

(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2007-518062
(P2007-518062A)

(43) 公表日 平成19年7月5日(2007.7.5)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D	4 H O 4 5
CO 7 K 14/47	(2006.01)	GO 1 N 33/53	X	
		GO 1 N 33/53	P	
		CO 7 K 14/47		

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 84 頁)

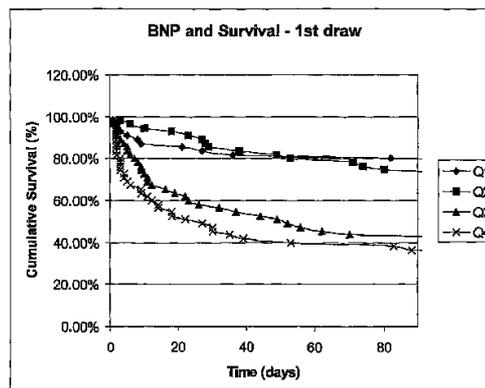
(21) 出願番号	特願2006-528307 (P2006-528307)	(71) 出願人	500204577 バイオサイト インコーポレイテッド アメリカ合衆国92121カリフォルニア 州サンディエゴ、サマーズ・リッジ・ロー ド9975番
(86) (22) 出願日	平成16年9月27日 (2004.9.27)	(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(85) 翻訳文提出日	平成18年4月27日 (2006.4.27)	(74) 代理人	100106840 弁理士 森田 耕司
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/031769	(74) 代理人	100105991 弁理士 田中 玲子
(87) 国際公開番号	W02005/033327	(74) 代理人	100114465 弁理士 北野 健
(87) 国際公開日	平成17年4月14日 (2005.4.14)		
(31) 優先権主張番号	60/507, 113		
(32) 優先日	平成15年9月29日 (2003.9.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/532, 777		
(32) 優先日	平成15年12月23日 (2003.12.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/558, 945		
(32) 優先日	平成16年4月2日 (2004.4.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症を診断する方法および診断するための組成物

(57) 【要約】

本発明は、被験体の症状に基づく鑑別診断、予後、および治療計画を決定するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、SIRSを含めるか除外するか、または敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを互いから、および/または非感染性SIRSから区別するための方法および組成物に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体の S I R S の原因を区別する方法であって、

前記被験体由来の試料について検定方法を実施し、前記検定方法は、血圧制御に関連したマーカー、炎症に関連したマーカー、並びに凝固および止血に関連したマーカーからなる群から独立して選択される被験体由来の複数のマーカーの存在または量に関連した複数の検出可能な信号を提供し、そして

前記検定方法から得られた信号を前記被験体における感染の有無と相関づけ、ここで、感染があるときは前記被験体が敗血症に罹患しているか、重症の敗血症に罹患しているか敗血症ショックに罹患しているのかが特定される、
の各工程を含む方法。

10

【請求項 2】

前記方法が、さらに、前記検定方法から得られた信号を、敗血症と重症の敗血症または敗血症ショックとの区別に相関づけることを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記方法が、さらに、前記検定方法から得られた信号を、敗血症または重症の敗血症と敗血症ショックとの区別に相関づけることを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記相関づける工程が、被験体由来の前記複数のマーカーの各々の濃度を測定する工程、および敗血症、重症の敗血症または敗血症ショックの有無の指標である閾値レベルに対して各マーカー濃度を個別に比較する工程を含む請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記相関づける工程が、被験体由来の前記複数のマーカーの各々の濃度を測定する工程、被験体由来の前記複数のマーカーの各々の濃度に基づいて単一パネル応答値を計算する工程、および敗血症、重症の敗血症または敗血症ショックの有無の指標である閾値レベルに対して前記指標値を比較する工程を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記複数のマーカーが、血圧制御に関連した少なくとも 1 つのマーカーおよび炎症に関連した少なくとも 1 つのマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記複数のマーカーが、血圧調節に関連した少なくとも 1 つのマーカー、および凝固および止血に関連した少なくとも 1 つのマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記複数のマーカーが、血圧調節に関連した少なくとも 1 つのマーカー、炎症に関連した少なくとも 1 つのマーカー、および凝固と止血とに関連した少なくとも 1 つのマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料がヒトに由来する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料が血液、血清および血漿からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記検定方法が免疫検定方法である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

被験体由来の前記複数のマーカーが、心房性ナトリウム利尿因子、B 型心房性ナトリウム利尿ペプチドからなる群から選択される血圧調節に関連した 1 つ以上のマーカー、B 型心房性ナトリウム利尿ペプチド、C 型心房性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、およびウロジラチンに関連したマーカー、またはこれらに関

50

連したマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

被験体由来の前記複数のマーカーが、急性期反応物、血管細胞接着分子、細胞間接着分子 - 1、細胞間接着分子 - 2、細胞間接着分子 - 3、C - 反応性蛋白質、HMG - 1、IL - 1、IL - 6、IL - 8、インターロイキン - 1 受容体作動薬、単球走化性蛋白質 - 1、カスパーゼ - 3、リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素、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、腫瘍壊死因子、フィブロネクチン、マクロファージ遊走阻止因子、および血管内皮増殖因子、からなる群から選択される炎症に関連した 1 つ以上のマーカー、またはこれらに関連したマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

被験体由来の前記複数のマーカーが、ヘプシジン、HSP - 60、HSP - 65、HSP - 70、S - FAS リガンド、不斉ジメチルアルギニン、マトリックス・メタロプロテイン 11, 3 および 9、デフェンシン HBD 1、デフェンシン HBD 2、血清アミロイド A、酸化 LDL、インスリン様増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インター - 阻害剤、e - セレクチン、グルタチオン - S - 転移酵素、低酸素症誘導因子 - 1、誘導酸化窒素合成酵素、細胞内接着分子、乳酸塩脱水素酵素、単球遊走ペプチド - 1、n - アセチルアスパルテート、プロスタグランジン E2、核因子リガンドの受容体アクチベータ、TNF 受容体スーパーファミリー・メンバー 1 A、およびシスタチン C からなる群から選択される 1 つ以上の急性期反応物、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項 1 3 に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

被験体由来の前記複数のマーカーが、プラスミン、フィブリノーゲン、D - ダイマー、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、血小板誘導増殖因子、プロトロンビン・フラグメント 1 + 2、プラスミン - 2 - 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、トロンピン、フォンビレブラント因子、組織因子、および血栓前駆体蛋白質からなる群から選択される凝固および止血に関連した 1 つ以上のマーカー、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRP、HMG - 1、カスパーゼ - 3、クレアチンキナーゼ - BB、MMP - 9、IL - 1、IL - 1ra、IL - 6、IL - 8、TNF、MIF、MCP - 1、BNP、CNP、pro - BNP、pro - CNP、NT - pro - BNP、組織因子、フォンビレブラント因子、vWF - A1、vWF - インテグリン結合ドメイン、および vWF - A3 からなる群から選択される 1 つ以上のマーカー、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 1 7】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRP、HMG - 1、カスパーゼ - 3、クレアチンキナーゼ - BB、MMP - 9、IL - 1、IL - 1ra、IL - 6、IL - 8、TNF、MIF、MCP - 1、BNP、CNP、pro - BNP、pro - CNP、NT - pro - BNP、組織因子、フォンビレブラント因子、vWF - A1、vWF - インテグリン結合ドメイン、および vWF - A3、またはそれらに関連したマーカーからなる群から選択される請求項 1 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 8】

被験体由来の前記複数のマーカーが、BNP または BNP に関連したマーカーを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRP、HMG - 1、HSP - 60、IL - 1ra、インターロイキン、組織因子、TNF、MCP - 1 からなる群から選択される 1 つ以上のマーカー、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項 1 8 に記載の方法。

50

【請求項 20】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRPまたは免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

被験体由来の前記複数のマーカーが、IL-1raまたは免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

被験体由来の前記複数のマーカーが、インターロイキンまたは免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

被験体由来の前記複数のマーカーが、組織因子または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 24】

被験体由来の前記複数のマーカーが、TNF- または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 25】

被験体由来の前記複数のマーカーが、MCP-1または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 26】

被験体由来の前記複数のマーカーが、HMG-1または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 27】

被験体の敗血症を診断する方法であって、

前記被験体由来の試料について検定方法を実施し、前記検定方法は、血圧制御に関連したマーカー、炎症に関連したマーカー、並びに凝固と止血とに関連したマーカーからなる群から独立して選択される被験体由来の複数のマーカーの存在または量に関連した複数の検出可能な信号を提供し、そして

前記検定方法から得られた信号を前記被験体における敗血症の有無と関連づける、の各工程を含む方法。

【請求項 28】

SIRSを罹患しているか、罹患していると考えられている被験体の転帰のリスクを判定する方法であって、

前記被験体由来の試料について検定方法を実施し、前記検定方法は、血圧調節に関連した1つ以上のマーカーの存在または量に関連した複数の検出可能な信号を提供し、そして前記検定方法から得られた信号を前記被験体における前記転帰のリスクの有無と関連づける、

の各工程を含む方法。

【請求項 29】

SIRSを罹患しているか、罹患していると考えられている前記被験体が、敗血症と診断されるか、敗血症の罹患が疑わしいとされる請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

SIRSを罹患しているか、罹患していると考えられている前記被験体が、重症の敗血症および敗血症ショックと診断されるか、重症の敗血症および敗血症ショックの罹患が疑わしいとされる請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

SIRSを罹患しているか、罹患していると考えられている前記被験体が、敗血症ショックと診断されるか、敗血症ショックの罹患が疑わしいとされる請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記関連づける工程が、血圧調節に関連した1つ以上の前記マーカーの濃度（単数また

10

20

30

40

50

は複数)を測定する工程、および前記濃度(単数または複数)を前記転帰のリスクの指標である閾値レベルと比較する工程を含む請求項28に記載の方法。

【請求項33】

血圧調節に関連した前記1つ以上のマーカーが、心房性ナトリウム利尿因子、B型心房性ナトリウム利尿ペプチドからなる群から選択される1つ以上のマーカー、B型心房性ナトリウム利尿ペプチド、C型心房性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、アンギオテンシンI、アンギオテンシンII、アンギオテンシン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に関連したマーカー、またはこれらに関連したマーカーを含む請求項28に記載の方法。 10

【請求項34】

血圧調節に関連した前記1つ以上のマーカーが、BNPまたはそれに関連したマーカーを含む請求項28に記載の方法。

【請求項35】

血圧調節に関連した前記1つ以上のマーカーが、NT-proBNPを含む請求項32に記載の方法。

【請求項36】

前記試料がヒトに由来する請求項28に記載の方法。

【請求項37】

前記試料が血液、血清および血漿からなる群から選択される請求項28に記載の方法。 20

【請求項38】

前記検定方法が免疫検定方法である請求項28に記載の方法。

【請求項39】

前記方法が、BNPまたはそれに関連したマーカーの濃度を前記転帰のリスクに相関づけることを含む請求項28に記載の方法。

【請求項40】

前記転帰のリスクが死亡のリスクである請求項28に記載の方法。

【請求項41】

前記転帰のリスクに基づく前記被験体の処置計画の選択をさらに含む請求項28に記載の方法。 30

【請求項42】

前記相関づける工程が、血圧調節に関連した1つ以上のマーカーの濃度および少なくとも1つの他の被験体由来のマーカーの濃度を前記転帰のリスクに相関づけることを含む請求項28に記載の方法。

【請求項43】

前記少なくとも1つの他の被験体由来のマーカーが、急性期反応物、血管細胞接着分子、細胞間接着分子-1、細胞間接着分子-2、細胞間接着分子-3、C-反応性蛋白質、HMG-1、IL-1、IL-6、IL-8、インターロイキン-1受容体作動薬、単球走化性蛋白質-1、カスパーゼ-3、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素、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、腫瘍壊死因子、フィブロネクチン、マクロファージ遊走阻止因子、および血管内皮増殖因子前記少なくとも1つのからなる群から選択される炎症に関連した1つ以上のマーカー、またはこれらに関連したマーカーを含む請求項42に記載の方法。 40

【請求項44】

前記少なくとも1つの他の被験体由来のマーカーが、ヘプシジン、HSP-60、HSP-65、HSP-70、S-FASリガンド、不斉ジメチルアルギニン、マトリックスメタロプロテイン11,3および9、デフェンシンHBD1、デフェンシンHBD2、血清アミロイドA、酸化LDL、インスリン様増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インター-阻害剤、e-セレクチン、グルタチオン-S-転移酵素、低酸素症誘 50

導因子 - 1、誘導酸化窒素合成酵素、細胞内接着分子、乳酸塩脱水素酵素、単球遊走ペプチド - 1、n - アセチルアスパルテート、プロスタグランジン E 2、核因子のリガンド受容体アクチベータ、TNF 受容体スーパーファミリー・メンバー 1 A、およびシスタチン C からなる群から選択される 1 つ以上の急性期反応物、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記少なくとも 1 つの他の被験体由来のマーカーが、プラスミン、フィブリノーゲン、D - ダイマー、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、血小板誘導増殖因子、プロトロンビン・フラグメント 1 + 2、プラスミン - 2 - 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、フォンビレプラント因子、組織因子、および血栓前駆体蛋白質からなる群から選択される凝固と止血とに関連した 1 つ以上のマーカー、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項 4 2 に記載の方法。

10

【請求項 4 6】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRP、HMG - 1、カスパーゼ - 3、クレアチンキナーゼ - BB、MMP - 9、IL - 1、IL - 1ra、IL - 6、IL - 8、TNF、MIF、MCP - 1、BNP、CNP、pro - BNP、pro - CNP、NT - pro - BNP、組織因子、フォンビレプラント因子、vWF - A1、vWF - インテグリン結合ドメイン、および vWF - A3 からなる群またはそれらに関連したマーカーから選択される請求項 4 2 に記載の方法。

20

【請求項 4 7】

SIRS と診断された被験体に予後を割り当てる方法であって、

前記被験体由来の試料について検定方法を実施し、前記検定方法は、血圧制御に関連したマーカー、炎症に関連したマーカー、および凝固と止血とに関連したマーカーからなる群から独立して選択される被験体由来の複数のマーカーの存在または量に関連した複数の検出可能な信号を提供し、そして

前記検定法から得られた信号を前記被験体における将来の転帰に対する傾向に相関づける、

の各工程を含む方法。

【請求項 4 8】

SIRS と診断された前記被験体が、敗血症、重症の敗血症または敗血症ショックと診断される請求項 4 7 に記載の方法。

30

【請求項 4 9】

SIRS と診断された前記被験体が、敗血症と診断される請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記相関づける工程が、被験体由来の前記複数のマーカーの各々の濃度を測定する工程、および各マーカー濃度を前記被験体における将来の転帰に対する傾向の指標である閾値レベルと個別に比較する工程を含む請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記相関づける工程が、被験体由来の前記複数のマーカーの各々の濃度を測定する工程、被験体由来の前記複数のマーカーの各々の濃度に基づいて単一パネル応答値を計算する工程、および前記指標値を前記被験体における将来の転帰に対する傾向の指標である閾値レベルと比較する工程を含む請求項 4 7 に記載の方法。

40

【請求項 5 2】

前記複数のマーカーが、血圧調節に関連した少なくとも 1 つのマーカー、および炎症に関連した少なくとも 1 つのマーカーを含む請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記複数のマーカーが、血圧調節に関連した少なくとも 1 つのマーカー、および凝固と止血とに関連した少なくとも 1 つのマーカーを含む請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 4】

50

前記複数のマーカーが、炎症に関連した少なくとも2つのマーカーを含む請求項47に記載の方法。

【請求項55】

前記試料がヒトに由来する請求項47に記載の方法。

【請求項56】

前記試料が血液、血清および血漿からなる群から選択される請求項47に記載の方法。

【請求項57】

前記検定方法が免疫検定方法である請求項47に記載の方法。

【請求項58】

被験体由来の前記複数のマーカーが、心房性ナトリウム利尿因子、B型心房性ナトリウム利尿ペプチドからなる群から選択される血压調節に関連した1つ以上のマーカー、B型心房性ナトリウム利尿ペプチド、C型心房性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に関連したマーカー、またはこれらに関連したマーカーを含む請求項47に記載の方法。 10

【請求項59】

被験体由来の前記複数のマーカーが、急性期反応物、血管細胞接着分子、細胞間接着分子-1、細胞間接着分子-2、細胞間接着分子-3、C-反応性蛋白質、HMG-1、IL-1、IL-6、IL-8、インターロイキン-1受容体作動薬、単球走化性蛋白質-1、カスパーゼ-3、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素、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、腫瘍壊死因子、フィブロネクチン、マクロファージ遊走阻止因子、および血管内皮増殖因子からなる群から選択される炎症に関連した1つ以上のマーカー、またはこれらに関連したマーカーを含む請求項47に記載の方法。 20

【請求項60】

被験体由来の前記複数のマーカーが、ヘプシジン、HSP-60、HSP-65、HSP-70、S-FASリガンド、不斉ジメチルアルギニン、マトリックス・メタロプロテイン11、3および9、デフェンシンHBD1、デフェンシンHBD2、血清アミロイドA、酸化LDL、インスリン様増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インター-阻害剤、e-セレクチン、グルタチオン-S-転移酵素、低酸素症誘導因子-1、誘導酸化窒素合成酵素、細胞内接着分子、乳酸塩脱水素酵素、単球遊走ペプチド-1、n-アセチルアスパルテート、プロスタグランジンE2、核因子リガンドの受容体アクチベータ、TNF受容体スーパーファミリーメンバー1A、およびシスタチンCからなる群から選択される1つ以上の急性期反応物、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項59に記載の方法。 30

【請求項61】

被験体由来の前記複数のマーカーが、プラスミン、フィブリノーゲン、D-ダイマー、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、血小板誘導増殖因子、プロトロンビン・フラグメント1+2、プラスミン-2-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、フォンビレブラント因子、組織因子、および血栓前駆体蛋白質からなる群から選択される凝固と止血とに関連した1つ以上のマーカー、またはそれらに関連したマーカーを含む請求項47に記載の方法。 40

【請求項62】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRP、HMG-1、カスパーゼ-3、クレアチンキナーゼ-BB、MMP-9、IL-1、IL-1ra、IL-6、IL-8、TNF、MIF、MCP-1、BNP、CNP、pro-BNP、pro-CNP、NT-pro-BNP、組織因子、フォンビレブラント因子、vWF-A1、vWF-インテグ 50

リン結合ドメイン、およびvWF-A3からなる群から選択される1つ以上のマーカーまたはそれらに関連したマーカーを含む請求項47に記載の方法。

【請求項63】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRP、HMG-1、カスパーゼ-3、クレアチンキナーゼ-BB、MMP-9、IL-1、IL-1ra、IL-6、IL-8、TNF、MIF、MCP-1、BNP、CNP、pro-BNP、pro-CNP、NT-pro-BNP、組織因子、フォンビレブラント因子、vWF-A1、vWF-インテグリン結合ドメイン、およびvWF-A3、またはそれらに関連したマーカーからなる群から選択される、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

被験体由来の前記複数のマーカーが、BNPまたはBNPに関連したマーカーを含む請求項47に記載の方法。

10

【請求項65】

被験体由来の前記複数のマーカーが、CRP、HMG-1、HSP-60、IL-1ra、IL-1、IL-8、組織因子、TNF、およびMCP-1からなる群から選択される1つ以上のマーカー、またはそれらに関連したマーカーをさらに含む請求項64に記載の方法。

【請求項66】

被験体由来の前記複数のマーカーが、IL-8または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

20

【請求項67】

被験体由来の前記複数のマーカーが、IL-1raまたは免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

【請求項68】

被験体由来の前記複数のマーカーが、IL-1または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

【請求項69】

被験体由来の前記複数のマーカーが、組織因子または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

【請求項70】

被験体由来の前記複数のマーカーが、TNFまたは免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

30

【請求項71】

被験体由来の前記複数のマーカーが、MCP-1または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

【請求項72】

被験体由来の前記複数のマーカーが、HMG-1または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

【請求項73】

被験体由来の前記複数のマーカーが、カスパーゼ-3または免疫学的に検出可能なそのフラグメントを含む請求項47に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、敗血症に関連した診断マーカーの同定および利用に関する。種々の態様において、本発明は、敗血症の検出、その他の原因の全身性炎症反応症候群から敗血症の区別、および敗血症患者のリスクの層別化において使用する方法および組成物に関する。

【背景技術】

50

【0002】

本発明の背景に関する以下の説明は、単に読者が本発明を理解するのに助けるためのものであり、本発明に関する従来技術を説明したり構成するためのものではない。

【0003】

用語「敗血症」は、感染によって生じる炎症の全身症状に関連した多様な臨床症状の説明に使われている。非感染性病因による二次的炎症反応に臨床上類似しているため、敗血症の識別は特に困難な診断課題であった。最近、「胸部内科医のアメリカン・カレッジ」(the American College of Chest Physicians)および「救急医学のアメリカン・ソサイエティ」(the American Society of Critical Care Medicine)が、「全身性炎症反応症候群(Systemic Inflammatory Response Syndrome)」即ち「SIRS」について定義を公表した(ボーン[Bone]ら, チェスト[Chest] 101:1644-1653, 1992)。「SIRS」は、一般に、感染性または非感染性に対する重篤な全身反応、および関連症候群である「敗血症」、「重症の敗血症」および「敗血症ショック」に関する重篤な全身反応を意味する。これらの語句についての定義を以下説明するが、これは本出願用に定義されたものである。

10

【0004】

「SIRS」は、次の項目の2つ以上を呈する症状を指している。

体温が38 超または36 未満、

脈拍が90回/分を超えている(頻脈)、

呼吸数が20回/分を超えている(頻呼吸)または $P_aCO_2 < 4.3 \text{ kPa}$ 、

白血球数 $> 12,000 \text{ 個/mm}^3$ 、 $< 4,000 \text{ 個/mm}^3$ 、または $> 10\%$ 未熟(バンド)形式。

20

【0005】

「敗血症」は、臨床的に明らかな感染または微生物的に確認された感染をさらに伴うSIRSを指している。この感染は、細菌、真菌、寄生虫、またはウイルスのいずれでもよい。

【0006】

「重症の敗血症」は、低酸素血症、乏尿症、代謝性アシドーシス、または脳機能の変異などの少なくとも1つの臓器機能障害により明らかになった臓器灌流の低下をさらに伴う敗血症を指している。

30

【0007】

「敗血症ショック」は、 $< 90 \text{ mmHg}$ の収縮期の血圧、または血圧を維持するために投薬が必要になったことから明らかになった血圧低下をさらに伴う重症の敗血症を指している。

【0008】

SIRSの診断に結びつく全身炎症反応は、関係づけられる病因として感染性および多数の非感染性の両方がある。非感染性病因には、火傷、脾臓炎、外傷、熱射病および腫瘍形成が含まれる。敗血症と非敗血症SIRSとを区別することは、概念的には比較的単純であるが、これらの関連した症状を明確に区別する診断ツールについては何も知られていない。例えば、ルルウエリン(Llewellyn)およびコーヘン(Cohen), インテンシブ・ケア・メディシン(Int. Care Med.), 27: S10-S32, 2001, を参照のこと。例えば、敗血症の症例の90%以上は細菌による感染が関係しているため、感染を確認する「最も確実な方法」は、血液、尿、胸水、髄液、腹腔液、滑液、痰、またはその他の組織試料からの微生物増殖であった。しかし、このような培養は、敗血症の明確な臨床所見を呈する患者の50%以上で確認できないと報告されている。例えば、2003年6月26日に電子情報として発表された、ジェイムス(James)ら, インテンシブ・ケア・メディシン(Int. Care Med.), 29: 1368-1371, を参照のこと。

40

【0009】

50

敗血症において全身炎症症状に結びつく生理学的反応は、明確にされないままである。免疫細胞の活性化は、グラム陰性菌のLPS内毒素およびグラム陽性菌の外毒素に反応して生じる。この活性化は、炎症促進サイトカイン、接着分子、血管活性介在物、および反応性酸素化学種により仲介された一連の現象を引き起こす。肝臓、肺、心臓および腎臓を含む種々の臓器が、直接的または間接的に、この一連の現象により影響を受ける。敗血症は、凝固のサイトカイン活性化により仲介されると考えられる散在性血管内凝固(「DIC」)とも関連がある。流体と電解質とのバランスも、毛細管灌流の増加および組織の酸素添加の低減により影響を受ける。発生した炎症反応をチェックせず、抑制もしないと、心筋虚血になり、臓器の機能が失われ、死に至る。

【0010】

敗血症と非敗血症SIRSとを区別する能力は、治療法とその結果が劇的に異なるので、特に重要である。例えば、ある研究で、SIRS診断基準の内2つだけを有する非敗血症SIRSの症例では死亡率は7%であったが、死亡率は、敗血症では16%、重症の敗血症では20%、そして敗血症ショックでは46%に上がることが報告されている。ランゲル-フラウスト(Rangel-Frausto), ザ・ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(JAMA), 273:1117-1123, 1995。

【0011】

その上、抗生物質および支持療法が利用できるにも関わらず、上の統計で示されたように、敗血症は罹患率および死亡率の大きな原因になっている。同様に、より最近の研究によると、米国で毎年751,000の重症の敗血症が発生し、死亡率は30-50%であると推定されている。アングス(Angus)ら, クリティカル・ケア・メディシン(Crit. Care Med.), 29:1303-1310, 2001。

【0012】

敗血症の診断に関し、被験体の完全な臨床検査と共に使用することについて、いくつかのラボテストで研究がなされている。例えば、米国特許第5,639,617号および第6,303,321号、およびジアマレロス-ブルブリス(Giamarellos-Bourboulis)ら, インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Med.), 28:1351-1356, 2002、ハルバース(Harbarth)ら, アメリカン・ジャーナル・オブ・レシピレートリー・クリティカル・アンド・ケア・メディシン(Am. J. Respir. Crit. Care Med.), 164:396-402, 2001、マーチン(Martin)ら, ペディアトリックス(Pediatrics), 108:URL:http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/4/e61, 2001、およびボシンク(Bossink)ら, チェスト(Chest), 113:1533-1541, 1998、を参照のこと。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、敗血症を検出し、敗血症をSIRSのその他の原因から区別し、および敗血症患者のリスクを層別する場合のマーカーの識別および使用に関する。本明細書に記載された方法および組成物は、種々の形態のSIRSの診断および区別において使用される迅速で感度のよい特異的な診断検定法として当該分野で必要な要求を満たすことができる。その上、本発明の方法および組成物は、SIRS患者の処置および診断および/または予後上の指標をさらに開発することを容易にするためにも使用することができる。

【0014】

種々の態様において、本発明は、患者のSIRSの診断、予後、または区別と関連しているマーカーを識別する物質および手順、患者の診断および処置へのこの種のマーカーの使用および/または処置計画の経過の監視、SIRSに関連した1つ以上の有害転帰に関わるリスクにある患者の識別、このような症状を処置または予防する効果を与える可能性がある化合物および薬剤組成物を選別する物質および手順に関する。

10

20

30

40

50

【0015】

第1の態様では、本発明は、SIRSの症状を示す被験体の診断または予後を判定する方法、敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを互いからおよび/または非感染性SIRSから区別する方法を開示している。これらの方法は、血圧調節に関連した1つ以上のマーカーおよび/または炎症に関連した1つ以上のマーカーの存在または量について、被験体由来のテスト試料の分析を含んでいる。ある実施態様では、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、またはより多くのマーカーまたは個々のマーカーを含むこの種の複数のマーカーが、マーカーパネルの中に組み込まれる。SIRSとDICとの間の関係のために、好ましくは、凝固および止血に関連した1つ以上のマーカーおよび/または反応性酸素化学種の存在に関連した1つ以上のマーカーを含む追加のマーカーがこのようなパネルに加えられる。このようなパネルに入れるのに適したマーカーについて、以下、詳細に説明される。

10

【0016】

1つ以上のマーカーのレベルは、前記マーカーの予測レベルと比較され、前記患者は、前記予測レベルと同等以上の前記マーカーのレベルにより脳血管けいれん（脳血管けいれん）のリスクにあると診断される。別の方法では、複数のこの種のマーカーについてパネル応答値が測定される。さらに、1つ以上のこの種のマーカーレベルの変化は、本明細書に記述されたパネルにおいて独立マーカーとして使用される。

【0017】

特定の実施形態では、個々のマーカーの濃度は、各々、SIRSの診断、予後、または区別と関連があるレベル（「閾値」）と比較することができる。被験体の選択されたマーカーレベルの各々を、目的とする各マーカーの診断閾値に相関づけることにより、敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックの有無、その被験体がこれらの症状の1つに罹患する確率を決めることができる。同様に、被験体のマーカーレベルを各マーカーの予後閾値に相関づけることにより、この被験体が将来1つ以上の不都合な症状に罹患する確率が決められる。

20

【0018】

別の実施形態において、パネル内の1つ以上のマーカーの特定の閾値は、被験体由来のマーカーレベルのプロファイルが特定の診断の指標であるかどうかを判定するための拠り所にされない。そうではなく、本発明は、マーカーのプロファイル全体の評価を利用することができる。例えば、種々のマーカーレベルにおけるパネルの1 - （特異度）に対して、マーカーの個別パネルの感度のROC曲線をプロットすることにより、被験体からのマーカー測定のプロファイルは共に全体的確率（「パネル応答」は数値スコアとしてまたはパーセンテージ・リスクとして表された）を与えると考えられる。即ち、個々に観察された症状は、根底にある特定の疾患に起因する。この種の実施形態では、特定のサブセットのマーカーが増加していれば、一人の患者に特定の診断を示すには十分であり、一方、異なるサブセットのマーカーが増加していれば、別の患者に同じ診断または異なる診断を示すのに十分である。この種の分析を行う方法については、後で説明する。

30

【0019】

さらに別の実施形態では、1つ以上のマーカーを複数回測定することができ、マーカーの一時的な変化を用いて、観察された症状に対し1つ以上の特定の病因を含めるか、または除外することができる。例えば、1つ以上のマーカーを初回に測定し、次いで、2回目に再び測定すると、マーカーレベルの時間による変化（またはマーカーレベルの欠如）を測定することができる。このような実施形態において、初回より2回目にマーカーが増加すると、1つ以上の症状の基礎になる特定の疾患および特定の予後などについて診断することができる。同様に、初回より2回目にマーカーが低下すると、1つ以上の症状の基礎になる特定の疾患および特定の予後などを示すことができる。1つ以上のマーカーの一時的な変化は、単一時点のマーカーレベルと共に用いるとマーカーパネルの識別力を上げることもできる。さらに別の実施形態において、「パネル応答」をマーカーとして扱うと、パネル応答の一時的な変化は、1つ以上の症状の基礎になる特定の疾患および特定の予後

40

50

などを示すことができる。

【0020】

特に好ましい実施形態において、血圧調節に関連した1つ以上のマーカーの試料中の存在または量を予後的に用いて、SIRS、敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックに関連した将来の合併症のリスクを判定する。これらの実施形態において、血圧調節に関連した好ましいマーカーは、BNPまたはNT-proBNPまたはこれらに関連したマーカーである。後で記述するように、この種の方法を用いて被験体の転帰のリスクを判定し、このリスクを被験体の処置方法の指針として用いることができる。

【0021】

本明細書で記述されたマーカーは個別に使用されうるが、試料中で測定される複数のマーカーを含むマーカー「パネル」のメンバーとして使われるのが好ましい。この種のパネルは、当業者には周知の多数の様式で分析される。例えば、パネルの各メンバーは、「正常」値、即ち特定の疾患の有無の指標であるとして識別された値と比較される。特定の診断は、この値に対する各マーカーの比較に依存し、一方、マーカーの1つのサブセットのみが正常範囲を外れているならば、このサブセットは個々の診断の指標になる。

10

【0022】

したがって、複数のマーカーを併用して、個別にマーカーから得られた値と比較する予測分析値の数を増やすのが好ましい。この種のパネルは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、またはより多くのマーカーまたは個々のマーカーを含むことができる。当業者は、単一の検定またはデバイスにおいて、診断マーカー、鑑別診断マーカー、予後マーカー、開始時間マーカーなどを併用することも理解するであろう。例えば、デバイスまたは機器により測定された特定のマーカーは敗血症の診断に使い、デバイスまたは機器により測定された別のマーカーセットは重症の敗血症の診断を下し、デバイスまたは機器により測定された第3のマーカーセットは敗血症ショックの診断を下し、これらのマーカーセットの各々はユニークなマーカーを含むこともあり、その他のセットの1つまたは両方と重なり合うマーカーを含むこともできる。マーカーは、例えば、いろいろな目的のマーカーに別の分析パラメータ・セット（例えば、閾値または別の加重因子）を適用することにより、多数の目的にも普通に使える。例えば、1つの濃度または加重のマーカーは、敗血症の診断を下すために、単独またはより大きなパネルの部分として使い、別の濃度または加重の同じマーカーが、重症の敗血症の診断を下すために、単独またはより

20

30

【0023】

特定の実施形態では、1つ以上の診断または予後の両指標は、単に指標の有無により、症状または疾患に相関づけられる。別の実施形態では、診断または予後の両指標の閾値レベルは確定することができ、患者からの試料の指標のレベルは閾値レベルと単純に比較することができる。診断および/または予後テストの感度および特異度は、まさに、テストの分析「品質」に依存し、これらは異常な結果を構成するものの定義にも依存する。実際には、受診者動作特性曲線、即ち「ROC」曲線は、通常、変数値を、「正常」および「疾患」の両集団における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。あらゆる特定のマーカーでは、疾患の有無に関わらず、被験体のマーカーレベルの分布は互いに重なり合うようである。このような条件下では、1つのテストでは、正常と疾患を100%の精度で絶対的に区別することはできず、重なり合いの領域はテストが正常と疾患とを区別できない領域を示している。閾値は、その値より上では（または疾患によるマーカーの変わり方によってはその値未満）そのテストは異常であり、その値未満ではそのテストが正常であると考えられるような値が選択される。ROC曲線の下面積は、感知された測定が症状を正しく識別することを可能にする確率の尺度である。ROC曲線は、テスト結果が必ずしも正確な数値を与えないときでも使える。結果をランク付けできる限り、ROC曲線を作ることができる。例えば、「疾患」試料に関するテストの結果が、度合い（即ち、1 = 低い, 2 = 普通, 3 = 高い）によりランク付けされる。このランキングは、「正常」な集団における結果に相関づけることができ、ROC曲線が作られる。これら

40

50

の方法は、当該分野では周知である。例えば、ハンリー (Hanley) ら, ラジオロジ- (Radiology) 143:29-36 (1982)。

【0024】

好ましい実施形態では、マーカーおよび/またはマーカーパネルは、下に示す値の特異度と組み合わせられた下に示す値の感度を有するように選択される。即ち、感度は、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より一層好ましくは少なくとも85%、さらにより一層好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%である。また、特異度は、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より一層好ましくは少なくとも85%、さらにより一層好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%である。特に好ましい実施形態では、感度と特異度の両方が、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より一層好ましくは少なくとも85%、さらにより一層好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%である。

10

【0025】

1つ以上のマーカーは、単独で考える場合は予測的価値がないかもしれないが、パネルの一部として使われる場合はこの種のマーカーは特定の診断/予後を判定する上で大きな価値がある。加重因子はパネル内の1つ以上のマーカーにも加えることができ、例えば、特定の診断/予後を下す場合に1つのマーカーの有効性が特に高い場合は、このマーカーは重みを加えられているので、任意のレベルにおいて単独で有望な結果を十分示すことができる。同様に、加重因子は、個々のマーカーが正の結果を示すのに十分な任意のレベルはないが、別のマーカーも分析に寄与する場合のみ結果を示すと定めることができる。

20

【0026】

本明細書において代表的なパネルについて記述するが、これらの代表的なパネルから1つ以上のマーカーを、置換、追加、または排除することができ、その状態でも臨床的に有用な結果が得られる。これらのパネルは、疾患の特異的なマーカー(例えば、細菌感染において増加または減少するが、その他の疾患では増加または減少しないマーカー)および/または非特異的なマーカー(例えば、原因に関係なく炎症により増加または減少するマーカー、原因に関係なく止血の変化により増加または減少するマーカー、など)の両方を含むことができる。非特異的な(および/または特異的な)マーカーは、個別には、敗血症を診断できないが、特定の「指紋」パターンの変化は、事実上、疾患の特異な指標として作用することができる。上で述べたように、このパターンの変化は、単一試料から得られるか、または、随意に、パネルの1つ以上のメンバーにおける一時的な変化と考えることができる(またはパネル応答値の一時的な変化)。

30

【0027】

特に好ましいマーカーパネルは、例えば、心房性ナトリウム利尿因子(「ANP」)、pro-ANP、B型心房性ナトリウム利尿ペプチド(「BNP」)、NT-pro BNP、pro-BNP C型心房性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したマーカー(集合的に「
 10
 20
 30
 40
 50
 60
 70
 80
 90
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000

40

50

ジ遊走阻害因子 (MIF)、および血管内皮増殖因子 (「VEGF」、) またはこれらに関連したマーカー (集合的に「炎症に関連したマーカー」と呼ぶ) からなる群から選択される1つ以上の第2のマーカーを含む。

【0028】

プラスミン、フィブリノーゲン、D-ダイマー、ベータ-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、血小板誘導成長因子、プロトロンビン・フラグメント1+2、プラスミン-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、フォンビレブランド因子、組織因子、および血栓前駆体蛋白質またはそれらに関連したマーカー (集合的に「凝固および止血に関連したマーカー」と呼ぶ) からなる群から選択される1つ以上の追加のマーカーは、本発明のパネルに含まれる。

10

【0029】

「炎症に関連したマーカー」として上に挙げたこれらの急性期反応物に加えて、炎症に関連した1つ以上のマーカーは、ヘプシジン、HSP-60、HSP-65、HSP-70、不斉ジメチルアルギニン (酸化窒素合成酵素の内因性阻害剤)、マトリックス・メタロプロテイン11, 3および9、デフェンシンHBD1、デフェンシンHBD2、血清アミロイドA、酸化LDL、インスリン様増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インター-阻害剤、e-セレクチン、グルタチオン-S-転移酵素、低酸素症誘導因子-1、誘導酸化窒素合成酵素 (「1-NOS」、) 細胞内接着分子、乳酸塩脱水素酵素、マトリックス・メタロプロテイン分解酵素-9、単球遊走ペプチド-1 (「MCP-1」、) n-アセチルアスパルテート、プロスタグランジンE2、核因子の受容体アクチベータ (「RANK」、) リガンド、TNF受容体スーパーファミリー・メンバー1A、およびシスタチンCまたはそれらに関連したマーカーからなる群から選択することができる。

20

【0030】

同様に、反応性酸素化学種に関連した1つ以上のマーカーを、この種のパネルの一部として測定することができる。これらのマーカーは、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオン、-トコフェロール、アスコルベート、誘導酸化窒素合成酵素、脂質過酸化製品、酸化窒素、ミエロペロオキシダーゼ、および呼吸炭化水素 (好ましくはエタン)、またはこれらに関連したマーカーからなる群から選択される。

【0031】

追加のマーカーおよび/またはマーカークラスをこの種のパネルに追加して、疾患を区別する能力をさらに与えることができる。例えば、炎症反応および毛細管に対して得られる作用および組織の酸化作用の低減は、急性期反応に関連した1つ以上のマーカー、血管組織に関連した1つ以上のマーカー、および1つ以上の組織特異的 (例えば、神経特異的) マーカーと関係しており、それらのマーカーのレベルは虚血性症状において増加する。したがって、-2アクチン、塩基性カルポニン1、-1インテグリン、酸性カルポニン、カルデスモン、システインに富む蛋白質-2 (「CRP2」または「CRSP2」、) エラスチン、フィブリリン1、潜在トランスフォーミング増殖因子ベータ結合蛋白質4 (「LTBP4」、) 平滑筋ミオシン・ヘビーチェーン、およびトランスゲリン、またはそれらに関連したマーカー (集合的に「血管組織に関連したマーカー」と呼ぶ) からなる群から選択される1つ以上のマーカーは、この種のパネルに含めることができる。追加のマーカーおよびマーカークラスについては本明細書で後に記述する。

30

40

【0032】

これらのマーカーは、多様な組み合わせで併用することができる。例えば、好ましいパネルは、CRP、カスパーゼ-3、CK-BB、IL-1、IL-1ra、IL-6、IL-8、HMG-1、TNF、MIF、MCP-1、MMP-9、Fasリガンド、可溶性Fas (Apo-1)、TRAIL、TWEAK、ANP、pro-ANP、BNP、CNP、pro-BNP、pro-CNP、NT-pro-BNP、組織因子、フォンビレブランド因子、vWF-A1、vWF-インテグリン結合ドメイン、およびvWF-A3からなる群から選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または

50

より多くのマーカー、またはそれらに関連したマーカーを含むことができる。本明細書で述べたように、これらのマーカーは、単一時点で測定され、および/または時間によるマーカーレベルの変化を計算する場合は、複数の時点で測定される。

【0033】

関連した態様では、本発明は、前述の方法で使用するマーカーパネルを識別する方法に関連する。診断および/または予後で使用するマーカーのパネルを開発する場合、特定のマーカーの存在またはレベルをテストすることにより、一群の被験体から可能性がある多数のマーカーのデータが得られる。この被験体群は、次いで、複数のセットに分割される。例えば、第1のセットは、疾患を有すると識別されるか、または、より一般的には、第1の症状にあると識別された被験体を含む。この症状の識別は、敗血症の細菌の組織試料の培養などのより過酷および/または費用のかかるテストを通してなされる。以後、この第1セットの被験体は、「疾患している」と呼ばれる。第2セットの被験体は、第1セットに入らない被験体から選択される。第2セットの被験体は、以後、「疾患していない」と呼ばれる。

10

【0034】

これらのセットの被験体由来のデータには、複数のマーカーのレベルが含まれている。好ましくは、同じセットのマーカーのデータは、各患者に対して利用できる。代表的なマーカーは、本明細書に記載されている。目的とする疾患に対するこのマーカーの関連性は、実際に周知である必要はない。1つ以上のマーカーの関連性についてこれらの被験体セットを比較する方法は、後で記述される。本明細書に記述された方法およびシステムの実施形態は、候補マーカーのいずれが、この疾患の診断または任意の予後の症状にとって最も関連があるかを決定するために使われる。

20

【0035】

別の態様では、本発明は、SIRS、敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを示す被験体で使用するための治療計画を決定する方法に関連する。これらの方法は、SIRSを含めるか除外するか、敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを互いから、および/または非感染性SIRSから区別するために本明細書で記述した方法を行うことを含むのが好ましい。次いで、この被験体の疾患の型および病期を治療するために1つ以上の治療計画を選択することができる。

【0036】

さらに別の態様では、本発明は、SIRSを含めるか除外するためのキット、または敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを互いから、および/または非感染性SIRSから区別するためのキットに関連する。これらのキットは、患者からの試料について1つ以上のマーカーレベルを測定するデバイスおよび試薬、並びにこの検定を行う説明書を含むのが好ましい。随意に、これらのキットは、SIRSを含めるか除外するため、または敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを互いから、および/または非感染性SIRSから区別するために、マーカーレベルを相関づける1つ以上の手段を含むことができる。この種のキットは、1つ以上のこの種の測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)が承認したラベリングを含むのが好ましい。

30

40

【0037】

さらに別の態様では、本発明は、SIRSを含めるか除外するためのデバイス、または敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを互いから、および/または非感染性SIRSから区別するためのデバイスに関連する。この種のデバイスは、複数の診断ゾーンを含むのが好ましく、これらのゾーンの各々は目的とする特定のマーカーと関係づけられる。この種のデバイスは、「アレイ」または「マイクロアレイ」と呼ばれる。これらのデバイスと試料との反応に従って、この診断ゾーンから信号が発生し、次いで、信号を目的とするマーカーの存在または量と相関づける。当業者には多数の適切なデバイスが知られている。

【0038】

50

後で記述されるように、本明細書に記述されたマーカーは、パネル内のその他のマーカーの状態（例えば、存在または量）に依存する複数の疾患の指標になりうる。例えば、パネル内の特定のマーカーは、一般に、種々の原因から生じる炎症があると上昇する。1つ以上のこの種のマーカーの時間による変化、および/またはパネルの一部としてのこの種のマーカーの1つのセットの「指紋」は、単離された状態にある単一のマーカーでは診断できないという事実にも関わらず、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。マーカーの一時的な変化を測定する好ましい時間は、10分から24時間、より好ましくは30分から10時間、より一層好ましくは1時間から5時間の間にある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

本発明は、被験体の症状をベースとする鑑別診断、予後、および治療計画を決定するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、SIRSを含めるか除外し、または敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを互いから、および/または非感染性SIRSから区別するために選択された方法および組成物に関連する。

【0040】

鑑別診断は、被験体から観察されうる特徴を、可能性のある疾患の特徴と比較して、個々の被験体の症状の基礎にある個々の疾患を診断する方法を指している。鑑別診断において考慮されねばならない疾患の幅によって、臨床医が指示するテストの型および数は膨大なものになりうる。臨床医は、次いで、一連のテストから得られた情報を統合し、被験体由来の症状の範囲および/または診断テストの結果を最もぴたり表す臨床診断を下さねばならない。

【0041】

医学的処置を必要とする患者は、肉体的な特徴または機能において、疾患の指標である一つまたはいくつかの観察可能な主な変化を呈することが多い。しばしば、これらの「症状」は、可能性のある多数の疾患が観察可能な一つまたは複数の同じ症状を呈するという意味で非特異的である。SIRSの場合、次のような症状の内2つ以上が存在する時はいつても、定義によりその条件が存在する：

体温が38 超または36 未満、

脈拍が90回/分を超えている（頻脈）、

呼吸数が20回/分を超えている（頻呼吸）または $P_aCO_2 < 4.3 \text{ kPa}$ 、

白血球数 $> 12,000 \text{ 個/mm}^3$ 、 $< 4,000 \text{ 個/mm}^3$ 、または $> 10\%$ 未熟（バンド）形式。

【0042】

本発明は、観察された症状に関する可能性のある病因一つおよび複数の病因を含めるか除外するようにデザインされている診断マーカーを提供することにより、1つ以上の非特異的な症状の鑑別診断に役立つことができる方法および組成物について記述している。本明細書に記述された症状をベースにした鑑別診断は、ある患者について観察された非特異的な症状の基礎にある可能性のある疾患を区別するようにデザインされた診断マーカーのパネルを用いて達成されうる。

【0043】

定義

本明細書で使われる用語「マーカー」は、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、核酸、炭水化物、など、または被験体由来のテスト試料を選別する標的として使われる小分子を意味している。本発明においてマーカーとして使われる「蛋白質またはポリペプチド」は、これらの物質のフラグメント、特に免疫学的に検出できるフラグメントを含むものと考えられる。

【0044】

本明細書で使われる用語「関連マーカー」は、個々のマーカー、またはマーカー自身の代替物としてまたは独立マーカーとして検出されるマーカーのバイオ合成の親の1つ以上のフラグメントを意味している。例えば、ヒトBNPは、108個のアミノ酸前駆体分子

10

20

30

40

50

の蛋白質分解により導かれ、以後BNP₁₋₁₀₈と呼ばれる。成熟したBNP、または「BNPナトリウム排出性ペプチド」または「BNP-32」は、この前駆体の77-108のアミノ酸を表す、32個のアミノ酸からなり、BNP₇₇₋₁₀₈と呼ばれる。さらに、関連マーカ-は、例えば、メチオニン残基の酸化、ユビキチン化などによる親マーカ-の共有結合修飾の結果である。

【0045】

108個のアミノ酸BNP前駆体pro-BNP(BNP₁₋₁₀₈)の配列は次の通りであり、成熟BNP(BNP₇₇₋₁₀₈)の部分は下線を引いている。:

HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSE LQVEOTSLEP LQESPRPTGV 50
WKSREVATEG IRGHRKVMVLY TLRAPRSPKM VQSGGCFGRK MDRISSSSSGL 100
GCKVLRHH 108

10

(配列番号1)

【0046】

BNP₁₋₁₀₈は下記配列を有するより大きな前駆体pre-pro-BNPとして合成される(下線で示された「pre」配列を有する):

MDPQTAPSRA LLLLLFLHLA FLGGRSHPLG SPGSASDLET SGLQEQRNHL 50
QGKLSLELQVE OTSLEPLQES PRPTGVWKS R EVATEGIRGH RKMVLYTLRA 100
PRSPKMVQGS GCFGRKMDRI SSSSGLGCKV LRRH 134

(配列番号2)

【0047】

成熟BNP自身は、本発明においてマーカ-として使用されうるが、prepro-BNP、BNP₁₋₁₀₈およびBNP₁₋₇₆分子は、成熟BNPの代替物またはそれら自身におけるおよびそれら自身のマーカ-として測定されるBNP関連マーカ-を表す。さらに、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₇₆₋₁₀₇、BNP₆₉₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₀₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₃₉₋₈₆、BNP₅₃₋₈₅、BNP₆₆₋₉₈、BNP₃₀₋₁₀₃、BNP₁₁₋₁₀₇、BNP₉₋₁₀₆、およびBNP₃₋₁₀₈からなる群から選択されるBNP関連ポリペプチドを含むこれらの分子の1つ以上のフラグメントは、循環系中にも存在することができる。さらに、BNPフラグメントを含むナトリウム排出性ペプチドフラグメントは、1つ以上の酸化可能なメチオニンを含み、メチオニンスルホキサイドまたはメチオニンスルホンへのメチオニンの酸化は、追加のBNP関連マーカ-を生じる。例えば、2003年4月17日に出願された米国特許第10/419,059号を参照のこと。すべての表、図およびクレ-ムを含むこの特許の全体が、引用により本明細書中に組み入れられている。

20

30

【0048】

マーカ-フラグメントの製造は、1つの事象を引き起こすマーカ-を組織内へ放出する時間と試料が取得されるか分析される時間との間の経過時間、即ち試料取得と試料が分析される時間との間の経過時間、問題の組織試料の型、貯蔵条件、存在する蛋白質分解酵素の量、などの関数である、継続プロセスであるので、1つ以上のマーカ-の検定をデザインし、このような検定を行う場合には、正確な予後または診断の結果を得るためにはこの分解を考慮する必要がある。さらに、種々のフラグメントの存在または量を別々に検出するためには複数のマーカ-フラグメントを区別する個々の抗体が個別に用いられる。この個別の検出は、単一検定で複数のフラグメントを検出するよりも、より正確な予後または診断の結果を与える。例えば、異なる加重因子を種々のフラグメント測定に適用すると、試料中に初めから存在するナトリウム排出性ペプチドの量をより正確に推定することができる。

40

【0049】

類似の様式で、本明細書で記述された多くのマーカ-が比較的大きな前駆体分子として合成され、次いで、これらのマーカ-は処理されて成熟し、および/またはマーカ-のフラグメントの形で循環系中に存在する。このようにして、本明細書で記述されたマーカ-の各々について「関連マーカ-」が識別され、BNPについて上で記述した様式に類似し

50

た様式で使われる。

【0050】

循環系からのポリペプチドの除去は、分解経路を含むことが多い。その上、この種の分解経路の阻害剤は、特定の疾患を処置する場合に役割を果たすことができる。例えば、トリンダード (Trindade) およびルロー (Rouleau), ハート・フェリュアー・モニター (Heart Fail. Monit.) 2: 2-7, 2001。しかし、ポリペプチドマーカの測定は、一般に、分子の分解状態を考慮せずに、無傷の形態の測定に焦点を当てている。試料中の特定のポリペプチドマーカの生物学的に活性な形を正確に測定するために、これらのポリペプチドマーカの分解経路およびこの分解から形成された生成物を理解して検定法がデザインされる。目的とする生物学的に活性なポリペプチドマーカおよびこれらのマーカから導かれた不活性なフラグメントの両方の計画外の測定は、試料中の生物学的に活性な形態の濃度を過大に評価する結果になる。

10

【0051】

臨床試料に存在する分解フラグメントを考えないと、診断または予後の方法の精度について重大な結果をもたらすおそれがある。例えば、BNPについてサンドイッチ型免疫検定が行われる単純なケースについて考えると、存在していた生物学的に活性なBNPのかなりの量(例えば、50%)が不活性な形態に分解されている。生物学的に活性なBNPと不活性なフラグメントとに共通した領域を結合する抗体を用いてつくられた免疫検定は、試料中に存在する生物学的に活性なBNPの量を2倍に過大評価し、結果を「擬陽性」と判定するおそれがある。試料中に存在する生物学的に活性なBNPを過大に評価すると、患者の治療についても重大な結果をもたらすおそれがある。再びBNPの例を考えると、BNP濃度は、治療が有効であるかどうかを決めるのに使われる(例えば、上昇したレベルが治療により正常に戻るかどうかを知るためにBNPを監視することにより)。上で述べた同じ「擬陽性」BNPの結果は、現在の療法が無効であるという誤った印象があるために、臨床医が治療を継続したり、増加させたり、または修正する結果になるおそれがある。

20

【0052】

同様に、本明細書で記述された1つ以上のマーカの複合体形成状態を考慮する必要がある。例えば、トロポニン₁は、3つのトロポニンポリペプチド(T, IおよびC)を含む「3成分系複合体」として主として筋肉に存在する。しかし、トロポニンIおよびトロポニンTは、I/T/C三元複合体以外の形態で血液中を循環する。むしろ、(i)遊離の心特異的トロポニンI、(ii)二元複合体(例えば、トロポニンI/C複合体)、および(iii)三元複合体の各々は、すべて、血液中を循環する。さらに、トロポニンIおよびTの「複合体状態」は、例えば、遊離のトロポニン・ポリペプチドのその他の循環トロポニンポリペプチドへの結合により患者の体内で時間により変化する。トロポニンの「複合体状態」を考慮しない免疫検定は、目的とする心特異的アイソフォームのすべてを検出できない。

30

【0053】

後で記述される方法は、被験体から導かれる1つ以上のマーカを利用するのが好ましい。本明細書で使われる「被験体から導かれるマーカ」という用語は、蛋白質、ポリペプチド、りん脂質、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、または被験体の1つ以上の細胞により表されるか、または作られる小分子マーカを意味している。1つ以上のマーカの有無、量、または量の変化は、特定の疾患が存在しているか、存在していないことを示している。被験体から導かれたものではない追加のマーカを使用してもよいが、これは、特定の疾患と相関づけられる病原性または感染性細菌により表される。この種のマーカは、上で記述された感染性疾患を識別する蛋白質、ポリペプチド、りん脂質、核酸、プリオン、または小分子マーカが好ましい。

40

【0054】

本明細書で使われる用語「テスト試料」は、患者などの目的とする被験体の診断、予後

50

、または評価のために得られた体液の試料を意味している。特定の実施形態では、この種の試料は、進行中の症状の転帰またはある症状に対する治療計画の効果を判定するために得られる。好ましいテスト試料には、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、だ液、痰、および胸水がある。さらに、当業者は、一部のテスト試料は、分別または精製操作、例えば、全血の血清または血漿成分への分離後に、より簡単に分析できることを知っている。

【0055】

本明細書で使われているように、本明細書で使われた「複数」は、少なくとも2を意味している。好ましくは、複数は、少なくとも3を、より好ましくは少なくとも5を、より一層好ましくは少なくとも10を、より一層好ましくは少なくとも15を、および最も好ましくは少なくとも20を意味している。特に好ましい実施形態では、複数は大きな数、即ち少なくとも100である。

10

【0056】

本明細書で使われる用語「被験体」は、ヒトまたはヒト以外の生物を意味している。したがって、本明細書に記述された方法および組成物は、ヒトおよび動物両方の疾患に適用できる。さらに、被験体は生きている生物が好ましいが、本明細書で記述された発明は、死後の分析にも同様に使われる。好ましい被験体は、「患者」、即ち医学的ケアを受けて生きているヒトである。これには、病理学の徴候について調べられている特定の病気をもたないヒトが含まれている。

【0057】

本明細書で使われる用語「診断」は、ある患者が任意の疾患または症状に罹患しているか、いないかを推定および/または決定することができる方法を意味している。当業者は、1つ以上の診断指標、即ちマーカー、その症状の有無または重篤さの指標であるマーカーの有無、量、または量の変化に基づいて診断を下すことが多い。

20

【0058】

同様に、予後は、1つ以上の「予後指標」を調べることにより決められることが多い。これらは、マーカー、患者（または患者から得られた試料）において、任意の経過または転帰が生じる確率を知らせるマーカーの存在または量である。例えば、1つ以上の予後指標は、このような患者から得られた試料において十分高いレベルに到達する場合、このレベルは、比較的低いマーカーレベルを示す類似の患者に比べて、この患者は将来脳卒中を経験する確率が高いことを知らせることができる。予後指標のレベルまたはレベルの変化は、一方では、罹患率または死亡の確率の上昇と関係があり、患者における「逆の転帰が増加する傾向と関係がある」と呼ばれている。好ましい予後マーカーは、脳卒中後の患者の遅延した神経欠陥の発症または将来の脳卒中の機会を予測することができる。

30

【0059】

診断およびマーカーの使用に関連して本明細書で使われる用語「相関づける」は、ある患者におけるマーカーの存在または量を、任意の症状に罹患していることが知られているか、リスクにあることが知られているヒト、または任意の症状がないことが知られているヒトのそのマーカーの存在または量と比較することを意味している。上で述べたように、ある患者の試料のマーカーレベルは、特異的な診断と関係があることが知られているレベルと比較することができる。この試料のマーカーレベルは、診断と相関づけられたと言われる。即ち、当業者はその患者が特異的な型の診断に罹患しているかどうかを判定し、適当に対応するためにそのマーカーレベルを使うことができる。一方、この試料のマーカーレベルは良好な結果（例えば、疾患がない、など）と関連してい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。好ましい実施形態で、マーカーレベルのプロファイルは、全体的な確率またはROC曲線を用いた特定の転帰に相関づけられる。

40

【0060】

本明細書で使われている「診断を下す」というフレーズは、当業者がある患者において特定の疾患の有無を判定することができる方法を意味している。用語「診断」は、100%の精度で特定の疾患の有無を決定する能力を意味せず、または任意の経過または転帰がかなり起きるらしいということを決定する能力さえも意味しない。そうではなく、当業者

50

は、用語「診断」は特定の疾患がその被験体に存在する確率の上昇を意味していることを理解するであろう。好ましい実施形態では、ある診断は、ある疾患が存在する機会が約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約40%、約50%、約60%、約75%、約90%、約95%上昇することを示している。この文脈における用語「約」は+/-2%を意味している。

【0061】

本明細書で使われる用語「不連続な」は、非連続的である表面の領域を意味している。即ち、いずれかの領域の一部ではない1つの境界が2つの領域の各々を完全に囲んでいるならば、2つの領域は互いに不連続である。

【0062】

本明細書で使われる用語「独立してアドレス可能な」は、特異的な信号が得られる表面の不連続な領域を意味している。

【0063】

本明細書で使われる用語「抗体」は、抗原またはエピトープを特異的に結合しうる、免疫グロブリンによりつくられるか、または実質的にコード化された遺伝子または免疫グロブリン遺伝子、またはそれらのフラグメントから導かれたペプチドまたはポリペプチドを意味している。例えば、免疫学の基礎 (Fundamental Immunology), 第3版, W. E. ポール (Paul) 編, ラーベンプレス (Raven Press) 発行, ニューヨーク (N. Y.) (1993)、ウイルソン (1994)、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド (J. Immunol. Methods), 175: 267-273、ヤームッシュ (1992)、ジャーナル・オブ・バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・メソッド (J. Biochem. Biophys. Methods), 25: 85-97、を参照のこと。用語抗体には、抗原結合部分、即ち、(i) Fab フラグメント、即ち、VL、VH、CLおよびCH1ドメインを含む1価フラグメント、(ii) F(ab')₂ フラグメント、即ち、ちょうつがい領域においてジサルファイド・ブリッジにより連結された2つのFabフラグメントを含む2価フラグメント、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント、(iv) 単一アームの抗体のVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント、(v) VHドメインからなるdAbフラグメント (ワード (Ward) ら, (1989)、ネイチャー (Nature), 341: 544-546)、および(vi) 単離された相補性決定領域 (CDR)、を含む抗原を結合する容量を保有する「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)) が含まれている。単一鎖抗体も、用語「抗体」における引用により含まれる。

【0064】

マーカーパネルの識別

本発明によると、ある被験体により示された1つ以上の非特異的症状の鑑別診断において、1つ以上のマーカーを識別する方法およびシステムが提供される。疾患状態の診断に有用なマーカーを識別する適切な方法は、2002年12月24日に出願された米国特許仮出願第60/436,392号、2003年12月23日に出願されたPCT出願US03/41426号、2002年12月27日に出願された米国特許出願第10/331,127号、およびPCT出願US03/41453号に詳細に記述されており、これらの特許の各々は、すべての表、図およびクレームを含むこの特許の全体が、引用により本明細書中に組み入れられている。

【0065】

当業者は、マーカーの一変量分析を行うことができ、複数のマーカーの一変量分析からのデータは組み合わせる種々の疾患症状を区別するためにマーカーパネルを形成することができる。この種の方法には、多重線形回帰分析、相互作用項の決定、段階的回帰分析などが含まれる。

【0066】

鑑別診断に有用なマーカーパネルを開発する場合、可能性のある多数のマーカーのデー

10

20

30

40

50

タは、特定のマーカーの存在またはレベルに関するテストにより被験体群から得られる。被験体群は2つのセットに分割される。第1セットには、疾患を有すると確認されているか、またはより一般的には、第1の症状にあると確認されている被験体が含まれる。例えば、この第1セットの患者は、敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックと診断されている患者である。この症状の確認は、より過酷なテストおよび/または費用のかかるテストにより行われる。以後、この第1セットの被験体は「疾患している」と呼ばれる。

【0067】

第2セットの患者は、単に第1セットに入らない被験体である。以後、この第2セットの被験体は「疾患していない」と呼ばれる。第1セットと第2セットとは、各々がほぼ同数の被験体を有するのが好ましい。このセットは、普通の患者、および/または別の原因のSIRSに罹患している患者でもよい。

10

【0068】

これらのセットの患者から得られたデータには、複数のマーカーのレベルが含まれる。同じセットのマーカーのデータは、各患者について利用できるのが好ましい。このセットのマーカーには、特定の疾患または症状の検出に関係があると疑われる候補マーカーがすべて含まれる。実際に周知の関連性は必要ではない。本明細書で記述された方法およびシステムの実施形態は、候補マーカーのいずれが疾患または症状の診断に最も関係が深いかを定めるために使われる。2つのセットの被験体における各マーカーのレベルは、例えば、ガウス分布のように広範囲に分布することができる。しかし、分布の適合性は必要ではない。

20

【0069】

上で示されたように、1つのマーカーは、ある患者が疾患しているか否かを明確に識別することができないことが多い。例えば、ある患者が互いに重なり合う領域に入るマーカーレベルを有すると評価されるならば、テスト結果はその患者の診断において役に立たない。疾患または症状の検出のために、陽性と陰性とのテスト結果を区別するために人為的なカットオフが使われる。どこでカットオフが選択されるかは関係なく、診断ツールとしての単一マーカーの有効性は影響を受けない。カットオフの変更は、単一マーカーの使用から生じる擬陽性の数と擬陰性の数との間で単に相殺するだけである。このような重なり合いを有するテストの効果は、ROC（受診者動作特性）曲線を用いて表されることが多い。ROC曲線は当業者には周知である。

30

【0070】

ROC曲線の水平軸は、擬陽性の割合と共に増加する（1 - 特異度）を表している。この曲線の垂直軸は、真の陽性の割合と共に増加する感度を表している。したがって、選択された特定のカットオフでは、（1 - 特異度）の値が決められ、対応する感度が得られる。ROC曲線の下面積は、測定されたマーカーレベルが疾患または症状の正確な識別を可能にする確率の尺度である。したがって、ROC曲線の下面積は、テストの有効性を判定するために用いることができる。

【0071】

上で述べたように、単一マーカーのレベルの測定は用途を限定するおそれがあり、例えば、この測定は炎症により非特異的に増加する。追加のマーカーの測定により追加の情報が得られるが、2つの無関係な測定のレベルを適切に組み合わせることが困難である。本発明の実施形態による方法およびシステムにおいて、疾患患者のセットおよび非疾患患者のセットの種々のマーカーのレベルに関連したデータは、マーカーのパネルを開発し、有用なパネル応答を得るために使われる。データは、マイクロソフト・アクセス（Microsoft Access）、オラクル（Oracle）、その他のSQLデータベースまたは単にデータファイルにおいて得られる。データベースまたはデータファイルは、例えば、名称または番号、存在する種々のマーカーのレベル、などの患者識別子、および患者に疾患があるか、または非疾患であるかを含む。

40

【0072】

50

次に、人為的なカットオフ領域は、初めは各マーカーについて選択される。カットオフ領域の位置は、初めはあらゆる点で選択されうるが、選択は下に記述された最適化プロセスに影響を及ぼす。これに鑑みて、最適と考えられる位置の近くの選択は、オプティマイザーの迅速な集合を助長する。好ましい方法では、カットオフ領域は、初めは、2セットの患者の重なり合う領域の中心付近に集まる。1つの実施形態では、カットオフ領域は単にカットオフ点でよい。別の実施形態では、カットオフ領域はゼロより大きい長さを有する。これに鑑みて、カットオフ領域は、中央値および長さにより規定される。実際に、カットオフ領域の限界の最初の選択は、各被験体セットの予め選択された百分位数により決められる。例えば、疾患のある患者の予め選択された百分位数が測定される上の点は、カットオフ範囲の右(上)の端部として使われる。

10

【0073】

各患者の各マーカー値は、次いで、指標に対してマップされる。指標は、カットオフ領域の下に1つの値が割り当てられ、カットオフ領域の上に別の値が割り当てられる。例えば、マーカーが一般に非疾患患者に対して低い値を有し、疾患患者に対して高い値を有するならば、特定のマーカーの低い値に、ゼロ指標が割り当てられ、これは陽性の診断の可能性が低いことを示す。別の実施形態では、指標は多項式に基づいて計算される。多項式の係数は、疾患のある被験体および疾患のない被験体の間のマーカー値の分布に基づいて決められる。

【0074】

種々のマーカーの相対的な重要性は、加重因子により示すことができる。加重因子は、初めは、各マーカーの係数として割り当てられる。カットオフ領域の場合と同様に、加重因子の初めの選択は、あらゆる受け入れ可能な値において選択されるが、この選択は最適化プロセスに影響を及ぼすおそれがある。これに鑑みて、最適と考えられる位置の近くの選択は、オプティマイザーの迅速な集合を助長する。好ましい方法では、受け入れ可能な加重係数はゼロと1との間の範囲にあり、各マーカーの初めの加重係数は0.5として割り当てられる。好ましい実施形態では、各マーカーの初めの加重係数はマーカー自身によるそのマーカーの有効性と関係がある。例えば、ROC曲線は単一マーカーについて作られ、ROC曲線の下面積はそのマーカーの初めの加重係数として使われる。

20

【0075】

次に、2つのセットの各々における各被験体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プされる指標および各マーカーの加重係数の関数である。好ましい実施形態では、各被験体(j)のパネル応答(R)は次式で表され、

30

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

ここで、iはマーカー指数であり、Iはマーカーiのマーカーレベルが被験体jについてマップされる指標値であり、 $\sum_i w_i I_{i,j}$ は候補マーカーiすべての和である。このパネル応答値は「パネル指数」と呼ばれる。

【0076】

マーカー値ではなく指標値を用いる1つの利点は、異常に高いか低いマーカーレベルは、その個別のマーカーについて疾患または非疾患の診断の確率を変えないことである。通常、特定のレベルより上のマーカー値は、一般に、特定の状態を示す。このレベルより高いマーカー値は、同じ確からしさでその状態を示す。したがって、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。カットオフ領域の片側で一定である指標を使用すると、この懸念がなくなる。

40

【0077】

パネル応答は、また、マーカーレベルおよび、例えば、患者の人種および性別を含むその他の因子を含むいくつかのパラメータの一般的な関数である。パネル応答に寄与するその他の因子には、個々のマーカー値の時間による勾配を含めることができる。例えば、ある患者は、病院に到着するとまず個々のマーカーについて測定される。同じマーカーが1時間後に再び測定され、レベルの変化はパネル応答において反映される。さらに、追加の

50

マーカーは、その他のマーカーから導かれ、パネル応答の値に寄与できる。例えば、2つのマーカー値の比は、パネル応答を計算する場合の1つの因子である。

【0078】

被験体の各セットにおいて各被験体のパネル応答が得られると、各セットのパネル応答の分布を分析することができる。目的関数は、有効なパネルの選択を助長するように規定される。目的関数は、例えば、疾患した被験体のセットのパネル応答の重なり合い、および疾患していない被験体のセットのパネル応答により表されるパネルの有効性の指標になるべきものである。このようにして、目的関数は、例えば、重なり合いを最小にすることによりパネルの有効性を最大化するように最適化される。

【0079】

好ましい実施形態では、2セットの被験体のパネル応答を表すROC曲線が、目的関数を規定するために使われる。例えば、目的関数は、ROC曲線の下面積を表すことができる。この曲線の下面積を最大化することにより、マーカーのパネルの有効性を最大化することができる。別の実施形態では、ROC曲線のその他の特徴を用いて目的関数を規定することができる。例えば、ROC曲線の勾配が1に等しくなる点は有用な特徴である。別の実施形態では、感度と特異度との積が最大になる点は、「膝(knee)」と呼ばれて使われることがある。ある実施形態では、膝における感度が最大化される。別の実施形態では、所定の特異度のレベルにおける感度は目的関数を規定するために使われる。別の実施形態は、使われる所定の感度レベルにおいて特異度を用いることができる。さらに別の実施形態では、これらのROC曲線の2つ以上の特徴の組み合わせが使われる。

【0080】

パネル内のマーカーの1つが、その疾患または診断されている症状に対して特異的であることはありうる。この種のマーカーが、特定の閾値より上または下にある場合は、パネル応答は「陽性」のテスト結果に戻るよう設定することができる。しかし、閾値が満たされない場合は、マーカーのレベルは目的関数に対して寄与する可能性があるものとして使われる。

【0081】

最適化アルゴリズムが、目的関数を最大化または最小化するために使われる。最適化アルゴリズムは、当業者には周知であり、シンプレックス(Simplex)法およびその他の条件つき最適化技法を含む普通に利用できる最小化または最大化関数を含む。一部の最小化関数は、局所最小値よりむしろ全体的最小値を求める場合に、その他の最小化関数よりも優れていることが、当業者には理解されている。最適化プロセスにおいて、各マーカー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度の自由度を与えるように変わることが許される。この種の変数パラメータは、本明細書では独立変数と呼ばれる。好ましい実施形態では、各マーカーの加重係数は、最適化アルゴリズムを繰り返す度に変わること許される。種々の実施形態では、これらのパラメータの変更はすべて独立変数として使われる。

【0082】

上に記述されたパラメータに加えて、各マーカーの方向も、独立変数として使われる。例えば、多くの場合、特定のマーカーの比較的高いレベルが、一般に、疾患状態の指標であるか、非疾患状態の指標であるかが分からない。このような場合、最適化プロセスが両サイドで探すことを認めることは、有用であるかもしれない。実際に、これはいくつかの方法で実行することができる。例えば、1つの実施形態では、方向は、最適化プロセスにより正負の間を飛び移れる真に別の独立変数である。一方、方向は、加重係数が負になることを認めることにより実行される。

【0083】

最適化アルゴリズムは、やはり、特定の制約条件を具備している。例えば、得られるROC曲線は、特定の値よりも大きな曲線下面積を得られるように条件づけられている。曲線下の面積0.5を有するROC曲線は、完全な無作為を示しているが、1.0の曲線下の面積は、2つのセットが完全に分離していることを意味している。したがって、0.7

10

20

30

40

50

5などの受け入れ可能な最小値は、特に目的関数が曲線下の面積を組み込まないときは、制約条件として使われる。その他の制約条件には、特定のマーカーの加重係数への制約が含まれる。追加の制約条件は、加重係数すべての和を1.0などの特定の値に制約する。

【0084】

最適化アルゴリズムを繰り返し行くと、目的関数を最小化するか、最大化しながら、一般に、制約条件を満たすために独立パラメータを変える。繰り返しの回数は、最適化プロセスにおいて制約される。さらに、2つの逐次的繰り返しの間の目的関数の差が所定の閾値未満になれば、最適化アルゴリズムは局所的な最小値または最大値の領域に到達したことを示し、最適化プロセスは終結される。

【0085】

したがって、最適化プロセスは、各マーカーの加重係数および指標へのマーカー値のマッピングのカットオフ領域を含むマーカーパネルを与える。次いで、特定のマーカーが変えられるか、またはパネルからの排除さえ行われ、満足な結果が得られるまでこのプロセスが反復された。パネルにおける各マーカーの効率的寄与は、これらのマーカーの相対的重要性を識別するために決められる。1つの実施形態では、最適化プロセスから生じる加重係数は、各マーカーの相対的重要性を決めるために使われる。最低の係数を有するマーカーは排除されるか置換される。

【0086】

特定の場合、比較的低い加重係数は、重要性の低い指標にはならない。同様に、比較的高い加重係数は、重要性の高い指標にはならない。例えば、関連マーカーが診断と無関係であれば、最適化プロセスは高い係数を生じる。この場合、その係数を下げるという利点は何もない。この係数を変えても、目的関数の値には影響しない。

【0087】

テスト精度を決めるために、前述の方法により比較するために、被験体を2つ以上の群に選択することが可能な「ゴールドスタンダード」テスト基準が選択される。敗血症の場合、このゴールドスタンダードは、血液、尿、胸水、脳脊髄液、腹腔液、滑液、痰、またはその他の組織試料、の培養からの細菌の回収である。これは、ゴールドスタンダードについて陰性の被験体は敗血症ではないことを意味するが、しかし、上で述べたように、敗血症の強い臨床所見を示す患者の50%以上は培養について陰性である。この場合、敗血症の臨床所見を示すが、ゴールドスタンダードについて陰性の結果を示す患者は、比較群から排除される。一方、敗血症と確認された被験体は、まず、正常で健康な対照被験体と比較される。

【0088】

テスト精度の測定は、フィッシャー(Fischer)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Med.)、29:1043-1051, 2003、に記載されたように得られ、任意のマーカーまたはマーカーパネルの有効性を決めるために使われる。これらの測定には、感度および特異度、予測値、尤度比、診断オッズ比、およびROC曲線面積が含まれる。上で述べたように、適切なテストは、これら種々の測定に関する次のような結果の内1つ以上を示す。

少なくとも75%の特異度と組み合わせられた少なくとも75%の感度、
 少なくとも0.7、より好ましくは少なくとも0.8、より一層好ましくは少なくとも0.9、および最も好ましくは少なくとも0.95のROC曲線面積、および/または
 少なくとも5、より好ましくは少なくとも10、および最も好ましくは少なくとも20の正の尤度比(感度/(1-特異度))として計算された)、および0.3未満、より好ましくは0.2未満、および最も好ましくは0.1未満の負の尤度比((1-感度)/特異度、として計算された)。

【0089】

代表的なマーカーパネル

好ましい実施形態では、以下の論議は、SIRSの鑑別診断に含まれる、血圧調節に関連した1つ以上のマーカーの代表であるBNP、および炎症に関連した1つ以上のマーカー

10

20

30

40

50

ーの代表であるC - 反応性蛋白質について考える。追加のマーカーは、凝固および止血に関連した1つ以上のマーカー、および/または血管組織に関連した1つ以上のマーカー、および/または1つ以上の急性期反応物である。追加の適切なマーカー種は、後で記述される。

【0090】

BNP

脳型ナトリウム排出性ペプチドとも呼ばれる、B - 型ナトリウム排出性ペプチド (BNP) は、血圧および液体収支を調節するためにナトリウム利尿システムに含まれる、32個のアミノ酸からなる、4 kDaペプチドである。ボノウ (Bonow), R. O., サーキュレーション (Circulation), 93: 1946 - 1950 (1996) 10
。BNPの前駆体は、「pre pro BNP」と呼ばれる、108個のアミノ酸分子として合成される。この前駆体は、「NT pro BNP」と呼ばれる76個のアミノ酸からなるN - 末端ペプチド (アミノ酸1 - 76) およびBNPまたはBNP32と呼ばれる32個のアミノ酸からなる成熟ホルモン (アミノ酸77 - 108) に蛋白質分解処理される。これらの化学種 - NT pro BNP、BNP - 32、およびpre pro BNP - は、ヒトの血漿内で循環することができると示唆されている。タテヤマ (Tateyama) ら, バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 185: 760 - 767 (1992)、ハント (Hunt) ら, バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 20
214: 1175 - 1183 (1995)。pre pro BNPおよびNT pro BNPの2つの形、およびBNP、pre pro BNPおよびNT pro BNPから導かれ、およびBNP、NT pro BNPおよびpre pro BNPの蛋白質分解の結果として血液中に存在するペプチドは、BNPと関連または結合するマーカーとして集合的に記述される。

【0091】

本明細書で使われる用語「BNP」は、32個のアミノ酸からなる成熟BNP分子を意味する。しかし、当業者が認めているように、BNPに対する関係のために、NT pro BNP分子の濃度は、患者の診断または予後の情報も与えることができる。「BNPに関連したマーカー」または「BNP関連ペプチド」というフレーズは、32個のアミノ酸からなるBNP分子自身以外のpre pro BNP分子に由来するポリペプチドを意味している。BNPおよびBNPに関連したペプチドの蛋白質分解は、文献にも記述されており、これらの蛋白質分解フラグメントも用語「BNP関連ペプチド」に包含されている。 30

【0092】

BNPおよびBNP関連ペプチドは、心室の分泌顆粒において主として存在し、心室の容積膨張および圧力過負荷の両方に応えて心臓から放出される。ウィルキンス (Wilkins), M. ら, ランセット (Lancet), 349: 1307 - 1310 (1997)。BNPの上昇は、心房性および肺動脈けつ入圧の上昇、心室の収縮期および拡張期の機能の低減、左心室肥大、および心筋梗塞と関連づけられる。サグネラ (Sagnella), G. A., クリニカル・サイエンス (Clinical Science) 95: 519 - 529 (1998)。さらに、うつ血性心不全および腎不全に関連したBNP濃度の上昇については多数の報告がある。したがって、患者のBNPレベルは、呼吸困難の可能性のあるいくつかの基礎的な原因の指標になりうる。 40

【0093】

C - 反応性蛋白質

C - 反応性蛋白質 (CPR) は、宿主防御に関与している21 kDaのサブユニットを有するホモペンタマーCa²⁺ - 結合急性期蛋白質である。CPRは、微生物膜の普通成分であるホスホリルコリンに結合するのが好ましい。ホスホリルコリンは、哺乳類の細胞膜にも存在するが、CPRと反応できる形では存在しない。ホスホリルコリンとCPRの 50

反応は、細菌の凝集およびオプソニン作用、並びに補体カスケードの活性化を促進し、これらのすべては細菌排除に含まれる。さらに、CPRはDNAおよびヒストンと反応することができ、CPRは、損傷した細胞から循環系に放出された核物質の捕捉剤であると示唆されている(ロビイ(Robey), F. A. ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 259: 7311-7316, 1984)。CPRの合成は、IL-6、および間接的にはIL-1により誘導される。これは、IL-1は肝臓洞様血管においてクッパー細胞によりIL-6の合成を開始することができるからである。CPRの正常な血漿濃度は、健常な集団の90%において $< 3 \mu\text{g/ml}$ (30 nM)、および健常な個人の99%において $< 10 \mu\text{g/ml}$ (100 nM)である。血漿CPR濃度は、比濁分析またはELISAにより測定される。CPR濃度は、感染、手術、外傷、心筋梗塞、および脳卒中などの急性期反応を起こす症状を有する患者からの血漿において上がる。CPRは、合成後直ぐに血流中に放出される分泌された蛋白質である。CPRの合成は、IL-6により上の方へ調節され、血漿CPR濃度は、刺激作用の後6時間以内になんかなり上昇する(ピアスッチ(Biasucci), L. M., アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー(Am. J. Cardiol.) 77: 85-87, 1996)。血漿CPR濃度は、血流中で、刺激作用の後約50時間でピークに達し、その後低下し、約19時間の半減期を有する(ピアスッチ(Biasucci), L. M., アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー(Am. J. Cardiol.) 77: 85-87, 1996)。

【0094】

この代表的なマーカーパネルの詳細な分析は、次の実施例に提供されている。本明細書で記述された診断マーカーの識別および使用するための方法によりSIRSの原因をさらに区別するために、その他のマーカーがこのマーカーパネルにおいて置換または加えられることを、当業者は容易に認めるであろう。追加の適切なマーカーは、次のセクションにおいて記述される。

【0095】

本明細書で引用されたマーカーからなるパネルは、目的とする鑑別診断に関連した重要な情報を提供するために作られる。この種のパネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20の個別マーカーを用いて作られる。比較的大きなマーカーパネルを含む単一マーカーまたはマーカーのサブセットの分析は、種々の臨床状態における臨床感度または特異度を最適化するために当業者により行われる。これらには、外来、緊急治療、救命救急治療、集中治療、監視装置、入院患者、外来患者、医師オフィス、医療クリニック、および健康選別状態があるが、これらに限定されない。さらに、臨床感度および特異度を最適化するために後述の状態の各々における診断閾値の調整と組み合わせられたマーカーの比較的大きなパネルを含む単一マーカーまたはマーカーのサブセットを、当業者は使用することができる。以下、本明細書で記述された方法により適切なマーカーパネルを識別する場合に使用する追加の代表的マーカーについて簡潔に説明する。

【0096】

(i) 血圧調節に関連した代表的マーカー

A型ナトリウム排出性ペプチド(ANP)(心房ナトリウム排出性ペプチドまたはカーディオジラチンとも呼ばれる)(フォースマン(Forsmann)ら, ヒストケミストリー・アンド・セル・バイオロジー(Histchem. Cell Biol.) 110: 335-357, 1998)は、28個のアミノ酸ペプチドであり、このペプチドは合成され、貯蔵され、心房拡張、アンギオテンシンII、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による)に答えて心房筋細胞が放出される。ANPは前駆体分子(pro-ANP)として合成され、この前駆体分子は蛋白質分割により活性形ANPに変換され、N-末端ANP(1-98)も形成し、N-末端ANPおよびANPは、心房細動および心不全を示す患者において増加していると報告されている(ロッシ(Rossi)ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオ

ロジャー (Journal of the American College of Cardiology) 35:1256-1262, 2000)。心房ナトリウム排出性ペプチド (ANP99-126) 自身に加えて、そのN末端プロホルモン・セグメントからの線状ペプチドフラグメントも、生物活性を有することが報告されている。しかし、当業者が認識しているように、ANPに対する関係のために、N末端ANP分子の濃度は、患者の診断または予後の情報も与えることができる。フレーズ「ANP関連マーカ―またはANP関連ペプチド」は、28個のアミノ酸からなるANP分子自身以外のpro-ANP分子 (1-126) に由来するポリペプチドを意味している。ANPおよびANPに関連したペプチドの蛋白質分解は、文献にも記述され、これらの蛋白質分解フラグメントも用語「ANP関連ペプチド」に含まれる。

10

【0097】

ANPレベルの上昇は、血液量過多、心房細動およびうっ血性心不全の間に見られる。ANPは、長期にわたるナトリウムと水とのバランス、血液容積および動脈圧の調節に参与する。このホルモンは、副腎皮質によるアルドステロンの放出を低下させ、糸球体ろ過速度 (GFR) を増加させ、ナトリウム利尿および利尿 (カリウム保持性) をつくり、レニン放出を低下させて、それによりアンギオテンシンIIを低下させる。これらの作用は、血液容積の低下、したがって、中心静脈圧 (CVP)、心拍出量、および動脈血圧に参与する。ANPのいくつかのアイソフォームが識別され、脳卒中発生率とのこれらの関係が研究されている。例えば、ルバツ (Rubatu) ら、サーキュレーション (Circulation) 100:1722-1726, 1999、エストラダ (Estrada) ら、アメリカン・ジャーナル・オブ・ハイパーテンション (Am. J. Hypertens.) 7:1085-1089, 1994、を参照のこと。

20

【0098】

ANPの持続的な上昇は、主として、全身の血管抵抗を下げることにより、動脈血圧を下げるように思われる。全身の血管拡張のメカニズムは、ANP受容体が媒介し、並びに交感神経血管緊張の減衰による血管平滑筋のcGMPの上昇を含む。後者のメカニズムは、中枢神経システム内の部位に対する、並びに全身の神経末端によるノルエピネフリンの阻害によるANPの作用を含む。ANPは、レニン-アンギオテンシン・システムの逆調節システムと見なされる。

【0099】

C型ナトリウム排出性ペプチド (CNP) は、22個のアミノ酸からなるペプチドであり、これはヒトの脳における主要な活性ナトリウム排出性ペプチドであり、CNPは内皮性弛緩因子であるとも考えられ、これは酸化窒素 (NO) と同様に作用する (ダビッドソン (Davidson) ら、サーキュレーション (Circulation) 93:1155-1159, 1996)。CNPは、構造的には、心房ナトリウム排出性ペプチド (ANP) およびB型ナトリウム排出性ペプチド (BNP) と関係があるが、ANPおよびBNPは主として心筋中で合成され、CNPは血管内皮中で前駆体 (pro-CNP) として合成される (プリケット (Prickett) ら、バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 286:513-517, 2001)。CNPは、動脈および静脈の両方に対して血管拡張作用があり、血管平滑筋細胞における細胞間cGMP濃度を上げることにより主として静脈で作用すると報告されている。

30

40

【0100】

ウロテンシンIIは、配列Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Valを有し、Cys6とCys11との間にジサルファイド・ブリッジがあるペプチドである。ヒトのウロテンシン2 (UTN) は、prepro形にて合成される。処理されたウロテンシン2は、G蛋白質連結受容体GPR14に作用する、強力な血管活性効果および心刺激効果を有する。

【0101】

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

50

垂体後葉部から放出されたペプチド・ホルモンである。体内におけるバソプレシンの主な機能は、水の腎臓処理に影響を及ぼすことにより細胞外の液体容積を調節することである。A V Pの放出を調節するメカニズムはいくつかある。出血中に起きる血液量減少は心房圧の低下をもたらす。心房壁内の特別に緊張した受容体および心房に入る大きな静脈（心肺の圧受容体）は、心房圧力が低下するとこれらの受容体の発射速度を低下させる。視床下部内のこれらの受容体シナプスから求心的に、心房受容体の発射は、通常、下垂体後葉部によりA V Pの放出を阻害する。血液量が減少したり、中央静脈の圧力が低下すると、心房緊張受容体の発射の低下により、A V Pの放出が増加する。視床下部浸透圧受容体が、細胞外の容積モル浸透圧濃度を感知し、脱水の場合に起きるように、容積モル浸透圧濃度が上がるとA V Pの放出を刺激する。最後に、視床下部の領域に配置されたアンギオテンシンII受容体は、A V Pの放出を制御する。即ち、アンギオテンシンIIが増加すると、A V Pの放出を刺激する。

10

【0102】

A V Pは作用の2つの主要部位、即ち腎臓および血管を有する。A V Pの最も重要な生理学的作用は、A V Pが収集ダクトにおける水の浸透性を大きくすることにより腎臓による水の再吸収を増加させ、それにより一層濃縮された尿の形成を可能にすることである。これはA V Pの抗利尿作用である。このホルモンも、動脈血管を圧迫するが、A V Pの普通の生理学的濃度はその血管活性範囲未満である。

【0103】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、前駆体mRNAの選択的スプライシングにより導かれたカルシトニン遺伝子の生成物である37個のアミノ酸からなるポリペプチドである。カルシトニン遺伝子(CALC-I)一次RNA転写産物は、一次転写物の一部として異なるエキソンを含めたりまたは排除することにより異なるmRNAに処理される。カルシトニンコード化mRNAは、甲状腺のC細胞におけるCALC-I転写の主要な生成物であり、一方、CGRP-I(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で作られる(図2.2.1)(9)。第3のmRNA配列では、カルシトニン配列は失われ、一方、CGRPの配列はmRNAにコード化される。CGRPは、血管拡張特性を有する著しく目立つ血管活性ペプチドである。CGRPは、カルシウムおよびホスフェート代謝に対する作用はなく、血管の平滑筋細胞に関連した神経細胞で主として合成される(149)。proCGRP、即ちCGRPの前駆体、およびPCTは、部分的に一致するN-末端アミノ酸配列を有する。

20

30

【0104】

プロカルシトニンは、染色体11p15.4に配置されたCalc-1遺伝子によりコード化された116個のアミノ酸(14.5kDa)蛋白質である。Calc-1遺伝子は、選択的スプライシングの結果である2つの転写物を生じる。プレ-プロカルシトニンは、甲状腺においてC細胞により、57個のアミノ酸N末端フラグメント、32個のアミノ酸カルシトニン・フラグメント、および21個のアミノ酸カタカルシン・フラグメントに処理される25個のアミノ酸ペプチド信号を含む。プロカルシトニンは、その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の状態で分泌される。ウィッチャー(Whicher)ら、アナルス・オブ・クリニカル・バイオケミストリー(Ann. Clin. Biochem.) 38: 483-493(2001)。血漿プロカルシウムは、敗血症および敗血症の重症度のマーカーとして識別され(ユキオカ(Yukiooka)ら、アナルス・オブ・ジ・アカデミー・オブ・メディシン・シンガポール(Ann. Acad. Med. Singapore) 30: 528-531(2001))、日に2のプロカルシトニンレベルは死亡を予測する(ペッティラ(Pettilla)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Intensive Care Med.) 28: 1220-1225(2002))。

40

【0105】

アンギオテンシンIIは、循環基質、即ちアンギオテンシノーゲンに対するレニンの作用により形成されたオクタペプチド・ホルモンであり、蛋白質分解を受けてデカペプチド

50

であるアンギオテンシン I を形成する。特に肺における血管内皮は、酵素、即ちアンギオテンシン転換酵素 (ACE) を有し、この酵素は 2 つのアミノ酸に分割してオクタペプチド、即ちアンギオテンシン II (Angiotensin II) を形成する。

【0106】

Angiotensin II は、いくつかの非常に重要な機能を有する。即ち、Angiotensin II は、抵抗血管を圧迫し (Angiotensin II 受容体により) 全身の血管抵抗および動脈圧を上げ、副腎皮質に作用してアルドステロンを放出し、続いて腎臓に作用しナトリウムおよび液体の保持量を増加させ、腎臓に作用して液体保持量を増加させる下垂体後葉部からバソプレシン (抗利尿性ホルモン, ADH) の放出を刺激し、脳内の渇き中枢を刺激し、交感神経終末からのノルエピネフリンの放出を助長し、神経終末によるノルエピネフリンの再取り込みを阻害し、それにより交感神経のアドレナリン作動を高め、心臓肥大および血管肥大を刺激する。

10

【0107】

アドレノメジュリン (AM) は、副腎髄質、肺、腎臓および心臓を含む多くの組織で作られる 52 個のアミノ酸からなるペプチドである (ヨシトミ (Yoshitomi) ら, クリニカル・サイエンス (Clin. Sci. (Colch)) 94:135-139, 1998)。AM を静脈内に注入すると、永続的な血圧低下作用を生じ、実験動物では心拍出量の増加を伴う。AM は、右心房からの ANP の緊張誘導放出を高めると報告されているが、血管の BNP 発現には影響しない。AM は、前駆体分子 (pro-AM) として合成される。AM 前駆体から処理された N-末端ペプチドは、血圧低下ペプチドとして作用することも報告されている (クワサコ (Kuwakawa) ら, アナルス・オブ・クリニカル・バイオケミストリー (Ann. Clin. Biochem.) 36:622-628, 1999)。

20

【0108】

エンドセリンは、血管内皮により作られる別々の遺伝子によりコード化された 3 つの関連ペプチド (エンドセリン - 1, エンドセリン - 2, およびエンドセリン - 3) であり、各エンドセリンは強力な血管圧迫活性を示す。エンドセリン - 1 (ET-1) は、212 個の残基前駆体 (preproET-1) として合成された 21 個のアミノ酸残基ペプチドであり、これは大きな ET-1 として知られたペプチドを与えるために除去される 17 個の残基信号配列を含む。この分子は、エンドセリン転換酵素により trp21 と val22 との間で加水分解によりさらに処理される。大きな ET-1 および ET-1 の両方は、生物活性を示すが、成熟形の ET-1 はより大きな血管圧迫活性を示す (ブルックス (Brooks) とエルガル (Ergul), ジャーナル・オブ・モレキュラー・エンドクリノロジー (J. Mol. Endocrinol.) 21:307-315, 1998)。同様に、エンドセリン - 2 およびエンドセリン - 3 も、21 個のアミノ酸残基の長さがあり、それぞれ、大きなエンドセリン - 2 および大きなエンドセリン - 3 の加水分解により作られる (ヤップ (Yap) ら, ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー (Br. J. Pharmacol.) 129:170-176, 2000、リー (Lee) ら, ブラッド (Blood) 94:1440-1450, 1999)。

30

【0109】

(ii) 凝固および止血に関連した代表的マーカー

40

D-ダイマーは、約 200 kDa の分子量を有する架橋繊維素分解生成物である。D-ダイマーの正常な血漿濃度は、 $< 150 \text{ ng/ml}$ (750 pM) 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な狭心症の患者では上がるが、安定な狭心症の患者では上がらない。ホフマイスター (Hoffmeister), H.M. ら, サーキュレーション (Circulation) 91:2520-2527 (1995)、バイエス・ジェニス (Bayes-Genis), A. ら, トロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thromb. Haemost.) 81:865-868 (1999)、ガーフィンケル (Gurfinckel), E. ら, ブリティッシュ・ハート・ジャーナル (Br. Heart J.) 71:151-155 (1994)、クルスカール (Kruskal), J.B. ら, ザ・ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (N. Engl

50

. J . Med .) 3 1 7 : 1 3 6 1 - 1 3 6 5 (1 9 8 7)、タナカ (T a n a k a) , M . とスズキ (S u z u k i) , A . , トロンボシス・リサーチ (T h r o m b . R e s .) 7 6 : 2 8 9 - 2 9 8 (1 9 9 4)。

【 0 1 1 0 】

D - ダイマーの血漿濃度は、敗血症、脳卒中、手術、アテローム動脈硬化症、外傷、および血栓性血小板減少性紫斑病を含む凝固および繊維素溶解活性化に関連した症状の間にも上昇する。D - ダイマーは、プラスミンによる蛋白質分解による凝血の溶解の後、直ぐに血流中に放出される。D - ダイマーの血漿濃度は、不安定な狭心症の患者では、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ を超える。ガーフィンケル (G u r f i n k e l) , E . ら , プリティッシュ・ハート・ジャーナル (B r . H e a r t J .) 7 1 : 1 5 1 - 1 5 5 (1 9 9 4)。血漿 D - ダイマーは、繊維素分解の特異的マーカーであり、急性心筋梗塞および不安定な狭心症に関連したプロトロンボティック症状の存在を示している。D - ダイマーの血漿濃度は、急性肺塞栓症の患者ではほとんど常に上昇する。したがって、D - ダイマーのレベルが正常であれば、肺塞栓症を排除することができる。エーゲルマイヤー (E g e r m a y r) ら , ソラックス (T h o r a x) 5 3 : 8 3 0 - 8 3 4 (1 9 9 8)。

10

【 0 1 1 1 】

プラスミンは 78 kDa のセリン蛋白質分解酵素であり、この酵素は架橋フィブリンを蛋白質分解により消化し、凝血を溶解する結果になる。 70 kDa のセリン蛋白質分解酵素阻害剤である 2 アンチプラスミン (2 A P) は、プラスミンと共有結合性の $1 : 1$ 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調節する。得られる約 150 kDa のプラスミン - 2 A P 複合体 (P A P) は、プラスミン阻害性複合体 (P I C) とも呼ばれ、繊維素分解中に活性化されるプラスミンと 2 A P が接触すると直ぐに形成される。P A P の正常な血清濃度は、 $< 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (6.9 nM) である。P A P の血清濃度の上昇は、繊維素分解を活性化するためである。P A P の血清濃度の上昇は、凝血の存在、または繊維素分解の活性化を生じるか、または繊維素分解の活性化の結果である何らかの症状と関係がある。これらの症状には、アテローム動脈硬化症、散在性血管内凝固、急性心筋梗塞、手術、外傷、不安定な狭心症、脳卒中、および血栓性血小板減少性紫斑病が含まれる。P A P は、プラスミンの蛋白質分解活性化の後、直ぐに形成される。P A P は、繊維素分解の活性化、および最近の連続的凝固亢進症状の存在に関わる特異的マーカーである。

20

30

【 0 1 1 2 】

- トロンボグロブリン (T G) は、血小板を活性化すると放出される、 36 kDa の血小板 顆粒成分である。T G の正常な血漿濃度は、 $< 40 \mu\text{g}/\text{ml}$ (1.1 nM) である。T G の血漿レベルは、不安定な狭心症の患者や急性心筋梗塞の患者では上がるようであるが、安定した狭心症の患者では上がらない (ド・カテリーナ (D e C a t e r i n a) , R . ら , ユーロピアン・ハート・ジャーナル (E u r . H e a r t J .) 9 : 9 1 3 - 9 2 2 , 1 9 8 8、バザン (B a z z a n) , M . ら , カルディオロギア (C a r d i o l . o g i a) 3 4 : 2 1 7 - 2 2 0 , 1 9 8 9)。血漿 T G の上昇も、不安定な狭心症の患者の虚血症の発作と相関関係があるように思われる (ソーベル (S o b e l) , M . ら , サーキュレーション (C i r c u l a t i o n) 6 3 : 3 0 0 - 3 0 6 , 1 9 8 1)。T G の血漿濃度の上昇は、凝血の存在、または血小板を活性化させる何らかの症状と関係がありうる。これらの症状には、アテローム動脈硬化症、散在性血管内凝固、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病および脳卒中が含まれる (ランディ (L a n d i) , G . ら , ニューロロジー (N e u r o l o g y) 3 7 : 1 6 6 7 - 1 6 7 1 , 1 9 8 7)。T G は、血小板が活性化され、凝集したら直ぐに循環系に放出される。T G は二相性の半減期、即ち、10分間の半減期とそれに続く血漿内で延長された1時間の半減期とを有する (スウィタルスカ (S w i t a l s k a) , H . I . ら , ザ・ジャーナル・オブ・ラボラトリー・アンド・クリニカル・メディシン (J . L a b . C l i n . M e d .) 1 0 6 : 6 9 0 - 7 0 0 , 1 9 8 5)。血漿 T G 濃度は、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の間に上がると言われている。血液試料採取中は、血小板の活性

40

50

化を回避するために特別注意する必要がある。血液試料採取中に、血小板の活性化が起きるのは普通のことであり、血漿 TG 濃度を人為的に上げることができる。さらに、血流中に放出された TG の量は、かなりの変動がある個人の血小板数に依存している。ACS に関連した TG の血漿濃度は、約 70 ng/ml (2 nm) であるが、この値は試料採取操作中の血小板の活性化により影響を受ける。

【0113】

血小板因子 4 (PF4) は、血小板を活性化すると放出される、40 kDa の血小板顆粒成分である。PF4 は、血小板活性化のマーカーであり、ヘパリンを結合し、中和する能力がある。PF4 の正常な血漿濃度は、< 7 ng/ml (175 pM) である。PF4 の血漿濃度は、不安定な狭心症の患者や急性心筋梗塞の患者では上がるようであるが、安定した狭心症の患者では上がらない (ガリノ (Galino), R. ら, アメリカン・ハート・ジャーナル (Am. Heart J.) 112: 285 - 290, 1986、サカタ (Sakata), K. ら, ジャパニーズ・サーキュレーション・ジャーナル (Jpn. Circ. J.) 60: 277 - 284, 1986、バザン (Bazzan), M. ら, カーディオロギア (Cardiol. ologia) 34: 217 - 220, 1989)。血漿 PF4 の上昇も、不安定な狭心症の患者の虚血症の発作と相関関係があるように思われる (ソーベル (Sobel), M. ら, サーキュレーション (Circulation) 63: 300 - 306, 1981)。PF4 の血漿濃度の上昇は、凝血の存在、または血小板を活性化させる何らかの症状と関係がありそうである。これらの症状には、アテローム動脈硬化症、散在性血管内凝固、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病および急性脳卒中が含まれる (カーター (Carter), A. M. ら, アーテリオスクレロシス・スロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 18: 1124 - 1131, 1998)。PF4 は、血小板が活性化され、凝集したら直ぐに循環系に放出される。PF4 は二相性の半減期、即ち、1 分間の半減期、およびそれに続く血漿内で延長された 20 分間の半減期を有する (ルシンスキ (Rucinski), B. ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロギア (Am. J. Physiol.) 251: H800 - H807, 1986)。血漿 PF4 濃度は、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の間に上がると言われているが、これらの研究は完全に信頼できるものではない。血液試料採取中に、血小板の活性化を回避するために特別に注意する必要がある。血液試料採取中に、血小板の活性化が起きるのは普通のことであり、血漿 PF4 濃度を人為的に上げることができる。さらに、血流中に放出された PF4 の量は、かなりの変動がある患者の血小板数に依存している。疾患に関連した PF4 の血漿濃度は、100 ng/ml (2.5 nm) を超えることができるが、この値は試料採取操作中の血小板の活性化により影響を受ける。

【0114】

フィブリノペプチド A (FPA) は、トロンビ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される 16 個のアミノ酸からなる 1.5 kDa のペプチドである。フィブリノーゲンは、肝臓により合成され、分泌される。FPA の正常な血漿濃度は、< 5 ng/ml (3.3 nM) である。血漿 FPA 濃度は、急性心筋梗塞、不安定な狭心症、および異型狭心症の患者では上がるようであるが、安定した狭心症の患者では上がらない (ゲンシーニ (Gensini), トロンボシス・リサーチ (Thromb. Res.) 50: 517 - 525, 1988、ガリノ (Galino), R. ら, アメリカン・ハート・ジャーナル (Am. Heart J.) 112: 285 - 290, 1986、サカタ (Sakata), K. ら, ジャパニーズ・サーキュレーション・ジャーナル (Jpn. Circ. J.) 60: 277 - 284, 1986、セルー (Theroux), P. ら, サーキュレーション (Circulation) 75: 156 - 162, 1987、メルリーニ (Merlini), P. A. ら, サーキュレーション (Circulation) 90: 61 - 68, 1994、マンテン (Manten), A. ら, カーディオバスキュラー・リサーチ (Cardiovasc. Res.) 40: 389 - 395, 1998)。さらに、血漿 FPA は、狭心症の重症度を示している (ゲンシーニ (Gensini)

、トロンボシス・リサーチ (Thromb. Res.) 50: 517-525, 1988)。FPAの血漿濃度の上昇は、発作、手術、癌、散在性血管内凝固、ネフローゼ、敗血症、および血栓性血小板減少性紫斑病を含む凝固経路の活性化を含む何らかの症状と関係している。FPAは、トロンビンの活性化およびフィブリノーゲンの分割後循環系に放出される。FPAは小さなポリペプチドであるので、血流から迅速に除去されるようである。FPAは、凝血形成後1ヶ月以上上昇し、最大血漿FPA濃度は活動性狭心症において40 ng/mlを超えることができる(ゲンシーニ(Gensini), トロンボシス・リサーチ(Thromb. Res.) 50: 517-525, 1988、トーギ(Tohgi), H.ら, ストローク(Stroke) 21: 1663-1667, 1990)。

【0115】

血小板誘導成長因子(PDGF)は、同類のサブユニットAおよび/またはBから構成された28 kDaの分泌されたホモまたはヘテロの二量体蛋白質である(マハデバン(Mahadevan), D.ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 270: 27595-27600, 1995)。PDGFは、間充織細胞の強力な分裂促進因子であり、アテローム動脈硬化症の病因に関係している。PDGFは、血管損傷部位の近くで凝集血小板および単球により放出される。PDGFの正常な血漿濃度は、 $< 0.4 \text{ ng/ml}$ (15 pM)である。血漿PDGF濃度は、健康な対照または安定した狭心症の患者よりも急性心筋梗塞および不安定な狭心症の患者の方が高い(オガワ(Ogawa), H.ら, アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー(Am. J. Cardiol.) 69: 453-456, 1992、ウォーレス(Wallace), J. M.ら, アナルス・オブ・クリニカル・バイオケミストリー(Ann. Clin. Biochem.) 35: 236-241, 1998、オガワ(Ogawa), H.ら, コロナリー・アーテリー・ディーズ(Coron. Artery Dis.) 4: 437-442, 1993)。これらの患者における血漿PDGF濃度の変化は、増加した血小板および単球の活性化によるとの説が有力である。血漿PDGFは、脳腫瘍、肺癌、および高血圧の患者で上がる(クリモト(Kurimoto), M.ら, アクタ・ニューロシルルジカ(Acta Neurochir. (Wien)) 137: 182-187, 1995、セイムール(Seymour), L.ら, プレスト・キャンサー・リサーチ・アンド・トリートメント(Breast Cancer Res. Treat.) 26: 247-252, 1993、ロッシ(Rossi), E.ら, アメリカン・ジャーナル・オブ・ハイパーテンション(Am. J. Hypertens.) 11: 1239-1243, 1998)。血漿PDGFは、炎症促進症状または手術、外傷、敗血症、散在性血管内凝固、および血栓性血小板減少性紫斑病を含む血小板の活性化の原因になる何らかの症状においても上昇する。PDGFは、活性化した血小板および単球の分泌顆粒から放出される。PDGFは、動物では約5分間と1時間の二相半減期を有する(コーエン(Cohen), A. M.ら, ザ・ジャーナル・オブ・サージカル・リサーチ(J. Surg. Res.) 49: 447-452, 1990、ボーエンポープ(Bowen-Pope), D. F.ら, ブラッド(Blood) 64: 458-469, 1984)。ACSにおける血漿PDGF濃度は、 0.6 ng/ml (22 pM)を超えることがある(オガワ(Ogawa), H.ら, アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー(Am. J. Cardiol.) 69: 453-456, 1992)。PDGFは、血小板活性化の感度のよい、特異的マーカーである。さらに、PDGFは、血管損傷、および付随する単球および血小板活性化の感度のよいマーカーである。

【0116】

プロトロンビン・フラグメント1+2は、トロンビン活性化の間にトロンビンのアミノ末端から遊離する32 kDaのポリペプチドである。F1+2の正常な血漿濃度は、 $< 32 \text{ ng/ml}$ (1 nM)である。F1+2の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の患者では上昇し、安定な狭心症では上がらないと言われているが、この症状は完全なものではなかった(メルリーニ(Merlini), P. A.ら, サーキュレーション(Circulation) 90: 61-68, 1994)。その他の報告は、心血管疾

10

20

30

40

50

患における血漿 F 1 + 2 濃度の有意な変化はないことを示した (ピアスッチ (Biasucci), L. M. ら, サーキュレーション (Circulation) 93: 2121 - 2127, 1996、マンテン (Manten), A. ら, カーディオバスキュラー・リサーチ (Cardiovasc. Res.) 40: 389 - 395, 1998)。血漿中の F 1 + 2 の濃度は、脳卒中、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病、および散在性血管内凝固、を含む凝固活性化に関連した何らかの症状の間に上昇しうる。F 1 + 2 は、トロンピンが活性化すると直ぐに血流中に放出される。F 1 + 2 の半減期は血漿中で約 90 分であるが、この長い半減期がトロンピン形成のバーストを隠していると示唆されている (ピアスッチ (Biasucci), L. M. ら, サーキュレーション (Circulation) 93: 2121 - 2127, 1996)。

10

【0117】

顆粒膜蛋白質 - 140、GMP - 140、PADGEM、および CD - 62 P と呼ばれる、P - セレクチンは、血小板および内皮細胞に発現された 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ワイベル - パレード (Wibel - Palade) 体の中に貯蔵される。活性化すると、P - セレクチンは、内皮細胞および血小板の表面に迅速に移行し、好中球および単球と「回転」細胞表面との反応を助長する。P - セレクチンの膜結合形および可溶性が識別されている。可溶性 P - セレクチンは、細胞外 P - セレクチン分子の蛋白質分解、または表面結合した P - セレクチン分子に近接した細胞内細胞骨格の成分の蛋白質分解により、膜結合した P - セレクチン分子を流し出すことにより作られる (フォックス (Fox), J. E., ブラッド・コアギュレーション・アンド・フィブリノリシス (Blood Coagul. Fibrinolysis) 5: 291 - 304, 1994)。さらに、可溶性 P - セレクチンは、N - 末端膜貫通ドメインをコード化しない mRNA から翻訳される (ダンロップ (Dunlop), L. C. ら, ジャーナル・オブ・イクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.) 175: 1147 - 1150, 1992、ジョンストン (Johnston), G. I. ら, ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 265: 21381 - 21385, 1990)。

20

【0118】

活性化された血小板は、膜に結合した P - セレクチンを流し出し、循環系に留まり、P - セレクチンの洗い出しは、血漿 P - セレクチン濃度を約 70 ng/ml だけ上げることができる (マイケルソン (Michelson), A. D. ら, プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 93: 11877 - 11882, 1996)。可溶性 P - セレクチンは、膜結合した P - セレクチンとは異なる立体配座をとることもできる。可溶性 P - セレクチンは、1つの端部に球状ドメインを備えたモノマー性棒状構造を有し、膜結合した分子は、外側に向いた球状ドメインを備えたロゼット構造を形成する (ウシヤマ (Ushiyama), S. ら, ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 268: 15229 - 15237, 1993)。可溶性 P - セレクチンは、白血球と活性化された血小板および内皮細胞との間の反応を妨害することにより炎症および血栓症を調節する重要な役割を果たすことができる (ガンブル (Gamble), J. R. ら, サイエンス (Science) 249: 414 - 417, 1990)。可溶性 P - セレクチンの正常な血漿濃度は、< 200 ng/ml である。血液は、普通、抗凝血剤としてクエン酸を用いて集められるが、血小板の活性化を防止するためにプロスタグランジン E などの添加剤と共に EDTA 血漿を用いた研究もいくつか行われている。EDTA は、クエン酸塩を用いて得られた結果と比肩できる結果を得られる適切な抗凝血剤である。さらに、可溶性 P - セレクチンの血漿濃度は、試料採取操作中に起こりうる血小板の活性化による影響を受けない。血漿可溶性 P - セレクチン濃度は、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の患者ではかなり上昇したが、安定な狭心症の患者では、運動ストレステストの後でも上がらなかった (イケダ (Ikeda), H., ら, サーキュレーション (Circulation) 92: 1

30

40

50

693-1696, 1995、トモダ (Tomoda), H. とアオキ (Aoki), N., アンギオロジー (Angiology) 49: 807-813, 1998、ホルランダ (Hollander), J. E. ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 34: 95-105, 1999、カイキタ (Kaikita), K. ら, サーキュレーション (Circulation) 92: 1726-1730, 1995、イケダ (Ikeda), H., ら, コロナリー・アーテリー・ディジーズ (Coron. Artery Dis.) 5: 515-518, 1994)。急性心筋梗塞の場合の膜結合 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76%、および32%対45%である (ホルランダ (Hollander), J. E. ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 34: 95-105, 1999)。不安定な狭心症+急性心筋梗塞の場合の膜結合 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 (ホルランダ (Hollander), J. E. ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 34: 95-105, 1999)。安定な狭心症よりも不安定な狭心症の患者からの冠状動脈内じゅく腫切除試料において、P-セレクチン発現は大きい (テナグリア (Tenaglia), A. N. ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー (Am. J. Cardiol.) 79: 742-747, 1997)。さらに、血漿可溶性 P-セレクチンは、不安定な狭心症の患者より、急性心筋梗塞の患者の方が、上昇の度合いが大きい。血漿可溶性および膜結合 P-セレクチンは、非インスリン依存性糖尿病およびうつ血性心不全の患者でも上昇する (ノムラ (Nomura), S. ら, トロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thromb. Haemost.) 80: 388-392, 1998、オコナー (O'Connor), C. M. ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー (Am. J. Cardiol.) 83: 1345-1349, 1999)。可溶性 P-セレクチン濃度は、突発性血栓性血小板減少性紫斑病、リウマチ性関節炎、高コレステロール血症、急性脳卒中、アテローム動脈硬化症、高血圧、急性肺炎、結合組織疾患、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、散在性血管内凝固、および慢性腎不全の患者の血漿中で上昇する (カタヤマ (Katayama), M. ら, ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (Br. J. Haematol.) 84: 702-710, 1993、ハツネダログル (Haznedaroglu), I. C. ら, アクタ・ヘマトロジカ (Acta Haematol.) 101: 16-20, 1999、エルテンリ (Ertlenli), I. ら, ザ・ジャーナル・オブ・リウマトロジー (J. Rheumatol.) 25: 1054-1058, 1998、ダビ (Davi), G. ら, サーキュレーション (Circulation) 97: 953-957, 1998、フリンス (Frins), C. J. ら, ストローク (Stroke) 28: 2214-2218, 1997、ブラン (Blann), A. D. ら, トロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thromb. Haemost.) 77: 1077-1080, 1997、ブラン (Blann), A. D. ら, ジャーナル・オブ・ヒューマン・ハイパーテンション (J. Hum. Hypertens.) 11: 607-609, 1997、サカマキ (Sakamaki), F. ら, アメリカン・ジャーナル・オブ・レスピラトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディシン (Am. J. Respir. Crit. Care Med.) 151: 1821-1826, 1995、タケダ (Takeda), I. ら, インターナショナル・アーカイブス・オブ・アレルギー・イムノロジー (Int. Arch. Allergy Immunol.) 105: 128-134, 1994、チョン (Chong), B. H. ら, ブラッド (Blood) 83: 1535-1541, 1994、ボノミニ (Bonomini), M. ら, ネフロン (Nephron) 79: 399-407, 1998)。さらに、血小板活性化を含む何らかの症状は、P-セレクチンの血漿上昇の原因になりうる。P-セレクチンは、血小板の内皮細胞活性化の後、細胞表面に迅速に提供される。膜貫通ドメインを欠いている代替 mRNA から翻訳された可溶性 P-セレクチン

は、この活性化の後細胞外空間に放出される。可溶性P-セレクチンは、直接または間接に、膜結合P-セレクチンを含む蛋白質分解によっても形成される。

【0119】

血漿可溶性P-セレクチンは、開始後4時間に起きるピーク上昇を有するtPAまたは冠状血管形成による治療を受けた急性心筋梗塞の患者の入院時に上がる(シモムラ(Shimomura), H.ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー(Am. J. Cardiol.) 81: 397-400, 1998)。血漿可溶性P-セレクチンは、不安定な狭心症の患者の狭心症発作の後1時間未満に上昇し、濃度は時間と共に低下し、発作開始後5時間以上かけてベースラインに近づいた(イケダ(Ikeda), H.ら, サーキュレーション(Circulation) 92: 1693-1696, 1995)。可溶性P-セレクチンの血漿濃度は、ACSにおいて $1\mu\text{g}/\text{ml}$ に近づくことができる(イケダ(Ikeda), H., ら, コロナリー・アーテリー・ディーズ(Coron. Artery Dis.) 5: 515-518, 1994)。可溶性P-セレクチンの血流内への放出および血流からP-セレクチンの除去についてさらに研究する必要がある。P-セレクチンは、血小板および内皮細胞活性化、血栓および炎症を支える症状の感度のよい、特異的マーカーである。しかし、P-セレクチンは、ACSの特異的マーカーではない。心組織損傷に対して特異的な別のマーカーと併用すると、P-セレクチンは、安定な狭心症から不安定な狭心症および急性心筋梗塞を区別する場合に有用である。さらに、可溶性P-セレクチンは、不安定な狭心症より急性心筋梗塞において大幅に上昇する。発表された研究は、可溶性形のP-セレクチンが、血小板および内皮細胞により、次いで、膜結合P-セレクチンを洗い出すことにより作られることを強調している。これは、蛋白質分解メカニズムにより可能になる。可溶性P-セレクチンは、その血漿濃度が、PF4およびTGなどの血小板活性化のその他のマーカーと同じ程度に血液試料採取操作による影響を受けないので、現在識別された血小板活性化の最も有用なマーカーであることが判明している。

【0120】

トロンピンは、フィブリノーゲンを蛋白質分解してフィブリンを形成し、フィブリンは、最終的には、凝血形成中に架橋したネットワークに統合される。アンチトロンピンI I I (A T I I I) は、トロンピン、因子X I a、因子X I I a、および因子I X a蛋白質分解活性の生理学的調節剤である65 kDaのセリン蛋白質分解酵素阻害剤である。A T I I Iの阻害活性は、ヘパリンの結合に依存する。ヘパリンは、A T I I Iの阻害活性を2桁から3桁だけ高め、A T I I Iにより阻害された蛋白質分解酵素をほとんど瞬間的に不活性化する。A T I I Iは、共有結合性の1:1化学量論的複合体の形成によりA T I I Iの標的蛋白質分解酵素を阻害する。約100 kDaのトロンピン-A T I I I複合体(T A T)の正常血漿濃度は、 $<5\text{ng}/\text{ml}$ (50 pM)である。T A T濃度は、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の患者で、特に突発虚血発作の間に上昇する(ピアスッチ(Biasucci), L. M.ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー(Am. J. Cardiol.) 77: 85-87, 1996、キーナスト(Kienast), J.ら, トロンボシス・アンド・ヘモスタシス(Thromb. Haemost.) 70: 550-553, 1993)。さらに、T A Tは、安定狭心症の患者の血漿中で上がるマンテン(Manten), A.ら, カーディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovasc. Res.) 40: 389-395, 1998)。その他の発表された報告書では、ACSの患者の血漿中のT A T濃度の有意な差は見出されていない(マンテン(Manten), A.ら, カーディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovasc. Res.) 40: 389-395, 1998、ホフマイスター(Hoffmeister), H. M.ら, アセロスクレロシス(Atherosclerosis) 144: 151-157, 1999)。ACSに関連した血漿T A T濃度の変化を決めるためには、さらなる研究が必要である。血漿T A T濃度の上昇は、脳卒中、手術、外傷、散在性血管内凝固、および血栓性血小板減少性紫斑病を含む凝固活性化に関連した何らかの症状と関係がある。T A Tは、ヘパリンの存在下トロンピンの活性化後直ぐに形成され

る。なお、ヘパリンは、この反応の制限因子である。TATの半減期は、血流中で約5分である(ピアスッチ(Biasucci), L.M.ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー(Am. J. Cardiol.) 77: 85-87, 1996)。TAT濃度は、上昇し、15分後に急低下し、凝固活性化後1時間以内にベースラインに戻る。TATの血漿濃度は、約50 ng/mlである(ピアスッチ(Biasucci), L.M.ら, サーキュレーション(Circulation) 93: 2121-2127, 1996)。TATは、凝固活性化、特にトロンビン活性化の特異的マーカーである。

【0121】

フォンビレブラント因子(vWF)は、血小板、巨核細胞、および内皮細胞により作られる血漿蛋白質である。内皮細胞は、220 kDaのモノマーから構成され、これらのモノマーは結合して一連の高分子量マルチマーを形成する。これらのマルチマーは、通常、600-20,000 kDaの範囲の分子量を有する。vWFは、循環凝固因子VIIIを安定化することにより、露出サブ内皮、並びにその他の血小板への血小板の接着を媒介することにより、凝固プロセスに関与している。vWFのA1ドメインは、血小板糖蛋白質Ib-IX-V複合体に結合し、非繊維状コラーゲンのタイプVIおよびA3ドメインは、繊維状コラーゲンのタイプIおよびIIIに結合する(エムスリー(Emsley), J.ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 273: 10396-10401, 1998)。vWF分子に存在するその他のドメインには、血小板と血小板との反応を媒介するインテグリン結合ドメイン、タイプ11Aフォンビレブラント疾患の病因と関係があるように思われる蛋白質分解酵素分解ドメインがある。血小板とvWFの反応は、正常な生理学的条件において血小板とvWFとの間の反応を回避するために厳密に調節される。vWFは、通常、球状にて存在し、普通、血管損傷の部位で見られる、高い剪断応力の条件下で拡大された鎖構造の立体配座の転移を受ける。この立体配座の変化は、この分子の分子内ドメインを露出させ、vWFが血小板と反応することを認める。さらに、剪断応力によりvWFが内皮細胞から放出され、血小板との反応に利用できる多数のvWF分子を作る。vWFの立体配座の変化は、リストセチンおよびポツロセチンのような非生理学的修飾物質の添加により試験管中で誘起されうる(ミヤタ(Miyata), S.ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 271: 9046-9053, 1996)。血管損傷部位において、vWFは、サブ内皮マトリックスにおいてコラーゲンと速やかに結合し、および血小板とほぼ不可逆的に結合し、損傷部位において血管サブ内皮細胞と血小板との間でブリッジを効果的に形成する。事実は、vWFにおける立体配座の変化は、サブ内皮マトリックスとのvWFの反応には必要ではないことも示唆している(シクスマ(Sixma), J.J.およびド・グルート(de Groot), P.G., マヨ・クリニック・プロシーディングス(Mayo Clin. Proc.) 66: 628-633, 1991)。これは、vWFが、血管損傷部位で露出されたサブ内皮マトリックスに結合し、非常に局在的な剪断応力のために立体配座の変化を受け、新たに形成された血栓内に統合される循環血小板に迅速に結合することを示唆している。

【0122】

vWFの総量の測定は、当業者が、総vWF濃度の変化を識別することを認めることになる。この測定は、種々の形のvWF分子の測定により行われる。A1ドメインの測定は、A1ドメインが血小板結合に接近できるので、代替凝固剤状態が存在することを示している、循環系における活性vWFの測定を認めることになる。これに鑑みて、露出A1ドメインおよびインテグリン結合ドメインか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検定法が、血小板と血小板との反応を媒介する場合に利用できるか、または血管サブ内皮細胞への血小板の架橋を媒介する活性vWFの識別を可能にする。これらvWF形のいずれかの測定が、蛋白質分解構造分解ドメインに対して特異的な抗体を用いる検定法で使われる場合は、フォンビレブラント病の存在とは無関係に、患者の種々のvWF形の循環濃度を測定するために検定法が使われることが許される。vWFの正常な

血漿濃度は、5 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、または血小板の凝集により測定した活性は60 - 110%である。特異的な形のvWFの測定は、脳卒中および心血管疾患を含むあらゆる型の血管疾患において重要である。血漿vWF濃度は、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の患者の場合上昇するが、安定な狭心症の場合は上がらないと言われている（ゴト（Goto），S.ら，サーキュレーション（Circulation）99：608 - 613，1999、トソーリス（Tousoulis），D.ら，インターナショナル・ジャーナル・オブ・カーディオロジー（Int. J. Cardiol.）56：259 - 262，1996、ヤズダニ（Yazdani），S.ら，ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー（J. Am. Coll. Cardiol.）30：1284 - 1287，1997、モンタレスコット（Montalescot），G.ら，サーキュレーション（Circulation）98：294 - 299）。

【0123】

vWFの血漿濃度は、内皮細胞の損傷または血小板の活性化と関連しているあらゆる所見と共に上昇する。vWFは、血流に高濃度で存在し、活性化した血小板および内皮細胞から放出される。vWFは、血小板活性化、または血小板活性化および血管損傷部位への接着を支持する症状のマーカーとして最も有効性が大きいようである。vWFの立体配座は、部分的に狭められた血管と関係がある高い剪断応力により変えられることも知られている。血液が狭められた血管を流れる時に、血液は、疾患していないヒトにおいて遭遇する剪断応力よりもかなり高い剪断応力にさらされる。

【0124】

組織因子（TF）は、脳、腎臓、および心臓において、且つ血管周囲の細胞および単球上で転写により調節される様式において発現される45 kDaの細胞表面蛋白質である。TFは、 Ca^{2+} の存在下で因子VIIaと複合体を形成し、TFが膜に結合している場合は生理学的に活性である。この複合体は、蛋白質分解により因子Xを分割し、因子Xaを形成する。TFは、通常、血流から排除される。組織因子は、因子VIIaに結合した可溶性として、または因子VIIaとの複合体として、および因子Xaを含むこともできる組織因子経路阻害剤として血流中で検出される。TFは、マクロファージの表面でも発現され、通常、動脈硬化性斑の中に見られる。TFの正常な血清濃度は、 $< 0.2 \text{ ng}/\text{ml}$ （4.5 pM）である。虚血性心不全の患者では、血漿TF濃度が高い（ファルシアニ（Falciani），M.ら，トロンボシス・アンド・ヘモスタシス（Thromb. Haemost.）79：495 - 499，1998）。TFは、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の患者では高いが、安定な狭心症の患者では高くない（ファルシアニ（Falciani），M.ら，トロンボシス・アンド・ヘモスタシス（Thromb. Haemost.）79：495 - 499，1998、スエフジ（Suefujii），H.ら，アメリカン・ハート・ジャーナル（Am. Heart J.）134：253 - 259，1997、ミスミ（Misumi），K.ら，ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー（Am. J. Cardiol.）81：22 - 26，1998）。さらに、マクロファージ上のTF発現および動脈硬化性斑におけるTF活性は、安定な狭心症よりも不安定な狭心症においてより普通に見られる（ソエジマ（Soejima），H.ら，サーキュレーション（Circulation）99：2908 - 2913，1999、カイキタ（Kaikita），K.ら，アーテリオスクレロシス・トロンボシス・アンド・バスキュラー・パイオロジー（Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.）17：2232 - 2237，1997、アルディッシノ（Ardissoni），D.ら，ランセット（Lancet）349：769 - 771，1997）。

【0125】

安定狭心症対不安定狭心症における血漿TF濃度の差は、統計学的意味はなさそうである。TFの血清濃度の上昇は、外因経路による凝固活性化を生じるか、またはその活性化の結果である何らかの症状と関係がある。これらの症状には、くも膜下の出血、散在性血管内凝固、腎不全、血管炎、および鎌状赤血球疾患が含まれる（ヒラシマ（Hirashima），Y.ら，ストローク（Stroke）28：1666 - 1670，1997、

タカハシ (Takahashi), H. ら, アメリカン・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (Am. J. Hematol.) 46: 333 - 337, 1994、コヤマ (Koyama), T. ら, ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (Br. J. Hematol.) 87: 343 - 347, 1994)。TFは、血管損傷が血管外細胞損傷と結びつくと、直ぐに放出される。虚血性心不全の患者のTFレベルは、発症後2日以内に800 pg/mlを超えることがある (ファルシアニ (Falciani), M. ら, トロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thromb. Haemost.) 79: 495 - 499, 1998)。TFレベルは、慢性期に比べて、急性心筋梗塞の慢性期において低下した (スエフジ (Suefujii), H. ら, アメリカン・ハート・ジャーナル (Am. Heart J.) 134: 253 - 259, 1997)。TFは、外因凝固経路および一般的な凝固亢進症状の活性化に対して特異的なマーカーである。TFは、斑の破裂により生じる血管損傷の感度のよいマーカーである。

【0126】

凝固カスケードは、外因性か内因性経路のいずれかにより活性化される。これらの酵素の経路は、1つの最終共通経路を共有する。共通経路の第1のステップは、因子Xa / 因子Va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分割を含み、活性トロンピンを生じる。トロンピンは、蛋白質分解によりフィブリノーゲンを分割するセリン蛋白質分解酵素である。トロンピンは、まず、フィブリノーゲンからフィブリノペプチドAを除去し、desAAフィブリンモノマーを生じ、このモノマーは、フィブリン分解生成物、フィブリノーゲン分解生成物、desAAフィブリン、およびフィブリノーゲンを含むその他のすべてのフィブリノーゲン誘導蛋白質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、フィブリノーゲン分割の第1の生成物であるので、一般的には可溶性フィブリンと呼ばれるが、因子XIIIaを介した不溶性フィブリン凝血への架橋はなされていない。desAAフィブリンモノマーは、さらに、トロンピンによる蛋白質分解による分割を受けて、フィブリノペプチドBを除去して、desAABBフィブリンモノマーを生じることにもできる。このモノマーは、その他のdesAABBフィブリンモノマーと重合して、可溶性フィブリンまたはトロンバス前駆体蛋白質 (Tp^{PTM}) ととも呼ばれる、可溶性desAABBフィブリンポリマーを形成することができる。Tp^{PTM}は不溶性フィブリンの直接の前駆体であり、「網状」構造を形成しており、新たに形成されたトロンバスに構造的剛さを与える。これに鑑みて、血漿中のTp^{PTM}の測定は、活性凝血形成の直接測定である。

【0127】

Tp^{PTM}の正常な血漿濃度は、< 6 ng/mlである (ラウリノ (Laurino), J. P. ら, アニュアルス・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス (Ann. Clin. Lab. Sci.) 27: 338 - 345, 1997)。アメリカン・バイオジェネティック・サイエンス (American Biogenetics Sciences) は、Tp^{PTM}の検定法を開発 (米国特許第5453359号および第5843690号) し、そのTp^{PTM}検定法は急性心筋梗塞の早期診断、胸痛患者における急性心筋梗塞の除外、および急性心筋梗塞に進行する可能性がある不安定な狭心症の患者の識別に役立つと述べている。その他の研究は、Tp^{PTM}が急性心筋梗塞の患者で、大抵が発症後6時間以内に上昇することを確認した (ラウリノ (Laurino), J. P. ら, アニュアルス・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス (Ann. Clin. Lab. Sci.) 27: 338 - 345, 1997、カービル (Carville), D. G. ら, クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.) 42: 1537 - 1541, 1996)。Tp^{PTM}の血漿濃度は、不安定な狭心症の患者でも上がるが、これらの上昇は、狭心症の重症度および急性心筋梗塞への最終的な進行の指標になるようである (ラウリノ (Laurino), J. P. ら, アニュアルス・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス (Ann. Clin. Lab. Sci.) 27: 338 - 345, 1997)。血漿中のTp^{PTM}の濃度は、理論的には、凝固活性化を生じるか、凝固活性化の結果である、散在性血管内凝固、深部静脈血栓症、うっ血性心不全、

手術、癌、胃腸炎、およびコカイン過量投与を含む何らかの症状の間に上がる（ラウリノ（Laurino），J．P．ら，アニュアルス・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス（Ann．Clin．Lab．Sci．）27：338-345，1997）。Tp^{PTM}は、トロンピン活性化後直ぐに血流中に放出される。Tp^{PTM}は、凝血形成部位において不溶性のフィブリンに迅速に転換されるので、血流中の半減期は短いようである。血漿中のTp^{PTM}の濃度は、急性心筋梗塞発症後3時間以内にピークに達し、発症12時間後には正常値に戻る。Tp^{PTM}の血漿濃度は、CVDにおいて30ng/mlを超えることができる（ラウリノ（Laurino），J．P．ら，アニュアルス・オブ・クリニカル・アンド・ラボラトリー・サイエンス（Ann．Clin．Lab．Sci．）27：338-345，1997）。Tp^{PTM}は、凝固活性化の感度のよい、特異的なマーカーである。Tp^{PTM}は、心組織損傷の特異的なマーカーと共に用いられる場合のみ、急性心筋梗塞の診断に有用であることが証明されている。

10

【0128】

(iii) 急性期反応に関連した代表的なマーカー

ヒト好中球エラスターゼ（HNE）は、通常、好中球のアズール親和性顆粒内に含まれる30kDaのセリン蛋白質分解酵素である。HNEは、好中球が活性化されると放出され、その活性は、循環している α_1 -蛋白質分解酵素阻害剤により調節される。活性化された好中球は、普通、アテローム動脈硬化症の斑において見られ、これらの斑が破裂するとHNEを放出することになる。血漿HNE濃度は、通常、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、50ng/mlであり、これはHNEの正常な濃度は約25ng/ml（0.8nM）であることを示している。HNEの放出も、特異的なHNE誘導フィブリノペプチドである、フィブリノペプチドB₃₀₋₄₃の、血漿における特異的検出により測定することができる。血漿HNEは、冠動脈狭窄症の患者で上がり、その上昇は、単純な斑の患者よりも複雑な斑の患者の方が大きい（コサー（Kosar），F．ら，アンギオロジー（Angiology）49：193-201，1998、アマロ（Amaro），A．ら，ユーロピアン・ハート・ジャーナル（Eur．Heart J．）16：615-622，1995）。血漿HNEは安定狭心症の患者では目だつた上昇はないが、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の入院患者では上がる。即ち、フィブリノペプチドB₃₀₋₄₃を測定すると、急性心筋梗塞の場合よりも、不安定な狭心症の場合の方が濃度が2.5倍高い（ディナーマン（Dinnerman），J．L．ら，ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー（J．Am．Coll．Cardiol．）15：1559-1563，1990、メーラ（Mehra），J．ら，サーキュレーション（Circulation）79：549-556，1989）。血清HNEは、心臓手術、運動誘発筋損傷、巨細胞動脈炎、急性呼吸窮迫症候群、虫垂炎、膵炎、敗血症、喫煙関連肺気腫、およびのう胞性線維症で上昇する（ジェネロー（Genereau），T．ら，ザ・ジャーナル・リウマトロジー（J．Rheumatol．）25：710-713，1998、ムーサー（Mooser），V．ら，アーテリオスクレロシス，トロンボシス，アンド・バスキュラー・バイオロジー（Arterioscler．Thromb．Vasc．Biol．）19：1060-1065，1999、グリーソン（Gleeson），M．ら，ユーロピアン・ジャーナル・オブ・アプライド・フィジオロジー（Eur．J．Appl．Physiol．）77：543-546，1998、ガンド（Gando），S．ら，ザ・ジャーナル・オブ・トラウマ（J．Trauma）42：1068-1072，1997、エリクソン（Eriksson），S．ら，ザ・ユーロピアン・ジャーナル・オブ・サージェリー（Eur．J．Surg．）161：901-905，1995、リラス（Liras），G．ら，レビスタ・エスパニョーラ・エンフェルムダード・ダイジステイバ（Rev．sp．Enferm．Dig．）87：641-652，1995）、エンド（Endo），S．ら，ジャーナル・オブ・インフラメーション（J．Inflamm．）45：136-142，1995、ジャノフ（Janoff），A．，アニュアル・レビュー・オブ・メディシン（Annu．Rev．Med．）36：207-216

20

30

40

50

、1985)。HNEは、血液凝固中にも放出される(プロウ(P low), E. F. およびプレシア(Plesc ia), J., ジャーナル・オブ・トロンボシス・アンド・ヘモスタシス(J. Thromb. Haemost.) 59: 360 - 363, 1988、プロウ(P low), E. F., ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 69: 564 - 572, 1982)。HNEの血清上昇も、好中球の補充および活性化を含む何らかの非特異的感染または炎症症状と関係がありそうである。活性化された好中球がアテローム動脈硬化症の斑に存在するので、斑の破裂による放出が最もありそうである。HNEは、 γ -PIと複合体を形成した後、おそらく、肝臓により排除される。

【0129】

誘導酸化窒素合成酵素(iNOS)は、内皮細胞マクロファージ中の130kDaの細胞質ゾルの蛋白質であり、その発現は、インターフェロン- γ 、インターロイキン-1、インターフェロン-6、および腫瘍壊死因子 α 、およびリポ多糖体を含むサイトカインにより調節される。iNOSは、L-アルギニンからの酸化窒素(NO)の合成を触媒し、酸化窒素の誘導は、NOの大量生産を持続させ、NOは抗菌活性を有し、種々の生理学的所見および炎症所見の媒介物である。iNOSによるNOの産生は、本質的に発現されたNOSにより産生された量の約100倍である(デプレ(Depre), C.ら, カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovasc. Res.) 41: 465 - 472, 1999)。ACSに関連した血漿iNOS濃度の変化について発表された研究はない。iNOSは、冠状アテローム動脈硬化症の斑において発現され、iNOSはパーオキシナイトレートを産生することにより斑の安定性を妨害し、このパーオキシナイトレートは、NOとスーパーオキシドとの生成物であり、血小板の接着と凝集とを高める(デプレ(Depre), C.ら, カルディオバスキュラー・リサーチ(Cardiovasc. Res.) 41: 465 - 472, 1999)。心筋虚血症の間のiNOSの発現は上がらず、急性心筋梗塞と狭心症を区別する場合にiNOSが役立つことを示唆している(ハンマーマン(Hammerman), S. I.ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.) 277: H1579 - H1592, 1999、カエ(Kaye), D. M.ら, ライフ・サイエンス(Life Sci.) 62: 883 - 887, 1998)。血清iNOS濃度の上昇は、肝硬変、鉄欠乏による貧血、または細菌感染を含むマクロファージを活性化させるその他の何らかの症状に関連があるかもしれない(ジメネツ(Jimenez) 30: 670 - 676, 1999、ニ(Ni), Z.ら, キドニー・インターナショナル(Kidney Int.) 52: 195 - 201, 1997)。iNOSは、アテローム動脈硬化症の斑の破裂の結果として血流中に放出され、血流中に増量したiNOSが存在することは、斑の破裂が起きたことだけでなく、血小板の接着を促進するために理想的な環境が創られたことも示している。しかし、iNOSはアテローム動脈硬化症の斑の破裂に対して特異的ではなく、iNOSの発現は非特異的な炎症を発症する間に誘起されうる。

【0130】

リゾホスファチジン(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中に形成されたリゾリン脂質中間体である。LPAは、アシル補酵素Aによるグリセロール-3ホスフェートのアシル化により、低密度リポ蛋白質(LDL)の軽い酸化の間に形成される。LPAは、血管作動特性を有する脂質第2メッセンジャーであり、血小板アクチベータとして作用することができる。LPAは、アテローム動脈硬化症の病変の1つの成分であり、特に最も破裂しがちなコアの中にある(シース(Sie ss), W., プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 96, 6931 - 6936, 1999)。正常な血漿LPA濃度は、540nMである。血清LPAは、腎不全、卵巣癌およびその他の婦人科の癌で上昇する(ササガワ(Sasagawa), T.ら, ジャーナル・オブ・ニュートリショナル・サイエンス・アンド・ビタミンロジー(J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)

10

20

30

40

50

) 44 : 809 - 818 , 1998、ジュ(Xu) , Y.ら , ザ・ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(JAMA) 280 : 719 - 723 , 1998)。不安定な狭心症の場合、LPAは、斑の破裂の直接的結果として最も放出されやすいようである。血漿LPA濃度は、婦人科系癌の患者の場合60 μMを超えることがある(ジュ(Xu) , Y.ら , ザ・ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(JAMA) 280 : 719 - 723 , 1998)。血清LPAは、アテローム動脈硬化症の斑の破裂の有用なマーカーである。

【0131】

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部分の酸化中に形成される。LDLのMDA修飾は、脂質過酸化がない場合に起きるので、MDA修飾LDLは、酸化されたLDLから区別することができる(ホルベット(Holvoet) , P. , アクタ・カーディオロジー(Acta. Cardiol.) 53 : 253 - 260 , 1998)。MDA修飾LDLの正常な血漿濃度は、4 μg/ml (~10 μM)未満である。酸化されたLDLの血漿濃度は、安定な狭心症、不安定な狭心症、および急性心筋梗塞で上昇し、このLDLがアテローム動脈硬化症のマーカーであることを示している(ホルベット(Holvoet) , P. , アクタ・カーディオロジー(Acta. Cardiol.) 53 : 253 - 260 , 1998、ホルベット(Holvoet) , P. , サーキュレーション(Circulation) 98 : 1487 - 1494 , 1998)。血漿MDA修飾LDLは、安定な狭心症では上がらないが、不安定な狭心症および急性心筋梗塞ではかなり上昇する(ホルベット(Holvoet) , P. , アクタ・カーディオロジー(Acta. Cardiol.) 53 : 253 - 260 , 1998、ホルベット(Holvoet) , P. , サーキュレーション(Circulation) 98 : 1487 - 1494 , 1998、ホルベット(Holvoet) , P. , ザ・ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(JAMA) 281 : 1718 - 1721 , 1999)。血漿MDA修飾LDLは、ベータ地中海貧血の患者および腎移植患者で上昇する(リブレア, M. A.ら , ブラッド(Blood) 92 : 3936 - 3942 , 1998、ガネム(Ghanem) , H.ら , キドニー・インターナショナル(Kidney Int.) 49 : 488 - 493 , 1996、ファンデンドルペル(van den Dorpel) , M. A.ら , トランスプラント・インターナショナル・9サプリメント(Transpl. Int. 9 Suppl.) 1 : S54 - S57 , 1996)。さらに、血清MDA修飾LDLは、低酸素症の間に上昇する(バラゴパラクリシュナ(Balagopalakrishna) , C.ら , アドバンシス・イン・イクスペリメンタル・メディシン・アンド・バイオロジー(Adv. Exp. Med. Biol.) 411 : 337 - 345 , 1997)。MDA修飾LDLの血漿濃度は、胸痛の発症から6 - 8時間以内に上昇する。MDA修飾LDL血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者では20 μg/ml (~50 μM)に、不安定な狭心症の患者では15 μg/ml (~40 μM)に近づくことができる(ホルベット(Holvoet) , P. , サーキュレーション(Circulation) 98 : 1487 - 1494 , 1998)。血漿MDA修飾LDLは、マウスにおいて5分未満の半減期を有する(リング(Ling) , W.ら , ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 100 : 244 - 252 , 1997)。MDA修飾LDLは、急性冠動脈症におけるアテローム動脈硬化症の斑の破裂の特異的マーカーであるように思われる。しかし、それは、MDA修飾LDLの血漿濃度の上昇が、斑の破裂または血小板の活性化の結果であるならば、不明確である。最も納得のいく説明は、増量したMDA修飾LDLの存在が、両現象の徴候であることである。MDA修飾LDLは、不安定な狭心症および急性心筋梗塞を安定な狭心症から区別するのに役立つ。

【0132】

コラーゲナーゼ - 1とも呼ばれるマトリックス・メタロプロテイン分解酵素 - 1(MMP - 1)は、41 / 44 kDaの亜鉛およびカルシウム血流蛋白質分解酵素であり、この

酵素は、主として、タイプIコラーゲンを分割するが、コラーゲンタイプII、III、VIIおよびXも分割することができる。活性な41/44kDaの酵素は、なおも活性な22/27kDa形に自己分解することができる。MMP-1は、平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ誘導泡沫細胞、Tリンパ球、および内皮細胞を含む種々の細胞により合成される(ジョンソン(Johnson), J. L.ら, アーテリオスクレロシス, トロンボシス, アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 18:1707-1715, 1998)。その他のMMPと同様に、MMP-1は、損傷後または血管の間の細胞移動の間に起こりうる細胞外マトリックスのリモデリングに含まれる。MMP-1は、自由形またはMMP-1の天然の阻害剤である、TIMP-1との複合体として血流中に存在しうる。MMP-1は、通常、血漿中に<25ng/mlの濃度で存在する。MMP-1は、最も破裂しやすい領域であるアテローム動脈硬化症の斑の肩の領域で検出される(ジョンソン(Johnson), J. L.ら, アーテリオスクレロシス, トロンボシス, アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 18:1707-1715, 1998)。さらに、MMP-1は、心筋再灌流損傷の病因に含まれている(シバタ(Shibata), M.ら, アンギオロジー(Angiology) 50:573-582, 1999)。血清MMP-1は、マスト細胞の脱顆粒を誘発する炎症症状により上げられる。血清MMP-1濃度は、関節炎および全身紅斑性狼瘡の患者で上がる(カイスツァー(Keyszer), G.ら, ツァイトシュリフト・フュール・リユーマトロジー(Z. Rheumatol.) 57:392-398, 1998、カイスツァー(Keyszer), G.ら, ザ・ジャーナル・オブ・リユーマトロジー(J. Rheumatol.) 26:251-258, 1999)。血清MMP-1も、前立腺癌の場合に上昇し、上昇の度合いは、腫瘍の転移可能性に対応する(ベーカー(Baker), T.ら, ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー(Br. J. Cancer) 70:506-512, 1994)。MMP-1の血清濃度は、その他の型の癌の患者でも上昇する。血清MMP-1は、血色素症の患者および慢性ウイルス性肝炎の患者でも低下し、その濃度は重症度とは逆の関係がある(ジョージ(George), D. K.ら, ガッツ(Gut) 42:715-720, 1998、ムラワキ(Murawaki), Y.ら, ジャーナル・オブ・ガストロエンテロロジー・アンド・ヘパトロジー(Gastroenterol. Hepatol.) 14:138-145, 1999)。血清MMP-1は、急性心筋梗塞の後最初の4日は低下し、その後増加に転じ、急性心筋梗塞の発症後2週間でピークに到達する(ジョージ(George), D. K.ら, ガッツ(Gut) 42:715-720, 1998)。

【0133】

ゼラチナーゼAとも呼ばれる、マトリックス・メタロプロテイン分解酵素-2(MMP-2)は、不活性な72kDaの前駆体として合成される亜鉛およびカルシウム結合蛋白質分解酵素である。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のコラーゲンを分割する。MMP-2は、血管平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ誘導泡沫細胞、Tリンパ球、および内皮細胞を含む種々の細胞により合成される(ジョンソン(Johnson), J. L.ら, アーテリオスクレロシス, トロンボシス, アンド・バスキュラー・バイオロジー(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 18:1707-1715, 1998)。MMP-2は、通常、その生理学的調節剤である、TIMP-2との複合体として血漿中に存在する(ムラカワ(Murakawa), Y.ら, ジャーナル・オブ・ヘパトロジー(J. Hepatol.) 30:1090-1098, 1999)。MMP-2の正常な血漿濃度は、<~550ng/ml(8nM)である。MMP-2の発現は、アテローム動脈硬化症の病変内の血管平滑筋において上昇し、MMP-2は斑が不安定な場合に血流中に放出される(カイ(Kai), H.ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー(J. Am. Coll. Cardiol.) 32:368-372, 1998)。さらに、MMP-2は斑の不安定性および破裂への寄与者として関係していた(シャー(

Shah), P. K. ら, サーキュレーション (Circulation) 92: 1565 - 1569, 1995)。血管 MMP-2 濃度は、安定な狭心症、不安定な狭心症、および急性心筋梗塞の患者で上昇し、不安定な狭心症よりも不安定な狭心症および急性心筋梗塞の方が、大幅に上昇した (カイ (Kai), H. ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32: 368 - 372, 1998)。安定な狭心症の患者の場合、トレッドミル運動テスト後の血清 MMP-2 濃度の変化はなかった。血清および血漿の MMP-2 は、胃癌、肝細胞癌、肝硬変、ウロセリアルな癌、リウマチ様関節炎、および肺癌の患者で上昇した (ムラカワ (Murakawa), Y. ら, ジャーナル・オブ・ヘパトロジー (J. Hepatol.) 30: 1090 - 1098, 1999、エンド (Endo), K. ら, アンチキ 10
 キャンサー・リサーチ (Anticancer Res.) 17: 2253 - 2258, 1997、ゴージ (Gohji), K. ら, キャンサー (Cancer) 78: 161 - 171, 1996、グルーバー (Gruber), B. L. ら, クリニカル・イムノロジー・アンド・イムノパソロジー (Clin. Immunol. Immunopathol.) 78: 161 - 171, 1996、ガルビサ (Garbisa), B. L. ら, キャン 20
 サー・リサーチ (Cancer Res.) 52: 4548 - 4549, 1992)。さらに、MMP-2 は、血小板から細胞分可溶成分を、血小板凝集中に、細胞外空間に移行させることもできる (サウィッキ (Sawicki), G. ら, トロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thromb. Haemost.) 80: 836 - 839, 1998)。MMP-2 は、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の患者の血清が入院時に上昇し、最高 20
 レベルは $1.5 \mu\text{g/ml}$ (25nM) 近くになった (カイ (Kai), H. ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32: 368 - 372, 1998)。血清 MMP-2 濃度は、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の両方が発症後 1 - 3 日でピークに達し、1 週間後に正常値に戻り始めた (カイ (Kai), H. ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32: 368 - 372, 1998)。

【0134】

ストロメリシン-1とも呼ばれる、マトリックス・メタロプロテイン分解酵素-3 (MMP-3) は、不活性な 60kDa の前駆体として合成される 45kDa の亜鉛およびカルシウム結合蛋白質分解酵素である。成熟 MMP-3 は、プロテオグリカン、フィブリネクチン、ラミニン、およびタイプ IV コラーゲンを分割するが、タイプ I コラーゲンは分割しない。MMP-3 は、平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ誘導泡沫細胞、Tリンパ球、および内皮細胞を含む多様な細胞により合成される (ジョンソン (Johnson), J. L. ら, アーテリオスクレロシス, トロンボシス, アンド・バスキュラー・バイオロジー (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 18: 1707 - 1715, 1998)。その他の MMP と同様に、MMP-3 は、損傷後または血管間の細胞移動の間に起きる細胞外のマトリックスのリモデリングに含まれる。MMP-3 は、通常、血漿中に $< 125 \text{ng/ml}$ の濃度で存在する。血清 MMP-3 濃度は、年齢と共に上がり、女性よりも男性の方が約 2 倍高い (マニコート (Manicourt), D. H. ら, アースリチス・アンド・リュウマチズム (Arthritis and Rheum.) 37: 1774 - 1783, 1994)。MMP-3 は、最も破裂しやすい領域であるアテローム動脈硬化症の肩の領域に存在し、アテローム動脈硬化症の斑の不安定化に含まれる (ジョンソン (Johnson), J. L. ら, アーテリオスクレロシス, トロンボシス, アンド・バスキュラー・バイオロジー (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.) 18: 1707 - 1715, 1998)。したがって、MMP-3 の濃度は、不安定な狭心症におけるアテローム動脈硬化症の斑の破裂の結果として上昇する。血清 MMP-3 は、マスト細胞の脱顆粒を誘起する炎症症状を上昇させる。血清 MMP-3 の濃度は、関節炎および全身性紅斑性狼瘡の患者で上昇する (ツッカー (Zucker), S. ら, ザ・ジャーナル・オブ・リウマトロジー (J. 30
 40
 50

Rheumatol.) 26:78-80, 1999、カイスツァー (Keyszer), G.ら, ツァイトシュリフト・フュール・リューマトロジー (Z. Rheumatol.) 57:392-398, 1998、カイスツァー (Keyszer), G.ら, ザ・ジャーナル・オブ・リューマトロジー (J. Rheumatol.) 26:251-258, 1999)。血清MMP-3は、前立腺癌およびウロセリアルな癌、および糸球体腎炎の患者でも上昇する (ライン (Lein), M.ら, ウロロゲ (Urologe) A 37:377-381, 1998、ゴージ (Gohji), K.ら, キャンサー (Cancer) 78:2379-2387, 1996、アキヤマ (Akiyama), K.ら, リサーチ・コミュニケーション・イン・モレキュラー・パソロジー・アンド・ファーマコロジー (Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.) 95:115-128, 1997)。MMP-3の血清濃度は、その他の型の癌の患者でも上昇する。血清MMP-3は、血色素症の患者の場合低下する (ジョージ (George), D. K.ら, ガッツ (Gut) 42:715-720, 1998)。

【0135】

ゼラチナーゼとも呼ばれる、マトリックス・メタロプロテイン分解酵素-9 (MMP-9) は、不活性な92kDaの前駆体として合成される84kDaの亜鉛およびカルシウム結合蛋白質分解酵素である。成熟MMP-9は、タイプIおよびVのゼラチン、およびタイプIVおよびVのコラーゲンを分割する。MMP-9は、モノマー、ホモダイマー、および25kDaの₂-マクログロブリン関連蛋白質を有するヘテロダイマーとして存在する (トリーベル (Triebel), S.ら, FEBSレターズ (Lett.) 314:386-388, 1992)。MMP-9は、多様な型の細胞、特に好中球により合成される。MMP-9の正常な血漿濃度は、 $< 35 \text{ ng/ml}$ (400 pM) である。MMP-9の発現は、アテローム動脈硬化症の病変内の血管平滑筋細胞で上昇し、MMP-9は斑が不安定な場合に血流に放出される (カイ (Kai), H.ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32:368-372, 1998)。さらに、MMP-9は、ACSの発症における病原の役割を有する (ブラウン (Brown), D. L.ら, サーキュレーション (Circulation) 91:2125-2131, 1995)。血漿MMP-9濃度は、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の患者ではかなり上がるが、安定な狭心症の患者では上がらない (カイ (Kai), H.ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32:368-372, 1998)。急性心筋梗塞の患者における上昇は、これらの患者が不安定な狭心症を罹患した患者であることを示している。MMP-9の血漿濃度の上昇も、急性心筋梗塞よりも不安定な狭心症の方が大きい。安定な狭心症の患者では、トレッドミル運動テスト後の血漿MMP-9のレベルの有意な変化はなかった (カイ (Kai), H.ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32:368-372, 1998)。血漿MMP-9は、リウマチ様関節炎、敗血症ショック、巨細胞動脈炎および種々の癌の患者で上昇する (グルーバー (Gruber), B. L.ら, クリニカル・イムノロジー・アンド・イムノパソロジー (Clin. Immunol. Immunopathol.) 78:161-171, 1996、ナカムラ (Nakamura), T.ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・ザ・メディカル・サイエンス (Am. J. Med. Sci.) 316:355-360, 1998、ブランカート (Blankaert), D.ら, ジャーナル・オブ・アクワイアド・イミュン・デフィシェンシー・シンドローム・アンド・ヒューマン・レトロウイルス学 (J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology) 18:203-209, 1998、エンド (Endo), K.ら, アンチキャンサー・リサーチ (Anticancer Res.) 17:2253-2258, 1997、ハヤサカ (Hayasaka) A.ら, ヘパトロジー (Hepatology) 24:1058-1062, 1996、ムーア (Moore), D. H.ら, ジャインコロジック・オンコロジー (Gynecol. Oncol.) 65:78-8

2, 1997、ソルビ (Sorbi), D.ら, アーサリチス・アンド・リウマチズム (Arthritis Rheum.) 39: 1747 - 1753, 1996、イイザサ (Iizasa), T.ら, クリニカル・キャンサー・リサーチ (Clin. Cancer Res.) 5: 149 - 153, 1999)。さらに、血漿 MMP - 9 濃度は、脳卒中および脳出血の場合に上昇する (マンブライス (Mun-Bryce), S. およびローゼンバーグ (Rosenberg), G. A., ジャーナル・オブ・セレブラル・ブラッド・フロー・アンド・メタボリズム (J. Cereb. Blood Flow Metab.) 18: 1163 - 1172, 1998、ロマンック (Romanic), A. M.ら, ストローク (Stroke) 29: 1020 - 1030, 1998、ローゼンバーグ (Rosenberg), G. A., ジャーナル・オブ・ニューロトラウマ (J. Neurotrauma) 12: 833 - 842, 1995)。MMP - 9 は、不安定な狭心症および急性心筋梗塞の患者の血清で入院中に上昇し、最高レベルは 150 ng/ml (1.7 nM) に近い (カイ (Kai), H.ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32: 368 - 372, 1998)。血清 MMP - 9 の濃度は、不安定な狭心症の患者が入院時に最高になり、濃度は治療後次第に低下し、発症後 1 週間以上してベースラインに近づいた (カイ (Kai), H.ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 32: 368 - 372, 1998)。

10

20

30

40

50

【0136】

マトリックス・メタロプロテイン分解酵素とそれらの阻害剤との間のバランスは、腫瘍の侵入および転移に影響を及ぼす重要な要因である。TIMPファミリーは、メタロプロテイン分解酵素を阻害する1種の小さな (21 - 28 kDa) 関連蛋白質である。メタロプロテイン分解酵素1 (TIMP1) は、ヒトの骨の正常な発達における骨のモデリングおよびリモデリングの調節に含まれると言われており、多形性X染色体不活性化を実証している急性骨髄性白血病の侵入表現型に含まれる。TIMP1は、mmp - 1、mmp - 2、mmp - 3、mmp - 7、mmp - 8、mmp - 9、mmp - 10、mmp - 11、mmp - 12、mmp - 13およびmmp - 16に作用することが知られている。メタロプロテイン分解酵素2 (TIMP2) の組織阻害剤は、メタロプロテイン分解酵素 (コラーゲナーゼなど) と複合体を形成し、不可逆的にそれらを不活性化する。TIMP2は、mmp - 1、mmp - 2、mmp - 3、mmp - 7、mmp - 8、mmp - 9、mmp - 10、mmp - 13、mmp - 14、mmp - 15、mmp - 16およびmmp - 19に作用することが知られている。2つの交互に接合した形態は、SYN - 4と結合し、急性骨髄性白血病の侵入表現型に含まれる。その他一部のTIMP遺伝子ファミリー・メンバーの誘導的発現と異なり、この遺伝子の発現は大いに構成的である。メタロプロテイン分解酵素 (TIMP3) の組織阻害剤は、マトリックス・メタロプロテイン分解酵素活性を抑制し、腫瘍の増殖、血管形成、侵入、および転移を抑制することができる。TIMP - 3の喪失は、腫瘍形成に関連づけられる。

【0137】

インター - アルファ - 阻害剤 (I - I) ファミリーは、4つの血漿蛋白質 (フリーピクニン, I - I (またはインター - トリプシン阻害剤),) プレ - アルファ - 阻害剤 (P - I) およびインター - 様阻害剤 (I - LI) を包含する。最後の3つの蛋白質の各々は、H1、H2およびH3と呼ばれる1つ以上のユニークな重い (H) 鎖を有する1つのピクニン鎖の別の集合である。3つのH鎖およびピクニン鎖は、4つの別のmRNAによりコード化される。これらの分子および鎖、並びに対応するmRNAは、軽症または重症の急性感染症有無の両患者からの血清において定量化された。急性炎症では、H2およびピクニン鎖は、下方に調節されると報告されており、関連分子 (I - IおよびI - LI) は負の急性期蛋白質として挙動し、一方、H3鎖は上方に調節され、対応する (P - I) 分子は正の急性期蛋白質である。H1遺伝子は、炎症症状により影響を受けないようである。例えば、サライアー (Salier) ら、ザ・

バイオケミカル・ジャーナル (B i o c h e m . J) 3 1 5 : 1 - 9 , 1 9 9 6 、 を 参 照 の こと、 国 際 公 開 第 0 1 / 6 3 2 8 0 号 も 参 照 の こと。

【 0 1 3 8 】

(i v) 炎 症 に 関 連 し た 代 表 的 マーカ-

肺 表 面 活 性 物 質 蛋 白 質 D (S P - D) は、 4 3 k D a の 蛋 白 質 と し て 合 成 さ れ、 呼 吸 上 皮 に よ り 肺 の 空 気 空 間 中 に 分 泌 さ れ る。 肺 胞 の レ ベ ル に お い て、 S P - D は 構 成 的 に 合 成 さ れ、 タ イ プ I I 肺 胞 細 胞 に よ り 分 泌 さ れ る。 コ ラ - ゲ ン の カ ル シ ウ ム 依 存 性 レ ク チ ン (ま た は コ レ ク チ ン) で あ る S P - D は、 多 種 多 様 な 微 生 物 に よ り 発 現 さ れ た 表 面 複 合 糖 質 お よ び 種 々 の 複 合 有 機 抗 原 の 表 面 に 結 び つ い た オ リ ゴ 糖 に 結 合 す る。 S P - D は、 特 に、 マ ク ロ フ ァ - ジ、 好 中 球、 お よ び リ ン パ 球 の 表 面 で 発 現 さ れ た 糖 複 合 体、 お よ び そ の 他 の 分 子 と も 反 応 す る。 さ ら に、 S P - D は、 特 異 的 に 界 面 ア ク チ ベ - タ と 結 合 し た 脂 質 と 結 合 し、 試 験 管 で ホ ス フ ァ チ ジ ル イ ノ シ ト - ル を 含 む、 脂 質 混 合 物 の 組 織 に 影 響 を 及 ぼ す こ と が で き る。 S P - D 欠 陥 ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク ・ マ ウ ス は、 界 面 ア ク チ ベ - タ 脂 質 の 異 常 な 蓄 積 を 示 し、 呼 吸 ウ イ ル ス お よ び 細 菌 リ ポ 多 糖 類 を 用 い た 挑 戦 に 対 し て 異 常 に 反 応 す る と い う 観 察 は、 こ れ ら 多 様 な 試 験 管 活 性 と 一 致 す る。 S P - D 欠 陥 マ ウ ス の 肺 か ら 単 離 さ れ た マ ク ロ フ ァ - ジ の 表 現 型 は 変 更 さ れ、 異 常 な オ キ シ ダ ン ト 代 謝 お よ び / ま た は 増 加 し た メ タ ロ プ ロ テ イ ン 分 解 酵 素 の 発 現 が、 肺 気 腫 の 発 症 に 寄 与 す る。 S P - D の 発 現 は、 多 く の 形 の 肺 損 傷 に 反 応 し て 増 加 し、 適 切 に オ リ ゴ マ - 化 さ れ た S P - D の 欠 陥 蓄 積 は 多 様 な ヒ ト 肺 疾 患 の 病 因 に 寄 与 す る (ク ラ ウ チ (C r o u c h) 1 : 9 3 - 1 0 8 , 2 0 0 0) 。

10
20

【 0 1 3 9 】

イ ン タ - ロ イ キ ン (I L) は、 サ イ ト カ イ ン と し て 知 ら れ た 比 較 的 大 き な 種 類 の ポ リ ペ プ チ ド で あ る。 こ れ ら は、 免 疫 系 の 種 々 の 細 胞 間 で 信 号 を 伝 え る メ ッ セ ン ジ ャ - 分 子 で あ る。 こ れ ら の 分 子 は、 大 抵、 マ ク ロ フ ァ - ジ お よ び リ ン パ 球 に よ り 分 泌 さ れ、 こ れ ら の 産 生 は 損 傷 ま た は 感 染 に 応 じ て 誘 導 さ れ る。 こ れ ら の 作 用 は、 免 疫 系 並 び に そ の 他 の 組 織 お よ び 肝 臓 と 脳 と を 含 む 臓 器 の そ の 他 の 細 胞 に 影 響 す る。 記 述 さ れ た 少 なく と も 1 8 の I L が あ る。 本 発 明 に お い て マーカ- と し て 使 用 す る の に 好 ま し い の は、 I L - 1 、 I L - 2 、 I L - 4 、 I L - 6 、 I L - 8 、 I L - 1 0 、 I L - 1 2 、 I L - 1 3 、 I L - 1 8 、 I L - 2 2 、 I L - 2 3 、 お よ び I L - 2 5 で あ る。 下 記 表 に は、 代 表 的 な イ ン タ - ロ イ キ ン の 選 択 さ れ た 機 能 を 示 す。

30

【 0 1 4 0 】

【 表 1 】

代 表 的 な イ ン タ - 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 反 応 の 亢 進	+	+	+	+	-	+
免 疫 反 応 の 抑 制	-	-	-	-	-	+
炎 症 の 亢 進	+	+	+	+	+	-
炎 症 の 抑 制	-	-	-	-	-	+
細 胞 増 殖 の 促 進	+	+	-	-	-	-
走 化 性 (ケモカイン)	-	-	-	-	+	-
発 熱 原 性	+	-	-	-	-	-

40

【 0 1 4 1 】

イ ン タ - ロ イ キ ン - 1 (I L - 1) は 1 7 k D a の 分 泌 さ れ た 炎 症 促 進 サ イ ト カ イ ン で あ り、 こ の サ イ ト カ イ ン は、 急 性 期 反 応 に 含 ま れ、 多 く の 疾 患 の 病 因 媒 介 体 で あ る。 I L - 1 は、 通 常、 マ ク ロ フ ァ - ジ お よ び 上 皮 細 胞 に よ り 産 生 さ れ る。 I L - 1 は、 ア ポ ト - シ ス を 受 け て い る 細 胞 か ら も 放 出 さ れ る。 I L - 1 の 正 常 な 血 清 濃 度 は、 < 3 0 p g / m l (1 . 8 p M) で あ る。 理 論 的 に は、 I L - 1 は 不 安 定 な 狭 心 症 お よ び 急 性 心 筋 梗 塞 に お け る C R P な ど の そ の 他 の 急 性 期 蛋 白 質 よ り も 早 く 上 昇 す る。 こ れ は、 I L - 1 は 急 性 期 反 応 に 早 く か ら 関 与 し て い る た め で あ る。 さ ら に、 I L - 1 は 虚 血 症 の 初 期 段 階 に お い て 活 性 化 さ れ る ア ポ ト - シ ス を 受 け て い る 細 胞 か ら 放 出 さ れ る。 こ れ に

50

鑑みて、ACSと関連した血漿IL-1濃度の上昇は、高感度の検定法を用いた研究をさらに行う必要がある。血漿IL-1濃度の上昇は、外傷および感染などの炎症促進症状における急性期の反応と関連がある。IL-1は、5分と4時間からなる生理学的に二相の半減期を有する(クド(Kudo),ら, キャンサー・リサーチ(Cancer Res.) 50:5751-5755, 1990)。IL-1は、炎症反応の活性化またはアポトーシスにより細胞外の環境に放出される。

【0142】

インターロイキン-1受容体阻害剤(IL-1ra)は、主として、肝細胞、上皮細胞、単球、マクロファージ、および好中球において発現されたIL-1ファミリーの17kDaのメンバーである。IL-1raは、交互スプライシングにより作られた、細胞内と細胞外との両方の形態を有する。IL-1raは、生理学的IL-1活性の調節に参与していると考えられる。IL-1raは、IL-1の様な生理学的活性は有しないが、IL-1とIL-1との結合を遮断し、これらの生物活性を阻害し、IL-1の親和性に類似した親和性を有するT細胞および線維芽細胞上にIL-1受容体を結合することができる(ストックマン(Stockman), B. J.ら, バイオケミストリー(Biochemistry) 31:5237-5245, 1992、アイゼンベルク(Eisenberg), S. P.ら, プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 88:5232-5236, 1991、カーター(Carter), D. B.ら, ネチャー(Nature) 344:633-638, 1990)。IL-1raは、通常、血漿中でIL-1よりも高濃度で存在し、IL-1raのレベルは、IL-1よりも疾患重症度との相関が良好であることが示唆されている(ピアスッチ(Biasucci), L. M.ら, サーキュレーション(Circulation) 99:2079-2084, 1999)。さらに、IL-1raは、急性期蛋白質であるという所見がある(ガベイ(Gabay), C.ら, ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 99:2930-2940, 1997)。IL-1raの正常な血漿濃度は、 $< 200 \text{ pg/ml}$ (12 pM)である。IL-1raの血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者および急性心筋梗塞、死亡または難治性狭心症に進行する不安定な狭心症の患者では上昇する(ピアスッチ(Biasucci), L. M.ら, サーキュレーション(Circulation) 99:2079-2084, 1999、ラチーニ(Latini), R.ら, ジャーナル・オブ・カーディオバスキュラー・ファーマコロジー(J. Cardiovasc. Pharmacol.) 23:1-6, 1994)。さらに、IL-1raは、合併症のない急性心筋梗塞に比べて重症の急性心筋梗塞でかなり上昇した(ラチーニ(Latini), R.ら, ジャーナル・オブ・カーディオバスキュラー・ファーマコロジー(J. Cardiovasc. Pharmacol.) 23:1-6, 1994)。IL-1raの血漿濃度の上昇は、感染、外傷および関節炎を含む炎症または急性期の反応の活性化を含む何らかの症状と関連がある。IL-1raは、炎症促進症状において血流中に放出され、IL-1raは、急性期の反応に参与する時も放出される。IL-1raの血流からの排除は、主に、腎臓および肝臓で行われるようである(キム(Kim), D. C.ら, ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス(J. Pharm. Sci.) 84:575-580, 1995)。IL-1raの濃度は、不安定な狭心症の患者の血漿中で発症後24時間以内に上昇し、これらの上昇は発症後2時間以内に明らかになることさえある(ピアスッチ(Biasucci), L. M.ら, サーキュレーション(Circulation) 99:2079-2084, 1999)。不安定な狭心症が重篤に進行した患者では、IL-1raの血漿濃度は、入院時のレベルよりも発症後48時間頃が比較的高く、経過が順調な患者ではこの濃度は低下した(ピアスッチ(Biasucci), L. M.ら, サーキュレーション(Circulation) 99:2079-2084, 1999)。さらに、不安定な狭心症と関連したIL-1raの血漿濃度は、約 1.4 ng/ml (80 pM)である。IL-1raの血漿濃度の変化は、疾患の重症度と関係があ

10

20

30

40

50

るように思われる。さらに、IL-1raは、炎症促進症状におけるIL-1の放出と共にまたはIL-1の放出後直ぐに放出されるようであり、IL-1raは、IL-1よりも高い濃度で存在する。これは、IL-1raは、IL-6の産生を検出するIL-1活性の有用な間接的マーカーであることを示している。

【0143】

インターロイキン-6 (IL-6) は、造血ファミリー炎症促進サイトカインである20 kDaの分泌蛋白質である。IL-6は、急性期の反応物であり、接着分子を含む種々の蛋白質の合成を刺激する。IL-6の主要な機能は、血液蛋白質の急性期の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、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の正常な血清濃度は、 $< 3 \text{ pg/ml}$ (0.15 pM) である。IL-6の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の患者で上昇し、急性心筋梗塞の方が上がりかたが激しい(ピアスッチ (Biasucci), L.M.ら, サーキュレーション (Circulation) 94: 874-877, 1994、マンテン (Mantén), A.ら, カーディオバスキュラー・リサーチ (Cardiovasc. Res.) 40: 389-395, 1998、ピアスッチ (Biasucci), L.M.ら, サーキュレーション (Circulation) 99: 2079-2084, 1999)。IL-6は、安定な狭心症の患者では、血漿中で顕著に上がることはない(ピアスッチ (Biasucci), L.M.ら, サーキュレーション (Circulation) 94: 874-877, 1994、マンテン (Mantén), A.ら, カーディオバスキュラー・リサーチ (Cardiovasc. Res.) 40: 389-395, 1998)。さらに、IL-6の濃度は、重症化する不安定な狭心症の患者の血漿中で発症から48時間にわたり増加するが、経過が順調な場合は低下する(ピアスッチ (Biasucci), L.M.ら, サーキュレーション (Circulation) 99: 2079-2084, 1999)。これは、IL-6が、疾患の進行の有用な指標になることを示している。IL-6の血漿上昇は、外傷、感染、または急性期の反応を検出するその他の疾患などの非特異的な炎症促進症状に関連している。IL-6の半減期は、血流中で4.2時間であり、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の後では延びる(マンテン (Mantén), A.ら, カーディオバスキュラー・リサーチ (Cardiovasc. Res.) 40: 389-395, 1998)。IL-6の血漿濃度は、急性心筋梗塞発症後9-12時間以内に上昇し、 100 pg/ml に近づくことができる。不安定な狭心症の患者のIL-6の血漿濃度は、おそらく、傷害の重症度により、発症後72時間でピークレベルに上昇した(ピアスッチ (Biasucci), L.M.ら, サーキュレーション (Circulation) 94: 874-877, 1996)。

【0144】

インターロイキン-8 (IL-8) は、単球により産生された6.5 kDaのケモカインである。IL-8は、走化性および好中球およびT細胞の活性化を誘起する。

【0145】

腫瘍壊死因子 (TNF) は、急性期反応に関与し、多くの疾患の病因媒介体である分泌された17 kDaの炎症促進サイトカインである。TNFは、通常、マクロファージおよび天然キラー細胞により産生される。TNFは、73および172の位置でグリコシル化された185個のアミノ酸からなる蛋白質である。TNFは、212個のアミノ酸からなる前駆体蛋白質として合成される。単球は、21.5-28 kDaの分子量を有するTNFの少なくとも5種類の分子形を発現する。これらは、主として、グリコシル化およびホスホリル化などの翻訳後の変化による違いがある。TNFの正常な血清濃度は、 $< 40 \text{ pg/ml}$ (2 pM) である。TNFの血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者で上がり、不安定な狭心症の患者でわずかに上がる(リ (Li), D.ら, アメリカン・ハート・ジャーナル (Am. Heart J.) 137: 1145-1152, 1999、スクアドリト (Squadrito), F.ら, インフラメーション・リサーチ (Inflamm. Res.) 45: 14-19, 1996、ラチーニ (Latini), R.

ら, ジャーナル・オブ・カーディオバスキュラー・ファーマコロジー (J . C a r d i o v a s c . P h a r m a c o l .) 23 : 1 - 6 , 1994、カールシュテット (C a r l s t e d t) , F . ら, ジャーナル・オブ・インターナル・メディシン (J . I n t e r n . M e d .) 242 : 361 - 365 , 1997)。TNF の血漿濃度の上昇は、外傷、脳卒中、および感染を含む何らかの炎症促進症状と関係がある。TNF の半減期は、血流中で約1時間であり、TNF は発症後直ぐに循環系から除去されることを示している。急性心筋梗塞の患者では、TNF は、胸痛発症後4時間上昇し、発症後48時間以内に正常レベルまで次第に低下した (リ (L i) , D . ら, アメリカン・ハート・ジャーナル (A m . H e a r t J .) 137 : 1145 - 1152 , 1999)。急性心筋梗塞患者の血漿中のTNF の濃度は、300 pg / ml (15 p M) を超えた (スクアドリト (S q u a d r i t o) , F . ら, インフラメーション・リサーチ (I n f l a m m . R e s .) 45 : 14 - 19 , 1996)。単球によるTNF の放出は、石炭労働者の塵肺症の悪化にも関係していた (シン (S c h i n s) およびボルム (B o r m) , オキュペーションナル・アンド・エンバイロンメンタル・メディシン (O c c u p . E n v i r o n . M e d .) 52 : 441 - 450 (1995))。

10

20

30

40

50

【0146】

CD54とも呼ばれる、可溶性細胞間接着分子 (s I C A M - 1) は、85 - 110 k D a の細胞表面結合免疫グロブリン様インテグリン・リガンドであり、これは白血球の補充と移動の間に抗原提示細胞および内皮細胞への白血球の結合を促進する作用がある。s I C A M - 1 は、通常、血管内皮細胞、造血幹細胞および非造血幹細胞により産生され、これらの細胞は腸および表皮に存在している。s I C A M - 1 は、細胞死または蛋白質分解活性の結果として細胞表面から放出されうる。s I C A M - 1 の正常な血漿濃度は、約250 ng / ml (2 . 9 n M) である。s I C A M - 1 の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の患者ではかなり上昇するが、安定な狭心症では上昇しない (ペレガッタ (P e l l e g a t t a) , F . ら, ジャーナル・オブ・カーディオバスキュラー・ファーマコロジー (J . C a r d i o l . P h a r m a c o l .) 30 : 455 - 460 , 1997、ミワ (M i w a) , K . ら, カーディオバスキュラー・リサーチ (C a r d i o v a s c . R e s .) 36 : 37 - 44 , 1997、ガイサス (G h a i s a s) , N . K . ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー (A m . J . C a r d i o l .) 80 : 617 - 619 , 1997、オガワ (O g a w a) , H . ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー (A m . J . C a r d i o l .) 83 : 38 - 42 , 1999)。さらに、I C A M - 1 は、アテローム動脈硬化症の斑および病変を形成しやすい領域において発現され、I C A M - 1 は斑が破裂した時に血流中に放出される (イヤマ (I i y a m a) , K . ら, サーキュレーション・リサーチ (C i r c . R e s .) 85 : 199 - 207 , 1999、テナグリア (T e n a g l i a) , A . N . ら, ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー (A m . J . C a r d i o l .) 79 : 742 - 747 , 1997)。s I C A M - 1 の血漿濃度の上昇は、虚血発作、頭部外傷、アテローム動脈硬化症、癌、子癇前症、多発性硬化症、のう胞性線維症、およびその他の非特異的炎症病状と関係がある (キム (K i m) , J . S . , ジャーナル・オブ・ザ・ニューロロジカル・サイエンシズ (J . N e u r o l . S c i .) 137 : 69 - 78 , 1996、ラスコビッチ (L a s k o w i t z) , D . T . ら, ジャーナル・オブ・ストローク・セラプロバスキュラー・ディージェイズ (J . S t r o k e C r e b r o v a s c . D i s .) 7 : 234 - 241 , 1998)。s I C A M - 1 の血漿濃度は、急性心筋梗塞および不安定な狭心症の急性段階の間に上昇する。血漿 s I C A M - 1 の上昇は、急性心筋梗塞が発症してから9 - 12時間の間にそのピークに達し、24時間以内に正常なレベルに戻る (ペレガッタ (P e l l e g a t t a) , F . ら, ジャーナル・オブ・カーディオバスキュラー・ファーマコロジー (J . C a r d i o l . P h a r m a c o l .) 30 : 455 - 460 , 1997)。s I C A M - 1 の血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者において、700 ng / ml (8 n M) に近づくことができる (ペレガッタ (P e l l e g a t t a) , F . ら, ジャーナル・オブ・カーディオバスキュラー・

ファーマコロジー (J . C a r d i o l . P h a r m a c o l .) 3 0 : 4 5 5 - 4 6 0 , 1 9 9 7) 。 s I C A M - 1 は、心筋梗塞および不安定な狭心症の血漿中で上昇するが、s I C A M - 1 はこれらの疾患に対して特異的ではない。しかし、血漿上昇は安定な狭心症とは関係がないので、s I C A M - 1 は、安定な狭心症から急性心筋梗塞および不安定な狭心症を区別する場合に有用なマーカーである。興味深いことに、I C A M - 1 は、アテローム動脈硬化症の斑の中に存在し、斑が破裂すると血流中に放出される。追加の I C A M 分子は、血液中にも存在する I C A M - 2 (C D 1 0 2 と呼ばれる) および I C A M - 3 (C D 5 0 と呼ばれる) を含めて、当該分野で周知である。

【 0 1 4 7 】

C D 1 0 6 と呼ばれる血管細胞接着分子 (V C A M) は、1 0 0 - 1 1 0 k D a 細胞表面結合免疫グロブリン様インテグリン・リガンドであり、これは、リンパ球補充中に、抗原提示細胞への B リンパ球および発達中の T リンパ球の結合を促進する。V C A M は、通常、血管およびリンパ管、心臓、およびその他の体腔を裏打ちする内皮細胞により産生される。V C A M - 1 は、細胞死の間に、または蛋白質分解活性の結果として、細胞表面から放出されうる。s V C A M の正常な血清濃度は、約 6 5 0 n g / m l (6 . 5 n M) である。s V C A M の血漿濃度は、急性心筋梗塞、不安定な狭心症、および安定な狭心症の患者でわずかに上がる (ムルビヒル (M u l v i h i l l) , N . ら , ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー (A m . J . C a r d i o l .) 8 3 : 1 2 6 5 - 1 2 6 7 , 1 9 9 7 、ガイサス (G h a i s a s) , N . K . ら , ジ・アメリカン・ジャーナル・オブ・カーディオロジー (A m . J . C a r d i o l .) 8 0 : 6 1 7 - 6 1 9 , 1 9 9 7) 。しかし、s V C A M - 1 は、アテローム動脈硬化病変において発現され、その血漿濃度はアテローム動脈硬化症の程度と相関づけることができる (イイヤマ (I i y a m a) , K . ら , サーキュレーション・リサーチ (C i r c . R e s .) 8 5 : 1 9 9 - 2 0 7 , 1 9 9 9 、ピーター (P e t e r) , K . ら , アーテリオスクレロシス , トロンボシス , アンド・パスキュラー・バイオロジー (A r t e r i o s c l e r . T h r o m b . V a s c . B i o l . 1 7 : 5 0 5 - 5 1 2 , 1 9 9 7) 。s V C A M - 1 の血漿濃度の上昇は、虚血発作、糖尿病、血管損傷、およびその他の非特異的炎症病状と関係がある (ビッチ (B i t s c h) , A . ら , ストローク (S t r o k e) 2 9 : 2 1 2 9 - 2 1 3 5 , 1 9 9 8 、オツキ (O t s u k i) , M . ら , ダイアビーツ (D i a b e t e s) 4 6 : 2 0 9 6 - 2 1 0 1 , 1 9 9 7 、バンクス (B a n k s) , R . E . ら , ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (B r . J . C a n c e r) 6 8 : 1 2 2 - 1 2 4 , 1 9 9 3 、スタイナー (S t e i n e r) , M . ら , トロンボシス・アンド・ヘモスタシス (T h r o m b . H a e m o s t .) 7 2 : 9 7 9 - 9 8 4 , 1 9 9 4 、アウストグレン (A u s t g u l e n) , R . ら , ユーローピアン・ジャーナル・オブ・オブステトリックス・ガイニコロジー・アンド・レプロダクティブ・バイオロジー (E u r . J . O b s t e t . G y n e c o l . R e p r o d . B i o l .) 7 1 : 5 3 - 5 8 , 1 9 9 7) 。

【 0 1 4 8 】

単球走化性蛋白質 - 1 (M C P - 1) は、単球および好塩基球を引き付けるが、好中球または好酸球を引き付けない、1 0 k D a の走化性因子である。M C P - 1 は、通常、モノマー形とホモダイマー形との間で平衡状態にあり、単球および血管内皮細胞により産生され、分泌される (ヨシムラ (Y o s h i m u r a) , T . ら , F E B S レターズ (L e t t e r s) 2 4 4 : 4 8 7 - 4 9 3 , 1 9 8 9 、リ (L i) , Y . S . ら , モレキュラー・アンド・セルラー・バイオケミストリー (M o l . C e l l . B i o c h e m .) 1 2 6 : 6 1 - 6 8 , 1 9 9 3) 。M C P - 1 は、乾せん、リウマチ様関節炎、およびアテローム動脈硬化症を含む単球浸潤を含む種々の疾患の病因に関係していた。血漿中の M C P - 1 の正常な濃度は、 $< 0 . 1 \text{ ng/ml}$ である。M C P - 1 の血漿濃度は、急性心筋梗塞の患者で上昇し、不安定な狭心症の患者の血漿において上昇し、安定な狭心症の場合は上昇しない (ソエジマ (S o e j i m a) , H . ら , ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J . A m . C o l l . C a r d i o l .) 3 4

: 983 - 988, 1999、ニシヤマ (Nishiyama), K.ら, ジャパニーズ・サーキュレーション・ジャーナル (Jpn. Circ. J.) 62: 710 - 712, 1998、マツモリ (Matsumori), A.ら, ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・セルラー・カーディオロジー (J. Mol. Cell. Cardiol.) 29: 419 - 423, 1997)。興味深いことに、MCP-1は、アテローム動脈硬化症の間動脈壁内への単球の補充にも関与している。MCP-1の血清濃度の上昇は、アルコール性肝疾患、間質肺疾患、敗血症、および全身性紅斑性狼瘡を含む炎症関連の種々の症状と関係している (フッシャー (Fisher), N. C.ら, ガッツ (Gut) 45: 416 - 420, 1999、スガ (Suga), M.ら, ユーローピアン・レスピラトリ・ジャーナル (Eur. Respir. J.) 14: 376 - 382, 1999、ボシンク (Bossink), A. W.ら, ブラッド (Blood) 86: 3841 - 3847, 1995、カネコ (Kaneko), H.ら, ジャーナル・オブ・リウマトロジー (J. Rheumatol.) 26: 568 - 573, 1999)。MCP-1は、単球および内皮細胞を活性化すると血流中に放出される。急性心筋梗塞の患者からの血漿のMCP-1の濃度は、ほぼ1 ng/ml (100 pM) であると報告されており、1ヶ月間上昇した状態を続ける (ソエジマ (Soejima), H.ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・カレッジ・オブ・カーディオロジー (J. Am. Coll. Cardiol.) 34: 983 - 988, 1999)。MCP-1は、単球の移動を含む炎症促進症状の存在に関する特異的マーカーである。

10

20

30

【0149】

マクロファージ移動阻害因子 (MIF) は、細胞媒介性免疫、免疫調節、および炎症に関与したリンホカインである。MIFは、糖質コルチコイドの抗炎症作用を抑制することにより、患者の防御においてマクロファージ機能を調節する役割を果たしている。単球およびマクロファージは、内毒素 (リポ多糖類、即ちLPS) またはサイトカイン腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターフェロン (IFN) による刺激の後MIFの有意な供給源になると報告されている。MIFは、IFN (8, 9) と併用された場合TNF および酸化窒素を産生するためにマクロファージを刺激して、特定の炎症促進作用を媒介することも記述されている。TNF およびIL-1 と同様に、MIFは内毒素血症に対する患者の反応において中心的な役割を果たしている。組み換えMIFとLPSを共注入すると、LPS死亡率を悪化させ、一方、アンチMIF抗体を中和すると、内毒素ショックからマウスを十分保護する。

【0150】

ヘモグロビン (Hb) は、赤血球中に存在する酸素を運搬する鉄含有球状蛋白質である。ヘモグロビンは、2つのグロビン・サブユニットのヘテロダイマーである。 $\alpha_2\beta_2$ は、胎児Hbと呼ばれ、 $\alpha_2\beta_2$ は成人Hb Aと呼ばれ、 $\alpha_2\beta_2$ は成人Hb A₂と呼ばれる。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型に存在し、鎖状細胞ヘモグロビンさえもそうである。Hbは、体中の細胞に酸素を運ぶ責任がある。Hb₂は、通常、血清中には検出されない。

【0151】

- トレースとも呼ばれる、ヒトリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (hPDGS) は、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30 kDaの糖蛋白質である。健康に見える患者のhPDGS濃度の上限は、約420 ng/ml であると報告されている (欧州特許出願公開第0999447号)。hPDGSの上昇は、不安定な狭心症および脳梗塞の患者からの血液中で確認された (欧州特許出願公開第0999447号)。さらに、hPDGSは、虚血発作の有用なマーカーになるように思われ、hPDGSの濃度は、経皮的冠動脈拡張術 (PTCA) の後、狭心症の患者では時間の経過と共に低下することが分かり、これは、hPDGS濃度は虚血が解決されると低下することを示唆している (欧州特許出願公開第0999447号)。

40

【0152】

トリプターゼとも呼ばれる、マスト細胞トリプターゼは、275個のアミノ酸 (30

50

・7 kDa) からなる蛋白質であり、この蛋白質はマスト細胞中に存在する主要な中性蛋白質分解酵素である。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、喘息および多様なアレルギー・セットに対するアレルギー反応におけるアレルギー性気道炎症のマーカーである。例えば、タイラ (Taira) ら, ザ・ジャーナル・オブ・アスマ (J. Asthma) 39: 315 - 322 (2002)、シュバルツ (Schwartz) ら, ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (N. Engl. J. Med.) 316: 1622 - 1626 (1987) を参照のこと。発生後1乃至6時間の間に上昇した血清トリプターゼ・レベルは、マスト細胞脱顆粒の特異的な徴候を与える。

【0153】

好酸球カチオン性蛋白質 (ECP) は、16 - 24 kDa の範囲の分子量および pH 10.8 の pI を有する不均一性蛋白質である。ECP は細胞毒性が強く、活性化された好酸球により放出される。ベンゲ (Venge), クリニカル・アンド・イクスペリメンタル・アレルギー (Clinical and experimental allergy), 23 (Suppl. 2) 3 - 7 (1993)。喘息患者の気管支肺胞洗浄検査液 (BALF) における ECP の濃度は、これらの疾患の重症度により変わり、痰の中の ECP 濃度は、その疾患の病態生理を反映していることも示された。ブスケット (Bousquet) ら, ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (N. Engl. J. Med.) 323: 1033 - 1039 (1990)。ビルチョウ (Virchow) ら, ジ・アメリカン・レビュー・オブ・レスピラトリー・ディジーズ (Am. Rev. Respir. Dis.) 146: 604 - 606 (1992)。血清 ECP の評価は、気管支喘息における肺の炎症を示しているように思われる。コラー (Koller) ら, アーカイブス・オブ・ディジーズ・イン・チャイルドフッド (Arch. Dis. Childhood) 73: 413 - 417 (1995)、ソークネス (Sorkness) ら, クリニカル・アンド・イクスペリメンタル・アレルギー (Clin. Exp. Allergy) 32: 1355 - 1359 (2002)、バドル・エルディン (Badr-eldin) ら, イースタン・メディタレーニアン・ヘルス・ジャーナル (East. Med. Health J.) 5: 664 - 675 (1999) も参照のこと。

【0154】

KL-6 (MUC1 と呼ばれる) は、肺単球上に発現された高分子量 (> 300 kDa) の粘液性糖蛋白質である。KL-6 の血清レベルは、労作性呼吸困難により特徴づけられる間質性肺疾患において上がると言われている。KL-6 は、肺線維症、間質性肺炎、サルコイド症、および間質性肺実質炎を含む種々の間質性肺疾患のマーカーであることが証明されている。例えば、コバヤシ (Kobayashi) およびキタムラ (Kitamura), チェスト (Chest) 108: 311 - 315 (1995)、コオノ (Kohnno), ザ・ジャーナル・メディカル・インベストイゲーション (J. Med. Invest.) 46: 151 - 158 (1999)、バンドン (Bandon) ら, アニユアルズ・オブ・リウマチック・ディジーズ (Ann. Rheum. Dis.) 59: 257 - 262 (2000)、およびヤマネ (Yamane) ら, ザ・ジャーナル・オブ・ザ・リウマトロジー (J. Rheumatol.) 27: 930 - 934 (2000) を参照のこと。

【0155】

インターロイキン 10 (「IL-10」) は、160 個のアミノ酸 (予想質量 18.5 kDa) サイトカインであり、このサイトカインはサイトカインの 4 つの -らせん状の束からなるファミリーのメンバーである。溶液中では、IL-10 は、39 kDa の見かけの分子量を有するホモダイマーを形成する。ヒトの IL-10 遺伝子は、染色体 1 に配置されている。ピエラ (Vira) ら, プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 88: 1172 - 1176 (1991)、キム (Kim) ら, ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) 14

10

20

30

40

50

8 : 3 6 1 8 - 3 6 2 3 (1 9 9 2) 。 I L - 1 0 の過剰産生が、敗血症においてマーカーとして確認され、これは、重症度および死亡率を予測している。ゴゴス (G o g o s) ら、ザ・ジャーナル・オブ・インフェクシャス・ディジーズ (J . I n f e c t . D i s .) 1 8 1 : 1 7 6 - 1 8 0 (2 0 0 0) 。

【 0 1 5 6 】

(v) 神経組織の損傷に関する代表的な特異的マーカー

アデニレート・キナーゼ (A K) は、A T P および A M P の A D P への相互転換を触媒する 2 2 k D a の偏在性細胞分可溶成分の酵素である。アデニレート・キナーゼの 4 つのアイソフォームが、哺乳類において確認されている (ヨネダ (Y o n e d a) , T . ら , プレインリサーチ、モレキュラー・プレインリサーチ (B r a i n R e s . M o l . B r a i n R e s .) 6 2 : 1 8 7 - 1 9 5 , 1 9 9 8) 。 A K 1 アイソフォームは、脳、骨格筋、心臓、および大動脈に存在する。A K 1 の正常な血清質量濃度は、総 A K 濃度の測定には、通常、官能基検定法が使われるので、現在不明である。正常な血清 A K 濃度は、< 5 ユニット / リッターであり、A K の上昇は C S F を用いてなされた (ボレンセン (B o l l e n s e n) , E . ら , アクタ・ニューロロジカ・スカンジナビカ (A c t a N e u r o l . S c a n d .) 7 9 : 5 3 - 5 8 2 , 1 9 8 9) 。血清 A K 1 は、脳の損傷のマーカーとして A K アイソフォームの中で最大の特異性を持っていると思われる。A K は、脳虚血の脳脊髄液マーカーとして最も適しており、A K の主なソースは神経組織である。

【 0 1 5 7 】

ニューロトロフィンは、哺乳類の神経系において発現された増殖因子のファミリーである。実施例には、神経増殖因子 (N G F) 、脳誘導ニューロトロフィン因子 (B D N F) 、ニューロトロフィン - 3 (N T - 3) およびニューロトロフィン - 4 / 5 (N T - 4 / 5) がある。ニューロトロフィンは、それらの作用を、主として、標的誘導パラクリンまたはオートクリン・ニューロトロフィン因子として発揮する。存続しているニューロトロフィンの役割、即ち、神経細胞の区別および保持は周知である。これらの神経細胞は、発現の別のパターンおよび細胞の標的を除いて、一部重なり合いを示す。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末梢求心性および遠心性の神経細胞にも影響を及ぼす。

【 0 1 5 8 】

B D N F は、神経細胞および / またはグリア細胞の増殖と存続性を支持する効能のあるニューロトロフィン因子である。B D N F は、成熟 B D N F 形に分割される 3 2 k D a の前駆体「 p r o - B D N F 」分子として発現される。モーラ (M o w l a) ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J , B i o l . C h e m .) 2 7 6 : 1 2 6 6 0 - 1 2 6 6 6 (2 0 0 1) 。ヒト B D N F の最も豊富で活性な形は、2 つの同一の 1 1 9 個のアミノ酸サブユニットにより形成された 2 7 k D a のホモダイマーであり、サブユニットは強い親水性反応により一緒に保持される。しかし、p r o - B D N F は、細胞外にも放出され、生物学的に活性である。B D N F は、C N S 全体に広く分布しており、試験管では、海馬神経、小脳の神経および皮質神経を含む広範囲の神経細胞に対して栄養作用を示す。生体では、B D N F は、外傷および毒性脳損傷から神経細胞を救出することが判明している。例えば、複数の研究で、一時的な中大脳動脈閉塞の後、B D N F m R N A が皮質神経において上の方に調節されることが示された (シャビルツ (S c h a b i l t z) ら、ジャーナル・オブ・セレブラル・ブラッドフロー・メタボリズム (J . C e r e b . B l o o d F l o w M e t a b .) 1 4 : 5 0 0 - 5 0 6 , 1 9 9 7) 。実験的に誘導された片側に集中した血栓性の脳卒中では、B D N F m R N A が、発作後 2 から 1 8 時間に増加した。このような結果は、B D N F は、集中的脳虚血において神経を保護する役割を果たしている可能性があることを示唆している。

【 0 1 5 9 】

N T - 3 も、2 つの 1 1 9 個のアミノ酸サブユニットからなる 2 7 k D a のホモダイマーである。一次皮質細胞培養への N T - 3 の添加は、酸素フリーラジカル・メカニズムを

介して可能な、酸素 - グルコース奪取により生じた神経死を悪化させることが証明された (ベーツ (Bates) ら, ニューロバイオロジー・オブ・ディジーズ (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、この分子は成熟した生物学的に活性な形に分割される。

【0160】

カルビンジン - Dは、細胞内の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発揮することができる、28 kDaの細胞質ビタミンD依存性Ca²⁺結合蛋白質である。カルビンジン - Dは、中枢神経系、主としてグリア細胞、および末端腎細管の細胞に存在する (ハセガワ (Hasegawa), S. ら, ザ・ジャーナル・オブ・ウロロジー (J. Urol.) 149: 1414 - 1418, 1993)。カルビンジン - Dの正常な血清濃度は < 20 pg/ml (0.7 pM) である。血清カルビンジン - D濃度は、心停止後上昇すると言われており、この上昇は脳虚血によるCNS損傷の結果であると考えられている (ウスイ (Usui), A. ら, ジャーナル・オブ・ザ・ニューロロジカル・サイエンス (J. Neurol. Sci.) 123: 134 - 139, 1994)。血清カルビンジン - Dは上昇するが、虚血後再灌流すると直ぐに平坦になる。最高血清カルビンジン - D濃度は、700 pg/ml (25 pM) 程度にすることができる。

10

【0161】

クレアチン・キナーゼ (CK) は、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細胞質ゾル酵素である。脳特異的CKアイソフォーム (CK - BB) は、脳の総CK活性の約95%を占める85 kDaの細胞質ゾル蛋白質である。CKは、心組織、腸、前立腺、直腸、胃、平滑筋、甲状腺、膀胱、および静脈にかなりの量が存在する (ジョンソン (Johnson), P. J., ジャーナル・オブ・カーディオソラシック・アンド・バスキュラー・アネセシア (J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.) 10: 120 - 126, 1996)。CK - BBの正常血清濃度は、< 10 ng/ml (120 pM) である。血清CK - BBは、低酸素および虚血による脳損傷後上昇するが、特異なタイプの脳卒中における血清上昇を識別するためにはさらに研究する必要がある (ラスコビッチ (Laskowitz), D. T. ら, ジャーナル・オブ・ストローク・セラプロバスキュラー・ディジーズ (J. Stroke Cerebrovasc. Dis.) 7: 234 - 241, 1998)。血清中のCK - BBの上昇は、血液脳関門の浸透性の増加と結びついた虚血による脳損傷に帰せられる。CK - BBの血清濃度と損傷の程度 (梗塞容積) との相関関係はなく、または神経学的転帰は確立されていない。CK - BBの半減期は、血清中で1 - 5時間であり、通常、< 10 ng/ml (120 pM) の濃度で血清中に検出される。いくつかの脳卒中では、血清濃度CK - BBは、脳卒中の発症後上昇し、直ぐにピークになり (24時間以内に)、3 - 7日後には次第に正常値に戻る (4)。頭部損傷患者の血清中のCK - BB濃度は、損傷後直ぐにピークに達し、損傷の程度により、損傷の3.5 - 12時間の間に正常値に戻る (スコグサイド (Skogseid), I. M. ら, アクタ・ニューロシルルジカ (Acta neurochir. (Wien)) 115: 106 - 111, 1992)。最高血清CK - BB濃度は、250 ng/ml (3 nM) を超えることができる。CK - BBは、脳虚血のCSFマーカーとして最高に適しており、CK - BBの主要なソースは神経組織であろう。CK - BBは、頭部損傷後CNS損傷の血清マーカーとしてより適している。何故ならば、CK - BBは、これらの患者では短時間で上昇し、CK - BBの除去は見かけ上損傷の程度に依存しているからである。

20

30

40

【0162】

グリア細胞線維性酸性蛋白質 (GFAP) は、55 kDaの細胞質ゾル蛋白質であり、この蛋白質は星状グリア細胞フィラメントの主要構成成分であり、星状グリア細胞における主要な中間体フィラメント蛋白質である。GFAPは、星状グリア細胞に対して特異的であり、星状グリア細胞はCNSに配置された間質細胞であり、血液脳関門の近くに存在しうる。GFAPは、通常、血清中には検出されない。血清GFAPは、虚血発作後上昇する (ニブロイ - ドボス (Niebroj - Dobosz), L. ら, フォリア・ニュー

50

ーロパソロジカ (Folia Neuropathol.) 32: 129 - 137, 1994)。発作に関連して血清GFAPの上昇を研究している最近の報告書は極めて少なく、すべてのタイプの発作に対する血清マーカーとしてGFAPを確立するためにはさらに多くの研究が必要である。発作マーカーとして、GFAPを研究している大抵の研究は、脳脊髄液を用いてなされた。血清中のGFAPの上昇は、血液脳関門の浸透性の増加と結びついた、虚血による脳の損傷に帰せられる。GFAPの血清濃度と損傷の程度(梗塞容積)との相関関係はなく、神経学的転帰は確立されていない。GFAPは、CNSに影響する種々の神経障害を有する患者の脳脊髄液中で上昇しているが、発作以外の疾患を有する患者の血清中へのGFAPの放出を記述している報告書は現在全く利用できない(アルブレヒトセン(Albrechtsen), M. およびボック(Bock), E. J., ジャーナル・オブ・ニューロイムノロジー(J. Neuroimmunol.) 8: 301 - 309, 1985)。血清濃度GFAPは、脳卒中の発症後直ぐに上昇し、増加を続け、損傷の重症度と相関づけられる時間(複数週間)の間持続するように思われる。GFAPは、重症のCNS損傷、具体的には、虚血または身体の損傷により生じた細胞死による星状グリア細胞に対する損傷の場合、非常に特異的マーカーであるように思われる。

10

【0163】

乳酸脱水素酵素(LDH)は、至る所に存在する135kDaの細胞質ゾルの酵素である。LDHは、AおよびB鎖のテトラマーであり、これは、NADHによるピルビン酸塩の乳酸塩への還元を触媒する。LDHの5つのアイソフォームは、哺乳類の組織において識別されており、組織特異的なアイソフォームは、AおよびB鎖の種々の組み合わせから作られる。LDHの正常な血漿質量濃度は、総LDH濃度を測定するために官能基検定法が通常使われるので、現在は不明である。正常血清LDH濃度は、<600ユニット/リッターである(レイ(Ray), P.ら, キャンサー・ディテクション・アンド・プリベンション(Cancer Detect. Prev.) 22: 293 - 304, 1988)。脳卒中の状態におけるLDHの上昇に関する研究の大部分は、脳脊髄液を用いて行われ、上昇は損傷の重症度と相関がある。血清LDH活性の上昇は、虚血と出血との両発作に従うと報告されているが、この観察を確認し、損傷の重症度および神経学的転帰との相関関係を決めるためにはさらに研究を行う必要がある(アガールワル(Aggarwal), S. P.ら, ジャーナル・オブ・ジ・インディアン・メディカル・アソシエーション(J. Indian Med. Assoc.) 93: 331 - 332, 1995、マイウリ(Maiuri), F.ら, ニューロロジカル・リサーチ(Neurol. Res.) 11: 6 - 8, 1989)。LDHは、脳虚血の脳脊髄液マーカーとして最も適しており、LDHの主なソースは神経組織である。

20

30

【0164】

ミエリン塩基性蛋白質(MBP)は、実際には、単一MBP遺伝子の選択的スプライシングにより作られた細胞質ゾルの蛋白質の14 - 21kDaのファミリーである。単一MBP遺伝子は、ミエリン形成プロセスの間に、軸索の周りでミエリンの肺細胞緊密化に関与しているようである。MBPは、CNSおよび末梢神経系(PNS)のシュワン細胞における希突起グリア細胞に対して特異的である。MBPは、CNSにおける総ミエリン蛋白質の約30%およびPNSにおける総ミエリン蛋白質の約10%を占める。MBPの正常な血清濃度は、<7ng/ml(400pM)である。血清MBPは、すべての型の重症脳卒中、具体的には、血栓性脳卒中、塞栓性脳卒中、脳内出血、およびくも膜下の出血の後に上昇し、一方、MBP濃度の上昇は、小空洞性の梗塞または一過性の虚血発作を含む、低乃至中程度の重症度を有する患者の血清では報告されていない(パルフレブマン(Palfreeman), J. W.ら, クリニカ・シミカ・アクタ(Clin. Chim. Acta) 92: 403 - 409, 1979)。血清中のMBPの上昇は、身体的損傷による脳の損傷、梗塞による虚血または血液脳関門の透過性の増加に結びついた脳出血に帰せられる。MBPの血清濃度は、損傷の程度(梗塞容積)に相関づけられると報告されており、この血清濃度は、神経学的転帰とも相関づけられる。脳卒中と関係がある血清MBPの上昇について利用できる情報の量は限られている。何故ならば、大抵の研究は、脳

40

50

脊髄液を用いて行われているからである。MBPは、通常、 7 ng/ml (400 pM) を上限にして血清中に検出され、重症の脳卒中および脳損傷の後上昇する。血清MBPは、発作開始後数時間内に上昇し、発症後2 - 5日以内に濃度が最高レベルに増加すると考えられている。血清濃度は、 120 ng/ml (6.9 nM) を超えることができる、濃度の最高値に到達後、1週間かけて正常濃度まで次第に下げることができる。損傷の重症度は、MBPの放出に対して直接的作用を有するので、MBPが血清中で上昇する時間の長さを支配することにより放出の速度論に影響を及ぼすであろう。MBPは、損傷が重症であるほど、より長時間にわたり血清中に存在するであろう。頭部損傷の患者の血清中へのMBPの放出は、血清MBP濃度は頭部損傷の患者の神経学的転帰と相関関係があるとされていることを除いて、脳卒中について記述された速度論と類似な速度論に従うと考えられる(トーマス(Thomas), D. G.ら, アクタ・ニューロシルルジカ・サブリメント(Acta neurochir. Suppl. (Wien)) 28:93-95, 1979)。頭蓋内に腫瘍がある患者の血清内へのMBPの放出は、持続すると考えられるがなおも研究する必要がある。最後に、血清MBP濃度は、脱髄疾患の患者で上がることがあるが、結論を下しているような研究は報告されていない。複数の硬化症の患者で報告されているように、MBPは脳脊髄液において上昇することがあるが、これと一致した血清中の上昇はほとんど報告されていない(ジャック(Jacque), C.ら, アーカイブス・ニューロロジー(Arch. Neurol.) 39:557-560, 1982)。これは、血清MBPの上昇をもたらすためには損傷は、血液脳関門の浸透性の増加を伴わねばならないことを示している。しかし、MBPは、頭蓋内腫瘍を有する患者集団においても上昇することがある。脳卒中に対するこのマーカーを用いる検定法の候補者になる比較的大きな患者集団に、このような患者が存在することは稀である。これらの患者は、脳神経外科の治療を受けている患者または脱髄患者と組み合わせて、脳損傷に対するMBPの特異性を決定するインパクトを有する。さらに、血清MBPは、tPA投与などの発作療法や処置が効かない患者を識別する能力がある、重篤な発作のマーカーとして有用である。

10

20

【0165】

CD56とも呼ばれる、神経細胞接着分子(NCAM)は、 170 kDa の細胞表面結合免疫グロブリン様インテグリン・リガンドであり、これは神経系における神経細胞とグリア細胞の反応の維持に関与しており、NCAMは星状グリア細胞、希突起グリア細胞、シュワン細胞、神経細胞および軸索の表面で発現される。NCAMは、骨格筋筋管を発達させるために局在化され、その発現は、発達、脱神経および再脈状化中に骨格筋において上の方に調節される。NCAMの正常な血清質量濃度は報告されていない。NCAMは、通常、官能基酵素免疫検定法により測定され、 < 20 ユニット/ ml の正常血清濃度を有することが報告されている。脳卒中に特異的に関係づけられた血清NCAM濃度の変化は、報告されていない。NCAMは、脳虚血のCSFマーカーとして最高に適しており、NCAMの主なソースは神経組織である。

30

【0166】

エノラーゼは、 α 、 β 、および γ サブユニットから作られた 78 kDa のホモまたはヘテロのダイマー性細胞質蛋白質である。エノラーゼは、糖分解経路において2 - ホスホグリセレートとホスホエノールピルベートとの相互転換を触媒する。エノラーゼは、 α 、 β 、および γ アイソフォームとして存在しう。サブユニットは、グリア細胞および大抵のその他の組織に存在し、 α サブユニットは筋肉組織に存在し、 β サブユニットは、存在するならば、主として神経細胞および神経内分泌細胞に存在する(クイン(Quin), G. B.ら, クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.) 40:790-795, 1994)。エノラーゼ・アイソフォームは、神経細胞に対して最も特異的であり、神経細胞特異的エノラーゼ(NSE)と呼ばれる。主として神経細胞および神経内分泌細胞に存在するNSEは、血小板および赤血球にも存在する。NSEの正常血清濃度は、 $< 12.5 \text{ ng/ml}$ (160 pM)である。

40

【0167】

50

NSEは2つのサブユニットから作られ、したがって、NSE濃度を検出するために使われた最も可能性のある免疫学的検定法は、サブユニットの1つに対して向けられた検定法である。この場合、サブユニットが理想的な選択である。しかし、サブユニット単独は、その測定がおよびアイソフォームの両方を検出するので、アイソフォームとして脳組織に対して特異的ではない。これに鑑みて、NSEの最高の免疫検定法は、アイソフォームを特異的に検出できる2部位検定法である。血清NSEは、脳に起源があり、ある患者が後により重篤な脳卒中を起こしやすいと考えられるTIAを含むすべての型の脳卒中後上昇すると言われている(イスグロ(Isglo), F.ら, ユーロピアン・ジャーナル・オブ・カーディオソラシック・サージェリー(Eur. J. Cardiothorac. Surg.) 11: 640 - 644, 1997)。血清中のNSEの上昇は、身体的損傷または血液脳関門の浸透率の上昇と結びついた梗塞または脳出血により生じた虚血による脳損傷に帰せられ、NSEの血清濃度は損傷の程度(梗塞容積)および神経学的転帰と相関づけられると言われている(マルテンス(Martens), P.ら, ストローク(Stroke) 29: 2363 - 2366, 1998)。血清NSE濃度の第2次の上昇は、脳血管けいれんから生じる遅延神経損傷を示すものである(ラスコピッチ(Laskowitz), D. T.ら, ジャーナル・オブ・ストローク・セラebrovasc. Dis.) 7: 234 - 241, 1998)。48時間の生物学的半減期を有し、通常、12.5 ng/ml (160 pM)の上限にて血清で検出されるNSEは、脳卒中および脳損傷後上昇する。血清NSEは、脳卒中開始4時間後に上昇し、濃度は、発症後1 - 3日で最高値に達する(ミスラー(Missler), U.ら, ストローク(Stroke) 28: 1956 - 1960, 1997)。300 ng/ml (3.9 nM)を超えることができる、血清濃度がその最高値に到達後、血清濃度は約1週間で正常濃度へ次第に低下する。NSEの放出に対して直接的な作用を有するので、損傷の重症度は、NSEが血清中で上昇する時間の長さを支配することにより放出速度論に影響を及ぼす。NSEは、損傷が重篤なほど、長時間血清中に存在するであろう。

10

20

30

40

50

【0168】

頭部を損傷した患者の血清中へのNSEの放出は、脳卒中の場合に見られる種々の速度論に従い、損傷後1 - 6時間以内に最高血清濃度に到達し、24時間以内にベースラインに戻ることが多い(スコグサイド(Skogseid), I. M.ら, アクタ・ニューロシルルジカ(Acta neurochir. (Wien)) 115: 106 - 111, 1992)。NSEは、脳損傷、具体的には、虚血または身体損傷により生じた細胞死による神経細胞の損傷に対する特異的なマーカーである。脳内では、神経細胞はグリア細胞の約1/10の数であるので、血液脳関門の増加した浸透性と結びついた何らかの脳損傷は、神経細胞のかなりの領域集団を有する領域で起き、血清NSE濃度をかなり上げることになる。さらに、上昇したNSEの血清濃度は、AMIおよび心臓手術後の脳損傷に関連した合併症を示すこともできる。NSEの血清濃度の上昇は、損傷の重症度および患者の神経学的転帰と相関関係がある。NSEは、TIAを含む、すべての型の脳卒中のマーカーとして使用することができる。

【0169】

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の内在性膜蛋白質である。PLPは、CNSにおける希突起グリア細胞に対して特異的であり、中央膜における総CNSミエリンの約50%を占める。ただし、極端に低いレベル(<1%)のPLPが末梢神経系(PNS)ミエリン中に存在している。PLPの正常な血清濃度は、<9 ng/ml (300 pM)である。血清PLPは、脳梗塞の後上昇するが、一過性の虚血発作の後には上がらない(トロッター(Trotter), J. L.ら, アニュアルズ・オブ・ニューロロジー(Ann. Neurol.) 14: 554 - 558, 1983)。発作に関連した血清PLPを研究している最近の報告書はほとんどない。血清中のPLPの上昇は、身体的損傷、あるいは梗塞または血液脳関門の増加した浸透性と結びついた脳出血により生じた虚血に帰せられる。PLPの血清濃度と損傷度合い

(梗塞容積)または神経学的転帰との相関関係は確立されていない。血清中へのPLPの放出速度論およびPLPのその後の除去を調べた研究は報告されていないが、60 ng/ml (2 nM)に近い最高濃度が脳炎の患者について報告されており、この値は脳卒中後に見出された濃度のほぼ2倍である。PLPは、重篤なCNS患者、特に希突起グリア細胞の損傷に対する非常に特異的なマーカーであると思われる。PLP血清上昇および発作に関連して利用できる情報は非常に少ない。PLPは、CNSに影響する種々の神経障害の患者の血清中でも上昇する。発作に対してこのマーカーを用いる検定法の候補者になる患者の大集団におけるこれらの患者の内、診断未確定の存在は稀である。

【0170】

S-100は、およびサブユニットから作られた21 kDaのホモまたはヘテロのダイマー性細胞質ゾルCa²⁺結合蛋白質である。S-100は、Ca²⁺依存性信号伝達経路に沿った細胞プロセスの活性化に関与していると考えられる(ボンフラー(Bonfrer), J. M.ら, プリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー(Br. J. Cancer) 77: 2210-2214, 1998)。S-100a(アイソフォーム)は、横紋筋、心臓および腎臓に存在し、S-100b(アイソフォーム)はグリア細胞に存在するが、シュワン細胞には存在せず、S-100c(アイソフォーム)はグリア細胞およびシュワン細胞に存在する。なお、S-100bは、主要な細胞質ゾル成分である。サブユニットは、正常な生理学的条件下で、神経系、特にCNSに対して特異的であり、実際に、脳に存在するS-100蛋白質の総量の約96%を占める(ジェンセン(Jensen), R.ら, ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー(J. Neurochem.) 45: 700-705, 1985)。さらに、S-100は、グリオーム、黒色腫、シュワン腫、神経線維腫、および神経節神経細胞芽腫および神経節神経腫の様な高度に分化された神経芽細胞腫などの神経内分泌から発生した腫瘍内に存在することができる(パーソン(Person), L.ら, ストローク(Stroke) 18: 911-918, 1987)。S-100の正常血清濃度は、< 0.2 ng/ml (19 pM)であり、これは用いた免疫学的検出検定法の検出限界である。血清S-100は、TIAを含むすべての型の脳卒中後上昇する。血清中のS-100の上昇は、身体的損傷または血液脳関門の浸透率の上昇と結びついた梗塞または脳出血により生じた虚血による脳損傷に帰せられ、S-100bの血清濃度は損傷の程度(梗塞容積)および神経学的転帰と相関づけられると言われている(マルテンス(Martens), P.ら, ストローク(Stroke) 29: 2363-2366, 1998、ミスラー(Missler), U.ら, ストローク(Stroke) 28: 1956-1960, 1997)。

【0171】

S-100bは、2時間の生物学的半減期を有し、通常、血清では検出されないが、脳卒中および脳損傷後上昇する。血清S-100は、脳卒中発症から4時間後に上昇し、濃度は、発症後2-3日で最高値に達する。20 ng/ml (1.9 nM)に近づくことができる、血清濃度がその最高値に到達後、血清濃度は約1週間で正常濃度へ次第に低下する。損傷の重症度が、S-100bの放出に対して直接的な作用を有するので、重症度はS-100bが血清中で上昇する時間の長さを支配することにより放出速度論に影響を及ぼす。S-100bは、損傷が重篤なほど、長時間血清中に存在するであろう。頭部損傷の患者の血清中へのS-100bの放出は、脳卒中について報告された幾分類似した速度論に従うように思われる。唯一の例外は、血清S-100は発症後2.5時間以内に検出することができ、発症後約1日で最高血清濃度に到達することができることである(ベルトゲン(Woertgen), C.ら, アクタ・ニューロシルルジカ(Acta Neurochir. (Wien)) 139: 1161-1164, 1997)。S-100は、脳の損傷、具体的には、虚血または身体的損傷により生じた細胞死によるグリア細胞の損傷の特異的なマーカーである。グリア細胞は、脳内では、神経細胞よりも約10倍多く、血液脳関門の増加した浸透性と結びついた何らかの脳の損傷は、血清S-100を増加させるようである。さらに、S-100bの上昇した血清濃度は、AMIおよび心臓手術の後の脳の損傷に関連した合併症を明示することができる。S-100bは、普通

の患者ではほぼ検出不可能であり、S - 100bの血清濃度の上昇は損傷の70および患者の神経学的転帰と相関づけられる。S - 100bは、TIAを含むすべての型の脳卒中のマーカーとして使うことができる。

【0172】

トロンボモジュリン(TM)は、血管内皮細胞の表面に存在する70kDaの単一鎖内在性膜糖蛋白質である。TMは、トロンビンの基質特異性を変えることにより抗凝固性活性を示している。トロンビンとTMとの間の1:1の化学量論的複合体の形成は、トロンビンの機能を親凝固性から抗凝固性に変える。この変化は、トロンビンを蛋白質C(因子Vaおよび因子VIIaの不活性化剤)を活性化する原因になるトロンビン基質特異性の変化により促進されるが、フィブリノーゲンを分割したり、その他の凝固因子を活性化することはない(デービー(Davie), E.W.ら, バイオケミストリー(Biochem.) 30:10363-10370, 1991)。TMの正常血清濃度は、25-60ng/ml(365-850pM)である。血清TM濃度の変化を記述している最近の報告書は、変化しないという報告がある一方で、かなり増加するという報告もある(セキ(Seki), Y.ら, ブラッド・コアギュレーション・アンド・フィブリノリシス(Blood Coagul. Fibrinolysis) 8:391-396, 1997)。血清TM濃度の上昇は、内皮細胞の損傷を反映し、凝固または線維素溶解の活性化を意味していない。

10

【0173】

蛋白質キナーゼCのガンマアイソフォーム(PKC γ)は、CNS組織に対して特異的であり、通常、循環系には存在しない。PKC γ は、脳虚血の間に活性化され、対側の組織におけるよりも2-24倍高いレベルにおいて虚血半影に存在し、梗塞した組織では上がらない(クルピンスキー(Krupinski), J.ら, アクタ・ニューロバイオロジエ・イクスペリメンタリス(Acta Neurobiol. Exp. (Warz.)) 58:13-21, 1998)。さらに、動物モデルが、脳動脈閉塞後ラットの末梢循環系におけるPKC γ のレベルの増加を識別した(コーネル-ベル(Cornell-Beall), A.ら, 国際公開第01/16599号)。PKCの追加のアイソフォーム、ベータIおよびベータIIは、脳虚血の患者からの脳組織の梗塞したコアのレベルの増加において見出された(クルピンスキー(Krupinski), J.ら, アクタ・ニューロバイオロジエ・イクスペリメンタリス(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、PKC α およびPKC δ)は、出血のカニンモデルを用いたくも膜下出血の後の血管けいれんの発症に関係していた。PKC δ の発現は、血管けいれんの初期段階の間に基底動脈においてかなり上昇し、PKC α は、血管けいれんが進行する時にかなり上昇した(ニシザワ(Nishizawa), S.ら, ユーローピアン・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー(Eur. J. Pharmacol.) 398:113-119, 2000)。したがって、種々のアイソフォームのPKCを個別にまたはそれらの種々の組み合わせで測定することは、脳の損傷、虚血性半影の存在、並びにくも膜下の出血後の脳血管けいれんの発症および進行を識別する場合に効果がある。PKC γ およびPKC β I、PKC β IIまたは両方などのPKCアイソフォームの比は、発作の進行を識別する上で効果があり、ここで、虚血けいれんは不可逆的に損傷し梗塞した組織に転換される。これに鑑みて、PKC γ は、虚血性けいれんの存在および容積の確認に使われ、PKC β I、PKC β IIまたは両方のいずれかが発作中に不可逆的に損傷した組織の梗塞したコアの存在および容積の確認に使われる。PKC δ 、PKC α 、およびPKC δ とPKC α との比は、くも膜下の出血後の脳血管けいれんの存在および進行の確認に使える。

20

30

40

【0174】

(vi) 細胞損傷のその他の非特異的なマーカー

ヒトの血管内皮増殖因子(VEGF)はダイマー性蛋白質であり、報告されたVEGFの活性には、内皮細胞の増殖、血管新生、および毛細管浸透性がある。VEGFは、種々

50

の血管新生組織により分泌される。酸素欠乏環境では、血管内皮細胞は損傷を受け、最終的には存続できない。しかし、このような内皮の損傷は血管平滑筋細胞による VEGF の産生を刺激する。血管内皮細胞は、VEGF の存在下では生存を増加、即ち Bcl-2 の発現により媒介されたと考えられている作用を示す。VEGF は、VEGF (189)、VEGF (165)、VEGF (164)、VEGF B (155)、VEGF (148)、VEGF (145)、および VEGF (121) として周知の多様なスプライス変異体として存在しうる。

【0175】

インスリン様増殖因子-1 (IGF-1) は、至る所に存在する 7.5 kDa の分泌された蛋白質であり、これは発達中の増殖ホルモンのたんぱく同化作用および体因性作用を媒介する (1, 2)。循環系において、IGF-1 は、通常、IGF 活性を調節する IGF 結合蛋白質に結合されている。IGF-1 の正常な血清濃度は、虚血発作の患者でかなり低下すると言われており、低下の度合いは損傷の重症度と相関関係があるように思われる (シュワブ (Schwab), S. ら, ストローク (Stroke) 28: 1744-1748, 1997)。外傷および免疫系の広範な活性化を有する患者では、IGF-1 血清濃度が低下すると報告されている。至る所に存在する IGF-1 の発現により、血清 IGF-1 濃度は、脳以外の虚血の場合にも低下することがある。興味深いことに、IGF-1 血清濃度は、たとえ、IGF-1 の細胞発現が梗塞ゾーンにおいて上の方に調節されるとしても、虚血発作の後低下する (リー (Lee), W. H. およびボンディー (Bondy), C., アニユアルズ・ニューヨーク・アカデミー・サイエンシズ (Ann. N. Y. Acad. Sci.) 679: 418-422, 1993)。血清濃度の低下は、増殖因子の増加した要求または増加した代謝排除速度を反映している。血清レベルは、脳卒中発症 24 時間後にかかなり低下し、10 日間にわたり低下したままであった (シュワブ (Schwab), S. ら, ストローク (Stroke) 28: 1744-1748, 1997)。血清 IGF-1 は、脳損傷の感度のよい指標になりうる。しかし、至る所に存在する IGF-1 の発現パターンは、すべての組織が IGF-1 の血清濃度に影響する可能性があり、脳卒中のマーカーとして IGF-1 を用いる検定法の特異性を弱める。これに鑑みて、IGF-1 は脳虚血の脳脊髄液として最高に適しており、IGF-1 の主なソースは神経組織である。

【0176】

炎症反応に含まれる接着分子は、これらの分子の発現レベルは傷害の結果として変えられるので、急性期反応物としても考えられる。この種の接着分子の例には、E-セレクトリン、細胞間接着分子-1、血管細胞接着分子などがある。

【0177】

ELAM-1 および CD62E とも呼ばれる、E-セレクトリンは、IL-1 および TNF に対して反応した内皮細胞上に発現された 140 kDa の細胞表面 C-型レクチンである。IL-1 および TNF は、好中球の補充の間に内皮細胞と好中球との「回転」反応を媒介する。E-セレクトリンの正常血清濃度は、約 50 ng/ml (nM) である。脳卒中後の血清 E-セレクトリン濃度の変化に関する研究は、様々な結果を報告している。虚血発作後血清 E-セレクトリン濃度が増加すると報告している研究があるが、一方では、変わらないと報告している研究もある (ビッチ (Bitsch), A. ら, ストローク (Stroke) 29: 2129-2135, 1998、キム (Kim), J. S., ジャーナル・オブ・ザ・ニューロシルルジカ・サイエンシズ (J. Neurol. Sci.) 137: 69-78, 1996、シュー (Shyu), K. G. ら, ジャーナル・オブ・ニューロロジー (J. Neurol.) 244: 90-93, 1997)。E-セレクトリン濃度は、くも膜下出血の患者の CSF において上昇し、血管けいれんを予測することができる (ポーリン (Polin), R. S. ら, 89: 559-567, 1998)。E-セレクトリンの血清濃度の上昇は、免疫系の活性化を示している。血清 E-セレクトリン濃度は、アテローム動脈硬化症、種々の形の癌、子癇前症、糖尿病、のう胞性線維症、AMI、およびその他の非特異的炎症病状の患者で上昇する (ワン (Hwang), S. J. ら

、サーキュレーション (Circulation) 96: 4219 - 4225, 1997、バンクス (Banks), R. E. ら, プリティッシュ・ジャーナル・オブ・ザ・キャンサー (Br. J. Cancer) 68: 122 - 124, 1993、アウスツグレン (Austglen), R. ら, ユーロピアン・ジャーナル・オブ・オブステトリックス・ガイニコロジー・アンド・レプロダクティブ・バイオロジー (Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.) 71: 53 - 58, 1997、スタイナー (Steiner), M. ら, トロンボシス・アンド・ヘモスタシス (Thromb. Haemost.) 72: 979 - 984, 1994、ド・ローズ (De Rose), V. ら, アメリカン・ジャーナル・オブ・レスピラトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディシン (Am. J. Respir. Crit. Care Med.) 157: 1234 - 1239, 1998)。E-セレクチンの血清濃度は、虚血発作後に上昇するが、これらの変化が一過性であるか、またはまだ確認されていないメカニズムにより調節されるならば、血清濃度は明確ではない。血清 E-セレクチンは、内皮細胞損傷の特異的マーカーになるかもしれない。しかし、E-セレクチンは、炎症病状を発生させる種々の症状を有する患者の血清中で上昇するので、脳卒中または脳損傷の特異的マーカーではない。さらに、血清 E-セレクチン濃度の上昇は、脳卒中に関連したリスク因子のいくつかと関係がある。

【0178】

頭部アクチベータ (HA) は、視床下部および腸内に存在する 11 のアミノ酸からなる 1.1 kDa の神経ペプチドである。HA は本来淡水の腔腸動物ヒドラに存在し、頭部特異的増殖および分化因子として作用する。ヒトでは、脳が発達する間の成長調節剤であると考えられている。正常血清 HA 濃度は、 $< 0.1 \text{ ng/ml}$ (100 pM) である。血清 HA 濃度は、神経または神経内分泌に由来する腫瘍を有する患者において持続的に上昇する (シャラー (Schaller), H. C. ら, ジャーナル・オブ・ニューロオンコロジー (J. Neurooncol.) 6: 251 - 258, 1988、ウィニキス (Winnikes), M. ら, ユーロピアン・ジャーナル・オブ・キャンサー (Eur. J. Cancer) 28: 421 - 424, 1992)。脳卒中に付随して起きる HA 血清上昇に関する研究は報告されていない。HA は、神経または神経内分泌に由来する腫瘍により連続的に分泌されると考えられ、腫瘍除去後血清濃度は正常値に戻る。神経内分泌に誘導された腫瘍を有する患者では、血清 HA 濃度は、 6.8 ng/ml (6.8 nM) を超えることがある。脳卒中パネルの一部としての HA の有用性は、神経または神経内分泌に由来する腫瘍を有する患者を識別することである。これらの患者は、脳卒中に関連した脳の損傷ではなく、癌の結果として脳損傷に付随するマーカーの血清上昇を有することができる。これらの患者は、脳損傷の迅速な診断から効果が得られる患者群の小さなサブセットかもしれないが、マーカーとして HA を使用することは患者の識別に役立つであろう。最後に、アンギオテンシン転換酵素である、血清酵素は、HA を分解する能力があり、血液試料は、この活性を阻害する抗凝固剤として EDTA を用いて抽出されねばならない。

【0179】

グリケート化されたヘモグロビン Hb A1c の測定により、血糖が延長時間において上昇する度合いの評価が得られ、したがって、この測定は糖尿病が患者においてコントロールされる程度に関連している。グルコースは、ヘモグロビン A にゆっくり結合し、A1c サブタイプを形成する。逆反応または分解は、比較的ゆっくり進むので、何らかの蓄積がほぼ 4 週間持続する。正常な血糖レベルの場合、グリケート化されたヘモグロビンは 4.5% ~ 6.7% になると期待される。しかし、血糖濃度が上がると、より多くの結合が生じる。グリケート化されたヘモグロビンの測定が 8.0% を超える場合は、経過時間による血糖のコントロールに欠陥があることが示唆されている。

【0180】

(vii) アポトーシスに関連したマーカー

CPP-32、YAMA、およびアポパインとも呼ばれる、カスパーゼ-3 は、細胞ア

ポトーシスの間に活性化される、インターロイキン - 1 転換酵素 (ICE) 様細胞内システイン蛋白質分解酵素である。カスパーゼ - 3 は、20 kDa および 11 kDa のサブユニットのヘテロダイマーへのアポトーシス導入の間に蛋白質分解酵素により活性化される不活性な 32 kDa の前駆体として存在する (フェルナンデス - アルネムリ (Fernandes - Alnemri), T. ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 269: 30761 - 30764, 1994)。カスパーゼ - 3 の細胞基質には、ポリ (ADP - リボース) ポリメラーゼ (PARP) およびステロール調節エレメント結合蛋白質 (SPEBP) (リウ (Liu), X. ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 271: 13371 - 13376, 1996) がある。カスパーゼ - 3 の正常血漿濃度は不明である。ACS に関連したカスパーゼ - 3 の血漿濃度の変化に関する研究は発表されていない。虚血および低酸素症に関連した心筋細胞へのアポトーシスの導入の仮説を支持する事実の数は増加している (サラステ (Saraste), A., ヘルツ (Herz) 24: 189 - 195, 1999、オーツカ (Ohtsuka), T. ら, コロナリー・アーテリー・ディーズ (Coron. Artry Dis.) 10: 221 - 225, 1999、ジェームス (James), T. N., コロナリー・アーテリー・ディーズ (Coron. Artry Dis.) 9: 291 - 307, 1998、ピアリク (Bialik), S. ら, ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (J. Clin. Invest.) 100: 1363 - 1372, 1997、ロング (Long), X. ら, ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (J. Clin. Invest.) 99: 2635 - 2643, 1997)。血漿カスパーゼ - 3 濃度の上昇は、アポトーシスを含む何らかの生理学的所見と関係がある。運動の間および運動後の骨格筋、および脳虚血においてアポトーシスが誘発されることを示唆する事実がある (キャラロ (Carraro), U. およびフランセスチ (Franceschi), C., エージング (Aging (Milano)) 9: 19 - 34, 1997、マックマナス (MacManus), J. P. ら, ジャーナル・オブ・セレブラル・ブラッドフロー・アンド・メタボリズム (J. Cereb. Blood Flow Metab.) 19: 502 - 510, 1999)。

【0181】

カテプシン D (E. C. 3. 4. 23, 5.) は、可溶性リソソームのアスパラチン酸蛋白質分解酵素である。カテプシン D は、プレプロカテプシン D として小胞体中で合成される。マンノース - 6 - ホスフェート・タグを有すると、カテプシン D は、マンノース - 6 - ホスフェート受容体により承認される。酸性リソソームに入ると、単一鎖プロカテプシン D (52 kDa) は、カテプシン D に活性化され、次いで、成熟 2 鎖カテプシン D (それぞれ、31 および 14 kDa) に活性化される。カテプシン D の標的に含まれる 2 つのマンノース - 6 - ホスフェート受容体は、細胞内および細胞外の膜の両方に発現される。グリコシル化は、細胞内で普通に行き交う場合は困難であると考えられている。カテプシン D の基礎的な役割は、細胞内および内在化された蛋白質を分解することである。カテプシン D は、抗原処理およびペプチドホルモンの酵素発生に参加してい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、プロラクチンの処理に連結しているように思われる。ラットの乳腺は、プロラクチンの生物学的に活性なフラグメントの形成にこの酵素を用いている。カテプシン D は、多種多様な組織においてそれらのリモデリングまたは退行において、およびアポトーシスにおいて機能的である。

【0182】

脳 スペクチン (フォドリンとも呼ばれる) は、約 284 kDa の細胞骨格蛋白質であり、これはカルシウムに依存する様式においてカルモジュリンと反応する。エリスロイド・スペクチンのように、脳 スペクチンは、オリゴマーを形成する (特に、ダイマーおよびテトラマー)。脳 スペクチンには、2 つの EF ハンド・ドメインおよび 23 のスペクチン反復体が含まれている。アポトーシス細胞死の間の スペクチンのカスパーゼ 3 が媒介する分割は、膜安定性の変更およびアポトーシス体の形成において重要な役割を果た

している。

【0183】

その他の好ましいマーカー

次の表は、疾患または症状に関連した追加の好ましいマーカーのリストを提示しており、各マーカーは鑑別診断について有用な情報を提示することができる。当業者が理解し、本明細書で記述されているように、パネル内の追加のマーカーを用いて考えるとマーカーは異なる症状を示すかもしれない、一方、患者の臨床状態すべてについて考えると、マーカーは、異なる症状を示すかもしれない。

【0184】

【表 2 - 1】

マーカー	分類
ミオグロビン	組織損傷
E-セレクトリン	組織損傷
VEGF	組織損傷
EG-VEGF	組織損傷
トロポニンIおよび複合体	心筋損傷
トロポニンTおよび複合体	心筋損傷
アネキシンV	心筋損傷
B-エノラーゼ	心筋損傷
CK-MB	心筋損傷
グリコーゲンホスホリラーゼ-BB	心筋損傷
心臓型脂肪酸結合蛋白質	心筋損傷
ホスホグリセリン酸ムターゼ	心筋損傷
S-100a0	心筋損傷
ANP	血圧調節
CNP	血圧調節
キニンゲン	血圧調節
CGRP II	血圧調節
ウロテンシン II	血圧調節
BNP	血圧調節
カルシトニン遺伝子関連ペプチド	血圧調節
arg-バソプレシン	血圧調節
エンドセリン-1 (および/または大ET-1)	血圧調節
エンドセリン-2 (および/または大ET-2)	血圧調節
エンドセリン-3 (および/または大ET-3)	血圧調節
プロカルシトニン	血圧調節
カルシホシン	血圧調節
アドレノメジュリン	血圧調節
アルドステロン	血圧調節
アンギオテンシン1	血圧調節
アンギオテンシン2	血圧調節
アンギオテンシン3	血圧調節
ブラジキニン	血圧調節
タチキニン-3	血圧調節
カルシトニン	血圧調節
エンドセリン-2	血圧調節
エンドセリン-3	血圧調節
レニン	血圧調節
ウロジラチン	血圧調節
グレリン	血圧調節
プラスミン	凝固および止血
トロンビン	凝固および止血

10

20

30

40

【0185】

【表 2 - 2】

アンチトロンピン-III	凝固および止血
フィブリノーゲン	凝固および止血
フォンビルブランド因子	凝固および止血
D-ダイマー	凝固および止血
PAI-1	凝固および止血
蛋白質C	凝固および止血
可溶性内皮蛋白質C受容体 (EPCR)	凝固および止血
TAFI	凝固および止血
フィブリノペプチドA	凝固および止血
プラスミン α 2アンチプラスミン複合体	凝固および止血
血小板因子4	凝固および止血
血小板誘導増殖因子	凝固および止血
P-セレクチン	凝固および止血
プロトロンビン・フラグメント1+2	凝固および止血
B-トロンボグロブリン	凝固および止血
トロンビン・アンチトロンピンIII複合体	凝固および止血
トロンボモジュリン	凝固および止血
血栓前駆体蛋白質	凝固および止血
組織因子	凝固および止血
組織因子経路阻害剤- α	凝固および止血
組織因子経路阻害剤- β	凝固および止血
塩基性カルポニン1	血管組織
ベータ様1インテグリン	血管組織
カルポニン	血管組織
CSR P2	血管組織
エラスチン	血管組織
エンドセリン内皮細胞選択接着分子 (ESAM)	血管組織
フィブリリン1	血管組織
結合接着分子-2	血管組織
LTBP4	血管組織
平滑筋ミオシン	血管組織
トランスジェリン	血管組織
タイプIプロコラーゲンのカルボキシ末端プロペプチド (PICP)	コラーゲン合成
コラーゲン・カルボキシ末端テロペプチド (ICTP)	コラーゲン分解
APRIL (TNFリガンド・スーパーファミリー・メンバー13)	炎症
補体C3a	炎症
CCL-5 (RANTES)	炎症
CCL-8 (MCP-2)	炎症
CCL-19 (マクロファージ炎症蛋白質-3 β)	炎症
CCL-20 (MIP-3 α)	炎症
CCL-23 (MIP-3)	炎症
CXCL-13 (小誘導性サイトカインB13)	炎症

10

20

30

40

【表 2 - 3】

CXCL-16 (小誘導性サイトカインB16)	炎症
グルタチオンS転移酵素	炎症
HIF1アルファ	炎症
IL-25	炎症
IL-23	炎症
IL-22	炎症
IL-18	炎症
IL-13	炎症
IL-12	炎症
IL-10	炎症
IL-1-ベータ	炎症
IL-1ra	炎症
IL-4	炎症
IL-6	炎症
IL-8	炎症
リソホスファチジン酸	炎症
MDA修飾LDL	炎症
ヒト好中球エラスターゼ	炎症
C反応性蛋白質	炎症
インスリン様増殖因子	炎症
誘導酸化窒素合成酵素	炎症
細胞内接着分子	炎症
リポカリン-2	炎症
乳酸脱水素酵素	炎症
MCP-1	炎症
MDA-LDL	炎症
MMP-1	炎症
MMP-2	炎症
MMP-3	炎症
MMP-9	炎症
TIMP-1	炎症
TIMP-2	炎症
TIMP-3	炎症
n-アセチルアスパルテート	炎症
PTEN	炎症
ホスホリパーゼA2	炎症
TNF受容体スーパーファミリー・メンバー1A	炎症
形質転換増殖因子ベータ	炎症
TL-1 (TNFリガンド関連分子-1)	炎症
TL-1a	炎症
腫瘍壊死因子アルファ	炎症
血管細胞接着分子	炎症
血管内皮増殖因子	炎症
シスタチンC	炎症

10

20

30

40

【0187】

【表 2 - 4】

サブスタンスP	炎症
ミエロペル酸化酵素 (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
カーディオトロフィン1	炎症
ハプトグロビン	炎症
PAPPA	炎症
s-CD40リガンド	炎症
HMG-1 (またはHMGB1)	炎症
IL-2	炎症
IL-4	炎症
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
オステオプロテゲリン	炎症
プロスタグランジンD-合成酵素	炎症
プロスタグランジンE2	炎症
RANKリガンド	炎症
HSP-60	炎症
血清アミロイド	炎症
s-iL18受容体	炎症
S-iL-1受容体	炎症
s-TNFP55	炎症
s-TNFP75	炎症
sTLR-1 (可溶性トール様受容体-1)	炎症
sTLR-2	炎症
sTLR-4	炎症
TGF- β	炎症
MMP-11	炎症
ベータNGF	炎症
CD44	炎症
BGF	炎症
E-セレクチン	炎症
フィブロネクチン	炎症
RAGE	炎症
好中球エラスターゼ	肺損傷
KL-6	肺損傷
LAMP3	肺損傷
LAMP3	肺損傷

10

20

30

40

【表 2 - 5】

肺界面活性蛋白質A	肺損傷
肺界面活性蛋白質B	肺損傷
肺界面活性蛋白質C	肺損傷
肺界面活性蛋白質D	肺損傷
ホスホリパーゼD	肺損傷
PLA2G5	肺損傷
SETPC	肺損傷
MAPK10	神経組織損傷
KCNK4	神経組織損傷
KCNK9	神経組織損傷
KCNQ5	神経組織損傷
14-3-3	神経組織損傷
4.1B	神経組織損傷
APOE4-1	神経組織損傷
ミエリン塩基性蛋白質	神経組織損傷
アトロフィン1	神経組織損傷
脳誘導ニューロトロフィン因子	神経組織損傷
脳脂肪酸結合蛋白質	神経組織損傷
脳チュブリン	神経組織損傷
CACNA1A	神経組織損傷
カルビンジンD	神経組織損傷
カルプレイン	神経組織損傷
炭酸脱水酵素X1	神経組織損傷
CBLN1	神経組織損傷
セレベリン1	神経組織損傷
キメリン1	神経組織損傷
キメリン2	神経組織損傷
CHN1	神経組織損傷
CHN2	神経組織損傷
毛様体神経栄養因子	神経組織損傷
CK-BB	神経組織損傷
CRHR1	神経組織損傷
C-タウ	神経組織損傷
DRPLA	神経組織損傷
GFAP	神経組織損傷
GPM6B	神経組織損傷
GPR7	神経組織損傷
GPR8	神経組織損傷
GRIN2C	神経組織損傷
GRM7	神経組織損傷
HAPIP	神経組織損傷
HIP2	神経組織損傷
LDH	神経組織損傷
ミエリン塩基性蛋白質	神経組織損傷

10

20

30

40

【0189】

【表 2 - 6】

NCAM	神経組織損傷	
NT-3	神経組織損傷	
NDPKA	神経組織損傷	
神経細胞接着分子	神経組織損傷	
NEUROD2	神経組織損傷	
ニューロフィリメントL	神経組織損傷	
ニューログロビン	神経組織損傷	
ニューロモジュリン	神経組織損傷	
神経細胞特異的エノラーゼ	神経組織損傷	10
ニューロペプチドY	神経組織損傷	
ニューロテンシン	神経組織損傷	
ニューロトロフィン1, 2, 3, 4	神経組織損傷	
NRG2	神経組織損傷	
PACE4	神経組織損傷	
ホスホグリセレート・ムターゼ	神経組織損傷	
PKCガンマ	神経組織損傷	
プロテオリピド蛋白質	神経組織損傷	
PTEN	神経組織損傷	
PTPRZ1	神経組織損傷	20
RGS9	神経組織損傷	
RNA結合蛋白質調節サブユニット	神経組織損傷	
S-100β	神経組織損傷	
SCA7	神経組織損傷	
セクレタゴジン	神経組織損傷	
SLC1A3	神経組織損傷	
SORL1	神経組織損傷	
SREB3	神経組織損傷	
STAC	神経組織損傷	30
STX1A	神経組織損傷	
STXBP1	神経組織損傷	
シンタクシン	神経組織損傷	
トロンボモジュリン	神経組織損傷	
トランススィレチン	神経組織損傷	
アデニレート・キナーゼ-1	神経組織損傷	
BDNF	神経組織損傷	
ニューロキニンA	神経組織損傷	
ニューロキニンB	神経組織損傷	
s-アセチル・グルタチオン	アポトーシス	40
チトクロームC	アポトーシス	
カスパーゼ3	アポトーシス	
カセプシンD	アポトーシス	
α-スペクトリン	アポトーシス	

【0190】

ユビキチン化および敗血症

蛋白質のユビキノン媒介による分解は、細胞外物質が細胞に組み込まれる方法、細胞膜から生物化学的信号の移動などの多数のプロセスのコントロール、および転写オン・オフ・スイッチなどの細胞機能の調節において主な役割を果たす。ユビキチン系は、免疫反応

および発症に関係している。ユビキチンは、76個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、これは分解の標的になっている蛋白質と結合している。ユビキチン-蛋白質の抱合体は、蛋白質からユビキチンを切り取り、次いで、この蛋白質は分解される26S蛋白質分解複合体により認識されている。

【0191】

敗血症は、非リソソーム系エネルギー依存型蛋白質分解経路により骨格筋中の蛋白質分解を刺激し、ユビキチンmRNAの筋肉レベルも上昇したので、これらの結果は、敗血症誘起筋肉蛋白質の分解が、エネルギー-ユビキチン依存型蛋白質分解経路の上の方へ調節された活性により生じることを示すと、解釈された。同じ蛋白質分解経路が、神経支配除去、空腹、酸血症、癌、および火傷により生じた筋肉分解に関係していた。したがって、ユビキチン化された蛋白質、または特異的ユビキチン-蛋白質抱合体またはそれらのフラグメントのレベルは、本発明の追加のマーカーとして測定することができる。チアノ(Tiano)ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 99:163-168, 1997、を参照のこと。その上、ユビキチン自身の循環レベルは、本明細書で記述された方法における有用なマーカーになりうる。例えば、マジェチャック(Majetscak)ら、ブラッド(Blood) 101:1882-1890, 2003、を参照のこと。

10

【0192】

興味深いことに、蛋白質または蛋白質フラグメントのユビキチン化は、敗血症の非特異的マーカーをより特異的なマーカーに転換することができる。例えば、筋肉損傷は、循環系内の筋肉蛋白質の濃度を上げることができる。しかし、ユビキチン化経路を特異的に上の方に調節することにより、敗血症は、ユビキチン化された筋肉蛋白質を増加させ、敗血症誘導筋肉損傷から非特異的筋肉損傷を区別できるようになる。

20

【0193】

当業者は、ユビキチン自身、ユビキチン-蛋白質抱合体、またはユビキチンとユビキチン-蛋白質抱合体との両方を認めるユビキチンの検定法がデザインされうることを承認するであろう。例えば、サンドイッチ型免疫検定法で使われる抗体は、固体相抗体およびラベルされた抗体の両方が、ユビキノンの一部が非抱合体ユビキチンとユビキチン抱合体の両方で結合に利用できることを認めるように選択される。一方、筋肉蛋白質トロポニンのユビキチン抱合体に対して特異的な検定法が、ユビキチンを認める1つの抗体(固体相またはラベル上で)、トロポニンを認める第2の抗体(固体相またはラベルのその他)を使用できる。

30

【0194】

本発明は、本明細書で記述された何らかのマーカーのユビキチン抱合体の測定を思料している。マーカーとして検出に好ましいユビキチン-筋肉蛋白質抱合体には、トロポニンI-ユビキチン、トロポニンT-ユビキチン、トロポニンC-ユビキチン、2成分および3成分トロポニン複合体-ユビキチン、アンチ-ユビキチン、ミオシン-ユビキチン、トロポミオシン-ユビキチン、およびアクチニン-ユビキチンがあるが、これらに限定されない。

【0195】

SIRSの原因を区別するための代表的マーカーおよびマーカーパネル

代表的マーカーおよびマーカーパネルは、敗血症を診断し、SIRSのその他の原因から敗血症、重症の敗血症、および/または敗血症ショックを区別し、敗血症患者のリスクの層別化に役立つようにデザインされるのが好ましい。特に好ましいマーカーは、CRP、IL-1、IL-1ra、IL-6、IL-8、HMG-1、TNF、MIF、MCP-1、BNP、CNP、pro-BNP、pro-CNP、NT-pro-BNP、組織因子、フォンビレブランド因子、vWF-A1、vWF-インテグリン結合ドメイン、vWF-A3、またはこれらの免疫学的に検出できるフラグメントである。これらのフラグメントは、これらのマーカーの1つの代用として使えるか、組織内にマーカーの放出を開始する現象の開始と試料が取得または分析される時間との間の経過時間、試料の取得

40

50

と試料が分析される時間の間の経過時間、問題の組織試料の型、貯蔵状態、存在する蛋白質分解酵素の量、などに関する追加の情報が得られるものである。

【0196】

これら個々のマーカーは、マーカーパネルの中でグループ分けすることもできる。好ましいパネルは、炎症に関連した1つ以上のマーカーおよび血圧調節に関連した1つ以上のマーカー、炎症に関連した1つ以上のマーカーおよび凝固および止血に関連した1つ以上のマーカー、または炎症に関連した1つ以上のマーカーおよび凝固および止血に関連した1つ以上のマーカーおよび血圧調節に関連した1つ以上のマーカーがある。

【0197】

特に好ましいマーカーパネルには、CRP、IL-1、IL-1ra、IL-6、IL-8、HMG-1、TNF、MIF、MCP-1、BNP、CNP、pro-BNP、pro-CNP、NT-pro-BNP、組織因子、フォンビレブランド因子、vWF-A1、vWF-インテグリン結合ドメイン、vWF-A3、またはこれらの免疫学的に検出できるフラグメントから選択される複数のマーカーが含まれる。

【0198】

検定法測定ストラテジー

本発明のマーカーの検出および分析に関する方法および装置については、多くの方法および装置が当業者には周知である。患者テスト試料中のポリペプチドまたは蛋白質については、免疫検定法の装置および方法がよく使われる。例えば、米国特許第6,143,576号、第6,113,855号、第6,019,944号、第5,985,579号、第5,947,124号、第5,939,272号、第5,922,615号、第5,885,527号、第5,851,776号、第5,824,799号、第5,679,526号、第5,525,524号、および第5,480,792号を参照のこと。なお、これらの特許の各々は、すべての表、図およびクレームを含めて、その全体が引用により本明細書に組み込まれている。これらの装置および方法は、目的とする分析対象物質の存在または量に関連している信号を作るために種々のサンドイッチ型、競合、または非競合検定法フォーマットにおいてラベルを付けた分子を利用することができる。さらに、バイオセンサーおよび光学免疫検定法などの特定の装置および方法は、ラベル付けされた分子を必要とせずに、分析対象物質の存在または量を定めるために使うことができる。例えば、米国特許第5,631,171号および第5,955,377号を参照のこと。なお、これらの特許の各々は、すべての表、図およびクレームを含めて、その全体が引用により本明細書に組み込まれている。当業者は、ベックマンアクセス(Beckman Access)、アボットアクスシム(Abbott AxSym)、ロッシュエレクシス(Roche Elec Sys)、ダーデ・ベーリング・ストラタス・システムズ(Dade Behring Stratus Systems)を含むが、これらに限定されないロボット装置が本明細書で開示された免疫検定法を行いうる免疫検定法分析器であることも認めている。

【0199】

当業者にはその他の方法が周知であるが、マーカーは、免疫検定法を用いて分析するのが好ましい(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、各マーカーに対して特異的な抗体を用い、特異的な結合を検出して測定される。例えば、酵素結合免疫検定法(ELISA)、放射免疫検定法(RIA)、競合結合検定法など、適切な免疫検定法が利用される。マーカーへの抗体の特異的免疫学的結合は、直接的または間接的に検出されうる。直接ラベルには、抗体に取り付けられた、蛍光または発光のタグ、金属、染料、放射性核種などがある。間接ラベルには、アルカリ性ホスファターゼ、セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼなど当該分野で周知の種々の酵素がある。

【0200】

マーカーに対して特異的な固定酵素を使用することも、本発明では思料されている。抗体は、磁性粒子またはクロマトグラフ・マトリックス粒子、分析場所(マイクロタイターウェルなど)の表面、固体基質物質の部片または膜(プラスチック、ナイロン、紙など)

などの多様な固体支持体上に固定される。検定用帯材は、固体支持体上に1つまたは複数の抗体を配列するか、抗体をコーティングすることにより作られる。この帯材は、次いで、テスト試料に浸漬し、洗浄および検出の工程を経て迅速に処理されて、着色スポットなどの測定可能な信号を発生させる。

【0201】

複数のマーカーの分析は、1つのテスト試料を用いて別々または同時に行われる。マーカーの別々または逐次的検定に適した装置には、Elec Sys (Roche)、AxSYM (Abbott)、Access (Beckman)、登録商標ADVIAおよび登録商標CENTAUR (Bayer)の免疫検定装置、登録商標NICHOLS ADVANTAGE (Nichols Institute)免疫検定装置、などの臨床検査分析器がある。好ましい装置または蛋白質チップは、単一表面上で複数のマーカーの同時検定を行う。特に有用な物理的フォーマットは、複数の異種分析対象物質を検出するための複数の個別のアクセス可能な位置を有する表面を含む。このようなフォーマットには、蛋白質マイクロ配列、または「蛋白質チップ」(例えば、ング(Ng)およびイラッグ(Illag)、ジャーナル・オブ・セルラー・アンド・モレキュラー・メディシン(J. Cell. Mol. Med.) 6: 329-340 (2002)を参照のこと)および特定の毛細管装置(例えば、米国特許第6,019,944号を参照のこと)が含まれる。これらの実施形態では、個別の各表面位置は、各位置における検出のために1つ以上の分析対象物質(例えば、マーカー)を固定するために抗体を含むことができる。一方、表面は、表面の個別の位置に固定された1つ以上の個別の粒子(例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子)を含む。表面の個別の位置では、マイクロ粒子が、検出するための1つの分析対象物質(例えば、1つのマーカー)を固定するために抗体を含む。

10

20

【0202】

複数の試料を効率的に処理するために、1つのテストにいくつかのマーカーが組み込まれる。さらに、当業者は、同じ患者からの複数の試料(例えば、連続的な時点における)をテストする価値を認めるであろう。このような一連の試料のテストにより、時間によるマーカーレベルの変化を確認することができるようになる。マーカーレベルの増減、並びにマーカーレベルの変化の不在は、疾患の発症からの時間をほぼ確認すること、救助可能な組織の存在および量、薬物療法の適切さ、症状の再発または緩解により示された種々の療法の効果、種々の型のACSの層別化、疾患重症度の確認、および将来の疾患のリスクを含む患者の転帰の確認を含むがこれらに限定されない疾患の状態について有用な情報を与える。

30

【0203】

上で引用されたマーカーからなるパネルは、鑑別診断に関する重要な情報を与えるために作られる。この種のパネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、またはそれ以上のマーカーまたは個々のマーカーを用いて作られる。単一マーカーまたは比較的大きなマーカーパネルを含むマーカーのサブセットの分析は、種々の臨床条件における臨床感度および特異度を最適化するために当業者により行われる。これらには、外来、緊急治療、重要治療、集中治療、監視装置、入院患者、外来患者、医師オフィス、内科クリニック、および健康スクリーニング条件が含まれるが、これらに限定されない。さらに、当業者は、単一マーカーまたは臨床感度および特異度を最適化するために前述の条件の各々における診断閾値調節と組み合わせられた比較的大きなマーカーパネルを含むマーカーのサブセットを使用することができる。検定法の臨床感度は、その検定法が正確に予測する疾患を有する被験体のパーセンテージとして規定され、検定法の特異度は、その検定法が正確に予測する疾患を有しない被験体のパーセンテージとして規定される(臨床化学のティーツ(Tietz)教科書, 第2版, カール・バーチス(Carl Burtis)およびエドワード・アッシュウッド(Edward Ashwood)編集, W. B. サウンダース・アンド・カンパニー(Saunders and Company) p. 496)。

40

【0204】

50

マーカの分析は、やはり、種々の物理的フォーマットで行われる。例えば、マイクロタイター・プレートまたは自動化の使用は、多数のテスト試料の処理の促進に使える。一方、単一試料フォーマットは、タイムリーな様式、例えば、外来輸送または緊急ルーム条件における直接治療および診断を促進するために開発された。

【0205】

別の実施形態では、本発明はマーカ分析用のキットを提供している。この種のキットは、少なくとも1つのテスト試料の分析用装置および試薬、および検定を行うための説明書を含むのが好ましい。随意に、これらのキットは、特定の診断を含めるか、または排除するためにマーカパネルについて行われた免疫検定法から得られた情報を用いる1つ以上の手段を含むことができる。

10

【0206】

抗体の選択

抗体の発生および選択は、いくつかの方法で達成される。例えば、1つの方法は、当該分野で周知の固体相ペプチド合成方法を用いて目的とするポリペプチドを合成し、精製する。例えば、蛋白質精製へのガイド (Guide to Protein Purification), ドイツチャー (Deutcher), M. P., 編集, メソード・イン・エンチモロジー (Meth. Enzymol.) Vol. 182 (1990)、固体相ペプチド合成 (Solid Phase Peptide Synthesis), フィールズ (Fields), G. B., 編集, メソード・イン・エンチモロジー (Meth. Enzymol.) Vol. 289 (1997)、キソ (Kiso) ら, ケミストリー・アンド・ファーマシューティカル・ビュレティン (Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192 - 1199, 1990)、モスタファビ (Mostafa vi) ら, バイオメディカル・ペプチド・プロテインズ・アンド・ヌクレイック・アシツズ (Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids) 1: 255 - 260, 1995、フジワラ (Fujiwara) ら, ケミストリー・アンド・ファーマシューティカル・ビュレティン (Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326 - 1331, 1996) を参照のこと。次いで、選択されたポリペプチドは、例えば、マウスまたはうさぎに注入され、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を産生する。当業者は、例えば、(抗体、ラボラトリー・マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual), ハーロウおよびデビッド・レーン (Harlow and David Lane) 編集, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor), ニューヨーク州 (N. Y.)) に記載されているように、抗体の産生に多くの操作が利用できることを認めている。当業者は、抗体に似ている結合フラグメントまたは Fab フラグメントは、種々の操作により遺伝子情報から作られることも理解している (抗体エンジニアリング: 実用的アプローチ (Antibody Engineering: A Practical Approach) (ボレベック (Borreback), C.,) 編集, 1995, オックスフォード大学プレス (Oxford University Press)、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) 149: 3914 - 3920 (1992))。

20

30

40

【0207】

さらに、多数の刊行物が、選択された標的に結合するポリペプチドのライブラリーを産生し、選別するためにファージ表示技術の使用を報告している。例えば、クワラ (Cwirlla) ら, プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステート・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 87, 6378 - 6382, 1990、デブリン (Devlin) ら, サイエンス (Science) 249, 404 - 406, 1990、スコット (Scott) およびスミス (Smith), サイエンス (Science) 249, 386 - 388, 1990、およびラードナー (Ladner) ら, 米国特許第 5, 571, 69

50

8号を参照のこと。ファージ表示方法の基本的な概念は、選別されるべきポリペプチドコード化DNAとこのポリペプチドとの間の物理的会合の確立である。この物理的会合は、ファージ粒子により与えられ、この粒子はポリペプチドをコード化するファージゲノムを封入しているキャプシドの一部としてポリペプチドを表示する。ポリペプチドとそれらの遺伝物質の間の物理的会合の確立は、異なるポリペプチドを有する非常に大きな数のファージの同時質量選別を行うことを可能にする。標的に対して親和性を有するポリペプチドを表示しているファージは、この標的に結合し、これらのファージはこの標的に対して親和性選別により濃縮される。これらのファージから表示されたポリペプチドのアイデンティティは、これらそれぞれのゲノムから決めることができる。これらの方法を用いて所望の標的に対して結合親和性を有することが確認されたポリペプチドは、次いで、普通の方法により大量に合成される。例えば、米国特許第6,057,098号を参照のこと。なお、この特許は、すべての表、図およびクレームを含めて、その全体が引用により本明細書に組み込まれている。

10

20

30

【0208】

これらの方法により作られる抗体は、精製され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する第1の選別により選択され、もし必要であれば、この抗体の親和性および特異性に関する結果を、結合から排除されることが望ましいポリペプチドと比較する。この選別操作は、マイクロタイター・プレートの個々のウェルにおける精製されたポリペプチドの固定を含む。可能性のある抗体および抗体群を含む溶液は、次いで、それぞれのマイクロタイターウェルに入れられ、約30分乃至2時間保温される。次いで、マイクロタイターウェルは洗浄され、ラベル付きの二次抗体（例えば、上昇した抗体がマウス抗体であれば、アルカリ性ホスフェートに結合したアンチマウス抗体）がウェルに添加され、約30分間保温され、次いで、洗浄される。このウェルに基質が添加され、この固定ポリペプチドに対する抗体が存在するならば、着色反応が起きるのである。

【0209】

そのようにして確認された抗体は、さらに、選択された検定デザインにおける親和性および特異性について分析される。標的蛋白質の免疫検定法を展開すると、精製された標的蛋白質は、選択された抗体を用いた免疫検定法の感度と特異度を判断するスタンダードとして作用する。種々の抗体の結合親和性は異なるので、特定の抗体ペア（例えば、サンドイッチ型検定において）は、互いに立体的に妨害し、抗体の絶対的な親和性および特異性よりも一層重要な尺度になる可能性がある。

【0210】

当業者は、抗体や結合フラグメントを産生したり、種々のポリペプチドに対する親和性と特異性についてスクリーニングおよび選択をするために多くのアプローチを取りうることを認めているが、これらのアプローチは本発明の範囲を変えるものではない。

【0211】

治療計画の選択

特定の非特異的な症状の潜在的原因の一例が、大きくて多様な1群の症状でありうるため、これらの潜在的原因に対する適切な治療は同様に大きくて多様でありうる。しかし、一旦診断が下されると、医師は、その診断に適合した処置方法を容易に選択することができる。当業者は、本明細書で記述された診断方法に関連して述べられた多数の疾患の適切な処置方法を知っている。例えば、（メルクの診断および治療法のマニュアル（Merck Manual of Diagnosis and Therapy），第17版，メルク・リサーチ・ラボラトリーズ（Merck Research Laboratories），ホワイト・ステーション，ニュージャージー州，1999）を参照のこと。

40

【0212】

以下の実施例は、本発明の説明に役立てるものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0213】

50

血液試料の採取

血液試料は、抗凝固剤としてEDTAを用いて熟練した検査員により採取され、10分以上遠心分離される。血漿成分は、無菌の冷凍小瓶に移され、-20以下の温度で冷凍される。検定データを統計学的に分析する場合に、これらの患者各々の臨床履歴が利用できる。

【実施例2】

【0214】

生化学分析

マーカーは、標準免疫検定技法を用いて測定される。これらの技法には、標的蛋白質を特異的に結合するための抗体の使用が含まれている。選択されたマーカーに対して向けられたモノクローナル抗体は、抗体あたり約5個のNHS-ビオチン部分の比率において、N-ヒドロキシサクシンイミド・ビオチン(NHS-ビオチン)を用いてビオチニル化される。次いで、抗体-ビオチン抱合体は、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され、このプレートに結合しない抗体抱合体は除去される。これが、マイクロタイター・プレート内に「アンチマーカー」を形成する。同じマーカーに対して向けられた別のモノクローナル抗体は、サクシンイミジル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-サクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート(SPDP)を用いてアルカリ性ホスフェートに対して結合される(ピアース, ロックフォード, イリノイ州)。

10

【0215】

免疫検定法はTECANジェネシスRSP200/8ワークステーションで行われる。ビオチニル化抗体は、予めアビジンを塗布されたマイクロタイター・プレートウェル内にピペットで注入され、60分間保温される。非結合抗体を含む溶液は除去され、150mMのNaCl、0.1%アジ化ナトリウム、および0.02%トウイーン-20を含む20mMボレート(pH7.42)からなる洗浄緩衝液でウェルは洗浄された。血漿試料(10 μ L)は、マイクロタイター・プレートウェル内にピペットで注入され、60分間保温される。次いで、試料は除去され、洗浄緩衝液でウェルは洗浄された。次いで、抗体-アルカリ性ホスフェート抱合体は、ウェルに添加され、さらに60分間保温され、その後抗体抱合体は除去され、洗浄緩衝液でウェルは洗浄された。基質(登録商標AttoPhos, プロメガ, マジソン, ウィスコンシン州)がウェルに添加され、蛍光生成物の形成速度は、その患者の試料のマーカー濃度に関係していた。

20

30

【実施例3】

【0216】

マーカー濃度

正常な被験体および菌血症について培養陽性である陽性SIRS患者から得られた試料は、次のようなマーカーについて分析される(測定単位は括弧内に示す): CRP(μ g/mL)、HSP-60(ng/mL)、IL-1(pg/mL)、IL1-ra(pg/mL)、IL-6(pg/mL)、IL-8(pg/mL)、MIF(ng/mL)、組織因子(pg/mL)、TNF(pg/mL)、VCAM(ng/mL)、フォンビレブランド因子(ng/mL)、MCP-1(pg/mL)、BNP(pg/mL)、トロンピン-アンチトロンピンIII(ng/mL)、ICAM(ng/mL)、およびCNP(pg/mL)。結果は、次の表に提示される。

40

【0217】

【表 3】

正常

	CRP	HSP-60	IL-1 β	IL-1ra	IL-6	IL-8	MIF
n	36	40	40	40	40	39	40
平均値	7.7	< 10	< 4	< 250	< 5	25.4	61.5
中央値	2.9	< 10	< 4	< 250	< 5	< 20	44.5
90番目の百分位数	23.1	< 10	< 4	< 250	< 5	< 20	114.5
95番目の百分位数	38.9	< 10	< 4	< 250	< 5	20.9	150.8
99番目の百分位数	51.0	< 10	< 4	< 250	< 5	68.7	> 200

10

【0 2 1 8】

【表 4】

菌血症

	CRP	HSP-60	IL-1 β	IL-1ra	IL-6	IL-8	MIF
n	96	90	89	90	90	90	85
平均値	152.2	74.8	24.2	4561.5	79.4	153.0	83.8
中央値	80.4	55.5	8.8	2082.1	33.4	46.8	75.8
90番目の百分位数	429.9	160.6	63.6	12481.5	232.1	174.8	159.5
95番目の百分位数	439.1	162.3	65.9	15341.3	316.4	264.5	165.1
99番目の百分位数	467.9	163.6	68.4	20269.2	450.0	1685.2	188.7

20

【0 2 1 9】

【表 5】

正常

	TF	TNF- α	VCAM	vWF	MCP-1	BNP	TAT	ICAM	CNP
n	40	40	40	32	45	25	24	31	25
平均値	50.5	< 15	550.6	594.4	174.4	8.9	37	315	< 250
中央値	< 50	< 15	567.1	521.2	157.0	7.6	28	330	< 251
90番目の百分位数	< 50	< 15	752.1	1057.5	246.3	18.8	74	498	339
95番目の百分位数	50.2	< 15	761.8	1139.8	254.1	22.1	98	528	409
99番目の百分位数	61.6	< 15	982.8	1271.2	337.1	43.0	109	594	428

30

【0 2 2 0】

【表 6】

菌血症

	TF	TNF- α	VCAM	vWF	MCP-1	BNP	TAT	ICAM	CNP
n	81	89	80	82	64	65	56	90	63
平均値	230.1	33.0	696.0	1011.1	574.8	227.3	80.7	534.1	514.8
中央値	138.7	25.5	593.9	692.2	373.9	95.3	72.7	513.3	446.5
90番目の百分位数	416.4	61.8	1144.6	1328.0	1061.7	666.0	129.1	803.9	789.7
95番目の百分位数	581.9	69.2	1474.6	2701.6	1720.7	882.0	151.7	901.3	905.2
99番目の百分位数	1308.5	71.5	2379.9	9394.5	3373.0	1432.7	200.6	1059.7	1173.9

40

【実施例 4】

【0 2 2 1】

S I R Sにおける予後指標としてのBNPの使用

予測研究において、S I R Sの診断に関する4つの基準の内少なくとも2つを示す被験体は、救急部に提示した場合、およびその後のいろいろな機会に、血清BNP濃度について評価された。患者の転帰は、一次端点を表す入院死亡率で評価された。合計288名の患者が評価された。BNP四分位数は、最初、24時間後、および48時間後に採取され

50

た試料について測定された。各四分位数のBNP (pg/mLとして) は次の通りである。

【0222】

【表7】

試料ID	四分位数1	四分位数2	四分位数3	四分位数4
最初の血液	<15.3	15.3-55.4	55.4-199	>199
24時間後の血液	<52	52-214	214-583	>583
48時間後の血液	<39	39-129	129-471	>471

10

【0223】

図1-3に示したように、各血液で観察された端点リスクは、各四分位数、特に四分位数3および4において増加している。約50pg/mLと500pg/mLとの間の閾値は、SIRSにおけるリスクを層別化する場合に理に合っているように思われる。

【実施例5】

【0224】

20

SIRSにおけるリスクを層別化するためのパネル

2003年12月23日に出願された国際出願PCT/US03/41426号に記述された方法を用いて、SIRSにおけるリスクを層別化するための代表的パネルが確認された。可能性のある多数のマーカーからスタートして、反復操作が適用された。この操作において、マーカーの個々の閾値濃度は、それ自身はカットオフとして使われていないが、各患者の検定値が比較され、正規化される値として使われている。カットオフ上下の最小値および最大値を計算するためにウィンドウ因子が使われた。最大値より上の検定値は、最大値に設定され、最小値より下の検定値は最小値に設定されている。個々のマーカーの加重絶対値に1まで加える。マーカーの負の加重は、対照群の検定値が、疾患群の検定値よりも高いことを意味している。

30

【0225】

「パネル応答」は、カットオフ、ウィンドウ、および加重因子を用いて計算される。患者および対照の全集団のパネル応答は、個々のマーカーについて普通に行われるように、ROC分析にかけられ、「パネル応答」カットオフは、パネルにとって望ましい感度および特異度を生じるように選択される。各セットについて反復を行った後、方程式への寄与が最も弱いものが削除され、低減した数のマーカーについて反復プロセスを再開する。このプロセスは、パネルの感度および特異度として受け入れ可能な最小数のマーカーが得られるまで続けられる。

【0226】

これらの実施例では、「疾患」データセットは、敗血症であると診断され、敗血症で死亡した被験体の集団を表し、「対照」データセットは、敗血症であると診断されたが、生存し、病院から退院した被験体の集団を表す。これらの被験体の試料は、可能であれば、0(入院時)、3時間、6時間、12時間、および24時間に得られた。層別化において、敗血症のリスクとして考えられたマーカーには、BNP、IL-8、HMG-1、IL-1、IL-1raが含まれた。各被験体は、各時点における試料をすべて用意できたわけではなく、また、各マーカーについてすべて測定できたわけではない。例えば、下に報告したBNPのデータは、パネル1において、162名の「対照」被験体および89名の「疾患」被験体を含み、12時間で死亡した被験体は、24時間の時点では含まれていない。

40

【0227】

50

次のパネルは、この種のパネルにおけるマーカー「勾配」（即ち、時間によるマーカーレベルの変化）の使用も例示している。次の代表的パネルの場合、この勾配は、時間0と比較した、3時間、6時間、12時間、および24時間（各被験体についてどの試料を利用できるかによる）におけるマーカー濃度の変化を考慮して計算される。

【0228】

下に報告されたオッズ比は、ROC曲線プロットを用いて92.5%特異度における報告された感度において計算される。

【0229】

【表8-1】

パネル#	1	2	3	4
パネル内のマーカー	IL-8, BNP, IL-1ra, IL-1 β , IL-8勾配, BNP勾配, IL-1ra勾配, IL-1 β 勾配	IL-8, BNP, IL-1ra, IL-1 β , IL-8勾配, BNP勾配, IL-1ra勾配	IL-8, BNP, IL-1ra, IL-1 β , BNP勾配, IL-1ra勾配	IL-8, BNP, IL-1ra, IL-1 β , IL-1ra勾配
対照試料数n	505	506	510	514
疾患試料数n	245	248	252	252
平均ROC面積	0.764	0.760	0.759	0.760
SD(%)	0.01	0.01	0.02	0.01
92.5%特異度における平均感度	42%	42%	42%	42%
SD(%)	2.5	2.5	3.6	2.3
92.5%感度における平均特異度	42%	40%	38%	39%
SD(%)	4.4	3.8	4.3	3.5
オッズ比	9.0	9.0	8.8	9.0

10

20

【0230】

【表8-2】

パネル#	5	6	7	8
パネル内のマーカー	IL-8, BNP, IL-1ra, IL-1ra勾配	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, IL-1 β , IL-8勾配, BNP勾配, HMG-1勾配, IL-1ra勾配, IL-1 β 勾配	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, IL-1 β , IL-8勾配, BNP勾配, HMG-1勾配, IL-1ra勾配	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, IL-8勾配, BNP勾配, HMG-1勾配, IL-1ra勾配
対照試料数n	521	354	355	357
疾患試料数n	253	181	184	185
平均ROC面積	0.760	0.780	0.781	0.787
SD(%)	0.01	0.03	0.02	0.02
92.5%特異度における平均感度	43%	41%	40%	41%
SD(%)	2.4	4.3	4.2	3.6
92.5%感度における平均特異度	37%	52%	52%	53%
SD(%)	3.2	6.9	6.5	7.3
オッズ比	9.1	8.4	8.2	8.5

30

40

【0231】

【表 8 - 3】

パネル#	9	10	11	12
パネル内のマーカー	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, IL-8勾配, HMG-1 勾配, IL-1ra勾 配	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, HMG-1勾配, IL- 1ra勾配	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, HMG-1勾配	IL-8, BNP, HMG-1, HMG-1 勾配
対照試料数n	357	361	365	374
疾患試料数n	185	189	194	196
平均ROC面積	0.790	0.788	0.789	0.794
SD(%)	0.04	0.02	0.03	0.02
92.5%特異度における平均感度	41%	41%	42%	41%
SD(%)	4.9	4.0	4.5	3.7
92.5%感度における平均特異度	53%	52%	52%	51%
SD(%)	7.3	6.9	8.0	7.1
オッズ比	8.6	8.6	8.7	8.5

10

【0232】

マーカー勾配を考慮するこれらのパネルに加えて、別々の時点で採取された単一試料のみを考慮しているマーカーパネルが作られる。例えば、次のパネルでは、「疾患」データセットは、敗血症であると診断され、敗血症で死亡した被験体の集団を表し、「対照」データセットは、臨床的に敗血症であると診断されたが、生存し、病院から退院した被験体の集団を表す。なお、強調されているように、考慮された試料は、臨床提示の時点で敗血症の各被験体から採取された「第1採血」の試料または提示3時間後に採取された試料である。下に報告されたオッズ比は、ROC曲線プロットを用いて、92.5%特異度において報告された感度において計算される。

20

【0233】

【表 9 - 1】

パネル#	13(第1採血)	14(第1採血)	15(3H採血)	16(3H採血)	17(3H採血)
パネル内のマーカー	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, IL-1 β	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, IL-1 β	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra	IL-8, BNP, HMG-1
対照試料数n	98	99	93	94	96
疾患試料数n	52	53	53	54	55
平均ROC面積	0.730	0.735	0.743	0.749	0.754
SD(%)	0.02	0.02	0.02	0.06	0.01
92.5%特異度における平均感度	33%	34%	32%	36%	37%
SD(%)	3.8	5.3	4.4	5.5	2.8
92.5%感度における平均特異度	43%	44%	52%	55%	56%
SD(%)	4.8	4.8	6.3	8.2	4.6
オッズ比	6.1	6.3	5.9	6.9	7.3

30

【0234】

【表 9 - 2】

パネル#	18(第1採血)	19(第1採血)	20(3H採血)	21(3H採血)
パネル内のマーカー	IL-8, BNP, IL-1ra, IL-1 β	IL-8, IL-1 β , IL-1ra	IL-8, BNP, IL-1ra, IL-1 β	IL-8, IL-1 β , BNP
対照試料数n	139	140	131	133
疾患試料数n	72	72	71	72
平均ROC面積	0.696	0.685	0.718	0.733
SD(%)	0.01	0.01	0.06	0.01
92.5%特異度における平均感度	26%	26%	33%	33%
SD(%)	2.4	2.0	3.3	1.1
92.5%感度における平均特異度	36%	32%	37%	39%
SD(%)	3.4	2.9	7.1	4.6
オッズ比	4.3	4.4	6.2	6.0

10

【実施例 6】

【0235】

SIRSにおける診断および/またはリスクの層別化のためのパネル

上で詳細に述べたように、敗血症の90%以上の症例は、細菌感染を含んでいる。ただし、敗血症の強い臨床所見を示す患者の内50%以上は、細菌培養を確認できなかったと報告されている。例えば、2003年6月23日に電子版で発行されたジェイムス(James)ら、インテンシブ・ケア・メディシン(Int. Care Med.) 29: 1368-1371、を参照のこと。したがって、この種の分析に使用する「対照」群の選択は、培養陰性被験体を分けるためにこの不能性により複雑になるかもしれない。この陰性被験体は、敗血症である培養陰性被験体から敗血症に罹患せず、したがって、アンチ細菌療法(例えば、抗生物質)の効果が期待できる。

20

【0236】

再び、2003年12月23日に出願された国際出願PCT/US03/41426号に記述された方法を用いて、敗血症を有すると臨床的に診断されたが、生存し、病院から退院した培養陰性被験体の「対照」集団を、敗血症を有すると診断され、敗血症で死亡した「疾患」集団と比較することにより次のような代表的パネルが確認された。この「疾患」集団は、培養陽性被験体と培養陰性被験体との両方を含み、培養状態とは無関係に、これらの被験体は死亡したので、この集団を識別できれば、より積極的な療法が許されたかもしれない。この種のパネルは、敗血症の診断において、陽性の細菌培養がない場合でも補助的な手段として使え、および/または予後のためにも使える。

30

【0237】

【表 10】

パネル#	22(第1採血)	23(第1採血)	24(第1採血)	25(第1採血)	26(第1採血)
パネル内のマーカー	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1ra, IL-1 β	IL-8, BNP, HMG-1, IL-1 β	IL-8, BNP, HMG-1	IL-8, BNP, IL-1 β , IL-1ra	IL-8, IL-1 β , IL-1ra
対照試料数n	29	29	29	40	40
疾患試料数n	52	53	55	72	72
平均ROC面積	0.837	0.822	0.826	0.816	0.805
SD(%)	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02
92.5%特異度における平均感度	65%	61%	60%	56%	53%
SD(%)	5.8	7.2	4.0	5.2	5.7
92.5%感度における平均特異度	52%	51%	53%	51%	46%
SD(%)	7.9	6.9	5.9	5.4	6
オッズ比	22.5	19.0	18.3	15.9	14.0

40

【0238】

50

本発明が、これらの目的を行い、上で触れた目的および利益、並びに本発明が本来備えているものを取得するのに適合していることを、当業者は容易に理解するであろう。本明細書で提示された実施例は、好ましい実施形態を代表しており、本発明の範囲を限定するものではない。

【0239】

本発明の範囲および精神を逸脱することなく、本明細書で開示された発明を変更できることは、当業者には明らかであろう。

【0240】

本明細書で言及されたすべての特許および刊行物は、当業者のレベルの指標であろう。すべての特許および刊行物は、あたかも個々の刊行物が引用により組み込まれていることが具体的且つ個別に示されている程度と同じ程度に引用により本明細書に組み込まれている。

10

【0241】

本明細書で説明のために記述された本発明は、本明細書で具体的に開示されていない1つまたは複数のエレメント、1つまたは複数の限定が存在しない場合も適切に実行される。したがって、例えば、本明細書の各実施例において、用語「 $\cdot\cdot$ を含む」、「本質的に $\cdot\cdot$ からなる」および「 $\cdot\cdot$ からなる」のいずれかは、他の2つの用語のどちらかで置換される。用いられた用語および表現は、説明のための用語として使われ、限定のための用語として使われるわけではなく、このような用語および表現を使用する場合は、記述された特徴または特徴の一部と等価なものを何か除外する意図はなく、本願発明の範囲内で種々の修正が可能であることは認められている。したがって、本発明は、好ましい実施形態および随意の特徴により具体的に開示されているが、本明細書で開示された概念の修正および変更は当業者により変更され、添付されたクレームにより規定された本発明の範囲内で考えられることは了解されるであろう。

20

【0242】

別の実施形態は、特許請求の範囲に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0243】

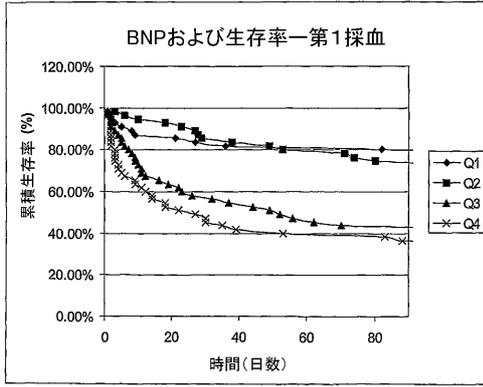
【図1】BNP濃度四分位値により層別されたSIRSに罹患している被験体の死亡率曲線を示している。

30

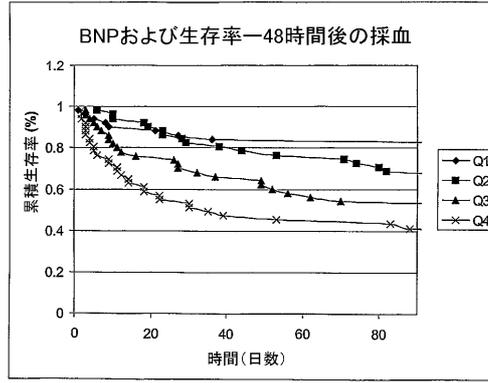
【図2】BNP濃度四分位値により層別されたSIRSに罹患している被験体の死亡率曲線を示している。

【図3】BNP濃度四分位値により層別されたSIRSに罹患している被験体の死亡率曲線を示している。

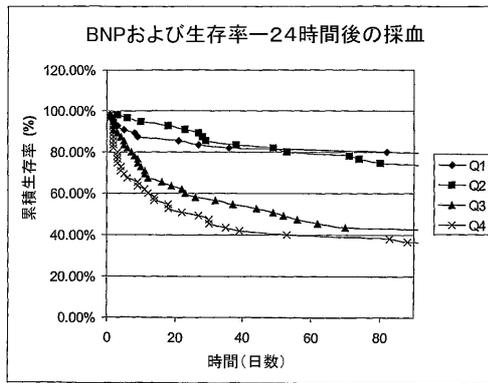
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

60700100049



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/31769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : c12 q 1/00		
US CL : 435/ 4, 7.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 435/ 4, 7.1		
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)		
West Medline Embase Biosis Chem Abs		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Brunkhorst F.M.et.al. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. Intensive Care Medicine. 2000 Volume 26 Supplement 2, pages S148-S152, see entire document	1-13, 16-17, 19-20, 27-33, 36-38, 40-43, 45-58, 61-62 and 64
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
07 August 2005 (07.08.2005)	29 JUN 2006	
Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer	
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450	Patrick J. Nolan	
Facsimile No. (703) 305-3230	Telephone No. 703-308-0196	
	571-272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

15. 2. 2007

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, 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 バルカース, ガナース, イー
 アメリカ合衆国 92025 カリフォルニア州 エスコンディド, パセオ デル ソル 289
 3

(72) 発明者 ダーレン, ジェフリー, アール
 アメリカ合衆国 92126 カリフォルニア州 サン ディエゴ, ケマートン ロード 105
 55

(72) 発明者 カーチック, ハワード, ジェイ
 アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州 サン ディエゴ, パノラミック レーン 54
 49

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

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA10 CA40 EA52

专利名称(译)	用于诊断败血症的方法和用于诊断的组合物		
公开(公告)号	JP2007518062A	公开(公告)日	2007-07-05
申请号	JP2006528307	申请日	2004-09-27
[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	バルカースガナースイー ダーレンジェフリーアール カーチックハワードジェイ ブシュラーケネスエフ		
发明人	バルカース,ガナーズ,イー ダーレン,ジェフリー,アール カーチック,ハワード,ジェイ ブシュラー,ケネス,エフ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C12Q C12Q1/68 G01N33/00 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.X G01N33/53.P C07K14/47		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA52		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
优先权	60/507113 2003-09-29 US 60/532777 2003-12-23 US 60/558945 2004-04-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于基于受试者的症状确定鉴别诊断，预后和治疗方案的方法和组合物。特别地，本发明涉及用于包括或排除SIRS或用于区分彼此和/或非感染性SIRS的败血症，严重败血症和/或败血症性休克的方法和组合物。

