

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-107931

(P2012-107931A)

(43) 公開日 平成24年6月7日(2012.6.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15	Z
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2010-255865 (P2010-255865)	(71) 出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都港区芝4丁目14番1号
(22) 出願日	平成22年11月16日 (2010.11.16)	(71) 出願人	504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
		(71) 出願人	505256685 一般社団法人久山生活習慣病研究所 福岡県糟屋郡久山町大字久原1822-1
		(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B c l - X L蛋白質による脳梗塞の検査方法

(57) 【要約】

【課題】脳梗塞を簡便で効率よく検査することのできる方法を提供すること。

【解決手段】被検動物より採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の診断のための検査方法、および脳梗塞の病型診断のための検査方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検動物より採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の診断のための検査方法。

【請求項 2】

被検動物より採取された血液試料が、脳梗塞様症状の発症直後から発症後20日目の間のいずれかの時期において被検動物より採取されたものであることを特徴とする請求項 1 に記載の脳梗塞の診断のための検査方法。

【請求項 3】

被検動物より採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の病型診断のための検査方法。

10

【請求項 4】

病型診断が、ラクナ梗塞、アテローム血栓性、心原性脳塞栓症、大動脈原性脳塞栓症、Branch atheromatous disease、動脈解離、分類不能のいずれかを診断するものである請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 5】

脳梗塞の予防薬もしくは治療薬が投与された脳梗塞の予防もしくは治療を必要とする動物から採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の予防もしくは治療効果の評価方法。

【請求項 6】

被検体と脳梗塞の予防薬または治療薬の候補化合物を接触させた後、該被検体中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、脳梗塞の予防薬または治療薬のスクリーニング方法。

20

【請求項 7】

Bcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定し得る試薬を含んでなる、脳梗塞検査用、脳梗塞治療効果評価用、または脳梗塞予防・治療薬候補化合物のスクリーニング用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脳梗塞の検査方法、脳梗塞治療または予防効果の評価方法、脳梗塞の予防薬または治療薬のスクリーニング方法、および脳梗塞検査用、脳梗塞治療効果評価用または脳梗塞予防・治療薬候補化合物スクリーニング用のキットに関するものである。

30

【背景技術】

【0002】

脳卒中とは、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害の総称である。これら脳卒中の病型のうち、最近では脳梗塞が相対的に増加してきている。脳梗塞急性期の薬物療法としては血栓溶解療法、抗凝固療法、抗血小板療法、脳保護薬投与などが用いられ、重篤な患者や出血性脳梗塞を起こした患者に対しては外科的手術が行われる。脳梗塞の症状は急性期にもっとも強く、その後徐々に改善していく。これは、壊死に陥った脳組織が腫脹して、周囲の脳組織も圧迫・障害していることによる。腫脹が引いていくとともに、周囲の組織が機能を回復して症状は固定していくのである。ただし、脳虚血部位から放出されるフリーラジカルは周囲の組織をも壊死させる働きがあるため急性期を過ぎても機能予後の向上につなげるため継続的な治療が必要とされている。

40

【0003】

脳梗塞の臨床病型には、脳内小動脈が閉塞して発症するラクナ梗塞、脳内大動脈が粥腫で閉塞して発症するアテローム血栓性脳梗塞、心臓内の血栓が栓子となり脳内動脈を閉塞して発症する心原性脳塞栓症等がある。これらの臨床病型により急性期及び慢性期の適切な治療法が異なるため、脳梗塞患者の臨床病型を迅速に診断する方法が求められていた。

脳梗塞の臨床病型の分類方法としては、臨床症候の観察と心エコー、MRI、MRA、頸部血管エコー等を施行してTOAST分類に準拠した脳梗塞臨床診断のフローチャート（非特許文

50

献 1) 等により分類する方法や、分子マーカーを用いた方法、具体的には、CRP、D-Dimer、RAGE、MMP-9、S100B、BNP等の分子マーカーを脳梗塞発症24時間以内に同時測定した結果、BNPとD-Dimerで、特定のカットオフ値を設定すると、心原性脳塞栓症を他病型と分類できること(非特許文献2)などが開示されているが、さらに迅速で確実な病型診断が可能となる分子マーカーが求められていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Lee, L.J. et al., Stroke, 1081-1089 (2000)

【非特許文献2】Montaner et al., Stroke, 2280-2287(2008)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記の問題点に鑑み、脳梗塞患者などの血清や血漿等を用いて迅速かつ確実な脳梗塞の検査を行う方法、及び脳梗塞治療効果の評価方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、前述の課題を解決すべく鋭意検討した結果、患者血漿中の、Bcl-XL蛋白質が、健常者、あるいは病型の異なる患者の血漿中のその濃度の間で異なるという知見を得、Bcl-XL蛋白質の量が脳梗塞の検査のための有用な指標となることを見出して、本発明を完成するに至った。

20

【0007】

即ち、本発明は以下を要旨とする。

[1] 被検動物より採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の診断のための検査方法。

[2] 被検動物より採取された血液試料が、脳梗塞様症状の発症直後から発症後20日目の間のいずれかの時期において被検動物より採取されたものであることを特徴とする[1]に記載の脳梗塞の診断のための検査方法。

[3] 被検動物より採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の病型診断のための検査方法。

30

[4] 病型診断が、ラクナ梗塞、アテローム血栓性、心原性脳塞栓症、大動脈原性脳塞栓症、Branch atheromatous disease (BAD)、動脈解離、分類不能のいずれかを診断するものである[3]に記載の検査方法。

[5] 脳梗塞の予防薬もしくは治療薬が投与された脳梗塞の予防もしくは治療を必要とする動物から採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の予防もしくは治療効果の評価方法。

[6] 被検体と脳梗塞の予防薬または治療薬の候補化合物を接触させた後、該被検体中のBcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、脳梗塞の予防薬または治療薬のスクリーニング方法。

40

[7] Bcl-XL蛋白質の蛋白質量を測定し得る試薬を含んでなる、脳梗塞検査用、脳梗塞治療効果評価用、または脳梗塞予防・治療薬候補化合物のスクリーニング用キット。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、脳梗塞患者の血漿中の濃度が、健常者、あるいは病型の異なる患者の血漿中のその濃度と異なるBcl-XL蛋白質が脳梗塞検査用分子マーカー(本明細書中ではこれを「Bcl-XL蛋白質マーカー」と称することがある)として提供される。Bcl-XL蛋白質マーカーを単独で、あるいは他の脳梗塞分子マーカーと組み合わせるにより脳梗塞の迅速、確実な診断、あるいは脳梗塞の病型の分類を行うことが可能となる。

【発明を実施するための形態】

50

【0009】

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

(1) 脳梗塞検査方法

本発明の第1は、被検動物より採取された血液試料中の、Bcl-XL蛋白質量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の検査方法である。

【0010】

本明細書において、「脳梗塞」とは、脳動脈が血栓または塞栓によって閉塞し虚血状態となり、脳組織が壊死および障害される疾患であり、脳内小動脈が閉塞して発症するラクナ梗塞、脳内大動脈が粥腫で閉塞して発症するアテローム血栓性脳梗塞、心臓内の血栓が栓子となり脳内動脈を閉塞して発症する心原性脳塞栓症、上行大動脈から大動脈弓部にできた粥状硬化巣から栓子が解離して脳内動脈を閉塞して発症する塞栓症である大動脈原性脳塞栓症、主幹動脈にできたプラークが穿通枝の入口部を閉塞することによって生じる穿通枝領域の梗塞である「Branch atheromatous disease」（以下、「BAD」と称することがある）、脳血管の内膜が損傷し血液が動脈壁内に侵入して脳血管を閉塞する動脈解離のいずれをも含む。また、脳梗塞でも急性期、亜急性期、回復期（慢性期）等のいずれをも含む。

10

【0011】

本明細書において「Bcl-XL蛋白質」とは、本発明の検査法において血液試料中の含有量を測定する対象であるBcl-XL蛋白質を意味し、被検動物に由来する蛋白質であればよいが、ヒト由来の蛋白質として具体的には、下述する特定のアミノ酸配列で示される蛋白質が例示される。さらに、これらと同様の機能を有する蛋白質の断片、誘導体、および変異体も包含される。

20

【0012】

上記検査方法において、「被検動物」は、脳梗塞を起こす可能性のある動物であれば如何なるものでもよく、具体的には、ヒト、サル、あるいはラット等のげっ歯類等が挙げられる。本発明の脳梗塞の検査方法は、このうち、脳梗塞の疑いのあるヒト、あるいは脳梗塞発症後のヒト等において特に好ましく行われる。

【0013】

また、上記被検動物から採取された「血液試料」としては、Bcl-XL蛋白質を含有し、その濃度を測定できるものであれば特に制限はないが、具体的には、EDTA血漿、クエン酸血漿等の血漿、血清、全血の何れでもよいが、これらのうち、EDTA血漿が簡便に採取でき、保存が容易で且つ採取量が多いため好ましく用いられる。被検動物から該血液試料を採取するために採血するタイミングは、脳梗塞の診断を行うタイミングであればいずれのタイミングでもよい。脳梗塞は、発症後刻々と症状や病態が変化するので、具体的には以下で詳述する。

30

【0014】

本発明の検査法において、被検動物から採取した血液試料中の含有量を測定する対象であるBcl-XL蛋白質とは、ヒトの場合には、UniProtKBのEntry Name B2CL1_HUMANで示されるアミノ酸配列からなる蛋白質である。例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースなどにおいて上記Entry Nameを入力することで配列情報を得ることができる。上記アミノ酸配列はヒトのものであるが、被検動物が異なる場合には、該動物由来のホモログ蛋白質が測定対象の蛋白質となる。

40

【0015】

上記蛋白質の血液試料中の含有量の測定方法としては、該蛋白質の含有量が測定できる方法であれば特に制限はないが、例えば、該蛋白質の抗体を用いた既存の免疫測定法や、クロマトグラフィー技術と飛行時間型質量分析 (TOF-MS) を組み合わせて、クロマト担体 (例：カチオン交換体、アニオン交換体、疎水性クロマト担体、金属イオンなど) に一定条件下で捕捉されるすべての成分の質量を一括して測定する方法、二次元ゲル電気泳動法等が用いられる。免疫測定法としては、酵素免疫定量法に従い定量検出する方法や、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法等で測定する方法等が好ましい。酵素免疫定量法は、標

50

識イムノアッセイ法のうち、酵素を標識物質として用いる検出方法である。また、イムノソルベントを用いる、enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法を選択するのが、特に好適である。また、ELISAのうちサンドイッチ法は、操作の簡便性、経済上の利便性、とりわけ臨床検査における汎用性を考慮すると、特に好適な測定態様の一つとして挙げられる。これらの測定方法は、例えば、新生化学実験講座(日本生化学会編;東京化学同人)、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory (2001))、Antibodies - A Laboratory Manual(E.Harlow, et al., Cold Spring Harbor Laboratory(1988))等の一般的実験書に記載の方法又はそれに準じて行うことができる。

【0016】

上記測定を行う際に用いられる抗体等(抗体断片を含む)は、対象のBcl-XL蛋白質を抗原として公知の方法によって得ることができる。ただし、対象のBcl-XL蛋白質を抗原として製造されたものである必要はなく、該蛋白質と少なくとも交差反応性を示し、その含有量を測定することができるものであれば何れのものでもよい。このような免疫測定法、及びそれに用いられる抗体としては、例えばR&D社製のHuman/Mouse Total Bcl-XLキット(カタログNo. DYC894-5)に付属の抗体等が好ましく用いられる。

【0017】

本発明の方法で使用する血液試料は、被検動物から採取直後のものを上記測定に用いることが好ましいが、保存したものをを用いてもよい。血液試料の保存方法としては、脳梗塞検査用分子マーカー量が変化しない条件であれば特に制限は無いが、例えば0~10の凍結しない程度の低温条件、暗所条件および無振動条件下が好ましい。止むをえず凍結する場合には、深凍結などマーカー分子の分解や酸化反応等を避けられる方法が好ましい。

【0018】

本発明の検査方法においては、被検動物から採取された血液試料(本明細書中では、これを「検体」と称することがある)中の上記Bcl-XL蛋白質マーカーの含有量を測定して、これを指標として、脳梗塞を検査することができる。また、既存の脳梗塞マーカーであるCRPやD-Dimer等の検体中含有意量とを組み合わせることや、臨床症候の観察と心エコー、MRI、MRA、頸部血管エコー等の結果とを関連付けた複合指標を用いることで、よりの確に検査することが可能である。

【0019】

上記脳梗塞検査用分子マーカーの検体中の含有量を指標として上記脳梗塞検査を行う場合には、脳梗塞検査用分子マーカーの検体中の含有量の絶対値を健常者(健常動物)のそれと比較してもよいし、適当なカットオフ値を規定して検査する方法でもよい。健常者の上記脳梗塞検査用マーカーの血液試料中の含有量は、予め脳梗塞でないことを臨床的に確認された健常者から血液を採取し、被検動物から採取した血液と同様の処理及び測定を行って定量することにより得ることができる。臨床的に各種脳梗塞を確認する方法は特に制限がないが、例えば頭部X線CT、頭部MRI、MRA、脳血管造影、頸部血管エコー等の機器診断方法等から確認する方法等が挙げられる。

【0020】

カットオフ値とは、ある物質に着目して目的とする疾患群と非疾患群(目的の疾患以外の群)とを判定する場合に定める値をいう。目的とする疾患と非疾患とを判定する場合に、カットオフ値以下であれば陰性、カットオフ値以上であれば陽性として、またはカットオフ値以下であれば陽性、カットオフ値以上であれば陰性として疾患を判定することができる(金井正光編、臨床検査法提要 金原出版株式会社)。

【0021】

カットオフ値の臨床的有用性を評価する目的で用いられる指標としては、感度と特異度が挙げられる。ある母集団をカットオフ値を用いて判定し、疾病患者のうち、判定で陽性とされたものをa(真陽性)、疾病患者でありながら判定で陰性とされたものをb(偽陰性)、疾病患者でないにも関わらず判定で陽性とされたものをc(偽陽性)、疾病患者でなく判定で陰性とされたものをd(真陰性)と表したときに、 $a / (a + b)$ で表される

10

20

30

40

50

値を感度（真陽性率）、 $d / (c + d)$ で表される値を特異度（真陰性率）として表すことができる。

【0022】

目的とする疾患群と非疾患群との測定値の分布は通常、一部重複する。したがって、カットオフ値を上下させることにより、感度と特異度は変化する。カットオフ値を下げることにより感度は高くなるが、特異度は低下し、カットオフ値を上げることにより感度は低くなるが、特異度は上がる。判定方法としては、感度と特異度の両者の値が高いほうが好ましい。また、感度と特異度の値が0.5を超えない判定方法は、有用とは認められない。

【0023】

カットオフ値を設定する方法としては、非疾患群の分布の95%を含む、中央からの両端のいずれかの値をカットオフ値として設定する方法、非疾患群の分布が正規分布を示す場合、平均値+2倍の標準偏差(SD)または平均値-2SDをカットオフ値として設定する方法等が挙げられる。

【0024】

また、一般に、診断方法が有用かどうかを判定するためには、前述のように設定されたカットオフ値によって感度と特異度が変化するため、単純にあるカットオフ値での感度と特異度で評価するよりも、カットオフ値を上下させたときに感度や特異度が高く保たれるような指標、例えばROC曲線のAUC値で評価するのが望ましい。ROC曲線のAUC値は感度と特異度が両方100%になるようなカットオフ値が存在する場合に1になり、診断性能が良くない場合に0.5に近づく。したがって、ある診断方法の性能をROC曲線のAUC値で判断する場合には0.7以上であれば該方法は診断方法として適当であると評価することが可能である。本発明に記載のBcl-XL蛋白質マーカーについても、ROC曲線のAUC値0.7以上であったので、後述する脳梗塞検査方法に用いられるものである。

【0025】

(1-1) Bcl-XL蛋白質マーカーを用いた脳梗塞検査方法

本発明のBcl-XL蛋白質マーカーを用いた脳梗塞検査方法の具体的方法として、健常者と脳梗塞患者を区別するための検査方法が挙げられる。この場合の検体の取得のタイミングは、脳梗塞様症状の発症直後から特に制限はないが、発症直後から発症後20日目までが診断を行う意味からも好ましい。特に好ましいタイミングとしては、発症後6日目~16日目の間である。採取された検体中の上記Bcl-XL蛋白質マーカーの含有量を測定して、この絶対値を健常者（健常動物）のそれと比較してもよいし、上記の方法で適当なカットオフ値を規定して検査する方法でもよい。脳梗塞が疑われる被検者から採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質マーカーの含有量の絶対値が、健常者（健常動物）のそれより高い場合や、カットオフ値より高い場合に、該被検者は脳梗塞患者であると判定することができる。健常者の上記脳梗塞検査用マーカーの血液試料中の含有量は、予め脳梗塞でないことを臨床的に確認された健常者から血液を採取し、被検動物から採取した血液と同様の処理及び測定を行って定量することにより得ることができる。臨床的に各種脳梗塞を確認する方法は特に制限がないが、例えば頭部X線CT、頭部MRI、MRA、脳血管造影、頸部血管エコー等の機器診断方法等から確認する方法等が挙げられる。また、既存の脳梗塞マーカーであるCRPやD-Dimer等の検体中含有意量とを組み合わせることや、臨床症候の観察と心エコー、MRI、MRA、頸部血管エコー等の結果とを関連付けた複合指標を用いることで、よりの確に検査することが可能である。

【0026】

(1-2) Bcl-XL蛋白質マーカーを用いた脳梗塞病型検査方法

本発明のBcl-XL蛋白質マーカーを用いた脳梗塞検査方法の具体的方法として、脳梗塞の病型を区別するための検査方法が挙げられる。病型とは、それ自体既知の臨床的に区別されている病型を意味し、具体的には、「ラクナ梗塞」（本明細書中では「ラクナ」と称することがある）、「アテローム血栓性脳梗塞」（本明細書中では、「アテローム血栓性」

10

20

30

40

50

と称することがある)、「心原性脳塞栓症」(本明細書中では、「心原性脳塞栓」と称することがある)、上行大動脈から大動脈弓部にできた粥状硬化巣から栓子が解離して脳内動脈を閉塞して発症する塞栓症である「大動脈原性脳塞栓症」、主幹動脈にできたプラークが穿通枝の入口部を閉塞することによって生じる穿通枝領域の梗塞である「Branch atheromatous disease」(以下、「BAD」と称することがある)、脳血管の内膜が損傷し血液が動脈壁内に侵入して脳血管を閉塞する動脈解離あるいはそれらのいずれにも該当しない病型(以下、これを「分類不能型」と称することがある)が挙げられる。

【0027】

検体中に含まれるBcl-XL蛋白質量を測定することにより脳梗塞の病型を区別するためには、まず、血液試料中のBcl-XL蛋白質量において、各病型を区別し得るカットオフ値を上

10

【0028】

述の方法により決定し、検体中のBcl-XL蛋白質量を該カットオフ値と比較して、いずれの病型群に入るかを判断することにより行われる。

本発明の血液試料中に含まれるBcl-XL蛋白質量により区別し得る病型としては、両病型群の間でBcl-XL蛋白質含有量によりお互いが区別されるカットオフ値を設定し得るものであれば特に制限はないが、具体的には、例えば、表1に示すように「アテローム血栓性脳梗塞」と「大動脈原性脳塞栓症」、「心原性脳塞栓症」と「大動脈原性脳塞栓症」、「心原性脳塞栓症」と「動脈解離」、「ラクナ梗塞」と「大動脈原性脳塞栓症」、「ラクナ梗塞」と「動脈解離」、「大動脈原性脳塞栓症」と「分類不能型」、「BAD」と「分類不能型」、「大動脈原性脳塞栓症」と「BAD」、「心原性脳塞栓症」と「動脈原性脳塞栓症」、

20

【0029】

「大動脈原性脳塞栓症」とそれ以外の病型、「動脈解離」とそれ以外の病型等が挙げられる。

これらの測定を行う場合の検体の取得のタイミングは、脳梗塞様症状の発症直後から特に制限はないが、表1に好ましいタイミングを示す。

【0030】

【表1】

表1

区別可能な病型群	Group1	アテローム	心原性脳塞栓症	心原性脳塞栓症	ラクナ	ラクナ	大動脈原性脳塞栓症	BAD	大動脈原性脳塞栓症	心原性脳塞栓症	大動脈原性脳塞栓症	動脈解離
	Group2	大動脈原性脳塞栓症	大動脈原性脳塞栓症	動脈解離	大動脈原性脳塞栓症	動脈解離	分類不能型	分類不能型	BAD	動脈原性脳塞栓症	アテローム血栓性、心原性脳塞栓症、ラクナ、動脈解離、BAD、分類不能型	アテローム血栓性、心原性脳塞栓症、ラクナ、大動脈原性脳塞栓症、BAD、分類不能型
検体取得の好ましいタイミング		発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目	発症直後～20日目
検体取得の特に好ましいタイミング		発症直後～5日目	発症直後～5日目	発症直後～5日目	発症直後～5日目	発症直後～5日目	発症直後～5日目	発症3日目～9日目	発症直後～9日目	発症直後～9日目	発症直後～5日目	発症直後～5日目

30

40

【0031】

本発明の測定方法では、予め、上記の区別される病型と臨床的に判断された患者の血液試料中のBcl-XL蛋白質量を測定し、上記の方法で、両病型群を区別するカットオフ値を設定する。採取された検体中の上記Bcl-XL蛋白質マーカーの含有量を測定して、この絶対値を、上記の方法で設定されたカットオフ値と比較することによっていずれの病型に検体を採取した被検者(動物)が含まれるかを判断することができる。

【0032】

50

また、上記病型の検査を行う場合には、既存の脳梗塞マーカーであるCRPやD-Dimer等の検体中含有量とを組み合わせることや、臨床症候の観察と心エコー、MRI、MRA、頸部血管エコー等の結果とを関連付けた複合指標を用いることで、よりの確に検査することが可能である。

【0033】

(2) 脳梗塞測定用キット

本発明は、さらに上記脳梗塞検査に用いるためのキット、あるいは下述する脳梗塞の予防もしくは治療効果の評価、あるいは脳梗塞予防もしくは治療薬のスクリーニング方法を行うためのキットも含まれる。キットの内容は、機器または試薬の組み合わせにより構成されるが、以下に述べる各構成要素と本質的に同一、またはその一部と本質的に同一な物質が含まれていれば、構成または形態が異なっていても、本発明のキットに包含される。試薬としては、例えば、免疫測定法によりBcl-XL蛋白質マーカーを測定する場合には、抗Bcl-XL蛋白質マーカー抗体を含む。また、必要に応じ、生体試料の希釈液、抗体固定化固相、反応緩衝液、洗浄液、標識された二次抗体またはその抗体断片、標識体の検出用試薬、標準物質なども含まれる。生体試料の希釈液としては、界面活性剤、緩衝剤などにBSAやカゼインなどの蛋白質を含む水溶液などが挙げられる。

10

【0034】

抗体固定化固相としては、各種高分子素材を用途に合うように整形した素材に、抗分子マーカー抗体またはそれらの抗体断片を固相化したものが用いられる。形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックスなどの微粒子、スティック等が、素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックスや金属等が挙げられる。抗体の固相化の方法としては物理的方法と化学的方法またはこれらの併用方法等、公知の方法が挙げられる。例えば、ポリスチレン製96ウェルの免疫測定用マイクロプレートに抗体または抗体断片等を疎水固相化したものが挙げられる。

20

【0035】

反応緩衝液は、抗体固定化固相の抗体と生体試料中の抗原とが結合反応をする際の溶媒環境を提供するものであればいかなるものでもよいが、界面活性剤、緩衝剤、BSAやカゼインなどの蛋白質、防腐剤、安定化剤、反応促進剤等を含む反応緩衝液が挙げられる。

30

【0036】

標識された二次抗体またはその抗体断片としては、本発明に用いられる抗体または抗体断片に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼなどの標識用酵素をラベルしたもの、緩衝剤、BSAやカゼインなどの蛋白質、防腐剤などを混合したものが用いられる。

【0037】

標識体の検出用試薬としては前記の標識用酵素に応じて、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼであれば、テトラメチルベンジジンやオルトフェニレンジアミンなどの吸光測定用基質、ヒドロキシフェニルプロピオン酸やヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光基質、ルミノールなどの発光基質が、アルカリホスファターゼであれば、4-ニトロフェニルフォスフェートなどの吸光度測定用基質、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどの蛍光基質等が挙げられる。

40

【0038】

(3) 脳梗塞の予防もしくは治療効果の評価方法

本発明の第2の態様は、脳梗塞の予防薬もしくは治療薬が投与された脳梗塞の予防もしくは治療を必要とする動物から採取された血液試料中のBcl-XL蛋白質マーカーの量を測定する工程を含む、該動物における脳梗塞の予防もしくは治療効果の評価方法である。

【0039】

脳梗塞の予防もしくは治療を必要とする動物とは、具体的には、脳梗塞の症状を示すヒトあるいは(1)記載の動物(これらを単に「被検者」と称することがある)や、上記(

50

1)の方法により脳梗塞と診断された患者等が挙げられる。

【0040】

脳梗塞予防もしくは治療薬とは、脳梗塞予防または治療薬として用いられているものであればいずれのものでもよいが、例えば、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーターの等血栓溶解剤、ヘパリン等の抗凝固剤、サイクロオキシゲナーゼ阻害薬、フォスフォリジエステラーゼ阻害薬、スロンボキセンA2(TXA2)合成阻害薬等の抗血小板剤、フリーラジカルスカベンジャー等の脳保護薬等が挙げられる。

【0041】

脳梗塞の予防薬もしくは治療薬が投与された脳梗塞の予防もしくは治療を必要とする動物から採取された血液試料におけるBcl-XL蛋白質マーカー量が、投与前の量に比べて増加又は減少するか、あるいは、脳梗塞を発症していない対照の動物における量に近づいた場合、予防または治療効果があったと判定することができる。

10

病型により治療する脳梗塞予防もしくは治療薬が異なるため、Bcl-XL蛋白質マーカーで病型診断を行えば患者に対して適切な治療を施すことが可能となる。例えば、ラクナ梗塞と診断されればスロンボキセンA2(TXA2)合成阻害薬で治療を行い、サイクロオキシゲナーゼ阻害薬で脳梗塞の再発を予防できる。

【0042】

(4)脳梗塞予防もしくは治療薬のスクリーニング方法

本発明の第3の態様は、被検体と脳梗塞の予防薬もしくは治療薬の候補化合物を接触させた後、該被検体の血液試料中のBcl-XL蛋白質マーカー量を測定する工程を含む、脳梗塞の予防もしくは治療薬のスクリーニング方法である。

20

【0043】

被検体とは、Bcl-XL蛋白質マーカーの含有量が、脳梗塞状態と同様の異常を示す非ヒト動物個体、組織、細胞等が用いられる。脳梗塞の症状を有する動物としては、例えば、外科的手法等で脳梗塞状態を形成させた脳梗塞モデル非ヒト動物(Yuji Kuge, Kazuo Minematsu et al. Nylon Monofilament for Intraluminal Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. Stroke, 26, 1655 (1995))等が挙げられる。被検体とともに、対照として被検体と同種の個体、組織、細胞等でBcl-XL蛋白質マーカーの含有量が、健常状態と同様(正常)であるものを用いることも好ましい。

Bcl-XL蛋白質マーカーをもとに、脳梗塞状態の非ヒト動物個体でヒトにおけるある病型に類似した病態を構築できれば、ある病型の脳梗塞患者における治療薬を開発するための実験系を確立することができる。

30

【0044】

これらの被検体に接触させる脳梗塞予防もしくは治療薬候補化合物(以下、「候補化合物」と称することがある)としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、低分子合成化合物などが挙げられ、これらの化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。また、これらの化合物を含む、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などでもよい。

その投与量、投与方法、処理時間等は、用いる被検体に従って適宜選択すればよい。

【0045】

40

候補化合物と接触させた後に、該被検体中のBcl-XL蛋白質マーカーの含有量を測定する方法としては、各被検体に適した方法により行うことができる。例えば、被検体が細胞の場合には、公知の方法に従って細胞抽出液に調製し、これを試料として用いてもよいし、細胞を培養プレートやスライドガラス上に固定化し、これを試料として用いてもよい。例えば、細胞抽出液を調製してこれを試料とする場合には、ELISA法等により検出を行うことができる。これらの試料は、検出の結果得られた数値を正確に比較・解析できるように、あらかじめ抽出に用いる細胞数をそろえるか、精製されたRNA量又は抽出された蛋白質量をそろえることが好ましい。

候補化合物と接触させた被検体におけるBcl-XL蛋白質マーカーの量が、接触前の量に比べて増加、又は減少するか、あるいは、対照の被検体における量に近づいた場合、該候補

50

化合物は脳梗塞の予防または治療効果を有すると判定することができる。

【実施例】

【0046】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0047】

実施例1 Bcl-XL蛋白質マーカーを用いた健常者と脳梗塞患者を判別するための検査方法の評価

脳梗塞発症7日後(表中「DAY7」と記載されている)の時点の脳梗塞患者と健常者(それぞれ表2中に記載の人数)から採血を行い、EDTA血漿を取得した。R&D社のHuman/Mouse Total Bcl-XL(カタログNo. DYC894-5)を用いた免疫測定法により、EDTA血漿中のBcl-XL蛋白質濃度を測定した。具体的にはキットに付属の標準品であるBcl-XL蛋白質を用いて検量線を作成し、この検量線からBcl-XL蛋白質の濃度を算出した。

10

【0048】

次に各採血時点において判別性能を評価するために、Fawcett, T. (2004) ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Researchers に記載の方法に従い ROC 曲線の AUC 値を算出した。その結果を表2に示す。それぞれの採血時点において、0.7を上回ったものが脳梗塞患者と健常者の判別するための検査方法として有用であることが示される。つまり、発症7日目の脳梗塞患者から血液を取得して、健常者と血漿中のBcl-XL蛋白質の濃度を比較することにより健常者と脳梗塞患者を判別するための検査が行えることが

20

【0049】

【表2】

表2

Group1	脳梗塞
Group2	健常
DAY7	
AUC of ROC curve	0.719
Number of group1	102
Number of group2	71

30

【0050】

実施例2 Bcl-XL蛋白質マーカーを用いた脳梗塞病型を判別するための検査方法の評価

脳梗塞の各病型に診断が確定している患者、具体的には、「ラクナ梗塞」(表中では「ラクナ」と称する)、「アテローム血栓性脳梗塞」(表中では、「アテローム血栓性」と称する)、「心原性脳塞栓症」(表中では、「心原性脳塞栓」と称する)、「大動脈原性脳塞栓症」(表中では、「大動脈原性脳塞栓」と称する)、「Branch atheromatous disease」(表中では「BAD」と称する)、「動脈解離」(表中では、「動脈解離」と称する)、「動脈原性脳塞栓症」(表中では、「動脈原性脳塞栓」と称する)、あるいはそれらのいずれにも該当しない病型(表中では「分類不能型」と称する)の患者について、脳梗塞発症直後(表中「DAY0」と記載されている)、発症7日後(表中「DAY7」と記載されている)、時点で採血を行い(それぞれ表3中に記載の人数)からそれぞれEDTA血漿を取得した。

40

該血漿中のBcl-XL蛋白質の濃度を実施例1の方法と同様に測定し、該測定値から実施例1と同様にROC 曲線の AUC 値を算出した。

それぞれの採血時点において、0.7を上回ったものが脳梗塞患者の病型を判別するための検査方法として有用であることが示される。

【0051】

つまり、発症直後の各病型患者の血漿中のBcl-XL蛋白質の濃度を比較することにより、「アテローム血栓性脳梗塞」と「大動脈原性脳塞栓症」の病型の脳梗塞患者を判別するた

50

めの検査を行うことができ、また、同じ比較において「心原性脳塞栓症」と「大動脈原性脳塞栓症」の病型の脳梗塞患者の判別、「心原性脳塞栓症」と「動脈解離」の病型の脳梗塞患者の判別、「ラクナ梗塞」と「大動脈原性脳塞栓症」の病型の脳梗塞患者の判別、「ラクナ梗塞」と「動脈解離」の病型の脳梗塞患者の判別、「大動脈原性脳塞栓症」と「分類不能型脳梗塞」の病型の脳梗塞患者の判別、「大動脈原性脳塞栓症」と「Branch atheromatous disease」の病型脳梗塞患者の判別、「心原性脳塞栓症」と「動脈原性脳塞栓」の病型の脳梗塞患者の判別、「大動脈原性脳塞栓症」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別、及び「動脈解離」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別をするための検査を行えることがわかった。

【0052】

また、発症後7日目の各病型患者の血漿中のBcl-XL蛋白質の濃度を比較することにより、「大動脈原性脳塞栓症」と「Branch atheromatous disease」の病型脳梗塞患者を判別するための検査を行うことができ、また、同じ比較において「Branch atheromatous disease」と「分類不能型脳梗塞」の病型の脳梗塞患者の判別をするための検査が行えることがわかった。

【0053】

【表3】

表3

Group1	アテローム	心原性脳塞栓	心原性脳塞栓	ラクナ	ラクナ	大動脈原性脳塞栓	BAD	大動脈原性脳塞栓	心原性脳塞栓	大動脈原性脳塞栓	動脈解離
Group2	大動脈原性脳塞栓	大動脈原性脳塞栓	動脈解離	大動脈原性脳塞栓	動脈解離	分類不能型	分類不能型	BAD	動脈原性脳塞栓症	アテローム血栓性、心原性脳塞栓、ラクナ、動脈解離、BAD、分類不能型	アテローム血栓性、心原性脳塞栓、ラクナ、大動脈原性脳塞栓、BAD、分類不能型
DAY0											
AUC of ROC curve	0.714	0.816	0.776	0.781	0.797	0.714		0.738	0.753	0.754	0.718
Number of group1	14	29	29	16	16	6		6	12	6	4
Number of group2	6	6	4	6	4	14		7	29	84	86
DAY7											
AUC of ROC curve							0.833	0.8			
Number of group1							6	5			
Number of group2							8	6			

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明の方法によれば脳梗塞の診断の検査や治療・予防効果の評価を行うことができ、医療や診断の分野で有用である。また、本発明の方法によれば脳梗塞の治療・予防薬をスクリーニングすることができ、医薬分野でも有用である。

フロントページの続き

- (74)代理人 100131392
弁理士 丹羽 武司
- (72)発明者 北園 孝成
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内
- (72)発明者 鴨打 正浩
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内
- (72)発明者 吾郷 哲朗
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内
- (72)発明者 桑城 貴弘
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内
- (72)発明者 清原 裕
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内
- (72)発明者 秦 淳
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内
- (72)発明者 栗野 秀人
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社モレキュエンス内
- (72)発明者 小林 輝章
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社モレキュエンス内
- Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 DA36