

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 539430

(P2002 - 539430A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ド* (参考)
G 0 1 N 33/573		G 0 1 N 33/573	A
33/15		33/15	Z
33/50		33/50	Z
33/53		33/53	K

審査請求 未請求 予備審査請求(全 34数)

(21)出願番号 特願2000 - 604226(P2000 - 604226)

(86)(22)出願日 平成12年3月8日(2000.3.8)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月24日(2001.7.24)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/00845

(87)国際公開番号 W000/54052

(87)国際公開日 平成12年9月14日(2000.9.14)

(31)優先権主張番号 9905417.3

(32)優先日 平成11年3月9日(1999.3.9)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(31)優先権主張番号 9919952.3

(32)優先日 平成11年8月23日(1999.8.23)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 ラックスデイル リミテッド  
イギリス スターリン エフケイ7 9ジェ  
イキュー ローレルヒル ビジネス パー  
ク キングス パーク ハウス (番地なし  
)

(72)発明者 グレン アラスター キャンベル アグニ  
ュー  
イギリス グラスゴー ジ-41 5エルピー  
ニッスデイル ロード 276 エイ

(72)発明者 マクドナルド ドナルド ジョン  
イギリス グラスゴー ジ-73 6エイチエ  
イ カンバーノールド ロード 186

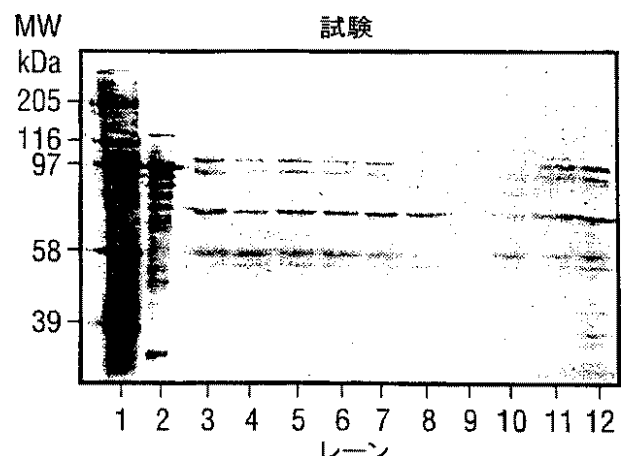
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 診断テスト

(57)【要約】

タイプIV サイトゾルホスホリパーゼA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)  
)又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質  
を検出するアッセイであって、該アッセイは、特に高度  
不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が関係す  
る病気の診断において使用するために、赤血球の使用を  
含む。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 タイプIVのサイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) 又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質を検出するためのアッセイであって、赤血球の使用を含む前記アッセイ。

【請求項2】 高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が関係する病気の診断における使用のための請求の範囲第1項記載のアッセイ。

【請求項3】 高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が関係する病気にかかっている患者に投与された投薬の有効性のモニタリングにおける使用のための請求の範囲第1項記載のアッセイ。

【請求項4】 高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が関係する病気の薬剤開発における使用のための請求の範囲第1項記載のアッセイ。

【請求項5】 高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が関係する病気の診断方法であって、赤血球内の又は赤血球上のタイプIVのサイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) 蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質の検出を含む前記方法。

【請求項6】 高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が関係する病気にかかっている患者に投与された投薬の有効性のモニタリング方法であって、赤血球内の又は赤血球上のタイプIVのサイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) 蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質の検出を含む前記方法。

【請求項7】 高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が関係する病気の薬剤開発方法であって、赤血球内の又は赤血球上のタイプIVのサイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) 蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質の検出を含む前記方法。

【請求項8】 赤血球がヒトの体から単離される請求の範囲第1項から第7項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項9】 前記アッセイ又は方法が前記赤血球の事前の単離なしに血液サンプル全体の使用を含む請求の範囲第1項から第7項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項10】 前記病気がタイプIV cPLA<sub>2</sub>活性又は濃度が通常のレベルと異なっている病気又は病気のプロセスである請求の範囲第2項から第9項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項11】 前記病気がタイプIV cPLA<sub>2</sub>活性又は濃度が増加する病気又は病気のプロセスである請求の範囲第2項から第9項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項12】 前記病気が精神分裂病、失読症、双極性鬱病又は躁鬱病、悪液質又は脳障害である請求の範囲第2項から第11項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項13】 前記脳障害が脳卒中又は機械的脳障害である請求の範囲第12項記載のアッセイ又は方法。

【請求項14】 タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質が80から110 kDaの範囲又は70から80 kDaの範囲又は50から60 kDaの範囲の分子量を有する請求の範囲第1項から第13項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項15】 タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質が90から105 kDaの範囲又は70から80 kDaの範囲又は50から60 kDaの範囲の分子量を有する請求の範囲第1項から第13項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項16】 被験者から血液のサンプルを収集し、ex vivoで蛋白質を検出する工程を含む請求の範囲第1項から第15項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項17】 その他の血液成分から赤血球を分離し、赤血球を分裂させ、直接又は蛋白質分離方法に続いて蛋白質を検出するさらに1つ以上の工程を含む請求の範囲第16項記載のアッセイ又は方法。

【請求項18】 赤血球を超音波処理、凍結、窒素キャビテーション又は溶解により分裂させる請求の範囲第17項記載のアッセイ又は方法。

【請求項19】 前記蛋白質が免疫測定法により検出される請求の範囲第1項から第18項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項20】 前記蛋白質がヒト単球（U937）細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸82から749までの1つ以上のエピトープを認識する1つ以上の抗体を用いて検出される請求の範囲第1項から第19項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項21】 前記蛋白質がヒト単球（U937細胞）由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸82から749までの1つ以上のエピトープに対して産生される又はヒト単球（U937）細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸82から749までと適合する合成ペプチドの1つ以上のエピトープに対して産生される1つ以上の抗体を用いて検出される請求の範囲第1項から第20項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項22】 1つ以上の前記エピトープが、ヒト単球（U937）細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の触媒作用中心を含む1つ以上のペプチド配列由来である請求の範囲第20項又は第21項記載のアッセイ又は方法。

【請求項23】 1つ以上の前記エピトープが、ヒト単球（U937）細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸241から260までのペプチド配列由来である請求の範囲第20項又は第21項記載のアッセイ又は方法。

【請求項24】 前記蛋白質がヒト単球（U937）細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸1から216までの1つ以上のエピトープに対して産生される1つ以上の抗体を用いて検出される請求の範囲第19項記載のアッセイ又は方法。

【請求項25】 2つ以上の抗体が組み合わせて又は連続して使用され、要求される特異性で前記蛋白質を検出する請求の範囲第20項、第21項、第22項、第23項又は第24項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項26】 前記蛋白質が基質アッセイによって検出される、タイプIV cPLA<sub>2</sub>を検出するための請求の範囲第1項から第18項のいずれか1項記載のアッセイ又は方法。

【請求項27】 赤血球から単離によって得られる蛋白質であって、タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相であり、80から110 kDaの範囲の分子量又は70から80 kDaの範囲の分子量又は50から60 kDaの範囲の分子量を有する前記蛋白質。

【請求項28】 前記蛋白質がタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相であり、90

から105 kDaの範囲の分子量又は70から80 kDaの範囲の分子量又は50から60 kDaの範囲の分子量を有する請求の範囲第27項記載の蛋白質。

【請求項29】 赤血球を分裂させる方法を含み、さらに赤血球から単離により得られる蛋白質に対する1つ以上の抗体を含み、前記蛋白質がタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である診断キット。

【請求項30】 1つ以上の前記抗体が、ヒト単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸82から749までの1つ以上のエピトープに対して産生される請求の範囲第29項記載の診断キット。

【請求項31】 1つ以上の前記抗体が、ヒト単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の触媒活性中心を含む1つ以上のペプチド配列由来の1つ以上のエピトープに対して産生される請求の範囲第28項記載の診断キット。

【請求項32】 赤血球を分裂するための前記方法が赤血球を溶解するための方法である請求の範囲第28項、第29項又は第30項のいずれか1項記載の診断キット。

【請求項33】 患者の近くでの試験に好適である請求の範囲第28項、第29項又は第30項のいずれか1項記載の診断キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、サイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub>酵素の蛋白質の同定及びその利用、特に診断、治療のモニタリング及び薬剤開発に関する。

ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 酵素は、一般にグリセロリン酸のSn2アシルエステル結合の加水分解を触媒して、遊離脂肪酸を放出する能力によって特徴付けられる (Mayer R.J. and Marshall L., FASEB J, 7, 339-348; Dennis E.A., Ed., Phospholipase A<sub>2</sub> Methods in Enzymology, 1991, 197, 359-433)。科学文献は、異なるタイプのPLA<sub>2</sub>酵素を認める (Dennis E.A., Trends Biochem. Sci., 22, 1-2)。タイプI、II及びIIIは、分泌性ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) 酵素と呼ばれる。分泌性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>酵素は、約14 kDaの分子量を有し、細胞外で見出され、血漿中で認識されている。

タイプIV PLA<sub>2</sub>酵素は、サイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) と呼ばれる。それはカルシウム結合領域の特色をなし、C2領域と呼ばれ、そのホスホリパーゼ活性は、高度不飽和脂肪酸、特にアラキドン酸について高い選択性であり、Sn2アシルエステルグリセロリン酸結合に存在する。細胞膜リン脂質からアラキドン酸を放出するのその能力は、アラキドネートの供給制御のために、それをキープポジションに固定し、その後細胞メッセンジャープロセスで作用する。

## 【0002】

また、PLA<sub>2</sub>酵素の別のタイプは、サイトゾルのPLA<sub>2</sub>酵素であるが、リン脂質アシルエステル加水分解のために、グリセロリン酸のSn2ポジションのアラキドン酸のための高い選択性を有しないタイプVI酵素である (Tang J.ら, J. Biol. Chem., 272, 1997, 8567-8575)。その触媒活性のためにカルシウムレベルとは無関係であることを認識して、iPLA<sub>2</sub>と呼ばれる。

タイプIVアラキドネート選択性cPLA<sub>2</sub>酵素は、ヒトの単球 (Clark J.D.ら, Cell, 65, 1991, 1043-1051; Kramer R.M.ら, J. Biol. Chem., 266, 1991, 5268-5272) 及びヒトの血小板 (Takayama K.ら, FEBS, 282, 1991, 326-330) を含む組織の数で同定されている。

## 【0003】

タイプIV cPLA<sub>2</sub>のアミノ酸配列は、ヒトの単球 (U937) 細胞から精製された酵素について決定されている (Clark J.D.ら, Cell, 65, 1991, 1043-1051)。U937細胞で見出されたタイプIV cPLA<sub>2</sub>は、749アミノ酸長であるアミノ酸配列を有する。この配列は、プロテインキナーゼC (PKC)、GTPase活性化蛋白質 (GAP)、ホスホリパーゼC及びシナプス小胞蛋白質p65を含む限定された数のその他の蛋白質との類似性の範囲を示す。類似点は、アミノ酸36から81の配列 (NH<sub>2</sub>末端から数えて) で、又は付近であるいわゆるカルシウム結合蛋白質における蛋白質のN-末端で生じる (Nalefskiら, J. Biol. Chem., 269, 18239-18249)。その他の哺乳類の蛋白質とタイプIV cPLA<sub>2</sub>アミノ酸82から749 (肺胞界面活性物質蛋白質Cを共有したアミノ酸129から135由来の配列を除いて) の間の配列の類似性の既知の領域は存在せず (Clarkら, J. Lipid Mediators Cell Signalling, 12, 83-117)、最近報告された2つのサイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub>酵素は、cPLA<sub>2</sub> 及びcPLA<sub>2</sub> と名付けられた (R.T. Pickardら, J. Biol. Chem., 1999, 274, 8823-8831)。これらは、ヒトのU937単球から単離されたcPLA<sub>2</sub>酵素と異なる蛋白質である (ここでは、cPLA<sub>2</sub> と名付ける)。cPLA<sub>2</sub>、及び の配列の類似性は、cPLA<sub>2</sub> においてセリン228からトリプトファン232のポジションで見出された5つのアミノ酸に限定される。

#### 【0004】

タイプIV cPLA<sub>2</sub>の触媒活性中心は、アミノ酸228を含むペプチド配列に位置しているとして報告され (Clark J.D.ら, J. Lipid Mediators Cell Signalling, 12, 83-117)、最近、セリン288及びアスパラギン酸549の分子の折りたたみ3次構造と結びつけた2つのアミノ酸の近くのその機能に依存するとして記載された (Dessen A.ら, Cell, 1999, 97, 349-360)。

循環におけるPLA<sub>2</sub>酵素の以前の観察は、基質アッセイ法による血清又は血漿の測定で行われ、含まれた酵素のタイプを特徴付けていない (Thuren T.ら, Clin. Chem., 31, 1985, 714-717; Gattaz W.F.ら, Biol. Psychiatry, 22, 1987, 421-426; Gattaz W.F.ら, Biol. Psychiatry, 28, 1990, 495-501)。血清及び血漿PLA<sub>2</sub>酵素は、ヒトの精神分裂病における正常なコントロール被験者に関する増加した活性を示すが、やはり、原因である酵素のPLA<sub>2</sub>タイプは特徴付けられてい

ない。現在まで、生理学的又は病理学的に、赤血球内の又は赤血球に付着した、サイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub>タイプIV蛋白質は同定されていない。

#### 【0005】

ここで、タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質が循環する赤血球内又は赤血球上で検出され得ることを見出した。これらのcPLA<sub>2</sub>蛋白質の検出及びアッセイは、病気の診断、治療に対する患者の応答のモニタリング及びcPLA<sub>2</sub>の活性又は濃度に影響する薬剤の開発における適用を有する。これらのcPLA<sub>2</sub>蛋白質が赤血球内又は赤血球上で検出されてもよいことの認識は、cPLA<sub>2</sub>レベルについて単純で、簡便な評価方法を提供する。

本発明の第一の局面によれば、タイプIV cPLA<sub>2</sub>又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質を検出するためのアッセイが提供され、該アッセイは赤血球の使用を含む。本発明の第二の局面において、赤血球のサンプルにおけるタイプIV cPLA<sub>2</sub>又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質のレベルを定量化するためのアッセイが提供される。該アッセイは、血液全体のサンプル又は血液全体からこれらの分離後、赤血球のサンプルで行ってもよい。

#### 【0006】

本明細書で使用される用語“タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質”は、ヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の任意の部分由来の1つ以上のエピトープ、好ましくはヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸82から749由来の1つ以上のエピトープを認識する1つ以上抗体と特異的に結合する蛋白質を意味する。本発明の好ましい実施態様において、用語“タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質”は、ヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の触媒活性中心を含む1つ以上のペプチド配列由来の1つ以上のエピトープを認識する1つ以上の抗体と特異的に結合する蛋白質を意味する。さらに好ましい実施態様において、用語“タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質”は、ヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸241から260のペプチド配列由来の1つ以上のエピトープを認識する1つ以上の抗体と特異的に結合する蛋白質を意味する。

#### 【0007】

別の実施態様において、用語“タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質”は、ヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の任意の部分又はヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の配列と整合する合成ペプチド由来の1つ以上のエピトープに対して産生される1つ以上の抗体と特異的に結合する蛋白質を意味する。好ましい別の実施態様において、用語“タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質”は、ヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸82から749由来の1つ以上のエピトープ、好ましくは触媒活性中心を含む1つ以上のペプチド配列又はヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸82から749の配列、好ましくは触媒活性中心を含む1つ以上の配列と整合する合成ペプチド由来の1つ以上のエピトープに対して産生される1つ以上の抗体と特異的に結合する蛋白質を意味する。さらに別の実施態様において、用語“タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質”は、ヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸241から260のペプチド配列又はヒトの単球(U937)細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸241から260のペプチド配列由来のアミノ酸配列と整合する合成ペプチド由来の1つ以上のエピトープに対して産生される1つ以上の抗体と特異的に結合する蛋白質を意味する。

#### 【0008】

本発明の第三の局面によれば、高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が結びつけられる病気の診断方法が提供され、該方法は、赤血球内又は赤血球上のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質の検出を含む。該方法は、さらに赤血球内又は赤血球上のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質のレベルを決定する工程を含んでもよく、もっとも好ましくはこのレベルをコントロールレベルと比較する工程を含む。

本明細書で使用する用語“高度不飽和脂肪酸”は、タイプIV cPLA<sub>2</sub>酵素の作用によって放出されるすべての脂肪酸を含む。本発明の実施態様において、用語“高度不飽和脂肪酸”は、3つ以上の炭素-炭素二重結合を有する脂肪酸を含む。特に、この用語は、必須の脂肪酸、特にジホモガンマリノレン(dihomogammalinolenic)酸(DGLA; 8,11,14-エイコサトリエン酸)、アラキドン酸(AA; 5,8,11,1

4-エイコサテトラエン酸)、アドレン(adrenic)酸(7,10,13,16-ドコサテトラエン酸)、4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸、ステアリドン(stearidonic)酸(SA; 6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸)、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸(EPA; 5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸)、ドコサペンタエン酸(DPA; 7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸)及びドコサヘキサエン酸(DHA; 4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸)を含む群の脂肪酸を含む。

#### 【0009】

本発明の第四の局面によれば、高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が結びつけられる病気にかかる患者に投与した投薬の有効性をモニタリングする方法が提供され、該方法は、赤血球内又は赤血球上のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質の検出を含む。例えば、該方法は、試験される化合物を患者に投与し、赤血球内又は赤血球上のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質のレベルを決定する工程を含んでもよく、もっとも好ましくはこのレベルとコントロールレベル又は薬物療法の早い段階で、又は薬物療法が開始される前に決定される1つ以上のレベルと比較する工程を含む。

#### 【0010】

本発明の第五の局面によれば、高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が結びつけられる病気のための薬の開発方法が提供され、該方法は、赤血球内又は赤血球上のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質の検出を含む。例えば、該方法は、高度不飽和脂肪酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が結びつけられる病気の治療において使用する化合物のスクリーニングで使用してもよく、該方法は、試験される化合物を患者又は試験動物に投与し、赤血球内又は赤血球上のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質のレベルを決定する工程を含んでもよく、もっとも好ましくはこのレベルとコントロールレベルを比較する工程を含む。

本発明は、特にアラキドン酸、ジホモガンマリノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸を含む細胞情報伝達系の

機能障害が結びつけられる病気に関する。特に、本発明は、アラキドン酸を含む細胞情報伝達系の機能障害が結びつけられる病気に関する。

#### 【0011】

赤血球内又は赤血球上のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相の蛋白質の同定が有用であろう病状としては、以下のものが挙げられる。

- 1) 増加したcPLA<sub>2</sub>の発現及び活性化が、病気の発生におけるメカニズム案である精神分裂病。
- 2) cPLA<sub>2</sub>異常性が存在するであろう双極性鬱病又は躁鬱病。
- 3) 腫瘍壊死因子がcPLA<sub>2</sub>活性を促進する悪液質。
- 4) cPLA<sub>2</sub>が損傷した膜から、又はアポトーシスのプロセスの部分として放出されるであろう脳卒中及び機械的傷害を含む脳傷害。
- 5) 異常なcPLA<sub>2</sub>活性が存在するであろう失読症。
- 6) タイプIV cPLA<sub>2</sub>活性又は濃度が正常なレベルから増加し、又は減少した任意のその他の病気又は病気のプロセス、特に、タイプIV cPLA<sub>2</sub>活性又は濃度が増加した病気又は病気のプロセス。

本発明のアッセイ及び方法は、被験者から血液のサンプルを収集し、ex vivoで蛋白質を検出する工程を含んでもよい。好ましくは、アッセイ及び方法は、その他の血液成分から赤血球を分離し、超音波処理、窒素キャビテーション、凍結又は溶解等の方法により赤血球を破壊し、直接又は蛋白質分離方法の後、蛋白質を検出する1つ以上の工程をさらに含む。本発明のアッセイ及び方法について、他の利用としては、赤血球の分離前の要求の有り無しで、血液全体についてのその使用が挙げられ、例えばそのような利用としては、診断ストリップ、カートリッジ、デバイスを患者の近くで(near-patient)試験することを含む。

#### 【0012】

好ましい実施態様において、本発明のアッセイ及び方法は、3つの特別なグループの蛋白質の1つ以上から1つ以上の蛋白質の赤血球内又は上の検出を含む。蛋白質は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE)を用いてウエスタンブロット法で測定される見かけ上の分子量で分類され、以下のように指定される。

#### グループA

80から110 kDaの範囲、特に90から105 kDaの範囲の見かけ上の分子量の1つ以上の蛋白質を含む。

#### グループB

70から80 kDaの範囲の見かけ上の分子量の1つ以上の蛋白質を含む。

#### グループC

50から60 kDaの範囲の見かけ上の分子量の1つ以上の蛋白質を含む。

示されたグループの蛋白質は、おそらくリン酸化度の結果である示されたグループの蛋白質間で見かけ上の分子量において構造的に相関し、差異が小さくてもよいとみなされる。しかし、本発明の範囲がこの理論によって限定されることを意図しない。示されたグループの蛋白質間の見かけ上の分子量の差異は、簡単には、蛋白質又は蛋白質のフラグメントのアミノ酸配列の長さの差異の結果であろう。

#### 【0013】

これらの蛋白質は、cPLA<sub>2</sub>に対する抗体と免疫学的に反応する。蛋白質は、その他の蛋白質との配列類似性を共有しないタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の領域（例えば、蛋白質のカルシウム結合部分以外の領域）に存在する1つ以上のエピトープと反応する1つ以上の抗体によって同定され得る。また、蛋白質は、その他の蛋白質との類似性を有する配列に存在する1つ以上のエピトープ（例えば、タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のカルシウム結合部分）と反応する第一抗体（“捕獲抗体”）及びその他の蛋白質との類似性を有さない蛋白質の領域の1つ以上のエピトープと反応する第二抗体（“検出抗体”）を用いて、必要な特異性を提供するために同定され得る。蛋白質の検出及び同定は、以下でより詳細に論じられる。

#### 【0014】

赤血球内又は上から単離された蛋白質又は蛋白質フラグメントは、ヒトの単球（U937）細胞で見出されるタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はそのフラグメントと同様であってもよいとみなされる。このため、80から110 kDa（特に90から105 kDa）の範囲、70から80 kDaの範囲及び50から60 kDaの範囲の見かけ上の分子量を有する蛋白質は、無傷のタイプIV cPLA<sub>2</sub>又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>の主成分であってもよいと

みなされる。しかし、本発明の範囲がこの理論により限定されることを意図しない。

本発明の別の局面によれば、赤血球から単離により得られる蛋白質が提供され、該蛋白質は、タイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である。該蛋白質は、80から110 kDaの範囲（特に90から105 kDaの範囲）の分子量を有する蛋白質の形態で、又は70から80 kDaの範囲の分子量を有する蛋白質の形態で、又は50から60 kDaの範囲の分子量を有する蛋白質の形態で体に存在してもよい、

#### 【0015】

##### 蛋白質分離

タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質と免疫学的に同相である蛋白質は、典型的には赤血球のその他の蛋白質からSDS PAGEによって分離されるが、種々のその他の蛋白質分離方法を使用してもよく、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び種々のカラム分離法（例えば、高速蛋白質液体クロマトグラフィー及び種々のセファロース又はその他の商業的に入手可能なカラム）が挙げられる。また、二次元電気泳動法を使用してもよい。上述のように、事前の蛋白質分離が必ずしも必要であるとは限らず、タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質を、事前の蛋白質分離の必要性のない免疫学的方法により赤血球内で検出してもよい。

#### 【0016】

##### 蛋白質検出

タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質及び/又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の検出は、以下に挙げる広範囲の蛋白質検出方法によって達成される。

- 1) 酵素結合免疫測定法、放射性免疫測定法、発光免疫測定法、蛍光免疫測定法、又はバイオセンサー法（エバネッセント波動光学バイオセンサー）を含む任意のその他の種々の競合又は標識抗体免疫測定法。
- 2) スメア、液滴、膜、固定された組織学的セクション又は組織サンプルの赤血球上の免疫蛍光又はその他の免疫測定法。
- 3) 蛋白質が特異的なポリクローナル又はモノクローナル抗体によって認識される及び特異的抗体がそれ自体クームスタンプ（Coombs-type）試験で認識される

n vitro試験。

4) その他のホスホリパーゼ酵素の特異的阻害剤と一緒に天然の又は人工のリン脂質基質を利用するタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質の酵素的な基質アッセイ。

【0017】

本発明の一の実施態様において、蛋白質検出は、上記方法のいずれか又は当業界で知られている任意のその他の方法を用いて蛋白質を検出する患者の近くでの試験に適した診断ストリップ、カートリッジ又はデバイスを用いて達成される。

好ましい実施態様において、蛋白質は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体又はそれらの組み合わせを用いて検出される。表1は、タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質及び/又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の検出のために、本発明のアッセイでの使用に適した抗体の例を提供する。

また、本発明の使用に適した抗体又は抗体の組み合わせとしては、例えばU937細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>のアミノ酸730から749又は分子のC末端由来の拡張された又は異なるアミノ酸配列を含むペプチド鎖のエピトープに対して産生される1つ以上のポリクローナル抗体、U937細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>の触媒活性サイトを含む1つ以上の中間分子 (mid-molecule) ペプチド配列に対して産生される1つ以上の抗体、配列のN末端部 (アミノ酸1から216) 由来のエピトープに対して産生される1つ以上の抗体、及びアミノ酸82と749との間のU937細胞由来のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のアミノ酸配列由来の他の1つ以上のエピトープに対して産生される1つ以上の抗体が挙げられる。

【0018】

【表1】

表1

抗原	タイプ	産生方法	源	赤血球中のcPLA <sub>2</sub> 類似蛋白質の検出
中間分子由来のヒトのタイプ IV cPLA <sub>2</sub> 合成ペプチド	ポリクローナル IgG	ウサギで産生される	Cayman Chemical	有り
C末端領域由来の24アミノ酸配列のヒトのタイプ IV cPLA <sub>2</sub> 合成ペプチド	ポリクローナル IgG	ヒツジで産生される	The Binding Site	有り
アミノ末端に対するヒトのcPLA <sub>2</sub> 合成ペプチド (アミノ酸1から216)	モノクローナル IgG	マウス	Chemicon International Inc.	有り
ヒトのタイプ IV cPLA <sub>2</sub> 合成ペプチド中間分子配列 (アミノ酸241から260) <sup>a</sup>	ポリクローナル IgG	ヒツジで産生される	院内産生	有り

a: この抗体は、抗原として卵白アルブミンと結合したタイプIV cPLA<sub>2</sub> (ヒトの単球、U937細胞で見出される) のアミノ酸241から260を含む合成ペプチドを用いて調製される。抗原は、標準承認 (standard approved) プロトコルの筋肉内及び皮下経路と結合するフロインドアジュバント (Freunds adjuvant) とともにヒツジに注入される。得られた抗血清はプロテインAを用いて最初に精製され、さらに卵白アルブミンと結合しないペプチド241から260を有する親和性マトリックスを用いて精製されて、精製された親和性IgG抗体を提供する。

#### 【0019】

血液の入手できる成分でのタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の認識は、以下のようなその利用を道を開く。

- a) それらのレベルの直接の免疫評価法による診断の利用。
- b) クームスタイン試験の部分として間接的な診断感覚の使用。
- c) スライド又はスメア上の赤血球上又は内の免疫蛍光又は組織調製による認識。
- d) 患者の近くでの試験の全血液サンプルのタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質を認識するための免疫沈降又はその他の反

応の使用。

e) PLA<sub>2</sub>活性又は濃度の抑制に向けられる治療のモニタリングでの使用。

f) 薬の発見のためにPLA<sub>2</sub>活性又は濃度を抑制する薬剤のための研究での使用。

ここで、本発明は、以下の実施例に関して詳細に記載される。本発明は実施例により記載され、詳細の修正は、本発明の範囲から離れることなしに行なってもよいことは、理解されるであろう。

## 【0020】

### 実施例

#### 1. サンプルの収集

蛋白質の分離及び検出のためのサンプルの収集を以下のようにして行った。

1) 静脈血のサンプル(4から6 ml)を、EDTAを用いて静脈穿刺によって抗凝血のための標準濃度で収集した(ヴァキュテナー(Vacutainer、登録商標)又はStarstedt Monovette(登録商標))。また、当業者に知られているその他の適した抗凝血剤を使用してもよい。

2) サンプルを取り除いてから3分以内に、プロテアーゼ阻害剤を添加した。血液の体積4から6 mlに対して、以下のように、新たに調製したプロテアーゼ阻害剤カクテル0.5 mlを添加した。

単位ml当たりアプロチニン(Trasylo1、登録商標)濃縮10,000のカリクレイン失活剤3 mlに対して、2 mgのフェニルメチルスルホニルフッ化物(PMSF)及び0.5 mgのロイペプチンを添加した。当業者に知られているその他の適した阻害剤の調製法を使用してもよい。

3) 次に、血液サンプル全体を3000 rpm(1,000 g)で、10分間遠心分離した。血漿を除去し、白血球及び血小板の層( Buffy Coat)をプラスチックピペットにより除去して、チューブ内に赤血球を残した。

4) 体積において、赤血球と等しい、氷冷リン酸緩衝食塩水PBS pH 7.4又はその他の適した緩衝剤の量を添加し、赤血球及び緩衝剤を転化により混合した。

5) 次に、緩衝剤中の細胞を1,000 gで遠心分離し、工程3及び4を3回繰り返し、洗浄した赤血球を用意した。

6) 洗浄した赤血球を0.5 ml凍結し、アリコットを0.5 mlの緩衝剤に懸濁し、以

下のように調製した。1リットルの水中に0.37 gのKCl、0.74 gの二ナトリウムEDTA、3.0 gのトリス、9 gのNaClを含み、HClでpH 7.4に調整した（Kramerら, J. Biol. Chem. 266, 5268-5272）。あるいは、洗浄した赤血球を濃縮赤血球として直接凍結してもよい。

単純化された手順において、血液をEDTAヴァキューター内に収集し、3000 rpm (1000 g) で10分間遠心分離し、血漿及びバフィーコートを吸引により除去し、濃縮赤血球を凍結保存した。

7) これらのサンプルを-80 で凍結保存し、又はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動又は較正されたアッセイにおける免疫測定法のための溶解を準備するために簡単に凍結した後直接使用した。濃縮赤血球を使用前に凍結保存し、それらを上述の工程(6)に記載された緩衝剤中で解凍する。

単純化された手順を使用する場合、プロテアーゼ阻害剤は、200 mlの緩衝剤当たり1つの錠剤のCOMPLETE（登録商標）プロテアーゼ阻害剤（Boehringer Mannheim）の形態での解凍方法のために、赤血球に添加された緩衝剤中に含まれる。

#### 【0021】

### II. SDS PAGEを用いた蛋白質の分離及び検出

以下に記載するようにSDS PAGEを用いて蛋白質の分離及び検出を達成した。

SDS PAGEにおいて、サンプルを、100 ml当たり6%のSDS、0.5%のジチオスレイトール及び20 mlのグリセロールを含むトリス緩衝剤pH 6.8を含むサンプル緩衝剤の量で処理した（あるいは当業者に知られている緩衝剤を使用してもよい）。ライセートを添加して、サンプル緩衝剤中にライセートの4倍以上の希釈液を用意した。サンプルを電気泳動のための、標準SDS 7.5%ポリアクリルアミドゲルに移した。電気泳動の後、電気プロット法により、蛋白質をゲルから膜に移した。

試験膜を、ウサギにおいて産生される中間分子タイプIV cPLA<sub>2</sub>に対するポリクローナル抗体と反応させ、次いでワサビのペルオキシダーゼと共役しているブタにおいて産生される抗ウサギIgG抗体と反応させて、cPLA<sub>2</sub>抗原の存在を示した。ブランク膜をワサビのペルオキシダーゼと共役しているブタにおいて産生される抗ウサギIgG抗体と反応させた。ブランク膜で観測される任意のバンドは、cPLA<sub>2</sub>

抗原以外の抗原の存在による。

#### 【0022】

図1a及び1bは、以下のサンプルの2つのウエスタンブロット解析を示す（図1aは試験膜であり、図1bはブランク膜である）。

レーン1：分子量マーカー。

レーン2：タイプIV cPLA<sub>2</sub>を発現するバキュロウイルスに感染した昆虫細胞由来の細胞サイトゾル。

レーン3 - 12：患者のサンプル。サンプルはクロザピン上の精神分裂病の患者から（レーン4、7、9及び10）、神経遮断薬上の精神分裂病の患者から（レーン8及び12）、及びコントロール患者から（レーン3、5、6及び11）得られる。

試験膜上の患者のサンプルは上述のように分子量によって分類される3つのバンドタイプを示す。

グループA：1つのバンドは、97 kDa分子量マーカーより上に観測され、約100から105 kDaの分子量を有し、別のバンドは、97 kDaの分子量マーカーより下に観測され、約90から95 kDaの分子量を有する。

グループB：単一のバンドが約70 kDaの分子量で観測された。

グループC：3つのバンドが約60 kDaの分子量で観測された。この分子量分類の2つのバンドは、タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質であると思われる。また、ブランク膜に現れるこれらのうち最も識別可能なものは、小さい特異的な免疫学的応答を有し、タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質ではないであろう。

#### 【0023】

要約すると、赤血球ライセートは、5種の蛋白質、約90から約105 kDaの領域の2種、約70から約80 kDaの範囲の1種及び約50から約60 kDaの範囲の2種を含み、SDS PAGEウエスタンブロット解析において、タイプIV cPLA<sub>2</sub>の中間分子配列に対して調製されたポリクローナル抗体と特異的に反応した。

上述のように、グループA、B及びCで分類されたバンドは、それぞれリン酸化の異なる段階の無傷のタイプIV cPLA<sub>2</sub>分子及び蛋白質分解によりアミノ酸を失ったタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質のペプチド配列の2つのグループを表すかもしれない

。しかし、上述のように、本発明の範囲を、この理論によって限定することを意図しない。また、グループA、B及びCで分類されたバンドは、無傷のタイプIV cPLA<sub>2</sub>及びアミノ酸配列の長さが異なるタイプIV cPLA<sub>2</sub>のフラグメントを表すかもしれない。

#### 【0024】

### III. 酵素結合免疫測定法 (ELISA) を用いた蛋白質の検出

また、免疫測定法、特に酵素結合免疫測定法を使用して、赤血球のタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質を検出した。この方法は、蛋白質検出の蛍光終点を使用する。

サンプルを収集して、上述のように調製した。解析のために赤血球のサンプルを-80 で保存した。

以下の試薬はELISAで要求される。

#### 1) コーティング緩衝剤、pH 9.6

1リットルの脱イオン水中に1.59グラムの炭酸ナトリウム、2.93グラムの炭酸水素ナトリウムを含む。

#### 2) 洗浄緩衝剤、pH 7.4

800 mlの脱イオン水中に6.07グラムのトリス、0.2グラムの塩化カリウム、29.2グラムの塩化ナトリウムを含み、塩酸でpH 7.4に調整し、1リットルにした。

#### 3) 標準 / サンプル希釈剤のための緩衝剤、pH 7.4

800 mlの脱イオン水中に0.37グラムの塩化カリウム、0.74グラムのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、3グラムのトリス、8.58グラムの塩化ナトリウムを含み、pH 7.4に調整し、1リットルにした。

#### 4) 標準 / サンプル希釈剤

0.2グラムのヒトアルブミン及び1錠のComplete (登録商標) プロテアーゼ阻害剤 (Boehringer Mannheim) を添加した200 mlの緩衝剤 (3)。

#### 5) クエン酸溶液、pH 7.4

800 mlの脱イオン水に溶解した2.94のクエン酸ナトリウムを塩酸でpH 7.4に調整し、1リットルにした。

#### 6) 抗体共役試薬

5 mlの試薬(2)、6 mlのRoti-Block(登録商標、Rotech Scientific, Milton Keynes, UK)、0.2 mlの試薬(5)、0.012グラムのヒト血清アルブミン及び1 mlの院内抗cPLA<sub>2</sub> IgG(本明細書に記載された)-アルカリホスファターゼ接合体。

7) Lumi-Phos(登録商標) 530(ジオキセタンLumigen(登録商標) PPDを含む緩衝溶液、蛍光剤及び界面活性剤)を含む発光試薬(Bechman Coulter, UKから得られる)。

#### 【0025】

アッセイは、以下の方法に従って96ウェルマイクロタイタープレートを用いて行った。

1) 捕獲抗体(The Binding Site, Birmingham, UKから得られる)を生理食塩水で1:10に希釈し、500 µlのアリコットに-20 °Cで保存した。この抗体の1つのアリコットを11.5 mlのコーティング緩衝剤に添加し、混合して、100 µlの希釈した捕獲抗体を白いマイクロタイタープレートの各ウェルにピペットで移し、捕獲抗体でプレートのウェルをコートした。プレートをシールし、4 °Cで一晩保存した。次いで、使用前に、プレートを洗浄緩衝剤pH7.4(上述の試薬(2))で4回洗浄した。

2) 試薬(2)で1:2に希釈した300 µlのRoti-Block(登録商標)を各ウェルにピペットで移すことにより、プレートを遮断した。遮断は90分25 °Cで行った。遮断試薬を試薬(2)で4回洗浄して除去した。

3) 次いで、サンプル又は標準の複製アリコット(100 µl)を各マイクロタイタープレートウェルにピペットで移し、プレートを90分間25 °Cでインキュベートした。インキュベーションは、試薬(2)で4回プレートを洗浄することによって停止した。

4) 次いで、第二抗体(共役した抗体、試薬(6))を添加した。抗体を標準方法によってアルカリホスファターゼと共役した(Duncanら, Analytical Biochemistry 132, 68-73)。100 µlの抗体接合体、試薬(6)を各ウェルに添加して、プレートを90分間25 °Cでインキュベートした。

5) このインキュベーションの終わりで、プレートを試薬(2)で8回洗浄した。

6) 各ウェルに100  $\mu$ lの発光試薬(7)を添加することによりプレートのウェルで、発光を発生させて、20分間インキュベートして照度計(Luminoscan Labsystems, Helsinki)でシェイキングした。

7) 示されたサンプルの相対的光量単位で発光を測定し、標準タイプIV cPLA<sub>2</sub>標品のものと比較した。標準タイプIV cPLA<sub>2</sub>標品の使用は、cPLA<sub>2</sub>のためのアッセイで較正曲線を導くために使用される。図2は、平均標識の標準エラーで10個の分離アッセイから導かれる較正曲線を示す。

#### 8) サンプル調製

解析前に、凍結した赤血球を解凍し、10,000 gで5分間遠心分離し、サンプル希釈剤(試薬(4))で1:40に希釈した。

#### 9) 標準調製

U937細胞サイトゾルを標準として使用した。これをU937ヒトの単球培養から調製し(Clarkら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 7708-7712)、細胞を培養から回収し、標準/サンプル希釈液で再懸濁し、アルブミン含量を取り除き、11.6 g/100 mlのスクロースを添加した。細胞をParr ボンベの窒素キャビテーションによって分裂し、得られた調製品を150,000 gで1時間4 で遠心分離した。U937細胞サイトゾルの上澄みを等分し、標準化のために-80 で保存した。この材料の希釈のウエスタンブロット解析は、タイプIV cPLA<sub>2</sub>がウエスタンブロット法によって検出される点からタイプIV cPLA<sub>2</sub>含量のための値の配分を許容する。標準は-80 で安定である。すべてのアッセイは、等分された赤血球ヘモライゼート(haemolysate)の内部品質コントロールサンプルを含む。

10) 赤血球ヘモライゼートのタイプIV cPLA<sub>2</sub>の評価のための単位は、ヘモグロビンの単位グラム当たり  $\mu$ gのcPLA<sub>2</sub>である。

サンプルを0.04%のアンモニアに希釈し、540nmで光学密度を読み取ることにより、ヘモグロビンの量を評価し、既知の濃度のヘモグロビンに対して標準化した。

バッチ内で、変動の百分率係数(CV%)は、相対的な変動の測定であり、即ち算術的な手段の百分率として表される標準偏差であり、典型的には8.6%で測定され、バッチ間CV%は、典型的には、10.8%で測定される。これらは、それぞれ

ヘモグロビンの単位グラム当たり9.0 ngのcPLA<sub>2</sub> (ng/gHb) 及び9.7 ng/gHbで測定される。

#### 【0026】

#### IV. 種々の患者グループの赤血球のタイプIV cPLA<sub>2</sub>レベルの測定

タイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の赤血球における測定の臨床適用の実例として、種々の血液サンプルを定義された精神医学の病気を有する各患者のグループ及びコントロールグループから収集した。本研究における各患者グループからのサンプルを上述のELISA法を用いて解析した。各グループ内の患者は、以下に記載するように、その臨床的診断のために提示されている基準を満足する。上述の工程1から7までを用いてサンプルを収集した。また、試料を収集し、洗浄工程4から5を省いて調製した。工程1から3及び6から7のみを使用するこの別の短縮した細胞調製法を、cPLA<sub>2</sub>の測定されたレベルでのその影響について調べた。比較は、完全な洗浄手順のサンプル及び短縮化された手順を用いたサンプルから行った。2つの赤血球調製手順を比較した場合に、明らかな違いは、グループ内又はすべてのグループでの結果の組み合わせで見出されなかった。患者のグループは以下の通りであった。

#### 【0027】

##### グループ1：精神分裂病

精神分裂病の診断でDSM IV基準を満足する49人の患者 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Edition, American Psychiatric Association 1994)。

男性36人、女性13人、年齢17歳から66歳、平均年齢37.3 +/- 11.9歳。

##### グループ2：失読症

失読症の同定のための認められた基準を有する27人のボランティア、即ち改定ウェクスラー成人知能検査 (Wechsler Adult Intelligence Scale Revised) (W AIS-R) 配分等価 (pro-rated equivalent) IQ (著作権 The Psychological Corporation Limited 1986) 及びワイドレンジアチーブメントテストスコア (Wide Range Achievement Test score) (WRAT) (Wilkinson (著作権) Wide Range Inc, 1993) の間の15ポイント以上の相違又は7以上に達するバンガー失読症試験

スコア (Bangor Dyslexia Test score) (T.R. Miles in Dyslexia, The Pattern of Difficulties. Grenada, 1983)。

男性17人、女性10人、年齢16歳から67歳、平均年齢35.4 +/- 13.2歳。

グループ3：コントロール

コントロールグループを含む51人のボランティア。

男性25人、女性26人、年齢16歳から57歳、平均年齢35.4 +/- 12.4歳。

#### 【0028】

本研究の結果を、上述のELISA法によって評価した赤血球タイプIV cPLA<sub>2</sub>又は蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の頻度ヒストグラムをヘモグロビン (Hb) の単位グラム当たり  $\mu\text{g}$  のcPLA<sub>2</sub> で示す図3 A、3 B及び3 Cに示す。図3 A、3 B及び3 Cは、それぞれコントロールグループ、精神分裂病グループ及び失読症グループを示す。

ヘモグロビン (Hb) の単位グラム当たり  $\mu\text{g}$  として測定された赤血球タイプIV cPLA<sub>2</sub> 又は蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub> と免疫学的に同相である蛋白質のためのアッセイの結果の分布は、ポジティブに非対称であり (positively skewed) (図3)、ノンパラメトリック検定法 (non-parametric tests) を解析で適用した。精神分裂病患者グループ及びコントロールのマンホイットニーU検定 (Mann Whitney U test) は、コントロールグループと比較して精神分裂病グループにおける赤血球cPLA<sub>2</sub> の明らかな上昇を示した ( $P < 0.0001$ )。コントロールと比較して失読症の被験者においては、赤血球cPLA<sub>2</sub> は小さく上昇した ( $P < 0.001$ )。赤血球cPLA<sub>2</sub> についてコントロールグループの95%を含む参照領域を決定することにより、Hbの単位グラム当たり2.8  $\mu\text{g}$  の赤血球cPLA<sub>2</sub> について参照領域上限カットオフのポイントを決定した。これは絶対値ではないが、上述のようにこれらの研究で使用された標準化手順から導出される。

#### 【0029】

赤血球ヘモライセートのタイプIV cPLA<sub>2</sub> 蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub> と免疫学的に同相である蛋白質のELISA解析の確認は、SDS PAGE及び前述の方法を用いたウエスタンブロット解析を用いて得てもよい。コントロールグループの患者及び精神分裂病の患者のグループ (グループI) の患者からのサンプルは、SDS PAGE及

びウエスタンブロットを用いた別の解析がなされる。グループIサンプルを、赤血球ヘモライセートのタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の高いレベルを有するためにELISAによって明らかになった患者から得た。

図4は、赤血球ヘモライセートのタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質及びSDS PAGE/ウエスタンブロットによって観測されるコントロール患者由来の赤血球ヘモライセートで観測される蛋白質を示す。ヒトの単球U937細胞由来のcPLA<sub>2</sub>蛋白質の分子量の蛋白質は、精神分裂病患者由来のヘモライセートで観測され、コントロール被験者由来のヘモライセートにおいてこの分子量を有し、検出される蛋白質は存在しなかった。図4に示されたウエスタンブロット解析における種々のサンプルは、以下の通りである。

レーン1：分子量マーカー

レーン2：タイプIV cPLA<sub>2</sub>を発現するバキュロウイルスに感染した昆虫細胞由来のサイトゾル

レーン3：cPLA<sub>2</sub>蛋白質を含むヒトの単球U937細胞由来のサイトゾル

レーン4：コントロール被験者由来の赤血球ヘモライセート

レーン5：精神分裂病被験者由来の赤血球ヘモライセート

【図面の簡単な説明】

【図1 a】

試験膜のウエスタンブロット解析を示す。

【図1 b】

ブランク膜のウエスタンブロット解析を示す。

【図2】

分離アッセイから導かれる較正曲線を示す。

【図3 a】

コントロールグループについて赤血球タイプIV cPLA<sub>2</sub>又は蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の頻度ヒストグラムを示す。

【図3 b】

精神分裂病グループについて赤血球タイプIV cPLA<sub>2</sub>又は蛋白質又はタイプIV c

PLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の頻度ヒストグラムを示す。

【図3c】

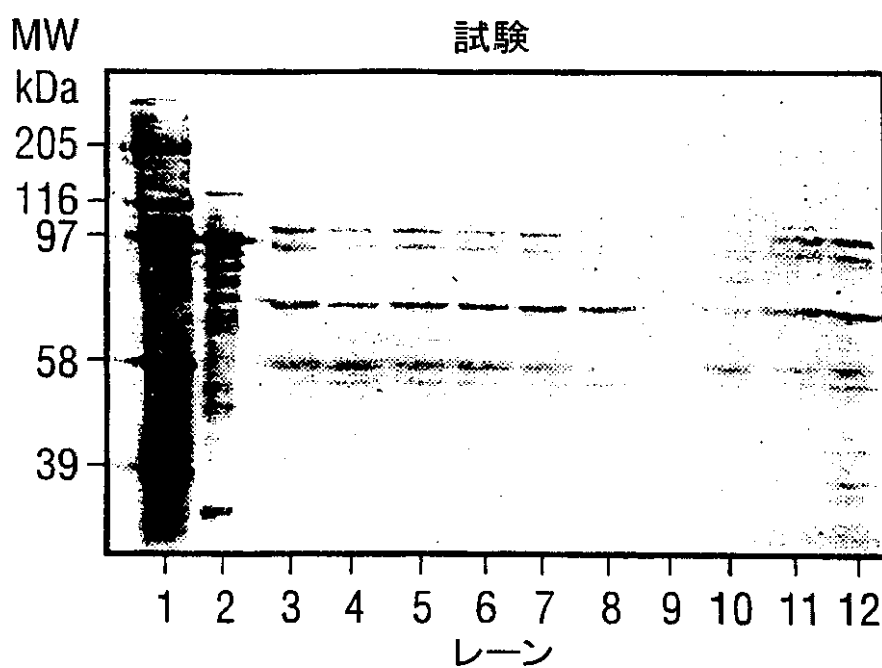
失読症グループについて赤血球タイプIV cPLA<sub>2</sub>又は蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質の頻度ヒストグラムを示す。

【図4】

赤血球ヘモライセートのタイプIV cPLA<sub>2</sub>蛋白質又はタイプIV cPLA<sub>2</sub>と免疫学的に同相である蛋白質及びSDS PAGE/ウエスタンブロットによって観測されるコントロール患者由来の赤血球ヘモライセートで観測される蛋白質を示す。

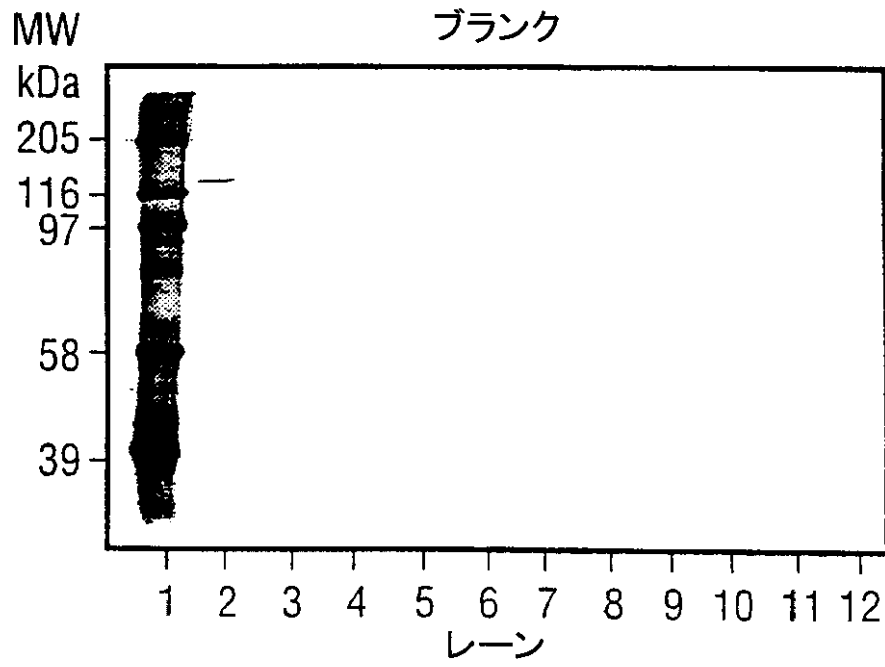
【図1a】

FIG. 1a

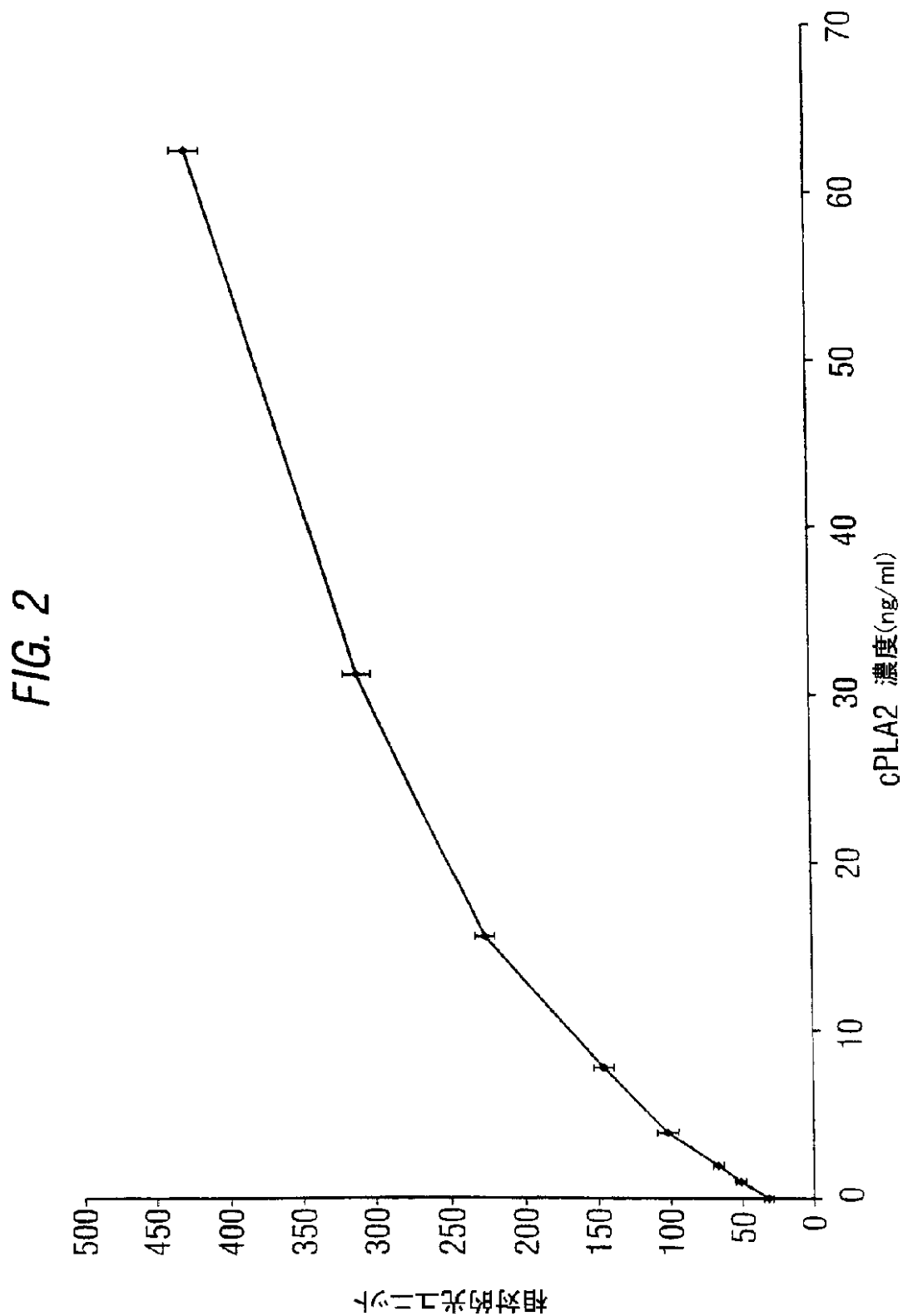


【図1b】

FIG. 1b

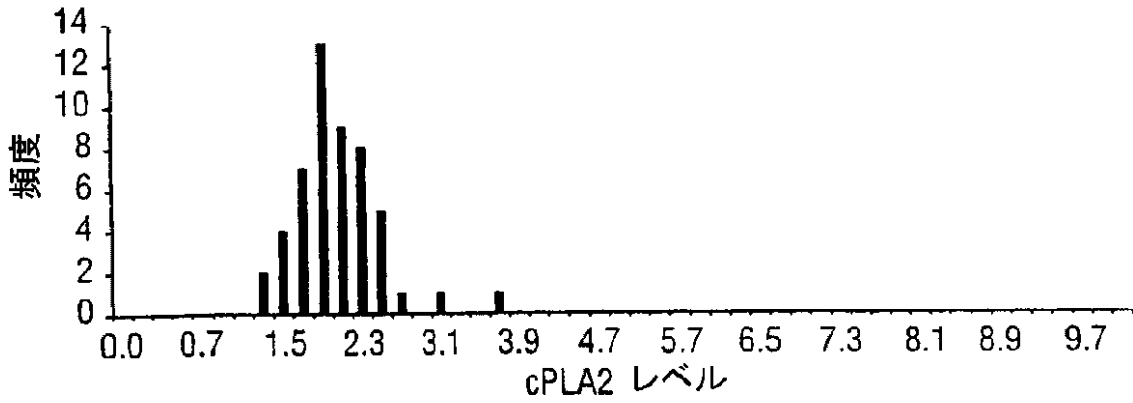


【図2】



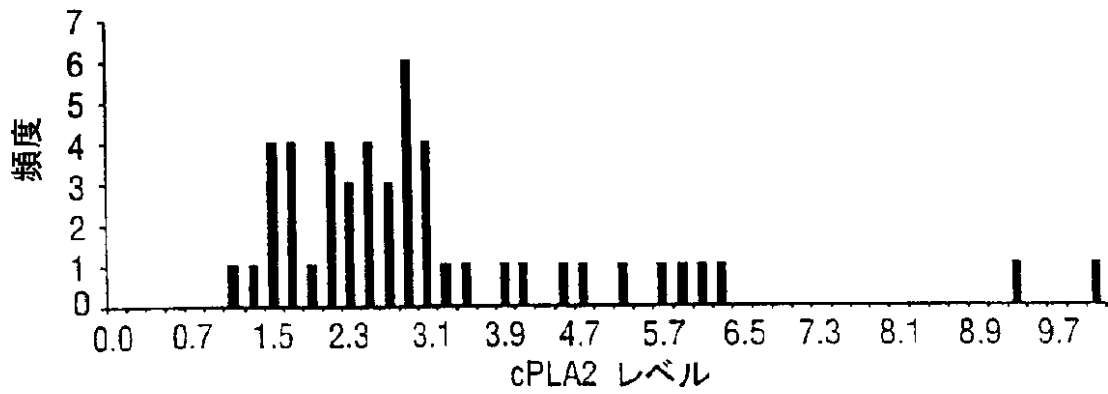
【図3A】

FIG. 3A



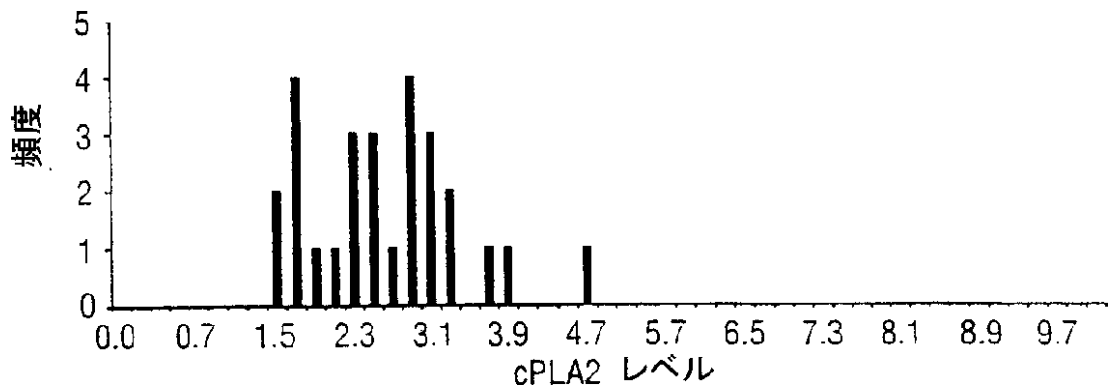
【図3B】

FIG. 3B



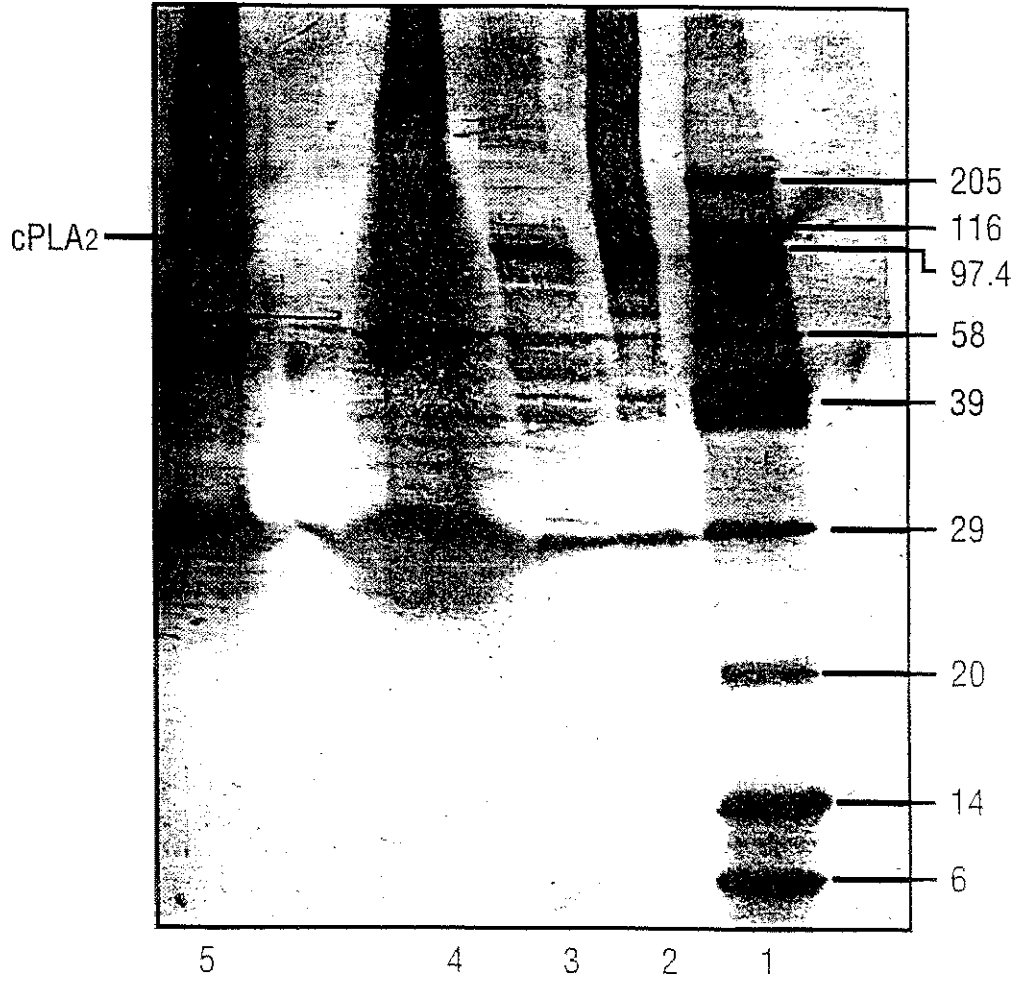
【図3C】

FIG. 3C



【図4】

FIG. 4



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/GB 00/00845
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/573 G01N33/80 C12N9/20		
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) IPC 7 G01N C12Q C12N		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1994-284640 XP002143989 FILIMONKOVA N.N.: "Predicting the course of psoriasis by determining the phospholipase A2 activity in the erythrocytes and blood plasma" & RU 2 009 509 C (SYERD SKIN VENERAL DISEASES RES INST), 15 March 1994 (1994-03-15) the whole document --- -/--	I-33
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*A* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 7 September 2000		Date of mailing of the international search report 20/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentleer 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, P

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 00/00845

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CLARK J.D. ET AL.: "A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca <sup>2+</sup> -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP" CELL, vol. 65, 1991, pages 1043-1051, XP002143986 cited in the application	27,28
A	abstract	1-26, 29-33
X	ZHU X. ET AL.: "Quantitation of the cytosolic phospholipase A2 (type iv) in isolated human peripheral blood eosinophils by sandwich-ELISA" J. IMMUNOLOG. METH., vol. 199, 1996, pages 119-126, XP002143987	27,28
A	the whole document	1-26, 29-33
X	US 5 354 677 A (KNOPF JOHN L ET AL) 11 October 1994 (1994-10-11) claims	27,28
X	US 5 527 698 A (KNOPF JOHN L ET AL) 18 June 1996 (1996-06-18) claims	27,28
X	US 5 593 878 A (KNOPF JOHN L ET AL) 14 January 1997 (1997-01-14) claims	27,28
X	US 5 279 957 A (GROSS RICHARD) 18 January 1994 (1994-01-18) abstract claim 1	27,28
P,X	R. TODD PICKARD ET AL.: "Molecular cloning of two new human paralogs of 85-KDa cytosolic phospholipase A2" J. BIOL. CHEM., vol. 274, no. 13, 26 March 1999 (1999-03-26), pages 8823-8831, XP002143988 cited in the application	27,28
A	the whole document	1-26, 29-33
A	GATTAZ W.F. ET AL.: "Increased plasma phospholipase A2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy" BIOLOGICAL PSYCHIATRY, vol. 22, 1987, pages 421-426, XP000933408 the whole document	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB 00/00845

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUDSON C.J. ET AL.: "Phospholipases: in search of a genetic base of schizophrenia" PROSTAGLANDINS, LEUKOTRIENES AND ESSENTIAL FATTY ACIDS, vol. 55, 1996, pages 119-122, XP000925733 the whole document -----	1-33

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 00/00845

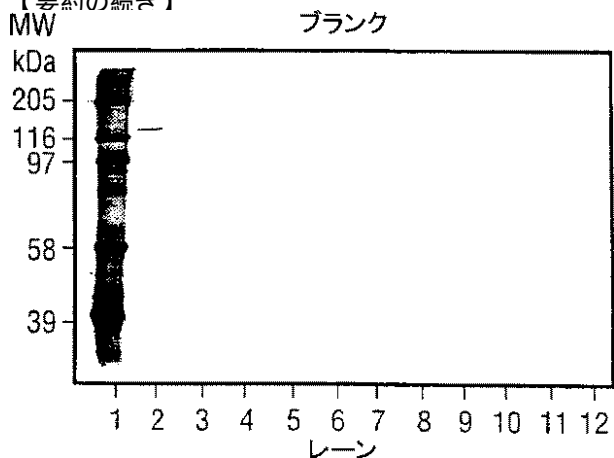
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
RU 2009509 C	15-03-1994	NONE	
US 5354677 A	11-10-1994	US 5622832 A US 5593878 A US 5527698 A US 5322776 A	22-04-1997 14-01-1997 18-06-1996 21-06-1994
US 5527698 A	18-06-1996	US 5354677 A US 5622832 A US 5593878 A US 5322776 A	11-10-1994 22-04-1997 14-01-1997 21-06-1994
US 5593878 A	14-01-1997	US 5354677 A US 5622832 A US 5527698 A US 5322776 A	11-10-1994 22-04-1997 18-06-1996 21-06-1994
US 5279957 A	18-01-1994	NONE	

フロントページの続き

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

【要約の続き】

ブランク



专利名称(译)	诊断测试		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002539430A</a>	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2000604226	申请日	2000-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	豪华戴尔有限公司		
申请(专利权)人(译)	豪华戴尔有限公司		
[标]发明人	グレンアラスターキャンベルアグニュー マクドナルドドナルドジョン		
发明人	グレン アラスター キャンベル アグニュー マクドナルド ドナルド ジョン		
IPC分类号	G01N33/573 C12N9/20 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/80		
CPC分类号	G01N33/573 C12Q1/44 G01N33/68 G01N33/80 G01N2800/30 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/573.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.K		
优先权	1999005417 1999-03-09 GB 1999019952 1999-08-23 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于与IV型胞质磷脂酶A2 (cPLA2) 或IV cPLA2进行免疫学同相蛋白质检测的方法，该方法特别适用于含有高度不饱和脂肪酸的细胞。包括将红细胞用于诊断涉及信号系统受损的疾病。

