

(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2011-237402

(P2011-237402A)

(43) 公開日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(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 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15	Z
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2010-255871 (P2010-255871)	(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
(31) 優先権主張番号	特願2010-93109 (P2010-93109)	(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
(32) 優先日	平成22年4月14日(2010.4.14)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(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】 ガレクチン-3結合蛋白質による脳梗塞の検査方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】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。

【解決手段】患者血漿中の、ガレクチン-3結合蛋白質が、健常者、あるいは病型や予後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、ガレクチン-3結合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た。この知見をもとにした患者より採取された血液試料中のガレクチン-3結合蛋白質の蛋白質量を測定する工程を含む、該患者における脳梗塞の診断のための検査方法、脳梗塞の病型診断のための検査方法、および脳梗塞の予後の予測のための検査方法。

【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ガレクチン - 3 結合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ガレクチン - 3 結合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、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】

被検動物より採取された血液試料中のガレクチン - 3 結合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後の予測のための検査方法。

【請求項 6】

被検動物より採取された血液試料が、脳梗塞発症直後に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 5 に記載の脳梗塞の予後の予測のための検査方法。

20

【請求項 7】

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ガレクチン - 3 結合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 8】

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、該被検体中のガレクチン - 3 結合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。

【請求項 9】

ガレクチン - 3 結合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。

30

【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。

【背景技術】

40

【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。

50

【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。

脳梗塞の予後は、発症後3ヶ月後ないしは1年後までの間にmodified Rankin Scale（非特許文献3）、またはBarthel Index（非特許文献4）により日常生活における動作の障害度を評価することで判断されている。予後を事前に予測することは、脳梗塞の治療方法を早期に決める上で重要である。入院時に測定した血漿中のBNPで特定のカットオフ値を定めることにより死亡が予測できること（非特許文献5）が開示されているが、生存した場合の障害の程度を予測す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)

【非特許文献3】van Swieten, J.C et al., Stroke, 604-607 (1988)

【非特許文献4】Mahoney, F.L et al., Maryland State Med J, 61-65 (1965)

【非特許文献5】Shibazaki, K et al., Inter Med, 1601-1604 (2009)

【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、ガレクチン-3結合蛋白質が、健常者、あるいは病型や予後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、ガレクチン-3結合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。

【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ガレクチン-3結合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ガレクチン-3結合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。

[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、Branch atheromatous disease (BAD)、大動脈原性脳塞栓症、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] 被検動物より採取された血液試料中のガレクチン - 3 結合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後の予測のための検査方法。

[6] 被検動物より採取された血液試料が、脳梗塞発症直後に被検動物より採取されたものであることを特徴とする [5] に記載の脳梗塞の予後の予測のための検査方法。

[7] 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ガレクチン - 3 結合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。

[8] 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、該被検体中のガレクチン - 3 結合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。

[9] ガレクチン - 3 結合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、あるいは病型や予後の異なる患者の血漿中のその濃度と異なるガレクチン - 3 結合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「ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカー」と称することがある）として提供される。ガレクチン - 3 結合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て用いること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や予後の予測を行うことが可能となる。

【発明を実施するための形態】

【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、ガレクチン - 3 結合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）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。

【0011】

本明細書において「ガレクチン - 3 結合蛋白質」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ガレクチン - 3 結合蛋白質を意味し、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。

【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、ガレクチン - 3 結合蛋白質

10

20

30

40

50

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。

【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ガレクチン - 3 結合蛋白質とは、ヒトの場合には、UniProtKBのEntry Name LG3BP_HUMANで示されるアミノ酸配列からなる蛋白質である。ガレクチン - 3 結合蛋白質は、Mac-2-binding proteinとも呼ばれる (J. Biol. Chem. 268 (19), 14245-14249 (1993))。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。

10

【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。

20

30

【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、対象のガレクチン - 3 結合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、対象のガレクチン - 3 結合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 (株) 免疫生物研究所製の s90K/Mac-2BP ELISA Kit (カタログNo. 82557) に付属のマウスモノクローナル抗体等が好ましく用いられる。

40

【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に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) 中の上記ガレクチン - 3 結合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

50

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。

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。本発明に記載のガレクチン-3結合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。

40

【0025】

50

(1 - 1) ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカーを用いた脳梗塞検査方法

本発明のガレクチン - 3 結合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ガレクチン - 3 結合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ガレクチン - 3 結合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。

10

【 0 0 2 6 】

(1 - 2) ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカーを用いた脳梗塞病型検査方法

本発明のガレクチン - 3 結合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」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）、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。

20

【 0 0 2 7 】

検体中に含まれるガレクチン - 3 結合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、血液試料中のガレクチン - 3 結合蛋白質量において、各病型を区別し得るカットオフ値を上述の方法により決定し、検体中のガレクチン - 3 結合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。

30

【 0 0 2 8 】

本発明の血液試料中に含まれるガレクチン - 3 結合蛋白質量により区別し得る病型としては、両病型群の間でガレクチン - 3 結合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、「ラクナ梗塞」とそれ以外の病型、「アテローム血栓性脳梗塞」とそれ以外の病型、「分類不能型」とそれ以外の病型等が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

こ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、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。また、ラクナ梗塞とそれ以外の病型の区別を行う場合の測定では、発症直後から20日目までの間に取得した検体が特に好ましく用いられる。また、アテローム血栓性脳梗塞とそれ以外の病型では、発症直後から20日目までに取得した検体が特に好ましく用いられる。さらに、分類不能型とそれ以外の病型を区別する測定を行うには、発症後3日目から20日目の間に取得した検体を用いることが特に好ましい。

40

【 0 0 3 0 】

また、上記病型においては、ガレクチン - 3 結合蛋白質の血液試料中濃度により以下の表 1 に示す病型の区別をすることも可能である。この場合の検体を取得するに好ましいタイミングも同じく表 1 に示す。

50

【 0 0 3 1 】

【 表 1 】

表 1

区別可能な 病型群	Group1	分類不能	分類不能 心原性脳塞栓	分類不能 アテローム血栓 性	分類不能 アテローム血栓 性	分類不能 ラクナ 心原性脳塞栓
	Group2	ラクナ アテローム血 栓性 心原性脳塞	ラクナ アテローム血 栓性	ラクナ 心原性脳塞栓	ラクナ	アテローム血栓性
検体取得の 好ましい タイミング		発症後3日～ 20日目	発症後3日～ 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		発症後6日～ 8日目	発症後6日～ 16日目	発症直後～ 8日目	発症直後～ 8日目	発症後9日～ 16日目

10

【 0 0 3 2 】

本発明の測定方法で区別できる脳梗塞の病型として、さらに詳細には、「ラクナ梗塞」、「アテローム血栓性脳梗塞」、「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)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「その他型」あるいは「その他」と称することがある)が挙げられる。これら病型でガレクチン-3結合蛋白質の血液試料中濃度により区別し得る組み合わせを、以下の表2及び表3に示し、この場合の検体を取得するに好ましいタイミングも同じく表2及び表3に示す。

20

【 0 0 3 3 】

【表 2】

表 2

区別可能な病型群	Group1	BAD アテローム血栓性	BAD アテローム血栓性 その他	BAD アテローム血栓性 心原性脳塞栓 その他	BAD 大動脈原性塞栓 アテローム血栓性 その他	BAD 大動脈原性塞栓 アテローム血栓性 心原性脳塞栓
	Group2	大動脈原性塞栓 ラクナ 心原性脳塞栓 その他	大動脈原性塞栓 ラクナ 心原性脳塞栓	大動脈原性塞栓 ラクナ	ラクナ 心原性脳塞栓	ラクナ
検体取得の好ましいタイミング		発症後3日～ 20日目	発症後3日～ 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		発症後6日～ 8日目	発症後6日～ 16日目	発症直後～ 8日目	発症直後～ 8日目	発症後9日～ 16日目
区別可能な病型群	Group1	BAD アテローム血栓性 心原性脳塞栓	BAD 大動脈原性塞栓 アテローム血栓性	BAD 大動脈原性塞栓 アテローム血栓性	BAD その他	BAD 大動脈原性塞栓 その他
	Group2	大動脈原性塞栓 ラクナ その他	ラクナ 心原性脳塞栓 その他	ラクナ その他	ラクナ 大動脈原性塞栓 アテローム血栓性 心原性脳塞栓	ラクナ アテローム血栓性 心原性脳塞栓
検体取得の好ましいタイミング		発症後8日～ 20日目	発症直後～ 20日目	発症直後～ 12日目	発症後3日～ 12日目	発症後3日～ 20日目
検体取得の特に好ましいタイミング		発症後9日～ 16日目	発症後6日～ 8日目	発症後6日～ 8日目	発症後6日～ 8日目	発症後6日～ 8日目
区別可能な病型群	Group1	BAD 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓 その他	BAD ラクナ	BAD ラクナ アテローム血栓性	BAD ラクナ アテローム血栓性 その他	BAD ラクナ アテローム血栓性 心原性脳塞栓
	Group2	ラクナ アテローム血栓性	大動脈原性塞栓 アテローム血栓性 心原性脳塞栓	大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓 その他	大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	大動脈原性塞栓
検体取得の好ましいタイミング		発症後3日～ 20日目	発症直後～ 12日目	発症後3日～ 20日目	発症後8日～ 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		発症後6日～ 16日目	発症直後～ 8日目	発症後9日～ 16日目	発症後9日～ 16日目	発症後6日～ 16日目

10

20

30

【 0 0 3 4 】

【表 3 - 1】

表 3-1

区別可能な病型群	Group1	BAD ラクナ アテローム血栓性 心原性脳塞栓 栓	BAD ラクナ 大動脈原性塞栓 アテローム血栓性 心原性脳塞栓	BAD ラクナ その他	BAD ラクナ 心原性脳塞栓 その他	BAD ラクナ 大動脈原性塞栓 その他
	Group2	大動脈原性塞栓 その他	その他	大動脈原性塞栓 アテローム血栓性 心原性脳塞栓	大動脈原性塞栓 アテローム血栓性	アテローム血栓性 心原性脳塞栓
検体取得の好ましいタイミング		発症後3日～ 20日目	発症後3日～ 12日目	発症直後～ 12日目	発症直後～ 12日目	発症後8日～ 20日目
検体取得の特に好ましい		発症後6日～ 16日目	発症後6日～ 8日目	発症直後～ 8日目	発症直後～ 8日目	発症後9日～ 16日目
区別可能な病型群	Group1	BAD ラクナ 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓 その他	BAD ラクナ 心原性脳塞栓	BAD ラクナ 大動脈原性塞栓	BAD ラクナ 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	BAD 大動脈原性塞栓
	Group2	アテローム血栓性	大動脈原性塞栓 アテローム血栓性 その他	アテローム血栓性 心原性脳塞栓 その他	アテローム血栓性 その他	ラクナ アテローム血栓性 心原性脳塞栓 その他
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～ 12日目	発症直後～ 20日目	発症直後～ 20日目	発症後3日～ 20日目
検体取得の特に好ましい		発症直後～ 16日目	発症後6日～ 8日目	発症後6日～ 16日目	発症後6日～ 16日目	発症後9日～ 16日目
区別可能な病型群	Group1	BAD 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓				
	Group2	ラクナ アテローム血栓性 その他				
検体取得の好ましいタイミング		発症後8日～ 20日目				
検体取得の特に好ましい		発症後9日～ 16日目				

10

20

30

【 0 0 3 5】

【表 3 - 2】

表 3-2

区別可能な病型群	Group1	心原性 脳塞栓	心原性 脳塞栓	心原性 脳塞栓	ラクナ	ラクナ	ラクナ	大動脈 原性脳 塞栓	BAD	アテロ ーム血 栓性
	Group2	分類不 能型	ラクナ	大動脈 原性脳 塞栓	大動脈 原性脳 塞栓	BAD	分類不 能型	BAD	分類不 能型	ラクナ
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
検体取得の特に好ましいタイミング		発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目	発症直 後～9日 目

40

【 0 0 3 6】

50

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ガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定し、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ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ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。

【0037】

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であるCRPやD-Dimer等の検体中含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。

10

【0038】

(1-3) ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカを用いた脳梗塞の予後予測の検査方法

本発明のガレクチン - 3 結合蛋白質マーカを用いた脳梗塞検査方法の具体的方法として、被検者（動物）の脳梗塞の予後を予測するための検査方法が挙げられる。脳梗塞の予後は、脳梗塞発症後、ある一定期間の後に、その患者の脳梗塞による障害の程度にて示される。障害の程度は、それ自体公知の既に確定している指標を用いて評価することができる。指標としては、例えば、日本版modified Rankin Scale (mRS) 判定基準（篠原幸人らmRS信頼性研究グループ、modified Rankin Scaleの信頼性に関する研究 - 日本語版判定基準書および問診表の紹介、脳卒中 2007 ; 29 : 6-13）等が用いられる。

20

【0039】

一定の期間後とは、発症後いつの時点でもよいが、被検者（動物）の社会復帰の状態を評価する観点から、例えば発症3ヶ月後から1年後までの間に評価するのが一般的である。予後の予測においては、予想方法の有用性を考慮して、発症直後から6日目程度の被検者から取得した血液試料中のガレクチン - 3 結合蛋白質の量で、発症後2週間から3週間後の該被検者の状態を予測することや、発症後1から2週間目程度の被検者から取得した血液試料中のガレクチン - 3 結合蛋白質の量で、発症後3ヵ月後の該被検者の状態を予測する方法等が好ましい。

【0040】

本発明の測定方法では、予め、予測目的時点で上記mRSをそれぞれ臨床的に判定された患者の、測定目的時の血液試料中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定し、予測目的時点で区別したいmRS間で、上述の方法で両mRS群を区別するカットオフ値を設定する。具体的に説明すると、例えば、発症3ヵ月後のmRSが1~4の患者と5の患者を区別する場合には、発症3ヵ月後（予測目的時）にmRSが0~5の患者の発症直後（測定目的時）の血液試料中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定し、3ヵ月後のmRSが0~4の患者の測定値と5の患者の測定値との間にカットオフ値を設定する。この後、測定目的時の検体を採取し、検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ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り、予測目的時の該被検者（動物）の状態を予測することができる。

30

【0041】

本発明の予測方法で特に好ましくは、発症直後から1週間程度、さらに好ましくは発症直後から2日目の被検者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、発症後10から20日目、あるいは3ヵ月後付近の該被検者のmRSが5となるか / 4以下となるかを予測する方法等が挙げられる。

40

【0042】

また、本発明の他の好ましい予測方法としては、発症後8~20日目の被検者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、3ヵ月後付近の該被検者のmRSが1となるか / 2以上となるかを予測する方法や、発症後8~20日目の被検者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、3ヵ月後付近の該被検者のmRSが1~2となるか / 3以上となるかを予測する方法、発症後8~20日目の検

50

者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、3ヵ月後付近の該被検者の mRS が 1 ~ 3 となるか / 4 以上となるかを予測する方法、さらには、発症後 3 ~ 10 日目の被検者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、3ヵ月後付近の該被検者の mRS が 0 ~ 2 となるか / 3 以上となるかを予測する方法、発症後 3 ~ 10 日目の被検者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、3ヵ月後付近の該被検者の mRS が 0 ~ 3 となるか / 4 以上となるかを予測する方法、発症直後の被検者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、3ヵ月後付近の該被検者の mRS が 5 となるか / 4 以下となるかを予測する方法、あるいは発症後 8 ~ 20 日目の被検者から採取した検体中のガレクチン - 3 結合蛋白質量を測定することにより、3ヵ月後付近の該被検者の mRS が 5 となるか / 4 以下となるかを予測する方法等が好ましい例として挙げられる。

10

【0043】

かくして、本発明の方法により脳梗塞の診断がついた被検者（動物）は、それぞれの疾患に適した治療法を受けることにより、予後の経過や治療効果が非常に良好となる。

【0044】**(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、免疫測定法によりガレクチン - 3 結合蛋白質マーカーを測定する場合には、抗ガレクチン - 3 結合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。

20

【0045】

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。

30

【0046】

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。

40

【0047】

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、ガラクトシダーゼなどの標識用酵素をラベルしたものの、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。

【0048】

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

50

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。

【0049】

(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ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ-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。

【0050】

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(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。

【0051】

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。

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ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ-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。

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、ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ-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。また、該マーカ-で予後不良となる可能性が予測できた場合には、フリーラジカルスカベンジャー等の数種の治療薬を治療早期から併用したり、リハビリテーションの内容を充実させることにより、予後が好転するような治療を施すことが可能となる。

【0052】

(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ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ-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。

【0053】

被検体とは、ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ-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、細胞等でガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ-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。

ガレクチン - 3 結合蛋白質マーカ-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。また、非ヒト動物個体の予後を該マーカ-でモニタリングすることにより、ヒトの脳梗塞の予後に有効な治療薬を開発することが可能となる。

【0054】

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

10

20

30

40

50

、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。

【0055】

候補化合物と接触させた後に、該被検体中のガレクチン - 3 結合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

10

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ガレクチン - 3 結合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】

【0056】

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。

20

【0057】

実施例1 ガレクチン - 3 結合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）、14日後（表中「DAY14」と記載されている）、および3ヵ月後（表中「3M」と記載されている）時点の脳梗塞患者と健常者（それぞれ表4中に記載の人数）から採血を行い、EDTA血漿を取得した。（株）免疫生物研究所製のs90K/Mac-2BP ELISA Kit(カタログNo.82557)を用いた免疫測定法により、EDTA血漿中のガレクチン - 3 結合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ガレクチン - 3 結合蛋白質を用いて検量線を作成し、この検量線から血漿中のガレクチン - 3 結合蛋白質の濃度を算出した。

30

【0058】

次に測定値が検出下限を下回った場合には、検出下限の1/2の値を、測定値が検出上限を上回った場合には、検出上限の2倍の値を補完して、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4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、発症後7日目及び14日目の脳梗塞患者から血液を取得して、健常者と血漿中のガレクチン - 3 結合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わかった。

40

【0059】

【表4】

表4

	DAY0	DAY7	DAY14	3M
Group1	脳梗塞	脳梗塞	脳梗塞	脳梗塞
Group2	健常	健常	健常	健常
AUC of ROC curve	0.651	0.743	0.742	0.588
Number of group1	114	114	30	98
Number of group2	55	55	55	55

【0060】

50

実施例2 ガレクチン-3結合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）、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）、14日後（表中「DAY14」と記載されている）、および3ヵ月後（表中「3M」と記載されている）時点で採血を行い（それぞれ表5中に記載の人数）からそれぞれEDTA血漿を取得した。（株）免疫生物研究所製のs90K/Mac-2BP ELISA Kit(カタログNo.82557)を用いた免疫測定法により、EDTA血漿中のガレクチン-3結合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ガレクチン-3結合蛋白質を用いて検量線を作成し、この検量線から血漿中のガレクチン-3結合蛋白質の濃度を算出した。

10

20

30

40

50

【0061】

次に測定値が検出下限を下回った場合には、検出下限の1/2の値を、測定値が検出上限を上回った場合には、検出上限の2倍の値を補完して、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5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。つまり、発症後7日目の各病型患者の血漿中のガレクチン-3結合蛋白質の濃度を比較することによりラクナ梗塞とそれ以外の病型の脳梗塞患者を判別するための検査が行えることがわかった。また、発症後14日目の各病型患者の血漿中のガレクチン-3結合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それ以外の病型の脳梗塞患者を判別するための検査が行えることがわかった。

【0062】

【表5】

表5

Group1	分類不能	分類不能 心原性脳塞栓	分類不能 アテローム血栓 性	分類不能 アテローム血栓 性	分類不能 ラクナ	分類不能 ラクナ 心原性脳塞栓	分類不能 ラクナ アテローム血栓
Group2	ラクナ アテローム血栓 性	ラクナ アテローム血栓 性	ラクナ 心原性脳塞栓	ラクナ	アテローム血栓 性 心原性脳塞栓	アテローム血栓 性	心原性脳塞栓
DAY0							
AUC of ROC curve	0.544	0.541	0.626	0.659	0.603	0.650	0.514
Number of group1	23	58	44	79	56	91	77
Number of group2	89	54	68	33	56	21	35
DAY7							
AUC of ROC curve	0.674	0.622	0.690	0.739	0.588	0.611	0.516
Number of group1	20	51	42	73	50	81	72
Number of group2	83	52	61	30	53	22	31
DAY14							
AUC of ROC curve	0.602	0.632	0.614	0.608	0.639	0.761	0.557
Number of group1	7	18	14	25	12	23	19
Number of group2	23	12	16	5	18	7	11
3M							
AUC of ROC curve	0.635	0.558	0.627	0.614	0.520	0.563	0.526
Number of group1	16	42	35	61	45	71	64
Number of group2	74	48	55	29	45	19	26

【0063】

さらに、詳細な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 atherom

atous disease」(表中では「BAD」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「その他」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)、14日後(表中「DAY14」と記載されている)、および3ヵ月後(表中「3M」と記載されている)時点で採血を行い(それぞれ表6中に記載の人数)EDTA血漿を取得した。該血漿中のガレクチン-3結合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。その結果を表6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。

【0064】

つまり、発症直後の各病型患者の血漿中のガレクチン-3結合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「ラクナ梗塞」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。

10

【0065】

また、発症後7日目の各病型患者の血漿中のガレクチン-3結合蛋白質の濃度を比較することにより、「心原性脳塞栓症」と「分類不能型脳梗塞」の病型の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「心原性脳塞栓症」と「ラクナ梗塞」の病型の脳梗塞患者の判別、「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、「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「Branch atheromatous disease」の病型の脳梗塞患者の判別、「ラクナ梗塞」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」の病型の脳梗塞患者の判別、「Branch atheromatous disease」と「分類不能型脳梗塞」の病型の脳梗塞患者の判別、「ラクナ梗塞」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別、「BADとラクナ梗塞」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別、また、「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、「大動脈原性脳塞栓症とその他」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別、「その他」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別、及び「ラクナ梗塞とBAD及び心原性脳塞栓症」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が行えることがわかった。

20

【0066】

また、発症後14日目の各病型患者の血漿中のガレクチン-3結合蛋白質の濃度を比較することにより「BADとアテローム血栓性脳梗塞」と、それ以外の脳梗塞病型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「BADとアテローム血栓性脳梗塞、及びその他」とそれ以外の病型脳梗塞患者の判別、また、「ラクナ梗塞と大動脈原性脳塞栓症」とそれ以外の病型の脳梗塞患者を判別、「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、「大動脈原性脳塞栓症とその他」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別、「アテローム血栓性脳梗塞」とそれ以外の病型の脳梗塞患者の判別、及び「アテローム血栓性脳梗塞とその他」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が行えることがわかった。

30

【0067】

さらに、発症後3ヶ月の各病型患者の血漿中のガレクチン-3結合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その他」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が行えることがわかった。

40

【0068】

【表 6 - 1】

表 6 - 1

Group1	心原性脳塞栓	心原性脳塞栓	心原性脳塞栓	ラクナ	ラクナ	ラクナ	大動脈原性脳塞栓	BAD	アテローム血栓性
Group2	分類不能型	ラクナ	大動脈原性脳塞栓	大動脈原性脳塞栓	BAD	分類不能型	BAD	分類不能型	ラクナ
DAY0									
AUC of ROC curve									0.724
Number of group1									23
Number of group2									33
DAY7									
AUC of ROC curve	0.764	0.701	0.737	0.888	0.755	0.85	0.8	0.833	0.731
Number of group1	35	35	35	32	32	32	5	9	25
Number of group2	8	32	5	5	9	8	9	8	32

10

【 0 0 6 9 】

【表 6 - 2】

表 6 - 2

Group1	BAD	BAD アテローム血栓性	BAD アテローム血栓性 その他	BAD アテローム血栓性 その他 心原性脳塞栓	BAD アテローム血栓性 その他 大動脈原性塞栓
Group2	ラクナ アテローム血栓性 その他 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	ラクナ その他 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	ラクナ 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	ラクナ 大動脈原性塞栓	ラクナ 心原性脳塞栓
DAY0					
AUC of ROC curve		0.565	0.597	0.610	0.622
Number of group1		8	29	38	73
Number of group2		104	83	74	39
DAY7					
AUC of ROC curve		0.504	0.592	0.651	0.670
Number of group1		8	30	37	68
Number of group2		95	73	66	35
DAY14					
AUC of ROC curve		0.593	0.748	0.744	0.722
Number of group1		3	10	11	22
Number of group2		27	20	19	8
3M					

30

40

【 0 0 7 0 】

【表 6 - 3】

表 6-3

Group1	BAD アテローム血栓 性 その他 大動脈原性塞栓	BAD アテローム血栓 性 心原性脳塞栓	BAD アテローム血栓 性 大動脈原性塞栓	BAD アテローム血栓 性 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	BAD その他
Group2	ラクナ	ラクナ その他 大動脈原性塞栓	ラクナ その他 心原性脳塞栓	ラクナ その他	ラクナ アテローム血栓性 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓
DAY0					
AUC of ROC curve	0.659	0.588	0.611	0.614	0.515
Number of group1	79	64	35	70	17
Number of group2	33	48	77	42	95
DAY7					
AUC of ROC curve	0.739	0.593	0.634	0.646	0.629
Number of group1	73	61	35	66	15
Number of group2	30	42	68	37	88
DAY14					
AUC of ROC curve	0.608	0.698	0.609	0.583	0.587
Number of group1	25	21	13	24	4
Number of group2	5	9	17	6	26
3M					
AUC of ROC curve	0.614	0.519	0.584	0.554	0.600
Number of group1	61	51	29	55	12
Number of group2	29	39	61	35	78

【 0 0 7 1 】

【表 6 - 4】

表 6-4

Group2	ラクナ アテローム血栓 性 大動脈原性 塞栓	ラクナ アテローム血栓 性 心原性脳塞栓	ラクナ アテローム血栓 性	アテローム血栓 性 その他 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	その他 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓
DAY0					
AUC of ROC curve	0.520	0.544	0.541	0.661	0.558
Number of group1	52	23	58	41	62
Number of group2	60	89	54	71	50
DAY7					
AUC of ROC curve	0.579	0.674	0.622	0.711	0.625
Number of group1	46	20	51	38	60
Number of group2	57	83	52	65	43
DAY14					
AUC of ROC curve	0.513	0.602	0.632	0.534	0.660
Number of group1	15	7	18	8	15
Number of group2	15	23	12	22	15
3M					
AUC of ROC curve	0.526	0.635	0.558	0.606	0.561
Number of group1	38	16	42	35	54
Number of group2	52	74	48	55	36

【 0 0 7 2 】

【表 6 - 5】

表 6-5

Group1	BAD ラクナ アテローム血栓 性 その他	BAD ラクナ アテローム血栓 性 その他	BAD ラクナ アテローム血栓 性 その他 大動脈原性塞栓	BAD ラクナ アテローム血栓 性 心原性脳塞栓	BAD ラクナ アテローム血栓 性 大動脈原性塞栓
Group2	大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	大動脈原性塞栓	心原性脳塞栓	その他 大動脈原性塞栓	その他 心原性脳塞栓
DAY0					
AUC of ROC curve	0.536	0.604	0.514	0.599	0.538
Number of group1	71	106	77	97	68
Number of group2	41	6	35	15	44
DAY7					
AUC of ROC curve	0.564	0.741	0.516	0.761	0.582
Number of group1	67	98	72	91	65
Number of group2	36	5	31	12	38
DAY14					
AUC of ROC curve	0.667	0.815	0.557	0.731	0.549
Number of group1	16	27	19	26	18
Number of group2	14	3	11	4	12
3M					
AUC of ROC curve	0.513	0.692	0.526	0.704	0.529
Number of group1	60	86	64	80	58
Number of group2	30	4	26	10	32

10

20

【 0 0 7 3 】

【表 6 - 6】

表 6-6

Group1	BAD ラクナ アテローム血栓 性 大動脈原性塞栓	BAD ラクナ その他	BAD ラクナ その他 心原性脳塞栓	BAD ラクナ その他 大動脈原性塞栓	BAD ラクナ その他 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓
Group2	その他	アテローム血栓 性 大動脈原性塞 栓 心原性脳塞栓	アテローム血栓 性 大動脈原性塞 栓	アテローム血栓 性 心原性脳塞 栓	アテローム血栓 性
DAY0					
AUC of ROC curve	0.584	0.626	0.654	0.603	0.650
Number of group1	103	50	85	56	91
Number of group2	9	62	27	56	21
DAY7					
AUC of ROC curve	0.749	0.635	0.654	0.588	0.611
Number of group1	96	45	76	50	81
Number of group2	7	58	27	53	22
DAY14					
AUC of ROC curve	0.552	0.524	0.583	0.639	0.761
Number of group1	29	9	20	12	23
Number of group2	1	21	10	18	7
3M					
AUC of ROC curve	0.692	0.554	0.598	0.520	0.563
Number of group1	84	41	67	45	71
Number of group2	6	49	23	45	19

30

40

50

【 0 0 7 4 】

【 表 6 - 7 】

表6-7

Group1	BAD ラクナ 心原性脳塞栓	BAD ラクナ 大動脈原性塞栓	BAD ラクナ 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓	BAD 心原性脳塞栓	BAD 大動脈原性塞栓	BAD 大動脈原性塞栓 心原性脳塞栓
Group2	アテローム血栓 性 その他 大動脈原性塞栓	アテローム血栓 性 その他 心原性脳塞栓	アテローム血栓性 その他	ラクナ アテローム血栓 性 その他 大動脈原性塞栓	ラクナ アテローム血栓性 その他 心原性脳塞栓	ラクナ アテローム血栓 性 その他
DAY0						
AUC of ROC curve	0.657	0.632	0.648	0.506	0.509	0.516
Number of group1	76	47	82	43	14	49
Number of group2	36	65	30	69	98	63
DAY7						
AUC of ROC curve	0.706	0.656	0.671	0.516	0.603	0.560
Number of group1	69	43	74	39	13	44
Number of group2	34	60	29	64	90	59
DAY14						
AUC of ROC curve	0.586	0.651	0.747	0.520	0.625	0.636
Number of group1	19	11	22	14	6	17
Number of group2	11	19	8	16	24	13
3M						
AUC of ROC curve	0.640	0.570	0.612	0.525	0.579	0.510
Number of group1	61	39	65	32	10	36
Number of group2	29	51	25	58	80	54

10

20

【 0 0 7 5 】

実施例3 ガレクチン-3結合蛋白質マーカーを用いた脳梗塞の予後予測のための検査方法の評価

脳梗塞の予後は、脳梗塞発症後、ある一定期間の後に、その患者の脳梗塞による障害の程度にて示される。脳梗塞発症後14日目の障害の程度を、日本版modified Rankin Scale (mRS) 判定基準(篠原幸人らmRS信頼性研究グループ、modified Rankin Scaleの信頼性に関する研究-日本語版判定基準書および問診表の紹介、脳卒中2007;29:6-13)を用いて0~5に分類した患者について、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)、14日後(表中「DAY14」と記載されている)、および3ヵ月後(表中「3M」と記載されている)時点で採血を行い(それぞれ表7中に記載の人数)EDTA血漿を取得した。

該血漿中のガレクチン-3結合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。その結果を表7に示す。

【 0 0 7 6 】

また、脳梗塞発症後3ヵ月後の障害の程度を同様に予測しえるかを確認した結果を表8に示す。ここでは脳梗塞発症後3ヵ月後の障害の程度を、日本版modified Rankin Scale (mRS) 判定基準を用いて0~5に分類した患者について、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)、および3ヵ月後(表中「3M」と記載されている)時点で採血を行い(それぞれ表8中に記載の人数)EDTA血漿を取得し、該血漿中のガレクチン-3結合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予後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。

【 0 0 7 7 】

具体的には、脳梗塞発症後3ヵ月後の障害の程度(予後)について、3ヵ月後に各ランクとなる患者の発症直後及び発症後7日目の血漿中のガレクチン-3結合蛋白質の濃度を比較することにより、発症後3ヵ月でランク5となる患者とそれ以外の患者を判別するた

30

40

50

めの検査を行うことができることがわかった。

【 0 0 7 8 】

【 表 7 】

表 7

Group1	4 5 3 2 1	4 5 3 2	5 4 3	5 4	5
Group2	0	1 0	2 1 0	3 2 1 0	4 3 2 1 0
DAY0					
AUC of ROC curve	0.522	0.546	0.570	0.568	0.678
Number of group1	81	55	37	29	5
Number of group2	22	48	66	74	98
DAY7					
AUC of ROC curve	0.501	0.504	0.560	0.562	0.535
Number of group1	86	57	38	30	5
Number of group2	22	51	70	78	103
DAY14					
AUC of ROC curve	0.966	0.510	0.537	0.583	0.648
Number of group1	29	26	22	16	5
Number of group2	1	4	8	14	25
3M					
AUC of ROC curve	0.506	0.568	0.525	0.555	0.616
Number of group1	82	56	37	29	5
Number of group2	16	42	61	69	93

10

20

【 0 0 7 9 】

【 表 8 】

表 8

Group1	4 2 1 3 5	4 2 3 5	4 3 5	4 5	5
Group2	0	0 1	0 2 1	0 2 1 3	4 0 2 1 3
DAY0					
AUC of ROC curve	0.524	0.513	0.503	0.532	0.770
Number of group1	76	50	30	17	1
Number of group2	25	51	71	84	100
DAY7					
AUC of ROC curve	0.515	0.580	0.631	0.636	0.844
Number of group1	82	53	29	16	1
Number of group2	25	54	78	91	106
3M					
AUC of ROC curve	0.506	0.522	0.536	0.511	0.938
Number of group1	75	51	28	16	1
Number of group2	23	47	70	82	97

30

【 産業上の利用可能性 】

40

【 0 0 8 0 】

本発明の方法によれば脳梗塞の診断や予後予測の検査や治療・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 尾前 照雄
福岡県糟屋郡久山町大字久原1822番地1 一般社団法人久山生活習慣病研究所内
- (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 磯村 哲
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 粟野 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 渡部 和加子
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 鈴木 一夫
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 金谷 啓一郎
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 DA36 FB03