

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3806694号  
(P3806694)

(45) 発行日 平成18年8月9日(2006.8.9)

(24) 登録日 平成18年5月19日(2006.5.19)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/25 (2006.01)	C 1 2 Q 1/25	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/50	

請求項の数 8 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-586802 (P2002-586802)	(73) 特許権者	500204577
(86) (22) 出願日	平成14年5月4日(2002.5.4)		バイオサイト インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2004-520598 (P2004-520598A)		アメリカ合衆国92121カリフォルニア
(43) 公表日	平成16年7月8日(2004.7.8)		州サン・ディエゴ、ローゼル・ストリート
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014219		11030番 スウィート・ディ
(87) 国際公開番号	W02002/089657	(74) 代理人	100105991
(87) 国際公開日	平成14年11月14日(2002.11.14)		弁理士 田中 玲子
審査請求日	平成15年6月11日(2003.6.11)	(74) 代理人	100106840
(31) 優先権主張番号	60/288,871		弁理士 森田 耕司
(32) 優先日	平成13年5月4日(2001.5.4)	(72) 発明者	バルカース, ガナース・イー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 92025 カリフォル
(31) 優先権主張番号	60/315,642		ニア州 エスコンディド, パセオ デル
(32) 優先日	平成13年8月28日(2001.8.28)		ソル 2893
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性冠状動脈症候群の診断マーカーおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者から得たサンプル中のBNPの濃度およびBNPに関連するマーカーの濃度から成る群より選ばれる第1の診断指標を決定すること；

前記患者の1またはそれ以上の第2の診断指標を決定すること、ここで前記1またはそれ以上の第2の診断指標が、アネキシンV、 - エノラーゼ、心臓トロポニンI (遊離および/または複合体)、心臓トロポニンT (遊離および/または複合体)、クレアチンキナーゼ - MB、グリコーゲンホスホリラーゼ - BB、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ホスホグリセリン酸ムターゼ - MB、およびS - 100a oからなる群より選ばれるマーカーの濃度であり；および、

前記第1の診断指標および前記1またはそれ以上の第2の診断指標を前記患者の心筋虚血の存在または不存在と関連づけること；

を含む、患者の心筋虚血の検出方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

前記患者の1またはそれ以上の第3の診断指標を決定すること、ここで前記1またはそれ以上の第3の診断指標が、 - トロンボグロブリン、D - ダイマー、フィブリノペプチドA、血小板由来増殖因子、プラスミン - - 2 - 抗プラスミン複合体、血小板第4因子、プロトロンピンフラグメント1 + 2、P - セレクチン、トロンピン - 抗トロンピンIII複合体、血栓前駆体タンパク質、組織因子、およびフォン・ビルブランド因子

からなる群より選ばれるマーカーの濃度であり；および、

前記 1 またはそれ以上の第 3 の診断指標を前記患者の心筋虚血の存在または不  
存在と関連づけること；

をさらに含む、方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、

前記患者の 1 またはそれ以上の第 3 の診断指標を決定すること、ここで前記 1  
またはそれ以上の追加の診断指標が、C - 反応性タンパク質、セルロプラスミン、フィブ  
リノーゲン、 1 - 酸性糖タンパク質、 1 - アンチトリプシン、およびハプトグロビン  
からなる群より選ばれるマーカーの濃度であり；および、

10

前記 1 またはそれ以上の第 3 の診断指標を前記患者の心筋虚血の存在または不  
存在と関連づけること；

をさらに含む、方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、

前記患者の 1 またはそれ以上の第 3 の診断指標を決定すること、ここで前記 1  
またはそれ以上の追加の診断指標が、インスリン様成長因子 - 1、インターロイキン - 1  
、インターロイキン - 1 レセプターアンタゴニスト、インターロイキン - 6、インター  
ロイキン - 8、トランスホーミング増殖因子、単球走化性タンパク質 - 1、および腫瘍  
壊死因子 からなる群より選ばれるマーカーの濃度であり；および、

20

前記 1 またはそれ以上の第 3 の診断指標を前記患者の心筋虚血の存在または不  
存在と関連づけること；

をさらに含む、方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法であって、

前記患者の 1 またはそれ以上の第 3 の診断指標を決定すること、ここで前記 1  
またはそれ以上の追加の診断指標が、ヒト好中球エラスターゼ、誘導型一酸化窒素シンタ  
ーゼ、リゾホスファチド酸、マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質、マトリック  
スメタロプロテイナーゼ - 1、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 2、マトリックスメ  
タロプロテイナーゼ - 3、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 9、キャスパーゼ - 3、  
ヘモグロビン<sub>2</sub>、溶解性細胞間接着分子 - 1 および溶解性血管細胞接着分子 - 1 からな  
る群より選ばれるマーカーの濃度であり；および、

30

前記 1 またはそれ以上の第 3 の診断指標を前記患者の心筋虚血の存在または不  
存在と関連づけること；

をさらに含む、方法。

【請求項 6】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選  
ばれる、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が、前記患者の心筋壊死と心筋虚血とを識別する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに  
記載の方法。

40

【請求項 8】

心筋虚血が、狭心症、安定狭心症、不安定狭心症、および無症候性虚血からなる群から  
選ばれる請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

この出願は、2001年5月4日に出願された米国仮特許出願番号60/288,871  
(Atty整理番号071949-6501)；および2001年8月28日に出願され  
た米国仮特許出願番号60/315,642 (Atty整理番号071949-5501  
)に関連し、かつこれの優先権を主張するものであり、引用することによりそのすべて

50

をそれぞれ本明細書の1部として取り込むものである。

【0002】

【発明の属する技術分野】

本発明は、急性冠状動脈症候群（ACS）の診断マーカーの同定と使用に関連する。種々の見地において、この発明は、ACSの早期の検出および識別の方法に関し、また、ACS症状の状態の不利な事象の危険性についての個々人の同定に関する。

【0003】

（発明の背景）

本発明の背景に関する以下の議論は、単に本発明を理解する上で読み手を助けるために提供するものであり、本発明の先行技術を記述または構成するものと認めるものではない。

10

【0004】

ACSは、心臓への血管傷害の発現であり、また心筋傷害または心筋損傷とも呼ばれ、これは、一般にアテローム硬化症や高血圧症に従属的なものであり、米国における主要な死亡原因である。ACSは、一般にアテローム硬化症のプラーク形成による冠状動脈疾患に関係した閉塞、およびさらなる閉塞または裂のいずれかの進行に起因する。ACSは、安定狭心症、不安定狭心症、または心筋梗塞として発現しうる。

【0005】

「急性冠状動脈症候群」（「ACS」）の用語は、心臓への虚血性の傷害から生じる冠状動脈疾患のグループに適用されてきた。ACSの患者は、病態生理学、臨床的状态、および不利な事象の危険性において異なった、異種のグループを形成する。このような患者は、不安定狭心症、非-ST上昇（「NST」）非-Q波心筋梗塞（「MI」）、ST-上昇非-Q波MI、および経壁（Q波）MI等の連続体を形成する状態を医師に示す。ACSは、1またはそれ以上の冠状動脈中での血栓の沈着と成長に大きく起因すると考えられており、動脈の部分的若しくは完全な閉塞をもたらす、そして頻繁にプラークの破裂を伴い、虚血性傷害をもたらす。ACSは、冠状動脈痙攣や心筋への要求の増加によっても引き起こされうる。総説として、例えばDavis, Clin. Cardiol. 20(増補1):12-17(1997)を参照のこと。

20

【0006】

ACSの重大さは、虚血性傷害の結果としての罹患率と死亡率により強調される。例えば、ACSの状態の4から6週間以内で、死亡またはこれに続く心筋梗塞（MI）の危険性は8~14%であり、死亡、MI、または難治性虚血の割合は15~25%であると、研究者は推定している(TherouxおよびFuster, Circulation 97:1195-1206, 1998)。米国における急性MIによる死亡者の総数は約600,000とされ、ACSの診断、予後、および対処に関連する情報のこの分野の調査は、当然のことながら広範囲に渡っている。循環している心臓トロポニン濃度（例えば、Antman et al., N. Eng. J. Med. 335:1342-9, 1996を参照；また、米国特許番号6,147,688、6,156,521、5,947,124、および5,795,725を参照。これらは、引用することによりそのすべてをそれぞれ本明細書の1部として取り込むものである。）、ST部分の降下（例えば、Savonitto et al., JAMA 281:707-13, 1999を参照。）、循環しているクレアチンキナーゼ濃度（例えば、Alexander et al., Circulation(増補)1629, 1998を参照）、および循環しているc-反応性タンパク質濃度（例えば、Morrow et al., J. Am. Coll. Cardiol. 31:1460-5, 1998参照）等の、ある患者集団においてこのような情報を提供しうるいくつかの可能性のあるマーカーが確認されている。

30

40

【0007】

安定狭心症は、激しい活動やストレスによって起こる狭窄した胸部痛により特徴づけられ、休息や舌下のニトログリセリンにより軽減される。不安定狭心症は、舌下のニトログリセリンにより軽減される休息時の狭窄した胸部痛により特徴づけられる。狭心症の胸部痛は、通常舌下のニトログリセリンにより軽減され、痛みは、通常30分以内に治まる。心筋梗塞は、診断の心電図検査（ECG）のQ波を伴い、30分以上続く狭窄した胸部痛により特徴づけられる。不安定狭心症は、安定狭心症と心筋梗塞との間の臨床的状态を

50

示すと考えられており、通常アテローム硬化症のプラーク破裂および血栓の形成に係る。この点において、アテローム硬化症のプラーク破裂は、心筋梗塞の最も一般的な原因となる。

【 0 0 0 8 】

安定狭心症の間に炎症が起こり、プラーク破裂のマーカー、血小板の活性化、および早期血栓症が、不安定狭心症の重篤度の進行の同定とモニターに用いられる。定義によれば、狭心症の発作の間に起こる心筋損傷は可逆であり、一方、心筋梗塞の間に起こる損傷は不可逆である。この形式によれば、心筋傷害の特異的マーカーは、心筋梗塞を同定するために用いることができる。穏和な不安定狭心症から重篤な不安定狭心症および心筋梗塞への冠状動脈疾患の進行は、プラークの不安定さおよび動脈の閉塞の度合いに関連する。安定なプラークが増大してより閉塞的になるとこの進行はゆっくりと起こり、不安定なプラークが破裂し、血小板の活性化および閉塞性血栓の形成をもたらすと、これは急激に起こりうる。心筋梗塞は、不安定狭心症と同様の病態生理を最も頻繁に共有するので、これら2つの事象間の唯一の区別が心筋損傷の可逆性とすることが可能である。しかし、重篤な不安定狭心症と穏和な心筋梗塞との間の唯一の区別が臨床的診断に基づいているので、心筋損傷のマーカーは不安定狭心症を有していると診断された患者の末梢循環においても現れるであろう。

10

【 0 0 0 9 】

現在のACSの診断方法は、一般的に臨床的症状、心電図検査( ECG )、および末梢循環の心臓マーカーの測定を含むものである。血管造影も、通常不安定狭心症および急性心筋梗塞( AMI )に係る重篤な胸部痛の場合に用いられる。ACSの患者は、頻繁に首、あご、肩、または左若しくは両方の腕の内側にしばしば広がる狭窄した胸部痛を有し、呼吸困難、発汗、動悸、頭のふらつき、および吐き気の症状を伴いうる。心筋虚血は、Q波およびST部分の変化等の診断のECGの変化を引き起こしうる。心臓酵素の血漿濃度の上昇は、重篤な不安定狭心症および心筋梗塞に係る心臓組織壊死の度合いを反映するであろう。

20

【 0 0 1 0 】

従って、この技術分野において、ACSの型を識別し、遅発の不利な事象の危険性を有するこれら個体をも同定できる、ACSの迅速、高感度で特異的な診断方法が現在求められている。このような診断方法は、有益な処置および治療を受けられる患者の数を非常に増加させ、間違った診断に係る費用を減少させることとなる。

30

【 0 0 1 1 】

( 発明の概要 )

本発明は、ACS、虚血、および/または壊死の診断および/または予後のマーカーの同定および使用に関連する。ここに記載された方法および組成物は、種々の形態のACSの診断、識別および予後に用いるために、迅速、高感度で特異的な診断方法に対するこの技術分野の要求に合致しうるものである。さらに、本発明の方法および組成物は、ACS患者の処置およびさらなる診断指標の発展を容易にするために用いることもできるものである。

【 0 0 1 2 】

「虚血および虚血性の」の用語は、心臓への血流の減少の結果としての心筋への損傷と関連する。「狭心症」、「安定狭心症」、「不安定狭心症」、「無症候性虚血」の用語は、一般的に心筋虚血に関連する。当業者はこれらの用語を認識するはずであり、そしてこれらは「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」第17版、1999、Ed.Keryn A.G.Lane、pp.1662-1668に記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。虚血の用語は、当業者が軽症の心筋傷害または損傷と見なすであろうものにも関連する。虚血の用語は、Journal of the American College of Cardiology 36、959-969(2000)にさらに記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。

40

【 0 0 1 3 】

50

「壊死および壊死性の」の用語は、心臓への血流の減少または停止の結果としての心筋細胞死と関係する。心筋壊死は、心筋虚血より重篤な心臓の状態である。「心筋梗塞」の用語は、一般的に心筋壊死と関連する。当業者はこれらの用語を認識するはずであり、そしてこれらは「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」第17版、1999、Ed.Keryn A.G.Lane、pp.1668-1677に記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。壊死の用語は、当業者が重症の心筋傷害または損傷と見なすであろうものにも関連する。心筋梗塞および壊死の用語は、Journal of the American College of Cardiology 36、959-969(2000)にさらに記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。

【0014】

種々の知見として、この発明は、患者のACSの診断、予後、または識別に關係するマーカーを同定する物質および工程に關係し、これらのマーカーを用いて、患者を診断および処置し、および/または処置計画の経過をモニターし、これらの状態の処置や予防の利益を提供しうる化合物および医薬組成物をスクリーニングする物質および工程に關係する。

【0015】

最初の知見として、この発明は、患者から得た試験サンプルを心筋傷害の1またはそれ以上のマーカーの存在または量について分析することによるACSの診断方法を特徴とする。これらの方法は、その存在または量がACSの診断、予後、または識別に關係する、1またはそれ以上のマーカーを同定することを含みうる。このようなマーカーが同定されると、患者サンプル中のこれらのマーカーの濃度が測定できる。ある態様では、これらのマーカーは、ACSの診断、予後、または識別に關係する診断濃度と比較できる。患者の濃度を診断濃度と関連づけることにより、ACSの存在または不存在、および患者における将来の不利な結果の可能性を迅速かつ正確に決定できうる。

【0016】

以下の議論の目的として、心筋梗塞の診断および予後に適用できるとして記載されている方法は、一般的に安定狭心症および不安定狭心症の診断および予後に適用できると考えられる。

【0017】

ある態様では、複数のマーカーから個別にまたは小グループとして得られたものと比較して、分析の予測価を増加させるために、これらの複数のマーカーが組み合わせられる。好ましくは、記載された方法の予測価を増強するために、心筋傷害の1またはそれ以上の特異的マーカーが、心筋傷害の1またはそれ以上の非特異的マーカーと組み合わせられる。

【0018】

ここで用いられる「マーカー」の用語は、患者の試験サンプルをスクリーニングする標的として用いられる分子を指す。このような分子標的の例としては、タンパク質またはポリペプチドがある。本発明でマーカーとして用いられる「タンパク質またはポリペプチド」は、これらのいずれのフラグメント、特に、免疫学的に検出可能なフラグメントをも含むことを企図されている。当業者は、血管傷害により損傷した心臓の細胞から放出されるタンパク質が、このようなフラグメントに分解または切断されることを認識できるはずである。さらに、あるマーカーは、不活性な形態で合成され、タンパク質分解によりその後活性化されうる。このようなマーカーの例は、以下に記載される。ここで用いられる「関連したマーカー」の用語は、マーカーそれ自身の代理として検出されうる特定のマーカーの1またはそれ以上のフラグメントを指す。

【0019】

現在のところ、BNPおよびBNP関連ペプチドは、心筋虚血のマーカーとしては用いられてこなかった。さらに、炎症、凝固、およびプラーク破裂等の種々の病態進行の他のマーカーは、心筋虚血のマーカーの大きなパネルの部分集合としては用いられてこなかった。この発明の好ましいマーカーは、心筋梗塞、不安定狭心症、および安定狭心症の患者の診断、識別、および予後を助けることができる。

【0020】

ここで用いられる「試験サンプル」の用語は、診断、予後、または評価の目的で得られた生物学サンプルを指す。ある態様では、このようなサンプルは、進行している状態の結果または状態の処置計画の効果を決定する目的のために得られるであろう。好ましい試験サンプルには、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿および唾液が含まれる。さらに、当業者は、いくつかの試験サンプルが分画や精製工程、例えば、全血液を血清または血漿成分に分離すること、の後に、容易に分析できることを認識できるはずである。

【0021】

ここで用いられる「心筋傷害の特異的マーカー」の用語は、心臓組織に典型的に関係する分子であり、そしてそれは心臓傷害に関連づけられるが、他の型の傷害には関連づけられないものを指す。このような心臓傷害の特異的マーカーには、アネキシンV、B型ナトリウム排泄増加性ペプチド、 $\alpha$ -エノラーゼ、心臓トロポニンI（遊離および/または複合体）、心臓トロポニンT（遊離および/または複合体）、クレアチンキナーゼ-MB、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ホスホグリセリン酸ムターゼ-MB、およびS-100a0が含まれる。これらの特異的マーカーは、以下に詳細に記載される。

10

【0022】

ここで用いられる「心筋傷害の非特異的マーカー」の用語は、凝固および鬱血または急性期反応物質の典型的な一般的マーカーである分子を指す。このようなマーカーは、心臓傷害の事象において上昇しうるが、非心臓の事象によっても上昇しうる。血小板の活性化および凝固の機構の因子には、 $\alpha$ -トロンボグロブリン、D-ダイマー、フィブリノペプチドA、血小板由来増殖因子、プラスミン- $\alpha$ -2-抗プラスミン複合体、血小板第4因子、プロトロンビンフラグメント1+2、P-セレクチン、トロンビン-抗トロンビンIII複合体、血栓前駆体タンパク質、組織因子、およびフォン・ビルブランド因子が含まれる。これらの非特異的マーカーは、以下に詳細に記載される。

20

【0023】

ここで用いられる「急性期反応物質」の用語は、感染、傷害、手術、外傷、組織壊死等を含む種々の傷害で起こるストレスの多いまたは炎症性の状態に応じてその濃度が上昇するタンパク質を指す。急性期反応物質の発現および血清濃度の上昇は、傷害の型に特異的ではなく、むしろ傷害に対する恒常性反応の一部である。

【0024】

いくつかの成分が必要でない場合でも、恐らく広範囲の傷害を処理するために、すべての急性期反応物質は傷害に応じて産生される。古典的急性期タンパク質の例には、C-反応性タンパク質、セルロプラスミン、フィブリノーゲン、 $\alpha$ -1-酸性糖タンパク質、 $\alpha$ -1-アンチトリプシン、およびハプトグロビンを含む。インスリン様成長因子-1、インターロイキン-1、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、インターロイキン-6、インターロイキン-8、トランスホーミング増殖因子、単球走化性タンパク質-1、および腫瘍壊死因子のような種々のサイトカインおよび関連分子は、急性期反応にも深く関与する炎症反応の成分である。このようなサイトカインは、傷害部位から血流に放出され、それ自身他の急性期タンパク質の発現を誘導する能力を有する。

30

【0025】

心筋傷害の他の非特異的マーカーには、アテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーを含む。アテローム硬化症のプラークは、蓄積した脂質、平滑筋細胞、結合組織、およびグリコサミノグリカンからなる。このようなプラークを含む血管は、プラーク形成が進行すると、収縮期の膨張を減少させ、異常急激波伝播を起こし、次第に弾力性を減少させる。プラークは、重篤な狭窄と全体的な動脈閉塞を進行させうる。いくつかのプラークは安定であるが、脂質と炎症細胞を多く含む他のものは典型的に薄い繊維性の被覆を有しており、自然な破裂を受けうる。これらの不安定プラークは、急性虚血事象の発症により緊密に関係する。従って、アテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーは、可能性あるACSの犠牲の診断および評価に有用であろう。このようなアテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーには、ヒト好中球エラスターゼ、誘導型一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファチド酸

40

50

、マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 2、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 3、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ - 9が含まれる。

【0026】

心筋傷害の他の非特異的マーカーには、キヤスパーゼ - 3、ヘモグロビン<sub>2</sub>、溶解性細胞間接着分子 - 1および溶解性血管細胞接着分子 - 1が含まれる。

【0027】

ここで用いられる「診断」の語は、所定の疾患や状態を患者が患っているかどうかを、当業者が見積もりおよび決定することができる方法を指す。当業者はしばしば、1またはそれ以上の診断指標、即ち、その状態の存在、重篤度、または不存在の表示となるマーカー

10

、その存在、不存在、または量、に基づいて診断を行う。

【0028】

同様に、予後はしばしば、1またはそれ以上の「予後の指標」を試験することにより決定される。これらはマーカーであり、患者（または患者から得たサンプル）中でのその存在または量は、所定の経過または結果が起こる可能性を表示するものである。例えば、1またはそれ以上の予後の指標がこのような患者から得たサンプル中で十分に高い濃度に達した場合、その濃度は、より低いマーカー濃度を示す同様の患者と比較して、その患者が将来事象を経験する増大した可能性を有することを示すこととなる。予後の指標の濃度および濃度の変化は、次に罹患率または死亡の増大した可能性と関係し、患者に「不利な結果となる増大した疾病素因と関係する」ものとみなされる。好ましい予後のマーカーは、患者の遅発の不利な事象の発症、または将来のACSの可能性を予測できる。

20

【0029】

診断および予後の指標の使用に関連してここで用いられる「関連づけ」の用語は、患者の指標の存在または量を、所定の状態で患うと知られている人若しくはその危険性がある人、または、所定の状態に影響されない、即ち、「健常人」として知られる人の指標の存在または量と比較するものを指す。例えば、患者のサンプルのマーカー濃度は、特異的な型のACSと関係しているとして知られた濃度と比較できる。サンプルのマーカー濃度は、診断と関連づけられたといわれ、これは、当業者が特異的な型のACSを患っている患者かどうかを決定するためにマーカー濃度を使用でき、これに従って対応できることを示すものである。あるいは、サンプルのマーカー濃度は、健常人の集合で見られる平均的な濃度のように、よい結果（例えばACSの不存在）に関係しているとして知られたマーカー濃度と比較することもできる。

30

【0030】

ある態様では、診断または予後の指標は、単にその存在または不存在によって、状態または疾患と関連づけられる。他の態様では、診断または予後の指標の閾値濃度が確立され、そして患者サンプル中の指標の濃度が単純に閾値濃度と比較されうる。本発明のマーカーの好ましい閾値濃度は、約25 pg/mL、約50 pg/mL、約60 pg/mL、約75 pg/mL、約100 pg/mL、約150 pg/mL、約200 pg/mL、約300 pg/mL、約400 pg/mL、約500 pg/mL、約600 pg/mL、約750 pg/mL、約1000 pg/mL、および約2500 pg/mLである。この文脈で「約」の用語は、+/- 10%を指す。

40

【0031】

また他の態様では、1またはそれ以上の診断または予後のマーカーの複合的決定が行われ、マーカーの一時的変化が診断または予後の決定に用いられうる。例えば、診断指標が1回目に決定され、そして2回目にも決定されうる。このような態様では、1回目から2回目へのマーカーの増加は、特定の型のACSの診断または所定の予後となりうる。同様に、1回目から2回目へのマーカーの減少は、特定の型のACSの表示または所定の予後となりうる。さらに、1またはそれ以上のマーカーの変化の度合いは、ACSの重篤度および将来の不利な事象に関連しうる。

【0032】

50

また他の態様では、1またはそれ以上の診断または予後のマーカーの複合的決定が行われ、マーカーの一時的変化が適切な治療の効果をモニターするために用いられうる。このような態様では、効果的な治療の経過の間にわたって、マーカーの減少または増加を観察することが期待される。

【0033】

ある態様では、比較測定が複数の時点で同一の診断マーカーについて行われるが、所定のマーカーを1時点で、第2のマーカーを第2の時点で測定し、これらのマーカーの比較が診断情報を提供しうることを、当業者は理解するであろう。

【0034】

ここで用いられる「予後を決定すること」の語は、当業者が患者の状態の経過や結果を予測できる方法を指す。「予後」の用語は、100%の正確さで状態の経過や結果を予測できるものを指さず、また、所定の経過や結果が試験マーカーの存在、不存在または濃度に基づいておおよそ起こりそうであると予測できるものを指すものでもない。その代わりに、当業者は、「予後」の用語がある特定の経過や結果が起こることの増大した可能性を指すものと理解できるであろうし、これは、その状態を示していない個体と比較したときに、経過や結果が所定の状態を示す患者において、より起こりそうなものである。例えば、その状態を示していない個体において、所定の結果を示す可能性は、約3%である。好ましい態様では、予後は、所定の結果を示す約5%の可能性、約7%の可能性、約10%の可能性、約12%の可能性、約15%の可能性、約20%の可能性、約25%の可能性、約30%の可能性、約40%の可能性、約50%の可能性、約60%の可能性、約75%の可能性、約90%の可能性、および約95%の可能性である。この文脈において「約」の用語は、+/-1%を指す。

10

20

【0035】

当業者は、予後の指標を不利な結果の疾病素因と関係づけることは統計分析であると理解するであろう。例えば、統計的優位さの濃度によって決定されるような、80 pg/mLより大きなマーカー濃度は、80 pg/mLより少ないかまたは同等の濃度の患者より不利な結果を患いやすい。さらに、ベースライン濃度からのマーカー濃度の変化は、患者の予後を反映するものであり、マーカー濃度の変化の度合いは不利な事象の重篤度と関連するであろう。統計的優位さは、2またはそれ以上の集団を比較することによりしばしば決定され、信頼区間および/またはp値が決定される。例えば、DowdyおよびWearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983を参照のこと。この発明の好ましい信頼区間は、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%および99.99%であり、一方好ましいp値は、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001および0.0001である。予後の指標を不利な結果の疾病素因と関係づける典型的な統計検定は、以下に記載される。

30

【0036】

他の態様では、予後または診断指標の濃度の変化の閾値度合いが確立され、患者サンプル中の指標の濃度の変化の度合いが、濃度の変化の閾値度合いと単純に比較されうる。この発明のマーカーの濃度の好ましい閾値変化は、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約50%、約75%、約100%および約150%である。この文脈において「約」の用語は、+/-10%を指す。また他の態様では、「ノモグラム」が確立され、これにより、予後または診断指標の濃度を所定の結果に関係した疾病素因と直接関連づけることができる。集団の平均ではなく個々のサンプル測定結果が参照されるので、2つの数値をこの測定の不確実性がマーカー濃度の不確実性と同様であるとの理解と関連させるように、当業者はこのようなノモグラムの使用に熟知している。

40

【0037】

また他の知見として、この発明は、ACSと診断された患者に用いる処置計画を決定する方法に関連する。この方法は、好ましくは以下に記載されるように1またはそれ以上の診断若しくは予後のマーカーの濃度を決定すること、および患者の診断を決定するためにそのマーカーを用いることを含む。診断に関係する不利な結果の増大する疾病素因を減少さ

50

せることにより患者の予後を改善する1またはそれ以上の処置計画は、患者を処置するために用いることができる。このような方法は、上述のように、患者の予後を改善できる物質の薬理的な化合物のスクリーニングにも用いられる。

【0038】

さらなる知見として、この発明は、患者の診断または予後を決定するためのキットに関連する。これらのキットは、好ましくは患者サンプル中の1またはそれ以上のマーカー濃度を測定する装置および試薬、また分析を行うための使用説明書を含む。任意に、このキットは、マーカー濃度を予後に変換する1またはそれ以上の方法を含みうる。このようなキットは、好ましくは1またはそれ以上のこのような決定を行うのに十分な試薬を含む。

【0039】

(発明の詳細な記載)

本発明に従って、患者のACSの診断、予後、または識別に関係するマーカーの同定と使用のための方法および組成物が提供される。このようなマーカーは、患者の診断および処置および/または処置計画の経過のモニター；このような状態の処置または予防に有益なものを提供する化合物および医薬組成物のスクリーニングに使用できるものである。

【0040】

心筋虚血は、心筋の酸素の供給と要求との平行失調によって起こるものである。特に、不十分な血液供給により要求が供給を超える。心臓は、全体重に対して少ない割合を占めるが、身体の酸素消費の7%の原因となる。心臓組織の代謝は、非常に酸素を消費し、不十分な血液供給に対して補償する蓄えをほとんど有していない。血液供給が心筋の要求に不十分なレベルに減少した場合、その組織は急激に低酸素となり、毒性の細胞代謝産物が取り除かれなくなる。心筋細胞は局所の微小血管内に残存している酸素供給物を急速に使用し、酸素を消費する代謝が持続する時間の長さは動脈閉塞の度合いに間接的に比例する。酸素供給物を使い果たすと、電子受容体としての酸素がもはや利用不可能なので、酸化のリン酸化が持続できなくなり、ピルビン酸はアセチルCoAに変換できず、クエン酸回路に入れなくなる。心筋の代謝は、蓄えられたグリコーゲンとグルコースを用いた無酸素代謝に転換し、ピルビン酸が乳酸に発酵される。乳酸の蓄積は、ACSの個体の胸部痛の主要な原因である。虚血が持続すると、乳酸および他の酸性中間物質が蓄積するので心臓組織はより酸性となり、ATP濃度が低下し、利用可能なエネルギー源が涸渇する。心臓組織は、虚血事象の15~20分後に再灌流されれば回復できる。細胞の蓄えられたグリコーゲンが涸渇すると、細胞は徐々にミトコンドリアの膨張および細胞膜の完全性の損失等の壊死の特徴を示す。再灌流により、おそらくイオン平衡を維持する細胞の不能の結果として、これらの損傷した細胞は死ぬ。細胞膜の完全性の損失は、細胞質内容物を循環系に放出する原因となる。

【0041】

安定狭心症、不安定狭心症、および心筋梗塞はすべて、心筋虚血に関係する狭窄した胸部痛という1つの共通する特徴を共有する。狭心症は、診断のECGの変化を伴う若しくは伴わない臨床的症狀の医師による解釈を通じて安定若しくは不安定に分類される。「安定」または「不安定」という狭心症の分類は、プラークそのものの安定性を指すものではなく、むしろ胸部痛を顕在化させるのに必要な激しい活動の度合いを指す。最も注目になるものとして、明白な心筋梗塞の場合の他は、安定または不安定(または軽症の心筋梗塞でさえ)としての胸部痛の分類は、完全に主観的なものである。診断およびこの場合の区別は、動脈の閉塞度合いを定量しうる血管造影によるのではなく、むしろ臨床的症狀の医師の解釈によりなされるのである。

【0042】

安定狭心症は、激しい活動やストレスで起こる狭窄した胸部痛により特徴づけられ、休息や舌下のニトログリセリンにより軽減される。安定狭心症の患者の冠状動脈血管造影により、少なくとも1つの冠状動脈において50~70%の遮断が通常見られる。安定狭心症は、通常臨床的症狀とECGの変化の評価により診断される。安定狭心症の患者は、一時的なST部分の異常を有するが、安定狭心症に関係したこれらの変化の感度と特異性は低

10

20

30

40

50

い。

【0043】

不安定狭心症は、舌下のニトログリセリンにより軽減される休息時の狭窄した胸部痛により特徴づけられる。狭心症の胸部痛は、通常舌下のニトログリセリンにより軽減され、痛みは通常30分以内に治まる。不安定狭心症には：クラスI、新規の発症で、重篤で、または促進された狭心症として特徴づけられる；クラスII、重篤度が増し、持続し、またはニトログリセリンを必要とすることを特徴とする休息時の亜急性の狭心症；そしてクラスIII、休息時の急性狭心症として特徴づけられる；の3つの分類がある。不安定狭心症は、安定狭心症とAMIとの間の臨床的状态を示し、主として、アテローム硬化症、冠状動脈痙攣、または続いて起こる血栓閉塞を伴う非閉塞性プラークへの出血の重篤度および範囲の進行によるものと考えられている。不安定狭心症の患者の冠状動脈血管造影により、少なくとも1つの冠状動脈において90%またはそれ以上の遮断が通常見られ、ベースラインの心筋の酸素要求を満たす酸素供給でさえ不能となる結果もたらす。安定なアテローム硬化症プラークの遅い成長または後に続く血栓の形成を伴う不安定なアテローム硬化症プラークの破裂は、不安定狭心症の原因となる。これらの原因の両方が、冠状動脈の致命的な狭窄をもたらす。不安定狭心症は、通常アテローム硬化症プラークの破裂、血小板の活性化、および血栓の形成に関係する。不安定狭心症は、通常臨床的症状、ECG変化、および（もし存在すれば）心臓マーカーの変化によって診断される。不安定狭心症の患者の処置には、硝酸塩、アスピリン、GPIIb/IIIa阻害剤、ヘパリン、およびベータ遮断薬が含まれる。血栓崩壊治療は、不安定狭心症患者に有益であるとは示されておらず、カルシウムチャンネル遮断薬も効果がないであろう。患者は、血管形成術およびステントも受けうる。最後に、不安定狭心症患者は、AMIに発展する危険性がある。

10

20

【0044】

心筋梗塞は、診断のECGのQ波を伴いうる30分以上継続する狭窄した胸部痛により特徴づけられる。AMIのほとんどの患者は、冠状動脈疾患を有しており、AMIの25%の場合で「無症候性」(silent)または無症候の梗塞であり、糖尿病の個体は無症候性梗塞の疑いがよりつよい傾向にある。集団調査により、20~60%の非致命的な心筋梗塞が患者に認識されない無症候性梗塞であることが示されている。AMIの非定型の臨床的状态には、鬱血性心不全、重篤または持続した発作を伴わない狭心症、非定型の局所の痛み、脳卒中に似た中枢神経系の発現、不安および神経質、突然性躁病または精神病、失神、虚弱、急性消化障害、および末梢血栓形成が含まれる。AMIは、通常臨床的症状、ECGの変化、および心臓性タンパク質で最も顕著には心臓トロポニン、クレアチンキナーゼ-MBおよびミオグロビンの上昇、により診断される。AMIの処置は、過去10年の間改善し、患者の結果を改善し、AMIに関係した死亡率を30%減少させることとなった。AMI患者の処置は、梗塞の大きさを制限し、および、閉塞物質を除去し、心臓組織への酸素供給を増加させ、または心臓組織の酸素要求を減少させることにより結果を改善する、薬を投与することにより成し遂げられる。処置には、酸素の補給、アスピリン、GPIIb/IIIa阻害剤、ヘパリン、血栓崩壊剤(tPA)、硝酸塩(ニトログリセリン)、マグネシウム、カルシウムチャンネルアンタゴニスト、 $\alpha$ -アドレナリンレセプター遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、血管形成(PTCA)、および管内冠状動脈ステントが含まれる。

30

40

【0045】

胸部痛発症から30分の時点は、虚血による可逆性心筋損傷の時期を示すものと考えられる。安定狭心症および不安定狭心症は、血管造影により動脈の閉塞がそれぞれ50~70%および90%以上のものとして特徴づけられ、心筋梗塞は、完全若しくはほぼ完全な閉塞により特徴づけられる。一般的な誤解は、安定狭心症および不安定狭心症はプラークの安定性を指すもの、または、心筋梗塞と一緒に、別個の疾患であるというものである。安定狭心症はしばしば不安定狭心症に進行し、不安定狭心症はしばしば心筋梗塞に進行するので、安定狭心症、不安定狭心症、心筋梗塞はすべて、重篤度の変化した冠状動脈疾患として特徴づけることができる。近年、次の冠状動脈疾患の進行の生理学的モデルが提唱さ

50

れた：炎症 プラーク破裂 血小板活性化 早期血栓症 早期壊死。このモデルは、安定狭心症の間に炎症が起こり、プラーク破裂、血小板活性化、および早期血栓症のマーカーが不安定狭心症の重篤度の進行を同定しモニターするのに用いることができるとの理論に合致させて設計されたものである。狭心症の発作の間に起こる心筋損傷は、定義上可逆性であるが、心筋梗塞の間に起こる損傷は、不可逆性である。従って、安定狭心症、不安定狭心症、およびAMIの区別のためのこのモデルには、2つの提唱された区切りがある。第1のものは、安定狭心症ではプラーク破裂が起こらないとする理論のもとで、炎症とプラーク破裂との間に起こる。第2のものは、不安定狭心症の間に受けた心筋損傷は可逆性のものであるとの理論のもとで、早期血栓症と早期壊死との間で起こる。早期心筋壊死を除いては、これらの事象が冠状動脈疾患のすべての形態と関係でき、この診断経路に沿った進行が必ずしも疾患の進行を示すものではないということを理解するのは重要である。軽症の不安定狭心症から重篤な不安定狭心症および心筋梗塞への冠状動脈疾患の進行は、プラークの不安定性と動脈閉塞の度合いに関連する。安定なプラークが増大しより閉塞的になると、この進行はゆっくりと起こり、血小板活性化および閉塞性血栓の形成により不安定なプラークが破裂すると、これは急激に起こりうる。心筋梗塞は、最も頻繁に不安定狭心症と同一の病態生理を共有するので、これら2つの事象の唯一の区別が心筋損傷の可逆性であるとするのは可能である。定義上、不安定狭心症は可逆性損傷を起こし、一方心筋梗塞は不可逆的損傷を起こす。不安定狭心症の患者には心筋壊死の存在が示されると公表した報告があった。定義上、これらの患者は、実際に早期のAMIを経験するかもしれない。にもかかわらず、これらの患者が早期AMIの代わりに不安定狭心症であると診断されたとしても、高い度合いの重篤度は、早期の集中的な処理により彼らが大いに利益を受けうることを示す。心筋虚血は、安定狭心症、不安定狭心症、および心筋梗塞の病因の主要な決定因子であり、これらは個々の疾患であると考えべきではない。むしろ、これらは、虚血による心筋損傷の増大する重篤度を反映するものである。

10

20

#### 【0046】

##### A C Sの凝固カスケード

血管の損傷に続く血液の損失を止めまたは防ぐために用いられる、基本的な2つのメカニズムがある。第1のメカニズムは、血管傷害部位への付着を容易にする血小板の活性化を伴う。活性化した血小板は、次いで血液の損失を減少させまたは一時的に止める血小板栓を形成するように凝集する。活性化した血小板から分泌される多数の因子によって、血小板の凝集の進行、栓の形成および組織の修復がすべて促進され、増強される。血小板の凝集および栓の形成は、活性化した血小板同士の間でのフィブリノーゲン架橋の形成により媒介される。第2のメカニズムにより同時に起こる活性化である凝固カスケードは、フィブリノーゲンからのフィブリンの発生および血小板栓を強固にする不溶性のフィブリン血塊の形成をもたらす。

30

#### 【0047】

凝固カスケードは、不活性またはチモーゲンの形態で通常存在する多数のセリンプロテイナーゼを伴う酵素による経路である。血管構造または血管の傷害の異質な表面の存在は、それぞれ、内因性および外因性の凝固経路の活性化をもたらす。最終の共通の経路が続き、これは、セリンプロテイナーゼトロンピンによるフィブリン、および最終的には架橋したフィブリン血塊の発生をもたらすものである。凝固カスケードにおいて、1つの活性化酵素が最初に形成され、これは他のものを活性化する他の酵素を活性化できるものであり、この工程は、調整されずにおかれれば、すべての凝固酵素が活性化されるまで続くこととなる。都合のよいことに、フィブリン溶解並びに凝固経路および血塊形成の活性を調整する内因性のプロテイナーゼ阻害因子の作用等の、適切なメカニズムがある。

40

#### 【0048】

フィブリン溶解は、タンパク質分解による血塊溶解工程である。凝固に類似した方法により、フィブリン溶解は、チモーゲンから活性化したセリンプロテイナーゼにより媒介される。セリンプロテイナーゼプラスミンは、フィブリンを血塊から遊離された小さい分解物に分解する原因となり、血塊の溶解をもたらす。フィブリン溶解は、血塊形成を調整する

50

ために凝固のすぐ後に活性化される。内因性セリンプロテイナーゼ阻害因子も、フィブリン溶解の調整剤として機能する。

#### 【0049】

血小板は、2～4 μmの平均直径を有する円形または楕円形の円盤であり、通常血液中に200,000～300,000/μlの濃度で見出される。これらは、血管の完全性を維持し、血管の傷害部位で血小板栓を形成することにより出血を最初に止め、血小板栓を安定化するフィブリン形成の工程に寄与することにより、止血を維持する基本的な役割を果たす。血管傷害が起こると、血小板は傷害部位および互いに付着し、付着した血小板および傷害が起こった内皮細胞から放出される種々の物質により凝集するように刺激される。これは、放出反応に次ぐものであり、この放出反応では血小板から細胞内顆粒の内容物を分泌し、血小板栓を形成する。凝固カスケードにおいてトロンピンによるフィブリンの形成は、血塊反応に続く栓の硬化およびフィブリンの架橋による栓の安定化を可能にさせる。活性トロンピンは、同時に起こる凝固カスケードで発生し、血小板の活性化および凝集を誘導する能力も有する。

10

#### 【0050】

凝固カスケードは、外因性または内因性のいずれかの経路を通じて活性化されうる。これらの酵素の経路は、1つの最終の共通経路を共有する。凝固活性化の結果は、架橋したフィブリン血塊の形成である。フィブリン溶解は、凝固活性化のすぐ後に活性化されるタンパク質分解による血塊の溶解工程であり、おそらく血塊形成の速度と量を制御する作用である。ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)および組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)は、タンパク質分解によりプラスミノゲンを切断し、活性セリンプロテイナーゼプラスミンを発生させる。プラスミンは、タンパク質分解により架橋フィブリンを消化し、血塊溶解およびフィブリン分解物の産生と放出をもたらす。

20

#### 【0051】

凝固カスケードの共通経路の第1の工程は、活性トロンピンを生成する第Xa因子/第Va因子プロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンピンのタンパク質分解による切断を伴う。トロンピンは、フィブリンを形成するようにフィブリノーゲンをタンパク質分解により切断するセリンプロテイナーゼであり、これは血塊形成の間の架橋ネットワーク中に最終的に蓄積される。

#### 【0052】

##### マーカーの具体例

##### (i) 心筋傷害の特異的マーカー

アネキシンVは、リポコルチンV、エンドネキシンII、カルホピンジンI、カルシウム結合タンパク質33、胎盤抗凝固タンパク質I、トロンボプラスミン阻害因子、血管抗凝固因子、およびアンコリンCIIとも呼ばれ、間接阻害因子であり組織因子の調整因子である33kDaのカルシウム結合タンパク質である。アネキシンVは、すべてのアネキシンファミリー構成員に共通するコンセンサス配列を有する4つの相同繰り返しから構成され、カルシウムおよびホスファチジルセリンに結合し、心臓、骨格筋、肝臓、および内皮細胞等の広く種々の組織で発現する(Giambanco, I. et al., J. Histochem. Cytochem. 39:P1189-1198, 1991; Doubell, A.F. et al., Cardiovasc. Res. 27:1359-1367, 1993)。アネキシンVの正常血漿濃度は、<2 ng/mlである(Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251:65-80, 1996)。アネキシンVの血漿濃度は、AMIの個体では上昇する(Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251:65-80, 1996)。広い組織への分布により、アネキシンVの血漿濃度の上昇は、非心臓組織の傷害を含むいずれの状態とも関係するであろう。しかし、血漿アネキシンV濃度が以前の心筋梗塞、胸部痛症候群、弁の心臓疾患、肺疾患、および腎臓疾患の患者では、有意には上昇しないことが1つの研究により見出された(Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251:65-80, 1996)。これらの先行する結果は、ACSマーカーとしてのアネキシンVの臨床的利用が決定される前に、確認を必要とする。アネキシンVは、AMI発症のすぐ後に血流に放出される。AMI患者の血漿中のアネキシンV濃度は、最初の(入院時の)値から減少し、これが血流から急速に除去される

30

40

50

ことを示す(Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251:65-80, 1996)。

【0053】

B型ナトリウム排泄増加性ペプチド(BNP)は、脳型ナトリウム排泄増加性ペプチドとも呼ばれ、32のアミノ酸であり、血圧および液体平衡を調整するためのナトリウム排泄増加系に関係する4kDaのペプチドである(Bonow, R.O., Circulation 93:1946-1950, 1996)。BNPの前駆体は、「プレプロBNP」と呼ばれる108のアミノ酸分子として合成され、これは、「NTプロBNP」と呼ばれる76のアミノ酸N末端ペプチド(アミノ酸1-76)と、BNPまたはBNP32と呼ばれる32のアミノ酸の成熟ホルモン(アミノ酸77-108)とに、タンパク質分解によりプロセッシングされる。これは、これらの種-NTPロBNP、BNP32、およびプレプロBNP-の各々がヒト血漿中で循環できることを示している(Tateyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 185: 760-7 (1992); Hunt et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 1175-83 (1995))。プレプロBNPおよびNTプロBNPの2つの形態、並びにBNP、プレプロBNP、およびNTプロBNP由来のペプチド、並びにBNP、NTプロBNPおよびプレプロBNPのタンパク質分解の結果として血液中に存在するペプチドは、BNPに関連したまたは関係したマーカーとして集合的に記載される。BNPおよびBNPに関連したペプチドのタンパク質分解による分解は、文献にも記載されており、これらのタンパク質分解によるフラグメントも、「BNP関連ペプチド」の用語に含まれる。BNPおよびBNP関連ペプチドは、心室の分泌顆粒中に主に見出され、心室体積の拡張および圧力の過負荷の双方に応じて心臓から放出される(Wilkins, M. et al., Lancet 349:1307-1310, 1997)。BNPの上昇は、増大した心房および肺の楔入圧、心室の収縮期および拡張期の低下した機能、左心室肥大、および心筋梗塞に関係している(Sagnella, G.A., Clinical Science 95:519-529, 1998)。さらに、鬱血性心不全および腎不全に関係した上昇したBNP濃度についての多数の報告がある。BNPおよびBNP関連ペプチドはACSに特異的なものではないが、これらが虚血による細胞損傷のみではなく、ACSに関係したナトリウム排泄増加系の混乱をも示すのであり得るので、これらはACSの高感度のマーカーとなりうる。ここで用いられる「BNP」の用語は、成熟32アミノ酸のBNP分子そのものを指す。当業者が認識するように、しかし、BNPに関連した他のマーカーも、ACSの患者の診断または予後の指標として役に立ちうる。例えば、BNPは、76アミノ酸の「NTプロBNP」と32アミノ酸のBNP分子とにタンパク質分解によりプロセッシングされる108アミノ酸のプレプロBNP分子として合成される。BNPとのその関係によって、NTプロBNP分子の濃度も、患者の診断または予後の情報を提供しうる。「BNPに関連するマーカーまたはBNP関連ペプチド」の語は、32アミノ酸のBNP分子そのもの以外の、プレプロBNP分子を起源とするいずれのポリペプチドをも指す。従って、BNPに関連したまたは関係したマーカーには、NTプロBNP分子、プロドメイン、全32アミノ酸配列よりも小さいBNPのフラグメント、BNP以外のプレプロBNPのフラグメント、およびプロドメインのフラグメントが含まれる。当業者は、循環系がBNPおよびBNP関連分子をタンパク質分解できるプロテアーゼを含んでおり、これらのタンパク質分解された分子(ペプチド)も「BNP関連」とみなされ、そしてこの発明のさらなる主題であることをも認識するであろう。

【0054】

エノラーゼは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、および  $\gamma$  サブユニットから産生される78kDaのホモまたはヘテロダイマーの細胞質タンパク質である。エノラーゼは、解糖経路における2-ホスホグリセレートとホスホエノールピルベートとの変換を触媒する。エノラーゼは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、および  $\delta$  アイソフォームとして存在する。サブユニットはほとんどの組織で見出され、 $\alpha$  サブユニットは心臓および骨格筋で見出され、 $\beta$  サブユニットはニューロンおよび神経内分泌組織で主として見出される。 $\alpha$ -エノラーゼは、 $\beta$  および  $\gamma$  エノラーゼから構成され、筋肉に特異的なものである。 $\alpha$ -エノラーゼの正常血漿濃度は、 $< 10 \text{ ng/ml}$  ( $120 \text{ pM}$ )である。 $\beta$ -エノラーゼは、AMIの個体の血清中で上昇するが、狭心症の個体では上昇しない(Nomura, M. et al., Br. Heart J. 58:29-33,

10

20

30

40

50

1987; Herraез-Dominguez, M.V. et al., Clin. Chim. Acta 64:307-315, 1975)。不安定狭心症および安定狭心症に関係した血漿 - エノラーゼ濃度の起こりうる変化についてのさらなる研究が、必要である。 - エノラーゼの血漿濃度は、心臓手術、筋ジストロフィー、および骨格筋傷害の間で上昇する(Usui, A. et al., Cardiovasc. Res. 23:737-740, 1989; Kato, K. et al., Clin. Chim. Acta 131:75-85, 1983; Matsuda, H. et al., Forensic Sci. Int. 99:197-208, 1999)。 - エノラーゼは、心臓または骨格筋傷害に続いて直ちに血流に放出される。血漿 - エノラーゼ濃度は、心臓手術の手術段階で  $150 \text{ ng/ml}$  以上に上昇し、1週間上昇したまま維持した。血清 - エノラーゼ濃度は胸部痛およびAMIの発症の約12~14時間後に最大となり、発症から1週間経過後にベースラインに近づき、最大濃度は  $1 \mu\text{g/ml}$  に近づいた(Kato, K. et al., Clin. Chim. Acta 131:75-85, 1983; Nomura, M. et al., Br. Heart J. 58:29-33, 1987)。

10

#### 【0055】

トロポニンI (TnI) は、 $25 \text{ kDa}$  のトロポニン複合体の阻害要素であり、すべての横紋筋組織で見出される。TnIは、 $\text{Ca}^{2+}$  の不存在下でアクチンに結合し、アクトミオシンのATPアーゼ活性を阻害する。心臓組織で見出されるTnIアイソフォーム (cTnI) は、骨格筋TnIから40%分岐したものであり、双方のアイソフォームは免疫学的に識別可能である。cTnIの正常血漿濃度は、 $< 0.1 \text{ ng/ml}$  ( $4 \text{ pM}$ ) である。血漿cTnI濃度は、AMIの患者で上昇する。不安定狭心症の患者の血漿cTnI濃度の変化についての研究では、相反した結果が得られたが、cTnIは、安定狭心症の個体の血漿では上昇しない(Benamер, H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998; Bertinchant, J.P. et al., Clin. Biochem. 29:587-594, 1996; Tanasijeвиc, M.J. et al., Clin. Cardiol. 22:13-16, 1999; Musso, P. et al., J. Ital. Cardiol. 26:1013-1023, 1996; Holvoet, P. et al., JAMA 281:1718-1721, 1999; Holvoet, P. et al., Circulation 98:1487-1494, 1998)。心筋虚血の程度が不安定狭心症の重篤度と直接比例するので、不安定狭心症に関係した相反した結果は、cTnIが不安定狭心症の重篤度を決定するために役立つことを示している。血漿cTnI濃度は、心臓外傷、鬱血性心不全、および心臓手術、非虚血性拡張型心筋症、筋障害、CNS障害、HIV感染、慢性腎不全、敗血症、肺疾患、および内分泌障害と連動して上昇しうる(Khan, I.A. et al., Am. J. Emerg. Med. 17:225-229, 1999)。この明らかな非特異性は、イムノアッセイに用いられる抗体の品質と特異性に関連するであろう。cTnIは、心臓細胞死に続いて血流に放出される。AMIの患者のcTnIの血漿濃度は、発症の4~6時間後に有意に上昇し、12~16時間の間に最大となり、1週間上昇したまま持続しうる。不安定狭心症に関係するcTnIの放出の動態も同様であろう。遊離心臓トロポニンI並びに心臓トロポニンIとトロポニンCおよび/またはTとの複合体等の、心臓トロポニンの特異的形態の測定は、ACSの種々の段階を同定する能力を使用者に提供しうる。

20

30

#### 【0056】

遊離および複合体化した心臓トロポニンTは、上述の心臓トロポニンIと類似の方法により用いることができるであろう。心臓トロポニンT複合体は、単独でも、あるいは、全心臓トロポニンIとの一部として発現している時でも、進行している心筋損傷の存在と関連した情報を提供し、有用であろう。進行中の虚血は心臓トロポニンTIC複合体の放出をもたらす、心臓トロポニンTIC：全心臓トロポニンIの高い比率が、解決していない虚血による継続性の損傷の表示となり得ることを示すであろう。

40

#### 【0057】

クレアチンキナーゼ (CK) は、ATPおよびクレアチンからADPおよびホスホクレアチンの可逆的な形成を触媒する  $85 \text{ kDa}$  の細胞質ゾル酵素である。CKは、MおよびB鎖から構成されるホモまたはヘテロダイマーである。CK-MBは、心臓組織に最も特異的であるが、骨格筋および他の組織にも存在するアイソフォームである。CK-MBの正常血漿濃度は、 $< 5 \text{ g/ml}$  である。血漿CK-MB濃度は、AMIの患者では有意に上昇する。血漿CK-MBは、安定狭心症の患者では上昇せず、不安定狭心症の患者における血漿CK-MB濃度の上昇に関する研究では、相反した結果が得られた(Thygesen, K.

50

et al., *Eur. J. Clin. Invest.* 16:1-4, 1986; Koukkunen, H. et al., *Ann. Med.* 30:488-496, 1998; Bertinchant, J.P. et al., *Clin. Biochem.* 29:587-594, 1996; Benamer, H. et al., *Am. J. Cardiol.* 82:845-850, 1998; Norregaard-Hansen, K. et al., *Eur. Heart J.* 13:188-193, 1992)。心筋虚血の範囲が直接不安定狭心症の重篤度に比例するので、不安定狭心症に関連した相反した結果は、CK-MBが不安定狭心症の重篤度を決定するのに役に立ちうることを示している。血漿CK-MB濃度の上昇は、骨格筋の傷害および腎疾患に関係している。CK-MBは、心臓細胞死に続いて血流に放出される。AMIの患者のCK-MBの血漿濃度は、発症の4~6時間後に有意に上昇し、12~14時間の間に最大となり、3日後にベースラインに戻る。不安定狭心症に関係するCK-MB放出の動態も、同様であろう。

10

## 【0058】

グリコーゲンホスホリラーゼ(GP)は、糖原分解の間無機リン酸の存在下でグリコーゲンの非還元末端からグルコースの除去(グルコース-1-リン酸として遊離される)を触媒する188kDaの細胞間アロステリック酵素である。GPはホモダイマーとして存在し、これは4量体の酵素的に活性なホスホリラーゼAを形成するように、もう一つのホモダイマーと結びつく。免疫学的に識別できる、GPの3つのアイソフォームがある。BBアイソフォームは脳および心臓組織で見出され、MMアイソフォームは骨格筋および心臓組織で見出され、LLアイソフォームは肝臓で優位に見出される(Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994)。GP-BBは、通常筋小胞体糖原分解複合体に関係し、この関係は、心筋の代謝状態に依存する(Mair, J., *Clin. Chim. Acta* 272:79-86, 1998)。低酸素症の発症時にはグリコーゲンが切断され、GP-BBが結合形態から遊離細胞質形態に転換される(Krause, E.G. et al., *Mol. Cell Biochem.* 160-161:289-295, 1996)。正常血漿GP-BB濃度は、 $< 7 \text{ ng/ml}$  ( $36 \text{ pM}$ )である。血漿GP-BB濃度は、AMIおよび一時的ST-T上昇の不安定狭心症の患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない(Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994; Mair, J., *Clin. Chim. Acta* 272:79-86, 1998; Rabitzsch, G. et al., *Clin. Chem.* 41:966-978, 1995; Rabitzsch, G. et al., *Lancet* 341:1032-1033, 1993)。さらに、GP-BBは、冠状動脈バイパス手術を受けている患者の手術中のAMIおよび心筋虚血の検出にも用いることができる(Rabitzsch, G. et al., *Biomed. Biochim. Acta* 46:S584-S588, 1987; Mair, P. et al., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32:543-547, 1994)。GP-BBは、CK-MB、心臓トロポニンT、およびミオグロビンに比べ、発症後早期の不安定狭心症およびAMIのより高感度のマーカーであることが示された(Rabitzsch, G. et al., *Clin. Chem.* 41:966-978, 1995)。これは脳でも見出されるので、血漿GP-BB濃度は、虚血性脳傷害の間でも上昇しうる。GP-BBは、通常は細胞壊死の結果である細胞膜の透過性の増加も伴う虚血状態で血流に放出される。GP-BBは、不安定狭心症および一時的ST-T ECG変化を有する個体の胸部痛の4時間以内に有意に上昇し、ミオグロビン、CK-MB、および心臓トロポニンTが正常濃度にとどまる一方で、有意に上昇する(Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994)。さらに、GP-BBは、AMIの患者の胸部痛の発症後1~2時間で有意に上昇しうる(Rabitzsch, G. et al., *Lancet* 341:1032-1033, 1993)。不安定狭心症およびAMIの患者の血漿GP-BB濃度は、 $50 \text{ ng/ml}$  ( $250 \text{ pM}$ )を超えうる(Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994; Mair, J., *Clin. Chim. Acta* 272:79-86, 1998; Krause, E.G. et al., *Mol. Cell Biochem.* 160-161:289-295, 1996; Rabitzsch, G. et al., *Clin. Chem.* 41:966-978, 1995; Rabitzsch, G. et al., *Lancet* 341:1032-1033, 1993)。GP-BBは、CK-BBの特異性と同様に、心筋虚血の非常に高感度のマーカーと思われる。GP-BB血漿濃度は、AMI発症後の最初の4時間以内に上昇し、これは心筋損傷の早期のマーカーとして非常に役に立ちうることを示している。さらに、GP-BBは心臓虚血の間に非結合形態に放出され、外傷性傷害では通常放出されないため、これは心臓組織損傷だけではなく虚血のより特異的マーカーである。これが、心臓手術中の心筋虚血の検出において、GP-BBの有用性として示される最良のものである。GP-BBは、AMIおよび重篤な不安定狭

20

30

40

50

心症の間の早期の心筋虚血の非常に有用なマーカーであろう。

【 0 0 5 9 】

心臓型脂肪酸結合タンパク質 (H - F A B P) は、脂質代謝を伴う細胞質ゾルの 1 5 k D a の脂質結合タンパク質である。心臓型 F A B P 抗原は、心臓組織だけでなく、腎臓、骨格筋、大動脈、副腎、胎盤、および脳でも見出されている (Veerkamp, J.H. and Maatman, R.G., Prog. Lipid Res. 34:17-52, 1995; Yoshimoto, K. et al., Heart Vessels 10:304-309, 1995)。さらに、心臓型 F A B P m R N A は、精巣、卵巣、肺、乳腺、および胃に見出される (Veerkamp, J.H. and Maatman, R.G., Prog. Lipid Res. 34:17-52, 1995)。F A B P の正常血漿濃度は、 $< 6 \text{ ng / ml (400 pM)}$  である。血漿 H - F A B P 濃度は、A M I および不安定狭心症の患者で上昇する (Ishii, J. et al., Clin. Chem. 43:1372-1378, 1997; Tsuji, R. et al., Int. J. Cardiol. 41:209-217, 1993)。さらに、H - F A B P は、A M I の患者の梗塞の大きさを見積もるのに有用であろう (Glatz, J.F. et al., Br. Heart J. 71:135-140, 1994)。H - F A B P 源としての心筋組織は、ミオグロビン / F A B P (グラム / グラム) 比を決定することにより確かめることができる。約 5 の比は、F A B P が心筋源のものであり、より高い比は骨格筋源であることを示す (Van Nieuwenhoven, F.A. et al., Circulation 92:2848-2854, 1995)。骨格筋、腎臓および脳の H - F A B P の存在のために、血漿 H - F A B P 濃度の上昇は、骨格筋傷害、腎臓疾患、または脳卒中と関係しうる。H - F A B P は、心臓組織壊死に続いて血流に放出される。血漿 H - F A B P 濃度は、C K - M B およびミオグロビンよりも早く、胸部痛の発症後 1 ~ 2 時間で有意に上昇する (Tsuji, R. et al., Int. J. Cardiol. 41:209-217, 1993; Van Nieuwenhoven, F.A. et al., Circulation 92:2848-2854, 1995; Tanaka, T. et al., Clin. Biochem. 24:195-201, 1991)。さらに、H - F A B P は急速に血流から除去され、血漿濃度は A M I 発症後 2 4 時間後にベースラインに戻る (Glatz, J.F. et al., Br. Heart J. 71:135-140, 1994; Tanaka, T. et al., Clin. Biochem. 24:195-201, 1991)。

【 0 0 6 0 】

ホスホグリセリン酸ムターゼ (P G A M) は、マグネシウムの存在下で 3 - ホスホグリセリン酸の 2 - ホスホグリセリン酸への転換を触媒する、2 9 k D a の M または B サブユニットから構成される 5 7 k D a のホモまたはヘテロダイマーの細胞間糖分解酵素である。心臓組織はアイソザイム M M、M B、および B B を含有し、骨格筋は主として P G A M - M M を、他のほとんどの組織は P G A M - B B を含有する (Durany, N. and Carreras, J., Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 114:217-223, 1996)。従って、P G A M - M B は、心臓組織に最も特異的なアイソザイムである。P G A M は、A M I の患者の血漿中で上昇するが、A M I、不安定狭心症および安定狭心症に関係する血漿 P G A M 濃度の変化を決定するためにはさらなる研究がなされる必要がある (Mair, J., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 34:1-66, 1997)。血漿 P G A M - M B 濃度の上昇は、関連のない心筋のまたは恐らく骨格組織の損傷と関係するかもしれない。P G A M - M B は、細胞壊死に続いて循環系に最も放出されやすい。P G A M は、ラットの血流中では 2 時間以下の半減期である (Grisolia, S. et al., Physiol. Chem. Phys. 8:37-52, 1976)。

【 0 0 6 1 】

S - 1 0 0 は、 および サブユニットから産生される 2 1 k D a のホモまたはヘテロダイマーの細胞質ゾルの  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質である。これは、 $\text{Ca}^{2+}$  依存シグナル導入経路に沿った細胞工程の活性化に関与すると考えられる (Bonfrer, J.M. et al., Br. J. Cancer 77:2210-2214, 1998)。S - 1 0 0 a o ( アイソフォーム ) は横紋筋、心臓および腎臓で見出され、S - 1 0 0 a ( アイソフォーム ) はグリア細胞で見出されるがシュヴァン細胞では見出されず、そして S - 1 0 0 b ( アイソフォーム ) はグリア細胞およびシュヴァン細胞で高濃度で見出され、ここではこれが主要な細胞質ゾルの構成要素である (Kato, K. and Kimura, S., Biochim. Biophys. Acta 842:146-150, 1985; Hasegawa, S. et al., Eur. Urol. 24:393-396, 1993)。S - 1 0 0 a o の正常血清濃度は、 $< 0.25 \text{ ng / ml (12 pM)}$  であり、その濃度は年齢および性別により影響され、男

性および年をとった個体では高い濃度となる(Kikuchi, T. et al., Hinyokika Kiyo 36:1117-1123, 1990; Morita, T. et al., Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 81:1162-1167, 1990; Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。S - 1 0 0 a o の血清濃度は、A M I の患者で上昇するが、疑似 A M I の狭心症患者では上昇しない(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。不安定および安定狭心症と関係する S - 1 0 0 a o の血漿濃度の変化を決定するためには、さらなる研究が必要である。血清 S - 1 0 0 a o は、腎細胞癌、膀胱癌、腎不全、および前立腺癌、並びに切開心臓手術を受けている患者の血清中で上昇する(Hasegawa, S. et al., Eur. Urol. 24:393-396, 1993; Kikuchi, T. et al., Hinyokika Kiyo 36:1117-1123, 1990; Morita, T. et al., Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 81:1162-1167, 1990; Usui, A. et al., Clin. Chem. 35:1942-1944, 1989)。S - 1 0 0 a o は、細胞死に続いて細胞外空間に放出されるであろう細胞質ゾルタンパク質である。S - 1 0 0 a o の血清濃度は、A M I の患者の入院時に有意に上昇し、入院後 8 時間で最大に増加し、1 週間後に減少してベースラインに戻る(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。さらに、S - 1 0 0 a o は、C K - M B と比べ、A M I 発症後の早期に有意に上昇すると思われる(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。最大血清 S - 1 0 0 a o 濃度は、1 0 0 n g / m l を超えうる。再灌流およびその尿素濃度の上昇に続いて心臓手術患者の血清 S - 1 0 0 a o 濃度の急速な減少により示されるように、S - 1 0 0 a o は腎臓により血流から急速に除去されうるが、A C S との関連で S - 1 0 0 a o の血流への放出および血流からのクリアランスの動態を決定するためにさらなる研究が必要である(Usui, A. et al., Clin. Chem. 35:1942-1944, 1989)。S - 1 0 0 a o は、心臓組織中で高濃度で見出され、心臓傷害の高感度のマーカーと思われる。A C S のためのこのマーカーの非特異性の主要な供給源には、骨格筋および腎臓組織の傷害が含まれる。S - 1 0 0 a o は、A M I 発症のすぐ後に有意に上昇し、不安定狭心症からの A M I の区別を可能にしよう。虚血性エピソードと関係した胸部痛で苦しんでいることを示す狭心症および疑似 A M I の患者は、有意に上昇した S - 1 0 0 a o 濃度を有していなかった。非特異性の危険性にもかかわらず、C K - M B およびミオグロビンのものとの区別がないと思われるが、S - 1 0 0 a o は、医師が不安定狭心症から A M I を区別することを可能にしよう。

#### 【 0 0 6 2 】

( i i ) 凝固に関連する心筋傷害のための非特異的マーカー

プラスミンは、タンパク質分解により架橋フィブリンを消化し、血塊溶解をもたらす 7 8 k D a のセリンプロテイナーゼである。7 0 k D a のセリンプロテイナーゼ阻害因子 2 - アンチプラスミン ( 2 A P ) は、プラスミンと共有結合の 1 : 1 化学量論的複合体を形成することによりプラスミンの活性を調整する。得られる ~ 1 5 0 k D a のプラスミン - 2 A P 複合体 ( P A P ) は、プラスミン阻害複合体 ( P I C ) と呼ばれ、2 A P がフィブリン溶解の間に活性化されたプラスミンと接触した後直ぐに形成される。P A P の正常血清濃度は、 $< 1 \mu g / m l$  ( 6 . 9 n M ) である。P A P の血清濃度の上昇は、フィブリン溶解の活性化の結果であると考えられる。P A P の血清濃度の上昇は、血塊の存在、またはフィブリン溶解に起因し若しくはフィブリン溶解の結果であるいずれの状態にも関係しうる。これらの状態には、アテローム硬化症、播種性血管内凝固症候群、A M I、手術、外傷、不安定狭心症、脳卒中、および血栓性血小板減少性紫斑病を含みうる。P A P は、プラスミンのタンパク質分解による活性化に続いて直ぐに形成される。P A P は、フィブリン溶解活性化および最近の若しくは継続的な凝固能亢進性状態の存在の特異的マーカーである。これは A C S に特異的なものではなく、多数の他の疾患状態でも上昇しうる。

#### 【 0 0 6 3 】

- トロンボグロブリン ( T G ) は、血小板の活性化によって放出される 3 6 k D a の血小板 顆粒成分である。T G の正常血漿濃度は、 $< 4 0 n g / m l$  ( 1 . 1 n M ) である。T G の血漿濃度は、不安定狭心症および A M I の患者では上昇しているように見えるが、安定狭心症では上昇していない(De Caterina, R. et al., Eur. Heart J. 9:913

-922, 1988; Bazzan, M. et al., *Cardiologia* 34, 217-220, 1989)。血漿 T G の上昇は、不安定狭心症の患者の虚血エピソードに関連づけられるように見える (Sobel, M. et al., *Circulation* 63:300-306, 1981)。T G の血漿濃度の上昇は、血塊の存在と関係し、または血小板の活性化の原因となるいずれの状態とも関係しうる。これらの状態には、アテローム硬化症、播種性血管内凝固症候群、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病、および脳卒中を含めることができる (Landi, G. et al., *Neurology* 37:1667-1671, 1987)。T G は、血小板の活性化および凝集の直後に循環系に放出される。これは、血漿中で延長された 1 時間の半減期に続く、10 分間の 2 相半減期を有する (Switalska, H.I. et al., *J. Lab. Clin. Med.* 106:690-700, 1985)。血漿 T G 濃度は、伝えるところによれば不安定狭心症および A M I の間で上昇するが、これらの研究は完全に信頼できるものではないであろう。血液採取工程の間の血小板の活性化を避けるために、特別な予防措置が必要である。血小板の活性化は、通常の血液採取の間で一般的なものであり、血漿 T G 濃度の人為的な上昇を導くこととなる。さらに、血流に放出された T G の量は、個体の血小板数に依存し、これは非常に変動しうるものである。A C S に関係した T G の血漿濃度は、70 ng/ml (2 nM) に近づきうるが、この値は、採取工程の間の血小板の活性化に影響されるであろう。

10

#### 【0064】

血小板第 4 因子 (P F 4) は、血小板の活性化により放出される 40 kDa の血小板顆粒成分である。P F 4 は、血小板活性化のマーカーであり、ヘパリンに結合し中和する能力を有する。P F 4 の正常血漿濃度は、< 7 ng/ml (175 pM) である。P F 4 の血漿濃度は、A M I および不安定狭心症の患者では上昇しているように思えるが、安定狭心症では上昇していない (Gallino, A. et al., *Am. Heart J.* 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., *Jpn. Circ. J.* 60:277-284, 1996; Bazzan, M. et al., *Cardiologia* 34:217-220, 1989)。血漿 P F 4 の上昇も、不安定狭心症の患者の虚血のエピソードと関連づけられるように見える (Sobel, M. et al., *Circulation* 63:300-306, 1981)。P F 4 の血漿濃度の上昇は、血塊の存在、または血小板の活性化の原因となるいずれの状態とも関連づけられるであろう。これらの状態には、アテローム硬化症、播種性血管内凝固症候群、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病、および急性脳卒中を含めることができる (Carter, A.M. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1124-1131, 1998)。P F 4 は、血小板の活性化および凝集の直後に循環系に放出される。血漿中で延長した 20 分の半減期に続く、1 分間の 2 相半減期を有する。血漿中の P F 4 の半減期は、ヘパリンの存在により 20 ~ 40 分間延長されうる (Rucinski, B. et al., *Am. J. Physiol.* 251:H800-H807, 1986)。血漿 P F 4 濃度は、伝えるところによれば不安定狭心症および A M I の間で上昇するが、これらの研究は完全に信頼できるものではないであろう。血液採取工程の間の血小板の活性化を避けるために、特別な予防措置が必要である。血小板の活性化は、通常の血液採取の間で一般的なものであり、血漿 P F 4 濃度の人為的な上昇を導くこととなる。さらに、血流に放出された P F 4 の量は、個体の血小板数に依存し、これは非常に変動しうるものである。疾患に関係した P F 4 の血漿濃度は、100 ng/ml (2.5 nM) を超えうるが、この値は、採取工程の間の血小板の活性化に影響されうるであろう。

20

30

#### 【0065】

フィブリノペプチド A (F P A) は、16 アミノ酸の、トロンビンの作用によりフィブリノーゲンのアミノ末端から遊離した 1.5 kDa のペプチドである。フィブリノーゲンは、肝臓により合成され分泌される。F P A の正常血漿濃度は、< 5 ng/ml (3.3 nM) である。血漿 F P A 濃度は、A M I、不安定狭心症、および異型狭心症の患者で上昇するが、安定狭心症では上昇しない (Gensini, G.F. et al., *Thromb. Res.* 50:517-525, 1988; Gallino, A. et al., *Am. Heart J.* 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., *Jpn. Circ. J.* 60:277-284, 1996; Theroux, P. et al., *Circulation* 75:156-162, 1987; Merlino, P.A. et al., *Circulation* 90:61-68, 1994; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998)。さらに、血漿 F P A は狭心症の重篤度を示しうる (Gensini, G.F. et al., *Thromb. Res.* 50:517-525, 1988)。F P A の血漿濃度の上昇は、脳卒中、手

40

50

術、癌、播種性血管内凝固症候群、ネフローゼ、および血栓性血小板減少性紫斑病等の、凝固経路の活性化を伴ういずれの状態にも関係する。FPAは、トロンビンの活性化およびフィブリノーゲンの切断に続いて循環系に放出される。FPAは小さなペプチドであるので、血流から急速に除去されやすい。FPAは、血塊形成に続いて1ヶ月以上上昇していることが示され、活性な狭心症では最大血漿FPA濃度が40 ng/mlを超えうる(Gensini, G.F. et al., *Thromb. Res.* 50:517-525, 1988; Tohgi, H. et al., *Stroke* 21:1663-1667, 1990)。

#### 【0066】

血小板由来増殖因子(PDGF)は、相同性サブユニットAおよび/またはBから構成される、28 kDaの分泌されたホモまたはヘテロダイマータンパク質である(Mahadevan, D. et al., *J. Biol. Chem.* 270:27595-27600, 1995)。PDGFは、間葉細胞のための能力のあるミトジェンであり、アテローム硬化症の病因に関係している。PDGFは、凝集した血小板および血管傷害部位の近くの単球から放出される。PDGFの正常血漿濃度は、 $< 0.4 \text{ ng/ml}$  ( $15 \text{ pM}$ )である。血漿PDGF濃度は、健康な対象や安定狭心症の個体に比べ、AMIおよび不安定狭心症の個体では、高い(Ogawa, H. et al., *Am. J. Cardiol.* 69:453-456, 1992; Wallace, J.M. et al., *Ann. Clin. Biochem.* 35:236-241, 1998; Ogawa, H. et al., *Coron. Artery Dis.* 4:437-442, 1993)。これらの個体の血漿PDGF濃度の変化は、増加した血小板および単球の活性化により最も起こりうる。血漿PDGFは、脳腫瘍、乳癌、および高血圧の個体で上昇する(Kurimoto, M. et al., *Acta Neurochir. (Wien)* 137:182-187, 1995; Seymour, L. et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 26:247-252, 1993; Rossi, E. et al., *Am. J. Hypertens.* 11:1239-1243, 1998)。血漿PDGFは、いずれの前炎症性状態または、手術、外傷、播種性血管内凝固症候群、および血栓性血小板減少性紫斑病等の血小板の活性化の原因となるいずれの状態でも上昇しうる。PDGFは、活性化により血小板および単球の分泌性顆粒から放出される。PDGFは、動物では、約5分間および1時間の2相半減期を有する(Cohen, A.M. et al., *J. Surg. Res.* 49:447-452, 1990; Bowen-Pope, D.F. et al., *Blood* 64:458469, 1984)。ACSでの血漿PDGF濃度は、 $0.6 \text{ ng/ml}$  ( $22 \text{ pM}$ )を超えうる(Ogawa, H. et al., *Am. J. Cardiol.* 69:453-456, 1992)。PDGFは、血小板活性化の高感度かつ特異的マーカーであり得る。さらに、血管傷害並びに付随する単球および血小板活性化の高感度のマーカーであり得る。

#### 【0067】

プロトロンビンフラグメント1+2は、トロンビンの活性化の間にトロンビンのアミノ末端から遊離する32 kDaのポリペプチドである。F1+2の正常血漿濃度は、 $< 32 \text{ ng/ml}$  ( $1 \text{ nM}$ )である。ACSに関係する血漿F1+2濃度上昇の研究報告は、対立している。F1+2の血漿濃度は、伝えるところによればAMIおよび不安定狭心症の患者で上昇するが、安定狭心症では上昇せず、その変化は大きくない(Merlini, P.A. et al., *Circulation* 90:61-68, 1994)。他の報告では、心臓血管疾患で血漿F1+2濃度の有意な変化がないことを示している(Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 93:2121-2127, 1996; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998)。血漿中のF1+2の濃度は、脳卒中、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病、および播種性血管内凝固症候群等の凝固活性化に関係したいずれの状態の間でも、上昇しうる。F1+2は、トロンビンの活性化により直ぐに血流に放出される。F1+2は、血漿中で約90分間の半減期を有し、この長い半減期がトロンビン形成の突発を遮蔽しうることを示された(Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 93:2121-2127, 1996)。

#### 【0068】

P-セレクチンは、顆粒膜タンパク質-140、GMP-140、PADGEM、およびCD-62Pとも呼ばれ、血小板および内皮細胞で発現する~140 kDaの接着分子である。P-セレクチンは、血小板のアルファ顆粒および内皮細胞のヴァイベル-パラード体に蓄えられる。活性化により、P-セレクチンは内皮細胞および血小板の表面に急速に移行し、好中球および単球との「ローリング(rolling)」細胞表面相互作用を容

10

20

30

40

50

易にする。P - セレクチンの膜結合性および溶解性の型が、同定されている。溶解性 P - セレクチンは、細胞外 P - セレクチン分子のタンパク質分解または表面結合性 P - セレクチン分子の極近傍での細胞内骨格細胞成分のタンパク質分解のいずれかによる、膜結合性 P - セレクチンの発散により産生されうる (Fox, J.E., *Blood Coagul. Fibrinolysis* 5:291-304, 1994)。さらに、溶解性 P - セレクチンは、N - 末端膜内外ドメインをエンコードしない mRNA から翻訳されうる (Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.* 175:1147-1150, 1992; Johnston, G.I. et al., *J. Biol. Chem.* 265:21381-21385, 1990)。活性化血小板は、膜結合性 P - セレクチンを発散して循環系にとどまることができ、P - セレクチンの発散は、血漿 P - セレクチン濃度を約 70 ng/ml に上昇させることができる (Micheison, A.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:11877-11882, 1996)。溶解性 P - セレクチンは、膜結合性 P - セレクチンと異なったコンフォメーションにも適合しうる。溶解性 P - セレクチンは、1つの末端に球状ドメインを有するモノマーの棒状構造であり、膜結合分子は、外側に向けた球状ドメインを有するロゼット構造を形成する (Ushiyama, S. et al., *J. Biol. Chem.* 268:15229-15237, 1993)。溶解性 P - セレクチンは、白血球と活性化した血小板および内皮細胞との相互作用を遮蔽することにより炎症と血栓症を調整する重要な役割を果たすであろう (Gamble, J.R. et al., *Science* 249:414-417, 1990)。溶解性 P - セレクチンの正常血漿濃度は、< 200 ng/ml である。血液は、通常抗凝固剤としてクエン酸を用いて採取されるが、いくつかの研究では血小板の活性化を防ぐためにプロスタグランジン E のような添加剤を加えた EDTA 血漿を用いていた。EDTA は、クエン酸を用いて得たものと比較しうる結果をもたらす適切な抗凝固剤であろう。さらに、溶解性 P - セレクチンの血漿濃度は、採取工程の間の潜在的な血小板活性化によっては、影響されないであろう。血漿の溶解性 P - セレクチン濃度は、AMI および不安定狭心症の患者では有意に上昇したが、安定狭心症では、運動ストレス試験の後であっても上昇しなかった (Ikeda, H. et al., *Circulation* 92:1693-1696, 1995; Tomoda, H. and Aoki, N., *Angiology* 49:807-813, 1998; Hollander, J.E. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 34:95-105, 1999; Kaikita, K. et al., *Circulation* 92:1726-1730, 1995; Ikeda, H. et al., *Coron. Artery Dis.* 5:515-518, 1994)。AMI について、膜結合性 P - セレクチン対溶解性 P - セレクチンの感度および特異性は、71% 対 76% および 32% 対 45% であった (Hollander, J.E. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 34:95-105, 1999)。不安定狭心症 + AMI について、膜結合性 P - セレクチン対溶解性 P - セレクチンの感度および特異性は、71% 対 79% および 30% 対 35% であった (Hollander, J.E. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 34:95-105, 1999)。P - セレクチン発現は、安定狭心症のものとは比べ、不安定狭心症の個体からの冠動脈内粥腫切除標本の方が大きい (Tenaglia, A.N. et al., *Am. J. Cardiol.* 79:742-747, 1997)。さらに、血漿の溶解性 P - セレクチンは、不安定狭心症の患者に比べ、AMI の患者の方が大きい度合いで上昇しうる。血漿の溶解性および膜結合性 P - セレクチンは、非インスリン依存性糖尿病および鬱血性心不全の個体でも上昇する (Nomura, S. et al., *Thromb. Haemost.* 80:388392, 1998; O'Connor, C.M. et al., *Am. J. Cardiol.* 83:1345-1349, 1999)。溶解性 P - セレクチン濃度は、特発性血小板減少性紫斑病、慢性関節リュウマチ、高コレステロール血症、急性脳卒中、アテローム硬化症、高血圧、急性肺傷害、結合組織疾患、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、播種性血管内凝固症候群、および慢性腎不全の個体の血漿で上昇する (Katayama, M. et al., *Br. J. Haematol.* 84:702-710, 1993; Haznedaroglu, I.C. et al., *Acta Haematol.* 101:16-20, 1999; Ertenli, I. et al., *J. Rheumatol.* 25:1054-1058, 1998; Davi, G. et al., *Circulation* 97:953-957, 1998; Frijns, C.J. et al., *Stroke* 28:2214-2218, 1997; Blann, A.D. et al., *Thromb. Haemost.* 77:1077-1080, 1997; Blann, A.D. et al., *J. Hum. Hypertens.* 11:607-609, 1997; Sakamaki, F. et al., *A. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1821-1826, 1995; Takeda, I. et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105:128-134, 1994; Chong, B.H. et al., *Blood* 83:1535-1541, 1994; Bonomini, M. et al., *Nephron* 79:399-407, 1998)。さらに、血小板の活性化を伴ういずれの状態も、潜在的には P - セレクチンの血漿上昇の供給源となりうる。P - セレ

クチンは、内皮細胞血小板の活性化に続いて細胞表面に即座に現れる。膜内外ドメインを欠いた代替 mRNA から翻訳された溶解性 P - セレクチンも、この活性化に続いて細胞外空間に放出される。溶解性 P - セレクチンは、膜結合性 P - セレクチンを伴う直接および間接のいずれかによるタンパク質分解によっても形成されうる。血漿の溶解性 P - セレクチンは、t P A または冠状動脈形成の処置をされた A M I の患者の入院時に上昇し、発症後 4 時間で最大上昇が起こる (Shimomura, H. et al., Am. J. Cardiol. 81:397-400, 1998)。血漿の溶解性 P - セレクチンは、不安定狭心症の患者の狭心症の発作に続いて 1 時間以内に上昇し、その濃度は時間経過とともに減少し、発作の発症後 5 時間以上でベースラインに近づいた (Ikeda, H. et al., Circulation 92:1693-1696, 1995)。溶解性 P - セレクチンの血漿濃度は、A C S で  $1 \mu\text{g} / \text{ml}$  に近づく (Ikeda, H. et al., Coron. Artery Dis. 5:515-518, 1994)。血流への溶解性 P - セレクチンの放出および血流から除去に関するさらなる研究がなされる必要がある。P - セレクチンは、血小板および内皮細胞の活性化、血栓の形成を支持する状態、および炎症、の高感度かつ特異的なマーカーでありうる。しかし、これは A C S の特異的なマーカーではない。心臓組織傷害に特異的な他のマーカーとともに用いた場合、P - セレクチンは、不安定狭心症および A M I を安定狭心症から識別するのに有用であろう。さらに、溶解性 P - セレクチンは、不安定狭心症より A M I において大きな度合いで上昇しうる。P - セレクチンは、通常は膜結合性と溶解性の 2 つの型で存在する。公表された研究では、P - セレクチンの溶解型は、血小板および内皮細胞により、膜結合性 P - セレクチンを遮蔽することにより、潜在的にはタンパク質分解機構により産生されるとしている。その血漿濃度が、P F 4 および T G のような他の血小板活性化マーカーのように血液採取工程によって影響されないので、溶解性 P - セレクチンは、血小板活性化の現在同定されている最も有用なマーカーであることが証明される。

#### 【 0 0 6 9 】

トロンピンは、フィブリノーゲンをタンパク質分解により切断してフィブリンを形成する  $37 \text{ kDa}$  のセリンプロテイナーゼであり、これは最終的には血塊形成の間に架橋したネットワーク中に蓄積される。アンチトロンピン I I I ( A T I I I ) は、トロンピン、第 X I a 因子、第 X I I a 因子、および第 I X a 因子のタンパク質分解による活性化の生理学的調整因子である  $65 \text{ kDa}$  のセリンプロテイナーゼ阻害因子である。A T I I I の阻害活性は、ヘパリンの結合に依存する。ヘパリンは、2 ~ 3 桁の大きさで A T I I I の阻害活性を増強し、A T I I I により阻害されるプロテイナーゼのほとんど瞬時の不活性化をもたらす。A T I I I は、共有結合の 1 : 1 化学量論的複合体の形成を通じて、その標的プロテイナーゼを阻害する。約  $100 \text{ kDa}$  のトロンピン A T I I I 複合体 ( T A T ) の正常血漿濃度は、 $< 5 \text{ ng} / \text{ml}$  (  $50 \text{ pM}$  ) である。T A T 濃度は、A M I および不安定狭心症の患者で、特に突発性虚血エピソードの間で上昇する (Biasucci, L.M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996; Kienast, J. et al., Thromb. Haemost. 70:550-553, 1993)。さらに、T A T は、安定狭心症の個体の血漿でも上昇しうる (Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。他の公表された報告では、A C S 患者の血漿の T A T 濃度に有意な違いはないことが見出された (Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998; Hoffmeister, H.M. et al., Atherosclerosis 144:151-157, 1999)。A C S に関係した血漿 T A T 濃度の変化を決定するためには、さらなる研究が必要である。血漿 T A T 濃度の上昇は、脳卒中、手術、外傷、播種性血管内凝固症候群、および血栓性血小板減少性紫斑病等の凝固活性化に関係したいずれの状態にも関係する。T A T は、ヘパリンの存在下でトロンピンの活性化に続いて直ぐに形成され、これはこの相互作用の限定因子である。T A T は、血流中で約 5 分間の半減期を有する (Biasucci, L.M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996)。T A T 濃度は上昇し、15 分後に急激な落ち込みを示して、凝固活性化に続いて 1 時間以内にベースラインに戻る。T A T の血漿濃度は、A C S で  $50 \text{ ng} / \text{ml}$  に近づく (Biasucci, L.M. et al., Circulation 93:2121-2127, 1996)。T A T は、凝固活性化、特にトロンピンの活性化の特異的なマーカーである。T A T は、ブランク破裂および / または心臓組織傷害に特異的な他のマーカーとともに診

断パネルの凝固活性化のマーカーとして有用であろう。

【0070】

D - ダイマーは、200 kDaの概算分子量を有する架橋フィブリン分解物である。D - ダイマーの正常血漿濃度は、 $< 150 \text{ ng/ml}$  ( $750 \text{ pM}$ )である。D - ダイマーの血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者で上昇するが、安定狭心症では上昇しない (Hoffmeister, H.M. et al., *Circulation* 91:2520-2527, 1995; Bayes-Genis, A. et al., *Thromb. Haemost.* 81:865-868, 1999; Gurfinkel, E. et al., *Br. Heart J.* 71:151-155, 1994; Kruskal, J.B. et al., *N. Engl. J. Med.* 317:1361-1365, 1987; Tanaka, M. and Suzuki, A., *Thromb. Res.* 76:289-298, 1994)。D - ダイマーの血漿濃度は、脳卒中、手術、アテローム硬化症、外傷、および血栓性血小板減少性紫斑病等の凝固およびフィブリン溶解活性化に関係したいずれの状態の間でも上昇するであろう。D - ダイマーは、プラスミンによるタンパク質分解による血塊溶解に続いて直ぐに血流中に放出される。血漿D - ダイマー濃度は、ACS発症後直ぐに上昇し(6時間以内に)、個体の凝固能亢進の度合いに比例して上昇したまま維持するであろう。この点で、ACSに続く血流からのD - ダイマーの除去の動態を決定するためには、さらなる研究が必要である。D - ダイマーの血漿濃度は、不安定狭心症の患者では $2 \mu\text{g/ml}$ を超えうる (Gurfinkel, E. et al., *Br. Heart J.* 71:151-155, 1994)。血漿D - ダイマーは、フィブリン溶解の特異的マーカーであり、AMIおよび不安定狭心症に関係したプロトロンビンの状態の存在を示すものである。D - ダイマーは、ACSに特異的ではなく、D - ダイマーの血漿上昇は、ACSの様々な危険因子に関係するであろう。しかし、心臓傷害に特異的なマーカーを含むパネルの構成員として用いる場合、D - ダイマーは、安定狭心症からの不安定狭心症およびAMIの区別を可能に示す。この識別は、医師が急性の胸部痛を示している患者をより効率的に処置することを可能にする。

【0071】

フォン・ビルブラント因子(vWF)は、一連の高分子量多量体を形成することに関係する220 kDaのモノマーから構成される、血小板、巨核球、および内皮細胞により産生される血漿タンパク質である。これらの多量体は、通常 $600 \sim 20,000 \text{ kDa}$ の分子量の範囲に入る。vWFは、循環している凝固因子VIIIを安定化すること、および他の血小板と同様に、露出した内皮下層への血小板の接着を媒介することにより、凝固工程に参加する。vWFのA1ドメインは、血小板糖タンパク質Ib - IX - V複合体および非原繊維VI型コラーゲンに結合し、A3ドメインは、原繊維IおよびIII型コラーゲンに結合する (Emsley, J. et al., *J. Biol. Chem.* 273:10396-10401, 1998)。vWF分子に存在する他のドメインには、血小板 - 血小板相互作用を媒介するインテグリン結合ドメイン、11A型フォン・ビルブラント疾患の病因に関連すると思われるプロテイナーゼ切断ドメイン、が含まれる。vWFの血小板との相互作用は、正常の生理状態では、vWFと血小板との相互作用を避けるために厳しく調整される。vWFは、通常球状の状態 で存在し、高い剪断応力の状態下で伸長した鎖構造へのコンフォメーション転移を受け、これは通常血管傷害部位に見出される。このコンフォメーションの変化は、分子の分子内ドメインを露出し、vWFが血小板と相互作用することを可能にする。さらに、剪断応力は、内皮細胞からのvWFの放出の原因となり、非常に多数のvWF分子を血小板と相互作用可能にする。vWFのコンフォメーションの変化は、リストセチンおよびボトロセチンのような非生理学的調整因子の添加により*in vitro*で誘発されうる (Miyata, S. et al., *J. Biol. Chem.* 271:9046-9053, 1996)。血管傷害部位では、vWFは、内皮下層マトリックスのコラーゲンと迅速に結合し、実質上不可逆的に血小板に結合し、傷害部位において血小板と血管内皮下層との間の架橋を効果的に形成する。vWFのコンフォメーションの変化が内皮下層マトリックスとの相互作用に必要なかもしれないという証拠も示されている (Sixma, J.J. and de Groot, P.G., *Mayo Clin. Proc.* 66:628-633, 1991)。これは、vWFが、血管傷害部位において露出した内皮下層マトリックスに結合し、非常に局在化した剪断応力のためにコンフォメーションの変化を受け、循環している血小板に迅速に結合し、新しく形成した血栓中に蓄積されるであろうことを示している。v

10

20

30

40

50

WFの全量の測定は、当業者が脳卒中や心臓血管疾患に関係した全vWF濃度の変化を同定することを可能にする。この測定は、種々の形態のvWF分子を測定することを通じて行われる。A1ドメインの測定は、循環系の活性vWFの測定を可能にし、A1ドメインが血小板の結合に近づきやすいので、凝固促進性の状態が存在することを示すこととなる。この点において、露出したA1ドメインと、インテグリン結合ドメイン若しくはA3ドメインのいずれかと、の双方においてvWF分子を特異的に測定するアッセイは、それぞれ、血小板-血小板相互作用を媒介することを可能にするか、または血小板の血管内皮下層への架橋を媒介する、活性vWFの同定をも可能にする。これらのvWF形態のいずれかの測定は、プロテアーゼ切断ドメインに特異的な抗体を用いるアッセイを用いた場合に、フォン・ビルブラント疾患の存在にかかわらず、いずれの個体においても種々のvWF形態の循環している濃度を決定するために用いるアッセイを可能にする。vWFの正常血漿濃度は、血小板凝集物として測定した場合、5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または60~110%の活性度である。vWFの特異的形態の測定は、脳卒中および心臓血管疾患等のいずれの型の血管疾患においても重要であろう。血漿vWF濃度は、伝えるところによればAMIおよび不安定狭心症の患者では上昇するが、安定狭心症では上昇しない(Goto, S. et al., *Circulation* 99:608-613, 1999; Tousoulis, D. et al., *Int. J. Cardiol.* 56:259-262, 1996; Yazdani, S. et al., *J Am Coll Cardiol* 30:1284-1287, 1997; Montalescot, G. et al., *Circulation* 98:294-299)。さらに、血漿vWF濃度の上昇は、不安定狭心症の患者の不利な臨床的結果の予測量になりうる(Montalescot, G. et al., *Circulation* 98:294-299)。vWF濃度は、脳卒中およびクモ膜下出血の患者でも上昇することが示されており、脳卒中に続く死亡の危険の評価にも有用と思われる(Blann, A. et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis* 10:277-284, 1999; Hirashima, Y. et al., *Neurochem Res.* 22:1249-1255, 1997; Catto, A.J. et al., *Thromb. Hemost.* 77:1104-1108, 1997)。vWFの血漿濃度は、内皮細胞の損傷または血小板の活性化に関係するいずれの事象とも連動して上昇する。vWFは、血流中で高濃度で存在し、活性化により血小板および内皮細胞から放出される。vWFは、血小板の活性化、または、特に血小板の活性化および血管傷害部位への接着に好ましい状態、のマーカーとして最良の有益がありそうである。vWFのコンフォメーションは、部分的に狭窄した血管に関係するような、高い剪断応力により変化することも知られている。血液が狭窄した血管を流れると、疾患を有しない個体の循環系で遭遇するものよりも相当高い剪断応力を受ける。この発明の他の知見は、剪断応力から生じるvWFの形態およびACSの存在に対するその形態の相関を測定することである。

#### 【0072】

組織因子(TF)は、脳、腎臓および心臓で発現する45kDaの細胞表面タンパク質であり、血管周辺の細胞および単球上で転写により調整される。TFは、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンの存在下で第VIIa因子と複合体を形成し、それが膜結合の場合に生理学的に活性である。この複合体は、第X因子を、第Xa因子を形成するようにタンパク質分解により切断する。これは、通常血流から隔離されている。組織因子は、血流中で溶解型、第VIIa因子に結合したもの、または第VIIa因子との複合体、および第Xa因子をも含むうる組織因子経路阻害因子、として検出されうる。TFは、マクロファージの表面でも発現し、これは通常アテローム硬化症プラーク中に見出される。TFの正常血清濃度は、 $< 0.2 \text{ ng}/\text{ml}$  (4.5 pM)である。血漿TF濃度は、虚血性心臓疾患の患者で上昇する(Falciani, M. et al., *Thromb. Haemost.* 79:495-499, 1998)。TFは、不安定狭心症およびAMIの患者で上昇するが、安定狭心症の患者では上昇しない(Falciani, M. et al., *Thromb. Haemost.* 79:495-499, 1998; Suefuji, H. et al., *Am. Heart J.* 134:253-259, 1997; Misumi, K. et al., *Am. J. Cardiol.* 81:2226, 1998)。さらに、マクロファージでのTFの発現およびアテローム硬化症プラークでのTFの活性は、安定狭心症より不安定狭心症においてより一般的である(Soejima, H. et al., *Circulation* 99:2908-2913, 1999; Kaikita, K. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:2232-2237, 1997; Ardissono, D. et al., *Lancet* 349:769-771, 1997)。不安定狭心症に対する安定狭心症の血

漿TF濃度の違いは、統計的に有意なものではないであろう。TFの血清濃度の上昇は、外因性経路を通じた凝固活性化の原因となるまたはその結果であるいずれの状態にも関係する。これらの状態には、クモ膜下出血、播種性血管内凝固症候群、腎不全、脈管炎、および鎌状赤血球症を含めることができる(Hirashima, Y. et al., Stroke 28:1666-1670, 1997; Takahashi, H. et al., Am. J. Hematol. 46:333-337, 1994; Koyama, T. et al., Br. J. Haematol. 87:343-347, 1994)。TFは、血管傷害が血管外細胞障害と結びつくと、直ぐに放出される。虚血性心臓疾患患者のTF濃度は、発症の2日以内に800 pg/mlを超えうる(Falciani, M. et al., Thromb. Haemost. 79:495-499, 1998)。TF濃度は、慢性期と比べて、AMIの慢性期では減少した(Suefuji, H. et al., Am. Heart J. 134:253-259, 1997)。TFは、外因性凝固経路の活性化および一般的な凝固能亢進性状態の存在の特異的マーカーである。これは、プラーク破裂による血管傷害の高感度のマーカーとなり、パネル構成員として有益であろう。これは、ACSに特異的ではなく、多くの疾患状態でも上昇し、血液採取工程により人為的にも上昇しうる。しかし、血栓崩壊治療の患者を除外するためのマーカーとしてTFを用いることは可能であろう。血栓崩壊治療の間の組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)の注入は、フィブリン溶解の活性化をもたらし、患者は、血塊を維持できなくなる。血管傷害の個体へのtPAの投与は、最終的には出血をもたらすこととなる。

### 【0073】

凝固カスケードは、外因性または内因性のいずれかの経路を通じて活性化されうる。これらの酵素的経路は、1つの最終の共通経路を共有する。共通経路の第1の工程は、第Xa因子/第Va因子プロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビンのタンパク質分解による切断を伴い、活性トロンピンを生成する。トロンピンは、フィブリノーゲンをタンパク質分解により切断するセリンプロテイナーゼである。トロンピンは、フィブリノーゲンからフィブリノペプチドAを最初に取り除いてdesAAフィブリンモノマーを生成し、これは、フィブリン分解物、フィブリノーゲン分解物、desAAフィブリン、およびフィブリノーゲン等のすべの他のフィブリノーゲン由来タンパク質と複合体を形成しうる。desAAフィブリンモノマーは、フィブリノーゲン切断の最初の産物であるので、一般的には溶解性フィブリンを指すが、第XIIIa因子を介して不溶性フィブリン血塊に未だ架橋していない。desAAフィブリンモノマーは、トロンピンによるさらなるタンパク質分解による切断を受けて、フィブリノペプチドBを取り除き、desABBフィブリンモノマーを生成する。このモノマーは、他のdesABBフィブリンモノマーと重合して溶解性desABBフィブリンポリマーを形成し、これは溶解性フィブリンまたは血栓前駆体タンパク質(TpT<sup>TM</sup>)とも呼ばれる。TpT<sup>TM</sup>は、溶解性フィブリンの直近の前駆体であり、これは「網状」構造を形成して新しく形成した血栓に構造的な強固さを提供する。この点において、血漿中のTpT<sup>TM</sup>の測定は、活性な血塊形成の直接的な測定となる。TpT<sup>TM</sup>の正常血漿濃度は、<6 ng/mlである(Laurino, J.P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。アメリカンバイオジェネティックサイエンシーズは、TpT<sup>TM</sup>のアッセイを開発し(米国特許番号5453359および5843690)、TpT<sup>TM</sup>アッセイは、AMIの早期診断、胸部痛を有する患者のAMIの除外、およびAMIに進行するであろう不安定狭心症の患者の同定、を補助できると述べている。他の研究により、TpT<sup>TM</sup>がAMIの患者において、発症の6時間以内に最もしばしば上昇することが確認された(Laurino, J.P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997; Carville, D.G. et al., Clin. Chem. 42:1537-1541, 1996)。TpT<sup>TM</sup>の血漿濃度は、不安定狭心症の患者でも上昇するが、これらの上昇は、狭心症の重篤度および来るべきAMIの進行の表示となりうる(Laurino, J.P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。血漿中のTpT<sup>TM</sup>の濃度は、播種性血管内凝固症候群、深層静脈血栓症、鬱血性心不全、手術、癌、胃腸炎、およびコカインの過剰投与等の凝固活性化の原因となるまたはその結果であるいずれの状態の間にも、理論的には上昇するであろう(Laurino, J.P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。TpT<sup>TM</sup>は、トロンピンの活性化に続いて直ぐに血流に放出される。TpT<sup>TM</sup>は、血塊形成部位において不溶性フィブリン

10

20

30

40

50

に即座に転換されるので、血流中では短い半減期を有することとなる。血漿 T p T<sup>TM</sup>濃度は、A M I 発症の 3 時間以内に最大となり、発症から 1 2 時間後に正常に戻る。T p T<sup>TM</sup>の血漿濃度は、C V D で 3 0 n g / m l を超えうる (Laurino, J.P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。T p T<sup>TM</sup>は、凝固活性化の高感度かつ特異的のマーカである。心臓組織傷害の特異的のマーカと併せて用いた場合のみであるが、T p T<sup>TM</sup>が A M I の診断に有用であることが示された。T p T<sup>TM</sup>は、A C S に特異的なマーカではなく、その濃度は、A C S の発展の危険因子と見なされる状態等の凝固活性化を伴う多数の疾患状態において上昇するであろう。T p T<sup>TM</sup>は、不安定狭心症の重篤度を決定するのにも有用であろう。アメリカンバイオジェネティックサイエンシーズ社は、T p T<sup>TM</sup> E L I S A アッセイキットの使用に抗凝固剤としてクエン酸を用いて血液を採取することを指示しており、彼らは E D T A を用いることに反対の提言をしている。血漿 T p T<sup>TM</sup>濃度に対する血液採取の間に用いられる抗凝固剤の効果は、現状では不明確である。血液採取工程が制御できれば、T p T<sup>TM</sup>は凝固活性化の利用可能な最良のマーカであろう。

10

## 【 0 0 7 4 】

## ( i i i ) アテローム硬化症のプラーク破裂に関連した心筋傷害の非特異的のマーカ

アテローム硬化症のプラーク破裂に関連したマーカの出現は、A C S がアテローム硬化症のプラーク破裂による場合、心筋傷害の特異的のマーカに先行するであろう。アテローム硬化症のプラーク破裂の可能性のあるマーカには、ヒト好中球エラスターゼ、誘導型一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファチド酸、マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質、並びに M M P - 1、- 2、- 3 および - 9 等のマトリックスメタロプロテイナーゼ ( M M P ) ファミリーの種々の構成員が含まれる。

20

## 【 0 0 7 5 】

ヒト好中球エラスターゼ ( H N E ) は、好中球のアズール親和顆粒に通常含まれる 3 0 k D a のセリンプロテイナーゼである。H N E は、好中球の活性化により放出され、その活性は循環している 1 - プロテイナーゼ阻害因子により調整される。活性化した好中球は、アテローム硬化症プラーク中で通常見出され、これらのプラークの破裂は H N E の放出をもたらす。血漿 H N E 濃度は、通常 H N E - 1 - P I 複合体を検出することにより測定される。これらの複合体の正常濃度は、5 0 n g / m l であり、これは H N E については約 2 5 n g / m l ( 0 . 8 n M ) の正常濃度であることを示す。H N E の放出は、血漿中で、特異的 H N E 由来フィブリノペプチドである、フィブリノペプチド B<sub>30-43</sub>の特異的検出を通じて測定される。血漿 H N E は、冠状動脈狭窄の患者で上昇し、その上昇は単純プラークを有するものよりも複合プラークを有する患者の方が大きい (Kosar, F. et al., Angiology 49:193-201, 1998; Amaro, A. et al., Eur. Heart J. 16:615-622, 1995)。血漿 H N E は、安定狭心症の患者では有意に上昇しないが、不安定狭心症および A M I の患者では上昇し、フィブリノペプチド B<sub>30-43</sub>の測定による決定では、不安定狭心症での濃度は、A M I に関連したものに比べ 2 . 5 倍高い (Dinerman, J.L. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 15:1559-1563, 1990; Mehta, J. et al., Circulation 79:549-556, 1989)。血清 H N E は、心臓手術、運動に誘導される筋肉の損傷、巨細胞性動脈炎、急性呼吸窮迫症候群、虫垂炎、膵臓炎、敗血症、喫煙に関連した気腫、および嚢胞性繊維症で上昇する (Genereau, T. et al., J. Rheumatol. 25:710-713, 1998; Mooser, V. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19:1060-1065, 1999; Gleeson, M. et al., Eur. J. Appl. Physiol. 77:543-546, 1998; Gando, S. et al., J Trauma 42:1068-1072, 1997; Eriksson, S. et al., Eur. J. Surg. 161:901-905, 1995; Liras, G. et al., Rev. Esp. Enferm. Dig. 87:641-652, 1995; Endo, S. et al., J. Inflamm. 45:136-142, 1995; Janoff, A., Annu Rev Med 36:207-216, 1985)。H N E は、血液凝固の間で放出されうる (Plow, E.F. and Plescia, J., Thromb. Haemost. 59:360-363, 1988; Plow, E. F., J. Clin. Invest. 69:564-572, 1982)。H N E の血清上昇は、好中級のリクルートメントおよび活性化を伴ういずれの非特異的感染または炎症にも関係する。活性化した好中級がアテローム硬化症プラークに存在するので、これはプラーク破裂により最も放出されやすい。H N E は、おそらく 1 - P I との複合体を形成した後に肝臓により除去され

30

40

50

る。

【 0 0 7 6 】

誘導型一酸化窒素シンターゼ ( i N O S ) は、その発現がインターフェロン -  $\gamma$ 、インターロイキン - 1、インターロイキン - 6、および腫瘍壊死因子等のサイトカイン並びにリポ多糖類により調整される、上皮細胞マクロファージの 130 k D a の細胞質ゾルタンパク質である。i N O S は、L - アルギニンからの一酸化窒素 ( N O ) の合成を触媒し、その誘導は持続した高出力の N O 産生をもたらす、これは抗菌活性を有し、様々な生理的および炎症性事象の媒介物である。i N O S による N O 産生は、構成的発現型 N O S により産生される量の約 100 倍以上である (Depre, C. et al., *Cardiovasc. Res.* 41:465-472, 1999)。A C S に関連した血漿 i N O S 濃度変化についての公表された研究はない。i N O S は、冠状動脈アテローム硬化症プラークで発現し、過酸化窒素の産生を通じてプラークの安定性を妨害し、これは N O と過酸化物との産物であり血小板の接着と凝固を増進するものである (Depre, C. et al., *Cardiovasc. Res.* 41:465-472, 1999)。心臓虚血の間の i N O S の発現は上昇せず、i N O S が A M I から狭心症を識別するために有用であり得ることを示している (Hammerman, S.I. et al., *Am. J. Physiol.* 277:H1579-H1592, 1999; Kaye, D.M. et al., *Life Sci* 62:883-887, 1998)。血漿 i N O S 濃度の上昇は、肝硬変、鉄欠乏性貧血、または細菌感染等のマクロファージの活性化をもたらすいずれの他の状態にも関係しうる (Jimenez, W. et al., *Hepatology* 30:670-676, 1999; Ni, Z. et al., *Kidney Int.* 52:195-201, 1997)。i N O S は、アテローム硬化症のプラーク破裂の結果として血流に放出され、血流中の i N O S の増加した量の存在は、プラーク破裂が起こっただけでなく、血小板の接着を促進するための理想的な環境が創生されたことを示すであろう。しかし、i N O S は、アテローム硬化症のプラーク破裂に特異的ではなく、その発現は、非特異的な炎症状態の間にも誘導されうる。

【 0 0 7 7 】

リゾホスファチド酸 ( L P A ) は、ホスホグリセリド類およびトリアシルグリセロールの合成において形成されるリゾリン脂質の中間体である。これは、アシル - 補酵素 A によるグリセロール - 3 リン酸のアシル化により、低密度リポタンパク質 ( L D L ) の穏やかな酸化の間に形成される。L P A は、血管作用性の性質を有する脂質の第 2 メッセンジャーであり、血小板活性化因子として機能できる。L P A は、アテローム硬化症病巣の成分であり、特に中心部にあり、最も破裂しやすい (Siess, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6931-6936, 1999)。正常血漿 L P A 濃度は、540 n M である。血清 L P A は、腎不全並びに卵巣癌および他の婦人科の癌で上昇する (Sasagawa, T. et al., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 44:809-818, 1998; Xu, Y. et al., *JAMA* 280:719-723, 1998)。不安定狭心症との関連で、L P A は、プラーク破裂の直接の結果として最も放出されやすい。血漿 L P A 濃度は、婦人科の癌の患者において 60  $\mu$  M を超える (Xu, Y. et al., *JAMA* 280:719-723, 1998)。血清 L P A は、アテローム硬化症のプラーク破裂の有用なマーカーであり、安定狭心症からの不安定狭心症の区別を可能にしうる。しかし、L P A は、プラーク破裂の他のマーカーのように特異的ではないであろう。

【 0 0 7 8 】

マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質 ( M D A - 修飾 L D L ) は、ホスホリパーゼ活性、プロスタグランジン合成、または血小板の活性化の結果としての L D L の a p o B - 100 部分の酸化の間に形成される。L D L の M D A 修飾が脂質の過酸化の不存在下で起こるので、M D A - 修飾 L D L は、酸化 L D L から識別できる (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* 53:253-260, 1998)。M D A - 修飾 L D L の正常血漿濃度は、4  $\mu$  g / m l ( ~ 10  $\mu$  M ) 以下である。酸化 L D L の血漿濃度は、安定狭心症、不安定狭心症、および A M I で上昇し、アテローム硬化症のマーカーであり得ることを示す (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* 53:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., *Circulation* 98:1487-1494, 1998)。血漿 M D A - 修飾 L D L は、安定狭心症では上昇しないが、不安定狭心症および A M I では有意に上昇する (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* 53:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., *Circulation* 98:1487-1494, 1998; Holvoet, P. et al., *JAMA* 281:1718-1721, 1999)

。血漿 M D A - 修飾 L D L は、ベータ - サラセミアの個体および腎臓移植患者において上昇する (Livrea, M.A. et al., Blood 92:3936-3942, 1998; Ghanem, H. et al., Kidney Int. 49:488-493, 1996; van den Dorpel, M.A. et al., Transpl. Int. 9 Suppl. 1:S54-S57, 1996)。さらに、血清 M D A - 修飾 L D L は、低酸素症の間に上昇する (Balagopala Krishna, C. et al., Adv. Exp. Med. Biol. 411:337-345, 1997)。M D A - 修飾 L D L の血漿濃度は、胸部痛の発症から 6 ~ 8 時間以内に上昇する。M D A - 修飾 L D L の血漿濃度は、A M I の患者では  $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  ( $\sim 50 \mu\text{M}$ ) に、不安定狭心症の患者では  $15 \mu\text{g} / \text{ml}$  ( $\sim 40 \mu\text{M}$ ) に近づきうる (Holvoet, P. et al., Circulation 98:1487-1494, 1998)。血漿 M D A - 修飾 L D L は、マウスで 5 分以下の半減期を有する (Ling, W. et al., J. Clin. Invest. 100:244-252, 1997)。M D A - 修飾 L D L は、急性冠動脈症候群のアテローム硬化症のプラーク破裂の特異的マーカーと思われる。しかし、M D A - 修飾 L D L の血漿濃度の上昇がプラーク破裂の結果であるのか、または血小板の活性化の結果であるのかは、不明確である。最も妥当な説明は、M D A - 修飾 L D L の増大した量の存在は両方の事象の表示であるというものである。M D A - 修飾 L D L は、安定狭心症からの不安定狭心症および A M I の区別に有用でありうるが、それ単独では不安定狭心症からの A M I を識別できない。この点において、M D A - 修飾 L D L は、特に不安定狭心症から A M I を区別できる他のマーカーとともに用いた場合に、マーカーのパネルの一部として最も有用であろう。

10

#### 【 0 0 7 9 】

マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1 ( M M P - 1 ) は、コラゲナーゼ - 1 と呼ばれ、主として I 型コラーゲンを切断するが I I、I I I、V I I および X 型コラーゲンも切断する、 $41 / 44 \text{ kDa}$  の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。活性な  $41 / 44 \text{ kDa}$  の酵素は、自己分解を受けなお活性な  $22 / 27 \text{ kDa}$  の形態になりうる。M M P - 1 は、平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、T リンパ球、および内皮細胞等の種々の細胞により合成される (Johnson, J.L. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:1707-1715, 1998)。M M P - 1 は、他の M M P と同様に、細胞外マトリックスの再構築に関係しており、これは傷害に続いて、または血管間細胞移動の間に起こりうる。M M P - 1 は、遊離またはその天然阻害因子である T I M P - 1 との複合体のいずれかの形態で血流中に見出される。M M P - 1 は、血漿中で通常  $< 25 \text{ ng} / \text{ml}$  の濃度で見出される。A C S に関係した M M P - 1 の血清または血漿濃度変化についての結論的な公表された研究はない。しかし、M M P - 1 は、アテローム硬化症プラークの肩領域で見出され、これは最も破裂しやすい領域であり、アテローム硬化症プラークの不安定化に関係しうる (Johnson, J.L. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:1707-1715, 1998)。さらに、M M P - 1 は、心筋再灌流傷害の病因に関連する (Shibata, M. et al., Angiology 50:573-582, 1999)。血清 M M P - 1 は、マスト細胞の分解を誘導する炎症状態で上昇しうる。血清 M M P - 1 濃度は、関節炎および全身性エリテマトーデスの患者で上昇する (Keyszer, G. et al., Z Rheumatol 57:392-398, 1998; Keyszer, G. J. Rheumatol. 26:251-258, 1999)。血清 M M P - 1 は、前立腺癌の患者でも上昇し、その上昇の度合いは、腫瘍の転移の可能性に対応する (Baker, T. et al., Br. J. Cancer 70:506-512, 1994)。M M P - 1 の血清濃度は、他の型の癌の患者においても上昇する。血清 M M P - 1 は、ヘモクロマトーシスの患者および慢性ウイルス性肝炎の患者で減少し、ここではその濃度が重篤度に反比例している (George, D.K. et al., Gut 42:715-720, 1998; Murawaki, Y. et al., J. Gastroenterol. Hepatol. 14:138-145, 1999)。M M P - 1 は、マスト細胞の脱顆粒の間で放出され、おそらくアテローム硬化症のプラーク破裂の間で放出される。M M P - 1 濃度は、E D T A 血漿または血清に比べヘパリンを加えた血漿では低く、希釈したサンプルは、希釈しないサンプルに比べ E L I S A アッセイで高い濃度値を示し、タンパク質 M M P 阻害因子またはマトリックス成分の阻害効果の減少によるものと考えられる (Lein, M. et al., Clin. Biochem. 30:491-496, 1997)。血清 M M P - 1 は、A M I に続く最初の 4 日間で減少し、その後増加し、A M I 発症の 2 週間後に最大濃度に達した (George, D.K. et al., Gut 42:715-720, 1998)。

20

30

40

50

## 【 0 0 8 0 】

マトリックスメタロプロテイナーゼ - 2 (MMP - 2) は、ゼラチナーゼ A と呼ばれ、不活性な 72 kDa の前駆体として合成される、66 kDa の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。成熟 MMP - 2 は、I 型ゼラチン並びに IV、V、VII および X 型コラーゲンを切断する。MMP - 2 は、血管平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、T リンパ球、および内皮細胞等の種々の細胞により合成される (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1707-1715, 1998)。MMP - 2 は、血漿中で通常その生理学的調整因子である TIMP - 2 との複合体として見出される (Murawaki, Y. et al., *J. Hepatol.* 30:1090-1098, 1999)。MMP - 2 の正常血漿濃度は、 $< \sim 550 \text{ ng/ml}$  (8 nM) である。MMP - 2 の発現は、アテローム硬化症の病巣の血管平滑筋細胞で上昇し、これはプラークが不安定の場合に血流に放出されうる (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。さらに、MMP - 2 は、プラークの不安定性および破裂に寄与するものとして関係する (Shah, P.K. et al., *Circulation* 92:1565-1569, 1995)。血清 MMP - 2 濃度は、安定狭心症、不安定狭心症、および AMI の患者で上昇し、不安定狭心症および AMI では、安定狭心症に比べその上昇は有意に高かった (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。トレッドミル運動試験後の安定狭心症の個体における血清 MMP - 2 濃度の変化はなかった (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。血清および血漿 MMP - 2 は、胃癌、幹細胞癌、肝硬変、尿路上皮癌、リュウマチ様関節炎、および肺癌の患者で上昇する (Murawaki, Y. et al., *J. Hepatol.* 30:1090-1098, 1999; Endo, K. et al., *Anticancer Res.* 17:2253-2258, 1997; Gohji, K. et al., *Cancer* 78:2379-2387, 1996; Gruber, B.L. et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 78:161-171, 1996; Garbisa, S. et al., *Cancer Res.* 52:4548-4549, 1992)。さらに、MMP - 2 は、血小板凝集の間に血小板細胞質ゾルから細胞外空間にも転移しうる (Sawicki, G. et al., *Thromb. Haemost.* 80:836-839, 1998)。MMP - 2 は、不安定狭心症および AMI の個体の血清で入院時に上昇し、最大濃度は  $1.5 \mu\text{g/ml}$  (25 nM) に近づいた (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。血清 MMP - 2 濃度は、不安定狭心症および AMI の双方において発症の 1 ~ 3 日後に最大となり、1 週間後に正常に戻り始めた (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。

## 【 0 0 8 1 】

マトリックスメタロプロテイナーゼ - 3 (MMP - 3) は、ストメリシン - 1 と呼ばれ、不活性な 60 kDa の前駆体として合成される 45 kDa の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。成熟 MMP - 3 は、プロテオグリカン、フィブリネクチン、ラミニン、および IV 型コラーゲンを切断するが、I 型コラーゲンを切断しない。MMP - 3 は、平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、T リンパ球、および内皮細胞等の種々の細胞により合成される (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1707-1715, 1998)。MMP - 3 は、他の MMP と同様に、細胞外マトリックスの再構築に関係しており、これは傷害に続いて、または血管間細胞移動の間に起こりうる。MMP - 3 は、血漿中で通常  $< 125 \text{ ng/ml}$  の濃度で見出される。血清 MMP - 3 濃度も年齢とともに増加することが示され、男性における濃度は、女性よりも約 2 倍高い (Manicourt, D.H. et al., *Arthritis Rheum.* 37:1774-1783, 1994)。ACS に関係した MMP - 3 の血清または血漿濃度変化についての結論的な公表された研究はない。しかし、MMP - 3 は、アテローム硬化症プラークの肩領域で見出され、これは最も破裂しやすい領域であり、アテローム硬化症プラークの不安定化に関係しうる (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1707-1715, 1998)。従って、MMP - 3 濃度は、不安定狭心症のアテローム硬化症のプラーク破裂の結果として上昇しうる。血清 MMP - 3 は、マスト細胞の脱顆粒を誘導する炎症状態で上昇しうる。血清 MMP - 3 濃度は、関節炎および全身性エリテマトーデスの患者で上昇する (Zucker, S. et al. *J. Rheumatol.* 26:78-80, 1999; Keyszer, G. et al., *Z Rheumatol.* 57:392-398, 1998; Keyszer, G. et al. *J. Rheumatol.* 26:251-258, 1999)。血清 MMP - 3 は、前立腺および尿路

10

20

30

40

50

上皮の癌並びに糸球体腎炎の患者でも上昇する(Lein, M. et al., Urologe A 37:377-381, 1998; Gohji, K. et al., Cancer 78:2379-2387, 1996; Akiyama, K. et al., Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 95:115-128, 1997)。MMP-3の血清濃度は、他の型の癌の患者でも上昇しうる。血清MMP-3は、ヘモクロマトーシスの患者で減少する(George, D.K. et al., Gut 42:715-720, 1998)。

#### 【0082】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)は、ゼラチナーゼBとも呼ばれ、不活性な92kDaの前駆体として合成される84kDaの亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。成熟MMP-9は、IおよびV型ゼラチン、並びにIVおよびV型コラーゲンを切断する。MMP-9は、モノマー、ホモダイマー、および25kDaの2-ミクログロブリン-関連タンパク質とのヘテロダイマーとして存在する(Triebel, S. et al., FEBS Lett. 314:386-388, 1992)。MMP-9は、種々の細胞型により、最も顕著には好中球により合成される。MMP-9の正常血漿濃度は、 $< 35 \text{ ng/ml}$  ( $400 \text{ pM}$ )である。MMP-9の発現は、アテローム硬化症病巣の血管平滑筋細胞で上昇し、これはプラークが不安定の場合に血流に放出されうる(Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。さらに、MMP-9は、ACSの発生に病原の役割を有しうる(Brown, D.L. et al., Circulation 91:2125-2131, 1995)。血漿MMP-9濃度は、不安定狭心症およびAMIの患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない(Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。AMIの患者での上昇は、これらの個体が不安定狭心症を患っていたことも示しうる。MMP-9の血漿濃度の上昇は、不安定狭心症がAMIに比べ大きいであろうが、これらの違いは統計的に有意ではないであろう。安定狭心症の患者のトレッドミル運動試験後の血漿MMP-9濃度の有意な変化はなかった(Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。血漿MMP-9は、リウマチ性関節炎、敗血症性ショック、巨細胞性動脈炎および種々の癌腫の個体で上昇する(Gruber, B.L. et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 78:161-171, 1996; Nakamura, T. et al., Am. J. Med. Sci. 316:355-360, 1998; Blankaert, D. et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 18:203-209, 1998; Endo, K. et al., Anticancer Res. 17:2253-2258, 1997; Hayasaka, A. et al., Hepatology 24:1058-1062, 1996; Moore, D.H. et al., Gynecol. Oncol. 65:78-82, 1997; Sorbi, D. et al., Arthritis Rheum. 39:1747-1753, 1996; Iizasa, T. et al., Clin. Cancer Res. 5:149-153, 1999)。さらに、血漿MMP-9濃度は、脳卒中および脳出血で上昇しうる(Mun-Bryce, S. and Rosenberg, G.A., J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:1163-1172, 1998; Romanic, A.M. et al., Stroke 29:1020-1030, 1998; Rosenberg, G.A., J. Neurotrauma 12:833-842, 1995)。MMP-9は、不安定狭心症およびAMIの個体の血清で入院時に上昇し、最大濃度は $150 \text{ ng/ml}$  ( $1.7 \text{ nM}$ )に近づいた(Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。血清MMP-9濃度は、不安定狭心症の患者の入院時に最高であり、その濃度は処置後徐々に減少し、発症の1週間以上後にベースラインに近づいた(Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。

#### 【0083】

##### (iv) 心筋傷害の他の非特異的マーカー

炎症性反応の活性化は、ACSの初期段階で明白であろう。この点において、炎症および急性期反応物の非特異的マーカーの循環系濃度の測定は、ACSの個体および発生するACSの危険性を有する個体を同定するために用いられるであろう。炎症および急性期反応物に関係するこのようなマーカーの例には、C-反応性タンパク質、インターロイキン-1、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、インターロイキン-6、単球走化性タンパク質-1、溶解性細胞間接着分子-1、溶解性血管細胞接着分子-1、腫瘍壊死因子、カスパーゼ-3およびヘモグロビン<sub>2</sub>がある。

#### 【0084】

C-反応性タンパク質(CRP)は、宿主の防御に関連する21kDaのサブユニットを有するホモ5量体のCa<sup>2+</sup>結合急性期タンパク質である。CRPは、微生物の膜の一般的

10

20

30

40

50

な構成成分であるホスホリルコリンに選択的に結合する。ホスホリルコリンは、動物細胞膜でも見出されるが、CRPと反応しうる形態では存在しない。CRPのホスホリルコリンとの相互作用は、補体カスケードを活性化すると同様に、細菌の凝集反応およびオプソニン作用を促進し、これらすべては細菌のクリアランスに関連する。さらに、CRPは、DNAおよびヒストンと相互作用でき、これはCRPが損傷細胞から循環系に放出された核物質のスカベンジャーであることを示す(Robey, F.A. et al., J. Biol. Chem. 259: 7311-7316, 1984)。CRP合成はIL-6により誘導され、IL-1が肝臓洞様血管のクップファー細胞によるIL-6の合成の引き金となりうるため、IL-1により間接的に誘導される。CRPの正常血漿濃度は、健康な集団の90%では $< 3 \mu\text{g/ml}$  ( $30 \text{ nM}$ )であり、健康な個体の99%では $< 10 \mu\text{g/ml}$  ( $100 \text{ nM}$ )である。血漿CRP濃度は、比濁法またはELISAにより測定できる。CRPの血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない(Biasucci, L.M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Biasucci, L.M. et al., Am. J. Cardiol. 77: 85-87, 1996; Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998; Caligiuri, G. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:1295-1304, 1998; Curzen, N.P. et al., Heart 80:23-27, 1998; Dangas, G. et al., Am. J. Cardiol. 83:583-5, A7, 1999)。CRPは、変異体(variant)または消散型(resolving)の不安定狭心症の個体の血漿でも上昇するが、相反した結果が報告されている(Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998; Caligiuri, G. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:1295-1304, 1998)。CRPは、AMIまたは不安定狭心症の患者の結果を予測するためには有用ではないであろう(Curzen, N.P. et al., Heart 80:23-27, 1998; Rebuzzi, A.G. et al., Am. J. Cardiol. 82:715-719, 1998; Oltrona, L. et al., Am. J. Cardiol. 80:1002-1006, 1997)。CRPの濃度は、感染、手術、外傷、および脳卒中のような急性期反応を顕在化させうるいずれの状態の個体でも、血漿において上昇するであろう。CRPは、合成直後に血流に放出される分泌性タンパク質である。CRP合成は、IL-6により調整され、血漿CRP濃度は、刺激の6時間以内に有意に上昇する(Biasucci, L.M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996)。血漿CRP濃度は、刺激後約50時間で最大となり、血流において約19時間の半減期で減少し始める(Biasucci, L.M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996)。他の研究により、不安定狭心症の個体の血漿CRP濃度が確認された(Biasucci, L.M. et al., Circulation 94:874-877, 1996)。CRPの血漿濃度は、ACSの個体で $100 \mu\text{g/ml}$  ( $1 \mu\text{M}$ )に近づく(Biasucci, L.M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Liuzzo, G. et al., Circulation 94:2373-2380, 1996)。CRPは、急性期反応の特異的なマーカーである。CRPの上昇は、AMIおよび不安定狭心症の個体の血漿で同定され、アテローム硬化症のプラーク破裂または心臓組織傷害と関係した急性期反応の活性化の結果として最もあり得ることである。CRPは、ACSに極めて非特異的なマーカーであり、血漿におけるCRP濃度の上昇は、免疫系の活性化を伴う状態に関連せず起こるのである。ACSに対する非特異性のその高い度合いにもかかわらず、心臓組織傷害に特異的な他のマーカーとともに使用された場合に、CRPは不安定狭心症およびAMIの同定に有用であろう。血漿は、高濃度のCRPを有し、報告された健康な個体の血液中のCRP濃度には、高い変動性がある。明らかに健康な個体の血漿のCRP濃度の上限を決定するためには、競合イムノアッセイが最も可能性が高いが、様々な血漿サンプルについての単一のアッセイを用いたさらなる研究が必要である。

#### 【0085】

インターロイキン-1 (IL-1) は、急性期反応に関連する $17 \text{ kDa}$ の分泌性前炎症性サイトカインであり、多くの疾患の病原性媒介物である。IL-1は、通常マクロファージおよび上皮細胞により産生される。IL-1は、アポトーシスが進行中の細胞からも放出される。IL-1の正常血清濃度は、 $< 30 \text{ pg/ml}$  ( $1.8 \text{ pM}$ )である。ACSの個体のIL-1の血漿濃度の潜在的上昇についての結論的な研究はなく、おそらくアッセイの感度限界またはACS発症直後の血流からのIL-1のクリアランスによるものであろう。IL-1は急性期反応の早期の関係物であるので、理論的に

は、IL-1 は不安定狭心症およびAMIにおけるCRPのような他の急性期反応タンパク質に比べ早期に上昇するであろう。さらに、IL-1 は、アポトーシスが進行中の細胞から放出され、これは虚血の早期の段階で活性化されうる。この点において、ACSに関係した血漿IL-1 濃度の上昇については、高感度のアッセイを用いたさらなる研究が必要である。血漿IL-1 濃度の上昇は、外傷および感染のような前炎症性状態における急性期反応の活性化に関係する。IL-1 は、4時間に続く5分間の2相生理学的半減期を有する(Kudo, S. et al., *Cancer Res.* 50:5751-5755, 1990)。IL-1 は、炎症性反応またはアポトーシスの活性化により細胞外環境に放出される。AMIおよび不安定狭心症エピソード後のわずかな短い時間だけIL-1 が上昇する可能性があり、入院時のACSの患者から採取されたほとんどの血液サンプルが、発作に続くIL-1 10  
上昇の時期の範囲外となる。

【0086】

インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)は、肝細胞、上皮細胞、単球、マクロファージ、および好中級において優勢的に発現する17kDaのIL-1ファミリーの構成員である。IL-1raは、選択的スプリングを通じて産生される細胞内および細胞外形態の両方を有する。IL-1raは、生理的IL-1活性の調整に関係すると考えられている。IL-1raは、IL-1様の生理的活性を有していないが、IL-1 およびIL-1 の結合を遮蔽してそれらの生化学的活性を阻害して、IL-1 と同様の親和性によりT細胞および繊維芽細胞のIL-1レセプターに結合することができる(Stockman, B.J. et al., *Biochemistry* 31:5237-5245, 1992; Eisenberg, S.P. 20  
et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:5232-5236, 1991; Carter, D.B. et al., *Nature* 344:633-638, 1990)。IL-1raは、通常血漿中でIL-1に比べて高濃度で存在し、IL-1ra濃度がIL-1に比べて疾患の重篤度とより相関していることが示された(Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999)。さらに、IL-1raが急性期タンパク質であるという証拠がある(Gabay, C. et al., *J. Clin. Invest.* 99:2930-2940, 1997)。IL-1raの正常血漿濃度は、 $< 200 \text{ pg/ml}$  ( $12 \text{ pM}$ )である。IL-1raの血漿濃度は、AMIおよびAMI、死亡、または難治性狭心症に進行する不安定狭心症の患者で上昇する(Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999; Latini, R. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:1-6, 1994)。さらに、IL-1raは、合併症を伴わないAMIと比較して重篤なAMIで有意に上昇する(L 30  
atini, R. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:1-6, 1994)。これは、IL-1raが不安定狭心症およびAMIにおいてACSの重篤度の有用なマーカーであり得ることを示す。IL-1raの血漿濃度の上昇は、感染、外傷、および関節炎等の炎症性または急性期反応の活性化を伴ういずれの状態にも関係する。IL-1raは、前炎症性状態の血流に放出され、急性期反応の関連物としても放出されうる。血流からのIL-1raのクリアランスの主要な起点は、腎臓および肝臓であると思われる(Kim, D.C. et al., *J. Pharm. Sci.* 84:575-580, 1995)。IL-1ra濃度は、不安定狭心症の個体の血漿で発症の24時間以内に上昇し、これらの上昇は発症の2時間以内でさえも明白であろう(Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999)。不安定狭心症が重度に進行した患者では、IL-1raの血漿濃度は、入院時の濃度に比べ発症の48時間後の方が高い 40  
が、一方平穩に進行した患者では、その濃度が減少した(Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999)。さらに、不安定狭心症に関係したIL-1raの血漿濃度は、 $1.4 \text{ ng/ml}$  ( $80 \text{ pM}$ )に近づきうる。IL-1raは、ACSの重篤度の有用なマーカーであろう。これはACSの特異的マーカーではないが、IL-1raの血漿濃度の変化は、疾患の重篤度に関連していると思われる。さらに、これは、前炎症性状態においてIL-1の放出と連動してまたはその直後に放出されやすく、IL-1に比べ高い濃度で見出される。これは、IL-1raがIL-1活性の有用な間接的なマーカーであり得ることを示し、IL-1はIL-6の産生を顕在化させるものである。従って、IL-1raは、不安定狭心症およびAMIの重篤度を等級付けするのみならず、IL-6濃度が有意に上昇する前に、急性期反応の早期の段階を同定するのに有用であろう。 50

## 【 0 0 8 7 】

インターロイキン - 6 ( I L - 6 ) は、ヘマトポエチンファミリーの前炎症性サイトカインである 2 0 k D a の分泌性タンパク質である。I L - 6 は、急性期の反応物であり、接着分子等の種々のタンパク質の合成を刺激する。その主要な機能は、肝臓タンパク質の急性期産生を媒介することであり、その合成はサイトカイン I L - 1 により誘導される。I L - 6 は、通常マクロファージおよび T リンパ球により産生される。I L - 6 の正常血清濃度は、 $< 3 \text{ pg / ml } ( 0 . 1 5 \text{ pM } )$  である。I L - 6 の血漿濃度は、A M I および不安定狭心症の患者で上昇し、A M I において大きい度合いである (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998; Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999)。I L - 6 は、安定狭心症の患者の血漿では有意には上昇しない (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998)。さらに、I L - 6 濃度は、重篤な進行の不安定狭心症患者の血漿では、発症の 4 8 時間以降に増加するが、平穩の進行のものでは減少する (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999)。これは、I L - 6 が疾患の進行の有用な指標となりうることを示している。I L - 6 の血漿上昇は、外傷、感染、または急性期反応を顕在化させる他の疾患のようないずれの非特異的前炎症性状態にも関係する。I L - 6 は、血流中で 4 . 2 時間の半減期を有し、A M I および不安定狭心症に続いて上昇する (Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998)。I L - 6 の血漿濃度は、A M I 発症の 8 ~ 1 2 時間以内に上昇し、 $1 0 0 \text{ pg / ml}$  に近づきうる。不安定狭心症の患者の I L - 6 の血漿濃度は、発症の 7 2 時間後に最大濃度に上昇し、おそらく発作の重篤度によるものである (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996)。I L - 6 は、A C S に関係した炎症の高感度のマーカーと思われる。しかし、これは A C S に特異的ではなく、A C S の危険因子と見なされる種々の状態で上昇しうる。しかし、I L - 6 は、A M I または不安定狭心症の重篤度を同定するのに有用であり、医師が疾患の進行についてこれらの患者を詳しくモニターすることを可能にしうる。さらに、I L - 6 は、不安定狭心症および A M I を安定狭心症から識別するのに有用であろう。

## 【 0 0 8 8 】

腫瘍壊死因子 ( T N F ) は、急性期反応に関連した 1 7 k D a の分泌性前炎症性サイトカインであり、多くの疾患の病原性の媒介物である。T N F は、通常マクロファージおよびナチュラルキラー細胞により産生される。T N F の正常血清濃度は、 $4 0 \text{ pg / ml } ( 2 \text{ pM } )$  である。T N F の血漿濃度は、A M I の患者で上昇し、不安定狭心症の患者でわずかに上昇する (Li, D. et al., *Am. Heart J.* 137:1145-1152, 1999; Squadrito, F. et al., *Inflamm. Res.* 45:1419, 1996; Latini, R. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:1-6, 1994; Carlstedt, F. et al., *J. Intern. Med.* 242:361-365, 1997)。T N F の血漿濃度の上昇は、外傷、脳卒中、および感染等のいずれの前炎症性状態にも関係する。T N F は、血流中で約 1 時間の半減期を有し、症状の発症直後に循環系から除去されうることを示す。A M I の患者では、T N F は、胸部痛の後 4 時間で上昇し、発症の 4 8 時間以内に正常濃度に徐々に減少する (Li, D. et al., *Am. Heart J.* 137:1145-1152, 1999)。A M I 患者の血漿中の T N F の濃度は、 $3 0 0 \text{ pg / ml } ( 1 5 \text{ pM } )$  を超えた (Squadrito, F. et al., *Inflamm. Res.* 45:14-19, 1996)。

## 【 0 0 8 9 】

溶解性細胞間接着分子 ( s I C A M - 1 ) は、C D 5 4 とも呼ばれ、白血球のリクルートメントおよび移動の間の白血球の抗原存在細胞および内皮細胞への結合を促進する、8 5 ~ 1 1 0 k D a の細胞表面結合免疫グロブリン様インテグリンリガンドである。s I C A M - 1 は、血管内皮、造血幹細胞および、非造血幹細胞により通常産生され、これは腸および表皮で見出されるものである。s I C A M - 1 は、細胞死の間またはタンパク質分解活性の結果として細胞表面から放出されうる。s I C A M - 1 の正常血漿濃度は、約  $2 5 0 \text{ ng / ml } ( 2 . 9 \text{ nM } )$  である。s I C A M - 1 の血漿濃度は、A M I および不安定狭心症の患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない (Pellegatta, F. et al.,

10

20

30

40

50

J. Cardiovasc. Pharmacol. 30:455-460, 1997; Miwa, K. et al., Cardiovasc. Res. 36:37-44, 1997; Ghaisas, N.K. et al., Am. J. Cardiol. 80:617-619, 1997; Ogawa, H. et al., Am. J. Cardiol. 83:38-42, 1999)。さらに、ICAM-1は、アテローム硬化症の病巣および病巣の形成を受けやすい範囲で発現し、このためこれはプラーク破裂により血流に放出されうる(Iiyama, K. et al., Circ. Res. 85:199-207, 1999; Tenaglia, A.N. et al., Am. J. Cardiol. 79:742-747, 1997)。sICAM-1の血漿濃度の上昇は、虚血性脳卒中、頭部の外傷、アテローム硬化症、癌、子癇前症、多発性硬化症、嚢胞性線維症、および他の非特異的炎症性状態に関係する(Kim, J.S., J. Neurol. Sci. 137:69-78, 1996; Laskowitz, D.T. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 7:234-241, 1998)。sICAM-1の血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の急性段階の間で上昇する。血漿sICAM-1の上昇は、AMI発症の9~12時間以内にその最大に達し、24時間以内に正常濃度に戻る(Pellegatta, F. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 30:455-460, 1997)。sICAMの血漿濃度は、AMIの患者で700 ng/ml(8 nM)に近づく(Pellegatta, F. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 30:455-460, 1997)。sICAM-1は、AMIおよび不安定狭心症の個体の血漿で上昇するが、これらの疾患に特異的ではない。しかし、血漿上昇が安定狭心症に関係しないため、これは安定狭心症からのAMIおよび不安定狭心症の識別に有用なマーカーであろう。興味深いことに、ICAM-1は、アテローム硬化症プラーク中に存在し、プラーク破裂により血流に放出されうる。従って、sICAMは、炎症のみならず、ACSに関係したプラーク破裂のマーカーとしても有用であろう。

10

20

#### 【0090】

血管細胞接着分子(VCAM)は、CD106とも呼ばれ、リンパ球のリクルートメントの間のBリンパ球および発生中のTリンパ球の抗原存在細胞への結合を促進する、100~110 kDaの細胞表面結合免疫グロブリン様インテグリンリガンドである。VCAMは、通常内皮細胞により産生され、これは血管およびリンパ管、心臓、並びに他の体腔の内側を覆うものである。VCAM-1は、細胞死の間またはタンパク質分解活性の結果として細胞表面から放出されうる。sVCAMの正常血清濃度は、約650 ng/ml(6.5 nM)である。sVCAM-1の血漿濃度は、AMI、不安定狭心症、および安定狭心症の患者でわずかに上昇する(Mulvihill, N. et al., Am. J. Cardiol. 83:1265-7, A9, 1999; Ghaisas, N.K. et al., Am. J. Cardiol. 80:617-619, 1997)。しかし、sVCAM-1は、アテローム硬化症の病巣で発現し、その血漿濃度は、アテローム硬化症の範囲に関連づけられる(Iiyama, K. et al., Circ. Res. 85:199-207, 1999; Peter, K. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17:505-512, 1997)。sVCAM-1の血漿濃度の上昇は、虚血性脳卒中、癌、糖尿病、子癇前症、血管傷害、および他の非特異的炎症性状態に関係する(Bitsch, A. et al., Stroke 29:2129-2135, 1998; Otsuki, M. et al., Diabetes 46:2096-2101, 1997; Banks, R.E. et al., Br. J. Cancer 68:122-124, 1993; Steiner, M. et al., Thromb. Haemost. 72:979-984, 1994; Austgulen, R. et al., Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 71:53-58, 1997)。

30

#### 【0091】

単球走化性タンパク質-1(MCP-1)は、単球および好塩基球を引き寄せ、好中級および好酸球を引き寄せない10 kDaの走化性因子である。MCP-1は、通常モノマーおよびホモダイマーの形態の間で平衡して見出され、通常単球および血管内皮細胞中で産生され、かつ分泌される(Yoshimura, T. et al., FEBS Lett. 244:487-493, 1989; Li, Y.S. et al., Mol. Cell. Biochem. 126:61-68, 1993)。MCP-1は、乾癬、リウマチ性関節炎、およびアテローム硬化症等の単球浸潤を伴う種々の疾患の病原と関係する。血漿中のMCP-1の正常濃度は、 $< 0.1 \text{ ng/ml}$ である。MCP-1の血漿濃度は、AMI患者で上昇し、不安定狭心症の患者の血漿ではおそらく上昇するが、安定狭心症に関係しては上昇しない(Soejima, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34:983-988, 1999; Nishiyama, K. et al., Jpn. Circ. J. 62:710-712, 1998; Matsumori, A. et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 29:419-423, 1997)。興味深いことに、MCP-1は、アテロ

40

50

ーム硬化症の間で動脈血管壁への単球のリクルートメントにも関係しうる。MCP-1の血清濃度の上昇は、アルコール性肝臓疾患、間隙性肺疾患、敗血症、および全身性エリテマトーデス等の炎症に関係する種々の状態に関係する(Fisher, N.C. et al., Gut 45:416-420, 1999; Suga, M. et al., Eur. Respir. J. 14:376-382, 1999; Bossink, A.W. et al., Blood 86:3841-3847, 1995; Kaneko, H. et al. J. Rheumatol. 26:568-573, 1999)。MCP-1は、単球および内皮細胞の活性化により血流中に放出される。AMIの患者からの血漿中のMCP-1の濃度は、1 ng/ml (100 pM) に近づくことが報告され、1ヶ月間上昇したまま維持されうる(Soejima, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34:983-988, 1999)。ACSとの関連でMCP-1の血流への放出および血流からのクリアランスの動態は、現在不明である。MCP-1は、単球の移動を伴う前炎症性状態の存在の特異的マーカーである。MCP-1は、ACSに特異的ではないが、伝えるところによればその濃度がAMIの患者の血漿中で上昇する。さらに、MCP-1濃度は、不安定狭心症または安定狭心症の患者の血漿では上昇せず、これはMCP-1がAMIを不安定および安定狭心症から区別するのに有用であろうことを示す。

#### 【0092】

キャスパーゼ-3は、CPP-32、YAMA、およびアポパインとも呼ばれ、細胞アポトーシスの間で活性化されるインターロイキン-1 転換酵素(ICE)様細胞内システインプロテイナーゼである。キャスパーゼ-3は、アポトーシス誘導の間にタンパク質分解により20 kDaと11 kDaのサブユニットのヘテロダイマーに活性化される、不活性の32 kDaの前駆体として存在する(Fernandes-Alnemri, T. et al., J. Biol. Chem. 269:30761-30764, 1994)。その細胞基質には、ポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ(PARP)およびステロール調整因子結合タンパク質(SREBPs)が含まれる(Liu, X. et al., J. Biol. Chem. 271:13371-13376, 1996)。キャスパーゼ-3の正常血漿濃度は、不明である。ACSに関係したキャスパーゼ-3の血漿濃度の変化に関する公表された研究はない。虚血および低酸素症に関係した心臓筋細胞のアポトーシス誘導の仮説を支持する増加する量の証拠がある(Saraste, A., Herz 24:189-195, 1999; Ohtsuka, T. et al., Coron. Artery Dis. 10:221-225, 1999; James, T.N., Coron. Artery Dis. 9:291-307, 1998; Bialik, S. et al., J. Clin. Invest. 100:1363-1372, 1997; Long, X. et al., J. Clin. Invest. 99:2635-2643, 1997)。血漿キャスパーゼ-3濃度の上昇は、アポトーシスを伴ういずれの生理的事象にも関係しうる。アポトーシスが、運動の間およびその後の骨格筋中で、および大脳虚血で誘導されることを示唆する証拠がある(Carraro, U. and Franceschi, C., Aging (Milano) 9:19-34, 1997; MacManus, J.P. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 19:502-510, 1999)。AMIの患者の末梢血液中でのキャスパーゼ-3の発見に関する公表された報告がないので、心臓細胞死のマーカーとしてのキャスパーゼ-3の有用性は、現在不明である。興味深いことに、虚血誘導アポトーシスは、それを他の形態のアポトーシスから識別する特徴を有しうるが、キャスパーゼ-3の誘導は、すべてのアポトーシス経路に共通である。これらのマーカーのすべてが血漿の膜の完全性の損失に続いて放出されるので、キャスパーゼ-3は心臓細胞死の他の細胞質ゾルのマーカーより有用であるとは証明されないであろう。アポトーシスを受けている細胞が、壊死の特徴である、膜の完全性を失うということがないことを示唆する証拠もあるが、むしろ、これらは最終的にはマクロファージおよび他の近接細胞により摂取される完全な膜を有するアポトーシス体を形成する(Saraste, A., Herz 24:189-195, 1999; James, T.N., Coron. Artery Dis. 9:291-307, 1998)。この点において、細胞内容物の放出は、壊死の結果であり、キャスパーゼ-3は、特にアポトーシスの結果としての、心臓細胞死の同定に適したマーカーではないであろう。

#### 【0093】

ヘモグロビン(Hb)は、赤血球に見出される酸素運搬鉄含有球状タンパク質である。これは、2つのグロブリンユニットのヘテロダイマーである。 $\alpha_2\beta_2$ は胎児Hbと呼ばれ、 $\alpha_2\beta_2$ は成人HbAと呼ばれ、そして $\alpha_2\beta_2\delta_2$ は成人HbA<sub>2</sub>と呼ばれる。ヘモグロビンの90~95%はHbAであり、 $\alpha_2\beta_2$ グロブリン鎖はすべてのHb型で、鎌状赤血球ヘモグ

10

20

30

40

50

ロビンでも、見出される。Hbは、身体全体にわたり細胞に酸素を運搬する責任を有する。Hb<sub>2</sub>は、通常は血清中では検出されない。ACSパネルでのHb<sub>2</sub>の有用性は、溶血の範囲を決定すること、および赤血球起源タンパク質の、測定された血清濃度への寄与をもたらすことにあろう。溶血の許容濃度は、赤血球に存在する血清マーカーの測定で確立されるべきものである。

#### 【0094】

ヒトリボカリン型プロスタグランジンDシンターゼ(hPDGS)は、 $\alpha$ -トレースとも呼ばれ、プロスタグランジンHからのプロスタグランジンD<sub>2</sub>の形成を触媒する30kDaの糖タンパク質である。明らかに健康な個体のhPDGS濃度の上限は、約420ng/mlであると報告されている(欧州特許公開番号EP0999447A1)。hPDGSの上昇は、不安定狭心症および脳梗塞の患者からの血液中で同定された(欧州特許公開番号EP0999447A1)。さらに、hPDGSは、虚血性エピソードの有用なマーカーと思われ、hPDGSの濃度は、経皮的経管的冠状動脈形成(PTCA)の後の狭心症の患者において経時的に減少することが見出され、虚血としてのhPDGS濃度減少が解決することを示している(欧州特許公開番号EP0999447A1)。

10

#### 【0095】

好ましい態様として、心筋傷害の1またはそれ以上の特異的マーカーは、ACSの診断パネルを作成するために、心筋傷害の1またはそれ以上の非特異的マーカーと組み合わせられる。さらに、本発明は、このような複数のマーカーの成分を決定する方法を提供する。このようなパネルが組み立てられると、種々のマーカーそれぞれの存在または濃度が1またはそれ以上の患者サンプルにおいて決定され、そして任意にそれぞれのマーカーの診断濃度とまたは正常濃度と比較される。

20

#### 【0096】

##### アッセイ測定方策

本発明のマーカーの検出および分析のために、非常に多くの方法および装置が当業者によく知られている。患者試験サンプルにおけるポリペプチドまたはタンパク質に関しては、イムノアッセイの装置および方法がしばしば用いられる。例えば、米国特許6,143,576; 6,113,855; 6,019,944; 5,985,579; 5,947,124; 5,939,272; 5,922,615; 5,885,527; 5,851,776; 5,824,799; 5,679,526; 5,525,524; および5,480,792を参照のこと。これらのそれぞれは、すべての表、図面および請求の範囲を含めてその全体を、引用することにより本明細書に取り込まれる。これらの装置および方法は、種々のサンドイッチ、競合、または非競合のアッセイ形態においてラベル化された分子に利用でき、目的とする分析物の存在または量と関連するシグナルを発生する。さらに、バイオセンサーおよびオプティカルイムノアッセイのような、ある特定の装置および方法は、ラベル化された分子を必要とせずに分析物の存在または量を決定するために使用することができる。米国特許5,631,171および5,955,377を参照のこと。これらのそれぞれは、すべての表、図面および請求の範囲を含めてその全体を、引用することにより本明細書に取り込まれる。

30

#### 【0097】

好ましくは、マーカーはイムノアッセイを用いて分析されるが、他の方法も当業者にはよく知られている(例えば、マーカーRNA濃度の測定)。マーカーの存在または量は、一般的には、各々のマーカーに特異的な抗体を用いて特異的結合を検出することにより決定される。例えば、酵素結合イムノアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、競合結合アッセイ等の、いずれの適当なイムノアッセイも利用しうる。マーカーへの抗体の特異的免疫的結合は、直接的または間接的に検出できる。直接ラベルには、抗体に結合した、蛍光若しくは発光タグ、金属、染料、放射性核種等が含まれる。間接ラベルには、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等のような、この技術分野でよく知られた種々の酵素が含まれる。

40

#### 【0098】

マーカーに特異的な固定化抗体の使用も、本発明により企図されたものである。抗体は、磁気またはクロマトグラフィーのマトリックス粒子、(マイクロタイターウェルのような

50

)アッセイ場所の表面、(プラスチック、ナイロン、紙のような)固体基質物質の断片等のような、種々の固体担体上で固定化される。アッセイ片は、抗体や固体担体上に配列した複数の抗体を被覆することにより調製される。この片は、その後試験サンプル中に浸漬され、そして、洗浄および検出工程を通じて即座に処理され、着色した点のような測定可能なシグナルを発生させる。

#### 【0099】

複数のマーカーの分析は、1つの試験サンプルで別個にまたは同時に実行されうる。いくつかのマーカーは、多数のサンプルの効率的な処理のために1つの試験に併合されうる。さらに、当業者は、同一の個体からの(例えば、経時的な時点での)多数のサンプルを試験することの価値を認識するであろう。一連のサンプルのこのような試験は、経時的なマーカー濃度の変化の同定を可能にするであろう。マーカー濃度の増加または減少は、マーカー濃度の変化の不存在と同様に、これらに限定されないが、事象の発症からのおおよその時間、救出可能な組織の存在および量、投薬治療の適切さ、再灌流や症状の消散により示されるような種々の治療効果、種々の型のACSの識別、事象の重篤度の同定、疾患の重篤度の同定、および将来の事象の危険性等の患者の結果の同定、を同定することを含む疾患の状態についての有用な情報を提供しうる。

10

#### 【0100】

上述したマーカーからなるパネルは、ACSの診断若しくは予後およびACSの患者の管理に関連した適切な情報を提供するために構築されうる。このようなパネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15または20の個体のマーカーを用いて構築されうる。単一のマーカー、またはマーカーの多数のパネルを含むマーカーの部分集合の分析は、種々の臨床的環境において臨床的な感度または特異性を最適化することにより当業者により実行されうる。これらには、限定されないが、通院、緊急治療、危機治療、集中治療、監視室、入院患者、外来患者、医院、医療診療所、および健康診断環境が含まれる。さらに、当業者は、前述した環境の各々において臨床的な感度および特異性を最適化するために、単一のマーカー、またはマーカーの多数のパネルを含むマーカーの部分集合を、診断閾値の調整と組み合わせることで用いることができる。アッセイの臨床的な感度は、アッセイが正確に予測する疾患を有するものの割合として定義され、アッセイの特異性は、アッセイが正確に予測する疾患を有しないものの割合により定義される(Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2<sup>nd</sup> edition, Carl Burtis and Edward Ashwood eds., W.B. Saunders and Company, p. 496)。

20

30

#### 【0101】

なお、マーカーの分析は、種々の実際的な形態において実行されうる。例えば、マイクロタイタープレートやオートメーションの使用は、多数の試験サンプルの処理を容易にしうる。あるいは、単一のサンプルの形態は、例えば、通院移動または緊急室の環境において、適時の仕方で即座の処理および診断を促進するために構築される。

#### 【0102】

他の態様として、本発明は、マーカーの分析のためのキットを提供する。このようなキットは、好ましくは、少なくとも1つの試験サンプルの分析のための装置および試薬並びにアッセイ実行のための指示書を含む。任意に、キットは、患者の診断または予後のためにマーカー濃度を変換する1またはそれ以上の方法を含みうる。

40

#### 【0103】

##### 【実施例】

##### 実施例1 血液の採取

血液標本は、訓練した研究職員により採取された。サンプルは、既述のように採取され処理された。de Lemos et al., The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes (急性冠状動脈症候群の患者のB-型ナトリウム排泄増加性ペプチドの予後の価値)、N Engl J Med 345:1014-21 (2001)を参照のこと。血漿サンプルは、クエン酸抗凝固剤中で採取され、採取から60分以内に研究現場において-20 またはそれより冷たくして凍結された。標本は、TIMI小児病院心臓

50

マーカーコア研究所（ボストン、マサチューセッツ州）にドライアイスを用いて輸送され、そこでは、これらは - 70 で保存された。O P U S - T I M I 1 6 試験の完了に続き、50 / 50 の処置アームからのすべての血漿標本は、バイオサイトインコーポレーテッド（サンディエゴ、カリフォルニア州）にドライアイスを用いて輸送され、そこでアッセイが行われた。

#### 【0104】

##### 実施例2 生化学的分析

マーカーは、標準的なイムノアッセイ技術を用いて測定された。これらの技術には、タンパク質標的に特異的に結合する抗体の使用が含まれた。選択されたマーカーに対して誘導されたモノクローナル抗体は、N - ヒドロキシサクシニミドビオチン（N H S - ビオチン）を用いて、抗体当たり約5のN H S - ビオチン部分の割合で、ビオチン化された。そして、抗体 - ビオチンコンジュゲートは、標準アビジン384ウェルマイクロタイタープレートのウェルに加えられ、プレートに結合していない抗体コンジュゲートは除去された。これは、マイクロタイタープレートの「抗マーカー」を形成した。同一のマーカーに対して誘導された他のモノクローナル抗体は、サクシニミジル4 - [ N - マレイミドメチル ] - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート（S M C C）およびN - サクシニミジル3 - [ 2 - ピリジリジチオ ] プロピオネート（S P D P）（ピアース、ロックフォード、イリノイ州）を用いてアルカリホスファターゼにコンジュゲートされた。

10

#### 【0105】

イムノアッセイは、T E C A N ジェネシス R S P 200 / 8 ワークステーションを用いて行われた。ビオチン化された抗体は、あらかじめアビジンで被覆されたマイクロタイタープレートのウェルにピペットで移され、60分間インキュベートされた。結合していない抗体を含む溶液は除去され、細胞は、150 mMのNaCl、0.1%のアジ化ナトリウム、および0.02%のT w e e n - 20を含む20 mMのホウ酸塩（pH 7.42）からなる洗浄バッファーを用いて洗浄された。血漿サンプル（10 μL）は、マイクロタイタープレートのウェルにピペットで移され、60分間インキュベートされた。そして、サンプルは取り出され、ウェルは洗浄バッファーにより洗浄された。そして、抗体 - アルカリホスファターゼコンジュゲートがウェルに加えられ、さらに60分間インキュベートされ、その後、抗体コンジュゲートは取り除かれ、ウェルは洗浄バッファーにより洗浄された。基質（A t t o P h o s（登録商標）、プロメガ、マジソン、ウイスコンシン州）がウェルに加えられ、蛍光産物の形成速度は、患者サンプルのマーカーの濃度と関連づけられた。

20

30

#### 【0106】

B N Pのアッセイは、サイオスインコーポレーテッド（サニーヴェール、カリフォルニア州）から得たネズミ抗B N Pモノクローナル抗体106.3を用いて行った。m A b 106.3を分泌するハイブリドーマ細胞系は、F O X - N Y細胞と、B S AにコンジュゲートされたヒトB N P 1 - 32により免疫されたB a l b / cマウスからの脾臓細胞との融合により発生させた。第2のネズミ抗B N P抗体は、バイオサイトインコーポレーテッド（サンディエゴ、カリフォルニア州）により、既述（米国特許番号6,057,098）のように抗原ファージディスプレイにより、標準技術によりK L HにコンジュゲートしたヒトB N P抗原（サイオスインコーポレーテッド、サニーヴェール、カリフォルニア州；米国特許番号5,114,923）を用いて、産生された。ヒトB N P抗原は、アッセイの標準化のためにも用いた。

40

#### 【0107】

M M P - 9のアッセイは、バイオサイトインコーポレーテッドにより、既述（米国特許番号6,057,098）のようにファージディスプレイおよび組み換えタンパク質発現を用いて発生させたネズミ抗M M P - 9抗体を用いて行った。市販のM M P - 9抗原は、アッセイの標準化のために用いた（カルバイオケム - ノババイオケムコーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州）。抗体産生のために用いた免疫原は、バイオサイトインコーポレーテッドにより調製された。P C Rプライマーは、ヒトM M P - 9の5' - 末端

50

の配列およびヒトMMP-9の3'-末端のコード配列に対応して作製した(ジェンバンク取得番号J05070)。金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによる組み換えタンパク質の精製を補助するために、6つのヒスチジンコドンが、コード配列の終端と終止コドンとの間に挿入された。5'-末端MMP-9プライマーは、プライマーAと表され、以下のヌクレオチド配列からなる；5'-AGGTGTCGTAAGCTTGAATTCAGACACCTCTGCCGCCACCATGAG-3'(SEQ ID NO:1)。5'プライマーは、その5'-末端において、EcoRI部位および直ぐ上流の配列に対応するpEAK12ベクター配列(エッジバイオシステムズ、ガイサーバーグ、メリーランド州)の21塩基対をも含む。3'-末端MMP-9プライマーは、プライマーBと表され、以下のヌクレオチド配列からなる；5'-GGCTGGCTTACCTGCGGCCCTTAGTGATGGTGAATGGTGAATGGTCCCTCAGG GCACTGCAGGATG-3'(SEQ ID NO:2)。3'プライマーは、その5'末端において、NotI部位の6塩基および直ぐ下流の配列等のベクター配列のさらなる20塩基対を含む。これらのプライマーの5'-末端におけるベクター配列は、T4DNAポリメラーゼ処理により、pEAK12ベクターのものに特異的で相補的な一本鎖オーバーハングを形成するであろう。MMP-9遺伝子挿入のPCR増幅は、100pmolの5'プライマー(A)、100pmolの3'プライマー(B)、2.5単位のエクスパンドポリメラーゼ、10μlの2mMdNTPs、10μlの10xエクスパンド反応バッファー、テンプレートとしての1μlのクロンテック-クイック-クローンヒト脾臓cDNA(クロンテックラボラトリーズ、パロアルト、カリフォルニア州)、および100μlの水を含む、2x100μlの反応スケールで行われた。反応は、(米国特許6,057,098の)実施例18に記載されたように、パーキン-エルマーサーマルサイクラー中で実行された。PCR産物は、沈殿され、アガロースゲル電気泳動により分画され、完全長産物がゲルから切除され、精製され、水中に再懸濁された(米国特許6,057,098の実施例17)。pEAK12ベクターは、NotIおよびEcoRI(ニューヨークバイオラボ、ピバリー、マサチューセッツ州)を用いた消化による挿入物を受け取るために調製された。挿入物およびEcoRI/NotI消化pEAK12ベクターは、1.0μlの10xバッファーAを1.0μgのDNAに添加して水により最終容積が9μlとすることによるT4エキソヌクレアーゼ消化のために、調製した。サンプルは、1μl(1U/μl)のT4DNAポリメラーゼにより30で4分間消化された。T4DNAポリメラーゼは、70で10分間インキュベートすることにより加熱不活性化された。サンプルは冷却され、短時間遠心分離され、新しいマイクロヒュージチューブ中で45ngの消化挿入物が100ngの消化されたpEAK12ベクターに添加された。1.0μlの10xアニーリングバッファーの添加後、容積は、水により10μlとされた。混合物は、70で2分間加熱され、20分以上室温にまで冷却され、挿入物とベクターがアニーリングできるようにした。アニーリングされたDNAは、蒸留水で4倍に希釈され、30μlのエレクトロコンポーネントE.coli株、DH10B(インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州)中にエレクトロポレーションされた。形質転換された細胞は、2xYT培養液により1.0mlに希釈され、アンピシリン(75μg/ml)を補給されたLB寒天プレートに10μl、100μl、300μlを培養し、37で一夜成長させた。コロニーを取り出し、37で2xYT(75μg/mlのアンピシリン)中で一夜成長させた。翌日グリセロール凍結保存物を-80での長期保存のために作製した。これらのクローン(MMPpeak12)の配列は、マコーネルリサーチ(サンディエゴ、カリフォルニア州)で、ジデオキシ鎖終了法により、シークワタームシーケンシングキット(エピセンターテクノロジー、マジソン、ウィスコンシン州)、オリゴヌクレオチドプライマーC、5'-TTCCTCAAGCCTCAGACAGTG-3'(SEQ ID NO:3)、およびD、5'-CCTGGATGCAGGCTACTCTAG-3'(SEQ ID NO:4)を用い、これらはpEAK12ベクターの挿入物の5'および3'側にそれぞれ結合し、そしてLI-COR4000L自動シーケンサー(LI-COR、リンカーン、ネブラスカ州)を用いて確認した。トランスフ

10

20

30

40

50

エクションに適したプラスミドおよびこれに続くヒトMMP-9の発現と精製は、製造者の提案に従いエンドフリープラスミドメガキット（キアジェン、ヴァレンシア、カリフォルニア州）を用いて、クローンMMP9 peak 12.2から調製した。HEK293（「Peak」）細胞は、1mlの凍結バイアル保存物（ $5 \times 10^6$ 細胞/ml）からT-75フラスコに、5%胎児ウシ血清（FBS）（JRHバイオサイエンス、レネキサ、カンザス州）、20単位/mlのヘパリン、0.1%のプルロニックF-68（JRHバイオサイエンス、レネキサ、カンザス州）、および $50 \mu\text{l}/\text{ml}$ のゲンタマイシン（シグマ、セントルイス、ミズーリ州）を含むIS293培地（アーバインサイエンティフィック、サンタアナ、カリフォルニア州）中で拡張された。37℃、湿度85%、5%CO<sub>2</sub>で2~3日間インキュベートした後、FBSを培地中2%に減少させて細胞はT-175フラスコに拡張された。そして細胞は、2~3週間にわたって連続的に1:2に拡張され、接着した細胞の均一な単層を確立した。上記の方法により成長したPeak細胞は、1000rpmで6分間遠心分離され、上清が捨てられた。密度を確立するために細胞を数え、標準染色試験により少なくとも90%の生存力を確認した後、細胞は、 $5 \times 10^5$ 細胞/mlで、2%FBSおよび $50 \mu\text{l}/\text{ml}$ ゲンタマイシンを含む400mlのIS293中で再懸濁され、1Lのスピナーフラスコに加えた。そして、コニカルチューブに、400mlスピナーフラスコ当たり5mlのIS293および320 $\mu\text{g}$ のMMP-9を加えた。これは、混合され、室温で2分間インキュベートされた。スピナー当たり400 $\mu\text{l}$ のX-tremeGENE RO-1539トランスフェクション試薬（ロシュディアグノスティクス、インディアナポリス、インディアナ州）が、チューブに加えられ、そして混合され、室温で20分間インキュベートされた。混合物は、スピナーフラスコに加えられ、37℃、湿度85%、5%CO<sub>2</sub>、100rpmで、4日間インキュベートされた。上記のスピナーフラスコからの細胞培養液は、3500rpmで20分間沈降され、上清がMMP-9の精製のために確保された。20mlのキレーティングファーストフロー樹脂（アマシャムファルマシアバイオテック、ピスケータウェイ、ニュージャージー州）を含むNiCl<sub>2</sub>で充填されたカラムは、BBSで平衡化された。そして、スピナーフラスコからの上清は、カラムに投入され、BBS+10mMイミダゾールで洗浄され、200mMイミダゾールで溶出された。溶出液は、10mMにCaCl<sub>2</sub>を添加した後次の精製工程の投入のために使用された。5mlのゼラチンセファローズ4B樹脂（アマシャムファルマシアバイオテック、ピスケータウェイ、ニュージャージー州）のカラムは、BBS+10mM CaCl<sub>2</sub>で平衡化された。抗原を投入後、カラムは平衡バッファーにより洗浄され、MMP-9は平衡バッファー+2%ジメチルスルフォオキシド（DMSO）を用いて溶出された。ポリオキシエチレングリコールドデシルエーテル（BRIJ-35）（0.005%）およびEDTA（10mM）は、溶出液に添加され、これは最終バッファー（50mM Tris、400mM NaCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、0.01%NaN<sub>3</sub>、pH7.5、0.005%BRIJ-35、10mMEDTA）中に透析された。最後に、タンパク質は、4℃での保存のために約0.25mg/mlに濃縮された。ザイモグラムゲルは、MMP-9の産生および精製の確認に用いられた。ウエスタンブロットも、タンパク質の活性を確認するために用いられた。MMP-9（オンコジーンリサーチプロダクツ、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）は、PEAK細胞系を用いて作製された精製抗原と既知の標準との比較のために用いられた。

#### 【0108】

MMP-9のアッセイは、バイオサイトインコーポレーテッドで発生させたネズミ抗MMP-9抗体を用い、ファージディスプレイおよび組み換えタンパク質発現技術を用いて行った。市販のMMP-9抗原を、アッセイの標準化のために用いた（カルバイオケム-ノババイオケムコーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州）。MMP-9の濃度は、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗体の結合を検出することにより定量した。このアッセイの最小検出可能濃度は、0.3ng/mlであり、報告可能範囲の上限は、2000ng/mlである。

#### 【0109】

10

20

30

40

50

血栓前駆体タンパク質 ( T p T<sup>TM</sup> ) のアッセイは、アメリカンバイオジェネティックサイエンシーズインコーポレーテッド、コロンビア、メリーランド州から得た試薬を用いて行った。溶解性フィブリンポリマーの異なるエピトープを認識する2つのネズミモノクローナル抗体は、アッセイに使用された。アッセイは、アメリカンバイオジェネティックサイエンシーズにより供給された T p T<sup>TM</sup> を用いて検定された。サンプルは、アッセイに先立ち 1 : 4 に希釈された。最小検出可能濃度は、 0 . 2 5 μ g / m l であり、報告可能範囲の上限は、 2 5 μ g / m l である。従って、 1 μ g / m l と 1 0 0 μ g / m l の間のサンプルは、報告可能な範囲でアッセイされうる。

【 0 1 1 0 】

単球走化性タンパク質 - 1 ( M C P - 1 ) のアッセイは、バイオサイトにおいて開発された抗体を用いて行われた。アッセイは、免疫学的測定 ( サンドイッチ ) 形態で開発された。アッセイは、社内 M C P - 1 リファレンス調製物を用いて検定された。このアッセイの最小検出可能濃度は、 2 0 p g / m l であり、報告可能範囲の上限は、 1 0 , 0 0 0 p g / m l であった。

10

【 0 1 1 1 】

種々の形態のトロポニン I ( T I C 複合体および全 T n I ) のアッセイは、捕捉のために市販のヤギ抗 T n I を用い、酵素ラベル化コンジュゲートとしてバイオサイトで開発された抗体を用いて行われた。アッセイは、社内 T I C 複合体および T n I リファレンス溶液を用いて検定された。最小検出可能濃度は、 T n I が 4 0 p g / m l 、 T I C 複合体が 5 0 p g / m l であった。報告可能範囲の上限は、両方のアッセイで 1 0 , 0 0 0 p g / m l であった。

20

【 0 1 1 2 】

脂肪酸結合タンパク質 ( F A B P ) のアッセイは、市販のモノクローナル抗体および市販の F A B P 抗原を用いて行われた。最小検出可能濃度は、 6 n g / m l であり、報告可能範囲の上限は 1 0 , 0 0 0 n g / m l であった。

【 0 1 1 3 】

C - 反応性タンパク質 ( C R P ) およびフィブリノーゲンは、市販のアッセイ ( デードベアリングインコーポレーテッド、ニューアーク、デラウェア州 ) を用いて測定された。

【 0 1 1 4 】

実施例 3 例示的マーカーパネル

30

心筋損傷をもたらす種々の病理学的事象のマーカーを含むマーカーパネルを、構築することができる。このようなパネルには、炎症、アテローム硬化症のプラーク破裂、血小板の活性化、血栓症、および心筋の傷害または壊死のマーカーが含まれうる。このパネルに現れるであろう適切なマーカーは、 I L - 6 、 マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質 ( M D A - 修飾 L D L ) 、 P - セレクチン、トロンプイン - 抗トロンプイン I I I ( T A T ) 複合体、 B N P 、 遊離心臓トロポニン I 、 全心臓トロポニン I 、 トロポニン T および / または C の複合体の心臓トロポニン I 、 遊離心臓トロポニン T 、 全心臓トロポニン T 、 トロポニン I および / または C の複合体の心臓トロポニン T 、 C - 反応性タンパク質、 および / または M M P - 9 である。マーカーパネルは、患者の臨床的な徴候および症状との関連で評価されるであろう。典型的には、 A C S の患者は、胸部痛の有力な症状を有する。

40

【 表 1 】

マーカー陽性	解釈
I L - 6	炎症反応の存在。 A C S に特異的ではないが、早期事象の表示となりうる。
M D A - 修飾 L D L	プラーク破裂の表示。 進行中の事象の表示であり、プラーク破裂が胸部痛の原因でありうる。
P - セレクチン	血小板活性化の表示。 血小板栓が形成中若しくは形成済みである。血小板栓およびその結果の閉塞が胸部痛の原因でありうる。
T A T 複合体	凝固活性化の表示。 血塊が形成中若しくは形成済みであり、その結果の閉塞が胸部痛の原因でありうる。
B N P	心室機能不全の表示 心臓虚血により生じる損傷と関連しうる。
全 c T n I	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。
全 c T n T I C	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。全 c T n I に対する c T n T I C の高い割合は、進行中の事象または継続的虚血の表示となりうる。

10

20

## 【 0 1 1 5 】

パネルの1つ以上のマーカーの経時的上昇および変化は、A C S の進行の表示となりうる。例えば、I L - 6、M D - 修飾 L D L、P - セレクチン、および T A T 複合体の上昇は、アテローム硬化症のプラーク破裂が起こったことを示し、そして、この破裂は血小板の凝集及び凝固の活性化の原因となり、血管の狭小をもたらしうる。さらに、P - セレクチンおよび T A T 複合体の上昇は、状態が血塊形成に有利であることを示しうる。経時的なその後のマーカー濃度の減少は、病的工程が遅くなったかまたは停止したことを示しうる。例えば、経時的な T A T 複合体濃度の減少は、凝固工程が遅くなったかまたは停止したことを示しうる。この点において、経時的な M D A - 修飾 L D L 濃度の減少は、プラーク破裂が継続していないことを示しうる。

30

## 【 0 1 1 6 】

他のマーカーが、上記の例に挙げられたマーカーに置き換え、または加えられうる。代替のまたはさらなる心筋傷害のマーカーには、アネキシン V、B N P および / または B N P 関連ペプチド、 - エノラーゼ、クレアチンキナーゼ - M B、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ホスホグリセリン酸ムターゼ - M B、および S - 1 0 0 a o が含まれる。

40

## 【 0 1 1 7 】

代替のまたはさらなる凝固活性化のマーカーには、プラスミン - - 2 - 抗プラスミン複合体、フィブリノペプチド A、プロトロンビンフラグメント 1 + 2、D - ダイマー、1 またはそれ以上の形態のフォン・ビルブランド因子、組織因子、および血栓前駆体タンパク質 ( T p P ) が含まれる。

## 【 0 1 1 8 】

代替のまたはさらなる血小板活性化のマーカーには、 - トロンボグロブリン、血小板第 4 因子および血小板由来増殖因子が含まれる。

## 【 0 1 1 9 】

代替のまたはさらなるアテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーには、ヒト好中球エラ

50

スターゼ、誘導型一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファジチン酸、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 1、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 2、マトリックスメタロプロテイナーゼ - 3、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ - 9 (MMP - 9) が含まれる。

【0120】

代替のまたはさらなる炎症または急性期反応のマーカには、C - 反応性タンパク質、インターロイキン - 1、インターロイキン - 1レセプターアンタゴニスト、腫瘍壊死因子、溶解性細胞間接着分子 - 1、溶解性血管細胞接着分子 - 1、および単球走化性タンパク質 - 1 が含まれる。

【0121】

さらに、他のマーカがパネルの診断力を増強するためにパネルに加えられることができる。

【0122】

実施例 4 : ACS の予後マーカーとしての MMP - 9、全 c T n I、c T n T I C、BNP、CRP、F A B P、T p P、および M C P - 1

研究母集団

不安定冠状動脈症候群の患者のオーボフィバンによる経口糖タンパク質 I I b / I I I a 阻害 (O P U S - T I M I 1 6) 試験は、10, 288 人の ACS 患者における経口糖タンパク質 I I b / I I I a 阻害因子、オーボフィバンをプラセボと比較した、無作為化した複数の研究機関にまたがった試験である。Cannon et al., Oral glycoprotein IIb/III a inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI 16) trial (不安定冠状動脈症候群の患者のオーボフィバンによる経口糖タンパク質 I I b / I I I a 阻害 (O P U S - T I M I 1 6) 試験)、Circulation 102:149-56 (2000) を参照のこと。患者は、彼らが虚血症状の発症から 72 時間以内に現れ、次の基準の 1 つに適合するならば、登録する資格があったとした：糖尿病または血管疾患を有する 65 歳以上；以前に冠状動脈疾患であった；動的な E C G 変化を有する；または上昇した心臓マーカーを有する。研究は、各々の病院の倫理調査委員会により承認され、すべての患者から書面のインフォームドコンセントが提供された。患者は、次の 3 つの処置アームの 1 つに無作為化された：オーボフィバン 50 mg を 1 日 2 回 (50 / 50 グループ)、オーボフィバン 50 mg を 1 日 2 回 1 月間、その後オーボフィバン 30 mg を 1 日 2 回 (50 / 30 グループ)、またはプラセボ。O P U S - T I M I 1 6 研究は、50 / 30 グループにおいて増加した死亡率が見出されたため、時期尚早に終了した。50 / 50 グループでは死亡率の上昇はなかった。本研究は、50 / 50 グループに割り当てられた患者により実施され、MMP - 9、全 c T n I、c T n T I C、BNP、CRP、F A B P、T p P、および M C P - 1 の分析に適したベースライン血漿標本が提供された。

【0123】

O P U S - T I M I 1 6 に登録した症状の発症からの中央値時間は、40 時間であった。

【0124】

MMP - 9 アッセイ

MMP - 9 のアッセイは、バイオサイトインコーポレーテッドで発生させたネズミ抗 MMP - 9 抗体を用いて、ファージディスプレイおよび組み換えタンパク質技術を用いて行われた。市販の MMP - 9 抗原を、アッセイの標準化のために用いた (カルバイオケム - ノババイオケムコーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州)。アッセイは、自動ハイスループットプラットフォームの 348 ウェルマイクロタイタープレートで行った (T E C A N ジェネシス R S P 2 0 0 / 8)。MMP - 9 の濃度は、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗体の結合を検出することにより定量した。すべてのサンプルは、2 回実行した。このアッセイの最小検出可能濃度は、3.0 ng / mL であり、報告可能範囲の上限は、2000 ng / mL であった。

【0125】

クリニカルエンドポイント

10

20

30

40

50

死亡、致命的でないMI、および鬱血性心不全のすべての原因は、30日目および10ヶ月の追跡期間の終了まで評価された。MIは、すでに報告された基準を用いて定義され、臨床事象委員会により判断された。Antman et al., Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction: Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 11B trial (エノキサパリンは不安定狭心症/非Q波心筋梗塞の死亡および心臓虚血事象を防ぐ：心筋梗塞の血栓症の結果(TIMI)11B試験)、Circulation 100:1593-601 (1999)を参照のこと。新規若しくは悪化しているCHF、または心臓性のショックのエンドポイントは、症例記録用紙から集め、判定されていない。

#### 【0126】

10

##### 統計的分析

被験者は、試験に登録した時点のマーカー濃度に基づいて四分位に分けた。平均値およびベースライン変数に対する割合は、連続変数についてのANOVAおよびカテゴリー変数についての<sup>2</sup>トレンド検定を用いて四分位の間で比較した。マーカーと他の連続ベースライン変数との直接の相関は、ピアソンの積率相関係数を用いて評価された。マーカー濃度は、研究のエンドポイントに合致した患者と合致していない患者との間で、ウィルコクソンランクサム検定を用いて比較した。累積ハザード関数を用いて、不利な事象の頻度を10ヶ月の追跡調査期間の終了時点で評価した。ログランク検定を用いて、四分位の間での結果を比較した。

#### 【0127】

20

分析は、年齢、性別、糖尿病の存在、および徴候診断により定義されたあらかじめ特定されたサブグループにおいて行われた。追跡調査(10ヶ月)の終了まで死亡のすべての原因について、コックスの比例ハザードモデルがフォワードステップワイズ変数選択を用いて構築された。不変のp値が $< 0.1$ で、データが $> 75\%$ の患者で利用可能な場合は、臨床的変数がモデルに入れられ、多重変化p値が $> 0.1$ の場合は、変数が除かれた。そして、全cTnI、BNP、およびMMP-9のベースライン濃度は、完成モデルに加えられた。すべての変数について完全なデータを有する患者のみが、これらの多重変化分析に含められた( $n = 2068$ )。モデルは、C-反応性タンパク質の測定を受けている患者の部分集合について、続いて繰り返された( $n = 736$ )。

#### 【0128】

30

##### MMP-9とベースライン臨床的変数との関係

MMP-9の高いベースライン濃度は、女性、非白人種および現在のたばこ使用者に関係するが、年齢、糖尿病、または以前の高コレステロール血症、冠状動脈疾患若しくは鬱血性心不全には関係しなかった。高MMP-9濃度は、早い心拍、キリップクラス $> I$ 、並びにトロポニンIおよびC-反応性タンパク質の上昇した濃度と関係した(表1)。対照的に、MMP-9は、ボディマス指標、腎機能、心電図の変化、上昇したBNP、LVEF、または冠状動脈血管造影で測定された冠状動脈疾患の範囲には関係しなかった。MMP-9濃度と、試験への登録のための症状発症からの時間との間には、関係はなかった。MMP-9と、CRP( $R = 0.16$ 、 $p < 0.001$ )、cTnI( $R = 0.07$ 、 $p = 0.001$ )、および記録された最大のCKMB( $R = 0.05$ 、 $p = 0.04$ )との濃度の相関は、わずかであった。MMP-9と、BNP( $R = 0.005$ 、 $p = 0.82$ )またはフィブリノーゲン( $R = -0.05$ 、 $p = 0.12$ )との濃度の関係はなかった。

40

#### 【表2】

表 1. MMP-9 の四分位によるベースラインの臨床的特徴 (ng/mL)

	四分位 1 (Q1)	四分位 2 (Q2)	四分位 3 (Q3)	四分位 4 (Q4)	p トレスト	pQ1 対 Q4	
範囲、 ng/mL	3.0-24.3	24.4-43.1	43.2-85.2	85.3-2000			
n	580	573	581	577			
無作為化までの時間 (時)	43 ± 19	40 ± 20	41 ± 20	39 ± 20	0.09	0.02	
年齢 (歳)	61 ± 12	60 ± 12	61 ± 11	61 ± 12	0.48	0.94	
男性	441 (76%)	404 (71%)	418 (72%)	397 (69%)	0.02	0.006	10
白人	558 (96%)	537 (94%)	557 (96%)	519 (90%)	<0.001	<0.001	
過去の医療履歴							
高血圧症	240 (41%)	244 (43%)	237 (41%)	256 (44%)	0.42	0.29	
鬱血性心不全	22 (4%)	34 (6%)	31 (5%)	32 (6%)	0.26	0.16	
冠状動脈疾患	280 (48%)	305 (53%)	291 (51%)	276 (48%)	0.64	0.88	
末梢血管疾患	32 (6%)	41 (7%)	49 (8%)	34 (6%)	0.60	0.78	
脳血管疾患	10 (2%)	20 (3%)	22 (4%)	16 (3%)	0.27	0.23	
糖尿病	127 (22%)	111 (19%)	125 (22%)	133 (23%)	0.46	0.63	20
高コレステロール血症	156 (27%)	162 (28%)	180 (31%)	152 (26%)	0.89	0.83	
喫煙の状態:							
現在の喫煙者	182 (31%)	201 (35%)	210 (36%)	241 (42%)	<0.001	<0.001	
非喫煙者	216 (37%)	181 (32%)	173 (30%)	164 (29%)	0.005	0.005	
過去の喫煙者	180 (31%)	191 (33%)	197 (34%)	170 (30%)	0.64	0.56	
徴候による診断:							
ST上昇MI	183 (32%)	165 (29%)	184 (32%)	218 (38%)	0.02	0.03	
非ST上昇MI	127 (22%)	119 (21%)	145 (25%)	127 (22%)	0.56	0.96	30
不安定狭心症	270 (46%)	288 (50%)	252 (43%)	232 (40%)	0.005	0.03	
身体的所見							
BMI kg/m <sup>2</sup>	28 ± 15	28 ± 5	29 ± 13	28 ± 5	0.84	0.87	
収縮期のBP (mm Hg)	130 ± 21	129 ± 21	127 ± 21	129 ± 21	0.27	0.73	
HR (BPM)	72 + 14	71 + 13	73 + 14	75 + 15	<0.001	<0.001	
キリップクラス II-IV	34 (6%)	42 (7%)	66 (12%)	64 (11%)	<0.001	0.001	

【表 3】

40

(表1つづき)

診断試験						
クレアチンクリアランス	223 (40%)	203 (37%)	214 (38%)	221 (40%)	0.83	0.92
≤90						
CK-MB > ULN	279 (72%)	264 (73%)	305 (76%)	311 (76%)	0.15	0.23
cTnI > 1.5 ng/ml	144 (25%)	137 (24%)	159 (28%)	187 (33%)	0.002	0.006
BNP > 80 pg/ml	278 (49%)	274 (48%)	313 (55%)	290 (51%)	0.18	0.48
CRP > 1.5 ng/ml	55 (38%)	74 (34%)	102 (43%)	128 (55%)	<0.001	0.002
ST 異常 > 1mm	288 (50%)	262 (46%)	264 (45%)	267 (46%)	0.26	0.25
CAD の範囲 (50% 狭窄症)						
0 血管	17 (7%)	18 (6%)	22 (7%)	26 (8%)	0.42	0.49
1 血管	77 (30%)	100 (34%)	113 (35%)	110 (34%)	0.29	0.26
2 血管	70 (27%)	90 (31%)	89 (28%)	85 (27%)	0.60	0.85
3 血管	92 (36%)	83 (29%)	98 (30%)	98 (31%)	0.31	0.19
陽性運動試験	77 (36%)	62 (36%)	74 (41%)	69 (38%)	0.44	0.63
駆出率 (%)	55 + 12	55 + 13	53 + 13	53 + 14	0.09	0.07

10

20

## 【 0 1 2 9 】

MMP-9 と臨床的結果との関係

MMP-9 の濃度は、次のいずれの時点でも生存していた患者に対し、30日以内 ( $p = 0.002$ ) または10ヶ月以内 ( $p < 0.0001$ ) に死亡した患者では、有意に高かった。同様に、MMP-9 濃度は、非致命的MIおよびCHFを有する患者は、これらのエンドポイントを有しないものに比べ、高かった。(30日および10ヶ月の双方におけるそれぞれのエンドポイントは、 $p < 0.01$ )

30

## 【 表 4 】

表 2. ベースラインMMP-9濃度 (ng/mL) と結果との関係

結果	n	中央値 [25, 75]	p 値	
30日				
死亡	34	65 [39, 151]	0.002	
生存	2277	43 [24, 85]		10
非致命的MI	61	65 [37, 110]	0.006	
非MI	2250	43 [24, 85]		
CHF	46	65 [35, 147]	0.008	
非CHF	2265	43 [24, 85]		
死亡、MI、またはCHF	116	65 [36, 145]	<0.001	20
非死亡MI、またはCHF	2195	42 [24, 84]		
10ヶ月				
死亡	78	64 [39, 142]	<0.001	
生存	2233	43 [24, 85]		30
非致命的MI	112	57 [33, 109]	0.002	
非MI	2199	43 [24, 84]		
CHF	67	64 [37, 142]	0.002	
非CHF	2244	43 [24, 85]		
死亡、MI、またはCHF	205	64 [35, 118]	<0.001	40
非死亡MI、またはCHF	2106	42 [24, 83]		

## 【0130】

調整していない死亡率が、それぞれMMP-9濃度の連続する四分位で増加した ( $p < 0.001$ )。同様の関係が、MMP-9と死亡および非致命的MIの混合との間 ( $p < 0.001$ )、並びに、MMP-9と鬱血性心不全との間 ( $p < 0.001$ )に観察された。方向性を持つ一致した関係が、MMP-9と、症状の発症から処置までの時間、徴候による診断、性別、糖尿病、および年齢により定義された患者のサブグループにおける死亡

率との間に、観察された。

【表 5】

表 3. 10ヶ月の死亡率についてのサブグループ分析

グループ	n	四分位 1 (Q1)	四分位 2 (Q2)	四分位 3 (Q3)	四分位 4 (Q4)	pトレンド	pQ1 対 Q4
全部分	2311	3 (0.5%)	20 (4.3%)	27 (6.1%)	28 (6.3%)	<0.001	<0.001
無作為化までの時間 C P							
0-24 時間	508	0 (0%)	4 (4.8%)	10 (12.9%)	7 (5.3%)	0.02	0.02
>24-48 時間	915	0 (0%)	9 (4.6%)	9 (4.5%)	15 (8.5%)	0.003	<0.001
> 48 時間	862	2 (0.9%)	6 (2.9%)	8 (4.3%)	6 (4.9%)	0.28	0.11
徴候 dx							
STEMI	750	0 (0%)	4 (2.5%)	8 (5.1%)	9 (6.2%)	<0.05	0.008
NSTEMI	518	1 (0.8%)	7 (8.7%)	7 (5.5%)	10 (9.8%)	0.07	0.008
UAP	1042	2 (0.8%)	9 (3.7%)	12 (6.7%)	9 (4.7%)	0.07	0.02
性別							
男性	1660	2 (0.5%)	12 (3.9%)	20 (6.5%)	16 (5.7%)	0.002	<0.001
女性	651	1 (0.7%)	8 (5.0%)	7 (5.1%)	12 (7.3%)	0.08	0.008
糖尿病							
存在	496	1 (0.8%)	6 (5.8%)	6 (5.5%)	12 (11.6%)	0.03	0.003
不存在	1814	2 (0.5%)	14 (3.9%)	21 (6.3%)	16 (4.7%)	0.003	0.001
年齢							
< 65	1402	0 (0%)	4 (1.4%)	14 (4.9%)	8 (3.4%)	0.001	0.006
> 65	896	3 (1.4%)	16 (9.2%)	13 (8.1%)	20 (10.9%)	0.007	<0.001

パーセンテージは、生存見積もりを表す。

【 0 1 3 1 】

全 c T n I とベースライン臨床的変数との関係

データは、2523人の患者から評価した。全 c T n I の高いベースライン濃度は、男性、糖尿病の不存在、以前の冠状動脈疾患の不存在、処置を必要とする高血圧症の不存在、およびこの使用に関係したが、老齢または人種には関係しなかった。高い全 c T n I 濃度は、腎機能、心電図の変化、キリップクラス > I、および C K - M B の上昇した濃度に関係した (表 4)。対照的に、全 c T n I は、ボディマス指標、冠状動脈血管造影で測定された冠状動脈疾患の範囲、ストレス試験、または人種とは関係しなかった。全 c T n I の濃度と症状の発症から試験への登録までの時間との間には、関係がなかった。全 c T n I と C R P ( R = 0 . 0 5、p = 0 . 1 6 ) またはフィブリノーゲン ( R = 0 . 0 4、p = 0 . 1 8 ) の濃度との間には、関係がなかった (表 5)。

【表 6】

10

20

30

40

50

表 4

ベースライン変数とベースラインマーカー濃度の四分位との関係  
全トロポニン I

	≤ 53.6	53.6-346	346-1816	>1816	p 対 Q1	p 対 Q4
マーカー濃度の範囲	0-53.6	53.8-346	346.6-1811.5	1820.3-69719		
発症から無作為化までの時間 (時)	36.99 ± 20.53	41.29 ± 20.7	44.28 ± 20.06	37.74 ± 17.74	0.1518	0.5085
年齢 (歳)	61.66 ± 11.41	61.58 ± 11.49	60.04 ± 11.45	59.24 ± 11.65	0	0.0002
男性	409 (64.7%)	437 (69.4%)	464 (73.7%)	506 (80.2%)	0	0
白人	596 (94.3%)	590 (93.7%)	589 (93.5%)	597 (94.6%)	0.8565	0.811
処置が必要な高血圧症	308 (48.7%)	297 (47.2%)	223 (35.5%)	230 (36.5%)	0	0
以前に CAD <sup>§</sup>	441 (69.8%)	367 (58.3%)	258 (41%)	194 (30.7%)	0	0
徴候事象の PCI	120 (19%)	179 (28.4%)	170 (27%)	206 (32.6%)	0	0
末梢 AVD	58 (9.2%)	54 (8.6%)	39 (6.2%)	28 (4.4%)	0.0003	0.001
以前に CVA/TIA <sup>+</sup>	45 (7.1%)	46 (7.3%)	34 (5.4%)	30 (4.8%)	0.0359	0.0771
糖尿病	158 (25%)	147 (23.3%)	131 (20.8%)	118 (18.7%)	0.0038	0.0071
CAD の家族履歴	258 (41.2%)	273 (43.8%)	237 (37.9%)	240 (38.3%)	0.098	0.2985
高コレステロール血症	225 (35.7%)	210 (33.4%)	154 (24.5%)	121 (19.2%)	0	0
現在の喫煙者	169 (26.9%)	220 (34.9%)	256 (40.7%)	276 (43.9%)	0	0
非喫煙者	223 (35.5%)	203 (32.2%)	191 (30.4%)	178 (28.3%)		
過去の喫煙者	236 (37.6%)	207 (32.9%)	182 (28.9%)	175 (27.8%)		
STEMI	38 (6%)	99 (15.7%)	262 (41.7%)	428 (67.8%)	0	0
NSTEMI	36 (5.7%)	114 (18.1%)	240 (38.2%)	172 (27.3%)		
UA	557 (88.3%)	417 (66.2%)	127 (20.2%)	31 (4.9%)		
以前にアスピリン	353 (55.9%)	309 (49.2%)	205 (32.5%)	144 (22.8%)	0	0
以前にヘパリン	502 (79.4%)	551 (87.6%)	568 (90.2%)	590 (93.5%)	0	0
以前に β 遮断薬	242 (38.4%)	201 (31.9%)	139 (22.1%)	112 (17.8%)	0	0
以前に低脂肪血症薬	178 (28.3%)	160 (25.6%)	109 (17.4%)	84 (13.3%)	0	0

10

20

30

40

【表 7】

(表 4 つづき)

BMI	28.84 ± 14.67	28.62 ± 12.23	27.96 ± 4.71	27.9 ± 4.58	0.0568	0.1028
収縮期の BP (mm Hg)	132.16 ± 20.76	131.93 ± 21.19	126.62 ± 20.01	124.58 ± 19.98	0	0
拡張期の BP (mm Hg)	75.33 ± 12.28	74.71 ± 12.16	73.58 ± 12.52	73.28 ± 12.97	0.0011	0.0037
キリップ II-IV	53(8.5%)	52(8.4%)	52(8.3%)	76(12.1%)	0.0433	0.0407
クレアチニンクリアランス ≤ 90	260 (43%)	227 (38.3%)	217 (35.9%)	202 (33.9%)	0.0008	0.0012
CK > ULN	99 (17.6%)	210 (36%)	503 (83.6%)	603 (97.7%)	0	0
CK-MB > ULN	93 (29.7%)	200 (55.9%)	445 (90.8%)	516 (98.1%)	0	0
CTnI ≥ 0.4 ng/mg	42 (32.3%)	114 (62.6%)	126 (84%)	123 (83.7%)	0	0
ST 低下 > 0.5mm	269 (42.6%)	292 (46.3%)	313 (49.7%)	354 (56.1%)	0	0
T 波転移 > 3mm	176 (27.8%)	170 (27%)	154 (24.4%)	124 (19.7%)	0.0004	0.0006
新 LBBB	12 (2%)	14 (2.3%)	7 (1.1%)	8 (1.3%)	0.1663	0.3411
血管造影 : ≥ 50% 狭窄 症の血管の数						
なし	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.9572	1
1 血管	3 (18.8%)	1 (5%)	4 (17.4%)	2 (6.5%)		
2 血管	10 (62.5%)	12 (60%)	8 (34.8%)	22 (71%)		
≥3 血管	3 (18.8%)	7 (35%)	11 (47.8%)	7 (22.6%)		
LVEF (%)	53.98 ± 13.35	56.13 ± 11.82	55.88 ± 12.55	50.42 ± 12.01	0.043	0.0556
ストレス試験 陽性	67 (39.4%)	61 (34.5%)	87 (38.8%)	79 (36.7%)	0.5179	0.4108
ストレス試験 中間	29 (17.1%)	29 (16.4%)	28 (12.5%)	31 (14.4%)		
ストレス試験 陰性	74 (43.5%)	87 (49.2%)	109 (48.7%)	105 (48.8%)		

<sup>§</sup> 以前に CAD: 以前に MI、報告された不安定狭心症、狭心症、血管造影的に確認された CAD、以前に徴候事象ではない PTCR または CABG

<sup>+</sup> 以前に CVA/TIA: 脳血管動脈疾患、以前に非出血性脳卒中または以前に T I A

【表 8】

## 表 5.

ベースラインマーカー濃度と連続的ベースライン変数との単純相関  
全トロポニン I

	R 値	p*	
年齢 (歳)	0.05	0.0113	10
BMI	0.02	0.3959	
最大記録 CK-MB (ULN の%)	0.36	0	
CRP (mg/dl)	0.05	0.1591	20
フィブリノーゲン (mg/dl)	0.04	0.1752	
LVEF (%)	0.19	0.0003	
クレアチンクリアランス	0.03	0.1333	

\* ピアソンの積率相関係数に基づく p 値

30

マーカーとベースライン変化との線形関係が有効であるかどうかのピアソン積率相関係数試験に基づいた p 値。R 値は、観測点が適合した線にいか  
に近いかを示す。

## 【 0 1 3 2 】

全 c T n I と臨床的結果との関係

全 c T n I の濃度は、同時点で生存していた患者に対して 30 日以内に死亡した患者で有意に高かった ( $p = 0.004$ )。同様に、全 c T n I 濃度は、死亡や非致命的 M I の組み合わされたエンドポイントを有する患者の方が、これらのエンドポイントを有さないものに比べ高かった。(30 日および 10 ヶ月の両方における各々のエンドポイントについて  $p < 0.01$  (表 6 および 7))

40

## 【表 9】

表 6  
 ベースラインマーカー濃度と 30 日の結果との相関  
 全トロポニン I

結果	n	平均 ± SD	中央値 (25, 75)	p
死亡	40	4656.93 ± 10309.66	1293.5 (104.3,4990.12)	0.0041
生存	2483	2144.1 ± 5384.8	335.4 (53.45,1775.8)	
MI	70	3248.72 ± 10172.18	219.9 (67.9,1820.75)	0.1006
非MI	2453	2153.55 ± 5310.15	346.6 (53.2,1811.5)	
虚血 -> 緊急血管再生	81	2226.51 ± 5366.63	470.8 (70.1,1744.4)	0.9436
非虚血 ->緊急血管再生	2442	2182.52 ± 5508.1	338.5 (53.52,1818.1)	
死亡/M I	103	3901.2 ± 10514.31	387.3 (69.6,3380.4)	0.0012
非死亡/M I	2420	2110.84 ± 5174.48	337 (52.68,1761.45)	
死亡/M I /虚血 ->緊急血管再生	180	3181.58 ± 8743.16	433.85 (69.77,2287.88)	0.0116
非死亡/M I /虚血 ->緊急血管再生	2343	2107.29 ± 5165.32	333.7 (52.55,1775.8)	

【表 10】

10

20

30

表7  
ベースラインマーカー濃度と10ヶ月の結果との相関  
全トロポニンI

	n	平均 ± SD	中央値 (25, 75)	p
死亡	86	3309.64 ± 7830.37	541.95 (94.72,3882.3)	0.0535
生存	2437	2144.21 ± 5400.14	335.4 (52.9,1744.4)	
MI	123	2758.01 ± 8494.07	200.7 (66.7,1497.6)	0.2356
非MI	2400	2154.51 ± 5305.09	351.3 (52.92,1829.52)	
虚血 -> 緊急血管再生	145	1981.8 ± 4703.86	335.4 (70.1,1519.8)	0.6488
非虚血 ->緊急血管再生	2378	2196.26 ± 5548.18	346.3 (53.42,1826.83)	
死亡/M I	190	3181.92 ± 8575.64	340.45 (69.8,2632.88)	0.0093
非死亡/M I	2333	2102.66 ± 5166.94	346 (52.4,1766.1)	
死亡/M I /虚血 ->緊急血管再生	328	2678.37 ± 7245.55	346.5 (69.97,1876.8)	0.081
非死亡/M I /虚血 ->緊急血管再生	2195	2110.05 ± 5190.23	346 (52.1,1804.2)	

10

20

30

## 【0133】

cTnT I Cとベースライン臨床的变化との関係

データは、2439人の患者から評価した。cTnT I Cの高いベースライン濃度は、男性、糖尿病の不存在、以前の冠状動脈疾患の不存在、処置が必要な高血圧症の不存在、およびたばこの使用に関連したが、年齢または人種には関係しなかった。高いcTnT I C濃度は、腎機能、心電図の変化、キリップクラス> I、cTnIの上昇した濃度、およびCK-MBの上昇した濃度に関係した(表8)。対照的に、cTnT I Cは、ボディマス指数、冠状動脈血管造影により測定された冠状動脈疾患の範囲、ストレス試験、または人種には関係しなかった。cTnT I CとCRP (R = 0.03、p = 0.36)またはフィブリノーゲン (R = 0.04、p = 0.29)の濃度との間には、関係がなかった(表9)。

40

## 【表11】

表 8

ベースライン変数とベースラインマーカー濃度の四分位との関係  
トロポニンT I C 複合体

	≤16.65	16.65-65.8	65.8-195	>195	p トロ ト	p Q4 対 Q1
マーカー濃度の範囲	0-16.6	16.7-65.8	65.9-193.4	196.6-58658.8		
発症から無作為化までの時間 (時)	41.05 ± 20.31	43.25 ± 20.49	42.53 ± 20.82	33.35 ± 16.43	0	0
年齢 (歳)	61.8 ± 11.64	60.76 ± 11.53	60.69 ± 11.35	59.75 ± 11.69	0.003	0.002
男性	381 (62.5%)	437 (71.6%)	437 (71.8%)	484 (79.3%)	0	0
白人	579 (94.9%)	570 (93.4%)	571 (93.8%)	583 (95.6%)	0.5822	0.5904
処置が必要な高血圧症	282 (46.3%)	269 (44.2%)	253 (41.5%)	226 (37.1%)	0.0008	0.0012
以前に CAD <sup>+</sup>	383 (62.8%)	356 (58.4%)	282 (46.3%)	207 (33.9%)	0	0
徴候事象の PCI	149 (24.4%)	134 (22%)	175 (28.7%)	185 (30.3%)	0.0022	0.021
末梢 AVD	56 (9.2%)	56 (9.2%)	32 (5.3%)	30 (4.9%)	0.0004	0.0041
以前に CVA/TIA <sup>+</sup>	47 (7.7%)	38 (6.2%)	32 (5.3%)	33 (5.4%)	0.0715	0.1071
糖尿病	154 (25.2%)	118 (19.3%)	142 (23.3%)	119 (19.5%)	0.0789	0.017
CAD の家族履歴	252 (41.7%)	245 (40.4%)	254 (42.1%)	226 (37.4%)	0.2088	0.1261
高コレステロール血症	192 (31.5%)	200 (32.8%)	162 (26.6%)	125 (20.6%)	0	0
現在の喫煙者	196 (32.3%)	212 (34.8%)	219 (36.1%)	255 (41.9%)	0.0026	0.0118
非喫煙者	220 (36.3%)	180 (29.5%)	193 (31.8%)	181 (29.7%)		
過去の喫煙者	190 (31.4%)	218 (35.7%)	195 (32.1%)	173 (28.4%)		
STEMI	74 (12.2%)	125 (20.5%)	222 (36.5%)	374 (61.3%)	0	0
NSTEMI	99 (16.3%)	117 (19.2%)	146 (24%)	182 (29.8%)		
UA	436 (71.6%)	367 (60.3%)	241 (39.6%)	54 (8.9%)		
以前にアスピリン	288 (47.3%)	305 (50%)	235 (38.7%)	149 (24.5%)	0	0
以前にヘパリン	520 (85.2%)	505 (82.8%)	537 (88.2%)	572 (93.9%)	0	0
以前にβ遮断薬	200 (32.8%)	199 (32.6%)	168 (27.6%)	110 (18%)	0	0
以前に低脂肪血症薬	152 (25.1%)	149 (24.5%)	116 (19.1%)	88 (14.4%)	0	0

10

20

30

40

【表 1 2】

(表 8 つづき)

BMI	28.76 ± 14.91	28.26 ± 5.15	28.41 ± 12.33	27.92 ± 4.55	0.2118	0.162
収縮期の BP (mm Hg)	131.87 ± 21.13	129.72 ± 20.49	128.98 ± 20.62	125.55 ± 20.25	0	0
拡張期の BP (mm Hg)	74.95 ± 12.5	74.75 ± 11.88	74.32 ± 12.44	73.38 ± 13.3	0.0244	0.0296
キリップ II-IV	40 (6.7%)	49 (8.1%)	62 (10.3%)	77 (12.7%)	0.0002	0.0005
クレアチニンアラス ≤ 90	239 (41.6%)	230 (39.4%)	222 (38.9%)	193 (33%)	0.0036	0.0025
CK > ULN	161 (29%)	253 (45.2%)	373 (65.7%)	570 (95%)	0	0
CK-MB > ULN	173 (50.6%)	211 (59.6%)	336 (78.9%)	484 (96.8%)	0	0
CTnl ≥ 0.4 ng/mg	81 (54%)	78 (55.3%)	109 (73.6%)	117 (81.8%)	0	0
ST 低下 > 0.5mm	274 (44.9%)	271 (44.4%)	309 (50.7%)	344 (56.4%)	0	0.0001
T 波転移 > 3mm	170 (27.9%)	169 (27.7%)	138 (22.7%)	126 (20.7%)	0.0007	0.0034
新 LBBB	10 (1.7%)	13 (2.2%)	8 (1.3%)	10 (1.7%)	0.6932	0.9698
血管造影 : ≥ 50% 狭窄症の血管の数						
なし	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.3038	1
1 血管	5 (45.5%)	1 (4.3%)	2 (8%)	2 (8%)		
2 血管	5 (45.5%)	13 (56.5%)	15 (60%)	15 (60%)		
≥3 血管	1 (9.1%)	9 (39.1%)	8 (32%)	8 (32%)		
LVEF (%)	53.49 ± 11.36	58.29 ± 12.34	53.84 ± 13.35	50.53 ± 12.17	0.0203	0.1235
ストレス試験 陽性	70 (40.5%)	79 (38%)	60 (32.8%)	71 (37.4%)	0.6382	0.5086
ストレス試験 中間	25 (14.5%)	34 (16.3%)	31 (16.9%)	27 (14.2%)		
ストレス試験 陰性	78 (45.1%)	95 (45.7%)	92 (50.3%)	92 (48.4%)		

10

20

30

§ 以前に CAD: 以前に MI、報告された不安定狭心症、狭心症、血管造影的に確認された CAD、以前に徴候事象ではない PTCR または CABG

\* 以前に CVA/TIA: 脳血管動脈疾患、以前に非出血性脳卒中または以前に T I A

【表 1 3】

表 9

ベースラインマーカー濃度と連続的ベースライン変数との単純相関  
トロポニンT I C複合体

	R 値	p*	
年齢 (歳)	0.02	0.3448	10
BMI	0	0.9317	
最大記録 CK-MB ( ULN の%)	0.22	0	
CRP (mg/dl)	0.03	0.3579	20
フィブリノーゲン (mg/dl)	0.04	0.2861	
LVEF (%)	0.07	0.186	
クレアチンクリアランス	0.03	0.1679	

\* ピアソンの積率相関係数に基づく p 値

30

マーカーとベースライン変化との線形関係が有効であるかどうかのピアソン積率相関係数試験についての p 値。R 値は、観測点が適合した線にいか  
に近いかを示す。

## 【 0 1 3 4 】

c T n T I C と臨床的結果との関係

c T n T I C の濃度は、同時点で生存していた患者に対して 30 日以内に死亡した患者で  
有意に高かった (  $p < 0.05$  ) ( 表 10 ) 。低い四分位の c T n T I C 濃度のトレンド  
は、10ヶ月で緊急血管再生を必要とする虚血の増加した頻度と関係があった ( 表 11 )  
。対照的に、高い四分位の c T n T I C 濃度のトレンドは、喫煙の履歴を有しない患者に  
おいて、死亡、緊急血管再生を必要とする虚血、および、死亡、非致命的 M I、若しくは  
事象後 30 日で緊急血管再生を必要とする虚血の組み合わせられたエンドポイント、に関係  
した ( 表 12 ) 。

40

## 【 表 1 4 】

**表 10**  
 ベースラインマーカー濃度と 30 日の結果との相関  
 トロポニン TIC 複合体

結果	n	平均 ± SD	中央値 (25, 75)	p
死亡	40	1255.76 ± 3208.86	163.3 (23.15,973.55)	0.0492
生存	2399	479.48 ± 2460.34	65.5 (16.65,188.85)	
MI	70	685.68 ± 2837.65	50.75 (6.25,287.27)	0.5071
非 MI	2369	486.49 ± 2464.51	66.3 (17,193.2)	
虚血 -> 緊急血管再生	82	411.49 ± 1422.44	82.95 (15.7,260.42)	0.764
非虚血 -> 緊急血管再生	2357	495.02 ± 2504.38	65.6 (16.7,189.6)	
死亡/MI	103	933.03 ± 3070.43	64.3 (12.35,442.65)	0.0648
非死亡/MI	2336	472.77 ± 2444.99	65.85 (16.95,188.42)	
死亡/MI/虚血 -> 緊急血管再生	181	710.78 ± 2513.32	66.1 (12.8,334.3)	0.2171
非死亡/MI/虚血 -> 緊急血管再生	2258	474.69 ± 2472.24	65.7 (17,187.05)	

10

20

30

【表 15】

表 11

ベースラインマーカー濃度と10ヶ月の結果との関係  
トロポニンTIC複合体

	≤16.65		16.65-65.8		65.8-195		>195		pトレ ンド	pQ4 対Q1
	n	%	n	%	n	%	n	%		
	610		610		609		610			
死亡	23	5	16	3.5	15	3.1	32	6.3	0.1619	0.1678
MI	44	8.6	32	5.9	21	4.6	27	5.7	0.0162	0.059
虚血 -> 緊急血管再生	40	7.7	40	8.8	30	5.6	36	6.1	0.4682	0.7325
死亡またはMI	56	10.9	45	8.7	35	7.5	55	11.1	0.7577	0.9498
死亡/MI/虚血 -> 緊急血 管再生	93	17.7	85	17.4	64	12.9	88	16.6	0.439	0.853

死亡の場合を除き、パーセンテージは、10ヶ月で打ち切った追跡調査による Kaplan-Meier 事象割合である。

p値は、Cox回帰分析からのものである。

【表 16】

10

20

30

表 12

ベースラインマーカー濃度と30日の結果との関係

トロポニンTIC複合体

喫煙: 非喫煙

	≤ 16.65		16.65-65.8		65.8-195		>195		p トレ ンド	p Q4 対 Q1
	n	%	n	%	n	%	n	%		
	220		180		193		181			
死亡	4	1.8	2	1.2	3	1.6	11	6.1	0.0178	0.0351
MI	9	4.1	7	4.1	4	2.1	6	3.5	0.4843	0.7361
虚血 -> 緊急血管再生	1	0.5	7	4.1	7	3.7	11	6.2	0.0042	0.0111
死亡またはMI	11	5	8	4.6	6	3.1	16	8.9	0.1884	0.1254
死亡/MI/虚血 -> 緊急血管再生	12	5.5	15	8.7	13	6.8	26	14.5	0.0054	0.0029

10

20

## 【 0 1 3 5 】

BNPとベースラインの臨床的变化との関係

データは、2525人の患者から評価した。BNPの高いベースラインの四分位の濃度は、年齢、高血圧症、およびたばこの使用に関係した。高い四分位のBNP濃度は、鬱血性心不全、腎機能、心電図の変化、キリップクラス>I、およびCK-MBの上昇した濃度に関係した(表13)。対照的に、四分位のBNP濃度は、冠状動脈疾患の以前の履歴、ボディマス指標、および糖尿病とは関係しなかった。BNPと連続したベースライン変化のCRP( $R=0.2$ 、 $p<0.0001$ )、フィブリノーゲン( $R=0.18$ 、 $p<0.0001$ )、LVEF( $R=0.23$ 、 $p<0.0001$ )との濃度の間で有意な相関があった。BNP濃度とボディマス指数との相関は、わずかであった( $R=0.06$ ) (表14)。さらに、高い平均BNP濃度は、50%またはそれ以上の狭窄症の血管の数、低い駆出率、および陽性ストレス試験結果と有意に関係した(表15)。

30

## 【表17】

表 13

BNP の四分位によるベースラインの臨床的特徴(pg/mL)

	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	p トレン ド	p Q4 対 Q1	
BNP 濃度の範囲, pg/mL	0-43.6	43.7-81.2	81.3-137.8	137.9-1456.6			
n	631	632	632	630			10
無作為化までの時間 (時)	39 ± 21	40 ± 21	41 ± 20	41 ± 19	0.04	0.10	
年齢 (歳)	57 ± 10	59 ± 11	61 ± 12	66 ± 11	<0.0001	<0.0001	
男性	474 (75%)	465 (74%)	472 (75%)	405 (64%)	0.0001	<0.0001	
白人	575 (91%)	592 (94%)	605 (96%)	603 (96%)	0.0002	0.001	
過去の医療履歴							
高血圧症	246 (39%)	254 (40%)	263 (42%)	298 (47%)	0.003	0.003	
鬱血性心不全	26	28	26 (4%)	56 (9%)	0.0006	0.0008	20
冠状動脈疾患*	329 (52%)	312 (49%)	294 (47%)	327 (52%)	0.7	0.9	
末梢血管疾患	33 (5%)	43 (7%)	48 (8%)	57 (9%)	0.008	0.009	
脳血管疾患	24 (4%)	32 (5%)	39 (6%)	60 (10%)	<0.0001	0.0001	
糖尿病	138 (22%)	133 (21%)	132 (21%)	152 (24%)	0.4	0.3	
CAD の家族履歴	268 (43%)	260 (41%)	253 (41%)	232 (37%)	0.045	0.04	
高コレステロール血症	199 (32%)	191 (30%)	173 (28%)	149 (24%)	0.0009	0.002	
喫煙の状態:							
現在の喫煙者	233 (37%)	263 (42%)	236 (38%)	189 (30%)	0.0002	0.001	30
非喫煙者	193 (31%)	161 (26%)	185 (29%)	254 (40%)			
過去の喫煙者	204 (32%)	205 (33%)	209 (33%)	186 (30%)			
徴候による診断:							
ST 上昇MI	141 (22%)	189 (30%)	231 (37%)	264 (42%)	<0.0001	<0.0001	
非ST 上昇MI	87 (64%)	137 (22%)	159 (25%)	182 (29%)			
不安定狭心症	402 (64%)	306 (48%)	241 (38%)	184 (29%)			

【表 18】

(表 13 つづき)

## 身体的所見

BMI kg/m <sup>2</sup>	29 ± 5	28 ± 5	28 ± 14	28 ± 12	0.1	0.08
収縮期の B P (mm Hg)	130 ± 20	129 ± 19	128 ± 22	129 ± 21	0.3	0.4
キリップクラス II-IV	31 (5%)	36 (6%)	56 (9%)	109 (18%)	<0.0001	<0.0001

## 診断試験

クレアチンクリアランス ≤ 90	146 (24%)	185 (31%)	229 (38%)	350 (58%)	<0.0001	<0.0001
CK-MB > ULN	212 (58%)	308 (72%)	349 (79%)	388 (86%)	<0.0001	<0.0001
ST低下 > 0.5mm	270 (43%)	297 (47%)	311 (49%)	356 (57%)	<0.0001	<0.0001
T波転移 > 3mm	137 (22%)	146 (23%)	171 (27%)	167 (27%)	0.02	0.047

\* 以前の冠状動脈疾患: 以前に MI、報告された不安定狭心症、狭心症、血管造影的に確認された CAD、以前に徴候事象ではない PTCR または CABG

【表 19】

表 14

BNP 濃度と連続的ベースライン変数との相関

	R 値	p 値
年齢 (歳)	0.28	<0.0001
BMI	0.06	0.006
最大記録 CK-MB (ULN の%)	0.09	0.0005
CRP (mg/dl)	0.2	<0.0001
フィブリノーゲン (mg/dl)	0.18	<0.0001
LVEF (%)	0.23	<0.0001
クレアチンクリアランス	0.28	<0.0001

10

20

30

40

50

## 【表 2 0】

表 15. 心臓試験結果とBNP濃度との関係

試験	結果	n	BNP			
			(平均 ± SD)	p 値		
冠状動脈血管造影:	なし	27	68 ± 48	<0.0001	10	
	≥50% 狭窄症	1	220			83 ± 65
	の血管数	2	106			98 ± 98
	≥3	79	143 ± 145			
LV 駆出率	≤ 50%	156	136 ± 161	0.003	20	
	> 50%	189	96 ± 78			
ストレス試験	陽性	296	118 ± 118	0.003	30	
	中間	118	118 ± 128			
	陰性	374	91 ± 95			

## 【 0 1 3 6 】

BNP と臨床的結果との関係

BNP の濃度は、同時点で生存していた患者に対して、30 日以内 ( $p < 0.0001$ ) および 10 ヶ月以内 ( $p < 0.0001$ ) に死亡した患者で有意に高かった (表 16)。さらに、BNP 濃度は、非致命的 MI を経験していない患者に対して、これを 30 日以内 ( $p = 0.01$ ) および 10 ヶ月以内 ( $p = 0.02$ ) に経験した患者で有意に高かった (表 16)。高い BNP 濃度と 30 日および 10 ヶ月以内の死亡との関係は、徴候による診断に基づいたサブグループの分析でも観察された (表 17)。

## 【表 2 1】

表 16. ベースラインBNP濃度 (pg/mL)と結果との関係

結果	n	中央値 [25,75]	平均 ± SD	p 値	
30日					
死亡	39	153 [79,294]	226 ± 204	<0.0001	10
生存	2486	80 [43,135]	113 ± 124		
MI	70	109 [50,159]	152 ± 159	0.01	
非MI	2455	80 [44,137]	113 ± 125		
10ヶ月					
死亡	85	143 [88,308]	228 ± 228	<0.0001	20
生存	2440	79 [43,133]	110 ± 120		
MI	124	101 [50,161]	141 ± 140	0.02	
非MI	2401	80 [43,134]	113 ± 126		

【表 2 2】

表 17. 徴候による診断に基づくサブグループにおけるベースラインBNP濃度 (pg/ml)と

10ヶ月の結果との関係				
結果	n	中央値 [25,75]	平均 ± SD	p 値
ST上昇MI	825	96 [56,161]	131 ±	
30日までの死亡	13	153 [77,265]	236 ± 220	0.002
30日での生存	812	95 [56,161]		
10ヶ月までの死亡	23	150 [90,227]	199 ± 176	0.008
10ヶ月での生存	802	95 [55,161)	129 ± 123	
非ST上昇ACS	1698	72 [39,124]	106 ±	
30日までの死亡	26	149 [84,307]	220 ± 200	<0.0001
30日での生存	1672	71 [39,123]	105 ± 124	
30日までの死亡	62	142 [88,320]	239 ± 245	<0.0001
30日での生存	1636	70 [38,121]	101 ± 117	
不安定狭心症	1133	60 [33,105]	92 ±	
30日までの死亡	14	94[69,237]	182 ± 195	0.002
30日での生存	1119	60 [33,105]	90 ± 109	
10ヶ月までの死亡	34	96 [70,265]	233 ± 292	<0.0001
10ヶ月での生存	1099	58 [33,104]	87 ± 97	

## 【0137】

FABPとベースライン臨床的変数との関係

データは、2287人の患者から評価した。FABPとベースライン臨床的変数との関係づけは、8ng/mlのFABPの切点を用いて行った。FABPの高いベースライン濃度は、年齢、鬱血性心不全の履歴、腎機能、心電図の変化、キリップクラス>I、並びにCK-MB、cTnI、BNP、およびCRPの上昇した濃度に関係した(表18)。対照的に、四分位のFABP濃度は、冠状動脈疾患の以前の履歴、ボディマス指数、高血圧症、および糖尿病には関係しなかった。FABPの濃度とcTnI濃度との間に有意な相関があった( $R = 0.21$ 、 $p < 0.0001$ )。FABP濃度と他の連続変数の間の相関は、わずかであった( $R^2 < 0.03$ ) (表19)。

## 【表23】

表 18. ベースライン FABP (ng/mL)によるベースラインの臨床的特徴

	FABP ≤8	FABP >8	p	
範囲、 ng/mL	<8	8 -434.2		
n	1955	332		
無作為化までの時間 (時)	42 ± 19	33 ± 19	<0.0001	
年齢 (歳)	60 ± 11	65 ± 12	<0.0001	10
男性	1401 (72%)	244 (73%)	0.5	
白人	1833 (94%)	315 (95%)	0.4	
過去の医療履歴				
高血圧症	820 (42%)	140 (42%)	1.0	
鬱血性心不全	89 (5%)	29 (9%)	0.001	
冠状動脈疾患*	983 (50%)	155 (47%)	0.2	
徴候事象の PCI	670 (34%)	105 (32%)	0.3	20
末梢血管疾患	132 (7%)	24 (7%)	0.8	
脳血管疾患	57 (3%)	10 (3%)	0.9	
糖尿病	428 (22%)	65 (20%)	0.3	
CADの家族履歴	793 (41%)	111 (34%)	0.02	
高コレステロール血症	576 (30%)	72 (22%)	0.003	
2週間以前のアスピリン	799 (41%)	120 (36%)	0.1	
2週間以前の脂質の処方	426 (22%)	53 (16%)	0.01	
無作為化以前のヘパリン	1734 (89%)	278 (84%)	0.009	30
ACE 管理	1577 (81%)	248 (75%)	0.01	
以前にβ遮断薬	538 (28%)	86 (26%)	0.5	
喫煙の状態 : :			0.08	
現在の喫煙者	37%	31%		
非喫煙者	31%	36%		
過去の喫煙者	32%	33%		
徴候による診断:			<0.001	40
ST上昇MI	29%	52%		
非ST上昇MI	22%	24%		
不安定狭心症	49%	24%		

【表 2 4】

(表 18 つづき)

## 身体的所見

BMI kg/m <sup>2</sup>	28 ± 11	28 ± 5	0.4
収縮期の B P (mm Hg)	129 ± 21	130 ± 22	0.2
HR (BPM)	72 ± 14	74 ± 16	0.03
キリップクラス II-IV	150 (8%)	56 (17%)	<0.001

10

## 診断試験

クレアチンクリアランス ス ≤ 90	679 (36%)	167 (53%)	<0.001
CI Cr (cc/min)	106 ± 40	92 ± 40	<0.0001
CK-MB > ULN	909 (71%)	240 (91%)	<0.001
CTnI > 1.5 ng/ml	232 (22%)	194 (59%)	<0.001
BNP > 80 pg/ml	908 (47%)	240 (73%)	<0.001
CRP > 1.5 ng/ml	262 (40%)	79 (50%)	0.03
ST 異常 > 1mm	857 (44%)	212 (64%)	<0.001
T波転移 > 3mm	278 (24%)	82 (25%)	0.9

20

## CAD 範囲 (50% 狭窄症)

0 血管	7%	4%	0.3
1 血管	33%	35%	
2 血管	28%	30%	
3 血管	32%	32%	
Pos ETT	245 (37%)	32 (37%)	0.2
EF (%)	55 ± 12	49 ± 13	<0.0001

30

【表 25】

表 19. FABP と連続変数との相関

変数	R <sup>2</sup>	P 値
無作為化までの時間	0.02	<0.0001
年齢	0.007	0.0001
BMI	0.0006	0.25
CKMB 最大値	0.024	<0.0001
バイオサイト cTnI	0.21	<0.0001
CRP	0.0001	0.75
フィブリノーゲン	0.003	0.002
BNP	0.006	0.0002
クレアチンクリアランス	0.008	0.008
LVEF	0.02	<0.0001

10

## 【 0 1 3 8 】

20

## F A B P と臨床的結果との関係

F A B P の平均濃度は、同時点で生存していた患者に対して、30日以内 ( $p < 0.0001$ ) および10ヶ月以内 ( $p < 0.0001$ ) に死亡した患者で有意に高かった (表 20)。平均 F A B P 濃度は、エンドポイントを有しない患者に対して、30日以内 ( $p < 0.0001$ ) および10ヶ月以内 ( $p < 0.0001$ ) の死亡、非致命的 M I、または血管再生の組み合わせたエンドポイントを有する患者で有意に高かった (表 20)。さらに、平均 F A B P 濃度は、C H F を有しないものに対し、30日以内 ( $p < 0.0001$ ) および10ヶ月以内 ( $p < 0.0001$ ) に C H F を有した患者で有意に高かった (表 20)。F A B P 濃度が陽性 (F A B P > 8) または陰性 (F A B P = 8 またはそれ以下) のいずれかに分類されたときに、これらの関係は統計的な有意さを維持した (表 21)

30

## 【表 2 6】

表 20. ベースライン FABP 濃度 (ng/mL) と結果との関係

結果	n	平均 ± SD	p 値*	
30日				
死亡	33	22.8 ± 27.5		
生存	2254	10.5 ± 14.7	<0.0001	10
死亡または MI	86	17.2 ± 22.0	<0.0001	
非死亡または MI	2201	10.4 ± 14.6		
D/MI/UR	157	16.2 ± 37.6	<0.0001	
非 D/MI/UR	2130	10.3 ± 11.7		
CHF	46	20.2 ± 21.0	<0.0001	20
非 CHF	2241	10.5 ± 14.8		
10ヶ月				
死亡	76	18.3 ± 22.7	<0.0001	
生存	2211	10.5 ± 14.6		
死亡または MI	169	14.5 ± 18.3	<0.0001	30
非死亡または MI	2118	10.4 ± 14.7		
D/MI/UR	294	13.7 ± 28.5	<0.0001	
非 D/MI/UR	1993	10.3 ± 11.7		
CHF	66	17.5 ± 18.5	<0.0001	
非 CHF	2221	10.5 ± 14.8		40

\* ウィコクソンランクサム検定

【表 27】

表 21. ベースライン FABP と結果との関係

結果	FABP 陰性	FABP 陽性	P 値	
n	1955	332		
30日				10
死亡	19 (1.0%)	14 (4.2%)	<0.001	
MI	45 (2.3%)	14 (4.2%)	0.04	
UR	58 (3.0%)	16 (4.8%)	0.08	
D/MI	59 (3.0%)	27 (8.1%)	<0.001	
D/MI/UR	116 (5.9%)	41 (12.4%)	<0.001	
CHF	24 (1.2%)	22 (6.3%)	<0.001	
10ヶ月 (推定値)				20
死亡	46 (3.1%)	30 (12.4%)	<0.0001	
MI	88 (5.6%)	22 (9.4%)	0.05	
UR	109 (6.4%)	22 (7.4%)	0.34	
D/MI	120 (7.8%)	49 (21.4%)	<0.0001	
D/MI/UR	226 (14.4%)	68 (29.0%)	<0.0001	
CHF	30 (2.0%)	21 (8.1%)	<0.0001	
D/MI/CHF	140 (9.3%)	56 (23.5%)	<0.0001	

30

## 【 0 1 3 9 】

T p P とベースライン臨床的変数との関係

データは、2349人の患者から評価した。T p Pの高いベースライン濃度は、年齢、冠状動脈疾患の履歴、腎機能、CHFの履歴、アスピリンの使用に関係し、白人の人種およびヘパリン治療に逆に関係した(表22)。対照的に、T p P濃度は、心拍数、キリッブクラス>I、ボディマス指数、高血圧症、冠状動脈疾患の範囲、および糖尿病には関係しなかった。

## 【 表 2 8 】

表 22. OPUS-TIMI 16 における TpP の四分位によるベースラインの臨床的特徴

エンドポイント	TpP 四分位				p 値 全体の $\chi^2$	
	第 1	第 2	第 3	第 4		
範囲	0-4.8	4.9-8.9	9-15.9	16-160		
N	596	590	577	586		
無作為化までの時間	39	41	43	40	0.07	10
<i>人口統計</i>						
年齢 (歳)	59	60	62	62	0.002	
男性	76%	70%	71%	69%	0.01	
白人	94%	93%	96%	93%	0.1	
<i>PMH</i>						
高血圧症	37%	43%	44%	43%	0.076	
糖尿病	18%	22%	22%	24%	0.06	20
現在の喫煙者	39%	38%	35%	34%		
高脂血症	25%	30%	28%	31%	0.1	
FHx	39%	40%	39%	42%	0.69	
以前に CAD	41%	49%	53%	56%	<0.001	
以前に MI						
以前に CHF	2.0%	5.7%	5.6%	7.5%	<0.001	
<i>徴候による診断</i>						
STEMI	44%	28%	30%	29%		30
NSTEMI	23%	24%	24%	19%		
UA	33%	48%	47%	52%		
<i>無作為以前の医療</i>						
アスピリン	33%	39%	43%	46%	<0.001	
ヘパリン	93%	88%	88%	83%	<0.001	
<i>身体的所見</i>						
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27	29	28	29	0.19	40
SBP (mm Hg)	127	129	130	129	0.16	
HR (bpm)	72	73	72	73	0.3	

【表 29】

(表 2 2 つづき)

キリップクラス II-IV	7.5%	8.3%	8.6%	11.2%	0.14	
<i>診断試験</i>						
CrCl ≤90 ml/min	35%	37%	44%	40%	0.02	
TnI >1.5 ng/mL	36%	25%	26%	23%	<0.001	10
CRP >1.5 mg/dL	42%	46%	38%	46%	0.24	
BNP >80 pg/mL	52%	49%	56%	46%	0.01	
ST 異常 >1 mm	49%	45%	47%	46%	0.47	
<i>CAD の範囲</i>						
0VD	7%	8%	5%	7%		
1VD	39%	27%	39%	33%		
2VD	30%	30%	24%	28%		20
3VD	23%	35%	32%	32%		

## 【 0 1 4 0 】

T p P と臨床的結果との関係

T p P 濃度は、同時点で生存した患者に対して、10ヶ月以内に死亡した患者で有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (表 2 3)。T p P 濃度は、入院を必要とする虚血を経験しないものに対し、10ヶ月以内に入院を必要とする虚血を経験した患者で有意に高かった ( $p = 0.0062$ ) (表 2 3)。T p P 濃度は、エンドポイントを経験しない患者に対して、10ヶ月以内に、死亡若しくは非致命的 M I、または、死亡、非致命的 M I 若しくは緊急血管再生の組み合わせたエンドポイントを有する患者で有意に高かった ( $p < 0.02$ ) (表 2 3)。

## 【表 3 0】

30

表 23. OPUS-TIMI 16 における死亡、MI、CHF、緊急血管再生、および虚血の割合

エンドポイント	TpP 四分位				p 値 トレンド の $\chi^2$
	第1	第2	第3	第4	
範囲	0-4.8	4.9-8.9	9-15.9	16-160	
N	596	590	577	586	
10ヶ月の結果					
死亡	2.68	2.37	3.64	4.44	0.047
MI	4.03	4.75	5.03	5.46	0.24
CHF	2.35	2.37	3.64	2.90	0.34
緊急血管再生	4.53	5.08	7.45	6.31	0.074
虚血 → 再入院	4.70	5.93	8.67	8.02	0.0062
D/MI	5.87	6.44	7.97	9.22	0.016
D/MI/CHF	7.38	7.97	9.36	10.24	0.055
D/MI/UR	10.40	11.36	14.90	15.19	0.0038

10

20

【0141】

MCP-1 とベースライン臨床的変数との関係

データは、2270人の患者から評価した。MCP-1の高いベースライン濃度は、年齢、冠状動脈疾患の履歴、腎機能、CHFの履歴、糖尿病、高血圧症、キリップクラス>I、およびアスピリンの使用に関係した(表24)。対照的に、MCP-1濃度は、心拍数、ボディマス指数、冠状動脈疾患の範囲、および喫煙には関係しなかった。

30

【表31】

表 24. MCP-1 (ng/mL)の四分位によるベースラインの臨床的特徴

	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	p トレンド	p Q4 対 Q	
範囲, ng/mL	40-127.9	128.1-177.3	177.4-238	238.5-7016.3			
n	567	568	568	567			
無作為化までの時間 (時)	41 ± 20	40 ± 19	42 ± 20	40 ± 20	0.45	0.54	
年齢 (歳)	57 ± 11	59 ± 12	62 ± 11	65 ± 11	<0.0001	<0.0001	10
男性	433 (76%)	414 (73%)	406 (72%)	375 (66%)	0.0001	<0.0001	
白人	531 (94%)	532 (94%)	539 (95%)	533 (94%)	0.61	0.81	
過去の医療履歴							
高血圧症	224 (40%)	223 (39%)	238 (42%)	276 (49%)	0.001	0.002	
鬱血性心不全	18 (3%)	25 (4%)	26 (5%)	45 (8%)	0.0004	<0.0001	
冠状動脈疾患*	245 (43%)	274 (48%)	291 (51%)	318 (56%)	<0.0001	<0.0001	
徴候事象の PCI	201 (35%)	186 (33%)	186 (33%)	199 (35%)	0.91	0.90	
末梢血管疾患	32 (6%)	32 (6%)	43 (8%)	47 (8%)	0.04	0.08	20
脳血管疾患	15 (3%)	18 (3%)	16 (3%)	19 (3%)	0.58	0.49	
糖尿病	115 (20%)	105 (19%)	124 (22%)	145 (26%)	0.01	0.03	
CADの家族履歴	242 (43%)	231 (41%)	214 (38%)	211 (38%)	0.21	0.08	
高コレステロール血症	161 (28%)	167 (29%)	163 (29%)	168 (26%)	0.39	0.41	
2週間以前のアスピリン	203 (36%)	230 (40%)	228 (40%)	252 (45%)	0.004	0.002	
2週間以前の脂質の処方	121 (21%)	122 (22%)	115 (20%)	116 (21%)	0.65	0.76	
無作為化以前のヘパリン	508 (90%)	495 (87%)	489 (86%)	506 (89%)	0.75	0.85	
喫煙の状態 :							
現在の喫煙者	215 (38%)	216 (38%)	204 (36%)	177 (31%)	0.24	0.06	30
非喫煙者	178 (31%)	175 (31%)	176 (31%)	196 (35%)			
過去の喫煙者	173 (31%)	175 (31%)	188 (33%)	192 (34%)			
徴候による診断:							
ST上昇MI	176 (31%)	187 (33%)	178 (31%)	196 (35%)	0.01	0.02	
非ST上昇MI	160 (28%)	111 (20%)	120 (21%)	120 (21%)			
不安定狭心症	231 (41%)	269 (47%)	270 (48%)	251 (44%)			

【表 3 2】

(表 2 4 つづき)

## 身体的所見

BMI kg/m <sup>2</sup>	28 ± 6	28 ± 4	29 ± 15	29 ± 13	0.28	0.96
収縮期の B P (mm Hg)	127 ± 19	129 ± 20	129 ± 22	130 ± 22	0.04	0.004
HR (BPM)	72 ± 14	72 ± 13	73 ± 14	73 ± 15	0.66	0.26
キリップクラス II-IV	46 (8%)	37 (7%)	46 (8%)	69 (12%)	0.02	0.003

## 診断試験

クレアチンクリアランス ≤ 90	143 (26%)	191 (35%)	229 (42%)	280 (52%)	<0.0001	<0.0001
ClCr (cc/min)	116 ± 42	107 ± 40	103 ± 41	93 ± 37	<0.0001	<0.0001
CK-MB > ULN	300 (79%)	280 (72%)	278 (72%)	284 (75%)	0.25	0.21
CTnl > 1.5 ng/ml	176 (31%)	156 (28%)	138 (25%)	149 (27%)	0.04	0.08
BNP > 80 pg/ml	265 (47%)	260 (47%)	276 (49%)	334 (59%)	<0.0001	<0.0001
CRP > 1.5 ng/ml	83 (43%)	83 (42%)	89 (42%)	94 (47%)	0.51	0.51
ST 異常 > 1mm	239 (42%)	267 (47%)	267 (47%)	289 (51%)	0.005	0.003

## CAD の範囲 (50% 狭窄症)

0 血管	26 (8%)	20 (7%)	19 (7%)	18 (6%)	0.49	0.07
1 血管	120 (38%)	91 (32%)	90 (32%)	90 (30%)		
2 血管	80 (26%)	84 (30%)	78 (28%)	87 (29%)		
3 血管	86 (28%)	84 (30%)	82 (33%)	102 (34%)		
Pos ETT	96 (46%)	95 (54%)	87 (44%)	65 (44%)	0.45	0.75
EF (%)	55 ± 13	54 ± 13	53 ± 13	53 ± 14	0.11	0.06

## 【 0 1 4 2 】

## M C P - 1 と臨床的結果との関係

平均 M C P - 1 濃度は、同時点で非致命的 M I を経験していない患者に対して、30 日以内 ( p = 0 . 0 1 ) または 10 ヶ月以内 ( p = 0 . 0 4 ) に経験した患者で有意に高かった ( 表 2 5 ) 。さらに、平均 M C P - 1 濃度は、エンドポイントを経験しない患者に対して、10 ヶ月以内に、死亡若しくは非致命的 M I ( p = 0 . 0 5 ) 、または、死亡、非致命的 M I 若しくは C H F の組み合わせたエンドポイントを有する患者で有意に高かった ( p < 0 . 0 2 ) ( 表 2 5 ) 。これらの所見は、四分位 M C P - 1 濃度および結果の分析でも観察された ( 表 2 6 ) 。

## 【 表 3 3 】

10

20

30

表 25. ベースライン MCP-1 濃度 (ng/mL) と結果との関係

結果	n	中央値 [25,75]	平均 ± SD	p 値*	
30日					
死亡	34	147 [116,227]	184 ± 117	0.19	
生存	2236	178 [128,239]	206 ± 212		
MI	59	209 [146,279]	235 ± 130	0.01	10
非 MI	2211	177 [128,237]	205 ± 213		
死亡または MI	88	197 [135,268]	221 ± 129	0.13	
非死亡または MI	2182	177 [128,236]	205 ± 213		
D/MI/UR	153	185 [140,251]	229 ± 284	0.12	20
非 D/MI/UR	2117	177 [127,237]	204 ± 205		
CHF	44	182 [134,236]	260 ± 468	0.79	
非 CHF	2226	177 [128,238]	204 ± 203		
D/MI/CHF	114	197 [136,264]	243 ± 308	0.06	
非 D/MI/CHF	2156	177 [128,236]	203 ± 204		
10ヶ月					
死亡	78	181 [136,248]	205 ± 213	0.41	30
生存	2192	177 [128,237]	208 ± 110		
MI	110	202 [136,268]	221 ± 122	0.04	
非 MI	2160	177 [128,236]	205 ± 214		
死亡または MI	172	192 [134,265]	216 ± 120	0.05	
非死亡または MI	2098	177 [128,235]	205 ± 216		

【表 3 4】

40

(表 2 5 つづき)

D/MI/UR	293	180 [133,253]	217 ± 225	0.23	
非 D/MI/UR	1977	177 [127,235]	204 ± 209		
CHF	65	192 [147,242]	246 ± 387	0.25	
非 CHF	2205	177 [128,239]	204 ± 203		
D/MI/CHF	203	196 [136,264]	229 ± 242	0.02	10
非 D/MI/CHF	2067	176 [127,235]	203 ± 207		

\* ウイコクソンランクサム検定

【表 3 5】

表 26. ベースライン MCP-1 四分位と結果との関係

結果	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	P トレ ンド	P Q1	Q4 対
範囲, ng/mL	40-127.9	128.1-177.3	177.4-238	>238			
n	567	568	568	567			
30日							
死亡	10 (1.8%)	12 (2.1%)	5 (0.9%)	7 (1.2%)	0.22	0.46	
MI	10 (1.8%)	14 (2.5%)	11 (1.9%)	24 (4.2%)	0.02	0.02	30
UR	8 (1.4%)	24 (4.2%)	19 (3.3%)	17 (3.0%)	0.23	0.07	
D/MI	19 (3.4%)	22 (3.9%)	16 (2.8%)	31 (5.5%)	0.14	0.08	
D/MI/UR	27 (4.8%)	46 (8.1%)	35 (6.2%)	45 (7.9%)	0.11	0.03	
CHF	9 (1.6%)	12 (2.1%)	12 (2.1%)	11 (1.9%)	0.68	0.65	
D/MI/CHF	23 (4.1%)	27 (4.8%)	25 (4.4%)	39 (6.9%)	0.048	0.04	
10ヶ月推定値							
死亡	14 (2.7%)	24 (5.2%)	15 (3.1%)	25 (7.0%)	0.21	0.07	40
MI	23 (4.8%)	24 (5.2%)	23 (5.1%)	40 (9.8%)	0.03	0.03	
UR	25 (5.3%)	43 (8.3%)	28 (6.0%)	31 (6.2%)	0.89	0.42	
D/MI	36 (7.4%)	42 (9.4%)	33 (7.0%)	61 (15.6%)	0.02	0.008	
D/MI/UR	61 (13.0%)	84 (18.2%)	60 (12.9%)	88 (21.7%)	0.11	0.02	
CHF	11 (2.2%)	9 (1.9%)	15 (3.9%)	16 (3.4%)	0.17	0.33	
D/MI/CHF	41 (8.4%)	46 (10.1%)	43 (10.1%)	68 (17.2%)	0.009	0.007	

【0143】

年齢、糖尿病、腎機能、CHFの徴候、ECGの変化、並びにcTnIおよびBNPの濃 50

度等、長期の死亡率の他の独立した予測値で調整した多変量モデルにおいて、増加する MMP-9 の濃度は、高い 10 ヶ月の死亡率と関係したまま維持された。MMP-9 の第 2、第 3、および第 4 の四分位の患者の 10 ヶ月での死亡の調整された確率比は、4.5 (1.3 - 15.6)、6.4 (1.9 - 21.4)、7.6 (2.3 - 25.5) であった。CRP 等のすべての変数について完全なデータで 736 人の患者においてモデルを繰り返した場合、MMP-9 は、10 ヶ月の死亡率と有意に関係したまま維持された。調整した確率比は、第 2、第 3、および第 4 の四分位において、3.1 (0.9 - 10.7)、3.9 (1.1 - 13.1) および 4.2 (1.3 - 14.4) であった。

## 【表 3 6】

表 27. 10 ヶ月の死亡率についての多変量モデル

変数	モデル 1 (n=2068)		モデル 2 (n=736)	
	HR	95% CI	HR	95% CI
年齢 > 75	2.25	1.03-4.92	1.91	0.83-4.40
糖尿病	1.59	0.69-2.43	1.30	0.73-2.31
キリップクラス > 1	2.98	1.71-5.21	2.37	1.27-4.45
左脚ブロック	4.96	2.21-11.12	5.32	2.19-12.90
クレアチンクリアランス < 90 cc/min	1.28	0.67-2.48	1.61	0.81-3.23
cTnI > 1.5 ng/mL	2.12	1.15-3.93	2.54	1.29-5.02
BNP > 40 pg/mL	5.70	1.35-24.04	5.58	1.29-24.15
CRP > 1.5 ng/mL	-	-	2.18	1.22-3.90
MMP-9 四分位 1 (リファレンス 四分位)	1.0	-	1.0	-
MMP-9 四分位 2	4.47	1.28-15.57	3.05	0.87-10.76
MMP-9 四分位 3	6.39	1.90-21.42	3.89	1.15-13.15
MMP-9 四分位 4	7.64	2.29-25.51	4.25	1.25-14.42

## 【0144】

モデル 1 は、C - 反応性タンパク質を除きすべての変数について完全なデータを有する患者を含む。モデル 2 は、C - 反応性タンパク質を含むすべての変数について完全なデータ

10

20

30

40

50

を有する患者を含む。列挙された変数に加えて、モデルは、高コレステロール血症、鬱血性心不全、または末梢動脈疾患；ヘパリン、硝酸塩、または利尿剤の以前の使用；徴候による診断（不安定狭心症、非ST上昇MI、ST上昇MI）；徴候事象の管理のための硝酸塩またはACE抑制剤の使用；血圧；および心電図のSTの変化、の以前の徴候について調整した。

【0145】

MMP-9の血漿濃度は、急性冠状動脈症候群の状態後の最初の数日以内に測定され、死亡率、非致命的MI、および鬱血性心不全の危険性の予測となる。MMP-9と死亡率の関係は、ベースライン臨床的変数、ECG所見、およびトロポニンI、C-反応性タンパク質、およびB型ナトリウム排泄増加性ペプチドのような確立された心臓生体マーカーの濃度と独立している。多変量解析により、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9、C-反応性タンパク質、B型ナトリウム排泄増加性ペプチド、およびトロポニンIの上昇した濃度は、増加した10ヶ月の死亡率の予測値からそれぞれ有意に独立していた。

10

【0146】

以前の研究において、MMP-9濃度は、虚血についての症状および心電図の徴候にもかかわらず、安定狭心症の患者における運動の後では増加しなかった（Kai H et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndrome*, *J Am Coll Cardiol* 32:368-372 (1998)）。本研究において、MMP-9とアテローム硬化症の範囲との間に関係はなく、MMP-9とCKMBおよびcTnIのような心臓壊死のマーカーとの間に、一般的に貧弱な相関が観察された。MMP-9と結果との間の関係は、不安定狭心症の患者と心筋梗塞の患者との間のものと同様であった。

20

【0147】

本実施例は、個々のマーカーの上昇と結果との間の関係の臨床的な利用を示している。さらに、危険性の層別化のための固有の病理学的工程に関連した異なる独立したマーカーを導入するという、多重マーカー方策を用いることによる利益も示される。この実施例で選択されたマーカーは、心筋損傷（cTnI、cTnT IC、およびFABP）、心室機能不全（BNP）、マトリックス分解またはプラーク破裂（MMP-9）、炎症（MCP-1およびCRP）、および凝固活性化（TpP）を示すものである。当業者は、これらの病理学的工程がこの実施例で記載された不利な事象に独立して関係していると承知している。この点において、それぞれのこれらの種々の病理学的工程の代替マーカーは、ACS患者の危険性の層別化のためのこの実施例のマーカーに置き換える。さらに、種々の病理学的工程のためのマーカーの種々の組み合わせは、ACSの患者の危険性の層別化に有用であろう。

30

【0148】

実施例5：診断的利用

MMP-9は、不安定狭心症からST部上昇心筋梗塞（STEMI）まで、急性冠状動脈系のすべての濃度で上昇する。TIMI OPUS-16研究集団は、不安定狭心症（UA）、非ST部上昇心筋梗塞（NSTEMI）、およびSTEMIの3つのグループに分離できる。特に興味深いことは、不安定狭心症の正常健康ドナーからの区別において、95%の特異性における感度の水準（97.8~100%）である（表28）。心臓損傷の最も広く受け入れられたマーカーであるTnIは、急性冠状動脈症候群のこの部分集合においてわずかに50%を超える感度を達成したにすぎない。

40

【表37】

表 28. 不安定狭心症の患者におけるマーカーの感度および特異性

症状発症からの時間	特異性	不安定狭心症 感度						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0-3 時間	94.8%	60.9%	5.3%	10.5%	100.0%	45.0%	0.0%	43.8%
0-6 時間	94.8%	65.5%	9.1%	13.3%	100.0%	50.0%	10.5%	33.0%
0-12 時間	94.8%	69.7%	9.0%	13.7%	98.0%	53.4%	18.0%	53.2%
0-24 時間	94.8%	34.8%	7.5%	83.5%	97.8%	56.0%	17.7%	54.9%

10

## 【 0 1 4 9 】

NSTEMIまたはSTEMIのいずれかの個体において、TnIは、特に症状発症時から6時間から24時間の間において、優れた感度および特異性を有する(表29および30)。不安定狭心症においてTnIがほんのわずかしが上昇しえない一方、MMP-9が上昇するという事実は、深刻でない不安定狭心症とより深刻な心筋梗塞との間の区別の有用な方法を提供するものである。医師がこの情報を利用可能であれば、治療の選択肢は影響されることとなる。

20

## 【 表 3 8 】

表 29. NSTEMI の患者におけるマーカーの感度および特異性

症状発症からの時間	特異性	NSTEMI 感度						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0-3 時間	94.8%	100.0%	0.0%	25.0%	100.0%	50.0%	25.0%	75.0%
0-6 時間	94.8%	75.0%	14.3%	14.3%	100.0%	28.6%	42.9%	71.4%
0-12 時間	94.8%	64.4%	23.1%	15.4%	100.0%	42.9%	50.0%	83.3%
0-24 時間	94.8%	76.7%	24.6%	20.6%	98.5%	50.0%	62.9%	91.2%

30

## 【 表 3 9 】

表 30. STEMI の患者におけるマーカーの感度および特異性

症状発症からの時間	特異性	STEMI 感度						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0-3 時間	94.8%	83.3%	25.0%	25.0%	100.0%	25.0%	0.0%	66.7%
0-6 時間	94.8%	61.1%	35.7%	14.3%	100.0%	46.2%	72.7%	90.9%
0-12 時間	94.8%	50.0%	48.9%	20.0%	97.8%	43.5%	86.5%	94.6%
0-24 時間	94.8%	68.2%	61.5%	22.2%	99.3%	49.3%	86.1%	97.0%

40

## 【 0 1 5 0 】

BNPは、不安定狭心症においても幾分上昇するが、これは、心筋梗塞の、特に事象の早

50

期において、より表示となるものである。MMP - 9とTnIの組み合わせで用いた場合、BNPは、急性冠状動脈症候群の診断の有用な情報を加えうる。

【0151】

TpP、MCP - 1、およびFABPはすべて、急性冠状動脈症候群の間の種々の時点で度合いを変化させて上昇し、その結果、診断を形成するのに使用される情報を加えうる。

【0152】

これらのマーカーのすべてが異なる機能を供給し、種々の供給源から由来するので、急性冠状動脈症候群の間の循環系へのこれらのマーカーの出現は、お互い独立しているようである。したがって、2またはそれ以上のマーカーを用いる診断パネルは、治療を導くことを助ける情報を提供する臨床医にとって有益であろう。

10

【0153】

実施例6：患者の治療におけるマーカーの使用

MMP - 9、cTnI、BNP、およびCRPがそれぞれ独立に10ヶ月の患者の死亡率に関係しているという所見は、ACSと疑われる患者における多重マーカー試験方策が個々のマーカーの測定と比べて危険予測を有利に改善できることを示す。このような予後および診断の利用に加え、本発明のマーカーは、ACS患者への治療の実施を助けるために用いることもできる。例えば、これらの生体マーカーの危険「プロフィール」は、異なった基礎をなす病態生理学的機構の標的特異的治療に用いられるであろう。この「危険プロフィール」は、MMP - 9、cTnI、BNP、およびCRPの種々の組み合わせにより、上記マーカーに加えて、またはその置き換えとして用いる他のマーカーと同様に、決定

20

【0154】

加えて、アテローム硬化症およびその合併症において直接の病因の役割を果たすMMP - 9のようなマーカーは、薬剤発見のための新規な治療の標的を提供できる。例えば、MMP系は、少なくとも4つの水準で調整されている：遺伝子転写、メッセージの翻訳、前酵素の活性化、およびメタロプロテアーゼの組織阻害因子(TIMPs)による阻害。これらの工程の1またはそれ以上の修飾は、アテローム硬化症のプラーク破裂を防ぎ、不利な血管および心臓の再構築を修正するであろう。

【0155】

治療方策には、例えば、MMP - 9の合成を妨害するためのアンチセンス組成物の実施；レセプターを基礎とする治療の実施(例えばMMP - 9またはそのフラグメントに向けられた抗体組成物)；および/または小分子治療の実施(例えばヘパリンはMMP - 9合成を減少させることができ、テトラサイクリン抗体は亜鉛をキレートすることによりMMPを不活性化でき、そしてHMG Co - Aレダクターゼ阻害因子およびペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター(PPAR) - ガンマはマクロファージからのMMP - 9の発現を減少させることができる)を、含めることができる。このような方策は、標的分子そのものに向けられ(この実施例のMMP - 9)、または、その代わりに標的の活性化若しくは活性のために必要な上流の分子に向けられる(例えば、プラスミンのようなプロテアーゼで、これはMMP - 9チモージェンをその活性形態に切断する)。

30

【0156】

この発明は当業者がこれを作製し、使用するために充分詳細に既述され、例示されているが、種々の代替、修正、および改良がこの発明の精神および範囲から離れることなく明白であろう。

40

【0157】

当業者は、本発明が、これらに内在するものと同様に、その目的を実行し、言及された目的および有利な点を得るのによく適していることを、容易に認識する。ここに提供された実施例は、好ましい態様の代表であり、例示であり、この発明の範囲の限定として意図するものではない。これらの修正および他の使用は、当業者に思い浮かぶものである。これらの修正は、この発明の精神の範囲に入るものであり、請求の範囲により定義されるものである。

50

## 【0158】

当業者にとって、様々な置き換えや修正がこの発明の範囲および精神から離れることなくここに記載された発明に対してなされうことは、容易で明白であろう。

## 【0159】

明細書に言及されたすべての特許および刊行物は、この発明の属する通常の知識を有するものの水準を示すものである。すべての特許および刊行物は、各々の個々の刊行物が特別に個別に参照により取り込まれることを示したように、同様の範囲で参照することによりここに取り込まれる。

## 【0160】

ここに適して例証的に記載された発明は、ここに特別に開示されていないいずれもの要素、限定の存在なしに実施されう。したがって、例えば、この各々の事例において、「含む」、「本質的に～からなる」および「～からなる」のいずれの用語も、他の2つのいずれの用語にも置き換えることができる。使用された用語および表現は、記述の用語として用いられ、限定のものではなく、そしてこのような用語および表現の使用において、示され、記載された特徴またはその部分のいずれの均等物をも排除する意図はないが、種々の修正がこの請求された発明の範囲に入ることが可能であると認識できる。したがって、本発明は好ましい態様および任意の特徴により特に記載されているが、ここに開示された概念の修正および多様化が当業者によって行われ、このような修正および多様化が添付の請求の範囲により定義されるこの発明の範囲に入ると見なされることを、理解すべきである。

10

20

## 【0161】

他の態様は、特許請求の範囲により明らかにされる。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
C 1 2 Q 1/527 (2006.01) C 1 2 Q 1/527  
C 1 2 Q 1/533 (2006.01) C 1 2 Q 1/533

(72)発明者 ダーレン, ジェフェリー・アール  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア州 サン ディエゴ, ケメルトン ロード 1 0 5  
5 5

(72)発明者 カーチック, ハワード  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サン ディエゴ, パノラミック レーン 5 4  
4 9

(72)発明者 ビューチェラー, ケネス・エフ  
アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サン ディエゴ, マニフェスト プレース 1  
2 5 2 3

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 American Journal of Veterinary Research, 1 9 9 9年, Vol.60, No.7, p860-864

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)  
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	急性冠状动脉综合征的诊断标志物及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP3806694B2</a>	公开(公告)日	2006-08-09
申请号	JP2002586802	申请日	2002-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
当前申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
[标]发明人	バルカースガナースイー ダーレンジエフェリーアール カーチックハワード ビューチェラーケネスエフ		
发明人	バルカース,ガナーズ・イー ダーレン,ジェフェリー・アール カーチック,ハワード ビューチェラー,ケネス・エフ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/25 C12Q1/37 C12Q1/48 C12Q1/50 C12Q1/527 C12Q1/533 C12N15/09 C12Q1/70 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/6887 G01N33/6893 G01N2333/58 G01N2800/324		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/25 C12Q1/37 C12Q1/48.Z C12Q1/50 C12Q1/527 C12Q1/533		
代理人(译)	田中玲子 森田浩二		
优先权	60/288871 2001-05-04 US 60/315642 2001-08-28 US		
其他公开文献	JP2004520598A JP2004520598A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及急性冠脉综合征的诊断和评估方法。特别地，测试样品的患者中分析了一组标志物的成员，包括非特异性标志物特异性的标记和一个或多个心肌损伤的一个或更多个心肌损伤的存在和量。公开了用于组装用于这种诊断和评估的一组标记的各种标记。在各个方面，本发明提供了用于早期检测和鉴定稳定型心绞痛，不稳定型心绞痛和心肌梗塞的方法。本发明的方法提供了一种快速，灵敏的特异性测定，其大大增加了可以从治疗和治疗中获益的患者数量，降低了与错误诊断相关的成本，提供有关患者预后的重要信息。

マーカー陽性	解釈
IL-6	炎症反応の存在。 ACSに特異的ではないが、早期事象の表示となりうる。
MDA-修飾LDL	プラーク破裂の表示。 進行中の事象の表示であり、プラーク破裂が胸痛の原因でありうる。
P-セレクテン	血小板活性化の表示。 血小板栓が形成中若しくは形成済みである。血小板栓およびその結果の閉塞が胸痛の原因でありうる。
TAT複合体	凝固活性化の表示。 血塊が形成中若しくは形成済みであり、その結果の閉塞が胸痛の原因でありうる。
BNP	心室機能不全の表示 心臓虚血により生じる損傷と関連しうる。
全cTnI	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。
全cTnTIC	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。全cTnIに対するcTnTICの高い割合は、進行中の事象または継続的虚血の表示となりうる。