

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 508753

(P2003 - 508753A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/573		G 0 1 N 33/573	B 2 G 0 4 5
33/53		33/53	D
33/545		33/545	Z
33/553		33/553	
33/577		33/577	B

審査請求 有 予備審査請求 (全 41数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 520103(P2001 - 520103)

(86) (22)出願日 平成12年8月25日(2000.8.25)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月27日(2002.2.27)

(86)国際出願番号 PCT/US00/24337

(87)国際公開番号 W001/016599

(87)国際公開日 平成13年3月8日(2001.3.8)

(31)優先権主張番号 09/384,356

(32)優先日 平成11年8月27日(1999.8.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ビアテック イメージング , エルエルシー
アメリカ合衆国 06442 コネチカット州,
アイボリートン, ピー.オー.ボックス
456, メイン ストリート 158

(72)発明者 コーネル - ベル , アン
アメリカ合衆国 06498 コネチカット州,
ウエストブルック, スティーブンスタウン
ロード, 55

(72)発明者 マッデン , キャサリン , エス .
アメリカ合衆国 20816 メリーランド州,
ベセスダ, リバー ロード 1805番 5101

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 中枢神経系の損傷を検出するためのアッセイ

(57)【要約】

虚血性イベント (例えば、脳卒中、一過性虚血発作、頭部外傷、心筋梗塞、または頭部の血流遮断をもたらす他の傷害) によって特徴づけられる疾患を迅速に診断するための方法を開示する。この方法は、末梢血中のプロテインキナーゼCの アイソフォーム (PKC γ) の存在を検出することを含むが、PKC γ は中枢神経系組織の損傷および血液脳関門の少なくとも一過性の損傷の指標となる。アッセイは、例えば救急医療スタッフによって、永久的な中枢神経系の損傷が起る前に患者の治療が可能な時間枠内で行なわれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物の中樞神経系から外れた末梢部において、プロテインキナーゼCの アイソフォーム (PKC γ) の存在を検出することを含んでなる、哺乳動物が虚血性イベントを起こしたかどうかを判定する方法。

【請求項2】 哺乳動物被験体において虚血性イベントを検出する方法であって、

(a) 該被験体から得られた末梢血試料を、PKC γ と結合複合体を形成する能力がある、検出可能な標識を有する結合パートナーと、接触させること；

(b) ステップ(a)で形成されたPKC γ /結合パートナー複合体の存在を検出すること；

を含んでなる、上記方法。

【請求項3】 前記結合パートナーが液体試料中に分散できる微細な固相支持体の形状をとり、該支持体がPKC γ と複合体を形成できる表面成分を展示する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記結合パートナーが抗PKC γ 抗体の形である、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 前記抗PKC γ 抗体が、主要な免疫グロブリンクラス、免疫グロブリンサブクラス、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、一本鎖抗体 (scFv)、キメラ抗体、ヒト化抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびダイアボディからなる群より選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記抗PKC γ 抗体が蛍光標識を有する、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 虚血性イベントが脳卒中、一過性虚血発作、頭部外傷、心筋梗塞、または頭部の血流遮断をもたらす外傷の結果生じたものである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項8】 哺乳動物被験体の血液中のPKC γ を検出する方法であって、
(a) 該被験体から得られた末梢血試料を、表面に第1の抗PKC γ 抗体を固定させた固相支持体と、該試料中のPKC γ と結合複合体を形成するのに適した条件下で、接

触させること；

(b) 該支持体を、第1抗体とは異なるPKCgエピトープを認識し、かつ検出可能な標識を有する抗PKCg抗体からなる第2抗体と、第2抗体がPKCgと反応するのに適した条件下で接触させること、および

(c) 検出可能な標識の存在を測定すること、
の各ステップを含んでなる、上記方法。

【請求項9】 哺乳動物被験体において虚血性イベントを検出する方法であって、

(a) 該被験体から得られた末梢血試料を、表面に第1の抗PKCg抗体を固定させた固相支持体と、該試料中のPKCgと結合複合体を形成するのに適した条件下で、接触させること；

(b) 該支持体を、第1抗体とは異なるPKCgエピトープを認識し、かつ検出可能な標識を有する抗PKCg抗体からなる第2抗体と、第2抗体がPKCgと反応するのに適した条件下で接触させること、および

(c) 検出可能な標識の存在を測定すること、
の各ステップを含んでなる、上記方法。

【請求項10】 ステップ(a)の後に、

(a-1) 前記試料の残りから固相支持体を分離すること、
をさらに含んでなる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 ステップ(b)の後に、

(b-1) 未結合のあらゆる第2抗体を除去すること、
をさらに含んでなる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 ステップ(c)で測定された検出可能な標識の量もしくは強度に基づいて、血液試料中のPKCgレベルを定量するステップをさらに含んでなる、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記支持体がマイクロタイタープレートのウェルである、請求項9に記載の方法。

【請求項14】 前記支持体が磁性ビーズである、請求項9に記載の方法。

【請求項15】 前記支持体が、手作業またはロボット操作で、前記血液試

料に接触する状態で配置されるプラスチック、ナイロン、木または紙の薄片である、請求項9に記載の方法。

【請求項16】 前記第2抗体が蛍光標識を有する、請求項9に記載の方法。

【請求項17】 虚血性イベントが脳卒中、一過性虚血発作、頭部外傷、心筋梗塞、または頭部の血流遮断をもたらす外傷の結果生じたものである、請求項9に記載の方法。

【請求項18】 前記第1および第2の抗PKC ζ 抗体が、独立して、主要な免疫グロブリンクラス、免疫グロブリンサブクラス、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、一本鎖抗体(scFv)、キメラ抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびダイアボディからなる群より選択される、請求項8または9に記載の方法。

【請求項19】 前記末梢血試料を、検出可能な標識を有する抗PKC ζ 抗体からなる第2抗体と混合したのち、その混合物を、表面に第1抗PKC ζ 抗体を固定させた固相支持体と接触させる、請求項8または9に記載の方法。

【請求項20】 哺乳動物被験体の末梢血におけるPKC ζ の存在を検出することを含んでなる、該被験体において脳卒中、一過性虚血発作、頭部外傷、心筋梗塞、または頭部の血流遮断をもたらす外傷を診断する方法。

【請求項21】 前記被験体から採取した静脈血試料中のPKC ζ を検出する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 検出可能な標識を有する抗PKC ζ 抗体を用いてPKC ζ を検出する、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 哺乳動物被験体において虚血性イベントの結果生じる損傷を迅速に診断するためのキットであって、

- (a) 表面に第1のPKC ζ 結合パートナーを固定させた固相支持体、
- (b) 第1のPKC ζ 結合パートナーが認識するエピトープとは異なるPKC ζ のエピトープと反応し、検出可能な標識を有する第2のPKC ζ 結合パートナー、および
- (c) 該被験体から得られた末梢血試料中のPKC ζ の存在についてサンドイッチ型アッセイを実施するための試薬および使用説明書、

を含んでなり、PKC γ の検出が虚血性イベントに起因する損傷を示すものである、上記キット。

【請求項24】 前記第1のPKC γ 結合パートナー、前記第2のPKC γ 結合パートナー、または前記2つのPKC γ 結合パートナーの両方ともが、抗PKC γ 抗体である、請求項23に記載のキット。

【請求項25】 前記第1の結合パートナーが磁性ビーズ上に固定されている、請求項23または24に記載のキット。

【請求項26】 前記第1の結合パートナーがマルチウェルマイクロタイタープレートのウェルに固定されている、請求項23または24に記載のキット。

【請求項27】 前記第1の結合パートナーがプラスチック、ナイロン、紙または木の小片に固定されている、請求項23または24に記載のキット。

【請求項28】 前記第2の結合パートナーが蛍光標識を有する、請求項23または24に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、脳卒中や頭部外傷のような虚血性イベントによって引き起こされる中枢神経系（CNS）の損傷を迅速かつ正確に検出するための方法を開示する。この方法は、例えば血液脳関門の損傷の結果、血流に放出されるプロテインキナーゼCのアイソフォーム（PKC γ ）を検出することを特徴とする。本発明は、虚血性イベントの早期診断および治療に有効な診断法および診断キットを提供する。このような方法およびキットは、例えば救急医療スタッフが、永続的なCNS損傷を避けることができるイベント後の一定期間内に、虚血性イベントの早期の徴候を得るために使用するのに好都合であると考えられる。この方法およびキットは、虚血性イベント後の患者の経過および回復をモニターするためにも使用することができる。

【0002】**発明の背景**

脳卒中、頭部外傷、またはその他の、脳への血流を遮断するイベントに起因する脳虚血は、先進工業国において死亡および身体障害の主要な原因である。例えば、脳卒中は北米および欧州人口の0.1～0.2%が罹患する。アメリカ合衆国では約700,000人が毎年新たに脳卒中を起し、または再発するが、かなりの数が死に至る。合衆国の推定3,000,000人が、脳卒中を切り抜けて生存したが、こうした生存者の多くが再発する発作の危険にさらされていると考えられる。

【0003】

虚血性発作を治療する特効薬が市場になく、結局こうした状況が、急性発作のために最初の3週間以内に25～35%死亡するという重大な臨床上の問題を象徴している。生存者のうち25～50%が、余生を家族または施設の介護に完全に依存することになる。

【0004】

急性CNS損傷の有効な治療法を確立するために重大な障害となるのは、適正で厳密な臨床試験計画を可能にする決定的な診断法がなかったことである。現行の

診断法は、通常、突然始まる神経症状、たとえば片側不全麻痺、失語症、半側視野欠損、意識変容状態、または歩行困難に基づく。

【0005】

脳卒中の疑いのある患者の初期評価は時間がかかるため、通常は永久的な神経の損傷がすでに起きてしまった後で、病院で行なわれることになる。卒中に関するメカニズムは完全に理解されているわけではないが、病状は最初の梗塞から生じることが提示された。この場合、細胞内および微小血管浮腫によってCNS組織への灌流圧および血流が減少し、次に梗塞に隣接する領域で圧迫が進行し灌流が減少する。こうした過程が進行すると、細胞の損傷が進むにつれて一連の生化学的イベントが発生する。細胞の損傷や細胞死を示す、このような生化学的イベントは、膜成分の酸化、フリーラジカルの形成、脂肪酸代謝の変化、プロテインキナーゼCのアイソフォームの活性化、細胞内へのカルシウムの流入、および血液脳関門の破壊を包含する。

【0006】

虚血性損傷に起因する永久的な脳の損傷を避けたいならば、発作の疑いをもたれたときから2時間以内に適切な治療を施さなくてはならない。しかしながら、現時点では、このような疾患に対する最終的な診断手順は、上記の重要な2時間の枠内で脳卒中もしくはその他の虚血性損傷の正確な診断を決定し、または評価することを可能にするには、不正確で、費用がかかり、医師や救急医療スタッフにとって利用し難い。こうした有効な診断法の欠如が、脳卒中やその他の虚血性イベントに起因する神経損傷を治療し予防するための新しい療法のない原因にもなっている。

【0007】

ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、ミエリン塩基性タンパク質、グリア細胞繊維性酸性タンパク質、およびS-100タンパク質(Misslerら、1997)を包含する、脳卒中と関連する可能性のある多数のマーカートンパク質についてのアッセイ法が提案されてきた。ほとんどの場合、上記の物質は、侵襲性の、困難な処置によって得られる脳脊髄液(CSF)中で測定される。永続的な損傷を回避するための短い診断時間枠を仮定すると、もっと容易に得られるサンプル、理想的には

末梢血サンプルを用いて実施することができる診断方法を開発しなければならない。たとえNSEおよびS-100が血中で測定できるとしても、ピークレベルは梗塞形成の約2日後まで現れないため、NSEおよびS-200が梗塞容積と相関していても、脳卒中の指標として実用的でない(Misslerら、1997)。また、上記のマーカはいずれも全般的な脳損傷の特異的指標ではなく、さらに、S-100は血漿の正常な成分であることが明らかになっている(Shashouaら、1984)。

【0008】

上記のように、脳卒中の疑いのある患者の初期評価は時間がかかり、通常は永久的な脳損傷が起ってしまってから評価することになる。したがって、卒中の早期開始時に特異的に発現され、さらに、末梢血のように採取が容易で迅速にアッセイできる生物試料中に出現するタンパク質を、迅速に検出し、もしくは定量するアッセイを開発することは、有用であると考えられる。

【0009】

発明の概要

本発明は、プロテインキナーゼCの特定のアイソフォーム、すなわち アイソフォーム(本文ではPKC またはPKCgと略す)が、中枢神経系(CNS)における虚血性イベントの後、速やかに末梢血中に出現するという発見に基づいている。

【0010】

本発明は、脳卒中、一過性虚血発作(TIA)、頭部外傷、心筋梗塞、または他の、結果的に脊髄や頭部の血流遮断をもたらすイベントに起因する、CNS、特に脳虚血を迅速かつ正確に診断するための方法を述べる。その方法は、救急車や救急処置室スタッフに容易に実施できるものであり、静脈(末梢)血液試料と本文に記載のアッセイキットを用いて実施することができる。

【0011】

本発明は、脳卒中、TIA、頭部外傷、心筋梗塞、または他の、結果的にCNS構造への血流遮断をもたらすイベントもしくは「発作」に特徴的な、一定の細胞損傷の結果としてのみ発現されるタンパク質であるPKCgを迅速に検出するためのアッセイを提供する。このようなCNSへの血流遮断に至る可能性のある他のイベントとは、医学的介入、例えば外科手術、外科的もしくは物理的なミス、麻酔、およ

び治療的もしくは医薬的な介入、を包含する。

【0012】

本発明にしたがって、哺乳類の被験体において、またはその被験体から得られた生物試料において、CNSの外側の（末梢の）PKCgの存在を検出することによって、当該被験者が虚血性イベントを起こしたかどうかを判定することができる。

【0013】

本発明の望ましい実施形態にしたがって、末梢血試料を罹患した個体から採取した後PKCgの存在を分析する。好ましくは、静脈血試料を、PKCgエピトープに特異的な抗PKCg抗体のようなPKCg結合パートナーと、抗PKCg抗体 / PKCg結合複合体の形成に適した条件下で接触させる。例えば抗体 / PKCg複合体の検出による、血液試料中のPKCgの存在の検出は、CNSの虚血性損傷を示す。

【0014】

血液試料にPKCgが存在するか否かによって、CNSの損傷が起ったかどうかを判定することに加えて、本発明は、虚血性イベントの重症度を判定するためにPKCgの定量法も提供する。もとの末梢血試料中のPKCgの量は、中枢神経系の損傷の量もしくは重症度に直接相関している。

【0015】

免疫吸着法を使用する場合、抗PKCg抗体は、当業界に公知の方法を使用する迅速検出のために、蛍光タグまたは標識を包含することが最も望ましい。抗体に基づく好適な方法では、血液試料を抗PKCg抗体と接触させた後、その溶液は、試料中の細胞や、もっと大きなタンパク質から結合複合体を分離するために、例えばDEAE/Sepharoseカラムのような、カラムを通過させる。このような好適な方法によって、未結合（遊離）の標識抗PKCg抗体はカラムに結合し、抗PKCg抗体 / PKCg複合体は通りぬけて流出する。未結合標識抗体を試料から除去することによって本方法の定量的な側面が向上し、CNS組織に対する虚血性発作の進行もしくは程度を評価することが可能となる。カラムを1回以上洗浄すると、結合した可能性のある、この大きな複合体をいずれも除去することができる。通りぬけた溶液を集めた後、抗PKCg抗体 / PKCg複合体の存在を、そのような複合体を検出するための当業界で公知の方法を用いて、検出することができる。

【0016】

別の実施形態において、本発明は、脳卒中または他のイベント、例えば一過性虚血発作、頭部外傷、心筋梗塞、もしくは頭部血流遮断に至る他のイベント、の結果として、損傷がCNSに起ったのかどうかを、サンドイッチ抗体アッセイを用いて判定するための方法を提供する。本発明にしたがって、PKCgタンパク質上の特異的エピトープに対する第1の抗PKCg抗体（捕捉抗体とも呼ばれる）を固相支持体に固定化する。静脈血試料を、脳卒中または他のCNS損傷にかかわる虚血性イベントにかかっていると推測される個体から採取し、固相支持体に固定化された第1の抗体と接触させて、抗体/PKCg結合複合体を形成させる。次の洗浄ステップを用いて、未結合PKCgタンパク質を残りの試料混合物から取り除く。第2の抗PKCg抗体は、第1の抗体とは異なるPKCgエピトープに特異的であって、検出可能な標識、たとえばフルオレセイン化タグ、生物発光タグ、比色タグ、または着色ビーズを有するが、この第2の抗体を次に、PKCgとの結合複合体の形成に適した条件下で、固相支持体に固定化された第1の抗体に結合したPKCgタンパク質と接触させる。この第2の結合ステップの後に洗浄ステップを加えて、未結合標識抗PKCg抗体を除去することができる。もとの試料中のPKCgの検出および/または定量は、例えば蛍光定量法、蛍光顕微鏡検査法、走査型共焦点レーザー顕微鏡法、照度計または比色アッセイのような当業界に公知の方法によって行なうことができる。

【0017】

サンドイッチ抗体アッセイのもう一つの実施形態において、第1の抗PKCg抗体を固定化するのに望ましい固相支持体は、磁気ビーズ、マイクロタイタープレートウェルの表面、またはアッセイストリップとして使用することができる固相支持体材料の小片もしくはストリップである。本発明のアッセイストリップは、固定化抗PKCg抗体（捕捉抗体）を含有する、プラスチック、ナイロン、もしくは他の固体材料からなる平らな長方形のストリップであることが望ましく、これを手作業またはロボットのいずれかによって試料およびアッセイ溶液に浸すことが可能であり、またはこれに試料およびアッセイ溶液を塗布することができる。

【0018】

本発明のサンドイッチ抗体アッセイのさらに別の実施形態において、本発明のアッセイで使用される抗PKC α 抗体の一方または両方は、主要クラスもしくはサブクラスの完全長免疫グロブリン、その機能性フラグメント（たとえばFab、F(ab')₂、Fv）、ハイブリッド抗体（例えばキメラ抗体もしくはヒト化抗体）、または比較的分子量の組換え抗体分子（例えば一本鎖抗体(scFv)もしくはダイアボディ)とすることができる。

【0019】

別の実施形態では、PKC α 結合パートナーは抗体以外のポリペプチドであり、本発明のアッセイ、組成物およびキットにおいて抗PKC α 抗体分子の代わりに使用される。

【0020】

もう一つの実施形態において、血液試料または他の溶液中のPKC α を検出もしくは定量するためのキットが与えられる。本発明の望ましいキットは、アッセイストリップ、マイクロタイタープレートのウェル、またはビーズもしくは粒子上に固定化された第1の(捕捉)PKC α 結合パートナー；検出可能な標識または検出可能なシグナルを発生するシステムの成分を含有する第2のPKC α 結合パートナー；および血液試料または他の溶液中のPKC α を検出もしくは定量するためのキットの使用方法を示す使用説明書、を含んでなる。

【0021】

定義

本文で使用される「虚血性イベント」という用語は、組織への血流の一時的または永続的な減少または停止の結果生じる、有害な可能性のあるあらゆる発作を指し、特に本発明に関しては、CNSへの血流、特に頭部の血流を遮断し、処置しないとCNSの損傷に至らせるあらゆるイベントまたは生理的な事象を指す。特定のタイプの虚血性イベントは、脳卒中、一過性虚血発作、頭部外傷、心筋梗塞、または他の、CNSへの血流遮断に至るイベントを包含する。このような血流遮断に帰着するイベントは、自然に発生し、予期できない(すなわち脳卒中や不慮の外傷)こともあるが、例えば外科的処置、外科的または物理的な事故、麻酔、ならびに治療法および医薬の介在といった、望まない血流の遮断を副作用として引

き起こす、介在する処置の結果であることもある。

【0022】

本文で使用される「PKCg結合パートナー」は、PKCgに結合する分子であって、PKCgに特異的に結合するあらゆるポリペプチドまたは免疫グロブリン分子もしくはそのフラグメントを包含する。

【0023】

「特異性」という用語は、1つの標的に対して他よりも高い結合親和性を有する結合パートナーまたは部分を指す。「PKCg特異性」という用語、および「PKCgと特異的に結合する」という語句は、血清タンパク質（例：ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)）やゼラチンなどの別の標的と比較して、PKCgに対してより高い親和性を有するPKCg結合パートナーを指す。

【0024】

「抗PKCg抗体」もしくは単に「PKCg抗体」、または「PKCg免疫グロブリン」は、PKCgのエピトープに対する少なくとも1の抗体結合部位を含有する、またはPKCgに結合する1以上の相補性決定領域(CDR)を含有する、PKCg結合パートナーである。PKCg抗体は、5つの完全長哺乳動物免疫グロブリンクラス（すなわち、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD）およびそれらのPKCgに結合するサブクラスのいずれも包含する。PKCg抗体はまた、完全長免疫グロブリンクラスの機能性フラグメント、例えばFab、F(ab')₂、およびFvフラグメント、とすることができ、さらにタンパク質工学または組換えDNAによって製造されるPKCg結合分子、たとえばキメラ免疫グロブリン分子（これは、別の免疫グロブリン、または他のポリペプチドの一部に融合された1つの免疫グロブリンの結合ドメインまたはCDRを含んでなる）；ヒト化免疫グロブリン分子（これは、ヒト抗体分子のフレームワーク構造内に挿入された、ヒト以外の抗体分子に由来するCDRを含んでなる）；一本鎖抗体(scFv)；またはダイアボディ（例えば、Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)参照）であってもよい。さらに、本発明の組成物および方法において有用なPKCg抗体は、ポリクローナル抗体（たとえば、PKCg抗原を接種された哺乳類由来の、抗PKCg抗体を含有する血清）またはハイブリドーマ技法（例えばMilstein, Scientific American, 243: 66-74(1980)）によって作

製されたモノクローナル抗体である。

【0025】

望ましい実施形態の詳細な説明

本発明は、虚血性イベントによって引き起こされるCNSの損傷を検出するための迅速かつ正確な方法を記述する。ここで、虚血性イベントの原因は脳卒中、頭部外傷、心筋梗塞、または他の頭部の血流遮断に至るイベントであると考えられる。脳卒中のような外傷性イベントは、細胞傷害過程として一連の生化学的事象を引き起こす。このような生化学的事象の1つが、プロテインキナーゼCのアイソザイム (PKC またはPKC γ) の生成であり、これは虚血性イベントの結果としてCNSにおいて発現される。

【0026】

PKC γ は、アラキドン酸 (AA) のような特定の一部の脂肪酸によって活性化されたCNS組織に特異的なマーカーである。さらに、AAはオキシゲナーゼ経路の完全にコンピテントな前駆物質である。CNSにおいて、特筆すべき経路は、シクロオキシゲナーゼ経路 (これはプロスタグランジン、トロンボキサン、およびプロスタサイクリンを生成する) およびリポキシゲナーゼ経路 (5-HETE、12-HETE、LTC $_4$ 、LxA) であり、これらも虚血およびCNS損傷時に活性化される。PKC γ は、虚血および外傷性CNS損傷時および直後に、活性化されることが明らかになった。PKC γ はCNSに特異的であり、普段は末梢血中に存在しない。本発明の発見は、血液脳関門が虚血性イベントの結果としてしばしば障害をおこし、末梢血中にPKC γ が出現するに至るといふ観察に従うものである。その上、末梢血中にPKC γ が存在するようになること、ならびに、その存在を、虚血性イベントのほぼ直後、そして最も重要なことには、虚血性損傷の診断と治療によってCNS組織の永久的な損傷を防ぐことができる臨界的な時間枠内に、末梢血中で検出することができることが明らかになった。

【0027】

したがって、末梢血試料中のPKC γ の検出は、脳卒中、TIA、頭部外傷または心筋梗塞のような虚血性イベントの早期診断の指標となり、それによって早期の有効な治療が可能となる。さらに、試料中に検出されたPKC γ の量は、正常組織への

損傷または発作の程度に比例するため、PKCgの定量アッセイはCNS傷害の程度の指標ともなる。

【0028】

脳卒中、TIA、頭部外傷、心筋梗塞または他の頭部の血流遮断に至るイベントに起因する脳組織への発作は、PKCgの活性化と、その結果としての神経組織からのPKCgの放出に端を発する細胞介在損傷の共通する経路を共有する。PKCgは通常CNSにのみ見出され、他のどの組織にも存在しないことが知られている。虚血性損傷が発生した場合には、付随して血液脳関門の損傷がおこり、その結果、脳内の正常な位置から静脈血へのPKCgの放出に至る。

【0029】

本発明の方法は、特にヒト患者に有益であると考えられるが、もちろん、PKCgアイソフォームがCNS損傷のシグナルとなる、いかなる哺乳類の被験体にも適している。

【0030】

PKCgマーカーを検出するあらゆる方法が適当であり、試料中の特定のタンパク質を検出するあらゆる公知の方法を使用することができる。試料をPKCgの結合パートナーと接触させることによって、哺乳類被験体に由来する血液試料中のPKCgを検出することが望ましい。この結合パートナーは、PKCgと複合体を形成する能力を有するペプチド、免疫グロブリン、低分子、または他の分子である。最も望ましいのは、試料中のPKCgが、PKCgに特異的な抗体を用いて検出される場合である。多数のPKCg抗体が市販されており、ヒトおよび他の哺乳類からPKCgを検出または測定するために、こうした抗体を本発明の方法、組成物、およびキットに使用することができる。たとえば、ヒトPKCgのエピトープに結合するモノクローナル抗体は、American Type Culture Collection (ATCC)に寄託された数多くのハイブリドーマによって作製されるが、これは、ATCC受託番号1021866（発売元：Transduction Laboratories, Lexington, KY）、ATCC受託番号1022645（発売元：Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA）、ATCC受託番号1022853（発売元：Calbiochem Novabiochem International, La Jolla, CA; Oncogene Research Products, Cambridge, MA）を包含する。ATCC受託番号1025435（

発売元：Sigma Chemical Co., St Louis, MO) によって作製された抗PKCgモノクローナル抗体は、PKCgのカルボキシ末端領域と反応するので、様々な種に由来する試料中のPKCgを検出するために本発明の方法、組成物、およびキットに使用することができる。1以上の起源に由来するPKCgと反応する、他の抗PKCg抗体も市販されており、例えば、実施例（下記）で使用したポリクローナルウサギ抗血清（発売元：Calbiochem）、およびモノクローナル抗体（発売元：Transduction Laboratories）がある。さらに、PKCgおよびその断片を、ヒトまたは他の種に由来する組織から単離すること、組換えDNA技法によってこれを作製すること（発売元：A. Ullrich, Milwaukee, WI）、または当業界に公知の標準的な方法によって化学合成することができる。その後、このようなPKCgまたはその断片は、PKCgに結合し、さらに本文に記載の様々な方法（たとえば、サンドイッチアッセイ、下記）、組成物、およびキットに使用することもできるポリクローナル、モノクローナル、または組換え型の抗体を作製するために、当業界に公知で利用可能な、あらゆる様々な方法において、免疫原として使用することができる。

【0031】

試料中のPKCg濃度を検出または測定するためにF、蛍光標識された抗体が最も望ましい。PKCgを直接検出する、またはPKCgと別の成分との複合体を検出する、多くの他の方法が知られており、これに含まれるものとしては、ガスクロマトグラフィー質量分析法、薄層クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、電子顕微鏡による金コロイド標識の検出、酵素免疫測定法（ELISA）、シンチレーションカウンターを用いたPKCgに特異的な放射能標識タグまたは抗体検出法、比色計を用いた生物発光標識抗体検出法、などがある。しかしながら、上記の方法のほとんどは、試料調製および/またはシグナルの測定に数時間または数日を要し、そのために、下記の実施例に述べるような高感度の蛍光に基づくアッセイより劣ったものとなる。また、検出に必要な装置（例えば、質量分析計、電子顕微鏡）が、場合によっては救急車の内部に適合しないため、虚血性イベントに罹ったと推定される患者を病院に運ぶ前に救急医療スタッフがアッセイを行なうことが不可能となる。

【0032】

本発明の血液試料中のPKC γ を検出し、または測定（定量）するために使用するPKC γ 結合パートナーは、溶液中で、もしくは様々な固相支持体の表面上に固定化して使用することができる。本発明の方法および組成物に使用するためにPKC γ 結合パートナーを固定化することができる固相支持体は、磁性またはクロマトグラフィーマトリクス粒子、アッセイプレートのウェルの表面（たとえば、マイクロタイターアッセイプレート）、および固相支持体材料片、例えばプラスチック、ナイロン、木、紙、または他の固体材料の小片または細長いストリップ（試料またはアッセイ溶液に浸漬する、または、そうでなければ、これと接触させて配置することができる）を含むが、これらに限定されない。

【0033】

PKC γ 結合パートナーを固相支持体の表面に固定化するには、吸着（非共有結合による付着）によって、または直接、固体表面に結合パートナーを共有結合すること、もしくは固相支持体につなぎ止めることができるリンカー分子に結合パートナーを共有結合することによって行なうことができる。マイクロタイタープレートのウェル表面へのPKC γ 結合パートナーの吸着によって、標準ELISA法で 사용되는、様々な半自動化または自動化マイクロタイタープレートリーダーを用いてPKC γ の検出またはアッセイを行なうことが可能になる。こうした装置は、多数のPKC γ 試料をアッセイするために特に有用である。

【0034】

好ましくは、個体から得られた血液試料中のPKC γ を、サンドイッチアッセイにより検出し、その場合には、第1のPKC γ 結合パートナー（または捕捉分子）が試料中のPKC γ を捕捉（結合）するために機能し、第2の結合パートナーは、PKC γ が第1の捕捉結合パートナーと結合することによって形成される複合体を検出する。このような本発明のサンドイッチアッセイは、標準ELISA法で使用するようなマイクロタイタープレートのウェル内の溶液中で、または本文に記載されたアッセイストリップ上で行なうことが望ましい。ELISA型サンドイッチアッセイ法においては、第1のPKC γ 結合パートナーをマイクロタイタープレートのウェルに吸着させる。結合しないPKC γ 結合パートナーは、プレートを逆さにして溶液を出すことによって、および/またはウェルをバッファー溶液で洗浄することによって

、ウェルから除去する。妨害する可能性のある物質による非特異的結合を防ぐために、ELISA法で使用されるあらゆる様々なブロッキングタンパク質または試薬、たとえばウシ血清アルブミンをウェルに加えて、第1のPKCg結合パートナーが占有していないウェル表面のあらゆる領域をブロックすることもできる。PKCg結合パートナーをウェル表面に固定化して、結合しない材料を除去した後、PKCgを含有することがわかっている、または推定される試料をウェルに添加する。つぎに、未結合物質を除去し、または洗い流す。固定化された第1のPKCg結合パートナーとは異なる部位でPKCgと結合する第2のPKCg結合パートナーをそこでウェルに添加し、ウェルに結合したPKCgの存在を検出する。このような第2の（検出および/または定量）PKCg結合パートナーは、検出可能なシグナルを提供する、または発生させることができる、検出可能な標識を有することが望ましい。このような検出可能な標識は、例えば抗原と抗体の結合のような特異的結合を検出するために使用することができる、当業界に公知のあらゆる様々な標識を包含する。よく用いられる検出可能な標識は、蛍光標識、放射性標識、ストレプトアビジン、生物発光もしくは化学発光標識、および色を生じる基質と反応することができる酵素、を包含するが、これらに限定されない。このような系で発生するシグナルは、マイクロタイタープレートを読み取る適当な機器によって容易に検出または測定することができる。発色する標識は、緊急事態のようにPKCgの検出だけで十分な場合には、虚血性イベントが起ったことを単に検出するために、肉眼で検出することもできる。

【0035】

本発明の別の方法において、PKCgは、PKCg結合パートナーが吸着または共有結合したアッセイストリップを用いて検出される。このようなアッセイストリップは、試料中のPKCgを検出または測定するために便利な方法を提供する。上記のマイクロタイタープレートと同様に、第1のPKCg結合パートナーをストリップ上に固定化し、未結合物質をたとえばすすぎによって除去する。固定化されたPKCg結合パートナーを含有するストリップも、洗浄して未結合物質を除去し、および/または、ウシ血清アルブミンのようなブロッキング試薬とともにインキュベートして妨害する可能性のある分子の非特異的結合を減らすことができる。本発明に

したがって、例えば手作業で、またはロボット操作でストリップを試料に浸すことによって、固定化されたPKC γ 結合パートナーを含有するアッセイストリップを、PKC γ の含有が疑われる試料と接触させる。つぎに、アッセイストリップを必要ならば洗浄して未結合物質を取り除き、さらに上記のいずれかのタイプの検出可能な標識を有する第2のPKC γ 結合パートナーに浸すか、別の方法で接触させる。必要ならば、アッセイストリップをさらに、測定可能なシグナルをストリップ上に発現させ、または発生させるために必要な何らかの試薬、たとえば発色する基質、に浸す、または接触させる。次に、試料中のPKC γ の形跡を求めて、アッセイストリップを肉眼で観察するか、または適当なシグナル検出装置によって読みとる。

【0036】

上記のサンドイッチアッセイに関するまた別の方法において、PKC γ を含有することが分かっている、または疑われる試料をまず定量PKC γ 結合パートナーと混合して、試料中のPKC γ と定量抗体との間に複合体を形成し、つぎにその混合物を、検出のために、捕捉抗体を含有するウェルまたは他の固相支持体に添加することができる（下記実施例5参照）。

【0037】

本発明によるPKC γ のアッセイは、PKC γ の存在を検査する試料の容量、または試料の数に応じて、大規模にも、小規模にも行なうことができる。本発明の1回のアッセイは、血液試料中のPKC γ を検出または測定するために、望ましいことに、わずか約0.5ミリリットル（ml）の末梢血または静脈血しか必要としないが、約50~400マイクロリットル（ μ l）がより望ましく、さらに約50マイクロリットル（ μ l）未満の末梢血であることが非常に望ましい。哺乳類被験体の血液試料中のPKC γ を検出または測定するために、本発明のアッセイが必要とするのは、例えば指や耳を針で穿刺して得られるような、わずか1滴から数滴までの血液であることが最も望ましい。

【0038】

PKC γ を含有するあらゆる液体試料（全血試料のような血液試料、もしくは血漿のような血液画分、ならびにPKC γ を含有する水溶液を包含するが、それらに限定

されない)において、PKC γ を検出または測定するために、本文に記載されたアッセイを使用することができると考えられる。

【0039】

血液試料中でPKC γ 量を正確に測定(定量)するために、本発明のアッセイを用いて検量線を作成することができる。たとえば、血液試料について、および既知濃度のPKC γ を含有する一連の溶液について、本文に記載されたアッセイを行なうことができる。つぎに、既知濃度のPKC γ を含む各溶液に関して得られたシグナルを用いて、シグナルの大きさまたは強さをPKC γ の量または濃度に相関させる検量線を作図する(例えば、下記実施例1)。つぎに、PKC γ 含有量が未知の試料から得られたシグナルを検量線上で読みとって、試料中に存在するPKC γ の量を決定することができる。

【0040】

静脈血試料中のPKC γ を検出するために必要な材料を、使用に都合よくキットに集めることによって、外傷被害者を処置し搬送するスタッフが、その患者が虚血性イベントに罹ったかどうかを迅速に判定することができ、そこで直ちに、それ以上の脳および/または中枢神経系への損傷を防止するために、治療を開始することができる。このような診断に役立つキットは、PKC γ の結合に基づいており、多くのレベルの検出および定量を提供することができる。検出レベルは、静脈血中で検出されたPKC γ に対する蛍光タグ付き抗体の検量に基づいて、虚血性損傷の量的な評価を与える。本発明の望ましいキットは、固相支持体材料に固定化された第1の(捕捉)PKC γ 結合パートナー、たとえばアッセイストリップ、マイクロタイタープレートのウェル、またはビーズもしくは粒子、に固定化された抗PKC γ 抗体;検出可能な標識、または検出可能なシグナルを発生する成分を含有する第2のPKC γ 結合パートナー;およびPKC γ アッセイを実施するためのキットの使用方を示す使用説明書、を含んでなる。本発明のキットにおける、固定化されたPKC γ 結合パートナーを有するビーズ、アッセイストリップ、またはマイクロタイタープレートは、乾燥した非水和状態;凍結乾燥もしくは脱水状態;または生理的緩衝溶液中で水和した状態を含む様々な状態で、パッケージすることができる。洗浄またはシグナル発生のための他の溶液も本発明のキットに含めることができ

る。別の望ましい実施形態において、本発明のキットは、ビーズ、アッセイストリップ、またはマイクロタイタープレートのような固相支持体に固定化された捕捉PKC α 結合パートナーを含んでなるが、ここで上記支持体は、この支持体への非特異的結合による妨害シグナルを防ぐために前処理されている。

【0041】

救急医療スタッフによる虚血性イベントの迅速な診断法を与えることに加えて、本明細書に記載の方法およびキットは、日常的な検診手順の一部としてPKC α 濃度をモニターするために、またはCNS組織の虚血性損傷からの回復をモニターするために、使用することもできる。本文に記載された方法およびキットの特質によって、多様な周囲の状況において、例えば救急車もしくは他の移動医療設備、実験室、病院、救急室、または家庭、病人室もしくは他の私的な設備においてさえ、虚血性イベントの診断およびモニタリングを行なうことが可能になる。

【0042】

本発明にしたがって虚血性イベントを検出する手段としてPKC α の検出を説明する実施例を、以下に示す。下記の実施例に含まれる特定の材料およびパラメーターは、本発明の実施を説明するためのものであって、これらは決して本発明の範囲を限定するために提示されるものではない。

【0043】

実施例

実施例1：虚血ラットにおけるPKC α の測定

この実施例に使用した中大脳動脈閉塞（MCA-O）動物モデルは、ラットにおける管腔内フィラメント法に基づく（Zhaoら、1994a,b）。ラットを亜酸化窒素/酸素混合物中のハロタンで麻酔し、頸動脈を露出した。溝付きモノフィラメント縫合糸（3/0）を結紮した頸動脈内に挿入し、外頸動脈、総頸動脈および内頸動脈の分岐部から翼口蓋動脈を通して、頭蓋内循環へと入れたが、そこで狭い近位前頸動脈に詰まって中大脳動脈を閉塞した。つぎに創部を縫合し、動物を麻酔から回復させた。偽手術も、若干の動物（偽手術対照群）に行なったが、この場合、動物は動脈を閉塞するために用いたステップ以外のすべての外科的処置を受けた。閉塞の90分後、神経機能を評価した。次に、動物を断頭し、体幹の血液を1.

5 mg/ml EDTAの入った容器に集め、分析まで凍結した。

【0044】

血液試料を、3群の動物から集めた：(1)未処理対照群 (n=3)；(2)偽手術対照群 (n=3)；および(3)虚血動物群 (n=5)。神経機能は、正常から重大な障害までランク付けした。評価段階を表1に示す。

【0045】

【表1】

表1 - 対照および誘発ラットにおける神経障害

神経障害評価	重症度	スコア
障害は観察されない	正常	0
前肢屈曲；把握反射は両方の前足にある	中程度	1
前肢屈曲；把握反射は対側前足のみにある	重症	1.5
前肢屈曲；把握反射は前足の両方ともない	重症	2
前肢屈曲；把握反射は前足の両方ともなく、さらに麻痺側に向かって旋回運動	重症	3

【0046】

対照群の神経障害スコアは、2つの対照群でいずれも0であり、虚血群の平均障害スコアは1.9であった。

【0047】

上記の結果は、中大脳動脈閉塞 (MCA-O) 処置が、結果として重度の神経損傷をもたらした一方で、未処理および偽手術対照群はいずれもまったく神経損傷の徴候を示さなかったことを証明している。さらに、神経障害スコアは、偽手術または未処理対照動物ではなく、虚血動物の末梢血試料から測定されたPKC γ 量と相関関係にあることが立証された。

【0048】

静脈血試料中のPKC γ のアッセイは、PKC γ タンパク質の1エピトープに特異的な、固定化「捕捉」抗体、および第2の「定量」抗体を使用した。後者は抗体に結合した蛍光マーカーを包含し、捕捉抗体とは異なるPKC γ のエピトープを認識し

た。

【0049】

この実施例において、捕捉抗体は、PKC γ タンパク質のアミノ酸306から318にあるアミノ酸配列を認識するポリクローナルウサギ抗血清 (Calbiochem; カタログ番号539529、1:500希釈で使用) とした。定量抗体は、PKC γ タンパク質のカルボキシ末端にある499-697アミノ酸と反応するモノクローナル抗体 (Transduction Laboratories; カタログ番号P20420、1:200希釈で使用) とした。定量抗体は、Fluoro Tagキット (Sigma Chemical) を使用して蛍光標識した。脳抽出試料は、抗体メーカー (Transduction Laboratories; カタログ番号B30900) から供給され、脳由来PKC γ の陽性対照として使用した。

【0050】

捕捉抗体は、トシル活性化磁気ダイナビーズ (DynaIカタログ番号142.03, 1402.4) に関するメーカーの使用説明書にしたがって固定化した。このような材料によって、走査型共焦点レーザー顕微鏡 (フルオレセインフィルターを装備したNikon PCM200) を用いて、容易に蛍光を画像化し定量することが可能となった。

【0051】

捕捉抗体をコーティングした常磁性ビーズを小試験管に入れ、これを磁石のついたホルダーに入れて、ビーズを引きつけてペレット状にした。捕捉抗体と磁性ビーズとの結合は、バッファーでビーズを洗浄した後、ウサギ抗体に選択的に結合するヤギ抗ウサギIgG-フルオレセイン抗体溶液中に再懸濁することによって、試験した。レーザー顕微鏡で観察された鮮明な蛍光によって、捕捉抗体の磁性ビーズとの結合が確認された。

【0052】

磁性ビーズへの捕捉抗体の結合が確認されたら、既知濃度のPKC γ (Calbiochemより購入; カタログ番号539627) : 0 pg/ml、1 pg/ml、10 pg/ml、100 pg/ml、1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml、および脳抽出物を用いて、検量線を作成した。様々な濃度のPKC γ をビーズとともにインキュベートし、捕捉抗体との複合体を形成させた。次に蛍光標識を有する定量抗体を加え、複合体の蛍光を、共焦点顕微鏡の強度測定ソフトウェアを用いて測定した。3つの異なるビーズ調製物の蛍光

強度測定を図1に示す。測定ソフトウェアにマクロ命令を書き込むことによって、測定バイアスを最小限に抑え、または排除したが、そのために、一定の直径の円を用いて、PKC γ 濃度あたり最低200ビーズに、強度測定のためのエリアを線引きした(すなわちn=200)。画面内の焦点のあったビーズだけを蛍光強度測定した。図1に示すように、PKC γ の用量あたり>100ビーズの平均と考えられる蛍光強度は、用量に依存して増加する。図1のデータは、抗PKC γ -FITC抗体のPKC γ への結合による蛍光増加からベースラインの蛍光を引いて算出された、特異的蛍光の増加パーセント(%)として表示される。

【0053】

次第に増加する濃度のPKC γ から導かれた用量反応曲線から検量線を確立するために、蛍光強度をもう一度共焦点顕微鏡を用いてビーズから測定したが、蛍光強度測定値は、図2に示すように蛍光ユニットのままとした。単純な曲線フィットを用いて、PKC γ 濃度の増加による蛍光強度の検量線を確立した。検量線を図3に示す。PKC γ によって発生する蛍光の検量線を用いて、外科的処置を行なったラットの体幹血液中に検出されるPKC γ 濃度を明らかにした。PKC γ 濃度は検量線から直接読みとった。

【0054】

血液試料から得られた結果によって、サンドイッチ法は、MCA-0法にしたがって末梢血試料中のPKC γ の有意な増加を検出するために、十分に感度が高いことが立証された。図4に示すように、未処理および偽手術対照動物から得られる血液は、虚血動物と比較したときすべてのケースで有意に少ない蛍光を示した。さらに、脳抽出物対照も、未処理および偽手術対照より有意に高い蛍光レベルを示した。

【0055】

蛍光レベルを図3に示した検量線を用いてPKC γ のピコグラム(pg)/mlに変換したとき、外科的処置に対するPKC γ 濃度の差異は、図5に示すように、著しく明白になる。図5は、虚血性イベント後に検出可能なPKC γ レベルが劇的に増加することを示す。MCA-0後に脳の外側で集められた血液中に検出されたPKC γ レベルは、脳抽出物から得られたPKC γ レベルよりも50%以上高かった。

【0056】

PKC ζ は虚血性イベント時には、活性化され、可動性となる。損傷を受けた細胞からPKC ζ が放出されるが、そこではPKC ζ がアラキドン酸およびリポキシゲナーゼサイクルを包含するいくつかの損傷カスケードを開始する。また、PKC ζ はグルタミン酸によって誘導される等毒性のカスケードも開始する。虚血性発作の直後に起こるイベントの1つは、血液脳関門の少なくとも一過性の損傷である。MCA-O処置の90分後に、体幹血液試料は、磁性ビーズを用いた抗体サンドイッチ法から測定したとき、6 ng/mlに近いPKC ζ レベルを有していた。

【0057】

この虚血レベルは、上記方法を用いて示されたPKC ζ の検出限界(600~1000 pg/ml)の少なくとも10倍である。これは、実際の測定値に対して許容できる検出比であり、末梢血試料から測定される虚血性イベントをモニターするためのサンドイッチアッセイのフォーマットの有用性が確認される。PKC ζ の検出はまた、蛍光定量抗体と結合したビーズの共焦点画像から、視覚的に行なうこともできる。

【0058】

実施例2：マルチウェルマイクロタイタープレートのフォーマットを用いた静脈血試料中のPKC ζ の検出および定量

上記のサンドイッチ型アッセイの経験が、96-ウェルマイクロタイタープレートのフォーマットを用いた本発明のアッセイの一般的プロトコルをもたらした。

【0059】

1. 1% BSA (画分V, Sigma Chemical, St. Louis, MO) および0.1% Tween-20 界面活性剤 (Sigma Chemical) を含有する0.1Mリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.4) を用いて、捕捉抗体を1:500に希釈する。リン酸ナトリウムバッファーを調製するために、1リットルの蒸留水に2.62 gのNaH₂PO₄ (MW=137.99) および14.42 gのNa₂HPO₄·2H₂O (MW=177.99) を使用し、pH7.4に調整する。プラスチック製96ウェルマイクロタイタープレート(または他の容器)に捕捉抗体を加え、37で最低2時間インキュベートする。

【0060】

2. プレートにPBS/Tween/BSAで2~3回洗浄して、未結合抗体をプレートから

除去する。この手順のごく小さい変更は抗体結合に影響しないであろう。

【0061】

3. 非特異的結合を防ぐために、PBSに溶解した10%ウシ胎児血清200 μ lを用いて、最低2時間、ウェルをブロックする。代わりに10%ウマ血清または3% BSA (画分V, Sigma Chemical) を用いることもできる。上記のPBS/Tween/BSA溶液で2~3回洗浄する。

【0062】

4. 標準品または試料をウェルに添加し、PBS/10%血清で希釈し(50~100 μ lサンプル量)、30分から1時間、37 $^{\circ}$ Cで放置する。PBS/Tween/BSAを用いて4回洗浄する。

【0063】

5. 定量抗体を加えて、30分インキュベートする。PBS/Tween/BSAを用いて4回洗浄する。

【0064】

6. Persepectives Instruments製のCytoFluor IIのような蛍光光度計で蛍光を読みとる。450 nmの励起および515 nmの発光でのフルオレセインオプティックスを利用した。

【0065】

また、マルチウェルプレートフォーマットを用いたサンドイッチ型アッセイの別のさらに好ましい手順は、実施例5に示され、これは実施例3および4に記載したラットにおける中大脳動脈閉塞(MCA-O)実験からの血液試料をアッセイするために特に有用である。

【0066】

実施例3：虚血性イベントの30分後に開始するラットにおけるPKC γ 検出の時間的経過

ラットにおいて中大脳動脈の血流を遮断した後、30分から3時間までの間の様々な時間に、血漿のPKC γ レベルを測定した。

【0067】

平滑断端を有するカテーテルを左頸動脈へ挿入し、これを分岐点の上部に通す

ことによって、それぞれ300～325グラムの重さがあるラットの中大脳動脈を閉塞し、中大脳動脈によって供給される脳の部分への血流が遮断されるようにした（閉塞した）。若干の動物に偽手術を行なったが、ここで、その動物は、動脈内に遮断用カテーテルをいれない点を除いてすべての外科的処置を受けた（すなわち、動脈を閉塞しない手術）。血液（2 ml）を閉塞前、ならびに閉塞開始から30、90、および180分後に、時点ごとに3匹のラットについて採取した。血液試料を冷却した遠心機で15分間2000 rpmで遠心して血漿を得た後、これを凍結して-70で保存した。また、3匹の偽手術ラットおよび3匹の未処理ラットからも分析のために血漿を調製し、これらを対照として含めた。血漿PKCgレベルは、実施例5（下記）に記載のマルチ-ウェルマイクロタイタープレートのフォーマットを用いた免疫化学サンドイッチ法にしたがって測定した。

【0068】

図6は、中大脳動脈閉塞が、それぞれの採取時間で血漿PKCgレベルの増加を引き起こすことを示す。未処理および偽手術試料中のPKCgレベルはおよそ1～3 ng/ml程度であったが、動脈閉塞を受けた動物由来の試料については、各時点で40～50 ng/mlに増加した（図6のデータはn = 3の平均および標準誤差として示してある）。

【0069】

実施例4：虚血性イベントの15分後に開始するラットにおけるPKCg検出の時間的経過

ラットにおいて中大脳動脈の血流を永久的に遮断した後、15分から24時間までの間の様々な時間に、血漿のPKCgレベルを測定した。

【0070】

この実験は、閉塞後の最後の血液採取時間が3時間から24時間に延びた以外は実施例3に記載のように行なった（上記参照）。閉塞の約30分前に採取した血液（ベースライン）を対照標準として使用した。実施例5（下記）に記載のマルチ-ウェルマイクロタイタープレートのフォーマットを用いた免疫化学サンドイッチ法にしたがって、試料中の血漿PKCgレベルを測定した。

【0071】

図7は、中大脳動脈の閉塞が血漿PKCgレベルの顕著な増加を引き起こし、各採取時間で、PKCgレベルはベースラインを超えて上昇した状態のままであったことを示す。ベースライン試料中のPKCgレベルはおよそ1 ng/ml程度であったが、閉塞後30分では、最大67 ng/mlに増加した。15分のPKCgレベルは、30分レベルのわずか5分の1 (12 ng/ml) であった。そのレベルは24時間までには徐々に減少して15 ng/mlになった。(図7のデータはn = 3の平均および標準誤差として示してある)。

【0072】

実施例5：マルチウェルプレートのフォーマットを用いた静脈血試料中のPKCgを検出および定量するための望ましい代替プロトコル

この実施例は、静脈血試料中のPKCgを検出および定量するためにマルチウェルプレートフォーマットでサンドイッチ型アッセイを利用するための、実施例2の方法の代替プロトコルを示す。このプロトコルは、実施例3および4に記載した、ラットにおける中大脳動脈閉塞実験からの血液試料中のPKCgをアッセイするために特に有用であった。

【0073】

1. マルチ-ウェルプレートの調製

6.183 gの H_3BO_3 を1リットルの蒸留水に希釈し、5 M NaOHでpHを調整することによって、0.1 Mホウ酸バッファー (pH 9.5) を調製した。高タンパク質結合プレート (Nunc Maxisorb, Nalge Nunc, Denmark) を、流体処理ロボット (Quadra 96流体処理ロボット、Tomtec, Inc., Hamden, CTより購入) を用いて、0.1 Mホウ酸バッファー (pH 9.5) で3回 (1回あたり5分間) 洗浄した。

【0074】

2. 捕捉抗体のマルチウェルプレートへの固定化

ポリクローナル抗PKCg捕捉抗体 (Calbiochem, カタログ番号539529) を0.1Mホウ酸バッファー (pH 9.5) を用いて1:1000に希釈した。このポリクローナル抗PKCgは、PKCgのアミノ酸306-318の領域と反応する (結合する)。この抗体の他のPKCgアイソザイムとの交差反応性は0.1%より小さいとELISAにより判定された。プレートを37 °Cで2~4時間インキュベートして、確実に捕捉抗体をプラスチックウ

エルに安定した状態で結合させた。この方法は、インキュベーション後に、流体処理ロボット（200 μ lをウェルに入れ、200 μ lをウェルから取り出す）を用いた10mMリン酸緩衝生理食塩水（PBS, pH 7.4）のすすぎに耐える、十分に安定な固定化捕捉抗体を提供した。

【0075】

3. 標識用（定量）抗体のフルオレセイン化

モノクローナル抗PKC γ 抗体は、PKC γ のカルボキシ末端基質結合領域にあるアミノ酸676-689の領域でPKC γ と結合するが、この抗体を標識用（定量）抗体として使用した（Transduction Laboratories, Louisville, KY; P82820）。この抗PKC γ を、Fluoro Tag FITC結合キット（Sigma Chemical, St, Louis, MO; カタログ番号FITC-1）を用いて、フルオレセイン標識した。過剰なフルオレセインイソチオシアネート（FITC）をメーカーの説明書にしたがって0.1 M 炭酸ナトリウム（pH 9.0）バッファーに溶解した。0.25 mlの反応容量において、絶えず混合しながら室温で2時間かけて、抗体をフルオレセインに結合させた。その結果得られたFITC-抗PKC γ 抗体結合体および未結合FITCの混合物をSephadex G30クロマトグラフィーカラムにかけた。カラムを2.5~3.0 mlのPBS/TWEEN/BSA（pH 7.4）バッファーで溶出したが、このバッファーは0.1%ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（TWEEN 60, Sigma Chemical）および0.1%ウシ血清アルブミン画分V（BSA, Sigma）含有するPBS（pH 7.4）である。300 μ lの画分をG30カラムから、96ウェルプレートに集め、CytoFluor II蛍光光度計（Persepectives Instruments, Framingham, MA）で、励起波長480 nmおよび発光波長515 nmを用いて読みとった。FITC-抗PKC γ 抗体は空隙容量で溶出し、最初の蛍光ピークを形成した。未結合FITCは、保持され、もっと後の2番目の蛍光ピークとして溶出された。FITC-抗PKC γ 抗体は、上記のPBS/TWEEN/BSAバッファー（pH 7.4）を用いて、300 μ l中で約1500蛍光ユニットに相当する容量に希釈した。このFITC-抗PKC γ 調製物の最終希釈はPBS/TWEEN/BSAバッファー（pH 7.4）を用いて30mlとした。

【0076】

4. PKC γ 検量線

組換えヒトPKC γ （Carbiochem, カタログ番号539637）を用いて、0~600 ngのP

KCg/mlにわたるPKCg濃度の検量線を作成した。PKCgをPBS/TWEEN/BSAバッファ（pH 7.4）で希釈した。アッセイの感度を最大にする条件を実験によって決定した。標準試料プロトコルは、100 μ lのPKCg標準試料、250 μ lのFITC-抗PKCg抗体、および650 μ lのPBS/TWEEN/BSAバッファ（pH 7.4）を混合したものであった。各混合物を30～60分間37℃で絶えず攪拌しながらインキュベートした。標準試料をFITC-抗PKCgとともにインキュベートした後、それぞれの混合物から125 μ l量を、捕捉抗体を含むマルチウェルプレートの8ウェルに入れ、37℃で30分間インキュベートした。その後、8通りの試料からの蛍光を、励起波長450 nmおよび発光波長515 nmでFITC用フィルターを用いて蛍光光度計で読みとった。それぞれの標準PKCg試料の読みから検量線を作成した。

【0077】

5. MCA-0処理ラットからの静脈血試料

中大脳動脈閉塞（MCA-0）処置（実施例3および4参照）を受けたラットの末梢血に由来する血漿試料を、PKCg標準試料を調製するために上記で説明した同様のプロトコルを用いて調製した。すなわち、それぞれの血漿試料100 μ lを、250 μ lのFITC-抗PKCg抗体、および650 μ lのPBS/TWEEN/BSAバッファ（pH 7.4）に添加した。各試料混合物を、つぎに、上記のように37℃で30～60分間インキュベートした。各試料混合物の125 μ l量を、固定化捕捉抗体を含むマルチウェルプレートの8ウェルに入れ、37℃で30分間インキュベートした。各試料の蛍光の読みを、励起波長450 nmおよび発光波長515 nmでFITC用フィルターを用いて蛍光光度計で集めた。各試料のPKCgレベルは、上記の検量線からPKCgレベルを読みとることから、確定された。平均PKCgレベル（n=8ウェル）および標準誤差は、それぞれの処理試料から導かれた。実施例4に記載のように、MCA-0処置を受けた動物由来の試料は、偽手術および未処理対照試料と比較したとき、有意に高いレベルのPKCgを示した。虚血性イベント後15分程度の早い時点で、有意なレベルに達し、虚血性イベント後少なくとも24時間は、有意なレベルに維持された（たとえば、図7参照）。

【0078】

いくつかの実施形態を上記で説明したが、当業者であれば、本発明の精神もし

くは特許請求の範囲から逸脱することなく、記載された組成物および方法の改良および変更が可能であることを理解するであろう。本文に引用した刊行物は参考として含めるものとする。

【0079】

参考文献

下記の刊行物は、当技術分野の現在の技術水準に関係しており、かつ/また、本発明を実施する際に使用できる技術を説明するものである。

【0080】

Adamsら、Guidelines for Management of Patient with Acute Ischemic Stroke, Stroke, 25(9): 1901-1914(1994年9月);

Bazan, Effect of Ischemia and Electroconvulsive Shock on the Free Fatty Acid Pool in the Brain., Biochim. Biophys. Acta, 218: 1-10 (1970);

Buttnerら、S-100 Protein: Serum Marker of Focal Brain Damage After Ischemic Territorial MCA Infarction, Stroke, 28: 1961-1965 (1997);

Conn 's Current Therapy, R. E. Rakel編、W. B. Saunders Co. (1993), PP. 840-851;

Dippelら、We Need Stronger Predictors of Major Vascular Events in Patients With a Recent Transient Ischemic Attack or Nondisabling Stroke, Stroke, 28: 774-776 (1997);

Feinbergら、Guidelines for the Management of Transient Ischemic Attacks, Stroke, 25(6): 1320-1335 (1994年6月);

Maddenら、Glutamate, Arachidonic Acid, and Calcium Regulation in Cultured Hippocampal Astrocytes: Involvement in Ischemia?, Cellular and Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage, Advances in Neurology, Siesjo および Wieloch編、Lippincott-Raven (Philadelphia 1996), 71: 53-60;

Misslerら、S-100 Protein and Neuron-Specific Enolase Concentrations in Blood as Indicators of Infarction Volume and Prognosis in Acute Ischemic Stroke, Stroke, 28: 1956-1960 (1997);

Shashouaら、Proteins of the Brain Extracellular Fluid: Evidence For Re

lease of S-100 Protein, J. Neurochem., 42(6): 1536-1541 (1984);

Wielochら、Intracellular Signal Transduction in the Postischemic Brain
. Cellular and Molecular Mechanisms in Ischemic Brain Damage, Advances i
n Neurology, SiesjoおよびWieloch編、Lippincott-Raven (Philadelphia 1996)
, 71: 371-388;

Wolfe, Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotriens and Othe
r Derivatives of Carbon-20 Unsaturated Fatty Acids, J. Neurochem., 28: 1
-14 (1982);

Zhaoら、Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion ind
uced by an intraluminal filament, Brain Res., 649: 253-259 (1994a);

Zhaoら、Delayed treatment with the spin trap alfa-phenyl-N-tert-butyl
nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral a
rtery occlusion in rats, Acta Physiol. Scand., 152: 349-350 (1994b)。

ここに言及した刊行物は、その全体を参考として本明細書に含めるものとする
。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、抗PKCgビーズ上に捕捉して、抗PKCg-FITCにより検出された、PKCgを
測定するサンドイッチ型免疫吸着アッセイからの、PKCg用量に依存した蛍光増加
パーセントを示す。

【図2】

図2は、抗PKCg被覆ビーズ上に捕捉され、抗PKCg-FITCにより検出された、PKC
gを測定するサンドイッチ型免疫吸着アッセイからの、PKCg用量に依存した蛍光
を平均蛍光ユニットで示す。

【図3】

図3は、図2に示すデータから作成されたPKCg検量線を示す。

【図4】

図4は、検査した末梢血試料から得られた、未処理(#1-#3)、偽処理(#4-#6
)および虚血(#7-#11)被験体における、検出されたPKCg濃度の差異を示す。脳

抽出物中のPKC α 濃度も示す（#12, #13）。

【図5】

図5は、末梢血中で検出された、未処理、偽手術および虚血被験体の中の、検出されたPKC α 濃度の差異を示すが、ここでPKC α 量は検量線から読みとる（図3参照）。

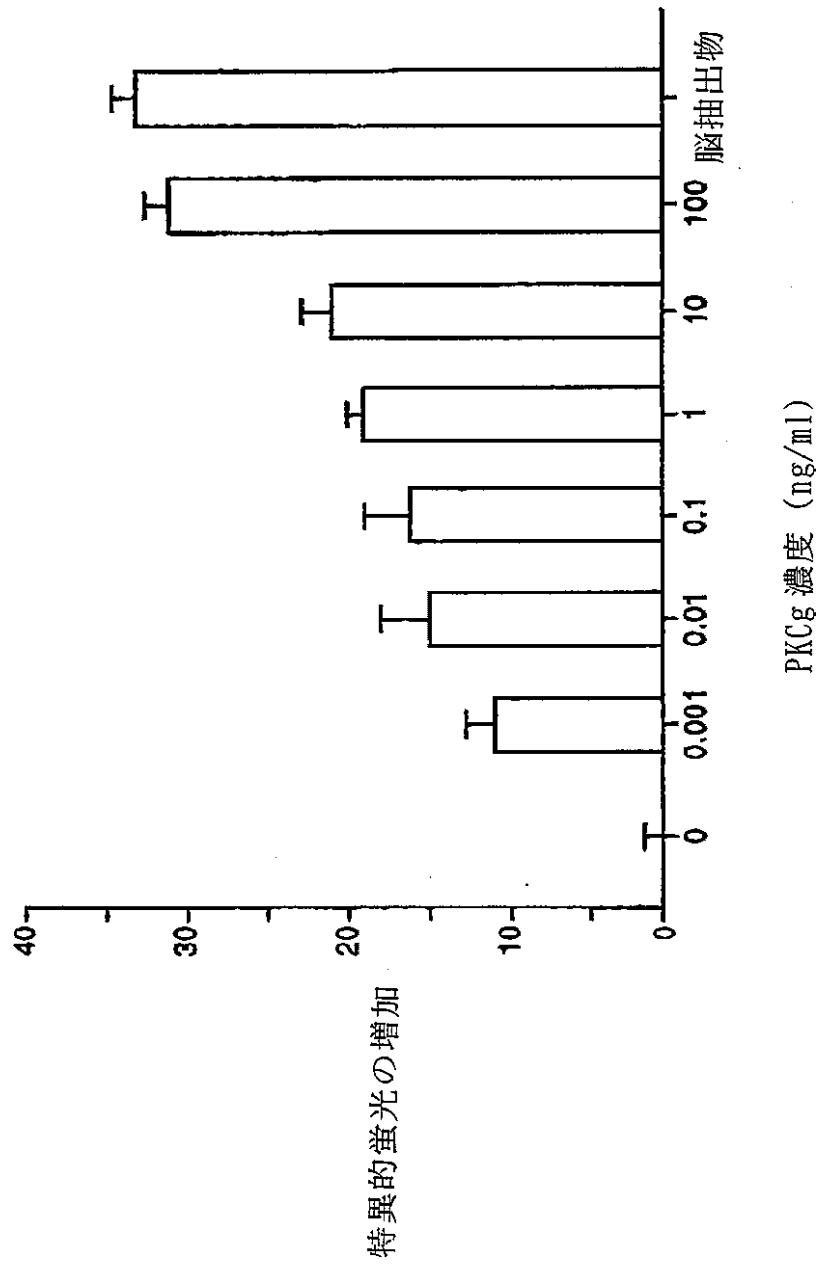
【図6】

図6は、正常ラット（手術せず）、偽手術ラット、および中大脳動脈閉塞術を施した、閉塞後30分、90分、および3時間のラットから採取した血液試料中のPKC α 濃度（ng/ml）を示す。PKC α 濃度はマイクロタイタープレートでサンドイッチアッセイを用いて測定した3匹のラットについての平均値である。

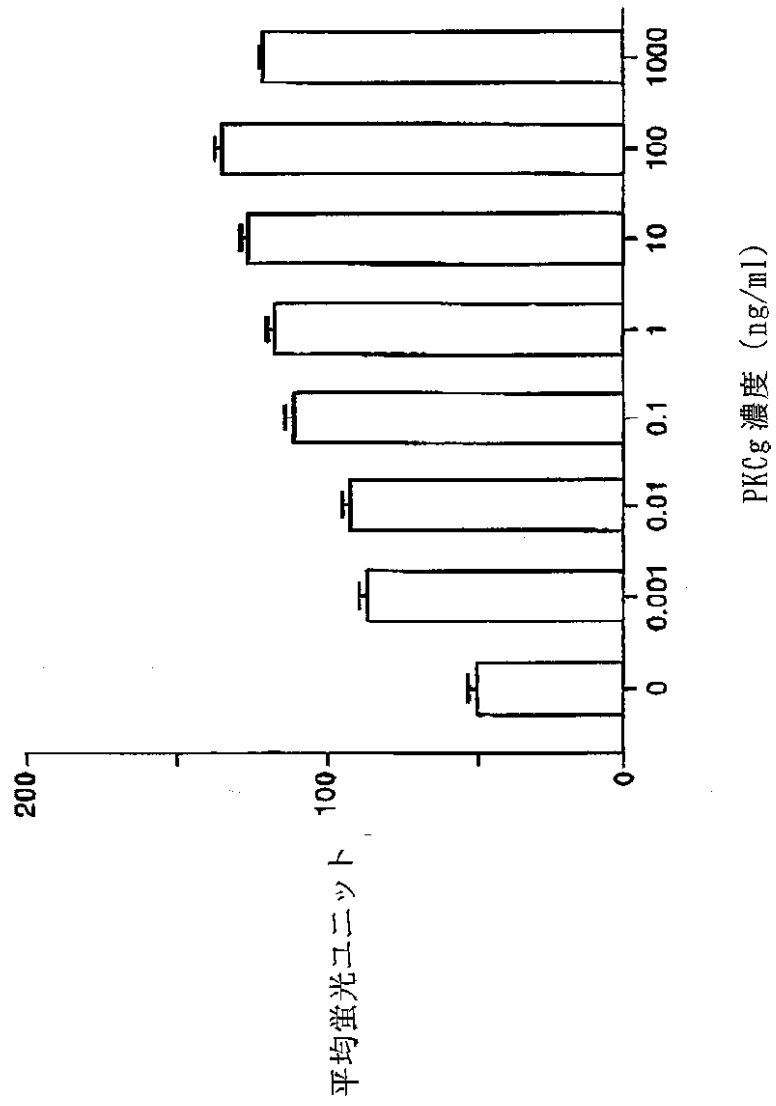
【図7】

図7は、中大脳動脈閉塞術を施した、閉塞後0分、15分、30分、120分、180分、6時間、および24時間のラットから採取した血液中のPKC α 濃度（ng/ml）を示す。閉塞およそ30分前に採取した血液を対照標準として使用した。PKC α 濃度はマイクロタイタープレートでサンドイッチアッセイを用いて測定した3匹のラットについての平均値である。

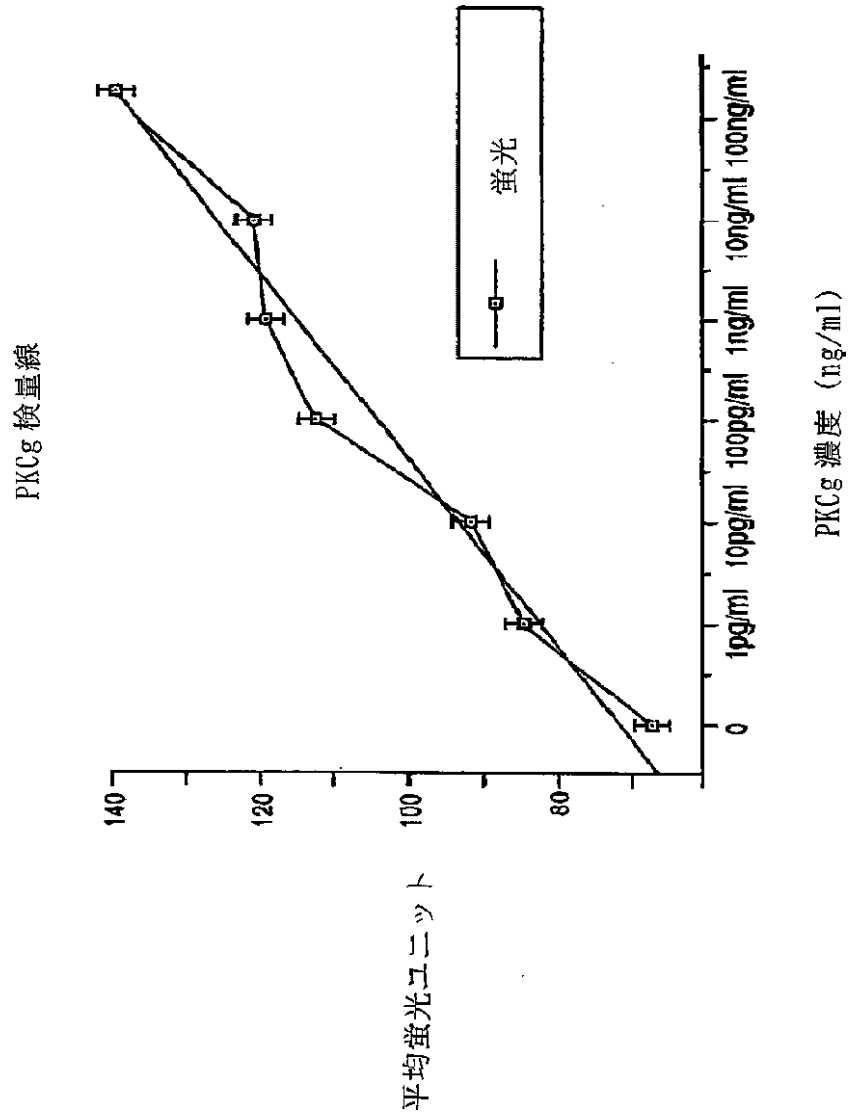
【図1】



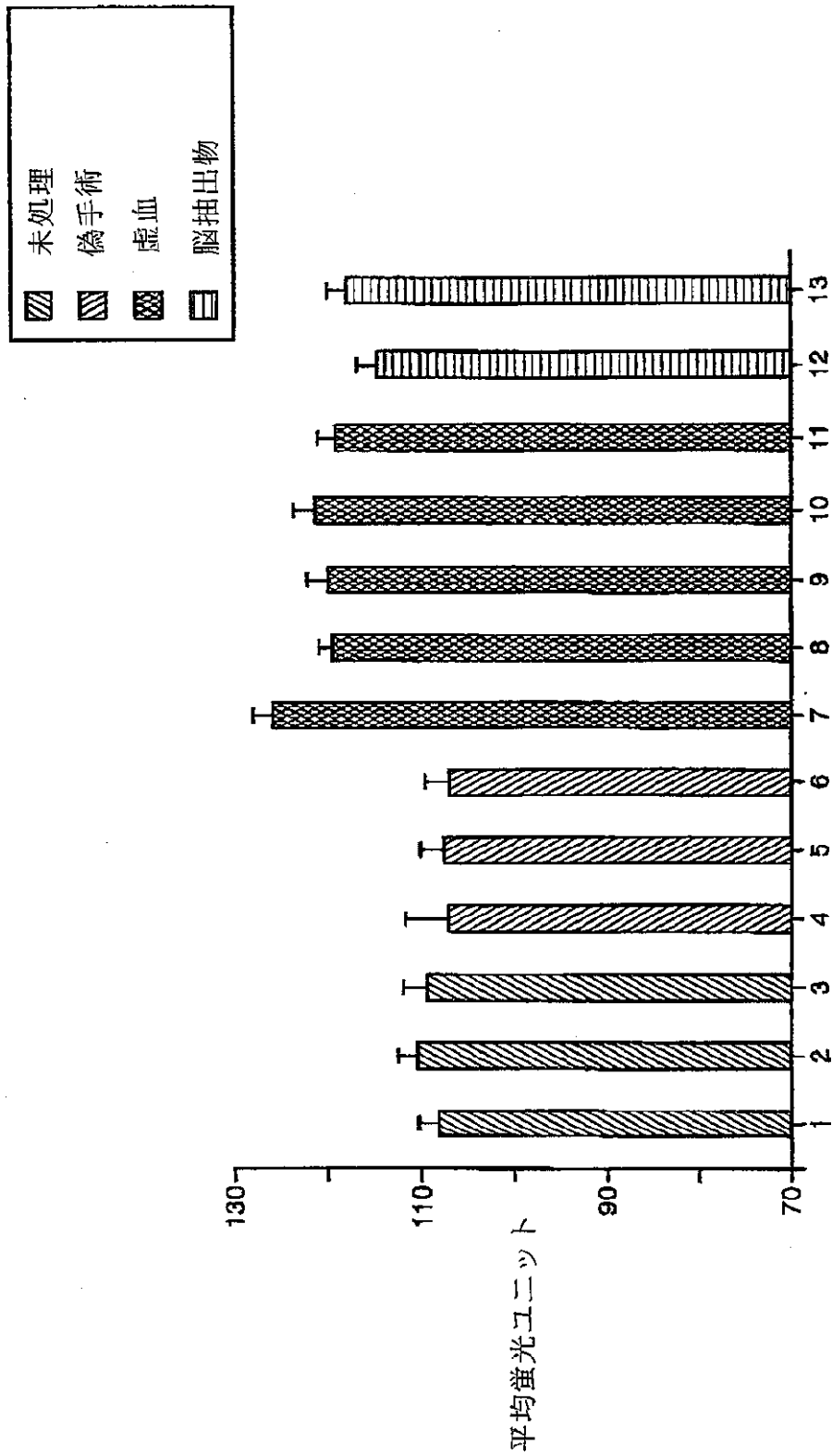
【図2】



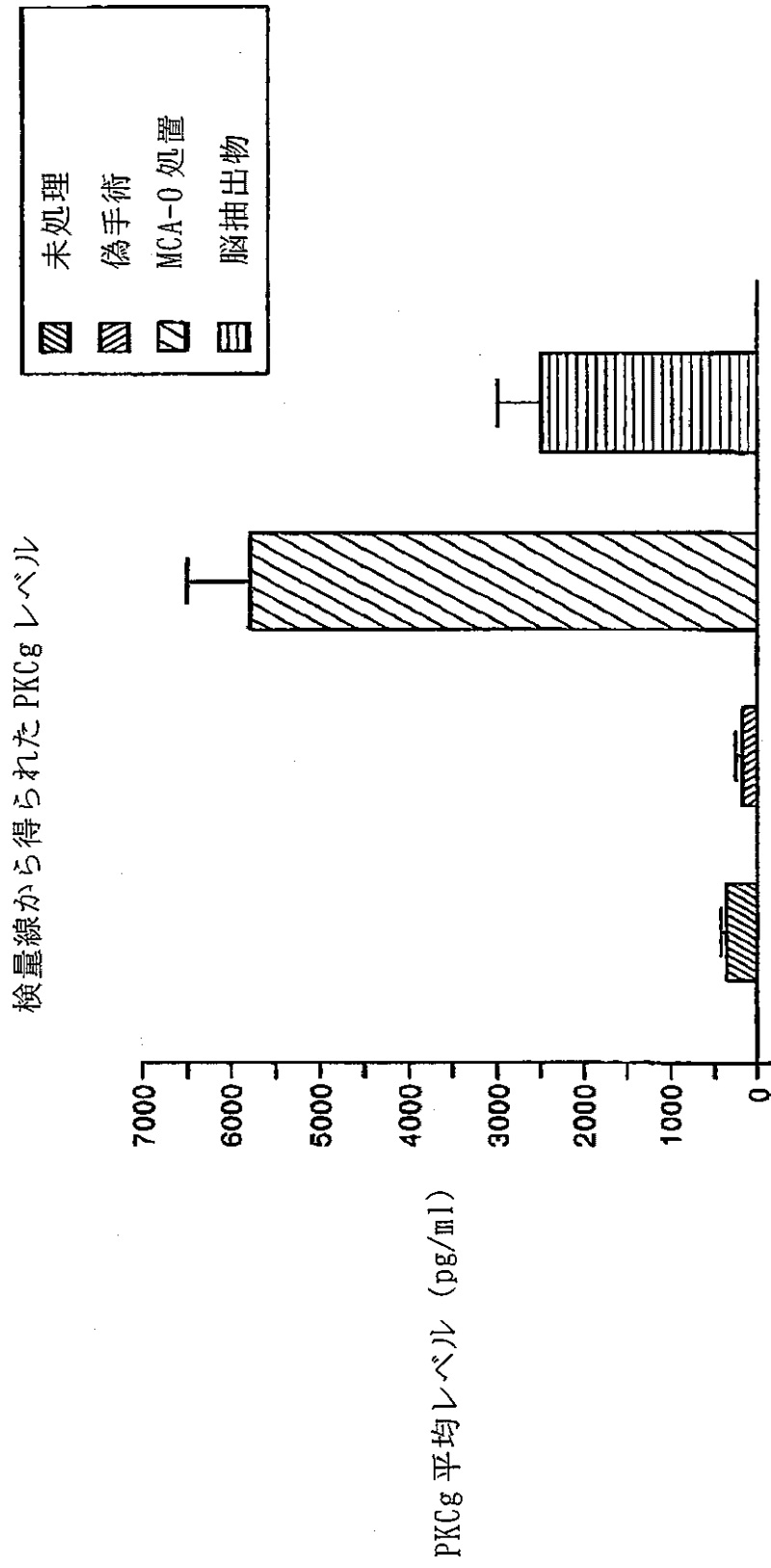
【図3】



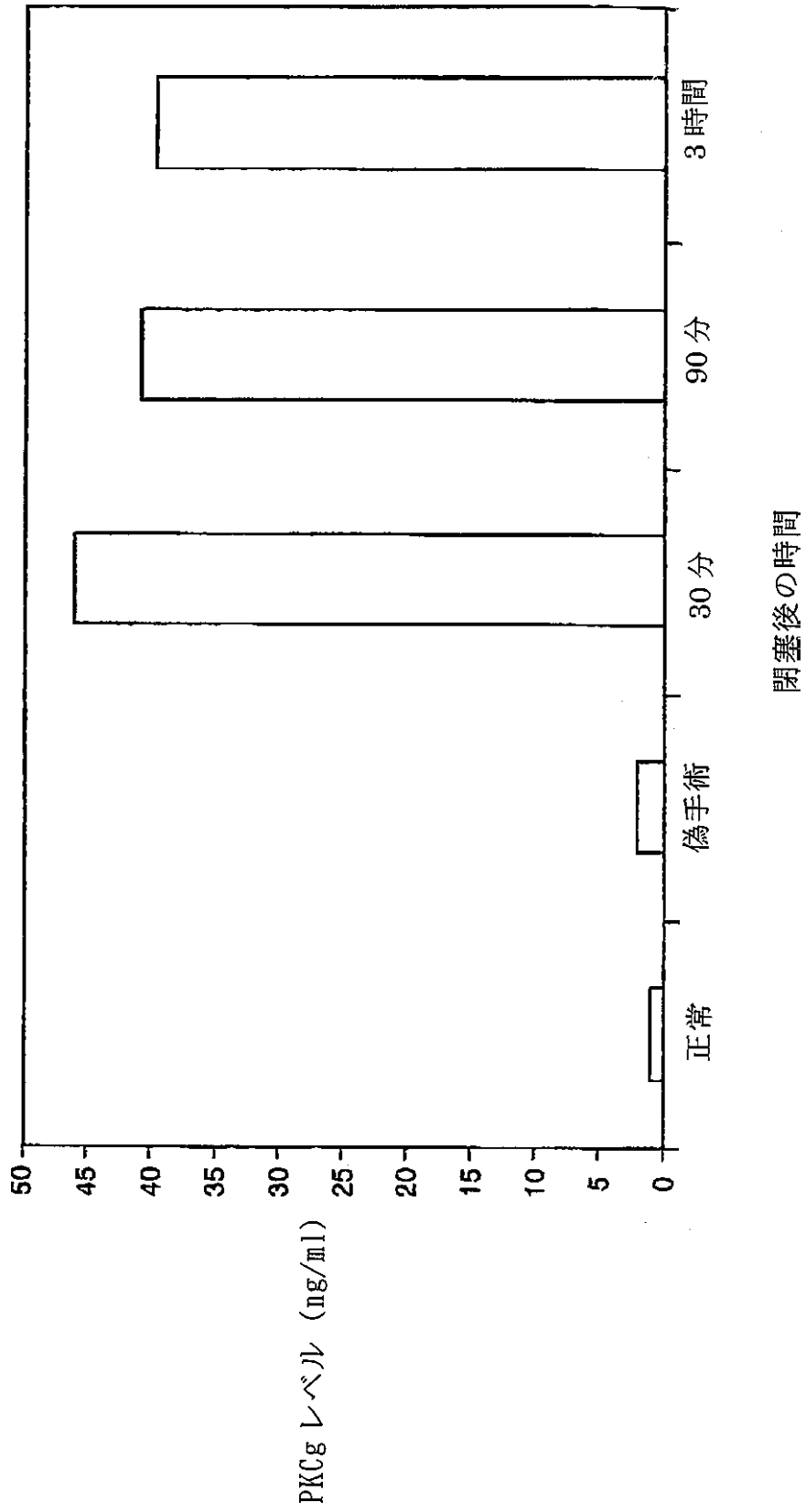
【図4】



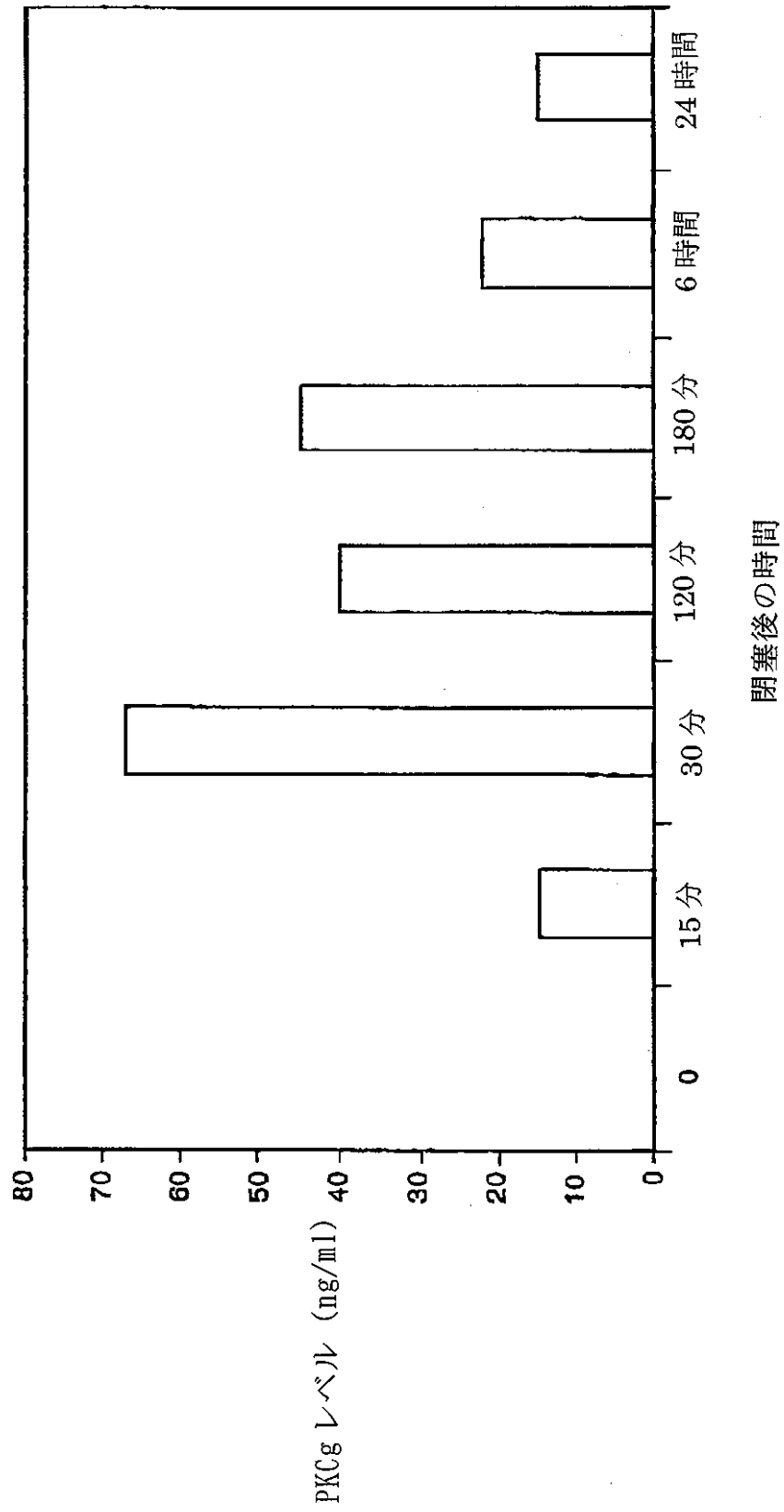
【図5】



【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/24337
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 436/526 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/ 7.1,7.94,975 ; 436/518,523,526,533,538,546,63; 530,380		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched EAST and WEST		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: caplus, embase, medline, lca, caba		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARRIS et al. Anti-CD3-Induced Changes in Protein Kinase C Isozymes Expression in Human CD4+ and CD8+ T Lymphocytes. Harris et al Journal of Clinical Immunology. 1995, Vol. 15, No. 5, pp 232-241, page 237 second col., page 233 first col. methods.	1, 2, 4-6, 27, 28
Y	KRUPINSKI et al. Protein Kinase C expression and activity in the human brain after ischemic stroke. Acta Neurobiol. Exp. 1998, Vol. 98, pages 13-21, figure 3, page 19 discussion.	6-24
Y	US 5,223,398 A (KORTRIGHT et al.) 29 June 1993, col. 5, lines 5-30.	3, 25, 26
A	WIELOCH et al. Intracellular Signal Transduction in the Postischemic Brain. Advances in Neurology Cellular and Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage. Vol. 71, pages 372-374.	1, 7, 17, 20
A	YOSHIDA et al. Translocation of protein Kinase C-alpha, gamma and epsilon isoforms in ischemic rat heart. Biochemica et Biophysica Acta. 1996, Vol. 1317, pages 36-44.	1-28
<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	"&" 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 12 October 2000 (12.10.2000)	Date of mailing of the international search report 14 NOV 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized Officer <i>Dimitris Loucaides</i> Long V Le Telephone No. 703-308-1235	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/58		G 0 1 N 33/58	Z
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	リブレット, レズリー, エー. アメリカ合衆国 06419 コネチカット州, キリングウェアース, チェストナット ヒル ロード 145		
Fターム(参考)	2G045 AA25 CA25 DA36 DA77 FA12 FA16 FA36 FB03 FB07 FB12 HA16		

专利名称(译)	检测中枢神经系统损伤的分析		
公开(公告)号	JP2003508753A	公开(公告)日	2003-03-04
申请号	JP2001520103	申请日	2000-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	通过技术成像有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Biatekku 成像, 有限责任公司		
[标]发明人	コーネルベルアン マッデンキャサリーンエス リブレットレズリーエー		
发明人	コーネル-ベル, アン マッデン, キャサリーン, エス. リブレット, レズリー, エー.		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/324 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/573.B G01N33/53.D G01N33/545.Z G01N33/553 G01N33/577.B G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FA36 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/HA16		
优先权	09/384356 1999-08-27 US		
其他公开文献	JP3517652B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了快速诊断以缺血事件为特征的疾病的方法(例如中风, 短暂性脑缺血发作, 头部外伤, 心肌梗塞或其他导致头部血流阻塞的损伤)。要做。该方法涉及检测外周血中蛋白激酶C (PKC γ) 的伽马同工型, 这是中枢神经系统组织损伤和至少对血脑屏障的短暂损伤的指标。成为该测定例如由急诊医疗人员在一定时间范围内进行, 该时间范围允许在发生永久性中枢神经系统损害之前对患者进行治疗。

神経障害評価	重症度	スコア
障害は観察されない	正常	0
前肢屈曲; 把握反射は両方の前足にある	中程度	1
前肢屈曲; 把握反射は対側前足のみにある	重症	1.5
前肢屈曲; 把握反射は前足の両方ともない	重症	2
前肢屈曲; 把握反射は前足の両方ともなく、さらに麻痺側に向かって旋回運動	重症	3