

(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2008-508518

(P2008-508518A)

(43) 公表日 平成20年3月21日(2008.3.21)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	N	2 GO 4 5
<b>GO 1 N 33/48</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y	
		GO 1 N 33/48	P	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2007-523695 (P2007-523695)  
 (86) (22) 出願日 平成17年7月25日 (2005. 7. 25)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月19日 (2007. 3. 19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/026336  
 (87) 国際公開番号 W02006/014876  
 (87) 国際公開日 平成18年2月9日 (2006. 2. 9)  
 (31) 優先権主張番号 60/591, 479  
 (32) 優先日 平成16年7月27日 (2004. 7. 27)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

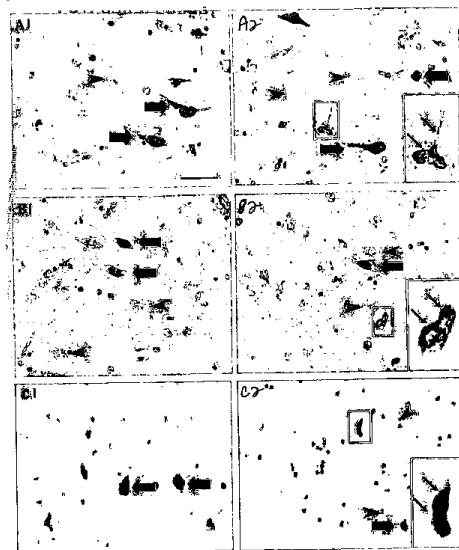
(71) 出願人 390033008  
 ジヤンセン・ファーマシューチカ・ナーム  
 ローゼ・フェンノートシヤツプ  
 JANSSEN PHARMACEUTI  
 CA NAAMLOZE VENNOOT  
 SCHAP  
 ベルギー・ビー-2340-ビールセ・ト  
 ウルンホウトセベーク30  
 (74) 代理人 100060782  
 弁理士 小田島 平吉  
 (72) 発明者 ダンドレア, マイケル・アール  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州080  
 03チエリーヒル・アンダースドライブ1  
 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病を診断する方法

(57) 【要約】

アルツハイマー病に存在することが示されている I g 陽性ニューロンは、補体 C 1 q および C 5 b - 9 タンパク質を有することが示される。C 1 q および C 5 b - 9 は、アルツハイマー病の診断および処置において用いられることができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

正常対照と比較した場合に被検者における増加した免疫グロブリン陽性ニューロンを検出することにより該被検者におけるアルツハイマー病の存在を診断する方法であって、該増加した免疫グロブリン陽性ニューロンを下記のとおり検出する：

該被検者の脳組織を抽出し；

免疫グロブリン陽性ニューロンについて該抽出物をアッセイし；そして

対照の脳組織からの同様な抽出物により同じアッセイにおいて示される該免疫グロブリン陽性ニューロンを比較する

方法。

10

## 【請求項 2】

正常対照と比較した場合に被検者における増加した C 1 q タンパク質を検出することにより該被検者におけるアルツハイマー病の存在を診断する方法であって、該増加した C 1 q タンパク質を下記のとおり検出する：

該被検者の脳組織を抽出し；

C 1 q タンパク質について該抽出物をアッセイし；そして

対照の脳組織からの同様な抽出物により同じアッセイにおいて示される該 C 1 q タンパク質を比較する

方法。

20

## 【請求項 3】

正常対照と比較した場合に被検者における増加した C 5 b - 9 タンパク質を検出することにより該被検者におけるアルツハイマー病の存在を診断する方法であって、該増加した C 5 b - 9 タンパク質を下記のとおり検出する：

該被検者の脳組織を抽出し；

C 5 b - 9 タンパク質について該抽出物をアッセイし；そして

対照の脳組織からの同様な抽出物により同じアッセイにおいて示される該 C 5 b - 9 タンパク質を比較する

方法。

## 【請求項 4】

該方法が死後に行われる請求項 1 の方法。

30

## 【請求項 5】

該方法が死後に行われる請求項 2 の方法。

## 【請求項 6】

該方法が死後に行われる請求項 3 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【関連出願へのクロスリファレンス】

## 【0001】

本願は、2004年7月27日に出願された出願第60/591,479号に優先権を主張する。

## 【背景技術】

40

## 【0002】

アルツハイマー病 (AD) の原因の究明は、血管病理および神経炎症からアミロイド斑および神経原線維変化のような神経病理学的成分まで多岐にわたる。しかしながら、AD は実際にはいくつかの同時に起こるかもしくは続いて起こる正常および病的プロセスの集合体であり得るようである。AD は単一の根本原因を有し得ることが可能であると思われるが、この最初の損傷はとらえにくいままである。最近、年齢適合非認知症対照脳組織と比較して、AD 脳組織における検出可能な実質免疫グロブリンの有意な増加が報告され、そして最も重要なことには、I g 陽性ニューロンの劇的な増加が認められた (非特許文献 1)。さらに、かなりの数のこれらの I g 陽性ニューロンは、I g 陰性ニューロンではめったに認められない神経変性のアポトーシス特徴を示した (非特許文献 1)。これらのデ

50

ータは、不完全な血液脳関門（BBB）と自己免疫機序によるニューロン死との間の重要な関係を意味した（非特許文献1、非特許文献2）。しかしながら、これらのIg陽性ニューロンについてはほとんど分かっていない。

【非特許文献1】D'Andrea MR: Evidence linking neuronal cell death to autoimmunity in Alzheimer's disease. *Brain Research* 2003; 982: 19-30

【非特許文献2】D'Andrea MR: Add Alzheimer's disease to the list of autoimmune diseases. *Medical Hypotheses* 2005; 64(3): 458-463

10

【発明の開示】

【0003】

[発明の要約]

Ig陽性ニューロンの炎症プロフィールは、特性化されている。特に、古典的抗体誘導性補体経路の特異的成分、補体生成物C1q(3)、および細胞膜傷害複合体に相当するC5b-9(4)は、Ig陽性ニューロンと共有化されたことが決定されている。これらのIg陽性ニューロンと反応性小神経膠細胞との関連もまた特性化されており、そして陽性ニューロンはIg陰性ニューロンと比較して反応性小神経膠細胞により優先的に関連しているかもしくは標的とされることが決定された。

【0004】

20

[発明の詳細な記述]

散発性ADにかかっている患者(n=12)および年齢適合対照(n=6)からの死後内嗅皮質脳組織をHarvard Brain Tissue Resource Center(HBTRC, Belmont, MA, USA)から入手し、そして10%中性緩衝ホルマリンにおいて固定した。ADの病理学的確認には、(1)アミロイド斑の存在、(2)神経原線維変化の存在および(3)減少したニューロン密度が含まれた(1、5、6)。組織を切り取り、そして常法に従ってパラフィン包埋用に処理した。5ミクロン切片を連続的に切断し、SuperFrost Plus+(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)顕微鏡スライドガラス上に載せ、そして一晚乾燥させた。日常的な単一免疫組織化学(IHC)のプロトコルは、以前に詳細に記述されている(1、5、6)。簡潔に言えば、顕微鏡スライドガラス上の組織切片から蠟を除去し、そして再水和させた。スライドガラスをTargetバッファー(Dako, Carpinteria, CA)においてレンジ加熱し、冷却し、リン酸緩衝食塩水(pH7.4, PBS)中に置き、そして3.0%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で室温で10分間処理した。全てのインキュベーション(各々30分)および洗浄は室温で行った。正常ブロッキング血清(Vector Labs, Burlingame, CA)を全てのスライドガラス上に10分間置いた。PBSにおける短時間のすすぎの後に、切片を一次抗体で処理した:ポリクローナル抗ヒトpan-Igは、IgG、IgM、IgAを認識する(1:1000, Serotec, NC; Dako, CA);ポリクローナル抗ヒトC1q(1:200, Quidel, CA);モノクローナル抗ヒトC5b-9(1:200, Quidel, CA);およびモノクローナル抗ヒトHLA-DR、反応性小神経膠細胞のマーカー(3、4、6、7、8)(1:200, Chemicon, Temecula, CA)。次に、スライドガラスをPBSにおいて洗浄し、そしてヤギ抗ウサギ(ポリクローナルprimaries)もしくはウマ抗マウス(モノクローナルプライマリー(polyclonal primaries))ビオチニル化二次抗体(Vector Labs)で処理した。PBSにおいて洗浄した後に、アビジン-ビオチン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体試薬(ABC法, Vector Las)を加えた。全てのスライドガラスを洗浄し、そして3,3'-ジアミノベンジジン(DAB, Biomed, Foster City, CA)で2回5分処理し、蒸留水においてすすぎ、そしてヘマトキシリンで対比染色した。

30

40

50

## 【0005】

さらに、反応性小神経膠細胞とI g陽性ニューロンとの間に空間的(二次元的)関連があったかどうかを決定するために、画像解析(Image Pro, ver. 4.01、Phase III Imaging、Glen Mills、PA)を用いてI g陽性もしくはI g陰性ニューロンの核と顕著な赤色に標識されたHLA-DR免疫反応性小神経膠線維との間の距離( $\mu\text{m}$ )を測定した。この目的を達成するために、二重IHCを適用した。簡潔に言えば、第一の一次抗体はABC-アルカリホスファターゼ(ABC ap)試薬、続いてFast Red(Sigma、MO)色素原を用いて検出し、一方、第二の一次抗体(pan-Ig)はABChp-DAB系を用いて検出した(1、6、8)。陰性対照には、抗体希釈剤での一次抗体の置換もしくはI g抗体について以前に示されたような(1)その特定の抗原での一次抗体の前吸収が含まれた。I g陽性およびI g陰性ニューロン(平均20/組織)は、10個の無作為視野(40x対物)/組織( $n=5$ )において分析した。SigmaStatを使用してマン-ホイットニー順位和検定を用いて統計分析を行い、そしてSigmaPlotを用いてプロットした。

10

## 【0006】

典型的な褐色に標識されたI g-、C1q-およびC5b-9-免疫陽性ニューロン(矢印)が、AD脳組織の内嗅皮質において検出された(図1)。検出可能な免疫標識は、陰性対照において認められなかった(データは提示されない)。図1Aにおけるパネルは、以前にも報告されている(1、2)、I g陰性ニューロン(矢じり)の近接近内(ミクロン以内)の強く免疫標識されたI g陽性ニューロン(矢印)の存在を示す。以前にも記述された(1、2)、正常に見える転写活性核真正染色質に埋め込まれた顕著な核小体を有する正常に見えるI g陰性ニューロン(矢じり)の中のI g陽性ニューロン(矢印、挿入物)の細胞萎縮および高密度の濃縮した核染色質(図1A、挿入物)のような神経変性の特徴に注目すべきである。

20

## 【0007】

図1Bにおけるパネルは、C1q陰性ニューロン(矢じり)の中の顕著なC1q免疫陽性ニューロン(矢印)を示す。この標識は、体細胞-樹状突起(somatic-dendritic)領域において減少したシグナルを有してニューロン核周囲部に主に位置した。興味深いことには、これらのC1q陽性ニューロンは、萎縮した核周囲部および高密度の濃縮した核染色質を有するI g陽性ニューロンと同じ神経変性の特徴を示し(図1B、挿入物)、C1q陽性ニューロンが変性しているだけでなく、I gおよびC1q免疫標識パターンがニューロンにおいて共局在化され得ることを示唆した。

30

## 【0008】

弱いC1q免疫標識はまたいくつかの形態学的に健常なニューロンにおいても検出され、別の研究におけるC1qの発現はナイーブマウスにおいて低かったが実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)において増加したので(9)、基礎発現検出を示唆した。

## 【0009】

同様の結果はまた、C5b-9免疫陽性ニューロン(矢印、図1C)においても認められた。この場合もやはり、小集団のニューロンのみがC5b-9免疫標識され、それらのいくつかは神経変性しているように見えた(図1C、挿入物)。図1Cにおける矢じりは、隣接したニューロンにおけるC5b-9検出の欠如を示す。

40

## 【0010】

I g、C1qおよびC5b-9の標識パターンは神経変性ニューロンと関連するよう見えたが、我々が連続(5 $\mu\text{m}$ )切片標識組織を分析するまでそれらがまた同じ細胞にも存在するかどうかは不明であった。これらのデータは、C1qおよびC5b-9が実際にI g陽性ニューロンに存在することを示した(図2)。特に、典型的な連続組において、図2A~CはI g陽性ニューロンにおけるC1q免疫反応性(図2A~C)を示した。C5b-9免疫反応性もまた、I g陽性ニューロンにおいて検出された(図2D)。しかしながら、この特定の例において、比較的より弱いI g免疫標識がC5b-9ニューロンにおいて検出され(図2D挿入物)、それは細胞が死に近づくにつれてI g免疫反応性を失

50

ったことを示唆し得る。重要なことには、これらのアッセイから得られるデータはまた、I g 陽性ニューロンが神経変性しており、そしてC 1 q およびC 5 b - 9 免疫陽性であることも示し、これらの特徴もしくはプロフィール間の強い関連を示唆した。

#### 【0011】

上述のように、年齢適合対照脳もまた、I g、C 1 q およびC 5 b - 9 の存在について分析した。実質I g 免疫標識はこれらの組織において検出されたが、標識の大部分は、以前に記述されたように(1)、大血管の周囲に限定された(データは提示されない)。いくつかのI g 陽性ニューロンは、6つの年齢適合対照脳組織の1つにおいて認められただけであり(データは提示されない)、それはまたC 1 q およびC 5 b - 9 免疫標識パターンも示した。

10

#### 【0012】

古典的補体経路成分、C 1 q (3、10) (図1B) および補体経路における最終段階のマーカでありそして細胞膜傷害複合体に相当する、C 5 b - 9 (4、10、11) (図1C) はI g 陽性ニューロンにおいて検出され(図2)、I g 陽性ニューロンに細胞死の古典的抗体依存性(代替抗体非依存性ではない)補体経路の存在の証拠を与える。補体カスケードはAD海馬および新皮質において十分に活性化され、ジストロフィー性神経炎(dystrophic neuritis)、NFTおよび老人斑上に(12、13)そして今回はI g 陽性ニューロン核周囲部にC 5 b - 9 の「沈着」をもたらすことが免疫細胞化学的研究により示されている。細胞内I g、C 1 q およびC 5 b - 9 の意味は不明であるが、内在化ならびにデノボ合成を意味し得る(14)。注釈として、補体活性化生成物は沈着物質として記述されている(15、16)。しかしながら、無作為な観点からの「沈着」のいかなる証拠も認められなかった。明確にするために、補体成分のどの検出も本研究において細胞と関連した。

20

#### 【0013】

次に、組織切片上の二重IHCを用いてI g 陽性ニューロン(褐色に標識される)と反応性小神経膠細胞(赤色に標識される)の空間分布を特性化するために一連のアッセイを行った(図3)。図3A~Eにおいて、反応性小神経膠細胞は、多数のI g 陽性ニューロン(矢印)に非常に近接近内で(場合により接触して)位置し、それらは近隣のI g 陰性ニューロン(矢じり)では容易に認められなかった。過剰解釈を前提とするが、図3Aにおいて検出される小神経膠細胞は、わずかにジストロフィーのように見えるI g 陽性ニューロン核周囲部と接触していると思われる図3パネルB~Dにおいて検出される小神経膠細胞と比較した場合に、I g 陽性ニューロンは形態学的に健常であるように見えるので発見の初期段階に相当し得る。図3E~Gにおける小神経膠細胞およびI g 陽性ニューロンの配置は、いくつかの赤色に標識された反応性小神経膠細胞が変性I g 陽性ニューロンと劇的にかかわり合うように見える戦闘地帯(後期)のものに似ている(図3E、F、G)。I g 陰性ニューロン(矢じり、図3)と関連する反応性小神経膠細胞の欠如に注目すべきである。

30

#### 【0014】

反応性小神経膠細胞がI g 陰性細胞よりI g 陽性ニューロンを標的とするかどうかを決定しようとして、画像解析を用いてI g 陽性およびI g 陰性ニューロン核に対する小神経膠細胞のHLA-DR陽性突起間の平均距離を測定した。図4に提示されるように、反応性小神経膠細胞はI g 陰性ニューロンよりI g 陽性ニューロンと有意に( $p < 0.001$ )関連することが分析データにより示された。これらのデータは静止二次元画像から得られたが、反応性小神経膠細胞がI g 陰性( $n = 172$ ; 平均 =  $31.74 \mu\text{m} \pm 1.44 \text{SE}$ )ニューロンよりI g 陽性( $n = 101$ ; 平均 =  $7.69 \mu\text{m} \pm 0.72 \text{SE}$ )と関連する可能性を無視することは難しい。

40

#### 【0015】

これらのデータは、未決定の細胞死プロセスにおける小神経膠細胞の関与を示唆する。裏づけとして、C 1 q およびC 5 b - 9 はアポトーシス細胞の表面に結合し、小神経膠細胞によるこれらの細胞の貪食をもたらすことができる(17、18)。また、反応性小神

50

経膠細胞により局所的に生産される補体は、ハンチントン病においてニューロンの膜上で活性化され、ニューロンの壊死ならびに前炎症活性に寄与した(14)。従って、これらのI g陽性の補体に支配されたニューロン上のこれらの小神経膠細胞の存在を説明することは論理的であるが、神経膠細胞がこれらのニューロンに召集されるかどうかもしくはそれらがこれらのニューロン上の補体蓄積に寄与するかどうかはまだ決定されていない。しかしながら、C1qヌルマウスにおいて線維状A 沈着物を囲む有意に少ない小神経膠細胞活性化があったので(7)、前者は真実であることが最近の研究により示唆された。

#### 【0016】

これまで、AD脳において報告される古典的経路成分および活性化フラグメントの圧倒的な証拠にもかかわらず抗体の発見はまだ「明白に示されて」いないので抗体誘導性古典的補体経路の存在はADにないことが提示された(13、19、20)。続いて、 $\beta$ -アミロイドならびに他の神経病理学的マーカーは、補体活性化に関与することが提示されていた(21)。個人的所見として、A $\beta$ 42はI g陽性およびI g陰性ニューロンにおいて検出され、I g免疫反応性はニューロンにおけるA $\beta$ 42免疫反応性から独立していることを示唆した(データは提示されない)。

#### 【0017】

血管由来の実質I gおよびI g陽性の神経変性ニューロンの劇的増加に基づく自己免疫性AD仮説が示唆されていた(1、2)。本研究からのデータは、脳実質への血管由来のI gの無差別通過を可能にする機能不全の調節されていないBBBから始まる可能性が最も高い提示された経路(1、2)を実証し、そして拡張する。いったんCNSに入ると、これらのかつては害のない抗体のいくつかは、ニューロン上のそれらのニューロンもしくはニューロン様抗原(1つもしくは複数)に不合理に結合し、補体形成(MAC)を引き起こし、AD脳において自己免疫性/古典的(抗体依存性)補体-細胞死プロセスをもたらす。古典的補体系の活性化はまた自己免疫性脱髄(autoimmune demyelination)において(9)、そして多発性硬化症、重症筋無力症、頭部外傷および脳卒中において(22)中心的役割を果たすことも既知であるので、これらの結果はADに限定されない。明らかではないが、それらのニューロン標的に特異的にもしくは非特異的に結合するこれらの血管由来の抗体の能力もしくは潜在的な可能性は、そのアイソタイプ、アビディティおよび親和性(1、2)ならびに補体を固定するその能力によって決まることができる可能性がある。各因子は、その抗原への自己抗体応答の「臨床」病原性を決定することにおいて重要な役割を果たし(20)、そしてBBB突破単独、もしくは実質I gの存在が必ずしもADをもたらすとは限らない可能性がある理由を説明し得る。にもかかわらず、ニューロンの特定集団へのこれらの抗体の「不合理な」結合の効果は、好ましいように見えなかった。

#### 【0018】

I g陽性ニューロンの集団は古典的補体経路によって死にかけていることおよび小神経膠細胞はこれらの変性ニューロンの多くと優先的に関連することがデータにより示唆される。残念なことに、いったん2ヒット(特定のニューロン損傷抗体の存在およびBBB突破)カスケード経路が始まると、それに続く炎症のプロセスが免疫グロブリンおよび補体とは独立にさらなるニューロン細胞死を与え得る(23)。以前に記載されたように(1、2)、かつて特性化された、この「自己」抗体の存在は、ADを処置しそして場合により予防するために新規治療標的を提供するはずである。その間に、自己抗体(1つもしくは複数)の異常な存在およびその後のCNSへのその有害な作用を阻止しようとしてBBBの完全性を保持するように治療機会が考案されるはずであり、一方、自己抗体がCNSに回り道して入り込む前にそれが血管系に存在する間にそれを増やすか、取り除くかもしくは阻止するように他の戦略が指示され得る。最低限、本研究との関連で、血管疾患指標および自己免疫生成物(すなわち、補体)の存在と「一緒に」BBB完全性を評価するCNS画像データは、臨床認識力試験パラダイムに加えて、診断および予後能力を提供し得る。

#### 【0019】

10

20

30

40

50

## 参考文献

1. D'Andrea MR: Evidence linking neuronal cell death to autoimmunity in Alzheimer's disease. *Brain Research* 2003; 982: 19-30.
2. D'Andrea MR: Add Alzheimer's disease to the list of autoimmune diseases. *Medical Hypotheses* 2005; 64(3): 458-463.
3. Emmerling MR, Watson MD, Ruby CA, Spiegel K: The role of complement in Alzheimer's disease pathology. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1502: 158-171.
4. Webster S, Lue LF, Brachova L, Tenner AJ, McGeer PL, Teria K, Walker DG, Bradt B, Cooper NR, Rogers J: Molecular and cellular characterization in the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 1997; 18: 415-421. 10
5. D'Andrea MR, Nagele RG, Wang H-Y, Peterson PA, Lee DHS: Evidence that neurons accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology* 2001; 38: 120-134.
6. D'Andrea MR, Reiser PA, Gumula NA, Hertzog BM, Andrade-Gordon P: Application of triple-label immunohistochemistry to characterize inflammation in Alzheimer's disease brains. *Biotechnic & Histochemistry* 2001; 76: 97-106.
7. Fonseca MI, Zhou J, Botto M, Tenner AJ: Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neuroscience* 2004; 24(29): 6457-6465. 20
8. Wang HY, Lee DHS, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank R, Reitz A: b-amyloid<sub>1-42</sub> binds to  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor with high affinity: Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 2000; 275(8): 5626-5632.
9. Weerth SH, Rus H, Shin ML, Raine SH: Complement C5 in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) facilitates remyelination and prevents gliosis. *Am J Pathol* 2003; 163(3): 1069-1080.
10. Pasinetti GM: Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease: The role of the complement system. *Neurobiol of Aging* 1996; 17(5): 707-716.
11. Rogers J, Cooper NR, Schultz J, McGeer PL, Webster S, Styren SD, Civin WH, Brachova L, Bradt B, Ward P, Lieberburg I: Complement activation by b-amyloid in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10016-10020. 30
12. Loeffler DA, Camp DM, Schonberger MB, Singer DJ, LeWitt PA: Early complement activation increases in the brain in some aged normal subjects. *Neurobiol of Aging* 2004; 25(8): 1001-1007.
13. Shen Y, Lue L-F, Yang L-B, Roher A, Kuo Y-M, Strohmeier R, Goux WJ, Lee V, Johnson GVW, Webster SD, Cooper NR, Bradt B, Rogers J: Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Letters* 2001; 305: 165-168.
14. Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P: Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Exp Neurol* 1999; 159: 362-376. 40
15. Barnum SR: Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 132-146.
16. Mukherjee P, Pasinetti GM: The role of complement anaphylatoxin C5a in neurodegeneration: implications in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunology* 2000; 105: 124-130.
17. Korb LC, Ahearn JM: C1q binding directly and specifically to surface belts of apoptotic human keratinocytes. *J Immunol* 1997; 158: 4525-4528.
18. Webster SD, Yang AJ, Margol L, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Tenner AJ: Com 50

plement component C1q modulates the phagocytic behavior of microglia. *Exp Neuro* 2000; 161: 127-138.

19. Neuroinflammation Working Group, Inflammation and Alzheimer's Disease. *Neurobiol of Aging* 2000; 21: 383-421.

20. Piddlesden SJ, Lassmann H, Zimprich F, Morgan BP, Lington L: The demyelinating potential of autoantibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* 1993; 143(2): 555-564.

21. Velazquez P, Cribbs DH, Poulos TL, Tenner AJ: Aspartate residue 7 in amyloid b-protein is critical for classical complement pathway activation: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Nature Medicine* 1997; 3(1): 77-79.

22. Spiegel K, Barnum SR, Emmerling ML in: P.L. Wood (Ed.), *Neuroinflammation: Mechanisms and Management*, Human Press, pp. Totowa, NJ, 1997, 129-176.

23. D'Andrea MR, Cole GM, Ard MD: The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol of Aging* 2004; 25(5): 675-683.

10

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0020】

【図1】pan-Ig、C1qもしくはC5b-9検出のないニューロン（矢じり）の間のAD内嗅皮質のいくつかの錐体ニューロンにおけるpan-Ig（A）、C1q（B）およびC5b-9（C）免疫標識（矢印）の典型的な例。棒 = 50 μm（挿入物、25 μm）。

20

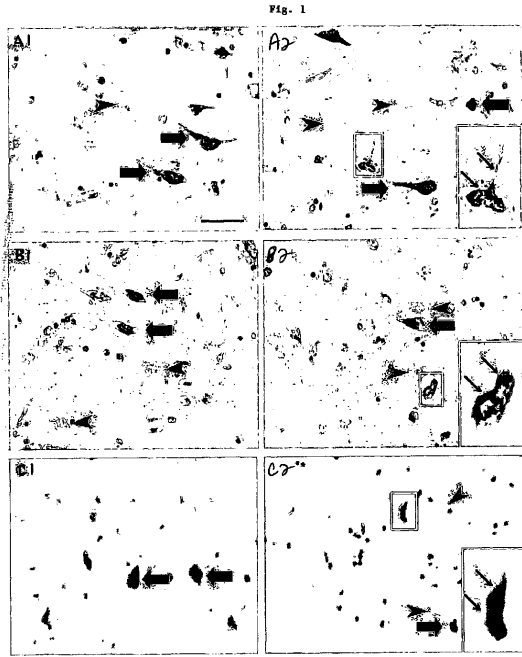
【図2】典型的な連続切片（5mm）組は、顕著なpan-Ig、C1qもしくはC5b-9検出のないニューロン（矢じり）の間のAD内嗅皮質のいくつかのニューロンにおけるpan-IgとC1q免疫標識の共局在化（A、B、C）およびpan-IgとC5b-9免疫標識の共局在化（D）（矢印）を示す。星印は、連続している血管の領域を示す。棒 = 100 μm（A）；25 μm（挿入物A）；50 μm（B～D）；D = 12 μm（挿入物D）。

【図3】典型的な二重IHC画像（A～H）は、AD内嗅皮質における褐色に標識されたIg陽性ニューロン（矢印）と接触したもしくは関連する赤色に標識されたHLA-DR陽性反応性小神経膠細胞の存在を示す。矢じりは、関連する反応性小神経膠細胞のない近隣のIg陰性ニューロンの存在を示す。棒 = 25 μm。

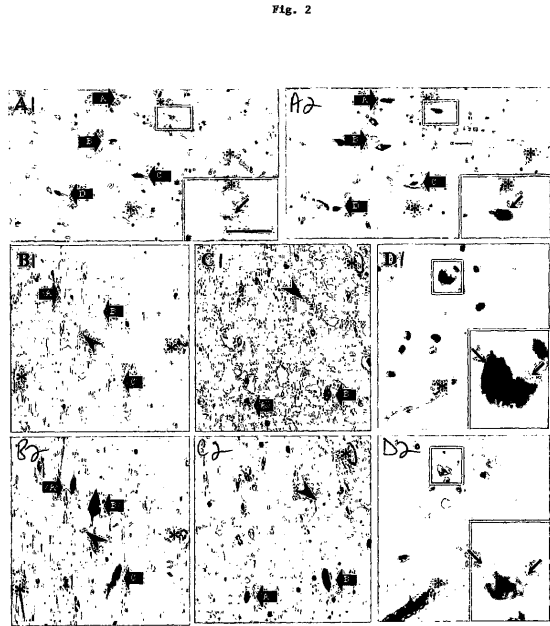
30

【図4】グラフで表すデータは、HLA-DR免疫標識反応性小神経膠細胞がAD（n = 5）内嗅皮質の代表的領域（n = 10、本文を参照）においてIg陰性ニューロン（n = 172；31.74 μm ± 1.44 SE）よりもIg陽性ニューロン（n = 101；7.69 μm ± 0.72 SE）に有意に近い傾向があることを示す。マン-ホイットニー順位和検定（\* p < 0.001）。

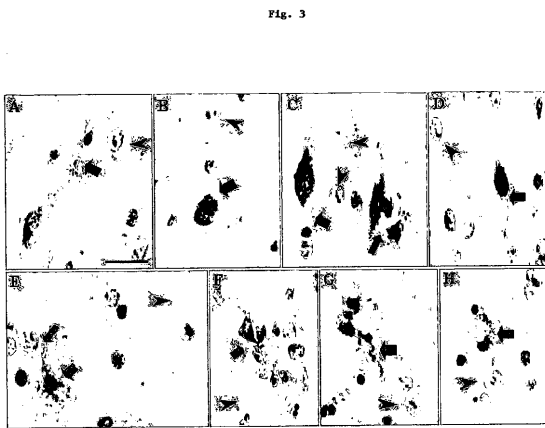
【 図 1 】



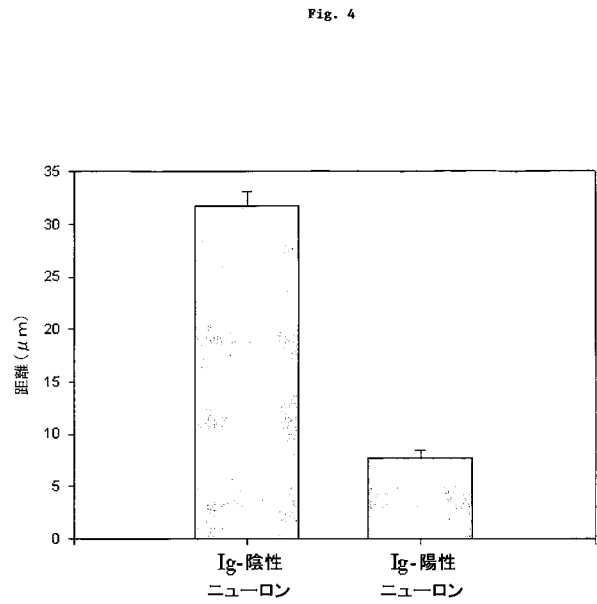
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US2005/026336
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/68		
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, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ		
<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	WEBSTER, S. ET AL: "Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease" NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 18, no. 4, 1997, pages 415-421, XP009058360 USA the whole document ----- -/--	3,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input 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 "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 <b>14 December 2005</b>		Date of mailing of the international search report <b>29/12/2005</b>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Moreno de Vega, C</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2005/026336

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YASOJIMA K ET AL: "Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain."            AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. MAR 1999, vol. 154, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 927-936, XP002234955            ISSN: 0002-9440            the whole document -----</p>	2,5
X	<p>D'ANDREA, M.R.: "Evidence linking neuronal cell death to autoimmunity in Alzheimer's disease"            BRAIN RESEARCH,            vol. 982, 2003, pages 19-30, XP009058297            cited in the application            the whole document -----</p>	1,4
X	<p>FONSECA MARIA I ET AL: "Neuronal localization of C1q in preclinical Alzheimer's disease."            NEUROBIOLOGY OF DISEASE. FEB 2004, vol. 15, no. 1, February 2004 (2004-02), pages 40-46, XP009058361            ISSN: 0969-9961            the whole document -----</p>	2,5
P,X	<p>D'ANDREA M R: "Add Alzheimer's disease to the list of autoimmune diseases"            MEDICAL HYPOTHESES, EDEN PRESS, PENRITH, US,            vol. 64, no. 3, 2005, pages 458-463, XP004691092            ISSN: 0306-9877            the whole document -----</p>	1-6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2005/026336

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Although claims 1-3 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.**
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

---

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB01 BB03 BB24 CB01 CB26 DA36 DA37 DA77 FB03

专利名称(译)	如何诊断阿尔茨海默病		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008508518A</a>	公开(公告)日	2008-03-21
申请号	JP2007523695	申请日	2005-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	Jiyansen杉机郁吃喀-Namuroze和非日元纸币施家伙翻牌		
[标]发明人	ダンドレアマイケルアール		
发明人	ダンドレア,マイケル・アール		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB01 2G045/BB03 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB03		
优先权	60/591479 2004-07-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

已经显示存在于阿尔茨海默氏病中的Ig阳性神经元显示具有补体C1q和C5b-9蛋白。C1q和C5b-9可用于阿尔茨海默病的诊断和治疗。

