

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4751555号  
(P4751555)

(45) 発行日 平成23年8月17日(2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日(2011.5.27)

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

請求項の数 8 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2001-544031 (P2001-544031)	(73) 特許権者	506049655
(86) (22) 出願日	平成12年12月4日 (2000.12.4)		エレクトロフォレティックス リミテッド
(65) 公表番号	特表2003-516541 (P2003-516541A)		ELECTROPHORETICS LIMITED
(43) 公表日	平成15年5月13日 (2003.5.13)		イギリス国, KT11 3EP サリー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/012227		, コブハム, ダウンサイド ブリッジ ロード (番地なし), コーヴハム ハウス
(87) 国際公開番号	W02001/042793	(74) 代理人	100074099
(87) 国際公開日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		弁理士 大菅 義之
審査請求日	平成19年11月9日 (2007.11.9)	(72) 発明者	ホーホシュトラーサー, ドウニ フランソワ
(31) 優先権主張番号	9929140.3		スイス国 セーアッシュー1245 ジュネーヴ, コロンジューベルリヴ, シュマン ドゥ ラ サヴォニエール (番地なし)
(32) 優先日	平成11年12月10日 (1999.12.10)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳卒中のための診断アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脳卒中を罹患する疑いのある患者から採取された体液サンプルにおいて、脳卒中または脳卒中の可能性を分析するのに使用するための分析方法であって、

前記分析方法は、

前記サンプル中の心臓脂肪酸結合タンパク質 (H - F A B P) または脳脂肪酸結合タンパク質 (B - F A B P) の濃度を決定する工程と、

決定した濃度が、非脳卒中の患者から取得された体液のサンプルにおける濃度と比較して、増加していることを脳卒中の可能性を分析するための指標として用いる工程、を包含する、

分析方法。

【請求項 2】

前記決定した濃度が、非脳卒中の患者から取得された体液のサンプルにおける濃度と比較して増加している患者から、急性心筋梗塞 (A M I) に対する第 2 の分析の結果が陽性であった患者を除外する工程を、さらに含み、

ここで、前記濃度を決定する工程が、H - F A B P の濃度を決定する、請求項 1 に記載の分析方法。

【請求項 3】

A M I に対する前記第 2 の分析が、血漿、血液または血清中の、トロポニン - I またはクレアチンキナーゼ M B の濃度を決定する工程を包含する、請求項 2 に記載の分析方法。

10

20

## 【請求項 4】

H - F A B P に対する抗体が、H - F A B P に対する前記分析方法において使用される、請求項 1、2 または 3 に記載の分析方法。

## 【請求項 5】

ポリクローナル抗ヒト F A B P 抗体が、使用される、請求項 4 に記載の分析方法。

## 【請求項 6】

H - F A B P に対する前記分析方法が、サンドイッチ E L I S A を包含する、請求項 4 または 5 のいずれかに記載の分析方法。

## 【請求項 7】

B - F A B P または B - F A B P に対する抗体が、その組み合わせにおいて A M I に対する分析を用いなくて、使用される、請求項 1 に記載の分析方法。

10

## 【請求項 8】

H - F A B P または B - F A B P に対する前記分析方法が、血液サンプル、血清サンプル、または血漿サンプルにおいて実行される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の分析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、タンパク質またはそれに対する抗体を用いる診断アッセイの分野にある。

20

## 【0002】

(関連技術の説明)

脳卒中 (stroke) は、工業国において 3 番目に高い死亡率を持つ。これは、大脳の血流の恒久的な減少または一時的な減少のいずれか起因する。この血流の減少は、ほとんど場合、塞栓または局所的な血栓症のいずれかに起因する動脈の閉塞により生じる。脳の損傷の場所および壊死した神経細胞の強度に依存して、脳卒中 症状は、患者にとって生活上の障害となり得、そして脳卒中 が起こることによる死亡率は、30% に達する。

## 【0003】

近年、S100B が、脳卒中 の診断のための可能性のある生化学的マーカーとして記載されている (U. Missler ら、「S100 Protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarct volume and prognosis in acute ischemic stroke」、Stroke 1997; 28: 1956-60 を参照のこと)。しかし、S100B はまた、黒色腫の転移および脳損傷および心臓手術の由来する大脳の合併症の早期検出にとって有用なマーカーであると報告されている。したがって、S100 試験による感度および特異性は、それぞれ 44% および 67% に限定されている (M. Takahashi ら、「Rapid and sensitive immunoassay for the measurement of serum S100B using isoform-specific monoclonal antibody」、Clin. Chem. 1999; 45: 1307-11 を参照のこと)。新たな脳卒中 のマーカーを開発することは、臨床家が早期診断を達成するための助けとなり、従ってこの患者における潜在的な再発を回避するための助けとなる。

30

40

## 【0004】

(発明の要旨)

この度、驚くべきことに、心臓脂肪酸結合タンパク質 (H - F A B P) および脳脂肪酸結合タンパク質 (B - F A B P) のとして知られている、2 つの脂肪酸結合タンパク質 (F A B P) が、脳卒中 のマーカーであることが発見された。これにより、本発明は、脳卒中 または、脳卒中 に罹患していると疑われる患者から採取した体液サンプル中での脳卒中 の可能性についての診断アッセイの方法を提供し、この方法は、サンプル中の、心臓脂肪酸結合タンパク質または脳脂肪酸結合タンパク質 (H - F A B P または B - F A B P) の

50

濃度を決定する工程を包含する。このようにして決定された濃度を使用して、診断をするか、または診断をする補助をする。

【0005】

好都合なことに、この方法は、H - F A B PまたはB - F A B Pに対する抗体を用いて施行され、これにより、抗体とサンプル中の間のF A B Pの反応の程度がアッセイされ、そしてサンプル中のF A B Pの濃度と関連付けられる。

【0006】

本発明は、脳卒中に対する、高感度、高特異性、および施行された高い予測的な陽性値をもつアッセイを実行することを可能にする。「感度」とは、臨床的な試験により脳卒中であることが確認された患者から採取したサンプルに対するアッセイによって得られる、真陽性の百分率として定義される。これは、 $(\text{真陽性}) / (\text{真陽性} + \text{偽陰性}) \%$ として算出される。「特異性」は、コントロールサンプル(すなわち、臨床的な試験において、脳卒中であると示されなかった患者からのサンプル)において得られた、真陰性の百分率を意味する。これは、 $(\text{真陰性}) / (\text{偽陽性} + \text{真陰性}) \%$ として算出される。「予測的な陽性値」は、比率 $(\text{真陽性}) / (\text{真陽性} + \text{偽陽性}) \%$ を意味する。

【0007】

H - F A B Pは、急性心筋梗塞(A M I)の公知のマーカである(J . I s h i i r a、「Serum concentrations of myoglobin vs human heart-type cytoplasmic fatty-acid binding protein in early detection of acute myocardial infarction」、Clinical Chemistry 1997; 43 1372 - 1378を参照のこと)。それゆえ、脳卒中に対するH - F A B Pについてアッセイを用いて、より良い利点を得るためには、脳卒中に対する診断から、A M Iアッセイで陽性になった患者を取り除く目的で、A M Iに対する別の種類のアッセイ(マーカがF A B Pでないアッセイ)を施行することが所望される。

【0008】

従って、特定の実施形態では、上記で定義されたように、第一のアッセイでH - F A B Pの濃度を決定し、これにより陽性の結果が脳卒中または急性心筋梗塞のいずれかの可能性を示す工程を含み、そしてさらに、急性心筋梗塞(A M I)のみに対して、第二の診断アッセイを実施して、これにより、H - F A B Pアッセイで陽性の結果およびA M Iに対するアッセイで陰性の結果は、この患者が脳卒中に罹患している可能性を示す工程を含む、方法を、本発明は提供する。トロポニン - IおよびクレアチンキナーゼM B (C K - M B)を、急性心筋梗塞(A M I)の初期の生化学的マーカとして用いるアッセイは、周知であり、そして上記の目的について適切である。これらは、血漿、血清、または血液において、施行され得る。当然ながら、用語「第一に」、「第二に」とは、単なる便宜上の標記である：この2つのアッセイは、いずれの順序でも実行し得る。

【0009】

類似のH - F A B Pおよび、また、脳特異的な脂肪酸結合タンパク質(B - F A B P)は、マウスの脳内で見つがっている(P u r a、M o l e c u l a r a n d C e l l u l a r B i o c h e m i s t r y 1999; 198 69 - 78を参照のこと)。脳H - F A B P (B - F A B Pと混同しないように)は、心臓のH - F A B Pと、一つのアミノ酸残基置換だけ違うと考えられている。しかしながら、B - F A B Pは、相当に違っている。P . A . S e l l n e rらは、「Development role of fatty acid binding proteins in mouse brain」(Dev . B r a i n R e s . 1995年; 89 : 33 - 46)で、69%のDNA相同性であると見積もっており、一方、A . S c h r e i b e r rは、「Recombinant human heart-type fatty acid binding protein as standard in immunochemical assays」で64%のアミノ酸配列相同性であり、そしてヒトH - F A B Pに対するモノクローナル抗体が、わずか1 . 7%の程度で、ヒトB - F A B Pと交叉反発的であると述べている。

10

20

30

40

50

## 【0010】

本発明者がH-FABPが脳卒中のマーカーであることを見出した以上は、B-FABPもまた、マーカーであるとするのは、大変妥当な予測である。B-FABPは、脳組織にとって特異的であり、そしてH-FABPに対するモノクローナル抗体と有意に反応しないようなので、これは、AMIについて陽性を示さず、AMIに対する別のアッセイを不必要にする。

## 【0011】

(好ましい実施形態の説明)

アッセイの方法のために、サンプルは、患者の血液、血漿または血清から採取し得る。マーカーは、H-FABPまたはB-FABPであり、H-FABPについて特異的な抗体を用いて、そして抗原(H-FABPまたはB-FABP)/抗体相互作用の程度を測定し、好ましくはイムノアッセイにより、測定される。ヒト患者の診断について、抗体は、好ましくは、抗ヒトH-FABPまたはB-FABPである。同様に、患者が動物である場合、抗体は、同じ動物種のH-FABPまたはB-FABPに対するものであるべきである。例えば、患者がウマである場合は、抗ウマH-FABPまたは抗ウマB-FABPである。それが、モノクローナル抗体または操作された抗体であり得る。都合の良いことには、マウスの抗ヒト、抗ウマなどのモノクローナル抗体が使用される。H-FABPに対する抗体は公知であり、例えば、66E2および67D3(Roosら、「Monoclonal antibodies to human heart type fatty acid-binding protein」、J. Immunol. Methods 1995年; 183 149-153によって記載される)は、商業的に入手可能である。また、通常のKoehler-Milstein法を使用して、H-FABP抗体またはB-FABP抗体を惹起し得る。この目的のためのタンパク質の供給源は、天然由来、または組換えDNA調製タンパク質(DNA-prepared protein)であり得る。組換えヒトH-FABPおよびB-FABPは、A. Schreiber(前出)およびF. Simizuら(「Isolation and expression of cDNA for human brain fatty acid binding protein (B-FABP)」、Biochim. Biophys. Acta 1997; 1354: 24-28)により、それぞれ記載されている。より好ましくはないが、この抗体はポリクローナルであり得る。

## 【0012】

任意の公知なイムノアッセイの方法を使用し得る。サンドイッチアッセイが、好ましい。この方法にて、FABPに対する抗体(例えば、ポリクローナル)は、固相、例えば、プラスチックマイクロタイタープレートのウェルに結合し、そして検出されるべきサンプルとともにインキュベートされ、そしてH-FABPまたはB-FABPに特異的な、標識化した第二の抗体とともにインキュベートされる。あるいは、抗体捕捉アッセイ(antibody capture assay)(また、「間接アッセイ」とも呼ばれる)が、使用され得る。ここで、試験サンプルは固相に結合することを可能にされ、そして抗FABP抗体(ポリクローナルまたモノクローナル)が、ついで加えられ、結合が可能にされる。この状況でポリクローナル抗体が使用された場合、それは、望ましくは、FABPの他の形態に対して、低い交差反応性を提示する抗体であるべきである。結合していない物質を洗浄した後、固相に結合している抗体の量は、標識された第二の抗体を用いて、決定される。

## 【0013】

直接アッセイは、標識された抗FABP抗体を使用することにより、実施され得る。試験サンプルは、固相に結合することを可能にされ、そして抗FABP抗体が加えられる。結合していない物質を洗浄した後、固相に結合している抗体の量が、決定される。抗体は、第二の抗体を介するのではなく、直接的に標識化され得る。

## 【0014】

別の実施形態において、競合アッセイは、サンプルと、標識化されたFABPまたはそ

10

20

30

40

50

れらに由来するペプチドとの間で、実施され得、これら2つの抗原は固体支持体に結合している抗FABP抗体の限定された量に対して、競合関係にある。標識されたFABPまたはペプチドは、固相上の抗体とともにプレインキュベートされ、これにより、サンプル中のFABPは、抗体に結合しているFABPまたはそれらのペプチドの部分を置換える。

【0015】

さらに別の実施形態としては、2つの抗原は、抗体との単一の共インキュベーション (co-incubation) の中で競合することが可能である。結合していない抗原を、洗浄により、支持体から取り除いた後、支持体に結合している標識の量が決定され、そしてサンプル中のタンパク質の量が、事前に定めておいた標準滴定曲線を参照することにより、決定される。

10

【0016】

全体を通じて、この標識は、好ましくは、酵素である。この酵素に対する基質は、発色性、蛍光性、また化学発光性であり得る。あるいは、この標識は、放射性同位体または蛍光を発するものであり得、例えば、結合されたフルオレセインである。

【0017】

酵素は、好ましくはアルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼであり、そして都合の良いことには、酵素は比色分析的に使用され得、例えば、アルカリホスファターゼとともに、黄色形成基質としてp-ニトロフェニルリン酸塩を用いる。

【0018】

化学発光アッセイについては、この抗体は、アクリジニウムエステルまたは西洋ワサビペルオキシダーゼを用いて標識され得る。後者は、増強化学発光 (enhanced chemiluminescent) (ECL) アッセイとして使用される。ここで、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗体は、ルミノール、過酸化物質基質および、放出する光の強度および持続を増強する化合物 (代表的には、4-ヨードフェノールまたはオキシ桂皮酸) とともに化学発光反応に加わる。

20

【0019】

増幅されたイムノアッセイ、例えばイムノ-PCR (immuno-PCR) を使用し得る。この技術において、抗体はPCRプライマーを含む任意のDNAの分子に共有結合的に結合され、ここで抗体が結合するDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応により、増幅される。E. R. Hendricksonら、Nucleic Acid Research 1995; 23, 522-529 (1995) またはT. Sanoら、「Molecular Biology and Biotechnology」編、Robert A. Meyers、VCH Publishers, Inc. (1995)、頁458-460を参照のこと。このシグナルは前と同様に読み取られる。

30

【0020】

特に好ましい手順は、酵素結合免疫吸着定量法 (ELISA) が開発されて、H-FABPが検出できるようになった。H-FABPがAMIについても同様にマーカーであるので、トロポニン-IまたはCK-MBの濃度を、いずれの心臓に対する損傷も排除するために、アッセイした。実施例に記述されたように、これらのアッセイは、AMIおよび脳卒中に罹患してない22人の患者、AMIに罹患した20人の患者および脳卒中に罹患していることが確認された22人の患者から、医療センターに入院した後の4回にわたって、連続的な血漿サンプルの中で評価された。脳卒中における、H-FABPについての感度、特異性および予測的な陽性値は、それぞれ、59.1%、90.0%、および86.7%であった。22の脳卒中患者のうち一人だけが、H-FABPおよびトロポニン-Iの発現を上昇させた。従って、トロポニン-IアッセイまたはCK-MBアッセイを組み合わせた、H-FABP検出は、脳卒中診断または脳損傷の有用なマーカーを提供する。

40

【0021】

高速微粒子増強濁度分析イムノアッセイ (rapid microparticle -

50

enhanced turbidimetric immunoassay) はAMIの場合においてH-FABP用に関発されたのだが(M. Robertら「Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction」、Clin. Chem. 1998; 44: 1564-1567)、この使用は、劇的にアッセイの時間を減少させた。したがって、広範に使用されている臨床化学分析装置(例えば、M. Robertsら(前出)に記載されているような、Hoffmann-La Roche製のCOBAS<sup>TM</sup> MIRA Plus システム、または、Abbott Laboratories製のAxSYM<sup>TM</sup> システム)における全自動化は、可能であり、そして脳卒中中の日常的な臨床診断に適応されるはずである。

10

## 【0022】

H-FABPまたはB-FABPの濃度は、イムノアッセイの他の手段により測定され得る。例えば、このサンプルは2D-ゲル電気泳動を受け得、そしてこのFABPの量は、ゲルのデンストメトリスキャニングまたはそれからのプロットにより見積もられ得る。しかしながら、患者が迅速に処置されようとして高速で、アッセイを実行されることが所望される。

## 【0023】

以下の実施例は本発明を明示する。

20

## 【0024】

(実施例)

(材料および方法)

(患者)

研究群は、22名の年齢と性別を適合させたコントロール患者(コントロール群)、20名の確認されたAMI患者(AMI群)および22名の確認された脳卒中患者(脳卒中群)からなる。コントロール群は、14人の男性、平均年齢66歳、34~86歳の範囲および8人の女性、平均年齢63歳、51~81歳の範囲を含んだ。AMI群は、16人の男性、平均年齢65歳、29~90歳の範囲および4人の女性、平均年齢72歳、66~81歳の範囲を含んだ。脳卒中群は、14人の男性、平均年齢65歳、30~87歳の範囲および8人の女性、平均年齢64歳、51~85歳の範囲を含んだ。4つの血液サンプルを、入院後、脳卒中群の各患者から集めた( $t_0 = 0$ 時間;  $t_1 = 1$ 日;  $t_3 = 3$ 日;  $t_7 = 7$ 日)。血液サンプルを、乾燥ヘパリン含有チューブに採血した。4、1500gで、15分間の遠心分離後、血漿サンプルを、分析まで、 $-20^\circ\text{C}$ でアリコートとして保存した。脳卒中の診断を確認するために、脳卒中群からの患者は、神経内科医によって連続して臨床評価を受けた。AMI群からの患者は、慢性AMI(confirmed AMI)(トロポニン-I濃度 $> 2\text{ ng/ml}$ )で病院に入院した。臨床評価は、脳卒中およびAMIを除くために、コントロール群からのすべての患者において実行した。

30

## 【0025】

(脳および心臓H-FABPの測定)

40

H-FABPの濃度を、血漿において、サンドイッチELISAによって測定した。96ウェルポリスチレンマイクロプレート(NUNC)に、4、一晚、 $0.1\text{ M}$ 、 $\text{pH } 9.6$ 炭酸緩衝液中 $20.4\text{ ng/ml}$ のポリクローナルヤギ抗ヒト筋肉-FABP(Spectral Diagnosis BC, Ontario, USA)を $100\text{ }\mu\text{l}$ /ウェルでコートした。このプレートを、自動的に、BioRad NOVAPATH<sup>TM</sup> washerにおいて、 $\text{PBS}$ ( $15\text{ mM Na}_2\text{PO}_4 - 120\text{ mM NaCl} - 2.7\text{ mM KCl}$   $\text{pH } 7.4$ , Sigma)で洗浄した。すべての洗浄工程を、新しいPBSで行った。非特異的結合部位を、 $200\text{ }\mu\text{l}$ /ウェルで、炭酸緩衝液中2%カゼインで、37、2時間ブロッキングした。洗浄工程の後、サンプルを、 $100\text{ }\mu\text{l}$ /ウで2連にピペットで移した。このプレートを、37で2時間インキュベートした。洗浄工程の

50

後、振盪しながら室温 (R.T.) で、 $100\mu\text{l}$  / ウェルの、PBS 1% BSA 中  $0.3\text{ ng/ml}$  のマウス抗ヒト心臓 FABP (clone 66E2, HyCult Biotechnology BV, Uden, Netherlands) を、1時間インキュベートした。洗浄工程の後、PBS 中  $15\text{ ng/ml}$  のホスファターゼ標識化抗マウス免疫グロブリン (Dako, Denmark)  $100\mu\text{l}$  / ウェルを、室温で、振盪しながら1時間30分間インキュベートした。洗浄工程の後、 $50\mu\text{l}$  / ウェルのジエタノールアミン中ホスファターゼ基質、 $1.5\text{ mg/ml}$  のパラ-ニトロフェニルリン酸を、30分間インキュベートした。この反応を、 $100\mu\text{l}$  / ウェル 1M NaOH で止めた。発色を、 $405\text{ nm}$  の波長で、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。

## 【0026】

10

(CK-MB測定およびトロポニン-I測定)

AMIを、臨床評価およびトロポニン-I測定ならびにCK-MB測定によって診断した。サンプルを、 $1500\text{ g}$  で15分間遠心分離し、そして $-20^\circ\text{C}$  で保存した。血清CK-MB濃度および血清トロポニン-I濃度を、自動化化学分析機 AxSYM<sup>TM</sup> system (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) を用いた蛍光微小粒子酵素免疫アッセイ (fluorescent microparticle enzyme immunoassay) (MEIA) を使用して決定した。蛍光産生物の形成比は、サンプル中のトロポニン-Iの量に比例した。トロポニン-Iの検出限界は、 $0.3\mu\text{g/l}$  であった。CK-MB測定は、蛍光プローブの量に比例し、検出限界は、 $0.7\mu\text{g/l}$  であった。

20

## 【0027】

(統計的解析)

H-FABP濃度を、平均 $\pm$ SDとしてかまたはメジアンおよび四分位数間範囲としてかのいずれかとして、光学的濃度(OD)値で表現する。トロポニン-I濃度およびCK-MB濃度を、濃度単位( $\text{ng/ml}$ )で表現する。非母数マン-ホイットニーU検定(non-parametric Mann-Whitney U-test)を、使用して、群間の血漿H-FABP濃度、血清トロポニン-I濃度および血漿CK-MB濃度を比較した。PRISM<sup>TM</sup>ソフトウェアを使用して、ボックス/ホイッスカー(box/whisker)および散乱プロットを作成した。95%の信頼区間およびReceiver Operating Characteristic (ROC) 曲線 (Analyse-it<sup>TM</sup> software for Microsoft EXCEL<sup>TM</sup>により規定される)を、使用して、指標の差別的時点(discriminatory time point)を評価した。J.M. Murphyら、「Performance of screening and diagnostic tests」、Arch. Gen. Psychiatry 1987; 44: 550-555を参照のこと。

30

## 【0028】

単変量Z検定(univariate Z-test)を使用して、H-FABPのROC曲線下の面積と比較した。各時点での感度、特異性およびH-FABP濃度の推定陽性値における差異を評価した。 $P < 0.05$ を、統計学的有意と見なした。

## 【0029】

40

(結果)

(臨床的特徴)

脳卒中群の患者に、完全な臨床評価を与えた。虚血および出血を、コンピューター断層撮影(CT)走査ならびに大脳のIRM応答およびそれらの局在(データは示していない)の助けを借りて診断した。脳卒中の診断を、脳卒中群の各患者について確認した。傷害の型および局在は、H-FABP濃度(データは示していない)と関連しなかった。

## 【0030】

コントロール群の患者を、病院に入院させ、そして、脳卒中およびAMIを臨床評価によって除外した。

## 【0031】

50

AMI群の患者を、高トロポニン-Iレベル(>2 ng/ml)を有する慢性AMIで、病院に入院させた。

【0032】

アッセイの結果は、下の表1に示す。

【0033】

【表1】

表1

アッセイ型	コントロール群	AMI群	脳卒中群			
			0時間	1日	3日	7日
<b>H-FABP</b> メジアン (25-75%) OD, 405 nm 有意性	0.19 (0.14- 0.35)	2.65 (2.27- 2.86) ***	0.64 (0.28- 1.01) ***	0.46 (0.25- 0.98) **	0.37 (0.20- 0.76) ns	0.33 (0.18- 0.73) ns
<b>トロポニン-I</b> メジアン (25-75%) IU ng/ml 有意性	0 (0.0- 0.0)	50 (50- 359) **	0 (0.0- 0.3) ns	0 (0.0- 0.2) ns		
<b>CK-MB</b> メジアン (25-75%) IU ng/ml 有意性	1 (0.7- 0.12)	63 (27- 87.5) **	2.7 (1.35- 4.05) ns	1.6 (1.3- 3.3) ns		

有意性 : \*\*\* p<0.001  
\*\* p<0.01  
ns 無有意性

AMI群におけるH-FABP血漿濃度(OD測定)は、コントロール群(表1)におけるH-FABP血漿濃度(OD測定)より有意に高かった。AMI群は、2.65(2.27~2.86)のH-FABPメジアン濃度(範囲25~75%)を有し、一方で、コントロール群は、0.19(0.14~0.35)の濃度を有した。脳の急性的な現象が増大した後、H-FABP濃度は、時間とともに低下する。脳卒中群におけるH-FABPメジアン濃度(範囲25~75%)は、 $t_0$ (0.28~1.01)では0.64、 $t_1$ (0.25~0.98)では0.46、 $t_3$ (0.20~0.76)では0.37および $t_7$ (0.18~0.73)では0.33であった。いくつかの重複が、偽陰性の存在により脳卒中群とコントロール群との四分位数間範囲の間に存在する。H-FABP濃度分布は、図の散乱プロットによって視覚化された。Receiver Operating Curveプロットを、異なる時間(すなわち、患者の入院時および入院後1日目、3日目および7日目において)における特異性に対する感度から作成した。ROC曲線を用いて、感度および特異性の最適化し、そしてH-FABP濃度を示す、光学濃度の単位における適切なカットオフ値を選択することにより感度および特異性の合計を最大化し、このプロットは、患者のこの群に対する最高の感度および特異性が、OD0.53のカットオフ

10

20

30

40

50

値で、患者の入院時に得られたことを示した。これらの条件下で、H-FABP濃度の感度、特異性および推定陽性値は、それぞれ、59.1%、90.9%および86.7%であった。入院時におけるROC曲線と入院時以後の時間において作成されたROC曲線との間の比較は、入院時に得られた感度値および特異性値を越える感度および特異性値の増大を全く示さなかった。

【0034】

AMI群とコントロール群と間のH-FABP濃度における差異を確認するために、CK-MBおよびトロポニン-Iをアッセイした。さらに、AMIと脳卒中を区別するために、これらをまた、脳卒中サンプルにおいてアッセイした。トロポニン-I濃度およびCK-MB濃度を、各群において測定した。AMI群におけるトロポニン-I濃度およびCK-MB濃度は、コントロール群より有意に( $P > 0.01$ )高かった。コントロール群と脳卒中群との間で、これら指標の濃度の有意差は、見られなかった。アボット(ABBOTT)研究所は、AMI診断に対するASYM<sup>TM</sup>トロポニン-IアッセイおよびASYM<sup>TM</sup>CK-MBアッセイを使用した予想値を、それぞれ、カットオフ値2ng/mlおよびカットオフ値9.3ng/mlと決めることを示した。コントロール群に対して予想されるCK-MB値は、3.8ng/mlまでである。トロポニン-I濃度 $> 2$ ng/mlで、MEIAトロポニン-Iアッセイの感度および特異性は、 $t_1$ で、それぞれ、93.3%および94.4%であった。血漿におけるメジアントロポニン-I濃度およびメジアンCK-MB濃度(25%~75%)を、計算し、そして表1に示す。

【0035】

【表2】

表2. アッセイの評価の要約

表2

群	コントロール	AMI	脳卒中
No. samples	22	20	22
H-FABP (OD)			
0.531 より大きい	2	20	13
0.531 以下	20	0	9
トロポニン-I & CK-MB			
AMI診断		20	1
AMIを有しない			6
心筋の苦痛			
臨床既往歴			
脳卒中診断			22
てんかん	1		
骨折	2		

コントロール群において、2名の偽陰性を、検出した。H-FABPを、 $t_0$ で増加した(表2)。偽陰性のうちの1名は、健康的と心筋の苦痛(3.8ng/ml)との間の境界におけるトロポニン-I濃度およびCK-MB濃度を有し、このことは、この人は、心筋欠損AMI(myocardial muscle lacking)を被っているはずであることを示す)。確かに、偽陰性のうちの1つは、癲癇を有し、両方ともに幾つかの骨折を被った。脳卒中群において、13名の真陽性を検出した(10名は虚血を有し、そして3名は出血を有した)。高H-FABP濃度を測定し、そして脳卒中の診断を確認

した。健康的なトロポニン - I 濃度および C K - M B 濃度を測定し、そして 1 名の患者を除いて、A M I 診断の除外を可能にした。この例外に関して、臨床評価は、心筋の苦痛を検出せず、そして A M I に対するトロポニン - I 濃度と関連しなかった。測定された H - F A B P は、脳の苦痛と心筋の苦痛との間の区別を可能にしなかった。脳卒中群において、9 名の偽陰性を、低 H - F A B P レベルで、検出した（6 名は虚血を有し、そして 3 名は出血を有した）。これらの症例については、説明がつかなかった。低 H - F A B P 濃度と臨床評価との間の相関性は、見つけられなかった。

#### 【 0 0 3 6 】

（考察）

上記の結果は、H - F A B P が、脳卒中の診断のための潜在的なマーカーであることを示す。H - F A B P が、数年前、急性心筋梗塞のマーカーとして存在していたので、脳卒中および A M I は、例えばトロポニン - I または C K - M B といった別の A M I の生化学的マーカーによって区別されるべきであった。脳卒中患者に対する A M I の区別後、血清 H - F A B P 濃度は、脳卒中の特異的なマーカーとして使用され得た。

#### 【 0 0 3 7 】

入院で、H - F A B P アッセイにより、それぞれ、59.1%、90.9% および 86.7% の感度、特異性および推定陽性値 ( O D 測定 > 0.531 ) が可能になった。これらの値は、脳卒中の検出のための S 1 0 0 B タンパク質の値より有意に高かった。脳卒中のための S 1 0 0 B アッセイの感度および特異性は、それぞれ、44% および 67% であった。S 1 0 0 B 分析の利点は、3 時間未満の素早いイムノアッセイの開発であった。しかし、S 1 0 0 B の特異性は、脳卒中に限られず、黒色腫の転移、頭部傷害からの大脳の合併症および心臓の外科手術をも含んだ。血流における H - F A B P の速度論を、慢性脳卒中の各患者に対する入院後の臨床的なスクリーニングの 4 つの異なる時点で (  $t_0$  ( 0 時間 )、 $t_1$  ( 1 日 )、 $t_3$  ( 3 日 ) および  $t_7$  ( 7 日 ) ) の H - F A B P の測定によって研究した。最大 H - F A B P 濃度は、主に  $t_0$  で観察された。H - F A B P 濃度は、 $t_1$  で高いままであったので、脳での発症と入院との間の変動時間は、結果に干渉しなかった。R O C 曲線面積は、 $t_3$  および  $t_7$  と比較して、 $t_0$  および  $t_1$  において、より高い H - F A B P 濃度と確認された。このアッセイの最もよい特徴 ( 感度、特異性 ) は、 $t_0$  において得られた。

#### 【 0 0 3 8 】

急性心筋梗塞を、例えば、心臓のトロポニン - I、クレアチン - キナーゼ M B、ミオグロブリンおよび最近では、H - F A B P アッセイといった生化学的マーカーアッセイの助けを借りて診断する。H - F A B P 濃度は、A M I を示したので、A M I と 脳卒中 との間の区別は、別の A M I マーカーの使用によって行った。

#### 【 0 0 3 9 】

トロポニン - I は、A M I または虚血傷害の初期マーカーである ( A M I 後、数日間、上昇したままという利点を有する )。遊離されたトロポニン - I の濃度は、入院後、12 ~ 24 時間で最大に達するので、脳卒中群を、 $t_0$  および  $t_1$  で分析した。A M I 群におけるトロポニン - I 濃度は、2 n g / m l のカットオフ値より有意に高かった。大部分の 脳卒中群の患者は、カットオフ値より下の正常トロポニン - I 濃度を示した。これは、1 名の患者を除いて、この研究の A M I 患者を除外した。彼の臨床評価は、全く心筋の苦痛を診断せず、そしてこれは、彼のトロポニン - I 濃度と関連しなかった。この 1 症例において、H - F A B P 測定は、脳の苦痛と心筋の苦痛との間の区別を可能にしなかった。

#### 【 0 0 4 0 】

並行して、血漿におけるクレアチンキナーゼ M B の濃度を、各患者について測定した。このマーカーにより、任意の筋肉の苦痛の型が検出されるので、トロポニン - I よりあまり特異的ではない。兆候の発症後、2 時間と 6 時間との間に始まる場合、C K - M B は、血流に遊離され、そして血中での C K - M B の濃度は、兆候の発症後、18 時間までに上昇する。徴候の発生後、約 2 日間まで、高い濃度のままであり、その後正常にまで低下する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 1 】

コントロール群において、2名の偽陰性を検出した。偽陰性のうち1名は、脳卒中に干渉しない癲癇を有した。両方ともに、床への倒れこみそして大腿および足を骨折した。増加したCK-MBは、H-FABPの増加と非常に相関した。癲癇は、H-FABPレベルの上昇で説明し得た。H-FABPは、CK-MBアッセイと98.6%の相関を可能にした。トロポニン-Iは、これら偽陰性の検出が可能でなかったため、トロポニン-I測定およびH-FABP測定は、95.3%の相関を与えた。

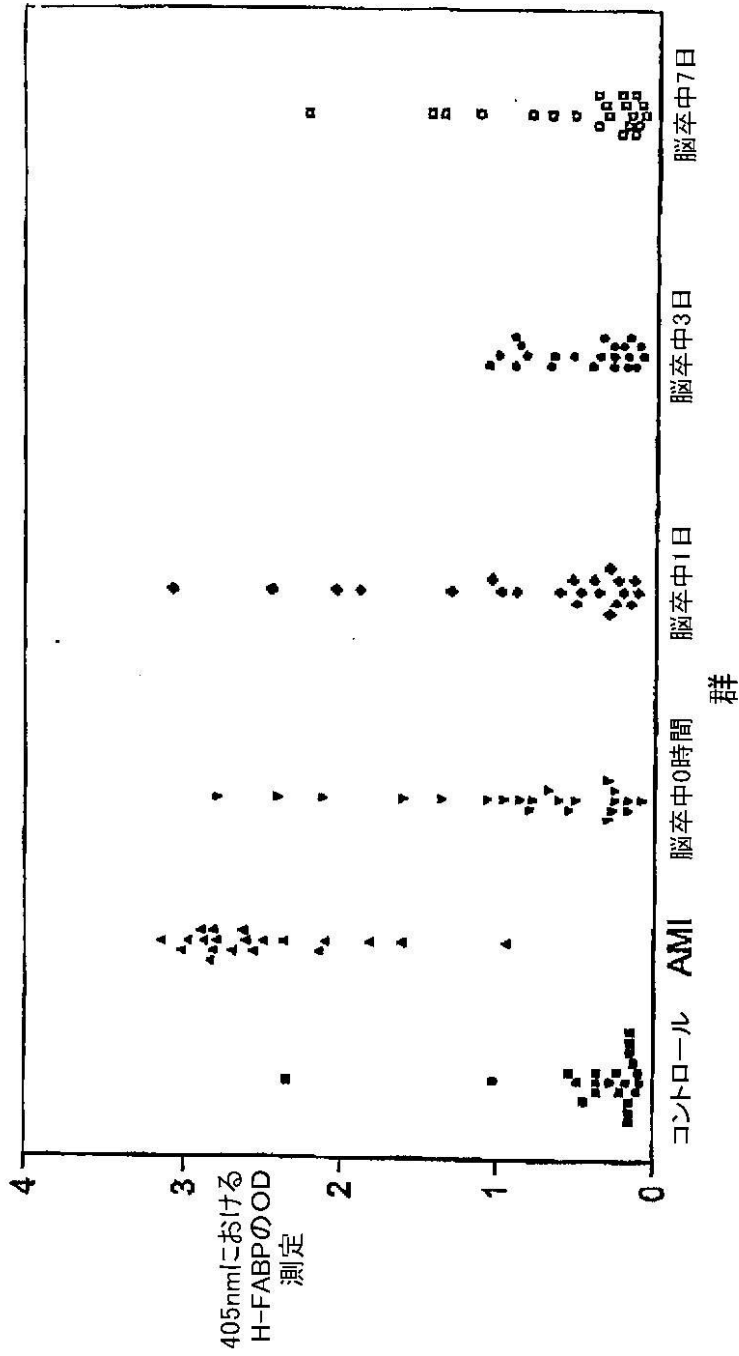
## 【 0 0 4 2 】

上記に引用された各刊行物は、本明細書中に対して信頼される範囲まで、参考として本明細書中に援用される。

## 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 が、唯一の図あり、405 nmの光学密度測定で示したHFBP濃度をy軸としてグラフ表示しており、これは本発明の方法によって以下について、入院後4回（0時間、1日、3日、7日）、決定された：（a）脳卒中もAMIにも罹患していないコントロール群、（b）AMIに罹患している群、および（c）脳卒中の群。

【 図 1 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 サンチェ, ジャン - シャルル  
スイス国 セーアッシュ - 1208 ジュネーヴ, シュマン フランク - トマス 42
- (72)発明者 ツィンマーマン, カトゥリーヌ ガブリエル  
スイス国 セーアッシュ - 1207 ジュネーヴ, リュ モノワール 48

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特開平04 - 031762 (JP, A)  
国際公開第98 / 043630 (WO, A1)  
特開平04 - 258765 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/53  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	中风 的诊断分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP4751555B2</a>	公开(公告)日	2011-08-17
申请号	JP2001544031	申请日	2000-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	单威赛引用和日内瓦		
申请(专利权)人(译)	Université de Geneve 酒店		
当前申请(专利权)人(译)	电Foret的 株式会社		
[标]发明人	ホーホシュトラーサー ドウニフランソワ サンチェジャンシャルル ツインマーマンカトゥリーヌガブリエル		
发明人	ホーホシュトラーサー, ドウニフランソワ サンチェ, ジャン-シャルル ツインマーマン, カトゥリーヌガブリエル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/2871 G01N2800/324 Y10S435/97 Y10S435/973 Y10S436/811 Y10T436/104165 Y10T436/105831 Y10T436/106664		
FI分类号	G01N33/53.D		
优先权	1999029140 1999-12-10 GB		
其他公开文献	JP2003516541A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

心脏和脑脂肪酸结合蛋白 ( H-FABP , B-FABP ) 是中风的标志物。本发明提供了这些标志物中的任一种的诊断测定，优选通过使用抗H-FABP或B-FABP抗体的ELISA进行。由于H-FABP也是急性心肌梗塞 ( AMI ) 的标志物，因此要区分中风和AMI需要特异于AMI的测定，例如，AMI。使用肌钙蛋白-I或肌酸激酶-MB作为标记物，也可以进行。

表1

アッセイ型	コントロール群	AMI群	脳卒中群			
			0時間	1日	3日	7日
<b>H-FABP</b>						
メジアン (25-75%) OD, 405 nm	0.19 (0.14-0.35)	2.65 (2.27-2.86)	0.64 (0.28-1.01)	0.46 (0.25-0.98)	0.37 (0.20-0.76)	0.33 (0.18-0.73)
有意性		***	***	**	ns	ns
<b>トロポニン-I</b>						
メジアン (25-75%) IU ng/ml	0 (0.0-0.0)	50 (50-359)	0 (0.0-0.3)	0 (0.0-0.2)		
有意性		**	ns	ns		
<b>CK-MB</b>						
メジアン (25-75%) IU ng/ml	1 (0.7-0.12)	63 (27-87.5)	2.7 (1.35-4.05)	1.6 (1.3-3.3)		
有意性		**	ns	ns		