

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年12月8日(08.12.2022)



(10) 国際公開番号

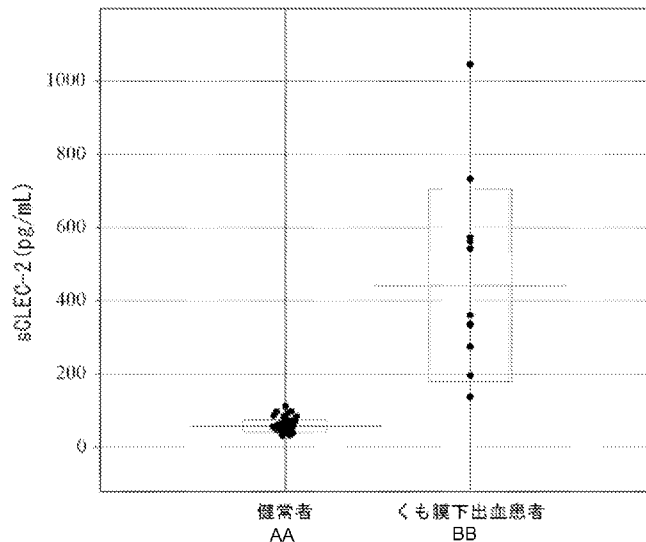
WO 2022/255349 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/022077
- (22) 国際出願日: 2022年5月31日(31.05.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-091607 2021年5月31日(31.05.2021) JP
- (71) 出願人: 株式会社 L S I メディエンス (LSI MEDIENCE CORPORATION) [JP/JP];
〒1018517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 和田 英夫(WADA Hideo); 〒5108561 三重県四日市市大字日永5450番地13
- 2 地方独立行政法人三重県立総合医療センター内 Mie (JP). 川村 雅英(KAWAMURA Masahide); 〒1018517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号 株式会社 L S I メディエンス内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 山口 健次郎(YAMAGUCHI Kenjiro); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目67番8号 板橋中央ビル5階 森田・山口国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) Title: METHOD FOR ASSESSING RISK OF HEMORRHAGIC STROKE USING SOLUBLE CLEC2

(54) 発明の名称: 可溶性CLEC2を用いた出血性脳卒中のリスク評価法

[図2]



AA Normal subjects
BB Patients with subarachnoid hemorrhage

(57) Abstract: Provided is a means of easily supplementing diagnosis using a blood test in medical care for a hemorrhagic stroke. This method comprises a step for measuring (or determining) the concentration of soluble CLEC2 (or a value calculated by dividing soluble CLEC-2 concentration by platelet count) present in blood sampled from a patient who is suspected of having a hemorrhagic stroke or a patient who is diagnosed as having a hemorrhagic stroke.



WO 2022/255349 A1

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
-

(57) 要約：出血性脳卒中の診療において、血液検査で簡便に診断を補う手段を提供する。前記方法は、出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者から採取した血液中に存在する、可溶性C L E C 2濃度 (又は可溶性C L E C - 2濃度を血小板数で除した値) を測定 (又は決定) する工程を含む。

明 細 書

発明の名称：

可溶型CLEC2を用いた出血性脳卒中のリスク評価法

技術分野

[0001] 本発明は、可溶型CLEC2を用いた出血性脳卒中の診断方法、モニタリング方法に関する。

背景技術

[0002] 脳卒中は、脳の血管が詰まる事によって発症する虚血性脳卒中、即ち脳梗塞と、脳の血管が切れることにより発症する出血性脳卒中、即ち脳出血、くも膜下出血とを含む疾患群であり、世界の死亡原因では虚血性心疾患について第2位をしめる。脳卒中は死亡原因の多くを占めるだけでなく、命を取り留めた後でも重度の後遺症を残すことが多く介護が必要となる大きな要因となっていて、患者の負担、また社会的負担も大きいことから、予防、早期診断、診断後の迅速な対応、と幅広い多くの医療関係者によるケアやリスク管理ができる体制が必要である。

[0003] 出血性脳卒中には脳の表面の動脈にできた動脈瘤が破裂するなどして生じるくも膜下出血と、脳内の細い動脈が破れて発症する脳出血がある。

[0004] くも膜下出血は、くも膜と呼ばれる脳表面に在る膜と脳との間の空間にある血管の出血である。くも膜下出血の症状はほとんどが激しい頭痛であり、「バットで殴られたような頭痛」あるいは「これまで体験したことのない頭痛」などと表現されほどのものである。くも膜下出血の死亡率は30%にも達し、すぐに対処が必要な非常に重篤な急性期疾患であり、出来るだけ早く診断する必要がある。

[0005] くも膜下出血の診断は、典型的な臨床症状を呈する場合はすぐにCTスキャン（以下CTと略す）画像により比較的容易に確定することができる。CTによる画像検査の感度（患者の陽性率）は発症後12時間では98～100%と言われ診断能は非常に良好であり、それだけで診断可能である。しか

し、CT検査装置が無い場合はCT検査装置のある施設への搬送が必要となるし、地域によってはCT検査装置のある病院が少ない場合や感度の悪いCT検査装置しかない場合もある。また、くも膜下出血症例の10～15%は徒歩で来院する軽症例であり、これらの症例では、発症から時間が経過している、あるいは出血が軽度であるなどの理由で、CTの画像では出血が確認できないこともある。このような場合、腰椎に針を刺して髄液を採取し、その中の血液の有無を確認することになる。この検査の感度（患者の陽性率）はほぼ100%であり、CT画像が陰性の場合を補う非常に良いものであるが、腰椎に針を刺すため侵襲性が高く患者への負担が大きい検査法である。

[0006] 血液検査によってくも膜下出血を診断しようとする試みとして、D-ダイマー測定などが過去に提案された。しかし、髄液測定を補うためには感度（患者の陽性率）がほぼ100%で無ければならないが、髄液測定だけでなく従来の血液検査項目においてもそのような感度を達成したものは無く、現在実際に使用されているものはない。

[0007] くも膜下出血では発症後初期に救命できたとしても、その後脳血管攣縮を起こすなどの合併症も治療上の大きな問題である。脳血管攣縮は発症4日後くらいから2～3週間後までに起こることが多いので、患者の経過観察は非常に重要となる。くも膜下出血の診療にあたっては、単にくも膜下出血であるかどうかを診断するだけでなく、発症後に脳血管攣縮などの重大な合併症を起こすかどうかの予測も重要な要素となる。

[0008] くも膜下出血の合併症を予測しようとするバイオマーカーとしては、髄液をサンプルとするものは数多く知られている。エンドセリン、TNF- α 、IL-8、IL-6、トロンビン-アンチトロンビン複合体、HMGB1等多くの髄液中のバイオマーカーがくも膜下出血患者の合併症と関連するとの記載があるが、これらは腰椎から髄液を採取する必要があるので、実用には至っていない。仮に行ったとしても、侵襲性が高く患者の負担が大きいため検体の採取は1回だけで、経時的变化を見るために使用することは現実的ではない。

[0009] 一方、脳出血は何らかの原因により脳の血管が破れて、脳の中に出血を起こす急性疾患である。出血による血の塊が脳を圧迫したり、脳にむくみが起こったりして、脳の機能が障害される。出血した部位や量によって症状は異なるとされているが、症状は頭痛、吐き気、嘔吐、といった感覚の症状である場合や、手や足の運動麻痺、痺れ、歩行障害といった運動の症状などさまざまであり、脳梗塞と似た症状も含まれることから見分けることが難しいとされている。また、出血量が多い場合には生命に危険が及ぶこともある。くも膜下出血と同様CTで診断されることが多い。

[0010] 脳出血は診断後血圧を下げるなどの治療等により出血が止まればよいが、止まらない場合は脳での血腫の増大が起き症状は増悪する。血腫の増大はCT画像を何度も撮れば確認できるが、前述の通り、一定以上の精度を備えたCT検査装置によるCT画像検査を頻繁に行うことが困難である場合も少なくない。

また、脳出血の病態をモニタリングするバイオマーカーとしては、S100 β やGFAP等が研究レベルでは知られているが、その臨床的有用性は低く実際の臨床の場では使用されているものはないため、血液検査等で簡便にモニターできる検査はない。

[0011] C-type lectin-like receptor 2 (CLEC2) は血小板活性化蛇毒ロドサイチンの受容体として、血小板上に同定された。CLEC2はヒトではほぼ血小板・巨核球特異的に発現しており、血小板に特異的な分子と言える。このsCLEC2は血小板が活性化される際に、可溶性CLEC2 (soluble CLEC2、以下sCLEC2と略記) として血液中に放出されることが報告された (特許文献1、非特許文献1)。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：特許第6078845号公報

特許文献2：特願2020-032797

特許文献3：特願2021-003671

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：F. Kazama et al., Platelets 2015; 26(8):711-719
非特許文献2：Y. Yamashita et al., Thrombosis Research 178 (2019) 54-58

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0014] 出血性脳卒中は死亡率も高く、また死亡を免れたとしても後遺症が残る可能性がある重篤な急性期疾患であるため、出来るだけ早く診断し治療を開始することが極めて重要である。典型的な症状を呈し、発症後短時間に医療機関を受診して、CT、MRI等の画像検査を受け脳内の出血が確認された場合はそれだけで診断が可能であるが、軽症で出血量が少なかったり、軽症で時間が経ってから専門的な医療機関にたどり着いた場合等では、CT画像等では出血が確認できない場合もある。また、国、地域の状況により感度の高いCT、MRIを持つ医療機関が限られる場合もある。そのような場合、くも膜下出血では腰椎穿刺による髄液検査という侵襲性の高い検査を受けることになる。脳出血では腰椎穿刺は実施されないが、CT画像等で確認ができなかった場合、的確な診断が困難になってしまうという問題がある。
- [0015] くも膜下出血は初期治療により死を免れたとしても、脳血管攣縮という非常に危険な合併症があるため、患者は初期治療後もしばらくは医師の監視下で慎重な療養が必要となる。脳血管攣縮を予測できるバイオマーカーは文献的には髄液を使ったものはあるが、血液検査で簡便に病態をモニタリングできるバイオマーカーで実際の臨床に使用されているものはない。
- [0016] 脳出血は、初期治療はCT、MRI等で診断した後、降圧等の治療に入るが、その治療が奏功して止血ができているかをモニタリングできるバイオマーカーは存在しない。
- [0017] 従って本発明の課題は、出血性脳卒中の診療において、血液検査で簡便に診断を補う手段を提供することである。さらに、くも膜下出血の治療中の患

者の状態を血液検査によって簡便にモニタリングする方法を提供することである。また、脳出血については、血液検査で簡便に治療効果を判定し、病態をモニタリングする手段を提供することである。

課題を解決するための手段

[0018] 本発明者らは前記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、出血性脳卒中患者の血中 s C L E C 2 濃度は、健常者と比べほぼ全ての患者において上昇していることを見出し、本発明を完成させるに至った。即ち、血液検査によって簡便に、患者の陽性率である感度に非常に優れ、出血性脳卒中患者を検出することにより、くも膜下出血、脳出血の診断をする方法を見出した。

[0019] 更に、くも膜下出血患者、脳出血患者の s C L E C 2 濃度を経時的に測定してその変動を観察することによって、くも膜下出血患者の状態のモニタリングが可能であることを見出した。これにより、くも膜下出血患者の脳血管攣縮などの重篤な合併症の予測に使用できる可能性もある。

[0020] 出血性脳卒中患者と出血性脳卒中ではない患者を、s C L E C 2 を使用して判定するには、適切な閾値、即ち閾値が必要となる。本発明では、血中 s C L E C 2 濃度の出血性脳卒中の閾値は 1 3 7 p g / m L 以下であることが好ましいことを見いだした。

これらをもとに、s C L E C 2 を用いた出血性脳卒中のリスク評価方法として、本発明を完成させるに至った。

[0021] すなわち、本発明は、以下を提供する：

[1] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者から採取した血液中に存在する、可溶性 C L E C 2 濃度を測定する工程を含む、出血性脳卒中のリスク評価を行う方法。

[2] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、

(1) 前記患者に由来する血液試料を提供する工程、

(2) 前記試料中の可溶性 C L E C 2 濃度を決定する工程、

(3) 前記可溶性CLEC2濃度と、前記患者における出血性脳卒中の存在若しくは非存在、又は転帰の可能性を相関させる工程、を含む、[1]の方法。

[3] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、前記可溶性CLEC2濃度と、前記患者における出血性脳卒中の存在若しくは非存在、又は転帰の可能性を相関させる工程が、前記可溶性CLEC2濃度の変化に基づいて、リスクを前記患者が有するかどうかを評価することを含む、[2]の方法。

[4] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、可溶性CLEC2濃度と出血性脳卒中を相関させる工程で、その閾値が137 pg/mLである、[2]又は[3]の方法。

[5] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、

(1) 前記患者に由来する血液試料を提供する工程、

(2) 前記試料中の可溶性CLEC2濃度を決定する工程、

(3) 前記試料中の血小板数を測定する工程、

(4) 前記可溶性CLEC2濃度を血小板数で除する工程、

(5) 前記可溶性CLEC2濃度を血小板数で除した値と、前記患者における出血性脳卒中の存在又は非存在を相関させる工程、を含む、[1]の方法。

[6] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者における出血性脳卒中のリスク評価を行う方法であって、可溶性CLEC2濃度を血小板数で除した値と出血性脳卒中を相関させる工程で、前記値の閾値が0.7~1.0である、[5]の方法。

[7] 出血性脳卒中が、くも膜下出血又は脳出血のいずれかである、[1]~[6]のいずれかの方法。

[8] 可溶性CLEC2濃度を決定する工程が、高感度免疫測定法、例えば

、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、蛍光免疫測定法である、
[1] ~ [7] のいずれかの方法。

[0022] また、本発明には、

試料中の可溶性CLEC2濃度（又は可溶性CLEC-2濃度を血小板数で除した値）を測定（又は決定）する、出血性脳卒中のリスク評価を行う方法

、

試料中の可溶性CLEC2濃度（又は可溶性CLEC-2濃度を血小板数で除した値）を測定（又は決定）する、出血性脳卒中のリスク評価を補助する方法、

出血性脳卒中のリスク評価のために、試料中の可溶性CLEC2濃度（又は可溶性CLEC-2濃度を血小板数で除した値）を測定（又は決定）する方法、

試料中の可溶性CLEC2濃度（又は可溶性CLEC-2濃度を血小板数で除した値）を測定（又は決定）することを特徴とする、出血性脳卒中の *in vitro* リスク評価方法、

可溶性CLEC2濃度を検出できる抗体の、出血性脳卒中のリスク評価用キットの製造における使用、

出血性脳卒中のリスク評価に必要な情報を提供するために、試料中の可溶性CLEC2濃度（又は可溶性CLEC-2濃度を血小板数で除した値）を測定（又は決定）する方法

が含まれる。

発明の効果

[0023] 本発明の方法である、出血性脳卒中を疑われる患者血液中に存在するsCLEC2濃度を測定することで、迅速かつ簡便に出血性脳卒中の診断を行うことが可能となる。また、くも膜下出血の診断後の治療経過のモニタリングにおいても、治療効果の判定や合併症予測の精度の向上が期待される。脳出血患者については、患者血液中に存在するsCLEC2濃度を測定することで、簡便に治療効果の判定が可能となる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]ヒト s C L E C 2 蛋白質を標準品として用いて作成した標準曲線である

。

[図2]くも膜下出血患者と健常者とで s C L E C 2 の血漿中濃度を比較した図である。

[図3]脳出血患者と健常者とで s C L E C 2 の血漿中濃度を比較した図である

。

[図4]くも膜下出血症例の経時的モニタリング例である。

[図5]脳出血症例の経時的モニタリング例である。

発明を実施するための形態

[0025] 以下において、本発明の実施形態について詳細に説明するが、利用方法の態様についてはこれに限定されるものではない。

[0026] また、本明細書において「C L E C 2」とは、C型レクチンファミリーに属する血小板活性化受容体であり、通常、血小板の膜に存在するが、血小板の活性化に伴って、血液中に放出される。本明細書において用語「可溶性 C L E C 2 (s C L E C 2)」とは、このような血小板から遊離し、血液中に検出される C L E C 2 または C L E C 2 由来の分子のことを意味する。

[0027] s C L E C 2 には、還元条件下 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) における分子量約 40 kDa のタンパク質、分子量約 32 kDa のタンパク質、分子量約 25 kDa のタンパク質などが含まれるとされる。(非特許文献 1) 分子量約 40 kDa のタンパク質、分子量約 32 kDa のタンパク質は血小板膜表面に存在し、血小板活性化に伴って産生されるマイクロパーティクルに含まれた状態で放出されると推定される。これらには糖鎖が付加されていると考えられる。一方、分子量約 25 kDa のタンパク質は血小板の活性化に伴ってプロテアーゼによって切断を受けて血小板から遊離すると考えられる。本発明においては、前記のような s C L E C 2 の量を測定する。s C L E C 2 は分子量約 40 kDa のタンパク質、分子量約 32 kDa のタンパク質および分子量約 25 kDa のタンパク質をまと

めて検出してもよいし、分子量約25 kDaのタンパク質のみを検出してもよい。

[0028] 本発明において使用するsCLEC2濃度は、sCLEC2濃度のみで使用してもよいが、好ましくは、sCLEC2濃度を血小板数で除して得られた値（以下、C2PACインデックスと称することがある。）を使用してよい。本明細書においては、特に断りが無い限り、sCLEC2濃度とは、sCLEC2濃度を使用した場合、sCLEC2濃度を血小板数で除した場合のいずれも含むものと解釈される。

[0029] sCLEC2濃度を血小板数で除してTIAの診断に使用する場合には、血小板数の測定は、通常は自動血球計数機（血算計）を用いて測定が行われるが、血球計数板と顕微鏡を用いて計数することも可能である。

[0030] 血漿中のsCLEC2濃度を例えばpg/mLで表し、血中血小板数を例えば1,000個/mm³で表現し、sCLEC2濃度/血小板数を計算するC2PACインデックスを用いることが好適であるが、ここで用いるsCLEC2の濃度はng/mL、ng/Lなどどの任意の単位を用いてもよく、血小板数も10,000個/mm³など任意の単位を用いることができるが、比較には統一した単位を用いるべきである。様々な単位を用いることにより、sCLEC2濃度/血小板数は様々な値を取ることができるが、本質的には同じ概念のものである。

[0031] 比率の計算は、sCLEC2濃度を測定する臨床検査機器から出てきた測定値と血小板数を測定する血算計から出てきた測定値を使って行うことが多いと予想できる。この計算は、両方の測定器と繋がった病院の検査システム、病院のシステム、あるいは電子カルテなどのシステム上で自動的に計算することが日常診療上好適であるが、二つの測定器のデータをつなぐシステムを構築してもよいし、sCLEC2濃度と血小板数を同時計測できる機械を構築することも可能である。また、両データを用いて手計算してもよい。

また、血漿中のsCLEC2濃度、又はsCLEC2濃度/血小板数と血小板活性化の程度や各種疾患との相関を示すものを、例えば、判定用閾値、

あるいは、判定用閾値を算出するためのオリジナルデータ又は統計処理データなどとして使用してもよい。

血漿中 s C L E C 2 濃度を血中血小板数で除して、血小板当たりの s C L E C 2 放出量を計算してこれを指標として血栓性疾患の診断を行うと、血中血小板数に依存すること無く、血小板の活性化度合いを評価することが可能となるため、好ましい。具体的には、例えば血漿中 s C L E C 2 濃度を p g / m L で表し (A)、血中血小板数を 1, 0 0 0 個 / m m ³ で表し (B)、A を B で除した数字を血小板活性化の指標とすることができる。

[0032] 測定に用いる試料はヒト由来であることが好ましいが、実験動物の病態把握等のために、ヒト以外の動物由来の試料を用いてもよい。実験動物としては特に制限されないが、例えば、モルモット、ラット、マウス、イヌ等が挙げられる。

[0033] s C L E C 2 の存在を検出するための方法は、特に制限されないが、s C L E C 2 を認識する抗体を用いた免疫学的方法が好ましい。免疫学的にタンパク質の検出を行う方法としては、例えば、酵素免疫測定法 (E L I S A 法)、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィー等の標識抗体を用いた免疫測定法、あるいは、ウェスタンブロットティング法、ラテックス凝集法、免疫比濁法等のそれ自体公知の通常用いられる方法であればいかなる方法でも用い得るが、この中でも、操作の簡便性や測定精度の点から、標識抗体を用いた免疫測定法が好ましく用いられる。救急領域での診断のためには、迅速に結果が得られることが望まれているため、化学発光免疫測定法や免疫クロマトグラフィー等が特に好ましく用いられる。

[0034] 対象の被験者 (特には患者) から、例えば、血漿採血用の採血管で検体を採取する。通常は残存血小板の少ないクエン酸入りの採血管が好適であるが、ヘパリン、E D T A 入りのものでも可能である。血中血小板数測定用には E D T A 入り採血管が用いられるが、同時採血であれば、各々別の採血管でもよい。血漿中 s C L E C 2 濃度は例えば 2 0 0 0 p g で 2 0 分程度遠心分離

した血漿を用いて測定するが、遠心の条件はこれに限るものではなくまた全血を使用した測定系であってもよい。以下、血漿中sCLEC2濃度の測定を例にとって説明するが、これに限定されるものではない。

[0035] 本発明においてリスク評価の対象とする出血性脳卒中とは、脳の内部で起こる脳出血（脳内出血と称する場合もある）及び脳を覆う組織の内側の層である軟膜と外側の層であるくも膜の間で起こる出血である、くも膜下出血を意味し、頭部外傷が原因で生じた脳出血は含まない。脳出血の原因としては、高血圧症、脳動脈瘤破裂、脳動静脈奇形破裂、静脈洞閉塞、硬膜動静脈瘻、アミロイド沈着、もやもや病等に由来するものが知られているが、本発明において対象とする脳出血は、特定の原因によって生じるものに限定されない。

[0036] リスク評価の実施方法としては、例えば、出血性脳卒中（くも膜下出血または脳出血）が疑われる患者の血中sCLEC2濃度の値が、健常者あるいは脳内の出血や梗塞が無い神経性疾患群と比較して高い場合は出血性脳卒中である可能性が高いといえ、このような比較をもとに、sCLEC2濃度を出血性脳卒中（くも膜下出血または脳出血）の診断に使用することができる。

[0037] 測定された患者由来試料中のsCLEC2濃度と、出血性脳卒中の可能性との相関については、患者由来試料中のsCLEC2濃度と、非出血性脳卒中者由来試料中のsCLEC2濃度との比較から閾値を適宜設定して使用してもよいし、同一患者において発症前にsCLEC2濃度の経時的記録から、sCLEC2濃度の顕著な変動が検出された場合に評価を行うこととしてもよい。

[0038] 測定された患者由来試料中のsCLEC2濃度と、出血性脳卒中の可能性との相関については、患者由来試料中のsCLEC2濃度と、健常人由来試料中のsCLEC2濃度との比較から閾値を適宜設定して使用することができる。例えば、閾値を算出するための方法としては、測定した血漿中のsCLEC2の値からROC曲線（Receiver Operating C

h a r a c t e r i s t i c C u r v e) を作成する解析を行って、診断の感度と特異度が共に80%以上を示す濃度を閾値として使用することができる。

本発明の方法において、sCLEC2による出血性脳卒中の閾値は137 pg/mL以下で任意の値を選ぶことが好適である。また、更に好適な態様として、sCLEC2濃度を血小板数で除した値であるC2PACインデックスを使用した場合にも同様の解析を行って、閾値を算出することができる。C2PACインデックスを使用した場合の閾値は、0.7~1.0の間で任意に設定して使用することができる。

このような閾値を設定してリスク評価を行う場合、例えば、出血性脳卒中が疑われる頭痛の患者で、血中sCLEC2濃度がある閾値以下であれば、出血性脳卒中を否定するという使用法も可能である。

[0039] 血中sCLEC2濃度は血小板の活性化に伴って上昇するので、血中sCLEC2濃度は血栓の形成と関連するであろうことが示唆され、脳梗塞、心筋梗塞の診断に利用可能であることが報告されているが、出血性脳卒中との関連は知られておらず、sCLEC2濃度の測定がリスク評価に有用であることは、意外であった。

従来はくも膜下出血を疑い、画像診断で出血性脳卒中が確認できない場合には、腰椎に注射針を刺して髄液を採取する腰椎穿刺・髄液検査が行われているが、侵襲性の高い検査であり、医療従事者であればだれでもどこでも簡単に行えるものではないので、血液検査でその代替ができれば非常に簡便、有用である。もしくは膜下出血と診断された場合には、発症直後は再出血を予防するため、安静を保ち、侵襲的な検査や処置は避けることが望ましいとされていることから、本発明の実施により侵襲性の高い検査の代替となり得ることは、好ましい。

[0040] くも膜下出血と診断された場合の治療としては、主に以下の治療が挙げられる。発症直後の再出血を予防する治療として初期段階では、安静を保つ（鎮静）、痛みをできる限り抑える（鎮痛）ことを目的とした痛み止め、吐き

気止め、鎮痛剤の使用、再出血リスク低減のために血圧を下げる（降圧）を目的とした降圧剤投与、頭蓋内圧上昇による脳へのダメージを防ぐために、髄液を減らすマンニトールやグリセオールといった利尿剤を使用する治療である。一方で、重症例においては降圧による脳灌流圧の低下から脳虚血が増加する可能性を考慮するなど慎重な判断が求められるケースも少なくない。

脳出血と診断された場合に推奨される治療法としては、急性期の血圧は、早期に収縮期血圧を降下させ、7日間維持することが検討され、脳出血急性期に用いる降圧剤として、カルシウム拮抗薬、硝酸薬が選択される。また、可能であれば、患者の状態等に応じて、早期にカルシウム拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（ARB）、利尿薬を用いた経口治療へ切り替えることを考慮してもよいとされている。

くも膜下出血、脳出血いずれの場合であっても、その治療は高度な経験と知識が必要とされものであり、本発明の実施が治療方針を決定する指標となることが期待される。

[0041] その他の実施態様としては、くも膜下出血と診断された患者から経時的に血液サンプルを採取し、sCLEC2を測定することによって、患者の状態をモニタリングすることも可能である。sCLEC2は血小板の活性化の状況を表すとされているので、sCLEC2は高値を維持するならば出血が続いて止血血栓の形成が続いていることが予想でき、低値化して行けば止血血栓の形成が減少していることが予想できる。重篤な合併症である脳血管攣縮は血管から漏れた血液により惹起されると言われているので、血中sCLEC2により出血の状況を把握することは重要であり、有用である。

[0042] また、このようなモニタリングによるリスク評価の使用方法としては、sCLEC2濃度を出血性脳卒中患者に対する治療の前後で比較をしてリスク予測として使用することもできる。例えば、治療により、sCLEC2濃度が減少すれば血小板の活性化が抑えられる方向であるが、sCLEC2濃度が高値を持続する又は増加するような場合は出血が続いていることが考えら

れ、例えば、降圧による治療が奏功していない場合には、さらに降圧を行う等の治療法の選択を考慮する材料を提供できる。モニタリングの過程においては、血中血小板数の変動が見られることもあるので、C2PACインデックスを用いてモニタリングすることも患者の状態を観察するのには更に好適である。

[0043] その他の実施態様としては、脳出血と診断された患者の場合も経時的に血液サンプルを採取し、sCLEC2を測定することによって、患者の状態をモニタリングすることが可能である。sCLEC2は血小板の活性化の状況を表すとされているので、sCLEC2は高値を維持するならば出血が続いて止血血栓の形成が続いていることが予想でき、低値化して行けば止血血栓の形成が減少していることが予想できる。出血が続いている場合は、脳内の血腫が増大して脳を圧迫し症状が増悪するため、血中sCLEC2により出血の状況を把握することは重要であり、有用である。

[0044] また、このようなモニタリングによるリスク評価の使用方法としては、sCLEC2濃度を出血性脳卒中患者に対する治療の前後で比較をしてリスク予測として使用することもできる。例えば、治療により、sCLEC2濃度が減少すれば血小板の活性化が抑えられる方向であるが、sCLEC2濃度が高値を持続する又は増加するような場合は、降圧療法の見直しも考慮することができる。

モニタリングの過程においては、血中血小板数の変動が見られることもあるので、C2PACインデックスを用いてモニタリングすることも患者の状態を観察するのには更に好適である。

[0045] モニタリングによってリスク評価を実施する場合であっても、出血性脳卒中（くも膜下出血または脳出血）を疑いうる症状を述べている患者に対して血中sCLEC2濃度の測定を行い、その値が健常者等に比べ高値であれば、出血性脳卒中の可能性が高いと判断できる。また、出血性脳卒中と診断された患者の血液を経時的に採取して、そのsCLEC2濃度を測定して経時的に比較することにより、患者の状態をモニタリングすることができる。

[0046] モニタリングによってリスク評価を実施する場合であっても、測定された患者由来試料中の s C L E C 2 濃度と、出血性脳卒中の可能性との相関については、患者由来試料中の s C L E C 2 濃度と、非出血性脳卒中者由来試料中の s C L E C 2 濃度との比較から閾値を適宜設定して使用してもよいし、同一患者において発症前に s C L E C 2 濃度の経時的記録から、s C L E C 2 濃度の顕著な変動が検出された場合に評価を行うこととしてもよい。

[0047] s C L E C 2 は、血小板の活性化に伴い血中に放出される。既存の血小板活性化マーカー、例えば、血小板第 4 因子 (P F 4) 、 β トロンボグロブリン (β T G) は、採血による物理的な圧力により血小板が刺激され、疾患に対して非特異的な放出を起こすことが問題とされているが、s C L E C 2 は、血小板活性化を惹起するシグナル伝達依存的な放出機序であり、生体内の血小板の活性化をより正確に反映するマーカーになりうる。また、C L E C 2 はヒトでは血小板・巨核球系に発現がほぼ限られるため、偽陽性が少ない血小板特異的なマーカーになる。従って、s C L E C 2 を測定することにより血小板の活性化状態を早期に推定することが可能となり、出血性脳卒中の診断、病態のモニタリングに利用可能となる。

実施例

[0048] 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。

[0049] 《実施例 1 : ヒト血漿中 s C L E C 2 の測定》

血漿中の s C L E C 2 濃度を、以下のようにして測定を実施した。

(測定用試薬の作製と被検試料の調製)

・検体希釈液：防腐剤を含む 0. 1 m o l / L の H E P E S 緩衝液 (p H 7 . 5) を用いて、オクタン酸ナトリウム 2 % 、 n - オクチル - β - D - グルコシド (O G) 0. 5 % になるように組み合わせて検体希釈液とした。

試薬に含まれる抗体は、特許第 6 0 7 8 8 4 5 号公報の実施例に記載の抗体を使用し、以下のように調製した。

・第 1 抗体溶液：磁性ラテックス粒子 (J S R 社) に s C L E C 2 を認識す

るマウスモノクローナル抗体（11D5）を結合させ、防腐剤を含む0.01 mol/LのMES緩衝液（pH6.0）に分散させた。

・第2抗体溶液：sCLEC2を認識する別のマウスモノクローナル抗体（11E6）をマレイミド法によりアルカリホスファターゼ（ALP）標識し、防腐剤を含む0.01 mol/LのMES緩衝液（pH6.5）に分散させた。

・発光基質溶液：2-クロロ-5-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)-トリシクロ[3.3.1.1.3,7]デカン}-4-イル)-1-フェニルホスフェート・二ナトリウム（CDP-Star（登録商標）：アプライドバイオシステム社）を使用した。

・B/F洗浄液：0.1 mol/Lクエン酸（pH6.5）、0.15 mol/L NaCl、0.1% Triton X-100、を含む緩衝液を使用した。

・被検試料：組換えhCLEC2蛋白質を緩衝液（0.025 mol/L HEPES、0.14 mol/L NaCl、0.1%オクタン酸ナトリウム、0.3%BSA）を用いて希釈したものを被検試料1、クエン酸血漿を用いて希釈したものを被検試料2として使用した。

[0050]（測定試薬による測定）

測定には、全自動臨床検査システムSTACIA（登録商標、LSIメディエンス社製）を使用した。

STACIA専用ボトルに、調製した検体希釈液、第1抗体溶液（磁性ラテックス試薬）、第2抗体溶液（酵素標識抗体試薬）をそれぞれ充填し、装置にセットした。以下前記装置の運転方法に従い測定した。

具体的には、試料10 μLに検体希釈液40 μLを加え、37℃で数分間加温した後、第1抗体溶液（磁性ラテックス試薬）25 μLを加え、37℃で数分間加温した。次いで、B/F分離を行い、50 μLの第2抗体溶液（酵素標識抗体試薬）を加え、37℃で数分間加温し、再度B/F分離を行った後、100 μLの発光基質溶液を加え、37℃で数分反応後にシグナル強

度（カウント）を測定した。

図1にhsCLEC2蛋白質を標準品として用いて作成した標準曲線を示した。

[0051] 《実施例2：くも膜下出血患者、脳出血患者及び健常者の血漿検体中のsCLEC2の測定》

外来患者の診察によりくも膜下出血または脳出血と診断された患者から得られたクエン酸血漿を用いて実施例1の方法で血漿中sCLEC2濃度、血小板値、sCLEC2／血小板比（C2PACインデックス）を測定した（表1、表2）。また、健常者のsCLEC濃度についても測定を実施した（表3）。

[0052] [表1]

くも膜下出血患者のsCLEC測定値及びC2PACインデックス値

くも膜下出血症例	sCLEC2 (pg/mL)	血小板数 (X1000/ μ L)	C2PACインデックス
1	573.0	229	2.50
2	195.8	407	0.481
3	195.0	200	0.975
4	275.6	386	0.714
5	561.7	177	3.17
6	360.4	282	1.28
7	332.3	268	1.24
8	734.0	239	3.07
9	1045.8	360	2.91
10	138.3	317	0.436

[0053]

[表2]

脳出血患者の s C L E C 測定値及び C 2 P A C インデックス値

脳出血症例	s C L E C 2 (pg/mL)	血小板数 (X1000/ μ L)	C 2 P A C インデックス
1	248.1	350	0.71
2	184.0	186	0.99
3	1154.0	497	2.32
4	696.8	654	1.07
5	474.2	223	2.13
6	263.8	312	0.85
7	234.8	284	0.83
8	703.1	226	3.11
9	196.4	222	0.88
10	168.9	229	0.74
11	272.2	191	1.43
12	147.2	128	1.15
13	258.5	267	0.97
14	408.5	209	1.95
15	245.1	221	1.11
16	161.7	104	1.55
17	505.1	186	2.72
18	365.2	227	1.61
19	162.8	286	0.57
20	216.2	261	0.83
21	442.0	282	1.57
22	199.0	263	0.76
23	251.8	251	1.00
24	169.3	130	1.30

[0054]

[表3]

健常者の s C L E C 2 測定値

健常者	s C L E C 2	健常者	s C L E C 2	健常者	s C L E C 2
1	112.7	25	82.8	49	45.8
2	85.7	26	70.9	50	67.0
3	42.7	27	53.9	51	55.6
4	47.5	28	54.0	52	55.5
5	54.5	29	43.8	53	33.0
6	64.4	30	73.2	54	63.8
7	57.8	31	63.8	55	40.1
8	51.7	32	84.7	56	48.9
9	57.2	33	44.5	57	34.1
10	98.8	34	58.0	58	48.4
11	56.6	35	77.7	59	83.5
12	63.6	36	97.6	60	41.7
13	49.4	37	47.7	61	34.1
14	34.0	38	57.3	62	48.5
15	46.9	39	61.0	63	31.5
16	52.0	40	65.9	64	54.0
17	52.2	41	52.3	65	58.8
18	44.7	42	70.2	66	48.9
19	85.8	43	43.3	67	51.3
20	61.8	44	63.5	68	44.7
21	94.7	45	47.6	69	48.2
22	59.0	46	55.5	70	50.7
23	45.0	47	77.2	71	42.4
24	42.5	48	49.6		

[0055] [表4]

健常者と出血性脳卒中中の s C L E C 2 値の統計データ

	健常者 (71 例)	くも膜下出血症例 (10 例)	脳出血症例 (24 例)
平均	57.6	440.9	338.7
標準偏差	16.7	263.2	235.4
中央値	54.6	348	250.0

[0056] くも膜下出血、脳出血のいずれも出血性脳卒中患者の s C L E C 2 測定値 (p g / m L) は健常者の s C L E C 測定値に比べ有意に高値であった (P

<0.0001) (表4)。各々の測定値は図2 (くも膜下出血)、図3 (脳出血) に示した。

また、別途測定したC2PACインデックスの健常者の上限値は0.55であった。

[0057] 《実施例3：sCLEC2による出血性脳卒中 (くも膜下出血及び脳出血) の診断の感度及び特異度》

閾値を120pg/mLに設定とすると、sCLEC2の出血性脳卒中の診断能は、感度(34/34)=100%、特異度(71/71)=100%、正診率(105/105)=100%、となる(表5)。

以上のことより、sCLEC2の測定、並びにsCLEC2/血小板比(C2PACインデックス)は、出血性脳卒中の診断に対して簡便、且つ正確なデータを提供する手段となる。

[0058] [表5]

	出血性脳卒中患者	健常者	合計
sCLEC2 > 120 pg/mL	34	0	34
sCLEC2 < 120 pg/mL	0	71	71
合計	34	71	105

[0059] 《実施例4：sCLEC2によるくも膜下出血患者のモニタリング》

くも膜下出血と診断された1症例の第1病日、第8病日、第10病日の各種検査値を示す(図4)。sCLEC2は第1病日から第8病日に若干上昇したが、血小板数も大きく上昇しているため、C2PACインデックスは若干の減少傾向を示した。

[0060] 《実施例5：sCLEC2による脳出血患者のモニタリング》

脳出血と診断された1症例の第1病日、第2病日、第12病日、第14病日の各種検査値を示す(図5)。sCLEC2、およびC2PACインデックスは第12病日に上昇し第14病日で下降したが、D-ダイマーは第12病日から第14病日にかけて上昇した。

産業上の利用可能性

[0061] 以上のように、本発明における血中sCLEC2の測定値、及びsCLEC2／血小板比は、出血性脳卒中であるくも膜下出血、脳出血の診断に使用できる臨床検査となり、出血性脳卒中であるくも膜下出血患者、脳出血患者の状態のモニタリングとしても使用できるため、sCLEC2測定は、出血性脳卒中患者のリスク評価法として有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者から採取した血液中に存在する、可溶性CLEC2濃度を測定する工程を含む、出血性脳卒中のリスク評価を行う方法。
- [請求項2] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、
- (1) 前記患者に由来する血液試料を提供する工程、
 - (2) 前記試料中の可溶性CLEC2濃度を決定する工程、
 - (3) 前記可溶性CLEC2濃度と、前記患者における出血性脳卒中中の存在若しくは非存在、又は転帰の可能性を相関させる工程、
- を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、前記可溶性CLEC2濃度と、前記患者における出血性脳卒中中の存在若しくは非存在、又は転帰の可能性を相関させる工程が、前記可溶性CLEC2濃度の変化に基づいて、リスクを前記患者が有するかどうかを評価することを含む、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、可溶性CLEC2濃度と出血性脳卒中を相関させる工程で、その閾値が137 pg/mLである、請求項2又は3に記載の方法。
- [請求項5] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者のリスク評価を行う方法であって、
- (1) 前記患者に由来する血液試料を提供する工程、
 - (2) 前記試料中の可溶性CLEC2濃度を決定する工程、
 - (3) 前記試料中の血小板数を測定する工程、
 - (4) 前記可溶性CLEC2濃度を血小板数で除する工程、
 - (5) 前記可溶性CLEC2濃度を血小板数で除した値と、前記患

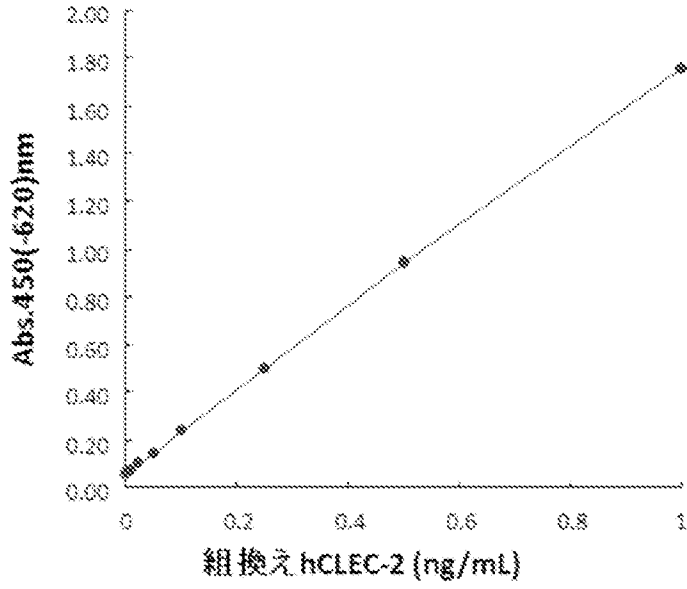
者における出血性脳卒中の存在又は非存在を相関させる工程、
を含む、請求項1に記載の方法。

[請求項6] 出血性脳卒中の罹患が疑われる患者又は出血性脳卒中と診断された患者における出血性脳卒中のリスク評価を行う方法であって、可溶性C L E C 2濃度を血小板数で除した値と出血性脳卒中を相関させる工程で、前記可溶性s C L E C 2濃度を血小板数で除した値の閾値が0.7～1.0である、請求項5に記載の方法。

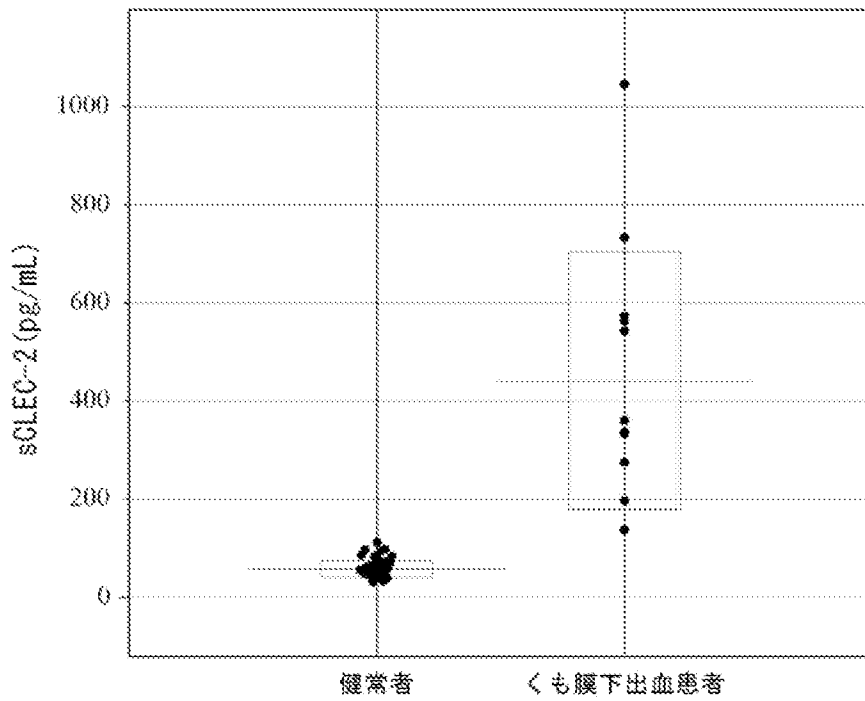
[請求項7] 出血性脳卒中が、くも膜下出血又は脳出血のいずれかである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

[請求項8] 可溶性C L E C 2濃度を決定する工程が、高感度免疫測定法、例えば、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、蛍光免疫測定法である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

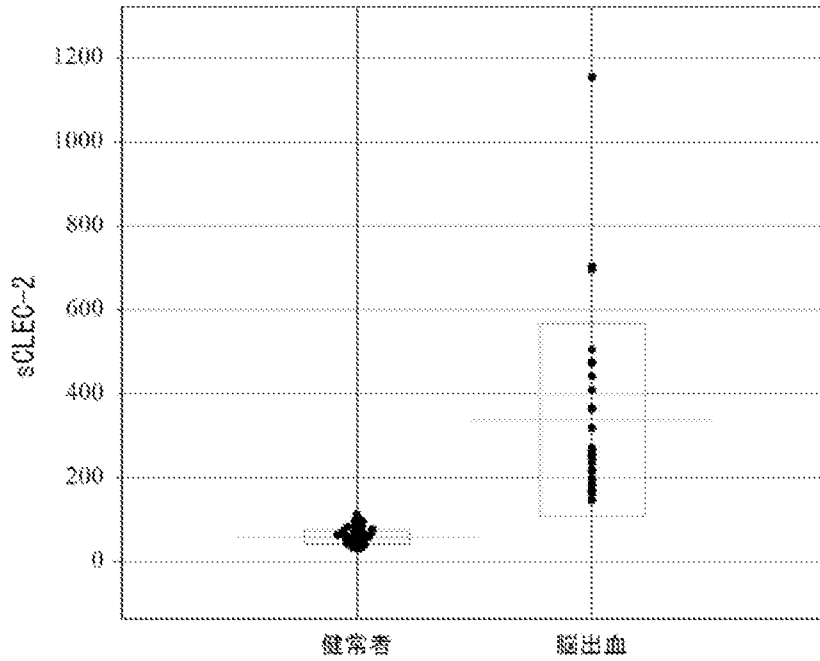
[図1]



[図2]

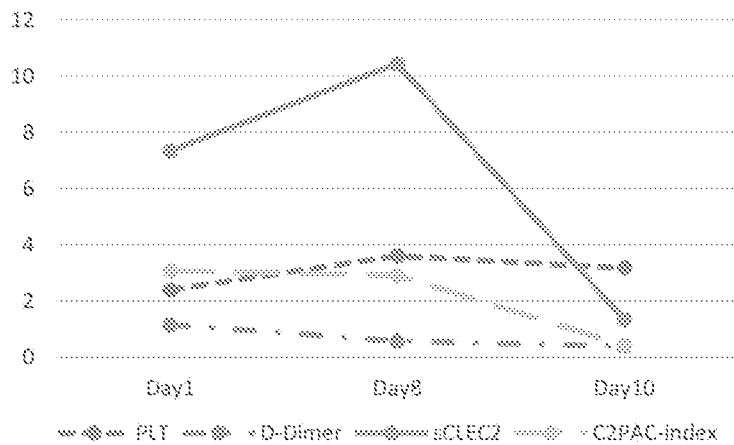


[図3]



[図4]

くも膜下出血症例のモニタリング例



各検査項目の単位

PLT (血小板) : 100,000/μL

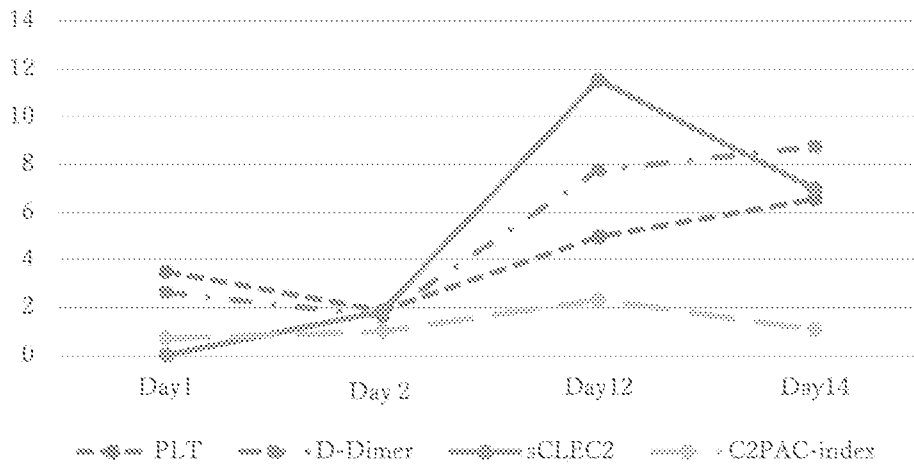
D-ダイマー : μg/mL

sCLEC2 : 100 pg/mL

C2PAC インデックス : 単位無し

[図5]

脳出血症例のモニタリング例



各検査項目の単位

PLT (血小板) : 100,000/ μ L

D-ダイマー : μ g/mL

sCLEC2 : 100 pg/mL

C2PAC インデックス : 単位無し

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/022077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/49</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/68</i> (2006.01)i FI: G01N33/68; G01N33/49 X		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/49; G01N33/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	井上 克枝, 特集: 基礎と臨床をつなぐ血液・血管生物学 胎生期の血管リンパ管分離と成体の血管統合性維持を担う血小板, 生化学, 25 June 2017, vol. 89, no. 3, pp. 377-383 2. Fetal angiolympathic vessel separation and promotion of cerebrovascular maturity (2) Brain vascular maturation during development: platelet CLEC-2 and podoplanin on neuroepithelial cells (fig. 2C)., (SUZUKI-INOUE, Katsue. Journal of Japanese Biochemical Society.), non-official translation (Special Review: Blood and vascular biology connecting basic and clinical Platelets responsible for fetal blood vessel and angiolympathic vessel separation and maintenance of vascular integrity in adults)	1-8
A	井上克枝, 新規血小板活性化受容体CLEC-2その発見から今後の展望まで, 日本血栓止血学会誌, 01 December 2011, vol. 22, no. 6, pp. 348-362 p. 358. right column, (SUZUKI-INOUE, Katsue. Katsue. Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects. Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis.)	1-8
A	GUO, Mi. Higher plasma C-type lectin-like receptor 2 concentrations for prediction of higher risk of 30-day m. Clinica Chimica Acta. 14 June 2019 2.2. Data collection and outcome measure, 3.1. Subjects	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 August 2022		Date of mailing of the international search report 23 August 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	NISHIGAKI, Akisato. Soluble C-Type Lectin-Like Receptor 2 Elevation in Patients with Acute Cerebral Infarction. J Clin Med. 30 July 2021, vol. 10, no. 15, p. 3408 entire text, all drawings	1-8
P, A	MENG, Danyang. The Role of CLEC-2 and Its Ligands in Thromboinflammation. Frontiers in Immunology. 09 June 2021, vol. 12, p. 688643 entire text, all drawings	1-8
A	井上克枝, 新規血小板活性化受容体CLEC-2, 日本血栓止血学会誌, 2009, vol. 20, no. 4, pp. 401-405 entire text, all drawings, (SUZUKI-INOUE, Katsue. An overview of the novel platelet activation receptor CLEC-2. Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis.)	1-8
A	長田 誠, 血中 s C L E C - 2 測定法の確立と臨床応用に向けた検討: 動脈血栓症の予防を目指して, 科学研究費助成事業 (科学研費補助金) 研究成果報告書 [オンライン], 2013 [retrieval date 08 August 2022], Internet<URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-22590520/22590520seika.pdf > entire text, all drawings, (OSADA, Makoto. Establishment of a method for measuring plasma sCLEC-2 and its clinical application aiming to prevent arterial thrombosis.), non-official translation (Final research report of Grants-in-Aid for Scientific Research (Grant-in-Aid for Scientific Research) [online])	1-8
A	井上克枝, 新規血小板上受容体CLEC-2を標的とした抗血小板薬、抗転移・腫瘍薬、検査の開発 [オンライン], 2013 [retrieval date 08 August 2022], Internet<URL: https://researcher.jp/projects/view/106336 > entire text, all drawings, (SUZUKI-INOUE, Katsue), non-official translation (Development of antiplatelet drugs, anti-metastatic and antitumor drugs tests targeting the novel platelet receptor CLEC-2 [online])	1-8
A	JP 2014-70942 A (MITSUBISHI CHEMICAL MEDIENCE CORP) 21 April 2014 (2014-04-21) entire text, all drawings	1-8
P, A	WO 2021/172493 A1 (LSI MEDIENCE CORP) 02 September 2021 (2021-09-02) entire text, all drawings	1-8
A	WO 2015/053381 A1 (PERSEUS PROTEOMICS INC.) 16 April 2015 (2015-04-16) entire text, all drawings	1-8
A	US 2005/0107598 A1 (BAUM, Peter R.) 19 May 2005 (2005-05-19) entire text, all drawings	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/022077

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2014-70942	A	21 April 2014	(Family: none)	
WO	2021/172493	A1	02 September 2021	(Family: none)	
WO	2015/053381	A1	16 April 2015	US	2016/0347834 A1
US	2005/0107598	A1	19 May 2005	US	2008/0182793 A1
				US	2010/0279350 A1
				WO	2003/054164 A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/49(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: G01N33/68; G01N33/49 X		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） G01N33/49; G01N33/68 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2022年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2022年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	井上 克枝, 特集: 基礎と臨床をつなぐ血液・血管生物学 胎生期の血管リンパ管分離と成体の血管統合性維持を担う血小板, 生化学, 2017.06.25, Vol.89 No.3, Page.377-383 2. 胎生期のリンパ管血管分離と脳血管成熟の促進 (2) 発生時の脳血管の成熟: 血小板CLEC-2と神経上皮のポドプラニン (図2C)	1-8
A	井上克枝, 新規血小板活性化受容体CLEC-2その発見から今後の展望まで, 日本血栓止血学会誌, 2011.12.01, Vol.22 No.6, Page.348-362 358ページ右欄	1-8
A	GUO Mi, Higher plasma C-type lectin-like receptor 2 concentrations for prediction of higher risk of 30-day m, Clinica Chimica Acta, 2019.06.14 2.2. Data collection and outcome measure, 3.1. Subjects	1-8
P, A	NISHIGAKI Akisato, Soluble C-Type Lectin-Like Receptor 2 Elevation in Patients with Acute Cerebral Infarction, J Clin Med, 2021.07.30, Vol.10 No.15, Page.3408 全文・全図	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	08.08.2022	国際調査報告の発送日 23.08.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 三木 隆 2J 3312 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, A	MENG Danyang, The Role of CLEC-2 and Its Ligands in Thromboinflammation, <i>Frontiers in Immunology</i> , 2021.06.09, Vol.12, Page.688643 全文・全図	1-8
A	井上克枝, 新規血小板活性化受容体CLEC-2, <i>日本血栓止血学会誌</i> , 2009, Vol.20 No.4, Page.401-405 全文・全図	1-8
A	長田 誠, 血中 s C L E C - 2 測定法の確立と臨床応用に向けた検討: 動脈血栓症の予防を目指して, 科学研究費助成事業 (科学研費補助金) 研究成果報告書 [オンライン], 2013 [検索日 2022.08.08], インターネット<URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-22590520/22590520seika.pdf > 全文・全図	1-8
A	井上克枝, 新規血小板上受容体CLEC-2を標的とした抗血小板薬、抗転移・腫瘍薬、検査の開発 [オンライン], 2013 [検索日 2022.08.08], インターネット< URL: https://research-er.jp/projects/view/106336 > 全文・全図	1-8
A	JP 2014-70942 A (三菱化学メディエンス株式会社) 21.04.2014 (2014 - 04 - 21) 全文・全図	1-8
P, A	WO 2021/172493 A1 (株式会社L S I メディエンス) 02.09.2021 (2021 - 09 - 02) 全文・全図	1-8
A	WO 2015/053381 A1 (株式会社ベルセウスプロテオミクス) 16.04.2015 (2015 - 04 - 16) 全文・全図	1-8
A	US 2005/0107598 A1 (BAUM PETER R.) 19.05.2005 (2005 - 05 - 19) 全文・全図	1-8

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2022/022077

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2014-70942	A	21.04.2014	(ファミリーなし)			
WO	2021/172493	A1	02.09.2021	(ファミリーなし)			
WO	2015/053381	A1	16.04.2015	US	2016/0347834	A1	
US	2005/0107598	A1	19.05.2005	US	2008/0182793	A1	
				US	2010/0279350	A1	
				WO	2003/054164	A2	