

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/111645

発行日 平成18年7月20日(2006.7.20)

(43) 国際公開日 平成16年12月23日(2004.12.23)

(51) Int. Cl. F 1 テーマコード(参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

出願番号	特願2005-506988 (P2005-506988)	(71) 出願人	000002912 大日本住友製薬株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/008471		大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
(22) 国際出願日	平成16年6月10日(2004.6.10)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(31) 優先権主張番号	特願2003-165456 (P2003-165456)	(72) 発明者	箸井 寛 大阪府高槻市南芥川町1番1号 財団法人 大阪府三島救急医療センター内
(32) 優先日	平成15年6月10日(2003.6.10)	(72) 発明者	西本 昌義 大阪府高槻市南芥川町1番1号 財団法人 大阪府三島救急医療センター内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	竹下 仁 大阪府高槻市南芥川町1番1号 財団法人 大阪府三島救急医療センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性大動脈解離の判定方法及び判定用試薬

(57) 【要約】

ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離(スタンフォードA型又はスタンフォードB型)を発症しているか否かを判断する急性大動脈解離の判定方法及び、該判定方法を実施するための判定用試薬等を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項 2】

ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項 3】

ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードB型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項 4】

急性大動脈解離を発症しているヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、発症している急性大動脈解離がスタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離のいずれの疾患であるのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項 5】

胸痛発作を起こしたヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離と急性心筋梗塞のいずれの疾患を発症しているのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法。

【請求項 6】

測定された血液中のD-ダイマー濃度と、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間において予め設定された血液中のD-ダイマーのカットオフ値とを比較して、前記濃度が前記カットオフ値以上の場合には急性大動脈解離を発症していると判断し、前記カットオフ値未満の場合には急性心筋梗塞を発症していると判断する請求の範囲5に記載の鑑別方法。

【請求項 7】

胸痛発作を起こしたヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の中のいずれの疾患を発症しているのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法。

【請求項 8】

血液中のD-ダイマー濃度の測定を免疫化学的方法により行う請求の範囲1～4のいずれかに記載の急性大動脈解離の判定方法。

【請求項 9】

免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である請求の範囲8に記載の判定方法。

【請求項 10】

血液中のD-ダイマー濃度の測定を免疫化学的方法により行う請求の範囲5～7のいずれかに記載の急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法。

【請求項 11】

免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である請求の範囲10に記載の鑑別方法。

【請求項 12】

D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離の判定用試薬。

【請求項 13】

スタンフォードA型急性大動脈解離の判定用試薬である請求の範囲12に記載の判定用試薬。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

スタンフォードB型急性大動脈解離の判定用試薬である請求の範囲12に記載の判定用試薬。

【請求項15】

D-ダイマーを認識する抗体を含有するスタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離の鑑別用試薬。

【請求項16】

抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲12～15のいずれかに記載の試薬。

【請求項17】

D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬。

【請求項18】

スタンフォードA型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬である請求の範囲17に記載の鑑別用試薬。

10

【請求項19】

スタンフォードB型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬である請求の範囲17に記載の鑑別用試薬。

【請求項20】

スタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬である請求の範囲17に記載の鑑別用試薬。

【請求項21】

抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲17～20のいずれかに記載の鑑別用試薬。

20

【請求項22】

請求の範囲12～15のいずれかに記載の試薬及び該試薬に関する記載物を含む商業パッケージであって、該記載物および／または該パッケージに、該試薬は急性大動脈解離の判定の用途に使用できる、又は使用すべきであることが記載されている商業パッケージ。

【請求項23】

請求の範囲17～20のいずれかに記載の鑑別用試薬及び該試薬に関する記載物を含む商業パッケージであって、該記載物および／または該パッケージに、該試薬は急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別の用途に使用できる、又は使用すべきであることが記載されている商業パッケージ。

30

【請求項24】

急性大動脈解離の判定用試薬の製造のための、D-ダイマーを認識する抗体の使用。

【請求項25】

急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬の製造のための、D-ダイマーを認識する抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、ヒトから分離された血液中のD-ダイマー(D-dimer)濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離(acute aortic dissection)を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法等に関する。

40

また本発明は、上記判定方法を実施するために使用され、D-ダイマーを認識する抗体(以下「抗D-ダイマー抗体」ということもある)を含有する急性大動脈解離の判定用試薬等に関する。

【背景技術】

急性大動脈解離の発生頻度は一般に考えられている以上に高率であり、循環器系疾患による急死例においては、急性心筋梗塞に次いで2番目に多い死因である。

本疾患は、激しい胸痛を主訴とし、突然に発症して急速に死に至る転帰をとることが稀ではない疾患であり、適切な処置・治療のためには、本疾患と、同じく胸痛を主訴とする急性心筋梗塞、肺梗塞、胸部大動脈瘤切迫破裂、気胸などを鑑別することが極めて重要である。

50

特に、後述するスタンフォードA型の急性大動脈解離では、解離が冠動脈にまで進展し、血管が閉塞することにより急性心筋梗塞の病態を呈することがある。もし診断を誤り、急性大動脈解離患者に対して、急性心筋梗塞に対する治療法である血栓溶解療法を施すと、大動脈からの大出血により患者を死に至らしめる可能性がある。

以上のように、医療、中でも救急医療の現場において、急性大動脈解離は、激しい胸痛を主訴とし、特に、急性心筋梗塞との鑑別が難しい疾患とされている。

D-ダイマーは二次線溶系亢進のマーカーとして、血液凝固・線溶系亢進の病態を詳細に把握するために利用されている生体内蛋白である。具体的には、播種性血管内凝固症候群(DIC)や各種の血栓性疾患の診断、病態把握、治療効果判定のマーカーとして使用されている。

10

「日本胸部外科学会雑誌」、平成10年7月10日、第46巻、第7号、p. 616-621において、急性大動脈解離症例の手術におけるトラネキサム酸(止血剤)大量投与の止血効果を検討するために、血液凝固のパラメーターとして、術前、術後のヘモグロビン(Hb)値、血小板数、フィブリノーゲン値、アンチトロンビン(AT)III値、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、FDP値及びD-ダイマー値が測定されている。

しかしながら、上記文献においては、急性大動脈解離症例の手術におけるトラネキサム酸大量投与の効果を検討するための血液凝固パラメーターの一つとして、D-ダイマーが測定されているに過ぎない。

また、“CHEST”(米国)、2003年5月、第123巻、No. 5、p. 1375-1378には、急性大動脈解離患者24名の血液中の平均D-ダイマー濃度が $9.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ であることが記載されている。

20

本願発明においては、後記実施例に示すとおり、急性大動脈解離患者の血液中D-ダイマー濃度の平均値は $33.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、前記文献の値とは大きく異なっている。

また、これら二つの文献には血液中のD-ダイマー濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離とが区別できることについて、記載も示唆もされていない。

【発明の開示】

本発明の目的は、急性大動脈解離の判定方法及び判定用試薬等を提供することにある。

30

本発明者らは急性大動脈解離を発症している患者の血液を採取し、その中に含まれるD-ダイマー濃度を測定した。その結果、健常人よりも高濃度のD-ダイマーが血液中に存在することが知られている急性心筋梗塞患者と比較しても、はるかに高濃度のD-ダイマーが急性大動脈解離患者において存在していること、及びその濃度が後述するスタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離との間では大きく異なることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法、

40

[2] ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法、

[3] ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードB型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法、

[4] 急性大動脈解離を発症しているヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、発症している急性大動脈解離がスタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離のいずれの疾患であるのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法、

50

[5] 胸痛発作を起こしたヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離と急性心筋梗塞のいずれの疾患を発症しているのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法、

[6] 測定された血液中のD-ダイマー濃度と、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間において予め設定された血液中のD-ダイマーのカットオフ値とを比較して、前記濃度が前記カットオフ値以上の場合には急性大動脈解離を発症していると判断し、前記カットオフ値未満の場合には急性心筋梗塞を発症していると判断する上記[5]に記載の鑑別方法、

[7] 胸痛発作を起こしたヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の中のいずれの疾患を発症しているのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法、

[8] 血液中のD-ダイマー濃度の測定を免疫化学的方法により行う上記[1]～[4]のいずれかに記載の急性大動脈解離の判定方法、

[9] 免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である上記[8]に記載の判定方法、

[10] 血液中のD-ダイマー濃度の測定を免疫化学的方法により行う上記[5]～[7]のいずれかに記載の急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法、

[11] 免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である上記[10]に記載の鑑別方法、

[12] D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離の判定用試薬、

[13] スタンフォードA型急性大動脈解離の判定用試薬である上記[12]に記載の判定用試薬、

[14] スタンフォードB型急性大動脈解離の判定用試薬である上記[12]に記載の判定用試薬、

[15] D-ダイマーを認識する抗体を含有するスタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離の鑑別用試薬、

[16] 抗体がモノクローナル抗体である上記[12]～[15]のいずれかに記載の試薬、

[17] D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬、

[18] スタンフォードA型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬である上記[17]に記載の鑑別用試薬、

[19] スタンフォードB型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬である上記[17]に記載の鑑別用試薬、

[20] スタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬である上記[17]に記載の鑑別用試薬、

[21] 抗体がモノクローナル抗体である上記[17]～[20]のいずれかに記載の鑑別用試薬、

[22] 上記[12]～[15]のいずれかに記載の試薬及び該試薬に関する記載物を含む商業パッケージであって、該記載物および/または該パッケージに、該試薬は急性大動脈解離の判定の用途に使用できる、又は使用すべきであることが記載されている商業パッケージ、

[23] 上記[17]～[20]のいずれかに記載の鑑別用試薬及び該試薬に関する記載物を含む商業パッケージであって、該記載物および/または該パッケージに、該試薬は急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別の用途に使用できる、又は使用すべきであることが記載されている商業パッケージ、

[24] 急性大動脈解離の判定用試薬の製造のための、D-ダイマーを認識する抗体の使用、

[25] 急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬の製造のための、D-ダイマーを認識する抗体の使用、

10

20

30

40

50

[26] 急性大動脈解離が疑われるヒトから分離された血液中のD-ダイマーを検出することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法、

[27] 急性大動脈解離が疑われるヒトが胸痛発作を起こしたヒトである上記[26]に記載の判定方法、

[28] D-ダイマーの検出をD-ダイマーを認識する抗体を使用する免疫化学的方法により行う上記[26]又は[27]に記載の判定方法、

[29] 免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である上記[28]に記載の判定方法、

[30] 急性大動脈解離及び/又は急性心筋梗塞が疑われるヒトから分離された血液中のD-ダイマーを検出することを特徴とする急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定方法、

[31] 急性大動脈解離及び/又は急性心筋梗塞が疑われるヒトが胸痛発作を起こしたヒトである上記[30]に記載の判定方法、

[32] 検出された血液中のD-ダイマー濃度と、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別が可能な血液中のD-ダイマーのカットオフ値とを比較して、前記濃度が前記カットオフ値以上の場合には急性大動脈解離を発症していると判定し、前記カットオフ値未満の場合には急性心筋梗塞を発症していると判定する上記[30]又は[31]に記載の判定方法、

[33] D-ダイマーの検出をD-ダイマーを認識する抗体を使用する免疫化学的方法により行う上記[30]～[32]のいずれかに記載の判定方法、

[34] 免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である上記[33]に記載の判定方法、

[35] 急性大動脈解離がスタンフォード分類によりA型に分類される急性大動脈解離である上記[26]～[34]のいずれかに記載の判定方法、

[36] 急性大動脈解離がスタンフォード分類によりB型に分類される急性大動脈解離である上記[26]～[34]のいずれかに記載の判定方法、

[37] 上記[28]又は[29]に記載の判定方法を実施するために使用され、少なくともD-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離の判定用試薬、

[38] 上記[37]に記載の判定用試薬を含む商業パッケージであって、該判定用試薬を急性大動脈解離の判定に使用できる又は使用すべきであることが該パッケージ上に記載されているか、又は該パッケージ中に前記のように記載した該判定用試薬に関する記載物を含む商業パッケージ、

[39] 上記[33]又は[34]に記載の判定方法を実施するために使用され、少なくともD-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定用試薬、

[40] 上記[39]に記載の判定用試薬を含む商業パッケージであって、該判定用試薬を急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別に使用できる又は使用すべきであることが該パッケージ上に記載されているか、又は該パッケージ中に前記のように記載した該判定用試薬に関する記載物を含む商業パッケージ、

[41] 急性大動脈解離がスタンフォード分類によりA型に分類される急性大動脈解離である上記[37]～[40]のいずれかに記載の判定用試薬又は商業パッケージ、

[42] 急性大動脈解離がスタンフォード分類によりB型に分類される急性大動脈解離である上記[37]～[40]のいずれかに記載の判定用試薬又は商業パッケージ、である。

【図面の簡単な説明】

図1は、実施例2における急性大動脈解離症例および急性心筋梗塞症例の血液中D-ダイマー濃度から作成したROC曲線を示す。

図2は、実施例2における急性大動脈解離症例および急性心筋梗塞症例の血液中D-ダイマー濃度の分布を示す。

図3は、実施例5の急性大動脈解離症例（スタンフォードA型及びスタンフォードB型

) および急性心筋梗塞症例の血液中D-ダイマー濃度測定値の分布図を示す。

図4は、実施例6において作成したROC曲線を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

本発明は、ヒト、例えば、急性大動脈解離が疑われるヒトから分離された血液中のD-ダイマーを検出することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法に関する。換言すれば、本発明は、かかるヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法に関する。

なお、本明細書中で「D-ダイマー濃度」は「D-ダイマーレベル」と同義であり、また、「D-ダイマー濃度の測定」は「D-ダイマー（レベル）の検出」と同義である。 10

本発明の判定の対象疾患である急性大動脈解離は、大動脈壁を構成する中膜が解離し、内膜側と外膜側に裂けている病態を特徴とする疾患である。なお、大動脈壁は組織学的に血管内腔側から順に、内膜、中膜および外膜から構成される。

本疾患の典型的な初発症状は突然に生じる激しい胸痛であり、この症状は一般的に「胸痛発作」と呼ばれている。胸痛発作における痛みは、急性大動脈解離の発症部位やその大きさによっては、胸部には限局せず、背部にまで拡大し胸背部痛の様相を呈することもある。なお、このような痛みは大動脈壁が裂けることに起因している、と一般的に理解されている。

本疾患では、解離の発症部位によって臨床症状、治療方法が異なるため、解離の発症部位による病型分類がなされ、治療方針決定のために利用されている。代表的なスタンフォード (Stanford) の病型分類によれば、本疾患は、解離が心臓から頸部に至る上行大動脈に存在する「スタンフォードA型急性大動脈解離」と、解離が上行大動脈には存在しない、より詳細には解離が上行大動脈には存在せず、且つ胸部大動脈から腹部大動脈へ至る下行大動脈に存在する「スタンフォードB型急性大動脈解離」の何れかに分類される。 20

スタンフォードA型急性大動脈解離の患者の中には、解離が冠動脈にまで進展し、重篤な合併症を併発したり、動脈破裂を起こす患者も多く、スタンフォードA型急性大動脈解離の自然予後は、スタンフォードB型急性大動脈解離のものに比べ極めて不良である。従って、急性大動脈解離を発症していると判断された場合には、スタンフォードA型急性大動脈解離を発症しているのか、スタンフォードB型急性大動脈解離を発症しているのかを 30

鑑別することは救急医療の分野においては重要である。

急性大動脈解離の上記のような典型的な臨床症状により、本発明の別の実施形態においては、胸痛発作を起こしたヒトをD-ダイマー検出の対象としている。

本発明において、ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度の測定は、特に制限されず、たとえば、免疫化学的方法やHPLC法などの各種クロマトグラフィー法等、いずれの方法によっても行うことができる。その中でも特に、抗D-ダイマー抗体を利用する免疫化学的方法により濃度の測定を行うのが好ましい。なお、本明細書において「濃度の測定」は、定量的にD-ダイマー濃度を測定することのみならず、ある一定濃度以上のD-ダイマーの存否を定性的に検出することをも意味する。

血液中のD-ダイマー濃度の測定に使用される免疫化学的方法としては、特に制限はなく、従来公知の例えば、酵素免疫測定法 (EIA法)、ラテックス凝集法、免疫クロマト法、放射免疫測定法 (RIA法)、蛍光免疫測定法 (FIA法)、ルミネッセンス免疫測定法、スピンドット法、抗原抗体複合体形成に伴う濁度を測定する比濁法、抗体固相膜電極を利用し抗原との結合による電位変化を検出する酵素センサー電極法、免疫電気泳動法、ウエスタンブロット法などが挙げられる。これらの中でも、EIA法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法によってD-ダイマー濃度を測定するのが好ましい。 40

EIA法には、酵素標識抗原と検体中の抗原とを競合させる競合法と、競合させることのない非競合法があるが、これらの方法の中でも、2種類の抗体、特にモノクローナル抗体を用いた、非競合法の一種であるサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法 (サンドイッチ ELISA法) が抗原 (D-ダイマー) に対する特異性および検出操作の容易性において 50

特に好ましい。

サンドイッチELISA法は、D-ダイマーに存在している異なったエピトープを認識する2種類の抗体、すなわち固相化抗D-ダイマー抗体と酵素標識抗D-ダイマー抗体との間に、D-ダイマーを挟み込む(サンドイッチ)ことによりD-ダイマー濃度を測定するものである。すなわち、固相化抗体によって捕捉されたD-ダイマーと結合した標識抗体の酵素量を測ることにより、D-ダイマー濃度を測定することができる。

また、サンドイッチELISA法の一つとしてアビジン-ビオチン反応を利用した方法もある。本法によれば、血液中のD-ダイマーを固相化抗D-ダイマー抗体でもって捕捉し、捕捉されたD-ダイマーと、ビオチンで標識された抗D-ダイマー抗体との間で抗原抗体反応を行わせ、次に、酵素標識ストレプトアビジンを加えることによって、前記と同様にしてD-ダイマー濃度を測定することができる。

ラテックス凝集法は、抗体感作ラテックス粒子と抗原との凝集反応を利用した免疫化学的方法である。この方法によるD-ダイマー濃度の測定は、抗D-ダイマー抗体感作ラテックス粒子と検体血液中のD-ダイマーとを免疫反応させ、その結果生じたラテックス粒子の凝集の程度を測定することにより実施できる。

また、免疫クロマト法は全ての免疫化学反応系がシート状のキャリア上に保持されており、血液の添加のみで操作が完了する方法である。本法によるD-ダイマー濃度の測定の要領は、次のとおりである。まず、検体たる血液がキャリアに滴下されると、血液中のD-ダイマーとキャリア上に配置された標識物(金コロイド等)で標識された抗D-ダイマー抗体とが免疫反応し、その結果、免疫複合体が生成される。この複合体がキャリア上を展開してゆき、キャリア上の特定箇所(別)に固相化された別のエピトープを認識する抗D-ダイマー抗体に捕捉されると標識物が集積し、その集積度合いを肉眼で観察することによって、D-ダイマー濃度を測定することができる。

免疫クロマト法の実施には特別な測定機器は不要であり、病院外での疾患の判定や、救急などで迅速な疾患判定が求められる場合には有利な方法である。本方法は任意に設定した濃度以上のD-ダイマーの存否を定性的に検出するのに適しており、後述するカットオフ値(D-ダイマー濃度)をあらかじめ定めた場合には、カットオフ値以上のD-ダイマーの存在を検出すれば陽性の結果が、また、それが検出されなければ陰性の結果が出るような形態で使用される。

なお、血液中のD-ダイマー濃度の測定を目的とする上記サンドイッチELISA法やラテックス凝集法などの免疫化学的方法は既に公知であり、これらの方法を利用したD-ダイマーの測定試薬は後述のとおり市販されている。これらの試薬を使用すれば、ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度の測定は容易に実施することができる。

本発明において、検体として使用される血液としては、全血、血清、血漿のいずれであってもよく、これらはヒトから採取した血液を常法に従って処理することで、適宜、得ることができる。

急性大動脈解離を発症しているか否かの判断は、前述のようにして測定された血液中のD-ダイマー濃度を、例えば、あらかじめ求めておいた、多数の急性大動脈解離患者の血液中D-ダイマー濃度の平均値や、多数患者の測定値の分布と比較することにより行うことができる。例えば、後記実施例において測定された、スタンフォードA型及びスタンフォードB型を含む急性大動脈解離患者の血液中D-ダイマー濃度の平均値は $33.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

また、本発明は、上記のようにして測定された血液中のD-ダイマー濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断する急性大動脈解離の判定方法に関し、また、同様にしてスタンフォードB型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断する急性大動脈解離の判定方法に関する。

スタンフォードA型急性大動脈解離を発症しているか否かの判断、及び、スタンフォードB型急性大動脈解離を発症しているか否かの判断は、上記急性大動脈解離を発症しているか否かの判断と同様にして実施することができる。

例えば、後記実施例において測定されたスタンフォードA型急性大動脈解離患者18名

の血液中D-ダイマー濃度の平均値は $48.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、スタンフォードB型急性大動脈解離患者14名の血液中D-ダイマー濃度の平均値は $14.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった(実施例1)。

このように、スタンフォードA型急性大動脈解離患者の血液中D-ダイマー濃度の平均値は、スタンフォードB型急性大動脈解離患者と比較して3倍以上高かった(実施例1)。この知見から、本発明の判定方法においては、急性大動脈解離を発症していると診断された患者血液中のD-ダイマー濃度に基づいて、発症している急性大動脈解離がスタンフォードA型と、スタンフォードB型のいずれであるのかを判断することもできる。

上記本発明の判定方法を実施する場合には、公知の一般的な心臓血管系疾患の検査法である他の方法、例えば、胸部単純X線撮影、超音波断層、CTスキャンなどと組み合わせることによって急性大動脈解離の判定をより確実にすることができる。

また、本発明の別の形態は、急性大動脈解離及び/又は急性心筋梗塞が疑われるヒト、例えば、胸痛発作を起こしたヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離と急性心筋梗塞のいずれの疾患を発症しているのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法に関する。

鑑別の対象疾患である急性心筋梗塞は、心筋を支配する冠状動脈が閉塞し、その支配下にある心筋が壊死する疾患である。世界保健機構(WHO)は、A.胸痛、B.心電図異常、及びC.クレアチンキナーゼ-MBやアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼなどの心筋逸脱酵素の血液中の上昇、のA~C総てを満たす者が急性心筋梗塞を発症しているとする診断基準を示している。

急性心筋梗塞は近年の食生活の欧米化により、日本において急激に増加している。本疾患は、主な症状である激しい胸痛及び呼吸困難を伴い突然に発症し、心筋の梗塞巣の大きさによっては、発症と同時に心停止に至ることもある極めて経過の早い疾患である。このため発症後1~2時間で患者が死亡することも多く、迅速かつ的確な本疾患の診断とそれに対応した適切な処置を施すことが救命のためには重要である。急性心筋梗塞の特徴的な症状である激しい胸痛も、急性大動脈解離の場合と同様に胸痛発作と呼ばれ、痛みが背部にまで拡大し胸背部痛の様相を呈することがある。

急性大動脈解離と急性心筋梗塞は、前記のような共通する特徴的な臨床症状である胸痛発作に因んで、「二大胸痛疾患」といわれており、この両疾患を臨床症状から鑑別することは困難である。しかしながら、医療の現場において、胸痛発作等によって急性大動脈解離および急性心筋梗塞が疑われた場合にはそのどちらを発症しているのか、さらには、急性大動脈解離がスタンフォードA型であるのかスタンフォードB型であるのかを鑑別することは適切な治療を施すためには極めて重要である。

両疾患は、前記のとおり「二大胸痛疾患」といわれることから、本発明の鑑別方法においては「胸痛発作を起こしたヒト」を血液中のD-ダイマー濃度測定の対象とするものである。

本明細書において「胸痛発作を起こしたヒト」は、血液を分離される以前に胸痛発作を起こしたヒトのみならず、血液を分離されている時点において現に胸痛発作を起こしているヒトをも意味する。

各疾患の鑑別は、前述した本発明の判定方法の場合と同様に、測定された血液中のD-ダイマー濃度を、あらかじめ求めておいた、各疾患を発症している多数の患者の血液中D-ダイマー濃度の平均値や、多数患者の測定値の分布などと比較することにより行うことができる。

例えば、後記実施例において測定された、急性心筋梗塞患者18名の血液中D-ダイマー濃度の平均値は $0.39 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった(実施例1)。

また、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間で、血液中のD-ダイマー濃度のカットオフ値をあらかじめ設定しておけば、測定されたD-ダイマー濃度が前記カットオフ値以上の場合には、急性大動脈解離を発症していると判断し、また、測定されたD-ダイマー濃度が前記カットオフ値未満の場合には、急性大動脈解離ではなく急性心筋梗塞を発症しているとの判断をすることができる。

10

20

30

40

50

「カットオフ値」は、その値を基準として疾患の鑑別をした場合に、高い診断感度（有病正診率）及び高い診断特異度（無病正診率）の両方を満足できる値を意味する。本発明においては、急性大動脈解離を発症している患者で高い陽性（カットオフ値以上）率を示し、かつ、急性心筋梗塞を発症している患者で高い陰性（カットオフ値未満）率を示す血液中のD-ダイマー濃度をカットオフ値として使用することができる。

カットオフ値の算出方法は、この分野において周知である。例えば、多数の急性大動脈解離及び急性心筋梗塞患者の血液中D-ダイマー濃度を測定し、測定された各濃度における、診断感度および診断特異度を求める。そしてこれらの測定値に基づいて、ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線を作成し、診断感度と診断特異度が可能な限り100%に近いときのD-ダイマー濃度を求めて、その値をカットオフ値とすることができる。なお、ROC曲線は、後記実施例に示すような市販の解析ソフトを使用して作成することもできる。

例えば、後記実施例で算出された、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間の血液中D-ダイマーのカットオフ値は、 $0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ （実施例2）と、 $1.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ （実施例4, 6）であった。従って、例えばカットオフ値として上記値のみならず、 $0.7 \sim 1.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ の値を使用することもできる。このようなカットオフ値は、特定の値をとるものではなく、D-ダイマーの検出に使用される患者母集団に依存して変動する。

なお、同一の検体を対象とした場合でも、D-ダイマー濃度の測定値は、使用する測定方法や試薬によって異なることもあるので、カットオフ値はD-ダイマーの測定に使用する測定方法や試薬ごとに設定する必要がある。

前述のとおり、スタンフォードA型急性大動脈解離患者とスタンフォードB型急性大動脈解離患者の血液中D-ダイマー濃度は大きく異なっていることから、本発明の鑑別方法に含まれる他の実施形態においては、スタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離と急性心筋梗塞の中のいずれの疾患を発症しているのかを判断することもできる。

上記本発明の鑑別方法を実施する場合には、公知の一般的な心臓血管系疾患の検査法である他の方法、例えば、胸部単純X線撮影、超音波断層撮影、CTスキャンなどと組み合わせることによって、各疾患の鑑別をより確実にすることができる。

また、本発明は、上記本発明の判定方法のうち、免疫化学的方法を実施するために使用され、D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離の判定用試薬に関する。

かかる判定用試薬は、免疫化学的方法により血液中のD-ダイマー濃度を測定して、急性大動脈解離を判定する場合に好適に使用することができ、かかる判定方法と同一の目的を達成するものである。

本発明の判定用試薬に含有される抗D-ダイマー抗体は、ヒトから分離された血液中に存在するD-ダイマーを認識し、D-ダイマーとの特異的な免疫反応性を有するものであれば、ポリクローナル抗体又は、モノクローナル抗体の何れでも良い。両者のうち、抗体の安定供給の点において、また、D-ダイマーに対する高い特異性及び均一性の点においてモノクローナル抗体が好ましい。

このような抗D-ダイマー抗体は公知の手段により製造することができ、遊離の状態、標識された状態または固相化された状態で本発明の判定用試薬に含まれる。

ポリクローナル抗体は、常法によりヒトの血液から分離・精製されたD-ダイマーを適当なアジュバントとともにマウス、ラット、ウサギなどの動物に免疫し、血液を採取して公知の処理をなすことにより製造することができる。

またモノクローナル抗体は、このように免疫された動物の脾臓細胞を採取し、ミルシュタインらの方法によりミエローマ細胞との細胞融合、抗体産生細胞スクリーニング及びクローニング等を行い、抗D-ダイマー抗体を産生する細胞株を樹立し、これを培養することにより製造することができる。ここで、免疫抗原として使用されるD-ダイマーは、必ずしもヒトの血液中に存在する天然のD-ダイマーである必要はなく、遺伝子工学的手法により得られる組換え型D-ダイマーやそれらの同効物（断片）であってもよい。

本発明の判定用試薬に、サンドイッチELISA法を採用する場合、かくして得られた

10

20

30

40

50

抗D-ダイマー抗体は、固相化抗D-ダイマー抗体及び酵素標識抗D-ダイマー抗体の形態で該試薬に含まれる。

固相化抗D-ダイマー抗体は、前述のようにして得られた抗D-ダイマー抗体を固相（例えば、マイクロプレートウェルやプラスチックビーズ）に結合させることにより製造することができる。固相への結合は、通常、抗体をクエン酸緩衝液等の適当な緩衝液に溶解し、固相表面と抗体溶液を適当な時間（1～2日）接触させることにより行うことができる。

さらに、非特異的吸着や非特異的反応を抑制するために、牛血清アルブミン（BSA）や牛ミルク蛋白等のリン酸緩衝液を固相と接触させ、抗体によってコートされなかった固相表面部分を前記BSAや牛ミルク蛋白等でブロッキングすることが一般的に行われる

10

酵素標識抗D-ダイマー抗体は、上記固相化された抗体とは異なるエピトープを認識する抗D-ダイマー抗体と酵素とを結合（標識）させることにより製造できる。該抗体を標識する酵素としては、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等が挙げられる。これらの酵素と抗D-ダイマー抗体との結合はそれ自体公知の方法、例えば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより行うことができる。

また、ELISA法において前記アビジン-ビオチン反応を利用する場合は、急性大動脈解離の判定用試薬に含まれるビオチン標識抗D-ダイマー抗体は、例えば、市販のビオチン標識化キットを使用することにより製造できる。

20

サンドイッチELISA法を実施する場合、前記抗D-ダイマー抗体以外に必要なに応じて、標準物質、洗浄液、酵素活性測定用試薬（基質剤、基質溶解液、反応停止液等）、酵素標識ストレプトアビジン（アビジン-ビオチン反応を利用した場合）などが使用される。従って、本発明の急性大動脈解離の判定用試薬は、抗D-ダイマー抗体以外にこれらを構成試薬として含むキットの形態であってもよい。

前記基質剤としては、選択した標識酵素に応じて適当なものが選ばれる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを選択した場合においては、 o -フェニレンジアミン（OPD）、テトラメチルベンチジン（TMB）などが使用され、アルカリホスファターゼを選択した場合においては、 p -ニトロフェニルホスフェート（PNPP）などが使用される。

30

また、反応停止液、基質溶解液についても、選択した標識酵素に応じて、従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

なお、サンドイッチELISA法によるD-ダイマーの測定試薬やキットが多数販売されており（例えば、ベリンガー・マンハイム社「アセラクロムDダイマー」（商品名）、富士レビオ社「ダイマーテストEIA」（商品名）など）、これらの試薬等を本発明の急性大動脈解離の判定用試薬として使用することもできる。

本発明の判定用試薬にラテックス凝集法を採用する場合、抗D-ダイマー抗体は、ラテックス感作抗D-ダイマー抗体の形態で該試薬に含まれる。ラテックス粒子と抗D-ダイマー抗体との感作（結合）は、この分野で公知の方法、例えば、化学結合法（架橋剤としてカルボジイミドやグルタルアルデヒド等を用いる方法）や物理吸着法により成すことができる。

40

ラテックス凝集法を実施する場合、上記ラテックス感作抗体以外に必要なに応じて、希釈安定化緩衝液、標準抗原などが使用される。従って、本発明の判定用試薬は、ラテックス感作抗D-ダイマー抗体以外に、これらを構成試薬として含む急性大動脈解離の判定用キットの形態で実現されてもよい。

なお、ラテックス凝集法によるD-ダイマーの測定試薬やキットが多数販売されており（例えば、ダイアヤトロン社「エルピアエースD-Dダイマー」（商品名）、日本ロッシュ社「コアグソルD-ダイマー」（商品名）など）、これらの試薬等を本発明の急性大動脈解離の判定用試薬として使用することもできる。

本発明の判定用試薬に免疫クロマト法を採用する場合、抗D-ダイマー抗体は、固相化抗D-ダイマー抗体及び標識抗D-ダイマー抗体の形態で該試薬に含まれる。標識抗D-

50

ダイマー抗体における標識物として、この分野における公知のものを適宜使用することができ、例えばそのような標識物として、金コロイド粒子が挙げられる。

このような免疫クロマト法による本発明の判定用試薬は、Watanabe et al., *Clinical Biochemistry* 34 (2001) 257-263 に記載の方法を参考にして製造することができる。

本発明の判定用試薬は、実際の医療現場において、商業パッケージの形態で提供される。かかる商業パッケージは上記判定用試薬をその中に含み、該判定用試薬を急性大動脈解離の判定に使用できる、または使用すべきであることが該パッケージに記載されている、及び／又は、そのように記載された該判定用試薬に関する記載物を該パッケージ中に含むものである。

10

また本発明は、上記本発明の急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法のうち、免疫化学的方法を実施するために使用され、D-ダイマーを認識する抗体を含有する、急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別用試薬に関する。

かかる試薬は、前述した判定用試薬と同一の構成をとるものであり、免疫化学的方法により血液中のD-ダイマー濃度を測定し、急性大動脈解離と急性心筋梗塞のいずれの疾患を発症しているのかを判定する場合に好適に使用することができ、かかる鑑別方法と同一の目的を達成するものである。

上記鑑別用試薬は、実際の医療現場において、商業パッケージの形態で提供される。かかる商業パッケージは上記鑑別用試薬をその中に含み、該鑑別用試薬を急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別に使用できる、または使用すべきであることが該パッケージに記載されている、及び／又はそのように記載された該判定用試薬に関する記載物を該パッケージ中に含むものである。

20

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1：急性大動脈解離を発症している患者血液中のD-ダイマーの検出（急性心筋梗塞患者との比較）

胸痛（胸背部痛含む）を訴えて来院した患者のうち、急性大動脈解離と確定診断された症例（スタンフォードA型18例、スタンフォードB型14例の計32例）及び、急性心筋梗塞と確定診断された症例（18例）の来院時に採血された血液中のD-ダイマー濃度を以下のようにして測定し、その結果を得た。

30

なお、これらの患者からはインフォームドコンセントを取得した。

（1）D-ダイマー濃度の測定

ラテックス凝集法を測定原理とするD-ダイマー測定試薬「STAライアテストD-ダイマー」（商品名、ロッシュダイアグノステイクス社製）を使用して以下のとおり測定した。なお、この試薬の基準値（一般的な血液凝固・線溶系異常判断の目安となる健常人の上限値）は $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ に定められている。

患者の静脈から市販のクエン酸ナトリウム採血管（インセパッカーC凝固検査用〔積水化学工業〕、3.13%クエン酸ナトリウム0.2mL含有）に1.8mLの全血を採取した。その後、採血管を緩やかに転倒混和し、3000rpmで5分間、室温で遠心分離した。遠心分離後の採血管をそのままD-ダイマー自動測定装置であるSTA（ロッシュダイアグノステイクス社製）にセットし、分析した。分析条件は、検体血液 $50 \mu\text{L}$ 、緩衝液（上記D-ダイマー測定試薬に添付の試薬1；トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン $11.5 \text{mg}/\text{mL}$ 、アジ化ナトリウム $1 \text{mg}/\text{mL}$ 、 NaCl $23.5 \text{mg}/\text{mL}$ 、メチルパラオキシ安息香酸〔防腐剤〕 $0.95 \text{mg}/\text{mL}$ ） $100 \mu\text{L}$ 、上記D-ダイマー測定試薬用のSTA機器用希釈液 $50 \mu\text{L}$ 、ラテックス感作抗D-ダイマー抗体液（上記D-ダイマー測定試薬に添付の試薬2；抗ヒトD-ダイマーマウスモノクローナル抗体 $55 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、ラテックス $0.65 \text{mg}/\text{mL}$ 、ウシ血清アルブミン $3 \text{mg}/\text{mL}$ 、メチルパラオキシ安息香酸〔防腐剤〕 $0.95 \text{mg}/\text{mL}$ 、アジ化ナトリウム $1 \text{mg}/\text{mL}$ ） $150 \mu\text{L}$ を自動的に添加し、分析時間240秒、反応温度 37°C で測定した。

40

50

この測定試薬の検量線範囲はD-ダイマー濃度0.2~4.0 μg/mLであり、この濃度範囲を超える高値検体は再検査の対象とした。高値検体はSTA機器用希釈液で予め所定の希釈倍数で希釈し、再度STA装置に掛けて検体中のD-ダイマー濃度を測定した。D-ダイマーの測定値はオンラインでコンピューター処理及び管理された。

(2) 測定結果

測定結果は下記表1に示すとおりであり、急性大動脈解離を発症している患者におけるD-ダイマーの血液中濃度は、急性心筋梗塞患者に比べてはるかに高かった。両群間にはウェルチのt検定により統計学的に有意差が認められた。また、急性心筋梗塞群とスタンフォードA型群及び急性心筋梗塞群とスタンフォードB型群との比較においても統計学的に有意な差が認められた。

なお、スタンフォードA型群とB型群の間においても統計学的に有意な差が認められている。

表 1：急性大動脈解離患者及び急性心筋梗塞患者の血液中のD-ダイマー濃度

患者	症例数	D-ダイマー(μg/mL) (平均±標準偏差)
急性大動脈解離 (スタンフォードA型及びB型)	32	33.0 ± 59.8**
スタンフォードA型	18	48.3 ± 77.4*
スタンフォードB型	14	14.5 ± 15.2**
急性心筋梗塞	18	0.39 ± 0.39

* ; 急性心筋梗塞群との比較において5%水準で有意差あり

** ; 急性心筋梗塞群との比較において1%水準で有意差あり

実施例2；カットオフ値の設定 (急性心筋梗塞を鑑別の対照疾患とした場合)

胸痛(胸背部痛含む)を訴えて来院した患者のうち、急性大動脈解離と確定診断された症例(60例)及び、急性心筋梗塞と確定診断された症例(37例)から血液を採取し、実施例1と同様にして、D-ダイマー濃度を測定した。なお、これら症例からはインフォームドコンセントを得た。なお、本実施例の症例には、前記実施例1の症例が含まれる。

得られた測定値についてROC曲線分析を、ROC解析ソフト「MedCalc」(商品名、Med Calc Software社[ベルギー])を使用して行い、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別が可能なD-ダイマーのカットオフ値を算出した。算出された値は0.7 μg/mLであった。図1はそのときのROC曲線であり、また、図2は測定値の分布を表す。なお、カットオフ値0.7 μg/mLの診断感度(急性大動脈解離症例中の陽性症例の割合)は91.9%であり、一方、診断特異度(急性心筋梗塞症例中の陰性症例の割合)は90.0%という非常に精度の高いものであった。このように、血液中のD-ダイマー濃度の0.7 μg/mLは、急性大動脈解離、そしてそれとの類症鑑別が最も必要とされる急性心筋梗塞とを明確に鑑別できるカットオフ値であった。

また、図1に示すROC曲線の曲線下面積(AUC; area under curve)は0.968という1に非常に近い値であった。このことは血液中のD-ダイマー濃度が、急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別するのに有用なマーカーであることを意味する。

実施例3；実施例2で求めたカットオフ値の適用

実施例2で設定した急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別するためのカットオフ値 (

0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の診断精度を確かめるために、実施例1の症例である急性大動脈解離患者および急性心筋梗塞患者の陽性率 (カットオフ値以上を示した症例の割合) を求め、下記表2に示す。

表2 ; 急性大動脈解離患者及び急性心筋梗塞患者における陽性率

患者	症例数	陽性例数	陽性率 (%)
急性大動脈解離 (スタンフォードA型及びB型)	32	29	90.6
スタンフォードA型	18	17	94.4
スタンフォードB型	14	12	85.7
急性心筋梗塞	18	3	16.7

10

カットオフ値 ; 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$

上記表2に示すとおり、実施例1の症例においても、0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にカットオフ値を設定した場合に、急性大動脈解離患者において極めて高い陽性率 (すなわち、診断感度が90.6%) を示した。また、急性心筋梗塞患者18症例のうち、15症例はカットオフ値よりも低い値であり、診断特異度は83.3%に達している (100% - 16.7%)。このことは0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを明確に鑑別できるカットオフ値であることを意味する。

20

実施例4 ; 実施例1の症例におけるカットオフ値の設定

また、実施例1の症例について、実施例2に記載の方法と同様にして急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別可能なカットオフ値を求めた。算出されたカットオフ値は1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。このときのROC曲線の曲線下面積は0.960であり、また、このカットオフ値の診断感度は87.9%、診断特異度は100%であって極めて診断精度の高い値である。

実施例5 ; 急性大動脈解離 (スタンフォードA型及びスタンフォードB型) を発症している患者血液中のD-ダイマー濃度の測定 (急性心筋梗塞患者との比較)

30

胸痛 (胸背部痛含む) を訴えて来院した患者のうち、急性大動脈解離と確定診断された症例 (スタンフォードA型39例、スタンフォードB型27例の計66例) 及び、急性心筋梗塞と確定診断された症例 (62例) の来院時に採血された血液中のD-ダイマー濃度を以下のようにして測定し、その結果を得た。本実施例の患者には、前記実施例2の患者が含まれる。

なお、これらの患者からはインフォームドコンセントを取得した。

(1) D-ダイマー濃度の測定

ラテックス凝集法を測定原理とするD-ダイマー測定試薬「STAライアテストD-ダイマー」 (商品名、ロッシュダイアグノステイクス社製) を使用し、実施例1と同様に測定した。

40

(2) 測定結果

測定結果は下記表3に示すとおりである。

表 3 : 急性大動脈解離患者 (スタンフォード A 型及びスタンフォード B 型) 及び急性心筋梗塞患者血液中の D-ダイマー濃度

患 者	症例数	D-ダイマー濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (平均 \pm 標準偏差)
急性大動脈解離	66	33.0 \pm 56.7**
スタンフォード A 型	39	42.1 \pm 64.0**
スタンフォード B 型	27	19.9 \pm 41.7**
急性心筋梗塞	62	1.7 \pm 5.7

** ; 急性心筋梗塞群との比較において 1%水準で有意差あり

10

上記表 3 に示すように急性大動脈解離を発症している患者における D-ダイマーの血液中濃度は、健常人よりも血液中 D-ダイマー濃度が高いことが知られている急性心筋梗塞患者と比較しても、はるかに高かった。両群間にはマン・ホイットニーの U 検定により統計学的に有意差が認められた。

また、スタンフォード A 型急性大動脈解離患者とスタンフォード B 型急性大動脈解離患者との比較において、上記表 3 に示すように、スタンフォード A 型はスタンフォード B 型に比べて、D-ダイマー濃度が 2 倍以上高かった。

20

図 3 に各疾患患者の血液中 D-ダイマー濃度の測定値分布を示す。

実施例 6 ; カットオフ値による急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別

(1) 急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間でのカットオフ値の設定

実施例 5 において得られた測定値について、ROC 解析ソフト「Med Calc」(商品名、Med Calc Software 社 [ベルギー]) を使用して ROC 曲線分析を行い、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間で D-ダイマーのカットオフ値を設定した。ROC 曲線 (図 4) から算出された値は $1.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

図 4 に示す ROC 曲線の曲線下面積 (AUC ; area under curve) は 0.911 という 1 に非常に近い値であった。これは血液中の D-ダイマー濃度が、急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別するのに有用なマーカーであることを意味している。

30

(2) カットオフ値による急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別

上記 (1) において求めたカットオフ値を使用して、実施例 5 に記載の急性大動脈解離症例と急性心筋梗塞症例の鑑別を試みた。

その結果、カットオフ値を $1.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した場合の診断感度及び診断特異度は下記表 4 のとおりであった。

表 4 において、診断感度は全急性大動脈解離症例中の陽性症例の割合を表し、診断特異度は全急性心筋梗塞症例中の陰性症例の割合を表す。

表 4：前記カットオフ値による急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別

対象疾患	診断基準（血液中 D-ダイマー濃度）	診断感度	診断特異度
急性大動脈解離	陽性（ $1.3 \mu\text{g/mL}$ 以上）	84.8%	87.1%
急性心筋梗塞	陰性（ $1.3 \mu\text{g/mL}$ 未満）	(56/66)	(54/62)

10

上記表 4 に示すように、前記（1）で設定したカットオフ値を使用して、実施例 5 の急性大動脈解離症例と急性心筋梗塞症例を鑑別すれば、診断感度が 84.8%、診断特異度が 87.1% と極めて高い値となった。

この結果は、血液中の D-ダイマー濃度 $1.3 \mu\text{g/mL}$ が、急性大動脈解離と急性心筋梗塞を精度良く鑑別できるカットオフ値であることを意味している。

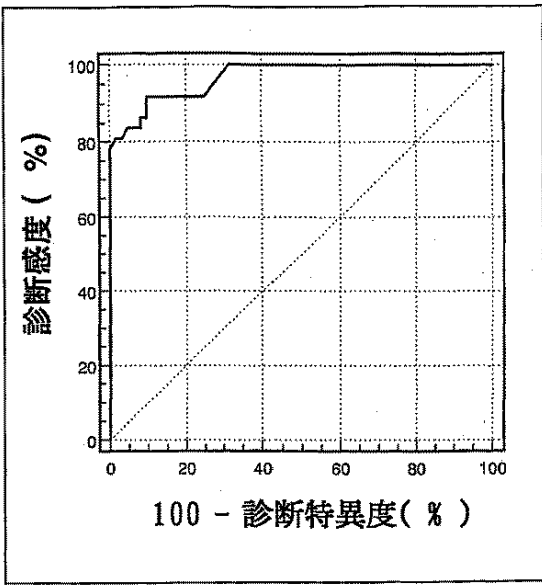
【産業上の利用可能性】

本発明の判定方法及び判定用試薬を使用することにより、急性心筋梗塞等の臨床症状が類似する疾患の中から急性大動脈解離の判定を行うことができ、さらに、発症している急性大動脈解離がスタンフォード A 型であるのか、または、スタンフォード B 型であるのかを判断することができる。医師はこの判定結果などに基づいて、各疾患に応じた適切な治療を施すことができる。

本出願は、日本で出願された特願 2003-165456（出願日：2003 年 6 月 10 日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

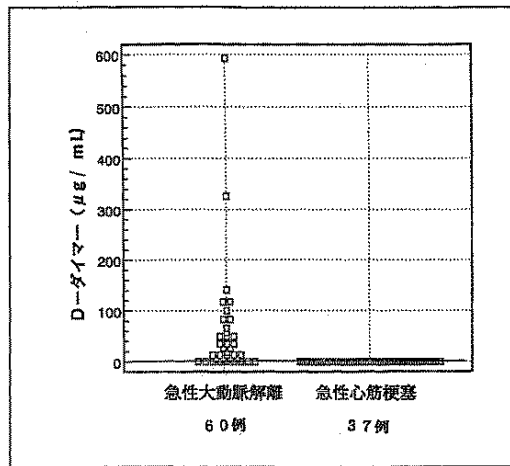
【図 1】

図 1



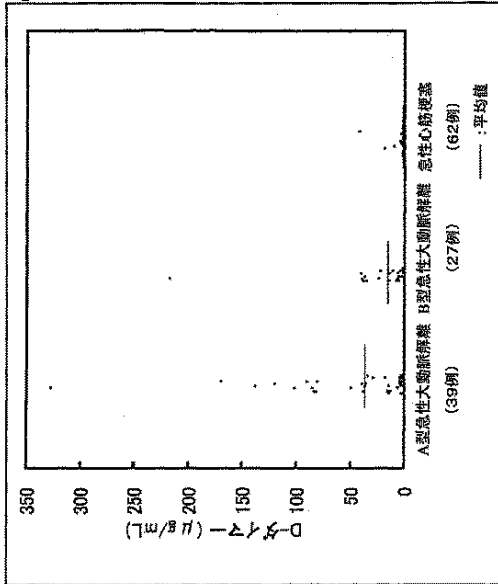
【図 2】

図 2



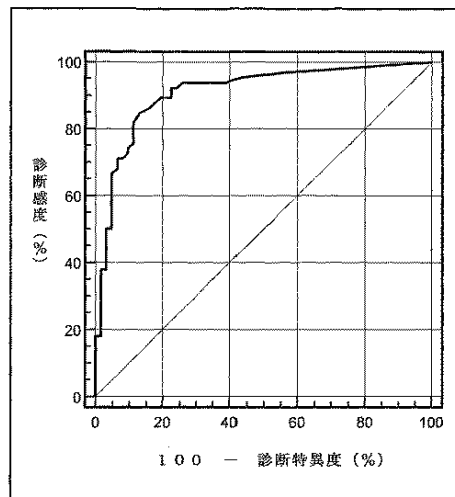
【図 3】

図 3



【図 4】

図 4



【手続補正書】**【提出日】**平成17年4月8日(2005.4.8)**【手続補正001】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**請求項1**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項1】 ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度が、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間において予め設定された血液中のD-ダイマーのカットオフ値以上の場合に、急性大動脈解離を発症している可能性があるとして判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【手続補正002】**【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**請求項12**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項12】 D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離の発症判定用試薬であって、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間におけるカットオフ値が予め設定されていることを特徴とする試薬。

【手続補正003】**【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**請求項13**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項13】 D-ダイマーを認識する抗体を含有するスタンフォードA型急性大動脈解離の判定用試薬。

【手続補正004】**【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**請求項14**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項14】 D-ダイマーを認識する抗体を含有するスタンフォードB型急性大動脈解離の判定用試薬。

【手続補正005】**【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**請求項24**【補正方法】**変更**【補正の内容】**

【請求項24】 請求の範囲12に記載の急性大動脈解離の発症判定用試薬の製造のための、D-ダイマーを認識する抗体の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2004/008471
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST (JOIS), CA (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ A	WEBER T. et al., "D-dimer in Acute Aortic Dissection", CHEST, Vol.123, No.5, (MAY 2003), pages 1375 to 1378	1, 8, 9, 12, 16, 24/ 2-7, 10, 11, 13-15, 17-21, 25
A	NAKAJIMA T. et al., "Coagulopathy associated with residual dissection after surgical treatment of type A aortic dissection", J. Vascular Surgery Vol.26, No.4, (1997), pages 609 to 615	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 August, 2004 (09.08.04)		Date of mailing of the international search report 24 August, 2004 (24.08.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008471

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 22 and 23

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention claimed in claims 22 and 23 is directed to methods of commercial pursuits and advertisement, thus directed to methods of business activity. Therefore, claims 22 and 23 relate to (Continued to extra sheet.)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008471

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

subject matter which this International Searching Authority is not required to search under the provisions of PCT Rule 39.1(iii).

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/008471	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ G01N33/53			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2004年 日本国登録実用新案公報 1994-2004年 日本国実用新案登録公報 1996-2004年			
国際調査でを使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICST(JOIS), CA(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/A	WEBER T et al. "D-dimer in Acute Aortic Dissection" CHEST Vol. 123, No. 5(MAY 2003) p. 1375-1378	1, 8, 9, 12, 16, 24/2-7, 10, 11, 13-15, 17-21, 25	
A	NAKAJIMA T et al. "Coagulopathy associated with residual dissection after surgical treatment of type A aortic dissection" J. Vascular Surgery Vol. 26, No. 4(1997) p. 609-615	1-25	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 09. 08. 2004		国際調査報告の発送日 24. 8. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子	2 J 9 2 1 7
		電話番号 03-3581-1101 内線 3251	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/008471

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT I 7条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 22,23 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲22, 23に記載された発明は、商業方法及び広告方法の発明であり、したがって事業活動の方法にあたる。請求の範囲22, 23は、PCT規則39.1(iii)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2004年1月)

フロントページの続き

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

(72)発明者 大軽 靖彦

大阪府吹田市江の木町3 3番9 4号 大日本住友製薬株式会社内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】 第6部門第1区分
【発行日】 平成19年7月26日(2007.7.26)

【国際公開番号】 WO2004/111645
【年通号数】 公開・登録公報2006-028
【出願番号】 特願2005-506988(P2005-506988)
【国際特許分類】
G 0 1 N 33/53 (2006.01)
【F I】
G 0 1 N 33/53 D

【手続補正書】
【提出日】 平成19年6月8日(2007.6.8)
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許請求の範囲
【補正対象項目名】 全文
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項1】

ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度が、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間において予め設定された血液中のD-ダイマーのカットオフ値以上の場合に、急性大動脈解離を発症している可能性があることを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項2】

ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項3】

ヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードB型急性大動脈解離を発症しているか否かを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項4】

急性大動脈解離を発症しているヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、発症している急性大動脈解離がスタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動脈解離のいずれの疾患であるのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項5】

胸痛発作を起こしたヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、急性大動脈解離と急性心筋梗塞のいずれの疾患を発症しているのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法。

【請求項6】

測定された血液中のD-ダイマー濃度と、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間において予め設定された血液中のD-ダイマーのカットオフ値とを比較して、前記濃度が前記カットオフ値以上の場合には急性大動脈解離を発症していると判断し、前記カットオフ値未満の場合には急性心筋梗塞を発症していると判断する請求の範囲5に記載の鑑別方法。

【請求項7】

胸痛発作を起こしたヒトから分離された血液中のD-ダイマー濃度を測定し、測定された該濃度に基づいて、スタンフォードA型急性大動脈解離とスタンフォードB型急性大動

脈解離と急性心筋梗塞の中のいずれの疾患を発症しているのかを判断することを特徴とする急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法。

【請求項 8】

血液中のD-ダイマー濃度の測定を免疫化学的方法により行う請求の範囲 1～4 のいずれかに記載の急性大動脈解離の判定方法。

【請求項 9】

免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である請求の範囲 8 に記載の判定方法。

【請求項 10】

血液中のD-ダイマー濃度の測定を免疫化学的方法により行う請求の範囲 5～7 のいずれかに記載の急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別方法。

【請求項 11】

免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である請求の範囲 10 に記載の鑑別方法。

【請求項 12】

D-ダイマーを認識する抗体を含有する試薬及び該試薬に関する記載物を含む商業パッケージであって、該記載物および/または該パッケージに、該試薬は急性大動脈解離の判定の用途に使用できる、又は使用すべきであることが記載されており、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との間におけるカットオフ値が予め設定されていることを特徴とする商業パッケージ。

【請求項 13】

D-ダイマーを認識する抗体を含有する試薬及び該試薬に関する記載物を含む商業パッケージであって、該記載物および/または該パッケージに、該試薬は急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別の用途に使用できる、又は使用すべきであることが記載されている商業パッケージ。

专利名称(译)	确定急性主动脉夹层的方法和用于测定的试剂		
公开(公告)号	JPWO2004111645A1	公开(公告)日	2006-07-20
申请号	JP2005506988	申请日	2004-06-10
申请(专利权)人(译)	大日本住友制药有限公司		
[标]发明人	笹井寛 西本昌義 竹下仁 大軽靖彦		
发明人	笹井 寛 西本 昌義 竹下 仁 大軽 靖彦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/329		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	2003165456 2003-06-10 JP		
其他公开文献	JPWO2004111645A5 JP4580869B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

评估急性主动脉夹层的方法，其包括测量从人分离的血液中的D-二聚体浓度，并且基于测量的浓度确定急性主动脉夹层（斯坦福A型或斯坦福B型）是否已经发展，用于评估执行评估方法的试剂等。

患者	症例数	D-ダイマー(μg/mL) (平均±標準偏差)
急性大動脈解離 (スタンフォードA型及びB型)	32	33.0±59.8**
スタンフォードA型	18	48.3±77.4*
スタンフォードB型	14	14.5±15.2**
急性心筋梗塞	18	0.39±0.39