(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4343866号
(P4343866)
(45)発行日　平成21年10月14日(2009.10.14)　(24)登録日　平成21年7月17日(2009.7.17)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 B
G01N 33/53 D

請求項の数 15　外国語出願　(全 36 頁)

(21)出願番号　特願2005-72768(P2005-72768)
(22)出願日　平成17年3月15日(2005.3.15)
(65)公開番号　特開2005-274569(P2005-274569A)
(43)公開日　平成17年10月6日(2005.10.6)
審査請求日　平成17年9月8日(2005.9.8)
(31)優先権主張番号　04006080.8
(32)優先日　平成16年3月15日(2004.3.15)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

前置審査

(73)特許権者　591003013
エフ．ホフマン－ラ　ロシュ　アーゲー
F．　HOFFMANN－LA　ROCHE　AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ－４０７０バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ１２４
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】容量過負荷の結果として心血管合併症に罹患するリスクを評価するための心臓ホルモンの使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
将来的な血管内容量の増大の結果として、心不全の兆候を示さない、あるいは心血管合併症の病歴がない患者が、心血管合併症に罹患するリスクを判定する方法であって、以下のステップ：
（ａ）ナトリウム利尿ペプチドのレベルをｉｎ　ｖｉｔｒｏで測定するステップであって、該ナトリウム利尿ペプチドがＡＮＰ型ペプチドもしくはその変異体、および／またはＢＮＰ型ペプチドもしくはその変異体である、上記ステップ、
（ｂ）測定したレベルを、患者の種々の程度のリスクに関連した少なくとも１つの既知レベルと比較することによって、患者のリスクを判定するステップ、
を含む、上記方法。
【請求項２】
ＢＮＰ型ペプチドがＮＴ－ｐｒｏＢＮＰまたはその変異体である、請求項１記載の方法。
【請求項３】
男性患者における６０を超え１０００ｐｇ／ｍｌ未満のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ血漿レベルは心血管合併症の罹患リスクの増大と関連しており、前記リスクの増大は治療を適用しうることを示すものである、請求項１または２記載の方法。
【請求項４】
女性患者における１２０を超え１０００ｐｇ／ｍｌ未満のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ血漿レベ

ルは心血管合併症の罹患リスクの増大と関連しており、前記リスクの増大は治療を適用しうることを示すものである、請求項１または２記載の方法。
【請求項５】
１０００～５０００ｐｇ／ｍｌのＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ血漿レベルは心血管合併症に罹患する高リスクと関連しており、前記高いリスクは血管内容量の増大が許容できるかどうかを再考しうることを示すものである、請求項１または２記載の方法。
【請求項６】
５０００ｐｇ／ｍｌを超えるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ血漿レベルは心血管合併症に罹患する非常に高いリスクと関連しており、前記非常に高いリスクは何らかの血管内容量の増大が許容できるかどうかを再考しうることを示し、かつ即時の入院および／または心臓の集中的な治療を考慮しうることを示すものである、請求項１または２記載の方法。
【請求項７】
血管内容量の増大が疾患により生じるものである、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
血管内容量の増大が、液体の注入もしくは輸液により、または薬剤の投与により人工的に生じるものである、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
薬剤が、以下：
（ａ）非ステロイド系抗リウマチ剤、
（ｂ）コルチコステロイド、
（ｃ）糖尿病薬、
（ｄ）エストロゲン、
（ｅ）ＴＮＦインヒビター、
（ｆ）選択的Ｃｏｘ－２インヒビター
からなる群より選択される、請求項８記載の方法。
【請求項１０】
心血管合併症が冠状動脈性心臓病、安定狭心症、急性冠症候群、不安定狭心症、心筋梗塞、左心室機能障害、鬱血性心不全、または肺鬱血である、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
心血管合併症が肺鬱血である、請求項１０記載の方法
【請求項１２】
ナトリウム利尿ペプチドレベルが、特異的に結合するリガンド、アレイ、微小流体装置、化学発光分析器、またはロボット装置を用いて測定される、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
特異的に結合するリガンドが抗体またはアプタマーである、請求項１２記載の方法。
【請求項１４】
特異的に結合するリガンドが標識されている、請求項１２または１３記載の方法。
【請求項１５】
将来の血管内容量の増大の結果として、心不全の兆候を示さない、あるいは心血管合併症の病歴がない患者が心血管合併症に罹患するリスクを判定するための、患者のナトリウム利尿ペプチドレベルをｉｎ ｖｉｔｒｏで測定可能な判定手段の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、血管内容量過負荷の結果として心血管合併症に罹患するリスクを評価するための心臓のホルモンの使用に関する。
【背景技術】

【０００２】
現代医療における目標の１つは、個人または個別対応の治療法を提供することである。これらは、患者の個々の必要性またはリスクを考慮に入れる治療法である。特に重要なリスクが心血管合併症、とりわけ認識されない心血管合併症の存在である。
【０００３】
心血管合併症、特に心疾患は、西半球における罹患および死亡の主因である。心血管合併症は、長期間、無症候を維持することがある。したがって、心血管合併症に関しては、信頼性のある診断が一般に考えられているより困難でありかつ誤りやすいものである（Svendstrup Nielsen,L.ら(2003)、N-terminal pro-brain natriuretic peptide for discriminating between cardiac and non-cardiac dyspnoea、The European Jounal of Heart Failure）。
【０００４】
血管内容量のわずかな増加（容量過負荷）によって、心血管合併症となることがあり、それに続いて、心臓代償不全、さらには死亡にさえ至る可能性のあることが最近判明した。所望の効果であれ、または望ましくない副作用であれ、それにより多くの医薬品は体液鬱滞を引き起こす。これによって血管内容量が増加することがあり、次いでこれによって心血管合併症または既存の心血管合併症の悪化が引き起こされることがある。例えば、糖尿病薬であるピオグリタゾンは、腎臓機能および心臓機能が弱い６人の男性で心不全および肺中体液の増量を引き起こしている（Reuters Health E-line 09/09/2003）。
【０００５】
内在するが認識されない心疾患または肺疾患に罹っている患者では、赤血球（赤血細胞）１単位の輸血が急性呼吸器ストレス（呼吸困難）を誘起するのに十分であったと報告されている。同様に、血小板または血漿の輸血も容量過負荷を引き起こすと報告されている（Kleinman,S.、Chan,P.、et al(2003)、Risks associated with transfusion of cellular blood components in Canada、Transfusion Medicine Reviews 17(2):120～162）。
【０００６】
現在、血管内容量の増加をもたらす治療を行う場合には、心疾患または高血圧についての既知の病歴をもつ患者のみが綿密なモニタリングを受けている。具体的には、一般開業医および非心臓内科医は、認識されない心血管障害を事前に特定する手段をもたないのである。
【０００７】
従来技術では、容量過負荷に関連した心血管合併症のリスクをいかにして診断できるかに関して何らの示唆もない。特に、心血管合併症のいかなる既知の病歴ももたない患者において、いかにしてそのような診断ができるかに関しては、何の言及もなされていない。
【０００８】
したがって、容量過負荷をもたらす治療を患者が受ける前に、その患者のリスクを特定する方法または手段が必要である。特に、適切な診断手段を提供する必要がある。特に、心血管合併症の病歴をもたない患者のリスクの特定を可能にする診断手段が必要である。また、この診断手段は信頼性があり、かつ一般開業医および非心臓内科医による使用に適すべきものである。
【発明の開示】
【０００９】
本発明の目的は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断する方法であって、
（ａ）患者の心臓ホルモン、特にナトリウム利尿ペプチドのレベルを、好ましくはｉｎｖｉｔｒｏで測定するステップ、
（ｂ）測定したレベルを、患者の様々な程度のリスクに関連した少なくとも１つの既知レベルと比較することによって、患者のリスクを診断するステップ
を含む方法により達成される。
【００１０】

この方法は、患者の体液または組織試料を採取するステップを含んでもよい。本発明の範囲内では、体液または組織試料の採取は、非医療要員（すなわち、医師の職業を遂行するのに必要な教育を受けていない）でも実施できることが好ましい。これは、とりわけ身体試料が血液である際に適用されるものである。

【００１１】

本発明の目的は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断するために、患者における心臓ホルモン、特にナトリウム利尿ペプチドのレベルを、好ましくはｉｎ　ｖｉｔｒｏで測定する診断手段を使用することにより達成される。心臓ホルモンのレベルは、患者の体液または組織試料中で測定されることが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１２】

本発明は、容量過負荷を示しているか、または容量過負荷をもたらす薬剤投与もしくは治療を受けようとしている患者を、これらの患者が上記容量過負荷の結果として心血管合併症を発症するリスクに関してスクリーニングする単純かつ安価な方法および手段を提供する。本発明は、心血管合併症の明白な症候を示す患者、またはそのような症候を示さない患者における心血管合併症の存在または重篤度を示す心臓ホルモンレベルも提供する。

【００１３】

ナトリウム利尿ペプチドの、分子マーカーまたは生化学的マーカーとしての使用は、それ自体が公知である。国際公開第ＷＯ０２／０８９６５７号では、心筋梗塞を診断するために、脳性ナトリウム利尿ペプチド（ＢＮＰ）を測定することが提案されている。国際公開第ＷＯ０２／０８３９１３号では、非ＳＴ上昇型急性冠症候群を患う患者における、短期間罹患率または死亡率を予測するのにＢＮＰを用いることが提案されている。

【００１４】

本発明は、特に、心臓内科医による大規模な心疾患学的試験を頻繁に利用する手段をもたない一般開業医、専門医師、および専門病棟、専門部局、または専門医院に有用である。本発明は、そのような非心臓内科医に、複数の患者の中から、血管内容量の増加の結果として心血管合併症を罹患するリスクにさらされている患者を見つけるための単純かつ信頼性のあるスクリーニング方法および手段を提供する。

【００１５】

本発明は、特定の生化学マーカーまたは分子マーカーを利用する。「生化学マーカー」および「分子マーカー」という用語は、当業者にとって公知である。詳細には、生化学マーカーまたは分子マーカーとは、ある特定の状態、疾患、または合併症の存在下または非存在下に特異的に発現される（すなわち、アップレギュレートされるか、またはダウンレギュレートされる）遺伝子発現産物である。通常、分子マーカーは核酸（ｍＲＮＡなど）と定義され、生化学マーカーは、タンパク質またはペプチドである。適当な生化学マーカーまたは分子マーカーは、そのレベルによって、状態、疾患、または合併症の存在または不在を指示でき、これによって診断を可能にする。

【００１６】

詳細には、本発明は、生化学マーカーとして心臓ホルモンを利用し、より詳細にはナトリウム利尿ペプチドを利用する。また、本発明には任意の心臓ホルモンまたはナトリウム利尿ペプチドの組合せを生化学マーカーとして利用することも包含される。

【００１７】

本発明において心臓ホルモンには、ナトリウム利尿ペプチドおよびウロテンシンが含まれる。特に、本発明において心臓ホルモンは、ナトリウム利尿ペプチドである。

【００１８】

本発明において使用するナトリウム利尿ペプチドには、ＡＮＰ型ペプチドおよびＢＮＰ型ペプチド、ならびにその変異体が含まれる（例えば、Bonow,R.O(1996)、New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93:1946～1950を参照）。

【００１９】

ＡＮＰ型ペプチドには、プレプロＡＮＰ、プロＡＮＰ、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ、およびＡ

ＮＰが含まれる。ＢＮＰ型ペプチドには、プレプロＢＮＰ、プロＢＮＰ、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、およびＢＮＰが含まれる。

【００２０】

プレプロペプチド（プレプロＢＮＰの場合には１３４アミノ酸）は、短いシグナルペプチドを含み、このシグナルペプチドは、酵素により切断されて、プロペプチド（プロＢＮＰの場合には１０８アミノ酸）を遊離する。このプロペプチドがさらにＮ端プロペプチド（ＮＴ－プロペプチド、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの場合には７６アミノ酸）と、活性ホルモン（ＢＮＰの場合には３２アミノ酸、ＡＮＰの場合には２８アミノ酸）とに切断される。

【００２１】

ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰを用いれば前分析がより着実なものとなり、中央試験室への試料の輸送が簡単になる（Mueller T、Gegenhuber A、Dieplinger B、Poelz W、Haltmayer M、Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples、Clin Chem Lab Med、2004年、42:942～4）。血液試料は室温で数日間保存することもできるし、または回収の損失なしに郵送もしくは出荷することもできる。対照的に、ＢＮＰを室温または４℃で４８時間保存した場合には、少なくとも２０％の濃度喪失が生じる（Mueller T、Gegenhuber A、et al、Clin Chem Lab Med 2004;42:942～4、前掲;Wu AH、Packer M、Smith A、Bijou R、Fink D、Mair J、Wallentin L、Johnston N、Feldcamp CS、Haverstick DM、Ahnadi CE、Grant A、Despres N、Bluestein B、Ghani F、Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study、Clin Chem 2004年、50:867～73）。

【００２２】

本発明において好ましいナトリウム利尿ペプチドは、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ、ＡＮＰ、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、ＢＮＰ、およびこれらの変異体である。ＡＮＰおよびＢＮＰは活性ホルモンであり、これらそれぞれの不活性対応物であるＮＴ－ｐｒｏＡＮＰおよびＮＴ－ｐｒｏＢＮＰより短い半減期をもつ。したがって、目的の経過に応じて、活性形態における測定が有利となる場合と、不活性形態における測定が有利となる場合とがある。本発明において最も好ましいナトリウム利尿ペプチドは、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰおよびその変異体である。

【００２３】

本明細書においては、「変異体」という用語は、上記のペプチドに実質上類似したペプチドに関するものである。当業者にとって、「実質上類似」という用語は周知である。詳細には、変異体とは、ヒト集団における最も一般的なペプチドアイソフォームのアミノ酸配列と比較した際に、アミノ酸の交換を示すアイソフォームまたはアレルの場合がある。好ましくは、そのような実質上類似したペプチドは、そのペプチドの最も一般的なアイソフォームに対して、少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有する。本発明の診断手段によって、またはそれぞれの完全長ペプチドに対するリガンドによってなおも認識されるタンパク分解性分解産物も、実質上類似したペプチドである。

【００２４】

「変異体」という用語は、グリコシル化されたペプチドなど、翻訳後修飾されたペプチドにも関する。試料採取後に、例えば標識の付加によって、詳細には放射性標識または蛍光標識の、ペプチドへの共有結合性または非共有結合性の付加によって修飾されたペプチドも、「変異体」の１つである。

【００２５】

本発明の他の実施形態は、様々な心臓ホルモンを組み合わせて、同時または非同時に測定することを含む。例えば、様々な心臓ホルモンを測定することによって、例えば、血管内容量増加の経過に関する情報など、重要な追加情報を得ることができる。例えば、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰのレベルは、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰのレベルよりゆっくり上昇する。他方で、容量増加後におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰのレベルは、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰのレベルより

長い期間、高いまま維持される（実施例２を参照）。したがって、本発明は、ＡＮＰ型ペプチドまたはその変異体と、ＢＮＰ型ペプチドまたはその変異体との両方を測定することにも関する。本発明は、血管内容量の増加が開始した少なくとも６時間後に、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰのレベルを測定することにも関する。本発明は、血管内容量の増加が開始した２から５時間後に、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰのレベルを測定することにも関する。

【００２６】

本発明による診断には、関連するリスク、疾患、または合併症の、判定、モニタリング、確認、細分類、および予測が含まれる。判定は、リスク、疾患、または合併症の存在を認識することに関する。モニタリングは、例えばリスク、疾患、または合併症の進行、あるいはリスク、疾患、または合併症の進行に対する特定の治療の効果を分析するために、既に診断されたリスク、疾患、または合併症の動向を把握することに関する。確認は、既に行われた診断を、他の指標またはマーカーを用いて強化または実証することに関する。細分類は、診断されたリスク、疾患、または合併症の種々のサブクラスに従って、診断をさらに詳しく特定すること、例えばリスク、疾患、または合併症の軽度な形態、および重度な形態に応じた特定を行うことに関する。予測は、他の症候もしくはマーカーが自明になるか、または有意に変化する前に、リスク、疾患、または合併症を予測することに関する。

【００２７】

心血管疾患に罹患した個体は、安定狭心症（ＳＡＰ）を罹患する個体である可能性があり、さらに急性冠症候群（ＡＣＳ）を罹患する個体である可能性もある。ＡＣＳ患者は、不安定狭心症（ＵＡＰ）を示す可能性があり、そうでなければ、これらの個体は既に、心筋梗塞（ＭＩ）に罹っているかもしれない。ＭＩは、ＳＴ上昇型ＭＩである可能性も、非ＳＴ上昇型ＭＩである可能性もある。ＭＩの発症に続いて、左心室機能障害（ＬＶＤ）が発症することがある。最後に、ＬＶＤ患者は、約１５％の死亡率で鬱血性心不全（ＣＨＦ）を発症する。

【００２８】

心血管疾患は、ニューヨーク心臓協会（New York Heart Association、NYHA）による機能的分類システムで分類されている。クラスＩの患者は、心血管疾患のいかなる明白な症候も示さない。身体的活動が制限されず、通常の身体的活動によって過度の疲労、動悸、または呼吸困難（呼吸の短縮）が生じない。クラスＩＩの患者は、身体的活動にわずかな制限を受ける。患者は安静時には快適であるが、通常の身体的活動によって疲労、動悸、または呼吸困難がある。クラスＩＩＩの患者は、身体的活動に著しい制限を受ける。患者は安静時には快適であるが、通常の活動より軽い身体的活動によって疲労、動悸、または呼吸困難が起こる。クラスＩＶの患者は、不快感なしにはいかなる身体的活動も実行できない。患者は安静時にも心不全の症候を示し、いかなる身体的活動が実行された場合にも、不快感が増強する。

【００２９】

これに従って、患者は、臨床的症状を示さない個体と、症候（例えば、呼吸困難）を示す患者とに分けることができる。

【００３０】

「左心室駆出分画率」（ＬＶＥＦ）は、「駆出率」としても知られ、心血管疾患の別の特性となりうる。健康な心臓をもつ人々は、通常、健全なＬＶＥＦを有し、これは通常５０％を越えると説明される。徴候的な収縮期性心疾患に罹る人々のほとんどが、通常４０％以下のＬＶＥＦを有する。

【００３１】

本発明は、血管内容量増加の結果として発症する「心血管合併症」に関する。

【００３２】

本発明による「心血管合併症」は、いかなる心血管疾患、事象、または、いかなる二次合併症にも関するものであり、例えば、肺鬱血、すなわち鬱血肺（例えば、左心室不全の結果発症しうる）にも関する。

【００３３】
詳細には、「心血管合併症」は、冠状動脈性心臓病、ＳＡＰ、ＡＣＳ、ＵＡＰ、ＭＩ、ＳＴ上昇型ＭＩ、非ＳＴ上昇型ＭＩ、ＬＶＤ、ＣＨＦ、および肺鬱血に関する。
【００３４】
より詳細には、「心血管合併症」は、ＡＣＳ、ＵＡＰ、ＭＩ、ＳＴ上昇型ＭＩ、非ＳＴ上昇型ＭＩ、ＬＶＤ、ＣＨＦ、および肺鬱血に関する。
【００３５】
本発明において心血管合併症は、症候、特にＮＹＨＡクラスＩＩ～ＩＶの症候、より詳細にはＮＹＨＡクラスＩＩＩ～ＩＶの症候を引き起こすものでもよい。
【００３６】
心血管合併症は、４０％以下のＬＶＥＦを伴うものであってもよい。
【００３７】
心血管合併症は、「代償性」であっても、「非代償性」であってもよい。代償性とは、身体における通常の酸素需要を満たすことがまだできることを意味し、一方、非代償性とは、身体における通常の酸素需要が既に満たされていないことを意味する。
【００３８】
本発明によれば、「心血管合併症に罹患する」ということには、既存の心血管合併症の悪化が含まれる。
【００３９】
本発明によれば、「患者」という用語は、健康な個体、明らかに健康な個体、または、特に疾患に罹っている個体に関する。詳細には、患者は、糖尿病（糖尿病Ｉ型またはＩＩ型）、リウマチ、リウマチ関節炎、炎症性疾患、または癌に罹っているか、またはその治療を受けている。さらにより詳細には、患者は、心血管合併症のいかなる既知な病歴もなく、かつ／または心血管合併症の症候を示さないか、わずかに（ＮＹＨＡクラスＩまたはＩＩ）のみ示し、かつ／または心血管合併症の治療を受けていない。しかし、心血管合併症の徴候または病歴をまったくもたない健常ボランティアも、本発明において患者であるとみなされる。
【００４０】
患者としては、血管内容量が増加しているか、または増加すると予想される患者であることが好ましい。血管内容量の増加は既に起こっていてもよく、または、将来起こることでもよい。
【００４１】
血管内容量とは、細胞性（例えば、赤血球）および非細胞性（血漿）血液成分の全容積に関する。成体個体の血管内容量は通常４から６リットルの範囲にある。
【００４２】
本発明によれば、血管内容量の増加とは、患者の血管内容量の少なくとも５％、詳細には少なくとも１０％、およびより詳細には少なくとも２０％の血管内容量の増加に関する。例えば、血液１単位（５００ｍｌ、これは血管内容量における約１０％の増加に等しい）、特に少なくとも２単位、より特別には少なくとも３単位の増量は、本発明による血管内容量の増加であるとみなされる。
【００４３】
「一時的」な血管内容量増加とは、所与の期間中に一度だけ存在する血管内容量増加である。これは、血管内容量の増加と、血管内容量増加の開始後短時間内、詳細には１２時間以内、より詳細には６時間以内、および最も詳細には３０分以内に、それに続いて起こる、ほぼ標準値までの減少とを特徴とする。
【００４４】
血管内容量の増加は、「一時的」な血管内容量の増加よりゆっくり現れて、より長時間にわたって、例えば１日間、数日間、または何週間も存在している場合、「持続性」であるとみなされる。
【００４５】

一時的な血管内容量増加の典型的な例には、液体の経口投与と、注入または輸液とが含まれる。例えば、飲水、スープの飲食、血漿の注入、栄養物の非経口投与、および輸血は、通常一時的な血管内容量増加を引き起こす。

【００４６】

「注入」には、血液、血漿、赤血球、血小板、電解質、抗生物質もしくは他の薬剤、または栄養物の非経口または静脈内の注入が含まれるが、これらに限定されるものではない。「輸液」には、特に血液、血漿、赤血球、血小板、または電解質の輸液が含まれる。

【００４７】

持続性増加の例には、液体の定常的静脈内投与と、とりわけ、水分貯留を引き起こす薬剤の投与とが含まれる。

【００４８】

持続性の血管内容量増加は、少量でさえ、相当な緊張を心血管系にもたらしうる。したがって、持続性の血管内容量増加は、患者に対してとりわけ危険となりうる。持続性の血管内容量増加は、例えば、利尿剤の使用によって、終止または治療されることがある。治療の選択肢のさらに別の例を、以下に示す。

【００４９】

どのような状況下で、心血管合併症が血管内容量増加の「結果」として発症したとみなされることがあるかは、当業者に公知である。詳細には、心血管合併症が一時的な血管内容量増加の開始後１日以内、詳細には１２時間以内、より詳細には４時間以内に発症した場合に、それは血管内容量の増加の結果として発症したとみなされる。あるいは、心血管合併症が持続性血管内容量の増加の開始後１日以内、数日以内、または数週間以内に発症した場合にも、それは血管内容量増加の結果として発症したとみなされる。

【００５０】

血管内容量の増加は、疾患によって引き起こされても、人工的に引き起こされてもよい。血管内容量の増加を引き起こす疾患の例には、敗血症と、血管内タンパク質濃度の増加を引き起こす疾患（例えば、免疫グロブリン血症）とが含まれる。

【００５１】

敗血症、すなわち血液中毒は、水分平衡の重大な撹乱を導くことがある。血管内容量の減少に続いて血管内容量の増加が起きることがあり、およびその逆が起きることもあるが、これらはしばしば迅速に交替しながら起こりうるものである。さらに治療では、大量の液体（最大数リットル）を注入する必要が生じることもある。本発明は、血管内容量の増加の結果として発症するいかなる心血管合併症のリスクも、詳細にモニターできるようにするものである。したがって、原疾患の治療をこのリスクに調整することも、それに付随して心血管薬を投与することもできる。本発明において心臓ホルモンのレベルを測定することによって、失った血管内容量の置換、または血管収縮薬の投与による影響を詳細にモニターすることができる。

【００５２】

人工的な血管内容量の増加は、内科療法によるものでも、実験的治療によるものでもよい。

【００５３】

血管内容量増加をもたらす内科療法には、液体の経口投与、注入、輸液、および水分貯留を引き起こす薬剤の投与が含まれる。

【００５４】

薬剤の投与によって引き起こされる血管内容量増加の進行は、注入、輸液、または経口投与された液体によって引き起こされる増加より、通常、長時間を要する。すなわち、薬剤は通常ゆっくりだが持続性の容量増加を誘導し、一方、注入、輸液、または経口投与された液体は、急速ではあるが一時的な容量増加を引き起こす。

【００５５】

水分貯留を引き起こす薬剤は、当業者に公知である。詳細には、そのような薬剤には、抗炎症薬（非ステロイド系抗リウマチ剤、Ｃｏｘ－２インヒビター、特に選択的Ｃｏｘ－

２インヒビター、コルチコステロイドを含む）、糖尿病薬、エストロゲン、およびＴＮＦインヒビターが含まれる。

【００５６】

抗炎症薬の例（非ステロイド系抗リウマチ剤（非ステロイド系抗炎症薬とも呼ばれる）を含む）には、アルクロフェナック；ジプロピオン酸アルクロメタゾン；アルゲストンアセトニド；アルファアミラーゼ；アムシナファル（Amcinafal）；アムシナフィド（Amcinafide）；アンフェナクナトリウム；塩酸アミプリロース；アナキンラ；アニロラク（Anirolac）；アニトラザフェン（Anitrazafen）；アパゾン；バルサラジド二ナトリウム；ベンダザック；ベノキサプロフェン；塩酸ベンジダミン；ブロメライン；ブロペラモール（Broperamole）；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロフェン（Cicloprofen）；シンタゾン（Cintazone）；クリプロフェン（Cliprofen）；プロピオン酸クロベタゾール；酪酸クロベタゾン；クロピラク（Clopirac）；プロピオン酸クロチカゾン（Cloticasone Propionate）；酢酸コルメタゾン（Cormethasone Acetate）；コルトドキソン；Ｃｏｘ－２インヒビター（特に特異的または「選択的」Ｃｏｘ－２インヒビター、より詳細にはセレコキシブ、ロフェコキシブ（バイオックス））；デフラザコルト；デソニド；デスオキシメタゾン；ジプロピオン酸デキサメタゾン；ジクロフェナク；ジクロフェナクカリウム；ジクロフェナックナトリウム；酢酸ジフロラゾン；ジフルミドンナトリウム（Diflumidone Sodium）；ジフルニサル；ジフルプレドナート；ジフタロン；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド（Drocinonide）；エンドリゾン（Endrysone）；エンリモマブ（Enlimomab）；エノリカムナトリウム（Enolicam Sodium）；エピリゾール；エトドラク；エトフェナメート（Etofenamate）；フェルビナク；フェナモール（Fenamole）；フェンブフェン；フェンクロフェナック；フェンクロラック（Fenclorac）；フェンドサル（Fendosal）；フェンピパロン（Fenpipalone）；フェンチアザク；フラザロン（Flazalone）；フルザコート（Fluazacort）；フルフェナム酸；フルミゾール；酢酸フルニソリド；フルニキシン；フルニキシンメグルミン；フルオコルチンブチル（Fluocortin Butyl）；酢酸フルオロメトロン；フルカゾン（Fluquazone）；フルルビプロフェン；フルレトフェン（Fluretofen）；プロピオン酸フルチカゾン；フラプロフェン（Furaprofen）；フロブフェン；ハルシノニド；プロピオン酸ハロベタゾール；酢酸ハロプレドン；イブフェナック；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ（Ilonidap）；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン；インドキソール（Indoxole）；イントラゾール（Intrazole）；酢酸イソフルプレドン；イソクセパック（Isoxepac）；イソキシカム；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール（Lofemizole Hydrochloride）；ロルノキシカム；エタボン酸ロテプレドノール；メクロフェナム酸ナトリウム；メクロフェナム酸；ブチル酸メクロリゾン（Meclorisone Dibutyrate）；メフェナム酸；メサラミン；メセクラゾン；スレプタン酸メチルプレドニゾロン；モルニフルメート（Morniflumate）；ナブメトン；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール（Naproxol）；ニマゾン（Nimazone）；オルサラジンナトリウム；オルゴテイン；オルパノキシン（Orpanoxin）；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン；塩酸パラニリン（Paranyline Hydrochloride）；ペントサン多硫酸ナトリウム；フェンブタゾンナトリウムグリセラート（Phenbutazone Sodium Glycerate）；パーフェニドン；ピロキシカム；ケイ皮酸ピロキシカム；ピロキシカムオラミン；ピルプロフェン；プレドナゼート（Prednazate）；プリフェロン（Prifelone）；プロドリックアシッド（Prodolic Acid）；プロクアゾン（Proquazone）；プロキサゾール（Proxazole）；クエン酸プロキサゾール（Proxazole Citrate）；リメキソロン（Rimexolone）；ロマザリツ（Romazarit）；サルコレックス（Salcolex）；サルンアセジン（Salnacedin）；サルサラート；サリチル酸；塩化サンギナリウム（Sanguinarium Chloride）；セクラゾン（Seclazone）；セルメタシン（Sermetacin）；スドキシカム（Sudoxicam）；スリンダク；スプロフェン；タルメタシン（Talmetacin）；タルニフルメート（Talniflumate）；タロサレート（Talosalate）；テブフェロン（Tebufelone）；テニダップ；テニダップナトリウム；テノキシカム；テシカム（Tesicam）；テシミド（Tesimide）；テトリダミン（Tet

rydamine）；チオピナク（Tiopinac）；ピバル酸チクソコルトール；トルメチン；トルメチンナトリウム；トリクロナイド（Triclonide）；トリフルミデート(Triflumidate）；ジドメタシン（Zidometacin）；およびゾメピラックナトリウムが含まれる。

【００５７】

コルチコステロイドの例には、コルチゾン；フルオコルトロン；ヒドロコルチゾン；メチルプレドニゾロン；プレドニソロン；プレドニソン；およびプレドニリデンが含まれる。

【００５８】

糖尿病薬の例には、チアゾリジンジオン（thiazolidinedone）、例えばグリタゾン；メジオン（medione）；ピオグリタゾン；ロシグリタゾン；およびトログリタゾンが含まれる。また、インスリン、スルホニル尿素、およびメトホルミンなどの薬剤の組合せも、本発明において使用する糖尿病薬である。

【００５９】

エストロゲンは、天然、合成、結合型、または非結合型でもよい。エストロゲンの例には、エストラジオール；エストリオール；吉草酸エストラジオール；エストロン；エチニルエストラジオール；およびメストラノールが含まれる。

【００６０】

ＴＮＦインヒビターの例には、エタネルセプトおよびインフリキシマブが含まれる。

【００６１】

選択的Ｃｏｘ－２インヒビターによって心血管合併症を起こすことがあり、それに続いて、心臓代償不全、さらには死亡さえ起こりうることが最近判明した。最近のある試験では（ＡＰＰＲＯＶＥ試験（バイオックスによる腺腫性ポリープ予防））、２５ｍｇのロフェコキシブを用いた場合、初期観察後フェーズにでさえ、プラセボより高い血圧レベルにあることが判明した。結腸腺腫の二次予防に関するこの試験には、認識可能な心血管リスクがない患者のみが含まれていた。

【００６２】

「非ステロイド系抗リウマチ剤」（非ステロイド系抗炎症薬またはＮＳＡＩＤとも呼ばれる）という用語は、当業者に公知である。ＮＳＡＩＤは、シクロオキシゲナーゼ（プロスタグランジンＨシンテターゼとしても知られる）を阻害する。シクロオキシゲナーゼは、アラキドン酸からプロスタグランジン$Ｈ_2$（環状エンドペルオキシド）への反応を触媒し、プロスタグランジン$Ｈ_2$は、プロスタグランジン$Ｉ_2$（プロスタサイクリンとしても知られる）、トロンボキサン$Ａ_2$、および他のプロスタグランジンの前駆体である。プロスタグランジンは、痛覚、熱、および炎症反応で重要な役割を果たしている。シクロオキシゲナーゼには、Ｃｏｘ－１およびＣｏｘ－２の２つのアイソフォームがある。Ｃｏｘ－２遺伝子は、即時型遺伝子であり、組織障害、疼痛反応、または炎症反応の状態下で誘導される。したがって、ＮＳＡＩＤには、Ｃｏｘ－１インヒビターおよびＣｏｘ－２インヒビターが含まれる。ＮＳＡＩＤは、両アイソフォームを阻害するものでも、または１つのアイソフォームに選択的な（すなわち、治療量において、それらは２つのイアイソフォームのうち１つのみを阻害する）ものでもよい。

【００６３】

非特異的なＮＳＡＩＤの例には、イブプロフェン；フルルビプロフェン；ナプロキセン；フルフェナム酸；メフェナム酸；ピロキシカム；ジクロフェナク；フェンブタゾンナトリウムグリセラート（Phenbutazone Sodium Glycerate）；インドメタシン；テノキシカムが含まれる。

【００６４】

本発明において使用する選択的Ｃｏｘ－２インヒビターは、治療条件下でＣｏｘ－２の発現または、好ましくは、酵素機能を阻害するが、Ｃｏｘ－１の発現または、好ましくは、酵素機能を有意に阻害しない化合物である。

【００６５】

選択的Ｃｏｘ－２インヒビターの例には、コキシブ（例えば、セレコキシブ、ロフェコ

キシブ、エトリコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ（バルデコキシブのプロドラッグ）、ルミラコキシブ）、メクロフェナム酸、スリンダク硫化物、ジクロフェナク、ニメスリド、メロキシカム、エトドラク、ＮＳ３９８、Ｌ－７４５３３７、ＤＦＰ（３－（２－プロピルオキシ）－４－（４－メチルスルホニルフェニル）－５，５ジメチルフラノン）が含まれる。最後の３つの化合物は、Warner,T.D.ら、1999年に記載されている。

【００６６】

２つのシクロオキシゲナーゼの酵素機能は、適当なｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏ試験を含めた、当技術分野で公知の方法で測定できる。Ｃｏｘ－１酵素機能の典型的なマーカーは、トロンボキサンA_2の生成であり、一方、Ｃｏｘ－２酵素機能の典型的なマーカーは、プロスタグランジン（例えば、マクロファージからのプロスタグランジンE_2）の生成である。

【００６７】

適当な試験系の例は公表されている（例えば、Warner,T.D.、Giuliano,F.、Vojnovic,I.ら(1999)、Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity:A full in vitro analysis、Proceedings of the National Academy of Sciences USA、96巻、7563～7568頁、関連の訂正が96巻(17)、9966d頁に掲載）。このアッセイはWilliam Harvey修正アッセイと呼ぶことにする。このアッセイは、上記Warner,T.D.ら、7563～4頁に詳細に記載されており、その記載を参照により本明細書に明示的に組み込む。

【００６８】

本発明による選択的Ｃｏｘ－２インヒビターは、好ましくは、William Harvey修正アッセイに従った場合に、５倍を越えるＣｏｘ－２選択性を有し、より好ましくは、William Harvey修正アッセイに従った場合に、５０倍を越えるＣｏｘ－２選択性を有する（上記Warner,T.D.ら、7567頁の図3を参照）。

【００６９】

あるいは、本発明による選択的Ｃｏｘ－２インヒビターは、好ましくはＣｏｘ－２に対してジクロフェナクより選択的、より好ましくはＣｏｘ－２に対してニメスリドより選択的、さらにより好ましくは、治療条件下でＣｏｘ－２に対して少なくともセレコキシブと同程度に選択的な化合物である。

【００７０】

別の好ましい実施形態では、本発明は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断する方法および手段であって、上記血管内容量増加が液体の注入もしくは輸液、または「コキシブ」類の投与によって人工的に引き起こされる方法および手段に関する。コキシブ類の例には、セレコキシブ（セレブレックス(商標)、Pfizer社）、ロフェコキシブ（バイオックス(商標)、Merck社）、エトリコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ（バルデコキシブのプロドラッグ）、ルミラコキシブ（プレキシジ(商標)、Novartis社）が含まれる。他の同様の化合物も本発明の範囲に包含され、それらのうちいくつかは、開発および試験の過程にある。

【００７１】

また、実験的治療が血管内容量の増加につながることもある。とりわけ、身体を傾斜させることは、血管内容量の増加をシミュレートし、心臓ホルモンの遊離を導くことができる。したがって、本発明は、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する患者のリスクを診断する方法であって、心臓ホルモン、好ましくはナトリウム利尿ペプチドを測定する前に患者を傾斜させる追加ステップを含む方法にも関する。傾斜させることは、本発明に係る診断方法と併せて、慎重に制御された医学環境における、心血管合併症に罹患するリスクの診断を可能にするものである。傾斜させることによって生じる心血管系の緊張は可逆的であるため、傾斜させる操作は、貴重な診断情報を安全な実験設定で提供することができる。

【００７２】

傾斜させることは、健常ボランティアが心血管合併症に罹患するリスクを評価するのに

も役立ちうる。詳細には、傾斜させる操作は、パイロット、スカイダイバー、バンジージャンパー、宇宙飛行士など、血圧または血中分布の急激な変化を経験する人々の身体試験に有用となりうる。

【００７３】

本発明によれば、傾斜させるとは、立位または仰臥位での血液分布と比較して、血液を上半身に再分布させることができるいかなる手段にも関する。例には、身体を、頭を下にして傾斜させること、重力または遠心力の使用、および加圧服の使用が含まれる。

【００７４】

詳細には、傾斜させることは、患者の身体を、頭を下にして、５～９０°、好ましくは１０～３０°、より好ましくは１０～２０°、最も好ましくは１５°傾斜させることに関する。対照として、傾斜プロトコールは、患者の身体を、足を下にしてそれぞれの傾斜角度で傾斜させることを含んでもよい。

【００７５】

本発明に係る診断は、診断手段を用いて行うことが好ましい。診断手段とは、目的の物質、詳細には目的のペプチドまたはポリペプチド、より詳細には心臓ホルモンのレベル、量、または濃度の測定を可能にするいかなる手段でもよい。

【００７６】

別の実施形態では、本発明は、容量過負荷を引き起こす注入、輸液、または薬剤の患者への投与を決定する方法であって、（ａ）患者の心臓ホルモンのレベルを、好ましくはｉｎ　ｖｉｔｒｏで、測定するステップ、ｂ）測定したレベルを、患者の様々な程度のリスクに関連した少なくとも１つの既知レベルと比較するステップ、（ｃ）場合により、心臓内科医による患者の検査を開始するステップ、および（ｄ）場合により心臓内科医による患者の検査の結果を考慮に入れて、注入、輸液、または薬剤の投与を推奨するまたは回避することを含む方法に関する。本明細書において前述したように、この方法が本発明のすべての実施形態に適合させうるものであることは自明である。詳細には、この方法は、容量過負荷を引き起こす薬剤の患者への投与を決定するものであり、この薬剤は選択的Ｃｏｘ－２インヒビターである。さらに、好ましい心臓ホルモンは、ＢＮＰ型ペプチド、特にＢＮＰまたはＮＴ－ｐｒｏＢＮＰである。

【００７７】

注入、輸液、または薬剤の投与を推奨または回避することは、測定したレベルを、少なくとも既知のレベルと比較することによって示されるリスクに基づくことが好ましい。前述したように、測定レベルによって、リスクの増加が示されない場合には、治療を推薦してもよい。注入、輸液、または薬剤の投与の推奨は、もう一方の心血管リスク因子（例えば、フラミンガムスコア、これは心臓内科医にとって周知である）も、心血管合併症に罹るリスクが低いことを示す場合に行われることが好ましい。測定レベルが増加したリスクを示す場合に投与が推奨されることもあるが、この場合、本発明の心臓ホルモンのレベルをさらに測定し、心電図記録法、心エコー法、熟練した心臓内科医に公知の任意の他の適当な方法などの別の診断を次に行う（すなわち、「モニターする」）ことが好ましい。測定レベルが高度に、または極めて高度に増加したリスクを示す場合には、注入、輸液、または薬剤の投与を回避することが好ましい。

【００７８】

場合により、患者は心臓内科医による検査を受ける。この検査は、測定レベルが高リスク、非常に高いリスク、または極めて非常に高いリスクを示す場合に、行われることが好ましい。心臓内科医は、公知でありかつ適切であると考えられるいかなる方法または手段によって患者を検査してもよい。本発明に従って示されるリスクと、心臓内科医による試験の結果とを考慮して、注入、輸液、または薬剤の投与を推奨するまたは回避してもよい。

【００７９】

それぞれのペプチドレベルを測定するのに使用できる方法および診断手段は当業者に公知である。これらの方法には、マイクロプレートＥＬＩＳＡに基づく方法、完全自動化イ

ムノアッセイまたはロボットイムノアッセイ（例えば、Elecsys(商標)分析器が利用可能）、ＣＢＡ（酵素コバルト結合アッセイ、例えば、Roche-Hitachi(商標)分析器が利用可能）、およびラテックス凝集反応（例えば、Roche社-Hitachi(商標)分析器が利用可能）が含まれる。

【００８０】

さらに、当業者ならば、ペプチドまたはポリペプチドのレベルを測定する様々な方法に精通している。「レベル」という用語は、患者体内または患者から採取された試料中のペプチドまたはポリペプチドの量または濃度に関する。

【００８１】

本発明による「測定」という用語は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、または他の目的の物質の量または濃度を、好ましくは半定量的または定量的に、決定することに関する。測定は、直接的にでも、間接的にでも行うことができる。間接的な測定には、細胞応答、結合リガンド、標識、または酵素反応生成物の測定が含まれる。

【００８２】

本発明に関しては、量は濃度にも関する。既知のサイズの試料中における、目的の物質の総量から、その物質の濃度が計算できること、また、この逆も同様であることは自明である。

【００８３】

測定は、当技術分野で公知のいかなる方法で行うこともできる。好ましい方法を以下に記載する。

【００８４】

好ましい実施形態では、目的のペプチドまたはポリペプチド、詳細には心臓ホルモンのレベルを測定する方法は、（ａ）上記ペプチドまたはポリペプチドに対し細胞応答しうる細胞を、適当な時間、上記ペプチドまたはポリペプチドと接触させるステップと、（ｂ）上記細胞応答を測定するステップとを含む。

【００８５】

別の好ましい実施形態では、目的のペプチドまたはポリペプチド、詳細には心臓ホルモンのレベルを測定する方法は、（ａ）ペプチドまたはポリペプチドを、十分な時間、適当な基質と接触させるステップと、（ｂ）産物の量を測定するステップとを含む。

【００８６】

別の好ましい実施形態では、目的のペプチドまたはポリペプチド、特に心臓ホルモンのレベルを測定する方法は、（ａ）ペプチドまたはポリペプチドを、特異的な結合リガンドと接触させるステップと、（ｂ）（場合により）非結合リガンドを除去するステップと、（ｃ）結合したリガンドの量を測定するステップとを含む。

【００８７】

このペプチドまたはポリペプチドは、試料中、特に体液または組織試料中に含有されて、試料中のペプチドまたはポリペプチドの量が測定されることが好ましい。

【００８８】

ペプチドおよびポリペプチド（タンパク質）は、組織、細胞、および体液試料中、すなわち、好ましくはｉｎ　ｖｉｔｒｏで、測定することができる。目的のペプチドまたはポリペプチドは、体液試料中で測定されることが好ましい。

【００８９】

本発明において組織試料は、ヒトまたは動物の死体または生体から得られるいかなる種類の組織も指す。組織試料は、当業者に公知のいかなる方法でも、例えば生検または掻爬術によって得ることができる。

【００９０】

本発明において体液には、血液、血清、血漿、リンパ液、脳液、唾液、および尿が含まれうる。詳細には、体液には、血液、血清、血漿、および尿が含まれる。体液試料は、当技術分野で公知のいかなる方法で入手することもできる。

【００９１】

細胞試料を入手する方法には、単一細胞または小細胞群の直接的調製、組織の解離（例えば、トリプシンを用いる）、および、例えば濾過または遠心による、体液からの細胞の分離が含まれる。本発明による細胞には、血小板および他の非核細胞、例えば赤血球も含まれる。

【００９２】

必要な場合、試料はさらに処理されてもよい。詳細には、核酸、ペプチド、またはポリペプチドは、濾過、遠心法、またはクロロホルム／フェノール抽出などの抽出法を含めた、当技術分野で公知の方法に従って、試料から精製してもよい。

【００９３】

細胞応答を測定するには、試料または処理された試料を、細胞培養に添加し、細胞内外の応答を測定する。細胞応答には、リポーター遺伝子の発現、または物質、例えば、ペプチド、ポリペプチド、または小分子の分泌が含まれる。

【００９４】

測定に適した多くの方法には、目的のペプチドまたはポリペプチドに特異的なリガンド結合の量を測定することが含まれうる。本発明による結合には、共有結合および非共有結合の両方が含まれる。

【００９５】

本発明においてリガンドは、目的のペプチドまたはポリペプチドに結合するいかなるペプチド、ポリペプチド、核酸、または他の物質でもありうる。ペプチドまたはポリペプチドは、ヒトまたは動物の体から採取または精製した場合、例えばグリコシル化によって、修飾できることが周知である。本発明による適当なリガンドは、そのような部位を介してペプチドまたはポリペプチドに結合するものでもよい。

【００９６】

リガンドは、測定対象のペプチドまたはポリペプチドに、好ましくは特異的に結合すべきである。本発明による「特異的結合」とは、リガンドが、試験対象の試料中に存在する別のペプチド、ポリペプチドまたは物質に実質上結合する（それと「交差反応する」）べきではないことを意味する。特異的に結合するタンパク質またはアイソフォームは、いかなる他の適切なペプチドまたはポリペプチドよりも、好ましくは少なくとも３倍以上高い親和性、より好ましくは少なくとも１０倍以上高い親和性、およびさらにより好ましくは少なくとも５０倍以上高い親和性で結合するべきである。

【００９７】

試験対象のペプチドまたはポリペプチドが、例えばウェスタンブロット上の大きさによって、またはそれが試料中で比較的豊富にあることによって、識別可能であり、かつ明確に測定できる場合、非特異的結合も許容されることがある。リガンドの結合は、当技術分野で公知のいかなる方法で測定することもできる。この方法は、半定量的であるか、または定量的であることが好ましい。適切な方法を以下に記載する。

【００９８】

第１に、リガンドの結合は、例えば、ＮＭＲまたは表面プラズモン共鳴法で直接測定することができる。

【００９９】

第２に、リガンドが目的のペプチドまたはポリペプチドのもつ酵素活性の基質として機能する場合には、酵素反応産物を測定することができる（例えば、プロテアーゼの量は、切断された基質の量を、例えば、ウェスタンブロットで測定することによって、測定することができる）。

【０１００】

酵素反応産物を測定するためには、基質の量が飽和状態に近いことが好ましい。基質は、反応前に検出可能な標識で標識されてもよい。試料は適当な時間、基質に接触させることが好ましい。適当な時間とは、検出可能であり、かつ好ましくは測定可能な量の産物が生成されるのに必要な時間を指す。産物の量を測定する代わりに、所定（例えば、検出可能な）量の産物が生じるのに必要な時間を測定することもできる。

【０１０１】
第３に、リガンドは、リガンドの検出および測定を可能にする標識と、共有結合または非共有結合によって結合させることができる。
【０１０２】
標識は、直接的方法で行っても、間接的方法で行ってもよい。直接標識は、標識をリガンドに直接（共有結合または非共有結合によって）結合させるものである。間接標識は、二次リガンドを一次リガンドに結合させる（共有結合または非共有結合によって）ものである。二次リガンドは、一次リガンドに特異的に結合すべきものである。上記二次リガンドは、適当な標識と結合してもよく、および／または二次リガンドに結合する三次リガンドの標的（受容体）であってもよい。シグナルを増強するために、二次、三次、またはさらに高次のリガンドがしばしば用いられる。適当な二次リガンド、およびより高次のリガンドには、抗体、二次抗体、および周知のストレプトアビジンビオチン系（（Vector Laboratories社）を含むことができる。
【０１０３】
リガンドまたは基質は、当技術分野で公知の、１つまたは複数のタグで「タグ標識」してもよい。そのようなタグは、その後、より高次のリガンドの標的となりうる。適当なタグには、ビオチン、ジゴキシゲニン、Ｈｉｓタグ、グルタチオンＳトランスフェラーゼ、ＦＬＡＧ、ＧＦＰ、ｍｙｃタグ、インフルエンザＡウイルスヘマグルチニン（ＨＡ）、マルトース結合タンパク質などが含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの場合、タグは、Ｎ末端および／またはＣ末端にあることが好ましい。
【０１０４】
適切な検出方法で検出可能ないかなる標識も、適当な標識である。典型的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素的に活性な標識、放射性標識、磁性標識（例えば、常磁性および超常磁性標識を含めた「磁性ビーズ」）、および蛍光標識が含まれる。
【０１０５】
酵素的に活性な標識には、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、βガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびこれらの誘導体が含まれる。検出用に適当な基質には、ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）、３，３’－５，５’－テトラメチルベンジジン、ＮＢＴ－ＢＣＩＰ（４－ニトロブルーテトラゾリウム塩化物および５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－リン酸、Roche Diagnostics社から既成の原液として購入可能）、CDP-Star(商標)(Amersham Biosciences社)、およびECF(商標)（Amersham Biosciences社）が含まれる。適当な酵素と基質との組合せは、有色の反応生成物、蛍光、または化学発光をもたらすことがあり、それらは、当技術分野で公知の方法で測定することができる（例えば、感光性フィルムまたは適当なカメラシステムを用いて）。酵素反応を測定することに関しては、上記の規準が同様に適用される。
【０１０６】
典型的な蛍光標識には、蛍光タンパク質（ＧＦＰおよびその誘導体など）、Ｃｙ３、Ｃｙ５、テキサスレッド、フルオレセイン、およびアレクシア色素（例えばアレクシア５６８）が含まれる。この他の蛍光標識は、例えば、Molcular Probes社（Oregon）から購入可能である。また、蛍光標識としての量子ドットの使用も考慮される。
【０１０７】
典型的な放射性標識には、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、および同様のものが含まれる。放射性標識は、例えば感光性フィルムまたは蛍光造影装置（phosphor imager）など、公知であり、かつ適切ないかなる方法でも検出できる。
【０１０８】
本発明において適切な測定方法には、沈殿（特に免疫沈降反応）、電気化学発光法（電気的に発生する化学発光）、ＲＩＡ（ラジオイムノアッセイ）、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、サンドイッチ酵素免疫試験、　電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ（ＥＣＬＩＡ）、解離増強ランタニド蛍光イムノアッセイ（ＤＥＬＦＩＡ）、シンチ

レーション近接アッセイ（ＳＰＡ）、比濁分析、比ろう分析、ラテックス強化比濁分析もしくは比ろう分析、または固相免疫試験も含まれる。当技術分野で公知の他の方法（ゲル電気泳動、２次元ゲル電気泳動、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）、ウエスタンブロッティング、質量分析など）は、単独で使用することも、上述の標識化法または他の検出方法と組み合わせて使用することもできる。

【０１０９】

好ましいリガンドには、抗体、核酸、ペプチド、ポリペプチド、およびアプタマー、例えば核酸アプタマーまたはペプチドアプタマーが含まれる。そのようなリガンドに関する方法は、当技術分野で周知である。例えば、適当な抗体またはアプタマーの同定および製造は、供給業者によって提供される。当業者は、そのようなリガンドの、より高い親和性および特異性を有する誘導体を開発する方法に精通している。例えば、核酸、ペプチド、またはポリペプチドにランダム変異を導入することができる。これらの誘導体は、その後、当技術分野で公知のスクリーニング方法、例えばファージディスプレイによって、結合の有無を試験することができる。

【０１１０】

本明細書において、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方と、Ｆｖ、Ｆａｂ、およびＦ（ａｂ）$_2$フラグメントなど、抗原またはハプテンに結合可能なそれらのフラグメントとが含まれる。本発明には、「ヒト化された」ハイブリッド抗体も含まれるが、そのような抗体では、所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列がヒトアクセプター抗体の配列に結合される。

【０１１１】

ドナー配列は、通常、少なくともドナーの抗原結合性アミノ酸残基を含むが、さらに、構造上および／または機能上適切な、ドナー抗体の他のアミノ酸残基も含むことができる。そのようなハイブリッドは、当技術分野で周知のいくつかの方法で調製することができる。

【０１１２】

別の好ましい実施形態では、リガンドが、好ましくは、核酸、ペプチド、およびポリペプチドからなる群から、より好ましくは、核酸、抗体、およびアプタマーからなる群から選択され、アレイ上に提示される。

【０１１３】

上記アレイは、少なくとも１つの追加リガンドを含有し、これは、目的のペプチド、ポリペプチド、または核酸に対するリガンドでもよい。上記追加リガンドは、本発明に関しては、特に関心のないペプチド、ポリペプチド、または核酸に対するリガンドでもよい。アレイ上には、本発明との関連で目的の少なくとも３つ、好ましくは少なくとも５つ、より好ましくは少なくとも８つのペプチドまたはポリペプチドに対するリガンドが含有されることが好ましい。

【０１１４】

本発明によれば、「アレイ」という用語は、その表面に少なくとも２つの化合物が一次元、二次元、または三次元配置で付着または結合されている固相またはゲル様担体を指す。そのようなアレイ（「遺伝子チップ」、「プロテインチップ」、抗体アレイなどを含む）は、当業者に公知であり、通常、顕微鏡用ガラススライド上、特に、ポリカチオン、ニトロセルロース、またはビオチンでコーティングされたガラススライドなどのコーティングされたガラススライド上、カバーガラス上、ならびに、例えば、ニトロセルロースまたはナイロンを主材とする膜などの膜上に作製される。

【０１１５】

アレイは、結合リガンド、またはそれぞれ少なくとも１つのリガンドを発現する少なくとも２つの細胞を含んでもよい。

【０１１６】

本発明において、アレイとして、「懸濁液アレイ」を用いることも考慮される（Sklar LA、Nolan JP(2002)、Suspension array technology:evolution of the flat-array para

digm、Trends Biotechnol、20(1):9～12）。そのような懸濁液アレイでは、担体（例えば、ミクロビーズまたはミクロスフェア）が懸濁液中に存在する。このアレイは、様々なリガンドを保持し、場合によっては標識された様々なミクロビーズまたはミクロスフェアからなる。

【０１１７】

本発明はさらに、上記に定義したようなアレイを生成する方法であって、少なくとも１つのリガンドが他のリガンドに加えて、担体物質にも結合する方法にも関する。

【０１１８】

そのようなアレイを生成する方法、例えば固相化学および感光性保護基に基づく方法は公知である（米国特許第５，７４４，３０５号）。そのようなアレイは、物質または物質ライブラリーと接触させて、相互作用、例えば、結合またはコンフォメーション変化の有無を試験することができる。したがって、上記に定義したようなペプチドまたはポリペプチドを含むアレイは、上記のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合するリガンドを特定するために使用してもよい。

【０１１９】

本発明に係る方法は、測定したレベルを、患者の様々な程度のリスクに関連した既知レベルと比較することによって、患者のリスクを診断するステップを含む。

【０１２０】

当業者ならば、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する様々な程度のリスクと関連した既知レベルの心臓ホルモンを決定することができる。

【０１２１】

本発明によれば、「リスク」という用語は、特定の事象、より詳細には心血管合併症が起こる確率に関する。リスクの程度は、高リスク、非常に高いリスク、極めて非常に高いリスクに分けることができる。リスクの程度は、高くない場合もある。「リスクが高くない」とは、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患するリスクが、明白には存在しないことを意味する。

【０１２２】

どのようなレベルの心臓ホルモンが、どの程度のリスクに関連しているかに関しては、心血管疾患の存在又は重篤度との関連が既知である心臓ホルモンレベルから、指針を得ることができる。例えば、年齢５０歳未満の個体で得られた９７．５百分位数に基づいた場合、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの血漿レベルにおいては１２５ｐｇ／ｍｌが正常レベルであるとみなされた（実施例３を参照）。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰのこれより高いレベルは、例えば、ＮＹＨＡ分類による症候レベル、およびＬＶＥＦにおける機能障害のレベルと相関する。「血漿レベル」という用語は、血漿中で測定されたＮＴ－ｐｒｏＢＮＰのレベルに関する。

【０１２３】

以下では、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの血漿レベルが提示されるが、通常これは、血管内容量増加の結果として心血管合併症に罹患するリスクを示した程度に関連していると考えられる。

【０１２４】

下記に提示するレベルが、患者のリスクに関する第１分類としての役割しかもたないことは、明らかである。例えば、リスクは、特定の患者における心臓の予備ポンピング容量（spare pumping capacity）にも依存している。

【０１２５】

さらには、当業者ならば、以下にさらに示された実施例から、他の適当なレベル、特に、老齢患者または甲状腺機能（例えば、ＴＳＨまたはＦＴ４）に関するマーカーのレベルが増加または減少している患者など、ある特定の患者集団で適当なレベルを決定することができる。

【０１２６】

典型的には、５０ｐｇ／ｍｌ未満のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの血漿レベルが、血管内容量増

加の結果として心血管合併症に罹患するリスクが高くないことと関連づけられる。詳細には、男性患者では、約６０～１００ｐｇ／ｍｌ未満の血漿レベルが、高くないリスクと関連づけられ、女性患者では、約１２０～１５０ｐｇ／ｍｌ未満の血漿レベルが、高くないリスクと関連づけられる。平均値は１２５ｐｇ／ｍｌである。

【０１２７】

典型的には、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの血漿レベルが、高くないリスクの血漿レベルより高いが、１０００ｐｇ／ｍｌ未満である場合に、この血漿レベルは、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する高リスクと関連づけられる。

【０１２８】

典型的には、１０００から５０００ｐｇ／ｍｌのＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの血漿レベルが、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する非常に高いリスクと関連づけられる。

【０１２９】

典型的には、５０００ｐｇ／ｍｌを越えるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの血漿レベルが、血管内容量の増加の結果として心血管合併症に罹患する極めて非常に高いリスクと関連づけられる。

【０１３０】

患者のリスクがいったん診断されれば、それは、以下に記載されるように、後続の治療に影響を与えることができる。下記のリスク程度は、特に、上記のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルに関連したリスク程度を指す。

【０１３１】

本発明に係る方法が、高リスクを示さない場合には、計画通りに治療を継続してもよい。

【０１３２】

本発明に係る方法が、高リスクを示す場合には、治療を調整することができる。治療は、本発明の心臓ホルモンのレベルをさらに測定し、心電図記録法、心エコー法、または熟練した心臓内科医に公知の任意の他の適当な方法などの別の診断を次に行うことが好ましい。

【０１３３】

本発明に係る方法が非常に高いリスクを示す場合には、高リスクに関して記載した通りに治療を調整してもよい。しかし、何らかの血管内容量の増加を許容できるかどうか、例えば、人工的な血管内容量の増加を誘起するものかどうかを再考してもよい。

【０１３４】

本発明に係る方法が極めて非常に高いリスクを示す場合には、高リスクの増加に関して記載した通りに治療を調整してもよい。しかし、即時の入院および／または心臓の集中治療も考慮してもよい。

【０１３５】

治療を調整することには、既存または計画中の血管内容量増加の制限、塩摂取の制限、定期的かつ適度な運動、非ステロイド系抗炎症薬の回避、インフルエンザおよび肺炎球菌に対する免疫処置の提供、利尿剤（複数の利尿剤の併用投与を含める）、ＡＣＥインヒビター、Ｂ－アドレナリン遮断薬、アンギオテンシン受容体遮断薬、およびジギタリスなどの薬剤の投与、ならびに当業者に公知で適切と考えられる他のいかなる処置も含まれる。したがって、本発明は、血管内容量が増加しているか、またはいずれ増加すると予想される患者を治療する方法も提供する。

【０１３６】

図１　傾斜操作を受けた１６人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。データは平均±標準偏差である。ＳＡＢＰ、ＤＡＢＰ、およびＭＡＰは、収縮期血圧、弛緩期血圧、および平均血圧を示す。ＨＲ：心拍数、ＬＡＤ：左心室直径、ＬＡＤのデータは基線（ＢＬ）に対するパーセントとして示す。＊：ｐ＜０．０５の群間変動、ＡＮＯＶＡ反復測定による。

【０１３７】
図２　ｎ＝８の２群で、連続傾斜操作を受けた１６人の健常ボランティアにおけるＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ（上側パネル）、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ（中央パネル）、およびリラキシン（ＲＬＸ）の血漿レベルの経過を示す図である。円は、最初に足を下にした体位におかれ、続いて頭を下にした体位におかれた被験者を示し、正方形は、逆の傾斜プロトコールを受けた被験者を示す。データは、１００％に設定した基線値に対するパーセントを、平均±ＳＥＭとして示す。＊：ｐ＜０．０５の群間変動、ＡＮＯＶＡ反復測定による。黒四角の白丸：基線値との比較における有意差（ｐ＜０．０５）（対応のあるスチューデントのｔ検定）。
【０１３８】
図３　対照群およびナトリウム負荷（血管内容量増加、Na^+）群における、１０人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。データは平均±標準偏差（絶対データ）である。ＭＡＰ：平均動脈圧、ＨＲ：心拍数、ＬＡＤ：左心室直径、Ｔ：時間、＊：ｐ＜０．０５の群間変動、フリードマン検定とそれに続いて行ったウィルコクソン符号順位和検定とによる。§：基線レベルとの比較におけるｐ＞０．０５の個体内変動。
【０１３９】
図４　対照プロトコール（円）中、およびナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコール（正方形）中の、１０人の健常ボランティアにおける、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ（上側パネル）、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ（中央パネル）、およびリラキシン（ＲＬＸ）の血漿レベルの経過を示す図である。データは平均±ＳＥＭとして示す。＊：ｐ＜０．０５の群間変動。黒四角の白丸：基線値との比較における有意差（ｐ＜０．０５）（ウィルコクソン符号順位和検定）。
【０１４０】
図５　ナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコール中の、１０人の健常ボランティアにおける、尿流量（ＵＶ）、ナトリウム排泄率（FE_{Na}）、およびクレアチニンクリアランス（C_{crea}）の経過を示す図である。データは平均±ＳＥＭとして示す。†：基線値との比較における有意差（ｐ＜０．０５）。§：１０：００の値（ナトリウム注入前）との比較における有意差（ｐ＜０．０５）、ウィルコクソン符号順位和検定による。
【０１４１】
図６　ナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコール中の、１０人の健常ボランティアにおける、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ尿排泄（$U_{NT-proBNP}$）、リラキシン尿排泄（U_{RLX}）、およびウロジラチン尿排泄（U_{URO}）の経過を示す図である。データは、クレアチニン１μｍｏｌあたりにおけるホルモン濃度相互の比率として計算し、平均±ＳＥＭとして示す。†：基線値との比較における有意差（ｐ＜０．０５）。§：１０：００の値（ナトリウム注入前）との比較における有意差（ｐ＜０．０５）、ウィルコクソン符号順位和検定による。
【０１４２】
図７　観測時間中の健常ボランティアにおける、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、およびリラキシンの血漿中濃度および尿中ホルモン排出と、尿流量およびナトリウム排泄率との間の相関分析を示す図である。２０ｍｌ＊ｋｇ$^{-1}$等張食塩水の注入後１０時間の観測時間中における、１０人の健常ボランティアからプールされたデータに関して計算したスピアマンの順位相関検定による。ＵＶ：尿流量、FE_{Na}：ナトリウム排泄率、ｐｌ．：血漿、ｕｒ．：尿。相関関係は「スピアマンのロー」として示す。ｍ．ｓ．：試料の喪失により分析できなかった。ｎ．ｓ．：有意でない。＊：ｐ＜０．０５の群間変動。
【０１４３】
図８　年齢１８～６５歳（１８～２９歳、３０～３９歳、４０～４９歳、５０～５９歳、６０～６５歳）の献血者（ｎ＝２９４８）におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル（中央値）の度数分布を示す図である。Ｍ：男性、Ｆ：女性。
【０１４４】

図９　献血者における、年齢群別および性特異的ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。Ｎ：献血者数。ｍ：男性、ｆ：女性。

【０１４５】

図１０　ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが高いＮ＝４８の献血者の追跡試験（１２カ月）を示す図である。

【０１４６】

図１１　献血者におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルと、それらのヘモグロビンレベルに対する関係とを示す図である。ｍ：男性（菱形）、ｆ：女性（正方形）、ｔ：合計（三角形）。

【０１４７】

図１２　クレアチニンレベルに対する、献血者の年齢群特異的および性特異的ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル（中央値）を示す図である。Ｎ：献血者の数。

【０１４８】

図１３　心疾患の疑いで来診した患者の試験集団特性を示す図である。ｔ：合計、ｍ：男性、ｆ：女性。

【０１４９】

図１４　ＬＶＥＦおよびＮＹＨＡ分類に応じた、患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５０】

図１５　ＬＶＥＦに応じた、男性のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５１】

図１６　ＬＶＥＦに応じた、女性のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５２】

図１７　ＬＶＥＦの減失を有し、かつＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルがカットオフ（男性：８４ｐｇ／ｍｌ、女性：１５５ｐｇ／ｍｌ）より低い患者に関する図である。

【０１５３】

図１８　心房細動を示さない患者との比較における、心房細動を示す患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５４】

図１９　心筋梗塞の既往症（ＡＭＩ）がない患者との比較における、ＡＭＩ既往症がある患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５５】

図２０　狭心症を有しない患者との比較における、狭心症を有する患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５６】

図２１　クレアチニンがレベル高い患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５７】

図２２　甲状腺機能不全を有する患者との比較における、正常な甲状腺機能を有する患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

【０１５８】

図２３　敗血症性心筋梗塞およびそれに続く肺鬱血を有する患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰおよびＢＮＰレベルを示す図である。Ｈｂ：ヘモグロビン、Ｌｅｕｋｏｚｙｔｅｎ：白血球。

【０１５９】

図２４　実施例８の患者００５におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。Ｐａｔ．：患者。

【０１６０】

図２５　実施例８の患者０２５におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。Ｐａｔ．：患者。

【０１６１】

図２６　実施例８の患者０４７におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。Ｐａｔ．：患者。

【０１６２】

図２７　実施例８の患者０６６におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。Ｐａｔ．：患者。

【０１６３】

図２８　実施例８の患者０８５におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。Ｐａｔ．：患者。

【０１６４】

以下の実施例は、本発明を例示するものであり、いかなる意味においても本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例１】

【０１６５】

ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの測定

ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰは、Elecsys 2010を用いた電気化学発光イムノアッセイ（ElecsysproBNPサンドイッチイムノアッセイ;Roche Diagnostics社、Mannheim、独国）で測定した。このアッセイは電気化学発光サンドイッチイムノアッセイの原理に従って機能する。第１ステップでは、ビオチン標識されたＩｇＧ（１～２１）捕獲抗体と、ルテニウム標識されたＦ（ａｂ’）$_2$（３９～５０）シグナル抗体と、２０μｌの試料とを３７℃で９分間インキュベートした。その後、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性微粒子を添加し、混合物をさらに９分間インキュベートした。第２のインキュベーションの後に、反応混合物を装置の測定セルに移した。ビーズは、そこで磁力により電極の表面に捕捉される。結合しなかった標識は、測定セルを緩衝液で洗浄することによって除去した。

【０１６６】

最終のステップでは、トリプロピルアミンを含む緩衝液の存在下で電極に電圧を印加し、この結果得られた電気化学発光シグナルを光電増倍管で記録した。すべての試薬および試料はElecsys(登録商標)測定器によって完全に自動的に操作された。結果は、２点較正と、試薬バーコードで得られるマスター曲線とで測定器に特有に生成された検量線を用いて決定した。試験は製造者の教示に従って行った。

【実施例２】

【０１６７】

施設内審査委員会による承認と書面によるインフォームドコンセントとの後、通常のナトリウム食を摂っている１６人の健常男性非喫煙ボランティア（年齢：２７±４歳、体重：８２±１１ｋｇ、身長：１８４±６ｃｍ）を試験した。すべての被験者が傾斜プロトコールに参加し、これに加えて１０人のボランティアがナトリウム負荷プロトコールに登録された。ナトリウム負荷プロトコールは、血管内容量の増加、すなわち容量過負荷を引き起こした。試験は、終夜の絶食後に温度制御実験室で行った。８：００に被験者が実験室に到着した後、被験者を仰臥位に配置し、１６ゲージの静脈カニューレを装着して、鬱血することなく血液試料採取できるようにした。９：１５にすべての被験者に標準的な朝食（２枚のトースト、マーマレード、３ｍｌ＊ｋｇ$^{-1}$の水）を支給した。

【０１６８】

傾斜プロトコール：

１６人のボランティアを、無作為に、ｎ＝８の２群に分割し、以下の別々の体位にしてそれぞれ２時間試験した。すなわち、仰臥位での休養時間の後、被験者を、頭を下にした体位（ＨＤ）か、または足を下にした体位（ＦＤ）で１５°に傾斜させ、仰臥位に戻し、その後、反対の方向に傾斜させた。

【０１６９】

血行動態（心拍数（ＨＲ）、心電図、平均動脈圧（ＭＡＰ、自動振動血圧計））を１５分毎に記録して、それぞれの時間に関して平均した。収縮終期左心室直径（ＬＡＤ）は傍胸骨長軸断面における経胸壁心エコー検査（ATL Ultrasound、Apogee社、CX100-150）で

測定した。ＬＡＤ測定は、それぞれの体位で１時間後に行い、３つの測定値の平均として取得した。血液化学およびホルモンの測定用血液の採取は、９：００から開始して毎時間に行った。

【０１７０】

ナトリウム負荷プロトコール：

１０人のボランティアに対して、仰臥位における１０時間の観測時間中に無作為に試験する（対照群）か、または１５ｍｌ＊ｋｇ$^{-1}$量の０．９％ＮａＣｌを、１０：００から１１：００までの６０分間、注入ポンプで静脈注入した（容量群）。試験は、別々の日に少なくとも２週間の間をおいて行った。

【０１７１】

両群において、血液化学およびホルモンの測定用血液の採取と、心エコーによるＬＡＤ測定とを、９：００、１０：００、１１：００、１２：００、１４：００、１６：００、および１８：００に行った。容量群では、８：００、１０：００、１１：００、１２：００、１４：００、１６：００、および１８：００に、自発的排尿による尿試料の採取を行った。血行動態は、１５分毎に測定し、それぞれの時間に関して平均した。

【０１７２】

分析：

ホルモン分析用の血液は、必要に応じて、５０００Ｕのアプロチニン（トラジロール、Ｂｅｙｅｒ社、独国）を含有するＥＤＴＡチューブ中と、リチウムヘパリンチューブ（臨床化学用）中とに採取した。血液および尿試料は、即座に４℃、３４００ｒｐｍで１０分間遠心し、上清を分析まで－８０℃で保存した。

【０１７３】

ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰの測定：

ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰは、Sundsfjord,J.A.、Thibault,G.ら(1988)、Idenfication and plasma concentrations of the N-terminal fragment of proatrial natriuretic factor in man、J Clin Endocrinol Metab 66:605～10の改変法による磁性固相技術を用いた競合的結合放射イムノアッセイで、同じウサギ抗ラットｐｒｏＡＮＰポリクローナル血清と、標準試料としてPeninsula Lab（Bacherm社、St. Helene、英国）からのヒトｐｒｏＡＮＰ（１～３０）と、放射標識用にＨＰＬＣで精製されたヨウ素化ｐｒｏＡＮＰ１～３０とを用いて測定した。高い感度と良好な精度とを実現するために、固相として、ヒツジ抗ウサギＩｇＧ（Dynal Biotech社、Oslo、ノルウェー）を備えたDynabeads M280を用い、また二次抗体を使用した。４２５、１１６３、および２４９０ｐｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$における分散係数は、それぞれ、７．５、３．７、および３．４％であった。検出限界は３０ｐｍｏｌ／ｌであった。

【０１７４】

ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの測定：

ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰは、Elecsys 2010を用いた電気化学発光イムノアッセイ（Elecsys proBNPサンドイッチイムノアッセイ、Roche Diagnostics社、Basel、スイス）で測定した（Mueller,T.、Gegenhuber,A.(2003)、Comparison of the Biomedica NT-proBNP enzyme immuno assay and the Roche NT-proBNP chemiluminescence immuno assay:implications for the prediction of symptomatic and asymptomatic structural heart disease、Clin. Chem. 49:976～9；実施例１も参照）。アッセイ内平均分散は４．３％であった（範囲：２．７～５．９％、濃度７．６～２７３２ｐｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$にある血漿試料のアッセイ、アッセイ間分散は３．２％）。検出下限は０．６ｐｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$であった。

【０１７５】

統計学的分析：

有意性はｐ＜０．０５に設定した。

【０１７６】

傾斜プロトコール：基線における分散に関して、ホルモンデータおよびＬＡＤデータを基線レベル（１００％に設定）に応じて正規化し、反復測定のＡＮＯＶＡ分析を行った。

ボンフェローニ補正は用いなかった。正規化した基線値との比較における個体内変動は、対応のあるスチューデントのｔ検定で分析した。

【０１７７】

ナトリウム負荷プロトコール：対照群と容量群との間の個体内変動は、フリードマンの検定と、それに続くウィルコクソン符号順位和検定とで分析した。測定値の数および試料サイズに関して、ボンフェローニ補正は用いなかった。観測時間中の個体内変動はウィルコクソン符号順位和検定で決定した。相関分析には、スピアマンの順位相関検定を用いた。

【０１７８】

傾斜プロトコールの結果：

血行動態：心拍数も動脈圧も観測時間中に有意な個体内変化または個体間変化を示さなかった（図１）。ＬＡＤにおける有意差は、第２の傾斜時間中に観測された（図１）。

【０１７９】

臨床化学：基線での血漿ナトリウム、カリウム、およびクレアチニンは、両傾斜群間で差はなかった（血漿ナトリウム：群Ｉ：１３８±２ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$、群ＩＩ：１３９±２ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$；血漿カリウム：群Ｉ：３．８±０．３ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$、群ＩＩ：３．６±０．２ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$；血漿クレアチニン：群Ｉ：７５±９μｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$、群ＩＩ：８１±８μｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$）。これらのパラメータにおける、いかなる有意な群間変動も観測時間中に観測されなかった。

【０１８０】

正規化されたレベルのＮＴ－ｐｒｏＡＮＰおよびＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの経過を図２に示した。加えて、リラキシン（ＲＬＸ）のレベルも示した。第２の傾斜時間におけるＮＴ－ｐｒｏＡＮＰレベルは、ＨＤ中の方がＦＤ中より高かった。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルは、時間の経過に従い、１５：００まで増加したが、両群間では差はなかった。血漿ＲＬＸレベルにおける、いかなる有意な個体間変動も観測されなかった。このホルモンの個体内経過は、両群で同様なものであり、基線と比較すると、１５：００に正規化されたＲＬＸレベルの最底部（ｓｅａｒｃｈ）を示し、および１５：００から１６：００までに増加を示して、基線レベルまで戻った。

【０１８１】

容積負荷プロトコールの結果：

血行動態：ＨＲおよびＭＡＰにおけるいかなる有意な群内および群間変動も観測されなかった（図３）。流体負荷の後の１１：００から１２：００までに、ＬＡＤの小さいが有意な増加が観測された。その後、ＬＡＤは減少して、基線レベルまで戻った（図３）。

【０１８２】

臨床化学：基線での血漿ナトリウム、カリウム、クレアチニン、およびヘマトクリットは、対照とナトリウム負荷プロトコールとの間で差はなかった（血漿ナトリウム：対照：１３９±２ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$、ナトリウム負荷：１４０±２ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$；血漿カリウム：対照：３．６±０．３ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$、ナトリウム負荷：３．４±０．７ｍｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$；血漿クレアチニン：対照：８０±１１μｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$、ナトリウム負荷：７６±９μｍｏｌ＊ｌ$^{-1}$；ヘマトクリット：対照：４０．７±２．０％、ナトリウム負荷：４０．１±１．８％）。血漿ホルモン値：ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、およびＲＬＸの血漿レベルを図４に示す。ナトリウム負荷群では、ナトリウム負荷直後にＮＴ－ｐｒｏＡＮＰが増加し、注入の２時間後にピークに達した。対照群でも中程度の増加が観測された。しかし、１２：００以降では、この群のＮＴ－ｐｒｏＡＮＰレベルは基線レベルと差がなかった。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰは、両群において、観測時間の最後まで遅延性の増加を示した。ナトリウム注入群におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルは、１３：００以降では対照群より有意に高かった。ＲＬＸレベルにおける、いかなる有意な変動も、群間変動も観測されなかった。

【０１８３】

腎機能パラメータ：尿流量（ＵＶ）および分画ナトリウム排泄率（FE_{Na}）は、８：

００から１０：００まで、中程度の増加を示した。ナトリウム注入後に、別のより顕著な増加が観測された（図５）。その後、ＵＶは増加して注入前のレベルまで戻ったが、FE_{Na}は、観測時間の最後まで高いままに維持された。クレアチニンクリアランスは観測時間中に変化しなかった（図５）。ホルモンの尿排泄：ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、ＲＬＸ、およびウロジラチン（ＵＲＯ）の尿排泄（$U_{NT-proBNP}$、U_{RLX}、およびU_{URO}）を図６に示す。ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰの測定は、少数の尿試料でのみ可能であった。したがって、このパラメータの計算は行わなかった。$U_{NT-proBNP}$およびU_{RLX}は、８：００から１０：００まで有意に増加し、さらに増加して１２：００にピークに達した。その後、尿中ホルモン排泄は減少したが、基線レベルより上まで増加した状態に維持された。U_{URO}も、$U_{NT-proBNP}$およびU_{RLX}と同様な経過を示したが、分散が大きかったこと、およびツール被験者におけるU_{URO}濃度が検出限界未満であったという事実により、このペプチドにおける注入後の経過は統計的な有意性に達しなかった。しかし、１４：００におけるU_{URO}レベルは、基線レベルより有意に高いものであった。

【０１８４】

相関分析：対照群とナトリウム負荷群との間の、基線における血漿ホルモンレベルの相関分析を測定値の信頼性を判定するために行ったところ、次に示す有意な相関関係が明らかにされた。すなわち、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ：ｒｈｏ　＝　０．９１；ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ：ｒｈｏ　＝　０．８２；ＲＬＸ：ｒｈｏ　＝　０．９１である。腎機能パラメータと、ホルモン血漿レベルおよびこれらのホルモンの尿排泄との間の相関分析を図７に示す。これらの分析により、一方をＮＴ－ｐｒｏＡＮＰおよびＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの血漿レベルとして、他方をFE_{Na}とする弱い相関関係が明らかになった。しかし、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、ＲＬＸ、およびＵＲＯの尿排泄と、ＵＶとの間、ならびにＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、およびＲＬＸと、FE_{Na}との間で、さらに良好な相関関係が観測された。

【実施例３】

【０１８５】

献血者におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの試験

合計１９８１人の献血者を独国マインツ大学（the University of Mainz）の輸血サービスから募集した。献血者の大部分が反復ドナーであったが、反復ドナーは年に１回の間隔で身体試験を受けている。この試験に基づいて、この試験に包含されたすべての献血者は臨床的に健康であるとみなされた。献血時に、クレアチニンレベルおよびヘモグロビンレベルを測定した。すべての測定は、献血前に行われた。この試験は、ヘルシンキ宣言（the Declaration of Helsinki）に従って実施され、地域の倫理委員会によって承認された。

【０１８６】

図８に示すように、個体のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値は、年齢および性別に対してプロットした。図７から明らかであるように、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル（中央値）は、男性より女性で高かった。異常値は、高齢個体（年齢が５０歳より上）でより高頻度に観測され、一方、若年個体（５０歳未満）では個体の測定値が集中した。９７．５百分位数に基づいて、年齢および性別に関連した参照値を計算したところ、それぞれ５０歳未満の年齢で、男性では８４．２ｐｇ／ｍｌ、および女性では１４６．２ｐｇ／ｍｌであることが判明した（図９）。

【０１８７】

図１０の表からわかるように、上記範囲外のすべての個体から、約１２カ月の間隔をおいて第２の試料を採取したところ、試料の大部分がそれぞれの参照範囲外に留まっていた。これは、これらの高い値が一定した試験結果であったことを示唆するものである。初期値が、記載の範囲外の個体の小集団が、第２の試料では、特定された参照範囲内にあるとみなされる値を有していた。

【０１８８】

ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値がヘモグロビンレベルに依存していないかどうかを評価するため

に、ヘモグロビン濃度を男性および女性で測定したところ、女性では、男性より平均して１．５ｇ／ｍｌ低濃度であることが判明した（図１０）。ヘモグロビンレベルは年齢に依存しなかった。

【０１８９】

同一ヘモグロビンレベルでおよび年齢別群でＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値を男性と女性との間で比較したところ、男性と女性の間では、依然としてＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの差があった。これは、男性と女性との間で見いだされているＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ濃度の差異が、ヘモグロビンレベルによって説明されないことを示唆するものである。また、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが事実上ヘモグロビンに依存しており、ヘモグロビン濃度の減少に伴ってＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが増加することも明らかになった（図１１）。

【０１９０】

個体の小集団で、クレアチニンレベルをＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルと比較した。試験した群では、試験したすべての個体のクレアチニンレベルが正常な範囲にあった。クレアチニンレベルは年齢と共に増加しなかったが、これと対照的に、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルは年齢と共に増加した（図１２）。これは、年齢の増加によるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの増加が、腎臓機能によって引き起こされるものではない可能性を示唆するものである。

【０１９１】

この試験は、明らかに健康な集団でＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの正常値および参照値を決定するために開始した。示したように、個体のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルは、年齢５０歳までクラスターを形成し、異常値はわずかであった。この試験結果は、心疾患、特に心血管疾患がこの年齢群ではまれであるという前提と一致するものである。したがって、年齢５０歳未満の個体で得られた値は、９７．５百分位数に基づいて、正常値とみなされた。これらの値が男性と女性との間で相違していることも判明した。また、ヘモグロビンレベルが低い個体は、より高いＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを有したので、ヘモグロビンレベルが実際にＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルに影響を与えることも示すことができた。同じヘモグロビンレベルで見た場合、男性と女性との間には、依然として差があった。したがって、ヘモグロビンレベルでは、両性間で見られたＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの差を説明できなかった。

【０１９２】

この試験は、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが、かなりの数の個体で、年齢５０歳未満の個体の９７．５百分位数を超えていることを示した。これらの異常値の数は年齢と共に増加した。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの測定は、実施例１に記載した通りに、Elecsys(登録商標)イムノアッセイによって行った。

【実施例４】

【０１９３】

心疾患の疑いで来診した患者におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの試験

１８人の心臓内科医に来診した合計４７３人の患者を、この試験に動員した。患者は病歴問診、身体検査、および心エコー検査を受け、心エコー試験では左心室駆出分画率が記録された。さらに、血液１０ｍｌを採取し、遠心し、分析するまで－２０℃で保存した。この試験に含まれた患者に関する人口統計学的変数の主要なものを、図１３に示す。この試験は、地域の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言（the Declaration of Helsinki）に従って実施された。

【０１９４】

すべての患者またはその大部分において、以下の試験を実施した。すなわち、クレアチニンレベル、ＴＳＨ、ＦＴ４、およびＮＴ－ｐｒｏＢＮＰである。これらの試験は、製造者（Roche Diagnostics社、Mannheim、独国）の教示に従って実施した。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰは、Elecsys(登録商標)2010測定器を用いた新規に開発されたイムノアッセイ（Roche Diagnostics社、Mannheim、独国）を用いて分析した（実施例１を参照）。

【０１９５】

有意性はウィルコクソンスコア法およびピアソンカイ二乗検定に基づいて計算し、ｐ－

値によって＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１として表した。誤差確率は５％を超えるべきではない。

【０１９６】

患者は、左心室駆出分画率（ＬＶＥＦ）に応じて、すなわち、３０％未満のＬＶＥＦ、３０～５０％のＬＶＥＦ、および５０％を越えるＬＶＥＦの３つの群に分割した。また、患者の等級付けも行い、ＮＹＨＡ分類に従って程度Ｉ～ＩＶに等級付けした。

【０１９７】

図１４に示すように、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルは、左心室駆出分画率のレベルと、症候とに基づいて記録した。男性では８４ｐｇ／ｍｌ、女性では１４６ｐｇ／ｍｌのカットオフを用いた場合、個体の大部分でＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが増加していた。このカットオフ値は正常な心臓機能と、異常な心臓機能とを区別するものである（実施例３を参照）。平均ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルは、ＮＹＨＡ分類で評価された症候レベル、およびエコーで測定された駆出分画率の減失レベルと共に増加した。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの左心室駆出分画率への依存は、男性および女性に関して、それぞれ図１５および図１６にもその概要を示す。図からわかるように、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル（中央値）は、駆出分画率が減少すると共に増加した。

【０１９８】

図１７に示されるように、心臓内科センターにおける試験に編成された個体のうちごく少数のみが、年齢５０歳未満の献血者の試験から導かれたカットオフ（実施例３を参照）に基づいた正常なＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを有した。正常なＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値は、無傷の左室分画を有しかつ無症候の個体に集中し、わずかな異常値が同定されたのみである。

【０１９９】

心電図（ＥＣＧ）が示すように、合計３２個体が心房細動を有し、一方、大多数の個体では心房細動の証跡が見られなかった。図１８からわかるように、心房細動群における中央値は非心房細動群より高かった。これらの患者群に関する人口統計学的変数の主要なものを示す。心房細動を有していなかった個体は、しばしば、心筋梗塞および狭心症の病歴を有していた。これらのデータは、心房細動がＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの上昇に対する独立した寄与因子を表すものであることを示す（Ｐ：０．０００２）。

【０２００】

合計７８個体が心筋梗塞（ＭＩ）の病歴を有し、一方大多数はＭＩの病歴を有しなかった。心筋梗塞の病歴をもつ個体は、ＭＩの病歴をもたない個体より高いＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを有した（図１９）。

【０２０１】

ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値は、狭心症の病歴をもたない個体より、狭心症の病歴をもつ個体でより高かった（図２０）。狭心症の病歴をもつ患者は、症候性であることはまれであり、より高頻度で心疾患に罹っており、より高頻度で心筋梗塞の病歴を有した（図１９）。

【０２０２】

４７０個体でクレアチニンを測定した。クレアチニンレベルが正常範囲にあったのは１５２個体のみであり、３１８個体が正常範囲の外であった。クレアチニンレベルが高い個体は、クレアチニンレベルが正常な個体より高いＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを有した。人口統計学的変数は、クレアチニンレベルが高い個体が、より高頻度で心筋梗塞の病歴を有したことを示唆している。これらのデータは、ＭＩ（ＡＭＩ）の病歴をもつ患者を評価から除外した場合、腎臓機能の障害がそれ自体でＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの上昇に寄与し得ることを示唆するものである（図２１）。

【０２０３】

３０６個体の小集団で甲状腺機能を測定した。これら患者を、ＴＳＨおよびＦＴ４レベルに基づいて、正常な甲状腺機能をもつ個体と、異常な甲状腺機能をもつ個体とに分類した。異常な甲状腺機能をもつ個体の大多数で、ＴＳＨレベルが上昇していたが、ＦＴ４レベルは正常であった。これは、低下した甲状腺機能が代償されていることを示唆するもの

である。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの中央値は、正常な甲状腺機能をもつ個体より、異常な甲状腺機能をもつ個体でより高かった。これは、甲状腺の機能不全が、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル上昇に対する寄与因子を表すものであることを示唆し、このＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル上昇は、おそらく、甲状腺機能の障害を介した心機能の障害に伴うものであると考えられる（図２２）。

【０２０４】

ここに示したデータは、献血者（実施例３）で得られたデータと比較した際、心臓内科医に来診する患者の大多数でＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが上昇していることを示唆する。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルは症候レベルおよび左心室駆出分画率の減失と共に増加した。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの上昇が、無症候の個体において、および駆出分画率に減失のない個体において記録されたという事実は、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰが、心臓内科医によって用いられている現在の標準手法より早期に、心臓合併症を認識することを示す。この試験において、クレアチニンレベルに基づくと、心臓合併症の証跡を有する患者の群において、しばしば腎臓機能が損傷していることが判明した。これは、同程度の年齢の集団において、正常レベルおよび有意に低下したクレアチニンレベルが見いだされた、献血者での試験と対照的である（実施例３を参照）。この試験は、腎臓機能および心臓合併症の両要素を考慮する必要があることを示唆し、また、これらのデータは、軽度から中程度の腎機能障害が、心臓合併症の診断および評価において、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値の解釈に影響を与えないことも示す。

【０２０５】

これらのデータは、甲状腺機能不全が心機能障害に関連し得ること、およびＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの上昇に寄与し得ることも示す。

【実施例５】

【０２０６】

急性敗血症事象を示す７６歳の女性患者が入院した（図２３）。疾患の過程において、患者は発熱し、抗体療法と共に大容積の注入を必要とした。それにもかかわらず、患者は敗血症ショックを発症し、彼女は注入治療を受けたが、血圧が下がった。疾患の過程において、ＣＲＰおよびＮＴ－ｐｒｏＢＮＰが徐々に増加したが、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰは、流体過負荷と進行性心不全の徴候として増加した。

【実施例６】

【０２０７】

ＩＩ型糖尿病の既知の病歴と、既知の冠状動脈性心臓病を有する７０歳の男性が、かかりつけの一般開業医に来診した。男性は、右ひざの領域における疼痛を訴えた。この疼痛は階段を登る際にとりわけ不快感を引き起こした。呼吸困難は心不全の明白な徴候であるが、来診時には呼吸困難は明らかではなかった。ひざのレントゲン試験を行った後、一般開業医は非ステロイド系抗リウマチ剤の投与を考慮した。初診の際に測定したＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値は１８００ｐｇ／ｍｌに達し、無症候の心臓合併症を示すものであった。心臓薬の同時投与と、詳細な臨床監視との下に、非ステロイド系抗リウマチ剤による治療を開始し、それに続いてＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの測定を行った。

【実施例７】

【０２０８】

他の疾患に関する有意な病歴がなく、手術可能な結腸癌腫を有する７６歳の女性患者が外科病室に入院した。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ値は１２００ｐｇ／ｍｌであった。結腸癌腫は手術によって除去された。続いて、腸機能の回復まで、非経口的栄養法が開始された。液体の必要量は１日あたり３０００ｍｌに達した。これに続く正の平衡化の間に平衡を慎重に保ちながら、平衡にある水分バランスを回復させるために、利尿剤による治療を開始した。

【実施例８】

【０２０９】

集中治療室の合計１２０人の患者を、標準的な規準に従って一定の間隔で診断した。Ｎ

Ｔ－ｐｒｏＢＮＰは遡及的に分析した。注入療法および／または利尿剤による治療の終止との関連において、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰの増加を合計５人の患者で観測し、それに続き心不全の臨床診断を行った。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの増加は、注入療法を開始する前にも観測されたが、これは心血管リスクを示すものである。

【０２１０】

患者００５：既知の冠状動脈性心臓病および肺炎を患っている４５歳の患者。４日目にＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが増加し始め、６日目に心不全が診断された。

【０２１１】

患者０２５：注入／輸液を受けている、入院まもない、心筋梗塞および貧血の後の状態にある６６歳の患者。１日目および２日目の間にＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが増加し始めた。３日目に肺浮腫が観測され、患者は利尿剤による治療を受けた。

【０２１２】

患者０４７：既知の狭心症、既知の冠状動脈性心臓病、および入院時における脱水症（脱水）を患っている７６歳の患者。脱水症は１日あたり約２リットルで治療した。ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰが継続的に増加し、入院後の５日目に心不全が診断された。

【０２１３】

患者０６６：既知の肝動脈三枝病変および確認済みの冠状動脈性心臓病を患い、高コレステロール血症、うつ病、および貧血に罹る６４歳の女性患者。１日目の後に悪化し、５日目まで利尿剤で治療した。その後、８日目までＮＴ－ｐｒｏＢＮＰが増加し、容量過負荷による心不全の反跳徴候として心不全が発症した。

【０２１４】

患者０８５：心不全を患い、その後利尿剤による治療を受け、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルの減少（高いスタートレベルにおける）を示す７８歳の患者。続いて、栄養（約２．５リットル／日）に関して注入治療を受けた。１２日目にＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが増加し、１８日目に心不全が診断された。

【図面の簡単な説明】

【０２１５】

【図１】傾斜操作を受けた１６人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。

【図２】ｎ＝８の２群で、連続傾斜操作を受けた１６人の健常ボランティアにおけるＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ（上側パネル）、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ（中央パネル）、およびリラキシン（ＲＬＸ）の血漿レベルの経過を示す図である。

【図３】対照群およびナトリウム負荷（血管内容量増加、Na^+）群における、１０人の健常ボランティアの血行動態データを示す図である。

【図４】対照プロトコール（円）中、およびナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコール（正方形）中の、１０人の健常ボランティアにおける、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ（上側パネル）、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ（中央パネル）、およびリラキシン（ＲＬＸ）の血漿レベルの経過を示す図である。

【図５】ナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコール中の、１０人の健常ボランティアにおける、尿流量（ＵＶ）、ナトリウム排泄率（FE_{Na}）、およびクレアチニンクリアランス（C_{Crea}）の経過を示す図である。

【図６】ナトリウム負荷（血管内容量増加）プロトコール中の、１０人の健常ボランティアにおける、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ尿排泄（$U_{NT-proBNP}$）、リラキシン尿排泄（U_{RLX}）、およびウロジラチン尿排泄（U_{URO}）の経過を示す図である。

【図７】観測時間中の健常ボランティアにおける、ＮＴ－ｐｒｏＡＮＰ、ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、およびリラキシンの血漿中濃度および尿中ホルモン排出と、尿流量およびナトリウム排泄率との間の相関分析を示す図である。

【図８】年齢１８～６５歳（１８～２９歳、３０～３９歳、４０～４９歳、５０～５９歳、６０～６５歳）の献血者（ｎ＝２９４８）におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル（中央値）の度数分布を示す図である。Ｍ，男性；Ｆ，女性。

【図９】献血者における、年齢群別および性特異的ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図で

ある。ｍ，男性；ｆ，女性。
【図１０】ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルが高いＮ＝４８の献血者の追跡試験（１２カ月）を示す図である。
【図１１】献血者におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルと、それらのヘモグロビンレベルに対する関係とを示す図である。ｍ，男性（菱形）；ｆ，女性（四角）；ｍ，男性（三角）。
【図１２】クレアチニンレベルに対する、献血者の年齢群特異的および性特異的ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベル（中央値）を示す図である。Ｎ，献血者数。
【図１３】心疾患の疑いで来診した患者の試験集団特性を示す図である。ｔ，合計；ｍ，男性；ｆ，女性。
【図１４】ＬＶＥＦおよびＮＹＨＡ分類に応じた、患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図１５】ＬＶＥＦに応じた、男性のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図１６】ＬＶＥＦに応じた、女性のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図１７】ＬＶＥＦの減失を有し、かつＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルがカットオフ（男性：８４ｐｇ／ｍｌ、女性：１５５ｐｇ／ｍｌ）より低い患者に関する図である。
【図１８】心房細動を示さない患者との比較における、心房細動を示す患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図１９】心筋梗塞の既往症（ＡＭＩ）がない患者との比較における、ＡＭＩ既往症がある患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２０】狭心症を有しない患者との比較における、狭心症を有する患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２１】クレアチニンがレベル高い患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２２】甲状腺機能不全を有する患者との比較における、正常な甲状腺機能を有する患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２３】敗血症性心筋梗塞およびそれに続く肺鬱血を有する患者のＮＴ－ｐｒｏＢＮＰおよびＢＮＰレベルを示す図である。
【図２４】実施例８の患者００５におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２５】実施例８の患者０２５におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２６】実施例８の患者０４７におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２７】実施例８の患者０６６におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。
【図２８】実施例８の患者０８５におけるＮＴ－ｐｒｏＢＮＰレベルを示す図である。

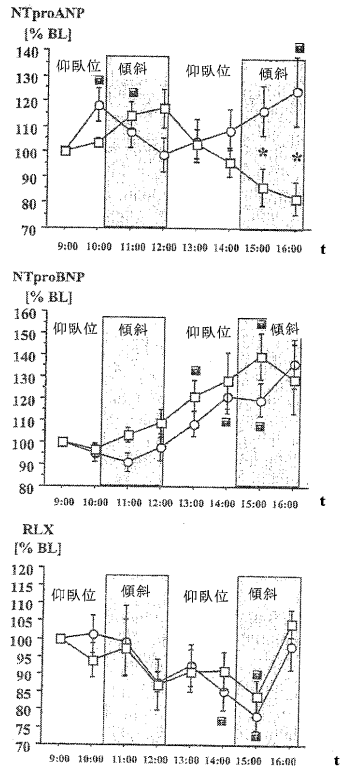
【図１】

群１（n=8）

配置		SUP	FD	SUP	HD	SUP	FD	SUP	HD
	T	10:00	12:00	14:00	16:00	10:00	12:00	14:00	16:00
SABP [mmHg]		121±7	121±7	126±7	125±6	113±11	112±11	116±13	117±10
DABP [mmHg]		63±6	65±5	65±6	67±5	61±9	60±11	63±12	65±9
MAP [mmHg]		83±6	86±5	85±7	88±6	79±7	78±8	80±9	82±8
HR [bpm]		65±5	63±5	63±6	62±3	68±12	67±8	67±8	72±10
LAD [%BL]		100	92±5	98±6	106±10*	100	112±16	98±8	88±4

群２（n=8）

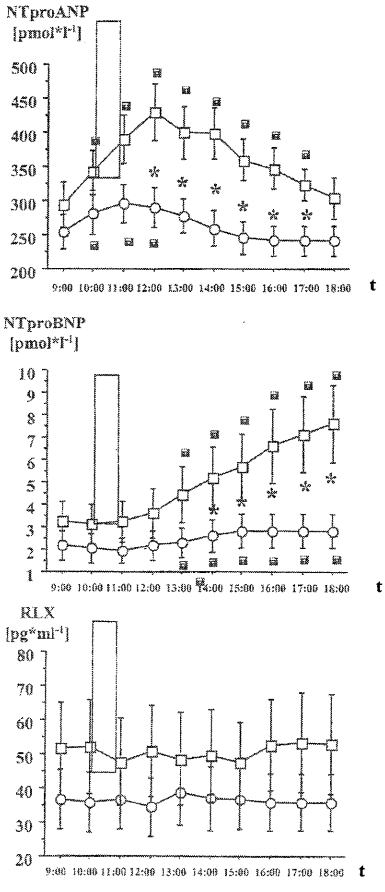
【図２】



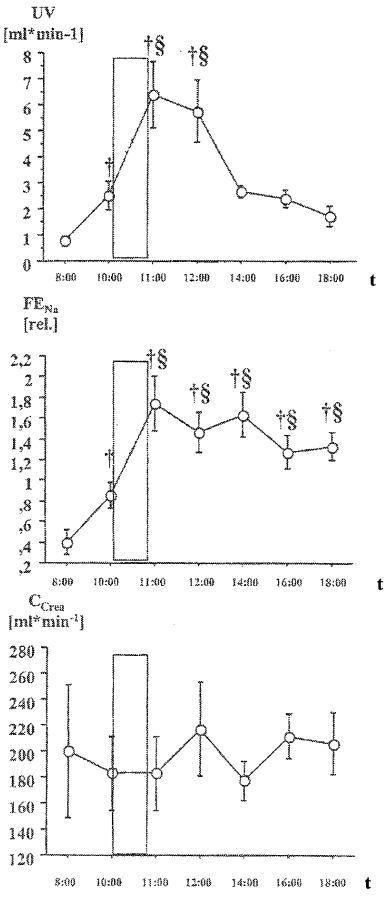
【図３】

T:	9:00	10:00	11:00	12:00	14:00	16:00	18:00
MAP [mmHg]							
対照	83±6	83±5	81±6	79±8	85±7	85±2	85±7
Na^+	83±5	83±7	80±6	82±3	80±6	80±6	86±4
HR [bpm]							
対照	67±10	64±8	68±8	63±8	66±7	68±11	60±22
Na^+	67±8	65±5	67±5	65±7	68±6	64±8	66±6
LAD [mm]							
Na^+	3.7±0.4	3.9±0.46	3.8±0.4	3.7±0.4	3.6±0.3	3.6±0.3	3.6±0.4

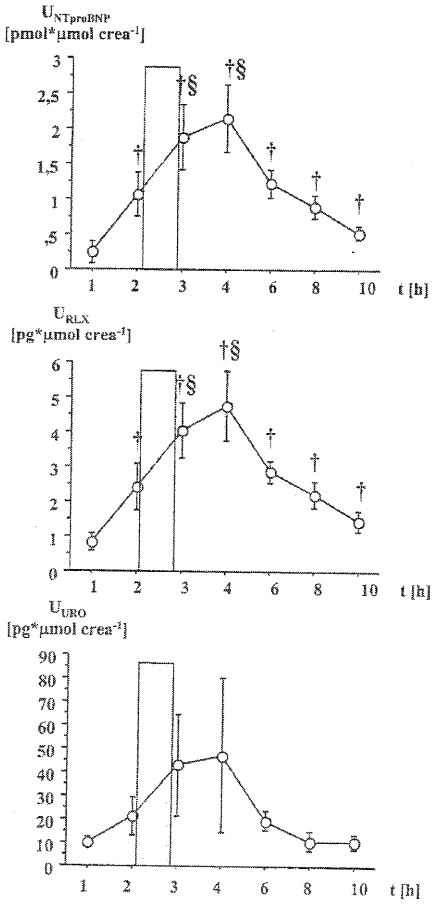
【図４】



【図５】



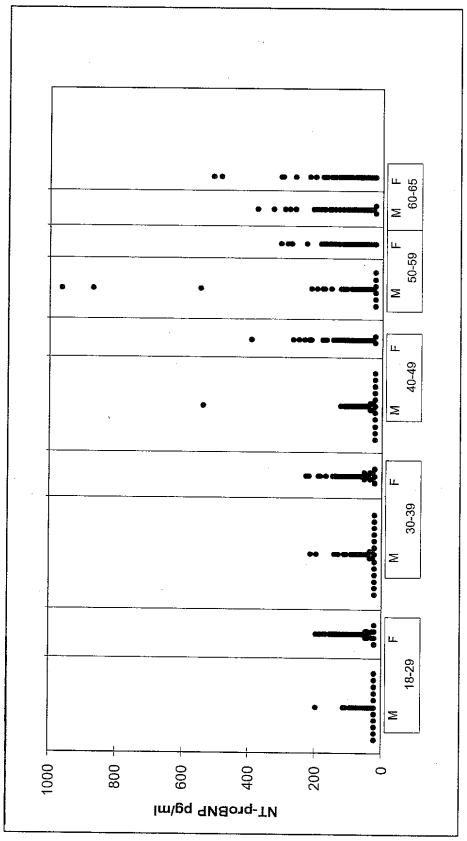
【図６】



【図７】

UV	血漿	0.34*	n.s.	n.s.	n.s.
	尿	n.s.	0.85*	0.80*	0.47*
FE$_{Na}$	血漿	0.42*	0.27*	n.s.	n.s.
	尿	n.s.	0.42*	0.5*	n.s.
		NTproANP	NTproBNP	RLX	URO

【図８】



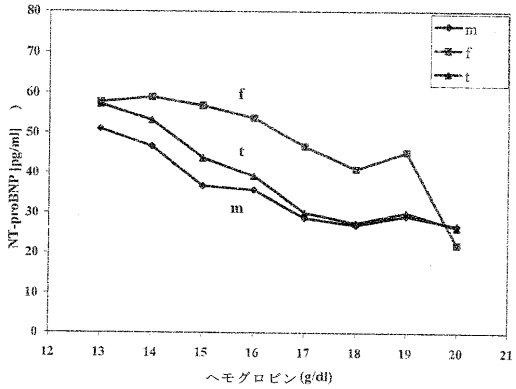
【図９】

年齢 (y)	18-49	18-49	18-29	18-29	30-39	30-39	40-49	40-49	50-59	50-59	> 60	> 60
性別	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
N	964	574	278	232	379	194	307	148	211	94	110	28
平均	20.0	39.3	20.0	37.0	20.0	36.9	20.0	49.8	27.4	65.8	42.0	61.4
97.5 % 百分位数	84.2	146.2	64.7	129.7	88.1	132.2	94.6	230.7	178.5	270.3	278.0	261.7

【図１０】

	NT-proBNP 正常範囲に戻る	NT-proBNP 高濃度の維持
男性数	7	14
女性数	7	20
合計数	14	34

【図１１】



【図１２】

年齢分布	N	クレアチニン [mg/dL] 中央値	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	N	クレアチニン [mg/dL] 中央値	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	N	クレアチニン [mg/dL] 中央値	NT-proBNP [pg/ml] 中央値
	合計			男性			女性		
合計	880	0,79	25,3	528	0,80	20,0	352	0,66	47,0
≤ 20	7	0,81	20,0	2	0,90	20,0	5	0,72	20,0
21-30	192	0,78	20,0	109	0,87	20,0	83	0,66	43,4
31-40	264	0,78	22,0	155	0,80	20,0	109	0,66	37,2
41-50	205	0,79	25,5	121	0,89	20,0	84	0,66	53,2
51-60	157	0,80	37,6	100	0,83	25,3	57	0,67	61,4
61-65	55	0,79	43,7	41	0,83	41,6	14	0,63	72,3

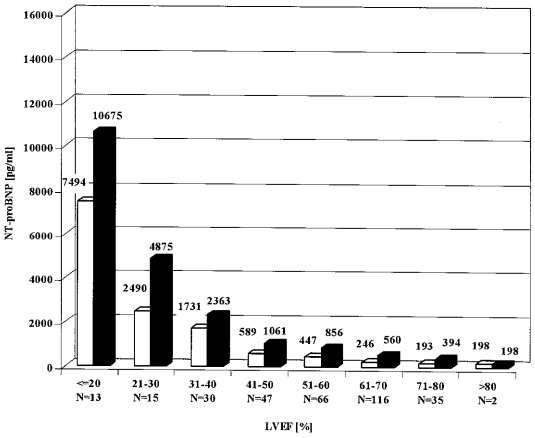
【図１３】

患者	合計	男性	女性
N	473	258	215
年齢 [中央値]	66,0	64,5	68,0
症候及び既往症	N	N	N
動脈性高血圧	280	144	136
血圧、収縮期	182	96	86
血圧、拡張期	78	34	44
呼吸困難	208	102	106
浮腫	45	20	25
不整脈	32	16	16
狭心症	122	64	58
AMI 既往歴	165	59	106
等級	N	N	N
NYHA I	308	176	132
NYHA II	112	52	60
NYHA III	50	27	23
NYHA IV	3	3	0
NYHA II-IV	165	82	83
LVEF < 30%	27	18	9
LVEF 30-50%	86	56	30
LVEF > 50%	360	184	176

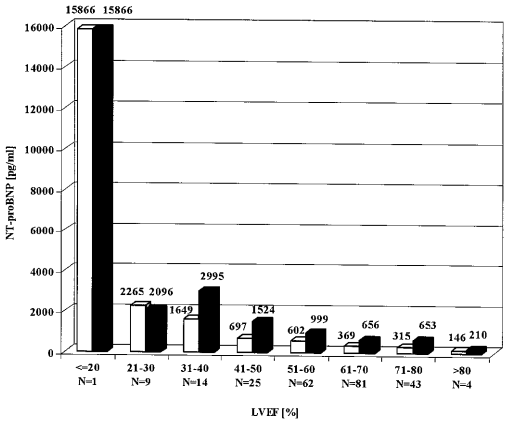
【図１４】

	LVEF	≤30%	30-50%	>50%
NYHA	合計数	27	86	361
I	N	2	27	280
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	2848,8	506,4	302,1
II	N	6	36	70
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	1896,5	862,5	488,5
III	N	16	23	11
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	2467,9	1946,3	698,4
IV	N	3	0	0
	NT-proBNP [pg/ml] 中央値	16223,2	0	0

【図１５】



【図１６】



【図１７】

	LVEF	≦30%		30-50%		>50%	
	合計数	27		86		361	
NYHA		男性	女性	男性	女性	男性	女性
I	N	0	0	2	0	29	11
II	N	0	0	0	3	1	5
III	N	0	0	0	0	0	0
IV	N	0	0	0	0	0	0

【図１８】

	心房細動		心房細動なし		p-値
合計数	32		442		
年齢 [中央値]	68,0		66,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	1055,0		401,7		0.0002 ***
	N	%	N	%	
NYHA I	22	68,8 %	287	64,9 %	>= 0.05
NYHA II	6	18,8 %	106	24,0 %	>= 0.05
NYHA III	4	12,5 %	46	10,4 %	>= 0.05
NYHA IV	0	0	3	0,7 %	>= 0.05
LVEF < 30%	0	0	27	6,1 %	>= 0.05
LVEF 30-50%	6	18,8 %	80	18,1 %	>= 0.05
LVEF > 50%	26	81,3 %	335	75,8 %	>= 0.05
動脈性高血圧	13	40,6 %	267	60,4 %	>= 0.05
血圧、収縮期	12	37,5 %	170	38,5 %	>= 0.05
血圧、拡張期	7	21,9 %	71	16,1 %	>= 0.05
呼吸困難	13	40,6 %	195	44,1 %	>= 0.05
浮腫	3	9,4 %	42	9,5 %	>= 0.05
狭心症	6	18,8 %	116	26,2 %	>= 0.05
AMI 既往症	0	0	78	17,6 %	0.0154*

【図１９】

	AMI		AMI なし		p-値
合計数	78		381		
年齢 [中央値]	67,5		66,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	797,0		370,8		0.0001 ***
	N	%	N	%	
NYHA I	33	42,3 %	266	69,8 %	0.001 **
NYHA II	31	39,7 %	79	20,7 %	0.001 **
NYHA III	14	17,9 %	33	8,7 %	0.001 **
NYHA IV	0	0	3	0,8 %	0.001 **
LVEF < 30%	7	9,0 %	19	5,0 %	0.001 **
LVEF 30-50%	37	47,4 %	47	12,3 %	0.001 **
LVEF > 50%	34	43,6 %	315	82,7 %	0.001 **
動脈性高血圧	45	57,7 %	234	61,4 %	>= 0.05
血圧、収縮期	21	26,9 %	154	40,4 %	>= 0.05
血圧、拡張期	4	5,1 %	72	18,9 %	>= 0.05
呼吸困難	51	65,4 %	156	40,9 %	0.0001* **
浮腫	10	12,8 %	35	9,2 %	>= 0.05
狭心症	32	41,0 %	89	23,4 %	0.0015**
不整脈	0	0	27	7,1 %	0.0154*

【図２０】

	狭心症		狭心症なし		p-値
N	122		335		
年齢 [中央値]	69,5		64,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	589,5		369,3		0.009 **
	N	%	N	%	
NYHA I	55	45.1 %	242	72.2 %	0.00001 ***
NYHA II	50	41.0 %	60	17.9 %	0.00001 ***
NYHA III	16	13.1 %	31	9.3 %	0.00001 ***
NYHA IV	1	0,8 %	2	0.6 %	0.00001 ***
LVEF < 30%	6	4.9 %	12	3.6 %	>=0.05
LVEF 30-50%	30	24.6 %	62	18.5 %	>=0.05
LVEF > 50%	86	70.5 %	261	77.9 %	>=0.05
動脈性高血圧	87	71,3 %	191	57,0 %	0.0056**
血圧、収縮期	45	36,9 %	129	38,5 %	>=0.05
血圧、拡張期	18	14,8 %	57	17,0 %	>=0.05
呼吸困難	81	66,4 %	125	37,3 %	0.001***
浮腫	20	16,4 %	25	7,5 %	0.0042**
AMI 既往症	32	26,2 %	46	13,7 %	0.0015**
不整脈	6	4,9 %	21	6,3 %	>=0.05

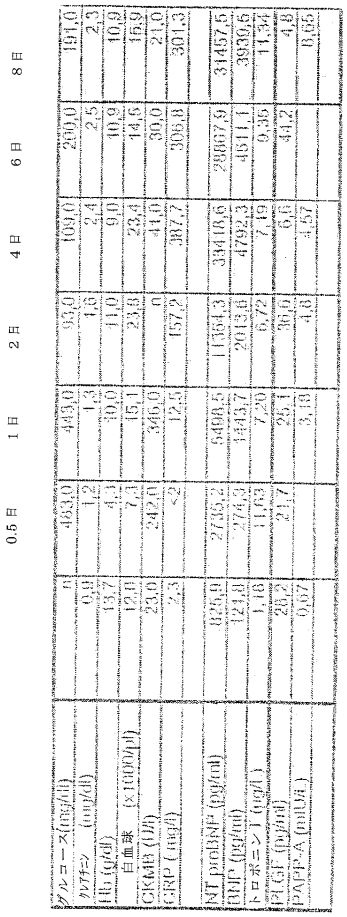
【図２１】

クレアチニン	正常		上昇		p-値
	0.66-1.1 mg/dl		> 1.1 mg/dl		
合計数	140		253		
年齢 [中央値]	66,0		65,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	289,7		456,5		0.0003 ***
	N	%	N	%	
NYHA I	99	70,7 %	176	69,6 %	>=0.05
NYHA II	31	22,1 %	49	19,4 %	>=0.05
NYHA III	10	7,1 %	25	9,9 %	>=0.05
NYHA IV	0	0	3	1,2 %	>=0.05
LVEF ≤ 30%	5	3,6 %	15	5,9 %	>=0.05
LVEF 30-50% + > 50 %	135	96,4 %	238	94,1 %	>=0.05
動脈性高血圧	92	65,7 %	141	55,7 %	>=0.05
血圧、収縮期	66	47,1 %	94	37,2 %	>=0.05
血圧、拡張期	32	22,9 %	41	16,2 %	>=0.05
呼吸困難	57	40,7 %	97	38,3 %	>=0.05
浮腫	16	11,4 %	19	7,5 %	>=0.05
狭心症	31	22,1 %	58	22,9 %	>=0.05
不整脈	8	5,7 %	24	9,5 %	>=0.05

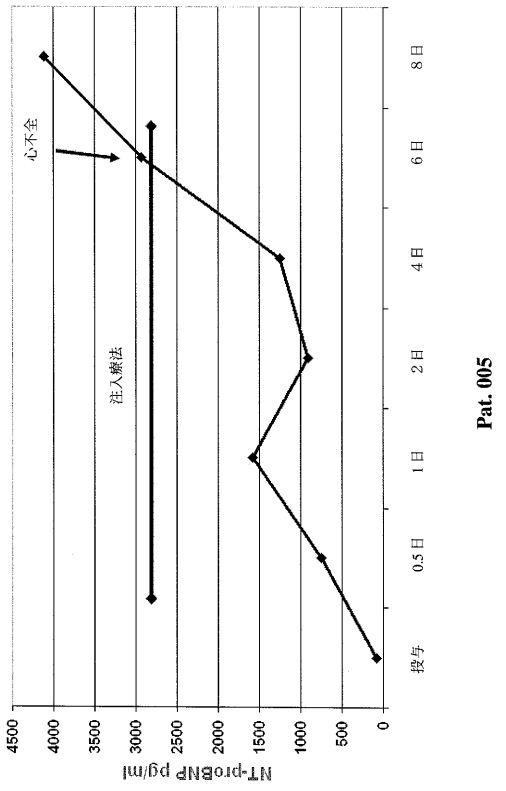
【図２２】

	甲状腺機能正常 (Euthyreose)		甲状腺機能異常		p-値
合計数	139		167		
年齢 [中央値]	66,0		66,0		
NT-proBNP [pg/ml] 中央値	397,2		555,5		0.048*
	N	%	N	%	
NYHA I	97	69,8 %	109	65,3 %	>=0.05
NYHA II	30	21,6 %	38	22,8 %	>=0.05
NYHA III	12	8,6 %	19	11,4 %	>=0.05
NYHA IV	0	0	1	0,6 %	>=0.05
LVEF < 30%	6	4,3 %	8	4,8 %	>=0.05
LVEF 30-50%	24	17,3 %	37	22,2 %	>=0.05
LVEF > 50%	109	78,4 %	122	73,1 %	>=0.05
動脈性高血圧	83	59,7 %	96	57,5 %	>=0.05
血圧、収縮期	54	38,8 %	53	31,7 %	>=0.05
血圧、拡張期	24	17,3 %	23	13,8 %	>=0.05
呼吸困難	53	38,1 %	76	45,5 %	>=0.05
浮腫	13	9,4 %	18	10,8 %	>=0.05
狭心症	37	26,6 %	41	24,6 %	>=0.05
AMI 既往症	22	15,8 %	29	17,4 %	>=0.05
不整脈	6	4,3 %	12	7,2 %	>=0.05

【図２３】

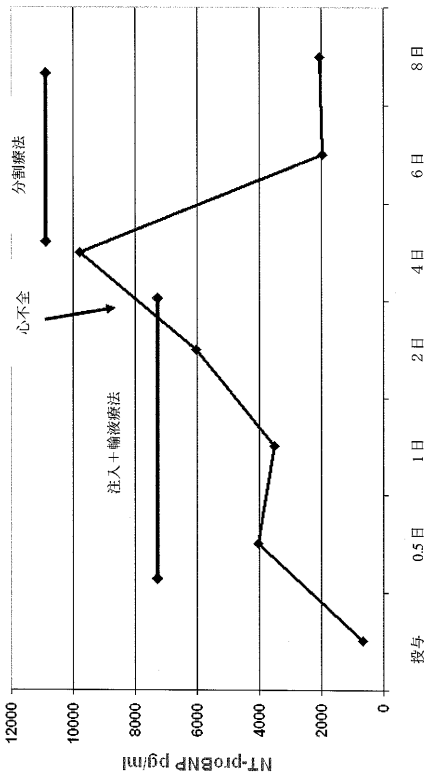


【図２４】



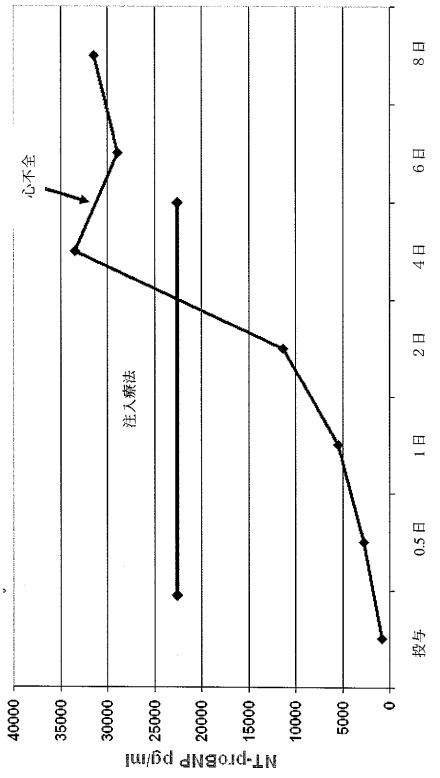
Pat. 005

【図２５】



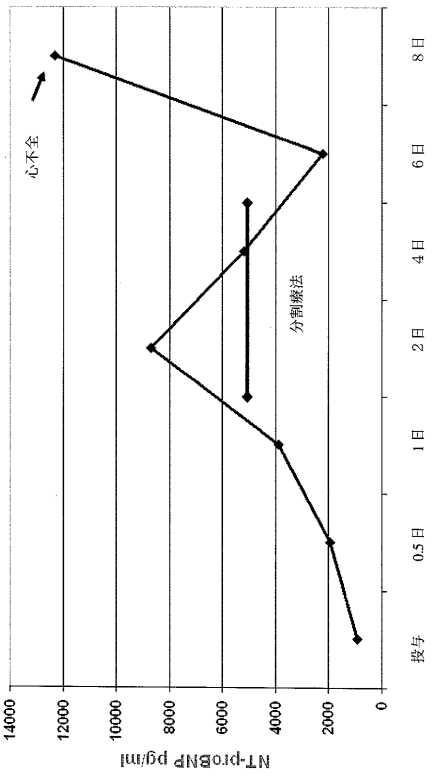
Pat. 025

【図２６】



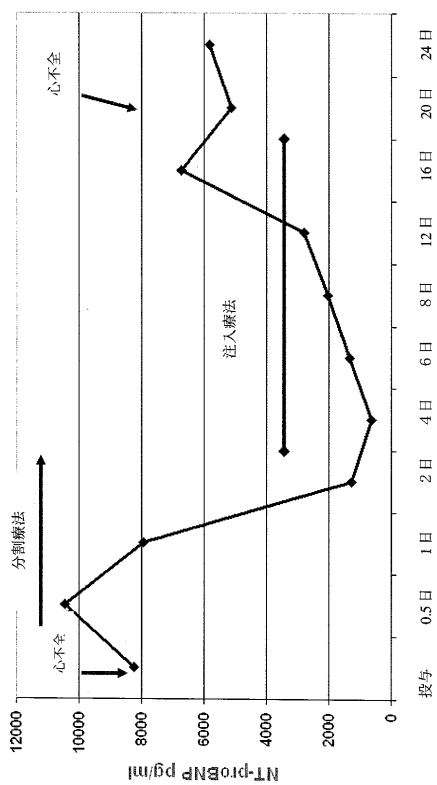
Pat. 047

【図２７】



Pat. 066

【図２８】



Pat. 085

フロントページの続き

(72)発明者　ゲオルグ　ヘス
ドイツ連邦共和国　５５１３０　マインツ，オッペンハイマー　シュトラーセ　８２
(72)発明者　アンドレア　ホルシュ
ドイツ連邦共和国　６８２５９　マンハイム，クリスティアンーモルゲンシュターン　シュトラーセ　１１

審査官　海野　佳子

(56)参考文献　特開２００４－０３７４５５（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／５３