

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4070443号  
(P4070443)

(45) 発行日 平成20年4月2日(2008.4.2)

(24) 登録日 平成20年1月25日(2008.1.25)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)

F 1

G01N 33/53  
G01N 33/68

V

請求項の数 3 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2001-314357 (P2001-314357)  
 (22) 出願日 平成13年10月11日 (2001.10.11)  
 (65) 公開番号 特開2003-121444 (P2003-121444A)  
 (43) 公開日 平成15年4月23日 (2003.4.23)  
 審査請求日 平成16年8月16日 (2004.8.16)

(73) 特許権者 000138277  
 株式会社三菱化学ヤトロン  
 東京都新宿区西五軒町13番1号  
 (74) 代理人 100090251  
 弁理士 森田 憲一  
 (74) 代理人 100139594  
 弁理士 山口 健次郎  
 (72) 発明者 小池 隆夫  
 北海道札幌市中央区宮の森2条13丁目2  
 -38  
 (72) 発明者 渥美 達也  
 北海道札幌市北区新琴似5条2丁目1-4  
 -1308  
 (72) 発明者 加藤 久雄  
 大阪府吹田市上山田8-13-1013  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脳梗塞を検出する方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度を測定することを特徴とする、脳梗塞を検出する方法。

## 【請求項2】

体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度(N)及びトータル 2グリコプロテインIの濃度(T)を測定し、トータル 2グリコプロテインIの濃度(T)に対するニック 2グリコプロテインIの濃度(N)の比率(N/T)を算出し、その比率を指標とする、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

濃度測定を免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行う、請求項1又は2に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、脳梗塞を検出する方法に関する。本発明は、特に、脳梗塞患者の診断及び治療後の病態観察に利用することができる。

## 【0002】

本明細書において、「ニック 2グリコプロテインI」とは、プロテアーゼによりアミノ酸配列の一部に開裂を受けて2本のポリペプチド鎖からなるものの、それらがジスルフィ

ド結合により結合している 2 グリコプロテイン I を意味する。

また、本明細書において、プロテアーゼによる開裂を受けていない 2 グリコプロテイン I を、前記の「ニック 2 グリコプロテイン I」と区別する必要がある場合には、「インタクト 2 グリコプロテイン I」と称することがある。従って、本明細書において、単に「 2 グリコプロテイン I」と称する場合には、特に断わらない限り、「インタクト 2 グリコプロテイン I」を指すものとする。

更に、本明細書において、「トータル 2 グリコプロテイン I」とは、前記「ニック 2 グリコプロテイン I」と前記「インタクト 2 グリコプロテイン I」との両方を含む。

#### 【 0 0 0 3 】

##### 【 従来の技術 】

2 グリコプロテイン I は、健常人の血液中に約 200 μg / mL の濃度で存在する糖タンパク質であり、陰性荷電リン脂質と結合する性質を有し、内因系凝固の接触相、 A D P による血小板凝集、活性化第 5 因子やリン脂質依存性プロトロンビナーゼ活性、プロテイン S とその結合タンパクとの相互反応などを抑制して抗凝固活性を示すことが知られている。

また、 2 グリコプロテイン I の一部がプロテアーゼにより開裂を受けたニック 2 グリコプロテイン I では、陰性荷電リン脂質との親和性が、インタクト 2 グリコプロテイン I の親和性から約 1 / 100 以下に低下することが報告されている [ J . E . Huntら , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A , 第 90 卷 , 第 2141 頁 ~ 第 2145 頁 ( 1993 年 ) ] 。様々な病態において、血管内凝固系が活性化されると、これに引き続いて線溶系酵素であるプラスミンが活性化されるので、このプラスミンによって 2 グリコプロテイン I が開裂を受け [ 大藏ら , Blood , 第 91 卷 , 第 4173 頁 ~ 第 4179 頁 ( 1998 年 ) ] 、陰性荷電リン脂質との親和性が低下し、ニック 2 グリコプロテイン I が血液中に遊離してくるものと考えられる。

#### 【 0 0 0 4 】

脳梗塞は血栓による脳動脈の閉塞により生じる疾患であり、日本における死因の第 3 位になっている脳卒中の主病型で死亡率の高い疾患である。

従来から、脳梗塞の診断には C T 検査などによる画像診断がなされているが、これに加えて、血中の脳梗塞特異的な分子マーカーを測定することが可能となれば、脳梗塞の予知や治療後の病態のスクリーニングに有効に活用されるものと考えられる。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【 発明が解決しようとする課題 】

本発明者は、脳梗塞検出可能な方法を開発する目的で鋭意研究したところ、ニック 2 グリコプロテイン I は健常人に比べ脳梗塞患者で有意に高値となること、更に、トータル 2 グリコプロテイン I 濃度に対するニック 2 グリコプロテイン I 濃度の比率も、脳梗塞の診断に有効であることを見出した。

また、従来の凝固線溶系マーカー、例えば、 T A T ( トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 ) 値、 P I C ( プラスミン・ 2 プラスミンインヒビター複合体 ) 値、及び D D ( D - D ダイマー ) 値では、健常人における正常基準値と脳梗塞患者 ( あるいは脳梗塞経験患者 ) の測定値との間に統計学的な有意差が認められない。これに対し、ニック 2 グリコプロテイン I ( 例えば、プラスミンにより開裂を受けたニック 2 グリコプロテイン I ) は、健常人に比べ脳梗塞患者で統計学的に有意に高値となり、更に、トータル 2 グリコプロテイン I 濃度に対するニック 2 グリコプロテイン I 濃度の比率も、健常人に比べ脳梗塞患者で統計学的に有意に高値となるので、ニック 2 グリコプロテイン I 、又はトータル 2 グリコプロテイン I 濃度に対するニック 2 グリコプロテイン I 濃度の比率は、脳梗塞の診断に有効な高感度のマーカーとなる。

本発明は、こうした知見に基づくものである。

#### 【 0 0 0 6 】

##### 【 課題を解決するための手段 】

本発明は、体液試料中のニック 2 グリコプロテイン I の濃度を測定することを特徴とす

10

20

30

40

50

る、脳梗塞を検出する方法に関する。

また、本発明は、体液試料中のニック 2 グリコプロテイン I の濃度 (N) 及びトータル 2 グリコプロテイン I の濃度 (T) を測定し、トータル 2 グリコプロテイン I の濃度 (T) に対するニック 2 グリコプロテイン I の濃度 (N) の比率 (N / T) を算出し、その比率を指標とする、脳梗塞を検出する方法に関する。

更に、本発明の好ましい態様においては、前記の濃度測定を免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行う。

#### 【0007】

本明細書において、「ニック 2 グリコプロテイン I」とは、前記のとおり、プロテアーゼによりアミノ酸配列の一部に開裂を受けて 2 本のポリペプチド鎖からなるものの、それらがジスルフィド結合により結合している 2 グリコプロテイン I を意味する。具体的には、前記「ニック 2 グリコプロテイン I」には、例えば、(1) プラスミンにより第 V ドメインに開裂 (ヒト 2 グリコプロテイン Iにおいては、第 317 番目のリジン残基と第 318 番目のトレオニン残基との間で開裂) を受けたニック 2 グリコプロテイン I、及び(2) 顆粒球エラスターーゼにより第 V ドメインに開裂 (ヒト 2 グリコプロテイン Iにおいては、第 314 番目のアラニン残基と第 315 番目のフェニルアラニン残基との間で開裂) を受けたニック 2 グリコプロテイン I が含まれる。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

本発明方法によれば、脳梗塞を高感度に検出することができる。脳梗塞は、血栓による脳動脈の閉塞により生じる疾患である。頭蓋内外の脳動脈に、狭窄ないし閉塞により、脳循環障害が起こり、その結果、脳組織に非可逆的に損傷が起こることにより脳梗塞となる。脳組織の損傷により、種々の神経症状を呈する。脳梗塞は、生じる血管の閉塞機序により、塞栓性の心原性脳梗塞、血栓性のラクナ梗塞、あるいは前記 2 者に血行力学性因子が加わるアテローム血栓性脳梗塞に分類される。その診断は、従来から、例えば、画像診断 (Computed Tomography, Magnetic Resonance Angiography) 所見及び臨床所見 (神経徵候、等) により行われている [東ら, Medical Technology, 第 29巻 2 号, 第 138 項 ~ 146 項 (2001 年)]。また、脳梗塞 (ラクナ梗塞) の診断への補助的アプローチとして、凝血学的検査として TAT (トロンビン・アンチトロンビン III 複合体) 値、PTC (プラスミン・

2 プラスミンインヒビター複合体) 値、DD (D - D ダイマー) 値の測定が行われている [山口ら, 今日の診断指針, 第 3 版, 医学書院, 第 499 項 ~ 500 項 (1992 年)]。

本明細書において「脳梗塞」とは、例えば、上記の診断方法により診断された疾患病態をいう。また、前記の脳梗塞を経験し、その後の治療経過を観察中の病態も含まれる。

#### 【0009】

本発明方法においては、任意の哺乳動物 (特にヒト) の任意の体液試料を用いることができる。体液試料としては、例えば、血液試料、特に血漿、血清を挙げることができ、特に血漿を用いるのが好ましい。

#### 【0010】

本発明者は、後述する実施例に示すとおり、脳梗塞患者においては、健常人と比較して、体液試料中に含まれているニック 2 グリコプロテイン I の濃度が統計学的に有意に高くなることを見出した。

従って、本発明方法においては、検査対象者から採取した体液試料中に含まれているニック 2 グリコプロテイン I の濃度を測定することによって、脳梗塞を検出することができる。

ニック 2 グリコプロテイン I の濃度は、例えば、免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行うことができる。

#### 【0011】

また、本発明者は、後述する実施例に示すとおり、脳梗塞患者では、健常人と比較して、

10

20

30

40

50

体液試料中においてトータル 2 グリコプロテイン I の濃度 (T) に対するニック 2 グリコプロテイン I の濃度 (N) の比率 (N / T) (すなわち、R 値) が統計学的に有意に高くなることを見出した。

従って、本発明方法においては、検査対象者から採取した体液試料中に含まれているニック 2 グリコプロテイン I の濃度 (N) 及びトータル 2 グリコプロテイン I の濃度 (T) を測定し、トータル 2 グリコプロテイン I の濃度 (T) に対するニック 2 グリコプロテイン I の濃度 (N) の比率 (N / T) (すなわち、R 値) を算出し、そしてその R 値を指標とすることによって、脳梗塞を検出することができる。

ニック 2 グリコプロテイン I の濃度は、例えば、前記の免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行うことができ、トータル 2 グリコプロテイン I の濃度も、同様に、免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行うことができる。 10

#### 【0012】

前記のニック 2 グリコプロテイン I の免疫学的測定は、例えば、特開 2000-28607 号公報に記載の「インタクト 2 グリコプロテイン I と反応しないが、ニック 2 グリコプロテイン I とは反応するモノクローナル抗体」(以下、抗ニック 2 G P I モノクローナル抗体と称することがある) 又はその抗体フラグメントを用いて実施することができる。

前記の抗ニック 2 G P I モノクローナル抗体としては、好ましくは、(1) インタクト 2 グリコプロテイン I とは反応せず、ニック 2 グリコプロテイン I と反応し、しかも、ニック 2 グリコプロテイン I の第 V ドメインに反応する [特に、ヒト 2 グリコプロテイン I における (アミノ末端側から数えて) 第 242 番目のアミノ酸残基 ~ 第 326 番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する] モノクローナル抗体、より好ましくは、ハイブリドーマ N G P I - 59 (F E R M P - 16892) から分泌されるモノクローナル抗体 N G P I - 59、あるいは、(2) インタクト 2 グリコプロテイン I とは反応せず、ニック 2 グリコプロテイン I と反応し、しかも、ニック 2 グリコプロテイン I の第 I ドメイン ~ 第 IV ドメインからなる領域に反応する [特に、ヒト 2 グリコプロテイン I における (アミノ末端側から数えて) 第 1 番目のアミノ酸残基 ~ 第 241 番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する] モノクローナル抗体、より好ましくは、ハイブリドーマ N G P I - 60 (F E R M P - 16893) から分泌されるモノクローナル抗体 N G P I - 60 を挙げることができる。 20 30

#### 【0013】

前記のトータル 2 グリコプロテイン I の免疫学的測定は、例えば、特開 2000-28607 号公報に記載の「インタクト 2 グリコプロテイン I と反応し、しかもニック 2 グリコプロテイン I とも反応するモノクローナル抗体」(以下、抗トータル 2 G P I モノクローナル抗体と称することがある) 又はその抗体フラグメントを用いて実施することができる。

前記の抗トータル 2 G P I モノクローナル抗体としては、インタクト 2 グリコプロテイン I (特には、ヒトイントラクト 2 グリコプロテイン I)、及びニック 2 グリコプロテイン I [特には、第 V ドメインに開裂を受けたヒトニック 2 グリコプロテイン I] と反応し、好ましくはインタクト 2 グリコプロテイン I 及びニック 2 グリコプロテイン I の第 I ドメイン ~ 第 IV ドメインからなる領域 [例えば、ヒト 2 グリコプロテイン I における (アミノ末端側から数えて) 第 1 番目のアミノ酸残基 ~ 第 241 番目のアミノ酸残基からなる領域] にエピトープを有するモノクローナル抗体が好ましく、ハイブリドーマ N G P I - 23 (F E R M P - 16891) から分泌されるモノクローナル抗体 N G P I - 23 がより好ましい。 40

#### 【0014】

抗ニック 2 G P I モノクローナル抗体又は抗トータル 2 G P I モノクローナル抗体の抗体フラグメントとしては、前記の各モノクローナル抗体のフラグメントであって、しかも、もとの各モノクローナル抗体と同じ反応特異性を有する抗体フラグメントを用いることができる。抗体フラグメントには、例えば、F a b、F a b'、F (a b')<sub>2</sub>、又は

Fv等が含まれる。

【0015】

ニック2グリコプロテインIの免疫学的測定法は、例えば、前記の抗ニック2GPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを第1抗体として不溶性担体に固定化し、この固定化された第1抗体と体液試料とを接触させ、続いて、第1抗体とは別種の前記の抗ニック2GPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体、又は前記の抗トータル2GPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体と接触させると、前記の固定化第1抗体-ニック2グリコプロテインI複合体と結合した前記第2抗体又は前記の固定化第1抗体-ニック2グリコプロテインI複合体と結合しなかった前記第2抗体の前記標識からの信号を検出することができる、体液試料中のニック2グリコプロテインIの量を測定することができる(サンドイッチ法)。10

【0016】

また、前記の抗ニック2GPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント少なくとも1種類と、別種の前記の抗ニック2GPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント又は前記の抗トータル2GPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント1種類とを不溶性担体に固定化し、これらの固定化したモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントと体液試料とを接触させると、体液試料中のインタクト2グリコプロテインIとは凝集反応を起こさず、ニック2グリコプロテインIとの間でのみ凝集反応を起こさせることができるので、体液試料中のニック2グリコプロテインIの量を測定することができる(凝集法)。20

【0017】

従って、前記のニック2グリコプロテインIの免疫学的分析方法においては、体液試料を前処理せずに(例えば、クロマトグラフィーの手法で、予めインタクト2グリコプロテインIとニック2グリコプロテインIとを分離操作することなく)、そのまま使用しても、体液試料中に存在するインタクト2グリコプロテインIの妨害を避けることができる。

【0018】

サンドイッチ法を利用するニック2グリコプロテインIの免疫学的分析方法では、具体的には、前記の抗ニック2GPIモノクローナル抗体(例えば、前記のモノクローナル抗体NGPI-59又はモノクローナル抗体NGPI-60)又はその抗体フラグメントを適当な不溶性担体に固定化する(第1抗体)。次に、不溶性担体と体液試料との非特異的結合を避けるために、適当なプロッキング剤[例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)やゼラチン等]で不溶性担体の表面を被覆する。続いて、未希釈の体液試料を加えて一定時間(例えば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(1次反応)。続いて、前記第1次抗体として用いたモノクローナル抗体とは別種の前記の抗ニック2GPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体、又は前記の抗トータル2GPIモノクローナル抗体(例えば、モノクローナル抗体NGPI-23)若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体を加えて一定時間(例えば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(2次反応)。これを適当な洗浄液(例えば、界面活性剤を含む生理食塩水)で洗浄してから、不溶性担体上に存在する標識抗体の量を定量する。その値から、体液試料中のニック2グリコプロテインIの量を算出することができる。また、1次反応と2次反応とを同時にを行うことも可能である。30

【0019】

トータル2グリコプロテインIの免疫学的測定法は、例えば、前記のニック2グリコプロテインIの測定法において、抗ニック2GPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントの代わりに抗トータル2GPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを用いて同様の方法により測定することができる(サンドイッチ法)。40

## 【0020】

前記のサンドイッチ法による免疫学的分析方法に使用することのできる不溶性担体は特に限定されるものでなく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子、その他ニトロセルロース、紙、アガロース及びこれらの組み合わせ等を例示することができる。標識物質としては、酵素、蛍光物質、又は発光物質を使用するのが有利である。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、-D-ガラクトシダーゼ等、また、蛍光物質としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート等、また、発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステル、ルシフェリン等を使用することができる。

10

## 【0021】

凝集反応を利用する免疫学的分析方法において、不溶性担体としては、一般に抗原抗体反応の凝集反応を利用する免疫学的分析方法において用いられる任意の不溶性担体を用いることができる、例えば、ラテックス粒子（特に、ポリスチレンラテックス粒子）を挙げることができる。モノクローナル抗体を不溶性担体に固定化させるには、公知の方法、例えば、化学結合法（架橋剤としてカルボジイミド、グルタルアルデヒド等を用いる）又は物理吸着法を用いることができる。

## 【0022】

前記のニック 2グリコプロテイン I 及びトータル 2グリコプロテイン I の濃度は、例えば、生化学的に測定することもできる。例えば、ニック 2グリコプロテイン I 及びインタクト 2グリコプロテイン I の生化学的測定法は、過塩素酸処理したヒト血漿を、HiTrap-Heparin column を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより分画することで実施することができる [大蔵ら, Blood, 第 91巻, 第 4173 頁～第 4179 頁, (1998 年)]。この際、ニック 2グリコプロテイン I 及びインタクト 2グリコプロテイン I は、それらの溶出位置の違いにより（すなわち、ヘパリンに対するアフィニティーの違いにより）、分離が可能となる。溶出フラクションのタンパク定量を行うことにより、ニック 2グリコプロテイン I 及びインタクト 2グリコプロテイン I のそれぞれの量を測定することができる。前記のニック 2グリコプロテイン I 及びインタクト 2グリコプロテイン I のそれぞれの量からトータル 2グリコプロテイン I の濃度を算出し、これらの値からトータル 2グリコプロテイン I 濃度 (T) に対するニック 2グリコプロテイン I 濃度 (N) の比率 (N / T = R) を求めることができる。

20

## 【0023】

## 【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

## 【実施例 1】

## 《ニック 2グリコプロテイン I の測定》

本実施例では、脳梗塞患者群、及び健常人群におけるニック 2グリコプロテイン I の濃度を測定した。ここで、脳梗塞患者群は、脳梗塞経験者で定期的に経過観察をしている患者である。

40

## 【0024】

前記の脳梗塞患者より採取された血漿検体及び健常人より採取された血漿検体を試料とし、以下の方法にてニック 2グリコプロテイン I の測定を行った。

モノクローナル抗体 NGPI-60 の断片 F (a b')<sub>2</sub> を 10 μg / mL の濃度で含有するトリス緩衝液 A [50 mmol / L Tris-HCl, 0.15 mol / L NaCl (pH 7.5)] 100 μL を 96 ウェル ELISA 用マイクロタイプレート (Immulation-II; 日本ダイナテック株式会社) の各ウェルに入れて、4 °C で 18 時間放置した。そのプレートを洗浄液 W (0.05% Tween-20 : 0.5 mol / L NaCl) で 3 回洗浄した。このようにして抗体を感作したプレートのウェルに、ニッ

50

ク 2グリコプロテインIを200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL及び6.25ng/mLの濃度になるようにトリス緩衝液B [20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 0.05% Tween-20 (pH 7.6)]にそれぞれ添加して調製したスタンダード試料100μL、あるいは、検体血漿を同様のトリス緩衝液Bにて5倍に希釈した検体試料100μLを加え、25で2時間反応させた。

## 【0025】

次に、前記洗浄液W (0.05% Tween-20 - 0.5mol/L NaCl) で3回洗浄した後に、ビオチン標識モノクローナル抗体NGPI-23の断片F (ab')<sub>2</sub>を2μg/mLの量で含有するトリス緩衝液B [20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 0.05% Tween-20 (pH 7.6)] 100μLを加え、25で1時間反応させた。続いて、前記洗浄液W (0.05% Tween-20 - 0.5mol/L NaCl) で3回洗浄した後、トリス緩衝液Bにて2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン(ダコ社)100μLを加え、25で1時間反応させた。前記洗浄液Wで3回洗浄した後、酵素基質液 [10mmol/L フェノール / 0.5mmol/L 4-アミノアンチピリン / 0.005% 過酸化水素を含む50mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl (pH 7.5)] を各ウェルに200μLずつ加え、各ウェルの492nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (MPR A4i型; 東ソー) で測定した。各濃度のスタンダード試料の吸光度をもとに検量線を作製し、この検量線より検体血漿中のニック2グリコプロテインIの濃度を求めた。

## 【0026】

結果を表1及び図1に示す。各群のニック2グリコプロテインI濃度の平均値±SDは、健常人群(44例)が58.60±38.98ng/mL、脳梗塞患者群(63例)が196.69±145.75ng/mLであった。健常人に対して脳梗塞患者群はp<0.001であり、統計学的に有意な差が認められた。

## 【0027】

## 《表1》

	健常人	脳梗塞患者
濃度(ng/mL)	58.60±38.98	196.69±145.75

30

統計学的有意差

健常人 vs 脳梗塞: p<0.001

## 【0028】

## 【実施例2】

## 《トータル2グリコプロテインI及びR値の測定》

本実施例では、脳梗塞患者群、並びに健常人群におけるトータル2グリコプロテインIを測定し、R値を算出した。

40

実施例1と同じ血漿検体を試料として使用し、以下の方法にてトータル2グリコプロテインIの測定を行った。

モノクローナル抗体NGPI-23を5μg/mLの濃度で含有するトリス緩衝液A [50mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl (pH 7.5)] 50μLを96ウェルELISA用マイクロタイタープレート (Immulation-II; 日本ダイナテック株式会社) の各ウェルに入れて、4で18時間放置した。そのプレートを前記洗浄液W (0.05% Tween-20 - 0.5mol/L NaCl) で3回洗浄した。このようにして抗体を感作したプレートのウェルに、インタクト2グリコプロテインIを200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12

50

.5 ng/mL 及び 6.25 ng/mL の濃度になるようにトリス緩衝液 B [ 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.05% Tween-20 (pH 7.6) ] にそれぞれ添加して調製したスタンダード試料 50 μL 及び、検体血漿を同様のトリス緩衝液 B にて 8000 倍に希釈した検体試料 50 μL を加え、25 で 2 時間反応させた。

【0029】

次に、前記洗浄液 W ( 0.05% Tween-20 - 0.5 mol/L NaCl ) で 3 回洗浄した後に、ビオチン標識抗ヒト 2 グリコプロテイン I ウサギポリクローナル抗体 ( セダレーン社 ) を 2.5 μg/mL の量で含有するトリス緩衝液 B [ 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.05% Tween-20 ( pH 7.6 ) ] 50 μL を加え、25 で 1 時間反応させた。続いて、前記洗浄液 W ( 0.05% Tween-20 - 0.5 mol/L NaCl ) で 3 回洗浄した後、トリス緩衝液 B にて 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン ( ダコ社 ) 100 μL を加え、25 で 1 時間反応させた。前記洗浄液 W で 3 回洗浄した後、酵素基質液 [ 10 mmol/L フェノール / 0.5 mmol/L 4-アミノアンチピリン / 0.005% 過酸化水素を含むトリス緩衝液 A [ 50 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl ( pH 7.5 ) ] ] を各ウェルに 200 μL ずつ加え、各ウェルの 492 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー ( MPR A4i 型 ; 東ソー ) で測定した。各濃度のスタンダード試料の吸光度をもとに検量線を作製し、この検量線より検体血漿中のトータル 2 グリコプロテイン I 濃度を求めた。

【0030】

前記実施例 1 で測定したニック 2 グリコプロテイン I 濃度 ( N ) を用いて、本実施例で測定したトータル 2 グリコプロテイン I 濃度 ( T ) に対するニック 2 グリコプロテイン I 濃度 ( N ) の比率 ( N / T = R ) を個々の検体について算出した。その結果を表 2 及び図 2 に示す。健常人に対して脳梗塞患者群では  $p < 0.001$  となり、統計学的に有意な差が認められた。

【0031】

《表 2》

	健常人	脳梗塞患者
R	0.44±0.22	1.30±1.15

統計学的有意差

健常人 vs 脳梗塞 :  $p < 0.001$

【0032】

【実施例 3】

《 TAT、PIC、及び DD 測定値とニック 2 グリコプロテイン I 値の相関性の検定》  
本実施例においては、脳梗塞患者群に関して、従来法によって TAT ( トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 ) 値、PIC ( プラスミン・2 プラスミンインヒビター複合体 ) 値、及び DD ( D-D ダイマー ) 値を測定し、ニック 2 グリコプロテイン I 値との相関性の検討を行った。

本実施例でも、実施例 1 及び 2 で用いた同じ血漿検体を使用した。前記凝固線溶系マーカーの測定は、TAT、PIC、及び DD のいずれに関しても凝集法 ( ヤトロン ) を使用した。

【0033】

その結果、ニック 2 グリコプロテイン I との相関は、それぞれ以下の通りであった。

TAT 値 :  $r = 0.017$  、

PIC 値 :  $r = -0.028$  、

10

20

30

40

50

DD 値 :  $r = -0.018$ 。

すなわち、いずれの測定値ともニック 2 グリコプロテイン I との相関性は認められなかった。

【0034】

【実施例 4】

《脳梗塞患者群の TAT、PIC、及び DD 測定値における正常基準値との比較》

実施例 3 で測定した TAT、PIC 及び DD 測定値を用いて、これらの値と正常基準値（各試薬の添付文書に記載された参考基準値による）との比較を行った。結果を表 3 に示す。

【0035】

《表 3》

	基準値	脳梗塞患者
TAT	〈 3 ng/mL	1.87±3.59 ng/mL
DD	〈 1 μg/mL	0.84±1.34 μg/mL
PPi	〈 0.8 μg/mL	1.36±1.02 μg/mL

【0036】

その結果、脳梗塞患者群における TAT、PIC 及び DD の値はいずれも正常基準値とほとんど統計学的有意差が認められなかった。

【0037】

【発明の効果】

本発明方法によれば、脳梗塞を高感度で検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明方法によるサンドイッチ酵素免疫測定法により測定した血漿検体中のニック 2 グリコプロテイン I (ニック 2 G P I ) 濃度の値を、健常人及び脳梗塞患者群別に示した棒グラフである。

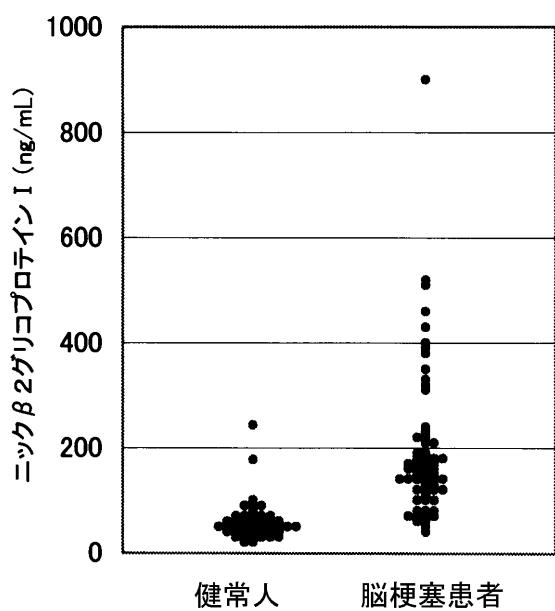
【図 2】本発明方法によるサンドイッチ酵素免疫測定法にて測定した血漿検体中のニック 2 グリコプロテイン I 濃度及びトータル 2 グリコプロテイン I 濃度から算出した比率 R を、健常人及び脳梗塞患者群別に示した棒グラフである。

10

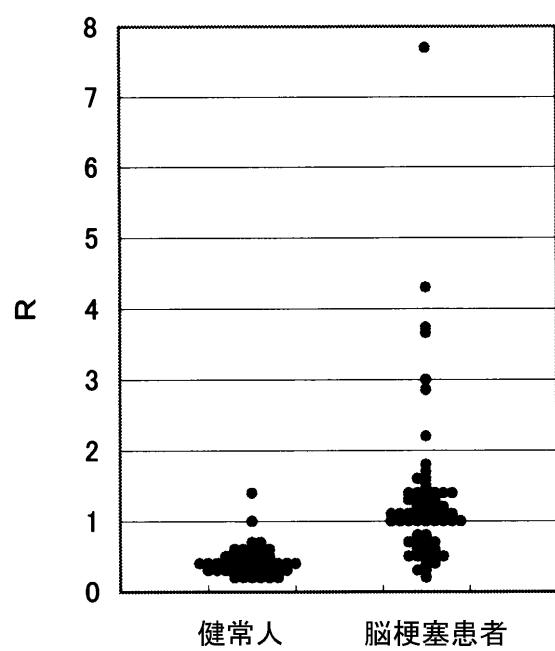
20

30

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(72)発明者 田中 英之  
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(72)発明者 風早 由美子  
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 Hisao Kato, et al., Generation of nicked form of domain V in 2 Glycoprotein I by plasmid: Its in vivo significance., LUPUS, 1998年, NO.SUPPL.2, P.S174  
小池隆夫, 抗リン脂質抗体症候群, 炎症, 2000年, VOL.20, NO.5, P.571-580