



(10) 申请公布号 CN 117813505 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 02

(21) 申请号 202280038994.9

(22) 申请日 2022.05.31

(30) 优先权数据

2021-091606 2021.05.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/022076 2022.05.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/255348 JA 2022.12.08

(71) 申请人 普和希株式会社

地址 日本爱媛县

(72) 发明人 和田英夫 川村雅英

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

专利代理师 李琴 谢顺星

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

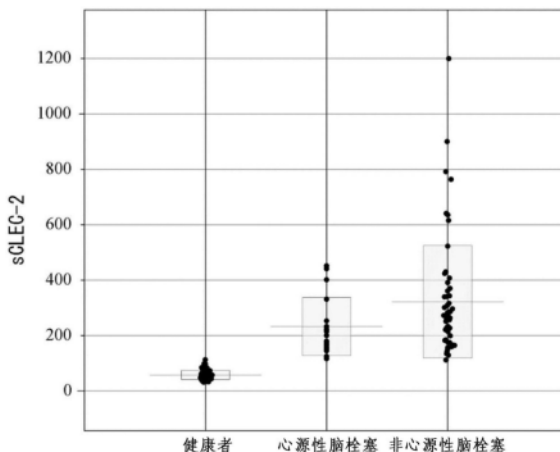
权利要求书2页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

使用了可溶型CLEC2的急性脑血管病的风险评价方法

(57) 摘要

本发明针对TIA的诊断提供一种能够增强临床表现问诊的简便、迅速且客观的基于血液检查的风险评价方法,并且针对TIA这类急性脑血管病的心源性、非心源性的鉴别诊断,提供一种能够增强图像、心电图、以往的血液检查的简便、迅速且客观的基于血液检查的风险评价方法。测定存在于取自患者的血液中的可溶型CLEC2浓度。



1. 一种急性脑血管病的风险评价方法,其包括:测定存在于取自疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的血液中的可溶型CLEC2浓度的工序。

2. 根据权利要求1所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的风险评价方法,其包括:

(1) 提供来自所述患者的血液试样的工序;

(2) 确定所述试样中的可溶型CLEC2浓度的工序;及

(3) 使所述可溶型CLEC2浓度与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序。

3. 根据权利要求2所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的风险评价方法,其中,使所述可溶型CLEC2浓度与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序包括:根据所述可溶型CLEC2浓度的变化,评价所述患者是否具有风险。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其中,所述急性脑血管病为一过性脑缺血发作,在使可溶型CLEC2浓度与一过性脑缺血发作相关联的工序中,所述可溶型sCLEC2浓度的临界值为66 ~ 148pg/mL。

5. 根据权利要求1所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的风险评价方法,其包括:

(1) 提供来自所述患者的血液试样的工序;

(2) 确定所述试样中的可溶型CLEC2浓度的工序;

(3) 测定所述试样中的血小板数的工序;

(4) 用所述可溶型CLEC-2浓度除以血小板数的工序;及

(5) 使用数所述可溶型CLEC2浓度除以血小板所得到的值与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序。

6. 根据权利要求5所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其中,所述急性脑血管病为一过性脑缺血发作,在使用可溶型CLEC2浓度除以血小板数所得到的值与一过性脑缺血发作相关联的工序中,所述用可溶型sCLEC2浓度除以血小板数所得到的值的临界值为0.55 ~ 0.7。

7. 根据权利要求1 ~ 4中任一项所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,该方法中,提供判定所述急性脑血管病为心源性还是非心源性的材料。

8. 根据权利要求1所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其包括:

(1) 提供来自所述患者的血液试样的工序;

(2) 确定所述试样中的可溶型CLEC2浓度的工序;

(3) 测定所述试样中的血小板数的工序;

(4) 用所述可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物的工序;及

(5) 使用所述可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物所得到的值与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法, 其中, 所述凝血纤溶标志物为D-二聚体。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的方法, 其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法, 其中, 来自所述患者的试样通过在发生急性脑血管病的症状后48小时之内自所述患者采集而提供。

11. 根据权利要求1~10中任一项所述的方法, 其中, 确定可溶型CLEC2浓度的工序为高灵敏度免疫检测法, 例如为化学发光免疫检测法、电化学发光免疫检测法、荧光免疫检测法。

使用了可溶型CLEC2的急性脑血管病的风险评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用了可溶型CLEC2的急性脑血管病的风险评价方法。

背景技术

[0002] 脑卒中为包括因脑血管堵塞而发病的缺血性脑卒中,即脑栓塞,与因脑血管破裂而发病的出血性脑卒中,即脑出血和蛛网膜下腔出血的疾病群,其在世界中作为死亡原因占据第二位,仅次于缺血性心脏病。脑卒中不仅大多数会导致死亡,并且即便在保住性命之后大多仍会残留重度的后遗症,很大程度上会导致需要进行看护,使患者负担或社会负担变大,因此,需要一种能够预防、早期诊断、诊断后迅速进行应对的能够通过更多的医疗相关人员进行护理及风险管理的体制。

[0003] 对于缺血性脑卒中,脑栓塞由于脑内的血管狭窄、或在其他位置形成的血栓堵塞脑血管而变得无法向脑供给氧气或营养,而导致发病,结果使得脑神经细胞坏死,产生各种各样的障碍。

[0004] 作为导致脑栓塞的原因的血栓大致分为:心脏处形成的血栓移动至血管中并堵塞脑动脉的心源性脑栓塞;与于心脏之外的位置形成的血栓所导致的非心源性脑栓塞。在心源性脑栓塞的情况下,血栓的主体为纤维蛋白,在治疗、二次预防中使用抑制形成纤维蛋白的抗凝药物(华法林或DOAC)。另一方面,在非心源性的脑栓塞的情况下,血栓的主体为血小板,在治疗、二次预防中使用抑制血小板活化的抗血小板药(阿司匹林、氯吡格雷等)。即,心源性脑缺血脑卒中与非心源性脑卒中的治疗明显不同,因此正确地诊断其为心源性还是非心源性是非常重要的。

[0005] 关于心源性脑栓塞,心房中的因血流瘀滞等而形成的血栓因心房颤动而随着血流到达脑并引起栓塞,会形成较大的栓塞。通过利用MRI图像观察到较大的栓塞、或者心房颤动或心律不齐、心脏病等既往症等信息对其进行诊断。另一方面,非心源性脑栓塞大致分为动脉粥样硬化性与腔隙性等。由于动脉粥样硬化性脑栓塞堵塞较大的动脉,而腔隙性脑栓塞堵塞较细的血管,根据通过MRI图像获得的栓塞大小、动脉硬化的状态、通过血液检查获得的代谢异常等信息进行诊断。

[0006] 心房颤动通过心电图进行检测,但心房颤动有持续性心房颤动和突发性心房颤动,在突发性心房颤动的情况下是难以简单地显现的。并且,很多情况下无法明确区分动脉粥样硬化性脑栓塞与心源性脑栓塞的图像。

[0007] 另一方面,作为呈现出类似脑栓塞的症状的疾病,已知有一过性脑缺血发作(transient ischemic attack:TIA)。TIA与脑栓塞相同,血管狭窄或者血管被血栓堵塞,但该现象为一过性,TIA是指一过性地产生与脑栓塞相同的症状的状态。

[0008] 过去认为TIA的脑缺血症状会在24小时之内消失。但在现在,随着图像检查技术的进步,即使症状消失但仍能够通过图像发现脑栓塞的情况增加,因此,在2009年的美国心脏协会、脑卒中协会(AHA/ASA)的论文中定义如下:“TIA是指,因脑、脊髓或视网膜的局部缺血造成的暂时性神经学功能障碍,且不伴随急性栓塞”,与症状的持续时间无关,将TIA区分成

不同于栓塞的病症。即,将即使症状消失但仍能够通过图像观察到栓塞的情况定义为脑栓塞,TIA则被定义为症状消失且图像中也未确认到脑栓塞的病症。在WHO(世界卫生组织)的国际疾病分类(ICD-11,2018年)中,TIA被定义为不能具有栓塞病灶,且通过图像进行判断的观点为世界性共识。

[0009] 在日本,其于2019年被日本脑卒中学会定义为“为由于局部脑或视网膜的缺血造成的神经功能障碍的一过性的发作期(episode),且未观察到急性栓塞。神经功能障碍的发作期最长也会在24小时之内消失”。此外,TIA虽然为脑血管病(cerebrovascular diseases)中的一型,但由于其被定义为不呈现脑栓塞病灶的疾病,明确不包含在由脑栓塞、脑出血、蛛网膜下腔出血这三种疾病组成的脑卒中(stroke)内。

[0010] 如上所述,TIA被明确地区分为不同于脑栓塞的疾病。即使在症状消失的状态下,TIA的诊断仍极其重要。这是由于TIA患者往往会在较早的时期发生脑栓塞。多个临床研究结果报告了,在发生了TIA的病例中,有10~15%会在3个月之内发生脑栓塞,且其一半会在48小时之内发病,明确了相较于以往的经验,往往会在更早的时期发生脑栓塞。基于这些数据,在日本脑卒中学会于2009年发行的“脑卒中治疗指南”中,推荐“在怀疑为TIA时立即开始预防性治疗”。即,可以说TIA为作为重度疾病的脑栓塞的预兆、前兆。

[0011] 如上所述,对于TIA的诊断而言,有无病灶是必需要诊断的,而自TIA发病起至实施基于MRI弥散加权成像(diffusion weighted image:DWI)的图像检查前的时间越长,则DWI阳性率越高(在6小时之内为17%,在24小时以后为37%),并且在初次DWI中无病变的病例大多会在第二次的DWI中发现病变。即,对于将在图像上确认到病灶的例子定义为脑栓塞,而将在图像上未确认到病灶的例子定义为TIA的定义而言,DWI的实施时期会对诊断产生较大影响。

[0012] 然而,需要一种不仅是专科医院,无法进行图像检查的全科医生也能够进行TIA诊断的方法,并且也需要能够应对非脑卒中专业医生或神经内科医生这种专业医生的医师必须在综合医院的急诊中迅速进行判断的状况。

[0013] 此外,在首次就诊时,TIA的症状大多会在患者来院时消失,此时TIA的诊断依靠包含既往病史或并发症的正确问诊,因此,大多情况下难以明确进行诊断。此外,对于应当与TIA进行辨别的疾病,可列举出神经症候所带来的偏头痛、痉挛发作、特发性的一过性全面遗忘症、梅尼埃综合征、换气过度综合征、昏迷、低血糖、嗜睡症、周期性四肢麻痹等,大多情况下难以进行判断。

[0014] 为了改善这种状况并提升TIA的正确诊断率,要求一种能够使用生物标志物并客观地进行判断的指标。

[0015] 随着近年来MRI图像及超声波检查等诊断技术的进步,使得机制的详细研究成为可能,虽然不断尝试如脑栓塞般明确其究竟为心源性、动脉粥样硬化血栓性、腔隙性、还是其他原因那样明确TIA的机制,但相较于脑栓塞而言,无法看到栓塞图像的TIA更难明确地鉴别诊断其原因。

[0016] C型凝集素受体2(CLEC2)已在血小板上被鉴定为血小板活化蛇毒蛋白。有报告指出,CLEC2在人体中基本上以血小板/巨核细胞特异性表达,其为血小板特异性分子。该CLEC2在血小板活化时,作为可溶型CLEC2(soluble CLEC-2,以下简称为sCLEC2)释放至血液中(专利文献1、非专利文献1)。

[0017] 关于血管破裂时形成血栓,首先,血小板活化并凝聚,形成一次血栓,此时凝固系受到活化而使得水溶性的纤维蛋白原成为不溶性的纤维蛋白网并进行覆盖,形成牢固的二次血栓。在实际的止血血栓中,血小板系与凝固系彼此间相互活化,可观察到由血小板、纤维蛋白及被卷入两者之间的红血球等形成的止血血栓。

[0018] 血中的sCLEC2浓度由于随着血小板的活化而上升,表示血中sCLEC2浓度与血栓的形成相关联,可以说血中sCLEC2为高值则暗示了在身体某处形成了血栓(专利文献1~3)。

现有技术文献

专利文献

[0019] 专利文献1:日本专利第6078845号公报

专利文献2:日本特愿2020-032797

专利文献3:日本特愿2021-003671

专利文献4:日本特愿2021-060870

[0020] 非专利文献

非专利文献1:F.Kazama et al.,Platelets 2015;26(8):711-719

非专利文献2:Y.Yamashita et al.,Thrombosis Research 178(2019)54-58

非专利文献3:X.Zhang et al.,Stroke.2019;50:45-52.

发明内容

本发明要解决的技术问题

[0021] 脑栓塞为一种重度疾病,其死亡率高,且即使避免了死亡大多情况下也会残留后遗症。如上所述,已知发生了TIA的病例中会有15%左右引发脑栓塞,因此,早期诊断、进行预防性治疗极为重要。这是由于若能够诊断为TIA,则能够通过进行适当的抗血栓疗法,大幅降低之后引发脑栓塞的概率。此外,通过使已被诊断为TIA的患者在例如发病后一周内处于医师的监视下,即使发生脑栓塞,也能够立刻通过溶栓治疗法等进行脑栓塞的治疗,从而大幅改善其后遗症。由于是与时间比赛,脑栓塞的治疗越早越好。

[0022] TIA的诊断通过临床表现的问诊与患者的风险评价来进行。即,单侧手脚麻痹(运动障碍)、单侧麻木(感觉障碍)、无法说话、口齿不清(语言障碍)、单侧眼睛难以视物(视力障碍)、难以看到位于单侧的事物(视野障碍)等为主要症状,但这些症状会在数分钟至1小时左右消失。除了通过问诊对其症状进行听取诊断以外还不存在其他方法,症状也有强有弱,患者并不见得能够正确地向医师表达症状。

[0023] 作为对这种问诊难度进行补强的手段,普遍地会对患者进行风险评价。代表例为ABCD2评分,其将Age(年龄)、Blood Pressure(血压)、Clinical Feature(临床表现)、Diabetes(糖尿病)、Duration of Dymptoms(症状持续时间)分数化以进行评价。但其只不过是之后的脑栓塞发病风险的评价,并非针对TIA本身进行诊断。如上所述,在进行TIA诊断时,不存在能够增强临床表现问诊的客观性图像检查及血液检查。

[0024] 此外,如上所述,对于脑栓塞或TIA这种急性脑血管病,虽然鉴别、诊断其原因究竟为心源性还是非心源性是非常重要的,但该判断并不一定简单。现在,作为鉴别脑栓塞为心源性还是非心源性的诊断,根据图像检查、心电图、超声心电图、脂质或血糖、心力衰竭标志

物等血液检查的结果综合性地进行判断。作为血栓学上支持诊断的生物标志物,提倡D-二聚体、可溶性纤维蛋白等,但其并不见得具有能够鉴别是否为心源性的程度的精度,实际上尚未使用于临床现场。对于TIA,由于其将在图像检查中未确认到栓塞的病例作为对象,更难诊断究竟为心源性还是非心源性。

[0025] 因此,本发明的技术问题在于,针对TIA的诊断,提供一种能够增强临床表现问诊的简便、迅速且客观的基于血液检查的风险评价方法,以及针对脑栓塞、TIA这类急性脑血管病的心源性、非心源性的鉴别诊断,提供一种能够增强图像、心电图、以往的血液检查的简便、迅速且客观的基于血液检查的风险评价方法。

解决技术问题的技术手段

[0026] 为了解决上述技术问题,本申请的发明人进行了深入研究。结果发现,相较于健康者,TIA患者的血液中sCLEC2浓度显著上升。并且还发现,即便并非如脑栓塞般有栓塞并存在血栓的状态,而是如TIA般无栓塞也无法确认到血栓的状态下,sCLEC2也为能够取高值的状态。这与TIA患者在不久的将来会引发脑栓塞的概率较高这一点一致。即,即便现阶段为无栓塞也无法确认到血栓的状态,sCLEC2为高值则表示能够预测血小板已活化,且会在不久的将来形成一定程度大小的血栓,并堵塞血管,引起栓塞的可能性较高。

[0027] 此外,对于TIA患者,利用sCLEC2浓度进行风险判定需要适当的阈值,即临界值。本发明发现TIA的血中sCLEC2浓度的临界值优选为66pg/mL以上且148pg/mL以下。

[0028] 对于TIA患者,由于无法通过栓塞图像进行判定,基于血液检查的心源性、非心源性的判定的辅助是极其有用的。

[0029] 进一步,测定脑栓塞患者的血液中的sCLEC2后发现,相较于心源性患者,非心源性患者的sCLEC2测定值表现出显著的高值。基于该见解,同时对表示纤维蛋白血栓的存在的生物标志物、即D-二聚体进行测定,计算sCLEC2与D-二聚体的比(sCLEC2/D-二聚体比),结果发现相较于心源性患者,非心源性患者的sCLEC2/D-二聚体比以更大的显著性差异表现出高值。即,由于sCLEC2表示血小板活性,D-二聚体表示纤维蛋白血栓的存在,在判别优先血小板而将抗血小板药用于治疗的非心源性、与优先纤维蛋白而将抗凝药物用于治疗的心源性时,通过利用sCLEC2与D-二聚体的比,能够提供一种在以往的方法的基础上对更正确的诊断进行辅助的方法。

[0030] 基于上述内容,设计一种使用了可溶型CLEC2的急性脑血管病的风险评价方法,从而完成了本发明。

[0031] 即,本发明提供以下发明:

{1}一种急性脑血管病的风险评价方法,其包括:测定存在于取自疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的血液中的可溶型CLEC2浓度的工序。

{2}根据{1}所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的风险评价方法,其包括:

(1)提供来自所述患者的血液试样的工序;

(2)确定所述试样中的可溶型CLEC2浓度的工序;及

(3)使所述可溶型CLEC2浓度与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序。

{3}根据{2}所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急

性脑血管病的患者的风险评价方法,其中,使所述可溶型CLEC2浓度与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序包括:根据所述可溶型CLEC2浓度的变化,评价所述患者是否具有风险。

{4}根据{2}或{3}所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其中,所述急性脑血管病为一过性脑缺血发作,在使可溶型CLEC2浓度与一过性脑缺血发作相关联的工序中,所述可溶型sCLEC2浓度的临界值为66~148pg/mL。

{5}根据{1}所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的风险评价方法,其包括:

- (1)提供来自所述患者的血液试样的工序;
- (2)确定所述试样中的可溶型CLEC2浓度的工序;
- (3)测定所述试样中的血小板数的工序;
- (4)用所述可溶型CLEC-2浓度除以血小板数的工序;及
- (5)使用所述可溶型CLEC2浓度除以血小板数所得到的值与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序。

{6}根据{5}所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其中,所述急性脑血管病为一过性脑缺血发作,在使用可溶型CLEC2浓度除以血小板数所得到的值与一过性脑缺血发作相关联的工序中,所述用可溶型sCLEC2浓度除以血小板数所得到的值的临界值为0.55~0.7。

{7}根据{1}~{4}中任一项所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,该方法中,提供判定所述急性脑血管病为心源性还是非心源性的材料。

{8}根据{1}所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其包括:

- (1)提供来自所述患者的血液试样的工序;
- (2)确定所述试样中的可溶型CLEC2浓度的工序;
- (3)测定所述试样中的血小板数的工序;
- (4)用所述可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物的工序;及
- (5)使用所述可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物所得到的值与所述患者存在或不存在急性脑血管病、转归的可能性、或者为心源性还是非心源性相关联的工序。

{9}根据{8}所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其中,所述凝血纤溶标志物为D-二聚体。

{10}根据{1}~{9}中任一项所述的方法,其为针对疑似罹患急性脑血管病的患者或已被诊断为急性脑血管病的患者的急性脑血管病的风险评价方法,其中,来自所述患者的试样通过在发生急性脑血管病的症状后48小时之内自所述患者采集而提供。

{11}根据{1}~{10}中任一项所述的方法,其中,确定可溶型CLEC2浓度的工序为高灵敏度免疫检测法,例如为化学发光免疫检测法、电化学发光免疫检测法、荧光免疫检测法。

[0032] 此外,本发明还包括以下内容:

一种急性脑血管病的风险评价方法,其中,测定(或确定)试样中的可溶型CLEC2浓度(或用可溶型CLEC-2浓度除以血小板数所得到的值、或者用可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物所得到的值);

一种辅助急性脑血管病的风险评价的方法,其中,测定(或确定)试样中的可溶型CLEC2浓度(或用可溶型CLEC-2浓度除以血小板数所得到的值、或者用可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物所得到的值);

一种用于急性脑血管病的风险评价的测定(或确定)的试样中的可溶型CLEC2浓度(或用可溶型CLEC-2浓度除以血小板数所得到的值、或者用可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物所得到的值)的方法;

一种急性脑血管病的体外(in vitro)风险评价方法,其特征在於,测定(或确定)试样中的可溶型CLEC2浓度(或用可溶型CLEC-2浓度除以血小板数所得到的值、或者用可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物所得到的值);

一种能够检测可溶型CLEC2浓度的抗体在制造急性脑血管病的风险评价用试剂盒中的应用;

一种用于对急性脑血管病的风险评价提供必要信息的测定(或确定)试样中的可溶型CLEC2浓度(或用可溶型CLEC-2浓度除以血小板数所得到的值、或者用可溶型CLEC-2浓度除以凝血纤溶标志物所得到的值)的方法。

发明效果

[0033] 通过本发明的方法,即通过测定存在于TIA患者血液中的sCLEC2浓度或利用sCLEC2/D-二聚体比,能够简便且迅速地进行客观的急性脑血管病的风险评价。此外,在被诊断为TIA之后,在脑栓塞或TIA的预防性治疗的监控中,也能够期待有助于提升治疗效果的判定精度。

附图说明

[0034] 图1为将人源sCLEC2蛋白质用作标准物时所绘制的标准曲线。

图2为针对TIA患者与健康者对sCLEC2的血浆中浓度进行比较的图表。

图3为通过血中sCLEC2浓度测定进行TIA诊断时的ROC曲线(接收者操作特征曲线(Receiver Operating Characteristic Curve))。

图4为测定健康者及脑栓塞患者的sCLEC2浓度,并针对健康者、心源性脑栓塞患者、非心源性脑栓塞患者这三组对sCLEC2浓度进行比较的图表。

图5为利用脑栓塞患者的sCLEC浓度,对心源性脑栓塞与非心源性脑栓塞进行鉴别诊断时的ROC曲线。

图6为利用脑栓塞患者的D-二聚体浓度,对心源性脑栓塞与非心源性脑栓塞进行鉴别诊断时的ROC曲线。

图7为利用脑栓塞患者的sCLEC2/D-二聚体比,对心源性脑栓塞与非心源性脑栓塞进行鉴别诊断时的ROC曲线。

具体实施方式

[0035] 以下,对本发明的实施方案进行详细说明,但利用方法的形态不受其限定。

[0036] 此外,在本说明书中,“CLEC2”为属于C型凝集素家族的血小板活化受体,其通常存在于血小板的膜中,但会伴随血小板的活化被释放至血液中。在本说明中,术语“可溶型CLEC2 (sCLEC2)”是指这种从血小板中游离出并在血液中(在缓冲液中培养时为缓冲液中)检测到的CLEC2或来自CLEC2的分子。

[0037] sCLEC2包括在还原条件下SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中的分子量约为40kDa的蛋白质、分子量约为32kDa的蛋白质、分子量约为25kDa的蛋白质等(非专利文献1)。推测分子量约为40kDa的蛋白质、分子量约为32kDa的蛋白质存在于血小板膜表面,并伴随血小板活化以包含在所产生的微粒中的状态而被释放出来。认为在这些蛋白质上加成有糖链。另一方面,认为分子量约为25kDa的蛋白质伴随血小板的活化而被蛋白酶切断并从血小板中游离出来。在本发明中,测定这种sCLEC2的量。对于sCLEC2,可以一并检测分子量约为40kDa的蛋白质、分子量约为32kDa的蛋白质及分子量约为25kDa的蛋白质,也可以仅检测分子量约为25kDa的蛋白质。

[0038] 本发明中所使用的sCLEC2浓度可以仅以sCLEC2浓度的形式而使用,也可以与其他生物标志物进行组合的形式而使用。例如,在进行TIA诊断时,可以使用用sCLEC2浓度除以血小板数所得到的值(以下,有时称为C2PAC指数)。在本说明书中,只要没有特别说明,则sCLEC2浓度解释为既包括使用sCLEC2浓度的情况,也包括用sCLEC2浓度除以血小板数的情况。此外,对于心源性脑栓塞或非心源性脑栓塞的鉴别诊断,不仅能够采用sCLEC2浓度,还能够采用用sCLEC2浓度除以D-二聚体所得到的sCLEC2/D-二聚体比。

[0039] 用于测定的试样优选来自人,但为了掌握实验动物的病症等,也可以使用来自除人以外的动物的试样。实验动物没有特别限定,例如可列举出豚鼠、大鼠、小鼠、犬等。

[0040] 用于检测sCLEC2的存在的方法没有特别限制,但优选使用了识别sCLEC2的抗体(以下,有时将其称为“抗sCLEC2抗体”)的免疫学方法。作为通过免疫学检测蛋白质的方法,只要为例如酶免疫检测法(ELISA法)、化学发光免疫检测法、电化学发光免疫检测法、荧光免疫检测法、放射免疫检测法、免疫色谱法等使用了标记抗体的免疫检测法、或者蛋白质印迹法、乳胶凝集法、免疫比浊法等本身公知的常用方法,则可以使用任意一种方法。然而,对于单纯的免疫检测法,由于在测定健康者的sCLEC2浓度时测定灵敏度不充分,应使用一种在测定健康者的血中sCLEC2时具有充分灵敏度的测定方法。因此,最好是一种高灵敏度检测法,特别优选使用化学发光免疫检测法或电化学发光免疫检测法、荧光免疫检测法等。

[0041] 例如,使用血浆采血用采血管自作为对象的受试者(特别是患者)采集样本。通常优选残留血小板较少的加入了柠檬酸的采血管,也可使用加入了肝素、EDTA的采血管。在用于测定血中血小板数时,可使用加入了EDTA的采血管,若为同时采血,则也可以为各个不同的采血管。血浆中的sCLEC2浓度例如使用以2000g进行了20分钟左右的离心分离的血浆进行测定,离心条件并不限于于此,还可以为使用了全血的测定体系。以下,以测定血浆中的sCLEC2浓度为例进行说明,但并不限于于此。自患者采血的时期优选在表现出症状起未经过48小时,但即使经过了48小时,也能够用于本发明。更优选为24小时之内,进一步优选为18小时之内,最优选为12小时之内。

[0042] 在本说明书中,急性脑血管病包括脑栓塞等缺血性脑卒中及TIA,但并不限定于

此。

TIA是指一过性地表现出类似脑栓塞的症状,但无法通过图像检查确认到栓塞的病症。类似脑栓塞的症状例如可列举出单侧手脚麻痹(运动障碍)、单侧麻木(感觉障碍)、无法说话、口齿不清(语言障碍)、单侧眼睛难以视物(视力障碍)、难以看到位于单侧的事物(视野障碍)等,但并不限于此。由于这些症状会在数分钟至1小时左右消失,除了通过问诊对其症状进行听取诊断以外还没有其他方法,症状的程度有强有弱,但不问其严重程度。脑栓塞患者为具有上述临床表现,并且通过MRI、CT等在脑中确认到栓塞图像的患者。

[0043] 脑栓塞为脑动脉处于闭塞状态(栓塞),由于此时明显存在血栓,认为作为血小板的活化标志物的血中sCLEC2的值的上升是合理的。此外,由于弥散性血管内凝血(DIC)、血栓性微血管病(TMA)、深静脉血栓症也是在病理学上能够明显观察到血栓的病症,认为sCLEC2的上升也是合理的。然而,在如TIA这种无法确认栓塞的状态下同样也无法确认血栓的存在,认为血栓的相关标志物(例如有名的D-二聚体)并不会怎么上升,但令人意外的是,被暗示可用作血栓症标志物的sCLEC2的浓度发生了上升,能够用作用于TIA风险评价的血中生物标志物。

[0044] 作为风险评价的实施方法,当疑患TIA的患者的sCLEC2浓度的值比健康者或非血栓性疾病群多时,能够判定TIA的可能性较高。基于这种比较,能够在针对TIA患者进行的脑栓塞的预防性治疗之前与之后对sCLEC2浓度进行比较,从而用于脑栓塞发病的风险预测。

[0045] 对于所测定的来自患者的试样中的sCLEC2浓度与TIA的可能性的关联,能够根据来自患者的试样中的sCLEC2浓度与来自健康者的试样中的sCLEC2浓度的比较,适当设定阈值并对其进行使用。此外,作为脑栓塞发病的风险预测,当从针对同一患者在发病前测定的sCLEC2浓度的经时记录中检测出sCLEC2浓度的显著变动时,能够进行TIA的评价。

[0046] 具体实例可列举出以下的使用方法:对描述了可能被怀疑为TIA的症状的患者测定血中sCLEC2浓度,若该值比健康者等高,则能够判断其为TIA的可能性较高,进一步进行检查并通过风险判断,预防性地给药阿司匹林等抗血小板药或华法林等抗凝药物。并且有助于以下讨论:在被诊断为TIA后通过治疗服用抗血小板药或抗凝药物后,实施sCLEC2浓度测定,若为高值,则可决定变更不同种类的药物或者追加给药等治疗方针。

[0047] 作为用于计算判定用阈值(临界值)的原始数据或统计处理数据等,可以使用表示血浆中的sCLEC2浓度与血小板活化的程度或与各种疾病的关联的数据。

例如,作为用于计算临界值的方法,能够进行由所测定的血浆中的sCLEC2的值绘制ROC曲线(接收者操作特征曲线)的分析,将诊断的灵敏度与特异度均表现出80%以上的浓度用作临界值。

在本发明的方法中,基于sCLEC2的TIA的临界值适合选择66pg/mL~148pg/mL之间的任意值。此外,作为更合适的方案,在使用sCLEC2浓度除以血小板数所得到的值、即C2PAC指数时,也能够进行相同的分析,计算出临界值。使用C2PAC指数时的临界值能够设为0.7。

[0048] sCLEC2伴随血小板的活化而被释放至血中。现有的血小板活化标志物,例如血小板因子4(PF4)、 β -血小板球蛋白(β TG)存在因采血造成的物理性刺激而引发非特异性释放的问题,但sCLEC2为依赖引起血小板活化的信号传导的释放机制,能够成为更正确地反映生物体内血小板活化的标志物。此外,CLEC2由于在人体中基本上仅限于在血小板/巨核细

胞类中表达,为假阳性较少的血小板特异性标记。因此,通过测定sCLEC2,能够早期诊断血小板的活化状态,能够用于TIA的诊断。

[0049] 此外,也可以用所测定的sCLEC2浓度除以血小板并用于风险评价。虽然在sCLEC2浓度因治疗而减少时,会使得血小板活化受到抑制,而当sCLEC2浓度持续为高值或增加的情况下,还能够考虑对抗血栓药进行重新评估、追加、增量等。在本说明书中,将用sCLEC2浓度除以血小板数所得到的值称为C2PAC指数,在进行TIA的诊断时,当记载为sCLEC2浓度时,即便是在未明确记载为C2PAC指数的情况下,也能够将所有sCLEC2浓度替换为C2PAC指数而进行实施。

[0050] 在用sCLEC2浓度除以血小板数并用于TIA的诊断时,血小板数的测定通常使用自动血细胞计数器(血细胞计数仪)进行测定,但也能够使用血球计数板与显微镜进行计数。

[0051] 虽然适合用例如pg/mL来表示血浆中的sCLEC2浓度,用例如 $1,000$ 个/ mm^3 来表现血中血小板数,并使用计算sCLEC2浓度/血小板数而得出的C2PAC指数,但此处采用的sCLEC2的浓度可以使用ng/mL、ng/L等任意单位,血小板数也能够使用 $10,000$ 个/ mm^3 等任意单位,但应使用相对统一的单位。由于使用各种各样的单位,sCLEC2浓度/指数能够取各种值,但本质上为相同的概念。

[0052] 能够预想到多数情况下会使用由测定sCLEC2浓度的临床检查设备得出的测定值与由测定血小板数的血细胞计数仪得出的测定值进行比率的计算。在日常诊疗上,该计算适合在与两种测定仪相连的医院的检查系统、医院的系统或电子病历等系统上自动进行计算,但也可以构建将两个测定仪的数据相连的系统,还能够构建可同时测量sCLEC2浓度与血小板数的仪器。此外,还可以使用该两种数据进行手算。

此外,可以将表示血浆中的sCLEC2浓度与血小板活化的程度或与各种疾病的关联的数据,用作例如判定用阈值或者用于计算判定用阈值的原始数据或统计处理数据等。

当用血浆中的sCLEC2浓度除以血中血小板数从而计算出每单位血小板的sCLEC2释放量,并将其作为指标进行血栓性疾病的诊断时,能够在不依赖血中血小板数的情况下评价血小板的活化程度,因而优选。具体而言,例如能够以pg/mL表示血浆中的sCLEC2浓度(A),以 $1,000$ 个/ mm^3 表示血中血小板数(B),将用A除以B所得到的数字作为血小板活化的指标。

[0053] 此外,本发明并不排除在脑栓塞的诊断中的应用。在进行脑栓塞的诊断时,在考虑到由例如单侧手脚麻痹(运动障碍)、单侧麻木(感觉障碍)、无法说话、口齿不清(语言障碍)、单侧眼睛难以视物(视力障碍)、难以看到位于单侧的事物(视野障碍)等症状做出的判断、与通过MRI等图像检查确认栓塞的基础上,进行综合性判断。对于疑患脑栓塞的患者,通过测定基于本发明的血液中的sCLEC2浓度,能够有助于迅速且简便的脑栓塞诊断的辅助,因而优选。并且,在临床现场中,不仅是包括脑栓塞的脑血管病的诊断,能够通过迅速且简便的手法客观地判断其究竟为心源性还是非心源性也是很重要的,本发明能够应对该需求。

[0054] 在鉴别诊断为心源性脑栓塞还是非心源性脑栓塞时,例如,对已被诊断为急性脑血管病的患者测定血中的sCLEC2浓度。此时,可确认到sCLEC2浓度显著上升,若高于预先设定的阈值,则能够判断其为非心源性脑栓塞的概率较高,若低于预先设定的阈值,则能够判断其为心源性脑栓塞的概率较高。

除此以外,还能够将sCLEC2浓度与其他血栓止血标志物进行组合并用于鉴别诊断为心源性脑栓塞还是非心源性脑栓塞。例如,对已被诊断为急性脑血管病的患者测定血中的sCLEC2浓度与D-二聚体浓度。测定优选使用同时采集的血样,但也可以使用分别采集的血样实施测定。即使在进行各个浓度测定的采血时存在时间差,本领域技术人员也能够对其影响程度做出适当判断而进行实施。

[0055] 若用sCLEC2浓度除以D-二聚体的浓度所得到的sCLEC2/D-二聚体比高于某个阈值,则其为非心源性的概率较高,若该比值低于某个阈值,则其为心源性的可能性较高。用sCLEC2的浓度除以D-二聚体的浓度并用于计算sCLEC2/D-二聚体比,D-二聚体能够以 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 ng/L 等各种浓度进行表示,但在进行比较时,应使用统一的浓度单位。优选以常规的标记 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行表示,但并不限于此。

[0056] 此外,除了D-二聚体以外,作为能够体现纤维蛋白血栓的存在、纤维蛋白的形成的凝血纤溶标志物,作为纤维蛋白/纤维蛋白原分解产物的FDP、作为凝血酶的活化标志物的可用性纤维蛋白、纤维蛋白单体、凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、凝血酶原片段F1+2,也能够与sCLEC2求比,并用于心源性/非心源性的判定。

[0057] 当通过MRI等图像观察到较大的栓塞,且曾发生心房颤动或心律不齐等时,容易诊断心源性脑栓塞。此外,虽然也有能够容易推测出:栓塞图像以中等程度于颈动脉处存在动脉粥样硬化性的狭窄、或者在脑栓塞附近的动脉处观察到狭窄等典型的动脉粥样硬化性脑栓塞的案例,但在均非典型的案例时大多难以判定。然而,由于治疗方法会因该判定而有着决定性的不同,在实际的临床中,会在MRI、MRA、CT、超声波等图像检查的基础上,通过临床表现、病历、心电图、血液检查等进行综合性判定,但引发栓塞的血栓究竟为纤维蛋白优先还是血小板优先的这种血栓方面的信息,对于诊断是非常有用的。在脑栓塞的情况下,虽然需要争分夺秒地开始进行治疗,但为急救等外来病例且不清楚其在接受诊察之前究竟经过了多长时间的情况并不在少数。若通过本发明这种简便的方法,鉴别诊断究竟为心源性脑栓塞还是非心源性脑栓塞,则能够迅速地选择适当的治疗方法,因此优选使用这种风险评价方法。

[0058] 作为急性期脑栓塞的治疗方法,已知有作为点滴治疗药的抗凝药物或抗血小板药,但即便同为抗凝药物,也存在适应场景会不同的情况。例如,对于作为抗凝药物的阿加曲班与肝素,阿加曲班适合非心源性脑栓塞,而肝素适合心源性脑栓塞。并且,有时也会因脑栓塞发病后的经过时间不同而导致能够适应的治疗药不同。对于抗凝药物(阿加曲班),若在发病2天之内且栓塞图像为1.5cm以上,则阿加曲班能够适应,但当栓塞图像不大或已经经过3天以上时,则无法适应。由此,在确定治疗方针之后,通过实施本发明,不仅能够实施脑栓塞的诊断,还能够迅速地鉴别其究竟为心源性还是非心源性,因而优选。

[0059] 以前曾提倡过一种与抗凝药物或抗血小板药的作用机制完全不同,且同时适应心源性与非心源性的通过去除自由基来降低脑栓塞恶化的依达拉奉这种治疗药,但也存在并未被近年来的美国的治疗指南提及等、治疗方针在各个国家之间观点并不相同的情况。根据上述状况也优选实施本发明,通过实施本发明,不仅能够实施脑栓塞的诊断,还能够迅速地鉴别其究竟为心源性还是非心源性,以应对日新月异的治疗方针的确定。

[0060] 作为急性期的脑栓塞的治疗案例,有时会先联合使用抗凝药物与抗血小板药,以一周至两周左右为基准,一边观察其效果,一边确定之后的治疗方针。此时,作为下一阶段,

大多会选择作为口服药的阿司匹林或华法林。然而,对于应当选择哪一种药剂,并不是只要能够通过图像检查判断为腔隙性脑栓塞、动脉粥样硬化性脑栓塞或心源性脑栓塞,就能够做出判断,即便是专科医生,有时也难以判断。而当无法仅通过图像检查做出判断时,会根据通过24小时心电图、植入式心电图、颈动脉超声、经胸超声、经食道超声这类检查所得到的结果,进行综合性判断。但即便经过上述检查仍难以判断其为心源性还是非心源性的病例也并不在少数,因此,此时,通过采用本发明,利用使用了生物标志物的检查,能够简便且高精度地判断其为心源性脑栓塞还是非心源性脑栓塞的效果极大。

[0061] 对在脑栓塞为心源性还是非心源性的鉴别诊断中的应用进行了记载,但也能够用于TIA为心源性还是非心源性的鉴别诊断。鉴别诊断心源性TIA、非心源性TIA时,也能够通过与鉴别诊断究竟为心源性脑栓塞还是非心源性脑栓塞时相同的方法进行使用。对于TIA,由于无法确认到通过MRI等图像获得的栓塞图像,能够进行上述鉴别诊断,因而更加优选。

实施例

[0062] 以下,通过实施例对本发明进行具体说明,但本发明的范围并不受这些实施例的限定。

[0063] 《实施例1:人血浆中的sCLEC2的测定》

在本实施例中,按照以下所示的步骤,测定血浆中的sCLEC2浓度。

(测定用试剂的制备与待测试样的制备)

- 样本稀释液:使用含有防腐剂的0.1mol/L的HEPES缓冲液(pH7.5),以辛酸钠为2%、n-辛基- β -D-葡萄糖苷(OG)为0.5%的方式进行组合,制成样本稀释液。

试剂所含有的抗体使用日本专利第6078845号公报的实施例中记载的抗体,其通过以下方式制备。

- 第一抗体溶液:使识别sCLEC2的小鼠单克隆抗体(11D5)结合在磁性胶乳颗粒(JSR Corporation)上,并使其分散在含有防腐剂的0.01mol/L的MES缓冲液(pH6.0)中。

- 第二抗体溶液:通过马来酰亚胺法对识别sCLEC2的其他小鼠单克隆抗体(11E6)进行碱性磷酸酶(ALP)标记,并使其分散在含有防腐剂的0.01mol/L的MES缓冲液(pH6.5)中。

- 发光基质溶液:使用了2-氯-5-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)-三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)-1-苯基磷酸二钠(CDP-star(注册商标):Applied Biosystems公司)。

- B/F清洗液:使用含有0.1mol/L的柠檬酸(pH6.5)、0.15mol/L的NaCl、0.1%的Triton X-100的缓冲液。

- 待测试样:将使用缓冲液(0.025mol/L HEPES、0.14mol/L NaCl、0.1%辛酸钠、0.3% BSA)对hCLEC-2重组蛋白质进行稀释而成的待测试样用作待测试样1,将使用柠檬酸血浆对hCLEC-2重组蛋白质进行稀释而成的试样用作待测试样2。

[0064] (基于测定试剂的测定)

测定中使用全自动临床检查系统STACIA(注册商标,LSIMedience Corporation制造)。

将所制备的样本稀释液、第一抗体溶液(磁性胶乳试剂)、第二抗体溶液(酶标记抗体试剂)分别填充在STACIA专用瓶中,并设置在装置中。按照所述装置的如下操纵方法进行

测定。

具体而言,向10 μ L的试样中加入40 μ L的样本稀释液,并以37 $^{\circ}$ C进行数分钟加温之后,加入25 μ L的第一抗体溶液(磁性胶乳试剂),并以37 $^{\circ}$ C进行数分钟加温。接着,进行B/F分离,加入50 μ L的第二抗体溶液(酶标记抗体试剂),以37 $^{\circ}$ C进行数分钟加温,并在再次进行B/F分离之后,加入100 μ L的发光基质溶液,并以37 $^{\circ}$ C进行数分钟反应后,测定信号强度(计数)。

图1示出了将hsCLEC2蛋白质用作标准物时所绘制的标准曲线。

[0065] 《实施例2:TIA患者及健康者的血浆样本中的sCLEC2的测定》

使用由经过临床表现问诊且MRI未发现新栓塞图像的被诊断为TIA的患者获得的柠檬酸血浆、及由健康者获得的柠檬酸血浆,通过实施例1的方法测定血浆中的sCLEC2浓度、血小板值、sCLEC2/血小板比(C2PAC指数)(表1、表2)。

[0066] [表1]

TIA患者的sCLEC2测定值

TIA病例	sCLEC2 (pg/ml)	血小板数 ($\times 1000/\mu$ L)	C2PAC指数
1	89.6	139	0.64
2	236.6	222	1.07
3	184.6	179	1.03
4	221.2	324	0.68
5	186.1	217	0.86
6	155.4	270	0.58
7	148.5	185	0.80
8	110.1	131	0.84
9	313.2	314	1.00
10	156.0	160	0.98
11	159.0	184	0.86
12	451.8	191	2.37

[0067] [表2]

健康者的sCLEC2测定值

健康者	sCLEC2	健康者	sCLEC2	健康者	sCLEC2
1	112.7	25	82.8	49	45.8
2	85.7	26	70.9	50	67.0
3	42.7	27	53.9	51	55.6
4	47.5	28	54.0	52	55.5
5	54.5	29	43.8	53	33.0
6	64.4	30	73.2	54	63.8
7	57.8	31	63.8	55	40.1
8	51.7	32	84.7	56	48.9

9	57.2	33	44.5	57	34.1
10	98.8	34	58.0	58	48.4
11	56.6	35	77.7	59	83.5
12	63.6	36	97.6	60	41.7
13	49.4	37	47.7	61	34.1
14	34.0	38	57.3	62	48.5
15	46.9	39	61.0	63	31.5
16	52.0	40	65.9	64	54.0
17	52.2	41	52.3	65	58.8
18	44.7	42	70.2	66	48.9
19	85.8	43	43.3	67	51.3
20	61.8	44	63.5	68	44.7
21	94.7	45	47.6	69	48.2
22	59.0	46	55.5	70	50.7
23	45.0	47	77.2	71	42.4
24	42.5	48	49.6		

[0068] [表3]

健康者与TIA患者的sCLEC2值的统计数据

	健康者 (71例)	TIA病例 (13例)
平均	51.9	198.3
标准偏差	16.7	94.9
中位数	54.6	166.0

[0069] 利用这些测定值,制成健康者与TIA患者的sCLEC2值的统计数据(表3)。对于TIA病例,sCLEC2测定值(pg/mL)的平均、标准偏差、中位数为198.3、94.9、166.0,而另外测定的健康者的sCLEC2测定值(pg/mL)的平均、标准偏差、中位数则为51.9、16.7、54.6,因此与健康者相比,TIA患者的sCLEC2值为显著的高值($P < 0.0001$)。将各自的测定值示于图2。

此外,另外测定的健康者的C2PAC指数的上限值为0.7。

[0070] 《实施例3:基于sCLEC2的TIA的诊断的灵敏度/特异度》

改变sCLEC2的临界值对实施例2的测定值进行分析后,可得到如图3所示的ROC曲线(接收者操作特征曲线),其曲线下面积为0.994,非常良好。

将通过该分析使临界值由60pg/mL变化至150pg/mL时的诊断的灵敏度与特异度示于表4。灵敏度、特异度同时表现出80%以上的临界值为66pg/mL~148pg/mL。

[0071] [表4]

临界值 pg/mL	灵敏度	特异度
148.5	76.9%	100.0%
112.7	84.6%	100.0%
110.1	84.6%	98.6%
98.8	92.3%	98.6%
97.6	92.3%	97.2%
94.7	92.3%	95.8%
89.6	92.3%	94.4%
85.8	100.0%	94.4%
85.7	100.0%	93.0%
84.7	100.0%	91.5%
83.5	100.0%	90.1%
82.8	100.0%	88.7%
77.7	100.0%	87.3%
77.2	100.0%	85.9%
73.2	100.0%	84.5%
70.9	100.0%	83.1%
70.2	100.0%	81.7%
67	100.0%	80.3%
65.9	100.0%	78.9%
64.4	100.0%	77.5%
63.8	100.0%	76.1%
63.6	100.0%	73.2%
63.5	100.0%	71.8%
61.8	100.0%	70.4%
61	100.0%	69.0%

[0072] 假设将利用sCLEC2浓度时的临界值设定为100pg/mL时,sCLEC2的TIA诊断能力为:灵敏度(11/12)=91.6%,特异度(70/71)=98.6%,正确诊断率(81/83)=97.6%(表5)。此外,将利用C2PAC指数时的临界值设为0.55时,TIA患者中C2PAC指数为.7以上的有10例,灵

敏度为83.3%。

由此可知,sCLEC2的测定、以及sCLEC2/血小板比(C2PAC指数)对于TIA的诊断而言为一种简便且正确地提供客观数据的手段。

[0073] [表5]

	TIA	健康者	合计
sCLEC2>100pg/mL	12	1	13
sCLEC2<100pg/mL	1	70	71
合计	13	71	84

[0074] 《实施例4:各病型的脑栓塞及TIA的sCLEC2、D-二聚体、sCLEC2/D-二聚体比》

通过实施例1的方法测定已被诊断为脑栓塞的患者中的心源性脑栓塞、动脉粥样硬化性脑栓塞、腔隙性栓塞的血中sCLEC2(图4)。通过曼-惠特尼U检验(Mann-WhitneyU test),在心源性脑栓塞患者的sCLEC2浓度与非心源性脑栓塞患者的sCLEC2浓度之间确认到显著差,p值为0.002720(<0.05),确认到sCLEC2对于鉴别栓塞为心源性脑栓塞还是非心源性脑栓塞而言是有用的。

进一步,为了以更高的精度实施心源性脑栓塞与非心源性脑栓塞的鉴别,通过LPIA-Genesis D-二聚体(LSIMEIENCE Corporation制造)测定取自上述脑栓塞患者的试样中所含有的D-二聚体。测定中使用全自动临床检查分析器STACIA(LSIMEIENCE Corporation制造)。利用ROC曲线,对利用D-二聚体、sCLEC2以及sCLEC2/D-二聚体比时的非心源性脑栓塞(动脉粥样硬化性脑栓塞与腔隙性栓塞)与心源性脑栓塞的鉴别诊断能力进行分析(图5~图7)。D-二聚体、sCLEC2、sCLEC2/D-二聚体比的曲线下面积分别为0.67、0.73、0.79,sCLEC2/D-二聚体比表现出了最良好的诊断能力。

对于疑似为心源性的TIA患者的代表例,以相同的方式使用sCLEC2以及sCLEC2/D-二聚体比进行确认,结果与脑栓塞的情况相同,确认到了为低于非心源性TIA患者的低值的倾向。

工业实用性

[0075] 如上所述,本发明的血中sCLEC2、sCLEC2/血小板比的测定能够成为可用于TIA诊断的临床检查,sCLEC2测定试剂成为TIA的临床检查诊断药。此外,血中sCLEC2、sCLEC2/D-二聚体比能够成为可用于脑栓塞、TIA的心源性/非心源性诊断的临床检查,sCLEC2测定试剂成为脑栓塞、TIA的心源性/非心源性的临床检查诊断试剂。

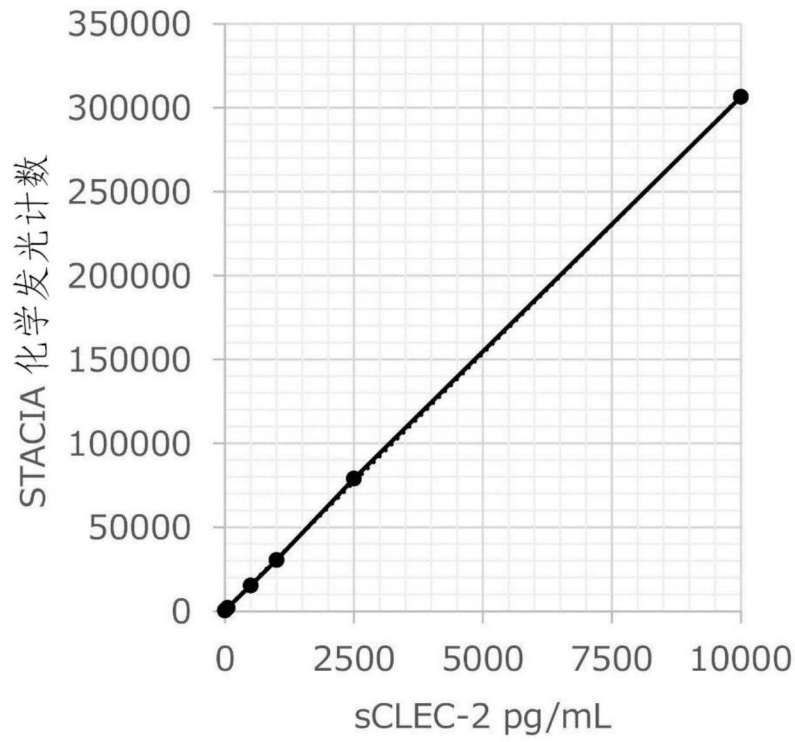


图1

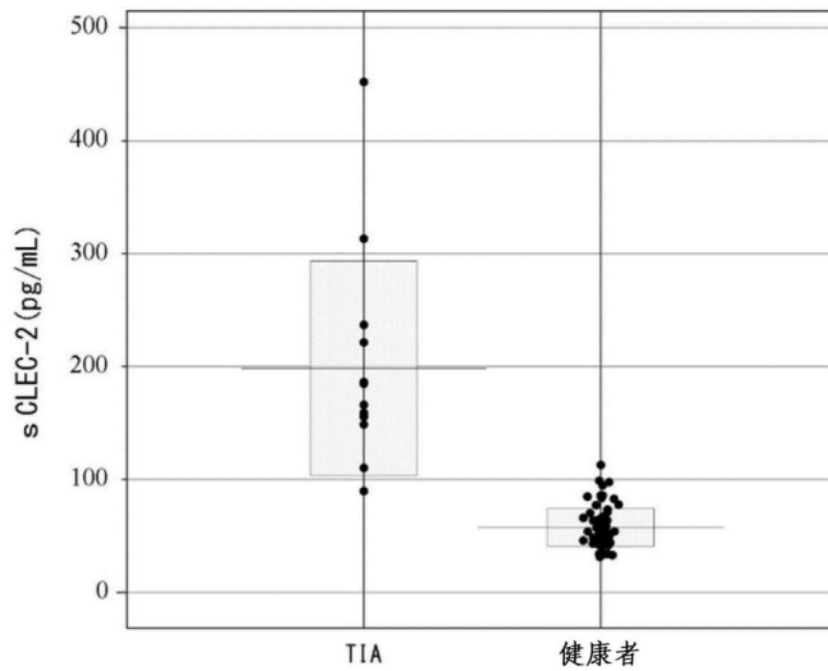


图2

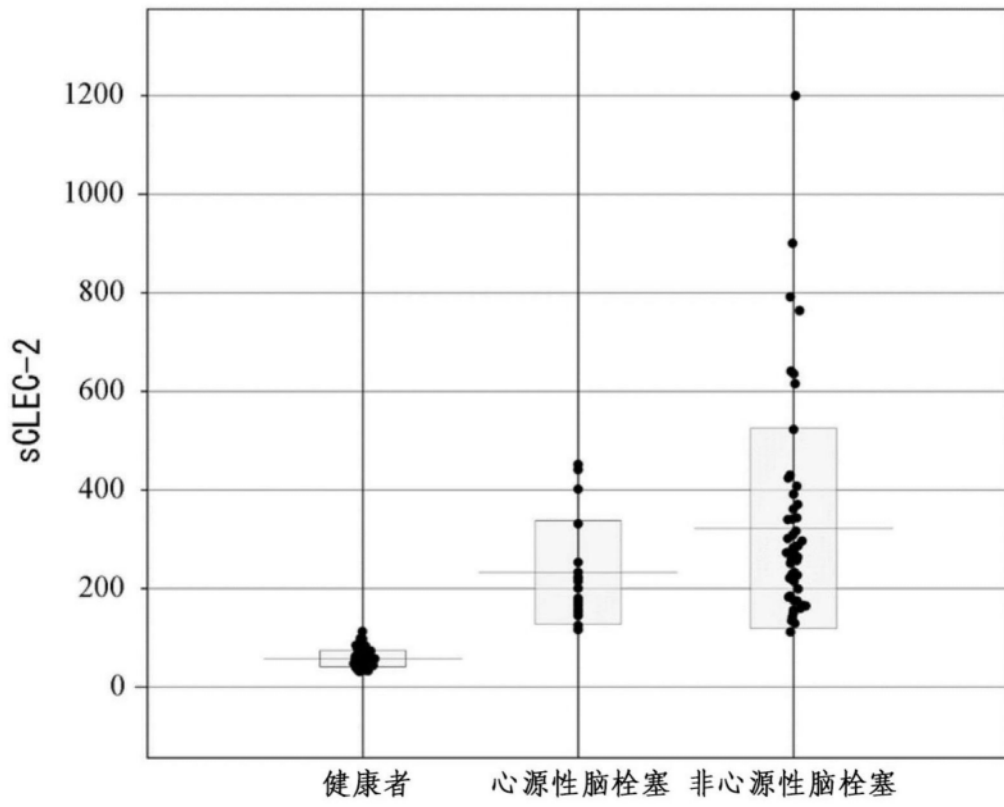


图4

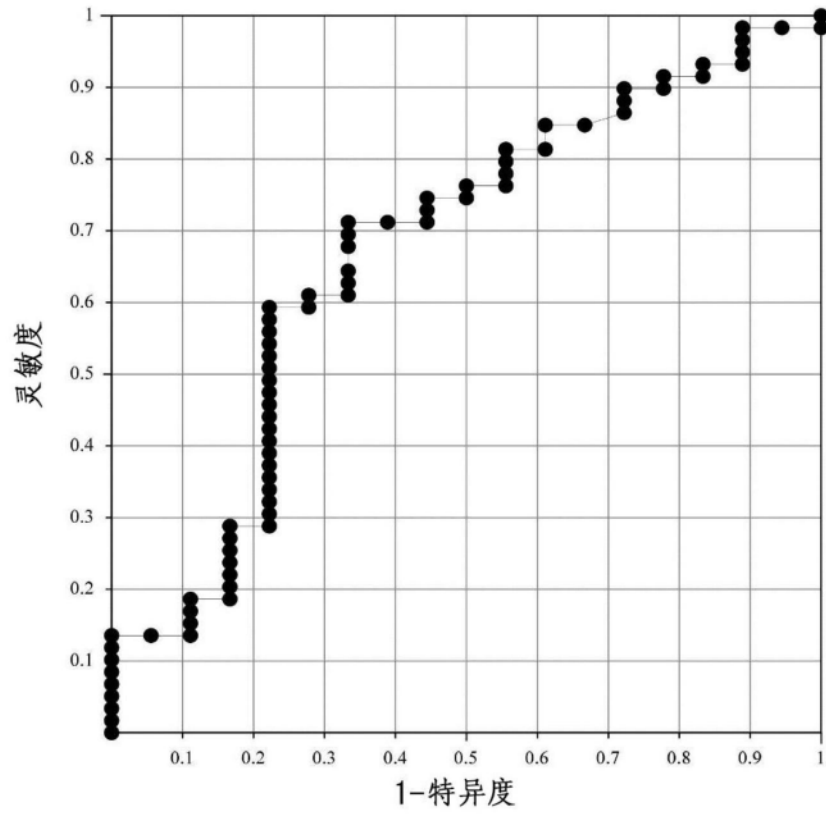


图5

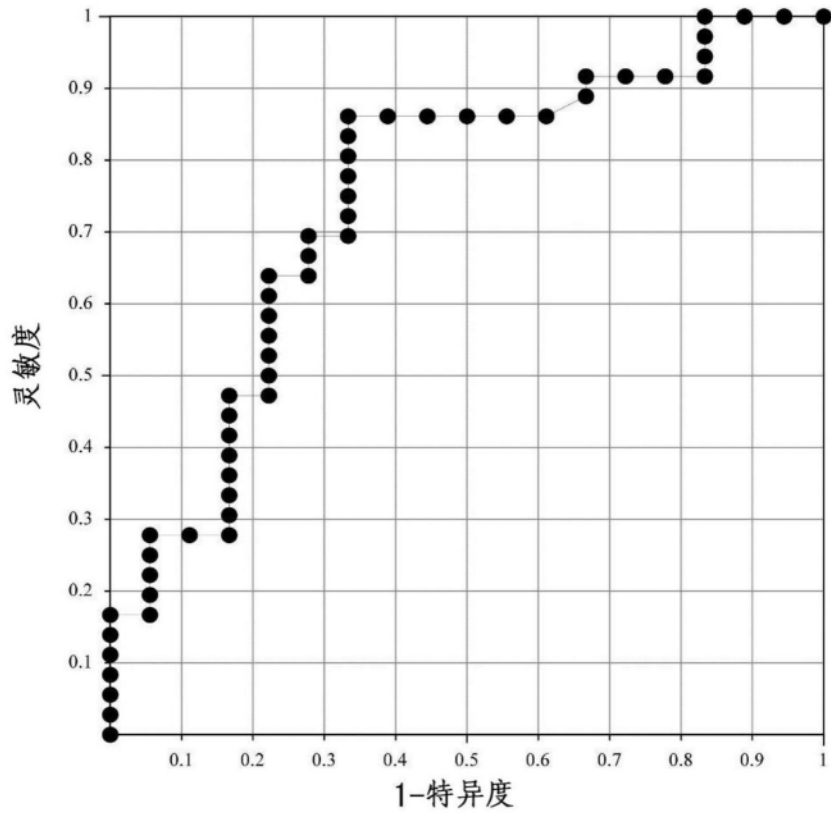


图6

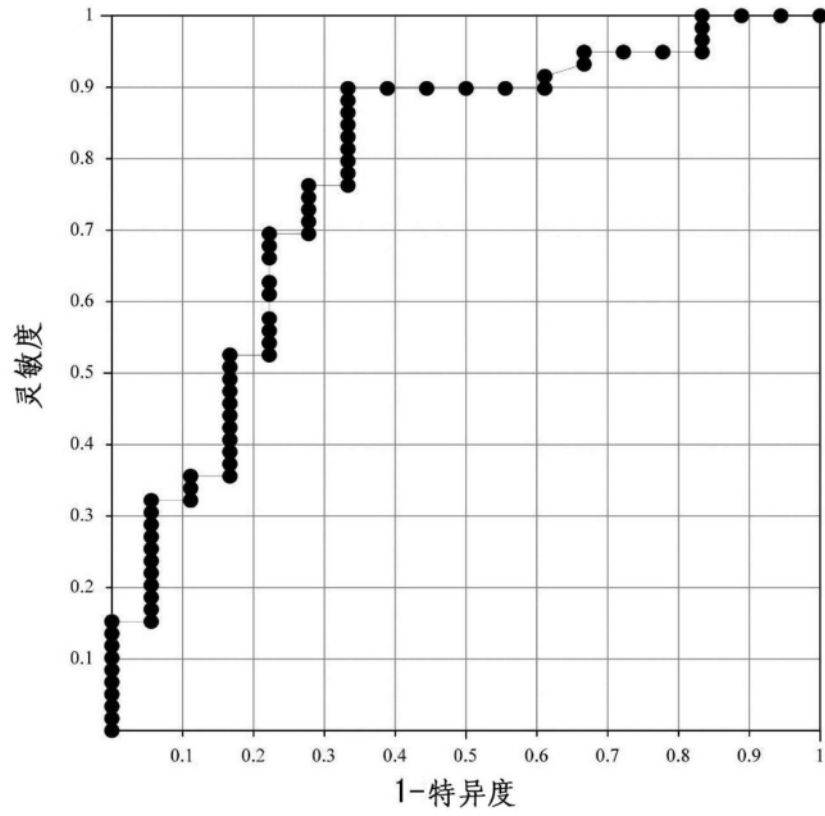


图7