

## 同意文書

自主臨床試験課題名：冠動脈カテーテル治療後再狭窄の新規バイオマーカー（BNP 断片比）の探索的臨床的試験

### <説明事項>

1. はじめに：自主臨床試験について
2. この試験の目的
3. この試験の方法
4. この試験の予定参加期間
5. この試験への予定参加人数
6. この試験への参加により予想される効果と起こるかもしれない副作用
7. この試験に参加しない場合の、他の治療方法
8. この試験中に、あなたの健康に被害が生じた場合について
9. この試験への参加は、患者さんの自由意思によること
10. この試験に関する情報は、随時ご連絡すること
11. この試験を中止させていただく場合があること
12. この試験に参加された場合、あなたのカルテなどが試験中あるいは試験終了後に調査されることがあること
13. この試験結果が公表される場合でも、あなたの身元が明らかになることはないこと
14. この試験への参加に同意された場合に守っていただくこと
15. あなたの費用負担について
16. 知的財産権と利益相反について
17. 担当医師
18. 相談窓口

### 【患者さんの署名欄】

私はこの試験に参加するにあたり、上記の事項について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容等を十分理解いたしましたので、本試験に参加することに同意します。

同意日：平成 年 月 日 患者ID：\_\_\_\_\_

患者氏名：\_\_\_\_\_（自署）

### 【医師の署名欄】

私は、上記患者さんに、この自主臨床試験について十分に説明いたしました。

説明日：平成 年 月 日 所属：\_\_\_\_\_

氏名：\_\_\_\_\_（自署）

## 同意文書

自主臨床試験課題名：冠動脈カテーテル治療後再狭窄の新規バイオマーカー（BNP 断片比）の探索的臨床的試験

### <説明事項>

1. はじめに：自主臨床試験について
2. この試験の目的
3. この試験の方法
4. この試験の予定参加期間
5. この試験への予定参加人数
6. この試験への参加により予想される効果と起こるかもしれない副作用
7. この試験に参加しない場合の、他の治療方法
8. この試験中に、あなたの健康に被害が生じた場合について
9. この試験への参加は、患者さんの自由意思によること
10. この試験に関する情報は、随時ご連絡すること
11. この試験を中止させていただく場合があること
12. この試験に参加された場合、あなたのカルテなどが試験中あるいは試験終了後に調査されることがあること
13. この試験結果が公表される場合でも、あなたの身元が明らかになることはないこと
14. この試験への参加に同意された場合に守っていただくこと
15. あなたの費用負担について
16. 知的財産権と利益相反について
17. 担当医師
18. 相談窓口

### 【患者さんの署名欄】

私はこの試験に参加するにあたり、上記の事項について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容等を十分理解いたしましたので、本試験に参加することに同意します。

同意日：平成 年 月 日 患者ID：\_\_\_\_\_

患者氏名：\_\_\_\_\_（自署）

### 【医師の署名欄】

私は、上記患者さんに、この自主臨床試験について十分に説明いたしました。

説明日：平成 年 月 日 所属：\_\_\_\_\_

氏名：\_\_\_\_\_（自署）

## 同意文書

自主臨床試験課題名：冠動脈カテーテル治療後再狭窄の新規バイオマーカー（BNP 断片比）の探索的臨床的試験

### <説明事項>

1. はじめに：自主臨床試験について
2. この試験の目的
3. この試験の方法
4. この試験の予定参加期間
5. この試験への予定参加人数
6. この試験への参加により予想される効果と起こるかもしれない副作用
7. この試験に参加しない場合の、他の治療方法
8. この試験中に、あなたの健康に被害が生じた場合について
9. この試験への参加は、患者さんの自由意思によること
10. この試験に関する情報は、随時ご連絡すること
11. この試験を中止させていただく場合があること
12. この試験に参加された場合、あなたのカルテなどが試験中あるいは試験終了後に調査されることがあること
13. この試験結果が公表される場合でも、あなたの身元が明らかになることはないこと
14. この試験への参加に同意された場合に守っていただくこと
15. あなたの費用負担について
16. 知的財産権と利益相反について
17. 担当医師
18. 相談窓口

### 【患者さんの署名欄】

私はこの試験に参加するにあたり、上記の事項について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容等を十分理解いたしましたので、本試験に参加することに同意します。

同意日：平成 年 月 日 患者ID： \_\_\_\_\_

患者氏名： \_\_\_\_\_（自署）

### 【医師の署名欄】

私は、上記患者さんに、この自主臨床試験について十分に説明いたしました。

説明日：平成 年 月 日 所属： \_\_\_\_\_

氏名： \_\_\_\_\_（自署）

2014/01/23

## 試験審査結果通知書

実施医療機関の長  
東京大学医学部附属病院  
病院長 門脇 孝 殿

臨床試験審査委員会  
名称 東京大学医学部附属病院臨床試験審査委員会  
所在地 東京都文京区本郷7丁目3番1号  
委員長 南学 正臣

審査依頼のあった件についての審査した結果を下記のとおり通知いたします。

記

試験課題名	冠動脈カテーテル治療後再狭窄の新規バイオマーカー（BNP断片比）の探索的臨床試験
審査事項 (審査資料)	<p>■試験の実施の適否 (自主臨床試験および未承認薬等の臨床使用申請書(2014/01/07 付様式第2号))</p> <p><input type="checkbox"/>試験の継続の適否 <input type="checkbox"/>重篤な有害事象 (重篤な有害事象の報告書(西暦 年 月 日付様式第11号))</p> <p><input type="checkbox"/>安全性情報等 (新たな安全性情報の報告書(西暦 年 月 日付様式第12号))</p> <p><input type="checkbox"/>試験に関する変更 (一部変更申請書(西暦 年 月 日付様式第10号))</p> <p><input type="checkbox"/>緊急の危険を回避するための試験実施計画書からの逸脱 (緊急の危険を回避するための試験実施計画書からの逸脱に関する報告書(西暦 年 月 日付様式第13号))</p> <p><input type="checkbox"/>継続審査 (試験実施状況報告書(西暦 年 月 日付様式第9号))</p> <p><input type="checkbox"/>その他( )</p>
審査区分	<p><input checked="" type="checkbox"/>委員会審査 (審査日: 2014/01/23 )</p> <p><input type="checkbox"/>迅速審査 (審査終了日: )</p>
審査結果*	<p><input type="checkbox"/>承認 <input checked="" type="checkbox"/>修正の上で承認 <input type="checkbox"/>却下 <input type="checkbox"/>既承認事項の取り消し <input type="checkbox"/>保留</p>
指示事項および理由・条件等*	<p>試験実施計画書および説明文書について、当日提出された修正案のとおり修正すること。</p> <p>回答書の提出の要否 [ <input checked="" type="checkbox"/>要 <input type="checkbox"/>否 ]</p>
備考	

\*未承認薬等の臨床使用の場合は、「(臨床)試験」とあるのを「(臨床)使用」と適宜読み替えるものとする。  
\*「修正の上で承認」とは正式な承認ではない。回答書の提出「要」となった場合は、試験開始前に必ず対応すること。  
修正が済み文書が必要な場合は、回答書とともに提出すること。

2014/01/23

治験責任医師 ユビキタス予防医学講座・鈴木亨 殿

依頼のあった試験に関する審査事項について上記のとおり決定しましたので通知いたします。

実施医療機関の長  
東京大学医学部附属病院  
病院長 門脇 孝

### 臨床試験審査委員会の指示事項への回答書

東京大学医学部附属病院臨床試験審査委員会委員長 殿

ユビキタス予防医学講座

試験責任医師

職名・氏名 特任准教授 鈴木 亨



下記のとおり、西暦 2014 年 1 月 23 日に(修正の上承認) 保留として指示事項等のあった試験について以下のごとく回答します。

記

整理番号	P2013048-11Y	
試験課題名	冠動脈カテーテル治療後再狭窄の新規バイオマーカー (BNP 断片比) の探索的臨床試験	
指示事項	試験実施計画書および説明文書について、当日提出された修正案のとおり修正すること。	
回答	試験実施計画書および説明文書について、当日提出した修正案のとおり修正した。訂正後の試験実施計画書および説明文書を添付する。  (同意説明文書等の訂正を行った場合は、訂正後のものを添付する)	
備考	説明文書・同意文書第 2 版 (2011 年 1 月 29 日)	
確認欄 確認日、確認印	臨床研究支援センター 荒川 義弘 (印) 西暦 2014 年 2 月 4 日	臨床試験審査委員会委員長* [Signature] 西暦 2014 年 2 月 5 日 (印)

上記の試験において、以上の修正が適切に修正されていることを確認いたしました。

西暦 2014 年 02 月 05 日

病院長

\*条件付き承認時の回答の場合に使用

未承認薬等の臨床使用の場合は、「(臨床) 試験」とあるのを「(臨床) 使用」と適宜読み替えるものとする。

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
相澤 健一	動脈硬化のバイオマーカー	循環器内科	75(2)	234-240	2014
相澤 健一	診断マーカーと測定しておくべき血液検査	medicina	51(4)	616-620	2014
Fujimoto H, Suzuli T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Komuro I, Nagai R	Processed B-type natriuretic peptide is a biomarker of post-interventi restenosis in ischemic heart disease.	Clin Chem	59(9)	1330-7	2013
相澤 健一, 鈴木 亨	新しい動脈硬化のバイオマーカー開発 : 新しいプロテオーム技術を用いて(3. 動脈硬化のバイオマーカーの臨床的意義, <特集>第76回日本循環器学会学術集会)	循環器専門医 : 日本循環器学会専門医誌	20(2)	237-244	2012
相澤 健一, 鈴木 亨	バイオマーカーの探索・発見・同定の試 (5. 今後のバイオマーカーの展望, 特集: 循環器病のバイオマーカー企画・構成 / 井上晃男)	Heart View	16(12)	306-310	2012

### III. 研究成果の刊行物・別刷





## 解説

# 動脈硬化のバイオマーカー\*

相澤 健 一<sup>\*\*,\*\*\*</sup>

**Key Words** : atherosclerosis, biomarker, restenosis, BNP, mass-spectrometry

### はじめに

成人発症の心血管疾患におけるバイオマーカーは診断・治療に際し、必須の役割を果たし、その必要性は増加の一途である。過去の基礎研究の発展により、動脈硬化の形成過程に関与するさまざまな変性蛋白質が明らかになり、心血管疾患の病理進展の背景に対するわれわれの理解は深まったが、その中でバイオマーカーの果たしてきた役割は大きい。一例として、動脈硬化の進展因子となる血中酸化LDLの測定法が開発され、臨床現場でも利用可能となった。

ヒトゲノム配列解析により、生体において生理活性を有す分子は遺伝子ではなく蛋白質であり、蛋白質は相互作用、翻訳後修飾、プロセッシングなどで制御されていることが判明した。蛋白質解析は遺伝子に比べ複雑で困難なため遅れを取ってきたが、近年の質量分析装置の飛躍的な発達により現実のものになりつつある。最近10年間においてはプロテオミクス(質量分析)などの、より新しい技術が注目されている。われわれはこの分野に新しい技術(免疫質量分析法、プロテインチップ法)を導入し、その臨床応用を行ってきた。

最近われわれは、冠動脈再狭窄の除外診断に役立つ有望なバイオマーカーを開発した。この

アッセイは心臓特異的 B 型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)がプロセスされたペプチド産物を、末梢血から質量分析計で測定するものであり、感度100%で再狭窄の除外診断が可能となる信頼できる結果を得た。本結果は循環器領域ではじめてのプロテオームを用いたバイオマーカーとして臨床応用可能となる見込みである。

本稿では、動脈硬化を中心とし、心血管疾患におけるプロテオミクス解析技術を用いた最近の研究の成果と、同技術を心血管病態の解析(バイオマーカーなど)を中心とした医療に応用する試みを中心に概説する。

### 動脈硬化とバイオマーカー

心血管疾患におけるバイオマーカーは診断・治療に際し、必須の役割を果たし、その必要性は増加の一途である。蛋白質は発現調節、プロセッシング、化学修飾、相互作用などの多段階にわたる制御を受けるが、病態・老化変性などの場合、さらに経時的変化による制御が加わる。代表的な病態である動脈硬化は多因子が関与する複雑な病態である。脂質異常のみならず、血管内皮細胞機能障害、血管平滑筋細胞障害、脂肪細胞の機能不全、炎症、石灰化などさまざまな要素が関係する。なかでも、メタボリックシンドロームを背景として発症する心血管疾患な

\* Biomarkers for atherosclerosis.

\*\* Kenichi AIZAWA, M.D., Ph.D.: 東京大学大学院医学系研究科循環器内科[〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1]; Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, JAPAN

\*\*\* 朝日生命成人病研究所循環器科[〒103-0002 東京都中央区日本橋馬喰町2-2-6]; The Institute for Adult Diseases, Asahi Life Foundation, Tokyo 103-0002, JAPAN

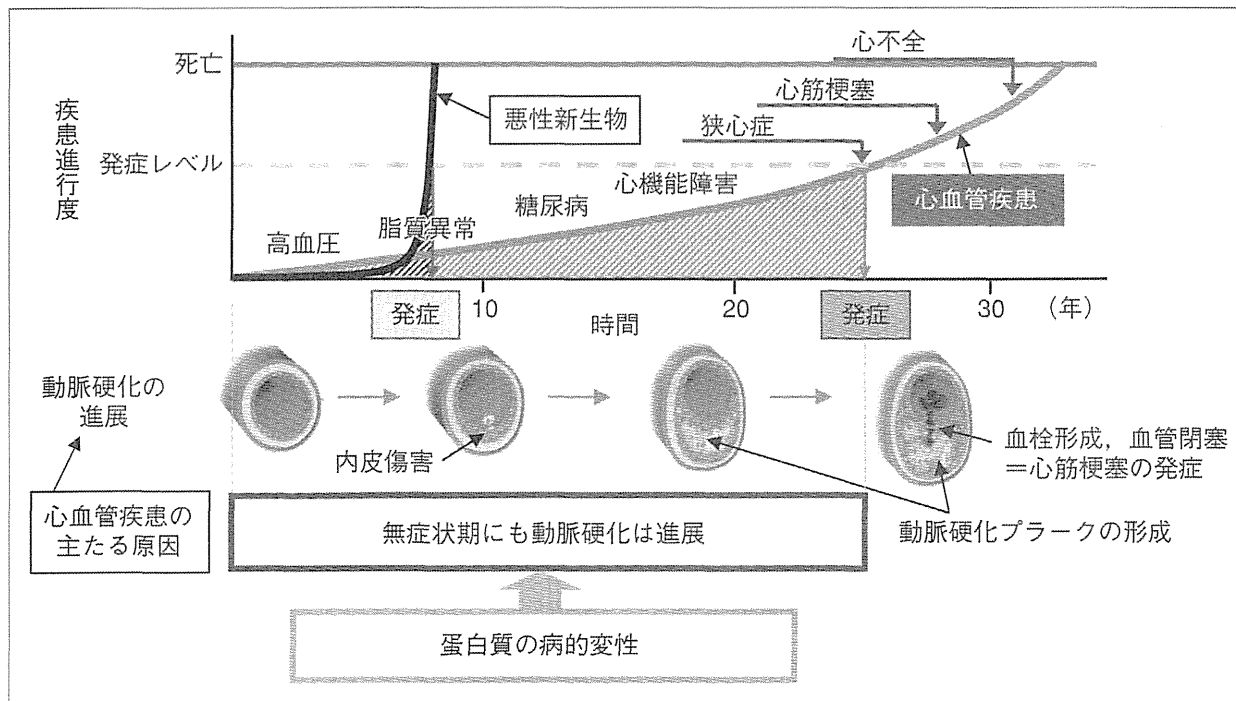


図1 心血管病の形成過程と蛋白質の変性

心血管疾患などの生活習慣病は、発症前に非常に長い潜伏期間を有すが、この間に経年的な蛋白質の変性が進行する。

どの生活習慣病は、その発症前に非常に長い潜伏期間を有すが、この間に経年的な蛋白質の変性に基づく病態が進行する。このように、長い潜伏期間において蛋白質は、発現調節、プロセッシング、化学修飾、相互作用などの多段階にわたる制御を受けるが、病態・老化変性などの場合、さらに経時的変化による制御が加わる。このように、長い潜伏期間における蛋白質の酸化修飾・変性は、疾患発症において中心的な役割を果たす(図1)。よって、蛋白質の質的・量的変化の時空間的な制御の理解は、ヒトの多様性や疾患発症の個人差をはじめテーラーメイド(個別化)医療の解明の鍵となると考えられる。特に成人後に発症する動脈硬化を背景とした疾病(心血管疾患, 生活習慣病)については、発症時期の情報として蛋白質の動態ならびにその変化に関する情報は重要である。

### 動脈硬化病変における多様なLDLの変性と酸化LDLの測定

低密度リポ蛋白質(low density lipoprotein : LDL)は多様な酸化修飾を受ける。LDLは540 kDの巨大分子であるアポ蛋白 B(アポ B)とコレス

テロール, リン脂質, 中性脂肪などの脂質から構成され, 活性酸素により不飽和脂質の過酸化が生じる。この過程で, 脂肪酸の分解産物として各種のアルデヒドやケトンが生じるが, これらの反応性分子がアポ B を修飾し, LDLを変性させた結果, 酸化LDLが生じる。すなわち, 酸化LDLはLDLが多様な酸化修飾を受けているため, 不均一な成分構成からなる(図2)。なかでも, 酸化変性によって生じる酸化LDLは, 動脈硬化の形成と進展において重要な役割を果たしている。脂質酸化物のうち最も代表的なものがLDLであり, 量も豊富である。これがアポ B のリジン残基に結合したものが, マロンジアルデヒド化LDL(MDA-LDL)である<sup>1)2)</sup>。MDA-LDLは酸化LDLを直接的にみたものではないが, 血中の酸化LDLがきわめて微量なことに比べると, 量的に豊富であり, 測定が容易である。

### 酸化LDL(MDA-LDL)測定の臨床的意義

最近, 末梢血中のMDA-LDLの測定法が開発され, 臨床的意義が検討された。血中のMDA-LDLは冠動脈疾患患者において有意に高値であった<sup>3)</sup>。ほかの典型的な脂質マーカーと比較し, 有用性

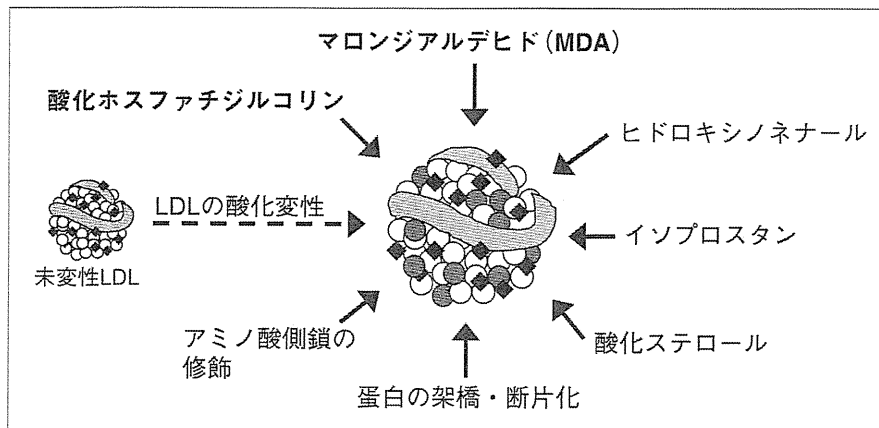


図2 多様なLDLの酸化修飾

LDLはホスファチジルコリン(PC)の酸化や、MDA化など、多様な酸化修飾を受ける。

が示された。また、糖尿病患者において、経皮的冠動脈インターベンション(PCI)治療を行った症例について再狭窄群、非再狭窄群におけるMDA-LDL値の比較をした研究では、MDA-LDL値は、PCI治療の再狭窄や冠動脈イベント発症と関連した<sup>4)</sup>(図3)。血清中MDA-LDL値は、冠動脈疾患既往歴のある糖尿病患者における予後予測マーカーとして、また糖尿病患者における経皮的冠動脈形成術などによる治療後の再狭窄予測マーカーとして有用と考えられる。MDA-LDLは2008年6月に保険収載された。冠動脈疾患既往歴のある糖尿病患者において、冠動脈疾患発症に関する予後を予測する目的で測定する場合、3か月に1回算定できる。また、糖尿病患者においてPCI時に、治療後の再狭窄に関する予後予測を目的として測定する場合は、術前1回算定可能である。

大規模臨床スタディにおいて、MDA-LDLおよび被修飾LDLに対する自己抗体が頸動脈の動脈硬化進展に関与することも示されている。最近の研究では、従来のリポ蛋白や伝統的な冠動脈リスク因子に比べ、血漿中の酸化LDL濃度が心血管疾患イベント発症の最も良い予知因子であることが示された<sup>5)</sup>。今後も、動脈硬化のさまざまな段階において酸化LDLを測定することにより、酸化LDLの有害作用を示す特異的な作用が病態生理の分子メカニズムが解明されるであろう。

さらに、酸化LDLの増加は安定プラークから脆弱な不安定プラークへの移行に関与する可能性

もある。最近の研究により、酸化LDLはヒトの血管内皮細胞と単球由来のマクロファージにおけるMMP(matrix metalloproteinase)-1およびMMP-9を促進することが明らかになった。また、酸化LDLはヒトの冠動脈において、MMP-1、MMP-3を制御することも示されている。この作用は、内皮受容体であるLOX-1を介して行われる。さらに、酸化LDLはCD40/CD40Lシグナル伝達経路を契機とし、炎症様反応をひき起こし、内皮障害を惹起すると考えられている。このように、酸化LDLは血管壁における脂質の蓄積だけでなく、MMPや組織因子の発現およびアポトーシス誘導など、幅広い炎症作用を示すことにより、動脈硬化プラークの不安定化や破綻および血栓形成に関与すると考えられている。

### プロテオミクス解析とは

プロテオミクス解析とは通常、静的状態における蛋白質とその機能を包括的に解析し、その機能を理解することを目的とする。疾患関連因子の発現する時間的差異を明らかにすることは病態生理を理解する上で重要である。DNAに書き込まれた遺伝情報はRNAを介して蛋白質へ翻訳される。実際、ヒトゲノムの配列の解読が終了した現在では、RNAの発現プロファイルと蛋白質の発現プロファイルは必ずしも一致するわけではなく、その相関は50%以下であるともいわれている<sup>6)</sup>。したがって、蛋白レベルの研究が、疾患の発症や伸展を理解する上で理想的かつ重

要である。本稿の後半では、蛋白質に影響を及ぼす分子レベルでの変化に着目して、疾患における蛋白質制御機構を明らかにする。さらに、制御機構の理解に留まらず、関連蛋白質に着目した診断ツールの開発および治療薬のターゲットとして鍵となる可能性がある。

### プロテオミクスを支える 質量分析の技術革新

質量分析法とは、質量分析装置(MS)を用いて蛋白質やペプチドのような試料をイオン化し、得られたイオンを質量/電荷(m/z)に従い分離して、その強度を測定することにより試料の質量を決定する方法である。本邦においては島津製作所の田中耕一氏がMALDI-TOF/MS(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry)の原理を開発し、2002年にノーベル化学賞(生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発)を受賞したことで広く知られるようになった。試料にレーザーを照射することにより、エネルギーを受けてイオン化した蛋白質は一定の電圧で加速され、真空管の対局にあるイオン検知器へ向かって飛行する。イオン検知管に到達するまでの時間は軽い分子ほど早く、重い分子ほど遅いので、飛行時間を計測することによって、物質の質量数を求めることができる。1サンプルの測定に要する時間は約1分であり、ほかの方法に比べて非常に短い時間で測定可能である。MSを使えば、蛋白質を同定したり、蛋白質の動態を調べたり、翻訳後の修飾や蛋白質-蛋白質相互作用などを分析することができる。

### プロテオミクスを用いた バイオマーカーの探索

最近、プロテオミクスを疾患の早期診断や、病因の解明、さらに創薬研究への適応など、医療技術に応用する試みがなされている。心血管および癌などの疾患の早期診断や進行状況のモニタリングを可能にするバイオマーカー蛋白質の同定は、医療現場に直接応用することが可能であり、臨床的価値が高い。

プロテオミクス技術を用いて血中から蛋白質

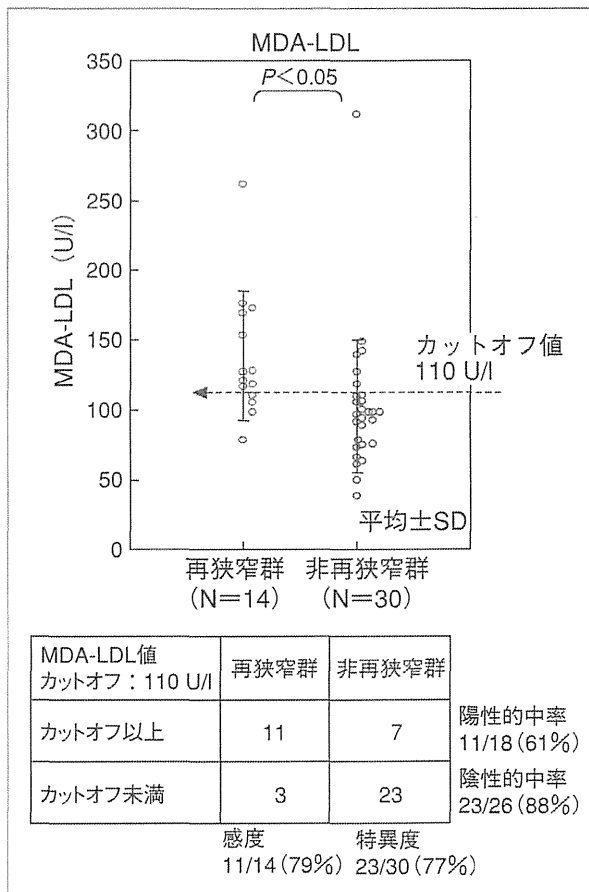


図3 経皮的冠動脈インターベンション(PCI)治療を行った糖尿病患者の再狭窄群, 非再狭窄群におけるMDA-LDL値の比較

糖尿病患者では、MDA-LDL値は経皮的冠動脈インターベンション(PCI)治療の再狭窄や、冠動脈イベント発症と相関した。(文献<sup>4)</sup>より引用)

を同定する場合に、質量分析計(MALDI-TOF/MS)を基本とした高感度の測定機器)、および試料の分画方法が重要である。血液検体を扱う上では試料の分画が、質量分析計の感度以上に重要である。プロテオミクス技術が医療分野で実践的な真価を発揮するためにはこのような簡便な方法が向いているであろう。一方、特異抗体を用いた免疫分離法も効果的な分離法である。この手法は、目的の蛋白質が決まった場合に有効である。疾患時には蛋白質の修飾とともに、蛋白質の断片化が行われることがある。たとえば、心筋トロポニンNの断片化および修飾が心疾患に特徴的に認められ、臨床的指標として役に立っている<sup>7)8)</sup>。特異抗体を用いてこのような蛋白質の特徴的な変化を検出することが重要と考えられる。

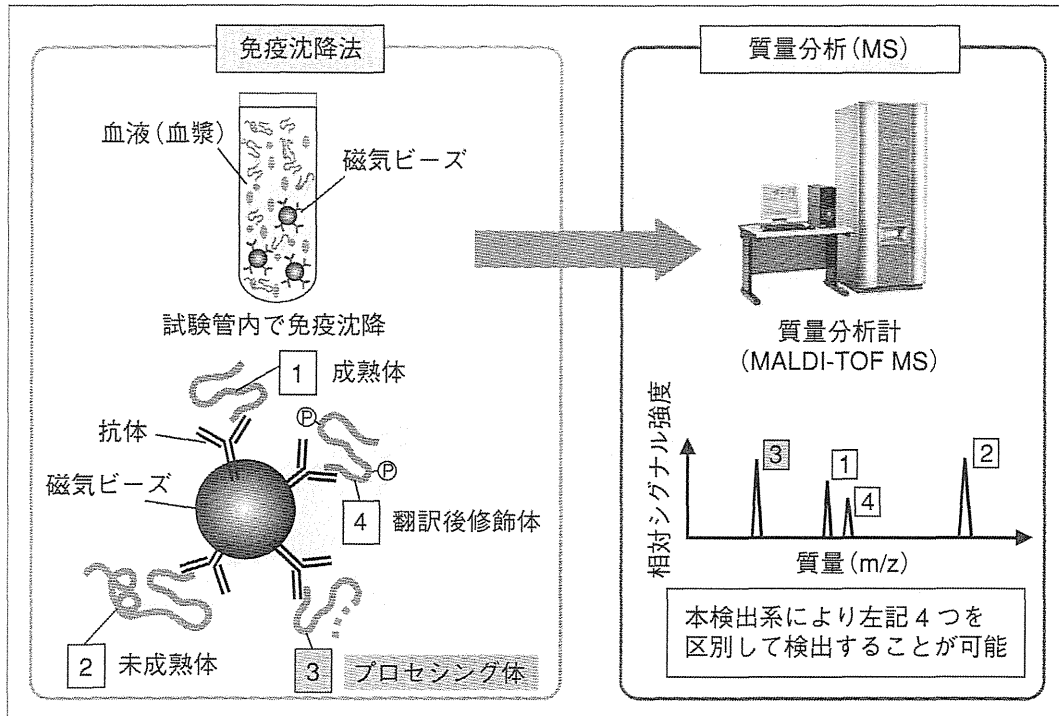


図4 質量分析を基にした免疫学的アッセイ法  
 血漿中から目的の蛋白質に対する抗体を用いて免疫沈降し(左), 質量分析計で分析することにより, さまざまな修飾体を区別することが可能となる.

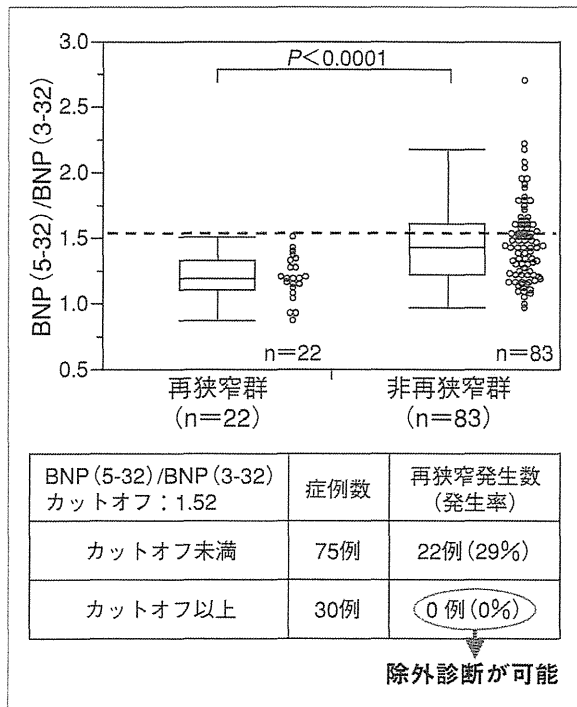


図5 BNPフラグメントのシグナル強度比BNP (5-32)/BNP (3-32)と冠動脈再狭窄との相関  
 カットオフ値1.52以上では再狭窄症例が皆無である. すなわち, 除外診断が可能である.

### 質量分析技術を用いた冠動脈狭窄症の血液検査法

冠動脈狭窄症の治療として年間20万件以上実施されている心臓カテーテル治療では, 約1割の症例において, 施術後の約半年以内に再狭窄が生じることが, 治療上の課題ないし限界となっている. このため, 再狭窄の生じている患者を見分けるためのサロゲート(代替)マーカーが待ち望まれている. BNPは負荷のかかった心臓から分泌されるホルモンであり, 心不全のバイオマーカーとしてすでに広く臨床で用いられている. しかし, 虚血性心疾患における診断に有用かどうかは未解明であった. 最近, 末梢血中にはプロセシングを受けたBNPが存在することが報告されてきている<sup>9)~11)</sup>. われわれはこのプロセシングを受けたBNPが心臓カテーテル治療後の再狭窄を診断するのに有用であると仮説をたて, それを検証した. 末梢血中にはプロセシングを受けたBNPを分析するために, 質量分析を基にした免疫学的アッセイ法を新たに開発した(図4). 心臓カテーテル治療を受けて約6か月

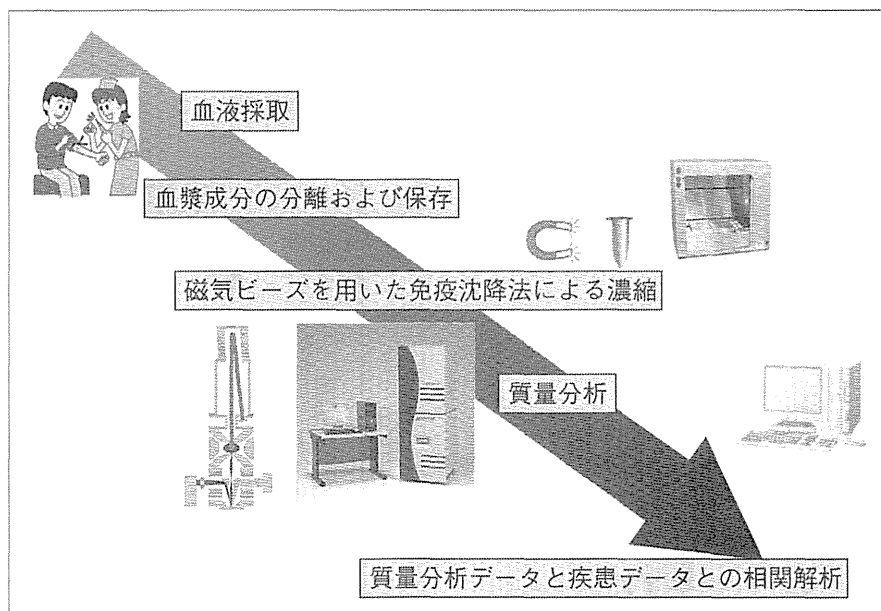


図6 プロテオミクスを用いた臨床血液診断システムの開発の流れ

経過した時点で冠動脈造影の再検査を受けた連続105症例について横断研究を行った<sup>12)</sup>。各患者の冠動脈カテーテル造影検査による再狭窄の診断、および、末梢血中のプロセッシングを受けたBNPのシグナル強度比BNP(5-32)/BNP(3-32)を測定対象とした。その結果、再狭窄を生じていた患者群において、BNPフラグメントのシグナル強度比BNP(5-32)/BNP(3-32)が有意に低くなっていた〔再狭窄を生じていた群(n=22)：再狭窄を生じていなかった群(n=83)=1.19(四分位範囲, 1.11~1.34)：1.43(四分位範囲, 1.22~1.61), ( $P < 0.001$ )〕。つまり、BNPフラグメントのシグナル強度比〔BNP(5-32)/BNP(3-32)〕のカットオフ値を、再狭窄を有する症例で1.52とすることで再狭窄の除外診断が可能になり、有用な診断手法であることがわかった。感度は100%であった。このように、BNPフラグメント比〔BNP(5-32)/BNP(3-32)〕は再狭窄の有無を診断する有用なバイオマーカーとなりうることが明らかとなった(図5)。

### おわりに

質量分析技術を医療に応用する試みははまだ端緒に着いたばかりで歴史が浅いが、今後、医療における中心的役割を有す可能性も高いと思われる。なかでも、心血管疾患のプロテオミク

ス解析は現在注目されている。米国でNHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute)において、臨床プロテオミクス・ワーキンググループが活動中である<sup>8)</sup>。また、HUPO (The Human Proteome Organization)による血漿プロテオーム解析も行われ、ヒトの血漿からの蛋白質の網羅的同定が試みられ、心血管関連の蛋白質の包括的同定が行われつつある<sup>13)</sup>。ほかにも、心血管疾患に特異的な蛋白質プロファイリングを行った研究も行われつつある<sup>14)15)</sup>。今後も同様のデータを蓄積していくことにより、動脈硬化などの疾患特異的バイオマーカーの同定のみならず、疾患関連蛋白質の病態における動態(相互作用、修飾、分解など)を包括的に把握することも可能となるであろう。疾患病態制御機構の解明は最終的には治療薬の開発に繋がるものと期待される。

質量分析装置が臨床診断の主流となるか否かは現段階では答えは出ていないが、費用対効果が示され、従来の検査技術では測定不能な重要な情報を与えることになれば、十分に現実味はある。たとえば、疾患における蛋白質の断片化や翻訳後修飾などについては質量分析装置の利用価値が非常に高いところである。定量性、再現性、機器の可搬性などの問題についても解決が必要である。このように、現在の先端的なプロテオーム解析法はまだ端緒に着いたところで

あり、高度な熟練と知識を必要としている。実際、まだ誰もが簡単に利用できるものではないが、今後、簡易型の質量分析システム、またはロボットを用いた再現性とスループットの高い測定法の開発が期待される(図6)。

## 文 献

- 1) Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988 ; 241 : 215.
- 2) Fogelman AM, Shechter I, Seager J, et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 ; 77 : 2214.
- 3) Amaki T, Suzuki T, Nakamura F, et al. Circulating malondialdehyde modified LDL is a biochemical risk marker for coronary artery disease. *Heart* 2004 ; 90 : 1211.
- 4) Shigematsu S, Takahashi N, Hara M, et al. Increased incidence of coronary in-stent restenosis in type 2 diabetic patients is related to elevated serum malondialdehyde-modified low-density lipoprotein. *Circ J* 2007 ; 71 : 1697.
- 5) Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005 ; 112 : 651.
- 6) Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mrna abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19 : 1720.
- 7) Labugger R, Organ L, Collier C, et al. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2000 ; 102 : 1221.
- 8) Granger CB, Van Eyk JE, Mockrin SC, Anderson NL. National heart, lung, and blood institute clinical proteomics working group report. *Circulation* 2004 ; 109 : 1697.
- 9) Brandt I, Lambeir AM, Ketelslegers JM, et al. Dipeptidyl-peptidase IV converts intact b-type natriuretic peptide into its des-serpro form. *Clin Chem* 2006 ; 52 : 82.
- 10) Niederkofler EE, Kiernan UA, O'Rear J, et al. Detection of endogenous b-type natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 2008 ; 1 : 258.
- 11) Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, et al. Processing of pro-b-type natriuretic peptide : Furin and corin as candidate convertases. *Clin Chem* 2010 ; 56 : 1166.
- 12) Fujimoto H, Suzuki T, Aizawa K, et al. Processed b-type natriuretic peptide is a biomarker of post-interventional restenosis in ischemic heart disease. *Clin Chem* 2013 ; 59 : 1330.
- 13) Berhane BT, Zong C, Liem DA, et al. Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO plasma proteome project pilot phase. *Proteomics* 2005 ; 5 : 3520.
- 14) Westbrook JA, Wheeler JX, Wait R, et al. The human heart proteome : Two-dimensional maps using narrow-range immobilised ph gradients. *Electrophoresis* 2006 ; 27 : 1547.
- 15) Mayr U, Mayr M, Yin X, et al. Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. *Proteomics* 2005 ; 5 : 4546.

\* \* \*

# 診断マーカーと測定しておくべき血液検査

相澤健一

## ポイント

- ◎急性心筋梗塞、不安定狭心症などの臨床診断に有用な生化学マーカーとして、クレアチンキナーゼ、トロポニン、心臓型脂肪酸結合蛋白、ミオグロビンがある。
- ◎心機能指標としてBNPがあり、虚血性心疾患の予備心機能や予後を予測する際に有用である。
- ◎急性心筋梗塞の二次予防の重要なリスク因子として評価すべき脂質、糖尿病などがある。

急性心筋梗塞の臨床診断においては、心筋壊死を示す診断マーカーの一過性上昇を認めることが必須であり、これに加え虚血の存在を示唆する遷延する胸痛や心電図所見のいずれかの存在が必要となる。

急性心筋梗塞(ST上昇型)の診療に関するガイドライン<sup>1)</sup>に基づく、急性冠症候群の初期診断において、臨床検査はクラスI適応であり、患者到着後10分以内の血液生化学検査が推奨されている(レベルC)(図1,表1)。初期に評価すべき検査項目として以下が挙げられる。

- ・心筋バイオマーカー：心筋トロポニン、クレアチンキナーゼ(CK, CK-MB)、ミオグロビン、心臓型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)
- ・血算
- ・生化学
- ・電解質

クラスI適応として、CKあるいはCK-MBの経時的な測定により心筋梗塞サイズを推定することが有用とされている(レベルB)。また、クラスII適応として、発症72時間以内におけ

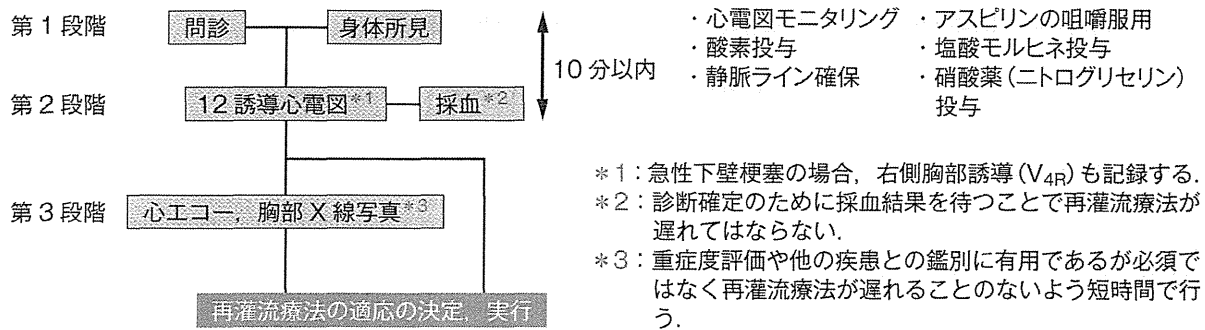
るトロポニン値により心筋梗塞サイズを推定する方法もある(レベルB)。そのほか、心機能の指標としてのBNP、急性心筋梗塞の二次予防に重要な評価すべき脂質プロファイル、血糖、HbA1cなど、本稿では虚血性心疾患の診療において行うべき検査について概説する。

## クレアチンキナーゼ(CK, CK-MB)

心筋壊死のマーカーのスタンダードはクレアチンキナーゼ(creatine kinase: CK)である。CKは細胞質に含まれ、心筋梗塞発症後、3~4時間後に上昇し、約24時間後にピークに達し、2~3日後に元のレベルに戻る。CKは、MM(96%以上)、MB(1~4%)、BB(1%未満)のアイソザイムに分類され、MBないしMMが心筋に相当する。

CK-MBの最高値は心筋壊死量と相関するため、梗塞の大きさを推定するのに役立つ。また、死亡率を含む予後と直接関連することが示され





first medical contact (あるいは door)-to-needle time : 30 分以内  
 first medical contact (あるいは door)-to-device time : 90 分以内

図1 ST 上昇型急性心筋梗塞の診断アルゴリズム (文献1より引用)

ている。したがって、血清 CK-MB を測定することは心筋梗塞の診断とその重症度判定に役に立つ。

注意すべきことは、血清 CK-MB 値は心筋梗塞発症後、数時間以上経過しないと有意な高値を示さない点である。このため、発症後数時間以内では CK-MB 値が基準値内であっても心筋梗塞を否定することはできない。また、CK-MB は少量ながら骨格筋にも含まれるため、筋炎、横紋筋融解症、甲状腺機能低下症など、骨格筋に損傷がある場合にも高値を示す。心筋梗塞との鑑別のポイントは、骨格筋損傷の場合は総 CK 値も上昇するため、CK-MB の割合が 5% を超えない。また、前述したように心筋由来の CK-MB の上昇は梗塞後一過性である。このような時間依存的な CK-MB 値の経過はほかの骨格筋由来の疾患では認められない。時空間的に病態を把握することにより、心筋梗塞と心筋損傷との鑑別は可能である。

## 心筋トロポニン

心筋トロポニン(Troponin)は心筋の収縮調節蛋白の一つであり、トロポニン T, トロポニン I, トロポニン C とともにトロポニン複合体を形成している。

トロポニン T は細胞質の可溶性分画に 6%、筋原線維の構造蛋白として 94% 分布している。心筋が壊死に陥り、筋原線維が分解されると、血中に流出する。心筋梗塞発症後 3~4 時間で有意な上昇を示し、約 10 日遷延する。CK は健常人でも検出され心筋特異性が低いのに対し、心筋トロポニンは心筋特異性が高く、健常人で上昇することはない(基準値 < 0.01 ng/mL)。心筋トロポニンの上昇は、CK が上昇しない程度の微小心筋傷害でも確実に検出される。しかし、心筋トロポニンは発症早期には上昇していないことが多く、超急性期の診断には有用性が低い。一方、確定診断に有用であり、European Society of Cardiology/American College of Cardiology (ESC/ACC) ガイドライン 2000 では急性心筋梗塞の最終診断は CK や CK-MB に代わって、心筋トロポニンの上昇と定義された。ACC/American Heart Association (AHA), ESC, World Heart Federation (WHF) 共同タスクフォースによる心筋梗塞の診断基準改訂版でもトロポニンは心筋梗塞の診断に最も有用なマーカーとされている<sup>2,3)</sup>。また、主に非 ST 上昇型心筋梗塞での診断やリスク層別化において臨床的有用性が高い。

発症 72 時間におけるトロポニン T 値が梗塞量を最も反映するとされている。また、トロポ

表 2 発症からの経過時間別にみた各心筋バイオマーカーの診断精度(文献 1 より引用)

	<2 時間	2~4 時間	4~6 時間	6~12 時間	12~24 時間	24~72 時間	>72 時間
ミオグロビン*	○	○	○	○	○	△	×
心臓型脂肪酸結合蛋白 (H-FABP)*	○	○	○	○	○	△	×
心筋トロポニン I, T*	×	△	◎	◎	◎	◎	◎
高感度心筋トロポニン I, T	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CK-MB	×	△	◎	◎	◎	△	×
CK	×	△	○	○	○	△	×

◎：感度、特異度ともに高く診断に有用である。○：感度は高いが、特異度に限界がある。△：感度、特異度ともに限界がある。  
 ×：診断に有用でない。\*：全血迅速診断が可能である。

ニン I, トロポニン T の上昇は心臓死や再梗塞の頻度増加とも関連している。トロポニンの上昇の程度は、発症 30 日間の死亡率、および長期予後を規定する。ただし、心筋トロポニンは心不全、心筋炎、急性肺血栓塞栓症など虚血以外の原因による心筋傷害でも上昇することに注意が必要である。

現在、臨床現場で利用可能なトロポニン T の迅速診断キットとして、トロップ T センシティブ®(ロシュ・ダイアグノスティックス)がある。EDTA またはヘパリン添加採血管(血算または血漿用の採血管)で採取した血液で測定可能であり、採血後の血液をそのまま数滴キットに滴下するだけで、約 15 分で結果が判明するため、ベッドサイドや救急外来でも測定可能である。

## 心臓型脂肪酸結合蛋白 (H-FABP)

心臓型脂肪酸結合蛋白(heart-type fatty acid-binding protein : H-FABP)は、心筋細胞質に比較的豊富に存在する低分子可溶性蛋白である。低分子であるために軽度の心筋傷害のレベルで循環血中に逸脱する鋭敏な遊出動態を示す。H-FABP は、心筋トロポニン T では診断できない発症 2 時間以内の超急性期の急性心筋梗塞

の診断を可能とするが、心筋特異性が低く、大動脈解離、骨格筋障害、腎機能障害例などでも陽性となることも報告されており、注意を要する(表 2)。

現在、心筋トロポニン T 同様、H-FABP の迅速診断キットとして、ラピチェック®(DS ファーマバイオメディカル株式会社)がある。急性心筋梗塞発症後早期(2~3 時間)に心筋傷害の有無を確認でき、胸痛などの自覚症状が顕著でない場合や、心電図やほかの蛋白質マーカーでは診断が困難な場合にも急性心筋梗塞の診断、治療の層別化に有用である。ただし、偽陽性が多い点に注意すべきである。

## ミオグロビン

ミオグロビンはトロポニン、H-FABP と同様、心筋細胞質に局在する細胞質可溶性マーカーである。心筋梗塞に特異的ではないが、そのほかの心筋壊死のマーカーよりも早く増加するため、診断がつかない心電図を有する患者のトリアージに役立つことがある。ただし、現在、迅速診断キットはないため、臨床現場における有用性はトロポニン、H-FABP に劣る。

## 心機能指標としての BNP の役割

B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は主に左室の伸展刺激を反映して左室心筋から循環血中に分泌される。BNPとNT-proBNPは同じBNP遺伝子に由来する。BNP遺伝子から転写・翻訳後、BNP前駆体(108個のアミノ酸からなるproBNP)が生成され、その後、NT-proBNP(proBNPのN端側の76個のアミノ酸からなる)とBNP(残りの32個のアミノ酸からなる)に切断される。BNPは生理活性を有する一方、NT-proBNPは生理的に非活性である。ナトリウム利尿ペプチドは心不全をはじめとする種々の心血管病態で上昇するため、虚血性心疾患における特異性は低い。しかし、心筋梗塞発症後の長期予後とは良く相関することが知られている。先述したCK、トロポニンなどの心筋逸脱マーカーは壊死心筋から放出されるため、心筋梗塞のサイズを反映する一方、BNPは残存心筋から分泌されるため、心筋梗塞時の心筋予備能などを反映する可能性がある。つまり、左室リモデリングおよび心イベントの予測に有用と考えられる<sup>5,6)</sup>。

再灌流治療の有無にかかわらず、左室機能はST上昇心筋梗塞の予後予測に最も重要な因子である。左室機能を反映するBNPはST上昇型急性心筋梗塞の診療に関するガイドライン<sup>1)</sup>でも、梗塞範囲の進展と左室拡張能を反映し、単独もしくは左室駆出分画率と併わせて評価することで、ST上昇心筋梗塞後の予後推定に役立つとされている。

注意すべき点として、BNP、NT-proBNPともに心血管病態にかかわらず、腎機能の低下に伴い血中濃度が上昇する。特に、NT-proBNPはほとんどが腎臓からの濾過により排泄されるため、軽度の腎機能低下(eGFR 80 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>未満)でも影響を受ける。また、高齢者

においても両ペプチドとも血中濃度は高値を示す傾向がある。

## 急性心筋梗塞の二次予防の 重要なリスク因子として 評価すべき血液検査項目

心筋梗塞二次予防に関するガイドライン(2011年改訂版)<sup>4)</sup>では、心筋梗塞二次予防を達成するには数々の治療法があるが、一般療法、薬物療法および侵襲的治療法に分類している。一般療法は、生活スタイルを是正して冠危険因子を除去することおよび高血圧や糖尿病などの合併症を治療することである。これはすべての心筋梗塞患者に励行すべきものである。

心筋梗塞をはじめとする冠動脈疾患は、主に粥状動脈硬化を基盤としているため、主な危険因子として、血清脂質異常[総コレステロール高値、低比重リポ蛋白コレステロール(LDL-C)高値、高比重リポ蛋白コレステロール(HDL-C)低値、トリグリセライド(TG)高値]、高血圧、糖尿病、肥満などの身体的因子に加え、喫煙、運動、飲酒等の生活習慣が挙げられる。このなかで、脂質および糖代謝に関連する診断マーカーは日常臨床で評価すべき重要なものである。

### 脂質異常の管理

LDL-Cは心血管イベントの予測マーカーとして有用であり、LDL-C推定値が151 mg/dL以上の群は、98 mg/dL未満の群に比べて、冠動脈疾患の発症リスクは男性で3.7倍高い。また、HDL-C値40 mg/dL未満の男性はそれ以上の男性に比べて、冠動脈疾患の発症リスクが2.5倍高く、冠動脈疾患の死亡リスクが2.0~2.5倍高い。さらにTG値150 mg/dL以上の男性は、それ未満の男性に比べて、冠動脈疾患の死亡リスクが1.8倍高い。同ガイドライン<sup>4)</sup>において

もクラスI適応として、高LDL-C血症にはスタチンを投与することが推奨されている(レベルA)。また、HDL-CはLDL-Cよりも有力な予測マーカーとの報告もあり、LDL-Cの目標値を達成した後の残存リスクとして改善することが勧められる。

## 糖尿病の管理

糖尿病管理は心筋梗塞二次予防として重要であり、ガイドライン<sup>4)</sup>においてクラスIIa適応である。糖尿病を合併する患者では、HbA1c 7.0% (国際標準値: NGSP)未満を目標に、体格や身体活動量などを考慮して適切なエネルギー摂取量を決定し、管理することが推奨されている(レベルB)。最近では、食後高血糖や短時間の血糖値変動が心血管イベントに対し影響する可能性も指摘されており、それらのマーカーとして最終糖化産物(advanced glycation end products: AGE)や1,5アンヒドログルシトール(1,5-anhydroglucitol: 1,5-AG)もあり、注目されつつある。

## おわりに

診断マーカーの時間的および空間的動態を理解するうえで、それらの正常時の存在分布と発症時の遊出動態を理解することが役に立つ。す

なわち、発症後の超早期(数時間以内)では細胞質に含まれるマーカー(CK-MB, H-FABP, ミオグロビン)がまず流出することにより血中濃度が上昇する。その後、虚血が長時間にわたり心筋壊死が進展すると、筋原線維に含まれるマーカー(トロポニンT)の血中濃度が上昇する(表2)。このように、診断マーカーを最大限に活用するためには、病態を念頭に置いた診断マーカーの使用法を理解することが重要である。

## 文献

- 1) 循環器病の診断と治療に関するガイドライン。ST上昇型急性心筋梗塞の診断に関するガイドライン(2013年改訂版)。2013  
[http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2013\\_kimura\\_h.pdf](http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2013_kimura_h.pdf)(2014年2月閲覧)
- 2) Thygesen K, et al: Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 116:2634-2653, 2007
- 3) Thygesen K, et al: Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 126:2020-2035, 2012
- 4) 循環器病の診断と治療に関するガイドライン。心筋梗塞二次予防に関するガイドライン(2011年改訂版)。2011  
[http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2011\\_ogawah\\_h.pdf](http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2011_ogawah_h.pdf)(2014年2月閲覧)
- 5) 循環器病の診断と治療に関するガイドライン。慢性心不全治療ガイドライン(2010年改訂版)。2010  
[http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2010\\_matsuzaki\\_h.pdf](http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2010_matsuzaki_h.pdf)(2014年2月閲覧)
- 6) 循環器病の診断と治療に関するガイドライン。急性心不全治療ガイドライン(2011年改訂版)。2011  
[http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2011\\_izumi\\_h.pdf](http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2011_izumi_h.pdf)(2014年2月閲覧)