

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6415546号
(P6415546)

(45) 発行日 平成30年10月31日(2018.10.31)

(24) 登録日 平成30年10月12日(2018.10.12)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	X
	GO 1 N 33/53	P

請求項の数 16 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2016-517677 (P2016-517677)	(73) 特許権者	512145734
(86) (22) 出願日	平成26年6月4日(2014.6.4)		ランドックス ラボラトリーズ リミテッ ド
(65) 公表番号	特表2016-521850 (P2016-521850A)		イギリス B T 2 9 4 Q Y カウンティ アントリム クラムリン ダイヤモンド ロード 5 5 アードモア
(43) 公表日	平成28年7月25日(2016.7.25)		
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/051721	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開番号	W02014/195698		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開日	平成26年12月11日(2014.12.11)	(74) 代理人	100126505
審査請求日	平成29年3月9日(2017.3.9)		弁理士 佐貫 伸一
(31) 優先権主張番号	1309928.8	(74) 代理人	100131392
(32) 優先日	平成25年6月4日(2013.6.4)		弁理士 丹羽 武司
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100151596
			弁理士 下田 俊明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳卒中中の鑑別診断を支援する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脳卒中を患ったことがあるかまたは現在患っている患者において出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作の鑑別診断を支援する方法であって、

i) 前記患者から得られる生体外サンプル中のバイオマーカー VCAM-1、GFAP および CRP の濃度を測定し、そして

i i) 前記バイオマーカーの前記濃度の統計的有意性を確立することを含む、方法。

【請求項 2】

脳卒中を患ったことがあるかまたは現在患っている患者において出血性脳卒中中の鑑別診断を支援する方法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

i i i) 前記患者から得られる生体外サンプル中の前記バイオマーカー IL-6 および sTNFR1 の濃度を測定し；

i v) 前記患者の性を確定し；そして

v) 前記患者の性と合わせて、5つのバイオマーカーの濃度の統計的有意性を確立することをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記バイオマーカー濃度値の各々を1つの統計的アルゴリズムまたは複数の統計的アルゴリズムに入力して、出血性脳卒中、虚血性脳卒中または一過性脳虚血発作の鑑別診断と相関する出力値を得る、請求項 1 ～ 3 のいずれか1項に記載の方法。

10

20

【請求項 5】

出血性脳卒中と虚血性脳卒中／一過性脳虚血発作との鑑別診断が支援される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記統計的アルゴリズムがロジスティック回帰式を含む、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記患者が脳卒中を現在患っているかまたは患ったことがあるとの診断が支援される、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記患者から得られる生体外サンプル中の少なくとも 2 つのバイオマーカーの濃度を測定し、そして各バイオマーカーの前記濃度値を対応する対照値と比較することにより前記バイオマーカーの前記濃度の統計的有意性を確立することによって、前記患者が、脳卒中を患ったことがあるかまたは現在患っているとの診断が支援され、ここで、前記少なくとも 2 つのバイオマーカーが、I C A M-1、L-セ렉チン、P-セ렉チン、V C A M-1、I L-6、s T N F R 1、D-ダイマーおよび C R P から選択され、そして前記 2 つのバイオマーカーのうちの少なくとも 1 つが I C A M-1、L-セ렉チン、P-セ렉チンおよび V C A M-1 から選択され、前記患者および対照バイオマーカー濃度値の各々を 1 つの統計的アルゴリズムまたは複数の統計的アルゴリズムに入力して脳卒中が起こったかどうかを示す出力値を得る、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記サンプルが血液、血清または血漿サンプルである、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の患者における出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作の鑑別診断を支援するための方法で使用するための V C A M-1、G F A P および C R P のプローブを含む基体。

【請求項 11】

I L-6 および s T N F R 1 のプローブをさらに含む、請求項 10 に記載の基体。

【請求項 12】

前記基体がある上に固定化されたプローブを有する、請求項 10 または請求項 11 に記載の基体。

【請求項 13】

前記基体がバイオチップである、請求項 10 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の基体。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の患者における出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作の鑑別診断を支援する方法における V C A M-1、G F A P および C R P のプローブを含む基体の使用。

【請求項 15】

前記基体が I L-6 および s T N F R 1 のプローブをさらに含む、請求項 14 に記載の基体の使用。

【請求項 16】

V C A M-1、G F A P、C R P、I L-6 および／または s T N F R 1 の、出血性脳卒中のバイオマーカーとして、および／または出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作間の識別因子としての使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

脳卒中は世界中で死因の第 3 位であり、脳への血液供給の遮断に起因する急速に進行する脳機能の喪失と定義できる。世界保健機関によると、世界中で 1 年間に 1 5 0 0 万人が

10

20

30

40

50

脳卒中を患い、500万人が亡くなり、さらに500万人が回復不能の障害を抱える。これらの1500万の脳卒中症例のうち1270万例で高血圧が要因であると推定される。英国では、毎年約150,000人が脳卒中に罹患し、1年間に約53,000人の死因が脳卒中である。脳卒中は英国だけで1年間で経済に推定80億ポンドの損失を与え、脳卒中患者はすべての緊急入院の約20パーセントを占め、そして長期入院の25パーセントを占める。

【0002】

脳卒中は3つの亜型に分類できる：

i) 虚血性脳卒中 (IS) は脳への血液供給が減少すると起こり、その結果、脳損傷が起こる。虚血性脳卒中は、通常、血栓により血管が詰まると起こる。この血栓はアテローム斑で局所的に生じ得る (血栓性脳卒中) か、または血流中のどこか他の場所で生じた移動する粒子もしくは破片のために起こり得る (塞栓性脳卒中) ；

ii) 一過性脳虚血発作 (TIA) は、脳への血液供給が一時的に減少する場合に起こる「軽度の脳卒中」である。症状が急速に消失する (24時間以内に消失し、個体は正常な健康状態に戻る) 場合にTIAと診断される；そして

【0003】

iii) 出血性脳卒中 (HS) は、頭蓋冠内に血液がたまる場合、通常は、弱くなった血管が破裂する場合に起こる。出血性脳卒中は、2つの主な亜型、すなわち、大脳内 (脳組織内) と、くも膜下 (脳の表面付近およびその保護層下) とに分類できる。

【0004】

ISおよびTIAは全脳卒中症例の約85%を占め、そしてHSは15%を占める。脳卒中後の神経障害を最小限に抑えるためには、適切な治療を施すことができるように、脳卒中患者を迅速かつ正確に診断することが重要である。例えば、血栓を破壊するために、組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) などの血栓溶解治療を施すことができる。しかしながら、そのような治療はISでのみ必要とされ、HSでは有害である。TIAの本質はそのような治療を必要とせず、ワルファリンおよびアスピリンなどの抗凝血剤 (blood thinner) がそのような症例で処方される。

【0005】

現在のところ、脳卒中が疑われる場合、身体症状を評価し、コンピュータ断層撮影 (CT) スキャンを通常実施する。CTスキャンはHS患者を特定するためには感度が良好 (約90%感度) であるが、ISおよびTIA患者を特定するためには感度が低い (約20%感度)。実際には、その一時的性質のためにTIAについて起こる組織損傷はほとんどまたは全くなく、したがってCTスキャンは診断技術として無効である。磁気共鳴映像法 (MRI) はIS診断の感度が (約80%まで) 改善されているが、必要とされる時間の増加、マシンアクセスビリティ (machine accessibility)、および高コストによって脳卒中診断のためのその使用が限定される。ISおよびTIAの検出に関するCTスキャンの低い感度は、ISおよびTIAを検出するための生体液ベースの診断バイオマーカー試験が脳卒中亜型の診断において臨床医を支援するための非常に貴重なツールであることを意味する。生体液ベースのバイオマーカーは脳卒中診断を促進し、その精度を増大させる可能性を有する。

【0006】

様々な候補バイオマーカーが脳卒中および脳卒中亜型の線引きの診断のために提案され、例えば特許文献1～4などの先行技術でIS/TIA対HS識別の複数の記載がある。

【0007】

特許文献5は、ISとHSとを識別し、全種類の脳卒中と非脳卒中对照とを識別するデータを開示する。しかしながら、今までのところどれも臨床診療で利用できず、正確な診断を可能にする高い感度および特異性を有する3つの脳卒中亜型すべてのバイオマーカーが臨床で真に必要とされている。

【0008】

血液試験を使用する3つの異なる脳卒中亜型間の鑑別診断はより多くの情報を得た上で

10

20

30

40

50

の臨床決定を促進し、高価かつ非迅速な神経画像診断を不要にする可能性があり、そして患者の臨床転帰を改善できる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】欧州特許出願公開第1238284号明細書

【特許文献2】国際公開第2010/086697号

【特許文献3】国際公開第2010/012834号

【特許文献4】国際公開第2002/012892号

【特許文献5】欧州特許出願公開第1419388号明細書

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

第1の態様によると、本発明は、脳卒中を患ったことがあるかまたは現在患っている患者において出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作の鑑別診断を支援する方法であって、患者から得られる生体外サンプル中のバイオマーカーVCAM-1、GFAPおよびCRPの濃度を測定し、そしてバイオマーカーの濃度の有意性を確立することを含む方法を提供する。

【0011】

第2の態様によると、本発明は、本発明の第1の態様による、患者における出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作の鑑別診断を支援する方法で使用するためのバイオマーカーVCAM-1、GFAPおよびCRPのプローブを含む基体を提供する。

20

【0012】

第3の態様によると、本発明は、本発明の第1の態様による、患者における出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作の鑑別診断を支援する方法におけるVCAM-1、GFAPおよびCRPのプローブを含む基体の使用に関する。

【0013】

第4の態様によると、本発明は、出血性脳卒中のバイオマーカーとして、ならびに／または出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作間の識別因子(differentiator)としての、VCAM-1、GFAP、CRP、IL-6および／またはsTNFR1の使用に関する。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、本発明のバイオマーカーを使用してTIAと脳卒中の他の種類とを識別するためのROC曲線分析である。

【図2】図2は、本発明のバイオマーカーを使用してISと脳卒中の他の種類とを識別するためのROC曲線分析である。

【図3】図3は、本発明のバイオマーカーを使用してHSと脳卒中の他の種類とを識別するためのROC曲線分析である。

【図4】図4は、男性対象および女性対象の両方における各脳卒中亜型のGFAPの濃度を示すグラフである。

40

【図5】図5は、男性対象および女性対象の両方における各脳卒中亜型のVCAM1の濃度を示すグラフである。

【図6】図6は、男性対象および女性対象の両方における各脳卒中亜型のCRPの濃度を示すグラフである。

【図7】図7は、男性対象および女性対象の両方における各脳卒中亜型のsTNFR1の濃度を示すグラフである。

【図8】図8は、男性対象および女性対象の両方における各脳卒中亜型のIL-6の濃度を示すグラフである。

【図9】図9は、HSとすべての脳卒中種類とを識別するための分類アルゴリズムを考案

50

するためのロジスティック回帰および神経回路網法をそれぞれ比較するデータおよび対応するROC曲線分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、3つの脳卒中亜型：出血性脳卒中（HS）と虚血性脳卒中（IS）と一過性脳虚血発作（TIA）との識別を支援するために使用できるバイオマーカーベースの方法およびバイオチップに関する。

【0016】

特に指定のない限り、「脳卒中」という語に対する本明細書中のすべての言及は、脳卒中の3つの形態すべてを包含する。

【0017】

本明細書中で用いられる場合、「虚血性脳卒中（IS）」という語は、脳への血液供給が減少する場合に起こり、結果として脳損傷が起こる脳卒中の種類を指す。虚血性脳卒中は、血管が、通常は血栓によって詰まった場合に起こる。この血栓は、局所的にアテローム斑を生じる可能性があるか（血栓性脳卒中）、あるいは血流中のどこかほかの場所で生じた移動する粒子または破片のために起こる可能性がある（塞栓性脳卒中）。「一過性脳虚血発作（TIA）」という語は、脳への血液供給が一時的に減少する場合に起こる「軽度の脳卒中」を指す。TIAは、症状が急速に消失する（24時間以内に消失し、個体は正常な健康状態に戻る）場合に診断される。「出血性脳卒中（HS）」という語は、血液が頭蓋冠内にたまる場合、通常は弱くなった血管が破裂する場合に起こる。出血性脳卒中は2つの主な亜型：大脳内（脳組織内）；および、くも膜下（脳の表面付近およびその保護層の下）に分類できる。

【0018】

「脳卒中を患ったことがあるかまたは現在患っている患者」に対する本明細書中の言及は、脳卒中を現在患っていると診断された患者または脳卒中を患っていたことがあると診断された患者を包含する。脳卒中は最近の事象である可能性があり、そのような事象により臨床の助けを求めるといった個体のプロセスは開始されている。

【0019】

「対象」および「患者」という語は、本明細書中では交換可能に使用することができ、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、ラットおよびマウス）ならびに霊長類（例えば、サルおよびヒト）を包含する哺乳類を指す。好ましくは、対象または患者はヒトである。

【0020】

本明細書中で用いられる場合、「バイオマーカー」という語は、患者から得られる生体サンプル中に存在する分子を指し、前記サンプル中のその濃度は、病的状態を示すものであり得る。異なる脳卒中亜型の識別で、単独もしくは他の診断法と組み合わせて、または他のバイオマーカーと組み合わせて相補的バイオマーカーとして有用であることが本発明者らによって見出された様々なバイオマーカーが明細書中で記載されている。本明細書中で用いられる場合、「相補的バイオマーカー」という語は、診断を裏付けるために他の脳卒中バイオマーカーとあわせて使用できるバイオマーカーを指す。

【0021】

当該技術分野では、バイオマーカーの標準または「バックグラウンド」濃度は、例えば、年齢、性または民族的／地域的遺伝子型のために若干のばらつきを示す可能性があることはよく理解される。その結果、本発明の方法で使用されるカットオフ値も、標的患者／集団に応じた最適化のために若干変動する可能性がある。

【0022】

患者から得られる生体サンプルは、好ましくは血液、血清または血漿サンプルである。本明細書中で用いられる場合、「生体外」という語は、当該技術分野でのその通常の意味を有し、患者の身体から取り出されたサンプルを指す。

【0023】

血液サンプルが分析のために患者から採取される場合、全血、血清または血漿が分析される。血液サンプルの分析は、クロマトグラフィーなどの前分離ステップと関連させた質量分析法などのいくつかの分析法によるものであり得る。好ましい方法は免疫検出に基づく。免疫検出技術はまた、臨床環境外で使用するために可搬型または携帯用機器に容易に組み込まれる。ウェスタンブロットまたはELISAなどの定量的イムノアッセイを使用してタンパク質の量を検出できる。好ましい分析方法は、複数のタンパク質が同時に検出され、定量されるのを可能にする多検体 (multi-analyte) バイオチップの使用を含む。2Dゲル電気泳動も多検体分析のために使用できる技術である。

【0024】

本発明の第1の態様は、脳卒中を患ったことがあるかまたは現在患っている患者において出血性脳卒中 (HS)、虚血性脳卒中 (IS) および一過性脳虚血発作 (TIA) の鑑別診断を支援する方法であって、患者から得られる生体外サンプル中のVCAM-1、GFAPおよびCRPの濃度を測定し、そしてバイオマーカーの濃度の有意性を確立することを含む方法を提供する。逆方向段階的ロジスティック回帰 (backwards stepwise logistic regression) を使用して、本発明者らは、バイオマーカーGFAP、VCAM、CRPが、TIAとISとHSとを識別できる予測モデルに重大な影響を及ぼすことを見出した。

10

【0025】

好ましい実施形態において、方法は、患者から得られた生体外サンプル中のIL-6およびsTNFR1の濃度を測定し、患者の性を確定し、そして5つのバイオマーカーの濃度の有意性を、患者の性とあわせて確立することをさらに含む。

20

【0026】

性は、恒常性および疾患の両方におけるバイオマーカーレベルに対して大きな影響を及ぼすことが判明した。本発明者らは、どの種類の脳卒中を患者が呈する可能性があるのかを正確に予測できるアルゴリズムを開発して適切な治療を可能にするために、5つのバイオマーカーGFAP、VCAM、CRP、IL-6およびsTNFR1を、性と組み合わせて使用できることを見出した。

【0027】

上述の実施形態のいずれかに加えて、本発明の方法は、バイオマーカーICAM-1、L-セレクトリン、P-セレクトリン、D-ダイマーおよびFABPのうちの1つの濃度を測定し、そして統計的アルゴリズムで濃度値を使用して異なる脳卒中亜型を区別することもさらに含み得る。

30

好ましくは、バイオマーカー濃度値の各々を、1つの統計的アルゴリズムまたは複数の統計的アルゴリズムに入力して、HS、ISまたはTIAの鑑別診断と相関する出力値を得る。1つの実施形態において、方法を使用して、HSおよびIS/TIAを鑑別診断する。

【0028】

当業者は、統計的アルゴリズムを開発するための多くの好適な方法を知っており、これらはすべて本発明の範囲内に含まれる。好適な分類アルゴリズムの例としては、多項ロジスティック回帰、多層パーセプトロン神経回路網 (MLP)、人工の神経回路網、サポートベクターマシンおよびランダムフォレスト分類器 (random forest classifier) が挙げられる。本発明者らは、多項ロジスティック回帰およびMPLの両方が本発明との関連で類似した性能を達成することを見出し、このことは、アルゴリズムモデルを生成させるために使用する方法よりもむしろ本発明の方法で使用される検体 (すなわちバイオマーカー) の重要性を示唆する。しかしながら、好ましい実施形態では、統計的アルゴリズムはロジスティック回帰式を含む。

40

【0029】

本発明に従って使用する統計的方法の精度は、それらの受信者操作特性 (ROC) によって最もよく表すことができる。ROC曲線は、試験の感度、真陽性の数、および特異性、真陰性の数の両方を対象とする。したがって、バイオマーカーの所定の組み合わせの感

50

度および特異性値はアッセイの精度を表示するものである。例えば、バイオマーカーの組み合わせが80%の感度および特異性値を有する場合、脳卒中に罹っている100人の患者のうち80人がバイオマーカーの特定の組み合わせの存在の決定から脳卒中に関して陽性であると正しく特定され、一方、脳卒中に患っていない100人の患者のうち80人はこの疾患について正確に陰性である。

【0030】

2またはそれ以上のバイオマーカーが診断法で使用される場合、ロジスティック回帰式などの好適な数学モデルを誘導することができる。ロジスティック回帰式は、患者の年齢および性などの他の変数を含み得る。ROC曲線を使用して、ロジスティック回帰モデルの精度を評価することができる。ロジスティック回帰式は、臨床決定を下すのを支援するために、独立して、またはアルゴリズムで使用できる。ロジスティック回帰式はそのような場合に使用される一般的な数学的／統計的手法であり、本発明の関連で好ましいが、他の数学的／統計的手法も使用できる。

10

一例として、脳卒中に罹っていたことがあるかまたは現在罹っていることが疑われる患者における脳卒中の種類を示すためのバイオマーカーの組み合わせGFAP、CRPおよびVCAMの本発明に適用可能なロジスティック回帰式（分類カットオフ値0.5）は次のようにして算出される：

【0031】

【数1】

ISの確率＝

20

$$\frac{e^{(-3.075-0.581[GFAP]+0.094[CRP]+0.05[VCAM])}}{1 + e^{(-3.075-0.581[GFAP]+0.094[CRP]+0.05[VCAM])} + e^{(-3.605+3.979[GFAP]-0.116[CRP]+0.04[VCAM])}}$$

【0032】

式中、[GFAP]、[CRP]および[VCAM]は、患者から採取された血液サンプル中で測定されるGFAP、CRPおよびVCAMの濃度である（AUC値については表1の118番を参照のこと）。

【0033】

好ましくは、HS、ISおよびTIAの鑑別診断を支援する方法は、脳卒中を患っていると、または脳卒中に患ったことがあると事前に診断された患者に対して実施される。本発明の方法の目的は、適切な治療を施すことができるように、患者が現在患っているか、または患ったことのある脳卒中亜型を特定することである。したがって、1つの実施形態において、本発明の方法は、脳卒中亜型の識別診断が下され次第、患者に適切な治療を施すさらなるステップを含む。例えば、本発明の方法を実施した結果として、患者がISを患ったことがあるかまたは現在患っていると判定される場合、血栓溶解療法（例えば組織プラスミノゲン活性化因子（TPA））などの適切な治療を施して血栓を破壊できる。これは、医師の判断により、他の適切な治療とあわせて施してもよい。本発明の方法を実施した結果として患者がTIAを患っていたことがあるかまたは現在患っていると判定される場合、ワルファリンおよびアスピリンなどの抗凝血剤を処方し、投与することができる。本発明の方法を実施した結果として、患者がHSを患ったことがあるか、または現在患っていると判定される場合、これらの患者は典型的には損傷を受けた血管を修復するために手術室へ移送される。

30

40

【0034】

患者が脳卒中を現在患っているかまたは患っていたことがあると診断する最初のステップは、CTおよびMRIなどのスキャン技術をはじめとする当該技術分野で公知である任意の好適な診断法もしくは技術を使用して、または脳卒中のバイオマーカーについて患者のサンプルを分析して、実施することができる。しかしながら、好ましい実施形態において、患者は、患者から得られる生体外サンプル中の少なくとも2つのバイオマーカーの濃度を測定し、そして各バイオマーカーの濃度値と対応する対照値とを比較することによりバイオマーカーの濃度の有意性を確立することによって、脳卒中を現在患っているか

50

または患ったことがあると診断された。好ましくは、少なくとも2つのバイオマーカーは、ICAM-1、L-セ렉チン、P-セ렉チン、VCAM-1、IL-6、sTNFR1、D-ダイマーおよびCRPから選択され、好ましくは2つのバイオマーカーのうちの少なくとも1つは、ICAM-1、L-セ렉チン、P-セ렉チンおよびVCAM-1から選択される。脳卒中を最初に診断するこの好ましい方法に従って、患者および対照バイオマーカー濃度値の各々を1つの統計的アルゴリズムまたは複数の統計的アルゴリズムに入力して、脳卒中がおこったかどうかを示す出力値を得る。本発明のこの実施形態についての好ましいバイオマーカー組み合わせは、表1または表2で記載されているものである。これらの表は、脳卒中对対照についての様々なバイオマーカーの組み合わせの感度、特異性およびAUCデータを提供する。

【0035】

【表1-1】

表1

バイオマーカー	%感度	%特異性	AUC
1. VCAM-1 + ICAM-1	80.6	75.0	0.831
2. VCAM-1 + Psel	87.8	71.7	0.913
3. VCAM-1 + Lsel	89.8	86.7	0.943
4. VCAM-1 + IL-6	80.6	78.3	0.879
5. VCAM-1 + CRP	78.6	75.0	0.826
6. VCAM-1 + D-dimer	87.8	76.7	0.886
7. VCAM-1 + NGAL	81.6	73.3	0.867
8. VCAM-1 + sTNFR1	82.7	75.0	0.832
9. IL-6 + sTNFR1	78.6	75.0	0.870
10. ICAM-1 + Psel	92.9	76.7	0.932
11. ICAM-1 + Lsel	90.8	90.0	0.954
12. ICAM-1 + IL-6	83.7	83.3	0.897
13. ICAM-1 + CRP	79.6	80.0	0.822
14. ICAM-1 + D-dimer	86.7	76.7	0.905
15. ICAM-1 + NGAL	81.6	73.3	0.836
16. ICAM-1 + sTNFR1	77.6	73.3	0.832
17. IL-6 + NGAL	87.8	81.7	0.909

【表 1 - 2】

18. Psel + Lsel	88.8	65.0	0.867
19. Psel + IL-6	90.8	78.3	0.937
20. Psel + CRP	87.8	68.3	0.888
21. Psel + D-dimer	90.8	85.0	0.931
22. Psel + NGAL	86.7	58.3	0.838
23. Psel + sTNFR1	86.7	65.0	0.885
24. IL-6 + D-dimer	84.7	81.7	0.910
25. Lsel + IL-6	84.7	85.0	0.907
26. Lsel + CRP	86.7	71.7	0.863
27. Lsel + D-dimer	88.8	80.0	0.894
28. Lsel + NGAL	90.8	51.7	0.833
29. Lsel + sTNFR1	84.7	61.7	0.862
30. IL-6 + CRP	76.5	81.7	0.870
31. IL-6 + NGAL + sTNFR1	89.8	81.7	0.942
32. IL-6 + D-dimer + sTNFR1	85.7	80.0	0.908
33. IL-6 + D-dimer + NGAL	92.9	83.3	0.943
34. IL-6 + CRP + sTNFR1	75.5	78.3	0.872
35. VCAM-1 + ICAM-1 + Psel	91.8	80.0	0.946
36. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel	93.9	93.3	0.975
37. VCAM-1 + ICAM-1 + IL-6	85.7	81.7	0.906
38. VCAM-1 + ICAM-1 + CRP	80.6	78.3	0.853
39. VCAM-1 + ICAM-1 + D-dimer	88.8	80.0	0.907
40. VCAM-1 + ICAM-1 + NGAL	85.7	80.0	0.895
41. VCAM-1 + ICAM-1 + sTNFR1	82.7	75.0	0.856
42. IL-6 + CRP + NGAL	85.7	80.0	0.915
43. VCAM-1 + Psel + Lsel	92.9	88.3	0.957
44. VCAM-1 + Psel + IL-6	90.8	76.7	0.962
45. VCAM-1 + Psel + CRP	87.8	78.3	0.930
46. VCAM-1 + Psel + D-dimer	89.8	83.3	0.955
47. VCAM-1 + Psel + NGAL	89.8	76.7	0.932
48. VCAM-1 + Psel + sTNFR1	88.8	76.7	0.923
49. IL-6 + CRP + D-dimer	81.6	80.0	0.911
50. VCAM-1 + Lsel + IL-6	89.8	90.0	0.957
51. VCAM-1 + Lsel + CRP	91.8	91.7	0.951
52. VCAM-1 + Lsel + D-dimer	89.8	85.0	0.946
53. VCAM-1 + Lsel + NGAL	92.9	83.3	0.962
54. VCAM-1 + Lsel + sTNFR1	83.3	87.8	0.947
55. Lsel + NGAL + sTNFR1	89.8	80.0	0.931
56. VCAM-1 + IL-6 + CRP	79.6	81.7	0.881
57. VCAM-1 + IL-6 + D-dimer	86.7	88.3	0.916
58. VCAM-1 + IL-6 + NGAL	91.8	86.7	0.941

10

20

30

【表 1 - 3】

59. VCAM-1 + IL-6 + sTNFR1	81.6	80.0	0.882
60. Lsel + D-dimer + sTNFR1	83.7	76.7	0.905
61. VCAM-1 + CRP + D-dimer	85.7	81.7	0.895
62. VCAM-1 + CRP + NGAL	87.8	81.7	0.911
63. VCAM-1 + CRP + sTNFR1	80.6	78.3	0.837
64. Lsel + D-dimer + NGAL	91.8	85.0	0.921
65. VCAM-1 + D-dimer + NGAL	90.8	96.7	0.938
66. VCAM-1 + D-dimer + sTNFR1	87.8	80.0	0.891
67. Lsel + CRP + sTNFR1	84.7	73.3	0.875
68. VCAM-1 + NGAL + sTNFR1	89.8	80.0	0.930
69. Lsel + CRP + D-dimer	86.7	76.7	0.908
70. Lsel + CRP + NGAL	86.7	73.3	0.882
71. ICAM-1 + Psel + Lsel	95.9	91.7	0.977
72. ICAM-1 + Psel + IL-6	93.9	91.7	0.979
73. ICAM-1 + Psel + CRP	92.9	83.3	0.949
74. ICAM-1 + Psel + D-dimer	93.9	88.3	0.969
75. ICAM-1 + Psel + NGAL	88.8	78.3	0.938
76. ICAM-1 + Psel + sTNFR1	91.8	81.7	0.946
77. Lsel + IL-6 + sTNFR1	84.7	81.7	0.911
78. ICAM-1 + Lsel + IL-6	92.9	90.0	0.975
79. ICAM-1 + Lsel + CRP	89.8	90.0	0.958
80. ICAM-1 + Lsel + D-dimer	90.8	88.3	0.964
81. ICAM-1 + Lsel + NGAL	91.8	86.7	0.963
82. ICAM-1 + Lsel + sTNFR1	91.8	88.3	0.965
83. Lsel + IL-6 + NGAL	90.8	83.3	0.920
84. ICAM-1 + IL-6 + CRP	83.7	83.3	0.896
85. ICAM-1 + IL-6 + D-dimer	87.8	85.0	0.931
86. ICAM-1 + IL-6 + NGAL	89.8	86.7	0.934
87. ICAM-1 + IL-6 + sTNFR1	84.7	80.0	0.903
88. Lsel + IL-6 + D-dimer	86.7	81.7	0.920
89. ICAM-1 + CRP + D-dimer	88.0	85.0	0.911
90. ICAM-1 + CRP + NGAL	85.7	76.7	0.882
91. ICAM-1 + CRP + sTNFR1	77.6	73.3	0.844
92. Lsel + IL-6 + CRP	87.8	81.7	0.914
93. ICAM-1 + D-dimer + NGAL	90.8	83.3	0.932
94. ICAM-1 + D-dimer + sTNFR1	87.8	80.0	0.909
95. Psel + NGAL + sTNFR1	89.8	76.7	0.930
97. ICAM-1 + NGAL + sTNFR1	87.8	83.3	0.920
98. Psel + D-dimer + sTNFR1	89.8	81.7	0.930
99. Psel + D-dimer + NGAL	91.8	86.7	0.947
100. Psel + Lsel + IL-6	89.8	78.3	0.943

10

20

30

【表 1 - 4】

101. Psel + Lsel + CRP	89.8	75.0	0.903
102. Psel + Lsel + D-dimer	90.8	83.3	0.936
103. Psel + Lsel + NGAL	88.8	70.0	0.873
104. Psel + Lsel + sTNFR1	90.8	71.7	0.914
105. Psel + CRP + sTNFR1	87.8	70.0	0.897
106. Psel + IL-6 + CRP	88.8	76.7	0.945
107. Psel + IL-6 + D-dimer	90.8	88.3	0.957
108. Psel + IL-6 + NGAL	92.9	88.3	0.953
109. Psel + IL-6 + sTNDRI	89.8	78.3	0.944
110. Psel + CRP + NGAL	86.7	75.0	0.907
111. Psel + CRP + D-dimer	91.8	85.0	0.946
112. VCAM-1 + IL-6 + NGAL + sTNFR1	91.8	90.0	0.961
113. VCAM-1 + D-dimer + NGAL + sTNFR1	89.8	88.3	0.959
114. ICAM-1 + Lsel + IL-6 + D-dimer	92.9	90.0	0.980
115. ICAM-1 + Lsel + IL-6 + NGAL	94.9	91.7	0.983
116. ICAM-1 + Lsel + IL-6 + sTNFR1	92.9	91.7	0.978
117. ICAM-1 + Lsel + D-dimer + NGAL	94.9	91.7	0.975
118. ICAM-1 + Lsel + D-dimer + sTNFR1	93.9	90.0	0.975
119. ICAM-1+ Lsel + NGAL + sTNFR1	96.9	95.0	0.978
120. ICAM-1 + IL-6 + D-dimer + NGAL	91.8	88.3	0.966
121. ICAM-1 + IL-6 + D-dimer + sTNFR1	86.7	86.7	0.932
122. ICAM-1 + IL-6 + NGAL + sTNFR1	92.9	85.0	0.967
123. ICAM-1 + D-dimer + NGAL + sTNFR1	91.8	85.0	0.959
124. Lsel + IL-6 + D-dimer + NGAL	92.9	88.3	0.948
125. Psel + Lsel + IL-6 + ICAM-1	95.9	95.0	0.995
126. Lsel + IL-6 + NGAL + sTNFR1	93.9	85.0	0.958
127. Lsel + D-dimer + NGAL + sTNFR1	90.8	86.7	0.946
128. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel + IL-6	96.9	95.0	0.985
129. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel + D-dimer	94.9	93.3	0.978
130. VCAM-1 + ICAM-1 + Lsel + NGAL	96.9	93.3	0.984
131. VCAM-1+ ICAM-1 + Lsel + sTNFR1	94.9	95.0	0.977
132. VCAM-1 + ICAM-1+ IL-6 + D-dimer	86.7	86.7	0.933
133. VCAM-1 + ICAM-1+ IL-6 + NGAL	91.8	83.3	0.954
134. Psel + Lsel + IL-6 + VCAM-1	93.9	86.7	0.972
135. VCAM-1 + ICAM-1 + D-dimer + NGAL	89.8	80.0	0.948
136. Psel + Lsel + IL-6 + D-dimer	89.8	88.3	0.959
137. VCAM-1 + ICAM-1 + NGAL + sTNRI	85.7	81.7	0.944
138. VCAM-1 + Lsel + IL-6 + D-dimer	90.8	91.7	0.956
139. VCAM-1 + Lsel + IL-6 + NGAL	92.9	91.7	0.972
140. VCAM-1 + Lsel + IL-6 + sTNFR1	88.8	90.0	0.959

10

20

30

【表 1 - 5】

141. VCAM-1 + Lsel + D-dimer + NGAL	93.9	90.0	0.968
142. VCAM-1 + Lsel + D-dimer + sTNFR1	92.9	88.3	0.949
143. VCAM-1 + Lsel + NGAL + sTNFR1	91.8	90.0	0.970
144. VCAM-1 + IL-6 + D-dimer + NGAL	92.9	88.3	0.971
145. IL-6 + D-dimer + NGAL + sTNFR1	89.8	88.3	0.971
146. Psel + Lsel + IL-6 + NGAL	93.9	85.0	0.953
147. CRP + D-dimer + ICAM-1 + IL-6	87.8	85.0	0.932
148. CRP + D-dimer + ICAM-1 + Lsel	91.8	91.7	0.966
149. CRP + D-dimer + ICAM-1 + NGAL	87.8	83.3	0.939
150. Psel + Lsel+ ICAM-1+ D-dimer	98.0	93.3	0.989
151. Psel + Lsel + ICAM-1 + CRP	95.9	90.0	0.980
152. Psel + IL-6 + ICAM-1 + D-dimer	95.9	93.3	0.988
153. CRP + D-dimer + IL-6 + NGAL	91.8	85.0	0.948
154. CRP + Lsel + sTNFR1 + VCAM-1	87.8	90.0	0.952
155. Psel + IL-6 + ICAM-1+ NGAL	94.9	90.0	0.983
156. CRP + D-dimer + Lsel + NGAL	93.9	80.0	0.935
157. CRP + Lsel + NGAL + sTNFR1	91.8	81.7	0.933
158. CRP + D-dimer + Lsel + VCAM-1	88.3	91.8	0.950
159. Lsel + Psel + VCAM-1 + ICAM-1	94.9	95.0	0.986
160. CRP + D-dimer + NGAL + VCAM-1	90.8	85.0	0.950
161. CRP + IL-6 + NGAL + VCAM-1	90.8	88.3	0.947
162. CRP + ICAM-1 + IL-6 + Lsel	92.9	90.0	0.975
163. CRP + ICAM-1 + IL-6 + NGAL	88.8	83.3	0.938
164. CRP + IL-6 + NGAL + sTNFR1	89.8	80.0	0.947
165. CRP + IL-6 + Lsel + VCAM-1	90.8	91.7	0.957
166. CRP + ICAM-1 + Lsel + NGAL	94.9	88.3	0.970
167. CRP + ICAM-1 + Lsel + sTNFR1	91.8	88.3	0.968
168. CRP + ICAM-1 + Lsel + VCAM-1	93.9	95.0	0.976
169. CRP + IL-6 + Lsel + NGAL	88.8	83.3	0.931
170. CRP + NGAL + sTNFR1 + VCAM-1	87.8	85.0	0.934

[Lsel (L-セレクトイン) Psel(P-セレクトイン)]

【 0 0 3 6 】

10

20

30

【表 2 - 1】

表 2

バイオマーカー	%感度	%特異性	AUC
1. VCAM1 + FABP	89.8	95.0	0.960
2. ICAM1 + FABP	92.9	93.3	0.964
3. Psel + FABP	95.9	91.7	0.981
4. Lsel + FABP	91.8	95.0	0.970
5. VCAM1 + ICAM1 + FABP	92.9	93.3	0.965
6. VCAM1 + Psel + FABP	95.9	91.7	0.983
7. VCAM1 + Lsel + FABP	92.9	96.7	0.971
8. VCAM1 + IL6 + FABP	90.8	95.0	0.961
9. VCAM1 + CRP + FABP	89.8	95.0	0.960
10. VCAM1 + D-dimer + FABP	90.8	95.0	0.963
11. VCAM1 + NGAL + FABP	98.0	93.3	0.986
12. VCAM1 + sTNFR1 + FABP	89.8	91.7	0.962
13. ICAM1 + Psel + FABP	96.9	93.3	0.990
14. ICAM1 + Lsel + FABP	96.9	93.3	0.993
15. ICAM1 + IL6 + FABP	91.8	91.7	0.966
16. ICAM1 + CRP + FABP	92.9	93.3	0.964
17. ICAM1 + D-dimer + FABP	92.9	95.0	0.968
18. ICAM1 + NGAL + FABP	96.9	95.0	0.984
19. ICAM1 + sTNFR1 + FABP	91.8	93.3	0.966
20. Psel + Lsel + FABP	95.9	93.3	0.985
21. Psel + IL6 + FABP	93.9	93.3	0.985
22. Psel + CRP + FABP	92.9	91.7	0.983
23. Psel + D-dimer + FABP	93.9	93.3	0.984
24. Psel + NGAL + FABP	96.9	96.7	0.993
25. Psel + sTNFR1 + FABP	93.9	91.7	0.983
26. Lsel + IL6 + FABP	90.8	93.3	0.975
27. Lsel + CRP + FABP	91.8	93.3	0.970
28. IL6 + CRP + FABP	91.8	96.7	0.962
29. IL6 + D-dimer + FABP	89.8	93.3	0.963
30. IL6 + NGAL + FABP	91.8	93.3	0.990
31. IL6 + sTNFR1 + FABP	89.8	91.7	0.963
32. Lsel + D-dimer + FABP	90.8	93.3	0.973
33. Lsel + NGAL + FABP	95.9	93.3	0.989
34. Lsel + sTNFR1 + FABP	92.9	93.3	0.972
35. FABP + CRP + D-dimer	90.8	93.3	0.962
36. FABP + CRP + NGAL	95.9	93.3	0.985
37. FABP + CRP + sTNFR1	90.8	93.3	0.959
38. FABP + D-dimer + NGAL	95.9	93.3	0.985

10

20

30

【表 2 - 2】

39. FABP + D-dimer + sTNFR1	91.8	93.3	0.962
40. CRP + IL6 + FABP	89.8	93.3	0.962
41. D-dimer + IL6 + FABP	91.8	93.3	0.963
42. NGAL + IL6 + FABP	95.9	93.3	0.990
43. sTNFR1 + IL6 + FABP	89.8	91.7	0.963
44. IL6 + NGAL + FABP + D-dimer	96.9	93.3	0.990
45. Lsel + NGAL + FABP + D-dimer	95.9	93.3	0.992
46. Lsel + NGAL + FABP + IL6	94.9	93.3	0.994
47. Psel + sTNFR1 + FABP + D-dimer	93.9	93.3	0.985
48. Psel + sTNFR1 + FABP + NGAL	96.9	96.7	0.994
49. Psel + IL6 + FABP + D-dimer	93.9	91.7	0.986
50. Psel + IL6 + FABP + NGAL	96.9	95.0	0.996
51. Psel + Lsel + FABP + D-dimer	95.9	93.3	0.987
52. Psel + Lsel + FABP + IL6	93.9	91.7	0.987
53. Psel + Lsel + FABP + NGAL	96.9	96.7	0.994
54. Psel + Lsel + FABP + CRP	94.9	93.3	0.985
55. ICAM1 + NGAL + FABP + IL6	95.9	93.3	0.991
56. ICAM1 + NGAL + FABP + D-dimer	96.9	95.0	0.986
57. ICAM1 + NGAL + FABP + CRP	96.9	95.0	0.986
58. ICAM1 + Lsel + FABP + IL6	95.9	95.0	0.994
59. ICAM1 + Lsel + FABP + NGAL	99.0	96.7	0.996
60. ICAM1 + Lsel + FABP + D-dimer	96.9	95.0	0.993
61. ICAM1 + Lsel + FABP + CRP	96.9	93.3	0.993
62. ICAM1 + Lsel + FABP + sTNFR1	96.9	93.3	0.993
63. ICAM1 + Psel + FABP + IL6	98.0	95.0	0.994
64. ICAM1 + Psel + FABP + NGAL	96.9	96.7	0.996
65. ICAM1 + Psel + FABP + D-dimer	96.9	93.3	0.991
66. ICAM1 + Psel + FABP + CRP	98.0	91.7	0.990
67. ICAM1 + Psel + FABP + sTNFR1	96.9	93.3	0.990
68. ICAM1 + Psel + Lsel + FABP	100.0	95.0	0.997
69. VCAM1 + NGAL + FABP + D-dimer	96.9	93.3	0.988
70. VCAM1 + ICAM1 + Lsel + FABP	99.0	95.0	0.993
71. VCAM1 + Lsel + FABP + D-dimer	92.9	95.0	0.971
72. VCAM1 + Lsel + FABP + NGAL	96.9	93.3	0.991
73. FABP + NGAL + sTNFR1	95.9	93.3	0.986

[Lsel (L-セレクチン) Psel (P-セレクチン)]

【0037】

上記の脳卒中を最初に診断する好ましい方法において、対照値は、脳卒中に罹っていない1つの個体または複数の個体から得られる生体サンプル中の対応するバイオマーカーの濃度から誘導できる。脳卒中に罹ったことがないそのような個体は、例えば、健常な個体、脳卒中以外の疾患を患っている個体であり得る。あるいは、対照値は、脳卒中事象前の患者から得られるサンプル中のバイオマーカーの各々の濃度に対応し得る。

【0038】

誤解を避けるために、「対応するバイオマーカー」という語は、患者のサンプルに関して決定されるバイオマーカーの同じ組み合わせの濃度が、対照値を決定するためにも使用されることを意味する。例えば、患者のサンプル中のICAM-1およびL-セレクチンの濃度が決定される場合、対照サンプル中のICAM-1およびL-セレクチンの濃度も決定される。

【0039】

好ましい実施形態において、患者および／または対照バイオマーカー濃度値の各々を1以上の統計的アルゴリズムに入力して、脳卒中が起こったかどうかを示す出力値を得る。

【0040】

カットオフ濃度またはカットオフ値は、統計的技術を使用して誘導され、統計的アルゴリズムを開発するために様々な異なる方法が利用可能であり、当業者には周知である。バイオマーカー統計的分析の標準的方法は、一変量法を使用して、様々な群におけるバイオマーカーレベルを比較し、その濃度が特定の群全体にわたって、また特定の群間で有意に異なるそれらバイオマーカーをハイライトすることである。

【0041】

バイオマーカー濃度は、サンプルと、バイオマーカーの組み合わせに含まれるバイオマーカーの各々に特異的なプローブを有する基体とを接触させることによって決定できる。バイオマーカーとその各々のプローブとの間の相互作用は、当該技術分野で周知の様々な技術を使用してモニタリングすることができ、定量化できる。バイオマーカー濃度は、好ましくは ng/ml で測定される。

10

【0042】

したがって、本発明の第2の態様は、VCAM-1、GFAPおよびCRPに特異的なプローブを含む基体を提供する。基体は、HS、ISおよびTIAの鑑別診断を支援するための本発明の方法で使用するために好適である。好ましくは、基体は、IL-6およびsTNFR1に特異的なプローブをさらに含み、そして場合によって表1および/または2に記載のバイオマーカーのいずれか1以上のプローブをさらに含んでもよい。

【0043】

本明細書中で用いられる場合、「特異的」という語は、プローブが、本発明のバイオマーカーのうちの1つだけと結合し、分析される生体サンプル中の本発明の他のバイオマーカーまたは他の検体との結合は無視できることを意味する。このことは、診断アッセイの完全性および本発明のバイオマーカーを使用するその結果が、さらなる結合事象によって損なわれないことを保証する。

20

【0044】

好ましくは、プローブを基体の表面上に固定し、好ましくは共有結合で固定する。基体は、1以上のプローブを支持できる任意の物質であり得るが、好ましくはバイオチップなどの固体素子である。バイオチップは、例えば、鉱物またはポリマーベースで有り得るが、好ましくはセラミックである平面基体である。本発明の様々なバイオマーカー/タンパク質を同定する場合、タンパク質の正確な同定を可能にするならば、完全長タンパク質の同定と同様にタンパク質の1つまたは複数のフラグメントの同定が可能であることは当業者には明らかであろう。同様に、本発明の好ましいプローブはポリクローナルまたはモノクローナル抗体であるが、他のプローブ、例えばアプタマー、分子インプリントポリマー、ファージ、短鎖抗体フラグメントおよび他の抗体ベースのプローブを使用してもよい。

30

【0045】

好ましくは、固体素子を、好ましくはBiochip Array Technologyシステム(BAT)(Randox Laboratories Limitedから入手可能)を本発明の方法で使用する。さらに好ましくは、Evidence EvolutionおよびEvidence Investigator装置(Randox Laboratoriesから入手可能)を使用してサンプル中のバイオマーカーのレベルを測定してもよい。

40

【0046】

本発明の関連する第3の態様では、本発明の第2の態様によるVCAM-1、GFAPおよびCRPのプローブを含む基体を、本発明の第1の態様による患者における出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作の鑑別診断を支援する方法で使用する。

【0047】

第4の態様によると、本発明は、VCAM-1、GFAP、CRP、IL-6および/またはsTNFR1の出血性脳卒中のバイオマーカーならびに/または出血性脳卒中、虚血性脳卒中および一過性脳虚血発作間の識別因子としての使用に関する。

【0048】

50

本発明はまた、VCAM-1、GFAPおよびCRPのプローブを含み、場合によってIL-6および／またはsTNFR1、さらなる試薬、基体／反応表面および／または使用説明書も含んでもよいキットも提供する。そのようなキットを使用して、本発明の第1の態様による患者における脳卒中亜型を鑑別診断することができる。

【0049】

ここで、本発明を以下の非限定的実施例を参照することによりさらに説明する。

【実施例】

【0050】

患者群

試験は、ギリシャ国アテネのKAT総合病院の救急科に入院している、脳卒中症状を呈する98人の患者から構成されていた。血液サンプルを入院時ならびに1日、2日、3日および7日に採取した。脳卒中症状の開始および入院からの平均時間は3.2時間であった。患者の平均年齢は75.2歳（標準偏差9.4）であった。臨床医評価（背景技術の節で強調した基準を使用）および神経画像技術により、44人の虚血性脳卒中（IS）、25人の出血性脳卒中（HS）、29人の一過性脳虚血発作（TIA）が特定され、60人の健常対象は対照（C）としての役割を果たした。

10

【0051】

サンプル分析

以下のタンパク質を、試験群の患者から得られる血液のEDTA血漿サンプルに対して試験した：VCAM-1、GFAP、CRP、IL-6およびsTNFR1。タンパク質は、バイオマーカー特異的抗体を組み入れた多重バイオチップおよびEvidence Investigator（Randox Laboratories Ltd（英国クラムリン））を使用して検出し、定量化した。同時イムノアッセイを製造業者の指示に従って実施した。9点較正曲線および3つの参考対照（reference control）を各バイオマーカーについて分析して、結果の検証を可能にした。CRP IS対TIA分析のために、サンプルを10倍に希釈した。

20

【0052】

統計的分析

単一バイオマーカーをROC曲線分析に供して、感度および特異性を評価した。ロジスティック回帰を使用して、バイオマーカーの様々な組み合わせの濃度に対する脳卒中および脳卒中亜型の依存性のモデルを作製し、続いてROC曲線分析を行ってモデルの分類精度を評価した。結果を図1～3に示す。

30

【0053】

脳卒中亜型を決定するためのバイオマーカーの各々に関する性の関連性を図4～8に示す。

【0054】

結果

表3中に示されるデータは、HSとIS／TIAとを識別するための本発明のバイオマーカーの使用を示す。本発明のバイオマーカーを用いたHS患者とISおよびTIA患者とを識別するためのROC曲線分析を図3に示す。

40

【0055】

【表 3】

表 3

バイオマーカー	AUC	出血性脳卒中 (HS)	
		%感度	%特異性
GFAP	0.872	48	100
GFAP, IL-6及びVCAM-1	0.886	60	100
GFAP, CRP及びVCAM-1	0.901	60	100
GFAP, CRP, VCAM-1, IL-6 (性別) sTNFR1 (性別)	0.914	72	100

10

【0056】

さらに、図1～3および表4は、多項ロジスティック回帰を使用するこの例で、全ての脳卒中患者をTIA、ISまたはHS患者のいずれかに分類するためにバイオマーカーの組み合わせを使用することによって、単独でのバイオマーカーのどれよりも改善された区別ができることを示す。

【0057】

【表 4】

表 4

変数	TIA					IS					HS				
	AUC	S.E.	P値	95% CI	AUC	S.E.	P値	95% CI	AUC	S.E.	P値	95% CI	AUC	S.E.	P値
VCAM1 (ng/ml)	0.224	0.051	0.000	0.125 0.324	0.652	0.056	0.011	0.543 0.761	0.584	0.064	0.165	0.468 0.718	0.584	0.064	0.165
GFAP (pg/ml)	0.367	0.059	0.043	0.252 0.481	0.318	0.055	0.002	0.211 0.425	0.875	0.052	0.000	0.774 0.976	0.875	0.052	0.000
IL-6 (ng/ml)	0.239	0.05	0.000	0.141 0.338	0.591	0.059	0.124	0.476 0.707	0.656	0.062	0.021	0.535 0.776	0.656	0.062	0.021
CRP (mg/l)	0.36	0.058	0.034	0.246 0.475	0.695	0.055	0.001	0.587 0.803	0.395	0.063	0.119	0.271 0.519	0.395	0.063	0.119
sTNFR1 (ng/ml)	0.336	0.064	0.013	0.211 0.461	0.629	0.057	0.030	0.518 0.74	0.506	0.07	0.933	0.368 0.643	0.506	0.07	0.933
ロジスティック回帰：GFAP, CRP, VCAM1, IL-6 (性別), sTNFR1 (性別)	0.875	0.035	0.000	0.806 0.944	0.882	0.033	0.000	0.818 0.946	0.914	0.041	0.000	0.835 0.994	0.914	0.041	0.000

【0058】

加えて、人工の神経回路網を使用するなどのカテゴリー化アルゴリズムを考案する別のアプローチ（図9および表5を参照のこと）は類似した性能特性を示す。

【0059】

10

20

30

40

【表 5】

表 5 曲線下の面積

試験結果変数	面積	標準誤差 ^a	漸近有意 確率 ^b	漸近 95%信頼区間	
				下限	上限
ロジスティック回帰：GFAP、CRP、VCAM、IL-6（性別）、sTNFR1（性別）	0.914	0.041	0.000	0.835	0.994
神経回路網：GFAP、IL-6、CRP、VCAM、sTNFR1および性別	0.941	0.029	0.000	0.885	0.998

a. ノンパラメトリック仮説のもとで

b. 帰無仮説：真の面積＝0.5

【0060】

これは、当該技術分野で公知の任意の方法によって導かれるアルゴリズムで関心対象のバイオマーカーを組み合わせる際の確固とした本質をさらに例示する。

【0061】

略語

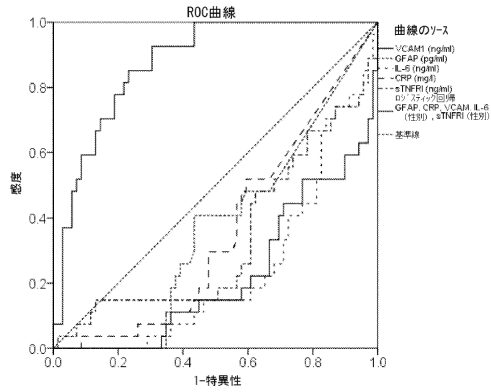
GFAP グリア細胞繊維性酸性タンパク質
 IL-6 インターロイキン-6
 ICAM-1 細胞内接着分子-1
 VCAM-1 血管細胞接着分子-1
 CRP C反応性タンパク質
 FABP 脂肪酸結合タンパク質
 sTNFR1 可溶性TNF α 受容体1
 L-セレクトイン リンパ球接着分子（CD62L）
 P-セレクトイン 血小板細胞接着分子
 D-ダイマー フィブリン分解産物

10

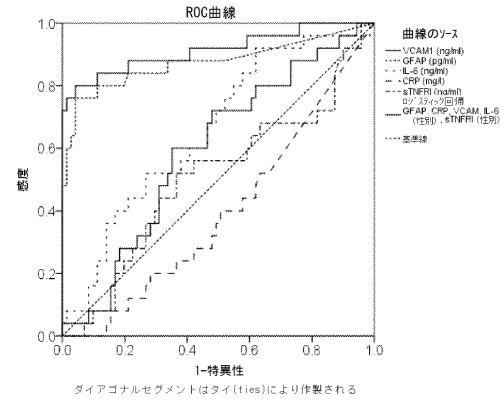
20

30

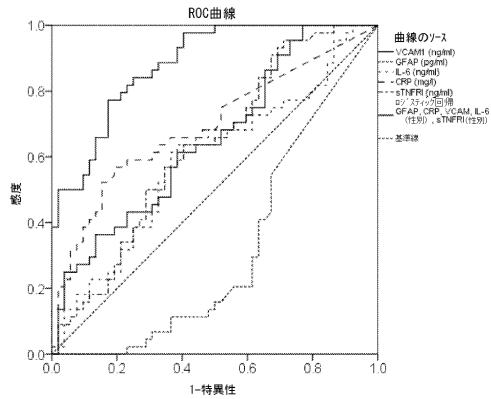
【図 1】



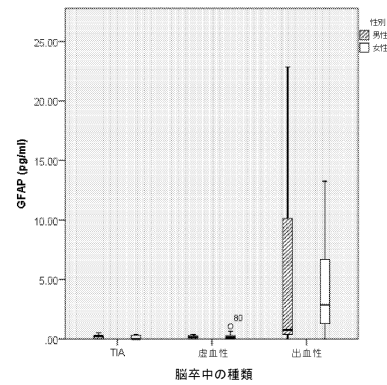
【図 3】



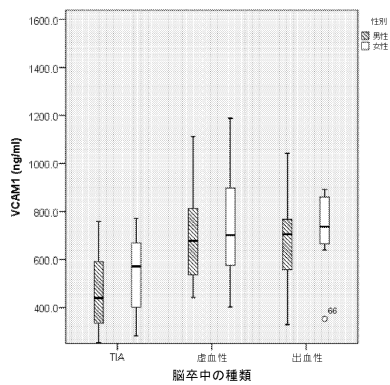
【図 2】



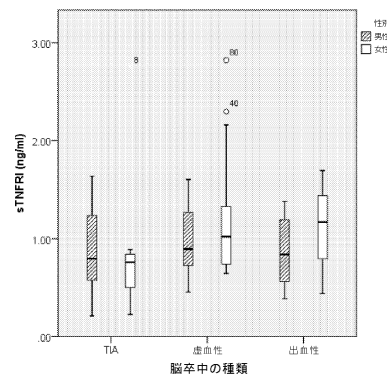
【図 4】



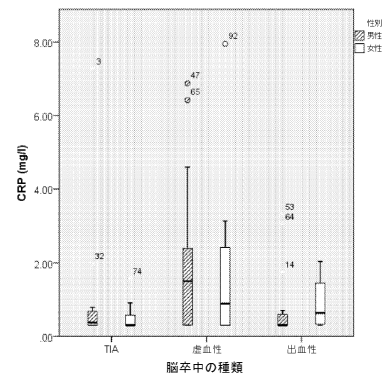
【図 5】



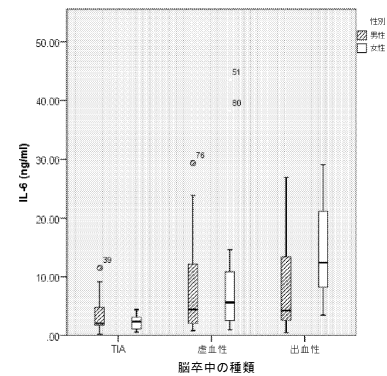
【図 7】



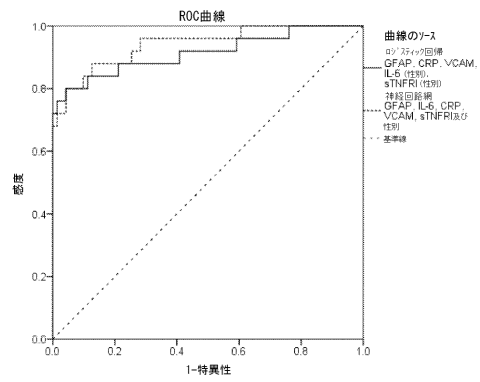
【図 6】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

- (72)発明者 マコネル, アイヴァン
イギリス BT29 4QY カウンティ アントリム クラムリン ダイヤモンド ロード 5
5 アードモア ランドックス ラボラトリーズ リミテッド内
- (72)発明者 ラモント, ジョン
イギリス BT29 4QY カウンティ アントリム クラムリン ダイヤモンド ロード 5
5 アードモア ランドックス ラボラトリーズ リミテッド内
- (72)発明者 フィッツジェラルド, ピーター
イギリス BT29 4QY カウンティ アントリム クラムリン ダイヤモンド ロード 5
5 アードモア ランドックス ラボラトリーズ リミテッド内
- (72)発明者 マクリス, コンスタンティノス
ギリシャ アテネ キフィシア 4561 ニキス ストリート 2 ケーエーティー ゼネラル
ホスピタル内

審査官 磯田 真美

- (56)参考文献 特表2005-522669 (JP, A)
国際公開第03/016910 (WO, A1)
特開2011-107116 (JP, A)
米国特許出願公開第2006/0240480 (US, A1)
特表2006-526140 (JP, A)
国際公開第2004/059293 (WO, A1)
TUTTOLOMONDO, A. et al., Immune-inflammatory markers and arterial stiffness indexes in subjects with acute ischemic stroke, Atherosclerosis, 2010年, Vol. 213, pp. 311-318
CAMPBELL, D.J. et al., Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and N-terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Predicting Ischemic Stroke in Patients With Cerebrovascular Disease, Arch. Neurol., 2006年, Vol. 63, pp. 60-65
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)