

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-534464  
(P2019-534464A)

(43) 公表日 令和1年11月28日(2019.11.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
CO 7 K 14/605 (2006.01)	CO 7 K 14/605	
CO 7 K 16/26 (2006.01)	CO 7 K 16/26	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2019-536681 (P2019-536681)  
 (86) (22) 出願日 平成29年9月19日 (2017. 9. 19)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月20日 (2019. 5. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/073584  
 (87) 国際公開番号 WO2018/054881  
 (87) 国際公開日 平成30年3月29日 (2018. 3. 29)  
 (31) 優先権主張番号 16306199.7  
 (32) 優先日 平成28年9月20日 (2016. 9. 20)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2017/057292  
 (32) 優先日 平成29年3月28日 (2017. 3. 28)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 517347805  
 ユニヴェルシテ ドゥ ブルゴーニュ  
 UNIVERSITE DE BOURG  
 OGNE  
 フランス共和国, 21078 ディジョン  
 , エスプラナード エラスム, メゾン ド  
 ウ リュニヴェルシテ

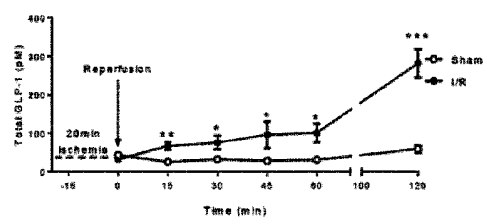
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腸管虚血を初期で診断するためのインピトロ方法

(57) 【要約】

本発明は、腸管虚血を患っている疑いがある患者の腸管虚血を初期で診断するためのインピトロ診断方法に関する。

Figure 2A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腸管虚血を患っている疑いがある患者の腸管虚血を初期段階で診断するためのインビトロ診断方法であって、

( i ) 前記患者からの生物学的試料において循環グルカゴン様ペプチド 2 ( G L P - 2 ) レベルおよび / または循環グルカゴン様ペプチド 1 ( G L P - 1 ) レベルを決定することと、

( i i ) 前記レベルを参照試料中の循環グルカゴン様ペプチド 2 レベルおよび / または循環グルカゴン様ペプチド 1 レベルと比較することと

を含み、

前記患者の前記レベルの増加は、前記患者が腸管虚血を患っていることを示す、方法。

10

## 【請求項 2】

前記腸管虚血が腸間膜虚血 - 再灌流、特に急性腸間膜虚血、慢性腸間膜虚血、または虚血性大腸炎、または腸バリアに関連する疾患もしくはトラブルである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記生物学的試料が血漿試料である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記循環グルカゴン様ペプチド 2 または循環グルカゴン様ペプチド 1 のレベルが免疫測定法によって決定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記免疫測定法が E L I S A である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記参照試料が健康な対象からの生物学的試料である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

腸管虚血を患っている疑いがある患者の腸管虚血を初期段階にインビトロで診断するための、循環グルカゴン様ペプチド 2 または循環グルカゴン様ペプチド 1 のレベルを検出することができる試薬の使用。

## 【請求項 8】

前記試薬がグルカゴン様ペプチド 2 またはグルカゴン様ペプチド 1 に対する抗体である、請求項 7 に記載の使用。

30

## 【請求項 9】

腸管虚血を患っている疑いがある患者の腸管虚血を初期段階にインビトロで診断するための、グルカゴン様ペプチド 2 またはグルカゴン様ペプチド 1 に対する抗体を含む E L I S A キットの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、腸管虚血の初期で診断するためのインビトロ方法に関する。

40

## 【0002】

急性腸間膜虚血 ( A M I ) は、いくつかの疾患、外傷、ショック、外科手術または臓器移植の結果としての、腸間膜血管を通る血流の突然の減少によって引き起こされる深刻な医学的緊急事態である。腸間膜虚血は、細胞機能障害および腸管壁の最終的な壊疽につながる。A M I は動脈性または静脈性のいずれかに分類され得る。動脈性 A M I はまた、非閉塞性腸間膜虚血 ( N O M I ) または閉塞性腸間膜動脈虚血 ( O M A I ) として分類され得る。大部分はアテローム性動脈硬化との関連のために、A M I は一般に高齢集団の疾患と考えられており、典型的な発症年齢は 60 歳より上である ( C a r d i n ら、A g i n g C l i n E x p R e s . 2 0 1 2 年 6 月 2 4 日 ( 3 補遺 ) : 4 3 ~ 4 6 ) 。

50

## 【0003】

腸間膜虚血自体が生物にとって有害であるならば、再灌流にあるその治療はなおいっそう悪くなり得るだろう。腸は虚血 - 再灌流に最も敏感な器官の1つである (Yamamotoら、J. Surg. Res.、2001、99:134~141)。腸管粘膜は、低灌流 (酸素欠乏) によって急速に影響を受け得る。しかしながら、逆説的に、虚血性損傷を受けた腸組織の虚血後の血流の回復 (再灌流) は、壊死を促進または加速するフリーラジカルの生成を刺激する酸素を突然再導入するので、組織損傷を減少させるよりもさらに組織損傷を悪化させ得る (Guanら、Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009、297:G187~G196)。虚血、その後の再灌流 (IR) は、炎症メディエーターの産生を急速に誘因し得る。この局所炎症は全身レベルで急速に一般化され得る。炎症促進性細菌エンドトキシンが腸管バリアを通過すると、全身性炎症反応症候群 (SIRS) 状態および他の器官の機能障害がもたらされ得る。さらに、腸管虚血 - 再灌流は多臓器不全 (MOF) 状態の原動力考えられている (Harwardら、J. Vasc. Surg. 1993、18:459~469)。

10

## 【0004】

最近の医学的進歩にもかかわらず、この病態の高い死亡率は1940年代以来変わっていない:それは前記疾患を患っている患者の約60%~80%に関係している (Schootsら、Br. J. Surg. 2004年1月91(1):17~27)。いったん腸管壁梗塞が起こると、死亡率は90%にもなり得る。残念なことに、たとえ良い治療をしたとしても、患者の50~80%が依然として死亡している。

20

## 【0005】

この高い死亡率は、一部は、AMIを初期で診断するのが困難なためである。腹膜炎の警告サインが現れる前は、AMIの症状は最初是非特異的である。これまで、AMIを初期で診断することを可能にする効率的な生物学的マーカーはない。従来臨床的に使用されているマーカーは、血清乳酸レベルおよび白血球数である。これらのマーカーは満足のいく特異性も感度も有さず、AMIを初期で診断することはできない。他の既存の診断試験は血管造影または断面デンシトメトリーである。これらは侵襲的であり、腎臓レベルにおけるものなどの医学的合併症を生じ得るので多くの欠点を示す (Glenister et Corker、ANSZ J. Surg. 2004、74:260~265)。

30

## 【0006】

ここ数年で、全身レベルになる前に胃腸損傷を予測することができるバイオマーカーを探すために、大きな臨床的および前臨床的努力がなされてきた。D-乳酸 (Demirら、Dig. Surg.、2012、29:226~235)、腸脂肪酸結合タンパク質「I-FABP」(Cronkら、Curr. Surg. 2006、63:322~325)、 $\alpha$ -グルタチオンS-トランスフェラーゼ (Khuranaら、2002、J. Pediatr. Surg.、2002、37:1543~1548)、アルブミン (Dundarら、Acad. Emerg. Med. 2010、17:1233~1238) およびD-ダイマー (Chiura、Am. J. Emerg. Med. 2009、27:975~979) がAMI診断のための潜在的なバイオマーカーとして研究されている。マウスにおける血漿I-FABPの濃度は、2時間の再灌流が続く虚血の30分後で上昇し、病理学的証拠の出現前に腸管虚血を予測することを可能にするので、I-FABPは特に有望である (Khadarooら、PloS One、2014、9:e115242)。

40

## 【0007】

これらの有望な結果にもかかわらず、I-FABPは虚血の30分後にしか虚血を検出することができない。そのため、AMIをより迅速に、かつより初期に診断する能力を有する新しいバイオマーカーを開発することが依然として必要である。

## 【0008】

本発明者らは、驚くべきことに、腸管虚血/再灌流のマウスモデルにおいて、マウスが

50

腸管虚血を患っている場合、前記マウスの血漿レベルにおける循環グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) およびグルカゴン様ペプチド 2 (GLP-2) の増加を、わずか 10 ~ 15 分間の虚血、その後の 15 分間の再灌流の後に観察することができることを見出した。換言すれば、GLP-1 および GLP-2 は、マウスの腸管虚血のごく初期で予測的である。

【0009】

これらの実験結果は、GLP-1 および GLP-2 が、ヒトまたは他の非ヒト哺乳動物、特に腸管虚血を患っている疑いがある患者における腸管虚血のごく初期でも予測的であり得ることを示唆している。

【0010】

グルカゴン様ペプチド 1 およびグルカゴン様ペプチド 2 は共に腸内分泌 L 細胞におけるプログルカゴンの特異的翻訳後タンパク質切断によって生成される。GLP-1 および GLP-2 は栄養素摂取時に共分泌 (co-secreted) される。

【0011】

ヒト循環 GLP-1 タンパク質は遠位小腸および結腸に主に局在する腸 L 細胞によって主に分泌される。血漿中に存在する GLP-1 型は、GLP-1-(7-37)、GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub> およびそれらの分解型、例えば GLP-1-(9-36)、GLP-1-(28-36) であり得る。

【0012】

ヒト循環 GLP-2 タンパク質は 33 アミノ酸ペプチドである。血漿中には、生物活性型 GLP-2-(1-33) およびその分解産物 GLP-2-(3-33) が存在する。

【0013】

したがって、本発明の第 1 の態様は、腸管虚血を患っている疑いがある患者の腸管虚血を初期で診断するためのインビトロ診断方法であって、

(i) 前記患者からの生物学的試料において循環グルカゴン様ペプチド 2 (GLP-2) レベルおよび / または循環グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) レベルのレベルを決定することと、

(ii) 前記レベルを参照試料中の循環グルカゴン様ペプチド 2 レベルおよび / または循環グルカゴン様ペプチド 1 レベルと比較することと

を含み、

患者の前記レベルの増加は、前記患者が腸管虚血を患っていることを示す、方法に関する。

【0014】

「腸管虚血を患っている疑いがある患者」とは、腸管虚血の原因として一般に知られている疾患の 1 つを患っている、または素因になる状態を有する患者、例えば心臓塞栓、近位大動脈血栓の断片からの塞栓、動脈カテーテルもしくは外科手術により移動されたアテローム性プラーク、アテローム性血管病、大動脈瘤、大動脈解離、動脈炎、心筋梗塞もしくはうっ血性心不全からの心拍出量の減少、任意の原因による脱水、うっ血性心不全からの低血圧、心筋梗塞、敗血症、大動脈弁閉鎖不全、重度の肝臓もしくは腎臓疾患、または最近の大きな心臓もしくは腹部外科手術を患っている患者、または昇圧薬、エルゴタミン、コカインもしくはジギタリスを消費している患者、またはプロテイン C および S 欠乏症からの凝固亢進、アンチトロンビン III 欠乏症、異常フィブリノーゲン血症、異常なプラスミノーゲン、真性多血症、血小板増加症、鎌状赤血球症、第 V 因子ライデン変異、妊娠および経口避妊薬の使用、静脈圧迫もしくは凝固亢進を引き起こす腫瘍、腹腔内感染症、例えば虫垂炎、憩室炎もしくは膿瘍、肝硬変による静脈うっ血、事故もしくは外科手術、特に門脈大静脈外科手術による静脈外傷、腹腔鏡手術中の気腹からの腹腔内圧の上昇、膵炎、減圧症を有する患者を指す。

【0015】

「初期」という用語は、10 分間の虚血、その後の 15 分間の再灌流という短い期間を指す。

10

20

30

40

50

## 【0016】

「生物学的試料」という用語は、患者から得ることができる任意の生物学的試料、特に尿または血液などの体液の試料を指す。本発明の好ましい実施形態では、生物学的試料が血漿試料である。

## 【0017】

本発明のインビトロ方法に使用される参照試料は、健康な対象から得られた生物学的試料である。

## 【0018】

「循環グルカゴン様ペプチド1」という用語は、GLP-1-(7-37)、GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub>およびGLP-1-(9-36)の形態でヒト血漿中に存在するGLP-1を指す。

10

## 【0019】

「循環グルカゴン様ペプチド2」という用語は、GLP-2-(1-33)およびGLP-2-(3-33)の形態でヒト血漿中に存在するGLP-2を指す。

## 【0020】

患者からの生物学的試料において測定されるのがGLP-1のレベルである場合、比較のステップは、前記測定されたGLP-1と参照試料におけるGLP-1のレベルとの間で行われる。

## 【0021】

患者からの生物学的試料において測定されるのがGLP-2のレベルである場合、比較のステップは、前記測定されたGLP-2と参照試料におけるGLP-2のレベルとの間で行われる。

20

## 【0022】

GLP-1とGLP-2の両方のレベルが患者からの生物学的試料において測定される場合、比較のステップは、前記測定されたGLP-1レベルおよびGLP-2レベルと参照試料におけるGLP-1レベルおよびGLP-2レベルとの間で行われる。

## 【0023】

一実施形態では、本発明の方法が、  
(i) 前記患者からの生物学的試料において循環グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) レベルのレベルを決定することと、  
(ii) 前記レベルを参照試料中の循環グルカゴン様ペプチド1レベルと比較すること

30

とを含み、

患者の前記レベルの増加は、前記患者が腸管虚血を患っていることを示す。

## 【0024】

本発明によると、腸管虚血を患っている疑いがある患者の生物学的試料中のGLP-1レベルが、参照試料で同時に測定されたGLP-1レベルよりも、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%または300%高い場合、前記患者においてGLP-1レベルの増加があり、前記患者が腸管虚血を患っている可能性が非常に高いと考えられる。

40

## 【0025】

別の実施形態では、本発明の方法が、  
(i) 前記患者からの生物学的試料において循環グルカゴン様ペプチド2 (GLP-2) レベルのレベルを決定することと、  
(ii) 前記レベルを参照試料中の循環グルカゴン様ペプチド2レベルと比較すること

とを含み、

患者の前記レベルの増加は、前記患者が腸管虚血を患っていることを示す。

## 【0026】

腸管虚血を患っている疑いがある患者の生物学的試料中のGLP-2レベルが、参照試

50

料で同時に測定された G L P - 2 レベルよりも、少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、2 5 0 % または 3 0 0 % 高い場合、前記患者において G L P - 2 レベルの増加があり、前記患者が腸管虚血を患っている可能性が非常に高いと考えられる。

【 0 0 2 7 】

「腸管虚血」は、胃腸管内の血流が不十分である場合に生じる種々の障害を指し、それは小腸（腸間膜虚血）または結腸（虚血性大腸炎）に影響を及ぼし得る。本発明の方法は、腸間膜虚血 - 再灌流、特に急性腸間膜虚血もしくは慢性腸間膜虚血、虚血性大腸炎、または腸バリアに関連する疾患もしくはトラブルのインビトロ診断に使用することができる。好ましい実施形態では、本発明の方法は急性腸間膜虚血をインビトロ診断するためのものである。

10

【 0 0 2 8 】

本発明の方法によると、循環グルカゴン様ペプチド 1 またはグルカゴン様ペプチド 2 のレベルは、免疫測定法の平均値によって決定される。

【 0 0 2 9 】

免疫測定法は、E L I S A（酵素結合免疫吸着測定法）、ウエスタンブロット、R I A（放射免疫測定法）、競合的 E I A（競合的酵素免疫測定法）、免疫細胞化学および免疫組織化学技術などの当業者に知られている様々な免疫学的技術として理解される。

【 0 0 3 0 】

一実施形態では、本発明は、患者の腸管虚血を初期で診断および治療するためのインビトロ診断方法であって、

20

（ i ）前記患者からの生物学的試料において循環グルカゴン様ペプチド 1（ G L P - 1 ）レベルを決定することと、

（ i i ）前記レベルを参照試料中の循環グルカゴン様ペプチド 1 レベルと比較することと、

（ i i i ）前記患者の G L P - 1 のレベルが参照試料で同時に測定された G L P - 1 レベルよりも、少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、2 5 0 % または 3 0 0 % 高く増加している場合、腸管虚血の治療を施すことと

を含む方法に関する。

30

【 0 0 3 1 】

本発明の別の実施形態は、患者の腸管虚血を初期で診断および治療するためのインビトロ診断方法であって、

（ i ）前記患者からの生物学的試料において循環グルカゴン様ペプチド 2 レベルを決定することと、

（ i i ）前記レベルを参照試料中の循環グルカゴン様ペプチド 2 レベルと比較することと、

（ i i i ）前記患者の G L P - 2 のレベルが参照試料で同時に測定された G L P - 2 レベルよりも、少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、2 5 0 % または 3 0 0 % 高く増加している場合、腸管虚血の治療を施すことと

40

を含む方法に関する。

【 0 0 3 2 】

前記腸管虚血治療は、先行技術において知られており、病院で施される任意の治療方法であり得る。

【 0 0 3 3 】

特定の実施形態では、免疫測定法が E L I S A 試験であり、G L P - 1 に対する特異性を有する少なくとも 1 つの抗体または G L P - 2 に対する特異性を有する抗体を使用する。前記抗体は、G L P - 1 または G L P - 2 に対する市販のモノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。

50

## 【0034】

E L I S A 試験は、市販の G L P - 1 E L I S A 試験または市販の G L P - 2 E L I S A 試験によって行うことができる。

## 【0035】

前記 E L I S A アッセイは、直接 E L I S A、間接 E L I S A、サンドイッチ E L I S A または競合 E L I S A であり得る。

## 【0036】

直接 E L I S A 試験では、G L P - 1 または G L P - 2 の存在が酵素と結合した特異的抗体によって直接示される；一方、間接 E L I S A 試験では、G L P - 1 または G L P - 2 が、G L P - 1 または G L P - 2 タンパク質に特異的な第 1 の抗体によって認識され、前記第 1 の抗体が酵素と結合した第 2 の抗体によって認識される。

10

## 【0037】

サンドイッチ E L I S A は、2 層の抗体（すなわち捕捉抗体および検出抗体）間の G L P - 1 または G L P - 2 タンパク質を定量する。サンドイッチ E L I S A システムにおける捕捉抗体および検出抗体としては、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを使用することができる。

## 【0038】

本発明の別の態様は、腸管虚血を患っている疑いがある患者の腸管虚血を初期にインビトロで診断するための、循環グルカゴン様ペプチド 1 または循環グルカゴン様ペプチド 2 のレベルを検出することができる試薬の使用に関する。

20

## 【0039】

好ましい実施形態では、前記試薬がグルカゴン様ペプチド 1 またはグルカゴン様ペプチド 2 に対する抗体である。前記抗体は、先行技術で公知の任意の従来または市販のモノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。

## 【0040】

特に、本発明は、腸管虚血を患っている疑いがある患者の腸管虚血を初期にインビトロで診断するための、グルカゴン様ペプチド 1 またはグルカゴン様ペプチド 2 に対する抗体を含む E L I S A キットの使用に関する。

## 【0041】

E L I S A 試験は、市販の G L P - 1 E L I S A 試験または G L P - 2 E L I S A 試験によって行うことができる。

30

## 【0042】

本発明を、以下の図面および実施例によってより詳細に説明する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0043】

【図 1】急性腸間膜虚血および再灌流後の腸の損傷を示す図である。偽処置（図 1 A）、20 分間の虚血、その後の 15 分間の再灌流（図 1 B）および 40 分間の虚血、その後の 15 分間の再灌流（図 1 C）後の回腸組織切片のヘマトキシリン / エオシン染色。

【図 2】腸管虚血 / 再灌流が G L P - 1 の迅速な分泌を誘導することを示す図である。上腸間膜動脈の虚血 - 再灌流（I / R）を 6 匹のマウスの群に適用する。偽手術マウスを対照として使用した。独立 t 検定を用いて統計分析を行い、偽との差（\*）を表示する：\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  および \*\*\*  $p < 0.001$ 。値は平均  $\pm$  S E M である。図 2 A：20 分間の虚血、その後の 15、30、45、60 および 120 分間の再灌流後の総 G L P - 1 血漿レベル（pM；n = 5）。図 2 B：5、10 および 15 分間の虚血、その後の 15 分間の再灌流後の総 G L P - 1 血漿レベル（偽の %；n = 5）。

40

【図 3】短時間および長時間の I / R 後の総 G L P - 1 および I - F A B P 血漿レベル（偽の %、n = 6）（それぞれ 20 分間の虚血、その後の 15 分間または 2 時間の再灌流）を示す図である。

【図 4】偽群および I / R 群のマウスにおける I / R（20 分間 / 30 分間）の処置後の炎症マーカーの分泌の比較を示す図である。

50

【図5】45分間の虚血および0、30または120分間の再灌流の前後における患者の総GLP-1動静脈差を示す(n=6)図である。全ての結果を平均±SEMとして表す。

【図6】腸管虚血/再灌流が総GLP-2の迅速な分泌を誘導することを示す図である。上腸間膜動脈の虚血-再灌流(I/R)を6匹のマウスの群に適用する。偽手術マウスを対照として使用した。独立t検定を用いて統計分析を行い、偽との差(\*)を表示する：  
\* p < 0.05、\*\* p < 0.01および\*\*\* p < 0.001。値は平均±SEMである。図6A：5、10および15分間の虚血、その後の15分間の再灌流後の総GLP-2血漿レベル(ng/mL; n=5)。図6B：20分間の虚血、その後の15、60および180分間の再灌流後の総GLP-2血漿レベル(ng/mL; n=5)。

10

#### 【実施例】

#### 【0044】

##### 1. 材料および方法

##### 動物

均質なC57BL/6JバックグラウンドからのWTマウス(8~12週齢、Charles River)を制御された環境に収容し、標準的な固形飼料(A03飼料; Safe, Augy, フランス)を与えた。動物は水と食料に自由にアクセスできた。動物を含む全ての実験は、施設のガイドラインに従って行われ、ブルゴーニュ大学の実験動物の使用に関する倫理委員会によって承認された(プロトコル番号5459)。

20

#### 【0045】

##### 腸管虚血/再灌流の動物モデル

マウスを偽手術群と虚血/再灌流(I/R)群(n=5/6)に分けた。これらをイソフルラン吸入で麻酔し、加熱パッド上に仰臥位に置いて体温を37℃に維持した。正中開腹を行い、上腸間膜動脈(SMA)を分離した。5、10、15または20分間SMAをクランプすることによって虚血を誘発し、15、30、45、60または120分間の再灌流(クランプの除去)を続けた。腸虚血を腸の色、変化によって確認し、腸再灌流を脈動および色の再出現によって確認した。採血を行ってGLP-1、GLP-2およびサイトカインを定量化した。血液試料を、全身(後眼窩または心臓内穿刺)循環からEDTA被覆管(BD Vacutainer(登録商標))に回収した。4℃で10分間、8000rpmで遠心分離することによって血漿を分離した。さらなる分析のために、血液および血漿試料を-20℃で凍結した。マウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、小腸の遠位部(回腸)を取り出し、組織学的試験のために直ちに固定した。

30

#### 【0046】

偽手術群マウスに対する外科手術は、上腸間膜動脈をクランプしなかったことを除いて同じであった。

#### 【0047】

##### ヒト腸管虚血/再灌流

実験プロトコルは以前に記載されているようにして行った(Grootjansら、2010)。この試験はマーストリヒト大学医療センターの医療倫理委員会によって承認され、全患者の書面によるインフォームドコンセントを得た。良性または悪性疾患のために膵頭十二指腸切除術を受けている66歳の中央年齢(範囲、54~83歳)の6人の患者をこの試験に含めた。胆管閉塞性疾患の患者は外科手術前にステント留置した。全ての患者は、外科手技時には正常な胆汁流を有していた。膵頭十二指腸切除術の間、空腸の可変部分を、外科手技の一部として膵頭および十二指腸と連続で日常的に切除する。この空腸セグメントの末端6cmを分離し、2つの非侵襲的血管鉗子を腸間膜上に配置することによって45分間の虚血に供した。その間に、外科手術は計画通りに進行した。45分間の虚血後、分離した虚血性空腸の3分の1(2cm)を線形切断ステープラーを用いて切除した。次に、クランプを外して、正常なピンク色の回復および腸の運動性の回復によって確認される再灌流を可能にした。分離した空腸の別のセグメント(2cm)を30分間の再灌流後に同様に切除した。最後の部分は120分間の再灌流後に切除した。同時に、外

40

50

科手術中に未処置のままであった空腸2 cmを切除し、内部対照組織として役立てた。このセグメントは、空腸の分離した部分と同様の外科的取り扱いを受けたが、I/Rには供さなかった。虚血前、再灌流直後、ならびに再灌流開始30分後および120分後に動脈血を採取した。各それぞれの動脈血試料と同時に、直接穿刺によって分離した空腸セグメントに流れ込む細静脈から血液を採取し、分離した空腸セグメントにわたる濃度勾配を評価した。全ての血液試料を予め冷却したEDTA真空管(Becton Dickinson Diagnostics, Aalst, Belgium)に直接移し、氷上に保った。手順の最後に、全ての血液試料を4000rpm、4で15分間遠心分離して血漿を得た。分析まで血漿をアリコートに分けて-80で直ちに保存した。

#### 【0048】

##### 光学顕微鏡法

腸内の形態学的変化を光学顕微鏡で調べた( $\times 50$ 、 $\times 100$ および $\times 200$ )。手短に言えば、遠位小腸(回腸)からの組織を、20分間または40分間の虚血および15分間の再灌流後、直ちに偽手術およびI/R群に入れた。腸試料を室温で10%中性緩衝ホルマリン中で48時間固定し、等級エタノールで脱水し、組織学的分析のためにパラフィン中に包埋した。組織切片(厚さ5  $\mu\text{m}$ )をキシレンで脱パラフィンし、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。

#### 【0049】

##### 生化学分析

総GLP-1、GLP-2およびI-FABP濃度を、製造業者のプロトコルに従って市販のELISAキット(Millipore, St. Charles, MOおよびCliniscience)によって決定した。

#### 【0050】

サイトカイン血漿濃度(インターロイキン(IL)-1、IL-6および腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ ))を、製造業者のプロトコルに従ってマウスサイトカイン/ケモカイン磁気ビーズパネル(Millipore, Billerica, MA)を用いて、およびLuminex(登録商標)装置(Bio-Plex 200、Bio-Rad)を用いて、Milliplex MAP 5-Plexキットによって測定した。

#### 【0051】

##### 統計分析

数値データを平均 $\pm$ 平均の標準誤差として提示する。統計分析を、データ分布の正規性に応じて、独立スチューデントt検定またはノンパラメトリックマン・ホイットニーU検定を使用して行った。ダゴステーノのK二乗検定を使用して、データ群が正規分布であるかどうかを立証した。分散が群間で異なる場合、統計補正を適用した。 $P < 0.05$ の値を統計学的に有意とみなした。

#### 【0052】

##### 2. 結果

##### 2.1. 腸バリア損傷後のマウスにおける迅速なGLP-1分泌

腸間膜虚血-再灌流(I/R)を一群のマウスで生成した。一群の偽手術マウスを対照として使用した。腸の超微細構造は、I/R後に深く破壊された(図1A、図1B、図1C)。短時間のI/Rは、偽手術マウスと比較して腸絨毛を損傷するのに十分であった(図1Aおよび図1B)。I/Rの時間が長くなると、損傷の増加が観察された(図1C)。I/R実験は、GLP-1血漿レベルの急速な増加をもたらした(図2Aおよび図2B)。図2Aに示されるように、20分間の虚血後の2時間の腸間膜動脈の再灌流は、GLP-1血漿レベルの上昇をもたらした。さらに注目すべきことに、この増加はわずか15分間の再灌流後に有意であった。より短時間の虚血(<20分)も依然としてGLP-1分泌を誘導することができた(図2B)。

#### 【0053】

腸間膜虚血-再灌流後、GLP-1分泌がI-FABP分泌(図3)および炎症のマーカー、例えばIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ (図4)に先行することが明らかにされ

10

20

30

40

50

ている。I - F A B Pと対照的に、短時間のI / R処置は有意な血漿G L P - 1を誘導するのに十分であった。さらに、腸間膜虚血 - 再灌流後、G L P - 1分泌は、I - F A B Pよりも定量的に重要である(図3)。

【0054】

これらの結果は、I - F A B Pと比較して、G L P - 1がより敏感であり、腸バリア損傷をより初期で診断するためのバイオマーカーとして使用することができることを示している。

【0055】

2.2. 腸バリア損傷後のヒトにおける迅速なG L P - 1分泌

ヒト腸組織を用いた新しいI / Rモデル(Grootjansら、2010)を使用して、インビボでのヒト腸内のI / R損傷がG L P - 1分泌の増加と関連しているかどうかを評価した。ヒト血漿G L P - 1レベルにおける動静脈差を、45分間の虚血の前後および30分間または120分間の再灌流後に測定した。G L P - 1レベルは、45分間の虚血後に著しく増加し、再灌流後にベースラインレベルに戻った(図5)。これらの結果は、ヒト腸損傷がインビボでのG L P - 1分泌の迅速な誘導と関連していることを実証している。

10

【0056】

2.3. 腸バリア損傷後のマウスにおける迅速なG L P - 2分泌

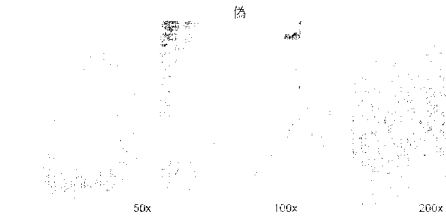
G L P - 2分泌レベルも、G L P - 1分泌レベルを測定するためのものと同様の実験条件で腸バリア損傷後のマウスにおいて測定する。非常に短時間(15分間)の腸管虚血後に血漿G L P - 2レベルの急速な増加が観察される(図6A)。20分間の虚血後の180分間の再灌流後に血漿G L P - 2レベルの重要な増加が観察される(図6B)。

20

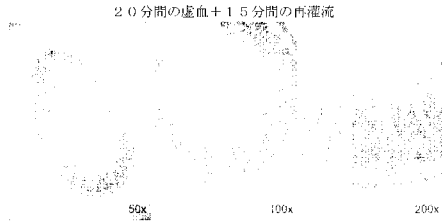
【0057】

これらの結果は、G L P - 2も腸バリア損傷に対して敏感であり、腸バリア損傷をより初期で診断するためのバイオマーカーとして使用することができることを示している。

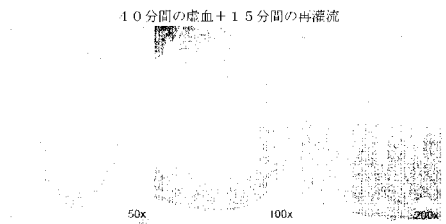
【図 1 A】



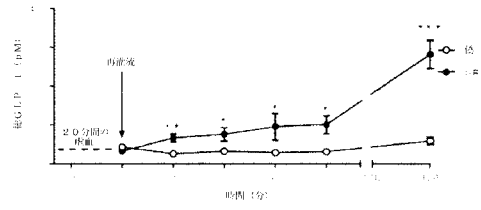
【図 1 B】



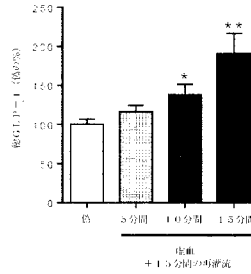
【図 1 C】



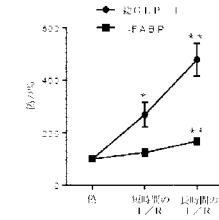
【図 2 A】



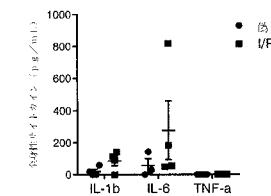
【図 2 B】



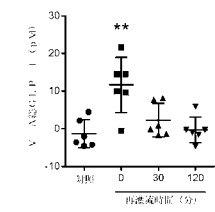
【図 3】



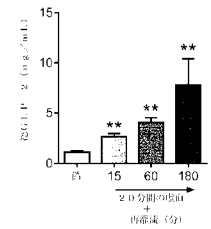
【図 4】



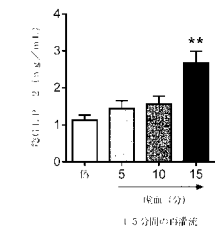
【図 5】



【図 6 B】



【図 6 A】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/073584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/74 ADD.		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	POWELL ALEXIS ET AL: "Plasma biomarkers for early diagnosis of acute intestinal ischemia", SEMINARS IN VASCULAR SURGERY, vol. 27, no. 3, 29 April 2014 (2014-04-29), pages 170-175, XP029163626, ISSN: 0895-7967, DOI: 10.1053/J.SEMVASCURG.2015.01.008 the whole document ----- -/--	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 14 November 2017		Date of mailing of the international search report 24/11/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoesel, Heidi

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/073584
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHI HUI ET AL: "The role of serum intestinal fatty acid binding protein levels and D-lactate levels in the diagnosis of acute intestinal ischemia.", CLINICS AND RESEARCH IN HEPATOLOGY AND GASTROENTEROLOGY JUN 2015, vol. 39, no. 3, June 2015 (2015-06), pages 373-378, XP002766326, ISSN: 2210-741X abstract -----	1-9
A	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 2015, SIT M ET AL: "Serum omentin levels predicts mesenteric ischemia.", XP002766327, Database accession no. NLM25869566 abstract -----	1-9
A	WO 2007/079301 A2 (HILLS PET NUTRITION INC [US]; FRIESEN KIM GENE [US]; YAMKA RYAN MICHAEL) 12 July 2007 (2007-07-12) claims 1-14 -----	1-9
A	DRUCKER D J: "Gut adaptation and the glucagon-like peptides", GUT, vol. 50, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 428-435, XP002766328, ISSN: 0017-5749 the whole document -----	1-9
A	US 2001/027180 A1 (ISAACS INDU J [US]) 4 October 2001 (2001-10-04) par. 0045 -----	1-9

1

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/073584

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007079301 A2	12-07-2007	AU 2006332614 A1 CA 2635202 A1 EP 1979743 A2 JP 2009522553 A US 2009123951 A1 WO 2007079301 A2	12-07-2007 12-07-2007 15-10-2008 11-06-2009 14-05-2009 12-07-2007
US 2001027180 A1	04-10-2001	AT 353665 T AU 782110 B2 CA 2395814 A1 DE 60033437 T2 DK 1246639 T3 EP 1246639 A2 ES 2282161 T3 JP 5001498 B2 JP 5604463 B2 JP 5934739 B2 JP 2003519195 A JP 2012116861 A JP 2014159463 A PT 1246639 E US 2001027180 A1 WO 0149314 A2	15-03-2007 07-07-2005 12-07-2001 29-11-2007 11-06-2007 09-10-2002 16-10-2007 15-08-2012 08-10-2014 15-06-2016 17-06-2003 21-06-2012 04-09-2014 31-05-2007 04-10-2001 12-07-2001

## フロントページの続き

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

(71)出願人 518027461

アンセル(アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシェ メディカル)

INSERM(Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale)

フランス共和国, 75013 パリ 13, リュ デュ トルビアック 101

(71)出願人 519099254

アンスティテュ ナシオナル スペリユール デ シアンセ アグロノミクス, ドゥ ラリマン タシオン エ ドゥ ランヴィロヌマン

INSTITUT NATIONAL SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, DE L'ALIMENTATION ET DE L'ENVIRONNEMENT

フランス共和国, 21000 ディジョン, プールヴァール ドクター プティジャン 26

(74)代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

(74)代理人 100185915

弁理士 長山 弘典

(74)代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(72)発明者 グローバー, ジャック

フランス共和国, 21310 ベルヌーヴ, アレ デ リラ 3

(72)発明者 ルブラン, ロレーヌ

フランス共和国, 21000 ディジョン, リュ クロス スリュテ 6

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 CA40 DA30 DA75 EA50

专利名称(译)	肠缺血早期诊断的体外方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019534464A</a>	公开(公告)日	2019-11-28
申请号	JP2019536681	申请日	2017-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
发明人	グローバー, ジャック ルブラン, ロレーヌ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K14/605 C07K16/26		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/575 G01N2333/605 G01N2800/065 G01N33/53 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A C07K14/605 C07K16/26		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	山口健次郎 森田健一		
优先权	2016306199 2016-09-20 EP PCT/EP2017/057292 2017-03-28 WO		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种体外诊断方法，用于在怀疑患有肠缺血的患者中早期诊断肠缺血。

Figure 2A

