

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7009977号  
(P7009977)

(45)発行日 令和4年1月26日(2022.1.26)

(24)登録日 令和4年1月17日(2022.1.17)

(51)国際特許分類		F I		
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 0 7 K	14/515 (2006.01)	C 0 7 K	14/515	

請求項の数 14 (全28頁)

(21)出願番号	特願2017-247153(P2017-247153)	(73)特許権者	504139662 国立大学法人東海国立大学機構 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(22)出願日	平成29年12月25日(2017.12.25)	(73)特許権者	390014960 シスメックス株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5 番1号
(65)公開番号	特開2019-113426(P2019-113426 A)	(74)代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(43)公開日	令和1年7月11日(2019.7.11)	(72)発明者	菊地 良介 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立 大学法人名古屋大学内
審査請求日	令和2年10月23日(2020.10.23)	(72)発明者	原田 一宏 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立 大学法人名古屋大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 被検体の血中 V E G F - A に関する測定値を用いた心疾患の重症度及び予後予測を行うための方法、装置及びコンピュータプログラム

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被検体の VEGF-A に関する値を取得することを含む方法であって、  
前記値が、血液試料中の total VEGF-A の測定値で血液試料中の VEGF-A<sub>165b</sub> の測定値を除すことによって得られる値 (VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A) であり、  
前記値が前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆する、  
前記方法。

## 【請求項2】

前記被検体が心筋梗塞発症後の被検体であり、  
前記 VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A が対応する基準値よりも高いときに前記被検体の心筋梗塞の予後が不良であることが示唆される、  
請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記基準値が、心筋梗塞発症後の被検体であって予後が良い群の VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A に基づいて算出された値である、  
請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

前記 VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A が対応する基準値よりも低いときに前記被検体の心筋梗塞の予後が良好であることが示唆される、  
請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記予後の不良が、主要有害心脳血管イベントが生じるリスクが高いことを意味する、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記主要有害心脳血管イベントは、心血管死、非致死性心筋梗塞の再発、冠動脈血行再建術の再適用、及び脳梗塞よりなる群から選択される一種又は複数種のイベントを含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A が対応する基準値よりも低いときに前記被検体が冠動脈疾患重症群に属することが示唆される、  
請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 8】

冠動脈疾患重症群は、SYNTAX スコアが 22 よりも大きい被検体の群である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A が対応する基準値よりも高いときに前記被検体が冠動脈疾患非重症群に属することが示唆される、  
請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記基準値が、冠動脈疾患重症群の VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A に基づいて算出された値である、  
請求項 1、及び 7 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 11】

冠動脈疾患非重症群は、SYNTAX スコアが 22 以下の被検体の群である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 12】

被検体の VEGF-A に関する値を取得する装置であって、  
前記装置は、処理部を備え、  
前記処理部は、血液試料中の total VEGF-A の測定値で血液試料中の VEGF-A<sub>165b</sub> の測定値を除すことによって得られる値 (VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A) を前記値として取得し、  
前記値が前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆する、  
前記装置。

30

## 【請求項 13】

コンピュータに、被検体の VEGF-A に関する値を取得するためのステップを実行させるコンピュータプログラムであって、  
前記値が、血液試料中の total VEGF-A の測定値で血液試料中の VEGF-A<sub>165b</sub> の測定値を除すことによって得られる値 (VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A) であり、  
前記値が前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆する、  
前記コンピュータプログラム。

40

## 【請求項 14】

抗 total VEGF-A 抗体を含む検査試薬、及び抗 VEGF-A<sub>165b</sub> 抗体を含む検査試薬を含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

被検体の VEGF-A に関する値を取得するための方法、装置及びコンピュータプログラムが開示される。

## 【背景技術】

## 【0002】

50

心疾患は心臓の不全に起因する疾患の総称であり、主な死因の一つである重篤な疾患群である。

【 0 0 0 3 】

非特許文献 1 には、ST上昇型の急性心筋梗塞患者でVEGF-A<sub>165b</sub>を測定し核磁気共鳴画像法 ( magnetic resonance imaging ) MRIによる心筋梗塞のサイズを検討し、発症後 24時間の時点でVEGF-A<sub>165b</sub>が上昇している患者では、梗塞範囲が広く、左室駆出率が低下することが示されている。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 4 】

【 文献 】 Scientific Reports 7, Article number: 9962 (2017) doi:10.1038 / s41598-017-10505-9

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

心筋梗塞は、治療の向上により死亡率は低下傾向であるが、依然として予後不良な心疾患の一つである。

【 0 0 0 6 】

また、心臓を栄養する冠動脈における血管内腔の狭窄や閉塞は、心筋梗塞の大きな要因の一つである。冠動脈内の病変の解剖学的特徴から冠動脈疾患の複雑性を算出する指標としてSYNTAX (SYnergy between PCI with TAXUS<sup>TM</sup> and Cardiac Surgery)スコアが知られている。SYNTAXスコアは、血管造影画像を用いてスコアリングをするため、血管造影剤を投与し、個々の患者について血管造影を行う必要がある。このため、SYNTAXスコアによる冠動脈疾患の重症度の評価は非常に煩雑であり、患者に対する侵襲度も高い。

【 0 0 0 7 】

本発明は、心筋梗塞の予後や冠動脈疾患の重症度の指標となる血液マーカーを提供することを一課題とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

前記課題を解決するための第 1 の実施形態は、被検体のVEGF-Aに関する値を取得することを含む方法に関する。前記値は、血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値、又は血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値で血液試料中のVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値を除すことによって得られる値 ( VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A ) を含む。

【 0 0 0 9 】

前記課題を解決するための第 2 の実施形態は、被検体のVEGF-Aに関する値を取得する装置 ( 1 0 ) に関する。装置 ( 1 0 ) は、処理部 ( 1 0 1 ) を備る。処理部 ( 1 0 1 ) は、血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値、又は血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値で血液試料中のVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値を除すことによって得られる値 ( VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A ) を前記値として取得する。

【 0 0 1 0 】

前記課題を解決するための第 3 の実施形態は、コンピュータに、被検体のVEGF-Aに関する値を取得するためのステップを実行させるコンピュータプログラムに関する。前記値は、血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値、又は血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値で血液試料中のVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値を除すことによって得られる値 ( VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A ) である。

【 0 0 1 1 】

第 1 から第 3 の実施形態において、前記値は、前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆することができる。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 2 】

10

20

30

40

50

本発明によると、心筋梗塞の予後や冠動脈疾患の重症度の指標となる血液マーカーを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】装置の概略を示す図である。

【図2】装置のハードウェアの概略を示す図である。

【図3】装置の動作を示すフローチャートである。

【図4】装置の動作を示すフローチャートである。

【図5】装置の動作を示すフローチャートである。

【図6】装置の動作を示すフローチャートである。

【図7】装置の動作を示すフローチャートである。

【図8】検査試薬の概略を示す図である。

【図9】キットの概略を示す図である。

【図10】Aは、心筋梗塞発症後3日目、及び30日目のtotal VEGF-Aの測定値の箱ひげ図を示す。Bは、心筋梗塞発症後3日目、及び30日目のVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値の箱ひげ図を示す。Cは、心筋梗塞発症後3日目、及び30日目のVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aの箱ひげ図を示す。+は、MACCEを認めた群を示し、-はMACCEを認めなかった群を示す。

【図11】Aは、心筋梗塞発症後30日目のtotal VEGF-Aの測定値が基準値よりも低かった群(Low:実線)と高かった群(High:破線)におけるMACCEの累積発生率を示す。Bは、心筋梗塞発症後30日目のVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aが基準値よりも低かった群(Low:破線)と高かった群(High:実線)におけるMACCEの累積発生率を示す。

【図12】Aは、対照群、SYNTAXスコアが22以下の群(Low SS)、及びSYNTAXスコアが22よりも大きい群(High SS)のtotal VEGF-Aの測定値の箱ひげ図を示す。Bは、対照群、SYNTAXスコアが22以下の群(Low SS)、及びSYNTAXスコアが22よりも大きい群(High SS)のVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aの箱ひげ図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

[1.方法]

方法は、被検体のVEGF-Aに関する値を取得することを含む。VEGF-Aに関する値は、血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値、及び/又は血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値で血液試料中のVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値を除すことによって得られる値(VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A)を含む。前記方法は、前記被検体の血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値、及び/又はVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値(以下、「VEGF-Aに関する測定値」ともいう)を取得する工程を含んでもよい。total VEGF-Aの測定値、及びVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aの取得は同時であっても時間差があってもよい。total VEGF-Aの測定値、及びVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値の取得も同時であっても時間差があってもよい。前記方法において、前記値は、前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆する。好ましくは、前記示唆することには、前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を予測すること、前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を予測することを補助すること、又は前記被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を決定することが含まれる。

【0015】

前記方法は、VEGF-Aに関する各値と、対応する基準値との比較結果を得ることを含んでもよい。前記示唆は、前記比較結果に基づいて行われてもよい。

【0016】

前記方法は、ヒトが実施してもよく、後述する装置10が実現してもよい。

【0017】

[1-1. VEGF-Aに関する測定値の取得方法]

前記被検体は、前記方法により心筋梗塞の予後又は冠動脈疾患の重症度を示唆する必要がある個体である限り特に制限されない。前記個体には、ヒト及びヒト以外の哺乳動物が含

10

20

30

40

50

まれる。前記哺乳動物としては、例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、サル等が挙げられる。前記個体として、好ましくはヒトである。前記個体の年齢、性別は問わない。前記個体として好ましくは、生きている個体である。被検体としては、虚血性心疾患若しくは冠動脈疾患が疑われない個体であってもよいが、虚血性心疾患若しくは冠動脈疾患を疑う個体、又は虚血性心疾患若しくは冠動脈疾患を発症した個体であることが好ましい。心筋梗塞の予後を示唆される対象となる被検体は、心筋梗塞発症後の個体であることが好ましい。冠動脈疾患を疑うとは、胸部症状（胸痛、又は胸部圧迫感等）、背部痛、上腹部痛、肩の痛み、息苦しさ、及び冷や汗等より選択される少なくとも一種の自覚症状がある場合、運動負荷試験において心電図や自覚症状に異常が認められる場合、及び/又は心筋シンチグラフィにより異常が認められる場合等をいう。

10

**【0018】**

前記虚血性疾患は、循環障害に伴って心筋組織に生じる病変である限り制限されない。例えば、狭心症、及び心筋梗塞が含まれる。好ましくは心筋梗塞である。心筋梗塞の定義は、the third universal definition of myocardial infarction (Circulation 2012; 126: 2020-2035) にしたがう。心筋梗塞の予後は、例えば主要有害心脳血管イベント (major adverse cardiac and cerebrovascular events: MACCE) が起こるか否かで評価することができる。主要有害心脳血管イベントは、例えば心筋梗塞発症から遠隔期の総死亡、心筋梗塞の再発、脳血管障害、冠動脈の血行再建術の再適用等を挙げることができる。好ましくは、主要有害心脳血管イベントは、心血管死、非致死性心筋梗塞の再発、冠動脈血行再建術の再適用、及び脳梗塞よりなる群から選択される一種又は複数種のイベントを含む。

20

**【0019】**

前記冠動脈疾患は、心臓を栄養する冠動脈系血管に生じる病変である限り制限されない。好ましくは、前記冠動脈疾患は、血管内腔の狭窄及び/又は閉塞を伴う。前記冠動脈疾患の定義及び複雑性の評価は、Sianos, et al. (Journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology 2005; 1:219-227) にしたがう。例えば、Sianos, et al.によれば、冠動脈疾患の複雑性を血管造影画像によりスコアリングすることで得られるSYNTAX (SYnergy between PCI with TAXUS<sup>TM</sup> and Cardiac Surgery)スコアにより、冠動脈疾患の重症度を評価することができる。例えば、被検体のSYNTAXスコアが22よりも大きい場合には、その被検体が有する冠動脈疾患は重症であると評価できる。また、被検体のSYNTAXスコアが22以下である場合には、その被検体が有する冠動脈疾患は重症ではない（非重症である）と評価できる。好ましくは、被検体のSYNTAXスコアが22以下、かつ0よりも大きい場合に、その被検体が有する冠動脈疾患は重症ではない（非重症である）と評価することができる。被検体のSYNTAXスコアが33よりも大きい場合には、その被検体が有する冠動脈疾患は重症度が高度であると評価してもよい。被検体のSYNTAXスコアが33以下であり、22よりも大きい場合に、その被検体が有する冠動脈疾患は重症度が中程度であると評価してもよい。冠動脈疾患は、血管造影検査において冠動脈内腔に75%以上（左冠動脈主幹部においては50%以上）の狭窄、及び/又は閉塞が認められる場合に有意狭窄と判断される。したがって、有意狭窄がない個体を冠動脈疾患の陰性対照群としてもよい。前記陰性対照群をSYNTAXスコアが0の群と定義してもよい。

30

40

**【0020】**

前記被検体からは、心臓、及び/又は脳の虚血性疾患、及び冠動脈疾患以外の原因によりtotal VEGF-Aの測定値、及び/又はVEGF-A<sub>165b</sub>の測定値が変化していると予測される個体は除かれる。好ましくは血液透析を受けている（若しくは受けた）個体、前年に外科的治療又は化学療法が必要とされる悪性腫瘍を有した個体、悪性腫瘍を有する個体、及び膠原病等の自己免疫疾患を有する個体等は除かれる。

**【0021】**

前記total VEGF-A及びVEGF-A<sub>165b</sub>は、血液中（好ましくは循環血液中）に存在するものを測定対象とし、好ましくは血漿中又は血清中に存在するものを測定対象とする。個体

50

から採取された全血、及び個体から採取された全血から分離された血漿、又は血清を、血液試料とよぶ。血漿を採取する際に使用する抗凝固剤は、ヘパリン又はその塩以外を使用することが好ましい。また、カテーテル検査時に血液試料を採取する場合には、個体へのヘパリンの投与前に行うことが好ましい。測定に用いる被検体の血液試料と所定の基準値を決定する血液試料は同種であっても異種であっても良いが、同種であることが好ましい。また、血液試料として血漿を用いる場合、所定の基準値を決定するための血漿は、被検体の血漿と同じ抗凝固剤を用いて採血された血液から調製されることが好ましい。さらに、血液試料は、新鮮なものであっても、保存されていたものであってもよい。血液試料を保存する場合には、室温環境、冷蔵環境又は冷凍環境において保存することができるが、好ましくは冷凍保存である。血液試料として好ましくは、血清である。

10

**【0022】**

VEGF-Aは、vascular endothelial growth factor Aを意図し、ヒトであれば、例えば、National Center for Biotechnology InformationにGene ID: 7422で登録される遺伝子に由来する産物を意図する。total VEGF-Aは、VEGF-A遺伝子から転写を経て翻訳される全てのバリエーションを含むことを意図する。VEGF-A<sub>165b</sub>は、VEGF-A遺伝子から転写及び翻訳されるバリエーションの1つであり、例えばCancer research 2002; 62:4123-4131で報告されている。VEGF-A<sub>165b</sub>は、VEGF<sub>165b</sub>とも称される。

**【0023】**

「測定値」とは、total VEGF-A又はVEGF-A<sub>165b</sub>タンパク質（以下、標的タンパク質という）の量又は濃度を反映した値をいう。当該測定値を「量」で標記する場合には、モルであっても質量であってもよいが、質量で標記することが好ましい。また、値を「濃度」で表記する場合には、モル濃度であっても血液試料の一定容量あたりの質量の割合（質量/容量）であってもよいが、好ましくは質量/容量である。量又は濃度を反映する値としては、上記の他に、蛍光や発光などのシグナルの強度であってもよい。

20

**【0024】**

「対応する基準値」とは、各VEGF-Aに関する値に応じて決定された基準値をいう。基準値は予め決定されていることが好ましい。心筋梗塞の予後の示唆を行うために使用される基準値は、心筋梗塞発症後の被検体であって予後が良い群から採取された血液試料中のVEGF-Aに関する値から決定されることが好ましい。さらに好ましくは、心筋梗塞発症後の被検体であって予後が良い群から採取された血液試料中のVEGF-Aに関する値と、心筋梗塞発症後の被検体であって予後が不良の群から採取された血液試料中のVEGF-Aに関する値とから決定される。冠動脈疾患の重症度の示唆を行うために使用される基準値は、冠動脈疾患重症群から採取された血液試料中のVEGF-Aに関する値から決定されることが好ましい。さらに好ましくは、冠動脈疾患非重症群から採取された血液試料中のVEGF-Aに関する値と、冠動脈疾患重症群から採取された血液試料中のVEGF-Aに関する値とから決定される。

30

**【0025】**

例えば、心筋梗塞発症後の1又は複数の被検体であって予後が不良の群から採取されたVEGF-Aに関する値（陽性対照値）と、心筋梗塞発症後の1又は複数の被検体であって予後が良い群から採取された血液試料中のVEGF-Aに関する値（陰性対照値）とを取得する。あるいは、冠動脈疾患重症群から採取されたVEGF-Aに関する値（陽性対照値）と、冠動脈疾患非重症群から採取されたVEGF-Aに関する値（陰性対照値）とを取得する。これらの複数の値に基づいて陽性対照値と対応する陰性対照値とを最も精度よく分類できる値を「基準値」とすることができる。ここで、「最も精度よく分類できる値」は、検査の目的によって感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率などの指標に基づいて適宜設定することができる。さらに、ROC曲線（Receiver Operating Characteristic curve、受信者動作特性曲線）、判別分析法、モード法、Kittler法、3法、p tile法等により、基準値を決定することもできる。

40

**【0026】**

前記VEGF-Aに関する測定値を取得する方法は、制限されない。例えば、標的タンパク質

50

の測定値を取得するために、標的タンパク質に特異的に結合可能な抗体、すなわち抗標的タンパク質抗体を用いることができる。抗標的タンパク質抗体を用いた標的タンパク質の測定値の取得方法としては、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法や、ウェスタンブロッティング法を挙げることができる。

【0027】

抗標的タンパク質抗体を用いた標的タンパク質の測定値の取得について、ELISA法を例にして説明する。

【0028】

はじめに、標的タンパク質を捕捉するための抗標的タンパク質抗体（捕捉用抗標的タンパク質抗体）と血液試料とを混合する。血液試料と捕捉用抗標的タンパク質抗体とを混合する順序は特に限定されず、これらを実質的に同時に混合してもよいし、逐次混合してもよい。

10

【0029】

具体的には、先に捕捉用抗標的タンパク質抗体と血液試料中の標的タンパク質との複合体を形成させてから前記複合体を固相上に固定化するか、又は予め捕捉用抗標的タンパク質抗体を固相上に固定化し、固定化された捕捉用抗標的タンパク質抗体と血液試料中の標的タンパク質との複合体を形成させることができる。より好ましくは、先に前記複合体を形成させてから前記複合体を固相上に固定化する態様である。そして、固相上に固定化された前記複合体又は固相上で形成された複合体を、前記技術において公知の方法で検出することにより、血液試料に含まれる標的タンパク質の測定値を取得することができる。

20

【0030】

先に捕捉用抗標的タンパク質抗体と血液試料中の標的タンパク質との複合体を形成させてから前記複合体を固相上に固定する場合、ビオチン等で修飾した捕捉用抗標的タンパク質抗体を、血液試料中の標的タンパク質と接触させて複合体を形成させる。別途固相にアビジン又はストレプトアビジン（以下、「アビジン類」ともいう）をあらかじめ結合させておくことにより、ビオチンとアビジン類との結合を介して、前記複合体を固相に固定化することができる。

【0031】

また、予め捕捉用抗標的タンパク質抗体を固相に固定する場合、捕捉用抗標的タンパク質抗体の固相への固定の態様は、特に限定されない。例えば、捕捉用抗標的タンパク質抗体と固相とを直接結合させてもよいし、捕捉用抗標的タンパク質抗体と固相との間を別の物質を介して間接的に結合させてもよい。直接の結合としては、例えば、物理的吸着などが挙げられる。間接的な結合としては、例えば、アビジン類との組合せを介した結合が挙げられる。この場合、捕捉用抗標的タンパク質抗体を予めビオチンで修飾し、固相にアビジン類を予め結合させておくことにより、ビオチンとアビジン類との結合を介して、捕捉用抗標的タンパク質抗体と固相とを間接的に結合させることができる。本実施態様においては、捕捉用抗標的タンパク質抗体と固相との結合は、ビオチンとアビジン類を介した間接的な結合であることが好ましい。

30

【0032】

固相の素材は特に限定されず、例えば、有機高分子化合物、無機化合物、生体高分子などから選択できる。有機高分子化合物としては、ラテックス、ポリスチレン、ポリプロピレンなどが挙げられる。無機化合物としては、磁性体（酸化鉄、酸化クロム及びフェライトなど）、シリカ、アルミナ、ガラスなどが挙げられる。生体高分子としては、不溶性アガロース、不溶性デキストラン、ゼラチン、セルロースなどが挙げられる。これらのうちの2種以上を組み合わせて用いてもよい。固相の形状は特に限定されず、例えば、粒子、膜、マイクロプレート、マイクロチューブ、試験管などが挙げられる。それらの中でも粒子が好ましく、磁性粒子が特に好ましい。

40

【0033】

複合体の形成後、好ましくは複合体形成後であって標識物質の検出前に、複合体を形成していない未反応の遊離成分を除去するBound/Free (B/F)分離を行ってもよい。未反応

50

の遊離成分とは、複合体を構成しない成分をいう。例えば、標的タンパク質と結合しなかった抗標的タンパク質抗体などが挙げられる。B/F分離の手段は特に限定されないが、固相が粒子であれば、遠心分離により、複合体を捕捉した固相だけを回収することによりB/F分離ができる。固相がマイクロプレートやマイクロチューブなどの容器であれば、未反応の遊離成分を含む液を除去することによりB/F分離ができる。また、固相が磁性粒子の場合は、磁石で磁性粒子を磁氣的に拘束した状態でノズルによって未反応の遊離成分を含む液を吸引除去することによりB/F分離ができる。前記方法は、自動化の観点で好ましい。未反応の遊離成分を除去した後、複合体を捕捉した固相をリン酸緩衝食塩水(PBS)などの適切な水性媒体で洗浄してもよい。

#### 【0034】

前記複合体の検出は、標識物質で標識された抗標的タンパク質抗体を使用するかどうか、未標識の抗標的タンパク質抗体と前記未標識の抗標的タンパク質抗体と結合することができる標識物質で標識された抗イムノグロブリン抗体等を使用するかどうか、標識された抗標的タンパク質抗体を使用することが好ましい。また、標識された抗標的タンパク質抗体の標的タンパク質におけるエピトープと、固相に結合する抗標的タンパク質抗体の標的タンパク質におけるエピトープとは、異なることが好ましい。

#### 【0035】

標識抗標的タンパク質抗体又は標識抗イムノグロブリン抗体に用いられる標識物質は、検出可能なシグナルが生じる限り、特に限定されない。例えば、それ自体がシグナルを発生する物質(以下、「シグナル発生物質」ともいう)であってもよいし、他の物質の反応を触媒してシグナルを発生させる物質であってもよい。シグナル発生物質としては、例えば、蛍光物質、放射性同位元素などが挙げられる。他の物質の反応を触媒して検出可能なシグナルを発生させる物質としては、例えば、酵素が挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ(ALP)、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、Alexa Fluor(登録商標)などの蛍光色素、Enhanced green fluorescent protein(EGFP)などの蛍光タンパク質などが挙げられる。放射性同位元素としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ などが挙げられる。それらの中でも、標識物質として、酵素が好ましく、ALPが特に好ましい。

#### 【0036】

標識抗標的タンパク質抗体は、免疫測定技術分野において公知の標識方法により、抗標的タンパク質抗体を上記の標識物質で標識して得られる。また、市販のラベリングキットなどを用いて標識してもよい。また、標識イムノグロブリン抗体は、抗標的タンパク質抗体の標識と同じ手法を用いてもよいし、市販のものを使用してもよい。

#### 【0037】

複合体に含まれる標識抗標的タンパク質抗体の標識物質により生じるシグナルを検出することにより、血液試料に含まれる標的タンパク質の測定値を取得できる。ここで、「シグナルを検出する」とは、シグナルの有無を定性的に検出すること、シグナル強度を定量すること、及び、シグナルの強度を半定量的に検出することを含む。半定量的な検出とは、シグナルの強度を、「シグナル発生せず」、「弱」、「中」、「強」などのように段階的に示すことをいう。

#### 【0038】

シグナルを検出する方法自体は、免疫測定技術分野において公知である。本実施態様では、上記の標識物質に由来するシグナルの種類に応じた測定方法を適宜選択すればよい。

#### 【0039】

例えば、標識物質が酵素である場合、該酵素に対する基質を反応させることによって発生する光、色などのシグナルを、ルミノメーター、分光光度計などの公知の装置を用いて測定することにより行うことができる。

#### 【0040】

酵素の基質は、該酵素の種類に応じて公知の基質から適宜選択できる。例えば、酵素とし

10

20

30

40

50

てALPを用いる場合、基質として、CDP-Star（登録商標）（4 - クロロ - 3 - （メトキシスピロ [ 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - （5 ' - クロロ）トリクシロ [ 3 . 3 . 1 . 1 3 , 7 ] デカン ] - 4 - イル）フェニルリン酸 2 ナトリウム）、CSPD（登録商標）（3 - （4 - メトキシスピロ [ 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 - （5 ' - クロロ）トリクシロ [ 3 . 3 . 1 . 1 3 , 7 ] デカン ] - 4 - イル）フェニルリン酸 2 ナトリウム）などの化学発光基質、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルリン酸(BCIP)、5 - ブロモ - 6 - クロロ - インドリルリン酸 2 ナトリウム、p - ニトロフェニルリン酸などの発色基質が挙げられる。特に好ましくは、CDP-Star（登録商標）である。前記基質の発光は、ルミノメーターで検出することが好ましい。

#### 【0041】

標識物質が放射性同位体である場合は、シグナルとしての放射線を、シンチレーションカウンターなどの公知の装置を用いて測定できる。また、標識物質が蛍光物質である場合は、シグナルとしての蛍光を、蛍光マイクロプレートリーダーなどの公知の装置を用いて測定できる。なお、励起波長及び蛍光波長は、用いた蛍光物質の種類に応じて適宜決定できる。

#### 【0042】

シグナルの検出結果は、標的タンパク質の測定値として用いることができる。例えば、シグナルの強度を定量的に検出する場合は、シグナル強度の測定値自体又は該シグナル強度の測定値から算出される値を、標的タンパク質の測定値として用いることができる。シグナル強度の測定値から算出される値としては、例えば、該シグナル強度の測定値から陰性対照試料のシグナル強度の測定値を差し引いた値、該シグナル強度の測定値を陽性対照試料のシグナル強度の測定値で除した値、及びそれらの組み合わせなどが挙げられる。陰性対照試料としては、健常個体の血液試料等が挙げられる。陽性対照試料としては、標的タンパク質を所定の濃度で含む血液試料が挙げられる。

#### 【0043】

また、血液試料中の標的タンパク質の測定値は、既知濃度の標的タンパク質を含む陽性対照のシグナル強度の測定値から検量線を作成し、その検量線に血液試料中の標的タンパク質に由来するシグナルの強度の測定値を当てはめることにより算出することができる。また、検量線を作成せず、既知濃度の標的タンパク質を含む陽性対照のシグナル強度の測定値から回帰式を求め、その回帰式に血液試料中の標的タンパク質に由来するシグナルの強度の測定値を当てはめることにより、血液試料中の標的タンパク質の測定値を算出することができる。

#### 【0044】

抗標的タンパク質抗体は、標的タンパク質と特異的に結合する限り制限はなく、標的タンパク質又はその一部を抗原としてヒト以外の動物に免疫して得られたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、及びそれらの断片（例えば、Fab、F(ab)<sub>2</sub>等）のいずれも用いることができる。また、免疫グロブリンのクラス及びサブクラスは特に制限されない。

#### 【0045】

抗標的タンパク質抗体を作製するために用いられる、抗原となる標的タンパク質としては標的タンパク質の抗体を作製できる限り制限されない。抗原として用いられる標的タンパク質は、哺乳類細胞から公知の方法に従って抽出されたものでもよく、また組換え遺伝子工学技術によって得られたリコンビナントタンパク質であってもよい。標的タンパク質の一部を抗原とする場合には、標的タンパク質を酵素等で消化して得られるフラグメントを使用してもよく、また標的タンパク質の一部のアミノ酸配列と同じ配列を有するペプチドを抗原としてもよい。当該ペプチドは、公知の方法によって合成することができる。ここで、total VEGF-Aの測定値を取得されるために使用される抗標的タンパク質抗体は、VEGF-A全てのバリエーションと反応することが好ましいため、VEGF-A全てのバリエーションに共通するペプチド配列を有する抗原を用いて作製されることが好ましい。一方、VEGF-A<sub>165b</sub>の測定値を取得されるために使用される抗標的タンパク質抗体、特に捕捉用抗標的タンパク質抗体は、VEGF-A<sub>165b</sub>に特異的なペプチド配列を有する抗原を用いて作製されることが

10

20

30

40

50

好ましい。抗標的タンパク質抗体は、市販品を購入してもよい。

【0046】

また、標的タンパク質の測定値の取得は、ヒトVEGF Quantikine ELISAキット（DVE00、R&D）及びヒト血管内皮増殖因子-165b ELISAキット（MBS720132、MyBiosource）等の市販のキットを使用して取得することもできる。

【0047】

[1-2. 心筋梗塞の予後の示唆]

上記1-1. で述べた方法により取得された血液試料中のVEGF-Aに関する値は、心筋梗塞の予後を示唆するために使用される。

【0048】

前記被検体が心筋梗塞発症後の被検体であり、前記VEGF-Aに関する値がtotal VEGF-A測定値である場合、前記VEGF-Aに関する値と対応する基準値との間の比較において、前記total VEGF-A測定値が対応する基準値よりも低いという結果が得られたときに前記被検体の心筋梗塞の予後が不良であることが示唆される。また、前記total VEGF-A測定値が対応する基準値よりも高いという結果が得られたときに前記被検体の心筋梗塞の予後が良好であることが示唆されてもよい。

10

【0049】

前記被検体が心筋梗塞発症後の被検体であり、前記VEGF-Aに関する値がVEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aである場合、前記VEGF-Aに関する値と対応する基準値との間の比較において、前記VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aが対応する基準値よりも高いという結果が得られたときに前記被検体の心筋梗塞の予後が不良であることが示唆される。また、前記VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aが対応する基準値よりも低いという結果が得られたときに前記被検体の心筋梗塞の予後が良好であることが示唆されてもよい。

20

【0050】

前記被検体が心筋梗塞発症後の被検体である場合、血液試料は、心筋梗塞の発症日を1日目として、1~40日目、好ましくは3~30日目、より好ましくは3日目、及び/又は30日目に被検体から採取されることが好ましい。

本項において、上記1-1. で説明されている用語と共通する用語については、上記1-1. の説明をここに援用する。

【0051】

[1-3. 冠動脈疾患の重症度の示唆]

上記1-1. で述べた方法により取得された血液試料中のVEGF-Aに関する値は、冠動脈疾患の重症度を示唆するために使用される。

【0052】

前記VEGF-Aに関する値がtotal VEGF-A測定値である場合、前記VEGF-Aに関する値と対応する基準値との間の比較において、前記total VEGF-A測定値が対応する基準値よりも高いという結果が得られたときに前記被検体が冠動脈疾患重症群に属することが示唆される。また、前記total VEGF-A測定値が対応する基準値よりも低いという結果が得られたときに前記被検体が冠動脈疾患非重症群に属することが示唆されてもよい。

【0053】

前記VEGF-Aに関する値がVEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aである場合、前記VEGF-Aに関する値と対応する基準値との間の比較において、前記VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aが対応する基準値よりも低いという結果が得られたときに前記被検体が冠動脈疾患重症群に属することが示唆される。また、前記VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aが対応する基準値よりも高いときに前記被検体が冠動脈疾患非重症群に属することが示唆されてもよい。

40

【0054】

本項において、上記1-1. で説明されている用語と共通する用語については、上記1-1. の説明をここに援用する。

【0055】

[2. 被検体のVEGF-Aに関する測定値を取得する装置]

50

## [ 2 - 1 . 装置の構成 ]

被検体のVEGF-Aに関する測定値を取得する装置 1 0 は、少なくとも処理部 1 0 1 と記憶部を備える。記憶部は、主記憶部 1 0 2 及び / 又は補助記憶部 1 0 4 から構成される。装置 1 0 は、請求項 1 から 1 3 に記載の方法を実現するための装置であってもよい。装置 1 0 及び装置 1 0 の動作に係る説明において、上記 1 - 1 . で説明されている用語と共通する用語については、上記 1 - 1 . の説明をここに援用する。

## 【 0 0 5 6 】

処理部 1 0 1 は、前記被検体の血液試料中のVEGF-Aに関する値を取得する。

## 【 0 0 5 7 】

図 1 及び図 2 に、装置 1 0 の構成を示す。装置 1 0 は、入力部 1 1 1 と、出力部 1 1 2 と、記憶媒体 1 1 3 とに接続されていてもよい。また、ELISA測定等を行う測定部 3 0 と接続されていてもよい。すなわち、装置 1 0 は、測定部 3 0 と直接又はネットワーク等を介して接続された、被検体のVEGF-Aに関する値を取得するシステム 5 0 を構成することもある。

10

## 【 0 0 5 8 】

装置 1 0 において、処理部 1 0 1 と、主記憶部 1 0 2 と、ROM ( read only memory ) 1 0 3 と、補助記憶部 1 0 4 と、通信インタフェース ( I / F ) 1 0 5 と、入力インタフェース ( I / F ) 1 0 6 と、出力インタフェース ( I / F ) 1 0 7 と、メディアインタフェース ( I / F ) 1 0 8 は、バス 1 0 9 によって互いにデータ通信可能に接続されている。

## 【 0 0 5 9 】

処理部 1 0 1 は、CPU、MPU又はGPU等から構成される。処理部 1 0 1 が、補助記憶部 1 0 4 又はROM 1 0 3 に記憶されているコンピュータプログラムを実行し、取得されるデータの処理を行うことにより、装置 1 0 が機能する。

20

## 【 0 0 6 0 】

ROM 1 0 3 は、マスクROM、PROM、EPROM、EEPROMなどによって構成され、処理部 1 0 1 により実行されるコンピュータプログラム及びこれに用いるデータが記録されている。ROM 1 0 3 は、装置 1 0 の起動時に、処理部 1 0 1 によって実行されるブートプログラムや装置 1 0 のハードウェアの動作に関連するプログラムや設定を記憶する。

## 【 0 0 6 1 】

主記憶部 1 0 2 は、SRAM又はDRAMなどのRAM ( Random access memory ) によって構成される。主記憶部 1 0 2 は、ROM 1 0 3 及び補助記憶部 1 0 4 に記録されているコンピュータプログラムの読み出しに用いられる。また、主記憶部 1 0 2 は、処理部 1 0 1 がこれらのコンピュータプログラムを実行するときの作業領域として利用される。補助記憶部 1 0 2 は、ネットワークを介して取得された基準値等を一時的に記憶する。

30

## 【 0 0 6 2 】

補助記憶部 1 0 4 は、ハードディスク、フラッシュメモリ等の半導体メモリ素子、光ディスク等によって構成される。補助記憶部 1 0 4 には、オペレーティングシステム及びアプリケーションプログラムなどの、処理部 1 0 1 に実行させるための種々のコンピュータプログラム及びコンピュータプログラムの実行に用いる各種設定データが記憶されている。具体的には、基準値等を不揮発性に記憶する。

40

## 【 0 0 6 3 】

通信 I / F 1 0 5 は、USB、IEEE1394、RS-232Cなどのシリアルインタフェース、SCSI、IDE、IEEE1284などのパラレルインタフェース、及びD / A変換器、A / D変換器などからなるアナログインタフェース、ネットワークインタフェースコントローラ ( Network interface controller: NIC ) 等から構成される。通信 I / F 1 0 5 は、処理部 1 0 1 の制御下で、測定部 3 0 又は他の外部機器からのデータを受信し、必要に応じて装置 1 0 が保存又は生成する情報を、測定部 3 0 又は外部に送信又は表示する。通信 I / F 1 0 5 は、ネットワークを介して測定部 3 0 又は他の外部機器 ( 図示せず、例えば他のコンピュータ、又はクラウドシステム ) と通信を行ってもよい。

## 【 0 0 6 4 】

50

入力I/F106は、例えばUSB、IEEE1394、RS-232Cなどのシリアルインタフェース、SCSI、IDE、IEEE1284などのパラレルインタフェース、及びD/A変換器、A/D変換器などからなるアナログインタフェースなどから構成される。入力I/F106は、入力部111から文字入力、クリック、音声入力等を受け付ける。受け付けた入力内容は、主記憶部102又は補助記憶部104に記憶される。

【0065】

入力部111は、タッチパネル、キーボード、マウス、ペンタブレット、マイク等から構成され、装置10に文字入力又は音声入力を行う。入力部111は、装置10の外部から接続されても、装置10と一体となってもよい。

【0066】

出力I/F107は、例えば入力I/F106と同様のインタフェースから構成される。出力I/F107は、処理部101が生成した情報を出力部112に出力する。出力I/F107は、処理部101が生成し、補助記憶部104に記憶した情報を、出力部112に出力する。

【0067】

出力部112は、例えばディスプレイ、プリンター等で構成され、測定部30から送信される測定結果及び装置10における各種操作ウインドウ、分析結果等を表示する。

【0068】

メディアI/F108は、記憶媒体113に記憶された例えばアプリケーションソフト等を読み出す。読み出されたアプリケーションソフト等は、主記憶部102又は補助記憶部104に記憶される。また、メディアI/F108は、処理部101が生成した情報を記憶媒体113に書き込む。メディアI/F108は、処理部101が生成し、補助記憶部104に記憶した情報を、記憶媒体113に書き込む。

【0069】

記憶媒体113は、フレキシブルディスク、CD-ROM、又はDVD-ROM等で構成される。記憶媒体113は、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、又はDVD-ROMドライブ等によってメディアI/F108と接続される。記憶媒体113には、コンピュータがオペレーションを実行するためのアプリケーションプログラム等が格納されていてもよい。

【0070】

処理部101は、装置10の制御に必要なアプリケーションソフトや各種設定をROM103又は補助記憶部104からの読み出しに代えて、ネットワークを介して取得してもよい。前記アプリケーションプログラムがネットワーク上のサーバコンピュータの補助記憶部に格納されており、このサーバコンピュータに装置10がアクセスして、コンピュータプログラムをダウンロードし、これをROM103又は補助記憶部104に記憶することも可能である。

【0071】

また、ROM103又は補助記憶部104には、例えば米国マイクロソフト社が製造販売するWindows（登録商標）などのグラフィカルユーザインタフェース環境を提供するオペレーションシステムがインストールされている。第2の実施形態に係るアプリケーションプログラムは、前記オペレーティングシステム上で動作するものとする。すなわち、装置10は、パーソナルコンピュータ等であり得る。

【0072】

[ 2 - 2 . 装置の動作 ]

次に、図3から図7を用いて、装置10の動作について説明する。装置10の動作は、後述する被検体のVEGF-Aに関する値を取得するためのステップをコンピュータに実行させるコンピュータプログラムに従って、装置10の処理部101が制御する。VEGF-Aに関する値の取得は、処理部101が、total VEGF-A測定値、及び/又はVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aを値として処理部101、主記憶部102、又は補助記憶部104に取り込む動作であってよい。また、VEGF-Aに関する値の取得は、VEGF-Aに関する値がtotal VEG

10

20

30

40

50

F-A測定値である場合、測定部30によって取得された吸光度等の測定生データ、及び/又は測定値を処理部101、主記憶部102、又は補助記憶部104に取り込む動作であってもよい。VEGF-Aに関する値の取得は、VEGF-Aに関する値がVEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aである場合、測定部30によって取得されたtotal VEGF-A及びVEGF-A<sub>165b</sub>に関する吸光度等の測定生データ、及び/又は測定値を処理部101、主記憶部102、又は補助記憶部104に取り込み、処理部101が、VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aを算出する動作であってもよい。VEGF-Aに関する値の取得は、VEGF-Aに関する値がVEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aである場合、主記憶部102、又は補助記憶部104に記憶されたtotal VEGF-A測定値とVEGF-A<sub>165b</sub>測定値とから、処理部101が、VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aを算出する動作であってもよい。システム50においては、測定値の取得は、測定部30における測定開始であってもよい。

10

## 【0073】

初めに、図3を用いてVEGF-Aに関する値を取得するための装置10の動作の概略を説明する。

## 【0074】

処理部101は、検査者等によって入力部111から入力される、VEGF-Aに関する値を取得するための開始指令に従って、上記1.で述べた方法により取得された前記被検体の血液試料中のVEGF-Aに関する値を取得する(ステップS1)。

## 【0075】

処理部101は、ステップS1で取得された値を主記憶部102又は補助記憶部104に記憶されている対応する基準値と比較する(ステップS2)。

20

## 【0076】

続いて処理部101は、ステップS2の比較結果に基づいて、前記被検体について心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆する(ステップS3)。

## 【0077】

処理部101は、ステップS3に先だって、ステップS3と同時に、又はステップS3の後に、被検体について示唆の結果を補助記憶部104に記憶する、出力部112に出力する、及び/又は前記外部機器に送信することを行ってもよい(図示せず)。

## 【0078】

次に、VEGF-Aに関する値としてtotal VEGF-Aの測定値を用いて、被検体の心筋梗塞の予後を示唆するための装置10の動作を説明する(図4)。

30

## 【0079】

処理部101は、検査者等によって入力部111から入力される、VEGF-Aに関する値を取得するための開始指令に従って、上記1.で述べた方法により取得された前記被検体の血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値を取得する(ステップS11)。

## 【0080】

処理部101は、ステップS11で取得された測定値を主記憶部102又は補助記憶部104に記憶されている対応する基準値と比較する(ステップS12)。

## 【0081】

続いて処理部101は、ステップS12の比較において、被検体のtotal VEGF-Aの測定値が基準値よりも低いかなかを判定し(ステップS13)、total VEGF-Aの測定値が基準値よりも低い場合には、ステップS14に進み前記被検体の心筋梗塞の予後が不良であると示唆する。処理部101は、total VEGF-Aの測定値が基準値よりも高い場合には、ステップS15に進み前記被検体の心筋梗塞の予後が良好であると示唆する。

40

## 【0082】

ステップS14若しくはステップS15に先だって、ステップS14若しくはステップS15と同時に、又はステップS14若しくはステップS15の後に、処理部101は、被検体について示唆の結果を補助記憶部104に記憶する、出力部112に出力する、及び/又は前記外部機器に送信することを行ってもよい(図示せず)。

## 【0083】

50

次に、VEGF-Aに関する値として $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を用いて、被検体の心筋梗塞の予後を示唆するための装置10の動作を説明する(図5)。

【0084】

処理部101は、検査者等によって入力部111から入力される、VEGF-Aに関する値を取得するための開始指令に従って、上記1.で述べた方法により取得された前記被検体の血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値及び $VEGF-A_{165b}$ の測定値を取得する(ステップS21)。

【0085】

処理部101は、ステップS21で取得された $VEGF-A_{165b}$ の測定値をtotal VEGF-Aの測定値で除し、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を求める(ステップS22)。必要に応じて、処理部101は、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を、主記憶部102、及び/又は補助記憶部104に記憶しても良い(図示せず)。

10

【0086】

処理部101は、ステップS22で取得された $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を主記憶部102又は補助記憶部104に記憶されている対応する基準値と比較する(ステップS23)。

【0087】

続いて処理部101は、ステップS23の比較において、被検体の $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ が基準値よりも高いか否かを判定し(ステップS24)、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ が基準値よりも高い場合には、ステップS25に進み前記被検体の心筋梗塞の予後が不良であると示唆する。処理部101は、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ が基準値よりも低い場合には、ステップS26に進み前記被検体の心筋梗塞の予後が良好であると示唆する。

20

【0088】

ステップS25若しくはステップS26に先だつて、ステップS25若しくはステップS26と同時に、又はステップS25若しくはステップS26の後に、処理部101は、被検体について示唆の結果を補助記憶部104に記憶する、出力部112に出力する、及び/又は前記外部機器に送信することを行ってもよい(図示せず)。

【0089】

次に、VEGF-Aに関する値としてtotal VEGF-Aの測定値を用いて、被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆するための装置10の動作を説明する(図6)。

30

【0090】

処理部101は、検査者等によって入力部111から入力される、VEGF-Aに関する値を取得するための開始指令に従って、上記1.で述べた方法により取得された前記被検体の血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値を取得する(ステップS31)。

【0091】

処理部101は、ステップS31で取得された測定値を主記憶部102又は補助記憶部104に記憶されている対応する基準値と比較する(ステップS32)。

【0092】

続いて処理部101は、ステップS32の比較において、被検体のtotal VEGF-Aの測定値が基準値よりも高いか否かを判定し(ステップS33)、total VEGF-Aの測定値が基準値よりも高い場合には、ステップS34に進み前記被検体が冠動脈疾患の重症群に属すると示唆する。処理部101は、total VEGF-Aの測定値が基準値よりも低い場合には、ステップS35に進み前記被検体が冠動脈疾患の非重症群に属すると示唆する。

40

【0093】

ステップS34若しくはステップS35に先だつて、ステップS34若しくはステップS35と同時に、又はステップS34若しくはステップS35の後に、処理部101は、被検体について示唆の結果を補助記憶部104に記憶する、出力部112に出力する、及び/又は前記外部機器に送信することを行ってもよい(図示せず)。

【0094】

50

次に、VEGF-Aに関する値として $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を用いて、被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆するための装置10の動作を説明する(図7)。

【0095】

処理部101は、検査者等によって入力部111から入力される、VEGF-Aに関する値を取得するための開始指令に従って、上記1.で述べた方法により取得された前記被検体の血液試料中のtotal VEGF-Aの測定値及び $VEGF-A_{165b}$ の測定値を取得する(ステップS41)。

【0096】

処理部101は、ステップS41で取得された $VEGF-A_{165b}$ の測定値をtotal VEGF-Aの測定値で除し、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を求める(ステップS42)。必要に応じて、処理部101は、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を、主記憶部102、及び/又は補助記憶部104に記憶しても良い(図示せず)。

10

【0097】

処理部101は、ステップS42で取得された $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ を主記憶部102又は補助記憶部104に記憶されている対応する基準値と比較する(ステップS43)。

【0098】

続いて処理部101は、ステップS43の比較において、被検体の $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ が基準値よりも低いかなかを判定し(ステップS44)、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ が基準値よりも低い場合には、ステップS45に進み前記被検体が冠動脈疾患の重症群に属すると示唆する。処理部101は、 $VEGF-A_{165b} / total\ VEGF-A$ が基準値よりも高い場合には、ステップS46に進み前記被検体が冠動脈疾患の非重症群に属すると示唆する。

20

【0099】

ステップS45若しくはステップS46に先だって、ステップS45若しくはステップS46と同時に、又はステップS45若しくはステップS46の後に、処理部101は、被検体について示唆の結果を補助記憶部104に記憶する、出力部112に出力する、及び/又は前記外部機器に送信することを行ってもよい(図示せず)。

【0100】

[3. プログラム及び前記コンピュータプログラムを記憶した記憶媒体]  
コンピュータプログラムは、コンピュータにVEGF-Aに関する値を取得するステップを実行させる。前記コンピュータプログラムは、コンピュータを被検体のVEGF-Aに関する値を取得する装置10として機能させる。具体的には、コンピュータプログラムは、上記2-1.で述べたステップS1からS3、ステップS11からS15、ステップS21からS26、ステップS31からS35、及びステップS44からS46より選択される少なくとも一つをコンピュータに実行させるプログラムである。プログラムは、請求項1から12に記載の方法を実現させるためにコンピュータを制御するコンピュータプログラムであってよい。

30

【0101】

上記2-1.に記載の各ステップの説明は、ここに援用される。また、装置10、装置10の動作、及びコンピュータプログラムに係る説明において、上記1-1.で説明されている用語と共通する用語については、上記1-1.の説明をここに援用する。

40

【0102】

コンピュータプログラムは、記憶媒体記憶されていてもよい。すなわち、前記コンピュータプログラムは、ハードディスク、フラッシュメモリ等の半導体メモリ素子、光ディスク等の記憶媒体に記憶される。また前記コンピュータプログラムは、クラウドサーバ等のネットワークで接続可能な記憶媒体に記憶されていてもよい。コンピュータプログラムは、ダウンロード形式の、又は記憶媒体に記憶されたプログラム製品であってよい。

【0103】

前記記憶媒体へのプログラムの記憶形式は、前記提示装置が前記プログラムを読み取り可

50

能である限り制限されない。前記記憶媒体への記憶は、不揮発性であることが好ましい。

【0104】

[4. 検査試薬及びキット]

検査試薬は、抗total VEGF-A抗体、又は抗VEGF-A<sub>165b</sub>抗体を含む。前記抗体は、例えばビオチン等で標識されていてもよい。図8に、前記検査試薬を収容した容器151の概略図を示す。容器151には、前記抗体が乾燥品、又は緩衝液（例えばPBS）などの溶媒に溶解された状態で、検査試薬として収容される。

【0105】

キットは、少なくとも前記検査試薬を含む。図9に、キット150の概略図を示す。

【0106】

キット150は、検査試薬を含む容器151と、検出用に標識された抗total VEGF-A抗体、又は抗VEGF-A<sub>165b</sub>抗体を収容する容器152と、必要に応じて検出用試薬（発光基質等）を収容した容器153を含む。試薬キット150には取扱説明書あるいは取扱説明書を閲覧できるURLを記載した用紙154が含まれてもよい。さらに、試薬キット150には、これらの容器を納めた箱155が含まれていてもよい。また、図示しないが、キットは、標的タンパク質と捕捉用抗標的タンパク質抗体を固定化するための固相を含んでいてもよい。

【0107】

検査試薬及びキットは、被検体の心筋梗塞の予後又は前記被検体の冠動脈疾患の重症度を示唆する目的で、上記1.で説明したVEGF-Aに関する測定値を取得するために使用される。

【0108】

以上、装置10、装置10の動作、コンピュータプログラム、検査試薬、及びキットにすいて、添付の図面を参照して詳細に説明したが、本発明は、上記に説明する具体的な実施形態に限定されるものではない。本発明の実施形態は、本明細書の記載と当業者の技術常識に基づいて変形しうる。

【実施例】

【0109】

以下に実施例を示して本発明についてより詳細に説明するが、本発明は、実施例に限定して解釈されるものではない。

【0110】

血液試料中のtotal VEGF-A濃度、及びVEGF-A<sub>165b</sub>濃度の測定は、名古屋大学医学系研究科倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言の倫理原則にしたがって行った。

【0111】

I. 実施例1：心筋梗塞発症後の血液試料中のVEGF-Aに関する測定値の取得

1. 測定対象者

2015年7月から2017年2月まで、名古屋大学医学部附属病院で症状発症から24時間以内に経皮的冠動脈形成術（percutaneous coronary intervention：PCI）を受けた66人のAMI患者について評価した。血液透析を受けた患者（n = 4）、前年に外科的治療又は化学療法が必要とされる活動性悪性腫瘍を有する患者（n = 5）、及びコラーゲン病（n = 2）を有する患者を除外した。これらの疾患は、total VEGF-A濃度、及びVEGF-A<sub>165b</sub>濃度に影響を及ぼす可能性があるためである。最終的にAMI発症後入院から3日目、及び30日目に血液試料を採取でき、total VEGF-A濃度、及びVEGF-A<sub>165b</sub>濃度を測定できた患者は、23名であった。23名の患者の内訳、及びその臨床データを表1-1、及び表1-2に示す。

【0112】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

Variables	MACCE			p value
	All (n=23)	No (n=14)	Yes (n=9)	
Age (years)	67.0 ± 10.8	64.3 ± 11.3	71.2 ± 9.0	0.14
Male, n (%)	17 (73.9)	11 (78.5)	6 (66.7)	0.44
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.9 ± 2.9	23.2 ± 3.0	22.4 ± 3.0	0.54
Current smoking, n (%)	7 (30.4)	4 (28.6)	3 (33.3)	0.58
Hypertension, n (%)	10 (43.5)	6 (42.9)	4 (44.4)	0.64
Diabetes mellitus, n (%)	7 (30.4)	5 (35.7)	2 (22.2)	0.42
Dyslipidemia, n (%)	16 (69.6)	10 (71.4)	6 (66.7)	0.58
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	60.9 (57.0–71.8)	62.1 (58.8–74.1)	59.5 (54.2–68.4)	0.40
LDL cholesterol (mg/dL)	133.3 ± 28.7	136.5 ± 29.6	128.3 ± 28.1	0.52
HDL cholesterol (mg/dL)	50.1 ± 11.4	49.0 ± 10.2	51.9 ± 13.4	0.56
Triglycerides (mg/dL)	182.4 ± 102.7	187.3 ± 93.2	174.8 ± 121.5	0.78
Hemoglobin A1c (%)	5.8 (5.7–6.8)	5.9 (5.8–6.9)	5.8 (5.6–6.6)	0.64
C-reactive protein (mg/L)	1.0 (0.7–2.5)	1.0 (0.7–4.8)	0.8 (0.7–3.0)	0.56
Peak creatine kinase (IU/L)	2443 (1639–4694)	2874 (1874–5148)	2443 (1479–4491)	0.56
Creatine kinase (AUC) (IU/L × h)	43142 (29788–88934)	51164 (31922–92034)	40748 (18932–78411)	0.69
Peripheral artery disease, n (%)	2 (8.7)	1 (7.1)	1 (11.1)	0.66
Duration of hospital stay (days)	12 (8–16)	12 (9–17)	11 (8–20)	0.98
Time to reperfusion (min)	90.9 ± 31.9	85.6 ± 24.9	98.4 ± 40.4	0.37
Culprit lesion (LAD(%), LCX(%), RCA(%))	56.5, 13.0, 30.4	21.4, 57.1, 21.4	44.4, 55.6, 0	0.10
Multivessel disease, n (%)	7 (30.4)	5 (35.7)	2 (22.2)	0.42
Killip class (I(%), II(%), III(%), IV(%))	69.6, 4.3, 8.7, 17.4	78.6, 0, 0, 21.4	55.6, 11.1, 22.2, 11.1	0.40

【 0 1 1 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

Variables	MACCE			p value
	All (n=23)	No (n=14)	Yes (n=9)	
TIMI flow grade before PCI (0(%), 1(%), 2(%), 3(%))	73.9, 4.3, 13, 8.7	57.1, 7.1, 21.4, 14.2	100, 0, 0, 0	0.030
TIMI flow grade after PCI (0(%), 1(%), 2(%), 3(%))	0, 4.3, 4.3, 91.3	0, 0, 7.1, 92.9	0, 11.1, 0, 88.9	0.39
LVEF after PCI (%)	53.3 ± 10.9	55.6 ± 8.3	49.7 ± 13.8	0.21
Medication on admission				
Antiplatelet agents, n (%)	2 (8.7)	1 (7.1)	1 (11.1)	0.64
ACE-I or ARB, n (%)	8 (34.8)	6 (42.9)	2 (22.2)	0.29
Beta-blocker, n (%)	2 (8.7)	1 (7.1)	1 (11.1)	0.64
Calcium channel blocker, n (%)	5 (21.7)	3 (21.4)	2 (22.2)	0.67
Statin, n (%)	5 (21.7)	4 (28.6)	1 (11.1)	0.33
Medication at discharge				
Antiplatelet agents, n (%)	23 (100)	14 (100)	9 (100)	
ACE-I or ARB, n (%)	21 (91.3)	13 (92.9)	8 (88.9)	0.64
Beta-blocker, n (%)	14 (60.9)	10 (71.4)	4 (44.4)	0.20
Calcium channel blocker, n (%)	3 (13.0)	2 (14.3)	1 (11.1)	0.67
Statin, n (%)	22 (95.7)	13 (92.9)	9 (100)	0.61

## 【0114】

表 1 - 1 及び表 1 - 2 においてデータは、平均値 ± SD 若しくは中央値（四分位範囲）、又は数（パーセンテージ）を示す。表 1 - 1 及び表 1 - 2 において MACCE は、主要な有害な心臓及び脳血管イベント（major adverse cardiac and cerebrovascular events）を意味する。表 1 - 1 又は表 1 - 2 において略語は、eGFR：推定糸球体濾過率；LDL：低比重リポタンパク質；HDL：低比重リポタンパク質；AUC：濃度対時間曲線下面積；LAD：左前下行枝動脈；LCX：左回旋冠動脈；RCA：右冠動脈；Culprit lesion：責任病変；TIMI：心筋梗塞における血栓溶解；LVEF：左心室駆出率；PCI：経皮的冠動脈インターベンション；ACE-I：アンギオテンシン変換酵素阻害剤；ARB：アンギオテンシン受容体遮断薬を意味する。

## 【0115】

## 2. 臨床的定義及びエンドポイント

AMI は、the third universal definition of myocardial infarction（Circulation 2012；126：2020-2035）に従って診断した。プライマリ エンドポイントは、心血管死、再発性非致死性心筋梗塞（MI）、冠動脈血行再建術の再適用及びAMI後の脳梗塞の複合とした。心血管死は、発症後24時間以内の心血管系の原因による死亡と定義した。再発性非致死性MIは、the third universal definition of myocardial infarctionの基準を用いて診断した。冠動脈血行再建術は、ステント内再狭窄又は非責任病変における狭窄進行に伴うPCI又は冠動脈バイパス移植（CABG）と定義した。定量的冠動脈造影（QCA）を用いて、非責任病変は、プライマリPCI（最初の心筋梗塞発症時のPCI）時にQCAで狭窄直径（DS）が50%以下であった病変と定義した。進行（progression）は、最初の心筋梗塞後に後日新たに非責任病変に狭窄病変が進行したことを意味し、DSが50%を超えるも

のと定義した。心臓血管測定システム（QCA-CMSバージョン7.2、MEDIS、Leiden、オランダ）を用いてQCAを行った。脳梗塞は、磁気共鳴イメージング上で、新たに発症した神経学的欠損と定義した。MACCEに関する情報は、病院の医療記録から、又は患者若しくはその家族との電話インタビューによって収集した。MACCEの内訳は、表2に示す。高血圧は、ベースライン血圧 140 / 90 mmHg、及び / 又は降圧薬を使用している場合と定義した。脂質異常症は、トリグリセリド 150 mg / dL、低比重リポタンパク質コレステロール 140 mg / dL、高比重リポタンパク質コレステロール 40 mg / dL、及び / 又は抗高脂血症薬を使用している定義した。糖尿病は、空腹時血漿グルコース濃度 126 mg / dL、グリコシル化ヘモグロビン濃度 6.5%（National Glycohemoglobin Standardization Program）、及び / 又は抗糖尿病薬を使用していると定義した。現在の喫煙は、能動喫煙を申告した者と定義した。末梢動脈疾患（PAD）は、足首上腕指数 0.9、PADの跛行、及び / 又は以前に血行再建術を受けていることと定義した。

10

【 0 1 1 6 】

【表 2】

Major adverse cardiac and cerebrovascular events (MACCE)	
心血管死, n (%)	0 (0)
再発性非致死性心筋梗塞, n (%)	1 (4.3)
冠動脈血行再建術の再適用, n (%)	7 (30.4)
脳梗塞, n (%)	1 (4.3)

20

【 0 1 1 7 】

3 . VEGF-Aに関する測定値の取得

AMI発症後3日目、及び30日目に血液試料を採取し、血清を分離し、測定まで - 80 で保存した。血清VEGF-A濃度は、enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）キット（ヒトVEGF Quantikine ELISAキット、DVE00、R&D）を用いて、キットに添付のプロトコールに従って測定した。検出限界は9 pg / mLであった。また、アッセイ内、及びアッセイ間の変動係数はそれぞれ4.5%及び7.0%であった）。血清VEGF-A<sub>165b</sub>濃度は、ELISAキット（ヒト血管内皮増殖因子-165b ELISAキット、MBS720132、MyBiosource）を用いて、キットに添付のプロトコールに従って測定した。検出限界は1 pg / mLであった。また、アッセイ内、及びアッセイ間の変動係数はそれぞれ 10%及び 10%であった。

30

【 0 1 1 8 】

4 . 統計解析

連続値のデータは、正規分布変数の平均 ± 標準偏差又は非正規分布データの中央値（四分位範囲; IQR）として示した。カテゴリ変数は数値（パーセンテージ）として表した。スチューデントのt検定を用いて正規分布の連続値の差を評価し、マンホイットニーのU検定を用いて非正規分布値を評価した。カテゴリカル変数の差は、Kruskal-Wallis検定又はカイ2乗検定を用いて評価した。Kaplan-Meier分析を行って、MACCEの累積発生率を評価し、ログ-ランク検定を用いて比較を評価した。MACCEのカットオフ値は、受信機動作特性曲線（ROC）解析を用いて算出した。個々の患者に対して複数のイベントが発生した場合、最初のイベントの日のみについてKaplan-Meier分析を行った。p値 0.05を統計的に有意であるとした。全ての統計分析は、SPSSバージョン23（SPSS、Inc.、Chicago、IL、USA）を用いて行った。

40

【 0 1 1 9 】

5 . 結果

血液試料中のtotal VEGF-A濃度、VEGF-A<sub>165b</sub>濃度及びVEGF-A<sub>165b</sub>とtotal VEGF-Aの比（VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A）をMACCEの有無で比較した結果を図10に示す。

50

図10Aはtotal VEGF-A濃度、図10BはVEGF-A<sub>165b</sub>濃度、及び図10CはVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aを示す。上段はAMI発症後3日目のデータを示し、下段はAMI発症後30日目のデータを示す。

【0120】

total VEGF-A濃度は、AMI発症後3日目、及び30日目においてMACCEを認めなかった患者よりもMACCEが認められた患者において高値を示した。特に30日目ではその差が顕著であった（中央値：153.6、IQR：[130.6-371.4]対301.9 [242.5-384.1] pg / mL、 $p = 0.028$ ）。

【0121】

一方、VEGF-A<sub>165b</sub>濃度は、AMI発症後3日目、及び30日目においてMACCEの有無で差は認められなかった。

10

【0122】

VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aは、AMI発症後3日目、及び30日目においてMACCEを認めなかった患者よりもMACCEが認められた患者において高値を示した（それぞれ、0.70 [0.34-0.93] vs. 0.25 [0.21-0.62],  $p=0.039$ ; 0.65 [0.42-0.95] vs. 0.36 [0.23-0.52],  $p=0.023$ ）。

【0123】

AMI発症後30日後のtotal VEGF-A濃度、及びVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aの値に基づいて、MACCEの発生の有無を予測するためにカットオフ値を暫定的に求めた。カットオフ値は、ROC曲線からtotal VEGF-Aについて233.1 pg / mL (area under the ROC curve [AURC]=0.78,  $p=0.033$ )、VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aについて0.57 (AURC=0.79,  $p=0.015$ )とした。カットオフ値よりも各値が高い群をHigh群、カットオフ値よりも各値が高い群をLow群としてMACCEの累積発生率のグラフを作成した（図11A及びB）。Low群とHigh群の間の有意差は、Kaplan-Meier分析により求めた。

20

【0124】

total VEGF-A Low群におけるMACCEの発生率は92%であったのに対して、total VEGF-A High群におけるMACCEの発生率は22%であり、ログ - ランク検定において $p=0.011$ となり、有意差を認めた。また、VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A High群におけるMACCEの発生率は87%であったのに対して、VEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-A Low群におけるMACCEの発生率は25%であり、ログ - ランク検定において $p=0.0058$ となり、有意差を認めた。

30

【0125】

このことから、total VEGF-A濃度、及びVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aは、AMIの予後の予測に有用なマーカーであると考えられた。

【0126】

II. 実施例2：冠動脈疾患患者の血液試料中のVEGF-Aに関する測定値の取得

1. 測定対象者

名古屋大学病院で2015年2月から2016年6月まで、安定狭心症（AP）又は急性冠動脈症候群（ACS）のために経皮的冠動脈インターベンション（PCI）を受けた患者268人について評価した。これらの患者には、安定狭心症のためにPCIを受けた73人が含まれていた。除外基準には以下の通りとした：（i）血液透析（HD）治療を受けている患者；（ii）活動性の悪性腫瘍を有するか、又は1年未満以内に悪性腫瘍の手術、又は化学療法を受けた患者；（iii）虚血性心疾患のためにPCI又は冠動脈バイパス移植を受けた人；（iv）膠原病を有する者。観察者と心臓外科医は、全ての患者に対して、検討が適切であり、患者の要望と最も一致しているかを確認した。control群として、悪性腫瘍がなく、臨床症状又は心電図異常のために冠動脈造影を受けたが、SSは0であった32人の患者を選択した。control群は、正常な左心室機能を有し、かつ心臓手術又は透析を受けていない患者である。control群には、悪性腫瘍を有する患者は含めないこととした。患者は評価の前に全ての患者から文書による同意を得た。

40

【0127】

患者の内訳、その臨床データを表3 - 1及び表3 - 2に示す。

50

【 0 1 2 8 】

【 表 3 - 1 】

Variable	Control			PCI	P Value	PCI subjects (n=73)			P Value
	Number of subjects	Men (%)	Age (years)			Low SS	High SS		
Number of subjects	32	18 (56.3)	70.4 ± 9.8	73	-	63	10	-	
Men (%)			23.7 ± 4.1	57 (78.1)	0.03	48 (76.2)	9 (90.0)	0.44	
Age (years)			29 (90.6)	69.9 ± 9.3	0.77	69.0 ± 9.2	75.4 ± 8.2	0.04	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )			2 (6.3)	24.5 ± 3.4	0.34	24.6 ± 3.5	23.7 ± 3.5	0.48	
HT (%)			12 (37.5)	48 (65.8)	< 0.01	43 (68.3)	5 (50.0)	0.30	
DM (%)			13 (40.6)	32 (43.8)	0.67	28 (44.4)	4 (40.0)	0.79	
Current / Ex smoker (%)			2 (6.3)	43 (58.9)	0.09	37 (58.7)	6 (60.0)	0.94	
PAD (%)			65.8 ± 22.4	7 (9.6)	0.72	7 (11.1)	0 (0)	0.58	
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )			104.2 ± 29.0	67.1 ± 21.1	0.77	67.5 ± 21.0	64.4 ± 22.6	0.67	
LDL (mg/dl)			48.6 ± 10.8	100.8 ± 34.0	0.64	101.5 ± 36.3	96.3 ± 13.0	0.43	
HDL (mg/dl)			108.0 (81.3 – 153.5)	46.8 ± 10.4	0.43	47.3 ± 9.9	43.2 ± 13.4	0.28	
TG (mg/dl)				117.5 (79.8 – 170.3)	0.68	119.5 (83.0 – 169.5)	103.5 (69.0 – 185.8)	0.49	

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

Variable	Control	PCI	P Value	PCI subjects (n=73)		
				Low SS	High SS	P Value
Number of subjects	32	73	-	63	10	-
HbA1c (%)	6.4 ± 1.1	6.3 ± 0.8	0.59	6.3 ± 0.8	6.1 ± 0.7	0.46
Plt (×10 <sup>3</sup> /μl)	211 ± 55.9	225 ± 92.6	0.43	229 ± 9.8	200 ± 4.8	0.37
CRP (mg/dl)	0.10 (0.04 - 0.19)	0.14 (0.09 - 0.35)	< 0.05	0.14 (0.10 - 0.30)	0.24 (0.08 - 1.26)	0.70
Neutrophils (cells/μl)	3894 ± 1332.9	3858 ± 1793.3	0.92	3854 ± 1828.7	3880 ± 1639.7	0.97
Lymphocytes (cells/μl)	1534 ± 472.2	1751 ± 749.8	0.14	1748 ± 707.0	1770 ± 1026.4	0.93
LVEF (%)	67.0 ± 7.3	62.7 ± 11.0	0.06	64.2 ± 10.2	56.6 ± 13.4	< 0.05
LV mass index (g/m <sup>2</sup> )	123.7 ± 33.5	116.1 ± 35.4	0.33	111.3 ± 33.2	143.7 ± 36.7	< 0.01

## 【 0 1 3 0 】

表 3 - 1 及び表 3 - 2 において、値は平均 ± SD、中央値（四分位範囲）又は数（%）を示す。表 3 - 1 又は表 3 - 2 において略語は、PCI：経皮的冠動脈インターベンション、BMI：体格指数、HT：高血圧、DM：糖尿病、PAD：末梢動脈疾患、eGFR：推定糸球体濾過率、LDL：低比重リポタンパク質、HDL：高比重リポタンパク質、TG：トリグリセリド、HbA1c：ヘモグロビンA1c、Plt：血小板、CRP：C-反応性タンパク質、LVEF：左心室駆出率。

## 【 0 1 3 1 】

## 2. 血液試料の収集

10

20

30

40

50

12時間の一晩絶食後、及びヘパリン注射前のPCIの日に、全ての患者から血液献体を採取した。

【0132】

3. VEGF-Aに関する測定値の取得  
実施例1に準じて行った。

【0133】

4. 血管造影解析

冠動脈病変の複雑性はSYNTAXスコア (EuroInterv.2005;1:219-227) を用いて定量化した。ベースライン診断血管造影画像に従って1.5mm以上の血管に50%以上の直径の狭窄を生じさせる冠動脈病変を個々にスコア化し、次いで合計してSYNTAXスコアアルゴリズムを用いて算出した全体SYNTAXスコア (SS) を得た。冠動脈造影画像は、患者の身元と臨床情報を知らされていない2人の経験豊富な術者によって解析した。SYNTAX試験と共に、PCIを受けた被験者をLow SS群 (SS 22) とHigh SS群 (SS 22) の2つのグループに分けた。High SS群には、22 SS 33の冠動脈疾患の重症度が中程度の者と、SS 33の冠動脈疾患の重症度が高度な者が含まれる。

【0134】

5. 実施例2で使用される用語の説明

高血圧は、140mmHg以上の収縮期血圧、又は90mmHg以上の拡張期血圧、及び/又は降圧薬を使用していると定義した。血圧は、座位で少なくとも10分間休んでから、適切なアームカフと水銀柱血圧計を用いて血圧を測定した。糖尿病は、糖尿病であると現在診断されていること、空腹時血漿グルコース濃度  $126 \text{ mg/dL}$  又はグリコシル化ヘモグロビン (HbA1c) 濃度  $6.5\%$  (National Glycohemoglobin Standardization Program)、及び/又はいずれかの抗糖尿病薬を使用していることと定義した。eGFRは次の式に従って計算した (女性の場合) :  $eGFR (\text{mL/min/1.73 m}^2) = 194 \times \text{血清クレアチニン}^{-1.094} \times \text{年齢}^{-0.287} \times 0.739$ 。末梢動脈疾患 (PAD) は、足首上腕指数 (ABI)  $0.9$ 、跛行、及び/又は以前に血行再建術を受けていることと定義した。全ての心エコーパラメータは、米国心エコー検査学会の勧告に従って測定した。心エコー画像は、胸骨 (長軸及び短軸) 及び尖端のビューで得た。心エコーでは、以下のパラメータを評価した: 左心室拡張末期径 (LVEDD; mm); 左室収縮末期径 (LVESD; mm); 拡張末期の心室中隔直径 (IVSd; mm); 心拡張末期の左心室後壁径 (PWd; mm); 及びLV質量 (g)。LV質量は、体表面積 (LV質量指数;  $\text{g/m}^2$ ) に基づいて指標化した。左心室駆出率 (LVEF; %) は、バイプレーンシンプソンの方法及び先端4室及び2室のビューに基づいて計算した。

【0135】

6. 統計解析

実施例1に記載の方法に基づいて行った。

【0136】

7. 結果

図12に血液試料中のtotal VEGF-A濃度 (図12A)、及びVEGF-A<sub>165b</sub>とtotal VEGF-Aの比 (VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-A) (図12B) を示す。total VEGF-A濃度については、control群と比較してLow SS群の方が測定値の平均値がやや高い傾向を示し、High SS群は、control群、及びLow SS群と比較して、測定値の平均値が非常に高い値を示した (control群  $194.4 \text{ pg/ml}$ ; Low SS群  $243.4 \text{ pg/ml}$ ; High SS群  $377.9 \text{ pg/ml}$ ; control群 vs. Low SS群は  $p=0.044$ ; control群 vs. High SS群は  $p=0.005$ ; Low SS群 vs. High SS群は  $p=0.018$ )。

【0137】

また、VEGF-A<sub>165b</sub>/total VEGF-Aについては、control群と比較してLow SS群の方が平均値がやや低い傾向を示し、High SS群は、control群、及びLow SS群と比較して、平均値が低い値を示した (control群  $48.2\%$ ; Low SS群  $43.5\%$ ; High SS群  $18.2\%$ ; High SS群 vs. Low SS群は  $p=0.004$ ; High SS群 vs. control群は  $p=0.006$ )。

【0138】

10

20

30

40

50

以上の結果から、total VEGF-A濃度及びVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-Aは、冠動脈病変の重症度の指標となることが明らかとなった。また、total VEGF-A濃度及びVEGF-A<sub>165b</sub> / total VEGF-AはSYNTAXスコアを反映するマーカーとして使用できると考えられた。

【符号の説明】

【 0 1 3 9 】

1 0 装置

1 0 1 処理部

10

20

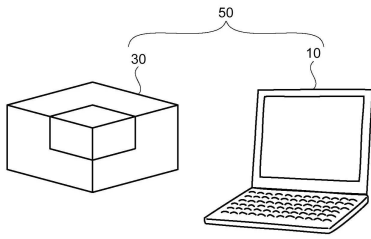
30

40

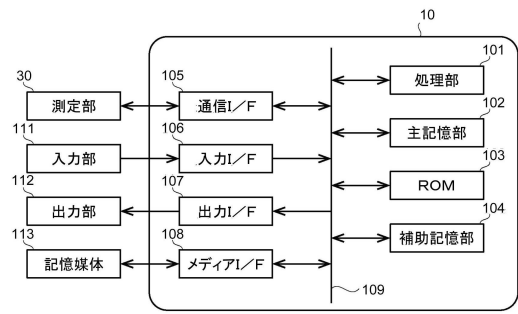
50

【図面】

【図 1】

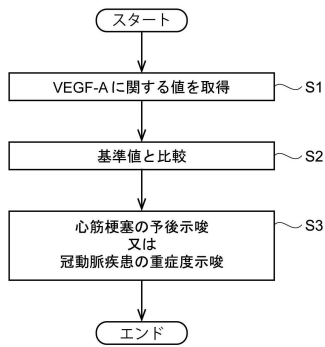


【図 2】

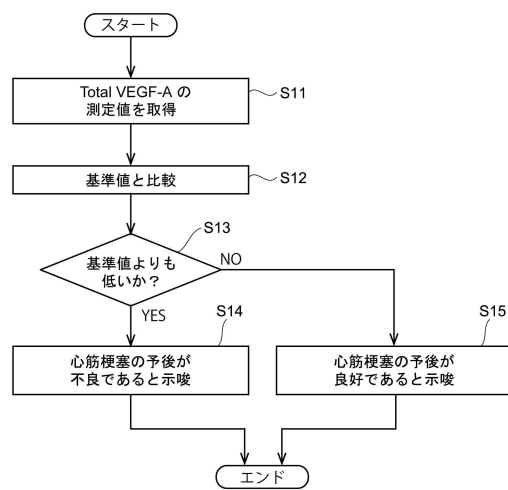


10

【図 3】



【図 4】



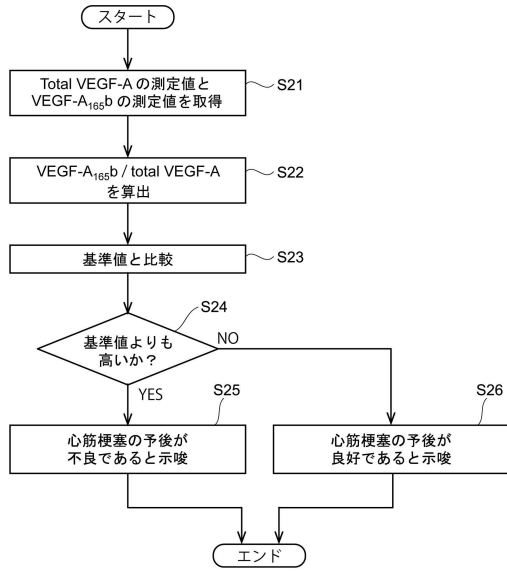
20

30

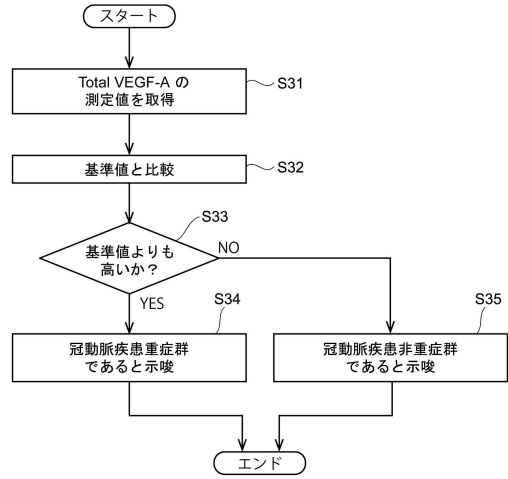
40

50

【 図 5 】

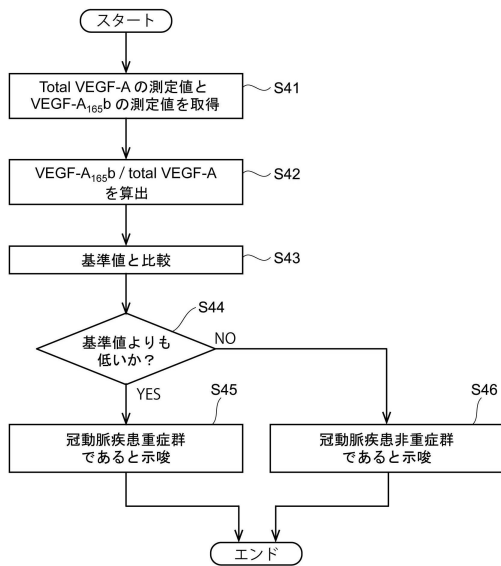


【 図 6 】



10

【 図 7 】



【 図 8 】



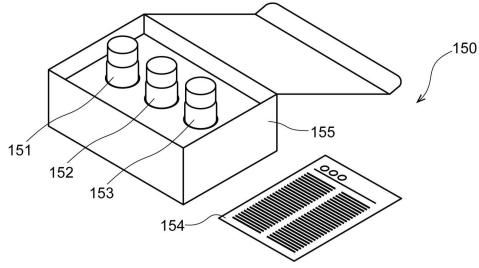
20

30

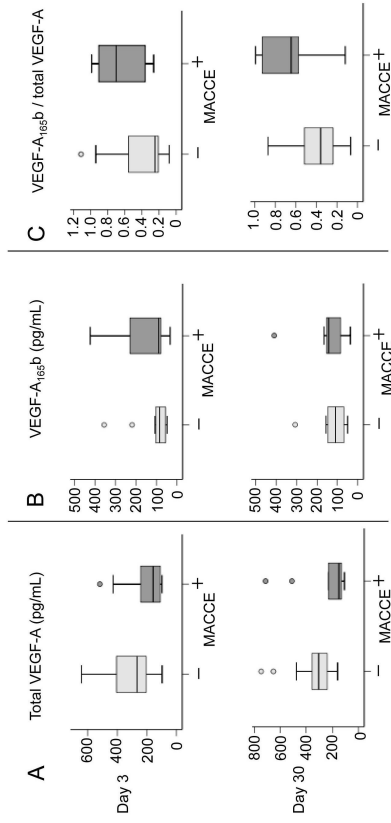
40

50

【 9 】



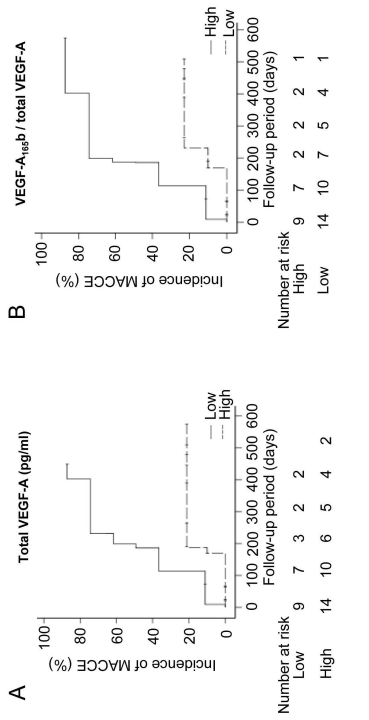
【 10 】



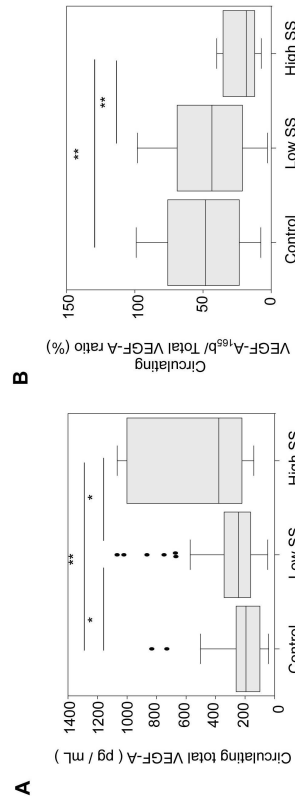
10

20

【 11 】



【 12 】



30

40

50

## フロントページの続き

- (72)発明者 柴田 陽平  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 石井 秀樹  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内
- (72)発明者 室原 豊明  
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内
- 審査官 三木 隆
- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 5 5 5 2 0 ( U S , A 1 )  
特表 2 0 1 4 - 5 2 0 5 2 3 ( J P , A )  
特表 2 0 1 4 - 5 0 5 2 5 9 ( J P , A )  
Anwar Siddiqui , Depressed expression of angiogenic growth factors in the subacute phase of myocardial ischemia: a mechanism behind the remodeling plateau? , Coronary Artery Disease , 2010年01月01日 , Vol.21 No.2 , Page.65-71
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
G 0 1 N 3 3 / 5 3  
C 0 7 K 1 4 / 5 1 5  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )