは, 好ましくは, そのそれぞれが目的とする特定のマーカーに関連する, 複数の別々の, 独立してアドレス可能な位置, もしくは“診断ゾーン”を含む。試料をデバイスと反応させた後, 診断ゾーンからシグナルが発生し, 次にこれを目的とするマーカーの存在または量と関連づける。キットは, マーカーレベルを診断または予後に変換するための 1 またはそれ以上の手段を任意に含んでいてもよい。そのようなキットは, 好ましくは, 1 回ま

50

たはそれ以上のそのような判定を行うのに十分な試薬，および／または米国食品医薬品局（FDA）または他の政府により認可された標識を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0071】

発明の詳細な説明

本発明は，症状に基づく被験者における疾病の鑑別診断の方法および組成物に関する。

【0072】

医学的治療に現れた患者は，しばしば，疾病を示す身体の特長または機能における1つまたはいくつかの最初の観察可能な変化を示す。しばしば，これらの"症状"は，多数の可能性のある疾病が同じ観察される症状を示しうるという点で，非特異的である。非特異的
10 症状の典型的なリストは，以下の1またはそれ以上を含みうる：息切れ（または呼吸困難），胸の痛み，発熱，めまい感および頭痛。これらの症状は，非常に一般的でありえ，臨床医が考慮しなければならない疾病の数は驚くほど多い。

【0073】

一例として息切れ（臨床的には"呼吸困難"と称される）をとりあげると，この症状は単独で考える場合には，ぜん息，慢性閉塞性肺疾病（"COPD"），気管狭窄，肺障害，閉塞性気管支内腫瘍，肺線維症，じん肺症，癌性リンパ管炎，脊柱後側弯症，胸水，筋萎縮性側索硬化症，うっ血性心不全，冠状動脈疾病，心筋梗塞，心房性細動，心筋症，弁機能不全，左心室肥大，心膜炎，不整脈，肺塞栓症，代謝性アシドーシス，慢性気管支炎，肺炎，不安，敗血症，動脈瘤切開等の多様な状態を示すことができる。例えば，Kelle
20 y's Textbook of Internal Medicine, 4th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000, pp. 2349 - 2354, "Approach to the Patient With Dysnea"; Mulrow et al., J. Gen. Int. Med. 8: 383 - 92 (1993)を参照。

【0074】

同様に，胸の痛みは，単独で考える場合には，安定性アンギナ，不安定性アンギナ，心筋虚血，心房性細動，心筋梗塞，筋骨格の創傷，胆嚢炎，胃食道の逆流，肺塞栓症，心膜炎，動脈解離，肺炎，不安等を示しうる。さらに，決定的な心筋梗塞以外の場合に，胸の痛みを安定性または不安定性アンギナ（またはさらに軽い心筋梗塞）として分類することは完全に主観的である。診断，およびこの場合には区別は，動脈閉塞の程度を定量しうる
30 血管造影法によらずに，医師による臨床症状の解釈により行われる。

【0075】

鑑別診断とは，被験者から観察される特徴的な特性とこれらの可能性のある疾病の特徴的な特性との比較に基づいて，特定の被験者における症状の根底にある特定の疾病および／または状態を診断する方法を表す。鑑別診断において考慮しなければならない疾病および状態の広さに応じて，臨床医が依頼しなければならない試験の種類および数は非常に多数となりうる。例えば，呼吸困難の場合，臨床医は，X線撮影，心電図，踏み輪運動試験，血液化学分析，心エコー検査，気管支刺激試験，肺活量測定，脈酸素測定，食道pHモニタリング，喉頭鏡検査，コンピュータ連動断層撮影，組織学，細胞学，磁気共鳴画像法
40 等を含む群から試験を依頼するであろう。例えば，Morgan and Hodge, Am. Fam. Physician 57: 711 - 16 (1998)を参照。次に，臨床医は，一連の試験から得られた情報を統合して，症状の範囲および／または被験者について得られた診断試験結果を最も密接に表す臨床診断につなげる。

【0076】

本発明は，観察される症状について可能性のある病因論の1つ，および好ましくは複数であると判定するかまたはそうではないと判定するように設計された診断マーカーを提供することにより，1またはそれ以上の非特異的症状の鑑別診断を助けることができる方法および組成物を記述する。本明細書に記載される症状に基づく鑑別診断の概念は，一緒に考慮して患者において観察される非特異的症状の基礎となる可能な疾病を区別するよう設
50

計されている診断マーカーのパネルを提供することができる。

【0077】

本明細書において用いる場合，“発熱”との用語は，口腔で100（Cまたは直腸で100.8（Cより高い体温を表す。発熱の場合，複数のマーカーは，好ましくは，以下の複数であると判定するかまたはそうではないと判定するよう選択される：敗血症；動脈炎；サルコイドーシス；および1またはそれ以上の感染性疾患，例えば，*Staphylococcus species*，*Neisseria species*，*Pneumococcal species*，*Listeria species*，*Anthrax*，*Nocardia species*，*Salmonella species*，*Shigella species*，*Haemophilus species*，*Brucella species*，*Vibrio species*，例えば*V. cholerae*，*Francisella tularensis*，*Yersinia pestis*，*Pseudomonas species*，*Clostridia species*，例えば*C. tetani*，*C. perfringens*，*C. ramosum*，*C. botulinum*，および*C. septicum*，*Actinomyces species*，*Treponema pallidum*，*Borrelia species*，例えば*B. burgdorferi*，*Leptospira species*，*Mycobacterium species*，例えば，*M. tuberculosis*，*M. bovis*，*M. leprae*，および*M. africanum*，*Histoplasma species*，*Escherichia coli*，*Coccidioides species*，*Blastomyces species*，*Paracoccidioides species*，*Sporothrix species*，*Cryptococcus species*，*Candida species*，および*Aspergillus species*による感染；リケッチア病，例えば，ロッキー山熱，Q熱，発疹チフス，壟壕熱，および猫ひっかき発熱；寄生虫病，例えば，マラリア，バベシア症，アフリカ睡眠病，トリパノソーマ症，リーシュマニア症，トキソプラズマ症，およびアメーバ症；インフルエンザウイルス，パラインフルエンザウイルス，ムンプウイルス，アデノウイルス，RSウイルス，ライノウイルス，ポリオウイルス，コクサッキーウイルス，ECHOウイルス，麻疹ウイルス，風疹ウイルス，パルボウイルス，A，B，C，D，またはE型肝炎ウイルス，サイトメガロウイルス，エプスタインバーウイルス，ヘルペス単純ウイルス，水痘-帯状疱疹ウイルス，アルファウイルス，フラビウイルス，例えば，黄熱病ウイルス，デング熱ウイルス，日本脳炎ウイルス，およびセントルイス脳炎ウイルス，西ナイルウイルス，コロラドダニ熱ウイルス，狂犬病ウイルス，アレナウイルス，マルブルク病原体，およびエボラウイルスによるウイルス感染。

【0078】

本明細書において用いる場合，“神経機能不全”との用語は，神経性の病因を有する，1またはそれ以上の正常の生理学的機能または精神的機能の喪失を表す。当業者には，神経機能不全は，種々の全身疾患における一般的な症状であることが理解されるであろう（例えば，アルコール中毒症，血管疾患，発作，自己免疫疾患，代謝性疾患，加齢など）。特定の神経機能不全には，限定されないが，痛み，頭痛，失語症，行動不能症，認知不能症，健忘症，昏迷，昏睡，せん妄，痴呆，てんかん，片頭痛，不眠症，睡眠過剰，睡眠時無呼吸，震え，運動異常症，麻痺等が含まれる。

【0079】

本明細書において用いる場合，“高血圧”との用語は，140 mmHg以上の収縮期血圧および/または90 mmHg以上の拡張期血圧を表す。高血圧には，孤立性収縮期高血圧（すなわち，拡張期血圧は上昇しない）も含まれる。高血圧の場合，複数のマーカーは，好ましくは，以下の複数であると判定するかまたはそうではないと判定するよう選択される：左心室不全，アテローム性動脈硬化症，腎臓疾患，例えば，慢性糸球体腎炎，および多発性嚢胞腎，大動脈の接合，腎動脈狭窄，および上皮小体機能亢進症。

【0080】

本明細書において用いる場合，“症状の鑑別診断の中の状態”との用語は，その病的状態に罹患した被験者が正常な被験者と比較して示す1またはそれ以上の物理学的特徴の特定の知覚しうる変化の原因となることが知られている病的状態を表す。鑑別診断の概念は当業者にはよく確立されている。例えば，Beck, Tutorials in Differential Diagnosis, Churchill Livingstone, 2002; Zackon, Pulmonary Differential Diagnosis, Elsevier, 2000; Jamison, Differential Diagnosis for Primary Practice, Churchill Livingstone, 1999; Bouchier et al., French's Index of Differential Diagnosis, Oxford University Press, 1997を参照。 10

【0081】

本明細書において用いる場合，“マーカー”との用語は，被験者から得た試験試料のスクリーニングの標的として用いるべき，蛋白質，ポリペプチド，糖蛋白質，プロテオグリカン，脂質，リポ蛋白質，糖脂質，リン脂質，核酸，炭水化物などの，小分子，または被験者の1またはそれ以上の他の特徴を表す。本発明においてマーカーとして用いられる“蛋白質またはポリペプチド”は，そのいずれかのフラグメント，特に免疫学的に検出可能なフラグメントを含むことが企図される。本明細書において用いる場合，“マーカー”には，以下に定義される誘導されたマーカーも含まれ，例えば，患者の病歴，年齢，性別および人種のような特性も含まれる。 20

【0082】

本明細書において用いる場合，“誘導されたマーカー”との用語は，1またはそれ以上の測定されたマーカーの関数である値を表す。例えば，誘導されたマーカーは，1またはそれ以上の測定されたマーカー値の時間間隔にわたる変化と関連していてもよく，測定されたマーカー値の比率と関連していてもよく，異なる測定時間におけるマーカー値であってもよく，または複雑な関数，例えば，パネル応答関数であってもよい。

【0083】

本明細書において用いる場合，“関連するマーカー”との用語は，マーカーそれ自体の代理物または独立したマーカーとして検出することができる，特定のマーカーの1またはそれ以上のフラグメントまたはその生合成の親を表す。例えば，ヒトBNPは，108アミノ酸の前駆体分子（本明細書においてBNP₁₋₁₀₈と称される）の蛋白質分解により得られる。成熟BNP，または“BNPナトリウム利尿ペプチド”または“BNP-32”は，この前駆体のアミノ酸77-108である32アミノ酸の分子であり，これはBNP₇₇₋₁₀₈とも称される。残りの残基1-76は本明細書においてBNP₁₋₇₆と称される。さらに，関連するマーカーは，親マーカーの共有結合的な修飾，例えば，メチオニン残基の酸化，ユビキチン化，システイン化，ニトロシル化，グリコシル化などの結果であってもよい。 30

【0084】

さらに，例としてBNPを考えると，108アミノ酸のBNP前駆体であるpro-BNP（BNP₁₋₁₀₈）の配列は以下に示すとおりであり，成熟BNP（BNP₇₇₋₁₀₈）には下線が施されている。 40

【化1】

```
HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSE LQVEQTSLEP LQESPRPTGV 50
WKSREVATEG IRGHRKMVLY TLRAPRSPKM VQSGSCFGRK MDRISSSSGL 100
GCKVLRHH 108
```

（配列番号1）

【0085】

BNP₁₋₁₀₈は，より大きい前駆体であるpre-pro-BNPとして合成され，こ 50

れは以下の配列を有する (" p r e "配列は太字で示される) :

【化 2】

MDPQTAPSRA LLLLLFLHLA **FLGGRSHPLG** SPGSASDLET SGLQEQRNHL 50
 QGKLSELQVE QTSLEPLQES PRPTGVWKS **R** EVATEGIRGH **R**KMVLTYTLRA 100
 PRSPKMVQGS GCFGRKMDRI SSSSGLGCKV LRRH 134

(配列番号 2)

【 0 0 8 6 】

本発明においては、成熟BNPそれ自体をマーカーとして用いることができるが、p r e p r o - B N P , B N P ₁₋₁₀₈およびBNP₁₋₇₆分子は、成熟BNPの代替として測定しても、またはそれ自体マーカーとして測定してもよいBNP関連マーカーである。さらに、これらの分子の1またはそれ以上のフラグメント、例えば、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₇₆₋₁₀₇、BNP₆₉₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₀₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₃₉₋₈₆、BNP₅₃₋₈₅、BNP₆₆₋₉₈、BNP₃₀₋₁₀₃、BNP₁₁₋₁₀₇、BNP₉₋₁₀₆、およびBNP₃₋₁₀₈からなる群より選択されるBNP関連ポリペプチドもまた循環中に存在しうる。さらに、ナトリウム利尿ペプチドフラグメント、例えばBNPフラグメントは、1またはそれ以上の酸化可能なメチオニンを含んでいてもよい。メチオニンのメチオニンスルホキシドまたはメチオニンスルホンへの酸化は、追加のBNP関連マーカーを生成する。例えば、米国特許10/419,059(2003年4月17日出願、すべての表、図面および特許請求の範囲を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)を参照。

【 0 0 8 7 】

マーカーフラグメントの生成は進行中のプロセスであり、とりわけ、マーカーを組織中に放出することを誘発した事象の開始から試料の取得または分析時までの経過時間；試料の入手から試料の分析時までの経過時間；問題とする組織試料のタイプ；保存条件；存在する蛋白質分解性酵素の量等の関数であるため、正確な予後または診断結果を得るためには、1またはそれ以上のマーカーのアッセイを設計する時、およびそのようなアッセイを行う時の両方で、この分解を考慮することが必要であろう。さらに、複数のマーカーフラグメントを区別する個々の抗体を個別に用いて、異なるフラグメントの存在または量を別々に検出することができる。この個別の検出の結果は、複数のフラグメントを単一のアッセイで検出するよりも、より正確な予後または診断結果を提供することができる。例えば、種々のフラグメントの測定値に異なる重み係数を適用して、試料中に元々存在したナトリウム利尿ペプチドの量のより正確な見積を得ることができる。

【 0 0 8 8 】

同様に、本明細書に記載されるマーカーの多くは、より大きな前駆体分子として合成され、次にプロセシングされて成熟マーカーが得られる；および/または、マーカーのフラグメントの形で循環中に存在する。すなわち、本明細書に記載されるマーカーのそれぞれに“関連するマーカー”を同定することができ、BNPについて上述したものと類似の様式で用いることができる。

【 0 0 8 9 】

循環からのポリペプチドマーカーの除去には、しばしば分解経路が関与する。さらに、そのような分解経路の阻害剤は、ある種の疾病の治療において有望であるかもしれない。例えば、Trindade and Rouleau, Heart Fail. Monit. 2: 2-7, 2001を参照。しかし、ポリペプチドマーカーの測定は、一般に、分子の分解状態を考慮せずは無傷な形の測定に焦点をあてている。試料中の生物学的に活性な形の特定のポリペプチドマーカーを正確に測定するためには、ポリペプチドマーカーの分解経路およびこの分解の間に生ずる生成物を理解したうえで、アッセイを設計することができる。目的とする生物学的に活性なポリペプチドマーカーとマーカーに由来する不活性なフラグメントとを意図せずに測定すると、試料中の生物学的に活性な形の濃度が過大

評価される。

【0090】

臨床試料中に存在するかもしれない分解フラグメントを考慮しないことは、診断または予後方法の正確性に関して重要な意味を有するであろう。例えばBNP用のサンドウィッチイムノアッセイを提供する簡単な場合を考えると、存在していた生物学的に活性なBNPの相当な量（例えば、50%）が、今や不活性な形に分解されている。生物学的に活性なBNPおよび不活性なフラグメントに共通する領域に結合する抗体を用いて作成したイムノアッセイは、試料中に存在する生物学的に活性なBNPの量を2倍過大評価して、“擬陽性”の結果を与える可能性がある。試料中に存在する生物学的に活性な形の過大評価はまた、患者の管理に対して重要な意味を有する。ここでも例としてBNPを考えると、BNP濃度は、治療が有効であるか否かを判定するために用いることができる（例えば、BNPをモニターすることにより、治療により上昇したレベルが正常に戻るか否かを見る）。上で説明したものと同一“擬陽性”のBNPの結果は、現在の治療が有効ではないという偽の印象のため、医師が治療を継続、増加または改変することにつながるであろう。

10

【0091】

同様に、本明細書に記載される1またはそれ以上のマーカーの複合体状態を考慮することが必要であろう。例えば、トロポニンは、筋肉中で、主として3つのトロポニンポリペプチド（T、IおよびC）を含む“三成分複合体”として存在する。しかし、トロポニンIおよびトロポニンTは、I/T/C三成分複合体ではない形で血液中に循環している。むしろ、（i）遊離心臓特異的トロポニンI、（ii）二成分複合体（例えば、トロポニンI/C複合体）、および（iii）三成分複合体のそれぞれは、すべて血液中で循環している。さらに、トロポニンIおよびTの“複合体状態”は患者中で時間と共に、例えば、遊離トロポニンポリペプチドが他の循環トロポニンポリペプチドに結合することにより、変化する。蛋白質マーカーの“複合体状態”を考慮しないイムノアッセイは、存在するマーカーのすべての検出することができないであろう。

20

【0092】

好ましくは、本明細書に記載される方法は、被験者に由来する1またはそれ以上のマーカーを利用する。本明細書において用いる場合、“被験者に由来するマーカー”との用語は、被験者の1またはそれ以上の細胞により発現されるかまたは産生される蛋白質、ポリペプチド、リン脂質、核酸、プリオン、糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質、脂質、リポ蛋白質、炭水化物、または小分子マーカーを表す。1またはそれ以上のマーカーの存在、非存在、量、または量の変化は、特定の疾病が存在することを示すことができ、または特定の疾病が存在しないことを示すことができる。被験者に由来するものではない追加のマーカー、例えば、病原性または感染性生物により発現される特定の疾病と関連づけられている分子、人種、開始からの時間、性別等々を用いることができる。そのようなマーカーは、好ましくは、上述の感染性疾病を同定する蛋白質、ポリペプチド、リン脂質、核酸、プリオン、または小分子マーカーである。

30

【0093】

本明細書において用いる場合、“試験試料”との用語は、目的とする被験者、例えば患者の診断、予後、または評価の目的で取得される体液の試料を表す。ある態様においては、そのような試料は、進行中の状態の帰結または状態に対する治療計画の影響を判定する目的で取得することができる。好ましい試験試料としては、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、涙液、および胸水が挙げられる。さらに、当業者には、ある種の試験試料は、分画または精製工程の後、例えば、全血液を分離して血清または血漿成分とした後に、より容易に分析されることが理解されるであろう。

40

【0094】

本明細書において用いる場合、“複数の”とは、少なくとも2つを表す。好ましくは、複数のとは少なくとも3、より好ましくは少なくとも5、さらにより好ましくは少なくとも10、さらにより好ましくは少なくとも15、最も好ましくは少なくとも20を表す。特に好ましい態様においては、複数のとは多数、すなわち少なくとも100を表す。

50

【 0 0 9 5 】

本明細書において用いる場合，“被験者”との用語は，ヒトまたは非ヒト生物を表す。すなわち，本明細書に記載される方法および組成物は，ヒトおよび獣医学的疾患の両方に適用可能である。さらに，被験者は好ましくは生きている生物であるが，本明細書に記載される本発明は，死後分析にも同様に用いることができる。好ましい被験者は，“患者”，すなわち医学的治療を受けている生きているヒトである。これには，病因の兆候について調べているが明確な病気を持たない者も含まれる。

【 0 0 9 6 】

本明細書において用いる場合，“診断”との用語は，当業者が患者が所定の疾病または状態に罹患しているか否かを評価および／または判定することができる方法を表す。当業者はしばしば，その存在，非存在，または量が，その状態の存在，重篤度，または非存在を示す１またはそれ以上の診断指標，すなわちマーカーに基づいて診断を行う。

10

【 0 0 9 7 】

同様に，“予後”はしばしば，１またはそれ以上の“予後指標”を調べることにより判定される。これらは，患者（または患者から得た試料）におけるその存在または量が所定の経過または帰結が生ずるであろう確率を示すマーカーである。例えば，そのような患者から得た試料中の１またはそれ以上の予後指標が十分に高いレベルに達している場合，そのレベルは，患者が，より低いマーカーレベルを示す同様の患者と比較して，将来の発作の確率が増加していることを示すことができる。予後指標のレベルまたはレベルの変化（次に罹患または死亡の確率の増加と関連づけられる）は，患者における“有害な帰結の疾病素質の増加と関連する”と称される。好ましい予後マーカーは，発作後の患者における遅延型神経学的欠損の開始，または将来の発作の確率を予測することができる。

20

【 0 0 9 8 】

本明細書において用いる場合，診断および予後マーカーの使用に関して“関連づける”との用語は，患者におけるマーカーの存在または量を，所定の状態に罹患していることが知られているかそのリスクを有することが知られている者，または所定の状態を有しないことが知られている者におけるその存在または量と比較することを表す。上で説明したように，患者試料におけるマーカーレベルを，特定の診断と関連することが知られているレベルと比較することができる。試料のマーカーレベルは，診断と関連づけられていると言われる。すなわち，当業者は，マーカーレベルを用いて，患者が特定のタイプの診断に罹患しており，そのように応じているか否かを判定することができる。あるいは，試料のマーカーレベルを，良い帰結（例えば，疾病が存在しないこと等）と関連することが知られているマーカーレベルと比較することができる。好ましい態様においては，マーカーレベルのプロファイルを全体的な確率または特定の帰結と関連づける。

30

【 0 0 9 9 】

本明細書において用いる場合，“診断を判定する”との句は，当業者がある患者における特定の疾患の存在または不存在を判定することができる方法を表す。“診断”との用語は，特定の疾患の存在または不存在を１００％の正確性で判定する能力を表すものではなく，所定の経過または帰結がより起こりやすいことを表すものでもない。そうではなく，当業者には，“診断”との用語は，被験者にある種の疾患が存在する確率が増加していることを表すことが理解されるであろう。好ましい態様においては，診断は，疾病が存在する約５％増加した確率，約１０％の確率，約１５％の確率，約２０％の確率，約２５％の確率，約３０％の確率，約４０％の確率，約５０％の確率，約６０％の確率，約７５％の確率，約９０％の確率，および約９５％の確率を示す。この文脈において，“約”との用語は，＋／－２％を表す。

40

【 0 1 0 0 】

同様に，本明細書において用いる場合，“予後を判定する”との句は，当業者がある患者について１またはそれ以上の将来の臨床的帰結の尤度を判定することができる方法を表す。当業者には，“予後”との用語は，被験者において将来ある種の臨床的帰結が生ずるであろう確率が増加していることを表すことが理解されるであろう。好ましい態様におい

50

ては、予後は、“対照”集団と比較してある種の臨床的帰結となる約5%増加した確率、約10%の確率、約15%の確率、約20%の確率、約25%の確率、約30%の確率、約40%の確率、約50%の確率、約60%の確率、約75%の確率、約90%の確率、および約95%の確率を示す。この文脈において、“約”との用語は、+/-2%を表す。

【0101】

本明細書において用いる場合、“別々の”との用語は、非連続的な表面の領域を表す。すなわち、いずれの領域の一部でもない境界が2つの領域を完全に囲んでいる場合、2つの領域は互いに別々である。

【0102】

本明細書において用いる場合、“独立してアドレス可能な”との用語は、そこから特異的シグナルを得ることができる表面の別々の領域を表す。

【0103】

本明細書において用いる場合、“抗体”との用語は、イムノグロブリン遺伝子、またはこれらのフラグメントから誘導されるか、これをモデルとするか、または実質的にコードされ、抗原またはエピトープに特異的に結合しうるペプチドまたはポリペプチドを表す。例えば、Fundamental Immunology, 3rd Edition, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175: 267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25: 85-97を参照。抗体との用語は、抗原結合部位、すなわち、抗原に結合する能力を保持した“抗原結合部位”（例えば、フラグメント、サブ配列、相補性決定領域(CDR)）を含み、例えば、(i) Fabフラグメント、VL, VH, CLおよびCH1ドメインから構成される一価フラグメント；(ii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント；(iii) VHおよびCH1ドメインから構成されるFdフラグメント；(iv) 抗体の1つのアームのVLおよびVHドメインから構成されるFvフラグメント；(v) VHドメインから構成されるdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)；および(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。“抗体”との用語には一本鎖抗体も含まれる。

【0104】

本明細書において用いる場合、“心筋の障害の特異的マーカー”との用語は、典型的には心臓組織に関連し、心臓障害と関連づけることができるが、他のタイプの創傷とは関連づけられない分子を表す。そのような心臓障害の特異的マーカーには、アネキシンV、B型ナトリウム利尿ペプチド、β-エノラーゼ、心臓トロポニンI（遊離型および/または複合体型）、心臓トロポニンT（遊離型および/または複合体型）、クレアチンキナーゼ-MB、グリコゲンホスホリラーゼ-BB、心臓型脂肪酸結合蛋白質、ホスホグリセリン酸ムターゼ-MB、およびS-100a_oが含まれる。

【0105】

本明細書において用いる場合、“神経組織の障害の特異的マーカー”との用語は、典型的には神経組織に関連し、神経創傷と関連づけることができるが他のタイプの創傷とは関連づけられない分子を表す。例示的な神経組織の障害の特異的マーカーは以下に詳細に説明する。

【0106】

呼吸困難（息切れ）の鑑別診断

以下に記載される本発明は、呼吸困難に関連する疾病および状態の鑑別診断について一般的に説明する。しかし、当業者には、本明細書に記載される症状に基づく鑑別診断の概念は、一般に複数の可能性のある病因を示す任意の物理学的特性、例えば、発熱、神経機能不全、胸の痛み（“アンギナ”）、めまい感、頭痛に適用しうることで理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【0107】

症状に基づく鑑別診断のための適切なマーカーの同定の第1段階では、観察される非特異的症状の原因であるかもしれない可能性のある診断を考慮することが必要である。呼吸困難の場合、可能な原因は無数にある。好ましい態様においては、以下の説明は3つの可能な診断、すなわち、うっ血性心不全、肺塞栓症、および心筋梗塞を考慮し、これらの可能性のある診断用の鑑別診断パネルに含めるための3つの可能なマーカー、すなわち、それぞれBNP、D-ダイマー、および心臓トロポニンを考慮する。別の好ましい態様においては、3つの可能な診断、すなわち、うっ血性心不全、肺塞栓症、および心筋梗塞のためのマーカーは、鑑別診断パネル中に3つの可能なマーカー、すなわち、それぞれBNP関連ペプチド、D-ダイマー、および心臓トロポニンを含む。好ましい態様においては、呼吸困難の場合の3つの可能な診断には、うっ血性心不全、肺塞栓症、および心筋梗塞が含まれる。第2の好ましい態様においては、呼吸困難の場合の4つの可能な診断には、うっ血性心不全、肺塞栓症、および心筋梗塞、および心房性細動が含まれる。鑑別診断パネルに含めるための可能性のあるマーカーには、以下の1またはそれ以上が含まれる：BNP、BNP関連ペプチド、D-ダイマー、心臓トロポニン、ANP、およびANP関連ペプチド。

10

【0108】

BNP

B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は、脳型ナトリウム利尿ペプチドとも称される、32アミノ酸の4kDaのペプチドであり、血圧および体液バランスを制御するナトリウム排泄増加系に関与している(Bonow, R.O., Circulation 93:1946-1950(1996))。BNPの前駆体は108アミノ酸の分子("preproBNP"と称される)として合成され、蛋白質分解的にプロセシングされて、76アミノ酸のN末端ペプチド(アミノ酸1-76)("NTproBNP"と称される)および32アミノ酸の成熟ホルモン(BNPまたはBNP32(アミノ酸77-108))となる。これらの種(NTpro-BNP, BNP-32, およびpreproBNP)のそれぞれがヒト血漿中で循環しうることが示唆されている(Tateyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 185:760-7(1992); Hunt et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:1175-83(1995))。2つの形、すなわちpreproBNPおよびNTproBNP、およびBNPから誘導され、BNP, NTproBNPおよびpreproBNPの蛋白質分解の結果として血液中に存在するペプチドであるpreproBNPおよびNTproBNPは、まとめてBNPに関連するマーカーとして説明する。

20

30

【0109】

BNPおよびBNP関連ペプチドは、主として心室の分泌顆粒において見いだされ、心室体積の拡大および圧力過負荷の両方に応答して心臓から放出される(Wilkins, M. et al., Lancet 349:1307-10(1997))。BNPの上昇は、心房および肺の楔(wedge)圧の上昇、心室収縮期および拡張期機能の低下、左心室肥大、および心筋梗塞と関連する(Sagnella, G.A., Clinical Science 95:519-29(1998))。さらに、うっ血性心不全および腎不全に伴うBNP濃度の上昇の多くの報告がある。すなわち、患者のBNPレベルは、呼吸困難の根底にあるいくつかの可能な原因を示すことができる。

40

【0110】

D-ダイマー

D-ダイマーは、架橋されたフィブリン分解産物であり、およその分子量200kDaを有する。D-ダイマーの正常な血漿濃度は<150ng/ml(750pM)である。D-ダイマーの血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する患者で上昇するが、安定性アンギナでは上昇しない(Hoffmeister, H.M. et al., Circulation 91:2520-27(1995); Bayes-Gen

50

is, A. et al., Thromb. Haemost. 81: 865 - 68 (1999); Gurfinkel, E. et al., Br. Heart J. 71: 151 - 55 (1994); Kruskal, J. B. et al., N. Engl. J. Med. 317: 1361 - 65 (1987); Tanaka, M. and Suzuki, A., Thromb. Res. 76: 289 - 98 (1994)).

【0111】

D - ダイマーの血漿濃度はまた、凝固およびフィブリン溶解活性化にともなう任意の状態、例えば、発作、手術、アテローム性動脈硬化症、外傷、および血栓性特発性血小板減少性紫斑病の間に上昇するであろう。D - ダイマーは、プラスミンによる蛋白質分解性の凝塊溶解の直後に血流中に放出される。D - ダイマーの血漿濃度は、不安定性アンギナを有する患者において $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ を超える場合がある (Gurfinkel, E. et al., Br. Heart J. 71: 151 - 55 (1994))。血漿 D - ダイマーは、フィブリン溶解の特異的マーカーであり、急性心筋梗塞および不安定性アンギナに伴うプロ血栓性状態の存在を示す。D - ダイマーの血漿濃度はまた、急性肺塞栓症を有する患者でもほぼ常に上昇している。すなわち、正常なレベルの D - ダイマーによって、肺塞栓症ではないと判断することができる (Egermayer et al., Thorax 53: 830 - 34 (1998))。

【0112】

心臓トロポニン

トロポニン I (TnI) は、トロポニン複合体の 25 kDa の阻害要素であり、筋肉組織に見いだされる。TnI は、 Ca^{2+} の非存在下でアクチンに結合し、アクトミオシンの ATPase 活性を阻害する。心臓組織に見いだされる TnI アイソフォーム (cTnI) は、骨格筋 TnI とは 40% 異なるため、両方のアイソフォームを免疫学的に区別することが可能である。cTnI の正常な血漿濃度は $< 0.1 \text{ ng} / \text{ml}$ (4 pM) である。cTnI は、心臓細胞の死亡の後に血流中に放出される。すなわち、血漿 cTnI 濃度は、急性心筋梗塞を有する患者で上昇する。不安定性アンギナを有する患者における血漿 cTnI 濃度の変化に関する研究は、多様な結果を示しているが、cTnI は安定性アンギナを有する個人の血漿では上昇しない (Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82: 845 - 50 (1998); Bertinchant, J. P. et al., Clin. Biochem. 29: 587 - 94 (1996); Tanasijevic, M. J. et al., Clin. Cardiol. 22: 13 - 16 (1999); Musso, P. et al., J. Ital. Cardiol. 26: 1013 - 23 (1996); Holvoet, P. et al., JAMA 281: 1718 - 21 (1999); Holvoet, P. et al., Circulation 98: 1487 - 94 (1998))。

【0113】

急性心筋梗塞を有する患者における cTnI の血漿濃度は、開始の 4 - 6 時間後に著しく上昇し、12 - 16 時間にピークに達し、1 週間上昇したままでありうる。不安定性アンギナにともなう cTnI の放出動力学も同様であろう。特定の形の心臓トロポニン、例えば、遊離型心臓トロポニン I および心臓トロポニン I とトロポニン C および / または T との複合体の測定は、種々の段階の ACS を識別する能力をユーザに与えることができる。遊離型および複合体型心臓トロポニン T は、心臓トロポニン I について説明したものと類似の様式で用いることができる。心臓トロポニン T 複合体は、単独で、または総心臓トロポニン I との比率で表したときに有用であり、進行しつつある心筋の障害の存在に関連する情報を提供することができる。進行中の虚血により、心臓トロポニン T I C 複合体が放出されるかもしれず、このことは、心臓トロポニン T I C : 総心臓トロポニン I の比率が高いことは、治癒していない虚血により引き起こされる連続的な障害を示すかもしれないことを表す。米国特許 6,147,688, 6,156,521, 5,947,124, および 5,795,725 (すべての表、図面および特許請求の範囲を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する) を参照。当業者には、心臓トロポニンの測定にあ

10

20

30

40

50

たって、トロポニン I およびトロポニン T の異なるアイソフォームを測定することができることが理解されるであろう。

【0114】

当業者に、心臓トロポニンの測定にあたって、異なる形のトロポニン I およびトロポニン T を測定することができることが理解されるであろう。すなわち、好ましくは、遊離型心臓トロポニン I、遊離型心臓トロポニン T、トロポニン T およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン I、トロポニン I およびトロポニン C の一方または両方を含む複合体中の心臓トロポニン T、総心臓トロポニン I (遊離型および複合体型心臓トロポニン I を意味する)、および/または総心臓トロポニン T を測定することができる。本明細書において用いる場合、“少なくとも 1 つの心臓トロポニン型”との用語は、これらの上述した形のいずれかを表す。

10

【0115】

ANP

A 型ナトリウム利尿ペプチド (ANP) (心房性ナトリウム利尿ペプチドまたはカルジオジラチンとも称される (Forssmann et al. *Histochem Cell Biol* 110:335-357 (1998))) は、28 アミノ酸のペプチドであり、心房性筋細胞において合成され、保存され、心房拡張、アンジオテンシン II 刺激、エンドセリン、および交感神経刺激 (ベータ-アドレナリン受容体媒介性) に応答して放出される。ANP は、前駆体分子 (pro-ANP) として合成され、蛋白質分解性切断により活性な形である ANP に変換され、また、N 末端 ANP (1-98) を形成する。N 末端 ANP および ANP は、心房性細動および心不全を示す患者において増加していることが報告されている (Rossi et al. *Journal of the American College of Cardiology* 35:1256-62 (2000))。心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP 99-126) それ自体に加えて、その N 末端プロホルモンセグメントからの直鎖状ペプチドフラグメントもまた、生物学的活性を有することが報告されている。しかし、当業者には認識されるように、N 末端 ANP 分子の濃度は、その ANP との関連性のため、患者における診断または予後情報を提供することができる。“ANP または ANP 関連ペプチドに関連するマーカー”との句は、28-アミノ酸 ANP 分子それ以外の、pro-ANP 分子 (1-126) から生ずる任意のポリペプチドを表す。ANP および ANP に関連するペプチドの蛋白質分解性分解も文献に記載されており、これらの蛋白質分解性フラグメントもまた、“ANP 関連ペプチド”との用語に包含される。

20

30

【0116】

循環血液量過多症、心房性細動およびうつ血性心不全の間に、上昇したレベルの ANP が見いだされる。ANP は、ナトリウムと水のバランス、血液容量および動脈圧の長期制御に関与している。このホルモンは、副腎皮質によるアルドステロン放出を低下させ、糸球体濾過率 (GFR) を増加させ、ナトリウム排泄増加および利尿 (カリウム節約) を生じ、レニン放出を低下させ、このことによりアンジオテンシン II を低下させる。これらの作用は、血液体積を低下させ、したがって、中心静脈圧 (CVP)、心臓出力、および動脈血圧を低下させることに寄与する。ANP のいくつかのアイソフォームが同定されており、これらと発作の発症との関連が研究されている。例えば、Rubatu et al., *Circulation* 100:1722-6, 1999; Estrada et al., *Am. J. Hypertens.* 7:1085-9, 1994 を参照。

40

【0117】

ANP の慢性的上昇は、主として全身の血管抵抗を減少させることにより動脈血圧を低下させるようである。全身血管拡張のメカニズムには、血管平滑筋 cGMP の ANP レセプター媒介性上昇、ならびに交感神経血管緊張を弱めることが関与しうる。この後者のメカニズムには、中枢神経系中の部位で、ならびに交感神経終末によるノルエピネフリン放出の阻害を介して作用する ANP が関与するかもしれない。ANP は、レニン-アンジオテンシン系の逆制御系であると考えられることができる。中性エンドペプチダーゼ (NEP)

50

阻害剤である新規なクラスの薬剤が心不全において有効であることが示されている。これらの薬剤は、ANPの分解を担う酵素である中性エンドペプチダーゼを阻害し、このことによりANPの血漿レベルを上昇させる。NEP阻害は、薬剤がNEPとACE阻害剤の両方の特性の組み合わせを有する場合、心不全において特に有効である。

【0118】

上述の説明に基づいて、当業者は、例えば、増加したBNPはうっ血性心不全を示すが、他の心臓関連状態、例えば、心筋梗塞をも示すことができることを認識するであろう。すなわち、心筋の障害に関連するマーカー、例えば、心臓トロポニンIおよび/または心臓トロポニンTを含めることにより、観察される呼吸困難および増加したBNPレベルの根底にある疾病をさらに識別することが可能となる。この場合、心臓トロポニンのレベルの増加を用いて、心筋梗塞であると判定することができる。

10

【0119】

同様に、BNPはまた、肺塞栓症を示すことができる。凝固およびうっ血に関連するマーカー、例えばD-ダイマーを含めることにより、観察される呼吸困難および増加したBNPレベルの根底にある疾病をさらに識別することが可能となる。この場合、D-ダイマーの正常なレベルを用いて、肺塞栓症ではないと判定することができる。

【0120】

この例示的マーカーパネルの詳細な分析は後述の実施例に示される。当業者には、本明細書に記載される診断マーカーの同定および使用の方法にしたがって、そのようなマーカーパネルにおいて他のマーカーで置き換えるかまたは加えて、呼吸困難の原因をさらに識別することができることが容易に理解されるであろう。追加の適当なマーカーは、以下の節に説明される。

20

【0121】

本明細書に詳細に説明されるように、マーカーパネル設計の上述の原理は、症状に基づく鑑別診断に広く適用することができる。例えば、腹痛の場合、複数のマーカーは、好ましくは、以下の複数であると判定するかまたはそうではないと判定するよう選択される：動脈解離、腸間膜塞栓症、膵炎、虫垂炎、アングナ、心筋梗塞、上述の1またはそれ以上の感染性疾病、インフルエンザ、食道癌、胃腺癌、結腸直腸腺癌、膵臓腫瘍、例えば、腺管癌、嚢胞腺癌、およびインスリノーマ。好ましい態様においては、腹痛についての可能性のある診断には、大動脈動脈瘤、腸間膜塞栓症、膵炎、虫垂炎、アングナおよび心筋梗塞が含まれる。

30

【0122】

また上述の原理を応用して、鑑別診断を臨床医学の専門家により必要とされる所定のレベルの詳細にさらに分割することができる。例えば、種々の症状の鑑別診断は、心不全と心房性細動との識別を必要とするかもしれない。そのような識別を実施するための例示的マーカーパネルは、好ましくは、それぞれ、BNPまたはBNP関連ペプチド、およびANPまたはANP関連ペプチドを含む。追加のマーカーを規定して、収縮期および拡張期機能不全および心房性細動を区別することができる。この場合の好ましいマーカーとしては、収縮期および拡張期機能不全の弁別のためには、BNP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニンおよびウロテンシン1、および心房性細動の検出のためにはANPまたはANP関連ペプチドが挙げられる。同様に、マーカーは、収縮期および拡張期機能不全、心房性細動、心筋虚血および心臓壊死を区別するよう規定することができる。この場合の好ましいマーカーとしては、収縮期および拡張期機能不全の弁別のためにはBNP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、カルシトニンおよびウロテンシン1、心房性細動の検出のためにはANPまたはANP関連ペプチド、および心筋虚血および壊死の検出のためにはBNPおよび心臓トロポニンが挙げられる。

40

【0123】

胸の痛みの場合には、本発明は、動脈解離、心筋虚血、および心臓壊死を区別することができるマーカー；動脈解離、心筋虚血、および心筋梗塞を区別することができるマーカー；動脈解離、心筋虚血、心臓壊死および心不全を区別することができるマーカー；動脈

50

解離，心筋虚血，心臓壊死および心筋梗塞を区別することができるマーカー；動脈解離，心筋虚血，心臓壊死および心房性細動を区別することができるマーカー；および／または動脈解離，心筋虚血および心臓壊死，心筋梗塞および心房性細動を区別することができるマーカーを提供することができる。上述にしたがえば，動脈解離の特に好ましいマーカーは平滑筋ミオシンであり，最も好ましくは平滑筋ミオシン重鎖であり，心房性細動の特に好ましいマーカーはANPまたはANP関連マーカーである。

【0124】

好ましいマーカーセットは，動脈解離および心房性細動を区別するための平滑筋ミオシン（または平滑筋ミオシン重鎖および／または軽鎖）およびANPまたはANP関連マーカーを含むセット；動脈解離，心房性細動および心筋虚血を区別するための平滑筋ミオシン（または平滑筋ミオシン重鎖および／または軽鎖），ANPまたはANP関連マーカー，およびBNPまたはBNP関連マーカーを含むセット；動脈解離，心筋虚血，および心筋梗塞を区別するための平滑筋ミオシン（または平滑筋ミオシン重鎖および／または軽鎖），BNPまたはBNP関連マーカー，および心臓トロポニンのある型を含むセット；および動脈解離，心筋虚血，心臓壊死，および心筋梗塞を区別するための平滑筋ミオシン（または平滑筋ミオシン重鎖および／または軽鎖），BNPまたはBNP関連マーカー，クレアチンキナーゼMB，ミオグロビン，および心臓トロポニンのある型を含むセットである。

【0125】

うっ血性心不全は，2つの一次的病因，すなわち，単独でまたは組み合わせて起こる左心室拡張期機能不全および収縮期機能不全から生ずる不均一な状態である（Gaasch，JAMA 271：1276-80（1994））。臨床的心不全を有する患者の40パーセントもが，正常な収縮期機能を有する拡張期機能不全を有する（Soufer et al.，Am. J. Cardiol. 55：1032-6（1984））。患者ケアおよび予後は，これらの病因の一方または両方の存在の判定にしたがって決定する（Shamsham and Mitchell，Am. Fam. Physician 2000；61：1319-28（2000））。収縮期および拡張期機能を弁別する例示的マーカーパネルは，BNP，BNP関連ペプチド，アルドステロン，ANP，ANP関連ペプチド，ウロジラチン，アンジオテンシン1，アンジオテンシン2，アンジオテンシン3，ブラジキニン，カルシトニン，カルシトニン遺伝子関連ペプチド，エンドセリン-2，エンドセリン-3，レニン，ウロテンシン1，ウロテンシン2，アンチトロポニンIII，D-ダイマー，MMP-3，MMP-9，MMP-11，カルボキシ末端proペプチドofタイプIコラーゲン（PICP），コラーゲンカルボキシ末端テロペプチド（ICTP），フィブリノーゲン，フィブロンネクチン，およびバソプレシンからなる群より選択される1またはそれ以上のマーカーを含む。収縮期および拡張期機能不全の両方に関連するマーカーには，BNP，ANPおよびANP関連マーカーがある。収縮期および拡張期心不全を弁別するマーカー好ましいのリストは，BNP，BNP関連ペプチド，カルシトニン遺伝子関連ペプチド，ウロテンシン2，エンドセリン2，カルシトニンおよびアンジオテンシン2からなる群より選択される1またはそれ以上のマーカーを含む。収縮期および拡張期機能不全を弁別するためのマーカーの特に好ましいリストは，BNP，アンジオテンシン2，ウロテンシン2，およびカルシトニン遺伝子関連ペプチドからなる群より選択される1またはそれ以上のマーカーを含む。

【0126】

動脈解離，心筋虚血，および心筋梗塞の弁別に関連する例示的マーカーパネルは，平滑筋ミオシンおよび／または平滑筋ミオシン重鎖，BNPおよび／またはBNP関連ペプチド，1またはそれ以上のトロポニン型，およびミオグロビンからなる群より選択される1またはそれ以上のマーカーを含む。

【0127】

心房性細動，心筋梗塞，および／またはうっ血性心不全の弁別に関連する例示的マーカーパネルは，ANP，ANP関連ペプチド，1またはそれ以上のトロポニン型，ミオグロ

10

20

30

40

50

ピン，BNP，およびBNP関連ペプチドからなる群より選択されるマーカーを含む。

【0128】

代謝状態の障害の場合には，複数のマーカーは，好ましくは以下の複数であると判定するかまたはそうではないと判定するように選択される：真性糖尿病，糖尿病性ケトアシドーシス，アルコール性ケトアシドーシス，呼吸アシドーシス，呼吸アルカローシス，非ケトン体生成性高血糖症，低血糖症，腎不全，間質性腎臓疾病，COPD，肺炎，肺浮腫およびぜん息。

【0129】

神経機能不全の鑑別診断

神経機能不全の場合，複数のマーカーは，好ましくは，以下の複数であると判定するかまたはそうではないと判定するように選択される：発作，脳腫瘍，脳低酸素症，低血糖症，片頭痛，心房性細動，心筋梗塞，心臓虚血，末梢血管疾病およびてんかん。この場合の好ましいマーカーとしては，脳障害の特異的マーカー，例えば，アデニレートキナーゼ，脳由来神経栄養因子，カルビンジン-D，クレアチンキナーゼ-BB，グリア細胞繊維性酸性蛋白質，乳酸デヒドロゲナーゼ，ミエリン塩基性蛋白質，神経細胞接着分子，ニューロン特異的エノラーゼ，ニューロトロフィン-3，プロテオリピド蛋白質，S-100β，トロポモジュリン，蛋白質キナーゼCガンマ；および/または1またはそれ以上の脳障害の非特異的マーカー，例えば，β-トロポグロブリン，D-ダイマー，フィブリノペプチドA，プラスミン-α-2-アンチプラスミン複合体，血小板因子4，プロトロンビンフラグメント1+2，トロピン-アンチトロピンIII複合体，組織因子，フォン・ビルブラント因子，アドレノメジュリン，心臓トロポニンI（心筋虚血および壊死用），ヘッドアクチベータ，ヘモグロビンα₂鎖，カススペース-3，血管内皮成長因子（VEGF），1またはそれ以上のエンドセリン（例えば，エンドセリン-1，エンドセリン-2，およびエンドセリン-3），インターロイキン-8，心房性ナトリウム利尿ペプチド，B型ナトリウム利尿ペプチド（心筋虚血および壊死用），およびC型ナトリウム利尿ペプチド；および/または1またはそれ以上の急性期反応物質，例えば，C反応性蛋白質，セルロプラスミン，フィブリノーゲン，α1-酸糖蛋白質，α1-アンチトリプシン，ハプトグロビン，インスリン様成長因子-1，インターロイキン-1β，インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト，インターロイキン-6，トランスフォーミング成長因子β，腫瘍壊死因子α，E-セレクトリン，細胞間接着分子-1，マトリクスメタロプロテイナーゼ（例えば，マトリクスメタロプロテイナーゼ9（MMP-9）），単球遊走促進蛋白質-1，および血管細胞接着分子が挙げられる。

【0130】

発作は，血液を，したがって酸素および栄養を脳に供給している血管の閉塞または破裂により引き起こされる，急に始まる病的な状態である。創傷に隣接した領域は“コア”と称され，これは虚血または物理学的障害の結果として死んだ脳細胞を含む。“半影”は，コア中の細胞に神経学的にまたは化学的につながっている脳細胞から構成される。半影中の細胞は，障害を受けているが，発作の間に引き起こされた害が除かれた後に完全に回復する能力をなお有している。しかし，虚血または出血からの失血が続くと，死んだ細胞のコアは障害の部位から広がり，その結果，半影中の細胞も同時に広がる。コア拡大の最初の体積および速度は発作の重篤度と関係しており，ほとんどの場合，神経学的帰結となる。

【0131】

脳は，2つの主要なタイプの細胞，すなわち，ニューロンおよびグリア細胞を含む。ニューロンは，脳における最も重要な細胞であり，電気的および化学的シグナリングを介する脳内のコミュニケーションの維持を担う。グリア細胞は，主として脳の構成成分として機能し，これはニューロンより約10倍多い。中枢神経系（CNS）のグリア細胞は神経膠星状細胞および稀突起神経膠細胞である。神経膠星状細胞は，脳の主要な間質性細胞であり，ニューロンと絡み合ってそのまわりで細胞プロセスを拡張し，この点で他のニューロンとは異なる。神経膠星状細胞はまた，そのプロセスの最後に，毛管を囲む‘末端足（

end feet) "を形成することができる。稀突起神経膠細胞は、CNSにおいて軸索のまわりにミエリン鞘を形成する細胞である。各稀突起神経膠細胞は50までの軸索を鞘で覆う能力がある。シュヴァン細胞は末梢神経系(PNS)のグリア細胞である。シュヴァン細胞は末梢において軸索のまわりにミエリン鞘を形成し、各シュヴァン細胞は単一の軸索を鞘で覆う。

【0132】

発作の間の細胞死は、CNSの細胞に対する虚血または物理学的障害の結果として起こる。虚血性発作の間に、梗塞が生じ、梗塞の部位を超えて血液流れを大きく低下させるかまたは停止させる。梗塞をちょうど超えたゾーンは、まもなく細胞生存に必須の栄養の適切な血液濃度を失う。代謝などの重要な機能の維持に必須の栄養が欠失した細胞はまもなく死ぬ。出血性発作は、直接外傷、頭蓋内圧の上昇、および障害を与える生化学的物質の血液中への放出による細胞死を誘導しうる。細胞が死亡したとき、これらはそのサイトゾル成分を細胞外環境中に放出する。

10

【0133】

中枢神経系の毛管内皮細胞間の堅い接合点の関門作用は“血液脳関門”と称される。この関門は、通常は蛋白質および他の分子(大きいものおよび小さいものの両方)に対して非透過性である。骨格筋、心筋および平滑筋等の他の組織においては、内皮細胞間の接合点は、ほとんどの分子が通過するのに十分緩いが、蛋白質は通過させない。

【0134】

中枢神経系(CNS)のニューロンおよびグリア細胞(細胞内脳コンパートメント)により分泌される物質は、自由に通過して細胞外環境(細胞外脳コンパートメント)に出ることができる。同様に、細胞外脳コンパートメントからの物質は、通過して細胞内脳コンパートメントに入ることができる。細胞内と細胞外脳コンパートメントとの間の物質の通過は、物質の流入および流出を制御する正常な細胞メカニズムにより制限されている。細胞外脳コンパートメントにおいて見いだされる物質もまた、脳脊髄液中に自由に入ることができ、逆も可能である。この移動は拡散により制御されている。

20

【0135】

脈管構造とCNSとの間の物質の移動は、血液脳関門により制限されている。この制限はCNSの細胞による消費のために、他の物質の中でも特にグルコースおよびアミノ酸等の栄養を、関門を超えて輸送する内皮細胞中の促進輸送メカニズムにより迂回することができる。さらに、脂溶性物質、例えば、分子状酸素および二酸化炭素、ならびにすべての脂溶性薬剤または麻酔薬は、血液脳関門を超えて自由に拡散することができる。

30

【0136】

発作または他のニューロパシーの間に障害を受けた脳細胞から放出される脳障害の特異的マーカーは、そのサイズに応じて、CNS創傷が血液脳関門の透過性の増加を伴うかまたは後に増加する場合にのみ末梢血液に見いだされる。このことは、より大きい分子については特にあてはまる。より小さい分子は、受動拡散、能動輸送、または血液脳関門の透過性の増加の結果として末梢血液に現れることができる。血液脳関門の透過性の増加は、腫瘍浸潤および溢血または血管破裂等の場合における物理学的破壊の結果として、または虚血による内皮細胞の死亡の結果として生じうる。発作の間、血液脳関門は内皮細胞死亡により障害を受け、局所的細胞外環境中に存在する死亡細胞のサイトゾル成分が血流中に入りうる。

40

【0137】

したがって、脳障害の特異的マーカーは、血液または血清および血漿等の血液成分、ならびに発作またはTIAを経験している患者のCSFにおいても見いだすことができる。さらに、虚血性発作における妨害物のクリアランスは、再灌流の間の酸化的障害からの創傷を引き起こすかもしれず、虚血性発作を起こした患者はしばしば、再灌流または血栓溶解治療の結果として出血性変換を経験する場合がある。さらに、出血後の脳の基底における大容量の動脈の限局性または散在性狭化である血管痙攣によっても創傷が引き起こさる。血液脳関門の透過性の増加は、障害の重篤度と関連しており、その完全性(int

50

e g r i t y) は、障害が解決した後に再び確立される。脳障害の特異的マーカーは、これらの大きい分子がこれを超えて拡散することを可能とする血液脳関門の透過性の十分な増加があった場合にのみ、末梢血液中に存在する。この点に関して、脳障害のほとんどの特異的マーカーは、発作または CNS に影響を及ぼす他のニューロパシーの後に脳脊髄液中に見いだすことができる。さらに、発作における凝固またはフィブリン溶解マーカーの多くの研究が脳脊髄液を用いて行われている。

【 0 1 3 8 】

発作における凝固カスケード

血管の創傷後の血液の喪失を停止または防止するために用いられる本質的に 2 つのメカニズムが存在する。第 1 のメカニズムは、血小板が活性化して血管の創傷の部位に接着することを促進することを含む。次に、活性化された血小板は、凝集して、血小板血栓を形成し、これが血液の喪失を減少させるかまたは一時的に停止させる。血小板凝集、血栓形成および組織修復のプロセスはすべて、活性化された血小板から分泌される多くの因子により加速され増強される。血小板凝集および血栓形成は、活性化された血小板間のフィブリノーゲン架橋の形成により媒介される。第 2 のメカニズムである凝固カスケードが同時に活性化されることにより、フィブリノーゲンからフィブリンが生成し、血小板血栓を強化する不溶性フィブリン凝塊が形成される。

10

【 0 1 3 9 】

凝固カスケードは通常は不活性型もしくはザイモゲン型で存在する多数のセリンプロテイナーゼが関与する酵素的経路である。血管系または血管の創傷に異質表面が存在する結果として、それぞれ内因性および外因性の凝固経路が活性化される。次に、最終的な共通の経路が続き、この結果、セリンプロテイナーゼであるトロンビンによりフィブリンが生成し、最終的には架橋されたフィブリン凝塊が生成する。凝固カスケードにおいては、最初に 1 つの活性な酵素が形成され、これは他の酵素を活性化させることができ、これはさらに別の酵素を活性化させる。制御されない場合には、このプロセスはすべての凝固酵素が活性化されるまで続くことができる。幸いなことに、フィブリン溶解、および凝固経路および凝塊形成の活性を制御する内因性プロテイナーゼ阻害剤の作用等のメカニズムが存在する。

20

【 0 1 4 0 】

フィブリン溶解は、蛋白質分解性凝塊溶解のプロセスである。フィブリン溶解は、凝固と類似する様式で、ザイモゲン型から活性化されたセリンプロテイナーゼにより媒介される。セリンプロテイナーゼであるプラスミンは、フィブリンを分解して凝塊から遊離したより小さい分解産物とすることを担い、その結果、凝塊が溶解する。フィブリン溶解は、凝塊形成を制御するために、凝固の直後に活性化される。内因性セリンプロテイナーゼ阻害剤もまた、フィブリン溶解の調節剤として機能する。

30

【 0 1 4 1 】

脳脊髄液に凝固またはフィブリン溶解マーカーが存在することは、用いるマーカーにより、血液脳関門の透過性の増加が生じていることと組み合わせて、凝固またはフィブリン溶解の活性化を示すであろう。この点に関して、急性発作にともなう凝固またはフィブリン溶解マーカーの存在に関するより明確な結論は、脳脊髄液を用いて得られるであろう。

40

【 0 1 4 2 】

血小板は、平均直径 2 - 4 μm の球形または卵形の円盤であり、通常は、血液中に濃度 200,000 - 300,000 / μl で見いだされる。これらは血管の一体性を維持することにより、血管創傷の部位において血小板の栓を形成して初期に出血を停止することにより、およびフィブリンを形成して血小板栓を安定化させるプロセスに寄与することにより、うっ血を維持するうえで重要な役割を果たす。血管創傷が起こると、血小板は創傷の部位に、および互いに結合し、接着した血小板および創傷を受けた内皮細胞から放出される種々の物質により、凝集するよう刺激される。この後に放出反応が生じ、ここでは、血小板はその細胞内顆粒の内容物を分泌し、血小板栓を形成する。凝固カスケードにおけるトロンビンによるフィブリンの形成により血栓が硬化し、続いて、架橋されたフィブリ

50

ンにより血栓の凝塊が収縮して安定化される。同時に生ずる凝固カスケードにおいて生成される活性なトロンビンもまた、血小板活性化および凝集を誘導する能力を有する。

【0143】

凝固カスケードは、外因性または内因性の経路のいずれかにより活性化されることができる。これらの酵素的経路は、1つの最後の共通経路を有する。凝固活性化の結果は、架橋されたフィブリン凝塊の形成である。フィブリン溶解は、凝固活性化の直後に活性化される、蛋白質分解性凝塊溶解のプロセスであり、これはおそらく、凝塊形成の速度および量を制御するためであろう。ウロキナーゼ型のプラスミノーゲンアクチベータ(uPA)および組織型のプラスミノーゲンアクチベータ(tPA)は、蛋白質分解的にプラスミノーゲンを切断し、活性なセリンプロテイナーゼプラスミンを生成する。プラスミンは、架橋したフィブリンを蛋白質分解的に消化し、その結果、凝塊溶解およびフィブリン分解産物の生成および放出が生ずる。

10

【0144】

凝固カスケードの共通経路の第1段階は、第Xa因子/第Va因子プロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビンの蛋白質分解性切断を含み、活性なトロンビンが得られる。トロンビンは、フィブリノーゲンを蛋白質分解的に切断してフィブリンを形成するセリンプロテイナーゼであり、これは最終的には、凝塊形成の間に架橋されたネットワーク中に一体化される。

【0145】

発作および他の脳創傷の鑑別診断のための方法およびマーカーセットは、米国特許10/225,082(8月20日出願2002年、表、図面および特許請求の範囲を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。ここに記載されているように、好ましいマーカーパネルは、発作、クモ膜下出血、脳内出血、および/または出血性発作を診断および/または弁別し;および/または虚血性および出血性発作を区別することができる。特に好ましいものは、血栓性、塞栓性、ラクナ状態(lacunar)、低灌流、脳内出血、およびクモ膜下出血のタイプの発作を弁別するマーカーである。特に好ましいマーカーセットは、BNP、IL-6、S-100β、MMP-9、TAT複合体、およびvWFA1-インテグリン;BNP、S-100β、MMP-9、およびvWF-A1-インテグリン;vWF-A1、VEGF、およびMMP-9;カスベース-3、MMP-9、およびGFAP;カスベース-3、MMP-9、vWF-A1、およびBNP;NCAM、BDNF、カスベース-3、MMP-9、vWF-A1、およびVEGF;NCAM、BDNF、カスベース-3、MMP-9、vWF-A1、およびS-100β;VEGF;NCAM、BDNF、カスベース-3、MMP-9、vWF-A1、およびMCP-1;VEGF;NCAM、BDNF、カスベース-3、MMP-9、VEGF、およびvWFA1-インテグリン;BDNF、MMP-9、S-100β、vWFA1-インテグリン、MCP-1、およびGFAP;BDNF、カスベース-3、MMP-9、vWF-A1、S-100β、およびGFAP;NCAM、BDNF、MMP-9、vWF-A1、S-100β、およびGFAP;カスベース-3、NCAM、MCP-1、S-100β、MMP-9、vWFA1-インテグリン、およびBNP;カスベース-3、NCAM、MCP-1、S-100β、MMP-9、vWFA1、BNP、およびGFAP;CRP、NT-3、vWF、MMP-9、VEGF、およびCKBB;CRP、MMP-9、VEGF、CKBB、およびMCP-1;CRP、NT-3、MMP-9、VEGF、CKBB、およびMCP-1;およびCRP、MMP-9、VEGF、CKBB、MCP-1、カルビンジン、vWFP1、vWFA3、vWFA1-A3、TAT複合体、プロテオリピド蛋白質、IL-6、IL-8、ミエリン塩基性蛋白質、S-100β、組織因子、GFAP、vWFA1-インテグリン、CNP、およびNCAMを含む。

20

30

40

【0146】

本明細書に記載されるマーカーから構成されるパネルは、目的とする鑑別診断に関連する適切な情報を与えるよう作製することができる。そのようなパネルは、1、2、3、4

50

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
または20個の別個のマーカーを用いて作製することができる。単一のマーカーまたはより大きなマーカーのパネルを含むマーカーのサブセットの分析は、当業者が、種々の臨床設定における臨床的感度または特異度を最適化するように実施することができる。これらには、限定されないが、救急車、緊急治療、重症治療、集中治療、監視ユニット、入院患者、外来患者、診察室、診療所、および健康スクリーニングの設定が含まれる。さらに、当業者は、単一のマーカーまたはマーカーのより大きいパネルを含むマーカーのサブセットを、上述した設定のそれぞれにおける診断閾値の調節と組み合わせて用いて、臨床的感度および特異度を最適化することができる。アッセイの臨床的感度は、アッセイが正しく予言した疾病を有する者のパーセンテージとして定義され、アッセイの特異度は、アッセイが正しく予言した疾病を有しない者のパーセンテージとして定義される (Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition, Carl Burtis and Edward Ashwood eds., W.B. Saunders and Company, p. 496)。以下に、本明細書に記載される方法により適切なマーカーパネルを同定するのに用いるための追加の例示的マーカーを簡単に説明する。

10

【0147】

急性心血管症候群

心筋虚血は、心筋の酸素供給と需要の不均衡により引き起こされる。特に、不適切な血液供給により、需要が供給を超える。心臓は総体重の小さいパーセンテージを占めるが、体酸素消費の7%を担う。心臓組織の代謝は非常に好気性であり、不適切な血液供給を補うための予備をほとんど有していない。血液の供給が心筋の需要にとって不適切なレベルにまで低下すると、組織は急速に低酸素状態となり、毒性の細胞代謝産物を除去することができなくなる。心筋の細胞は速やかに局所微小血管に残留する酸素供給を使用し、好気性代謝が継続する時間の長さは、動脈閉塞の程度に間接的に比例する。いったん酸素供給が消耗すると、もはや酸素を電子受容体として利用することができず、ピルビン酸をアセチルコエンザイムAに変換してクエン酸サイクルに入ることができなくなるため、酸化のリン酸化を続けることができなくなる。心筋の代謝は、貯蔵グリコゲンおよびグルコースを用いる嫌気性代謝に切り替わり、ピルビン酸が発酵して乳酸が生成する。乳酸の蓄積はACSを有する個人における胸の痛みの主要な原因である。虚血が続くにしたがって、乳酸および他の酸性中間体が蓄積するために心臓組織はより酸性となり、ATPレベルが低下し、利用可能なエネルギー源が涸渇する。心臓組織は、虚血性事象の15-20分後に再灌流されれば回復することができる。細胞グリコゲン貯蔵が涸渇した後は、細胞は徐々にミトコンドリア腫脹および細胞膜の一体性の喪失等の壊死の特徴を示す。再灌流すると、これらの障害を受けた細胞は、おそらくは細胞がイオン平衡を維持することができなくなった結果として死亡する。膜の一体性の喪失は、細胞のサイトゾル内容物が循環中に放出される原因となる。

20

30

【0148】

安定性アンギナ、不安定性アンギナ、および心筋梗塞はすべて、1つの共通の特徴、すなわち、心筋虚血にともなう締め付けられるような胸の痛みを有する。アンギナは、診断的ECG変化を用いるかまたは用いずに、医師による臨床症状の解釈により、安定または不安定であると分類される。アンギナの“安定性”または“不安定性”との分類は、プラークそれ自体の安定性を表すものではなく、胸の痛みを顕在化させるのに必要な労作の程度を表す。最も注目すべきことには、明確な心筋梗塞以外の場合において胸の痛みを安定性または不安定性アンギナ（または軽い心筋梗塞）と分類することは、完全に主観的である。診断、およびこの場合には区別は、動脈閉塞の程度を定量化することができる血管造影法により行われるのではなく、医師による臨床的症狀の解釈により行われる。

40

【0149】

安定性アンギナは、労作またはストレスの際に起こる締め付けられるような胸の痛みを特徴とし、安静または舌下ニトログリセリンにより軽減する。安定性アンギナを有する患

50

者の心血管造影は、通常、少なくとも1つの冠状動脈の50 - 70%の閉塞を示す。安定性アンギナは通常は臨床的症状およびECG変化の評価により診断される。安定性アンギナを有する患者は、一過性STセグメントの以上を有する場合があるが、安定性アンギナに伴うこれらの変化の感度および特異度は低い。

【0150】

不安定性アンギナは、安静時の締め付けられるような胸の痛みを特徴とし、舌下ニトログリセリンにより軽減する。アンギナ性の胸の痛みは、通常は舌下ニトログリセリンにより軽減され、痛みは通常は30分以内に治まる。不安定性アンギナの重篤性には3つのクラスがある：クラスI，新たに開始した、重症のまたは加速されたアンギナを特徴とする；クラスII，重篤度、持続またはニトログリセリンの必要が増加することを特徴とする安静時亜急性アンギナ；およびクラスIII，安静時急性アンギナとして特徴づけられる。不安定性アンギナは安定性アンギナとAMIとの間の臨床状態であり、主として、アテローム性動脈硬化症、冠状動脈痙攣、または閉塞していないプラーク中への出血および続く血栓性閉塞の重篤度および程度の進行のためであると考えられている。不安定性アンギナを有する患者の心血管造影法は、通常は少なくとも1つの冠状動脈の90%またはそれより高い閉塞を示し、その結果、心筋の酸素需要のベースラインさえ満たせないように酸素供給ができなくなる。安定なアテローム性動脈硬化症のプラークのゆっくりした成長、または不安定なアテローム性動脈硬化症のプラークの破裂および続く血栓形成は、不安定性アンギナを引き起こす可能性がある。これらの症例のいずれも、冠状動脈の危険な狭化を引き起こす。不安定性アンギナは通常、アテローム性動脈硬化症のプラーク破裂、血小板活性化、および血栓形成を伴う。不安定性アンギナは、通常は、臨床的症状、ECG変化、および心臓マーカー（存在すれば）の変化により診断される。不安定性アンギナを有する患者の治療には、硝酸塩、アスピリン、GPIIb/IIIa阻害剤、ヘパリン、およびベータブロッカーがある。血栓溶解療法は不安定性アンギナ患者については有益であることは示されておらず、カルシウムチャンネルブロッカーは効果がないかもしれない。患者に血管形成術およびステントを施す場合もある。最後に、不安定性アンギナを有する患者は、AMIを発症するリスクがある。

【0151】

心筋梗塞は、30分間より長く持続する締め付けられるような胸の痛みを特徴とし、診断用ECG Q波を伴う場合がある。AMIを有するほとんどの患者は冠状動脈疾病を有しており、AMI症例の25%もの多くが“無症候性”または無症状梗塞であり、糖尿病を有する個人は無症候性梗塞にかかりやすい傾向にある。集団の研究では、非致命性心筋梗塞の20 - 60%が患者により認識されない無症候性梗塞であることが示唆されている。AMIの非典型的な臨床的兆候には、うつ血性心不全、重症のまたは長期の発作を伴わない狭心症、非典型的な部位の痛み、発作に似た中枢神経系の症状発現、不安および神経質、突然の躁病または精神病、失神、虚弱、急性消化障害、および末梢血栓形成が含まれる。AMIは通常は、臨床的症状、ECG変化、および心臓性蛋白質、特に心臓トロポニン、クレアチンキナーゼ-MBおよびミオグロビンの上昇により診断される。AMIの治療は、過去10年間に改良されてきており、その結果、患者の帰結は改良され、AMIに伴う死亡率は30%減少した。AMI患者の治療は、梗塞サイズを制限して、妨害物質を除去し、心臓組織への酸素供給を増加させるかまたは心臓組織の酸素需要を減少させることにより帰結を改良する薬剤を投与することにより行われる。治療としては以下のものが挙げられる：補充酸素、アスピリン、GPIIb/IIIa阻害剤、ヘパリン、血栓崩壊剤（tPA）、硝酸塩（ニトログリセリン）、マグネシウム、カルシウムチャンネルアンタゴニスト、β-アドレナリン作動性レセプターブロッカー、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、血管形成術（PTCA）、および管内冠状動脈ステント。

【0152】

胸の痛みの開始から30分の時点が虚血により引き起こされる可逆的心筋障害のウインドウであると考えられている。安定性アンギナおよび不安定性アンギナは、血管造影でそれぞれ50 - 70%および90%またはそれ以上の動脈閉塞を特徴とし、心筋梗塞は、完

10

20

30

40

50

全なまたはほぼ完全な閉塞を特徴とする。一般的な誤解は、安定性アンギナおよび不安定性アンギナはプラーク安定性を表すというもので、またはこれらは心筋梗塞とともに、別々の疾病であるというものである。安定性アンギナはしばしば不安定性アンギナに進行し、不安定性アンギナはしばしば心筋梗塞に進行するため、安定性アンギナ、不安定性アンギナ、および心筋梗塞はすべて、種々の重篤度の冠状動脈疾病として特徴づけることができる。最近、冠状動脈疾病の進行の以下の生理学的モデルが提唱されている：炎症→プラーク破裂→血小板活性化→初期血栓症→初期壊死。このモデルは、安定性アンギナの間に炎症が起き、プラーク破裂、血小板活性化、および初期血栓症のマーカーを用いて不安定性アンギナの重篤度の進行を識別しモニターすることができるという理論に合致するように設計されている。アンギナ性発作の間に引き起こされる心筋の障害は、定義によれば、可逆的であるが、一方、心筋梗塞の間に引き起こされる障害は不可逆的である。したがって、このモデルにおいては、安定性アンギナ、不安定性アンギナ、およびAMIを識別するための2つの提唱されている区切り点がある。第1の点は、炎症とプラーク破裂との間に起こり、安定性アンギナにおいてはプラーク破裂が生じないという理論にしたがう。第2の点は、初期血栓症と初期壊死との間に起こり、不安定性アンギナの間に起こった心筋の障害は可逆的であるという理論にしたがう。これらの事象は、初期心筋壊死を除き、すべての形の冠状動脈疾病と関連しうること、および、この診断経路にしたがう進行は必ずしも疾病の進行を示しているとは限らないことを理解することが重要である。軽い不安定性アンギナから重症の不安定性アンギナおよび心筋梗塞への冠状動脈疾病の進行は、プラークの不安定性および動脈閉塞の程度に関係している。この進行は、安定なプラークが拡大してより閉塞性となるためにゆっくり起こる場合もあり、あるいは不安定なプラークが破裂して、血小板活性化および閉塞性血栓形成を引き起こすため、急速に起こる場合もある。心筋梗塞はしばしば不安定性アンギナと同じ病態生理学を有するため、これらの2つの事象を区別するものは心筋の障害の可逆性のみである可能性がある。定義によれば、不安定性アンギナは可逆的な障害を引き起こし、一方、心筋梗塞は不可逆的な障害を引き起こす。不安定性アンギナを有する患者において心筋の壊死の存在を示す報告が公表されている。定義によれば、これらの患者は、実際に初期のAMIを有しているかもしれない。いずれにしても、これらの患者が初期AMIではなく不安定性アンギナであると診断されたとしても、重篤度の程度が高いため、初期の積極的治療から多くの利益を得るであろうことが示唆される。心筋虚血は、安定性アンギナ、不安定性アンギナ、および心筋梗塞の病因論の主要な決定因子であり、別個の疾病であると考えてはならない。そうではなく、これらは、虚血からの心筋の障害の重篤度の増加を反映している。

【0153】

炎症メカニズムは、アテローム性動脈硬化症のプロセスにおいて重要な役割を果たす。アテローム発生の根底においては、マクロファージ、Tリンパ球と平滑筋細胞との間の複合体相互作用が存在する。炎症がACSの病因に関与しており、その臨床的展開に影響を与えることを示唆する実験的証拠が増加しつつある。ACSを有する患者においては、心血管アテローム性動脈硬化症のプラークは、大量の炎症浸潤により特徴づけられる。さらに、これらの患者においては、炎症反応の全身の兆候、活性化された循環炎症細胞（好中球、単球およびリンパ球）、およびプロ炎症サイトカイン（例えば、インターロイキン（IL）-1および6）および急性期反応物質（特にC反応性蛋白質（CRP））の濃度の増加が観察される。

【0154】

血栓前駆体蛋白質

トロンピンは、最初にフィブリノーゲンからフィブリノペプチドAを取り除いて、desAAフィブリンモノマーを生成し、これは、すべての他のフィブリノーゲン由来蛋白質、例えば、フィブリン分解産物、フィブリノーゲン分解産物、desAAフィブリン、およびフィブリノーゲンと複合体を形成することができる。desAAフィブリンモノマーは、フィブリノーゲン切断の最初の産物であるが、まだ第XIII因子と架橋して不溶性のフィブリン凝塊となっていないため、一般には可溶性フィブリンと称される。des

AAフィブリンモノマーは、トロンビンによりさらに蛋白質分解性切断を受けて、フィブリノペプチドBが除かれ、desAABBフィブリンモノマーが生成する。このモノマーは、他のdesAABBフィブリンモノマーとともに重合して、可溶性desAABBフィブリンポリマー（可溶性フィブリンまたは血栓前駆体蛋白質（TpP（商標））とも称される）を形成することができる。

【0155】

TpP（商標）は不溶性フィブリンの中間前駆体であり、“メッシュ様”の構造を形成して、新たに形成された血栓に構造的剛性を与える。この点に関して、血漿中のTpP（商標）の測定は、活性な凝塊形成の直接的な測定である。TpP（商標）の正常な血漿濃度は、 $< 6 \text{ ng/ml}$ であると報告されている（Laurino, J. P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27: 338 - 345, 1997）。American Biogenetic Sciencesは、TpP（商標）のアッセイを開発した（米国特許5,453,359, 5,837,540および5,843,690）。AMIを有する患者において上昇したTpP（商標）を測定した研究がある（Laurino et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27: 338 - 345, 1997; Carville et al., Clin. Chem. 42: 1537 - 1541, 1996）。TpP（商標）の血漿濃度はまた、不安定性アンギナを有する患者においても上昇していると報告されているが（Laurino et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27: 338 - 345, 1997）、別の研究者は、TpP（商標）レベルは、対照、不安定性アンギナ、および慢性安定努力アンギナにおいて類似していることを見いだしている（Fiotta et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 13: 247 - 255, 2002）。

【0156】

血漿中のTpP（商標）の濃度は、理論的には、凝固活性化、例えば、汎発性血管内凝固症候群、敗血症、肺塞栓症、深い静脈血栓症、うっ血性心不全、手術、癌、胃腸炎、およびコカイン過剰摂取を引き起こすかまたはその結果である任意の状態の間に上昇する（Laurino et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27: 338 - 345, 1997; Song et al., Haematologica 87: 1062 - 1067, 2002; LaCapra et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 11: 371 - 377, 2000）。TpP（商標）はトロンビン活性化の直後に血流中に放出される。TpP（商標）は、血流中で短い半減期を有するようである。これは、凝塊形成の部位において不溶性のフィブリンに変換されるためである。血漿TpP（商標）濃度は、AMIの開始から3時間以内にピークに達し、開始から12時間後に正常に戻ると報告されている。of TpP（商標）の血漿濃度は、CVDにおいて 30 ng/ml を超える場合がある（Laurino et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27: 338 - 345, 1997）。

【0157】

MCP - 1

単球走化性蛋白質 - 1（単球遊走促進因子 - 1とも称される）（MCP - 1）は、単球およびおよび好塩基球を誘引するが、好中球または好酸球は誘引しない、 10 kDa の走化性因子である。MCP - 1は、通常はモノマー形とホモダイマー形の平衡として見出され、通常は、単球および血管内皮細胞中で産生されこれらにより分泌される（Yoshimura, T. et al., FEBS Lett. 244: 487 - 493, 1989; Li, Y. S. et al., Mol. Cell. Biochem. 126: 61 - 68, 1993）。MCP - 1は、単球の浸潤が関与する種々の疾病、例えば、乾癬、慢性関節リウマチおよびアテローム性動脈硬化症の病因に関与していることが示唆されている。血漿中のMCP - 1の正常な濃度は $< 0.1 \text{ ng/ml}$ である。MCP - 1の血漿濃度は、AMIを有する患者で上昇し、不安定なアンギナを有する患者の血漿で上昇しているかもしれないが、上昇は安定なアンギナとは関連づけられていない（Soejima, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34: 983 - 988, 1999）。

1999; Nishiyama, K. et al., Jpn. Circ. J. 62: 710-712, 1998; Matsumori, A. et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 419-423, 1997)。興味深いことに、MCP-1はまた、アテローム性動脈硬化症の間に単球の動脈壁へのリクルートに関与しているかもしれない。

【0158】

MCP-1の血清濃度の上昇は、炎症にともなう種々の状態、例えば、アルコール性肝疾病、間質性肺疾病、敗血症、および全身性エリテマトーデスと関連している(Fisher, N. C. et al., Gut 45: 416-420, 1999; Suga, M. et al., Eur. Respir. J. 14: 376-382, 1999; Brossink, A. W. et al., Blood 86: 3841-3847, 1995; Kaneko, H. et al., J. Rheumatol. 26: 568-573, 1999)。MCP-1は、単球および内皮細胞が活性化すると血流中に放出される。AMIを有する患者からの血漿中のMCP-1の濃度は、1 ng/ml (100 pM)に達し、1か月間上昇したままでありうることが報告されている(Soejima, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34: 983-988, 1999)。ACSの状況におけるMCP-1の血流中への放出およびクリアランスの動力学は、現在のところ不明である。MCP-1は、単球移動が関与するプロ炎症状態の存在の特異的マーカーである。

10

【0159】

パネル中で用いるための例示的マーカー

20

(i) 心筋の障害の特異的マーカー

上に詳細に説明した心臓トロポニンに加えて、以下は例示的な心筋の障害の特異的マーカーである。このリストは限定を意味するものではない。

【0160】

アネキシンVは、リボコルチンV、エンドネキシンII、カルホピンディンI、カルシウム結合蛋白質33、胎盤抗凝固性蛋白質I、トロンボプラスチン阻害剤、血管抗凝固剤- α 、およびアンコリンCIIとも称される、33 kDaのカルシウム-結合蛋白質であり、組織因子の間接的な阻害剤およびレギュレータである(Giambanco, I. et al., J. Histochem. Cytochem. 39: P1189-1198, 1991; Doubell, A. F. et al., Cardiovasc. Res. 27: 1359-1367, 1993)。アネキシンVの正常な血漿濃度は<2 ng/mlである(Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251: 65-80, 1996)。ある研究では、AMIを有する個体ではアネキシンVの血漿濃度が上昇しているが、過去の心筋梗塞、胸の痛み症候群、心臓弁疾病、肺疾病、および腎臓疾病を有する患者では有意に上昇していないことが見出されている(Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251: 65-80, 1996)。

30

【0161】

エノラーゼは、 α 、 β 、および γ サブユニットから形成される78 kDaのホモダイマーまたはヘテロダイマーのサイトゾル蛋白質である。エノラーゼは、解糖経路において、2-ホスホグリセレートとホスホエノールピルビン酸との相互変換を触媒する。エノラーゼは、 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、および $\gamma\gamma$ のアイソフォームとして存在する。 α サブユニットはほとんどの組織において見いだされ、 β サブユニットは心筋および骨格筋において見いだされ、 γ サブユニットは主として神経および神経組織および神経内分泌組織において見いだされる。 β -エノラーゼは、 $\alpha\beta$ および $\beta\beta$ エノラーゼから構成され、筋肉に特異的である。 β -エノラーゼは、AMIを有する個人の血清では上昇するが、アンギナを有する個人では上昇しないと報告されている(Nomura, M. et al., Br. Heart J. 58: 29-33, 1987; Herreraez-Dominguez, M. V. et al., Clin. Chim. Acta 64: 307-315, 19

40

50

75)。β-エノラーゼの血漿濃度はまた、心臓手術、筋ジストロフィー、および骨格筋創傷の間に上昇する(Usui, A. et al., Cardiovasc. Res. 23:737-740, 1989; Kato, K. et al., Clin. Chim. Acta 131:75-85, 1983; Matsuda, H. et al., Forensic Sci. Int. 99:197-208, 1999)。

【0162】

クレアチンキナーゼ(CK)は、85kDaのサイトゾル酵素であり、ATPおよびクレアチンからADPおよびホスホクレアチンの可逆的形成を触媒する。CKは、MおよびB鎖から構成されるホモダイマーまたはヘテロダイマーである。CKはそれぞれ分子量43kDaの2つのサブユニットから構成される。2つの異なるサブユニット、すなわちB(脳)およびM(筋肉)の種々の対形成により3つのアイソザイムが生ずる。CK-MMは、主として骨格筋(総CKの約99パーセント)および心筋(総CKの約55パーセント)に存在し;CK-BBは主として脳組織に存在し(総CKの90パーセント以上);およびCK-MBは心筋中に最も多く存在する(総CKの約45パーセントまで)。心筋梗塞の後、CK-MBのレベルは3-8時間以内に上昇し、9-30時間以内にピークとなり、48-72時間後に正常に戻る(Thygesen, K. et al., Eur. J. Clin. Invest. 16:1-4, 1986; Koukkunen, H. et al., Ann. Med. 30:488-496, 1998; Bertinchant, J. P. et al., Clin. Biochem. 29:587-594, 1996; Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998; Norregaard-Hansen, K. et al., Eur. Heart J. 13:188-193, 1992)。心筋虚血の程度は不安定性アンギナの重篤度と直接比例するため、CK-MBは、不安定性アンギナの重篤度を判定するのに有用であろう。

【0163】

グリコゲンホスホリラーゼ(GP)は、188kDaの細胞内アロステリック酵素であり、グリコゲン溶解の間に無機リン酸の存在下でグリコゲンの非還元末端からのグルコースの除去を触媒する(グルコース-1-リン酸として放出される)。GPはホモダイマーとして存在し、これは、他のホモダイマーと会合して、四量体の酵素的に活性なホスホリラーゼAを形成する。GPには免疫学的に区別しうる3つのアイソフォームがある。BBアイソフォームは脳および心臓組織において見いだされ、MMアイソフォームは骨格筋および心臓組織において見いだされ、LLアイソフォームは主として肝臓中に見いだされる(Mair, J. et al., Br. Heart J. 72:125-127, 1994)。血漿GP-BB濃度は、AMIおよび一過性ST-T上昇をとともなう不安定性アンギナの患者では顕著に上昇するが、安定性アンギナでは上昇しない(Mair, J. et al., Br. Heart J. 72:125-127, 1994; Mair, J., Clin. Chim. Acta 272:79-86, 1998; Rabbitzsch, G. et al., Clin. Chem. 41:966-978, 1995; Rabbitzsch, G. et al., Lancet 341:1032-1033, 1993)。GP-BBはまた、冠動脈バイパス手術を受けている患者において周術期AMIおよび心筋虚血を検出するためにも用いることができる(Rabbitzsch, G. et al., Biomed. Biochim. Acta 46:S584-S588, 1987; Mair, P. et al., Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32:543-547, 1994)。これは脳にも見いだされるため、血漿GP-BB濃度はまた虚血性脳障害の間にも上昇しているかもしれない。

【0164】

心臓型脂肪酸結合蛋白質(H-FABP)は、サイトゾルの、15kDaの脂質結合蛋白質であり、脂質代謝に関与する。心臓型FABP抗原は、心臓組織のみならず、腎臓、骨格筋、大動脈、副腎、胎盤および脳において見いだされる(Veerkamp, J. H. and Maatman, R. G., Prog. Lipid Res. 34:17-5

10

20

30

40

50

2, 1995; Yoshimoto, K. et al., Heart Vessels 10:304-309, 1995)。血漿H-FABP濃度は, AMIおよび不安定性アングナを有する患者において上昇している(Ishii, J. et al., Clin. Chem. 43:1372-1378, 1997; Tsuji, R. et al., Int. J. Cardiol. 41:209-217, 1993)。心筋の組織がH-FABPの起源であることは, ミオグロビン/FABP(グラム/グラム)の比率を測定することにより確認することができる(Van Nieuwenhoven, F. A. et al., Circulation 92:2848-2854, 1995)。血漿H-FABP濃度は, CK-MBおよびミオグロビンより早く, 胸の痛みの開始の1-2時間後に顕著に上昇しうる(Tsuji, R. et al., Int. J. Cardiol. 41:209-217, 1993; Van Nieuwenhoven, F. A. et al., Circulation 92:2848-2854, 1995; Tanaka, T. et al., Clin. Biochem. 24:195-201, 1991)。

10

20

30

40

【0165】

ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM)は, 57kDaのホモまたはヘテロダイマー性の細胞内解糖系酵素であり, 29kDaのMまたはBサブユニットから構成され, マグネシウムの存在下で3-ホスホグリセレートと2-ホスホグリセレートとの相互変換を触媒する。心臓組織は, アイソザイムMM, MB, およびBBを含み, 一方, 骨格筋は, 主としてPGAM-MM, を含み, 他のほとんどの組織は, PGAM-BBを含む(Durany, N. and Carreras, J., Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 114:217-223, 1996)。

【0166】

S-100は, α および β サブユニットから生成する21kDaのホモまたはヘテロダイマー性サイトゾル Ca^{2+} -結合蛋白質である。これは, Ca^{2+} -依存性シグナル伝達経路に沿って細胞プロセスの活性化に関与すると考えられている(Bonfrer, J. M. et al., Br. J. Cancer 77:2210-2214, 1998)。S-100ao($\alpha\alpha$ アイソフォーム)は, 横紋筋, 心臓および腎臓において見いだされ, S-100a($\alpha\beta$ アイソフォーム)はグリア細胞において見いだされるがシュヴァン細胞では見いだされず, S-100 β ($\beta\beta$ アイソフォーム)はグリア細胞およびシュヴァン細胞で高濃度で見いだされ, ここではこれは主要なサイトゾル成分である(Kato, K. and Kimura, S., Biochim. Biophys. Acta 842:146-150, 1985; Hasegawa, S. et al., Eur. Urol. 24:393-396, 1993)。S-100aoの血清濃度は, AMIを有する患者では上昇するが, AMIであることが疑われる狭心症を有する患者では上昇することが報告されている(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。S-100aoの血清濃度は, 患者にAMIを投与すると著しく上昇し, 投与の8時間後にピークレベルまで増加し, 1週間後に減少してベースラインに戻る(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。さらに, S-100aoは, AMIの開始の後にCK-MBより早く顕著に上昇するようである(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。

【0167】

(ii) 血圧制御に関連する例示的マーカー

上で詳細に説明したANP, BNP, およびこれらに関連するマーカーに加え, 以下のものは, 当該技術分野において血圧制御に関連することが知られている例示的マーカーである。このリストは限定を意味するものではない。

【0168】

C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は, 22アミノ酸のペプチドであり, ヒト脳において主として活性なナトリウム利尿ペプチドである。CNPはまた, 一酸化窒素(NO

50

）と同様の仕方で作用する内皮由来弛緩因子であると考えられている (Davidson et al., Circulation 93:1155-9, 1996)。CNPは、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) および B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) と構造的に関連する。しかし、ANP および BNP は主として心筋層で合成されるが、CNP は血管内皮で前駆体 (pro-CNP) として合成される (Prickett et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 286:513-7, 2001)。

【0169】

ウロテンシン II は、以下の配列を有するペプチドであり、Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val Cys6 と Cys11 との間にジスルフィド架橋を有する。ヒトウロテンシン 2 (UTN) は、prepro の形で合成される。プロセッシングされたウロテンシン 2 は、強力な血管作用性および心臓刺激効果を有し、G 蛋白質結合レセプター GPR14 に作用する。

10

【0170】

バソプレシン (アルギニンバソプレシン, AVP; 抗利尿ホルモン, ADH) は、下垂体後葉から放出されるペプチドホルモンである。これの体内における主要な機能は、腎臓による水の扱いに影響を及ぼすことにより細胞外体液容量を制御することである。AVP の放出を制御するいくつかのメカニズムが存在する。出血の間に生ずる循環血液量減少は、心房圧の低下をもたらす。心房壁および大きい血管中の動脈に入る専門の伸張受容器 (心肺圧受容器) は、心房圧が低下したときにその発火速度を低下させる。これらの受容器から求心的に視床下部中にシナプスがある。心房受容器発火は通常は下垂体後葉による AVP の放出を阻害する。循環血液量が減少するかまたは中心静脈圧が低下すると、心房伸張受容器の発火が低下し、これは AVP 放出の増加につながる。視床下部浸透圧レセプターは、細胞外のオスモル濃度を検知して、脱水の際に生ずるようなオスモル濃度が上昇した場合に AVP 放出を刺激する。最後に、視床下部の領域に存在するアンジオテンシン II レセプターは、AVP 放出を制御する。すなわち、アンジオテンシン II の増加は AVP 放出を刺激する。

20

【0171】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、37 アミノ酸のポリペプチドであり、前駆体 mRNA の選択的スプライシングによりカルシトニン遺伝子から誘導された産物である。カルシトニン遺伝子 (CALC-I) の一次 RNA 転写産物は、プロセッシングされて、一次転写産物の一部として異なるエクソンを含むかまたは含まないことにより、異なる mRNA セグメントとなる。カルシトニンをコードする mRNA は、甲状腺の C-細胞における CALC-I 転写の主要な産物であり、一方、CGRP-ImRNA (CGRP = カルシトニン-遺伝子-関連ペプチド) は、中枢および末梢神経系の神経組織において産生される。第3の mRNA 配列においては、カルシトニン配列は欠失しており、その代わり mRNA では CGRP の配列がコードされる。CGRP は、顕著な血管作用性のペプチドであり、血管拡張特性を有する。CGRP は、カルシウムおよびリン酸代謝には影響を及ぼさず、主として血管の平滑筋細胞に関連する神経細胞で合成される。ProCGRP (CGRP の前駆体) および PCT は、部分的に同一の N 末端アミノ酸配列を有する。

30

40

【0172】

プロカルシトニンは、116 アミノ酸 (14.5 kDa) の蛋白質であり、染色体 11p15.4 に位置する Calc-1 遺伝子によりコードされる。Calc-1 遺伝子は、選択的スプライシング事象の結果である 2 つの転写産物を生ずる。Pre-プロカルシトニンは、25 アミノ酸のシグナルペプチドを含み、これは甲状腺の C-細胞によりプロセッシングされて、57 アミノ酸の N 末端フラグメント、32 アミノ酸のカルシトニンフラグメント、および 21 アミノ酸のカタカルシンフラグメントとなる。プロカルシトニンは、他の体細胞により、グリコシル化された生成物として無傷で分泌される (Whicher et al., Ann. Clin. Biochem. 38:483-93 (2001))

50

）。血漿プロカルシトニン¹⁾は、敗血症およびその重篤性のマーカーとして同定されている (Yukioka et al., Ann. Acad. Med. Singapore 30: 528-31 (2001); Pettila et al., Intensive Care Med. 28: 1220-25 (2002))。

【0173】

アンジオテンシンIIは、レニンが循環物質であるアンジオテンシノーゲンに作用することにより、デカペプチドであるアンジオテンシンIから蛋白質分解性切断が生じて形成されるオクタペプチドホルモンである。血管内皮は、特に肺においては、2つのアミノ酸を切り出してオクタペプチドであるアンジオテンシンII (AII)を形成する酵素であるアンジオテンシン変換酵素 (ACE)を有する。

10

【0174】

アドレノメジュリン (AM)は、52アミノ酸のペプチドであり、多くの組織、例えば、副腎髄質、肺、腎臓および心臓で産生される (Yoshitomi et al., Clin. Sci. (Colch) 94: 135-9, 1998)。実験動物では、AMを血管内投与すると、心臓拍出量の増加をともなう長時間持続する血圧低下効果を引き起こす。AMは、前駆体分子 (pro-AM)として合成される。AM前駆体からプロセシングされたN末端ペプチドもまた、血圧低下ペプチドとして作用することが報告されている (Kuwasako et al., Ann. Clin. Biochem. 36: 622-8, 1999)。

【0175】

20

エンドセリンは、別々の遺伝子によりコードされる3つの関連するペプチド (エンドセリン-1、エンドセリン-2、およびエンドセリン-3)であり、血管内皮により産生され、そのそれぞれは強力な血管収縮活性を示す。エンドセリン-1 (ET-1)は、21アミノ酸残基のペプチドであり、17残基のシグナル配列を含む212残基の前駆体 (preproET-1)として合成され、シグナル配列が除去されて、bigET-1として知られるペプチドが生成する。この分子はエンドセリン変換酵素によるtrp21とval22の間の加水分解によりさらにプロセシングされる。bigET-1およびET-1は両方とも生物学的活性を示す。しかし、成熟ET-1形はより強い血管収縮活性を示す (Brooks and Ergul, J. Mol. Endocrinol. 21: 307-15, 1998)。同様に、エンドセリン-2およびエンドセリン-3も21アミ

30

【0176】

(iii) 血液凝固およびホメオスタシスに関連する例示的マーカー

凝固およびうっ血に関連するマーカーの血清濃度の上昇は、凝塊の存在、またはフィブリン溶解活性化の原因または結果であるいずれかの状態、例えば、アテローム性動脈硬化症、汎発性血管内凝固症候群、急性心筋梗塞、手術、外傷、不安定性アンギナ、発作、肺塞栓症、静脈血栓症、および血栓性特発性血小板減少性紫斑病の存在と関連しているかもしれない。上で詳細に説明したD-ダイマーおよびTpPに加えて、以下は凝固およびうっ血に関連する例示的マーカーである。このリストは限定を意味するものではない。

40

【0177】

プラスミンは、78kDaのセリンプロテイナーゼであり、架橋したフィブリンを蛋白質分解的に分解して、凝塊を溶解させる。70kDaのセリンプロテイナーゼ阻害剤である $\alpha 2$ -アンチプラスミン ($\alpha 2$ AP)は、プラスミンと共有結合性の1:1の化学量論的複合体を形成することにより、プラスミン活性を制御する。生ずる約150kDaのプラスミン- $\alpha 2$ AP複合体 (PAP) (プラスミン阻害複合体 (PIC)とも称される)は、 $\alpha 2$ APがフィブリン溶解の間に活性化されたプラスミンと接触した直後に形成される。

50

【0178】

β -トロポグロブリン(β TG)は、36kDaの血小板 α 顆粒成分であり、血小板活性化に際して放出される。 β -TGの血漿レベルは、不安定性アンギナおよび急性心筋梗塞を有する患者では上昇するが、安定性アンギナでは上昇しないようである(DeCaterina, R. et al., Eur. Heart J. 9:913-922, 1988; Bazzan, M. et al., Cardiologia 34, 217-220, 1989)。血漿 β -TG上昇はまた、不安定性アンギナを有する患者における虚血のエピソードと相関しているようである(Sobel, M. et al., Circulation 63:300-306, 1981)。ACSに伴う β TGの血漿濃度は、70ng/ml(2nM)に達しうが、この値はサンプリング手順の間の血小板活性化により影響を受けるかもしれない。

10

【0179】

血小板因子4(PF4)は、40kDaの血小板 α 顆粒成分であり、血小板活性化に際して放出される。PF4は血小板活性化のマーカーであり、ヘパリンに結合してこれを中和する能力を有する。PF4の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する患者では上昇するが、安定性アンギナでは上昇しないようである(Gallino, A. et al., Am. Heart J. 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., Jpn. Circ. J. 60:277-284, 1996; Bazzan, M. et al., Cardiologia 34:217-220, 1989)。血漿PF4の上昇はまた、不安定性アンギナを有する患者における虚血のエピソードとも相関しているようである(Sobel, M. et al., Circulation 63:300-306, 1981)。

20

【0180】

フィブリノペプチドA(FPA)は、16アミノ酸の、1.5kDaのペプチドであり、トロンプインの作用によりフィブリノーゲンのアミノ末端から遊離する。血漿FPA濃度は、急性心筋梗塞、不安定性アンギナ、および変種アンギナを有する患者では上昇するが、安定性アンギナでは上昇しない(Gensini, G.F. et al., Thromb. Res. 50:517-525, 1988; Gallino, A. et al., Am. Heart J. 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., Jpn. Circ. J. 60:277-284, 1996; Theroux, P. et al., Circulation 75:156-162, 1987; Merlini, P.A. et al., Circulation 90:61-68, 1994; Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。さらに、血漿FPAは、アンギナの重篤度を示すかもしれない(Gensini, G.F. et al., Thromb. Res. 50:517-525, 1988)。

30

【0181】

血小板由来成長因子(PDGF)は、28kDaの、分泌される、均一なサブユニットAおよび/またはBから構成されるホモまたはヘテロダイマー蛋白質である(Mahadevan, D. et al., J. Biol. Chem. 270:27595-27600, 1995)。PDGFは、血管創傷の部位の近くで血小板および単球が凝集することにより放出され、アテローム性動脈硬化症の病因に関与することが示唆されている。血漿PDGF濃度は、急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する個人では、健康な対照または安定性アンギナを有する個人より高い(Ogawa, H. et al., Am. J. Cardiol. 69:453-456, 1992; Wallace, J.M. et al., Ann. Clin. Biochem. 35:236-241, 1998; Ogawa, H. et al., Coron. Artery Dis. 4:437-442, 1993)。

40

【0182】

プロトロンピンフラグメント1+2は、32kDaのポリペプチドであり、トロンプイン

50

活性化の間にトロンビンのアミノ末端から遊離する。F1 + 2の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する患者では上昇するが安定性アンギナでは上昇しないと報告されている (Merlini, P. A. et al., Circulation 90: 61 - 68, 1994)。別の報告は、心血管疾患における血漿F1 + 2濃度の有意な変化はないことを示している (Biasucci, L. M. et al., Circulation 93: 2121 - 2127, 1996; Mante, A. et al., Cardiovasc. Res. 40: 389 - 395, 1998)。

【0183】

P - セレクチン (顆粒膜蛋白質 - 140, GMP - 140, PADGEM, およびCD - 62Pとも称される) は、血小板および内皮細胞において発現される約140 kDaの接着分子である。P - セレクチンは、血小板のアルファ顆粒および内皮細胞のヴァイベル - パラーデ体の中に貯蔵される。膜結合型および可溶性のP - セレクチンが同定されている。可溶性P - セレクチンは、リンパ球および活性化血小板と内皮細胞との間の相互作用をブロックすることにより、炎症および血栓症の制御に重要な役割を果たすことができる (Gamble, J. R. et al., Science 249: 414 - 417, 1990)。血漿の可溶性P - セレクチン濃度は、急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する患者では有意に上昇しているが、安定性アンギナでは運動ストレス試験の後であっても上昇しなかった (Ikeda, H. et al., Circulation 92: 1693 - 1696, 1995; Tomoda, H. and Aoki, N., Angiology 49: 807 - 813, 1998; Hollander, J. E. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34: 95 - 105, 1999; Kikita, K. et al., Circulation 92: 1726 - 1730, 1995; Ikeda, H. et al., Coron. Artery Dis. 5: 515 - 518, 1994)。急性心筋梗塞についての膜結合性P - セレクチン対可溶性P - セレクチンの感度および特異度は、71%対76%および32%対45%である (Hollander, J. E. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34: 95 - 105, 1999)。不安定性アンギナ + 急性心筋梗塞についての膜 - 結合P - セレクチン対可溶性P - セレクチンの感度および特異度は、71%対79%および30%対35%である (Hollander, J. E. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34: 95 - 105, 1999)。

【0184】

トロンピンは、37 kDaのセリンプロテイナーゼであり、蛋白質分解的にフィブリノーゲンを切断してフィブリンを形成し、これは最終的には凝塊形成の間に一体化して架橋されたネットワークとなる。抗トロンピンIII (ATIII) は、65 kDaのセリンプロテイナーゼ阻害剤であり、トロンピン、第XIa因子、第XIIa因子、および第IXa因子の蛋白質分解性活性の生理学的レギュレータである。約100 kDaのトロンピン - ATIII複合体 (TAT) の正常な血漿濃度は < 5 ng/ml (50 pM) である。TAT濃度は、急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する患者で、特に突発性虚血性エピソードの間に上昇する (Biasucci, L. M. et al., Am. J. Cardiol. 77: 85 - 87, 1996; Kienast, J. et al., Thromb. Haemost. 70: 550 - 553, 1993)。さらに、TATは、安定性アンギナを有する個人の血漿でも上昇しているかもしれない (Mante, A. et al., Cardiovasc. Res. 40: 389 - 395, 1998)。別の公表されている報告では、ACSを有する患者の血漿におけるTATの濃度には有意な変化がないことが見いだされている (Mante, A. et al., Cardiovasc. Res. 40: 389 - 395, 1998; Hoffmeister, H. M. et al., Arteriosclerosis 144: 151 - 157, 1999)。

【0185】

フォン・ビルブラント因子 (vWF) は、血小板、巨核球、および内皮細胞により産生

される血漿蛋白質であり，220 kDaのモノマーが会合して形成された一連の高分子量のマルチマーから構成される。これらのマルチマーは，通常は，分子量600 - 20,000 kDaの範囲内である。vWFのA1ドメインは，血小板糖蛋白質Ib - IX - V複合体および非線維性コラーゲンタイプVIに結合し，A3ドメインは線維性コラーゲンタイプIおよびIIIに結合する (Emsley, J. et al., J. Biol. Chem. 273: 10396 - 10401, 1998)。vWF分子中に存在する他のドメインには，血小板 - 血小板相互作用を媒介するインテグリン結合ドメイン，およびタイプ11Aフォン・ビルブランド病の病因に関連性があるようであるプロテアーゼ切断ドメインが含まれる。vWFの総量を測定することにより，当業者は総vWF濃度の変化を同定することができる。この測定は，種々の形のvWF分子の測定により行うことができる。A1ドメインの測定により循環中の活性なvWFを測定することができ，これは，A1ドメインは血小板結合に利用可能であるため，凝固前状態が存在することを示す。この点に関して，曝露されているA1ドメインとインテグリン結合ドメインまたはA3ドメインのいずれかを有するvWF分子を特異的に測定するアッセイは，それぞれ，血小板 - 血小板相互作用の媒介に利用可能な，または血小板の血管内皮下への架橋の媒介に利用可能な，活性なvWFの同定を可能とするであろう。

10

【0186】

組織因子 (TF) は，45 kDaの細胞表面蛋白質であり，脳，腎臓，および心臓で発現されており，脈管周囲細胞および単球では転写的に制御された様式で発現されている。組織因子は，血流中では，可溶型で，第VIIaと結合した形で，または第VIIa因子との複合体として検出することができる。組織因子経路阻害剤はまた第Xa因子を含むことができる。TFはまた，マクロファージの表面でも発現されており，これは，アテローム性動脈硬化症のプラークでは一般に見られる。TFは，不安定性アンギナおよび急性心筋梗塞を有する患者では上昇しているが，安定性アンギナを有する患者では上昇しない (Falciani, M. et al., Thromb. Haemost. 79: 495 - 499, 1998; Suefuji, H. et al., Am. Heart J. 134: 253 - 259, 1997; Misumi, K. et al., Am. J. Cardiol. 81: 2226, 1998)。さらに，マクロファージ上のTF発現およびアテローム性動脈硬化症のプラークにおけるTF活性は，不安定性アンギナにおいて安定性アンギナにおけるより一般的である (Soejima, H. et al., Circulation 99: 2908 - 2913, 1999; Kaikita, K. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 2232 - 2237, 1997; Ardissino, D. et al., Lancet 349: 769 - 771, 1997)。

20

30

【0187】

(iv) 急性期応答に関連する例示的マーカー

急性期蛋白質は，肝臓の細胞により産生され，炎症を促進し，補体カスケードを活性化し，食細胞の走化性を刺激するC反応性蛋白質およびマンノース - 結合蛋白質等の一群の蛋白質である。上で詳細に説明したMCP-1に加え，以下は急性期応答に関連する例示的マーカーである。このリストは限定を意味するものではない。

40

【0188】

ヒト好中球エラスターゼ (HNE) は，30 kDaのセリンプロテイナーゼであり，通常は，好中球のアズール親和性顆粒中に含まれている。HNEは好中球活性化に際して放出され，その活性は循環 α_1 -プロテイナーゼ阻害剤により制御されている。血漿HNE濃度は通常はHNE - α_1 -PI複合体を検出することにより測定される。これらの複合体の正常な濃度は50 ng/mlであり，これは，HNEの正常濃度が約25 ng/ml (0.8 nM)であることを示す。HNE放出はまた，血漿中のフィブリノペプチドB β ₃₀₋₄₃ (特異的HNE由来フィブリノペプチド) を特異的に検出することにより測定することができる。血漿HNEは，心血管狭窄を有する患者で上昇しており，その上昇は，複合体プラークを有する患者で単純なプラークを有する患者より高い (Kosar, F.

50

et al., *Angiology* 49:193-201, 1998; Amaro, A. et al., *Eur. Heart J.* 16:615-622, 1995)。血漿 HNE は、フィブリノペプチド B β ₃₀₋₄₃ を測定することにより判定して、安定性アンギナを有する患者では有意に上昇しないが、不安定性アンギナおよび急性心筋梗塞を有する患者で上昇しており、不安定性アンギナにおける濃度は急性心筋梗塞に伴う濃度より 2.5 倍高い (Dinerman, J. L. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 15:1559-1563, 1990; Mehta, J. et al., *Circulation* 79:549-556, 1989)。

【0189】

誘導性一酸化窒素シンターゼ (iNOS) は、上皮細胞マクロファージ中の 130 kDa のサイトゾル蛋白質であり、その発現は、サイトカイン、例えば、インターフェロン- γ 、インターロイキン-1 β 、インターロイキン-6、および腫瘍壊死因子 α 、およびリポ多糖類により制御されている。iNOS は、L-アルギニンからの一酸化窒素 (NO) の合成を触媒し、その誘導により NO が継続して高出力で産生され、これは抗微生物活性を有し、種々の生理学的小および炎症事象のメディエータである。iNOS による NO の産生は、構成的に発現されている NOS により産生される量より約 100 倍多い (Depre, C. et al., *Cardiovasc. Res.* 41:465-472, 1999)。心筋虚血の間の iNOS 発現は上昇しないであろうが、このことは、iNOS はアンギナを急性心筋梗塞から弁別するのに有用であるかもしれないことを示唆する (Hammerman, S. I. et al., *Am. J. Physiol.* 277:H1579-H1592, 1999; Kaye, D. M. et al., *Life Sci* 62:883-887, 1998)。

【0190】

リゾホスファチド酸 (LPA) は、ホスホグリセリドおよびトリアシルグリセロールの合成において形成されるリソリン脂質中間体である。不安定性アンギナの状況では、LPA はおそらくはプラーク破裂の直接の結果として放出される。

【0191】

マロンジアルデヒド修飾低密度リポ蛋白質 (MDA-修飾 LDL) は、ホスホリパーゼ活性、プロスタグランジン合成、または血小板活性化の結果として LDL の apoB-100 成分が酸化される間に形成される。酸化 LDL の血漿濃度は、安定性アンギナ、不安定性アンギナ、および急性心筋梗塞において上昇しており、これがアテローム性動脈硬化症のマーカーでありうることを示す (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* 53:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., *Circulation* 98:1487-1494, 1998)。血漿 MDA 修飾 LDL は安定性アンギナでは上昇しないが、不安定性アンギナおよび急性心筋梗塞では有意に上昇する (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* 53:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., *Circulation* 98:1487-1494, 1998; Holvoet, P. et al., *JAMA* 281:1718-1721, 1999)。MDA-修飾 LDL の血漿濃度は、急性心筋梗塞を有する患者では 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (約 50 μM) に、不安定性アンギナを有する患者では 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (約 40 μM) に達しうる (Holvoet, P. et al., *Circulation* 98:1487-1494, 1998)。

【0192】

マトリクスメタロプロテイナーゼ-1 (MMP-1) (コラゲナーゼ-1とも称される) は、41/44 kDa の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼであり、主としてタイプ I コラーゲンを切断するが、コラーゲンタイプ II, III, VII および X も切断することができる。活性な 41/44 kDa の酵素は、自己溶解して、なお活性な 22/27 kDa の形になりうる。MMP-1 は、遊離型として、またはその天然の阻害剤である TIMP-1 との複合体のいずれかとして血流中に見いだすことができる。MMP-1 はアテローム性動脈硬化症のプラークのショルダー領域に見いだされる。この領域は最も

破裂しやすく、アテローム性動脈硬化症のプラーク不安定化に関与しているかもしれない (Johnson, J. L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1707-1715, 1998)。さらに, MMP-1は, 心筋の再灌流創傷の病因に関与することが示唆されている (Shibata, M. et al., *Angiology* 50:573-582, 1999)。

【0193】

リポ多糖類結合蛋白質 (LBP) は, 肝臓で産生される約 60 kDa の急性期蛋白質である。LBP はリポ多糖類に結合して, ヒトにおいて LPS ハンドリングに関与する。LBP 単核細胞において LPS の LPS レセプター (CD14) へおよび HDL 中への輸送を媒介することが報告されている。LBP はまた, LPS により引き起こされる肺血性シ

10

【0194】

マトリクスメタロプロテイナーゼ-2 (MMP-2) (ゼラチナーゼ A と称される) は, 66 kDa の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼであり, 不活性な 72 kDa の前駆体として合成される。成熟 MMP-3 はタイプ I ゼラチンおよびタイプ IV, V, VII, および X のコラーゲンを切断する。MMP-2 は通常はその生理学的レギュレータである TIMP-2 との複合体の形で血漿中に見いだされる (Murawaki, Y. et al., *J. Hepatol.* 30:1090-1098, 1999)。MMP-2 発現は, アテローム性動脈硬化症の病巣中の血管平滑筋細胞において上昇しており, プラーク不安定化の場合に血流中に放出されうる (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。血清 MMP-2 濃度は, 安定性アンギナ, 不安定性アンギナ, および急性心筋梗塞を有する患者で上昇しており, この上昇は不安定性アンギナおよび急性心筋梗塞において安定性アンギナより有意に高い (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。MMP-2 は入院時に不安定性アンギナおよび急性心筋梗塞を有する個人の血清中で上昇しており, 最大レベルは 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (25 nM) に達する (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。

20

【0195】

マトリクスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3) (ストロメリシン-1 と称される) は, 45 kDa の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼであり, 不活性な 60 kDa の前駆体として合成される。男性の血清 MMP-3 濃度は女性より約 2 倍高い (Manicourt, D. H. et al., *Arthritis Rheum.* 37:1774-1783, 1994)。MMP-3 は, アテローム性動脈硬化症のプラークのシヨルダー領域において見いだされる。この領域は最も破裂しやすい領域であり, アテローム性動脈硬化症のプラーク不安定化に関与しているかもしれない (Johnson, J. L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1707-1715, 1998)。

30

【0196】

マトリクスメタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) (ゼラチナーゼ B と称される) は, 84 kDa の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼであり, 不活性な 92 kDa の前駆体として合成される。MMP-9 はモノマー, ホモダイマー, および 25 kDa の $\alpha 2$ -ミクログロブリン関連蛋白質とのヘテロダイマーとして存在する (Triebebel, S. et al., *FEBS Lett.* 314:386-388, 1992)。血漿 MMP-9 濃度は, 不安定性アンギナおよび急性心筋梗塞を有する患者で有意に上昇するが, 安定性アンギナでは上昇しない (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。

40

【0197】

マトリクスメタロプロテイナーゼとその阻害剤とのバランスは, 腫瘍の浸潤性および転移に影響を与える重要な因子である。TIMP ファミリーとは, メタロプロテイナーゼを

50

阻害する一群の小さい (21 - 28 kDa) 関連蛋白質である。メタロプロテイナーゼ 1 (TIMP 1) の組織阻害剤は、正常に発生しているヒト骨において骨のモデリングおよびリモデリングの制御に関与し、多型 X - 染色体の不活性化を示す急性骨髄性白血病の浸潤性表現型に関与すると報告されている。TIMP 1 は、MMP - 1, MMP - 2, MMP - 3, MMP - 7, MMP - 8, MMP - 9, MMP - 10, MMP - 11, MMP - 12, MMP - 13 および MMP - 16 に作用することが知られている。メタロプロテイナーゼ 2 (TIMP 2) の組織阻害剤はメタロプロテイナーゼ (例えばコラゲナーゼ) と複合体を形成し、これらを不可逆的に不活性化する。TIMP 2 は、MMP - 1, MMP - 2, MMP - 3, MMP - 7, MMP - 8, MMP - 9, MMP - 10, MMP - 13, MMP - 14, MMP - 15, MMP - 16 および MMP - 19 に作用することが知られている。2つの選択的にスプライシングされた形が SYN 4 と会合することができ、急性骨髄性白血病の浸潤型の表現型に関与している。いくつかの他の TIMP 遺伝子ファミリーメンバーの誘導性発現とは異なり、この遺伝子の発現は非常に構成的である。メタロプロテイナーゼ 3 (TIMP 3) の組織阻害剤は、マトリクスメタロプロテイナーゼ活性と拮抗し、腫瘍成長、血管新生、浸潤、および転移を抑制することができる。TIMP - 3 の喪失は、腫瘍原性の獲得と関連づけられている。

10

【0198】

(v) 炎症に関連する例示的マーカー

急性期蛋白質は、局所または全身の炎症に関連するより大きな蛋白質の群の一部である。以下の追加の炎症に関連するマーカーの例示的リストは限定を意味するものではない。

20

【0199】

インターロイキン (IL) は、サイトカインとして知られるポリペプチドのより大きいクラスの一部である。これらは免疫系の種々の細胞でシグナルを伝達するメッセンジャー分子である。これらはほとんどがマクロファージおよびリンパ球により分泌され、創傷または感染にตอบสนองしてその産生が誘導される。その作用は、免疫系の他の細胞ならびに肝臓および脳等の他の組織および臓器に影響を及ぼす。少なくとも 18 種類の IL が記述されている。IL - 1 β , IL - 2, IL - 4, IL - 6, IL - 8 および IL - 10 は、本発明においてマーカーとして用いるのに好ましいものである。以下の表は代表的なインターロイキンの選択された機能を示す。

30

【0200】

【表 1】

表 1：代表的インターロイキンの選択された機能

機能	IL-1	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10
免疫応答の増強	+	+	+	+	-	+
免疫応答の抑制	-	-	-	-	-	+
炎症の増強	+	+	+	+	+	-
炎症の抑制	-	-	-	-	-	+
細胞成長の促進	+	+	-	-	-	-
走化性(ケモカイン)	-	-	-	-	+	-
発熱性	+	-	-	-	-	-

40

【0201】

インターロイキン - 1 β (IL - 1 β) は、17 kDa の分泌プロ炎症サイトカインであり、急性期応答に関与しており、多くの疾病の病原性メディエータである。IL - 1 β は通常はマクロファージおよび上皮細胞により産生される。IL - 1 β はアポトーシスを生じている細胞からも放出される。血漿 IL - 1 β 濃度の上昇は、プロ炎症状態、例えば外傷および感染における急性期応答の活性化と関連している。

50

【0202】

インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)は、IL-1ファミリーの17kDaのメンバーであり、主として、肝細胞、上皮細胞、単球、マクロファージ、および好中球で発現されている。IL-1raには、選択的スプライシングにより産生される細胞内型および細胞外型の両方がある。IL-1raは生理学的IL-1活性の制御に関与していると考えられている。IL-1raの血漿濃度は、急性心筋梗塞および急性心筋梗塞、死亡、または難治性アンギナに進行する不安定性アンギナを有する患者において上昇する(Biasucci, L.M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999; Latini, R. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 23:1-6, 1994)。さらに、IL-1raは、併発性ではない急性心筋梗塞と比較して、重症の急性心筋梗塞において有意に上昇していた(Latini, R. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 23:1-6, 1994)。

10

【0203】

インターロイキン-6(IL-6)は、20kDaの分泌蛋白質であり、造血素ファミリープロ炎症サイトカインである。この主要な機能は、肝臓蛋白質の急性期産生を媒介することであり、その合成は、サイトカインIL-1により誘導される。IL-6は通常はマクロファージおよびTリンパ球により産生される。IL-6の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する患者で、急性心筋梗塞におけるより高い程度で上昇する(Biasucci, L.M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998; Biasucci, L.M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999)。IL-6は安定性アンギナを有する患者の血漿では有意に上昇しない(Biasucci, L.M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。IL-6の血漿濃度は、急性心筋梗塞の開始から8-12時間以内に上昇し、100pg/mlに達しうる。不安定性アンギナを有する患者におけるIL-6の血漿濃度は、開始の72時間後にピークレベルに上昇し、これはおそらくは障害の重篤度のためであろう(Biasucci, L.M. et al., Circulation 94:874-877, 1996)。

20

30

【0204】

インターロイキン-8(IL-8)は、6.5kDaのケモカインであり、単球、内皮細胞、肺泡マクロファージおよび線維芽細胞により産生される。IL-8は好中球およびT細胞の走化性および活性化を誘導する。

【0205】

腫瘍壊死因子 α (TNF α)は、17kDaの分泌されたプロ炎症サイトカインであり、急性期応答に関与しており、多くの疾病の病原性メディエータである。TNF- α は、185アミノ酸の蛋白質であり、73位および172位でグリコシル化されている。これは212アミノ酸の前駆体蛋白質として合成される。単球は、分子量21.5-28kDaの少なくとも5つの異なる分子形のTNF- α を発現している。これらは、主として、翻訳後変更、例えば、グリコシル化およびリン酸化により異なる。TNF α の正常な血清濃度は<40pg/ml(2pM)である。TNF α の血漿濃度は、急性心筋梗塞を有する患者で上昇し、不安定性アンギナを有する患者でわずかに上昇する(Li, D. et al., Am. Heart J. 137:1145-1152, 1999; Squadrito, F. et al., Inflamm. Res. 45:1419, 1996; Latini, R. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 23:1-6, 1994; Carlstedt, F. et al., J. Intern. Med. 242:361-365, 1997)。急性心筋梗塞患者におけるTNF α の血漿中の濃度は300pg/ml(15pM)を超える(Squadrito

40

50

, F. et al., *Inflamm. Res.* 45:14-19, 1996)。

【0206】

可溶性細胞間接着分子(sICAM-1)(CD54とも称される)は, 85-110 kDaの細胞表面結合イムノグロブリン様インテグリンリガンドであり, 白血球のリクルートメントおよび移動の間に白血球の抗原提示細胞および内皮細胞への結合を容易にする。sICAM-1の血漿濃度は, 急性心筋梗塞および不安定性アンギナを有する患者では有意に上昇するが, 安定性アンギナでは上昇しない(Pellegatta, F. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30:455-460, 1997; Miwa, K. et al., *Cardiovasc. Res.* 36:37-44, 1997; Ghaisas, N.K. et al., *Am. J. Cardiol.* 80:617-619, 1997; Ogawa, H. et al., *Am. J. Cardiol.* 83:38-42, 1999)。さらに, ICAM-1は, アテローム性動脈硬化症の病巣および病巣形成の素因を有する領域で発現されており, したがって, プラークの破裂の際に血流中に放出されうる(Iiyama, K. et al., *Circ. Res.* 85:199-207, 1999; Tenaglia, A.N. et al., *Am. J. Cardiol.* 79:742-747, 1997)。別のICAM分子, 例えば, ICAM-2(CD102とも称される)およびICAM-3(CD50とも称される)は当該技術分野においてよく知られており, これらもまた血液中に存在する。

【0207】

血管細胞接着分子(VCAM)(CD106とも称される)は, 100-110 kDaの細胞表面結合イムノグロブリン様インテグリンリガンドであり, リンパ球リクルートメントの間の抗原提示細胞へのBリンパ球の結合およびTリンパ球の発達を促進する。sVCAM-1の血漿濃度は, 急性心筋梗塞, 不安定性アンギナ, および安定性アンギナを有する患者でわずかに上昇している(Mulvihill, N. et al., *Am. J. Cardiol.* 83:1265-7, 1999; Ghaisas, N.K. et al., *Am. J. Cardiol.* 80:617-619, 1997)。しかし, sVCAM-1はアテローム性動脈硬化症の病巣で発現されており, その血漿濃度はアテローム性動脈硬化症の程度と相関するかもしれない(Iiyama, K. et al., *Circ. Res.* 85:199-207, 1999; Peter, K. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:505-512, 1997)。

【0208】

マクロファージ移動阻害因子(MIF)は, 細胞媒介性免疫, 免疫制御および炎症に関与するリンホカインである。MIFは, TNF α およびIL-1 β と同様に, 内毒素血症に対する宿主応答において中心的な役割を果たす。組換えMIFとLPSをともに注入すると, LPSの致死性が悪化するが, 中和抗MIF抗体は内毒素ショックからマウスを完全に防御する。

【0209】

ヘモグロビン(Hb)は, 赤血球に見いだされる, 酸素を運搬する鉄含有球状の蛋白質である。これは, 2つのグロビンサブユニットのヘテロダイマーである。 $\alpha_2\gamma_2$ は胎児Hbと称され, $\alpha_2\beta_2$ は成人Hb Aと称され, $\alpha_2\delta_2$ は成人Hb A₂と称される。ヘモグロビンの90-95%はHb Aであり, α_2 グロビン鎖はすべてのHbタイプに見いだされ, 鎌状赤血球ヘモグロビンにも見いだされる。Hbは, 酸素を身体全体の細胞に運ぶことを担う。Hb α_2 は通常は血清中で検出されない。

【0210】

オキシステロール(コレステロールの酸化誘導体)および酸化リポ蛋白質は, アテローム性動脈硬化症の病巣で同定されており, 心血管心臓疾病の病因に役割を果たすことが示唆されている。例えば, Staprans et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:708-14, 2000を参照。最近, アテローム性動脈硬化症のプラークにおけるコレステロールのオゾン分解により形成されると

考えられるアルドール縮合生成物が，進行したアテローム性動脈硬化症の疾病を有する被験者からの血漿において検出可能であることが報告された。この分子はアテローム性動脈硬化症における動脈炎症のマーカーであるかもしれないことが示唆された (Wentworth et al., Science 302: 1053 - 6, 2003)。この刊行物はその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0211】

ヒトリボカリン型プロスタグランジンDシンターゼ (hPDGS) (β -トレースとも称される) は，30 kDaの糖蛋白質であり，プロスタグランジンHからプロスタグランジンD2の形成を触媒する。hPDGSの上昇が不安定性アンギナおよび脳梗塞を有する患者からの血液において同定されている (EP0999447A1)。さらに，hPDGSは，虚血性エピソードの有用なマーカーであるようである (EP0999447A1)。

10

【0212】

マスト細胞トリプターゼ (アルファトリプターゼとしても知られる) は，275アミノ酸 (30.7 kDa) の蛋白質であり，マスト細胞中に存在する主要な中性プロテアーゼである。マスト細胞トリプターゼは，マスト細胞活性化の特異的マーカーであり，ぜん息および多様なアレルゲンの組に対するアレルギー性反応におけるアレルギー性気道炎症のマーカーである。例えば，Taira et al., J. Asthma 39: 315 - 22 (2002)；Schwartz et al., N. Engl. J. Med. 316: 1622 - 26 (1987) を参照。事象の後1 - 6時間の間に上昇した血清トリプターゼレベル ($> 1 \text{ ng/mL}$) は，マスト細胞の脱顆粒を特異的に示す。

20

【0213】

好酸球カチオン性蛋白質 (ECP) は，16 - 24 kDaの分子量変種を有し，pH 10.8のpIを有する不均一な蛋白質である。血清ECPの評価は，気管支ぜん息における肺炎症を反映すると想定される (Koller et al., Arch. Dis. Childhood 73: 413 - 7 (1995))。また，Sorkness et al., Clin. Exp. Allergy 32: 1355 - 59 (2002)；Badr-el Din et al., East Mediterr. Health J. 5: 664 - 75 (1999) も参照。

【0214】

インターロイキン10 ("IL-10") は，160アミノ酸 (予測分子量18.5 kDa) のサイトカインであり，サイトカインの4つの α -ヘリックス束のファミリーのメンバーである。IL-10は，溶液中では，見かけ分子量39 kDaを有するホモダイマーを形成する。ヒトIL-10遺伝子は，染色体1に位置する (Viera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1172 - 76 (1991)；Kim et al., J. Immunol. 148: 3618 - 23 (1992))。IL-10の過剰発現は，敗血症におけるマーカーとして同定されており，重篤性および死亡率を推定することができる (Gogos et al., J. Infect. Dis. 181: 176 - 80 (2000))。

30

【0215】

(vi) 肺障害の例示的マーカー

KL-6 (MUC1とも称される) は，肺胞細胞で発現される高分子量 ($> 300 \text{ kDa}$) の粘液性糖蛋白質である。KL-6の血清レベルは間質性肺疾病において上昇すると報告されており，これは労作性呼吸困難により特徴づけられる。KL-6は，種々の間質性肺疾病，例えば，肺線維症，間質性肺炎，サルコイドーシス，および間質性肺炎のマーカーであることが示されている。例えば，Kobayashi and Kitamura, Chest 108: 311 - 15 (1995)；Kohnno, J. Med. Invest. 46: 151 - 58 (1999)；Bando et al., Ann. Rheum. Dis. 59: 257 - 62 (2000)；およびYamane et al., J. Rheumatol. 27: 930 - 4 (2000) を参照。

40

50

【0216】

サーファクタント蛋白質は、アポ蛋白質のファミリーであり、複合体中でリン脂質と会合している。SP-A, B, C, およびDとして知られる4つの主要なサーファクタント蛋白質が存在する。サーファクタント蛋白質の種々のものが、肺疾病と関連づけられている。例えば、Doyle et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156:1217-29, 1997; Bersten et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:648-52, 2001; Suwabe, Ribnsho Byori 50:1061-66, 2002; Cheng et al., Crit. Care Med. 31:311-13, 2003; Hastings, J. Clin. Monit. Comput. 16:385-92, 2000

10

【0217】

好中球エラスターゼは、蛋白質分解性酵素であり、長い間、肺障害のマーカーとして、全身循環中および気管支肺胞の洗浄液中の両方で測定されてきた。例えば、Morales et al., Crit. Care Med. 31(4 Suppl):S189-94, 2003を参照。

【0218】

タイプIVコラーゲン(基底膜の主要な構成成分)の分解に伴う生成物、例えば、コラーゲンの7S蛋白質フラグメントは、肺創傷を示すために用いられてきた。増加した7S蛋白質レベルは、心肺バイパスを受けた患者の気管支肺胞の洗浄液中における高いマトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP; 蛋白質分解性酵素)および好中球濃度と関連することが示されている。例えば、Owen et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 29:283-94, 2003を参照。

20

【0219】

(vii) 神経組織の障害の例示的特異的マーカー

血管疾病が心筋層以外の組織に影響を与える場合(例えば、発作の場合)、心筋組織障害のマーカー以外の組織障害の特異的マーカーが特に有用であろう。例として発作を考えると、以下の例示的神経組織の障害の特異的マーカーのリストが与えられる。このリストは限定を意味するものではない。

【0220】

アデニレートキナーゼ(AK)は、偏在する22kDaのサイトゾル酵素であり、ATPおよびAMPのADPへの相互変換を触媒する。哺乳動物組織においてアデニレートキナーゼの4つのアイソフォームが同定されている(Yoneda, T. et al., Brain Res Mol Brain Res 62:187-195, 1998)。AK1アイソフォームは、脳、骨格筋、心臓、および大動脈において見いだされる。血清AK1は、神経組織の障害のマーカーとしてAKアイソフォームの中では最も高い特異性を有するようである。AKは、その主要な起源が神経組織であるため、脳虚血の脳脊髄液マーカーとして最も適しているかもしれない。

30

【0221】

ニューロトロフィンは、哺乳動物の神経系で発現される成長因子のファミリーである。例としては、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)およびニューロトロフィン-4/5(NT-4/5)が挙げられる。ニューロトロフィンは、主として標的誘導性パラクリンまたはオートクリン神経栄養因子としてその効果を発揮する。ニューロンの生存、分化および維持におけるニューロトロフィンの役割はよく知られている。これらは、発現および細胞標的について、部分的に重複するが異なるパターンを示す。中枢神経系における効果に加えて、ニューロトロフィンはまた、末梢の求心性ニューロンおよび遠心性ニューロンにも影響を及ぼす。

40

【0222】

BDNFは、神経細胞および/またはグリア細胞の成長および生存を支持する強力な神経栄養因子である。BDNFは、32kDaの前駆体である"pro-BDNF"分子とし

50

て発現され、切断されて成熟BDNF型となる(Mowla et al., J. Biol. Chem. 276:12660-6(2001))。最も大量に存在する活性な形のヒトBDNFは、27kDaのホモダイマーであり、強い疎水的相互作用で一緒に保持された2つの同一の119アミノ酸のサブユニットから形成される。しかし、pro-BDNFもまた、細胞外に放出され、生物学的に活性である。

【0223】

NT-3もまた、2つの119-アミノ酸のサブユニットから構成される27kDaのホモダイマーである。皮質細胞の初代培養物にNT-3を加えると、酸素-グルコース遮断により引き起こされる悪化神経死が起こり、これはおそらく酸素フリーラジカルメカニズムによる(Bates et al., Neurobiol. Dis. 9:24-37, 2002)。NT-3は、不活性なpro-NT-3分子として発現され、切断されて成熟した生物学的に活性な形になる。

10

【0224】

カルビンジン-Dは、28kDaの、サイトゾルのビタミンD依存性Ca²⁺-結合蛋白質であり、細胞内カルシウムレベルを安定化させることにより細胞保護機能を果たす。カルビンジン-Dは、中枢神経系、主としてグリア細胞、および遠位尿細管の細胞において見いだされる(Hasegawa, S. et al., J. Urol. 149:1414-1418, 1993)。カルビンジン-Dの正常な血清濃度は<20pg/ml(0.7pM)である。血清カルビンジン-D濃度は、心臓停止の後に上昇することが報告されており、この上昇は、脳虚血によるCNSの障害の結果であると考えられている(Usui, A. et al., J. Neurol. Sci. 123:134-139, 1994)。血清カルビンジン-Dの上昇は、虚血後の再灌流の直後に上昇しプラトーに達する。最大血清カルビンジン-D濃度は700pg/ml(25pM)程度でありうる。

20

【0225】

クレアチンキナーゼ(CK)は、ATPおよびクレアチンからのADPおよびホスホクレアチンの可逆的な形成を触媒するサイトゾル酵素である。脳特異的CKアイソフォーム(CK-BB)は、85kDaのサイトゾル蛋白質であり、総脳CK活性の約95%を占める。これはまた、心臓の組織、腸、前立腺、直腸、胃、平滑筋、甲状腺子宮、膀胱、および静脈に有意な量で存在する(Johnsson, P. J., Cardiothorac. Vasc. Anesth. 10:120-126, 1996)。血清中のCK-BBの上昇は、血液脳関門の透過性の増加と組み合わされた虚血による神経組織の障害に起因するものでありうる。重症の発作においては、CK-BBの血清濃度は上昇し、発作の開始の直後にピークに達し(24時間以内)、3-7日後にゆっくりと正常に戻る(4)。

30

【0226】

グリア細胞繊維性酸性蛋白質(GFAP)は、55kDaのサイトゾル蛋白質であり、これは、大グリア細系の主要な構成成分であり、神経膠星状細胞中の主要な中間体細系蛋白質である。GFAPは、CNS中に存在する間質性細胞であり、血液脳関門の近くに見いだされる神経膠星状細胞に特異的である。血清GFAPは、虚血性発作の後に上昇し(Niebroj-Dobosz, I., et al., Folia Neuropathol. 32:129-137, 1994)、GFAPの血清濃度は、発作の開始の直後に上昇するようであり、連続して増加し、ある時間(数週間)持続する。これは障害の重篤度と相関しているかもしれない。

40

【0227】

乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)は、偏在性の135kDaのサイトゾル酵素である。これはAおよびB鎖の四量体であり、NADHによりピルビン酸を還元して乳酸にする反応を触媒する。哺乳動物組織においてLDHの5つのアイソフォームが同定されており、組織特異的アイソフォームは、A鎖およびB鎖の異なる組み合わせから構成される。虚血性および出血性発作の両方の後に血清LDH活性が上昇することが報告されているが、この知見を確認するため、および創傷の重篤度と神経学的帰結との相関を決定するためには、血清におけるさらなる研究が必要である(Aggarwal, S. P. et al.

50

, J. Indian Med. Assoc. 93: 331 - 332, 1995; Maiuri, F. et al., Neurol. Res. 11: 6 - 8, 1989)。

【0228】

ミエリン塩基性蛋白質(MBP)は、実際には、14 - 21 kDaの、単一のMBP遺伝子の選択的スプライシングのにより生成されるサイトゾル蛋白質のファミリーであり、髄鞘形成のプロセスの間に軸索のまわりでのミエリン圧縮に関与しているようである。MBPは、CNSおよび末梢神経系(PNS)のシュヴァン細胞における稀突起神経膠細胞に特異的である。血清MBPは、すべてのタイプの重症の発作、特に、血栓性発作、塞栓性発作、脳内出血、およびクモ膜下出血の後に上昇するが、MBP濃度の上昇は、小から中程度の重篤度の発作を有する個体の血清では報告されておらず、これには、ラクナ型梗塞または一過性虚血性発作が含まれる(Palfreyman, J. W. et al., Clin. Chim. Acta 92: 403 - 409, 1979)。MBPの血清濃度は、障害の程度と相関することが報告されており(梗塞体積)、また神経学的帰結とも相関するかもしれない。

【0229】

神経細胞接着分子(NCAM)は、CD56とも称され、170 kDaの細胞表面に結合したイムノグロブリン様インテグリンリガンドである。これは、神経系における神経細胞およびグリア細胞の相互作用の維持に関与しており、神経膠星状細胞、稀突起神経膠細胞、シュヴァン細胞、ニューロン、および軸索の表面で発現されている。NCAMは、発達している骨格筋の筋管にも局在し、その発現は発生、脱神経および再神経の間に骨格筋中でアップレギュレートされる。

【0230】

プロテオリピド蛋白質(PLP)は、CNSミエリンの主要な構成成分である、30 kDaの一体化した膜蛋白質である。PLPはCNS中の稀突起神経膠細胞に特異的であり、中心鞘中の総CNSミエリン蛋白質の約50%を占めるが、末梢神経系(PNS)ミエリン中で非常に低いレベルのPLPが見いだされている(<1%)。血清PLPは、脳梗塞の後に上昇するが、一過性虚血性発作の後は上昇しない(Trotter, J. L. et al., Ann. Neurol. 14: 554 - 558, 1983)。血清中のPLPの上昇は、物理学的損傷による神経組織の障害または梗塞または脳出血により引き起こされる虚血が原因であるかもしれず、血液脳関門の透過性の増加を伴う。

【0231】

S-100βは発作開始から4時間後に血清中で上昇し、開始から2 - 3日後に濃度は最大に達する。血清濃度が最大に達した後(20 ng/ml (1.9 mM)に達しう)る)、約1週間かけて除去除去に正常まで低下する。障害の重篤性は、S-100βの放出に対して直接的な効果を有するため、S-100βが血清中で上昇する時間の長さに影響を与えることにより、放出動力学に影響を及ぼす。S-100βは、創傷の重篤性が高まるにつれて、血清中により長い時間存在する。さらに、S-100βの血清濃度の上昇は、AMIおよび心臓手術の後の神経組織の障害に関連する合併症を示すことができる。

【0232】

トロンボモジュリン(TM)は、血管内皮細胞の表面に見いだされる、70 kDaの一本鎖の一体化した膜糖蛋白質である。虚血性発作後の血清TM濃度の変化を記述する現在の報告は、変化なしと有意な増加とが混ざっている(Seki, Y. et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 8: 391 - 396, 1997)。血清のTM濃度の上昇は内皮細胞の障害を反映しており、凝固またはフィブリン溶解活性化を示さないであろう。

【0233】

蛋白質キナーゼCのガンマアイソフォーム(PKCg)は、CNS組織に特異的であり、通常は循環中では見いだされない。PKCgは、脳虚血の間に活性化させ、虚血性半影中に対側性組織におけるより2 - 24倍高いレベルで存在するが、梗塞組織において上昇していない(Krupinski, J. et al., Acta Neurobiol

・Exp. (Warz) 58:13-21, 1998)。PKCの別のアイソフォームである、ベータIおよびベータIIは、脳虚血を有する患者からの脳組織の梗塞コアにおいて増加したレベルで見いだされた(Krupinski, J. et al., Acta Neurobiol. Exp. (Warz) 58:13-21, 1998)。さらに、PKCのアルファおよびデルタアイソフォーム(それぞれPKCaおよびPKCd)は、イヌの出血モデルを用いて、クモ膜下出血後の血管痙攣における関与が示唆されている。したがって、PKCの種々のアイソフォームを個別にまたは種々の組み合わせで測定することは、脳障害、虚血性半影の存在、ならびにクモ膜下出血後の脳血管痙攣の発達および進行の同定に有益であろう。PKCアイソフォーム、例えば、PKCgと、PKCbI, PKCbIIのいずれかまたは両方との比率もまた、虚血性半影が不可逆的に障害を受けた梗塞組織に変換される、進行しつつある発作を同定するのに有益であろう。

10

【0234】

(viii) 細胞創傷の非特異的マーカー

ミオグロビンは、筋肉細胞中に酸素を輸送する小さい(17.8 kDa)ヘム蛋白質であり、骨格筋および心筋のいずれにおいても、筋肉蛋白質の約2パーセントを構成する。ミオグロビンは分子量が低いため、循環中に急速に放出され、AMI後に上昇したレベルを示す第1のマーカーである。0.5-2時間後に上昇したレベルが循環中に現れる。しかし、上昇したレベルはまた、種々の骨格筋外傷および腎不全とも関連しており、したがって、心筋創傷に特異的ではない。

【0235】

20

ヒト血管内皮成長因子(VEGF)はダイマー蛋白質であり、報告されているその活性には、内皮細胞成長、血管新生、および毛管透過性の刺激が含まれる。VEGFは、種々の血管化された組織から分泌される。酸素が不十分な環境においては、血管内皮細胞は障害を受け、最終的に生存しないかもしれない。しかし、そのような内皮の障害は、血管平滑筋細胞によるVEGFの産生を刺激する。血管内皮細胞は、VEGFの存在下で増加した生存を示し、これはBcl-2の発現により媒介される効果であると考えられている。VEGFは、VEGF(189), VEGF(165), VEGF(164), VEGFB(155), VEGF(148), VEGF(145), およびVEGF(121)として知られる種々のスプライシング変種として存在しうる。

【0236】

30

インスリン様成長因子-1(IGF-1)は偏在する7.5 kDaの分泌蛋白質であり、発生の間に同化作用および成長ホルモンの体細胞性効果を媒介する(1, 2)。循環中では、IGF-1は通常はIGF活性を制御するIGF-結合蛋白質に結合する。血清IGF-1濃度は、虚血性発作を有する個体において有意に低下しており、低下の程度は障害の重篤度と相関するようであることが報告されている(Schwab, S. et al., Stroke 28:1744-1748, 1997)。血清IGF-1は、神経組織の障害の高感度の指標であるかもしれない。しかし、IGF-1の偏在的な発現パターンは、すべての組織がIGF-1の血清濃度に影響を及ぼす可能性があることを示す。

【0237】

接着分子は、炎症応答に関与しており、発作の結果としてその発現レベルが変化するため、急性期反応物質であるとも考えることができる。そのような接着分子の例としては、E-セレクトリン、細胞間接着分子-1、血管細胞接着分子等が挙げられる。

40

【0238】

E-セレクトリン(ELAM-1およびCD62Eとも称される)は、IL-1およびTNF α に応答して内皮細胞で発現される140 kDaの細胞表面C型レクチンであり、好中球リクルートメントの間に好中球と内皮細胞との“ローリング”相互作用を媒介する。ある研究は虚血性発作の後に血清E-セレクトリン濃度が増加することを報告しているが、別の研究では変化しないことが見いだされている(Bitsch, A. et al., Stroke 29:2129-2135, 1998; Kim, J. S., J. Neurol. Sci. 137:69-78, 1996; Shyu, K. G. et al., J

50

. *Neurol.* 244:90-93, 1997)。E-セレクチン濃度は、クモ膜下出血を有する個体のCSFにおいて上昇しており、血管痙攣を予測することができる(Pollin, R. S. et al., *J. Neurosurg.* 89:559-567, 1998)。血清E-セレクチン濃度は、アテローム性動脈硬化症、種々の形の癌、子癇前症、糖尿病、嚢胞性線維症、AMI、および他の非特異的炎症状態を有する個体において上昇している(Hwang, S. J. et al., *Circulation* 96:4219-4225, 1997; Banks, R. E. et al., *Br. J. Cancer* 68:122-124, 1993; Austgulen, R. et al., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 71:53-58, 1997; Steiner, M. et al., *Thromb. Haemost.* 72:979-984, 1994; DeRose, V. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:1234-1239, 1998)。

【0239】

ヘッドアクチベータ(HA)は、11アミノ酸の1.1kDaの神経ペプチドであり、視床下部および腸に見いだされる。これは元々、淡水腔腸動物であるヒドラにおいて見いだされ、ここでは、頭特異的成長および分化因子として作用する。

【0240】

糖化ヘモグロビンHbA1cの測定は、血液グルコースが長期間の間に上昇した程度の評価を与え、したがって、患者における糖尿病を管理する程度と関連づけられている。グルコースはヘモグロビンAにゆっくり結合して、A1cサブタイプを形成する。逆反応、すなわち分解は、比較的ゆっくり進行し、蓄積物はおおよそ4週間持続する。正常な血液グルコースレベルでは、糖化ヘモグロビンは4.5%-6.7%であると予測される。しかし、血液グルコース濃度が上昇するにつれて、より多くの結合が生ずる。糖化ヘモグロビンの測定値が8.0%を超えると、一定期間血糖の管理が良好ではなかったことが示唆される。

【0241】

(ix) アポトーシスに関連するマーカー

アポトーシスとは、真核生物の“プログラムされた細胞死”経路を表す。この経路は、細胞内プロテアーゼおよびヌクレアーゼに依存しており、最終的にはゲノムDNAのフラグメント化および細胞死につながる。アポトーシスに関連するマーカーの以下の例示的一覧は、限定を意味するものではない。

【0242】

カスパーは、キナーゼによるシグナリングを暗示させる段階を追って進行する様式で“最後の審判の日”のシグナルを伝達するプロテアーゼのファミリーである。カスパーは、すべての細胞に潜在性酵素として存在する。これらは、レセプターのオリゴマー化によりその形成が開始されるレセプター付随サイトゾル複合体(例えば、TNFレセプター、FAS、およびTRAILレセプター)に、および他の細胞質アダプター蛋白質、例えばAPAF-1にリクルートされる。オリゴマー化したレセプターへのカスパーのリクルートメントは、二量体化または自己蛋白質分解性切断を伴う二量体化を介する活性化につながる。活性化カスパーは、別のカスパーを蛋白質分解して、細胞生存に重要な蛋白質を切断するカスパーカスケードを生成することができる。このシグナリング経路の最終的な結果は、アポトーシスと称される制御された細胞死の形である。

【0243】

アポトーシスに關与するカスパーの亜群は、イニシエータまたはエフェクターのいずれかとして表されてきた。カスパー-8、-9、および-10(おそらく、-2および-5)は、カスパー活性化カスケードを開始させることができ、したがってイニシエータと称される。プロトタイプであるカスパー-8および-9に基づいて、イニシエータは、二量体化のみにより(カスパー-9)または二量体化および同時に生ずる自己切断により(カスパー-8)、活性化されることができる。エフェクターであるカスパー-3、-6、および-7はカスケードを伝達し、他のカスパーによる蛋白質分解性切

断により活性化される。イニシエータであるカススペースはカススペースカスケードを開始させる原因ではないかもしれないが、これは活性化されて、カスケードの後の工程において関与することができる。すなわち、後者のシナリオにおいては、カススペースは、エフェクターと呼ぶほうが適当であろう。

【0244】

カススペース - 3 は、C P P - 3 2 , Y A M A , およびアポパインとも称され、細胞のアポトーシスの間に活性化されるインターロイキン - 1 β 変換酵素 (I C E) 様細胞内システインプロテイナーゼである。カススペース - 3 は、不活性の 3 2 k D a の前駆体として存在し、アポトーシス誘導の間に蛋白質分解的に活性化されて、2 0 k D a および 1 1 k D a のサブユニットのヘテロダイマーとなる (F e r n a n d e s - A l n e m r i , T . e t a l . , J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 3 0 7 6 1 - 3 0 7 6 4 , 1 9 9 4) 。この細胞性基質には、ポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼ (P A R P) およびステロール制御要素結合蛋白質 (S R E B P) が含まれる (L i u , X . e t a l . , J . B i o l . C h e m . 2 7 1 : 1 3 3 7 1 - 1 3 3 7 6 , 1 9 9 6) 。カススペース - 3 の正常な血漿濃度は不明である。A C S と関連したカススペース - 3 の血漿濃度の変化に関する公表された研究はない。虚血および低酸素症にともなって心筋細胞でアポトーシスが誘導されるという仮説を裏付ける証拠が増えてきている (S a r a s t e , A . , H e r z 2 4 : 1 8 9 - 1 9 5 , 1 9 9 9 ; O h t s u k a , T . e t a l . , C o r o n . A r t e r y D i s . 1 0 : 2 2 1 - 2 2 5 , 1 9 9 9 ; J a m e s , T . N . , C o r o n . A r t e r y D i s . 9 : 2 9 1 - 3 0 7 , 1 9 9 8 ; B i a l i k , S . e t a l . , J . C l i n . I n v e s t . 1 0 0 : 1 3 6 3 - 1 3 7 2 , 1 9 9 7 ; L o n g , X . e t a l . , J . C l i n . I n v e s t . 9 9 : 2 6 3 5 - 2 6 4 3 , 1 9 9 7) 。血漿カススペース - 3 濃度の上昇は、アポトーシスが関与するすべての生理的事象と関連するようである。運動の間およびその後、および脳虚血において骨格筋中でアポトーシスが誘導されることを示唆する証拠がある (C a r r a r o , U . a n d F r a n c e s c h i , C . , A g i n g (M i l a n o) 9 : 1 9 - 3 4 , 1 9 9 7 ; M a c M a n u s , J . P . e t a l . , J . C e r e b . B l o o d F l o w M e t a b . 1 9 : 5 0 2 - 5 1 0 , 1 9 9 9) 。

【0245】

カテプシン D (E . C . 3 . 4 . 2 3 . 5 .) は、可溶性のリソソームアスパラギン酸プロテイナーゼである。これは、小胞体においてプレプロカテプシン D として合成される。マンノース - 6 - リン酸タグを有するため、プロカテプシン D はマンノース - 6 - リン酸レセプターにより認識される。酸性リソソームに入ると、一本鎖プロカテプシン D (5 2 K D a) は活性化されてカテプシン D となり、次に成熟した二本鎖カテプシン D (それぞれ 3 1 および 1 4 K D a) となる。プロカテプシン D のリソソームターゲティングに関与する 2 つのマンノース - 6 - リン酸レセプターは、細胞内および外細胞膜の両方で発現している。グリコシル化は正常な細胞内輸送に重要であると考えられている。カテプシン D の基本的な役割は細胞内のおよび取り込まれた蛋白質を分解することである。カテプシン D は、抗原プロセッシングおよびペプチドホルモンの酵素的生成に関与することが示唆されている。カテプシン D の組織特異的機能は、プロラクチンのプロセッシングと関係しているようである。ラット乳腺はこの酵素を使用してプロラクチンの生物学的に活性なフラグメントを形成する。カテプシン D は、広範な種類の組織において、そのリモデリングまたは退行、およびアポトーシスにおいて機能する。

【0246】

脳 α スペクトリン (α フォドリンとも称される) は、カルシウム依存性様式でカルモジュリンと相互作用する約 2 8 4 k D a の細胞骨格蛋白質である。赤血球スペクトリンと同様に、脳 α スペクトリンはオリゴマー (特にダイマーおよびテトラマー) を形成する。脳 α スペクトリンは、2 つの E F - ハンドドメインおよび 2 3 のスペクトリン反復を含む。アポトーシス性細胞死の間におけるカススペース 3 に媒介される α スペクトリンの切断は、膜の安定性を変化させ、アポトーシス体を形成するのに重要な役割を果たしているかもし

れない。

【 0 2 4 7 】

以下の表は、種々の好ましいマーカーおよびマーカーを関連するマーカーの群に分類したものの一覧である。当業者には理解されるように、かつ本明細書に記載されるように、マーカーは、パネル中の追加のマーカーとともに考慮したときに異なる状態を示すかもしれない。あるいは、マーカーは、患者の全体的な臨床的状況を考慮したときに、異なる状態を示すかもしれない。

【 0 2 4 8 】

【表 2】

マーカー	分類
ミオグロビン	組織障害
E-セレクトイン	組織障害
VEGF	組織障害
トロポニンI および複合体	心筋の障害
トロポニンT および複合体	心筋の障害
アネキシンV	心筋の障害
β -エノラーゼ	心筋の障害
CK-MB	心筋の障害
グリコゲンホスホリラーゼ-BB	心筋の障害
心臓型脂肪酸結合蛋白質	心筋の障害
ホスホグリセリン酸ムターゼ	心筋の障害
S-100ao	心筋の障害
ANP	血圧制御
CNP	血圧制御
ウロテンシン II	血圧制御
BNP	血圧制御
カルシトニン遺伝子関連ペプチド	血圧制御
arg-バソプレシン	血圧制御
エンドセリン-1	血圧制御
エンドセリン-2	血圧制御
エンドセリン-31	血圧制御
プロカルシトニン	血圧制御
カルシホシン	血圧制御
アドレノメジュリン	血圧制御
アルドステロン	血圧制御
アンジオテンシン 1	血圧制御
アンジオテンシン 2	血圧制御
アンジオテンシン 3	血圧制御
ブラジキニン	血圧制御
カルシトニン	血圧制御
エンドセリン-2	血圧制御
エンドセリン-3	血圧制御
レニン	血圧制御
ウロジラチン	血圧制御
プラスミン	血液凝固およびうっ血
トロンビン	血液凝固およびうっ血
抗トロンビン-III	血液凝固およびうっ血
フィブリノーゲン	血液凝固およびうっ血
フォン・ビルブラント因子	血液凝固およびうっ血
D-ダイマー	血液凝固およびうっ血
PAI-1	血液凝固およびうっ血
プロテイン C	血液凝固およびうっ血
TAFI	血液凝固およびうっ血
フィブリノペプチド A	血液凝固およびうっ血

10

20

30

40

【表 3】

プラスミンアルファ2アンチプラスミン複合体	血液凝固およびうっ血
血小板因子4	血液凝固およびうっ血
血小板由来成長因子	血液凝固およびうっ血
P-セレクチン	血液凝固およびうっ血
プロトロンビンフラグメント1+2	血液凝固およびうっ血
β -トロンボグロブリン	血液凝固およびうっ血
トロンビンアンチトロンビンIII複合体	血液凝固およびうっ血
トロンボモジュリン	血液凝固およびうっ血
血栓前駆体蛋白質	血液凝固およびうっ血
組織因子	血液凝固およびうっ血
塩基性カルポニン1	血管組織
β 様1インテグリン	血管組織
カルポニン	血管組織
CSRP2	血管組織
エラスチン	血管組織
フィブリリン1	血管組織
LTBP4	血管組織
平滑筋ミオシン	血管組織
トランスジェリン	血管組織
タイプIプロコラーゲン(PICP)のカルボキシ末	コラーゲン合成
コラーゲンカルボキシ末端テロペプチド(ICTP)	コラーゲン分解
グルタチオンSトランスフェラーゼ	炎症
HIF1アルファ	炎症
IL-10	炎症
IL-1-ベータ	炎症
IL-1ra	炎症
IL-6	炎症
IL-8	炎症
リゾホスファチド酸	炎症
MDA-修飾LDL	炎症
ヒト好中球エラスターゼ	炎症
C反応性蛋白質	炎症
インスリン様成長因子	炎症
誘導性一酸化窒素シンターゼ	炎症
細胞内接着分子	炎症
乳酸デヒドロゲナーゼ	炎症
MCP-1	炎症
MDA-LDL	炎症
MMP-1	炎症
MMP-2	炎症
MMP-3	炎症
MMP-9	炎症
TIMP-1	炎症
TIMP-2	炎症
TIMP-3	炎症

10

20

30

40

【表 4】

n-アセチルアスパラギン酸	炎症
TNF レセプタースーパーファミリーメンバー	炎症
トランスフォーミング成長因子ベータ	炎症
腫瘍壊死因子アルファ	炎症
血管細胞接着分子	炎症
血管内皮成長因子	炎症
シスタチンC	炎症
サブスタンスP	炎症
ミエロペルオキシダーゼ(MPO)	炎症
マクロファージ阻害因子	炎症
フィブロネクチン	炎症
カルジオトロフィン1	炎症
ハプトグロビン	炎症
PAPPA	炎症
s-CD40 リガンド	炎症
HMG	炎症
IL-1	炎症
IL-2	炎症
IL-4	炎症
IL-6	炎症
IL-8	炎症
IL-10	炎症
IL-11	炎症
IL-13	炎症
IL-18	炎症
好酸球カチオン性蛋白質	炎症
マスト細胞トリプターゼ	炎症
VCAM	炎症
sICAM-1	炎症
TNF α	炎症
オステオプロテグリン	炎症
プロスタグランジン D-シンターゼ	炎症
プロスタグランジン E2	炎症
RANK リガンド	炎症
HSP-60	炎症
血清アミロイド A	炎症
s-IL18 レセプター	炎症
S-IL-1 レセプター	炎症
s-TNFP55	炎症
s-TNFP75	炎症
TGF-ベータ	炎症
MMP-11	炎症
ベータ NGF	炎症
CD44	炎症
EGF	炎症

10

20

30

40

【表 5】

E-セ렉チン	炎症
フィブロネクチン	炎症
好中球エラスターゼ	肺障害
KL-6	肺障害
LAMP3	肺障害
LAMP3	肺障害
肺サーファクタント蛋白質 A	肺障害
肺サーファクタント蛋白質 B	肺障害
肺サーファクタント蛋白質 C	肺障害
肺サーファクタント蛋白質 D	肺障害
ホスホリパーゼ D	肺障害
PLA2G5	肺障害
SFTPC	肺障害
MAPK10	神経組織の障害
KCNK4	神経組織の障害
KCNK9	神経組織の障害
KCNQ5	神経組織の障害
14-3-3	神経組織の障害
4.1B	神経組織の障害
APOE4-1	神経組織の障害
ミエリン塩基性蛋白質	神経組織の障害
アトロフィン 1	神経組織の障害
脳由来神経栄養因子	神経組織の障害
脳脂肪酸結合蛋白質	神経組織の障害
脳チューブリン	神経組織の障害
CACNA1A	神経組織の障害
カルビンジン D	神経組織の障害
カルプレイン	神経組織の障害
カルボニックアンヒドラーゼ XI	神経組織の障害
CBLN1	神経組織の障害
セレベリン 1	神経組織の障害
キメリン 1	神経組織の障害
キメリン 2	神経組織の障害
CHN1	神経組織の障害
CHN2	神経組織の障害
毛様体神経栄養因子	神経組織の障害
CK-BB	神経組織の障害
CRHR1	神経組織の障害
C-tau	神経組織の障害
DRPLA	神経組織の障害
GFAP	神経組織の障害
GPM6B	神経組織の障害
GPR7	神経組織の障害
GPR8	神経組織の障害
GRIN2C	神経組織の障害
GRM7	神経組織の障害

10

20

30

40

【表 6】

HAPIP	神経組織の障害
HIP2	神経組織の障害
LDH	神経組織の障害
ミエリン塩基性蛋白質	神経組織の障害
NCAM	神経組織の障害
NT-3	神経組織の障害
NDPKA	神経組織の障害
神経細胞接着分子	神経組織の障害
NEUROD2	神経組織の障害
ニューロフィラメント L	神経組織の障害
ニューログロビン	神経組織の障害
ニューロモジュリン	神経組織の障害
ニューロン特異的エノラーゼ	神経組織の障害
神経ペプチド Y	神経組織の障害
ニューロテンシン	神経組織の障害
ニューロトロフィン 1,2,3,4	神経組織の障害
NRG2	神経組織の障害
PACE4	神経組織の障害
ホスホグリセレートムターゼ	神経組織の障害
PKC ガンマ	神経組織の障害
プロテオリピド蛋白質	神経組織の障害
PTEN	神経組織の障害
PTPRZ1	神経組織の障害
RGS9	神経組織の障害
RNA 結合蛋白質制御サブユニット	神経組織の障害
S-100 β	神経組織の障害
SCA7	神経組織の障害
セクレタゴギン	神経組織の障害
SLC1A3	神経組織の障害
SORL1	神経組織の障害
SREB3	神経組織の障害
STAC	神経組織の障害
STX1A	神経組織の障害
STXBP1	神経組織の障害
シンタキシン	神経組織の障害
トロンボモジュリン	神経組織の障害
トランスサイレチン	神経組織の障害
アデニレートキナーゼ-1	神経組織の障害
BDNF*	神経組織の障害
ニューロキニン A	神経組織の障害
s-アセチルグルタチオン	アポトーシス
シトクロム C	アポトーシス
カスパーズ 3	アポトーシス
カテプシン D	アポトーシス
α -スベクトリン	アポトーシス

10

20

30

40

【 0 2 5 3 】

マーカーのユビキチン化

50

蛋白質のユビキチン媒介性分解は、多くのプロセス、例えば、細胞外物質が細胞内に取り込まれる経路、細胞膜からの生化学的シグナルの動き、および転写のオンオフスイッチなどの細胞機能の制御の調節において重要な役割を果たす。ユビキチン系は、免疫応答および発生における関与が示唆されている。ユビキチンは、分解の標的である蛋白質とコンジュゲートされる76アミノ酸のポリペプチドである。ユビキチン-蛋白質コンジュゲートは、26S蛋白質分解性複合体により認識され、これはユビキチンを蛋白質から分離して、次に蛋白質が分解される。一般的にユビキチン化された蛋白質のレベル、または特定のユビキチン-蛋白質コンジュゲートまたはそのフラグメントのレベルを、本発明の追加のマーカーとして測定することができる。さらに、ユビキチンそれ自体またはそのフラグメントの循環レベルは、本明細書に記載される方法における有用なマーカーでありうる。例えば、Hu et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 21: 865-75, 2001を参照。

10

【0254】

当業者には、ユビキチンそれ自体、ユビキチン-蛋白質コンジュゲート、またはユビキチンおよびユビキチン-蛋白質コンジュゲートの両方を認識するユビキチンのアッセイを設計しうることが理解されるであろう。例えば、サンドウィッチイムノアッセイにおいて用いられる抗体は、固相抗体および標識抗体の両方が、コンジュゲート化していないユビキチンおよびユビキチンコンジュゲートの両方において結合に利用可能なユビキチンの部分を認識するよう選択することができる。あるいは、目的とするマーカーのユビキチンコンジュゲートに特異的なアッセイは、ユビキチンを認識する1つの抗体（固相上または標識）、およびマーカー蛋白質を認識する第2抗体（固相上または標識の他方）を使用することができる。

20

【0255】

本発明は、本明細書に記載される任意のマーカーのユビキチンコンジュゲートを測定することを企図する。

【0256】

マーカーパネルおよび"パネル応答値"の使用

上述したように、疾病の診断または予後においてマーカーレベルを評価するための伝統的な方法は、典型的には、目的とするマーカーについての"閾値"を確立することを含む。次に、試料中のそのマーカーの濃度をその閾値量と比較する。予め確立された閾値より多い量は1つの状態（例えば疾病）を示し、予め確立された閾値より少ない量は、別の状態（例えば正常）を示す。当業者は、マーカーの単変量分析を行い、多数のマーカーの単変量分析のデータを組み合わせてマーカーのパネルを作成して、異なる疾病状態を弁別することができることを認識するであろう。

30

【0257】

しかし、パネル中のマーカーの数が増加するにしたがって、個々の閾値を各マーカーに適用することは、非実際的となりうる。パネル中の1またはそれ以上のマーカーについて個々の閾値を使用することは本発明の範囲内であるが、以下の節では、複数のマーカーを評価するための、マーカーレベルを特定の診断および/または予後に関連づけるうえでマーカーパネル中の1またはそれ以上のマーカーについての特定の閾値に依存しない例示的方法を説明する。むしろ、複数のマーカーの全体を単一として考慮する。マーカーを統合して単一の結果を作成する簡単な例は、2またはそれ以上のマーカーの比率を計算することでありうる。以下の例示的方法においては、試料中で測定される各マーカー濃度は、"パネル応答値"に与えられ、これをあたかも単に単一のマーカーの濃度であるかのように、"閾値"パネル応答と比較することができる。これは1またはそれ以上のマーカーの量を予め決定された閾値レベルと比較しない診断方法の一例である。

40

【0258】

疾病状態の診断に有用なマーカーを同定する適当な方法は、米国特許仮出願60/436,392（標題"METHOD AND SYSTEM FOR DISEASE DETECTION USING MARKER COMBINATIONS"）（代理人書

50

類番号071949-6801), 2002年12月24日出願; 米国特許出願10/331, 127, 標題"METHOD AND SYSTEM FOR DISEASE DETECTION USING MARKER COMBINATIONS"(代理人書類番号071949-6802), 2002年12月27日出願; およびPCT出願, 2003年12月23日出願(代理人書類番号071949-6805), (このそれぞれは, すべての表, 図面および特許請求の範囲を含め, その全体を本明細書の一部としてここに引用する)に詳細に記載されている。当業者にはまた, マーカーの単変量分析を行うことができ, 多数のマーカーの単変量分析からのデータを組み合わせてマーカーのパネルを作成して異なる疾病状態を弁別することができることが理解されるであろう。

【0259】

診断において有用なマーカーのパネルを開発するにあたっては, ある種のマーカーの存在またはレベルを試験することにより一群の被験者から多数の潜在的マーカーについてのデータを取得することができる。被験者の群を2組に分け, 好ましくは第1の組および第2の組はそれぞれほぼ等しい数の被験者を有する。第1の組には, 疾病を有することが確認されている, またはより一般的には第1の疾病状態にある被験者が含まれる。例えば, この第1の組の患者は, 最近二次的な有害な帰結を有したACS患者でありうる。以下, この第1の組の被験者を“疾病を有する”と称する。

10

【0260】

第2の組の被験者は, 単に, 第1に含まれない者である。この第2の組の被験者は, “疾病を有しない”, すなわち, 正常な被験者である。あるいは, この第2の組の被験者は, “疾病を有する”被験者により示される症状を模倣する1つの症状または一群の症状を示すよう選択することができる。以下に示されるACSの例の場合には, “疾病を有しない”群は, 同じ期間にわたって二次的な有害な帰結を有しなかったACS患者であってもよい。

20

【0261】

これらの組の被験者から得たデータは, 複数のマーカーのレベルを含む。好ましくは, 各患者について同じセットのマーカーについてのデータが入手可能である。このマーカーのセットは, 特定の疾病または状態の検出に関連性があると疑われるすべての候補マーカーを含むことができる。実際に関連性がわかっている必要はない。本明細書に記載される方法およびシステムの態様を用いて, 候補マーカーのいずれが疾病または状態の診断に最も関連性が高いかを判定することができる。2組の被験者の各マーカーのレベルは, 広い範囲で分布, 例えば, ガウス分布するかもしれない。しかし, 分布適合は必要ではない。

30

【0262】

上述したように, マーカーはしばしば, 疾病を有するか疾病を有しないとして患者を決定的に識別することができない。例えば, 患者が重複する領域中に入るマーカーレベルを有するとして測定された場合, 試験の結果は, 患者を診断する上では役に立たない。疾病または状態の検出のために, 人工的なカットオフを用いて, 陽性および陰性の試験結果を区別することができる。カットオフを選択するか否かにかかわらず, 単一のマーカーの診断ツールとしての有効性は影響されない。カットオフの変更は単に, 単一のマーカーの使用の結果得られる擬陽性の数と偽陰性の数との間のトレードオフにすぎない。そのような重複を有する試験の有効性は, しばしばROC(Receiver Operating Characteristic)曲線を用いて表される。ROC曲線は当業者によく知られている。

40

【0263】

ROC曲線の横軸は(1-特異度)を表し, これは擬陽性の比率とともに増加する。曲線の縦軸は感度を表し, これは真陽性の比率とともに増加する。すなわち, 選択された特定のカットオフについて, (1-特異度)の値を決定することができ, 対応する感度を得ることができる。ROC曲線の下面積は, 測定されたマーカーレベルが疾病または状態を正しく識別しうる確率の尺度である。すなわち, ROC曲線の下面積を用いて試験の有効性を判定することができる。

50

【0264】

単一のマーカーのレベルの測定は限定された有用性しか有しないが、追加のマーカーの測定は追加の情報を与える。しかし、2つの潜在的に無関係の測定値のレベルを正しく組み合わせることには困難が伴う。本発明の態様にしたがう方法およびシステムにおいては、疾病を有する患者と疾病を有しない患者との組についての種々のマーカーのレベルに関連するデータを用いて、マーカーのパネルを開発し、有用なパネル応答を提供することができる。データは、データベース、例えば、Microsoft Access, Oracle, 他のSQLデータベース、または単にデータファイル中で提供することができる。データベースまたはデータファイルは、例えば、患者の識別名、例えば氏名または番号、存在する種々のマーカーのレベル、および患者が疾病を有するかまたは疾病を有しないかを含むことができる。

10

【0265】

次に、各マーカーについて最初に“ウインドウ”領域を選択することができる。ウインドウ領域の位置は、最初はすべての濃度のマーカーを含むよう選択することができるが、選択は以下に説明する最適化プロセスに影響を与えるであろう。この点に関して、最適な位置であると推測される位置と近い位置で選択すると、最適化の収斂をより早くすることができるであろう。好ましい方法においては、ウインドウ領域の中心は、最初は2組の患者の重複領域のほぼ中心とすることができる。ある態様においては、“ウインドウ”領域は、当該技術分野において知られるように、単にカットオフ点または閾値であってもよい。別の態様においては、ウインドウ領域はそのマーカーについて規定された濃度範囲にわたっていてもよい。この点に関して、ウインドウ領域は、中央値の値および幅により定義することができる。実用上は、ウインドウ領域の限定の最初の選択は、被験者の各組の予め選択された百分位数にしたがって決定することができる。例えば、その点の上で疾病を有する患者の予め選択された百分位数が測定される点をウインドウ範囲の右（上）末端として用いることができる。

20

【0266】

次に、各患者についての各マーカー値を指標にマッピングすることができる。指標は、ウインドウ領域の下で1つの値を、ウインドウ領域の上で別の値を割り当てる。例えば、マーカーが一般に疾病を有しない患者についてより低い値を、疾病を有する患者についてより高い値を有する場合、ゼロ指標を特定のマーカーについての低い値に割り当て、これは陽性の診断の尤度が低い可能性を示す。他の態様においては、指標は多項式に基づいて計算することができる。多項式の係数は、疾病を有する被験者および疾病を有しない被験者のマーカー値の分布に基づいて決定することができる。以下に詳細に説明される例示的態様においては、ウインドウ領域より低いマーカー濃度に0の値を割り当て、ウインドウ領域より高いマーカー濃度に1の値を割り当てる。ウインドウ領域の中では、濃度は0と1との間の値に直線的に内挿する。以下の例ではウインドウ中では一次関数を選択しているが、原理的にはウインドウ中のマーカー濃度に任意の非線形関数を適用することもでき、これは次節で説明する。

30

【0267】

多くの疾病状態においては、その状態と関連する非特異的マーカーが上昇する。しかし、ある閾値より上では、マーカーの値がより高いことは、疾病状態の確率がより高いことと相関しないかもしれない。ある閾値より下では、マーカー値がより低いことは疾病状態の確率がより低いことと相関しないかもしれない。この状況では、指標関数はマーカー値にともなって直線的に増加しないであろう。好ましい態様は、閾値の間では高くかつ単調な変化の割合を有し、それ以外のところでは小さい変化の割合を有する関数である指標関数である。このタイプの関数の例は、ランプ関数、ステップ関数、またはシグモイド関数である。低いほうの閾値を重複領域（またはウインドウ領域）の始めと関連づけ、高い方の閾値を重複領域の終わりに関連づけることができる。低いほうの閾値より下では、疾病の確率は実質的に0であり、一方、高い方の閾値より上では、疾病の確率は1である。指標関数がステップ関数であり、各マーカーについて重み付けの値が1である場合には、パネ

40

50

ル応答は単にウインドウより上のマーカーの数であることに注意すべきである。この事例は、上述で用いた、 m 個のマーカーのうちそのウインドウより上の n 個を有する最良のパネルを検索する例と同一である。指標が閾値の近くで連続的に変化することを可能とすることにより、パネル応答をウインドウのちょうど下のマーカーに対して感受性とすることができる。 m 個のマーカーのうち n 個の例または指標値が連続的ではないステップ関数の例に含まれるため、この情報は失われない。 $M \times W$ にわたって合計する別の慣用的な方法では、 M との直線的な関係に強制される。しかし、上で説明したように、最も適当な指標関数は、マーカー値とともに直線的には増加しない。別の好ましい態様においては、ランプ関数を上昇指標関数として用いる。ウインドウ領域中の指標値は、一方の端での 0 の値から他方の端での 1 の値まで直線的に様々でありうる。別の態様においては、指標値の非線形変動を用いることができる。ランプ関数は単純であるという利点を有し、この事例では他の関数とよく近似する。パラメータを適切に選択すれば、ランプ関数はステップ関数と同等でありえ、またはマーカー値にともなって直線的に増加することができる。

10

【0268】

ある疾病状態、例えば不安定性アンギナにおいては、特異的マーカー、例えば心臓トロポニン（トロポニン I および T およびトロポニン I，T および C の複合体を含む心臓トロポニンのアイソフォームを含む）は、正常な集団より上昇しているかもしれないが、さらなる上昇は急性状態（この場合は心筋梗塞）を示す。不安定性アンギナは心臓組織の小さい壊死につながる虚血性状態である。心筋梗塞の間には、心臓組織の大きな壊死が存在する。心臓壊死に特異的である心臓トロポニンは、両方の状態で上昇するが、上昇の量は壊死の量に関連する。不安定性アンギナの診断における心臓トロポニンの最もよい指標関数は、上昇指標関数ではないであろう。好ましい態様においては、指標関数は、不安定性アンギナの予測された値の近くでピークに達し、マーカー値が予測値の上または下であるときに減少する関数であろう。このタイプの関数の例には、ガウス関数、三角関数、台形関数、または二乗関数が含まれる。これらの関数は、目的とするマーカー値を特定の値のまわりに位置させる傾向にある。そのような指標関数の使用の別の例は、マーカー値のパターンが疾病状態を示す場合である。例えば、1 またはそれ以上のマーカーがある範囲の値の中であるとき疾病状態が示される。所望の場合には、このタイプの指標の使用により、マーカー値のパターンの認識が可能となる。

20

【0269】

種々のマーカーの相対的重要度は重み係数により表される。重み係数は、最初に各マーカーについての係数として設定することができる。カットオフ領域については、重み係数の最初の選択は、任意の許容しうる値に選択することができるが、選択は最適化プロセスに影響するであろう。この点に関して、最適な位置であると疑われる位置の近くにおける選択は、最適化のより早い収束を容易にするであろう。好ましい方法においては、許容しうる重み付け係数は、0 と 1 との間の範囲であり、各マーカーについての最初の重み付け係数は、0.5 に設定することができる。好ましい態様においては、各マーカーについての最初の重み付け係数は、そのマーカーそれ自身の有効性に関連するであろう。例えば、単一のマーカーについて ROC 曲線を作成し、ROC 曲線の下面積をそのマーカーについての最初の重み付け係数として用いることができる。

30

40

【0270】

次に、2つの組のそれぞれの各被験者についてパネル応答を計算することができる。パネル応答は、各マーカーレベルがマッピングされる指標と、各マーカーについての重み付け係数との関数である。好ましい態様においては、各被験者（ j ）についてのパネル応答（ R ）は以下のように表される：

【数1】

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

式中、 i はマーカー指標であり、 j は被験者指標であり、 w_i はマーカー i についての重

50

み付け係数であり， I はマーカー i についてのマーカーレベルが被験者 j についてマップされる指標値であり， Σ はすべての候補マーカー i についての合計である。

【0271】

マーカー値ではなく指標値を用いることの1つの利点は，異常に高いかまたは低いマーカーレベルは，その特定のマーカーについての疾病を有するかまたは疾病を有しないとの診断の確率を変化させないことである。典型的には，あるレベルより高いマーカー値は一般にある状態を示す。そのレベルより高いマーカー値は，同じ確からしさをもってその状態を示す。すなわち，異常に高いマーカー値はその状態の確率が異常に高いことを示さないかもしれない。カットオフ領域の一方の側で一定である指標を用いると，この懸念を排除することができる。

10

【0272】

パネル応答は，マーカーレベルと他の因子，例えば，患者の人種および性別を含むいくつかのパラメータの一般的関数であってもよい。パネル応答に寄与する他の因子には，ある時間にわたる特定のマーカーの値の傾きが含まれる。例えば，患者は，最初に病院に到着したときに，特定のマーカーについて測定することができる。1時間後に同じマーカーを再び測定し，変化のレベルをパネル応答に反映させることができる。さらに，他のマーカーから追加のマーカーを誘導することができ，これはパネル応答の値に寄与することができる。例えば，2つのマーカーの値の比率は，パネル応答を計算するうえで1つの因子である。

【0273】

被験者の各組の各被験者についてパネル応答を得ると，次に各組についてのパネル応答の分布を分析することができる。有効なパネルの選択を容易にするために，目的関数を定義することができる。目的関数は一般にパネルの有効性を示すはずであり，例えば，疾病を有する組の被験者のパネル応答と，疾病を有しない組の被験者のパネル応答との重複により表すことができる。このようにして，例えば，重複を最小限にすることにより，目的関数を最適化して，パネルの有効性を最大にすることができる。

20

【0274】

好ましい態様においては，2組の被験者のパネル応答を表すROC曲線を用いて目的関数を定義することができる。例えば，目的関数は，ROC曲線の下を面積を反映してもよい。曲線の下を面積を最大にすることにより，マーカーのパネルの有効性を最大にすることができる。別の態様においては，ROC曲線の他の特徴を用いて目的関数を定義することができる。例えば，ROC曲線の傾きが1と等しくなる点は，有用な特徴でありうる。別の態様においては，感度と特異度との積が最大になる点（“膝”と称されることもある）を用いることができる。ある態様においては，膝における感度を最大にすることができる。さらに別の態様においては，予め決定された特異度レベルにおける感度を用いて，目的関数を定義することができる。他の態様では，予め決定された感度レベルにおける特異度を用いることができる。さらに別の態様においては，これらのROC曲線の特徴の2またはそれ以上の組み合わせを用いることができる。

30

【0275】

パネル中のマーカーの1つが診断されている疾病または状態に特異的であることが可能である。そのようなマーカーがある閾値の上又は下で存在する場合，パネル応答は，“陽性”の試験結果を返すよう設定することができる。しかし，閾値が満足できないものである場合，なおマーカーのレベルを目的関数に対する潜在的寄与として用いることができる。

40

【0276】

最適化アルゴリズムを用いて目的関数を最大にまたは最小にすることができる。最適化アルゴリズムは当業者にはよく知られており，例えば，いくつかの一般に入手可能な最小化または最大化関数，例えばSimplex法および他の制約付き最適化手法が挙げられる。当業者には，いくつかの最小化関数は，局所的最小ではなく包括的最小を検索するのに他のものより優れていることが理解されるであろう。最適化プロセスにおいては，各マ

50

ーカーについてのカットオフ領域の位置およびサイズは、マーカーあたり少なくとも2の自由度を与えるよう可変とすることができる。そのような可変パラメータは、本明細書において独立変数と称される。好ましい態様においては、各マーカーについての重み付け係数もまた、最適化アルゴリズムの反復に際して可変でありうるようにする。種々の態様においては、これらのパラメータの順列を独立変数として用いることができる。

【0277】

上述したパラメータに加えて、各マーカーのセンスを独立変数として用いることもできる。例えば、多くの場合、あるマーカーについて、より高いレベルが一般に疾病を有する状態または疾病を有しない状態を示すか否かが不明でありうる。そのような場合、最適化プロセスが両方の側に検索をすることを可能とすることは有用であろう。実用的には、これはいくつかの方法により実行することができる。例えば、1つの態様においては、センスは最適化プロセスにより正と負の間で反転することができる、真に分離された独立変数でありうる。あるいは、センスは重み付け係数を負とすることにより実行することができる。

10

【0278】

本明細書の教示中では、しばしば簡単のために、マーカーは疾病を有する患者で上昇しているか、または“正センス”マーカーである。しかし、これは常に正しいとは限らず、しばしば、特に乏しい単変量マーカーについては、パネル中の他のマーカーと一緒に用いたときに、そのマーカーが正または負のセンスで最もよく用いられるかは単変量分析からでは明らかではない。マーカーのセンスが反転していれば、そのマーカーについての指標関数を反転させることが簡単である。センスが不明である場合、サーチエンジンは、これを自由度として含むことができる。例えば、1つの態様においては、センスは、最適化プロセスにより正と負の間で反転することができる、真に分離した独立変数であるかもしれない。最適なパフォーマンスのためには、センスを正しくないものから正しいものに滑らかにマッピングしなければならず、サーチエンジンが正しいセンスに向けて動くことを可能とする圧力が存在しなければならない。好ましい態様においては、被検物質の重み付け係数が負の値に行くことを可能とすることによりセンスを切り換える。間違ったセンスを選択すると、マーカーをパネル応答に含めることは目的関数にネガティブに影響するため、重み付け係数は0に向かうよう推進されるであろう。サーチエンジンは、重み付け係数を、0を超えて正しいセンスに向かわせることができるであろう。

20

30

【0279】

ある種の制限を有する最適化アルゴリズムも提供することができる。例えば、得られるROC曲線は、特定の値より大きい曲線下面積を提供するよう制限することができる。0.5の曲線下面積を有するROC曲線は完全な無作為性を示すが、1.0の曲線下面積は2つの組の完全な分離を反映する。すなわち、特に目的関数が曲線下面積を含まない場合には、最小の許容可能な値、例えば0.75を制限として用いることができる。他の制限には、特定のマーカーの重み付け係数の限定が含まれる。別の制限は、すべての重み付け係数の合計を特定の値、例えば1.0に限定することができる。

【0280】

最適化アルゴリズムの反復は一般に独立パラメータを変化させて、制限を満足させながら、目的関数を最小化または最大化する。反復回数は最適化プロセスにおいて限定することができる。さらに、最適化プロセスは、2つの連続する反復の間の目的関数の相違が予め決定された閾値より低くなり、最適化アルゴリズムが局所的最小または最大の領域に達したことを示したときに終了することができる。

40

【0281】

実用上は、多数のマーカーからの疾病状態の診断は混乱する場合がある。しばしば、個々のマーカー値は互いに矛盾するよう見えるかもしれない。個々のマーカーが非常に有効ではないパネルにおいては、その意味を理解することは非常に困難である。好ましい態様においては、マーカー値を組み合わせ、疾病の尤度の増加とともに増加するスカラー値とする関数を定義する。このようにして、多数のマーカーからの情報を使用可能な形で

50

与えることができる。この定義された関数は、本明細書においてパネル応答（PR）と称され、これはマーカー値：

【数 2】

$$(M_{0-n})$$

の関数であり、

【数 3】

$$PR = f(M_{0-n})$$

10

として表される。

【0282】

パネル応答は、すべての値が 0 と 1 との間になるような目盛りとすることができる。試験の有効性はパネル応答の目盛り付けにはよらないため、目盛り付けはこの方法の結果には影響を与えないであろう。しかし、目盛り因子によってのみ異なるパネル応答関数は実際には同じ解を示すため、パネル応答を所定の目盛りに強制することにより、不要な冗長さを除去することができるであろう。パネル応答はまた、マーカーレベルおよび他の因子、例えば、患者の病歴、患者の年齢、人種および性別等を含むいくつかのパラメータの一般関数であってもよい。

20

【0283】

好ましい態様においては、各被験者についてのパネル応答（PR）は以下のように表される：

【数 4】

$$PR = \sum_{\text{Markers}} I_i(M_i) \cdot W_i$$

式中、 i はマーカー指標であり、 W_i はマーカー i についての重み付け係数であり、 M_i はマーカー i についてのマーカー値であり、 I はマーカー i についての指標関数であり、 Σ はすべての候補マーカーについての合計である。

30

【0284】

重み係数は指標関数を定め、最終的なパネル応答に対して、より重要なまたは特異的なマーカーがより強い影響を有することを可能とする。指標関数はマーカー値をマーカーの病理学に適当な関数形にマッピングする。指標関数は複雑なものでありえ、マーカーとマッチするように選択すべきである。これは、以下に記載する態様において説明する。指標関数は各マーカーについて異なる関数形であってもよい。1つの例においては、指標関数はマーカー値を疾病状態の確率にマップすることができる。このマッピングはマーカー値の単純な関数ではないかもしれない。この例においては、各マーカーからの前記指標を合計して、患者が疾病を有する確率と関係する相対的指標を決定することができる。好ましい態様においてはすべての重み付け係数の合計は、特定の値、例えば 1.0 に制限される。好ましい態様においては指標関数は、0 と 1 との間の値に制限される。さらに別の好ましい態様においては、上述の制限の両方が満足され、したがって、パネル応答もまた 0 と 1 との間の値に制限される。

40

【0285】

すなわち、最適化プロセスは、各マーカーについての重み付け係数およびマーカー値を指標にマッピングするためのカットオフ領域を含むマーカーのパネルを提供することができる。より少ないマーカーレベルの測定を必要とするより低いコストのパネルを開発するためには、あるマーカーをパネルから排除することができる。この点に関して、パネル中の各マーカーの有効寄与度を決定して、マーカーの相対的重要度を識別することができる。1つの態様においては、最適化プロセスから得られた重み付け係数を用いて、各マーカー

50

一の相対的重要度を決定することができる。最も低い係数を有するマーカーを排除することができる。

【0286】

適切なパネルは、実用上の理由でしばしば10またはそれ以下のマーカーを意味しており、これを決定するためには、全体的な結果に有意に寄与しないマーカーを系統的に除く方法を見いださなければならない。これは、各マーカーからの寄与度を計算することにより行う。これを行う方法は、被検物質をパネルから除き、目的関数を再計算することである。目的関数の変化をマーカーの寄与度と関連づける。次に、マーカーを貢献度の低い順に並べる。重み付け係数を各被検物質に適用する態様においては、被検物質についての重みをゼロに設定して、被検物質をパネルから除くことができる。重み付け係数を各被検物質に適用する態様においては、単に重みを貢献度として用いることができない。これが何故正しい結果を与えないかの一例は、マーカーが試験に対してゼロの影響力を有する場合である。この場合には、サーチプログラムにより与えられる重みは任意の値であることができ、したがって、その重みが最も高くなることもありうる。

10

【0287】

ある場合においては、より低い重み付け係数は低い重要度を示さないかもしれない。同様に、より高い重み付け係数は高い重要度を示さないかもしれない。例えば、最適化プロセスは、関連するマーカーが診断とは無関係であれば、高い係数を与えるであろう。この例では、係数をより低いほうに動かすことには何の利点もない。この係数を変動させることは目的関数の値には影響しないであろう。

20

【0288】

本明細書に記載される方法においては、パネル応答値それ自体もまたマーカーとして用いることができる。例えば、複数のマーカーからパネルを構築し、パネルの各マーカーを、そのマーカーについて適用すべき関数および重み係数により記述することができる（上述した方法により判定して）。試験すべき試料について各個別のマーカーレベルを決定し、そのレベルをその特定のマーカーについて予め決定された関数および重み係数に適用して、そのマーカーについての試料値に到達する。各マーカーについての試料の値と一緒に加えて、試験すべきその特定の試料についてのパネル応答に到達する。“疾病”および“非疾病”群の患者について、得られたパネルの応答を、別の疾病マーカーのレベルであるかのように取り扱うことができる。

30

【0289】

そのような方法を用いて、パネル応答に基づいて新規“マーカー”を規定することができる。さらに“パネル応答のパネル応答”を決定することもできる。例えば、ACSおよび非ACS被験者を以下のように分割することができる：（1）ACS＋有害な帰結；（2）ACS－有害な帰結；（3）正常。上述のように複数のマーカーから作成された第1のパネルを規定し、すべての被験者についてこの第1のパネルからパネル応答を得る。次に、これらの3群のいずれか1つのメンバーをこれらの群の他の任意のメンバーのパネル応答と比較して、パネル応答に基づいてこれらの2つの群を最もよく弁別する関数および重み係数を定義することができる。3つの群の全てを2つ1組で比較するまでこれを繰り返すことができる。第2のパネルを規定するのに用いられる“マーカー”は、以下の任意のまたはすべてを新規“マーカー”として含んでもよい：（1）対（2）をマーカー1として；（1）対（3）をマーカー2として；（2）対（3）をマーカー3として。

40

【0290】

試験の正確性の尺度はFischer et al., Intensive Care Med. 29:1043-51, 2003; Zhou et al., Statistical Methods in Diagnostic Medicine, John Wiley & Sons, 2002; および Motulsky, Intuitive Biostatistics, Oxford University Press, 1995; および当業者によく知られる他の刊行物に記載されるようにして得ることができ、これを用いて所定のマーカーまたはマーカーのパネルの有効性を判定することができる。こ

50

これらの尺度には、感度および特異度、予測値、尤度比、診断オッズ比、ハザード比、およびROC曲線下面積が含まれる。上述したように、適当な試験は、これらの種々の尺度について以下の結果の1またはそれ以上を示すことができる：

約0.5より大きい、より好ましくは約0.7より大きい、さらにより好ましくは約0.8より大きい、さらにより好ましくは約0.85より大きい、最も好ましくは約0.9より大きいROC曲線下面積；

少なくとも約1.1またはそれ以上または約0.91またはそれ以下、より好ましくは少なくとも約1.25またはそれ以上または約0.8またはそれ以下、さらにより好ましくは少なくとも約1.5またはそれ以上または約0.67またはそれ以下、さらにより好ましくは少なくとも約2またはそれ以上または約0.5またはそれ以下、最も好ましくは少なくとも約2.5またはそれ以上または約0.4またはそれ以下のポジティブまたはネガティブの尤度比；

少なくとも約2またはそれ以上または約0.5またはそれ以下、より好ましくは少なくとも約3またはそれ以上または約0.33またはそれ以下、さらにより好ましくは少なくとも約4またはそれ以上または約0.25またはそれ以下、さらにより好ましくは少なくとも約5またはそれ以上または約0.2またはそれ以下、最も好ましくは少なくとも約10またはそれ以上または約0.1またはそれ以下のオッズ比；および/または

少なくとも約1.1またはそれ以上または約0.91またはそれ以下、より好ましくは少なくとも約1.25またはそれ以上または約0.8またはそれ以下、さらにより好ましくは少なくとも約1.5またはそれ以上または約0.67またはそれ以下、さらにより好ましくは少なくとも約2またはそれ以上または約0.5またはそれ以下、および最も好ましくは少なくとも約2.5またはそれ以上または約0.4またはそれ以下のハザード比。

10

20

30

【0291】

診断の正確性の尺度、例えば上述したものは、しばしば信頼区間またはp値とともに報告される。これらは、当該技術分野においてよく知られる方法により計算することができる。例えば、Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983を参照。本発明の好ましい信頼区間は、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%および99.99%であり、一方、好ましいp値は、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、および0.0001である。

【0292】

アッセイ測定戦略

本発明のマーカーを検出し分析するための多くの方法およびデバイスが当業者にはよく知られている。患者試験試料中のポリペプチドまたは蛋白質に関しては、イムノアッセイデバイスおよび方法がしばしば用いられる。例えば、米国特許6,143,576；6,113,855；6,019,944；5,985,579；5,947,124；5,939,272；5,922,615；5,885,527；5,851,776；5,824,799；5,679,526；5,525,524；および5,480,792（このそれぞれは、表、図面および特許請求の範囲を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する）を参照。これらのデバイスおよび方法は、種々のサンドウィッチ、拮抗的、または非拮抗的アッセイフォーマットにおいて標識された分子を用いて、目的とする被検物質の存在または量に関連したシグナルを生成することができる。さらに、ある種の方法およびデバイス、例えばバイオセンサーおよび光学的イムノアッセイを用いて、標識分子を必要とせずに、被検物質の存在または量を測定することができる。例えば、米国特許5,631,171および5,955,377（それぞれ表、図面および特許請求の範囲を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する）を参照。当業者にはまた、ロボット器械、例えば、限定されないが、Beckman Access, Abbott AxSym, Roche Elec Sys, Dade Behring Strat usシステム等も、本明細書に教示されるイムノアッセイを実施することができるイムノ

40

50

アッセイ分析器に含まれることが理解されるであろう。

【0293】

好ましくはマーカーはイムノアッセイを用いて分析するが、他の方法も当業者にはよく知られている（例えば、マーカーRNAレベルの測定）。マーカーの存在または量は、一般に、各マーカーに特異的な抗体を用いて測定し、特異的結合を検出する。任意の適当なイムノアッセイ、例えば、酵素結合イムノアッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、競合結合アッセイ等を用いることができる。抗体のマーカーへの特異的免疫学的結合は、直接検出しても間接的に検出してもよい。直接標識としては、抗体に結合させた蛍光または発光タグ、金属、染料、放射性核種などが挙げられる。間接的な標識としては、当該技術分野においてよく知られる種々の酵素、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等が挙げられる。

10

【0294】

マーカーに特異的な固定化された抗体の使用もまた本発明により企図される。抗体を種々の固体支持体、例えば、磁気またはクロマトグラフィーマトリクス粒子、アッセイプレートの表面（例えば、マイクロタイターウエル）、一片の固体基板材料または膜（例えば、プラスチック、ナイロン、紙）等に固定化することができる。アッセイストリップは、抗体または複数の抗体を固体支持体のアレイに被覆することにより製造することができる。次にこのストリップを試験試料中に浸漬し、次に急いで洗浄と検出の工程を行って、測定可能なシグナル、例えば呈色したスポットを得ることができる。

20

【0295】

複数のマーカーの分析は、1つの試験試料を用いて別々にまたは同時に行うことができる。マーカーの個別または逐次アッセイのためには、適切な装置としては、臨床実験室分析装置、例えば、Elec Sys (Roche)、AxSYM (Abbott)、Access (Beckman)、ADVIA (登録商標) CENTAUR (登録商標) (Bayer) イムノアッセイシステム、NICHOLS ADVANTAGE (登録商標) (Nichols Institute) イムノアッセイシステム等が挙げられる。好ましい装置または蛋白質チップは単一の表面上で複数のマーカーを同時にアッセイするものである。特に有用な物理学的フォーマットは、複数の異なる被検物質を検出するための複数の別々のアドレス可能な位置を有する表面を含む。そのようなフォーマットには、蛋白質マイクロアレイ、または"蛋白質チップ"（例えば、Ng and Ilag, J. Cell Mol. Med. 6: 329-340 (2002)）、およびある種のキャピラリー装置（例えば、米国特許6,019,944を参照）が含まれる。これらの態様においては、それぞれの別々の表面位置は、各位置で1またはそれ以上の被検物質（例えばマーカー）を検出するために固定化する抗体を含むことができる。あるいは、表面は、表面の別々の位置に固定化された1またはそれ以上の別々粒子（例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子）を含んでいてもよい。ここで、マイクロ粒子は1つの被検物質（例えばマーカー）を検出するために固定化する抗体を含む。

30

【0296】

多数の試料の効率的な加工のためにいくつかのマーカーを組み合わせて1つの試験とすることができる。さらに、当業者には、同じ個人から多数の試料（例えば、経時的な時点で）を試験することの価値が認識されるであろう。そのような一連の試料の試験により、ある期間にわたるマーカーレベルの変化を識別することができる。マーカーレベルの増加または減少、ならびにマーカーレベルの変化がないことは、疾病状態に関して有用な情報を提供するであろう。これには、限定されないが、事象の開始からのおよその時間の同定、救済可能な組織の存在および量、薬剤治療の適切性、再灌流または症状の消散により示される種々の治療の有効性、種々のタイプのACSの弁別、事象の重篤度の識別、疾病の重篤度の識別、および患者の帰結、例えば将来の事象のリスクの識別が含まれる。

40

【0297】

上述したマーカーから構成されるパネルは、鑑別診断に関連する情報を与えるよう作製することができる。そのようなパネルは、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

50

15, 20, またはそれ以上の別個のマーカーを用いて作製することができる。単一のマーカーまたはより大きなマーカーのパネルを含むマーカーのサブセットの分析は、当業者が、種々の臨床設定における臨床的感度または特異度を最適化するように実施することができる。これらには、限定されないが、救急車、緊急治療、重症治療、集中治療、監視ユニット、入院患者、外来患者、診察室、診療所、および健康スクリーニングの設定が含まれる。さらに、当業者は、単一のマーカーまたはマーカーのより大きいパネルを含むマーカーのサブセットを、上述した設定のそれぞれにおける診断閾値の調節と組み合わせて用いて、臨床的感度および特異度を最適化することができる。アッセイの臨床的感度は、アッセイが正しく予測した疾病を有する者のパーセンテージとして定義され、アッセイの特異度は、アッセイが正しく予測した疾病を有しない者のパーセンテージとして定義される (Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition, Carl Burtis and Edward Ashwood eds., W.B. Saunders and Company, p. 496)。

10

【0298】

マーカーの分析は、種々の物理学的フォーマットで行ってもよい。例えば、マイクロタイタプレートまたはオートメーションを用いて、多数の試験試料の処理を容易にすることができる。あるいは、単一の試料フォーマットを開発して、例えば、救急車移送または緊急室の設定で、タイミングのよい迅速な治療および診断を容易にしてもよい。

【0299】

別の態様においては、本発明は、マーカーの分析のためのキットを提供する。そのようなキットは、好ましくは、少なくとも1つの試験試料の分析のためのデバイスおよび試薬、およびアッセイを実施するための指針を含む。キットは任意に、マーカーパネルについて実施したイムノアッセイから得た情報を用いてある種の診断についてそうであると判定するかそうではないと判定する1またはそれ以上の手段を含んでもよい。

20

【0300】

抗体の選択

抗体の産生および選択は種々の方法で行ってもよい。例として目的とするポリペプチドを精製するか、または例えば当該分野で周知の固相ペプチド合成法を使用して目的とするポリペプチドを合成する方法がある (例えば、Guide to Protein Purification, Murray P. Deucher編, Meth. Enzymol. Vol 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields編, Meth. Enzymol. Vol 289 (1997); Kisoら, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafaviら, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwaraら, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996参照)。次いで選択したポリペプチドを (例えばマウスまたはウサギに) 注射し、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を産生させてもよい。当業者に認識されるように、抗体の生成のための多くの方法があり、それらは例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Ed HarlowおよびDavid Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。また当業者に認識されるように、抗体を模倣した結合フラグメントまたはFabフラグメントを遺伝情報から種々の方法で調製することもできる (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C.編), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992))。

30

40

【0301】

更に、選択した標的への結合に関するポリペプチドライブラリーの生成およびスクリーニングのためのファージディスプレイ法の使用が、多くの文献に報告されている。例えばCwirlaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990; Devlinら, Science 249, 404-6, 1990, ScottおよびSmith, Science 249, 386-88, 1990; およびLadnerら, 米国特許第5,571,698号を参照されたい。ファージディスプレイ法の基本コンセプトは、スクリーニングすべきポリペプチドをコードするDNAと同ポリペプチドの間の物理的結合の確立である。この物理的結合はファージ粒子によって提供され、これはポリペプチドをコードするファージゲノムを封入したキャプシッドの一部としてポリペプチドを提示する。ポリ

50

ペプチドとその遺伝物質間との物理的結合の確立によって、異なるポリペプチドを有する膨大な数のファージの大量同時スクリーニングが可能となる。標的への親和性を有するポリペプチドを提示するファージは標的に結合し、これらのファージは標的へのアフィニティスクリーニングによって濃縮される。これらのファージから提示されたポリペプチドの種類はそのそれぞれのゲノムから確認できる。その後、これらの方法を使用して所望の標的への結合親和性を有すると同定されたポリペプチドを、慣例的な方法によって大量に合成することができる。例えば米国特許第6,057,098号（全ての表、図面、および特許請求の範囲を含め、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0302】

次いでこれらの方法によって生成した抗体を選択するために、まず精製した目的とするポリペプチドとの親和性および特異性に関してスクリーニングを行い、必要であれば、その結果を結合から除外したいポリペプチドと抗体との親和性および特異性と比較してもよい。スクリーニング法は、精製したポリペプチドをマイクロタイタープレートの別々のウェル中に固定化することを含んでもよい。その後、可能性のある抗体または抗体群を含む溶液をマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに注入し、約30分から2時間インキュベートする。次いでマイクロタイタープレートのウェルを洗浄し、標識した2次抗体（例えば産生した抗体がマウス抗体の場合はアルカリホスファターゼにコンジュゲートした抗マウス抗体）をウェルに添加し、約30分間インキュベートした後洗浄する。基質をウェルに添加し、固定化したポリペプチドに対する抗体が存在する箇所を色素反応によって明らかにする。

10

20

【0303】

次いでそのようにして同定した抗体を、選択したアッセイ計画で親和性および特異性について更に分析してもよい。標的蛋白質のためのイムノアッセイの開発では、精製した標的蛋白質が標準物質の役割を果たし、これを用い、選択した抗体を使用してイムノアッセイの感度および特異性を判断する。種々の抗体の結合親和性は異なるので（例えばサンドイッチアッセイで）ある種の抗体対は立体化学的に互いに干渉しうるなど、抗体のアッセイ挙動は、抗体の絶対親和性および特異性より重要な尺度でありうる。

【0304】

当業者に認識されるように、多くの方法で抗体または結合フラグメントの生成、並びに種々のポリペプチドに対する親和性および特異性に関するスクリーニングおよび選択を行うことができるが、これらの方法は本発明の範囲を変えるものではない。

30

【0305】

治療計画の選択

種々の型の血管性疾患の好適な治療は広範かつ多様である。しかしながら、一度診断が得られると、医師は診断に適合する治療計画を容易に選択することができる。従って、本発明は急性期の時間ウィンドウの間に好適な介入を行うことを可能とする早期鑑別診断の方法を提供する。ここに記載する診断法に関係して検討される多くの疾病の好適な治療法は当業者に認識されるところである。例えばMerck Manual of Diagnosis and Therapy, 第17版 Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, 1999を参照されたい。

【0306】

ここに記載する方法による好適なマーカーパネルの同定に使用するための更なる代表的なマーカーについて、以下に簡潔に討議する。

40

【実施例】

【0307】

以下の実施例は本発明を例証するためのものである。これらの実施例はいかなる点でも本発明の範囲を制限することを意図しない。

【0308】

実施例1 血液サンプリング

血液検体は訓練を受けた研究員が抗凝血剤としてEDTAを使用して回収し、10分間以上遠心分離した。血漿成分を無菌の凍結バイアルに移し、-20℃以下で凍結した。以下の患者

50

および健常者ドナー集団からの検体を回収した（表1）。アッセイデータの統計分析を容易にするために、各患者の既往歴を得た。

【0309】

実施例2 生化学分析

標準的なイムノアッセイ技術を使用してマーカーを測定した。これらの技術は抗体を使用して蛋白質標的に特異的に結合させることを伴う。選択したマーカーに対するモノクローナル抗体を、N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン（NHS-ビオチン）をNHS-ビオチン約5部/抗体の割合で使用してビオチン化した。次いで、抗体-ビオチンコンジュゲートを標準アビジン384ウェルマイクロタイタープレートのウェルに添加し、プレートに結合しなかった抗体コンジュゲートを除去した。これによってマイクロタイタープレート内に“抗マーカー”が形成された。同じマーカーに対する別のモノクローナル抗体を、スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）およびN-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート（SPDP）（Pierce, Rockford, IL）を使用してアルカリホスファターゼにコンジュゲートさせた。

10

【0310】

TECAN Genesis RSP 200/8 Workstationでイムノアッセイを実施した。ビオチン化した抗体をあらかじめアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレートのウェルにピペッティングし、60分間インキュベートした。未結合の抗体を含有する溶液を除去し、ウェルを洗浄バッファー（150mM NaCl, 0.1% アジ化ナトリウム、および0.02% Tween-20を含有する20mM ホウ酸塩（pH 7.42）からなる）で洗浄した。血漿サンプル（10μL）をマイクロタイタープレートのウェルにピペッティングし、60分間インキュベートした。次いでサンプルを除去し、ウェルを洗浄バッファーで洗浄した。その後、抗体-アルカリホスファターゼコンジュゲートをウェルに添加し、更に60分間インキュベートし、その後、抗体コンジュゲートを除去し、ウェルを洗浄バッファーで洗浄した。基質（AttoPhos（登録商標）、Promega, Madison, WI）をウェルに添加し、蛍光産物の生成速度と患者サンプル中のマーカー濃度の関係を調べた。

20

【0311】

実施例3 呼吸困難の分析

以下の表で、臨床的呼吸困難を呈する患者個体および健常な被験者における肺表面活性蛋白質D（“SP-D”）、D-ダイマー、BNP、総心臓トロポニンI（“TnI”）、およびBNP：D-ダイマーの比率（“比率”）のレベルを比較する。呼吸困難患者を、うっ血性心不全（“CHF”）の臨床診断を受けた患者および肺塞栓症（“PE”）の臨床診断を受けた患者に分別した。BNP（pg/ml）および比率以外の全ての単位はng/mlである。

30

【0312】

【表 7】

多施設 CHF 患者					
患者 ID	SP-D	D-ダイマー	BNP	Tnl	比率
16	35.4	88	889	2.1	10.1
012	8.7	113	1228	2.2	10.9
003	6.9	62	552	0.0	8.9
11	11.7	160	987	0.5	6.2
010	13.3	145	466	0.0	3.2
18	7.9	39	330	0.0	8.6
131-2	7.2	125	1031	0.0	8.3
125-1	3.7	49	314	0.0	6.4
115	8.1	203	185	0.0	0.9
128-1	7.5	141	228	0.0	1.6
143-1	5.1	169	402	0.0	2.4
134-1	1.9	142	251	0.0	1.8
138-1	2.4	40	521	0.0	13.0
157-1	4.1	107	231	0.0	2.2
176-1	2.6	70	234	0.0	3.4
175-1	4.6	154	498	0.0	3.2
22	6.7	36	650	0.0	18.3
21	3.9	149	453	0.0	3.0
23	11.5	147	1024	0.0	7.0
103-2	3.3	70	640	0.0	9.2
20	2.9	78	858	0.0	11.0
148-2	6.2	79	1614	0.0	20.4
173-2	2.7	68	236	0.0	3.5
166-1	5.5	53	681	0.0	12.9
178-1	4.3	89	250	0.0	2.8
183-2	9.3	109	1199	0.0	11.0
189-2	2.2	270	335	0.0	1.2
42	3.5	143	846	0.0	5.9
43	4.2	63	287	0.0	4.5
54	3.5	51	302	0.0	5.9
25	4.6	61	768	0.0	12.5
53	4.5	77	1813	0.0	23.5
59	20.8	77	288	0.0	3.7
55	2.4	53	237	0.0	4.5
158-1	2.3	53	1030	0.0	19.6
平均値	6.7	100.9	624.5	0.1	7.8
中央値	4.6	79.3	498.0	0.0	6.2
標準偏差	6.3	53.1	415.8	0.5	5.9

10

20

30

40

【表 8】

PEを有する多施設患者					
患者 ID	SP-D	D-ダイマー	BNP	Tnl	比率
81	4.9	145	314.7	0.0	2.2
110	4.3	87	24.3	0.0	0.3
112	6.9	105	15.9	0.0	0.2
119	10.1	104	175.7	0.0	1.7
142	7.0	106	6.2	0.0	0.1
196	8.2	127	5.0	0.1	0.0
801-2	5.2	113	19.7	0.0	0.2
377-2	1.4	97	57.2	0.0	0.6
008264	1.3	258	121.3	0.0	0.5
008557	17.5	126	51.3	0.0	0.4
010647	3.8	106	355.3	0.0	3.4
10640	0.7	43	9.2	0.0	0.2
7329	3.4	191	287.3	0.0	1.5
008605	6.0	82	733.5	0.0	9.0
平均値	5.8	120.7	155.5	0.0	1.4
中央値	5.0	105.7	54.3	0.0	0.4
標準偏差	4.3	51.7	207.6	0.0	2.4

10

20

【 0 3 1 4 】

【表 9】

健常被験者					
患者 ID	SP-D	D-ダイマー	BNP	Tnl	比率
001511	5.1	90	20.4	0.0	0.2
001515	1.9	36	8.9	0.0	0.2
001520	1.0	61	6.5	0.0	0.1
001521	4.6	72	3.8	0.0	0.1
001524	2.3	69	11.1	0.0	0.2
001607	3.6	72	23.4	0.0	0.3
001610	1.1	52	18.3	0.0	0.4
001613	0.2	40	0.0	0.0	0.0
001616	2.6	28	0.0	0.0	0.0
001619	0.3	44	0.0	0.0	0.0
001622	1.4	25	0.0	0.0	0.0
001625	4.6	142	0.0	0.0	0.0
001628	1.6	40	0.0	0.0	0.0
001631	4.6	57	0.0	0.0	0.0
001634	7.2	60	6.6	0.0	0.1
001637	5.5	55	0.0	0.0	0.0
001640	0.0	260	19.1	0.0	0.1
001643	2.5	50	7.7	0.0	0.2
001646	0.0	56	4.7	0.0	0.1
002202	1.0	59	27.4	0.0	0.5
002205	1.7	39	23.4	0.0	0.6
002208	1.1	25	25.9	0.0	1.0
002211	0.9	55	45.9	0.0	0.8
002214	0.0	97	23.4	0.0	0.2
002217	2.8	117	15.3	0.0	0.1
002220	0.3	55	11.3	0.0	0.2
002223	2.5	47	8.1	0.0	0.2
002228	2.2	44	24.3	0.0	0.5
002229	2.6	61	11.2	0.0	0.2
002232	0.7	69	10.5	0.0	0.2
002235	0.0	54	4.0	0.0	0.1
002238	1.5	53	9.6	0.0	0.2
002241	7.5	16	10.8	0.0	0.7
002244	8.6	44	10.7	0.0	0.2
002247	3.7	68	33.1	0.0	0.5
平均値	2.5	63.3	12.2	0.0	0.2
中央値	1.9	55.0	10.5	0.0	0.2
標準偏差	2.3	42.3	11.1	0.0	0.3

10

20

30

40

【0315】

これらのデータは、肺塞栓症の診断を受けた患者におけるD-ダイマーレベルの中央値はCHF患者（これ自体、健常な被験者より高い）より高いことを示している。肺表面活性蛋白Dレベルは、健常群に比較して、いずれの疾病群でも健常群を超えてほぼ同程度まで上昇することが観察された。肺塞栓症の診断のための除外カットオフ値として $<82 \mu\text{g/ml}$ d-ダイマーを使用すると1つの擬陰性診断を得、CHF患者の35人中18人、健常者の35人中30人が正確に除外された。この患者群で、除外カットオフ値として >3.4 d-ダイマー / BNPを使用すると、ここでも1つの擬陰性診断を得たが、CHF患者の35人中25人が正確に除外

50

された。全ての疾病および健常被験者における低心臓トロポニンIレベルによって、全試験集団における心筋梗塞の発症が正確に除外される。この例は、d-ダイマー、BNP、および心臓トロポニンの測定によって呼吸困難の原因の鑑別診断を行うことができることを示している。更に、BNP、d-ダイマー、および肺表面活性蛋白質Dのレベルが正常レベルを超えて上昇し、トロポニンレベルが正常である場合、肺塞栓症は包含されうる。d-ダイマーレベルが正常範囲内である場合、肺塞栓症は除外されうる。BNPレベルが正常より高い場合、うっ血性心不全は包含されうる。心臓トロポニンレベルが正常より高い場合、心虚血または壊死のいずれかが包含されうる。

【0316】

実施例4 拡張期機能不全の同定

10

以下の表で、心臓病患者および健常被験者におけるBNP、バソプレシン、エンドセリン-2、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、ウロテンシン2、ANP、アンギオテンシンII、BNP：CGRP、BNP：ANP、BNP：ウロテンシン2の比率、およびカルシトニンのレベルを比較する。ニューヨーク心臓学会の機能的な能力および客観的評価の分類（New York Heart Association classification of functional capacity and objective assessment）に従って心臓病患者を更に分類した。Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 第9版 Boston, Mass: Little, Brown & Co; 1994, pp. 253-256を参照されたい。分類は以下のように行った：

【0317】

分類

20

NYHA1

機能的な能力：心臓病を有するが、それによる身体活動の制限は無い患者。通常、身体活動により過度の疲労、動悸、呼吸困難、または狭心痛が誘引されない。

客観的評価：心血管疾患の客観的証拠はない。

NYHA2

機能的な能力：心臓病を有し、それによって身体活動にわずかな制限がある患者。安静時は安楽である。通常、身体活動により疲労、動悸、呼吸困難、または狭心痛が誘引される。

客観的評価：最小限の心血管疾患の客観的証拠。

NYHA3

機能的な能力：心臓病を有し、それによって顕著な身体活動の制限がある患者。安静時は安楽である。通常より少ない活動により疲労、動悸、呼吸困難、または狭心痛が誘引される。

30

客観的評価：中度の心血管疾患の客観的証拠。

NYHA4

機能的な能力：心臓病を有し、それによっていずれの身体活動の維持にも不快を伴う患者。安静時でも心不全またはアンギナ性症候群の症状を示しうる。身体活動を開始すると不快は増加する。

客観的評価：重度の心血管疾患の客観的証拠。

【0318】

DDは拡張期機能不全と診断された患者を表し、駆出率は>50%である。低駆出率（EF）患者は<50%の駆出率を示す患者であり、NYHA4クラス患者は拡張期ではなく収縮期機能不全を示すとみなされる。BNP（pg/ml）および比率以外の全ての単位はng/mlであり、Nは各群の被験者数である。

40

【0319】

【表 1 0】

	BNP	バソプレシン	エンドセリン 2	CGRP	BNP/CGR P	カルシトニ ン
健常者	0	0.98	3.60	0.94	0	0.14
DD	142	1.13	4.63	1.06	247	0.20
NYHA1						
DD	152	0.89	3.70	0.77	289	0.19
NYHA2						
DD	325	0.84	3.72	1.02	309	0.16
NYHA3						
DD	600	0.99	4.38	0.66	853	0.17
NYHA4						
DD All	262	0.89	3.91	0.77	366	0.19
低 EF	839	1.10	4.38	0.97	957	0.19

10

	ウロテンシ ン 2	BNP/U2	ANP	BNP/ANP	アンギオテ ンシン 2	N
健常者	14.6	0	1.84	0	0.09	20
DD	18.9	11	2.11	162	0.09	2
NYHA1						
DD	18.4	9	1.48	113	0.08	6
NYHA2						
DD	18.8	16	1.95	149	0.09	6
NYHA3						
DD	19.8	30	1.07	297	0.06	6
NYHA4						
DD All	19.0	14	1.50	177	0.08	
低 EF	28.0	41	2.17	413	0.07	20

20

30

【 0 3 2 0】

これらのデータはウロテンシン-2およびANPによって拡張期機能不全を収縮期機能不全と区別できることを示している。どちらの場合も、収縮期機能不全の方が拡張期機能不全の場合よりレベルが高い。更に、BNPを加えることによって拡張期機能不全と収縮期機能不全の鑑別能は向上する。これはBNPおよびANPの両方の上昇は収縮期機能不全を示し、BNPが上昇してANPが正常レベルかそれ未満である場合は拡張期機能不全を示すと考えられるためである。ウロテンシン2は同様のパターンを示す。CGRPはBNPとの比率で表した場合に拡張期機能不全を収縮期機能不全と区別する能力に寄与し、収縮期機能不全の症例では拡張期機能不全に比較してより高い比率となる。

40

【 0 3 2 1】

Hammer-Lercherはコントロールおよび拡張期機能不全患者におけるNT-proBNPレベルの有意性またはその欠如について検討している (Hammer-Lercherら, Clin. Chim. Acta 310 (2):193-7 (2001))。好ましい態様では、BNPおよびNTproBNPからなるパネルによって拡張期機能不全を有する心不全患者を区別できる。NTproBNPおよびBNPが共にカットオフ値より高く上昇している場合、患者は収縮期機能不全を有する。NTproBNPが上昇せず、BNP

50

がカットオフ値より高い場合、これは患者が拡張期機能不全を有することを示す。

【0322】

実施例5 心臓鑑別診断のマーカーパネル

まず代表的なマーカーパネルを選択したが、これには血圧調節に関係するマーカーおよび心筋障害に関係する多数のマーカーを含ませ、うっ血性心不全、急性冠症候群、および心筋梗塞を診断および/または区別し、アッセイの結果に応じた治療の指標となるようにした。この目的でBNP、心臓トロポニンI（遊離型および複合型）、クレアチンキナーゼ-MB、およびミオグロビンを選択した。この実施例では、以下のような正常値の上限を使用して、測定したマーカー濃度の比較のための閾値を設定した：CKMB（4.3 ng/mL）、ミオグロビン（107 ng/mL）、およびトロポニンI（0.4 ng/mL）。少なくとも20分間の胸痛を伴うこれら3つのマーカーの上昇および/または経時的変化は、心筋梗塞を強く示唆する。更に、80pg/mL BNPを超えるBNP濃度によってこれらの患者におけるリスクが更に階層化されるが、これは、このレベルのBNPが、この閾値未満のBNPレベルである患者に比較して死亡、心筋梗塞、およびうっ血性心不全の率が上昇することに関係しているためである。更に、疾病の臨床症状を経験していない被験者でも、100pg/mLを超えるBNPレベルはうっ血性心不全の発病率が実質的に高いことと関係している。従って、このマルチマーカー法によって、個別のマーカーより、実質的により臨床的に関連性のある情報が得られる。

10

【0323】

マルチマーカーパネルに他のマーカーを加えることにより、リスク階層化および鑑別診断の両方に関する更なる臨床的情報が得られる。例えば、D-ダイマーを凝血および止血のマーカーとしてパネルに加えてもよい。上記のように、D-ダイマーを添加することによって、肺塞栓症および/または深在静脈血栓症と心筋梗塞およびうっ血性心不全を（それらの被験者は医師に対して実質的に同様の症状を示しうるという事実にも関わらず）鑑別できる。この場合、閾値を約1μg/mLと設定してもよい。D-ダイマーに加えて、またはそれに代わって、相対的に非特異的な炎症指標であるC-反応性蛋白質によってパネルの更なるリスク階層化を行うことができる。データはここに示していないが、CK-MBおよびミオグロビンによってもST-上昇および非ST-上昇ACSを区別することができる。

20

【0324】

パネル中のマーカー数が増加するほど、ここに記載する方法による一つのパネル応答およびそれと種々の疾病状態との関係の測定は有益となりうる。それらのパネルの一例は、心臓障害の特異的なマーカー（例えば心臓トロポニンIおよび/またはT（遊離型および複合型）、クレアチンキナーゼ-MBなど）および組織障害の非特異的なマーカー（例えばミオグロビン）を含んでもよく、ここではいずれのマーカーも既定の閾値と比較しない。多くの可能性のあるマーカーから開始して、手順を反復した。この方法ではマーカーの個々の濃度閾値自体はカットオフ値として使用しなかった。それより、マーカーの最低濃度および最高濃度間のアッセイ値の“ウィンドウ”を測定した。最高濃度を超えるマーカー濃度が測定された場合を1の値とし、最低濃度未満のマーカー濃度が測定された場合を0の値とする；ウィンドウ内のマーカー濃度が測定された場合は直線として内挿し、0から1の間の値とした。次いで、所定のマーカー濃度で得られた値に重み係数を乗じた。パネルで使用した個々のマーカーの全ての重みの絶対値の合計は1となる。マーカーの重みがマイナスのものは、コントロール群のアッセイ値が疾病群のものより高いことを意味する。パネル中の各マーカーの重みづけられた値を合計して“パネル応答”を算出する。“疾病群”および“コントロール”の集団全体のパネル応答についてROC分析を行い、そのパネルで所望の感度および特異度が得られるようにパネル応答閾値を選択した。各反復セット後、等式に対する寄与が最も小さいものを除去し、数が減ったマーカーで反復工程を再開してもよい。

30

40

【0325】

以下のパネルは急性心筋梗塞（“疾病群”と表示）に罹患した被験者を“コントロール”群から鑑別する能力に関して同定されたそれらのマーカーパネルを表す。パネル1は臨床的兆候時の“第一採血”から得た結果を表し、パネル2-4はそれぞれ60、90、および1

50

80分後の採血を使用して得た結果を表す。“最良と考えられているスタンダード (gold standard)”である心臓トロポニン I のみを使用して、第一、60、90、および180分後の採血からそれぞれ25.9%、28.7%、55.6%、および100%の特異度が得られ、感度は92.5%であった。

【0326】

【表11】

パネル番号	1	2	3	4
パネル中のマーカー	cTnl, CK-MB, ミオグロビン	cTnl, CK-MB, ミオグロビン	cTnl, CK-MB, ミオグロビン	cTnl, CK-MB, ミオグロビン
コントロール n	474	184	186	74
疾病 n	67	46	50	48
平均 ROC 面積	0.939	0.984	0.992	0.980
SD(%)	0.008	0.002	0.001	0.098
92.5%Specでの平均 Sens	81.6%	95.0%	97.6%	96.9%
SD(%)	2.1	1.1	0.80	9.80
92.5%Sensでの平均 Spec	76.9	93.3	96.5%	99.0%
SD(%)	2.6	0.6	0.60	10.00

10

20

【0327】

心臓トロポニン I のみから得られた結果と対照的に、上記のパネルでは初期の時点でより良好な特異性が得られた。これらの時点では、ミオグロビンおよびCK-MBはより高い重みで含有される。当然、最終時点（心臓トロポニン I のみで100%の特異度に達する）では心臓トロポニン I がパネル応答の優位を占める。更なるパネルは、ここに記載するような更なるマーカーを含んでもよく、それらには特に血圧調節に関係するマーカー（例えばBNP）、凝血および止血に関係するマーカー（例えばD-ダイマー、TpP）、アポトーシスに関係するマーカー（例えばカスパーズ-3、チトクロームc）、および/または炎症に関係するマーカー（例えばMMP-9、CRP、ミエロペルオキシダーゼ、IL-1ra、MCP-1）がある。更に好ましくは一定時間にわたる1つ以上の上記マーカーの変化を、それらのパネルにおいて更なるマーカーとして含ませる。

30

【0328】

この同じ方法を使用して同様のマーカーパネルを規定し、急性心筋梗塞と類似症状（例えば非心臓性胸痛および不安定狭心症）を区別することができる。以下の表で、これらの類似症状を有する被験者由来のサンプルと急性心筋梗塞に罹患した被験者から発症の10時間以内に得たサンプルを比較する。

40

【0329】

【表 1 2】

パネル番号	1	2	3
パネル中のマーカー	cTnl, CK-MB, ミオグロビン, BNP	cTnl, CK-MB, ミオグロビン, BNP	cTnl, CK-MB, ミオグロビン, BNP
“コントロール”被験者	非心臓性胸痛	不安定狭心症	非心臓性胸痛
コントロール n	210	210	210
“疾病”被験者	急性心筋梗塞	急性心筋梗塞	不安定狭心症
疾病 n	92	92	210
平均 ROC 面積	0.984	0.944	0.792
SD(%)	0.002	0.093	0.014
92.5%Specでの平均 Sens	97.1%	86.3%	34.6%
SD(%)	0.90	8.7	1.7
92.5%Sensでの平均 Spec	96.1%	81.7%	49.9%
SD(%)	0.60%	8.4	3.2

10

20

【0 3 3 0】

以下のパネルは、30日以内に有害事象（死亡、急性心筋梗塞、うっ血性心不全。“疾病群”と表示）を有したACS患者から得た試験サンプルを、それらの事象を有さないACS患者を表す“コントロール”患者から得たサンプルに対して分析するのに使用した予後兆候マーカーパネルを示す。そのような有害事象を予測する各パネルの能力に関して、これらの結果に基づいてオッズ比を算出した。

【0 3 3 1】

30

【表 1 3】

パネル番号	1	2	3	4	5
パネル中のマーカー	cTnI, CRP, BNP	cTnI, CRP, BNP, CK-MB	cTnI, CRP, BNP, カスパー-3, MMP-9	cTnI, CRP, BNP, MMP-9, TpP	cTnI, CRP, BNP, MMP-9, ミオグロビン, MCP-1, TpP
コントロール n	1936	977	1781	1762	1710
疾病 n	104	52	91	92	90
平均 ROC 面積	0.679	0.733	0.708	0.733	0.715
SD(%)	0.006	0.011	0.013	0.067	0.012
92.5%Spec での平均 Sens	29.0%	34.5%	30.8%	30.5%	37.7%
SD(%)	1.70	2.40	2.00	3.80	2.60
92.5%Sens での平均 Spec	23.5%	37.9%	32.1%	30.2%	33.4%
SD(%)	2.20	2.00	2.90	4.60	3.10
オッズ比	5.038	6.496	5.489	5.412	7.463

10

20

【 0 3 3 2】

以下のパネルは有害事象として180日以内の死亡のみを考慮するものである。

【表 1 4】

パネル番号	1	2	3	4
パネル中のマーカー	cTnI, CRP, BNP	ミオグロビン, CRP, BNP	BNP, ミオグロビン	CRP, BNP
コントロール n	768	768	776	768
疾病 n	63	63	63	63
平均 ROC 面積	0.801	0.804	0.803	0.799
SD(%)	0.011	0.006	0.004	0.005
92.5%Spec での平均 Sens	42.1%	42.7%	44.0%	42.6%
SD(%)	2.80%	2.20%	2.30%	1.10%
92.5%Sens での平均 Spec	51.4%	51.5%	51.1%	46.3%
SD(%)	3.00%	2.30%	3.20%	2.80%
オッズ比	9.0	9.2	9.7	9.2

30

40

【 0 3 3 3】

【表 15】

パネル番号	5	6	7	8
パネル中のマーカー	BNP のみ	BNP, cTnl, CK-MB, CRP, ミオグロビン	ミオグロビン, cTnl, BNP, CK-MB	CK-MB, cTnl, BNP, CRP
コントロール n	776	768	776	768
疾病 n	63	63	63	63
平均 ROC 面積	0.799	0.802	0.801	0.796
SD(%)	0.001	0.020	0.009	0.015
92.5%Spec での平均 Sens	42.9%	42.4%	45.0%	41.7%
SD(%)	0.10%	3.40%	4.00%	3.70%
92.5%Sens での平均 Spec	38.8%	54.3%	54.3%	53.4%
SD(%)	0.10%	4.60%	3.40%	4.40%
オッズ比	9.3	9.1	10.1	8.8

10

20

パネル番号	9
パネル中のマーカー	CRP, CK-MB, ミオグロビン, cTnl
コントロール n	768
疾病 n	63
平均 ROC 面積	0.701
SD(%)	0.034
92.5%Spec での平均 Sens	32.7%
SD(%)	3.90%
92.5%Sens での平均 Spec	34.8%
SD(%)	6.80%
オッズ比	6.0

30

40

【0334】

そして以下のパネルは有害事象としてそれぞれ90, 180, 365, および740日以内の死亡を考慮するものである。

【表 16】

パネル番号	1	2	3	4
パネル中のマーカー	cTnl, CRP, BNP, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, CK-MB	cTnl, CRP, BNP, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, CK-MB	cTnl, CRP, BNP, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, CK-MB	cTnl, CRP, BNP, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, CK-MB
コントロール n	760	760	760	760
疾病 n	42	60	70	94
平均 ROC 面積	0.781	0.784	0.792	0.767
SD(%)	0.015	0.080	0.015	0.077
92.5%Spec での平均 Sens	37.0%	38.7%	39.3%	34.4%
SD(%)	3.10%	4.90%	3.30%	4.60%
92.5%Sens での平均 Spec	57.9%	54.6%	54.0%	50.1%
SD(%)	4.30%	6.70%	3.00%	5.60%
オッズ比	7.2	7.8	8.0	6.5

10

20

【0335】

当業者に理解されるように、上記のパネルに更なるマーカー含めるか、または更なるマーカーで代替してもよい。更なるマーカーは1つの濃度のマーカーを含んでもよく、またはマーカー“スローブ”(すなわち一定時間にわたるマーカーの相対的变化、2つのマーカーの比率など)を含んでもよい。当業者に理解されるように、同じパネルで診断および予後兆候の情報の両方が得られうる。診断に使用されるマーカーは予後診断に使用されるものと同一であってもよく、または異なっていて、これらの目的の1つに使用される1つ以上のマーカーが他の目的には使用されなくてもよい。

30

【0336】

実施例6 MCP-1を使用する無症状アテローム性硬化症の診断

MCP-1はACSにおける独立したリスク予測物質であることが同定されている。de Lemosら, Circulation 107: 690-95 (2003) (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) 参照。以下のデータは無症状アテローム性硬化症の診断におけるMCP-1の使用を示す。(臨床症候に基づいて)アテローム性硬化症の症状を示さない3499人の患者でMCP-1のベースラインレベルを測定した。2733人の患者からなるサブセットにコンピューター電子線断層撮影(EBCT)スキャンを行った。EBCTは、CTスキャナーを使用して心臓動脈に見られるカルシウムの量を測定するイメージング法である。冠動脈カルシウム(“cac”)の測定によって、手術またはトラッキング液の注入を必要とせずに無症状冠動脈疾患を検出できる。例えばKhaleeliら, Am. Heart J. 141: 637-44, 2001参照。

40

【0337】

測定した3499患者中のMCP-1の分布：

【表 1 7】

四分位	N	中央値
1 (<= 123 pg/mL)	875	100.3 [83, 112]
2(>123.1-167.9 pg/mL)	877	146 [134, 157]
3 (168-226 pg/mL)	874	194 [180, 208]
4 (>226.1 pg/mL)	873	285 [248, 356]

10

【 0 3 3 8】

MCP-1レベルと心血管リスク因子

【表 1 8】

MCP-1 四分位

変数	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	P 値
年齢の中央値(歳)	40 [34, 48]	43 [36, 51]	44 [36, 52]	47 [39, 54]	<0.001
高血圧患者の%	21.04	23.21	25.66	30.09	<0.001
糖尿病患者の%	18.16	24.13	26.87	30.85	0.001
総コレステロールの中央値	172 [150, 198]	175 [154, 201]	180 [156, 204]	180 [155, 207]	<0.001
現役喫煙者の%	21.52	22.90	27.64	27.94	<0.001
hx CAD 家族歴のある患者の%	22.65	24.41	25.11	27.83	0.022
LDL の中央値	101 [81, 124]	102 [82, 123]	106 [84, 128]	107 [82, 129]	0.0188

20

30

これらの関係は3499患者全てに見られる。

LDL：4分した各群はそれぞれ約875患者を含む；HTN：1060患者は高血圧を有した；喫煙：1013患者は現役喫煙者であった；家族hx：1139患者は冠動脈疾患(cad)の家族歴を有した；DM：402患者はDMを有した。

40

ベースライン変動とMCP-1レベルの関係(未掲載)もEBCTスキャンを行った患者のサブセット内で観察した(n=2733)。

【 0 3 3 9】

図2にEBCTスキャンを行った2733患者におけるMCP-1と無症状アテローム性硬化症の関係を示す。これらのうち581患者は無症状アテローム性硬化症の証拠(冠動脈カルシウム沈着スコアが10以上)を示した。更なる証拠により、cacの程度(カテゴリー化したもの)およびMCP-1(連続値)間の有意な関連性が示唆されている。

【 0 3 4 0】

多元分析(年齢を除く)における無症状アテローム性硬化症(CACが10以上)の相対リス

50

ク

【表 19】

変数	オッズ比	P値
MCP 四分位 2	1.339	0.059
MCP 四分位 3	1.445	0.016
MCP 四分位 4	1.716	<0.001
性別	2.548	<0.001
糖尿病	2.391	<0.001
高血圧	3.425	<0.001
喫煙	1.781	<0.001
総 Chol	1.521	0.009

10

【0341】

中年またはより高い年齢三分位によって階層化した無症状アテローム性硬化症の多元モデル（40歳以上；n=1831）

【表 20】

変数	オッズ比	P 値
MCP 四分位 2	1.382	0.051
MCP 四分位 3	1.501	0.013
MCP 四分位 4	1.604	0.003
性別	2.561	<0.001
糖尿病	2.164	<0.001
高血圧	2.424	<0.001
喫煙	1.764	<0.001
総 Chol	1.322	0.099
CAD 家族歴	1.409	0.002

20

30

【0342】

急性心筋梗塞の場合，パネル応答値を使用して好ましくは90%を超える特異度で少なくとも80%の感度となるようにパネル，ウィンドウ値，および重み係数を選択する。

【0343】

実施例 7 脳血管障害の鑑別診断のためのマーカーパネル

脳血管障害の鑑別診断の場合，血圧調節に関係するマーカー-および神経組織障害に関係する複数のマーカーを含むマーカーパネルを選択し，発作の診断および/またはここで言う“発作様”患者との区別のためのパネルを開発する。マーカーパネル応答を増加するために試験した更なるマーカーのクラスにはアポトーシスのマーカー，炎症のマーカー，および/または急性期反応物質が含まれる。最終の代表パネルは90%を超える特異度で少なくとも80%の感度が得られることが確認された。多くの可能性のあるマーカーから開始して，手順を反復した。この方法ではマーカーの個々の濃度閾値自体はカットオフ値として使用しなかった。それより，マーカーの最低濃度および最高濃度間のアッセイ値の“ウィンドウ”を測定した。最高濃度を超えるマーカー濃度測定値を1とし，最低濃度未満のマーカー濃度測定値を0とする；ウィンドウ内のマーカー濃度測定値は直線として内挿し，0から1の間の値とした。次いで，所定のマーカー濃度で得られた値に重み係数を乗じた。パネルで使用した個々のマーカーの全ての重みの絶対値の合計は1となる。マーカーの重みがマイナスなのは，コントロール群のアッセイ値が疾病群のものより高いことを意味する。ここでも，いずれのマーカーも既定の閾値と比較しない。その代わりに，パネル中

40

50

の各マーカーの重みづけられた値を合計して“パネル応答”を算出する。“疾病群”および“コントロール”の集団全体のパネル応答についてROC分析を行い、そのパネルで所望の感度および特異度が得られるようにパネル応答閾値を選択した。各反復セット後、等式に対する寄与が最も小さいものを除去し、数が減ったマーカーで反復工程を再開してもよい。

【0344】

【表21】

パネル中のマーカー	NCAM, カススペース-3, IL-8, CK-BB, CRP, S100β, BNP, MMP-9		
発作の型	全ての発作	虚血性発作	出血性発作
“コントロール” n	49	49	49
“疾病” n	48	41	7
平均 ROC 面積	0.927	0.935	0.881
SD	0.018	0.024	0.039
92.5%Specでの平均 Sens	85.6%	86.8%	78.7%
SD	6.50%	7.20%	9.60%
92.5%Sensでの平均 Spec	83.2%	84.4%	39.8%
SD	8.10%	8.90%	27.80%

10

20

【0345】

更に、発作患者における神経障害の重症度を同定する能力についてパネルを評価した。これらのパネルでは、NIH発作スケール（“NIHSS”）のスコアが5未満である被験者をコントロールとし、NIHSSスコアが5以上の患者を疾病群とした。以下の表に示すように、単にパネルのパラメーター（例えばウィンドウの幅と位置および/または重み付け）を変更し、上記と同じ8つのマーカーを使用して発作診断を行うと、神経障害の重症度について

30

【0346】

【表22】

	パネル 1	パネル 2
パネル中のマーカー	NCAM, カススペース-3, IL-8, CK-BB, CRP, S100β, BNP, MMP-9	
“コントロール” n	66	66
“疾病” n	24	24
平均 ROC 面積	0.928	0.929
SD	0.021	0.018
92.5%Specでの平均 Sens	79.6%	80.2%
SD	12.70%	13.30%
92.5%Sensでの平均 Spec	86.9%	87.7%
SD	6.80%	6.10%

40

50

【 0 3 4 7 】

興味深いことに，MMP-9は神経障害と負の相関関係を示し，このことはMMP-9は発作様に比較して発作患者で増加するが，高い神経障害を示す発作患者の場合には，神経障害の重症度がより低い患者に比較して実際はMMP-9が低下することを示唆している。高いMMP-9は血管再生の増加を示唆している可能性があり，従って発作患者における正の予後マーカーとなりうる。更に，血栓溶解剤による治療は血管再生によって病変部の血流が増加するため，MMP-9が高い発作患者には利点が少ない可能性がある。それらのパネルにより，疾病および神経障害のリスクに関係する処置において，予後に関する情報が提供されうる。それらの処置には頸動脈内膜切除，低体温循環停止，大動脈弁置換術，僧帽弁置換術，冠動脈術，大動脈瘤の内部移植修復，冠動脈バイパス移植術，ラリンジアルマスク挿入，および先天性心臓欠陥の修復がある。

10

【 0 3 4 8 】

以下の表に示すような，より少ないマーカーを使用する更なるパネル（ゼロから中程度までの感度および特異度の低下を伴う）を提供してもよい：

【表 2 3】

パネル番号	3	4	5	6
パネル中のマーカー	CRP, BNP, MMP-9, CK-BB, カススペース-3, IL-8, S-100β	CRP, BNP, MMP-9, CK-BB, カススペース-3, IL-8	CRP, BNP, MMP-9, CK-BB, カススペース-3	CRP, BNP, CK-BB, カススペース-3
コントロール n	81	86	86	86
疾病 n	26	27	27	27
平均 ROC 面積	0.913	0.910	0.895	0.878
SD (%)	0.021	0.019	0.014	0.016
92.5%Spec cでの平均 Sens	74.8%	73.4%	65.3%	61.0%
SD	12.60%	10.50%	7.90%	6.00%
92.5%Sen sでの平均 Spec	83.6%	83.7%	80.9%	76.1%
SD	6.80%	5.50%	5.10%	7.40%

20

30

【 0 3 4 9 】

上記の原理に従って規定したパネルを選択して，（虚血性および／または出血性）発作に罹患した患者を同年齢の健常者と鑑別してもよい。そのようなパネルを使用して，発作様集団における急性虚血（発作の診断のレベルまで上昇しない）に罹患した被験者を同定することができる。例えばそれらのパネルを擬似集団（例えばTIA，失神，末梢血管疾患などに罹患した被験者）に使用して，偽陽性発作診断とみなされうるパネル応答を示す亜集団を同定することができる。この亜集団は有意な発作様症状を発現しうるが，病変の位置のために，臨床的に発作と診断されるに十分な神経障害を示さない可能性がある。それらの被験者は，パネル応答に従って“正常”であることが明かである擬似被験者より積極的な治療が有益でありうる。ここではこの擬似集団を“無症状発作”または“無症状虚血”に罹患していると言い，ここに記載する方法をそれらの無症状状態の診断および／または予後診断に使用することができる。

40

50

【0350】

実施例8 発作の診断

上記のマーカーを組み合わせて含むパネルを構築して、発作の診断、並びに発作およびTIAを有する患者の管理に関する情報を提供してもよい。更に、このより大きなパネルからのマーカーのサブセットを使用して、発作および種々の疾病に関する感度および特異度を最適化してもよい。ここに示す実施例で、6-マーカーパネルとして使用したBNP、IL-6、S-100 β 、MMP-9、TAT複合体、およびvWFのA1およびインテグリンドメイン（vWF A1-インテグリン）に特異的なイムノアッセイから得られたデータの統計学的分析について記載する。これらのアッセイに使用した閾値はBNPが55pg/ml、IL-6が27pg/ml、S-100 β が12pg/ml、MMP-9が200ng/ml、TAT複合体が63ng/ml、そしてvWF A1-インテグリンが1200ng/mlである。これらの閾値を使用して臨床的感度および特異度の統計分析を行い、患者の虚血性発作、クモ膜下出血、脳内出血、全ての出血性発作（頭蓋内出血）、全ての発作型、およびTIAの同定におけるマーカーパネルの有効性を確認した。更に臨床的感度および特異度の分析によって、マーカーパネルの有効性を現在の診断法、コンピューター断層撮影（CT）スキャンと比較した。

10

【0351】

コンピューター断層撮影（CT）スキャンは発作の診断にしばしば使用される。脳でイメージングを行うので、CTスキャンは発作に対して高度に特異的である。CTスキャンの感度は発症後早期の出血性発作患者において非常に高い。対照的に、虚血性発作後の初めの数時間ではCTの感度は低く、約1/3の患者は入院時のCTスキャンで陰性である。更に、50%の患者は発症後24時間以内のCTスキャンで陰性でありうる。ここに示すデータは、24患者についての入院時のCTスキャンの感度が虚血性発作患者の1/3しかCTスキャンで陽性にならないという予想と一致したことを示している。6-マーカーパネルでは少なくとも2つのマーカーが上昇した場合に患者が発作を有するとしてポジティブに同定されるが、これを使用して、高い特異度（92%）でCTスキャンより2.5倍近く高い79%の感度を得た。研究集団におけるCTスキャンの特異度は100%近いと考えられる。この仮定を制限するのは、CTスキャンを正常な集団を含む個体から得ていないことである。従って、この分析においてCTスキャンの特異度はCTスキャンで陽性となりうる他の疾病または症状を考慮に入れて算出する。CTスキャンは非発作状態の個体（頭蓋内腫瘍、動静脈奇形、多発性硬化症、または脳炎を含む）で陽性を示しうる。これらの非発作症状のそれぞれの予測発生率は米国の全人口の1%である。多発性硬化症および脳炎を原因とする陽性CTスキャンは通常、発作と区別できるので、発作の診断のためのCTスキャンの特異度は98%より高いと考えられる。以下の表に示すデータにより、マーカーのパネルの使用によって、CTスキャンより高い特異度および感度で虚血性発作経験患者を早期同定することが可能となる。

20

30

【0352】

【表24】

	感度	特異度
CT スキャン	33%	>98%
マーカー	92%	92%

40

【0353】

6-マーカーパネルの感度および特異度を虚血性発作、クモ膜下出血、脳内出血、全ての出血性発作（頭蓋内出血）、および全ての発作型に合わせたもの、発症から種々の時点で評価した。6-マーカーパネルの特異度を92%に固定し、2つのマーカーが上昇している場合に疾病を有するとして患者を分類した。更に、BNP、S-100 β 、MMP-9、およびvWF A1-インテグリンからなる4-マーカーパネルを6-マーカーパネルと同じ状況で、同一の閾値レベルを使用し、特異度を97%に設定して評価した。上記のように、疾病に対する感度または特異度を向上するために、より大きなマーカーパネルからマーカーサブセットを選択する

50

ためのモデルとして4-マーカパネルを使用した。表3-7に示すデータは、両パネルが、（特に発症後早期段階での）全ての発作型の診断に有用であることを示している。4-マーカパネルを使用することによって、発症後48時間以内の出血性発作に関して同等の感度で、6-マーカパネルより高い特異度が得られた。6-マーカパネルは虚血性発作に対してどの時点でも4-マーカパネルより高い感度を示し、これは6-マーカパネル法は高い感度を得るのに有用であり（すなわち擬陰性診断がより少ない）、4-マーカパネルはより高い特異度を得るのに有用である（すなわち擬陽性診断がより少ない）ことを示唆している。

【0354】

【表25】

10

感度分析－虚血性発作

発症後の時間 (時間)	サンプル数	感度 92%での特異度	特異度 97%での感度
3	6	100	83.3
6	19	100	94.7
12	36	91.7	88.9
24	60	88.3	86.4
48	96	88.5	84.4
All	175	89.7	84.0

20

感度分析－クモ膜下出血

発症後の時間 (時間)	サンプル数	感度 92%での特異度	特異度 97%での感度
3	3	100.0	100.0
6	5	100.0	100.0
12	6	100.0	100.0
24	14	96.3	92.0
48	32	95.2	86.8
All	283	91.3	83.0

30

感度分析－脳内出血

発症後の時間 (時間)	サンプル数	感度 92%での特異度	特異度 97%での感度
3	3	100.0	100.0
6	5	100.0	100.0
12	6	100.0	100.0
24	13	96.3	92.0
48	24	89.9	78.3
All	60	87.2	86.4

40

【0355】

【表 2 6】

感度分析－全ての出血性発作

発症後の時間 (時間)	サンプル数	感度 92%での特異度	特異度 97%での感度
3	6	100.0	100.0
6	10	100.0	100.0
12	12	100.0	100.0
24	27	96.3	92.0
48	56	92.9	84.6
All	343	90.7	83.6

10

感度分析－全ての発作

発症後の時間 (時間)	サンプル数	感度 92%での特異度	特異度 97%での感度
3	12	100.0	91.7
6	29	100.0	96.6
12	48	93.8	91.7
24	87	90.8	88.5
48	152	90.1	84.2
All	518	90.4	83.8

20

【0 3 5 6】

6-マーカーおよび4-マーカーパネルを，一過性脳虚血発作（TIA）患者を同定する能力について評価した。本来，TIAは短期の虚血事象であり，永続的な神経学的損傷の原因となるものではない。TIAは血流中へのマーカーの局所的放出を特徴とし，これは事象が解決されると中断される。従って，マーカーのパネルの感度は時間と共に低下すると予測される。表 8 に示すように，6-マーカーパネル（特異度を92%に固定）および4-マーカーパネル（特異度を97%に固定）はいずれも，事象の最初の24時間以内に感度の有意な低下を示す。これらの低下は表 3 - 7 に記載する発作集団のいずれでも観察されていない。データは，連続的な時点で患者からデータを集めることによって，TIA患者を他の発作型を有する患者と鑑別することが可能となりうることを示している。TIA患者の同定は，これらの患者は将来発作を起こすリスクが高いため，有益である。

30

【0 3 5 7】

【表 2 7】

発症後の時間 (時間)	サンプル数	感度 92%での特異度	特異度 97%での感度
0-6	9	100.0	88.9
6-12	7	57.1	57.1
12-24	8	37.5	37.5

40

【0 3 5 8】

実施例 9 クモ膜下出血を示す患者における脳血管痙攣のマーカー

45人の一連の患者（動脈瘤性クモ膜下出血（SAH）で入院した38患者および選択的動脈瘤クリッピングで入院した7人のコントロール患者）をこの研究に含めた。全てのSAH患者で，静脈穿刺によって静脈血サンプルを，入院時，およびその後連続12日間，または血管痙攣が発症するまで毎日採取した。脳血管痙攣の発生を，SAHの4-12日後の局所性神経障害の発症，または経頭蓋ドップラー（TCD）速度>190cm/sと定義した。選択的動脈瘤クリ

50

ッピングを行っている患者では、手術後13日（中央値）の期間にわたって、患者毎に 3 ± 1 の静脈血サンプルを採取した。採取した血液を遠心分離し（10,000g）、得られた上清を直ちに-70℃で、分析が完了するまで凍結した。vWF、VEGF、およびMMP-9の測定は免疫測定酵素イムノアッセイ（immunometric enzyme immunoassays）を使用して実施した。

【0359】

前血管痙攣同齡集団で観察された血漿vWF、VEGF、およびMMP-9の変化が前臨床的虚血の結果である、または脳血管痙攣の発生に特異的であるかどうかを確認するために、これらのマーカーを塞栓性または血栓性巣状虚血の状態下でも測定した。症候的巣状虚血発症の24時間以内に入院した一連の59患者から、入院時に静脈血1サンプルを静脈穿刺によって採取した。症候的巣状虚血で入院した42患者は、その後、MRIで脳梗塞の証拠を示した。17患者は脳梗塞の放射線医学的証拠を示さず、症状が消散し、一過性虚血発作と分類され、従って分析に含めなかった。

10

【0360】

3つの同齡集団を非血管痙攣（SAHで入院したが脳血管痙攣を発症しなかった患者）、前血管痙攣（SAHで入院し、その後脳血管痙攣を発症した患者）、および巣状虚血（症候的巣状虚血で入院し、その後MRIで脳梗塞と診断された患者）に分類した。平均最大血漿vWF、VEGF、およびMMP-9レベルを2ウェイANOVAによって同齡集団間で比較した。アルファエラーを0.05に設定した。分布が尖度を有するか、有意なゆがみを有するか、または分散が有意に異なる場合は、群間比較のためのノンパラメトリック・マンホイットニーU検定を使用した。フィッシャーグレードおよび血漿マーカー間の相関関係を、スเปルマン順位相関係数で評価した。患者の年齢、性別、人種、Hunt & Hess、およびフィッシャーグレードについて調整するロジスティック回帰分析を使用して、血漿マーカーの閾値毎の血管痙攣を起こすオッズ比を計算した。

20

【0361】

38患者が入院し、SAHの 1 ± 1 日後に最初の血液サンプルを採取した。これらのうち22人（57%）がSAHの中央値7日（範囲 4-11日）後に脳血管痙攣を発症した。18人（47%）が局所性神経障害を起こし、4人（10%）がTCDによる血管痙攣の証拠のみを示した。SAH非血管痙攣同齡集団の3患者はフィッシャーグレード1であり、同齡集団間の血漿マーカー比較に含めなかった。非血管痙攣および前血管痙攣同齡集団の患者人口統計、医学的特徴、およびフィッシャーグレードは以下の表の通りである。

30

【0362】

【表28】

SAH入院患者38人における人口統計、症状、およびX線写真の特徴

	SAH、非血管痙攣(n=16)	SAH、前血管痙攣(n=22)
年齢*	56 ± 10 歳	54 ± 13 歳
女性	12 (75%)	18 (82%)
入院時GCS**	14 (11-15)	12 (9-14)
入院時HH**	2 (1-3)	3 (2-4)
フィッシャーグレード**	3 (2-3)	3 (2-4)

40

* 値は平均値±SD

** 値は中央値(四分位間の範囲) GCS: Glasgow Coma スケール、HH: Hunt & Hess スケール

【0363】

非血管痙攣同齡集団では、平均最大血漿vWF（ $p=0.974$ ）、VEGF（ $p=0.357$ ）、およびMMP-9（ $p=0.763$ ）はコントロールに比較して変化を示さなかった（表10）。血漿vWF、VEGF、およびMMP-9は非血管痙攣同齡集団に比較して前血管痙攣で上昇した（表10）。フィッシ

50

ヤーグレードが上昇すると，最大血漿vWF（ $p<0.05$ ），VEGF（ $p<0.01$ ），およびMMP-9（ $p<0.05$ ）が増加するという相関関係があった。

【0364】

更に，20人の男性および22人の女性（年齢： 59 ± 15 歳）が症候的巣状虚血の24時間以内に来院し，NIH発作スケールスコアの平均は 6.7 ± 6.6 であった。巣状虚血同齡集団では，平均最大血漿vWF（ $p=0.864$ ），VEGF（ $p=0.469$ ），およびMMP-9（ $p=0.623$ ）はコントロールに比較して変化しなかった（表10）。血漿vWF，VEGF，およびMMP-9は，以下の表に示すように巣状虚血同齡集団に比較して前血管痙攣で顕著に増加した。

【0365】

非血管痙攣，前血管痙攣，および巣状虚血同齡集団における血漿マーカーの最高値の平均（参考としてコントロール群を提供する）

【表29】

	病巣虚血 (n=87)	p 値 V. SAH pre	SAH, 血管痙攣なし (n=16)	p 値 V. SAH pre	SAH, 前血管痙攣 (n=22)	対照 (n=7)
vWF	4645 $\pm$ 875	0.010	493 $\pm$ 599 4	0.025	5526 $\pm$ 929	4865 $\pm$ 868
VEGF	0.03 $\pm$ 0.04	0.001	0.06 $\pm$ 0.06	0.023	0.12 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.06
MMP-9	250 $\pm$ 308	0.001	438 $\pm$ 154	0.006	705 $\pm$ 338	408 $\pm$ 348

20

【0366】

以下の表に示すように，SAHの後，血漿vWF，VEGF，およびMMP-9の増加により，その後の血管痙攣のオッズ比が独立して17から25倍まで上昇し，陽性的中率は75%から92%であった。

【0367】

ロジスティック回帰分析により，血管痙攣の続発についての陽性／陰性的中率およびオッズ比は種々のレベルの血漿vWF，VEGF，およびMMP-9に関係する。

【0368】

【表30】

血漿マーカー	p 値	オッズ比	PPV	NPV
vWF(ng/ml)				
>5800	0.101	9.2	88%	57%
>5500	0.033	17.6	92%	67%
>5200	0.144	4.2	71%	63%
VEGF(ng/ml)				
>0.12	0.050	20.7	75%	58%
>0.08	0.023	16.8		
	60%		75%	
>0.06	0.064	7.3	64%	73%
MMP-9(ng/ml)				
>700	0.045	25.4	91%	64%
>600	0.105	5.7	77%	61%
>500	0.111	4.9	68%	65%

40

50

【 0 3 6 9 】

実施例 1 0 発作診断のための代表的なパネル

以下の表に発作診断のための本発明の方法の使用を示す。“分析物パネル”は発作患者および非発作ドナーから得た試験サンプルの分析に使用したマーカーの組み合わせを表す（NHDは健常ドナーを表す；NSDは特定の疾病を有さないドナーを表す）。時間（記載の場合）は発症からサンプル回収までの間隔を表す。ROC曲線を計算して種々のカットオフでのパネルの1-（特異度）に対する特定のマーカーパネルの感度，および得られた曲線下面積を求めた。92.5%の特異度（Spec）で診断の感度（Sens）を測定した；また，92.5%の感度で診断の特異度を測定した。

【 0 3 7 0 】

【表 3 1】

標本	発作 vs NHD+NSD		発作 vs NHD		発作 vs NSD	
	全時間	全時間	全時間	全時間	全時間	全時間
時間間隔						
発作 (n)	448		448		448	
非発作 (n)	338		236		102	
パラメータ	面積	Spec	面積	Spec	面積	Spec
	92.5% での Sens	92.5% での Spec	92.5% での Sens	92.5% での Spec	92.5% での Sens	92.5% での Spec
値	.944	85.7%	.955	86.6%	.919	75.0%
						76.5%

標本	発作 vs NHD		発作 vs NSD		発作 vs NHD		発作 vs NSD	
	0-6 時間	0-6 時間	0-6 時間	0-6 時間	6-48 時間	6-48 時間	6-48 時間	6-48 時間
時間間隔								
発作 (n)	16	16	16	16	89	89	89	89
非発作 (n)	236	102	102	236	236	102	102	102
パラメータ	面積	Spec	面積	Spec	面積	Spec	面積	Spec
	92.5% での Sens	92.5% での Spec	92.5% での Sens	92.5% での Spec	92.5% での Sens	92.5% での Spec	92.5% での Sens	92.5% での Spec
値	.958	93.8%	.931	87.5%	.963	86.5%	.920	71.9%
								76.5%

【 0 3 7 1 】

【 表 3 2 】

4-マーカー分析物パネル - 分析物:カススペース-3、MMP-9、vWF-A1、およびBNP

標本	発作 vs NHD+NSD		発作 vs NHD		発作 vs NSD	
	全時間		全時間		全時間	
時間間隔						
発作 (n)	482		482		482	
非発作 (n)	331		234		97	
パラメータ —	面積	Spec 92.5% での Sens	Sens 92.5% での Spec	面積	Sens 92.5% での Spec	Sens 92.5% での Spec
	.963	92.9%	92.7%	.980	94.6%	96.6%
					.923	74.7%
値						83.5%

標本	発作 vs NHD		発作 vs NSD		発作 vs NHD		発作 vs NSD	
	0-6 時間		0-6 時間		6-48 時間		6-48 時間	
時間間隔								
発作 (n)	18		18		101		101	
非発作 (n)	234		97		234		97	
パラメータ —	面積	Spec 92.5% での Sens	Sens 92.5% での Spec	面積	Spec 92.5% での Sens	面積	Sens 92.5% での Spec	Sens 92.5% での Spec
	.968	94.4%	96.6%	.912	77.8%	.987	98.0%	97.0%
							.937	76.2%
値								85.6%

【表 3 3】

6-マーカーパネル:分析物は記載の通り

	パネル 1	パネル 2			パネル 3			パネル 4							
NCAM	✓	✓			✓			✓							
BDNF	✓	✓			✓			✓							
カスベース-3	✓	✓			✓			✓							
MMP-9	✓	✓			✓			✓							
WVF-A1	✓	✓			✓			✓							
VEGF	✓														
S100		✓													
WVF-インテグリン															
MCP1								✓							
GFAP															
	パネル 1				パネル 2			パネル 3			パネル 4				
	時間				時間				時間			時間			
	全	0-6	6-48		全	0-6	6-48		全	0-6	6-48		全	0-6	6-48
発作 (n)	372	25	106		372	25	106		372	25	106		362	25	106
非発作 (n)	109	109	109		109	109	109		109	109	109		109	109	109
ROC 面積	0.940	0.985	0.946		0.955	0.988	0.952		0.948	0.986	0.944		0.952	0.985	0.948
Spec92.5% での Sens	94.6%	100.0	90.6%		95.2%	100.0	96.2%		95.3%	100.0	93.4%		93.6%	100.0	95.3%
Sens92.5% での Spec	92.7%	98.2%	90.8%		93.6%	98.2%	92.7%		92.7%	98.2%	93.6%		92.7%	97.2%	92.7%

【 0 3 7 3 】

10

20

30

40

【表 3 4】

	パネル 5		パネル 6		パネル 8		パネル 10	
NCAM					✓		✓	
BDNF	✓		✓		✓		✓	
カススペース-3			✓				✓	
MMP-9	✓		✓		✓		✓	
WVF-A1			✓		✓			
VEGF								
S100	✓		✓		✓		✓	
WVF-インテグリン	✓							
MCP1	✓							
GFAP	✓		✓		✓		✓	
	パネル 5		パネル 6		パネル 8		パネル 10	
	時間		時間		時間		時間	
	全	0-6	6-48	全	0-6	6-48	全	0-6
発作 (n)	109	109	109	109	109	109	109	109
非発作 (n)	360	25	105	367	25	106	367	25
ROC 面積	0.940	0.984	0.944	0.937	0.963	0.937	0.947	0.948
Spec92.5% での Sens	94.6%	100.0 %	86.7%	94.6%	100.0 %	94.3%	94.0%	93.4%
Sens92.5% での Spec	92.7%	97.2%	90.8%	92.7%	93.6%	92.7%	92.7%	92.7%

【 0 3 7 4 】

10

20

30

40

7-マーカーパネル - 分析物:カススペース-3、NCAM、MCP-1、S100-B、MMP-9、vWF-インデグリン、およびBNP

【 表 3 5 】

標本	発作 vs NHD+NSD		発作 vs NHD		発作 vs NSD	
	全時間		全時間		全時間	
時間間隔						
発作 (n)	419		419		419	
非発作 (n)	324		207		117	
パラメータ						
—	面積	Spec 92.5% での Sens	Sens 92.5% での Spec	面積	Spec 92.5% での Sens	Sens 92.5% での Spec
値	.953	88.3%	89.5%	.962	92.6%	92.8%
				.937	79.5%	83.8%

標本	発作 vs NHD		発作 vs NSD		発作 vs NHD		発作 vs NSD	
	0-6 時間		0-6 時間		6-48 時間		6-48 時間	
時間間隔								
発作 (n)	21		21		86		86	
非発作 (n)	207		117		207		117	
パラメータ								
—	面積	Spec 92.5% での Sens	Sens 92.5% での Spec	面積	Spec 92.5% での Sens	面積	Spec 92.5% での Sens	面積
値	.930	85.7%	77.8%	.900	81.0%	.972	96.5%	.948
								82.6%
								83.8%

【表 3 6】

7-マーカーパネル - 分析物:カススペース-3、NCAM、MCP-1、S100-β、MMP-9、vWF-インテグリン、BNP

分析物	卒中 vs NHD	卒中 vs NHD+ NSD	卒中 vs NHD	卒中 vs NHD	卒中 vs NHD	卒中 vs NHD
カススペース	X	X	X	X	X	X
NCAM	X	X	X	X	X	X
MCP-1	X	X	X	X	X	X
S-100b	X	X	X	X	X	X
MMP-9 (総)*			X			
MMP-9 (18/16)**	X	X				
MMP-9 (18/17)***				X		
MMP-9 (総+18/16)				X		
MMP-9 (総+18/17)					X	
MMP-9 (18/16+18/17)						X
vWF-インテグリン	X	X	X	X	X	X
BNP	X	X	X	X	X	X
全時間						
卒中 (n)	419	419	500	427	417	425
非卒中 (n)	207	324	248	208	207	208
ROC 面積	0.991	0.953	0.987	0.990	0.993	0.995
Spec92.5%での Sens	97.4%	88.3%	97.2%	97.9%	99.0%	98.4%
Sens92.5%での Spec	99.9%	89.5%	97.6%	99.0%	99.5%	99.0%

【 0 3 7 6 】

【表 3 7】

0-6 時間	卒中 (n)		21	21	24	21	21	21	21	21
	非卒中 (n)		207	207	248	208	207	208	207	207
	ROC 面積		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	Spec92.5%での Sens		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	Sens92.5%での Spec		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
6-48 時間	卒中 (n)		86	86	102	90	85	89	86	
	非卒中 (n)		207	207	248	208	207	208	207	
	ROC 面積		0.996	0.969	0.986	0.998	0.999	0.999	0.999	
	Spec92.5%での Sens		100.0%	96.5%	98.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	
	Sens92.5%での Spec		98.1%	94.1%	98.4%	99.5%	100.0%	100.0%	99.0%	

- * - 全ての型の MMP-9 を認識
- * - 活性型 MMP-9 以外の全ての型の MMP-9 を認識
- * - MMP-9/TIMP 複合体以外の全ての型の MMP-9 を認識

【 0 3 7 7 】

【表 3 8】

8-マーカーパネル - 分析物:カスパーース-3、NCAM、MCP-1、S100-β、MMP-9、vWF-A1、BNP、および GFAP.

標本	卒中 vs NHD+NSD	卒中 vs NHD	卒中 vs NSD
時間間隔	全時間	全時間	全時間
卒中 (n)	368	380	380
非卒中 (n)	298	214	93
パラメータ-	面積	面積	面積
	Spec 92.5% での Sens	Spec 92.5% での Sens	Spec 92.5% での Sens
	970	980	947
	93.9%	94.2%	80.3%
値			90.3%

標本	卒中 vs NHD	卒中 vs NSD	卒中 vs NHD	卒中 vs NSD
時間間隔	0-6 時間	0-6 時間	6-48 時間	6-48 時間
卒中 (n)	15	15	76	76
非卒中 (n)	214	93	214	93
パラメータ-	面積	面積	面積	面積
	Spec 92.5% での Sens	Spec 92.5% での Sens	Spec 92.5% での Sens	Spec 92.5% での Sens
	961	927	989	960
	93.3%	86.7%	98.7%	80.3%
値				90.3%

【0378】

更なる発作パネルを以下からなる群から選択される3, 4, 5, 6, 7, 8, またはそれ以上のマーカーを使用して得てもよい: IL-1ra, C-反応蛋白質, フォン-ウィルブランド因子 (vWF), Tweak, クレアチンキナーゼ-BB, c-Tau, D-ダイマー, 血栓前駆蛋白質, 血管内皮増殖因子 (VEGF), マトリックス・メタロプロテアーゼ-9 (MMP-9), 神経細胞接着分子 (NCAM), BNP, S100β, カスパーース-3. 以下の代表的なパネルを虚血性発作の診断のために提供する (健常ドナーサンプルを“コントロール”群として使用)。

【0379】

10

20

30

40

【表 3 9】

パネル番号	1	2	3
パネル中のマーカー	CRP, NCAM, D-ダイマー, BNP, CK-BB, カススペース-3, c-Tau, S-100β	CRP, NCAM, D-ダイマー, BNP, CK-BB, VEGF, MMP-9, S-100β	CRP, D-ダイマー, BNP, CK-BB, S-100β
コントロール n	76	76	76
疾病 n	40	40	43
平均 ROC 面積	0.976	0.968	0.960
SD(%)	0.008	0.007	0.006
92.5% Spec での平均 Sens	94.1	93.6	93.4
SD(%)	1.40	1.30	0.90
92.5% Sens での平均 Spec	98.7	99.5	96.0
SD(%)	1.40	0.80	1.30

10

パネル番号	4	5	6
パネル中のマーカー	CRP, IL-1ra, D-ダイマー, CK-BB, MMP-9, S-100β	CRP, D-ダイマー, カススペース-3, CK-BB, VEGF, MMP-9, S-100β	CRP, D-ダイマー, MMP-9, CK-BB, S-100β
コントロール n	76	76	76
疾病 n	43	43	43
平均 ROC 面積	0.947	0.957	0.954
SD(%)	0.096	0.007	0.007
92.5% Spec での平均 Sens	92.1	94.5	93.0
SD(%)	9.50	1.90	2.30
92.5% Sens での平均 Spec	93.1	94.8	93.9
SD(%)	9.60	1.70	1.60

20

30

【 0 3 8 0 】

【表 4 0】

パネル番号	7	8	9
パネル中のマーカー	CRP, BNP, D-ダイマー, CK-BB, MMP-9, S-100β	CRP, D-ダイマー, IL-1ra, CK-BB, MMP-9, S-100β	CRP, D-ダイマー, NCAM, BNP, S-100β
コントロール n	76	76	76
疾病 n	43	43	41
平均 ROC 面積	0.960	0.947	0.960
SD(%)	0.006	0.096	0.005
92.5% Spec での平均 Sens	93.4	92.1	92.5
SD(%)	0.90	9.50	0.60
92.5% Sens での平均 Spec	96.0	93.1	96.6
SD(%)	1.30	9.60	2.40

10

パネル番号	10
パネル中のマーカー	CRP, D-ダイマー, CK-BB, カススペース-3, MMP-9, S-100β
コントロール n	76
疾病 n	43
平均 ROC 面積	0.957
SD(%)	0.007
92.5% Spec での平均 Sens	94.5
SD(%)	1.90
92.5% Sens での平均 Spec	94.8
SD(%)	1.70

20

30

【0381】

実施例 11 虚血性発作と出血性発作の鑑別のための代表的なパネル

以下の表は異なるタイプの発作（この実施例では虚血性発作と出血性発作）の鑑別のための本発明の方法の使用を示す。“分析物パネル”は虚血性発作患者および出血性発作患者から得た試験サンプルを分析するのに使用したマーカーの組み合わせを表す。92.5%の特異度（Spec）で診断の感度（Sens）を測定した；また92.5%の感度で診断の特異度を測定した。

40

【0382】

【表 4 1】

			虚血性 vs. 出血性発作			
			Run set 1	Run set 2	Run set 3	Run set 4
分析物 パネル:	CRP		x	x	x	x
	NT-3		x			x
	総 vWF		x			
	MMP-9		x	x	x	x
	VEGF		x	x	x	x
	CKBB		x	x	x	x
	MCP-1			x	x	x
	カルビンディン				x	
	vWF-VP1				x	
	vWF A3				x	
	vWF A1-A3				x	
	トロンビン-抗トロンビン III 複合体				x	
	プロテオリピッドタンパク質				x	
	IL-6				x	
	IL-8				x	
	ミエリン塩基性タンパク質				x	
	S-100b				x	
	組織因子				x	
	GFAP				x	
	vWF A1-インテグリン				x	
	CNP				x	
	NCAM			x		
全時間	N	出血性発作	209	196	182	197
		虚血性発作	114	110	122	109
		ROC 面積	0.898	0.867	0.920	0.882
		92.5% Spec での Sens	75.1%	62.2%	77.9%	64.0%
		92.5% Sens での Spec	77.2%	71.8%	85.7%	72.5%

10

20

30

【0383】

実施例 12 急性発作の診断のための代表的なパネル

この研究の主な終点は24時間より長く継続する血管由来と考えられる局所性神経学的症候または症状で定義される臨床的な発作の存在であった。発作患者から採取した血液サンプルを、発症から血液採取までの潜在時間に基づいて2つのカテゴリーに階層化した：6時間未満（16サンプル）および6-24時間（38サンプル）。最初は発作を有する疑いがあったが臨床基準に合わなかった患者をコントロールとした。これらの21人にはTIA（13人）；失神（n=1）およびその他（n=7）の患者が含まれた。コントロール群には血管性疾患を有さない患者が多く含まれた（n=157）。

40

【0384】

インフォームドコンセントを得た後、静脈切開を行い、回収した血液を遠心分離し（10,000g）、得られた上清を直ちに-70 で凍結し、前記のような分析が完了するまで保存した（Grocottら、2001、McGirtら、2002）。生化学マーカーの測定をBiosite Diagnostics

50

(San Diego, CA) により, Genesis Robotic Sample Processor 200/8 (Tecan; Research Triangle park, NC) を使用して行った。全てのアッセイは384ウェルのマイクロプレート中, 10 μ L の反応液量で行い, 結合した抗原の量はアルカリホスファターゼにコンジュゲートした二次抗体およびAttoPhos基質 (JBL Scientific, San Luis Obispo, CA) によって検出した。

【0385】

記述統計 (カテゴリーデータに関する頻度およびパーセンテージ, 並びに連続変数に関する平均値および標準偏差, 中央値, 第1および第3四分位, および最小値と最大値を含む) を全ての人口統計およびサンプルアッセイデータについて算出した。人口統計変数 (demographic variables) をカテゴリー変数 (categorical variables) に関してWilcoxon検定 (年齢) またはカイ二乗検定で比較した。マーカー値の分布を外れ値 (outliers) および非正規性 (non-normality) について試験した。過剰な試験を最低限にするために, 所定のサンプル期間でマーカーレベルによって発作を区別する能力を, この調査研究におけるいくつかの段階で試験した。第一に, 各マーカーを一つの予測変数として単変量ロジスティック回帰で試験した。これらの結果, マーカーの臨床的特徴, および他のマーカーとの相関関係に基づいて, 3個一組のマーカーを選択し, 多変量ロジスティックモデルで試験した。有意ではないマーカーはこのモデルから除去し, 2つまでのマーカーを更に試験し, 最も安定した推定および予測ができる最終モデルに到達するまでこれを行った。含有されたマーカー間の相関関係をチェックして共線性 (collinearity) を回避するようにし, 影響のある統計 (カイ二乗を変化させる) を試験していずれの観察へも不適当な影響を与えないようにした。最後に, ブートストラップ法によってモデルの確実性を確認した。分析データセットと同じサイズの50の試験データセットを, 分析データセットからの置換でランダムに選択して生成した。次いでモデルをそれぞれの“ベースストラップを行った”データセットに適合させ, 結果の一貫性について調査した。この方法で, 十分な数の発作サンプルが得られた2つのマーカーサンプリング時間帯について別々のモデルを構築した (0-6時間および6-24時間)。同一患者からの複数のサンプルは同じ分析に使用せず, 各分析における独立性を保存した。複数のサンプルを同一患者から同一時間帯に採取できた場合, その時間帯の開始時間に最も近いサンプルのみを分析に使用した。発症後の時間と血清マーカーレベルの関係を調べるために, 発作患者全員の発症後0-24時間に採取した全てのサンプルを含めてデータセットを作製した。まず, 時間の関係をスピアマンの順位相関を用いて検討した; 次いで $p < 0.10$ との相関を, 反復測定多変量回帰法で検定してサンプルの非独立性を説明した。

【0386】

急性 (発症から血液回収まで0-6時間) および亜急性 (発症から血液回収まで6-24時間) の患者の人口統計を比較した。男性患者はどちらのデータセットでも臨床的発作が診断される可能性は低かったが, 過去の心筋梗塞の病歴とアフリカンアメリカンは発作の発生率が高かった。血液を迅速に (発症から6時間以内), およびやや迅速に (発症から6から24時間以内) 回収したデータセットについて患者を統計した。いずれのデータセットでも, 臨床的発作患者と発作を有さない患者の間に年齢における有意な差異はなかった (年齢は平均値 $\pm$ 標準偏差で表す)。発作を有さない患者において, 亜急性および急性の両方で男性患者の割合が高かった。いずれのデータセットでも, 高い割合の発作患者がアフリカンアメリカンであり, 過去に心筋梗塞を発症していた。

【0387】

【表 4 2】

	(0-6 時間)			(6-24) 時間		
	発作 (n=16)	非発作 (n=165)	p	発作 (n=38)	非発作 (n=176)	p
年齢	62 ± 15	63.3 ± 8	NS	63 ± 5	62 ± 9	NS
男性(%)	37.5	67.7	0.026	42.1	68	0.005
MI の病歴(%)	30.8	1.2	<0.001	37.1	2.3	<0.001
人種 (%)			<0.001			
白人	37.5	91.9		44.7	89.5	<0.001
黒人	62.5	3.8		52.6	6.4	
その他	0	4.4		2.6	4.1	

10

【0388】

発作および神経損傷の病因に関係する26の生化学マーカーを予測して設定し、6つのカテゴリーのうちの1つに分類した：グリア活性化のマーカー、炎症の非特異的メディエーター；血栓症または止血障害のマーカー、細胞傷害のマーカー；過酸化脂肪/ミエリン損傷のマーカー；アポトーシス/その他のマーカー。単変量ロジスティック分析により、4つのマーカーがどちらの時間帯でも発作と高度に相関することが明らかになった（ $p < 0.001$ ）。これらにはグリア活性化のマーカーが1つ（S100 β ）、炎症のマーカーが2つ（血管細胞接着分子、IL-6）、およびフォン-ウィルブランド因子（vWF）が含まれる。更に、いくつかのマーカーは時間の関数として、個別に亢進的に制御された。特に、アポトーシスのマーカーであるカスパー3は時間の関数として増加し（発症から血液採取までの24時間にわたって）、これは不可逆的に損傷した組織の容量の増加を示唆している。

20

【0389】

急性（6時間以内に採取した血液）および亜急性発作（6-24時間以内に採取した血液）患者から回収した血清を示す2つのデータセットを創製した。脳虚血の疑いのある患者の血液中のグリア活性化および炎症のマーカーをアッセイし、各マーカーについて単変量ロジスティック回帰を行った。多くのアッセイは非正規分布であることを仮定して、データは中央値±四分位範囲で表す；有意性は各単変量ロジスティックモデルからの未調整p値を表す。 $p > 0.05$ は有意ではない（NS）とみなす。

30

【0390】

【表 4 3】

	(0-6 時間)			(6-24) 時間		
	発作 (n=)	非発作	p	発作 (n=16)	非発作 (n=165)	p
	中央値 (25, 75 パーセンタイル)			中央値 (25, 75 パーセンタイル)		
グリアマーカー(単位)						
S100b (pg/ml)	42.9 (9.0,48.7)	0 (0,0)	<0.001	27.3 (9, 88)	0 (0,0)	<0.001
グリア線維性酸性タンパク質 (pg/ml)	488.9 (0,1729)	110.2 (0,395.1)	0.025	666.9 (188,1327)	96.8 (0,398)	0.002
炎症メディエーター(単位)						
マトリクスメタロプロティナーゼ 9 (MMP 9; ng/ml)	253.0 (138,524)	70.0 (26,109)	<0.001	176.8 (111,327)	74 (27,113.7)	<0.001
血管細胞接着分子 (VCAM; (g/ml)	2.2 (1.8,2.3)	1.3 (1,1.56)	<0.001	2.0 (1.6,2.4)	1.3 (1.0, 1.7)	<0.001
インターロイキン 6 (IL-6; pg/ml)	20.4 (11.4,56)	0.1 (0.1,9.4)	0.039	33.1 (6.8,73.2)	0.1 (0.1,11.4)	0.008
腫瘍壊死因子 (TNF α ; pg/ml)	31.2 (5.7,54.1)	0.1 (0.1,15.5)	0.016	29.8 (3.3,55)	0.1 (0.1,17.7)	0.039
神経細胞接着分子 (NCAM, ng/ml)	51.4 (45.6,60)	52.0 (51.1,53)	NS	49.3 (46,57)	51.9 (51,52.9)	NS
インターロイキン 1 受容体 アンタゴニスト (IL-1ra, pg/ml)	0 (0,1281)	221.9 (0,693.7)	NS	88.2 (0,927)	180.8 (0,699)	NS
インターロイキン 1 β (IL-1 β ; pg/ml)	1.9 (0.2,5)	0.1 (0.1,3.6)	NS	0.1 (0.1,4.9)	0.1 (0.1,4.2)	NS
インターロイキン 8 (IL8; pg/ml)	30.1 (10.1,39)	2.0 (0.1,18.4)	NS	18.2 (6.7, 46)	1.4 (0.1, 17.8)	NS
単球走化性タンパク質-1 (MCP-1; pg/ml)	203.7 (133,255)	115.1 (79,164)	NS	144.9 (104,222)	114.4 (79,162)	NS
血管上皮増殖因子 (VEGF; ng/ml)	0 (0,0)	0.1 (0,0.2)	0.008	0 (0,0)	0.1 (0,0.1)	0.002

【 0 3 9 1 】

急性（6時間以内に採取した血液）および亜急性発作（6-24時間以内に採取した血液）患者から回収した血清を示す2つのデータセットを創製した。脳虚血の疑いのある患者の血液中の急性脳虚血（アポトーシス，ミエリン損傷および過酸化，血栓，および細胞性を含む）のマーカーをアッセイし，各マーカーについて単変量ロジスティック回帰を行った。多くのアッセイは非正規分布であることを仮定して，データは中央値±四分位範囲で表す；有意性は各単変量ロジスティックモデルからの未調整 p 値を表す。p>0.05は有意ではない（NS）とみなす。

【 0 3 9 2 】

10

20

30

40

【表 4 4】

	(0-6 時間)			(6-24) 時間		
	発作	非発作	p	発作 (n=16)	非発作 (n=165)	p
	中央値 (25, 75 パーセンタイル)			中央値 (25, 75 パーセンタイル)		
血栓のマーカー(単位)						
フォン-ウィルブランド因子(vWFA1; ng/ml)	7991 (6964,9059)	5462 (4794, 6332)	<0.001	7720.7 (7036,8986)	5498.8 (4815,6404)	<0.001
トロンビン-抗トロンビン III (ng/ml)	95 (33,151)	15 (0.3, 38)	NS	69.2 (39,89)	16.5 (0.9,40.7)	NS
D-ダイマー (ng/ml)	2840 (2323, 3452)	3108 (2621, 4037)	NS	2684.3 (2296,3421)	3112.7 (2633,3955)	NS
細胞傷害およびミエリン損傷のマーカー(単位)						
クレアチニンホスホキナーゼ; brain band (CKBB; ng/ml)	3.5 (1.3,4.4)	0.5 (0.1, 107)	0.03	1.7 (0.2, 3.8)	0.5 (0.1,1.6)	0.04
組織因子 (pg/ml)	5766 (2828, 10596)	9497 (5309, 19536)	NS	4142.8 (2894,6333)	9085.5 (4572,1726 4)	0.013
ミエリン塩基性タンパク質 (ng/ml)	3.1 (0.3, 6.4)	0 (0,2.8)	NS	2.9 (0,5.5)	0 (0,2.8)	NS
プロテオリピドタンパク質(RU)	0.1 (0.1,0.2)	0.2 (0.1,0.6)	NS	0.1 (0.1,0.3)	0.2 (0.1,0.6)	NS
Malendialdehyde (μg/ml)	28 (20,35)	23 (20,26)	0.02	27.7 (24.8,31.3)	23.8 (20.1,27.2)	0.02
アポトーシス、増殖因子、その他のマーカー(単位)						
脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP; pg/ml)	53 (24,227)	28 (21,39)	0.019	120.4 (33.9,306)	27.4 (21.1,39.2)	<0.001
カスパー 3 (ng/ml)	7.7 (4.4, 16.7)	4.5 (3.0, 7.0)	NS	8.1 (4.9,35.4)	4.7 (3.0,7.4)	0.002
カルビンディン-D (pg/ml)	2493 (1406, 4298)	3003 (2287, 4276)	NS	3080.8 (1645,3950)	2982 (2312,4186)	NS
熱ショックタンパク質 60 (HSP 60; ng/ml)	0.1 (0,13.3)	0 (0,0)	NS	0 (0,15.9)	0 (0,0)	NS
チトクローム C (ng/ml)	0 (0, 0.1)	0 (0,0)	NS	0 (0,0.2)	0 (0,0)	NS

【 0 3 9 3 】

これらのマーカーを使用する診断法の感度および特異度を最大限にするため、出願人は次に上記のような多変量ロジスティック回帰を使用する発作バイオマーカーの3変数パネルを創製した。急性患者(発症から採血までの時間が6時間以内)の患者で、変数MMP9, vWF, およびVCAMを使用して感度および特異度を最適化した; マーカーの濃度は予測された

10

20

30

40

50

発作の確率と直接関係する。これらの変数はそれぞれ、有意に、かつ独立してモデルに寄与した（表 2 1）。このロジスティックモデルについてのモデル全体の尤度比のカイ 2 乗は 71.4 ($p < 0.0001$) であり、フィットの良さは $p = 0.9317$ と確認され（Hosmer & Lemeshow 検定）、一致性（concordance）はほとんど 98% であった（ $c = 0.979$ ）。帰結の確率レベルを 0.1 のカットオフに設定すると、このモデルでの臨床的に定義される発作（脳虚血を原因とし、24 時間より長く継続する局所性神経学的症状）の予測に関する感度は 87.5%，特異度は 91.5% であった。ブートストラップによる評価で、50 試験の全てでモデル $p < 0.0001$ であり、50 全てで一致指数（concordance indexes）は $> 94\%$ であることが明らかになった。MMP-9 は 50 中 43 サンプル、VCAM は 43/50、そして vWFa1 は 35/50 で有意（ $p < 0.05$ ）であった。

10

【 0 3 9 4 】

予測変数の 1 標準偏差単位におけるオッズ比の信頼区間。発症から 6 時間以内に採血した全ての患者のデータセットからロジスティック回帰モデルを創製した。3 つの共変量（MMP9、vWF、および VCAM）のそれぞれのオッズ比を 1 標準偏差単位当たりで表す。

【 0 3 9 5 】

【表 4 5】

効果	単位 (1 sd)	オッズ比	Lower CL	Upper CL	p-値
MMP9	137.0	13.202	3.085	98.035	0.0026
VCAM	0.5900	4.104	1.793	12.721	0.0045
vWFa1	1462.0	3.581	1.590	9.450	0.0036

20

【 0 3 9 6 】

同様に、亜急性症状を有する患者（発症から採血まで 6-24 時間経過）についてのロジスティック回帰モデルを作製した。この時間帯で、S100b、VCAM、および vWFa1 の変数を使用して感度および特異度を最適化した。そのそれぞれがモデルに有意に、かつ独立して寄与していた（表 22）。このロジスティックモデルについてのモデル全体の尤度比のカイ 2 乗は 95.1 ($p < 0.0001$) であり、当てはまりの良さは $p = 0.2134$ と確認され（Hosmer & Lemeshow 検定）、一致性はほぼ 95% であった（ $c = 0.935$ ）。帰結の確率レベルを 0.1 のカットオフに設定すると、このモデルでの発作を識別する感度は 97.1%，特異度は 87.4% であった。ブートストラップによる評価で、50 試験の全てでモデル $p < 0.0001$ であり、50 全てで一致指数は $> 89\%$ であることが明らかになった。S100b は 50 中 47 サンプル、VCAM は 45/50、そして vWFa1 は 49/50 で有意（ $p < 0.05$ ）であった。

30

【 0 3 9 7 】

予測変数の 1 標準偏差単位におけるオッズ比の信頼区間。発症から 6-24 時間以内に採血した全ての患者のデータセットからロジスティック回帰モデルを創製した。3 つの共変量（S100 β 、vWF、および VCAM）のそれぞれのオッズ比を 1 標準偏差単位当たりで表す。

【 0 3 9 8 】

【表 4 6】

効果	単位 (1 sd)	オッズ比	Lower CL	Upper CL	p-値
S100b	65.0	6.371	2.225	26.246	0.0024
VCAM	0.660	2.423	1.417	4.380	0.0020
vWFa1	1621.0	3.180	1.934	5.674	$< .0001$

40

【 0 3 9 9 】

実施例 1 3 急性および非急性発作を鑑別するための代表的なパネル

50

米国特許出願第10/331,127号 (METHOD AND SYSTEM FOR DISEASE DETECTION USING MARKER COMBINATIONS (代理人書類番号 071949-6802), 2002年12月27日出願) 記載の方法を使用して, 急性および非急性発作を鑑別するための代表的なパネルを同定した。多数の可能性のあるマーカー (例えば19個の異なるマーカー) から開始して, 反復法を適用した。この方法で, マーカーの個々の閾値濃度はカットオフ自体として使用せず, 各患者のアッセイ値を比較および標準化するための値として使用した。ウィンドウ因子を使用して, カットオフを超える, またカットオフ未満である最小値および最大値を算出した。最大値を超えるアッセイ値を最大値とし, 最小値未満のアッセイ値を最小値とした。個々のマーカーの重みの絶対値を合計すると1である。マーカーの重みがマイナスなのは, コントロール群のアッセイ値が疾病群のものより高いことを意味する。カットオフ, ウィンドウ, および重み係数を使用し “パネル応答” を算出する。患者およびコントロールの集団全体のパネル応答についてROC分析を行い, そのパネルで所望の感度および特異度が得られるようにパネル応答カットオフを選択する。各反復セット後, 等式に対する寄与が最も小さいものを除去し, 数が減ったマーカーで反復工程を再開してもよい。この工程を, 許容されるようなパネルの感度および特異度となる最小数のマーカーが得られるまで継続した。

10

【0400】

急性発作 (0-12時間) を同定するためのパネル組成は以下のマーカーを含み: BNP, GFAP, IL-8, β -NGF, vWF-A1, およびCRP, 非急性発作 (12-24時間) を同定するためのパネル組成は以下のマーカーを含んだ: BNP, GFAP, IL-8, CK-BB, MCP-1, およびIL-1ra。ポジティブな結果は94.4%の特異度での感度が少なくとも90%であることによって同定した。以下に示すように, 使用したマーカーは急性発作の同定, 非急性発作の同定, および/または急性と非急性発作の鑑別のためのパネルを提供する。

20

【0401】

【表 4 7】

0-12 時間のパネルの結果

全発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	54	6	100.0%
0-6 時間	54	13	100.0%
0-12 時間	54	24	95.8%
12-24 時間	54	19	68.4%
虚血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	54	5	100.0%
0-6 時間	54	11	100.0%
0-12 時間	54	20	95.0%
12-24 時間	54	17	64.7%
出血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	54	1	100.0%
0-6 時間	54	2	100.0%
0-12 時間	54	4	100.0%
12-24 時間	54	2	100.0%
0-12 時間パネル係数			
マーカー	カットオフ	ウィンドウ	重量
BNP	97.13	0.07	0.15
vWF-A1	29.35	0.25	-0.07
GFAP	2.64	0.22	0.07
BNGF	0.13	0.88	-0.20
IL-8	140.32	0.00	0.21
CRP	43.68	0.92	0.30

10

20

30

40

【 0 4 0 2 】

【表 4 8】

12-24 時間のパネルの結果

全発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	20	6	83.3%
0-6 時間	20	13	69.2%
0-12 時間	20	25	76.0%
12-24 時間	20	19	100.0%
虚血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	20	5	100.0%
0-6 時間	20	11	72.7%
0-12 時間	20	21	76.2%
12-24 時間	20	17	100.0%
出血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	20	1	0.0%
0-6 時間	20	2	50.0%
0-12 時間	20	4	75.0%
12-24 時間	20	2	100.0%

10

20

30

40

12-24 時間パネル係数			
マーカー	カットオフ	ウィンドウ	重量
MCP-1	67.93	0.69	-0.04
BNP	203.00	0.79	0.21
GFAP	1.71	0.79	0.27
IL-8	97.51	0.07	0.08
CK-BB	0.48	0.14	-0.14
IL-1ra	367.11	0.68	-0.26

【0 4 0 3】

発症から0-6時間の発作と発症から6時間以降の発作との鑑別のための別の代表的なパネルも同定した。急性発作（0-6時間）を同定するためのパネル組成は以下のマーカーを含み：BNP，GFAP，CRP，CK-BB，MMP-9，IL-8，および β -NGF，非急性発作（6-24時間）を同定するためのパネル組成は以下のマーカーを含んだ：BNP，GFAP，CRP，CK-BB，カススペース-3，MCP-1，およびvWF-インテグリン。ポジティブな結果は94.4%の特異度での感度が少なくとも90%であることによって同定した。以下の表25および26に示すように，使用したマーカーによって0-6時間のウィンドウでの急性発作の同定，このウィンドウ外の発作の同定，および／または発症時間のウィンドウ間の鑑別のためのパネルを提供できる。

【0 4 0 4】

50

【表 4 9】

0-6 時間のパネルの結果

全発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	55	13	92.3%
0-6 時間	55	33	97.0%
6-24 時間	55	76	65.8%
虚血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 h	55	11	90.9%
0-6 h	55	25	96.0%
6-24 h	55	51	64.7%
出血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	55	2	100.0%
0-6 時間	55	8	100.0%
6-24 時間	55	25	68.0%
0-6 時間パネル係数			
マーカー	カットオフ	ウィンドウ	重量
BNP	119.16	0.51	0.09
MMP-9	203.57	0.12	-0.08
GFAP	7.22	0.00	0.18
BNGF	0.05	0.00	-0.14
IL-8	32.41	0.00	0.12
CK-BB	1.69	0.90	0.16
CRP	34.86	0.00	0.24

10

20

30

【 0 4 0 5 】

【表 5 0】

6-24 時間のパネルの結果

全発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	55	11	63.6%
0-6 時間	55	29	62.1%
6-24 時間	55	66	93.9%
虚血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	55	9	55.6%
0-6 時間	55	22	77.3%
6-24 時間	55	44	93.2%
出血性発作			
発症からの時間	擬似被験者数	発作被験者数	94.4%特異度での感度
0-3 時間	55	2	100.0%
0-6 時間	55	7	71.4%
6-24 時間	55	22	94.5%

6-24 時間パネル係数			
マーカー	カットオフ	ウィンドウ	重量
カスベース-3	1.15	0.90	0.19
MCP-1	1242.63	0.87	-0.21
vWF-インテグリン	5.37	0.90	0.11
BNP	738.69	0.97	0.15
GFAP	3.22	0.18	0.11
CK-BB	3.52	0.99	-0.01
CRP	114.31	0.99	0.22

【0406】

実施例 14 クモ膜下出血後の脳血管痙攣の予測のためのマーカーおよびマーカーパネル

脳血管痙攣に起因する遅発性虚血性神経障害（DIND）は，動脈瘤性クモ膜下出血（SAH）後の罹病率および死亡率の主な要因である。その病因を明らかにするための多大な努力にもかかわらず，DINDの根底にある生物学的過程は未だ明かになっていない。

【0407】

脳血管痙攣を予測する代表的なマーカーおよびマーカーパネルを同定するために，動脈瘤性クモ膜下出血患者52人において，発症の48時間後から毎日血液サンプルを採取した。23患者（45%）は臨床的脳血管痙攣を起こし，脳血管痙攣の症状発現前に採取した血液サンプルのみを考慮に入れた。マーカーレベルの最高値を使用して単変量ロジスティック回帰を行い，最も有意な変数を多重ロジスティック回帰モデルに入力した。

【0408】

10

20

30

40

50

最終的なロジスティックモデルはVEGF ($p=0.002$) , NCAM ($p=0.004$) , およびカスパー-3 ($p=0.009$) を含み, 全体の p 値は <0.0001 であった。モデルは94%の感度 (95%の陰性的中率) および91%の特異度 (88%の陽性的中率) であった。

【0409】

近年, Sviriら (Stroke 31:118-122, 2000) は血清BNPレベルおよびDIND間の相関を同定した。Sviriが明らかにしたところによれば, 症候性脳血管痙攣を起こす患者においてのみSAHの7-9日後に血清BNPが6倍上昇し, 症候性血管痙攣を起こさない患者の血清BNPは上昇しない [18]。しかしながら, BNPの上昇とDIND発症の時間的な関係は報告されておらず, 血清BNPがDINDを促進し, 切迫するDINDを予測する血清マーカーとなりうるのかどうかという疑問が浮上する。

10

【0410】

従って第2の研究で, 動脈瘤性SAHで入院した40人の連続した患者を登録した。入院時の患者の症状を, Hunt & Hess分類に従って分類した。最初のCTの所見からSAHの重症度を分類した。入院後24時間以内に診断用脳血管造影を行った。全ての患者で, SAH後<48時間に開頭術および動脈瘤クリッピングを行った。デカドロンを手術前に投与し, 手術後直ちにテーパリングした。ニモジピン, フェニトイン, および胃腸予防薬 (H_2 -ブロッカーまたはプロトンポンプ阻害剤) を入院した日に投与し, 患者が集中治療室に滞在している間継続した。入院時に静脈穿刺によって血清BNPおよびナトリウムサンプルを採取し, 連続12日間, 12時間毎に反復した。全ての患者で, DINDの疑いが起きた時点まで週5回経頭蓋ドップラー超音波 (TCD) を行った。連続変数の差異の有意性は t -検定を用いて測定した。ノンパラメトリックデータはマンホイットニー検定を使用して比較した。パーセンテージはカイ二乗検定で比較した。Hunt & Hessグレードおよびフィッシャーグレードに適合させた多変量ロジスティック回帰分析を使用し, BNPとDIND発症間の独立した関係を評価した。

20

【0411】

16患者 (40%) はSAH後, 症候性脳血管痙攣を起こした。入院時の血清BNPの>3倍上昇は低ナトリウムの発症と関係した ($p<0.05$)。平均BNPレベルはSAHの<3日後の血管痙攣患者および非血管痙攣患者間で同様であったが (126 ± 39 対 154 ± 40 , $p=0.61$) , SAHの4-6日後 (285 ± 67 対 116 ± 30 , $p<0.01$) , SAHの7-9日後 (278 ± 72 対 166 ± 45 , $p<0.01$) , およびSAHの9-12日後 (297 ± 83 対 106 ± 30 , $p<0.01$) の血管痙攣同齡集団では上昇した。BNPレベルは独立してフィッシャーおよびHunt & Hessグレードに適合した血管痙攣と関係を有したままであった (OR, 1.28; 95%CI, 1.1-1.6)。血管痙攣発症患者では, 平均血清BNPは血管痙攣発症後24時間以内に5.4倍, 血管痙攣発症後3日で11.2倍に上昇した。入院時からBNPレベルが上昇していた患者はSAHの2週間後でGlasgow Comaスコア (GCS) は変化せず (0 ± 3) , これに対して血清BNPが上昇していなかった患者のGCSは 3.0 ± 2 ($p<0.05$) に改善された。

30

【0412】

血清BNPレベルの上昇は独立して低ナトリウムと関係し, DIND発症の24時間後までは有意に上昇せず, 2週間のGCSを予測した。BNPの上昇は脳血管痙攣による血流低下を悪化させ, 診断および治療管理の積極性を決定するためのマーカーとなりうる。

40

【0413】

本発明について, 当業者がこれを作製および使用するために十分詳細に記載および例証してきたが, 種々の変更, 修飾, および改良は, 本発明の意図および範囲を逸脱することなく明白である。

【0414】

実施例 15 虚血性発作に由来する頭蓋内出血を区別するためのマーカーおよびマーカーパネル

急性虚血性発作の初期管理は頭蓋内出血 (ICH) の存在の除去を伴う。虚血性発作またはICHと診断された113患者から血液を採取した。全ての患者は発症後48時間以内に来院した。最初の臨床的結果はICH (CTで確認される) または虚血性発作の診断 (24時間を超え

50

て持続する血管由来の局所的神経症状で、一貫したX線所見が得られるもの)であった。各変数について単変量ロジスティック回帰を行い、最も有意なものを多重ロジスティック回帰モデルに組み入れた。共線性を試験し、3変数の最終モデルを作製した。

【0415】

34患者(30%)がICH, 79患者(70%)が虚血性発作と診断された。最終的なロジスティックモデルにはC-反応性蛋白質($P=0.013$), 血管内皮増殖因子($P=0.045$), およびBNP($P=0.030$)が含まれ、全体のP値は <0.01 であった。確率のカットオフを0.215とすると、このモデルは感度94%, 陰性的中率93%, そして特異度40%であった。同じ3変数モデルが発症後24時間以内に来院した患者のみを含む場合に有意であり($n=83$, $P<0.05$), 感度94%, 陰性的中率96%, そして特異度48%であった。3つのバイオマーカーのパネルにより、発作を示す患者においてICHを高感度で除外することが可能であった。それらのパネルは、虚血性発作の疑いがある患者において治療介入の前にICHを除外するためのポイント・オブ・ケア検査として有用であることが判明するかもしれない。

10

【0416】

実施例16 クモ膜下出血後の脳血管痙攣の予測のためのマーカーおよびマーカーパネル

脳血管痙攣に起因する遅発性虚血性神経障害(DIND)は、動脈瘤性クモ膜下出血(SAH)後の罹病率および死亡率の主な要因である。その病因を明らかにするための多大な努力にもかかわらず、DINDの根底にある生物学的過程は未だ明かになっていない。

【0417】

脳血管痙攣を予測する代表的なマーカーおよびマーカーパネルを同定するために、動脈瘤性クモ膜下出血患者52人において、発症の48時間後から毎日血液サンプルを採取した。23患者(45%)は臨床的脳血管痙攣を起こし、脳血管痙攣の症状発現前に採取した血液サンプルのみを考慮に入れた。マーカーレベルの最高値を使用して単変量ロジスティック回帰を行い、最も有意な変数を多重ロジスティック回帰モデルに入力した。

20

【0418】

最終的なロジスティックモデルはVEGF($p=0.002$), NCAM($p=0.004$), およびカスベース-3($p=0.009$)を含み、全体のp値は <0.0001 であった。モデルは94%の感度(95%の陰性的中率)および91%の特異度(88%の陽性的中率)であった。

【0419】

近年、Sviriら(Stroke 31:118-122, 2000)は血清BNPレベルおよびDIND間の相関を同定した。Sviriが明らかにしたところによれば、症候性脳血管痙攣を起こす患者においてのみSAHの7-9日後に血清BNPが6倍上昇し、症候性血管痙攣を起こさない患者の血清BNPは上昇しない[18]。しかしながら、BNPの上昇とDIND発症の時間的な関係は報告されておらず、血清BNPがDINDを促進し、切迫するDINDを予測する血清マーカーとなりうるのかどうかという疑問が浮上する。

30

【0420】

従って第2の研究で、動脈瘤性SAHで入院した40人の連続した患者を登録した。入院時の患者の症状を、Hunt & Hess分類に従って分類した。最初のCTの所見からSAHの重症度を分類した。入院後24時間以内に診断用脳血管造影を行った。全ての患者で、SAH後<48時間に関頭術および動脈瘤クリッピングを行った。デカドロンを手術前に投与し、手術後直ちにテーパリングした。ニモジピン、フェニトイン、および胃腸予防薬(H_2 -ブロッカーまたはプロトンポンプ阻害剤)を入院した日に投与し、患者が集中治療室に滞在している間継続した。入院時に静脈穿刺によって血清BNPおよびナトリウムサンプルを採取し、連続12日間、12時間毎に反復した。全ての患者で、DINDの疑いが起きた時点まで週5回経頭蓋ドップラー超音波(TCD)を行った。連続変数の差異の有意性はt-検定を用いて測定した。ノンパラメトリックデータはマンホイットニー検定を使用して比較した。パーセンテージはカイ二乗検定で比較した。Hunt & Hessグレードおよびフィッシャーグレードに適合させた多変量ロジスティック回帰分析を使用し、BNPとDIND発症間の独立した関係を評価した。

40

【0421】

50

16患者（40%）はSAH後，症候性脳血管痙攣を起こした。入院時の血清BNPの>3倍上昇は低ナトリウムの発症と関係した（ $p<0.05$ ）。平均BNPレベルはSAHの<3日後の血管痙攣患者および非血管痙攣患者間で同様であったが（ 126 ± 39 対 154 ± 40 ， $p=0.61$ ），SAHの4-6日後（ 285 ± 67 対 116 ± 30 ， $p<0.01$ ），SAHの7-9日後（ 278 ± 72 対 166 ± 45 ， $p<0.01$ ），およびSAHの9-12日後（ 297 ± 83 対 106 ± 30 ， $p<0.01$ ）の血管痙攣同齡集団では上昇した。BNPレベルは独立してフィッシャーおよびHunt & Hessグレードに適合した血管痙攣と関連を有したままであった（OR，1.28；95%CI，1.1-1.6）。血管痙攣発症患者では，平均血清BNPは血管痙攣発症後24時間以内に5.4倍，血管痙攣発症後3日で11.2倍に上昇した。入院時からBNPレベルが上昇していた患者はSAHの2週間後でGlasgow Comaスコア（GCS）は変化せず（ 0 ± 3 ），これに対して血清BNPが上昇していなかった患者のGCSは 3.0 ± 2 （ $p<0.05$ ）に改善された。 10

【0422】

血清BNPレベルの上昇は独立して低ナトリウムと関係し，DIND発症の24時間後までは有意に上昇せず，2週間のGCSを予測した。BNPの上昇は脳血管痙攣による血流低下を悪化させ，診断および治療管理の積極性を決定するためのマーカーとなりうる。

【0423】

本発明について，当業者がこれを作製および使用するために十分詳細に記載および例証してきたが，種々の変更，修飾，および改良は，本発明の意図および範囲を逸脱することなく明白である。

【0424】

実施例 17 虚血性発作に由来する頭蓋内出血を区別するためのマーカーおよびマーカーパネル

急性虚血性発作の初期管理は頭蓋内出血（ICH）の存在の除去を伴う。虚血性発作またはICHと診断された113患者から血液を採取した。全ての患者は発症後48時間以内に来院した。最初の臨床的結果はICH（CTで確認される）または虚血性発作の診断（24時間を超えて持続する血管由来の局所的神経症状で，一貫したX線所見が得られるもの）であった。各変数について単変量ロジスティック回帰を行い，最も有意なものを多重ロジスティック回帰モデルに組み入れた。共線性を試験し，3変数の最終モデルを作製した。

【0425】

34患者（30%）がICH，79患者（70%）が虚血性発作と診断された。最終的なロジスティックモデルにはC-反応性蛋白質（ $P=0.013$ ），血管内皮増殖因子（ $P=0.045$ ），およびBNP（ $P=0.030$ ）が含まれ，全体のP値は <0.01 であった。確率のカットオフを0.215とすると，このモデルは感度94%，陰性的中率93%，そして特異度40%であった。同じ3変数モデルが発症後24時間以内に来院した患者のみを含む場合に有意であり（ $n=83$ ， $P<0.05$ ），感度94%，陰性的中率96%，そして特異度48%であった。3つのバイオマーカーのパネルにより，発作を示す患者においてICHを高感度で除外することが可能であった。それらのパネルは，虚血性発作の疑いがある患者において治療介入の前にICHを除外するためのポイント・オブ・ケア検査として有用であることが判明するかもしれない。 30

【0426】

本発明について，当業者がこれを作製および使用するために十分詳細に記載および例証してきたが，種々の変更，修飾，および改良は，本発明の意図および範囲を逸脱することなく明白である。 40

【0427】

当業者に容易に認識されるように，本発明はその本来のものに加え，目的を実施し，言及した目標および利益を得るために十分適合される。ここに提供する実施例は好ましい態様を表すものであり，例証的なもので，本発明の範囲を限定することを意図しない。当業者はその修飾および他の使用を行いうる。それらの修飾は本発明の意図の範囲内であり，特許請求の範囲で定義される。

【0428】

当業者に容易に明白なように，本発明の範囲および意図を逸脱することなく，ここに開 50

示する本発明に種々の置換および修飾を施与してもよい。

【0429】

本明細書に記載する特許および文献は全て、本発明が属する分野の技術者のレベルを示すものである。全ての特許および文献は、個々の文献が参照により明白かつ独立して参照により組み込まれることを示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0430】

ここに例証的に記載する本発明は、いずれかの要素（単数または複数）、制限（単数または複数）（ここには特に開示していない）がない状態で実施してもよい。従って、例えばそれぞれの場合で、“含む”、“本質的に・・・からなる”、および“からなる”という用語はいずれも、他の2つの用語のいずれと置き換えてもよい。使用した用語および表現は制限ではなく説明の用語として使用するもので、それらの用語および表現の使用において、表示および記載する特徴と同等のものおよびその一部を除外する意図はなく、認識されるように、請求する本発明の範囲内で種々の修飾が可能である。従って、好ましい態様および必要に応じた特徴によって本発明を明確に開示したが、当業者はここに開示するコンセプトの修飾および変更を行ってもよく、それらの修飾および変更は添付する特許請求の範囲で規定される本発明の範囲内にあるとみなされることは理解されるべきである。

【0431】

他の態様は別記の特許請求の範囲に記載する。

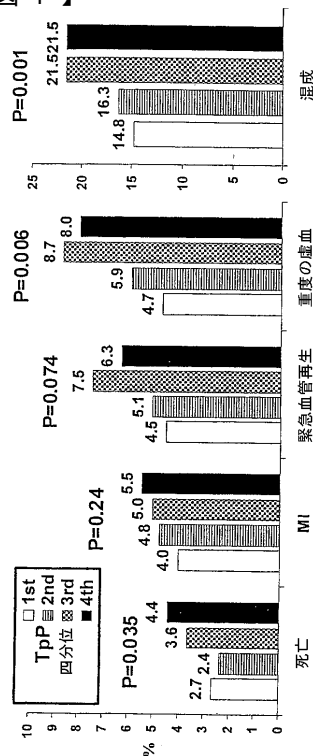
【図面の簡単な説明】

【0432】

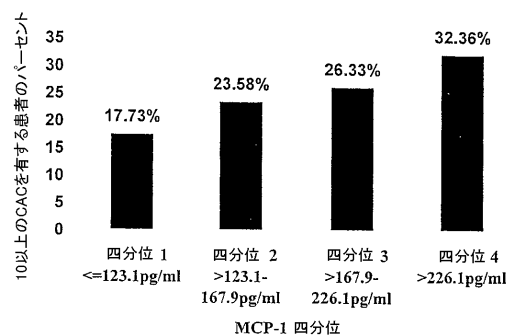
【図1】図1は、TpP（商標）濃度と、OPUS-TIMI16研究におけるACS被験者の登録後12か月間の臨床的帰結との相関を示す。

【図2】図2は、CACを決定することにより測定される臨床的に明らかなアテローム性動脈硬化症を示していない被験者におけるMCP-1濃度とアテローム性動脈硬化症との相関を示す。

【図1】



【図2】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/41453															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; 1/70 US CL : 435/, 6, 7.1, 7.2, 7.4, 7.92, 91.2; 436/500, 510, 517, 518, 525, 527; 422/50, 51, 68.1, 73, 82.05 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/, 6, 7.1, 7.2, 7.4, 7.92, 91.2; 436/500, 510, 517, 518, 525, 527; 422/50, 51, 68.1, 73, 82.05 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) MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X, P — Y, P</td> <td>WO 03/016910 A1 (VALKIRS et al.) 27 February 2003 (27.02.2003), see entire document.</td> <td>1-36, 68-76, and 78-141</td> </tr> <tr> <td>X, P — Y, P</td> <td>US 2003/0153014 A1 (SHEN et al.) 14 August 2003 (14.08.2003), see entire document.</td> <td>37-67, 77, and 142-182 1, 26-33, 35, and 67</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 6,214,560 B1 (YGUERABIDE et al.) 10 April 2001 (10.04.2001), see entire document.</td> <td>2-25, 34, 36-66, 68-137, and 141-182 32-34, 67, 76, 104, and 171</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 5,599,668 A (STIMPSON et al.) 04 February 1997 (04.02.1997), see entire document.</td> <td>141 32-34, 67, 76, 104, and 171 141</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X, P — Y, P	WO 03/016910 A1 (VALKIRS et al.) 27 February 2003 (27.02.2003), see entire document.	1-36, 68-76, and 78-141	X, P — Y, P	US 2003/0153014 A1 (SHEN et al.) 14 August 2003 (14.08.2003), see entire document.	37-67, 77, and 142-182 1, 26-33, 35, and 67	X — Y	US 6,214,560 B1 (YGUERABIDE et al.) 10 April 2001 (10.04.2001), see entire document.	2-25, 34, 36-66, 68-137, and 141-182 32-34, 67, 76, 104, and 171	X — Y	US 5,599,668 A (STIMPSON et al.) 04 February 1997 (04.02.1997), see entire document.	141 32-34, 67, 76, 104, and 171 141
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X, P — Y, P	WO 03/016910 A1 (VALKIRS et al.) 27 February 2003 (27.02.2003), see entire document.	1-36, 68-76, and 78-141															
X, P — Y, P	US 2003/0153014 A1 (SHEN et al.) 14 August 2003 (14.08.2003), see entire document.	37-67, 77, and 142-182 1, 26-33, 35, and 67															
X — Y	US 6,214,560 B1 (YGUERABIDE et al.) 10 April 2001 (10.04.2001), see entire document.	2-25, 34, 36-66, 68-137, and 141-182 32-34, 67, 76, 104, and 171															
X — Y	US 5,599,668 A (STIMPSON et al.) 04 February 1997 (04.02.1997), see entire document.	141 32-34, 67, 76, 104, and 171 141															
☒ 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 13 December 2004 (13.12.2004)		Date of mailing of the international search report 05 JAN 2005															
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 officer Gaifene R. Gabel <i>Gaifene R. Gabel</i> Telephone No. (571) 272-1600 <i>Don</i>															

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 10/603,891

(32)優先日 平成15年6月24日(2003.6.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 10/673,077

(32)優先日 平成15年9月26日(2003.9.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 10/714,078

(32)優先日 平成15年11月14日(2003.11.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ブシュラー, ケネス, エフ

アメリカ合衆国 9 2 0 6 7 カリフォルニア州 ランチョ サンタ フェ, ピー . オー . ボックス 7 7

(72)発明者 マイセル, アラン

アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州 デル マール, ピア ラ センダ 1 4 9 2 9

(72)発明者 アンダーバーグ, ジョセフ, マイケル

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州 エンシニタス, ドラージュ コート 4 7 0

(72)発明者 マクファーソン, ポール, エイチ

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州 エンシニタス, エルバ コート 1 4 4 9

(72)発明者 ダーレン, ジェフリー, アール

アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア州 サン ディエゴ, ケマートン ロード 1 0 5 5 5

(72)発明者 カーチック, ハワード, ジェイ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サン ディエゴ, パノラミック レーン 5 4 4 9

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006526140A5	公开(公告)日	2007-03-22
申请号	JP2005510072	申请日	2003-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
[标]发明人	ブシュラーケネスエフ マイセルアラン アンダーバーグジョセフマイケル マクファアソンポールエイチ ダーレンジェフリーアール カーチックハワードジェイ		
发明人	ブシュラー,ケネス,エフ マイセル,アラン アンダーバーグ,ジョセフ,マイケル マクファアソン,ポール,エイチ ダーレン,ジェフリー,アール カーチック,ハワード,ジェイ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6887 C12Q1/6883 G01N2333/4737 G01N2333/475 G01N2333/52 G01N2333/58 G01N2333/9123 G01N2333/96486 G01N2333/974 G01N2800/2871		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
优先权	60/436301 2002-12-24 US 10/330696 2002-12-27 US 10/371149 2003-02-20 US 10/603891 2003-06-24 US 10/673077 2003-09-26 US 10/714078 2003-11-14 US		
其他公开文献	JP2006526140A		

摘要(译)

本发明提供了用于鉴别和使用用于疾病和/或病症的鉴别诊断的诊断标志物的方法。在各个方面，本发明涉及能够确定一种，优选多种显示一种或多种相似或相同症状的疾病或病症的存在或不存在的方法和组合物。这样的方法和组合物可用于提供用于确定在临床环境中显示的一种或多种非特异性症状的疾病或病症的测定和测定装置。

