

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-78842

(P2015-78842A)

(43) 公開日 平成27年4月23日(2015.4.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO1N 33/53</b> (2006.01)	GO1N 33/53	R 2GO41
<b>GO1N 27/62</b> (2006.01)	GO1N 27/62	V 4BO63
<b>C12Q 1/68</b> (2006.01)	C12Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2013-214455 (P2013-214455)	(71) 出願人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
(22) 出願日	平成25年10月15日 (2013.10.15)	(71) 出願人	504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(72) 発明者	半澤 宏子 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置

(57) 【要約】

【課題】 簡便な操作によって、高精度に虚血性心疾患を評価する。

【解決手段】 被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定するステップと、上記ステップで測定した補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度を基準値と比較するステップとを含み、当該濃度が当該基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定するステップと、上記ステップで測定した補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度を基準値と比較するステップとを含み、

当該濃度が当該基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定することを特徴とする、虚血性心疾患の評価方法。

**【請求項 2】**

虚血性心疾患への重篤度は、被験者における虚血性心疾患の存在の判定及び被験者に存在する心疾患の進行程度を示す情報であることを特徴とする請求項 1 記載の虚血性心疾患の評価方法。

10

**【請求項 3】**

上記補体H因子及び/又は補体D因子を測定するステップでは、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質を定量する、或いは当該タンパク質をコードするmRNAを定量することを特徴とする請求項 1 記載の虚血性心疾患の評価方法。

**【請求項 4】**

上記補体H因子及び/又は補体D因子を測定するステップでは、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質に対して特異的に結合する物質を使用する、又は質量分析法若しくは電気泳動法により行う、請求項 1 記載の虚血性心疾患の評価方法。

**【請求項 5】**

被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定するための手段を含み、

補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度が基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定することを特徴とする、虚血性心疾患の評価用キット。

20

**【請求項 6】**

上記手段は、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質を測定する、或いは当該タンパク質をコードするmRNAを測定することを特徴とする請求項 5 記載の虚血性心疾患の評価用キット。

**【請求項 7】**

上記手段は、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質に対して特異的に結合する物質である、請求項 5 記載の虚血性心疾患の評価用キット。

30

**【請求項 8】**

上記手段は、補体H因子及び/又は補体D因子に対する抗体が固相支持体に固定されたものであることを特徴とする請求項 5 記載の虚血性心疾患の評価用キット。

**【請求項 9】**

被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定する測定部と、上記測定部で測定した補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度を基準値と比較する比較部と、

当該濃度が当該基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定する判定部とを含む、虚血性心疾患の評価装置。

40

**【請求項 10】**

上記判定部は、虚血性心疾患への重篤度として、被験者が虚血性心疾患に罹患している可能性を示す情報及び被験者に存在する心疾患の進行程度を示す情報を取得することを特徴とする請求項 9 記載の虚血性心疾患の評価装置。

**【請求項 11】**

上記測定部では、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質を定量する、或いは当該タンパク質をコードするmRNAを定量することを特徴とする請求項 9 記載の虚血性心疾患の評価装置。

**【請求項 12】**

上記測定部では、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質に対して特異的に結

50

合する物質を使用する、又は質量分析法若しくは電気泳動法により行う、請求項9記載の虚血性心疾患の評価装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、安定狭心症や急性心筋梗塞といった虚血性心疾患の有無及び/又はその重篤度を評価する方法、キット及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

食生活の欧米化や高齢化社会化に伴い、狭心症や心筋梗塞といった心疾患の患者数が急速に増加している。心疾患の主要原因は、動脈硬化によって動脈血管内に形成された不安定プラーク(病変)の破裂と急激な血栓形成、結果惹起された心筋虚血である(虚血性心疾患)。心疾患の体外診断は、古典的な危険因子(年齢、性別、脂質異常、高血圧、高血糖、喫煙)に加え、炎症、血管内皮障害、血栓形成関連因子を指標にした検定法が多数の疫学的研究において検討されている。中でもC反応性タンパク質(CRP)は、バイオマーカーとして最もよく研究され、大規模臨床試験による評価も実施されている。しかしながら、現時点では、CRP値のみでは、虚血性心疾患のリスクの指標とはなりえず、虚血性心疾患については新規なバイオマーカーによる、定量性と再現性に優れた簡便な検定方法の開発が課題であった(非特許文献1)。

10

【0003】

20

また、従来において、動脈硬化の進行に従って発現が変動するタンパク質群をプロテオーム解析により同定し、その変動を発現プロファイルデータベースとして記録し、サンプル中のタンパク質の発現変動と照らし合わせて、動脈硬化の有無や進行ステージを検定する方法が報告(特許文献1及び2)。特許文献1では、動脈硬化のモデルマウスを用いた解析によって、補体D因子を含む一群のタンパク質の発現量が動脈硬化性虚血性心疾患の重篤度に相関していることを明らかにしている。特許文献2では、動脈硬化病変部位において補体H因子を含む一群のタンパク質の発現量が変動していることから、動脈硬化病変部位(組織片)におけるこれらタンパク質の発現量を測定することで動脈硬化性虚血性心疾患の重篤度を評価できることを明らかにしている。

【0004】

30

なお、補体H因子や補体D因子は、免疫・炎症反応に関与し、生体制御機構の一つとして知られる「補体系」に含まれるタンパク質である。補体系は、図6に示すように、血液中に存在する20種類以上の一群のタンパク質(補体因子)から構成される。血液中に含まれる血球細胞や血管内皮細胞表面には、補体受容体や補体制御膜因子が存在し、病原体の侵入や炎症刺激により、これらのタンパク質が連鎖反応を起こすことで、補体(系)が活性化される。一方、好ましくない「活性化」の暴走を防止するため、補体因子に加え、調節因子による厳密な調節が行われている。補体因子の1つである、マンノース結合レクチンを遺伝的に欠損した患者では動脈硬化が亢進し、心疾患を多発することが報告されている(非特許文献2)ものの、動脈硬化性虚血性心疾患及び関連疾患の進行に、補体系がどのように関与しているかについては、これまでのところ殆ど明らかにされていない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2011-232218号公報

【特許文献2】特開2012-107989号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Wang X.及びConnolly T.M., Advances in Clinical Chemistry, 第50巻、第1-22頁、2010年

【非特許文献2】Madsen H.O., Videm V., Svejgaard A., Svennevig J.L.及びGarred P.

50

, Lancet, 第352巻、第959-960頁、1998年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述のように、虚血性心疾患の診断に関連した種々の研究結果があるものの、虚血性心疾患の有無やその重篤度を高精度且つ簡易に検出できるバイオマーカーは知られていなかった。特許文献1に開示された虚血性心疾患に関連するバイオマーカーは、動脈硬化モデルマウスを用いて同定されたものであり、ヒトを検査対象としたときに適用できるかは不明である。また、特許文献2に開示された虚血性心疾患に関連するバイオマーカーは、被験者より動脈硬化病変部位を採取し、これから作製された組織片から検出される。したがって、特許文献2に開示された技術は、虚血性心疾患の診断に非常に煩雑な操作を要するといった問題があった。

10

【0008】

そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、簡便な操作によって、高精度に虚血性心疾患の評価することができる、虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、健常ボランティア、安定狭心症患者と急性心筋梗塞患者を選択し、血液検体を収集した。次に、検体中のマーカー候補の濃度を測定した。その結果、虚血性心疾患がより重篤になるに従って、補体H因子及び補体D因子の血中濃度が有意に減少することを見いだした。また、補体H因子の濃度と補体D因子の血中濃度は正の相関を示すことを見出した。以上の結果から、補体H因子及び/又は補体D因子は、虚血性心疾患の存否及びその重篤度を評価するためのバイオマーカーとして使用できるという知見を得、本発明を完成するに至った。

20

【0010】

本発明は以下を包含する。

(1) 被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定するステップと、上記ステップで測定した補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度を基準値と比較するステップとを含み、当該濃度が当該基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定することを特徴とする、虚血性心疾患の評価方法。

30

(2) 虚血性心疾患への重篤度は、被験者における虚血性心疾患の存在の判定及び被験者に存在する心疾患の進行程度を示す情報であることを特徴とする(1)記載の虚血性心疾患の評価方法。

(3) 上記補体H因子及び/又は補体D因子を測定するステップでは、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質を定量する、或いは当該タンパク質をコードするmRNAを定量することを特徴とする(1)記載の虚血性心疾患の評価方法。

(4) 上記補体H因子及び/又は補体D因子を測定するステップでは、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質に対して特異的に結合する物質を使用する、又は質量分析法若しくは電気泳動法により行う(1)記載の虚血性心疾患の評価方法。

40

(5) 被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定するための手段を含み、補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度が基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定することを特徴とする、虚血性心疾患の評価用キット。

(6) 上記手段は、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質を測定する、或いは当該タンパク質をコードするmRNAを測定することを特徴とする(5)記載の虚血性心疾患の評価用キット。

(7) 上記手段は、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質に対して特異的に結合する物質である、(5)記載の虚血性心疾患の評価用キット。

(8) 上記手段は、補体H因子及び/又は補体D因子に対する抗体が固相支持体に固定されたものであることを特徴とする(5)記載の虚血性心疾患の評価用キット。

50

(9) 被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定する測定部と、上記測定部で測定した補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度を基準値と比較する比較部と、当該濃度が当該基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定する判定部とを含む、虚血性心疾患の評価装置。

(10) 上記判定部は、虚血性心疾患への重篤度として、被験者における虚血性心疾患の存在の判定及び被験者に存在する心疾患の進行程度を判定することを特徴とする(9)記載の虚血性心疾患の評価装置。

(11) 上記測定部では、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質を定量する、或いは当該タンパク質をコードするmRNAを定量することを特徴とする(9)記載の虚血性心疾患の評価装置。

(12) 上記測定部では、補体H因子及び/又は補体D因子であるタンパク質に対して特異的に結合する物質を使用する、又は質量分析法若しくは電気泳動法により行う(9)記載の虚血性心疾患の評価装置。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、簡便な操作により、虚血性心疾患の有無及び/又はその重篤度を高精度に評価することができる。すなわち、本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置によれば、被験者から採取した血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定するといった簡便な操作により、被験者に関して虚血性心疾患の有無、重篤度といった評価が可能となる。また本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置は、的確かつ簡便に虚血性心疾患とそれに起因する障害発生と進行の可能性に関する検査又は分析、様々な試薬や医薬の開発や、関連装置の開発にも利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明を適用した虚血性心疾患の評価装置の一例を示す概略構成図である。

【図2】低リスク群、安定狭心症群及び急性心筋梗塞群における血中CFH濃度を測定した結果を示す特性図である。

【図3】低リスク群、安定狭心症群及び急性心筋梗塞群における血中CFD濃度を測定した結果を示す特性図である。

【図4】各検体におけるCFDとCFHの血中濃度の相関関係を示す特性図である。

【図5】低リスク群、安定狭心症群及び急性心筋梗塞群における血中CFP濃度を測定した結果を示す特性図である。

【図6】複数の補体関連因子からなる補体活性化第二経路の概略構成図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置では、虚血性心疾患を評価するための新規なバイオマーカーを利用する。このバイオマーカーは、虚血性心疾患の進行に伴ってその発現が減少するタンパク質であるため、虚血性心疾患の発症の予測や、進行程度の判定、予後の予測、虚血性心疾患の治療薬又は治療法の有効性の評価などに有用である。新規なバイオマーカーは、血液由来サンプルに含まれる補体H因子及び/又は補体D因子である。

【0014】

ここで、虚血性心疾患とは、冠動脈が狭窄や閉塞することで心筋への血流が不足し(虚血)、心筋の壊死や心臓の機能が低下する病気を意味する。特に、冠動脈の狭窄や閉塞の原因が動脈硬化である場合、動脈硬化性虚血性心疾患と称する。本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置で使用するバイオマーカーは、虚血性心疾患のなかでも特に動脈硬化性虚血性心疾患の評価に有用である。

【0015】

また、虚血性心疾患には、安定狭心症、不安定狭心症及び労作性狭心症を含む狭心症、

10

20

30

40

50

急性心筋梗塞及び陳旧性心筋梗塞を含む心筋梗塞、並びに心不全が含まれる。狭心症から心筋梗塞、そして心不全の順に、詳細には安定狭心症、不安定狭心症、急性心筋梗塞、陳旧性心筋梗塞及び心不全の順に、虚血性心疾患の重篤度が高いとされる。

【0016】

用語「バイオマーカー」とは、虚血性心疾患を評価するために測定する対象となるタンパク質、すなわち補体H因子及び/又は補体D因子若しくは該タンパク質をコードする遺伝子(mRNA)を意味する。また「測定する」とは、タンパク質又は当該タンパク質をコードする遺伝子(mRNA)のサンプル中の存在量を求めることを意味する。また本発明では、「バイオマーカーを測定する」とは、バイオマーカーであるタンパク質又はその派生物若しくは誘導体を測定しても良いし、あるいは該タンパク質をコードする遺伝子(mRNA)の発現を測定しても良い。「派生物」及び「誘導体」とは、バイオマーカーであるタンパク質から派生する物質及び当該タンパク質に由来する物質をそれぞれ意味する。「派生物」及び「誘導体」には、例えば、シグナルペプチドを含むタンパク質、タンパク質の特定のサブユニット分子、修飾タンパク質、タンパク質断片などが含まれるが、これに限定されるものではない。

10

【0017】

血液由来サンプルとは、虚血性心疾患について評価しようとする被験者から採取した血液、及び当該血液を処理して得られるサンプルを意味する。より具体的に、血液由来サンプルには、血液サンプル、血清サンプル及び血漿サンプルが含まれる。特に、血漿サンプルを使用する場合には、抗凝固剤としてEDTAを使用することが好ましいが、ヘパリン、クエン酸ナトリウムなど当該分野で公知又は汎用されているものを使用することができる。血液サンプルの場合、採血後は氷冷又は冷蔵保存することが好ましい。

20

【0018】

また被験者は、ヒト、及びその他の哺乳動物、例えば霊長類(サル、チンパンジーなど)、家畜動物(ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジなど)、ペット用動物(イヌ、ネコなど)、実験動物(マウス、ラット、ウサギなど)であり、さらには爬虫類及び鳥類などであってもよい。特に、ヒトを被験者とするのが好ましい。

【0019】

バイオマーカーの測定は、血液由来サンプル中のその量又は濃度を、好ましくは半定量的又は定量的に測定することを意味し、その量は、絶対量であってもよいし又は相対量であってもよい。測定は、直接的又は間接的に行うことができる。直接的な測定は、サンプル中に存在するバイオマーカータンパク質又はmRNAの分子数と直接相関するシグナルに基づいて、その量又は濃度を測定することを含む。そのようなシグナルは、例えばタンパク質又はmRNAの特定の物理的又は化学的な特性に基づいている。間接的な測定は、二次成分(すなわちマーカータンパク質又はmRNA以外の成分)、例えば抗体などのリガンド、標識又は酵素反応生成物から得られるシグナルの測定である。

30

【0020】

本発明の一実施形態では、バイオマーカーがタンパク質である場合、バイオマーカーの測定は、サンプル中のタンパク質の量を測定するための手段によって行うことができる。そのような手段は当技術分野で公知であり、例えば免疫アッセイの方法及び試薬などがある。また、バイオマーカーがタンパク質である場合、バイオマーカーの測定は、当該タンパク質に特有の物理的又は化学的特性を測定するための手段、例えば正確な分子量又はNMRスペクトル等を測定するための手段によって行うことができる。当該タンパク質を測定するための手段としては、バイオセンサー、プロテインチップ、免疫アッセイと連結した光学装置、質量分析計、NMR分析計、二次元電気泳動装置及びクロマトグラフィー装置等の分析装置が挙げられる。これら分析装置を単独で使用してバイオマーカーを測定しても良いが、複数の分析装置によりバイオマーカーを測定したものよい。

40

【0021】

好ましい実施形態では、バイオマーカーがタンパク質である場合、バイオマーカーの測定は、免疫アッセイ(免疫学的測定法)により行うことができる。すなわち、血液由来サ

50

ンプル中の当該タンパク質と、当該タンパク質に特異的に結合する抗体との反応に基づいて、バイオマーカーを測定する。免疫アッセイは、当該分野で汎用されている方法を限定することなく使用することができる。例えば、免疫アッセイとしては、液相系及び固相系のいずれでもよい。検出の容易性の点で、固相系の免疫アッセイを利用することが好ましい。また、免疫アッセイの形式も限定されるものではなく、直接固相法の他、サンドイッチ法、競合法、ウエスタンブロッティング法、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 法などであってもよい。

#### 【0022】

ここで、バイオマーカーであるタンパク質に対する抗体はモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよいし、あるいはバイオマーカーであるタンパク質のエピトープに結合することができるFab、Fvフラグメントなどであってもよい。バイオマーカーを測定する際に一次抗体と二次抗体を使用する場合には、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。抗体は、当技術分野で公知の方法により調製することができ、また市販品として入手してもよい。

#### 【0023】

バイオマーカーであるタンパク質と抗体との結合は、周知の方法に従って測定できる。バイオマーカーであるタンパク質と抗体との結合を測定する方法は、特に限定されず、採用する免疫アッセイの種類及び形式、使用する標識の種類などに応じて、各アッセイについての有効かつ最適な測定方法を決定することができる。例えば、血液由来サンプル中のバイオマーカーと抗体との結合を容易に検出するために、該抗体を標識することにより該結合を直接検出するか、又は標識二次抗体若しくはビオチン-アビジン複合体等を用いることにより間接的に検出することができる。

#### 【0024】

免疫アッセイとして固相系を選択する場合には、例えば血液由来サンプル中のタンパク質成分を固相に固定化することができ、例えば、(1)血液由来サンプルからタンパク質成分を調製する工程、(2)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画する工程、(3)ゲル上のタンパク質を固相に転写する工程、(4)バイオマーカーであるタンパク質と特異的に結合する抗体(一次抗体)と反応させる工程、(5)固相を洗浄する工程、(6)固相に一次抗体に対し特異的に結合する標識抗体(二次抗体)を接触させる工程、(7)固相を洗浄する工程、(8)該標識に基づいてバイオマーカーを測定する工程からなる方法を採用することができる。あるいは、バイオマーカーであるタンパク質と特異的に結合する抗体を固相に固定してもよい。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA」として広く用いられている方法である。このような固相系の方法は、極微量のタンパク質の検出と操作の簡便化のため好ましい方法である。

#### 【0025】

固相系においては、バイオマーカーであるタンパク質と特異的に結合する抗体又はサンプル中のタンパク質成分を固相(プレート、膜、ビーズ等)上に固定化し、この固相上においてバイオマーカーと固体との免疫学的結合を試験する。固相は、当技術分野で慣用的に使用されているものであれば特に限定されるものではなく、例えば市販のニトロセルロース膜又はPVDF膜を用いることができる。上記抗体又はサンプル中のタンパク質成分を固相上に固定化することによって、未結合のサンプル成分や試薬を容易に除去することができる。また特に、数十種類の抗体を固定化したメンブレンを用いるタンパク質アレイ法では、少量の被験者由来のサンプル(血漿など)を用いて多種類のマーカータンパク質の発現を短時間で解析することができる。またこのような免疫アッセイは、例えば操作が簡便なテストストリップにおいても実施することができる。すなわち、虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置では、数十種類の抗体を固定化したメンブレンを用いるタンパク質アレイ法を適用することができる。

#### 【0026】

免疫アッセイとして液相系を選択する場合には、例えば、標識化抗体とサンプルとを接触させて標識化抗体とバイオマーカーであるタンパク質とを結合させ、この結合体を分離し、標識シグナルを検出する。あるいは、バイオマーカーであるタンパク質に対する抗体（一次抗体）と血液由来サンプルとを接触させて一次抗体とバイオマーカーであるタンパク質とを結合させ、この結合体に標識化抗体（二次抗体）を結合させ、この三者の結合体における標識シグナルを検出することもできる。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず抗体＋マーカータンパク質結合体に結合させ、この二次抗体に標識物質を結合させるようにしてもよい。このような二次抗体への標識物質の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、標識物質をアビジン化しておくことによって行うことができる。

10

**【0027】**

免疫アッセイにおいて使用する抗体を標識するための標識としては、酵素、放射性同位体、蛍光色素又はアビジン-ビオチン系を使用することができる。酵素としては、通常の酵素免疫アッセイ（EIA）に用いられる酵素、例えば、パーオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等を用いることができる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。放射性同位体としては、 $^{125}\text{I}$ や $^3\text{H}$ 等の通常のラジオイムノアッセイ（RIA）で用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。

20

**【0028】**

ビオチン-アビジン複合体系を利用する場合には、ビオチン化した抗体とサンプルとを反応させ、得られた複合体に標識を付加したアビジンを反応させる。アビジンは、ビオチンと特異的に結合することができるため、アビジンに付加した標識のシグナルを検出することによって、抗体とマーカータンパク質との結合を測定することができる。アビジンに付加する標識は特に限定されるものではないが、例えば酵素標識（パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなど）が好ましい。

**【0029】**

標識シグナルの検出もまた、当技術分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、酵素標識を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。基質は、使用する酵素の種類に応じて異なり、例えば酵素としてパーオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性標識を用いる場合には、放射性標識の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。蛍光標識は、例えば蛍光顕微鏡、プレートリーダー等を用いて検出及び定量することができる。

30

**【0030】**

また本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置においては、バイオマーカーの測定は、血液由来サンプルに含まれる、バイオマーカーであるタンパク質をコードするmRNAの量を測定するための手段によって行うことができる。そのような手段としては、特に限定されず、当技術分野で公知の如何なる手法を使用することができる。例えば、そのような手段としては、上記タンパク質をコードするDNAの全部若しくは一部の配列又はその相補配列を含むプライマーDNA又はプローブDNAが挙げられる。該プライマーDNA又はプローブDNAは、被験者から採取した血液由来サンプル中に含まれる上記タンパク質のmRNA又は該mRNAに対応するcDNAと特異的に結合する。

40

**【0031】**

プライマーDNA及びプローブDNAは、バイオマーカーであるタンパク質をコードするDNAの塩基配列に基づいて、公知のプログラムにより容易に設計することができ、また当業者

50

に公知の方法に従って調製することができる。

【0032】

被験者から採取した血液由来サンプルに含まれるバイオマーカーであるmRNAを測定するためには、上記プライマ-DNA及び/又はプローブDNAをそれぞれ増幅反応又はハイブリダイゼーション反応に使用し、その増幅産物又はハイブリッド産物を検出する。そのような反応を行う場合には、通常は、当技術分野で周知の方法を使用して被験者由来のサンプルからmRNA又は該mRNAに対応するcDNAを調製する。例えば、RNAを抽出する場合には、グアニジン-塩化セシウム超遠心法、ホットフェノール法、又はチオシアン酸グアニウム-フェノール-クロロホルム (AGPC) 法などを利用することができる。cDNAは、公知の逆転写酵素を利用して調製することができる。以上のように調製したサンプルを用いて、以下

10

【0033】

プライマ-DNAを用いてmRNA又はcDNAを鋳型とした増幅反応を行い、その特異的増幅反応を検出することにより、血液由来サンプルに含まれるバイオマーカーであるmRNAを測定することができる。増幅手法としては、特に限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法の原理を利用した公知の方法 (PCR、RT-PCR、リアルタイムPCRなど) を挙げることができる。増幅産物の検出には、増幅反応により得られる増幅産物を特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、アガロースゲル電気泳動法等を利用して、特定のサイズの増幅断片が増幅されているか否かを確認することにより、特異的な増幅反応を検出することができる。

20

【0034】

あるいは、増幅反応の過程で取り込まれるdNTPに、放射性同位体、蛍光物質、発光物質などの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。放射性同位体としては、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ などを用いることができる。また蛍光物質としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、スルホローダミン (SR)、テトラメチルローダミン (TRITC) などを用いることができる。また発光物質としてはルシフェリンなどを用いることができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、特に制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。例えば標識体の導入方法としては、放射性同位体を用いるランダムプライム法が挙げられる。

30

【0035】

標識したdNTPを取り込んだ増幅産物を観察する方法としては、上述した標識体を検出するための当技術分野で公知の方法であればいずれの方法でもよい。例えば、標識体として放射性同位体を用いた場合には、放射活性を、例えば液体シンチレーションカウンター、-カウンターなどにより計測することができる。また標識体として蛍光を用いた場合には、その蛍光を蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダーなどを用いて検出することができる。

【0036】

また、プローブDNAを用いてサンプルに対するハイブリダイゼーション反応を行い、その特異的結合 (ハイブリッド) を検出することにより、血液由来サンプルに含まれるバイオマーカーであるmRNAを測定することもできる。ハイブリダイゼーション反応では、プローブDNAが、血液由来サンプルに含まれるバイオマーカーであるmRNA又は当該mRNAから合成されるcDNAのみと特異的に結合するような条件、すなわちストリンジェントな条件下で行う。ハイブリダイゼーションを行う場合には、プローブDNAに蛍光標識 (フルオレセイン、ローダミンなど)、放射性標識 ( $^{32}\text{P}$  など)、ビオチン標識等の適当な標識を付加することができる。

40

【0037】

標識化したプローブDNAを用いた検出は、サンプル又はそれから調製したmRNA若しくはcDNAとプローブDNAとをハイブリダイズ可能なように接触させることを含む。具体的には、サンプル又はmRNA若しくはcDNAを適当な固相に固定化し、標識を付加したプローブDNAを添加することにより、あるいは標識プローブDNAを適当な固相に固定化し、サンプル又はmRNA若しくはcDNAを添加することにより、プローブDNAとサンプル又はmRNA若しくはcDNAと

50

を接触させてハイブリダイゼーション反応を行い、ハイブリダイズしなかったプローブDNAを除去した後、サンプル又はmRNA若しくはcDNAとハイブリダイズしているプローブDNAの標識を検出する。標識が検出された場合には、血液由来サンプル中に、バイオマーカーであるタンパク質のmRNAが発現していることとなる。標識化プローブDNAを用いた測定方法の例としては、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等を挙げることができる。

【0038】

以上のようにして、被験者から採取した血液由来サンプルに含まれるバイオマーカーを測定し、その結果に基づいて被験者における虚血性心疾患を評価することが可能である。本明細書中、「虚血性心疾患の評価」とは、被験者における虚血性心疾患の存在を判定すること、被験者に存在する虚血性心疾患の進行程度（重篤度）を決定することを含む意味である。また、このように行った被験者における虚血性心疾患の評価は、被験者に存在する虚血性心疾患の治療効果を評価すること、被験者に存在する虚血性心疾患の予後を予測する際にも利用することができる。また本発明において「評価」は、既に評価又は診断された虚血性心疾患の継続的なモニタリング、及び既に行った虚血性心疾患の評価又は診断の確認も包含する。

10

【0039】

なお、本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置による「評価」は、統計学的に有意な割合の被験者を評価できることを意図している。よって本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置による「評価」には、評価対象の被験者の全て（すなわち100%）について必ず正しい結果が得られない場合も含まれる。統計的に有意な割合は、様々な周知の統計評価ツール、例えば信頼区間の決定、p値の決定、スチューデントのt検定、マン・ホイットニー検定等を用いて決定することができる。好ましい信頼区間は、少なくとも90%である。p値は、好ましくは、0.1、0.01、0.005又は0.0001である。より好ましくは、被験者の少なくとも60%、少なくとも80%又は少なくとも90%を、本発明に係る虚血性心疾患の評価方法、評価用キット及び評価装置によって適切に評価することができる。

20

【0040】

虚血性心疾患の評価の具体例は次のとおりである。被験者の血液由来サンプルにおける補体H因子及び/又は補体D因子を測定し、例えば補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度をそれぞれ基準値と比較する。

30

【0041】

補体H因子の濃度及び補体D因子の濃度のいずれか一方又は両方が、基準値より低い場合には、該被験者に虚血性心疾患が発症している可能性が高いことを示す。特に、補体H因子の濃度及び補体D因子の濃度の両方が、それぞれ基準値より低い場合には、該被験者に虚血性心疾患が発症している可能性がより高いことを示す。逆に、補体H因子の濃度及び補体D因子の濃度の両方が、それぞれ基準値以上である場合には、該被験者は虚血性心疾患に罹患していない可能性が高いと判断する。

【0042】

ここで、血液由来サンプルとして血漿を使用する場合、補体H因子の濃度の基準値は320 µg/mlとすることができ、560 µg/mlとすることが好ましく、680 µg/mlとすることがより好ましい。同様に、補体D因子の濃度の基準値は2.1 µg/mlとすることができ、2.7 µg/mlとすることが好ましく、3.0 µg/mlとすることがより好ましい。なお、この基準値の値は、特に限定されない。例えば、基準値を算出する基礎となる血液由来サンプルの数が増えることで、当該基準値の数値を適宜修正することができる。

40

【0043】

さらに、補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度に基づいて、虚血性心疾患の重篤度を評価することができる。このとき、補体H因子の濃度及び補体D因子の濃度のいずれか一方又は両方が、上記基準値よりも更に低い基準値より低い場合には、該被験者に虚血性心疾患が進行している可能性が高いことを示す。ここで、虚血性心疾患の重篤度を評価す

50

る際には、血液由来サンプルとして血漿を使用する場合、補体H因子の濃度の基準値は260  $\mu\text{g/ml}$ とすることができ、450  $\mu\text{g/ml}$ とすることが好ましく、510  $\mu\text{g/ml}$ とすることがより好ましい。同様に、補体D因子の濃度の基準値は1.3  $\mu\text{g/ml}$ とすることができ、1.9  $\mu\text{g/ml}$ とすることが好ましく、2.2  $\mu\text{g/ml}$ とすることがより好ましい。なお、この基準値の値は、特に限定されない。例えば、基準値を算出する基礎となる血液由来サンプルの数が増えることで、当該基準値の数値を適宜修正することができる。

【0044】

さらに虚血性心疾患の評価方法は、他の従来公知の虚血性心疾患の診断方法と組み合わせてもよい。そのような公知の虚血性心疾患の診断方法としては、心疾患の生理学的及び生化学的マーカーの測定（例えば高血圧、コレステロール値、トリグリセリド値）、心電図による測定、動脈脈波伝播速度（PWV：pulse wave velocity）の測定、血管内造影法が挙げられる。

10

【0045】

本発明の虚血性心疾患の評価方法によって、虚血性心疾患の発症を早期に判定することができる。すなわち、他の従来公知の虚血性心疾患の診断方法によっては認識されない早期の虚血性心疾患の存在を判定することができる。また、虚血性心疾患が存在する場合には、その進行程度（重篤度）を判断することができる。そのため、被験者は、虚血性心疾患の治療を早期に、かつ疾患の進行において適切な治療を適時に受けることが可能となる。特に、血液由来サンプルを利用して虚血性心疾患の評価ができるため、従来の方法に比べ、迅速にかつ簡易に評価できるという利点もある。

20

【0046】

一方、本発明に係る虚血性心疾患の評価方法は、補体H因子の濃度及び/又は補体D因子といったバイオマーカーを測定するための手段を備えた評価用キット及び/又は評価装置を用いることによって、容易かつ簡便に行うことができる。

【0047】

評価用キットは、被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定するための手段を含んでいる。評価用キットの一例は、免疫アッセイ用試薬セットであり、バイオマーカーであるタンパク質に対する抗体試薬、希釈や洗浄用緩衝液、標準抗原、各抗体試薬に特異的に結合をする標識抗体試薬、発色・発光・蛍光を生じさせる基質試薬、手順と評価方法を記載した手順書等により構成される。評価用キットに含まれる抗体は、予め標識されたものであってもよいし、又は標識されていなくてもよい。また、この抗体は、固相支持体（例えば、メンブレン、ビーズ等）に固定されていてもよい。

30

【0048】

評価用キットは、上述した虚血性心疾患の評価方法を実施するための手順及びプロトコルを記載した説明書、評価において使用する基準値又は基準範囲を示した表などを含んでもよい。

【0049】

評価用キットに含まれる構成要素は、個別に提供されてもよいし、又は単一の容器内に提供されてもよい。好ましくは、評価用キットは、上述した虚血性心疾患の評価方法を実施するために必要な構成要素の全てを、即時に使用することができるように、例えば調整された濃度の構成要素として含む。

40

【0050】

一方、本発明に係る心疾患の評価用装置は、図1に示すように、被験者の血液由来サンプル中の補体H因子及び/又は補体D因子を測定する測定部1と、測定部1で測定した補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度を基準値と比較する比較部2と、当該濃度が当該基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定する判定部3とを備えている。

【0051】

ここで、測定部1は、上述のように、バイオマーカーがタンパク質である場合には血液由来サンプル中のタンパク質の量を測定するための手段、或いはタンパク質をコードするmRNAの量を測定するための手段を含んでいる。測定部1は、測定対象がタンパク質である

50

場合、上述のように、バイオセンサー、プロテインチップ、免疫アッセイと連結した光学装置、質量分析計、NMR分析計、二次元電気泳動装置及びクロマトグラフィー装置等の分析装置を備えている。一方、測定部1は、測定対象が核酸である場合、上述したように、液体シンチレーションカウンター、 $\beta$ -カウンター、蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダーなどの検出装置を備えている。

#### 【0052】

測定部1は、上述したような分析装置等から得られた測定値を処理するソフトウェアと計算機よりなるデータ解析部を備えている。データ解析部は、上述したような分析装置等から得られた測定値に基づいて検量線等のデータを参照することで、血液由来サンプルに含まれる補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度を算出する。データ解析部は、例えば、シグナル表示部分、測定値を分析するユニット、コンピュータユニット等を含むことができる。

10

#### 【0053】

また、比較部2は、バイオマーカーである補体H因子の濃度に関する基準値、補体D因子の濃度に関する基準値をそれぞれ記憶装置等から読み出し、上記測定部で測定した補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度と基準値とを比較する。このとき、比較部2は、血液由来サンプルの種類、すなわち血液であるか、血清、血漿であるかに応じて適切な基準値を選択して読み出す。

#### 【0054】

さらに、判定部3は、比較部2において補体H因子の濃度及び/又は補体D因子の濃度と基準値とを比較した結果に基づいて、当該濃度が当該基準値を下回る場合、虚血性心疾患への重篤度が高いと判定する。ここで、判定部3は、重篤度として、被験者が虚血性心疾患に罹患している可能性が高いという情報、被験者に存在する虚血性心疾患の進行程度を示す情報のいずれか一方又は両方を取得する。

20

#### 【0055】

ところで、上述したように、本発明に使用されるバイオマーカーを利用して、虚血性心疾患の治療薬又は治療法の有効性を評価、または虚血性心疾患の治療薬候補をスクリーニングすることができる。具体的に、虚血性心疾患の治療薬又は治療法の有効性を評価方法、または虚血性心疾患の治療薬候補をスクリーニング方法は

(a) 被験治療薬又は治療法による処置を受けた心疾患を有する動物からのサンプルにおいて、補体H因子の発現を測定するステップ、

30

(b) (a)の結果に基づいて心疾患に対する被験治療薬又は治療法の有効性を評価するステップを含む。

#### 【0056】

対象となる動物は、虚血性心疾患を有するヒトであってもよいし、あるいは虚血性心疾患モデル動物(マウス、ラット、ウサギなど)であってもよい。一般的には、モデル動物において被験治療薬又は治療法の有効性が確認された後に、ヒトにおいて、例えば臨床試験などにより有効性の評価が行われる。

#### 【0057】

評価又はスクリーニングの対象となる被験治療薬又は治療法の種類は特に限定されるものではない。例えば、被験治療薬又は治療法は、任意の物質的因子、具体的には、天然に生じる分子、例えば、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物(糖等)、ステロイド、グリコペプチド、糖タンパク質、プロテオグリカンなど;天然に生じる分子の合成アナログ又は誘導体、例えば、ペプチド擬態物、核酸分子(アプタマー、アンチセンス核酸、二本鎖RNA(RNAi)等)など;天然に生じない分子、例えば低分子有機化合物(無機及び有機化合物ライブラリー、又はコンビナトリアルライブラリー等)など;並びにそれらの混合物を挙げることができる。また治療薬又は治療法は、単一物質であってもよいし、複数の物質から構成される複合体や、食品及び食餌等であってもよい。さらに、被験治療薬又は治療法は、上記のような物質的因子に

40

50

加えて、放射線、紫外線などであってもよい。

【0058】

動物の被験治療薬又は治療法による処置は、その治療薬又は治療法の種類により異なるが、当業者であれば容易に決定することができる。例えば、被験治療薬の投与量、投与期間、投与経路などの投与条件は、当業者であれば適切に決定することができる。

【0059】

また、被験治療薬又は治療法の有効性は、いくつかの条件で検討することも可能である。そのような条件としては、被験治療薬又は治療法で処置する時間又は期間、量（大小）、回数などが挙げられる。例えば、被験治療薬の希釈系列を調製するなどして複数の用量を設定することができる。

10

【0060】

さらに、複数の被験治療薬又は治療法の相加作用、相乗作用などを検討する場合には、治療薬又は治療法を組み合わせ用いてもよい。

【0061】

被験治療薬又は治療法の処置後の動物から採取した血液由来サンプル中のバイオマーカーを測定し、処置前の濃度と比較することによって、被験治療薬又は治療法が、虚血性心疾患の改善、虚血性心疾患の進行の停止又は減速化に有効であるか否かを評価することができる。

【0062】

以上から、本発明に係る虚血性心疾患の治療薬又は治療法の有効性の評価方法により、虚血性心疾患を治療又は予防するための治療薬又は治療法を見出し、さらには治療薬又は治療法の有効性を確認することができる。

20

【実施例】

【0063】

以下、実施例により、本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術範囲は以下の実施例に限定されるものではない。当業者には、本明細書に記載した本発明の発想に基づく様々な実施形態が可能であることは明らかである。

【0064】

虚血性心疾患の進行における補体系の作用機構は殆ど明らかにされていない。そこで、本実施例では、補体の活性化経路（図6参照）のうち「代替経路」上にある補体H因子（CFH）及び補体D因子（CFD）について、血中濃度を測定し、虚血性心疾患の罹患及びその重篤度との関連を検討した。なお、比較のため、補体P因子（CFP）についても虚血性心疾患の罹患及びその重篤度との関連を検討した。

30

【0065】

[材料および方法]

以下の材料および方法を本明細書に開示の実験において用いた。

【0066】

動脈硬化性の虚血性心疾患（安定狭心症、急性心筋梗塞）患者のうち、年齢が45歳以上75歳未満の男性患者より同意を得て採血を実施した。また、健常ボランティアのうち、年齢が45歳以上75歳未満の男性患者より同意を得て、採血を実施した。一検体あたり真空採血管（EDTA-2Na血漿調製用：VP-NA050KN、テルモ）に採血後、直ちに血漿を分離し、-80に凍結保存した。

40

【0067】

CFH、CFD及びCFPの検体中の濃度は、市販の測定キットを用いて測定した。CFHの測定はUSCN社のヒトCFH検出キット（E90635HU、USCN）を用い、CFDの測定はR&Dシステムズ社のヒトCFD検出キット（Quantikine、DFD00、R&Dシステムズ）を用い、CFPの測定はUSCN社のヒトCFP検出キット（E90783HU、USCN）を用い、それぞれキット付属の取扱説明書に従って実施した。尚、実験間誤差を把握するため、精度管理用プール血清（コンセーラ、日水製薬）を測定ごとに必ず用いた。

【0068】

50

統計解析は、平均値 ± 標準偏差 (SD) として標記した。P値は片側のStudent's t-検定を用いて計算した。

【0069】

表1に被験体のプロフィールを示した。

【表1】

被験体	低リスク群* (n=25)	安定狭心症群 (n=51)	急性心筋梗塞群 (n=50)
年齢 (才)	58±8.2	65.9±6.9	61.8±8.5
性別	男性	男性	男性
収縮期血圧 (mmHg)	123.6±10.4	141.2±24.9	128.7±17.6
BMI (%)	22.2±1.7	24±3.3	24.7±3.2
血糖値 (mg/dL)	94.5±6.9	130.8±40.4	156.2±54.8
喫煙歴あり	5 (20.0%)	41 (80.4%)	26 (52.0%)
総コレステロール (mg/dL)	198.8±34.9	161.8±36.7	190.4±37.7
LDLコレステロール (mg/dL)	117±35.8	94.9±32.7	122.5±34.7
HDLコレステロール (mg/dL)	55±12.7	46.8±12.7	48.9±12.2
トリグリセリド (mg/dL)	125.4±118.4	128.9±60.3	159.7±187
高感度CRP (ng/mL)	700±600	1700±2000	2700±9500

\*低リスク群: 健常ボランティアのうち、①心疾患危険因子5項目(高血圧、肥満、高血糖、喫煙、脂質異常)のうち、該当が1項目以下、②心電図およびX線検査等により心臓に異常所見がみとめられない、③服薬(脂質異常症治療薬、降圧剤、糖尿病治療薬)なし、を満たす検体を抽出。

【0070】

CFH、CFD及びCFPの測定結果を表2に示す。CFHの血中濃度の平均値は、低リスク群、安定狭心症群と段階的に低下し、虚血性心疾患のうち最も進んだ病態である急性心筋梗塞群で低値を示した。CFDの血中濃度の平均値は、CFH同様、低リスク群、安定狭心症群、急性心筋梗塞群と虚血性心疾患の病態の進行度によって、段階的に低下した。これらCFH及びCFDの変動に対して、CFPは、低リスク群、安定狭心症群、急性心筋梗塞群と虚血性心疾患の病態の進行度に拘わらず一定であった。

【0071】

【表2】

	低リスク群	安定狭心症群	急性心筋梗塞群
CFD	3.3±0.6 <sup>(1)</sup>	2.5±0.6	2.2±0.6
(μg/ml)	18 <sup>(2)</sup>	18	26
CFH	794.8±239.2	637.8±189.3	454.3±141.9
(μg/ml)	14	23	13
CFP	62±14.6	61.4±8.2	55.6±9.3
(μg/ml)	8	10	10

(1)平均値±標準偏差, (2)標本数

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 2 】

また、図 2 にCFDの濃度分布を示す。統計解析の結果、低リスク群と安定狭心症群には有意差があり( $p=3.18 \times 10^{-4}$ )、低リスク群と急性心筋梗塞群(ACS群と表記)には有意差があったが( $p=2.01 \times 10^{-7}$ )、安定狭心症群と急性心筋梗塞群の間には有意差がなかった( $p=7.06 \times 10^{-2}$ )。

## 【 0 0 7 3 】

さらに、図 3 にCFHの濃度分布を示す。統計解析の結果、各群間には有意差があることが分かった(低リスク群vs安定狭心症群; $p=3.35 \times 10^{-2}$ 、低リスク群vs急性心筋梗塞群; $p=1.90 \times 10^{-5}$ 、安定狭心症群vs急性心筋梗塞群; $p=3.16 \times 10^{-3}$ )。

## 【 0 0 7 4 】

そして、図 4 に各検体におけるCFDとCFHの血中濃度の相関を示す。解析の結果、CFDとCFHの血中濃度は正の相関(相関係数;0.76)を示すことが分かった。しかし、CFD、CFHと高感度CRPの血中濃度は相関しなかった(データは示さない)。

## 【 0 0 7 5 】

以上の結果から、補体関連因子であるCFHとCFDの血中濃度は、虚血性心疾患と低リスク群とを判別するための指標となることが明らかとなった。よって、例えば、CFHとCFDの血中濃度についてそれぞれ基準値を設定し、CFH単独若しくはCFD単独、又はCFHとCFDを共に測定し、基準値と比較することで虚血性心疾患の診断に有効な情報を得ることができる。

## 【 0 0 7 6 】

さらに、CFHの血中濃度は、虚血性心疾患の進行に従って段階的に減少したことから、低リスク群と安定狭心症群とを区別する基準値に加え、安定狭心症と急性心筋梗塞群とを区別する基準値を設定することができる。そして、CFHの血中濃度を測定し、これら基準値と比較することで虚血性心疾患の有無及びその重篤度の診断に有効な情報を得ることができる。なお、CFHとCFDの血中濃度は互いによく相関していたため(図 4)、病態の層別化には、どちらか一方の血中濃度を測定すればよいことがわかった。

## 【 0 0 7 7 】

また、CFDとCFHの血中濃度と虚血性心疾患との関連性については、従来動脈硬化及び関連疾患の指標として用いられてきた高感度CRPといった血中マーカーとは異なっていることから、CFD及びCFHの血中濃度の測定値が新規マーカーとして有用であることが示唆された。なお、CFD及びCFHと同じ補体関連因子であるCFPについては、図 5 に示すように、CFP血中濃度と虚血性心疾患との間に有意差が見られなかった。このことから、複数の補体関連因子からなる補体活性化第二経路(図 6)の活性化や不活性化が、虚血性心疾患の有無及び進行度に関連するということではなく、CFD及びCFHの血中濃度が特異的に虚血性心疾患の有無及び進行度に関連していることが理解できる。

## 【 0 0 7 8 】

以上のように、本明細書において本発明に係る技術範囲を詳細に説明したが、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、当業者が実施できる範囲が存することは明らかである。そのため、上述した発明特定事項については多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも特許請求の範囲内のものである。

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 7 9 】

本発明により、虚血性心疾患の存在の有無とその進行を予測する技術が提供される。本発明により、虚血性心疾患の存在の有無とその状態又は進行の程度を簡便に判定できるので、虚血性心疾患の予防又は治療の分野で有用である。

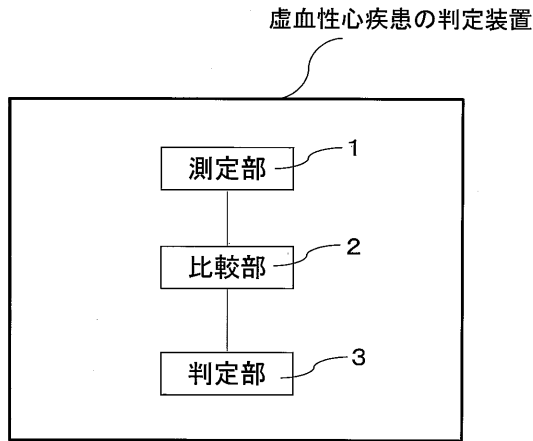
10

20

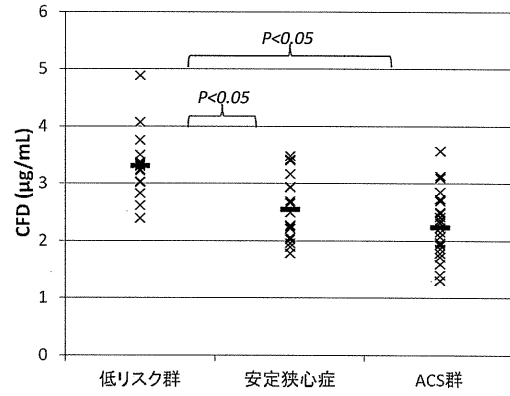
30

40

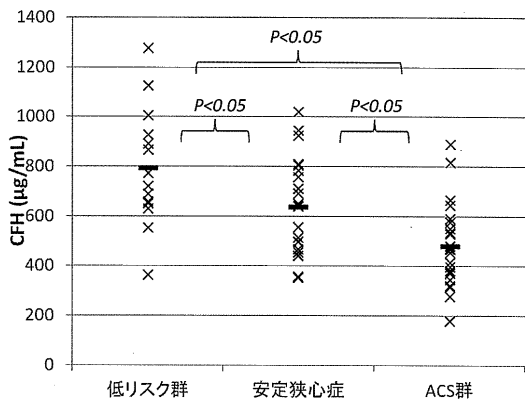
【 図 1 】



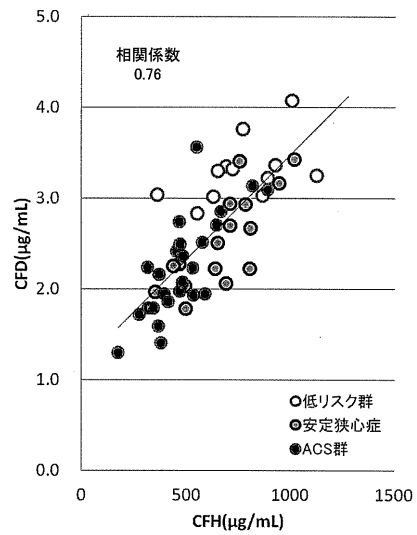
【 図 2 】



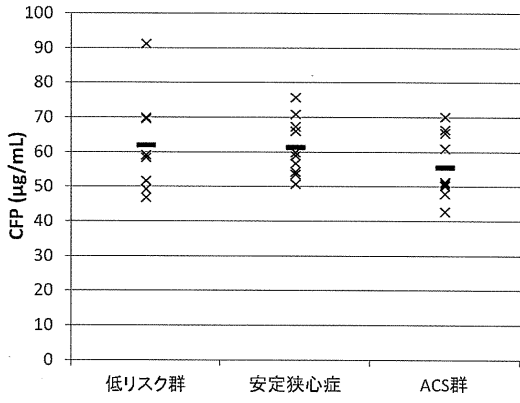
【 図 3 】



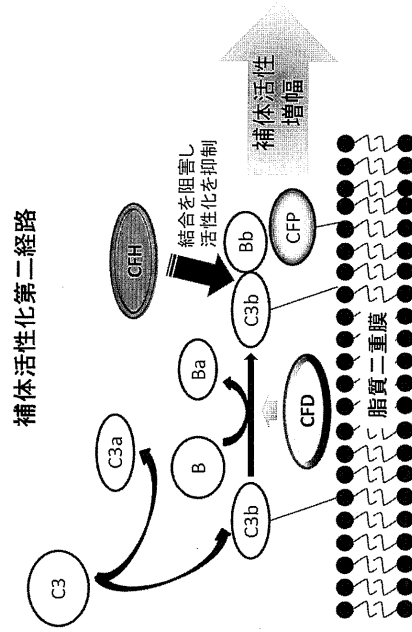
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 坂本 健

東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内

(72)発明者 久下 裕司

北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内

Fターム(参考) 2G041 CA01 FA12

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42 QR50  
QR55 QR62 QR66 QR72 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	缺血性心脏病的评价方法，评价试剂盒和评价装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015078842A</a>	公开(公告)日	2015-04-23
申请号	JP2013214455	申请日	2013-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所 国立大学法人北海道大学		
申请(专利权)人(译)	株式会社日立制作所 国立大学法人北海道大学		
[标]发明人	半澤宏子 坂本健 久下裕司		
发明人	半澤 宏子 坂本 健 久下 裕司		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/62 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/564 A61P9/10 C07K14/472 C07K14/745 C07K16/36 G01N33/50 G01N33/53 G01N2333/4716 G01N2800/324		
FI分类号	G01N33/53.R G01N27/62.V C12Q1/68.A C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
其他公开文献	JP6282436B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：通过简单的操作即可高精度评估缺血性心脏病。 解决方案：测量受试者血液样本中补体因子H和/或补体因子D的步骤，以及在上述步骤中测得的补体因子H和/或补体因子D的浓度用作参考。 如果浓度低于参考值，则确定为缺血性心脏病的严重程度较高。 [选择图]无

統計解析は、平均値±標準偏差(SD)として標記した。P値は片側のStudent's t-検定  
 0069】  
 表1に被験体のプロフィールを示した。  
 表1】

被験体	低リスク群* (n=25)	安定狭心症群 (n=51)	急性心筋梗塞群 (n=50)
年齢(才)	58±8.2	65.9±6.9	61.8±8.5
性別	男性	男性	男性
収縮期血圧 (mmHg)	123.6±10.4	141.2±24.9	128.7±17.6
BMI (%)	22.2±1.7	24±3.3	24.7±3.2
血糖値 (mg/dL)	94.5±6.9	130.8±40.4	156.2±54.8
喫煙歴あり	5 (20.0%)	41 (80.4%)	26 (52.0%)
総コレステロール (mg/dL)	198.8±34.9	161.8±36.7	190.4±37.7
LDLコレステロール (mg/dL)	117±35.8	94.9±32.7	122.5±34.7
HDLコレステロール (mg/dL)	55±12.7	46.8±12.7	48.9±12.2
トリグリセリド (mg/dL)	125.4±118.4	128.9±60.3	159.7±187
高感度CRP (ng/mL)	700±600	1700±2000	2700±9500

\*低リスク群:健康ボランティアのうち、①心疾患危険因子5項目(高血圧、肥満、高血糖、喫煙、脂質異常)のうち、該当が1項目以下、②心電図およびX線検査等により心臓に異常所見がみとめられない、③服薬(脂質