

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-538282

(P2010-538282A)

(43) 公表日 平成22年12月9日(2010.12.9)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/53	D
<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/543	5 4 5 D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2010-523316 (P2010-523316)	(71) 出願人	503148096 ユニヴェルズイテート・ツューリヒ
(86) (22) 出願日	平成20年9月2日 (2008.9.2)		スイス国ツェーハー ー 8006 ツューリヒ, レミシュトラーセ 71
(85) 翻訳文提出日	平成22年2月26日 (2010.2.26)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/007158	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(87) 国際公開番号	W02009/030456	(74) 代理人	100142907 弁理士 本田 淳
(87) 国際公開日	平成21年3月12日 (2009.3.12)	(74) 代理人	100149641 弁理士 池上 美穂
(31) 優先権主張番号	07017539.3	(72) 発明者	グラーフ、ロルフ スイス国 CH-8051 チューリッヒ プロブシュタイシュトラーセ 148 最終頁に続く
(32) 優先日	平成19年9月7日 (2007.9.7)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 ヒト敗血症を測定する方法

(57) 【要約】

本発明は、外傷後のヒトにおける敗血症を予測する信頼できる方法に関し、腓石タンパク質 / 再生タンパク質 (P S P / r e g) の濃度を血清中で測定し、高濃度であることを敗血症の発症についての当該疾患の初期段階における指標とする。また、血清中の P S P / r e g 濃度の測定方法も記載されている。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトにおける全身性感染症の予測および/または診断の方法であって、腓石タンパク質/再生タンパク質 (PSP/reg) の濃度を体液試料中で測定し、高濃度であることを敗血症の発症の指標とする方法。

## 【請求項 2】

PSP/reg 濃度を血清中で測定する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

外傷後敗血症の発症の指標となる前記高濃度が 60 ng/mL である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

敗血症の発症の指標となる前記高濃度が、外傷から 3 日目、4 日目または 5 日目において 80 ng/mL である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

ELISA、RIA、EIA、質量分析またはマイクロアレイ分析により PSP/reg の濃度を測定する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

サンドイッチ ELISA により PSP/reg の濃度を測定し、マイクロタイタープレートを PSP/reg に対する一種類の抗体で被覆した後、該プレートをブロックし、試料または標準を入れ、PSP/reg に対する第 2 の種類の抗体を与えた後、適当な標識と結合した特定の種類の第 2 の抗体を検出する第 3 の抗体を加え、前記標識は PSP/reg の量を定量するのに用いられる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記サンドイッチ ELISA における標識は発色検出用の酵素である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載のヒトにおける全身性感染症の予測および/または診断用に PSP/reg を測定するための部品からなるキットであって、装置と試薬と PSP/reg の標準溶液とを含むキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の分野

本発明は、体液中の腓石タンパク質/再生タンパク質 (PSP/reg) の濃度に基づいてヒトにおける全身性感染症の予測および/または診断、特に敗血症の発症の予測のための方法、および測定キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

発明の背景

重症外傷に対する全身性の応答には、先天性免疫、炎症反応および細胞活動に影響する多くのパラメータが含まれる。重症外傷患者には、感染症のない良性的結果を示す者もいれば、感染症または敗血症に苦しむ者もいる。敗血症は複数の臓器不全を伴い、死亡率が高い。敗血症の診断のために最も広く用いられているマーカーとしては、白血球数、C 反応性タンパク質およびプロカルシトニンがある。後の 2 つは、外傷後に多く誘導されるが、機能はまだ知られていないタンパク質である。また、IL-6、IL-8 および IL-18 などのサイトカインも患者の観察に利用されている。しかしながら、上記のマーカーのいずれも、敗血症を含む感染症について予測する指標としては働かず、治療は敗血症が発症してからと遅れる。

## 【0003】

動物パイロット実験において、腓臓組織の損傷がない場合であっても、取り扱いのスト

10

20

30

40

50

レスで膵タンパク質が誘導されることがわかっている（非特許文献1）。このタンパク質、膵石タンパク質/再生タンパク質（PSP/reg）は、レクチン結合タンパク質のファミリーに属する。急性または慢性の膵炎の状態において、このタンパク質は高度にアップレギュレートされて血清中に現れることもある。このタンパク質の調節は他の酵素前駆体のように単に食誘導性分泌には限定されないもので、他の状態、たとえば膵炎の間に上昇が見られることもある。したがって、現在までこのタンパク質の研究は主に膵臓内について行われてきた。このタンパク質は小腸のパネート（PANETH）細胞および胃底細胞中でも合成されている。PSP/regの機能については、いまだに論争が盛んに行われているが、一般には再生過程における細胞増殖の促進に関与していると思われる（非特許文献2）。

10

## 【0004】

PSP/regを疾病マーカーとして確立するための努力が行われてきている。血清濃度は様々な胃腸疾患において上昇するために、血清値と特定の疾病の存在との相関性を確立することはこれまでのところできていない（非特許文献3）。

## 【0005】

発明の概要

本発明は、ヒトにおける全身性感染症の予測および/または診断、特に敗血症の発症の予測のための方法に関し、膵石タンパク質/再生タンパク質（PSP/reg）の濃度を体液試料中で測定し、高濃度であることを敗血症の発症についての当該疾患の初期における指標とする。また、本発明は、体液中のPSP/reg濃度を測定する方法、およびそのような方法のための部品からなるキットに関する。

20

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】アール グラフ（R. Graf）ら、J SurgRes、2002年、195巻、136～144頁

【非特許文献2】ワイ キノシタ（Y. Kinoshita）ら、J. Gastroenterol、2004年、39巻、507～513頁

【非特許文献3】ワイ サトムラ（Y. Satomura）ら、J Gastroenterol、1995年、30巻、643～650頁

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0007】

【図1】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のC反応性タンパク質（CRP）値の測定。次のように遡及的（retrospectively）に患者を分類した。感染症なし（白抜きボックス、 $n = 14$ ）、感染症を伴った患者（斜線ボックス、 $n = 22$ ）、敗血症を伴った患者（黒ボックス、 $n = 27$ ）。3つの群のCRP値（ $\log_{10} \text{ng/mL}$ ）を平均および95%信頼区間とともにボックスプロットとしてプロットしている。d = 外傷後の日数。統計分析は、多変量解析を用いて行った。p = 有意性、\* = 非感染に対する敗血症のp値。

【図2】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のIL-6値の測定。患者の分類と、ボックスプロットにおけるIL-6値（ $\log_{10} \text{pg/mL}$ ）の表示は、図1のCRP値についてと同様である。

40

【図3】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のプロカルシトニン（PCT）値の測定。患者の分類と、ボックスプロットにおけるPCT値（ $\log_{10} \text{ng/mL}$ ）の表示は、図1のCRP値についてと同様である。

【図4】膵石タンパク質/再生タンパク質（PSP）の測定。0日における外傷後のPSP/regの時間的プロファイル。すべての値は各時点で合わせたものである。C (= 対照) は、健常な被験者についての値を示し、dは外傷後の日数である。

【図5A】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のPSP/reg値の測定。患者の分類と、白抜きボックス、斜線ボックスおよび黒ボックスの意味は、図1のCRP値につい

50

てと同様である。3つの群のPSP/reg値(ng/mL)を平均±SEMとしてプロットしている。d = 外傷後の日数。

【図5B】重症外傷を負った患者の入院後の血清中のPSP/reg値の測定。患者の分類と、ボックスプロットにおけるPSP/reg値(ng/mL)の表示は、図1のCRP値についてと同様である。p = 有意性、\* = 非感染に対する敗血症のp値。

【発明を実施するための形態】

【0008】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、ヒトにおける全身性感染症の予測および/または診断、特に敗血症の発症の予測のための方法に関し、腓石タンパク質/再生タンパク質(PSP/reg)の濃度を体液試料、たとえば血清中で測定し、高濃度であることを敗血症の発症についての当該疾患の初期における指標とする。

10

【0009】

PSP/reg濃度を測定するのに有用な血清以外の体液は、たとえば、全血、尿、唾液、脳脊髄液、涙液、汗、乳、または固体組織または糞便からの抽出物である。ついでに指標となるPSP/reg濃度は、測定のために選ばれた体液に依存する。血清に関して、この濃度は3日目、4日目または5日目において60~80ng/mLである。したがって、より詳細には本発明は、敗血症の発症の予測および/または診断の方法に関し、腓石タンパク質/再生タンパク質(PSP/reg)の濃度を血清中で測定し、3日目、4日目または5日目に60ng/mL以上の濃度、特に80ng/mL以上の濃度であることを敗血症の発症の指標とする。

20

【0010】

体液中のPSP/regの濃度を測定するためには任意の既知の方法を用いることができる。考えられる方法としては、たとえば、ELISA、RIA、EIA、質量分析、またはマイクロアレイ分析がある。こうした方法は、たとえば敗血症などの全身性感染症の診断に用いられる場合、本発明のさらなる目的である。

【0011】

ヒト体液、たとえば血清中のPSP/regの測定のための好ましい方法は、ELISAである。本発明の一実施形態において、PSP/regELISAは、サンドイッチアレイからなる。従来のマイクロタイタープレートにPSP/regに対する一種類の抗体(「第1」の抗体)、たとえばモルモットポリクローナル抗体で被覆する。その後、このプレートをブロック(block)、試料または標準を入れる。インキュベーションの後、PSP/regに対する異なる種類の抗体(「第2」の抗体)、たとえばポリクローナルウサギ抗体を与える。その後、特定の種類の「第2」の抗体を検出する第3の抗体、たとえば、発色検出用の酵素などの適当な標識と結合した抗ウサギ抗体を加える。最後に、PSP/regの有無および量の尺度となる標識の検出および定量のために、このプレートを標識についての基質で展開(develop)する。標識が発色検出用の酵素の場合、基質は共役酵素の発色性基質である。そしてこの色反応をマイクロプレートリーダにおいて検出し、標準と比較する。

30

当な抗体のペア(「第1」および「第2」の抗体)は、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ニワトリ、ロバ、またはウマの組み合わせである。ポリクローナル抗体が好ましいが、モノクローナル抗体または抗体断片を用いることもできる。適当な標識は、発色標識、すなわち検出可能な着色または蛍光化合物に基質を変化させるのに用いる酵素、分光学的標識、たとえば蛍光標識または可視色を呈する標識、標識に特異的なさらなる化合物によって形成可能であって容易な検出および定量を可能にするアフィニティ標識、または標準的なELISAにおいて使用される他の標識である。

40

【0012】

PSP/reg検出の他の好ましい方法は、単一の抗体を用いた放射免疫測定または競合免疫測定、および市販の自動分析ロボットでの化学発光検出である。微粒子増強蛍光、蛍光偏光法、または質量分析を用いてもよい。検出装置、たとえばマイクロアレイは、P

50

SP/regの読み取り装置として有用な部品である。

【0013】

本発明はさらに、全身性感染症の診断/予測用にPSP/regを測定するための部品からなるキットに関し、たとえば、装置と、試薬と、PSP/regの標準溶液とを含む。考えられる装置としては、たとえば、ELISA用マイクロタイタープレート、プレコートされたELISAプレート、およびプレートカバーが挙げられる。試薬は、PSP/regの検出のために特別に開発および設計された試薬である。PSP/regの標準溶液は、好ましくは、以下の説明に従って合成されるPSP/regを含む。部品からなるキットは、ピペットなどのさらなるハードウェア、バッファやブロッキング溶液などの溶液、フィルタ、カラーテーブル、および使用説明書を含んでいてもよい。

臓mRNAからクローニングし、酵母発現ベクターにサブクローニングすることができる。タンパク質はADHの制御下で発現させることができる。適当な発現培地は、PSP/regの分泌を誘導および維持するためにメタノールを含んでいてもよい。PSP/regは好ましくは、pHおよび塩勾配によりSP-セファロス-セルロースを用いて精製される。このような精製PSP/regは、体液中のPSP/reg濃度と比較するための標準溶液を調製するのに用いられる。このタンパク質に対するポリクローナル抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリ、ロバ、ウマおよびモルモットまたは他の適当な動物から標準的な方法を用いて得ることができる。

【0014】

敗血症の発症初期の段階において血清中のPSP/regが増加する理由は、完全には分かっていない。ラットのパイロット実験において、脾臓の損傷がない場合にPSP/reg合成の増加が観察され、他の臓器への有意な外傷性損傷がPSP/regの血中濃度の増加に繋がるということが明白となった。さらなる研究のために、重症外傷を負っているが明らかな脾臓損傷の無いヒト患者の組を選んだ(実施例を参照)。血清中へのPSP/regの出現は、脾液からのタンパク質を血液中へそらす経路変更を意味するものであろう。また、レクチン結合ファミリー(たとえば、脾炎関連タンパク質)の一部がサイトカインによって誘導可能であることも分かっている。外傷後にはサイトカインが強力にかつ協調して作用する。多くの異なるサイトカインが放出されるサイトカイン応答の複雑性は理解されていない。したがって、PSP/regは、全身性のストレスまたは外傷の状況下で上昇するサイトカインに対して反応すると思われる。これに対し、たとえばアミラーゼやリパーゼなどの他の脾酵素はサイトカインによって調節されならしく、それらの血液中への出現は迂回のみによるものである。血清中のPSP/reg濃度は、敗血症の信頼できる指標であることがここで示されている。血中のPSP/regの増加は、特異的なストレス応答を意味するのであろう。

【0015】

炎症の他の指標とは違ってPSP/regの濃度は、敗血症の臨床徴候が明白となる間または前に患者において高度に増加することが分かっている。血清PSP/regの検出および定量は、たとえば、100pg/mL未満の検出限界を有するサンドイッチELISAによって行われる。正常な血清値は5~15ng/mLである。重症外傷を負った患者は、その外傷の原因となった事故の7~10日後に敗血症を発症する。血清値は、敗血症の重症度と相関する。それは200ng/mLを超えることもある。PSP/reg値は、敗血症の臨床徴候が得られる以前に3日目から5日目に増加し始め、60~80ng/mLを超える値に達する。これらの値は、患者が敗血症を発症するかどうか、したがって高額な抗生物質による治療や集中治療室に滞在することを含む集中治療の必要性の予測を可能にする。市販の診断的測定と比べて、PSP/regELISAは、推定敗血症患者をモニタするのに著しく優れている。

【0016】

実施例

PSP/regの単離とサブクローニング

PSP/regに特異的な抗体の生産のためのcDNAを得るべく、最先端の実験手法

10

20

30

40

50

を用いて、豚臓 mRNA の逆転写によりそのような cDNA を調製する。PSP/reg をコードする配列に特異的なプライマーを用いて、PSP/reg の cDNA を選択的に増幅させる PCR 反応を行う。伸長プライマーを用いてこの PCR 反応を繰り返し、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) トランスフェクションベクターへの挿入に特異的な配列を付加する。プライマーは、アルファ接合因子のシグナルペプチドのコーディング領域を、KEX2 部位および成熟ヒト PSP/reg のコーディング領域に融合させるように設計される。ピキア・パストリスベクターへのサブクロニングは 2 段階法である。まず、PCR 産物を pCR2.1 ベクター (インビトロジェン (Invitrogen)、TA クロニング) にライゲーションし、配列を確認する。次に、この PCR 産物を XhoI/NotI の制限消化により切断し、トランスファーベクター pPIC9 (インビトロジェン) にライゲーションする。ピキア・パストリス KM71 株 (インビトロジェン) を形質転換し、組み換えタンパク質の拡張および生産のために最も生産的なクローンを選択する。

10

## 【0017】

PCR 増幅およびサブクロニングに用いたプライマー

ヒト PSP/reg/reg1 アルファ

順方向プライマー

5' G A A A A G A C A A G A G G C C C A G A C A G A G T T 3' (配列番号 1)

5' G T A T C T C T C G A G A A A A G A C A A G A G G C C C A G A 3' (伸長)

(配列番号 2)

逆方向

5' C T A G T T T T T G A A C T T G C A T A C 3' (配列番号 3)

ヒト PSP/reg/reg1 ベータ

順方向プライマー

5' G A A A A G A C A G G A G T C C C A G A C A G A G C T G 3' (配列番号 4)

5' G T A T C T C T C G A G A A A A G A C A G G A G T C C C A G A C 3' (伸長)

(配列番号 5)

逆方向プライマー

5' A T C T G C A G T C T A G A A T T C T G C A G G A C C A G T T C T A G A C 3' (配列番号 6)

タンパク質の大量発現

単一のコロニーを用い、250 mL のバッフル付きフラスコ中の 25 mL の BMG (緩衝化最小グリセロール、100 mM リン酸カリウム pH 6.0、1.34% 酵母窒素塩基、 $4 \times 10^{-5}$ % ビオチン、1% グリセロール) に植え付け、29 の振盪培養器 (300 rpm) 中で一晚培養する。この培養液の 10 mL を、3 リットルバッフル付きフラスコ中の 1 リットルの BMG に接種し、29 にて一晚培養 (300 rpm) する。室温で 5 分間、1500 ~ 3000 x g の遠心分離により細胞を回収する。同じバッフル付きフラスコ中の 1/5 容積 (200 mL) の BMM (緩衝化最小メタノール、グリセロールが 0.5% メタノールに置換された BMG) に細胞を再懸濁することにより、発現を誘導する。誘導の最適時間に達するまでの 24 時間毎に 100% メタノールを加え、0.5% (1 mL) の濃度を得る。室温で 1500 ~ 3000 x g の遠心分離により細胞を回収する。培地の上清を回収し、ペプチドの精製まで冷凍しておく。

30

40

## 【0018】

ポリペプチドを培地の上清から精製する。培地の上清を蒸留水で 1:3 に希釈する。pH は HCl を用いて pH 3.5 に調整する。培地の上清を SP-セファロースカラムにアプライし、塩および pH 勾配 (10 mM LiCl、50 mM MES、pH 5.3 開始バッファ、2 M LiCl、50 mM MES、pH 6.3 終了バッファ) によって溶出する。画分を回収し、SDS ゲル電気泳動によって分析する。最も高く純度も大きいタンパク質含量を有する画分を合わせ、10 mM HEPES、pH 7.5 に対して透析する。ポリペプチドの配列を N 末端配列決定法により確認し、アミノ酸分析によって濃度を判定する。

50

## 【0019】

## PSP/regELISA

トータルのPSP/regの測定には、組み換えヒトPSP/regに対して産生されたモルモット抗血清および同じタンパク質に対するウサギ抗血清に基づいたサンドイッチELISAを用いてもよい。ウサギ抗体の特異性および感受性を高めるために、プロテインAビーズ(ハイトラップ(HiTrap)(登録商標)、ファルマシア(Pharmacia))のカラム上への吸着によってIgGを精製する。ハイトラップ(登録商標)カラムは、pH7の200mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ によって平衡化する。同じバッファ溶液(最終濃度20mM)を用いてウサギ抗血清をpH調整してから、それをカラムに入れ、その後、100mMおよび10mMのTris/HCl pH8で連続して洗浄する。IgG画分を0.1Mのクエン酸 pH3で溶出する。溶出画分は、1MのTris/HCl pH8.9ですぐに中和させる。

10

## 【0020】

TBS(100 $\mu\text{L}$ /ウェル)に1:500で希釈したモルモット抗ラットPSP/reg IgG画分で、96ウェルのマイクロタイタープレート(コスター(Costar)EIAプレート、平底、高結合性)を一晩の間、4 $\times$ で被覆する。洗浄工程の後、プレートを150 $\mu\text{L}$ の1%BSA/TBSで1時間ブロックし、その後、異なる標準濃度の組み換えヒトPSP/reg(0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.5、3.5または5.0ng/mL)100 $\mu\text{L}$ または希釈した試料100 $\mu\text{L}$ で置き換える。試料および標準を2サンプルずつ充填し、室温で1時間インキュベートする。繰り返し洗浄した後、1:500に希釈した100 $\mu\text{L}$ のウサギ抗ラットPSP/reg IgGでプレートを1時間インキュベートする。もう一度洗浄してから、100 $\mu\text{L}$ の市販のマウスモノクローナル抗ウサギIgG抗体による30分間のインキュベートを開始する(マウス抗ウサギアルカリホスファターゼ共役のIgG画分、1:1000希釈、シグマ(Sigma)より購入)。次にプレートをもう一度洗浄し、アルカリホスファターゼバッファ(100mM Tris/HCl、pH9.5、100mM NaCl、0.8mM  $\text{MgCl}_2$ )に加えた可溶性ホスファターゼ基質、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(シグマ104(登録商標)錠剤)を加える。約20分間のインキュベーションの後、405nmにおける光学密度(OD)をMRXマイクロプレートリーダー(ダイナテックラボラトリーズ(Dynatech Laboratories))において測定する。

20

30

## 【0021】

すべての希釈物(コーティング抗体以外)は1%のBSA/TBS中で調製する。室温でのすべてのインキュベーションは、回転式ELISAプレート振盪機(タイトラマックス(Titramax)100、ハイドルフ(Heidolph)、バイオブロックサイエンティフィック(Bioblock Scientific))上で行う。すべての洗浄工程は、自動マイクロタイタープレート洗浄機(MRW、ダイナテックラボラトリーズ)を用いてTBS/Tween20(0.05%、v/v)によって行う。健全なボランティアに由来する希釈した血清への組み換えPSP/regの収率は以下の通りである。1:10の希釈では71%、1:20の希釈では18%、1:40の希釈では95%。プレート内およびプレート間での差異は、標準の範囲内の濃度(0.1~3.5ng/mL)でそれぞれ5%未満および10%未満である。

40

## 【0022】

試験は、組み換えヒトPSP/reg1アルファを用いて行う。同じ技術を用いて、第2のアイソフォームである組み換えPSP/reg1ベータを作製した。PSP/reg1ベータは、ELISAによって同様によく認識される。したがって、ELISAは、既知のPSP/regファミリーのタンパク質に対して特異的である。

## 【0023】

原理を証明するための試験患者

調査する集団には、2002年1月から2003年9月の期間にチューリッヒ大学病院の外傷外科(レベルI外傷センター)に入院してきた63人の負傷患者が含まれる。包含

50

する基準は、外傷重症度スコア (ISS) が 16 点を超えること、患者年齢が 15 歳を超えること、事故から入院までが 4 時間未満であること、集中治療室 (ICU) での監視下で 5 日を超えて生存したこととした。脾臓の損傷を有する患者は除外した。外傷二次救命処置 (ATLS) ガイドラインおよび標準外傷プロトコールに従ってすべての患者を治療した。簡単に説明すると、気道の確保、通気、および心血管機能のモニタリングの後、胸腔の減圧、出血および汚染の管理を含む救命処置を行った。続いて、根治的創面切除、コンパートメントの減圧、および殆どは外固定 (「初日手術」) による大きな骨折の一次安定化を行った。その後、臓器機能の回復のために患者を ICU に移した。注目すべきは、正常な腸内細菌叢および腸粘膜を維持するために、すべての患者が外傷後 24 時間以内に経腸栄養摂取を受けたことである。陽性の細菌培養物によって感染病巣が確認された場合には、抗生物質を用いた。さらに、開放骨折に対しては、標準的な抗生物質を 5 日間与え、骨折の骨接合術に対する予防としてセファロスポリンを単発で与えた。

10

## 【0024】

表 1 は、入院日における人口学的データおよび外傷スコアをまとめたものである。外傷の重症度と性別分布は非常に類似していた。

## 【0025】

## 【表 1】

対象患者の人口学的データ

パラメータ	非感染	感染症	敗血症
数	14	22	27
年齢(歳)	38.6±16.9	36.6±15.5	37.3±16.0
男性	11(78.6%)	15(68.2%)	22(81.5%)
ISS <sup>a</sup> (点)	34.6±9.3	32.2±13.9	38.7±15.6
GCS <sup>b</sup> (点)	8.9±5.2	9.2±4.9	8.8±5.1
APACHE II <sup>c</sup> (点)	15.0±6.2	13.6±6.6	17.0±6.8
ICU <sup>d</sup> (日)	9.1±5.9	16.3±8.2	26.6±9.9

20

平均±標準偏差。括弧内の数値は百分率。

<sup>a</sup>ISS: 外傷重症度スコア

<sup>b</sup>GCS: グラスゴー昏睡スケール

<sup>c</sup>APACHE II: 急性生理学および慢性健康評価II

<sup>d</sup>ICU: 集中治療室

30

## 外傷患者の血液状態

a) 非感染、b) 感染症、および c) 敗血症のスコアに基づいて遡及的に患者を 3 つの群に割り振る (表 2)。炎症および外傷の程度を判定するために用いたいくつかのパラメータの経過を明らかにするために、血液白血球数および C 反応性タンパク質を測定した。重症度の群に関係なく、すべての患者が入院 1 日目に血液白血球の強い減少を示した。白血球は、10 日目で  $1.8 \times 10^6 / L$  という有意に高い白血球数に達する敗血症患者を除いては、徐々に正常にまで増加する。C 反応性タンパク質 (CRP) の同時測定によって、すべての群において、入院時の低い濃度から 3 日目の約  $150 \text{ ng/mL}$  にまで徐々に増加することがわかった (図 1)。非感染群は他の群に比べて一貫して低い濃度を有するが、3 つの患者群を区別する明白なパターンはない。このように 5 日目と 7 日目の間、および 14 日目と 21 日目の間で、敗血症の患者は敗血症でない患者と比べて高い CRP を示すが、その違いは 2 倍未満である。

40

## 【0026】

【表 2】

対象患者の外傷パターンおよび外傷後の経過

パラメータ	非感染 (n=14)	感染症 (n=22)	敗血症 (n=27)
頭部(AIS <sup>a</sup> 、点)	85.7%(3.4)	86.4%(3.7)	70.4%(4.1)
胸部(AIS <sup>a</sup> 、点)	78.6%(3.0)	36.4%(3.3)	63.0%(3.5)
腹部(AIS <sup>a</sup> 、点)	50.0%(3.7)	36.4%(3.8)	44.4%(4.1)
四肢(AIS <sup>a</sup> 、点)	57.1%(3.0)	68.2%(2.3)	63.0%(2.5)
骨盤(AIS <sup>a</sup> 、点)	21.4%(3.0)	22.7%(2.6)	18.5%(2.8)
脊椎(AIS <sup>a</sup> 、点)	42.9%(2.8)	36.4%(2.5)	25.9%(2.9)
SIRS <sup>b</sup> なし	2(14.3%)	—	—
SIRS2 <sup>b</sup>	5(35.7%)	2(9.1%)	—
SIRS3/4 <sup>b</sup>	7(50.0%)	20(90.9%)	—
敗血症	—	—	27(100%)
死亡率	2(14.3%)	2(9.1%)	5(18.5%)

<sup>a</sup>AIS:簡易傷害スケール<sup>b</sup>SIRS:全身性炎症反応症候群

## 外傷患者における炎症の標準指標の測定

一般的に用いられる炎症の指標、たとえばIL-6(図2)やプロカルシトニン(PCR、図3)が3つの重症度の群の間を区別することができるかどうかを調べるために、入院中の全期間にわたってこれらのタンパク質の血中濃度を測定した。IL-6は、外傷後すぐに増加して1日目に最高濃度に達した。最初の2日間は、敗血症群(1200 pg/mL)および感染症群(600 pg/mL)において非感染群よりも高く、3つの重症度の群で違いがみられた。5~10日目において差異があるが、データのばらつきが大きいために統計値は有意性を示さない。敗血症(350 pg/mL)の期間中にわずかな増加が見られるが、これらの濃度は入院1日目と比べて低い。

## 【0027】

PCRは、敗血症の以前および最中の敗血症患者で20倍にまで明らかに増加したが、他の群では0.5~2 ng/mL前後の濃度に留まっている(図3)。PCRの最大の増加は健常者の25倍であった。試料中の大きなばらつきのために統計値は有意差を示さない。

## 【0028】

## PSP/regは外傷後にアップレギュレートされる

PSP/regは、大部分は脾臓および腸内で合成される。局所的な組織損傷にตอบสนองして、それは高度にアップレギュレートされる。脾臓組織の損傷がない場合には、PSP/regがアップレギュレートされることはないと予想される。しかしながら、PSP/regの発現および分泌に影響しうるサイトカインの放出が多発性外傷により起こる。したがって、脾臓の損傷はないが重症外傷を負っている患者においてこれらのタンパク質が増加しているかどうかを調べた。多発性外傷後のすべての患者のいずれのデータも、0日目ならびに健常者に比べて、1日目に増加を示し、それが3日目に有意となっている(図4)。

## 【0029】

このように、脾石タンパク質は、多発性外傷後にわずかに増加する。非感染の患者、感染症を伴った患者および敗血症を伴った患者に割り振った層別化を用いてデータを解析した。非感染の患者におけるPSP/reg値は、7~10日目がピークとなるようにわず

10

20

30

40

50

かに増加した(図5 A、図5 B)。感染症を示した多発性外傷の患者においては、さらなる増加が見られる。最後に、敗血症を示した多発性外傷の患者は、血清PSP / regの大きな増加を示す。

【0030】

増加は、敗血症の臨床基準が満たされる数日前に始まる。PSP / regは敗血症に高度に相関している。患者がまだ敗血症でない3日目において、血中のPSPの平均濃度は有意に増加して100 ng / mLを超え、敗血症の期間中には約20倍に達する(図5 A、図5 B、5 ~ 10日目)。

【0031】

したがって、敗血症を伴った患者におけるPSP / regの初期の増加は、敗血症を予測するための血清マーカーとして用いることができる。したがって、特異性、正および負の予測値は、3日目および5日目における3つの潜在的なカットオフ値、たとえば30 ng / mL、60 ng / mLおよび80 ng / mLに集約される。特異性は、60 ng / mLおよび80 ng / mLのカットオフ値の80%前後である。上記正および負の値もまた60 ~ 80%であり、本方法によって早い時期に患者の識別を行うことができることが示される。

10

【0032】

【表3】

敗血症を伴った患者のPSP血清濃度の3つのカットオフ点についての感受性、特異性ならびに正および負の予測値を、感染性合併症または局所感染症を伴わない患者と比較したもの。非感染の2つの群を敗血症群と比較した。感染症群は含んでいない。

20

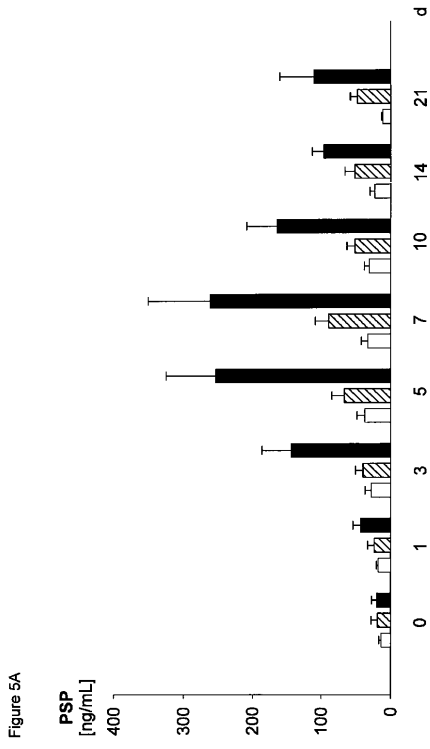
3日目	30ng/mL	60ng/mL	80ng/mL
感受性(%)	70.4	55.5	40.7
特異性(%)	72.2	83.3	83.3
正の予測値(%)	65.5	71.4	64.7
負の予測値(%)	76.5	71.4	65.2
5日目	30ng/mL	60ng/mL	80ng/mL
感受性(%)	74.1	63.0	51.9
特異性(%)	66.7	75.0	77.7
正の予測値(%)	62.5	65.4	63.6
負の予測値(%)	77.4	73.0	68.3

30

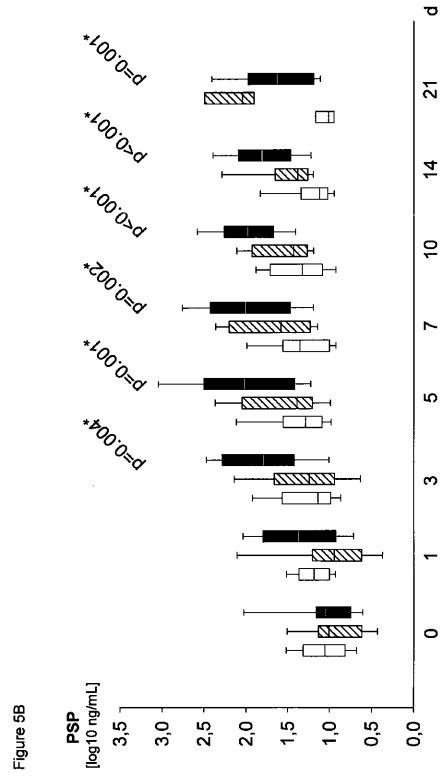
分析は、外傷後3日目または5日目に得られたPSP血清値に基づく。



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 配 列 表 】

[2010538282000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/007158

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2004/087874 A (NUVELO, INC. [US]) 14 October 2004 (2004-10-14)  abstract page 58, lines 5-8 page 63, line 26 - page 64, line 3 page 71, lines 1-9 page 73, lines 28-30 page 88, line 20 - page 89, line 5 page 90, lines 11-16 page 105, line 26 - page 106, line 15 page 106, lines 17-24 tables 2A,2B SEQ ID NO : 258  ----- -/-	8  1-7
<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 document 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. 'B' document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  3 December 2008		Date of mailing of the international search report  12/01/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer  Giry, Murielle

Form: PCT/ISA210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/007158

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2004/265230 A1 (MARTINEZ R.V. [US] ET AL.) 30 December 2004 (2004-12-30)  abstract paragraphs [0023], [0058], [0059], [0135], [0136], [0142], [0402], [0447] - [0449] claim 17 SEQ ID NOs : 95 and 96 (proteins) and SEQ ID NOs : 32 and 33 (nucleic acids)	8 1-7
X A	WO 98/00561 A (ZENECA LTD [GB]) 8 January 1998 (1998-01-08)  abstract page 3 claim 14	8 1-7
X A	WO 90/06993 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION [US]) 28 June 1990 (1990-06-28)  abstract page 5, line 30 - page 8, line 9 page 26, lines 16-33 page 46, lines 21-26 claims 1-39	8 1-7
A	US 2005/106645 A1 (BERGMANN A. [DE]) 19 May 2005 (2005-05-19) abstract claims 1-9	1-8
A	US 2005/059104 A1 (BERGMANN A. [DE]) 17 March 2005 (2005-03-17) abstract claims 1-9	1-8
A	US 2005/074811 A1 (BERGMANN A. [DE]) 7 April 2005 (2005-04-07) abstract claims 1-9	1-8
A	US 2005/064506 A1 (BERGMANN A. [DE]) 24 March 2005 (2005-03-24) abstract claims 1-9	1-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/007158

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOSHINO N. ET AL.: "Interleukin-8 regulates expression of Reg protein in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa" AM. J. GASTROENTEROL., vol. 100, no. 10, October 2005 (2005-10), pages 2157-2166, XP002506504 the whole document	1-8
P,X	US 2007/224638 A1 (MELANITOU-MCCLYMONT E. [FR]) 27 September 2007 (2007-09-27) abstract paragraphs [0026] - [0032], [0077] claims 1,2,7-9,20,23,45,46	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/007158

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004087874	A	14-10-2004	NONE
US 2004265230	A1	30-12-2004	NONE
WO 9800561	A	08-01-1998	AU 3349997 A 21-01-1998 CA 2252464 A1 08-01-1998 EP 0912762 A1 06-05-1999 JP 2000513936 T 24-10-2000
WO 9006993	A	28-06-1990	NONE
US 2005106645	A1	19-05-2005	AT 282831 T 15-12-2004 DE 50104561 D1 23-12-2004 WO 03048782 A1 12-06-2003 EP 1318405 A1 11-06-2003 JP 2005512060 T 28-04-2005
US 2005059104	A1	17-03-2005	AT 272215 T 15-08-2004 DE 50103032 D1 02-09-2004 WO 03048777 A1 12-06-2003 EP 1318404 A1 11-06-2003 JP 2005512058 T 28-04-2005
US 2005074811	A1	07-04-2005	AT 293794 T 15-05-2005 DE 50105971 D1 25-05-2005 WO 03048776 A1 12-06-2003 EP 1318402 A1 11-06-2003 JP 2005512057 T 28-04-2005
US 2005064506	A1	24-03-2005	AT 272214 T 15-08-2004 DE 50103030 D1 02-09-2004 WO 03048778 A1 12-06-2003 EP 1318403 A1 11-06-2003 JP 2005512059 T 28-04-2005
US 2007224638	A1	27-09-2007	NONE

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ビムラー、ダニエル

スイス国 CH - 8700 キュスナハト チュルヒャーシュトラッセ 119

(72)発明者 キール、マリウス

スイス国 CH - 8032 チューリッヒ ホフシュトラッセ 14

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010538282A5</a>	公开(公告)日	2011-10-20
申请号	JP2010523316	申请日	2008-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	海胆威赛罗卡泰特Tsuyurihi		
[标]发明人	グラーフロルフ ビムラーダニエル キールマリウス		
发明人	グラーフ、ロルフ ビムラー、ダニエル キール、マリウス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/474 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.D		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	2007017539 2007-09-07 EP		
其他公开文献	JP5048838B2 JP2010538282A		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种预测创伤后人类脓毒症的可靠方法，其中胰腺结石蛋白/再生蛋白 (PSP / reg) 的水平在血清中测定，并且高水平指示脓毒症的发展。疾病的早期阶段。此外，描述了测定血清中PSP / reg水平的方法。