

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-91735

(P2018-91735A)

(43) 公開日 平成30年6月14日(2018.6.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	2 G 0 5 3
GO 1 N 27/76 (2006.01)	GO 1 N 27/76	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2016-235514 (P2016-235514)	(71) 出願人 511113475 磁量生技股▲ふん▼有限公司 台湾新北市新店区中正路538巷12号3 F
(22) 出願日 平成28年12月5日 (2016.12.5)	
(11) 特許番号 特許第6273338号 (P6273338)	(74) 代理人 100130111 弁理士 新保 斉
(45) 特許公報発行日 平成30年1月31日 (2018.1.31)	(72) 発明者 楊 謝樂 台湾新北市新店区中正路538巷12号3 樓
特許法第30条第2項適用申請有り [公開場所] <a href="https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-016-0198-5">https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-016-0198-5</a> [公開日] 平成28年6月8日 [公開者] 楊謝樂、邱銘章、林靜嫻、楊哲權、謝振傑、陳信賢、劉秉勳 [発明の内容] パーキンソン病からパーキンソン病認知症を特定する方法に関する研究	Fターム(参考) 2G053 AB06 BA08 BB02

(54) 【発明の名称】 パーキンソン病からパーキンソン病認知症を特定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】被験者において正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法の提供。

【解決手段】被験者の血液試料中の - シヌクレインの生体外免疫磁氣的低下 (IMR) シグナルを検出し、そのうち、(a) 前記IMRシグナルが、 - シヌクレインに対する抗体を含む磁気ナノ粒子と結合した - シヌクレインにより生成される工程と、(b) 工程(a)で検出された - シヌクレインのIMRシグナルをロジスティック関数(I)に当てはめ、血液試料中の - シヌクレインの濃度を計算し、(c) 工程(b)で取得された - シヌクレインの濃度と所定の閾値範囲を比較し、所定の閾値範囲より高い場合はパーキンソン病認知症、所定の閾値範囲の間である場合は正常な認知力のパーキンソン病、所定の閾値範囲より低い場合は健康であることを示す工程とを含む。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験者において正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法であって、

(a) 被験者の血液試料中の  $\alpha$ -シヌクレインの生体外免疫磁氣的低下 (immunomagnetic reduction; IMR) シグナルを検出し、そのうち、前記 IMR シグナルが、 $\alpha$ -シヌクレインに対する抗体を含む磁気ナノ粒子と結合した  $\alpha$ -シヌクレインにより生成される工程と、

(b) 工程 (a) で検出された  $\alpha$ -シヌクレインの IMR シグナルをロジスティック関数 (1) に当てはめ、血液試料中の  $\alpha$ -シヌクレインの濃度を計算し、

10

$$\text{IMR}(\%) = \frac{A-B}{1 + \left(\frac{\varphi_{\alpha\text{-syn}}}{\varphi_0}\right)^\gamma} + B$$

(1)

そのうち、IMR (%) は  $\alpha$ -シヌクレインの IMR シグナルであり、 $\varphi_{\alpha\text{-syn}}$  は  $\alpha$ -シヌクレインの濃度であり、フィッティングパラメータ A はバックグラウンド値であり、B は最大値であり、 $\varphi_0$  は IMR シグナルが  $(A+B)/2$  に等しいときの  $\alpha$ -シヌクレインの濃度であり、 $\gamma$  は  $\varphi_{\alpha\text{-syn}}$  を x 軸、IMR (%) を y 軸としたときの曲線のデータポイント  $\varphi_0$  での傾斜である工程と、

20

(c) 工程 (b) で取得された  $\alpha$ -シヌクレインの濃度と、所定の閾値範囲を比較し、そのうち、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲より高い場合、パーキンソン病認知症であることを示し、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲の間である場合、正常な認知力のパーキンソン病であることを示し、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲より低い場合、健康であることを示す工程と、

を含むことを特徴とする、正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法。

## 【請求項 2】

前記磁気ナノ粒子の材料が、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ 、 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ 、 $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  で構成される群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法。

30

## 【請求項 3】

前記磁気ナノ粒子の材料が  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  であることを特徴とする、請求項 1 に記載の正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法。

## 【請求項 4】

前記血液試料が血漿であることを特徴とする、請求項 1 に記載の正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

40

本発明はパーキンソン病認知症をパーキンソン病から特定する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病に次いで、2 番目に多い神経変性病である。66 歳以上の高齢者の 1% 超が PD を患っている。世界で約 1000 万人が PD を抱えて暮らしている。PD 患者一人当たりの直接的または間接的医療コストは年間約 10 万米ドルと見積もられている。特に米国、カナダ、欧州、オーストラリアなど、多くの国が維持不可能な医療費の増加を心配している。PD の診断、治療、ワクチンの開発に多くのリソースと努力が注がれている。

## 【0003】

50

P D 診断の臨床基準は動作緩慢、歯車様硬直、休止時振戦、姿勢の不安定など運動障害の観察である。これらの臨床的特徴は一般的に使用されているが、P D の診断にはいくつかの重大な問題がある。例えば、他の運動障害（例：多系統萎縮症、大脳皮質基底核変性症、または進行性核上まひ）も P D の臨床症状と重なり、P D 診断の精度が低下することがある。さらに、臨床症状は大脳基底核、特に黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの 50% 超の変性後に現れることが報告されている。臨床的な運動障害の観察を使用した早期段階での P D 診断は非常に難しい。遺伝子配列の分析は早期段階での P D 診断においてより優れた方法であるかもしれない。それでも、P D 患者のうち遺伝性は 10% のみである。P D 患者の 90% は散発性である。

#### 【0004】

パーキンソン病認知症（PDD）と呼ばれる認知機能障害と認知症の発症は、P D において一般的である。P D における認知症進行の予測は難しく、当該分野において大きな影響がある。研究者らは現在 P D と PDD を区別する生体分子診断の達成に取り組んでいる。 - シヌクレインは P D または PDD の最も認知度の高いバイオマーカーである。 - シヌクレイン分子はリン酸化した、リン - - シヌクレイン分子で、相互に容易に凝集してドーパミン作動性ニューロン内でレビー小体を形成する。レビー小体を有するドーパミン作動性ニューロンは変性し、ドーパミンを発現する能力を失う。脳の運動皮質中の神経系細胞がドーパミン不足のため損傷し、運動障害が促進される。

#### 【0005】

数多くの発見において、P D または PDD 患者では健康な被験者と比較して、レビー小体の形成により脳脊髄液（CSF）中の - シヌクレインの濃度が低下することが示されている。しかしながら、血中 - シヌクレイン濃度におけるばらつきに付いて報告されている結果は一貫性がない。血漿 - シヌクレインについての分析結果に一貫性がない主な理由は、この分析法の低濃度検出限界が優れないためである。これらの報告によると、酵素免疫測定法（ELISA）が CSF または血漿中の - シヌクレインの分析に使用されている。 - シヌクレインは脳と脊髄で発現され、これらの部位では豊富であるが、末梢血系では量が非常に少ない。ELISA は血漿中の - シヌクレインのように、超低濃度のタンパク質を正確に検出することができない。このため、ELISA を使用した P D または PDD の生体分子診断における - シヌクレインの分析には血漿の代わりとして CSF のほうが適している。

#### 【0006】

CSF は通常腰椎穿刺によって採取されるが、これはリスクが高く、不快感を与える。CSF 中の - シヌクレイン分析による早期診断は一般人口に広く受け入れられてはいない。代わりに、血液は医療機関ですっと簡単に採取することができる。したがって、血漿中の超低 - シヌクレインの分析を実現するために、高感度の検出技術が必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

本発明の目的は、被験者における正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法を提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明の被験者における正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を特定する方法は、(a) 被験者の血液試料中の - シヌクレインの生体外免疫磁氣的低下 (immunomagnetic reduction; IMR) シグナルを検出し、そのうち、前記 IMR シグナルが、 - シヌクレインに対する抗体を含む磁気ナノ粒子と結合した - シヌクレインにより生成される工程と、(b) 工程 (a) で検出された - シヌクレインの IMR シグナルをロジスティック関数 (I) に当てはめ、血液試料中の - シヌクレインの濃度を計算し、

10

20

30

40

50

$$\text{IMR}(\%) = \frac{A-B}{1 + \left(\frac{\varphi_{\alpha\text{-syn}}}{\varphi_0}\right)^\gamma} + B$$

( I )

そのうち、IMR(%)は $\alpha$ -シヌクレインのIMRシグナルであり、 $\varphi_{\alpha\text{-syn}}$ は $\alpha$ -シヌクレインの濃度であり、フィッティングパラメータAはバックグラウンド値であり、Bは最大値であり、 $\varphi_0$ はIMRシグナルが((A+B)/2)に等しいときの $\alpha$ -シヌクレインの濃度であり、 $\gamma$ は $\varphi_{\alpha\text{-syn}}$ をx軸、IMR(%)をy軸としたときの曲線のデータポイント $\varphi_0$ での傾斜である工程と、(c)工程(b)で取得された $\alpha$ -シヌクレインの濃度と、所定の閾値範囲を比較し、そのうち、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲より高い場合、パーキンソン病認知症であることを示し、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲の間である場合、正常な認知力のパーキンソン病であることを示し、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲より低い場合、健康であることを示す工程と、を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】免疫磁氣的低下を使用して磁気Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子上に固定化された抗に対する生物活性試験を示すグラフである。

【図2】450nm、O.D.450nmでの $\alpha$ -シヌクレイン濃度依存的なIMRシグナル(実線)と吸光度(optical absorbance density)(破線)を示すグラフである。

20

【図3】 $\alpha$ -シヌクレイン測定用のダイナミックレンジ分析のためのPBS溶液中の変換された $\alpha$ -シヌクレイン濃度 $\varphi_{\alpha\text{-syn}}$ 、IMR対スパイクした $\alpha$ -シヌクレイン濃度 $\varphi_{\alpha\text{-syn}}$ を示すグラフである。

【図4】健康な被験者、PD患者、PDD患者についてIMRを使用して検出された血漿 $\alpha$ -シヌクレイン濃度を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

発明者らは、例えば1~10pg/ml以下などの超低濃度で生体分子を量的に検出するための免疫磁氣的低下(IMR)と呼ばれる免疫測定技術を開発した。IMRの超高感度に主に寄与しているのは、抗体機能性磁気ナノ粒子の利用である。これらの磁気ナノ粒子は試薬中によく分散され、試験試料中のあらゆる場所の標的生体分子を捕捉することができる。そのほか、粒子がナノレベルのサイズであるため、合計の結合免責が極めて大きい。したがって、磁気ナノ粒子の表面上に固定化された抗体は非常に効率的に標的生体分子に結合することができ、IMRを使用した超高感度の免疫測定が確立された。IMRはヒトの血漿中の超低濃度の $\alpha$ -アミロイドおよびタウ蛋白の分析に適用できることが示されている。健康な被験者と、アルツハイマー病による軽度認知障害患者間の明確な区別が血漿 $\alpha$ -アミロイドとタウ蛋白の分析によって明らかにされた。これらの結果によって、ヒト血漿中の超低濃度 $\alpha$ -シヌクレインを分析し、PDまたはPDDの生体分子診断を達成する、または血漿 $\alpha$ -シヌクレイン濃度によってPDとPDDを区別することの実行可能性を調査する動機付けを得た。この作業においては、IMRを利用した $\alpha$ -シヌクレイン分析用の試薬を調製する。試薬及び $\alpha$ -シヌクレイン分析の特性を調べる。さらに比較のため、ELISAを使用した $\alpha$ -シヌクレインに関する分析特性を調べる。最後に、血漿 $\alpha$ -シヌクレインの分析によるPD患者、PDD患者、健康な被験者の区別についての初期的な結果を報告する。この作業において行われる横断的研究はPDにおけるPDDの進行予測に対応することはできないが、結果はPDDとPDの区別におけるこの血漿 $\alpha$ -シヌクレイン測定方法の使用可能性を示唆している可能性がある。

30

40

【0011】

本発明の被験者における正常な認知力のパーキンソン病またはパーキンソン病認知症を

50

特定する方法は、(a)被験者の血液試料中の  $\alpha$ -シヌクレインの生体外免疫磁氣的低下 (immunomagnetic reduction; IMR) シグナルを検出し、そのうち、前記 IMR シグナルが、 $\alpha$ -シヌクレインに対する抗体を含む磁気ナノ粒子と結合した  $\alpha$ -シヌクレインにより生成される工程と、(b)工程(a)で検出された  $\alpha$ -シヌクレインの IMR シグナルをロジスティック関数 (I) に当てはめ、血液試料中の  $\alpha$ -シヌクレインの濃度を計算し、

$$IMR(\%) = \frac{A-B}{1 + \left(\frac{\varphi_{\alpha-syn}}{\varphi_0}\right)^{\gamma}} + B$$

10

(I)

そのうち、IMR (%) は  $\alpha$ -シヌクレインの IMR シグナルであり、 $\varphi_{\alpha-syn}$  は  $\alpha$ -シヌクレインの濃度であり、フィッティングパラメータ A はバックグラウンド値であり、B は最大値であり、 $\varphi_0$  は IMR シグナルが  $(A+B)/2$  に等しいときの  $\alpha$ -シヌクレインの濃度であり、 $\gamma$  は  $\varphi_{\alpha-syn}$  を x 軸、IMR (%) を y 軸としたときの曲線のデータポイント  $\varphi_0$  での傾斜である工程と、(c)工程(b)で取得された  $\alpha$ -シヌクレインの濃度と、所定の閾値範囲を比較し、そのうち、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲より高い場合、パーキンソン病認知症であることを示し、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲の間である場合、正常な認知力のパーキンソン病であることを示し、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度が所定の閾値範囲より低い場合、健康であることを示す工程と、を含む

20

【0012】

好ましい実施態様において、前記磁気ナノ粒子の材料は、 $Fe_3O_4$ 、 $Fe_2O_3$ 、 $MnFe_2O_4$ 、 $CoFe_2O_4$ 、 $NiFe_2O_4$  で構成される群より選択される。

【0013】

別の好ましい実施態様において、前記磁気ナノ粒子の材料は  $Fe_3O_4$  で構成される群より選択される。

【0014】

更に好ましい実施態様において、前記血液試料は血漿である。

【実施例】

30

【0015】

以下の実施例は本発明のさまざまな要素と特徴を説明するためだけのものであり、本発明を限定しない。

【0016】

方法

【0017】

$\alpha$ -シヌクレイン分析用試薬は磁気  $Fe_3O_4$  ナノ粒子 (MF-DEX-0060、MagQu)  $\alpha$ -シヌクレインに対する機能性モノクローナル抗体 (sc-12767、Santa Cruz Biotech.) を含む。磁気  $Fe_3O_4$  ナノ粒子への抗体固定に関する詳細なプロセスは Horng et al. (IEEE Trans Appl Supercond. 2005; 15: 668~671) 及び Yang et al. (J Magn Magn Mater. 2008; 320: 2688~2691) で説明されている。抗体機能性磁気  $Fe_3O_4$  ナノ粒子は pH=7.2 リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液中に分散される。粒径分布が動的レーザー光散乱法 (Nanotracs-150、Microtracs) により分析される。試薬の磁気濃度は振動試料磁力計 (HysterMag、MagQu) を使用して測定される。磁気ナノ粒子上の抗体の生物活性が IMR 分析器 (XacPro-S、MagQu) を使用して測定される。IMR 分析器は磁気センサーとして高温超伝導量子干渉計 (High-Tc SQUID) 磁力計を装備した AC 磁気磁化率計である。AC 磁気磁化率計の詳細については Yang et al. (IEEE Trans Appl Supercond. 2013; 23: 1600

40

50

604~1600607)及びChieh et al.(J Appl Phys 2008、103:014703-1-6)で説明されている。IMRシグナルと $\beta$ -シヌクレインの濃度間の関係を確立するため、PBS溶液でスパイクされた $\beta$ -シヌクレイン(ab51189、Abcam)が用意された。IMRシグナルの各測定について、80 $\mu$ lの試薬が40 $\mu$ lの $\beta$ -シヌクレイン溶液と混合され、続いてIMR分析器(XacPro-S、MagQu)を使用してIMRシグナルが検出された。 $\beta$ -シヌクレイン溶液の各濃度でIMRシグナルに対して同じ測定が行われた。IMRシグナルの測定に加え、 $\beta$ -シヌクレイン濃度依存的吸光度単位(optical absorbance unit)を見つけるために市販のELISAキット(KHB0061、Novex)が使用された。

10

## 【0018】

本発明に参加した志願者には、主要な全身性疾患、手術、入院の医療チェックリストが与えられた。心不全、最近の心筋梗塞(過去6ヶ月間)、悪性腫瘍(過去2年間)、または管理不良の糖尿病(HbA1C>8.5)を含む、管理されていない疾患を報告した志願者は除外された。また、志願者には健康診断も実施された。本発明は大学病院の倫理委員会および治験審査委員会により承認された。

## 【0019】

参加者には、10mlの非絶食静脈血(K3 EDTA、ラベンダーキャップ採血管)の提供が求められた。各試料にサンプリング順序に従って登録番号が割り当てられた。従って、試験室スタッフには被験者の臨床状態および人口学的データが知らされなかった。血液試料は採取の1時間以内に遠心分離され(2500g、15分間)、血漿がクライオチューブに分割され、-80℃で最長3ヶ月保管された後、IMRによる測定のため解凍された。IMRによる $\beta$ -シヌクレイン濃度の測定用に、80 $\mu$ lの試薬が40 $\mu$ lの血漿と混合された。各血漿試料について同様の測定が行われた。

20

## 【0020】

38~73歳の健康な被験者からのヒト血漿試料が9つ、PD患者(38~85歳)からのヒト血漿試料が9つ、PDD患者(60~81歳)からのヒト血漿試料14が、IMRを使用した $\beta$ -シヌクレイン分析に使用された。PD患者とPDD患者は臨床症状を使用して特定された。PD患者は認知的に正常であることに注意する。手順を行う前に、参加した患者全員にインフォームドコンセントが提供され、本発明は国立台湾大学病院研究倫理委員会により承認された。

30

## 【0021】

抗体機能性磁気Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子の流体力学的径の平均値は55.5nmであり、粒子流体力学的径の標準偏差は12.7nmであった。走査型電子顕微鏡を使用して、抗体機能性磁気Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ナノ粒子の径の平均値は~40nmとして取得された。試薬は飽和磁化0.3emu/gの超常磁性である。以前に公開された文献(J Appl Phys 2013、144903-1-5)によると、0.3emu/gの試薬1ml中における抗体機能性ナノ粒子の数はおよそ10<sup>13</sup>である。試薬1ml中の抗体機能性磁気ナノ粒子の合計表面積は約1000cm<sup>2</sup>である。実験では、80 $\mu$ lの試薬が使用される。各アッセイの試薬80 $\mu$ l中の抗体機能性磁気ナノ粒子の合計表面積は約80cm<sup>2</sup>である。96ウェルELISAプレートと比較する場合、各ウェルの抗体と標的生体分子間の結合面積は0.45cm<sup>2</sup>である。従って、IMRでの結合面積はELISAのそれより180倍近く大きいということになる。

40

## 【0022】

$\beta$ -シヌクレインと磁気ナノ粒子上の抗体間の結合のためIMRシグナルを測定することによって磁気ナノ粒子に固定化された抗体の生物活性が調べられる。図1に示すように、試薬と被験溶液を混合した後の試薬の時間依存的ac磁化率 $\mu_{ac}$ が記録された。純PBS溶液と、 $\beta$ -シヌクレイン溶液3.1fg/mlの2つの被験試料が作製された。図1中の破線は、試薬とPBS溶液の混合物の時間依存的ac磁化率 $\mu_{ac}$ を表す。明らかに、破線の経時的 $\mu_{ac}$ はほぼ変化のないままである。しかしながら、試薬と $\beta$ -シヌクレイン

50

3.1 fg/mlの混合溶液に対応する実線については、経時的  $a_c$  が45分間で低下して、より低いレベルに到達している。-シヌクレインと磁気ナノ粒子上の抗体間の結合による試薬の  $a_c$  磁化率  $a_c$  における大幅な減少が観察される。

【0023】

試薬の  $a_c$  磁化率  $a_c$  における減少を定量化するため、-シヌクレインと磁気ナノ粒子上の抗体間の結合前/後の最初/最後の  $a_c$  が図1に示す経時的  $a_c$  に従って計算される。以前に公開された文献 (ACS Chem Neurosci. 2011; 2: 500-505; J Appl Phys 2010, 107: 074903-1-5) で言及されていたように、試薬の  $a_c$  磁化率  $a_c$  における減少の判定のための信頼区間は、図1に示す時間依存的  $a_c$  磁化率  $a_c$  の最初と最後の40~50分以内である。本発明において、最初と最後の45分以内試薬の  $a_c$  磁化率  $a_c$  のデータが  $a_c$  の減少の判定に使用される。

10

【0024】

図1において、最初と最後の45分の区間の間の磁化率  $a_c$  の  $p$  値は、PBS溶液の場合0.046であった。PBSと混合された試薬の  $a_c$  磁化率  $a_c$  では若干の減少が観察される。3.1 fg/mlの-シヌクレイン溶液の場合、最初と最後の45分の区間の間の磁化率  $a_c$  の  $p$  値は、0.007であった。-シヌクレイン溶液と混合された後の試薬の時間依存的  $a_c$  磁化率  $a_c$  における明確な減少が証明された。

【0025】

最初の45分間内の  $a_c$  の平均値である初期  $a_c$  を  $a_{c,0}$  として表す。最後の45分間内の  $a_c$  の平均値である最終  $a_c$  を  $a_{c,1}$  として表す。試薬の  $a_c$  磁化率  $a_c$  における減少、即ちIMRシグナルは、次の式(1)により取得される。

20

$$\text{IMR}(\%) = (a_{c,0} - a_{c,1}) / a_{c,0} \times 100\% \quad (1)$$

【0026】

式(1)により、図1の破線と実線についてのIMRシグナルが計算され、それぞれ1.56と2.13%となる。図1に示す結果は、IMRアッセイのバックグラウンドレベルを示す。そのようなバックグラウンドレベルは主にアッセイシステムの電子ノイズに起因する。同様の測定によると、PBS溶液のIMRシグナルは1.56と1.65%である。従って、IMRシグナルのバックグラウンドレベルは1.61%、標準偏差0.06%である。

30

【0027】

-シヌクレインの濃度の関数としてのIMRシグナル、即ち、 $\text{IMR}(\%)$  -  $\phi_{\text{syn}}$  曲線を図2に示す。-シヌクレインの濃度  $\phi_{\text{syn}}$  が  $3 \times 10^{-4}$  pg/ml (= 0.3 fg/ml) から増加するにつれ、IMRシグナルが増加する。 $\phi_{\text{syn}}$  依存的IMR(%)は、次の式(2)で表されるロジスティック関数にしたがっていることが分かった。

$$\text{IMR}(\%) = \frac{A-B}{1 + \left(\frac{\phi_{\text{syn}}}{\phi_0}\right)^\gamma} + B$$

(2)

40

そのうち、 $A$ 、 $B$ 、 $\phi_0$ 、 $\gamma$  はフィッティングパラメータである。図2中のデータポイントを式(2)にフィッティングすることで、フィッティングパラメータが  $A = 1.94$ 、 $B = 3.95$ 、 $\phi_0 = 49.7$ 、 $\gamma = 0.26$  として取得される。フィッティングカーブが図2に実線で示されている。対応する決定係数  $R^2$  は0.998である。 $R^2$  が1に非常に近いということは、 $\phi_{\text{syn}}$  依存的IMR(%)がロジスティック関数に準じていることが示唆されている。

【0028】

式(2)のパラメータ  $A$  は  $\phi_{\text{syn}}$  のゼロへの外挿時IMR(%)の値である。通常、値  $A$  はバックグラウンドレベルよりも若干高い。例えば、 $A$  が1.94%で、ここでの

50

バックグラウンドレベルが1.61%である。Aとバックグラウンドレベル間の差は主にタンパク質分子と抗体機能性磁気ナノ粒子間の結合における動的平衡により引き起こされるノイズに起因する。しかしながら、Aは検出下限値 (low-detection limit) として使用されない。従来、検出下限値は、Aよりも低濃度試験のIMRシグナルの標準偏差の3倍高い (即ち3-基準) IMRシグナルを示す濃度として定義される。この実験において、低濃度試験の標準偏差は0.028%である。従って、低濃度限界はIMRシグナルが2.02%の濃度である。式(2)によって、 $\alpha$ -シヌクレインアッセイの検出下限値が0.3 fg/mlであることが分かる。

#### 【0029】

E L I S Aを使用した450 nm、O.D.450 nmでの $\alpha$ -シヌクレイン濃度依存的吸光度 (optical absorbance density) がx印で図2に示されている。実験データが次のロジスティック関数にフィッティングされる。

$$OD_{450} = \frac{A' - B'}{1 + \left(\frac{\phi_{\alpha-syn}}{\phi_0}\right)^n} + B'$$

(3)

#### 【0030】

式(3)におけるA'、B'、 $\phi_0$ 、nのフィッティングパラメータは、0.189、5.070、13566.08、1.44である。式(3)のロジスティック関数は図2において破線で示されている。x印と破線間の決定係数R<sup>2</sup>は0.999である。3-基準を利用することにより、E L I S Aを使用した $\alpha$ -シヌクレインアッセイの検出下限値は79.04 pg/mlである。 $\alpha$ -シヌクレインのアッセイに関してIMRがE L I S Aより250,000倍高感度であることが明らかである。前述したように、反応表面を考慮に入れると、IMRの検出感度はE L I S Aよりも200倍高い。追加の1250倍は超低ノイズ磁気センサー、即ち高温超伝導量子干渉計 (High-Tc SQUID) 磁力計による可能性がある。High-Tc SQUID磁力計ノイズレベル50 fT/Hz<sup>1/2</sup>を示しており、これは単一のナノ粒子により生成される磁気シグナルよりも3桁低い。これは、標的生体分子への結合による単一の磁気ナノ粒子に起因するac磁気シグナルの低下が、High-Tc SQUID磁力計により検出可能であり得ることを示唆している。このため、超低ノイズHigh-Tc SQUID磁力計は試薬のac磁気シグナルにおける低下に対して極めて感度が高く、生体分子のアッセイに極めて高い感度を示す。

#### 【0031】

検出下限値に加え、IMRを使用した $\alpha$ -シヌクレインアッセイのダイナミックレンジは重要な特性である。ダイナミックレンジを調べるために、図2に示す実験的IMRシグナルが式(2)により $\alpha$ -シヌクレインの濃度に変換される。変換された $\alpha$ -シヌクレインの濃度は $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ で表される。図3に示すように、 $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ と $\phi_{\alpha-syn}$ 間の相関性が調べられる。図3において、 $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ と $\phi_{\alpha-syn}$ の間で線形性を得ることができる。米国食品医薬品局 (FDA) により発布された規定によると、図3の線形の傾斜は0.90~1.10である必要がある。図3において、0.31 fg/ml~31 ng/mlの $\alpha$ -シヌクレイン濃度 $\phi_{\alpha-syn}$ に対する $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ が使用される場合、図3に点線で示されるように、 $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ と $\phi_{\alpha-syn}$ 曲線の傾斜は0.77で、決定係数R<sup>2</sup>は0.991である。図3の点線の傾斜は米国FDAの要件を満たしていない。アッセイのダイナミックレンジを調べるための $\alpha$ -シヌクレインの濃度範囲を狭くする必要がある。このため、図3における最高の $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ 、即ち31 ng/mlの $\phi_{\alpha-syn}$ は無視される。0.31~3.1 ng/ml範囲の $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ と $\phi_{\alpha-syn}$ 間の線形曲線が図3に破線で示されている。破線の傾斜は1.48で、決定係数R<sup>2</sup>は0.999である。破線の傾斜は米国FDAの要件よりもずっと高い。図3において2番目に高い $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ も無視する必要がありそうである。0.31 fg/ml~310 pg/ml範囲の $\phi_{\alpha-syn, IMR}$ と $\phi_{\alpha-syn}$ 間の線形曲線が図3に実線で示

10

20

30

40

50

されている。実線の傾斜は0.93で、決定係数 $R^2$ は0.999である。注意すべきは、実線の傾斜は米国FDAの要件を満たしている点である。従って、IMRアッセイの $\alpha$ -シヌクレイン濃度のダイナミックレンジは0.3 fg/ml ~ 310 pg/mlである。

#### 【0032】

図2に示したデータはIMRアッセイが極めて高感度であり、ヒト血漿中の $\alpha$ -シヌクレインを検出できる可能性があることを証明している。IMRを使用した健康な被験者とPD患者、及びPDD患者の区別に関する事前研究のために、9名の健康な被験者、9名のPD患者及び14名のPDD患者より提供された血漿試料が採取された。採取された33名の被験者の人口学的情報を表1に示す。ヒト血漿中の $\alpha$ -シヌクレインの検出された濃度 $\alpha$ -syn, IMRを図4に示す。PDD患者の血漿 $\alpha$ -syn, IMRは0.1 ~ 100 pg/mlの範囲で、一方健康な被験者の血漿 $\alpha$ -syn, IMRは0.1 pg/mlよりずっと低かった。PD患者の血漿 $\alpha$ -syn, IMRは、健康な被験者のものとPDD患者のものとの間に分布していた。健康な被験者とPD患者間の血漿 $\alpha$ -syn, IMRに関するp値は0.005であり、PD患者は健康な被験者と比較してより高い血漿 $\alpha$ -シヌクレイン濃度を示す事実が明らかになった。図4では、PD患者とPDD患者間の血漿 $\alpha$ -syn, IMRにおける明確な区別が観察された( $p < 0.001$ )。図4の結果によると、血漿 $\alpha$ -シヌクレインの濃度は、健康な被験者がPDを罹患し、PDDへと進行するにつれ上昇し続ける。健康な被験者とPD患者間( $p > 0.05$ )、PD患者とPDD患者間( $p > 0.05$ )で年齢を一致させたことを述べておく。

#### 【0033】

##### 【表1】

被験者の人口学的特性

群	健康な被験者	認知力正常PD	PDD患者
数	9	9	14
男性/女性	4/5	4/5	7/7
年齢(歳)	38-73	38-85	60-81
MMSE(平均±SD)	29.0 ± 1.1	28.7 ± 1.2	18.7 ± 6.3
罹患期間(年)	-	9.3 ± 6.7	10.1 ± 5.3

PDパーキンソン病; PDDパーキンソン病認知症; MMSE ミニメンタルステ

ート検査; SD標準偏差

#### 【0034】

先行研究において、 $\alpha$ -シヌクレインは神経細胞から開口分泌によりCSFと血漿を含む体液中に放出され、それが脳内における $\alpha$ -シヌクレインの病理学的変化の細胞から細胞への伝達に寄与することが示されている。数々の研究がPD患者から採取した血漿試料中のトータルまたはオリゴマーの $\alpha$ -シヌクレインレベルをチェックし、健康な対照群と比較することに重点を置いているが、結果は矛盾している。リン酸化及び線維化 $\alpha$ -シヌクレインはタンパク質の主要な病理学的変化形態であるため、最近の1つの研究では対照群と比較して認知症を伴わない早期のPD試料においてリン酸化 $\alpha$ -シヌクレインの血漿レベルがより高いことが観察された。これらの観察を通じて、 $\alpha$ -シヌクレイン(トータル、またはオリゴマーあるいはリン酸化形態)の血漿レベルが、PD患者の脳内における $\alpha$ -シヌクレインの病理学的変化を一部反映している可能性があることの実行可能性および潜在性を示唆している。さらに、皮質性レビー小体/神経突起の病変が認知症を伴わないPDよりもPDDでより広範囲であり、これは血漿中の $\alpha$ -シヌクレイン沈着がPDよりもPDDでより重度であることを示唆している。我々の結果は、 $\alpha$ -シヌクレインの血漿レベルは、正常な認知力のPDの場合健康な対照群よりも若干高いだけである一方で、PDDではずっと高いというこの仮説を支持した。アルツハイマー認知症の特徴的な病理であるアミロイドプラークとタウの神経原線維濃縮体も観察され、PDD患者における認知状態と相関しているため、PDDの病態生理をより理解するためには、PDDの血漿

レベルにおけるリン酸化- $\beta$ -シヌクレイン、アミロイドタンパク質、トータル及びリン酸化タウの評価を取り入れた今後の研究が必要である。

【0035】

血漿試料において、異好抗体は主要な交絡因子であり、サンドイッチELISA法によるアッセイ結果に干渉する。臨床検査標準委員会(Clinical and Laboratory Standards Institute)のガイダンス(CLSI-EP-A2: Interference Testing of Clinical Chemistry (臨床科学の干渉試験))によると、異好抗体(HA)は免疫測定的一般的な干渉物質の1つとして定義されている。IMR法は先行研究を通じてELISAと比較したとき低干渉と高特異性の効果を示している。選択のメカニズムは試薬中の振動する磁気ナノ粒子が寄与する遠心力に基づいている。詳細は先行研究で説明されている。事実、選択のメカニズムにより、HAだけでなく、血漿中に頻繁に使用される薬剤の自然に存在する生体分子も磁気ナノ粒子との結合が阻止される。これは、IMRをパーキンソン病の血漿バイオマーカーの臨床分析に対する高特異性の方法として特徴付ける。

10

【0036】

臨床的に、患者は最初にPDと診断され、疾患のより後の段階で認知症を発症することがあり、それによりPDDの診断がなされる。従って、PD患者におけるPDDの予測または進行の早期段階での診断ができるバイオマーカーは、実に臨床的な意義がある。図4の結果によると、PDD患者における血漿 $\beta$ -シヌクレインはPD患者よりも明確に高いレベルを示す( $p < 0.001$ )。これは、PD患者におけるPDDへの進行を監視する臨床的パラメータとしての血漿 $\beta$ -シヌクレインの使用が有望であることを示唆している。

20

【0037】

$\beta$ -シヌクレインに対する抗体を磁気ナノ粒子に固定することにより、 $\beta$ -シヌクレインのアッセイ用試薬が開発される。High-Tc SQUID磁力計の補助を利用した免疫磁気的低下(IMR)を活用することで、 $\beta$ -シヌクレインアッセイのダイナミックレンジは $0.3 \text{ fg/ml} \sim 310 \text{ pg/ml}$ となっている。超高感度SQUIDベースのIMRがヒト血漿 $\beta$ -シヌクレインのアッセイに適用される。初歩的な結果は、健康な被験者、PD患者、PDD患者の血漿 $\beta$ -シヌクレインの濃度に明確な差があることを示している。この方法は、血漿 $\beta$ -シヌクレインのアッセイによりPDとPDDの診断にIMRを適用することが有望であることを示している。

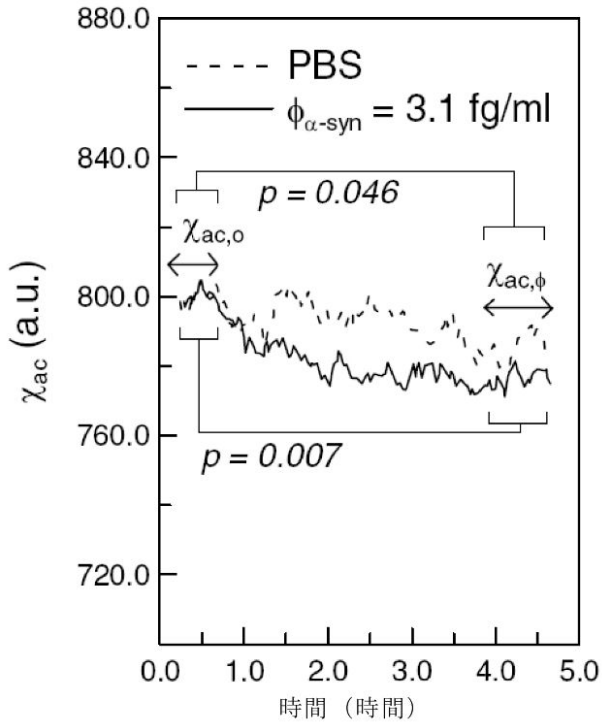
30

【符号の説明】

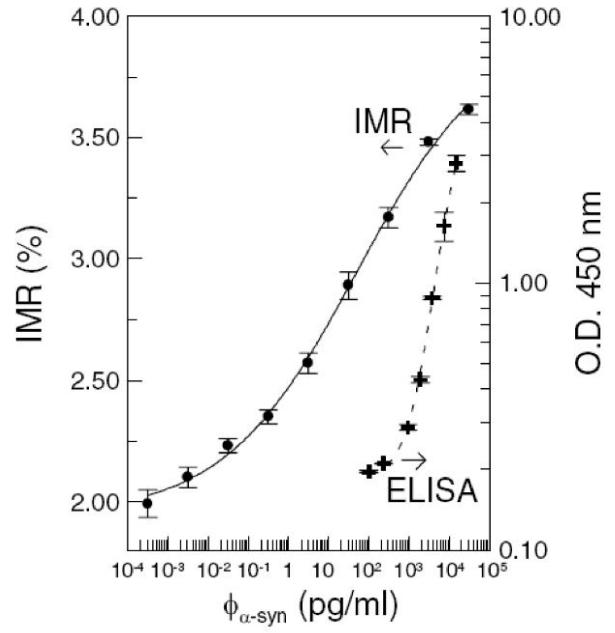
【0038】

無

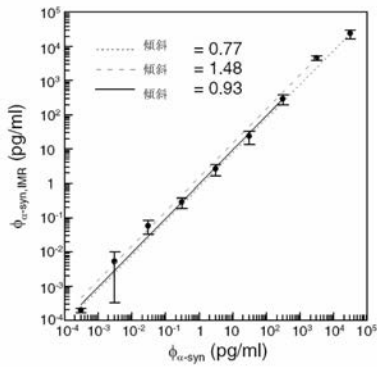
【 図 1 】



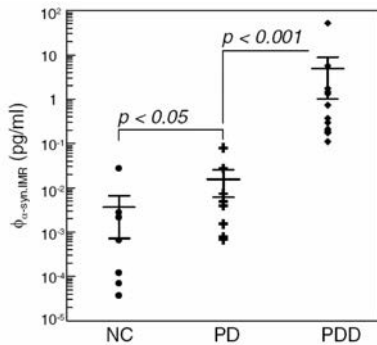
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



专利名称(译)	从帕金森病中鉴别帕金森病痴呆的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018091735A</a>	公开(公告)日	2018-06-14
申请号	JP2016235514	申请日	2016-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	磁量生技股份有		
申请(专利权)人(译)	磁量生技股▲ふん▼有限公司		
[标]发明人	楊謝樂		
发明人	楊 謝樂		
IPC分类号	G01N33/543 G01N27/76 G01N33/53 G01N33/553		
FI分类号	G01N33/543.541.A G01N27/76 G01N33/53.D G01N33/553		
F-TERM分类号	2G053/AB06 2G053/BA08 2G053/BB02		
代理人(译)	仁新报		
其他公开文献	JP6273338B1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种识别正常认知帕金森病或帕金森病痴呆症的方法。检测受试者血液样品中α-突触核蛋白的体外免疫磁性降低 (IMR) 信号，其中 (a) IMR信号结合包含抗α-突触核蛋白抗体的磁性纳米颗粒。(B) 将步骤 (a) 中检测到的α-突触核蛋白的IMR信号应用于逻辑函数 (I)，以计算血液样品中α-突触核蛋白的浓度，(c) 将步骤 (b) 中获得的α-突触核蛋白的浓度与预定的阈值范围进行比较，如果它高于预定的阈值范围，则帕金森病痴呆，如果它在预定的阈值范围之间，则正常包括认知帕金森病，以及如果低于预定阈值范围则指示健康的步骤。【选择图表】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特許2018-91735 (P2018-91735A)
	(43) 公開日	平成30年6月14日 (2018.6.14)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543	541A
G01N 27/76 (2006.01)	G01N 27/76	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D
G01N 33/553 (2006.01)	G01N 33/553	
審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 11 頁)		
(21) 出願番号	特願2016-235514 (P2016-235514)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成28年12月5日 (2016.12.5)	511113475
(11) 特許番号	特許第6273338号 (P6273338)	磁量生技股▲ふん▼有限公司
(45) 特許公報発行日	平成30年1月31日 (2018.1.31)	台湾新北市新店区中正路538巷12号3F
特許法第30条第2項適用申請有り (公開場所) h	https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-016-0198-5 (公開日) 平成28年6月8日 (公開者) 楊謝樂、邱銘章、林靜嫻、楊哲權、謝振傑、陳信賢、劉秉勳 (発明の内容) パーキンソン病からパーキンソン病認知症を特定する方法に関する研究	(74) 代理人
		100130111
		弁理士 新保 育
		(72) 発明者
		楊 謝樂
		台湾新北市新店区中正路538巷12号3樓
		Fターム(参考) 2G053 AB06 BA08 BB02
(54) 【発明の名称】	パーキンソン病からパーキンソン病認知症を特定する方法	