

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 107088

(P2003 - 107088A)

(43)公開日 平成15年4月9日(2003.4.9)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト [*] (参考)
G 0 1 N 33/53 33/68		G 0 1 N 33/53 33/68	V 2 G 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 30 L (全 8 数)

(21)出願番号	特願2001 - 302372(P2001 - 302372)	(71)出願人	000138277 株式会社ヤトロン 東京都千代田区東神田1丁目11番4号
(22)出願日	平成13年9月28日(2001.9.28)	(72)発明者	小池 隆夫 北海道札幌市中央区宮の森2条13丁目2 - 38
		(72)発明者	渥美 達也 北海道札幌市北区新琴似5条2丁目1 - 4 - 13 08
		(72)発明者	家子 正裕 北海道札幌市北区あいの里1条6丁目3 - 3 - 1308
		(74)代理人	100090251 弁理士 森田 憲一

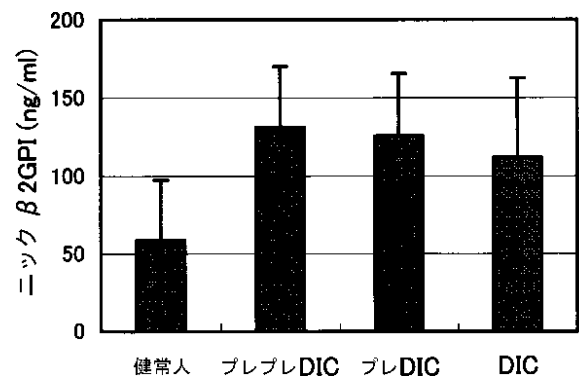
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 播種性血管内凝固症候群及びその発症前段階を検出する方法

(57)【要約】

【課題】 播種性血管内凝固症候群 (D I C) の発症、及び特にはD I Cの発症前段階 (プレプレD I C及びプレD I C) を高感度で検出する方法を提供する。

【解決手段】 体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度を測定して、播種性血管内凝固症候群又はその発症前段階を検出する。あるいは、体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度 (N) 及びトータル 2グリコプロテインIの濃度 (T) を測定し、トータル 2グリコプロテインIの濃度 (T) に対するニック 2グリコプロテインIの濃度 (N) の比率 (N / T) を算出し、その比率を指標として検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度を測定することを特徴とする、播種性血管内凝固症候群又はその発症前段階を検出する方法。

【請求項2】 体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度(N)及びトータル 2グリコプロテインIの濃度(T)を測定し、トータル 2グリコプロテインIの濃度(T)に対するニック 2グリコプロテインIの濃度(N)の比率(N/T)を算出し、その比率を指標とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 濃度測定を免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行う、請求項1又は2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation: DIC)又はその発症前段階を検出する方法に関し、特に、DIC発症の早期予知に利用することができる。

【0002】本明細書において、「ニック 2グリコプロテインI」とは、プロテアーゼによりアミノ酸配列の一部に開裂を受けて2本のポリペプチド鎖からなるものの、それらがジスルフィド結合により結合している 2グリコプロテインIを意味する。また、本明細書において、プロテアーゼによる開裂を受けていない 2グリコプロテインIを、前記の「ニック 2グリコプロテインI」と区別する必要がある場合には、「インタクト 2グリコプロテインI」と称することがある。従って、本明細書において、単に「 2グリコプロテインI」と称する場合には、特に断わらない限り、「インタクト 2グリコプロテインI」を指すものとする。更に、本明細書において、「トータル 2グリコプロテインI」とは、前記「ニック 2グリコプロテインI」と前記「インタクト 2グリコプロテインI」との両方を含む。

【0003】

【従来の技術】 2グリコプロテインIは、健常人の血液中中に約200 µg/mLの濃度で存在する糖タンパク質であり、陰性荷電リン脂質と結合する性質を有し、内因系凝固の接触相、ADPによる血小板凝集、活性化第5因子やリン脂質依存性プロトロンビナーゼ活性、プロテインSとその結合タンパクとの相互反応などを抑制して抗凝固活性を示すことが知られている。また、 2グリコプロテインIの一部がプロテアーゼにより開裂を受けたニック 2グリコプロテインIでは、陰性荷電リン脂質との親和性が、インタクト 2グリコプロテインIの親和性から約1/100以下に低下することが報告されている[J. E. Huntら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第90巻, 第2141頁~第2145頁, (1993年)]。様々な病態において、血管内凝固系が活性化されると、これに引き続いて

線溶系酵素であるプラスミンが活性化されるので、このプラスミンによって 2グリコプロテインIが開裂を受け[大蔵ら、Blood, 第91巻, 第4173頁~第4179頁, (1998年)]、陰性荷電リン脂質との親和性が低下し、ニック 2グリコプロテインIが血液中に遊離してくるものと考えられる。実際に、白血病や抗リン脂質抗体症候群の患者群においては、血液中のニック 2グリコプロテインIレベルが増加している知見が得られており[Itohyら、J. Biochem. m., 第128巻, 1017頁~1024頁(2000年)]、これらの疾患では生体内凝固線溶異常をきたす患者が多い。

【0004】悪性腫瘍、白血病、又は重症感染症など重篤な基礎疾患に合併して起こる播種性血管内凝固症候群(DIC)は消費性凝固障害による出血傾向と、微小血管内血栓による臓器障害を特徴とした死亡率の極めて高い症候群であり、早期の診断治療が患者の生命の維持や予後の改善に必要である。従って、できる限り早い段階で凝固線溶系亢進状態を反映する分子マーカーが要求されている。従来から、DICの診断には厚生労働省が定める診断基準を初め、様々な凝固線溶系分子マーカー〔例えば、可溶性フィブリンモノマー(SF)、D-Dダイマー(DD)、トロンピン・アンチトロンピンIII複合体(TAT)、プラスミン・ 2プラスミンインヒビター複合体(PIC)〕の測定等が臨床現場で行われているが、DICの診断、特にその早期診断、すなわち、発症前段階(プレDIC及びDIC)を検出するには感度的に不十分であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、DICの発症前段階を高感度で検出可能な方法を開発する目的で鋭意研究したところ、ニック 2グリコプロテインIが、DICの発症及びその発症前段階の高感度分子マーカーとして有効であることを見出した。また、トータル 2グリコプロテインI濃度に対するニック 2グリコプロテインI濃度の比率も、DICの発症及びその発症前段階の高感度検出に有効であることを見出した。本発明は、こうした知見に基づくものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度を測定することを特徴とする、播種性血管内凝固症候群又はその発症前段階を検出する方法に関する。また、本発明は、体液試料中のニック 2グリコプロテインIの濃度(N)及びトータル 2グリコプロテインIの濃度(T)を測定し、トータル 2グリコプロテインIの濃度(T)に対するニック 2グリコプロテインIの濃度(N)の比率(N/T)を算出し、その比率を指標とする、播種性血管内凝固症候群又はその発症前段階を検出する方法に関する。更に、本発明の好ましい態様においては、前記の濃

度測定を免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行う。

【0007】本明細書において、「ニック 2グリコプロテインI」とは、前記のとおり、プロテアーゼによりアミノ酸配列の一部に開裂を受けて2本のポリペプチド鎖からなるものの、それらがジスルフィド結合により結合している 2グリコプロテインIを意味する。具体的には、前記「ニック 2グリコプロテインI」には、例えば、(1) プラスミンにより第Vドメインに開裂(ヒト 2グリコプロテインIにおいては、第317番目のリジン残基と第318番目のトレオニン残基との間で開裂)を受けたニック 2グリコプロテインI、及び(2) 顆粒球エラスターゼにより第Vドメインに開裂(ヒト 2グリコプロテインIにおいては、第314番目のアラニン残基と第315番目のフェニルアラニン残基との間で開裂)を受けたニック 2グリコプロテインIが含まれる。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明方法によれば、播種性血管内凝固症候群(DIC)又はその発症前段階を高感度で検出することができる。ここで、DICとは、例えば、厚生労働省が定めた「DIC診断基準」において判定が7点以上となる状態をいう。本明細書において、DICの「発症前段階」とは、例えば、プレDIC(pre-DIC)及びプレプレDIC(pre-pre-DIC)を意味する。ここでプレDICとは、前記の厚生労働省が定めた「DIC診断基準」において判定が7点以上となる状態(DIC発症)には至らないが、例えば、凝固系亢進状態の指標となるものに動きがみられる状態をいう。また、プレプレDICとは、前記のプレDICにも至らないが、プレDICの状態に至る数日前(例えば、2~3日前)の状態をいう。

【0009】本発明方法においては、任意の哺乳動物(特にヒト)の任意の体液試料を用いることができる。体液試料としては、例えば、血液試料、特に血漿、血清を挙げることができ、特に血漿を用いるのが好ましい。

【0010】本発明者は、後述する実施例に示すとおり、DIC患者、プレDIC患者、及びプレプレDIC患者においては、健常人と比較して、体液試料中に含まれているニック 2グリコプロテインIの濃度が統計学的に有意に高くなることを見出した。従って、本発明方法においては、検査対象者から採取した体液試料中に含まれているニック 2グリコプロテインIの濃度を測定することによって、DIC又はその発症前段階を検出することができる。ニック 2グリコプロテインIの濃度は、例えば、免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行うことができる。

【0011】また、本発明者は、後述する実施例に示すとおり、DIC患者、プレDIC患者、及びプレプレDIC

患者では、健常人と比較して、体液試料中においてトータル 2グリコプロテインIの濃度(T)に対するニック 2グリコプロテインIの濃度(N)の比率(N/T)(すなわち、R値)が統計学的に有意に高くなることを見出した。従って、本発明方法においては、検査対象者から採取した体液試料中に含まれているニック 2グリコプロテインIの濃度(N)及びトータル 2グリコプロテインIの濃度(T)を測定し、トータル 2グリコプロテインIの濃度(T)に対するニック 2グリコプロテインIの濃度(N)の比率(N/T)(すなわち、R値)を算出し、そしてそのR値を指標とすることによって、DIC又はその発症前段階を検出することができる。ニック 2グリコプロテインIの濃度は、例えば、前記の免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行うことができ、トータル 2グリコプロテインIの濃度も、同様に、免疫学的測定法又は生化学的測定法に基づいて行うことができる。

【0012】前記のニック 2グリコプロテインIの免疫学的測定は、例えば、特開2000-28607号公報に記載の「インタクト 2グリコプロテインIと反応しないが、ニック 2グリコプロテインIとは反応するモノクローナル抗体」(以下、抗ニックGPIMONOクローナル抗体と称することがある)又はその抗体フラグメントを用いて実施することができる。前記の抗ニックGPIMONOクローナル抗体としては、好ましくは、(1) インタクト 2グリコプロテインIとは反応せず、ニック 2グリコプロテインIと反応し、しかも、ニック 2グリコプロテインIの第Vドメインに反応する[特に、ヒトニック 2グリコプロテインIにおける(アミノ末端側から数えて)第242番目のアミノ酸残基~第326番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する]モノクローナル抗体、より好ましくは、ハイブリドーマNGPI-59(FERM P-16892)から分泌されるモノクローナル抗体NGPI-59、あるいは、(2) インタクト 2グリコプロテインIとは反応せず、ニック 2グリコプロテインIと反応し、しかも、ニック 2グリコプロテインIの第Iドメイン~第IVドメインからなる領域に反応する[特に、ヒトニック 2グリコプロテインIにおける(アミノ末端側から数えて)第1番目のアミノ酸残基~第241番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する]モノクローナル抗体、より好ましくは、ハイブリドーマNGPI-60(FERM P-16893)から分泌されるモノクローナル抗体NGPI-60を挙げるができる。

【0013】前記のトータル 2グリコプロテインIの免疫学的測定は、例えば、特開2000-28607号公報に記載の「インタクト 2グリコプロテインIと反応し、しかもニック 2グリコプロテインIとも反応するモノクローナル抗体」(以下、抗トータルGPIMONO

クローナル抗体と称することがある)又はその抗体フラグメントを用いて実施することができる。前記の抗トータルGPIモノクローナル抗体としては、インタクト2グリコプロテインI(特に、ヒトインタクト2グリコプロテインI)、及びニック2グリコプロテインI[特に、第Vドメインに開裂を受けたヒトニック2グリコプロテインI]と反応し、好ましくはインタクト2グリコプロテインI及びニック2グリコプロテインIの第Iドメイン~第IVドメインからなる領域[例えば、ヒトニック2グリコプロテインIにおける(アミノ末端側から数えて)第1番目のアミノ酸残基~第241番目のアミノ酸残基からなる領域]にエピトープを有するモノクローナル抗体が好ましく、ハイブリドーマNGPI-23(FERM P-16891)から分泌されるモノクローナル抗体NGPI-23がより好ましい。

【0014】抗ニックGPIモノクローナル抗体又は抗トータルGPIモノクローナル抗体の抗体フラグメントとしては、前記の各モノクローナル抗体のフラグメントであって、しかも、もとの各モノクローナル抗体と同じ反応特異性を有する抗体フラグメントを用いることができる。抗体フラグメントには、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv等が含まれる。

【0015】ニック2グリコプロテインIの免疫学的測定法は、例えば、前記の抗ニックGPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを第1抗体として不溶性担体に固定化し、この固定化された第1抗体と体液試料とを接触させ、続いて、第1抗体とは別種の前記の抗ニックGPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体、又は前記の抗トータルGPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体と接触させると、前記の固定化第1抗体-ニック2グリコプロテインI複合体と結合した前記第2抗体又は前記の固定化第1抗体-ニック2グリコプロテインI複合体と結合しなかった前記第2抗体の前記標識からの信号を検出することができるので、体液試料中のニック2グリコプロテインIの量を測定することができる(サンドイッチ法)。

【0016】また、前記の抗ニックGPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメント少なくとも1種類と、別種の前記の抗ニックGPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント又は前記の抗トータルGPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメント1種類とを不溶性担体に固定化し、これらの固定化したモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントと体液試料とを接触させると、体液試料中のインタクト2グリコプロテインIとは凝集反応を起こさず、ニック2グリコプロテインIとの間でのみ凝集反応を起こさせることができるので、体液試料中のニック2グリコプロテインIの量を測定することができる(凝集法)。

【0017】従って、前記のニック2グリコプロテインIの免疫学的分析方法においては、体液試料を前処理せずに(例えば、クロマトグラフィーの手法で、あらかじめインタクト2グリコプロテインIとニック2グリコプロテインIとを分離操作することなく)、そのまま使用しても、体液試料中に存在するインタクト2グリコプロテインIの妨害を避けることができる。

【0018】サンドイッチ法を利用するニック2グリコプロテインIの免疫学的分析方法では、具体的には、前記の抗ニックGPIモノクローナル抗体(例えば、前記のモノクローナル抗体NGPI-59又はモノクローナル抗体NGPI-60)又はその抗体フラグメントを適当な不溶性担体に固定化する(第1抗体)。次に、不溶性担体と体液試料との非特異的結合を避けるために、適当なブロッキング剤[例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)やゼラチン等]で不溶性担体の表面を被覆する。続いて、未希釈の体液試料を加えて一定時間(たとえば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(1次反応)。続いて、前記第1次抗体として用いたモノクローナル抗体とは別種の前記の抗ニックGPIモノクローナル抗体若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体、又は前記の抗トータルGPIモノクローナル抗体(例えば、モノクローナル抗体NGPI-23)若しくはその抗体フラグメントに標識を付した第2抗体を加えて一定時間(たとえば、5分~3時間)及び一定温度(例えば、4~40、好ましくは室温付近)で接触させ反応させる(2次反応)。これを適当な洗浄液(例えば、界面活性剤を含む生理食塩水)で洗浄してから、不溶性担体上に存在する標識抗体の量を定量する。その値から、体液試料中のニック2グリコプロテインIの量を算出することができる。また、1次反応と2次反応とを同時に行うことも可能である。

【0019】トータル2グリコプロテインIの免疫学的測定法は、例えば、前記のニック2グリコプロテインIの測定法において、抗ニック2GPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントの代わりに抗トータル2GPIモノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを用いて同様の方法により測定することが可能である。(サンドイッチ法)。

【0020】前記のサンドイッチ法による免疫学的分析方法に使用することのできる不溶性担体は特に限定されるものでなく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子、その他ニトロセルロース、紙、アガロース及びこれらの組み合わせ等を例示することができる。標識物質としては、酵素、蛍光物質、又は発光物質を使用するのが有利である。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、

- D - ガラクトシダーゼ等、また、蛍光物質としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート等、また、発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステル、ルシフェリン等を使用することができる。

【0021】凝集反応を利用する免疫学的分析方法において、不溶性担体としては、一般に抗原抗体反応の凝集反応を利用する免疫学的分析方法において用いられる任意の不溶性担体を用いることができ、例えば、ラテックス粒子（特に、ポリスチレンラテックス粒子）を挙げることができる。モノクローナル抗体を不溶性担体に固

10 定化させるには、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、グルタルアルデヒド等を用いる）又は物理吸着法を用いることができる。

【0022】前記のニック 2グリコプロテインI及びトータル 2グリコプロテインIの濃度は、例えば、生化学的に測定することもできる。例えば、ニック 2グリコプロテインI及びインタクト 2グリコプロテインIの生化学的測定法は、過塩素酸処理したヒト血漿を、HiTrap-Heparin columnを用いた

20 アフィニティークロマトグラフィーにより分画すること
で実施することができる【大蔵ら、Blood、第91巻、第4173頁～第4179頁、（1998年）】。この際、ニック 2グリコプロテインI及びインタクト 2グリコプロテインIは、それらの溶出位置の違いにより（すなわち、ヘパリンに対するアフィニティーの違いにより）、分離が可能となる。溶出フラクションのタンパク定量を行うことにより、ニック 2グリコプロテインI及びインタクト 2グリコプロテインIのそれぞれの量を測定することができる。前記のニック 2グリコプロテインI及びインタクト 2グリコプロテインI

30 のそれぞれの量からトータル 2グリコプロテインIの濃度を算出し、これらの値からトータル 2グリコプロテインI濃度（T）に対するニック 2グリコプロテインI濃度（N）の比率（ $N/T=R$ ）を求めることができる。

【0023】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】《ニック 2グリコプロテインIの測定》
40 本実施例では、プレブレDIC患者、ブレDIC患者、及びDIC患者群、並びに健常人群におけるニック 2グリコプロテインIの濃度を測定した。ここで、各患者の診断は、以下の基準によって行った。

DIC患者：厚生労働省のDIC診断基準による診断。
プレDIC患者：厚生労働省の前記DIC診断基準を満たさないが凝固亢進状態の指標となるものに動きがみられる状態の患者。

プレブレDIC患者：プレDICの数日前（2～3日前）の状態の患者。

【0024】前記の従来の診断法によってそれぞれ診断された各患者より採取された血漿検体及び健常人より採取された血漿検体を試料とし、以下の方法にてニック 2グリコプロテインIの測定を行った。モノクローナル抗体NGPI-60の断片 $F(ab')_2$ を $10\mu\text{g/mL}$ の濃度で含有するトリス緩衝液A〔 50mmol/L Tris-HCl 、 0.15mol/L NaCl （ $\text{pH}7.5$ ）〕 $100\mu\text{L}$ を96ウェルELISA用マイクロタイタープレート（Immulon-II；日本ダイナテック株式会社）の各ウェルに入れて、4で18時間放置した。そのプレートを洗浄液W（ 0.05% Tween-20- 0.5mol/L NaCl ）で3回洗浄した。このようにして抗体を感作したプレートのウェルに、ニック 2グリコプロテインIを 200ng/mL 、 100ng/mL 、 50ng/mL 、 25ng/mL 、 12.5ng/mL 及び 6.25ng/mL の濃度になるようにトリス緩衝液B〔 20mmol/L Tris-HCl 、 0.5mol/L NaCl 、 0.05% Tween-20（ $\text{pH}7.6$ ）〕にそれぞれ添加して調製したスタンダード試料 $100\mu\text{L}$ 、あるいは、検体血漿を同様のトリス緩衝液Bにて5倍に希釈した検体試料 $100\mu\text{L}$ を加え、25で2時間反応させた。

【0025】次に、前記洗浄液W（ 0.05% Tween-20- 0.5mol/L NaCl ）で3回洗浄した後に、ビオチン標識モノクローナル抗体NGPI-23の断片 $F(ab')_2$ を $2\mu\text{g/mL}$ の量で含有するトリス緩衝液B〔 20mmol/L Tris-HCl 、 0.5mol/L NaCl 、 0.05% Tween-20（ $\text{pH}7.6$ ）〕 $100\mu\text{L}$ を加え、25で1時間反応させた。続いて、前記洗浄液W（ 0.05% Tween-20- 0.5mol/L NaCl ）で3回洗浄した後、トリス緩衝液Bにて2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン（ダコ社） $100\mu\text{L}$ を加え、25で1時間反応させた。前記洗浄液Wで3回洗浄した後、酵素基質液〔 10mmol/L フェノール/ 0.5mol/L 4-アミノアンチピリン/ 0.005% 過酸化水素を含む 50mmol/L Tris-HCl 、 0.15mol/L NaCl （ $\text{pH}7.5$ ）〕を各ウェルに $200\mu\text{L}$ ずつ加え、各ウェルの 492nm における吸光度をマイクロプレートリーダー（MPR A4i型；東ソー）で測定した。各濃度のスタンダード試料の吸光度をもとに検量線を作製し、この検量線より検体血漿中のニック 2グリコプロテインIの濃度を求めた。

【0026】結果を表1及び図1に示す。各群のニック 2グリコプロテインI濃度の平均値 \pm SDは、健常人群（44例）が $58.60\pm 38.98\text{ng/mL}$ 、プレブレDIC群（109例）が $131.14\pm 39.02\text{ng/mL}$ 、ブレDIC群（47例）が 125.52

± 39.89 ng/mL、及びDIC患者群(33例)が111.67 ± 51.02 ng/mLであった。健常人に対してプレブレDIC、ブレDIC及びDIC患者群はp < 0.001であり、統計学的に有意な差が認め*

*られた。このようにプレブレDIC群でも、すでに血漿中のニック 2グリコプロテインI濃度が健常人に比べて有意に上昇していた。

【0027】

《表1》

	健常人	プレブレDIC	ブレDIC	D
IC				
濃度(ng/mL)	58.60 ± 38.98	131.14 ± 39.02		
	125.52 ± 39.89	111.67 ± 51.02		

統計学的有意差：

プレブレDIC vs DIC： p < 0.05

健常人 vs プレブレDIC： p < 0.001

【0028】 健常人 vs ブレDIC：

【実施例2】《トータルのニコニコプロテインI及びR値の測定》本実施例では、プレブレDIC、ブレDIC及びDIC患者群、並びに健常人群におけるトータル2グリコプロテインIを測定し、R値を算出した。実施例1と同じ血漿検体を試料として使用し、以下の方法にてトータル 2グリコプロテインIの測定を行った。モノクローナル抗体NGPI-23を5 µg/mLの濃度で含有するトリス緩衝液A〔50 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl (pH 7.5)〕50 µLを96ウェルELISA用マイクロタイタープレート(Immulon-II; 日本ダイナテック株式会社)の各ウェルに入れて、4 で18時間放置した。そのプレートを前記洗浄液W(0.05% Tween-20-0.5 mol/L NaCl)で3回洗浄した。このようにして抗体を感作したプレートのウェルに、インタクト 2グリコプロテインIを200 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、25 ng/mL、12.5 ng/mL及び6.25 ng/mLの濃度になるようにトリス緩衝液B〔20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.05% Tween-20 (pH 7.6)〕にそれぞれ添加して調製したスタンダード試料50 µL及び、検体血漿を同様のトリス緩衝液Bにて8000倍に希釈した検体試料50 µLを加え、25 で2時間反応させた。

【0029】次に、前記洗浄液W(0.05% Tween-20-0.5 mol/L NaCl)で3回洗浄した後に、ビオチン標識抗ヒト 2グリコプロテインIウサギポリクローナル抗体(セダレン社)を2.5 µg/mLの量で含有するトリス緩衝液B〔20 mmol*

《表2》

	健常人	プレブレDIC	ブレDIC	DIC
R	0.44 ± 0.22	1.35 ± 1.16	1.49 ± 0.99	
	2.30 ± 1.79			

統計学的有意差：

健常人 vs ブレDIC： p < 0.001

健常人 vs プレブレDIC： p < 0.001

20

30

40

0.05 mol/L NaCl, 0.05% Tween-20 (pH 7.6)〕50 µLを加え、25 で1時間反応させた。続いて、前記洗浄液W(0.05% Tween-20-0.5 mol/L NaCl)で3回洗浄した後、トリス緩衝液Bにて2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン(ダコ社)100 µLを加え、25 で1時間反応させた。前記洗浄液Wで3回洗浄した後、酵素基質液〔10 mmol/L フェノール/0.5 mmol/L 4-アミノアンチピリン/0.005% 過酸化水素を含むトリス緩衝液A〔50 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl (pH 7.5)〕〕を各ウェルに200 µLずつ加え、各ウェルの492 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(MPR A4i型; 東ソー)で測定した。各濃度のスタンダード試料の吸光度をもとに検量線を作製し、この検量線より検体血漿中のトータル 2グリコプロテインI濃度を求めた。

【0030】前記実施例1で測定したニック 2グリコプロテインI濃度(N)を用いて、本実施例で測定したトータル 2グリコプロテインI濃度(T)に対するニック 2グリコプロテインI濃度(N)の比率(N/T = R)を個々の検体について算出した。その結果を表2及び図2に示す。健常人に対してDIC患者群、プレブレDIC群及びブレDIC群ではp < 0.001となり、統計学的に有意な差が認められた。このようにプレブレDIC群において、すでにR値が健常人に比べ有意に上昇していることが確認された。

【0031】

D I C v s 健常人： p < 0 . 0 0 1
 D I C v s プレD I C： p < 0 . 0 2
 D I C v s プレプレD I C： p = 0 . 0 0 5
 プレD I C v s プレプレD I C： 有意差なし 12

【0032】

【実施例3】《TAT、PIC、SF及びDD測定値並びに各検体群間の有意差検定》本実施例においては、プレプレDIC、プレDIC及びDIC患者群並びに健常人群に関して、従来法によってTAT（トロンピン・アンチトロンピンIII複合体）値、PIC（プラスミン・2プラスミンインヒビター複合体）値、DD（D-Dダイマー）値、及びSF（可溶性フィブリン）値を測定し、そして各検体群間の有意差を検定した。本実施例でも、実施例1及び2で用いた同じ血漿検体を使用した。前記凝固線溶系マーカーの測定は、TAT、PIC、及びDDについてはELISA法（国際試薬）、そしてSFについては凝集法（ヤトロン）を使用した。

*【0033】その結果を表3、表4及び図3～6に示す。健常人とプレプレDIC間においてTATではp<0.01となり、やや有意差が見られた。しかしながら、その他のマーカーについてはプレプレDICの段階で、健常人と有意差が認められるものはなかった。一方、実施例1及び2で示したように、ニック2グリコプロテインIとR値においてはp<0.001であり、有意差が認められている。このことから、ニック2グリコプロテインIは、従来の凝固線溶系マーカーに比べ、DICの発症前段階においては、より感度の高いマーカーになると思われる。

【0034】

《表3》

	健常人	プレプレDIC	プレDIC	D
TAT(ng/mL)	1.01 ± 1.44	10.67 ± 20.84		
	15.83 ± 19.38	38.37 ± 28.98		
PIC(μg/mL)	0.27 ± 0.35	1.08 ± 0.7	2.	
	20 ± 2.40	5.77 ± 4.37	20	
DD(μg/mL)	0.41 ± 0.39	0.94 ± 1.08	6	
	76 ± 5	194 ± 199	96	
	3.45 ± 2.06	33.75 ± 10.71	1	
	77 ± 453.6	1053.07 ± 158.10	p=0.1499	
		p<0.001		
PIC	p<0.05	p<0.001		

【0035】

【0036】

【発明の効果】本発明方法によれば、DICの発症、及び特にDICの発症前段階（プレプレDIC及びプレDIC）を高感度で検出することが可能である。

【図面の簡単な説明】p=0.0611

【図1】本発明方法によるサンドイッチ酵素免疫測定法により測定した血漿検体中のニック2グリコプロテインI（ニック2GPI）濃度の値を、健常人及びDIC患者群別に示した棒グラフである。

【図2】本発明方法によるサンドイッチ酵素免疫測定法にて測定した血漿検体中のニック2グリコプロテインI濃度及びトータル2グリコプロテインI濃度から算出した比率Rを、健常人及びDIC患者群別に示した棒グラフである。

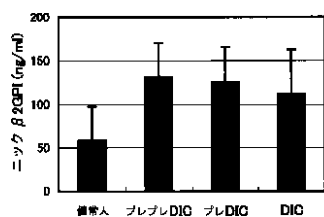
【図3】従来法によって測定した血漿検体中のTAT濃度を、健常人及びDIC患者群別に示した棒グラフである。

【図4】従来法によって測定した血漿検体中のPIC濃度を、健常人及びDIC患者群別に示した棒グラフである。

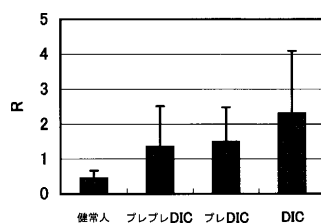
【図5】従来法によって測定した血漿検体中のSF濃度を、健常人及びDIC患者群別に示した棒グラフである。

【図6】従来法によって測定した血漿検体中のDD濃度を、健常人及びDIC患者群別に示した棒グラフである。

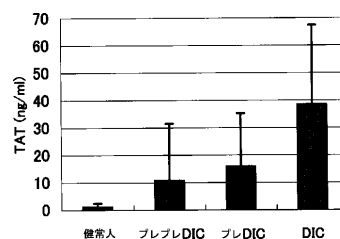
【図1】



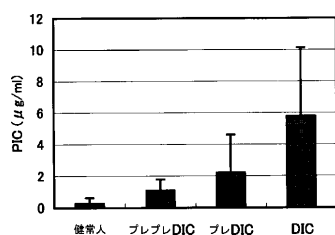
【図2】



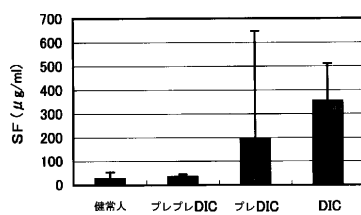
【図3】



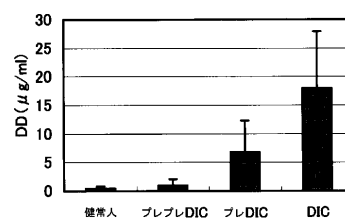
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 家子 正裕
北海道札幌市北区あいの里1条6丁目3-3-1308

(72)発明者 和田 英夫
三重県松坂市本町2213

(72)発明者 加藤 久雄
大阪府吹田市上山田8-13-1013

(72)発明者 田中 英之
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(72)発明者 風早 由美子
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA77 FB03

专利名称(译)	弥散性血管内凝血综合征和在发病前检测阶段的方法		
公开(公告)号	JP2003107088A	公开(公告)日	2003-04-09
申请号	JP2001302372	申请日	2001-09-28
申请(专利权)人(译)	株式会社ヤトロン		
[标]发明人	小池隆夫 渥美達也 家子正裕 和田英夫 加藤久雄 田中英之 風早由美子		
发明人	小池 隆夫 渥美 達也 家子 正裕 和田 英夫 加藤 久雄 田中 英之 風早 由美子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA77 2G045/FB03		
代理人(译)	森田健一		
其他公开文献	JP4681175B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

弥散性血管内凝血的发展 (DIC) , 尤其涉及用于检测DIC的临床前阶段提供了一种方法 (半固化片DIC和预DIC) 具有高灵敏度。一通过测量带切口的β2糖蛋白I的浓度的体液样品中, 检测弥散性血管内凝血综合征或临床前阶段物。可替代地, 浓度切口β2糖蛋白II (T) , 测定体液样品 (N) 和总β2糖蛋白的浓度, 结果总β2糖蛋白切口β2我糖蛋白的浓度 (T) 的浓度 (计算的N)) 的比率 (N / T , 在检测到比作为指标。

