

(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2013-543581

(P2013-543581A)

(43) 公表日 平成25年12月5日(2013.12.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2013-529664 (P2013-529664)  
 (86) (22) 出願日 平成23年9月23日 (2011. 9. 23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月21日 (2013. 5. 21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/066611  
 (87) 国際公開番号 W02012/038541  
 (87) 国際公開日 平成24年3月29日 (2012. 3. 29)  
 (31) 優先権主張番号 1016161.0  
 (32) 優先日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 509342153  
 ハンサ メディカル アクチボラゲット  
 スウェーデン国 エス - 220 07  
 ルンド、ビー、オー、ボックス 785  
 (74) 代理人 110000855  
 特許業務法人浅村特許事務所  
 (72) 発明者 ビエルク、ラルス  
 スウェーデン国、ルンド、マグレ ストラ  
 キルコガタ 10  
 (72) 発明者 クリステンソン、ベルティル  
 スウェーデン国、ルンド、ボトゥルフスガ  
 タン 5シー  
 (72) 発明者 ハーヴァルト、ヘイコ  
 スウェーデン国、ヴェベレド、キルコガタ  
 ン 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌性髄膜炎の治療方法

(57) 【要約】

細菌性髄膜炎を有する個体においてH B Pのレベルが増加することが実証された。したがって、個体におけるH B Pのレベルを使用して、個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを同定する方法であって、前記個体において H B P を測定し、それによって前記個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定することを含む上記方法。

## 【請求項 2】

前記 H B P が前記個体から採取されたサンプルにおいて測定される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記サンプルが体液サンプル、好ましくは脳脊髄液 ( C S F ) サンプルである、請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定することが、前記サンプル中の H B P の濃度が 1 5 n g / m l 超、好ましくは 2 5 n g / m l 超、より好ましくは 3 5 n g / m l 超、最も好ましくは 5 0 n g / m l 超であるか否かを決定することを含む、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記サンプル中の H B P のレベル又は濃度が、H B P のベースラインレベル又は濃度を基準として、少なくとも 3 倍又は 4 倍増加している、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記個体が髄膜炎を有することが疑われる、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記個体が、最近、脳神経外科手術を受けた、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記個体が、頭蓋骨外傷及び / 又は頭蓋骨、頸部若しくは腰仙部領域に影響を与える解剖学的異常の病歴を有する、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記個体が、免疫力が低下している ; 蝸牛インプラントを有する患者 ; 頭蓋若しくは脳神経外科インプラントを有する患者、又はその任意の組み合わせである、請求項 6 から 8 までのいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記個体が、細菌性髄膜炎の治療をすでに受けている、請求項 6 から 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記個体が哺乳類である、請求項 1 から 10 までのいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記哺乳類がヒトである、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定することにおける使用のための、H B P の検出用の作用物質。

40

## 【請求項 14】

H B P 特異的抗体又はその H B P 結合断片を含む、請求項 13 に記載の作用物質。

## 【請求項 15】

個体の細菌性髄膜炎を治療する方法であって、

( i ) 請求項 1 から 14 までのいずれか 1 項に記載の方法を用いて、個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定するステップと、

( i i ) ( i ) においてリスクを有すると同定された個体に、細菌性髄膜炎の治療に最適な作用物質の治療的有効量を投与するステップとを含む上記方法。

50

## 【請求項 16】

前記細菌性髄膜炎の治療に好適な作用物質が抗生物質である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定する方法における使用のための試験キットであって、個体における HBP の検出用の作用物質を含む上記試験キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、細菌性髄膜炎の診断及び治療に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

細菌性髄膜炎は、生命を脅かす疾患である。成人において、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 及び髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) は、全体的致死率がそれぞれ約 30% 及び 10% の主要病原体である。ウイルス性髄膜炎及び脳炎も生命を脅かす。最も一般的な原因病原体 (エンテロウイルス) は、神経学的合併症を呈することが比較的稀であるにもかかわらず、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 髄膜脳炎は、治療しない場合、70% 超の死亡率を有する。早期治療はすべての型の髄膜炎及び脳炎において予後を改善し、したがって、早期の診断が重要である。

20

## 【0003】

主として、診察時に急性の細菌性髄膜炎をウイルス性 CNS 感染症又は神経ボレリア症から区別することがしばしば困難であることによって、診断及び治療はいまだに大きな課題である。白血球 (WBC) 数、又は典型的に脳脊髄液 (CSF) 中で測定される乳酸、タンパク質、グルコース若しくは血漿 C-反応性タンパク質 (CRP) のレベルなどの従来の臨床検査変数は、疾患の初期においてはしばしば十分に差別的でない。最終診断は、細菌感染に関して血液又は CSF 培養陽性であること又はグラム染色などによる CSF 中の細菌の明確な同定を必要とする。一般に、これらのアッセイの 1 つにおける陽性の結果は、細菌源が証明され、さらなる試験が必要でないことの証拠と解釈される。しかしながら、これらの試験は、全体的感度がわずか 60% ~ 90% である。また、多くの患者は腰椎穿刺前に抗生物質を受容し、CSF 培養又はグラム染色からの確定的結果を得る機会が少なくなる。また、特に、培養は時間がかかり、診断の遅れをもたらす。これらの因子の結果として、髄膜炎を有することが疑われる患者は、典型的にスペクトルの広い抗生物質及び抗ウイルス療法による誤った治療を受け、最終診断が決定しない。

30

## 【0004】

個体が細菌性髄膜炎を有するか否かをできるだけ早く判定するための信頼できる生物学的又は臨床的マーカーが必要とされる。

## 【発明の概要】

## 【0005】

ヘパリン結合タンパク質 (HBP、CAP37、アズロシジン) は、ヒト好中球エラストラーゼと 44% の配列同一性を示す、グリコシル化された一本鎖の正電荷を有する 37 kDa 不活性セリンプロテアーゼホモログである。HBP の 3 次元構造は、公表されている (Iversen ら、*Nat Struct Biol*, 1997 Apr; 4(4): 265 ~ 8 ページ)。HBP は、ヒト好中球のアズール顆粒及び分泌胞に含まれる (Lindmark ら、*J Leukoc Biol* 1999; 66(4): 634 ~ 43 ページ及び Tapper ら、*Blood* 2000; 96: 2329 ~ 2337 ページ)。HBP は、血管細胞骨格の  $Ca^{2+}$  バランスを変更することによって血管漏出を誘発することが示された多機能タンパク質である (Gautam ら、*Nature Medicine*, 2001; 7(10): 1123 ~ 7 ページ)。フィブリノーゲンと複合体形成した A 群連鎖球菌 (GAS) の M-タンパク質は、好中球の B2-インテグリン受容体を刺

40

50

激することによってHBP放出を誘発することが示されている(Herwaldら、Cell 2004; 116(3): 367~79ページ)。LPSも、未知のメカニズムによってHBP放出を誘発することができる(Rasmussenら、FEBS Lett 1996; 390(1): 109~12ページ)。HBPの配列は、公表されており(例えば、NCBI寄託番号NP\_001691 REGION: 27..248として)、以下に配列番号1として複製される。

【化1】

配列番号1

```
IVGGRKARPRQFPFLASIQNGRHFCCGALIHARFVMTAASCFSQNPQVSTVVLGAYDLRRRE
RQSRQTFSSISSENGYDPPQNLNDLMLLQLDREANLTSVTLPLPLQONATVEAGTRCQVAGW
GSQSRSGGRLSRFPRFVNVTVPEDQCRPNVCTGVLTRRGGICNGDGGTPLVCEGLAHGVASF
LGPCGRGPDFFFTRVALFRDWIDGVLNNPGP
```

10

【0006】

髄膜炎を有することが疑われる患者におけるHBPレベルは、これまで調査されていなかった。本発明者らは、HBPレベルが急性の細菌性髄膜炎を有する個体において増加していることを初めて示した。こうして本発明によれば、個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを同定する方法であって、該個体においてHBPを測定し、それによって該個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定することを含む上記方法が提供される。

20

【0007】

本発明はさらに、

- 個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定することにおける使用のための、HBPの検出用の作用物質；
- 個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定する方法における使用のための試験キットであって、個体におけるHBPの検出用の作用物質を含む上記試験キット；
- 個体の細菌性髄膜炎を治療する方法であって、

(i) 本発明の方法を用いて、個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定するステップと、

(ii) (i)においてリスクを有すると同定された個体に、細菌性髄膜炎の治療に好適な少なくとも一種の作用物質の治療的有効量を投与するステップと

30

を含む上記方法

を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、急性細菌性髄膜炎(ABM)、ウイルス性脳炎、ウイルス性髄膜炎、神経ボレリア症(ボレリア)を有する患者、及び正常なWBCを有しCNS感染症を有さない患者(対照)における、HBP(A)、WBC数(B)、好中球(ポリ)数(C)、単核球(モノ)数(D)、グルコース(E)、タンパク質(F)、及び乳酸(G)の脳脊髄液(CSF)レベルを示す。点線は、HBPに関する50ng/mLのカットオフレベルを示す。中央値が示される。すべての散布点は、ログ2スケールで表される。

40

【図2】図2は、HBPのレベル及び病因細菌を示す。異なる細菌種を比較した場合、HBPレベルに有意な差はなかった。白三角は、28日以内に死亡した患者を示し、点線は、50ng/mLのカットオフレベルを示す。中央値が示される。散布点は、ログ2スケールで表される。

【図3】図3は、脳脊髄液(CSF)中のHBP(太い実線)、乳酸(細い破線)、好中球(ポリ; 細い点線)、単核球(モノ; 細い実線)、及び総WBC(太い不規則な点線)を用いて、細菌性髄膜炎を他のCNS感染症から鑑別するための受信者操作特性(ROC)曲線を示す。細菌性髄膜炎(n=40)とウイルス性CNS感染症又は神経ボレリア症(n=35)の間で鑑別を行った。ROC曲線下面積は、HBPに関して0.994(9

50

5% 確信間隔 (C I)、0.984 ~ 1.004)、乳酸に関して0.955 (95% C I、0.911 ~ 1.000)、ポリに関して0.966 (95% C I、0.920 ~ 1.011)、モノに関して0.729 (95% C I、0.614 ~ 0.843) 及び総 W B C に関して0.898 (95% C I、0.826 ~ 0.970) であった。

#### 【0009】

発明の詳細な説明

#### 診断

本発明は、対象が細菌性髄膜炎、特に、急性の細菌性髄膜炎を有するか否かを同定する方法に関する。したがって、本発明は、細菌性髄膜炎の診断に関する。本発明は、細菌性髄膜炎を類似の症状を引き起こす他の疾患、特に、ウイルス性髄膜炎又は脳炎 (ウイルス性髄膜脳炎) 及び神経ボレリア症から区別することに関する。

10

#### 【0010】

伝統的に、低度の髄液細胞増加又は相対的リンパ球増加が非細菌性の原因の徴候であるとして、C S F W B C 数は細菌性髄膜炎の鑑別診断の有用なツールであると考えられてきた。しかしながら、先の研究は、脳神経外科患者における C S F 感染症の診断マーカーとして、1000 細胞超の C S F 髄液細胞増加がわずか 61% の感度及び 68% の特異度を有することを報告した。さらに、細菌性髄膜炎患者の 94% が多形核白血球優位であり、この基準は 28% の特異度しかなかった。

#### 【0011】

さらに、細菌性髄膜炎が臨床上疑われる患者においては、腰椎穿刺の前に抗生物質が導入されることは珍しくなく、グラムスメア又は C S F 培養などの方法を介する迅速な確定診断の機会を減らし、いくつかの場合には、誤って抗生物質治療を長引かせる可能性がある。より重要なのは、細菌感染について陽性の C S F 培養は、一般に、細菌性髄膜炎の診断の究極の判断基準とみなされ、したがって、陰性の培養の場合に誤分類のリスクの可能性があるのである。要するに、細菌性及びウイルス性髄膜炎患者の臨床徴候は非常に類似しており、典型的に脳脊髄液 (C S F) における結果は決定的でない。

20

#### 【0012】

本発明者らは、髄膜炎を有することが疑われる患者における H B P のレベルを最初に調査した。本発明者らは、ウイルス性髄膜炎若しくは脳炎、神経ボレリア症の患者、又は髄膜炎を有さない対照患者に比べて、細菌性髄膜炎患者において H B P レベルが上昇していることを実証した。H B P レベルは、広範囲の異なる細菌感染により引き起こされた髄膜炎を有する患者において上昇する。これは、脳神経外科手術後に獲得された感染を有する患者も含む。術後髄膜炎 / 脳室炎の鑑別診断は困難であるため、脳神経外科設定における診断マーカーとして、H B P は特に有用である。

30

#### 【0013】

被験個体は、典型的に、髄膜炎を有することが疑われる。個体は、典型的に哺乳類である。哺乳類は、典型的にヒト、又はウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ若しくはネコなどの家畜哺乳類である。個体は、好ましくはヒトである。個体は、典型的に髄膜炎を有することが疑われる場合があり、それは、個体が、以下の症状：

発熱 / 嘔吐；激しい頭痛；(幼児では一般的でない) 項部硬直；羞明；音声恐怖；眠気 (患者は典型的に非常に眠い / うつろである / 覚醒が困難である)；精神錯乱 / 狂乱状態；(すべてのケースで存在するわけではない) 体の任意の場所における発疹；発作のうちの一つ又は複数呈するからである。

40

#### 【0014】

個体対象が幼児又は乳児である場合、上記症状はしばしば存在しない。その代わりに、幼児又は乳児は、典型的に髄膜炎を有することが疑われる場合があり、それは、幼児又は乳児が以下の症状：

食べること / 食べ物を与えられることに対する拒絶；(抱かれること / 触られることを望まない) 易刺激性；痙攣様の動きを伴う硬直した体、又はだらしとして立ち上がることができないこと；(生後 6 ヶ月までの対象における) 泉門膨隆；甲高い鳴き声又はうめき

50

声；脚の疼痛；手足の冷え；異常な皮膚の色  
のうちの1つ又は複数を呈するからである。

【0015】

成人においては、激しい頭痛は、およそ90%の細菌性髄膜炎のケースで発生する、最も一般的な髄膜炎の症状である。その次に最も一般的な症状は、成人のケースの70%において発生する、項部硬直（首の凝り）である。古典的な三つ組みの診断徴候は、項部硬直、急な高熱、及び精神状態の変化から成るが、3つの特徴すべてが存在するのは、細菌性髄膜炎のすべてのケースのうちのわずかに44～46%である。3つの徴候のどれも存在しない場合、髄膜炎ではなさそうだと考えられるが、除外はされない。一般的に髄膜炎に付随する他の徴候は、羞明（明るい光に対する不寛容）及び音声恐怖（大きな雑音に対する不寛容）を含む。

10

【0016】

髄膜炎の疑いを引き起こす他の徴候は、陽性のケルニツヒ徴候又はブラジンスキー徴候である。ケルニツヒ徴候は、腰と膝を90°に曲げて仰向けになった患者において評価される。陽性のケルニツヒ徴候を有する患者は、受動的な膝の伸長を痛みが制限する。陽性のブラジンスキー徴候は、首の曲げが膝と腰の不随意の曲げをもたらす場合に発生する。ケルニツヒ及びブラジンスキー徴候がどちらも髄膜炎のスクリーニングのために一般的に使用されるにもかかわらず、これらの試験の感度は制限されている。「振動強調処置（jolt accentuation maneuver）」として知られる他の試験は、発熱及び頭痛を訴えている患者に髄膜炎が存在するか否かを決定することを助ける。患者は、彼又は彼女の頭を水平に迅速に回転させるように命じられ；これが頭痛を悪化させないなら、髄膜炎のおそれはない。

20

【0017】

上記の発疹症状は、典型的に急速に広がる点状出血発疹であって、他の症状に先行しうるものである。発疹は、胴体、下肢、粘膜、結膜、及び（時には）手のひら又はかかどにおける無数の小さく不規則な紫色又は赤い点（「点状出血」）である。発疹は、典型的にブラッシングせず、指又はガラスランナーで押したときに赤みは消えない。かかる発疹は、時には他の細菌による髄膜炎において発生するが、通常は、細菌、髄膜炎菌により引き起こされる（「髄膜炎菌性髄膜炎」として知られる）髄膜炎を有する対象にのみ存在する。

30

【0018】

髄膜炎の疑いを引き起こす他の症状は、そのどちらもが様々な形態のウイルス性髄膜炎に付随する、手足口病及び/又は生殖器ヘルペスの皮膚徴候であってもよい。

【0019】

個体対象は、1つ又は複数のリスク因子の存在により、髄膜炎を有することが疑われる場合がある。髄膜炎のリスク因子は、

- 地域社会環境、特に、多数の個体が初めて一緒に住んでいる環境に住んでいること。例えば、動員中の兵舎；大学キャンパス；
- 頭蓋骨への外傷；特に、脳基底部に影響を与えるか又は洞若しくは錯体突起まで広がる頭蓋骨骨折；
- 解剖学的異常、特に、外部環境と神経系の間連続性を可能とする異常（典型例は、ヘテロトピックな脳組織、髄膜腫、頭蓋底欠陥（例えば、篩骨、側頭骨錐体又は蝶形骨洞）、皮様嚢腫/類表皮嚢腫/皮膚洞管、頭蓋骨リンパ管腫状態、神経腸管嚢腫、内耳異常、又はモンディーニ奇形、又は髄膜瘤若しくは皮膚洞/皮様嚢胞などの腰仙部異常；などの頭蓋若しくは頸部の異常を含む）；
- 蝸牛インプラント；又は脳のシャント若しくは関連装置（例えば、心室外ドレイン又はオマヤ槽）などの他の頭蓋又は脳神経外科インプラントの存在；
- 免疫系の障害/免疫不全、例えば、補体欠損症；
- HIV/AIDsの診断
- 最近の脳神経外科手術、例えば、脳室腹腔シャント若しくは脊髄手術、又はCSF

40

50

漏出をもたらす他の形態の頭蓋若しくは顎顔面手術、又は最近の耳鼻咽喉科学的介入；

- 副鼻腔炎、中耳炎、乳様突起炎、骨髄炎、マフッチ症候群、神経線維腫症1型などの頭部及び/又は頸部における感染症の、最近の又は進行中の診断；

- エンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス1型又は2型、パリセラ・ゾスターウイルス（水痘/帯状疱疹）、ムンプスウイルス、HIV、サイトメガロウイルス、又はLCMVなどの髄膜炎に関連するウイルスの、最近の又は進行中の診断

を含む。

#### 【0020】

本発明は、個体においてHBPLレベルを測定することを含む。HBPLのレベルは、典型的に、個体から得られたサンプル中でインビトロで測定される。サンプルは典型的に、個体の体液を含む。体液サンプルは、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液又は関節滑液のサンプルであってよい。サンプルは、脳脊髄液のサンプルであることが好ましい。

10

#### 【0021】

本発明に従って、ベースラインレベル又は濃度に比べて増加したHBPLのレベル又は濃度は、個体が細菌性髄膜炎を有することを示す。ベースラインレベルは、典型的に、髄膜炎を有することが疑われるが、その後、細菌性髄膜炎を有しないと確認される個体におけるHBPLレベルである。

#### 【0022】

例えば、発明者は、髄膜炎を有することが疑われる個体から得られたCSFサンプル中のHBPL濃度を決定することによってHBPLレベルが測定される場合、その後ウイルス性髄膜炎（ウイルス性髄膜炎又は脳炎）を有することが示される個体は、約4.7 ng/mlのHBPL濃度中央値を有し、その後神経ボレリア症を有することが示される個体は、約3.6 ng/mlのHBPL濃度中央値を有し、髄膜炎の疑いをもたらす症状を呈するが、その後髄膜炎を有さないことが示される個体は、約3.5 ng/mlのHBPL濃度中央値を有する、ということを示した。髄膜炎を有することが疑われるが、細菌性髄膜炎を有さない個体のすべてのカテゴリーに関するHBPL濃度中央値は、約3.6 ng/mlである。

20

#### 【0023】

より詳細には、個体の各カテゴリーに関するng/mlで表した平均HBPL濃度は、以下のとおりである：(i)ウイルス性髄膜炎/脳炎を有する個体(n=29)：平均7.3、中央値4.7、範囲3.0~41.0；(ii)ウイルス性髄膜炎又はボレリアを有する個体(n=36)：平均6.7、中央値4.4、範囲3~41；及び(iii)すべての非細菌性髄膜炎を有する個体(n=133)：平均4.5、中央値3.6、範囲2.4~41。

30

#### 【0024】

したがって、HBPLのベースラインレベル又は濃度は、典型的に、3~5 ng/mlの範囲にある。例えば、HBPLのベースラインレベル又は濃度は、約3 ng/ml、4 ng/ml又は5 ng/mlであってよい。

#### 【0025】

本発明によれば、細菌性髄膜炎の診断に関連するHBPLレベル又は濃度の増加は、ベースラインレベル又は濃度を基準として少なくとも3倍、4倍、5倍又は10倍の増加である。好ましくは、HBPLレベル又は濃度の増加は、ベースラインレベル又は濃度を基準として少なくとも4倍の増加である。

40

#### 【0026】

本発明において、細菌性髄膜炎の診断に関連する増加したHBPLレベル又は濃度は、典型的に、約11 ng/ml超、又は約12 ng/ml、13 ng/ml、14 ng/ml、15 ng/ml、20 ng/ml、23 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、32 ng/ml、35 ng/ml、40 ng/ml、41 ng/ml、42 ng/ml、43 ng/ml、44 ng/ml、45 ng/ml、46 ng/ml、47 ng/ml、48 ng/ml、49 ng/ml、50 ng/ml、51 ng/ml、52 ng/ml

50

、53 ng/ml、54 ng/ml、55 ng/ml、56 ng/ml、57 ng/ml、58 ng/ml、59 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、若しくは900 ng/ml超である。細菌性髄膜炎の診断に関連する増加したHB Pの濃度は、好ましくは、約50 ng/ml超である。

#### 【0027】

##### HB Pの検出

本発明は、典型的に、個体から得られたサンプル中のHB Pレベルをインビトロで測定することによって実施される。サンプルは、典型的に個体の体液を含む。体液サンプルは、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液又は関節滑液であってもよい。サンプルは好ましくは、脳脊髄液サンプルである。

#### 【0028】

サンプルは典型的に、アッセイされる前に、遠心分離などによって処理される。サンプルは、典型的に、アッセイ前に、好ましくは - 70 未満で貯蔵されてもよい。

#### 【0029】

本分野で知られた標準的方法が、HB Pレベルのアッセイに使用されてよい。これらの方法は、典型的にHB Pの検出用の作用物質を用いることを含む。この作用物質は、典型的にHB Pに特異的に結合する。この作用物質は、HB P特異的な抗体、HB Pに結合するアプタマー、例えば、Petersenら、Eur J Biochem 1993; 271~9ページに記載されたアプロチニンなどのセリンプロテイナーゼ阻害剤、又は例えば、Cai and Wright, S. D. J Exp Med 1996; 184: 213~23ページに記載されたインテグリンの可溶性断片であってもよい。特異的に、この作用物質又は抗体が、任意の他の分子、特に任意の他のタンパク質に対するいかなる有意な交差反応性もなく、HB Pに結合することが理解されるであろう。例えば、HB Pに対して特異的な作用物質又は抗体は、ヒト好中球エラスターゼとのいかなる有意な交差反応性も示さない。交差反応性は、任意の好適な方法によって評価されることができる。

#### 【0030】

本発明の方法において使用される抗体は、HB Pに結合可能な全抗体又はその断片のいずれであってもよい。抗体はモノクローナルであってもよい。かかる全抗体は、典型的に、本分野で知られた任意の好適な方法によって作製される抗体である。例えば、ポリクローナル抗体は、哺乳類、典型的にはウサギ又はマウスを好適な条件下でHB Pにより免疫化し、哺乳類の血清などから抗体分子を単離することによって得ることができる。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ又は組換え法によって得ることができる。

#### 【0031】

ハイブリドーマ法は、哺乳類、典型的にはウサギ又はマウスを好適な条件下でHB Pにより免疫化し、次いで、哺乳類の脾細胞を採取し、それらを骨髓腫細胞と融合させることを含む。次いで、融合細胞の混合物は、希釈され、クローンが単一の親細胞から培養される。異なるクローンにより分泌される抗体が、HB Pに結合するそれらの能力に関して試験され、最も繁殖能力があり、安定なクローンが大量に培地中で培養される。分泌された抗体が集められて、精製される。

#### 【0032】

組換え法は、ファージ又は酵母中に、異なるイムノグロブリン遺伝子断片をクローニングして、わずかに異なるアミノ酸配列を有する抗体のライブラリーを作製することを含む。HB Pに結合する抗体を生じさせる配列が選択されることができ、該配列は、産生のために、例えば、細菌細胞系中にクローニングされる。

#### 【0033】

抗体は、典型的に哺乳類の抗体、例えば、霊長類、ヒト、げっ歯類（例えば、マウス又はラット）、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウマ又はラクダ抗体である。抗体は、ラクダ科動物

10

20

30

40

50

又はサメの抗体であってもよい。抗体はナノ体 (nanobody) であってもよい。抗体は、抗体の任意のクラス又はアイソタイプ、例えば、IgM、であってもよいが、好ましくは、IgGである。

#### 【0034】

上記方法において使用されうる全抗体の断片は、抗原結合部位、例えば、Fab若しくはF(ab)<sub>2</sub>断片又はScFvを含む。全抗体又は断片は、2つ以上の断片又は抗体をつなぎ合わせるために使用されうるリンカーなどの他の部分と結合させることもできる。かかるリンカーは、化学的リンカーであってもよく、又は断片若しくは全抗体との融合タンパク質の形態で存在することもできる。したがって、リンカーは、同じ又は異なる結合特異性を有する全抗体又は断片、例えば、同じ又は異なる多型を結合可能なものをつなぎ合わせるために使用することもできる。抗体は、2つの異なる抗原、典型的には、本明細書中で言及される多型の任意の2つに結合可能な二重特異性抗体であってもよい。抗体は、二つの可変ドメインを連続してつなぐことにより形成される「二特異性抗体 (diabody)」であってもよい。上記方法において使用される抗体が、異なる特異性の異なる抗原結合部位を有する上記の形態のいずれかで存在する場合、これらの異なる特異性は、典型的に異なる位置又は異なるタンパク質における多型に対する。一実施態様において、抗体は、異なる自然抗体由来の配列を含むキメラ抗体、例えば、ヒト化抗体である。

10

#### 【0035】

HBPLレベルを評価する方法は、典型的に、HBPに特異的に結合可能な作用物質又は抗体とサンプルを接触させることを含む。かかる方法は、ディップスティックアッセイ及び酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を含む。典型的に、ディップスティックはHBPに特異的に結合する一種又は複数種の抗体又はタンパク質を含む。一種又は複数種の抗体が存在する場合、該抗体は、それらが同時にHBPに結合しうるように、異なる重複しない決定基を有することが好ましい。

20

#### 【0036】

ELISAは、試薬の分離を必要とする不均一な固相アッセイである。ELISAは、典型的にサンドイッチ技術又は競合技術を用いて実施される。サンドイッチ技術は、二種の抗体を必要とする。第一のものは、HBPを特異的に結合し、固相支持体に結合される。二次抗体は、マーカー、典型的には、酵素コンジュゲートに結合する。酵素の基質は、HBP-抗体複合体、したがって、サンプル中のHBPの量を定量するために使用される。抗原競合阻害アッセイも、典型的、支持体に結合したHBP特異的抗体を必要とする。HBP-酵素コンジュゲートが、アッセイされるべき (HBPを含む) サンプルに添加される。HBP-酵素コンジュゲートと非標識HBPの間の競合阻害は、サンプル中のHBP量の定量を可能とする。ELISA反応のための固相支持体は、ウエルを含むことが好ましい。

30

#### 【0037】

本発明は、抗体を含まないHBPの測定方法も使用してよい。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離及び蛍光検出が、HBPLレベルの決定方法として使用されることが好ましい。先に記載されたHPLCの装置及び方法が使用されてよい (Tsikas Dら、J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998 ; 705 : 174 ~ 6 ページ)。HPLCの間の分離は、典型的にサイズ又は電荷に基づいて行われる。典型的には、HPLCの前に内因性アミノ酸及び内部標準 - ホモアルギニンがアッセイサンプルに添加され、これらはCBAカートリッジで相分離抽出される (Varian, Harbor City, CA)。サンプル内のアミノ酸は、o-フタルアルデヒド (OPA) で誘導体化されることが好ましい。アッセイの正確度及び精度は、すべてのアミノ酸に関する品質管理サンプル内で決定されることが好ましい。

40

#### 【0038】

本発明はさらに、個体におけるHBPLレベルを測定し、それによって該個体が細菌性髄膜炎を有するか否かを決定する手段を含む診断キットを提供する。該キットは、典型的に特異的にHBPに結合する一種又は複数種の抗体を含む。例えば、該キットは、モノクロ

50

ーナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、CDR-グラフト化抗体又はヒト化抗体を含んでよい。抗体は、完全なイムノグロブリン分子、又はFab、F(ab')<sub>2</sub>若しくはFv断片などのその断片であってよい。一種超の抗体が存在する場合、該抗体は、それらが同時にHBPに結合しうるように、異なる重複しない決定基を有することが好ましい。

【0039】

上記キットは、さらに、他の実験的又は臨床的パラメータの測定手段を含んでよい。例えば、該キットは、個体におけるWBC数及び/又は乳酸、グルコース及びC反応性タンパク質のうちの1つ若しくは複数のレベル若しくは濃度を測定するための手段を含んでよい。

10

【0040】

上記キットは、さらに、上記の方法の任意の実施態様が実施されることを可能とする他の試薬又は機器の1つ又は複数を含んでよい。かかる試薬又は機器は、好適な緩衝液(単数又は複数)(水溶液)、サンプルからHBPを単離する手段、(針を含む容器又は機器などの)個体からサンプルを得る手段、又はそこで定量的反応が行われうるウエルを含む支持体のうちの1つ又は複数を含む。該キットは、場合により、該キットが本発明の方法において使用されることを可能とする指示書又は上記方法がどの個体において実施されるかについての詳細を含んでよい。

【0041】

治療

20

本発明は、本発明の方法によって細菌性髄膜炎を有することが同定された個体の治療にも関する。したがって、細菌性髄膜炎の治療における使用のための物質は、本発明の方法によって細菌性髄膜炎を有することが同定された個体の治療における使用のための医薬品の製造において使用されてよい。したがって、本発明の方法によって細菌性髄膜炎を有することが同定された個体の状態は、かかる物質の投与によって改善されることができる。細菌性髄膜炎の治療のために有用な物質の治療的有効量が、本発明の方法によってそれを必要とすることが同定された個体に与えられてよい。細菌性髄膜炎の治療に好適な物質は、典型的に、一種又は複数種の抗生物質及び/又は一種又は複数種の静脈内輸液及び/又は一種の抗炎症剤を含む。一種又は複数種の抗生物質は、典型的に広域抗生物質である。該広域抗生物質は、典型的に、一種又は複数種のアミノグリコシド、グリコペプチド、セファロスポリン、フルオロキノロン、リンコサミド、マクロライド、ペニシリン、カルバペネム、スルホンアミド又はテトラサイクリンから選ばれる。例えば、好適な抗生物質は、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、バンコマイシン、セファゾリン、セファレキシン、セファピリン、セフラジン、セフロキシム、セフィキシム、セフォタキシム、セフトジジム、セフトゾキシム、セフトリアキソン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、オフロキサシン、クリンダマイシン、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、アモキシシリン、アンピシリン、アンピシリン-スルバクタム、クロキサシリン、ジクロキサシリン、メズロシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリンGベンザチン、ペニシリンGカリウム、ペニシリンGプロカイン、ペニシリンVカリウム、ピペラシリン、チカルシリン、チカルシリン-クラブラン酸カリウム、イミペネム、メロペネム、ピリメタミン-スルファドキシム、スルファジジン、スルフィソキサゾール、スルフメトキサゾール、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、及びテトラサイクリンを含むが、これらに限定されない。

30

40

【0042】

上記一種又は複数種の抗炎症剤は、典型的に、コルチコステロイド、最も典型的には、デキサメタゾン、ベタメタゾン、ヒドロコルチゾン、又はメチルプレドニソロンである。

【0043】

本発明にかかる細菌性髄膜炎の治療に有用な物質は、典型的に本発明における投与のた

50

めに、医薬として許容可能な担体又は希釈剤とともに処方される。該医薬として許容可能な担体又は希釈剤は、例えば、等張溶液であってよい。例えば、固体経口剤形は、活性物質と一緒に、希釈剤、例えば、ラクトース、デキストロース、サッカロース、セルロース、トウモロコシデンプン又はジャガイモデンプン；滑沢剤、例えば、シリカ、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム若しくはカルシウム、及び/又はポリエチレングリコール；結合剤、例えば、デンプン、アラビアゴム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース又はポリビニルピロリドン；脱凝集剤、例えば、デンプン、アルギン酸、アルギネート又はデンプングリコール酸ナトリウム；沸騰剤；染料；甘味料；レシチン、ポリソルベート、ラウリルサルフェートなどの湿潤剤；及び一般的には、医薬製剤において使用される非毒性で薬理的に不活性な物質を含んでよい。かかる医薬製剤は、知られたやり方、例えば、混合、造粒、打錠、糖被覆、又はフィルム被覆プロセスの手段により製造されてよい。

10

## 【0044】

経口投与用の分散液は、シロップ、エマルジョン又は懸濁液であってよい。シロップは、担体として、例えば、サッカロース、又はグリセリン及び/若しくはマンニトール及び/若しくはソルビトールとともにサッカロースを含んでよい。

## 【0045】

懸濁液及びエマルジョンは、担体として、例えば、天然ゴム、寒天、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース又はポリビニルアルコールを含んでよい。筋肉内注射のための懸濁液又は溶液は、活性物質と一緒に、医薬として許容可能な担体、例えば、滅菌水、オリーブ油、オレイン酸エチル、グリコール、例えば、プロピレングリコール、及び所望により、好適な量の塩酸リドカインを含んでよい。

20

## 【0046】

静脈内投与又は輸注のための溶液は、担体として、例えば、滅菌水を含むことができるが、又は好ましくは、それらは滅菌された水性の等張食塩溶液であってよい。

## 【0047】

細菌性髄膜炎の治療のために使用される物質の治療的有効量が、本発明の方法に従って同定された患者に投与される。例えば、抗生物質の用量は、様々なパラメータ、特に、使用される物質；治療される患者の年齢、体重及び状態；投与経路；及び必要とされる治療計画に従って決定されてよい。さらに、医師は、任意の特定の患者に必要とされる投与経路及び用量を決定することができるであろう。典型的な日用量は、具体的な抗生物質、治療される患者の年齢、体重及び状態、並びに投与の頻度及び経路によって、体重1kgあたり約0.1~50mgである。好ましくは、日用量レベルは、5mg~2gである。該用量は、単一用量として提供してもよく、又は例えば、一定の間隔で服用される、例えば毎日2、3又は4用量が投与される、複数用量として提供してもよい。

30

## 【0048】

以下の実施例は、本発明を例示する：

## 【実施例】

## 【0049】

方法

40

試験対象母集団

二つの異なるコホートからの計174人の患者由来のCSFサンプルを分析した。腰椎穿刺を受けた臨床的に髄膜炎が疑われる159人の成人患者を、2006年3月及び2009年11月にClinic for Infectious Diseases, Lund University Hospital, Swedenにおける前向き研究に登録した。疑われるウイルス性CNS感染症又は神経ボレリア症によるCSF髄液細胞増加を有するが、微生物学的診断が証明されていない14人の患者は除外したため、計145人の患者を含めた。さらに、Clinic for Infectious Diseases, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Swedenにおいて1995年2004年のから間に集めた、細菌性髄

50

膜炎を有する16人の患者及びHSV-1脳炎を有する13人の患者の別の既往コホートを含めた。これは、試験材料、特に前向きに集めた患者材料において不足したHSV-1脳炎患者の数を拡張させるため、及びより珍しい細菌性髄膜炎病原体の数を増加させるためにも行った。HBPの結果を知らない担当医師が、標準的な試験室試験及び微生物学的試験を用いて患者の精密検査及び最終診断を行った。患者を5つの群：1．急性細菌性髄膜炎、2．ウイルス性脳炎、3．ウイルス性髄膜炎、4．神経ボレリア症、5．正常なCSF WBC数を有する対照患者に分類した。

#### 【0050】

細菌性膜炎の分類は、Durandらの基準(N Engl J Med 1993 Jan 7; 328(1): 21~8ページ)に基づき、ここで、適合した臨床的特徴、髄液細胞増加及びa) CSF培養陽性；b) CSF培養陰性(ただし、CSF抗原試験陽性、CSFのグラム染色における細菌の同定、16SrDNA PCR陽性、又は血液培養陽性のいずれかである)のうちの1つが細菌性髄膜炎の診断に必要であった。48時間未満の適切な抗生物質治療を受けた患者のみを含めた。

10

#### 【0051】

ウイルス性CNS疾患の診断は、細菌性CNS感染症を除くウイルス性髄膜炎又は脳炎に適合する症状の急性発症、及びa) CSF中のウイルスDNA又はRNAに関する陽性のPCR結果、或いはb) ダニ媒介脳炎(TBE)ウイルスに関する特異的血清IgM抗体のいずれかに基づいた。神経ボレリア症の診断には、CSF中の特異的B.ブルグドルフェリ(B. burgdorferi)抗体の検出と組み合わせたCSF髄液細胞増加が必要であった。Lund及びGöteborg大学の倫理委員会は試験を許可し、参加者のインフォームドコンセントを得てすべてのサンプルを採取した。

20

#### 【0052】

HBP及び他のCSFマーカーの脳脊髄液中濃度の分析

日常の患者管理の一部として、担当医師がCSFサンプルを集めた。HBP濃度は、常法を用いてELISAにより決定した。すなわち、コーティング緩衝液(0.05M NaHCO<sub>3</sub>、pH9.6)中1.1µg/mLのヒトHBPに対するマウスモノクローナル抗体(2F23A)でマイクロタイプレート(NUNC)をコーティングした。プレートをPBST(0.05% Tweenを含むリン酸緩衝食塩水)で洗浄し、PBST中2%のウシ血清アルブミン(Sigma)でブロッキングした。次いで、サンプル緩衝液(1M NaCl)で1/40に希釈した患者のCSFサンプルを二連でウエルに添加し、37で60分間インキュベートした。各プレートは、既知濃度の組換えヒトHBP(0~600ng/mL)の較正サンプルも含んだ。洗浄後、プレートを、1/7000に希釈したヒトHBPに対するポリクローナルウサギ抗血清とともにインキュベートした。結合した抗体を、ペルオキシダーゼと結合した抗ウサギIgG抗体(Bio-Rad)(1/3000)とともにインキュベートすることによって検出した。プレートを発色させ、常法を用いて405nmにおける光学密度を決定した。各患者サンプル中のHBPのレベルを、二つ組の平均光学密度を計算し、これを標準曲線からの結果に相関させることによって決定した。アッセイの日日変動は、10%未満の変動係数を有した。CSF中のWBC、グルコース、及びタンパク質の分析は、標準的手順であり、Lund及びSahlgrenska University Hospitalにおける臨床化学試験室での日常的試験として実施した。CSFサンプル中の乳酸濃度は、Cobasc501(Amazonas)において製造者の指示に従う試薬で分析した。

30

40

#### 【0053】

統計解析

二つの異なる群の間の比較をノンパラメトリックなマン-ホイットニー(Mann-Whitney)U検定によって行い、二つ超の群の間の比較においては、ノンパラメトリックなクラスカル-ウォリス(Kruskal-Wallis)一元配置ANOVA分析を使用した。0.05未満の両側P値を統計学的に有意であるとみなした。患者群間の相関関係を計算するために、スピアマンのノンパラメトリックな相関係数を使用した。HB

50

Pに関する様々なカットオフレベルを図解するために、受信者操作特性（ROC）曲線及び曲線下面積（AUC）を作図した。AUC値は、95%信頼区間（95%CI）とともに報告する。計算のために、SPSS 14.0ソフトウェアシステム（SPSS）及びGraph-Pad Prism 5.0（Graph-Pad software、La Jolla、CA）を使用した。

#### 【0054】

##### 結果

##### 患者特性

41人の患者が細菌性髄膜炎を有すると分類され、19人はウイルス性脳炎、10人はウイルス性髄膜炎、7人は神経ボレリア症、及び97人は正常なCSF WBC数（ $5 \times 10^6 / L$ 未満）を有し、CNS感染症を有さない対照群とみなされた。人口学的特性（年齢及び性別）は、感染症を有する上記4つの患者群間で類似した（表1）。対照群においては、平均年齢42才（範囲18～85才）で、男性/女性比は41/56であった。対照群における97人の患者のうち39人は、CNS感染症を伴わない発熱と頭痛を有し、後に様々な細菌性及びウイルス性感染症と診断された。細菌性髄膜炎群（ $n = 41$ ）においては、急性の地域感染型細菌性髄膜炎を有する37人の患者及び脳神経外科手術後の術後細菌性髄膜炎を有する4人の患者がいた。23人の患者（56%）はCSF培養で陽性、13人は16SrDNAで陽性、1人はCSF抗原試験で陽性、及び4人の患者は血液培養で陽性であった。細菌性の病因は、肺炎連鎖球菌（ $n = 16$ ）、髄膜炎菌（ $n = 5$ ）、リステリア・モノシトゲネス（*Listeria monocytogenes*）（ $n = 5$ ）、インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）（ $n = 2$ ）、大腸菌（*Escherichia coli*）（ $n = 2$ ）、A群連鎖球菌（group A streptococci）（ $n = 2$ ）、G群連鎖球菌（group G streptococci）（ $n = 2$ ）及びそれぞれ1人の黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、皮膚常在菌（*Staphylococcus epidermidis*）、連鎖球菌（-streptococci）、大便連鎖球菌（*Enterococcus faecalis*）、ゲメラ属（*Gemella*）種、肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）、及び緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）であった。細菌性髄膜炎群の前向き部分では、28日間死亡率は16%であった。ウイルス性CNS感染症の群においては、脳炎を有する19人の患者（HSV-1  $n = 15$ 、TBE  $n = 4$ ）、及び髄膜炎を有する10人の患者（エンテロウイルス  $n = 4$ 、パリセラ-ゾスターウイルス（VZV）  $n = 3$ 、単純ヘルペスウイルス2型（HSV-2）  $n = 2$ 、及びサイトメガロウイルス（Cytomegalovirus）（CMV）  $n = 1$ ）がいた。HSV-1脳炎患者の中では、5人の患者が腰椎穿刺時にアシクロビルによる治療を受けず、腰椎穿刺前のアシクロビル治療の時間の中央値は、48時間（範囲0～8日）であった。

#### 【0055】

##### CSF特性

CSF中の総WBC、ポリ及びモノ数は、両群の間でかなりの重複があったにもかかわらず、ウイルス性CNS感染症及び神経ボレリア症群に比べて細菌性髄膜炎群において有意に高かった（ $p < 0.01$ ）（図1B～D）。また、ウイルス性CNS感染症群中の2人の患者が好中球優位を有した一方、細菌感染症を有する11人の患者（27%）は単核球優位であり、17人の患者（41%）は1000細胞未満の総CSF WBC数を有した（図1B）。CSFタンパク質及び乳酸レベルが、3つの他の群に比べて細菌性髄膜炎群において有意に高かったにもかかわらず（ $p < 0.01$ ）、CSFグルコースレベルは有意に低かった（ $p = 0.01$ ）（図1E～G）。CSF特性を比較した場合、ウイルス性髄膜炎又は脳炎と神経ボレリア症の群の間には有意差はなかった（ $p > 0.05$ ）（図1B～F）。

#### 【0056】

##### HBPのCSFレベル

ウイルス性脳炎（中央値 5.0 ng/mL、範囲 3.0 ~ 41 ng/mL）、ウイルス性髄膜炎（中央値 4.2 ng/mL、範囲 3.1 ~ 40 ng/mL）、神経ボレリア症（中央値 3.6 ng/mL、範囲 3.2 ~ 10 ng/mL）を有する患者及びCSF中の髄液細胞増加を有さない対照群の患者（中央値 3.5 ng/mL、範囲 2.4 ~ 8.7 ng/mL）に比べて、細菌性髄膜炎患者（中央値 376 ng/mL、範囲 12 ~ 858 ng/mL）では、HBPレベルが有意に高かった（ $p < 0.01$ ）（図1A）。

#### 【0057】

細菌性髄膜炎を有する41人の患者のうちの37人（90%）は、50 ng/mL超のHBP濃度を有し、これは、3つの他の群において見出された最高のHBPレベルを上回った（図1A）。50 ng/mL未満のCSF HBPレベルを有する4人の患者の中では、2つのケースにおいてL・モノシトゲネス（L. monocytogenes）に関してCSF培養が陽性であり、1人の患者においてインフルエンザ菌に関してCSF抗原試験が陽性であり、1人の患者においては、A群連鎖球菌に関して血液培養が陽性であった（図2）。41人の患者のうちの15人において、抗生物質の導入前にCSFサンプルを集めた。11人、8人及び7人の患者が、それぞれ、CSFサンプル収集の1~12、12~24及び24~48時間前に適切な抗生物質治療を受けた。サンプリングの24時間前まで抗生物質治療を受けた26人の患者のうち、24人は50 ng/mL超のHBPレベルを有した。すべてが上昇したHBPレベルと結びついた、14の異なる細菌性病原体を見出した。6人の非生存者すべてが上昇したHBPレベルを有した（385 ng/mL超）（図2）。

10

20

#### 【0058】

ウイルス感染症の群において見出された最高のHBPレベルは、HSV-1脳炎を有する1人の患者（41 ng/mL）及びHSV-2髄膜炎を有する他の患者（40 ng/mL）においてであった（図1A）。HSV-1/2感染患者におけるアシクロビル処置の持続時間とHBP、乳酸、WBC、ポリ又はモノのレベルの間に相関関係はなかった。

#### 【0059】

細菌性髄膜炎の検出のために、50 ng/mLのカットオフレベルは90%の感度と100%の特異度を有した。受信者操作特性（ROC）曲線は、HBPに関して0.994の曲線下面積（AUC）値を示し、それを、この試験において細菌性髄膜炎と非細菌性髄膜炎又は神経ボレリア症の間の鑑別における最良のマーカースとしており、次いで、乳酸及び好中球（ポリ）が続く（図3）。HBPと乳酸、WBC、ポリ、モノ、タンパク質及びICU滞在日数の間には有意な相関関係（ $p < 0.01$ ）があった。

30

40

#### 【0060】

##### 考察

CNSの細菌性及びウイルス性感染症を有する患者の臨床的特徴には非常に類似しており、CSFにおける結果は決定的なものではないかも知れない。これは、CSF中の好中球由来HBPの存在を調査した最初の研究であり、私たちの知見は、HBPが細菌性及びウイルス性CNS感染症を有する患者の間の差別化における有用な診断マーカースであることを示す。伝統的に、CSF中の髄液細胞増殖は、細菌性及びウイルス性病因の鑑別における有用なツールと考えられており、低度の髄液細胞増殖又は相対的リンパ球増加は非細菌性の起源を示す。しかしながら、明白なCSF髄液細胞増殖のない細菌性髄膜炎の確認された症例が数報あったことを認識するのは重要である。Rossら（J Neurosurg 1988 Nov; 69(5): 669~74ページ）は、 $1000 \times 10^6$ 細胞/L超のCSF髄液細胞増殖は、術後の脳神経外科手術患者におけるCSF感染症の診断マーカースとしてわずかに61%の感度と68%の特異度しか有さなかったことを報告した。さらに、細菌性髄膜炎患者の94%が好中球優位であったにもかかわらず、この基準は、わずかに28%の特異度しか有さなかった。私たちの試験においては、細菌性髄膜炎患者の61%とウイルス性CNS感染症を有するものの3%が、 $1000 \times 10^6$ 細胞/L超のCSF髄液細胞増殖を有した。好中球優位は、細菌性髄膜炎患者とウイルス性CNS感染症患者のそれぞれ、73%と7%で見出された。

50

## 【0061】

細菌性髄膜炎の臨床的疑いを有する患者において、腰椎穿刺の前に抗生物質が導入されることは珍しくなく、微生物学的診断の機会を減らし、いくつかのケースでは抗生物質治療を長引かせる可能性がある。これは、本試験においても見られ、患者の64%が腰椎穿刺の48時間前まで抗生物質を受容した。しかしながら、これらの26人の患者のうち24人はなお50 ng/mL超のHB Pレベルを有した。陽性のCSF培養は、細菌性髄膜炎の診断における究極の判断基準であり、培養陰性の場合に誤分類のリスクの可能性がある。CSF培養陽性の23人の患者のうち21人が上昇したHB Pレベル(50 ng/mL超)を有したことは、さらに、診断マーカーとしてのHB Pの使用を支持する。興味深い発見は、B・ブルグドルフェリにより引き起こされた亜急性細菌性髄膜炎を有する患者が、CSF中のHB Pレベルが低かったということである。神経ボレリア症患者はしばしば、比較的軽度な疾患を有し、入院することは稀である。細菌性髄膜炎群においては、最も一般的な細菌性病原体は、他の研究によれば、肺炎連鎖球菌、髄膜炎菌及びL・モノシトゲネスであった。しかしながら、この試験における患者の間では、14の異なる細菌種が発見されており、これらすべてのケースで顕著なHB P放出が誘発された。したがって、ほとんどの細菌種は、この特異的な好中球活性化が可能であると見られ、それは、重篤な敗血症を有する患者においても示されている。細菌性髄膜炎群の中の4人の患者は、緑膿菌、大腸菌、大便連鎖球菌及びS・エピデルミジス(S・epidermidis)により引き起こされた脳神経外科手術後のCNS感染症を有し、すべての患者は上昇したHB Pレベルを有した。術後髄膜炎/脳室炎の診断は、挑戦的な診断であることができ、したがって、HB Pは脳神経外科設定において特別に有用なマーカーとなるであろう。

10

20

## 【0062】

4人の細菌性髄膜炎患者は、50 ng/mL未満のHB Pレベルを有した。1人は、血液培養において発見されたA群連鎖球菌によって引き起こされ、もう1人は、陽性の抗原試験によって診断されたインフルエンザ菌により引き起こされた。これらの患者はどちらもCSF培養陰性であった。これらのケースそれぞれにおいて、CSFの総WBC数は、300及び700×10<sup>6</sup>/Lであり、乳酸レベルは2.7及び2.1 mmol/Lであり、CSFサンプルは、適切な抗生物質治療の24から48時間後の間に集められた。50 ng/mL未満のHB Pレベルを有する他の2人の患者は、L・モノシトゲネスによる細菌性髄膜炎を有し、CSF培養陽性であり、サンプルは、抗生物質導入時点で集めた。CSF乳酸レベルは、2.8及び3.9 mmol/L、並びにCSF WBCは、1000×10<sup>6</sup>/L超であった。L・モノシトゲネスは、髄膜炎及び脳炎の両方をヒトにおいて引き起こす通性細胞内細菌であり、他の一般的な細菌性髄膜炎病原菌とは、その侵入メカニズム及びその後のライフサイクルにおいて異なる。計5人の患者がL・モノシトゲネス髄膜炎と診断された。彼らのうち、HB Pレベルが緩やかにしか上昇しなかった2人の患者は、意識が正常でICU治療を必要としない、より良性の疾患も有した。ウイルス性CNS感染症群においては、2人の患者が他よりもかなり高いHB P濃度(41 ng/mL及び40 ng/mL)を有した。1人は、CSF中で、496×10<sup>6</sup>/Lの総WBC及び6.6 mmol/Lの顕著に上昇した乳酸レベルを伴うHSV-2髄膜炎を有した。他の患者は、緩やかに上昇したCSF-WBC(84)及び-乳酸(2.3)レベルを伴うHSV-1脳炎を有した。どちらもアシクロビル治療により合併症のない経過をたどった。

30

40

## 【0063】

HB Pは、血管漏出と浮腫瘻性を誘発し、脳浮腫は、細菌性髄膜炎における重篤で時には致死的な合併症である。先の研究と同様、この試験の前向き部分における死亡率は16%であった。しかしながら、すべての非生存者が強力に上昇したHB Pレベルを有した(385 ng/mL超)。その後の血管漏出を伴うHB Pの内皮細胞に対する効果を考慮すると、これは、細菌性髄膜炎での脳浮腫の発生におけるHB Pの役割を示している。先の研究は、ヘパリン及びモノクローナルCD18抗体の両方による治療が、HB P放出に關与する好中球上の2-インテグリン受容体をブロックすることを示している。これらの

50

治療は、白血球のローリング、接着及び活性化を阻害し、肺炎球菌髄膜炎のラット及びウサギモデルにおいて脳浮腫及び死亡率を低下させる。この効果は、HBPにより誘発された血管漏出の阻止に関連しうると仮定される。

【0064】

結論として、この試験は、急性の細菌性髄膜炎患者においてCSF中のHBPが上昇していることを示す。細菌性及びウイルス性CNS感染症の鑑別におけるより良好な診断正確度は、臨床医が適切な治療をより早期に開始することを可能とするであろう。

【表1】

表1. 被験母集団の特徴

「最初の抗生物質治療」は、急性の細菌性髄膜炎が疑われて最初の抗生物質を受容する患者を意味する。

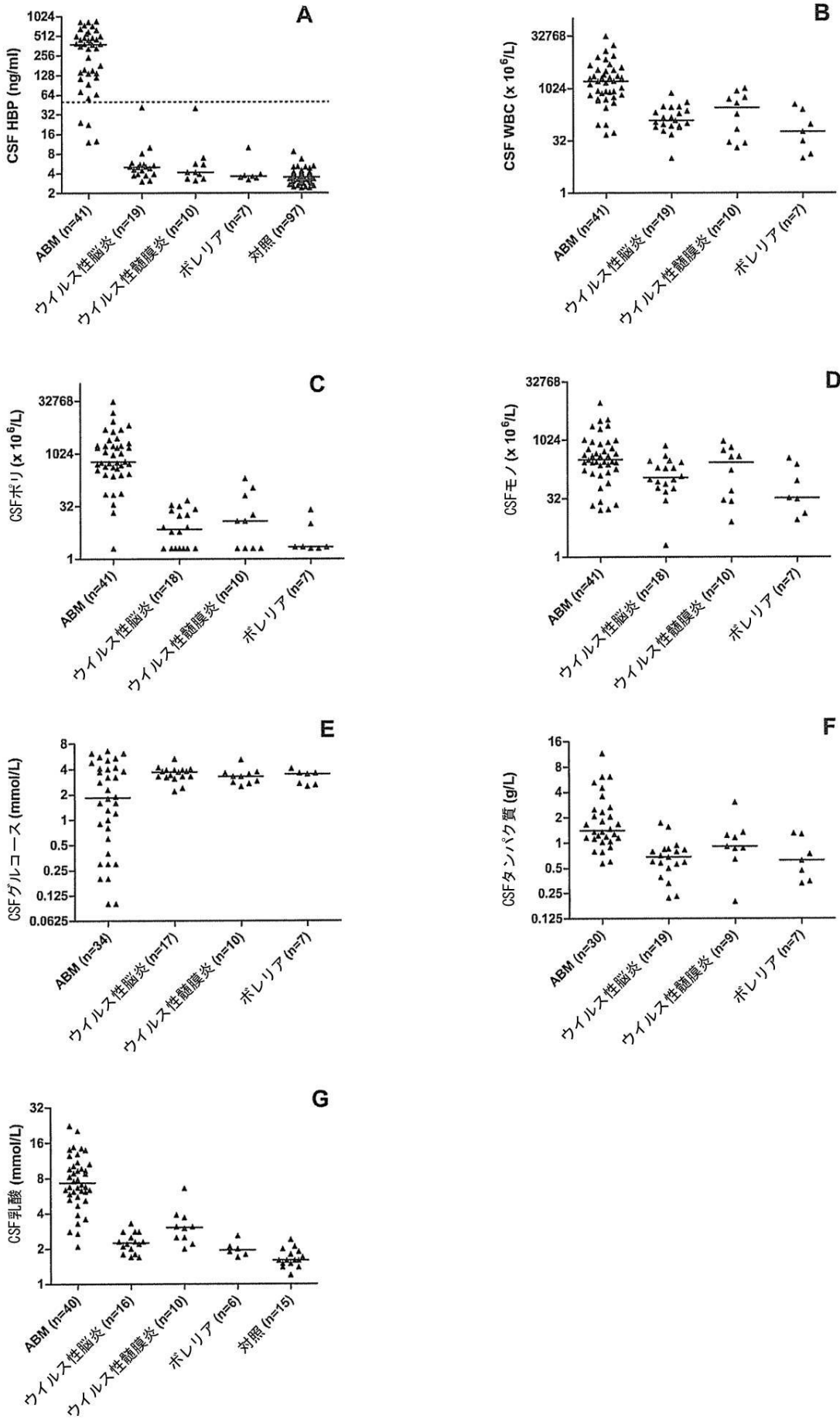
特徴	細菌性髄膜炎 (n=41)	ウイルス性 脳炎 (n=19)	ウイルス性 髄膜炎 (n=10)	神経 ボレリア症 (n=7)
性別 (M/F)	20/21	10/9	6/4	3/4
年齢 (平均、(範囲))	51 (18-82)	55 (30-80)	43 (22-83)	53 (18-74)
ステロイド治療-数 (%)	25 (61)	6 (32)	1 (10)	0
最初の抗生物質治療-数 (%)	39 (95)	7 (37)	3 (30)	1 (14)
サンプル採取前の抗生物質治療-数 (%)	26 (64)	8 (42)	2 (20)	0
併存疾患-数 (%)	21 (51)	4 (21)	1 (10)	2 (29)
入院の長さ (日数) (平均、(範囲))	18.8 (3-40)	19.3 (10-39)	5.9 (0-18)	5 (4-6)
ICU内の患者数-数 (%)	36 (88)			

10

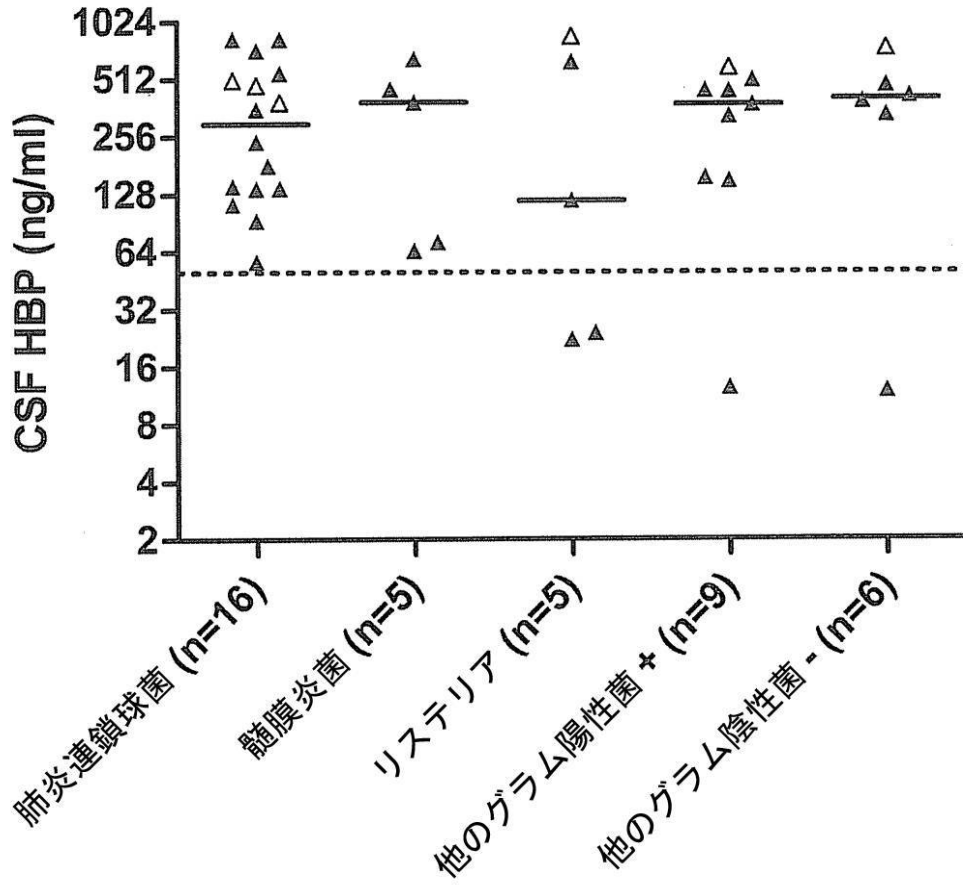
20

30

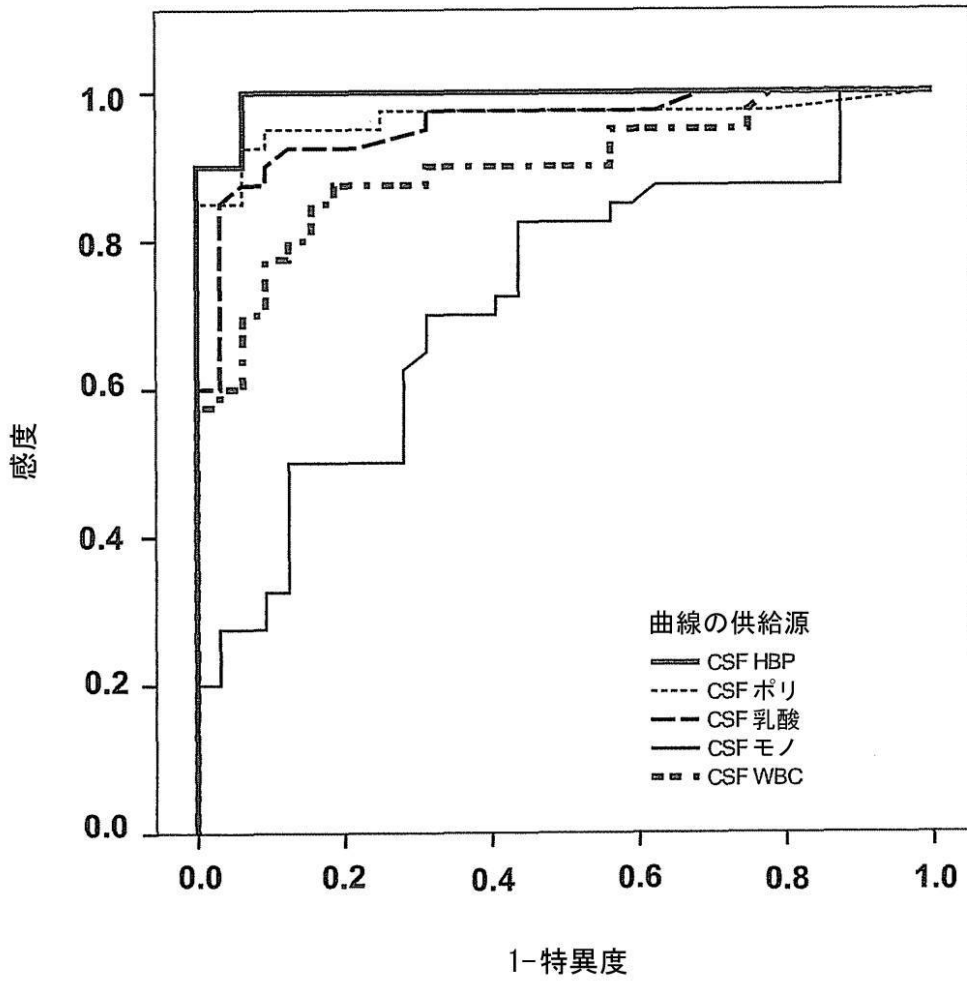
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 配列表 】

2013543581000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/066611
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/569 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2008/151808 A1 (HANSA MEDICAL AB [SE]; BJORCK LARS [SE]; CHRISTENSSON BERTIL [SE]; HER) 18 December 2008 (2008-12-18) page 10, line 19 - page 13, line 23 -----	13,14,17  1-12,15, 16
X A	TAPPER H ET AL: "Secretion of heparin-binding protein from human neutrophils is determined by its localization in azurophilic granules and secretory vesicles", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 99, no. 5, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 1785-1793, XP002275785, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD.V99.5.1785 Paragraph bridging p.1786-1787 -----	13,14,17  1-12,15, 16
-/--		
<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 document 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		Date of mailing of the international search report
15 December 2011		09/01/2012
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  Stricker, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/066611

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/016653 A2 (LEUKOTECH AS [DK]; DJURUP RENE [DK]; FLODGAARD HANS JAKOB [DK]; NORRIS) 26 February 2004 (2004-02-26)	13,14,17
A	abstract; claims page 25	1-12,15, 16
X	LINDER ADAM ET AL: "Heparin-binding protein: an early marker of circulatory failure in sepsis.", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES : AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA 1 OCT 2009 LNKD-PUBMED:19725785, vol. 49, no. 7, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 1044-1050, XP002665801, ISSN: 1537-6591	13,14,17
A	abstract page 1045, column 2, paragraph 2 table 1	1-12,15, 16
A	WO 2007/068830 A1 (ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS [FR]; CHALUMEAU MARTIN [FR]) 21 June 2007 (2007-06-21) abstract; claims	1-17
A	WO 98/32390 A1 (UAB RESEARCH FOUNDATION [US]) 30 July 1998 (1998-07-30) abstract; claims	1-17
X,P	LINDER ADAM ET AL: "Heparin-binding protein: a diagnostic marker of acute bacterial meningitis.", CRITICAL CARE MEDICINE APR 2011 LNKD-PUBMED:21200320, vol. 39, no. 4, April 2011 (2011-04), pages 812-817, XP009154797, ISSN: 1530-0293 the whole document	1-17
A,P	MARISCALCO M MICHELE: "Heparin-binding protein: another neutrophil granule protein ... another new biomarker?", CRITICAL CARE MEDICINE APR 2011 LNKD-PUBMED:21613851, vol. 39, no. 4, April 2011 (2011-04), pages 910-911, XP009154796, ISSN: 1530-0293 the whole document	1-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/066611

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008151808	A1	18-12-2008	AU 2008261252	A1 18-12-2008
			CA 2690067	A1 18-12-2008
			CN 101687023	A 31-03-2010
			EP 2129391	A1 09-12-2009
			JP 2010529468	A 26-08-2010
			KR 20100021578	A 25-02-2010
			US 2010305185	A1 02-12-2010
			WO 2008151808	A1 18-12-2008
WO 2004016653	A2	26-02-2004	AU 2003250810	A1 03-03-2004
			EP 1581556	A2 05-10-2005
			WO 2004016653	A2 26-02-2004
WO 2007068830	A1	21-06-2007	AT 475096	T 15-08-2010
			CA 2633912	A1 21-06-2007
			EP 1977244	A1 08-10-2008
			ES 2352045	T3 15-02-2011
			FR 2894675	A1 15-06-2007
			PT 1977244	E 11-11-2010
			SI 1977244	T1 28-02-2011
			US 2009221021	A1 03-09-2009
			WO 2007068830	A1 21-06-2007
			WO 9832390	A1
AU 6250398	A 18-08-1998			
CA 2281506	A1 30-07-1998			
EP 0973456	A1 26-01-2000			
US 5778895	A 14-07-1998			
WO 9832390	A1 30-07-1998			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72)発明者 リンデル、アダム  
スウェーデン国、ルンド、リタレグレンデン 10

(72)発明者 オケソン、ペル  
スウェーデン国、ルンド、ストゥーデントガタン 25

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB30 DA36

4C084 AA17 MA16 MA17 MA22 MA23 MA35 MA52 MA66 NA05 NA14  
ZB352

4H045 BA09 EA52

专利名称(译)	治疗细菌性脑膜炎的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013543581A</a>	公开(公告)日	2013-12-05
申请号	JP2013529664	申请日	2011-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	汉萨医疗公司		
申请(专利权)人(译)	汉莎医疗激活宝来获得		
[标]发明人	ビエルクラルス クリステンソンベルティル ハーヴァルトヘイコ リンデルアダム オケソンベル		
发明人	ビエルク、ラルス クリステンソン、ベルティル ハーヴァルト、ヘイコ リンデル、アダム オケソン、ベル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 A61K45/00 A61P31/04 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/56944 G01N33/6893 G01N2333/4721		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D A61K45/00 A61P31/04 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB30 2G045/DA36 4C084/AA17 4C084/MA16 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB352 4H045/BA09 4H045/EA52		
优先权	2010016161 2010-09-24 GB		
其他公开文献	JP2013543581A5 JP5891230B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

已经证明，患有细菌性脑膜炎的个体中HBP水平增加。因此，个体中HBP的水平可用于确定个体是否患有细菌性脑膜炎。

特徴	細菌性髄膜炎 (n=41)	ウイルス性 脳炎 (n=19)	ウイルス性 髄膜炎 (n=10)	神経 ボレリア症 (n=7)
性別 (M/F)	20/21	10/9	6/4	3/4
年齢(平均、(範囲))	51 (18-82)	55 (30-80)	43 (22-83)	53 (18-74)
ステロイド治療-数 (%)	25 (61)	6 (32)	1 (10)	0
最初の抗生物質治療- 数 (%)	39 (95)	7 (37)	3 (30)	1 (14)
サンプル採取前の 抗生物質治療-数 (%)	26 (64)	8 (42)	2 (20)	0
併存疾患-数 (%)	21 (51)	4 (21)	1 (10)	2 (29)
入院の長さ(日数) (平均、(範囲))	18.8 (3-40)	19.3 (10-39)	5.9 (0-18)	5 (4-6)
ICU内の患者数-数 (%)	36 (88)			