

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4790013号
(P4790013)

(45) 発行日 平成23年10月12日(2011.10.12)

(24) 登録日 平成23年7月29日(2011.7.29)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/37 (2006.01) C 1 2 Q 1/37
G O 1 N 33/53 (2006.01) G O 1 N 33/53 D

請求項の数 4 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2008-510925 (P2008-510925)	(73) 特許権者	000175892
(86) (22) 出願日	平成19年4月5日(2007.4.5)		エーディア株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/057663		東京都千代田区岩本町1-10-6
(87) 国際公開番号	W02007/119685	(74) 代理人	100080230
(87) 国際公開日	平成19年10月25日(2007.10.25)		弁理士 石原 詔二
審査請求日	平成20年10月7日(2008.10.7)	(74) 代理人	100147935
(31) 優先権主張番号	特願2006-110881 (P2006-110881)		弁理士 石原 進介
(32) 優先日	平成18年4月13日(2006.4.13)	(72) 発明者	高山 茂雄
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		茨城県稲敷郡阿見町吉原3262-12
			三光純薬株式会社 茨城事業所内
		審査官	清水 晋治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β -アミロイドの血中分解速度測定によるアルツハイマー病の検定に用いられる方法及び診断試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体血液成分の、 - アミロイド分解活性を測定する、アルツハイマー病の検定に用いられる - アミロイド分解活性の測定方法であって、

- アミロイド分解活性を測定する方法が、前記検体血液に、 - アミロイドペプチドを添加して、該ペプチドを分解する活性を測定し、健常者血液の該分解活性と比較することであり、

前記検体血液に添加する - アミロイドペプチドが、 - アミロイド1-42であり、前記検体血液に添加した - アミロイドペプチドの残存量を免疫学的測定法により測定して、前記検体血液の - アミロイドペプチドの分解活性を測定し、

前記免疫学的測定法が、前記検体血液に添加する - アミロイドペプチドのC末端部分を認識する抗体及びN末端部分を認識する抗体を使用する二抗体サンドイッチ免疫測定法であることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記検体血液が血清又は血漿であることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

請求項1又は2記載の方法に用いられるアルツハイマー病の診断試薬であって、

検体血液に添加する - アミロイドペプチド、該 - アミロイドペプチドのC末端部分を認識する抗体及び該 - アミロイドペプチドのN末端部分を認識する抗体を必須の構成成分とし、

前記 - アミロイドペプチドが、 - アミロイド 1 - 4 2 であり、

検体血液に添加した該 - アミロイドペプチドの残存量を測定することにより、検体血液の - アミロイドペプチド分解活性を測定することを特徴とする、アルツハイマー病の診断試薬。

【請求項 4】

前記検体血液が血清又は血漿であることを特徴とする、請求項 3 記載のアルツハイマー病の診断試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体血液中の - アミロイドの分解速度を測定することによる、アルツハイマー病など - アミロイドが関与する疾患の検定方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

- アミロイド (以下、A と記す) は、アルツハイマー病 (AD) 患者脳に特徴的に認められるアミロイドプラークの主な構成成分であり、A は、その前駆体タンパク質 (APP) N - 末端の 部位を切断する - セクレターゼと、細胞膜内に存在する APP - C - 末端を切断するプレセリニンの - セクレターゼによって切り出されることで産生されることが知られている。

A の分子種は、様々な分子量サイズのものが知られているが、それらの中で神経細胞毒性と関連して最もよく知られているのが、42個のアミノ酸からなる A (以下、A 1 - 42 と記す) である。A 1 - 42 は、容易に繊維化する性質を持っており、ADの早期から沈着しアミロイドプラークを形成することが知られており、AD発症の原因物質のひとつであると考えられている。

上記のように、A の合成過程及び A と AD 発症の関係についてはこれまでも盛んに研究が進められている。一方、産生した A の分解経路についても近年になって徐々にではあるが解明されつつある。特に、西道らのグループは脳の神経細胞内に特異的に局在する A 分解酵素であるネプリライシンの存在を突き止め、この酵素の働きが低下すると A の脳内沈着量が増加し、ADを引き起こす可能性について示唆した (非特許文献 1 ~ 3)。一方、A は脳内で産生した後、脊髄液を經由して最終的に血中まで移行すると考えられているが、血中を含む脳組織以外での A 分解に関しては、分解経路や分解酵素の存在の有無も含めて未だ不明である。

【0003】

診断の面から AD を見ると、A 1 - 42 が AD の発症と密接に関係しているため、AD 患者の診断に関して A 1 - 42 を疾患マーカーとする試みが以前から検討されてきた。これまでには脳脊髄液中の A 1 - 42 に関して、AD 患者でその濃度が低下していることが報告されている (非特許文献 4 ~ 7)。しかし脳脊髄液を検体とするのは、検体採取時の患者への身体的負担・身体機能損傷のリスクが大きく、実際には脳脊髄液を検体として使用することは現実的でない為、一般には普及していないのが現状である。一方、体外診断薬として最も一般的で、且つ身体的負担・リスクが低い検体として、血液検体 (血清又は血漿) が考えられる。しかし血清中での A 測定は、これまで行われてきた一般的測定手法、たとえば二抗体サンドイッチ免疫測定法では血液中からはほとんど検出されおらず、臨床的有用性も見出せていない。このことから血液検体で A 1 - 42 を測定することにより AD 患者を診断することは非常に困難だと考えられる (非特許文献 8)。体外診断薬として一般的な血液検体での診断が不可能であることは AD の診断学的研究において、現在大きな課題となっている。

【非特許文献 1】 Takaki Y, et al., J. Biochem (Tokyo). 2000; 128(6): 897-902.

【非特許文献 2】 Shirotani K, et al., J. Biol. Chem. 2001 276(24): 21895-901.

【非特許文献 3】 Iwata N, et al., Science. 2001 292(5521): 1550-2.

【非特許文献 4】 Tamaoka A, et al., J. Neurol. Sci. 1997; 148: 41-45.

10

20

30

40

50

【非特許文献5】Andreasen N, et al., Arch.Neurol.1999; 56:673-680.

【非特許文献6】Galasko D, et al., Arch. Neurol. 1998; 55:937-945.

【非特許文献7】Motter R, et al., Ann Neurol 1995; 38:643-648.

【非特許文献8】Tamaoka A, et al., J.Neurol. Sci.1996; 141:65-68.

【非特許文献9】難波et al.、電気化学発光法 (Electrochemiluminescence: ECL) による高感度免疫学的測定法の検討、日本臨床検査自動化学会誌 (JJCLA)、1996, Vol. 21 No. 5.

【非特許文献10】Nature, 256, 459-497(1975)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0004】

本発明は、検体血液中に添加したAペプチドの分解速度を測定する方法により、AD診断に応用することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決するために本発明者らは、ヒト血清中でのAペプチドの分解代謝の有無を測定できるかどうかを検討した。A₁₋₄₂の血中分解を確認する為、A₁₋₄₂合成ペプチドをヒト血清に添加し、経時的にA₁₋₄₂の残存量を測定した。測定法は、一次抗体としてA₁₋₄₂のN末端部分に特異性を有する抗体、第二抗体としてA₁₋₄₂のC末端部分に特異性を有する抗体を使用し、電気化学発光法(非特許文献9)を利用する二抗体サンドイッチ免疫測定法にて測定した。この方法は、全長A₁₋₄₂の測定は可能であるが、分解を受けて断片化したA₁₋₄₂は測定が不可能である測定系である。

20

測定の結果、添加したA₁₋₄₂合成ペプチドの測定値は時間の経過とともに低下していくことを確認した。また、A₁₋₄₂合成ペプチドを血清に添加する際に、血清中に酵素活性を阻害するプロテアーゼインヒビターをあらかじめ投入しておくこと、時間経過によるA₁₋₄₂測定値低下が大幅に抑えられることについても確認した。

これらの事実は、A_βが血液中で、速やかにプロテアーゼにより分解・断片化していることを意味しており、添加したA₁₋₄₂合成ペプチドが血液中で酵素消化され、断片化していくことで、全長A₁₋₄₂のみを測定できる二抗体サンドイッチ免疫測定法での測定が不可能となっていくことを意味する。

30

【0006】

次いで、AD患者と健常人血清検体にA₁₋₄₂合成ペプチドを任意の量添加し、25で20時間保存した検体について、上記二抗体サンドイッチ免疫測定法にて測定を行ったところ、AD患者、健常人血清ともにA₁₋₄₂合成ペプチド添加直後に測定した測定値と比べて、測定値の低下が見られ、いずれの検体についても検体中のプロテアーゼがA₁₋₄₂合成ペプチドを分解していることが確認された。さらに、AD患者と健常人の血清における測定値の低下率を比較すると、両者の間に有意差があり、AD診断に利用しえる可能性があることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0007】

40

すなわち本発明のアルツハイマー病の検定に用いられる A_β - アミロイド分解活性の測定方法は、検体血液成分の、A_β分解活性を測定することを特徴とする。A_β分解活性を測定する方法としては、検体血液にA_βペプチドを添加して、一定時間経過後、該ペプチドを分解する活性を測定して、健常者血液の該分解活性と比較する方法が用いられる。検体に添加するA_βペプチドは、A_βペプチド1-42が用いられる。添加したA_βペプチドの残存量の測定方法は、感度、簡便性に優れた免疫学的測定方法により、特に該ペプチドのN末端部分を認識する抗体とC末端部分を認識する抗体を使用した二抗体サンドイッチ免疫測定法により行う。検体血液は、血清又は血漿が好ましい。

【0008】

本発明のAD診断試薬は、本発明方法に用いられるアルツハイマー病の診断試薬であっ

50

て、検体血液に添加するA ペプチド、該A ペプチドのN末端部分を認識する抗体及び該A ペプチドのC末端部分を認識する抗体を必須の構成成分とし、前記 - アミロイドペプチドが、 - アミロイド1 - 42であり、検体血液に添加したA ペプチドの残存量を測定することにより、検体血液のA ペプチド分解酵素活性を測定することを特徴とする。該診断試薬は、採用する免疫測定方法及び添加するA ペプチドの種類により試薬の構成は異なるが、例えば、A 1 - 42ペプチド及び二抗体サンドイッチ免疫測定法を採用した場合は、固相化したA 1 - 42のN末端部分認識抗体と標識物で標識したA 1 - 42のC末端部分認識抗体を構成成分とする。あるいは固相化したA 1 - 42のC末端部分認識抗体と標識物で標識したA 1 - 42のN末端部分認識抗体を構成成分としてもよい。A 1 - 42のC末端部分認識抗体は特に限定されないが、21F12が好ましい。

10

【0009】

本発明の方法及び試薬において、前記抗体として、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体いずれも用いることができる。また前記抗体のうち、A 1 - 42のC末端部分認識抗体に関してはA 1 - 42に特異性の高い抗体であることが好ましいが、この限りではない。なお、前記血液検体が血清または血漿であることが好適であるが、全血を使用することもできる。標識物質として、蛍光物質、酵素、色素、発光物質などが挙げられ特に限定されないが、ルテニウム錯体が好ましい。固定化する支持体も特に限定されず、好ましくは磁気ビーズである。

なお、添加したA ペプチドの残存量の測定方法は上記の二抗体サンドイッチ免疫測定法に限らず、例えば発光物質や蛍光物質を標識したA 合成ペプチドを作製して血中に添加し、添加A ペプチド分解による発光、蛍光量の変化を測定する方法などを使用することも可能であり、本発明の趣旨は、検体血液成分のA 分解活性を測定することにある。言い換えれば、検体血液に含まれるプロテアーゼ活性又は量を測定してADを検定する方法である。その一つの手法として、検体血液に添加したA ペプチドの分解速度、つまり血液中でのA 分解酵素の活性を測定することによりAD診断に利用することにある。

20

【0010】

血液中のA 分解酵素の活性を測定する別法は、放射性同位元素や蛍光物質等で標識したA ペプチドを使う方法である。具体的には、例えば、A の特定の部位を蛍光物質で標識して被検血液に添加し、一定時間後に蛍光検出器を有するHPLC分析器にて分析して、蛍光物質が溶出される時間を測定する。分解されていない蛍光標識A ペプチドのピークとは異なる溶出時間に検出される、蛍光標識A ペプチド断片のピークを検出することにより、A ペプチドの分解を測定することができる。

30

本発明方法によれば、複数のA ペプチドの分解物が存在した場合でも、ADに特異的に現れるピークを測定することにより、より特異的な診断が可能になる。また、ADに特異的に現れるピークが特定できれば、AD特異的なA ペプチドの切断位置を特定することができ、より特異的なAD診断薬の開発につながる事が可能となる。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、A ペプチドを特異的に認識する抗体を用いる二抗体サンドイッチ免疫測定法を用いて、血液検体に添加したA 合成ペプチドの分解度合いを測定することにより、A ペプチド分解酵素活性の強弱を確認し、ADを診断することを可能としたものである。本発明によれば、血漿や血清などの血液検体にてADを診断することが可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】実験例1の結果を示すグラフである。

【図2】実験例2の結果を示すグラフである。

【図3】実施例1の結果を示すグラフである。

【図4】実施例2の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 1 3 】

以下に本発明の実施の形態を説明するが、本発明の技術思想から逸脱しない限り、様々な変形が可能であることはいうまでもない。

【 0 0 1 4 】

検体血液として血清を用い、検体血清に添加する A 1 - 4 2 合成ペプチドとして A 1 - 4 2 合成ペプチドを使用し、該ペプチドの定量法として二抗体サンドイッチ免疫測定法を採用した場合を一例として以下に記載する。

検体血清に A 1 - 4 2 合成ペプチドを添加して 2 5 で保温した後、その一定量を分取して残存する A 1 - 4 2 合成ペプチドを二抗体サンドイッチ免疫測定法にて定量し、検体血清の該ペプチド分解活性を算定する。この値と健常者血清の分解活性とを比較することにより、A D の疾患の有無を検定するものである。

二抗体サンドイッチ免疫測定法は、A 1 - 4 2 の N 末端部分に特異的な抗体を磁気ビーズに固相化したものと、ルテニウム錯体で標識した C 末端部分に特異的な抗体を使用し、手法は常法に準ずる。すなわち、分取したサンプルと、抗体を固相化した磁気ビーズを反応させて、A 1 - 4 2 合成ペプチドを結合させた後洗浄する (B F 分離)。次いで標識した二次抗体を反応させて、磁気ビーズに結合した A 1 - 4 2 合成ペプチドと結合させた後洗浄し、最後に、磁気ビーズに結合している標識物質ルテニウム錯体の量を、トリプトピルアミン存在下で電気エネルギーを加えて発光させ、発光の強度を測定する方法である。

【 0 0 1 5 】

添加した A 1 - 4 2 合成ペプチド残存量の測定法としては、免疫学的手法に限られず、A 1 - 4 2 量を測定することができる方法であれば特に限定されない。

前記二抗体サンドイッチ免疫測定法に用いられる抗体は、A 1 - 4 2 の N 末端部分に特異的な抗体と、C 末端部分に特異的な抗体であれば、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体いずれも使用することが可能である。

A 1 - 4 2 の N 末端部分認識抗体に関しては、必ずしも最 N 末端部である必要はなく、市販品としては、例えば、A 1 - 4 2 のアミノ酸 1 - 5 部位認識抗体である 3 D 6 抗体 (イノジェネティクス社製) やアミノ酸 1 0 - 1 6 部位認識抗体である 6 E 1 0 抗体 (ケミコン社製)、アミノ酸 1 7 - 2 4 部位認識抗体である 4 G 8 抗体 (ケミコン社製) などが使用可能である。

A 1 - 4 2 の C 末端部分認識抗体は、市販品としては、例えば、マウスモノクローナル抗体である 2 1 F 1 2 (イノジェネティクス社製)、8 G 7 (ナノツール社製)、あるいはウサギポリクローナル抗体である A B 5 0 7 8 P (ケミコン社製) などが挙げられる。

A 1 - 4 0 の C 末端部分認識抗体と N 末端部分認識抗体の二抗体サンドイッチ免疫測定系を用いて、A 1 - 4 0 合成ペプチドの血液検体中での分解速度を測定する方法などを用いる事も可能である。また、N 末端部分認識抗体として、アミノ酸 1 0 - 1 6 部位認識抗体 6 E 1 0 抗体を使用する場合は、添加する A 合成ペプチドの N 末端部分を短くすることも可能である。さらに、A 合成ペプチドの分解 (切断) 部位を認識する抗体を用いることにより、検体中での分解の有無を測定することもできる。

このように、検体血液に添加する A 合成ペプチドは、A 1 - 4 2 合成ペプチドに限らず、血液中で分解されうる長さを有しておれば特に限定されるものではなく、該ペプチドの測定法として免疫学的測定法を採用した場合は、使用する抗体の認識部位の特異性等を考慮して、ペプチドの長さは適宜選択することができる。本発明方法において、基質として使用する A 1 - 4 2 合成ペプチドは、ヒト由来 A 1 - 4 2 と同一アミノ酸配列であれば製造メーカーを問わず使用可能である。前記ペプチドは、固相合成法など常法に従い合成することが出来る。

【 0 0 1 6 】

抗体を固相化する支持体の材料としては、例えば、ガラス、プラスチック (例えばポリスチレン、ポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレンなど)、金属などが挙げられる。

支持体の形状は、カップ型、平板、粒子など、特に限定されない。好ましくは、マグネティックマイクロビーズ（磁気ビーズ）である。

抗体を支持体に固相化する方法は、常法に準ずればよい。支持体として磁気ビーズを使用する場合、該ビーズと抗体を緩衝液中で反応させた後、磁気ビーズをブロッキング剤で処理し、使用時までブロッキング剤下で保存することが好ましい。

本発明に使用する標識物質は、酵素、発光物質、蛍光物質、同位元素などに限定されず、好ましくはルテニウム錯体である。標識抗体の調製方法は常法に準ずる。例えば、抗体とルテニウム錯体（IGE N社製、ORIGEN TAG-NHS ESTER）を緩衝液中で反応させた後、2 Mグリシンを加えてさらに反応させる。次いで、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより標識抗体を精製することにより調製できる。

10

【0017】

本発明の二抗体サンドイッチ免疫測定法に基づく診断試薬（キット）は、A 1 - 4 2のN末端部分に特異性を有する抗体、C末端部分に特異性を有する抗体及びA 1 - 4 2合成ペプチドを必須の構成成分とするものである。なお、反応に使用する緩衝液、測定器具などを診断試薬に添付することは自由である。なお、上記に記載したように、使用する抗体の特異性に応じて、検体に添加するA 合成ペプチドは適宜選択することができる。

【0018】

本発明に使用する前記抗体は、常法により調製することができる。モノクローナル抗体の調製は、A 1 - 4 2のC末端部分を保有するペプチドを抗原として、必要に応じてキャリアー蛋白質との複合体を作り、これを動物に接種して免疫する。上記免疫動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合し、A 1 - 4 2のC末端部分に強い特異性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより調製される。その操作は従来既知の方法に準ずればよい。

20

免疫抗原はA 1 - 4 2も使用できるが、目的の抗体がA 1 - 4 2のC末端部分に特異性を有する抗体であるので、A 1 - 4 2のC末端部分を保有するペプチド、例えば、A 33 - 4 2など適宜選択することができる。通常、キャリアー蛋白質との複合体を抗原として使用するが、その調製は種々の縮合剤、例えばグルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性エステル等が使用される。キャリアー蛋白質はウシ血清アルブミン、サイログロブリン、ヘモシアニン等を使用し、通常1 ~ 5倍量の割合でカップリングさせる方法が用いられる。

30

免疫される動物としてはマウス、モルモットなどがあげられ、接種方法は皮下、筋肉あるいは腹腔内に投与される。投与に際しては、完全フロイントアジュバンドや不完全フロイントアジュバンドと混和して投与してもよく、投与は通常2 ~ 5週毎に1回ずつ行われる。免疫された動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞は骨髄腫細胞と細胞融合させられ、ハイブリドーマとして単離される。骨髄腫細胞としてはマウス、ラット、ヒト等由来のものが使用され、抗体産生細胞と同種由来のものであることが好ましいが、異種間においても可能な場合もある。

【0019】

細胞融合の操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法（非特許文献10）に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスなどが挙げられ、通常20 ~ 50%程度の濃度のポリエチレングリコール（平均分子量1000 ~ 4000）を用いて20 ~ 40、好ましくは30 ~ 37の温度下、抗体産生細胞数と骨髄腫細胞数の比は通常1 : 1 ~ 10程度、約1 ~ 10分間程度反応させることにより細胞融合を実施することができる。

40

A 1 - 4 2のC末端部分に特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは、種々の免疫化学的方法が使用できる。例えば、ELISA法、ウエスタンブロット法、競合法等があげられる。また、A 1 - 4 2ペプチド及びA 1 - 4 0ペプチドを使用することにより、A 1 - 4 2に反応しA 1 - 4 0に反応しない抗体を選択することができる。

このように選択されたウエルから更に、例えば限界希釈法によってクローニングを行い

50

、目的とするクローンを得ることができる。ハイブリドーマの選択、育種は、通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、10～20%ウシ胎児血清を含む動物細胞用培地（例、RPMI 1640）で行われる。このようにして得られたクローンは、あらかじめプリスタンを投与したBALB/Cマウスの腹腔内へ移植し、10～14日後にモノクローナル抗体を高濃度を含む腹水を採取し、抗体精製の原料とすることができる。また、該クローンを培養し、その培養液を抗体精製の原料とすることもできる。モノクローナル抗体の回収は、免疫グロブリンの精製法として既知の方法を用いればよく、例えば、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法、陰イオン交換体の利用、さらにアフィニティークロマトグラフィなどの手段により達成することができる。

ポリクローナル抗体も常法により調製することができる。抗原はA 1-42のC末端部分を主な構成とするペプチドを採用し、前記と同様な手法により、複合体としてウサギ、モルモットなどの動物に免疫して調製することができる。適宜採血して抗体力価を測定し、高力価の血清を抗体の精製原料として、前記の手法により精製することによりポリクローナル抗体を得ることができる。

【0020】

本発明の一つである二抗体サンドイッチ免疫測定法による検体血液（血漿、血清）に添加したA 合成ペプチド分解速度測定によるAD診断方法は、血液検体でのAD診断が可能な優れた方法である。これまでに血液検体を使用してADを診断する体外診断薬は存在せず、血中のA 分解酵素に着目し、A 1-42の分解度合いを測定することでAD診断を行う試みはこれまでに報告がない。よって本発明の手法がAD診断に有用であることは、本発明者が始めて見出したものであり、本発明はA ペプチドの分解測定によってAD患者と健常者の血液検体間での臨床的有用性を証明し、ADの血液検体での診断を可能にしたものである。また、本発明の趣旨から、A 分解酵素そのものを測定する手法も採用することができる。A が原因の一つとなる疾患の診断にも利用できる可能性がある。

【実施例】

【0021】

以下に実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0022】

（実験例1）3D6抗体と21F12抗体での電気化学発光二抗体サンドイッチ免疫測定法

一次抗体としてA 1-42の1-5アミノ酸部位を認識する3D6マウスモノクローナル抗体（イノジェネティクス社製）を使用し、二次抗体としてA 1-42のC末端部分認識抗体である21F12マウスモノクローナル抗体（イノジェネティクス社製）をルテニウム錯体標識して使用した。

【0023】

以下に試薬の各構成成分の調製方法について記す。

（1）3D6抗体結合磁気ビーズの調製方法

3D6マウスモノクローナル抗体を10mmol/Lリン酸カリウム緩衝液（pH7.8）で1mg/mL抗体濃度に希釈し、この抗体0.5mLを、30mg/mLの磁気ビーズ（DYNAL社製、DYNABEADS M-450 Epoxy）0.5mLと混合した。混合液を25、16時間攪拌し、磁気ビーズと抗体を結合させた。その後、この磁気ビーズ溶液より溶液のみを抜き取ることで、溶液中に残存していた磁気ビーズ未結合の遊離抗体を除去した。次にブロッキング剤として1mLの4%ブロックエース試薬（大日本製薬社製）を抗体結合磁気ビーズに加え、25、3時間攪拌した。その後、前述の4%ブロックエース試薬10mLで磁気ビーズを洗浄（2mLの4%ブロックエース/5回洗浄）した。洗浄後の3D6抗体結合磁気ビーズは前述の4%ブロックエース試薬0.5mLと混合し、使用時まで4 で保存した。

【0024】

（2）ルテニウム錯体標識21F12抗体の調製方法

ルテニウム標識抗体の調製方法は、21F12マウスモノクローナル抗体（イノジェネティクス社製）を10mmol/Lリン酸カリウム緩衝液（pH7.8）で1mg/mL抗体濃度に希釈した。1mg/mL抗体0.5mLに10mg/mLのルテニウム（IGEEN社製、ORIGEN TAG-NHS ESTER）を17.6μL加え、25、30分間攪拌した。その後、2mol/Lグリシンを30μL添加し、25、30分間攪拌した。

次いで、直径1cm、高さ30cmのガラス管に充填したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（アマシャム・バイオサイエンス社製、sephadex G-25）にルテニウム標識抗体液をアプライし、未標識のルテニウムとルテニウム標識抗体を単離精製した。溶出は10mmol/Lリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）にて行った。

【0025】

（3）二抗体サンドイッチ免疫測定法によるA1-42ペプチドの測定

500μL容ポリスチレンカップ（以下、反応カップと記述）を必要量用意し、それぞれに200μLの50mmol/L MOPS/1%（W/V）ブロッカー（大日本製薬社製）/0.15mol/L NaCl/0.01%（W/V）Tween20/10mmol/L EDTA2Na/0.1% CHAPS pH7.2（以下、反应用溶液と記述）を分注した。そこにA1-42合成ペプチド（ペプチド研究所社製）、A1-40合成ペプチド（ペプチド研究所社製）、A1-11合成ペプチド（バヘム社製）、及びA34-42合成ペプチド（シグマ社製）を反应用溶液で0、1、5、10、50、100、200又は400pg/mLに希釈してから20μLずつ混合した。次に反应用溶液で1mg/mL濃度に希釈した3D6抗体結合磁気ビーズを25μLずつ添加し、30で9分間反応させた（第一反応）。

その後、磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、50mmol/L TrisHCl/tween20/0.15mol/L NaCl pH7.5（以下、洗浄液と記述）350μLで2回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した。次に反应用溶液で4μg/mL濃度に希釈したルテニウム標識21F12抗体を200μL加えて30で9分間反応させた（第二反応）。反応後の磁気ビーズを磁石でトラップしておいてから反応カップ中の液体を抜き取り、350μLの洗浄液で2回磁気ビーズを洗浄し、抗原抗体反応以外の非特異結合物質を除去した。

その後、反応カップに発光基質である300μLのトリプトピルアミンを入れ、磁気ビーズと混合した。この状態で電気エネルギーを与えることでルテニウムが発光し、その発光強度を検出機で検出した。なお、上記の反応カップへの磁気ビーズ添加測定操作以降は、ルテニウム発光自動測定機であるピコルミ8220（三光純薬社製）上で行った。結果を表1及び図1に示す。

【0026】

10

20

30

【表 1】

実験例1の結果

サンプル	サンプル濃度 (pg/mL)	ECL 発光強度	ブランク差引値
ブランク	0	286.1	-
Aβ1-42 ペプチド	1	771.0	484.9
	5	4124.5	3838.4
	10	9027.1	8741.0
	50	62800.0	62513.9
	100	138701.6	138415.5
	200	281159.2	280873.1
	400	600815.1	600529.0
Aβ1-40 ペプチド	1	302.1	16.0
	5	297.8	11.7
	10	280.3	-5.8
	50	311.2	25.1
	100	290.1	4.0
	200	287.9	1.8
	400	307.9	21.8
Aβ1-11 ペプチド	1	267.5	-18.6
	5	296.1	10.0
	10	288.3	2.2
	50	367.1	81.0
	100	290.4	4.3
	200	311.0	24.9
	400	291.1	5.0
Aβ34-42 ペプチド	1	302.1	16.0
	5	277.1	-9.0
	10	293.7	7.6
	50	295.0	8.9
	100	290.2	4.1
	200	298.1	12.0
	400	287.3	1.2

【 0 0 2 7 】

表 1 及び図 1 に示した如く、本法での 2 抗体サンドイッチ免疫測定法は、全長 A₁₋₄₂ ペプチドのみを特異的に検出可能な測定系であり、断片化 A₁₋₄₂ は測定不可能な測定系であることが確認された。

【 0 0 2 8 】

(実験例 2) 血清による A₁₋₄₂ 合成ペプチドの酵素分解確認試験

マイクロチューブ (ピアス社製、Immuno Ware Micro Tubes、以下マイクロチューブと記述) 2 本に、健常人の血清を 90 μL ずつ分注した。2 本の内の 1 本に 9 μL のプロテアーゼインヒビターカクテル (ロッシュ社製) を添加し (以下、インヒビター添加サンプルと表記)、他方に 9 μL 滅菌水を加えた (以下、インヒビター無しサンプルと表記)。その後、それぞれのチューブは 25℃ で保温した。

サンプル作製直後 (0 時間)、保温開始 6 時間後、及び保温開始 20 時間後に各サンプルから 10 μL ずつを抜き取り、200 μL の反应用溶液とマイクロチューブ内で混合した (以下、測定前希釈サンプルと表記)。測定前希釈サンプルは作製後、時間を置かずに実験例 1 と同様の方法で A₁₋₄₂ サンドイッチ免疫測定法にて測定を行った。

【 0 0 2 9 】

ECL 発光強度の測定結果を表 2 に示す。表 2 中、サンプル作製直後の測定値を 100% としたときの、各サンプルの測定値を相対比で示した。図 2 はその相対比を図示した

ラフである。

【 0 0 3 0 】

【表 2】

実験例2の結果

サンプル	保温開始後 経過時間	ECL 発光強度	ブランク 差引値	相対比 %
ブランク	0 時間	295.2	-	-
インヒビター無しサンプル		201217.2	200922.0	100
インヒビター添加サンプル		208443.8	208148.6	100
ブランク	6 時間	280.9	-	-
インヒビター無しサンプル		91732.7	91451.8	46
インヒビター添加サンプル		201843.9	201563.0	97
ブランク	20 時間	277.8	-	-
インヒビター無しサンプル		3850.1	3572.3	2
インヒビター添加サンプル		188281.8	188004.0	90

10

【 0 0 3 1 】

表 2 及び図 2 に示した如く、プロテアーゼインヒビターを加えてから A 1 - 4 2 合成ペプチドを添加した血清の方が、明らかに時間経過による測定値の低下を抑えられるという結果が得られた。よって血清中には A 1 - 4 2 を分解する酵素が存在し、添加した A 1 - 4 2 合成ペプチドは時間とともに酵素分解されて断片化する為、全長 A 1 - 4 2 のみを測定可能な二抗体サンドイッチ免疫測定系では測定値が時間とともに低下したと考えられる。一方、プロテアーゼインヒビターを加えた場合は、酵素による A 1 - 4 2 分解が阻害される為、A 1 - 4 2 がプロテアーゼインヒビターを加えない場合よりも多く残存し、結果、測定値の低下も抑えられたと示唆される。

20

【 0 0 3 2 】

(実施例 1) AD 患者及び健常人血清の A 1 - 4 2 分解速度比較

マイクロチューブを必要量用意し、30 例の AD 患者血清、及び 30 例の健常人血清を 100 μ L ずつ分注した。各分注検体に 1 μ L の 400 ng/mL A 1 - 4 2 合成ペプチドを加えた。同時に血清検体の代わりに 100 μ L の反応用溶液に 1 μ L の 400 ng/mL A 1 - 4 2 合成ペプチドを加えたものを標準品として作製した。A 1 - 4 2 合成ペプチド添加血清及び標準品は 25 で 20 時間保温した。

30

保温開始 20 時間後の各サンプルから 10 μ L ずつを抜き取り、200 μ L の反応用溶液とマイクロチューブ内で混合し、測定前希釈サンプルとした。測定前希釈サンプルは作製後、時間を置かずに実験例 1 と同様の方法で二抗体サンドイッチ免疫測定法にて測定を行った。

【 0 0 3 3 】

AD 患者の ECL 発光強度の測定結果を表 3 に示し、健常人の ECL 発光強度の測定結果を表 4 に示した。表 3 及び 4 中、標準品の発光強度を 100 % としたときの各サンプルの発光強度の相対比を残存率として表示した。さらにこの残存率より算出した、A 1 - 4 2 の分解率 (%) について表示した。分解率は下記式 (1) により算出される。

40

分解率 = (1 - サンプルの発光強度 \div 標準品の発光強度) \times 100 \cdots (1)

また、AD 患者及び健常人の分解率の平均値をそれぞれ表 3 及び表 4 に示した。図 3 は、AD と健常人の A 1 - 4 2 の分解率を示したグラフである。

【 0 0 3 4 】

【表3】

実施例1のAD患者サンプルの結果

サンプル	ECL 発光強度	ブランク 差引値	残存率 (%)	分解率 (%)	平均値 (%)
ブランク	283.5	-	-	-	-
標準品	185636.1	185352.6	100	0	-
AD患者					
1	58851.8	58568.3	32	68	
2	71864.7	71581.2	39	61	
3	64720.8	64437.3	35	65	
4	82682.7	82399.2	44	56	
5	45090.5	44807.0	24	76	
6	60320.9	60037.4	32	68	
7	64796.5	64513.0	35	65	
8	33154.1	32870.6	18	82	
9	27314.6	27031.1	15	85	
10	49100.1	48816.6	26	74	
11	38677.8	38394.3	21	79	
12	73834.7	73551.2	40	60	
13	55765.3	55481.8	30	70	
14	55550.0	55266.5	30	70	
15	40748.3	40464.8	22	78	69
16	70231.4	69947.9	38	62	
17	49873.6	49590.1	27	73	
18	102935.4	102651.9	55	45	
19	62030.9	61747.4	33	67	
20	105944.0	105660.5	57	43	
21	54783.9	54500.4	29	71	
22	82510.7	82227.2	44	56	
23	50645.4	50361.9	27	73	
24	62341.1	62057.6	33	67	
25	37180.3	36896.8	20	80	
26	45537.1	45253.6	24	76	
27	24548.2	24264.7	13	87	
28	35322.8	35039.3	19	81	
29	25619.2	25335.7	14	86	
30	90013.5	89730.0	48	52	

10

20

30

【表 4】

実施例1の健常人サンプルの結果

サンプル	ECL 発光強度	ブランク 差引値	残存率 (%)	分解率 (%)	平均値 (%)
ブランク	283.5	-	-	-	-
標準品	185636.1	185352.6	100	0	-
健常人					
1	8327.6	8044.1	4	96	10
2	13559.4	13275.9	7	93	
3	2894.7	2611.2	1	99	
4	21526.1	21242.6	11	89	
5	6212.5	5929.0	3	97	
6	19143.9	18860.4	10	90	
7	31790.3	31506.8	17	83	
8	46978.0	46694.5	25	75	
9	24580.2	24296.7	13	87	
10	17087.3	16803.8	9	91	
11	19019.9	18736.4	10	90	20
12	11035.9	10752.4	6	94	
13	48559.0	48275.5	26	74	
14	3850.1	3566.6	2	98	
15	8402.4	8118.9	4	96	
16	18535.3	18251.8	10	90	
17	26507.6	26224.1	14	86	
18	25285.1	25001.6	13	87	
19	24973.5	24690.0	13	87	
20	31763.9	31480.4	17	83	
21	13458.4	13174.9	7	93	30
22	46984.2	46700.7	25	75	
23	11783.4	11499.9	6	94	
24	27980.4	27696.9	15	85	
25	22642.8	22359.3	12	88	
26	24479.0	24195.5	13	87	
27	4375.3	4091.8	2	98	
28	31787.1	31503.6	17	83	
29	19323.7	19040.2	10	90	
30	19570.9	19287.4	10	90	

【0036】

表3, 4及び図3に示した如く、健常人群ではA₁₋₄₂の分解率がAD群と比較して高いことが確認された。このことは健常人群では血液中A₁₋₄₂の分解能がAD群よりも高いことを示している。また、t検定によると二群間には有意差があると判定された(p < 0.01)ことから、本発明の手法は血清検体でのAD診断に使用しえることが確認された。

【0037】

(実施例2) 6E10抗体と21F12抗体での電気化学発光二抗体サンドイッチ免疫測定法による、AD患者及び健常人血清のA₁₋₄₂分解速度比較

一次抗体としてA₁₋₄₂の10-16アミノ酸部位を認識する6E10マウスモノクローナル抗体(ケミコン社製)を使用し、二次抗体としてA₁₋₄₂のC末端部分認識抗体である21F12マウスモノクローナル抗体(イノジェネティクス社製)をルテニウム錯体標識して使用した。6E10抗体結合磁気ビーズの調製方法、ルテニウム錯体標

10

20

30

40

50

識 2 1 F 1 2 抗体の調製方法及び二抗体サンドイッチ免疫測定法は、実験例 1 と同様の方法で行った。結果を表 5 , 6 及び図 4 に示す。

【 0 0 3 8 】

【表 5】

実施例2の AD 患者サンプルの結果

サンプル	ECL 発光強度	ブランク 差引値	残存率 (%)	分解率 (%)	平均値 (%)
ブランク	199.8	-	-	-	-
標準品	48543.4	48343.7	100	0	-
AD 患者					54
31	20766.9	20567.2	43	57	
32	23410.7	23211.0	48	52	
33	20757.9	20558.2	43	57	
34	18542.0	18342.3	38	62	
35	16370.8	16171.1	33	67	
36	18571.4	18371.7	38	62	
37	13287.9	13088.2	27	73	
38	26418.2	26218.5	54	46	
39	26393.8	26194.1	54	46	
40	29402.9	29203.2	60	40	
41	15522.0	15322.3	32	68	
42	28302.5	28102.8	58	42	
43	25235.2	25035.5	52	48	
44	22783.9	22584.2	47	53	
45	30225.6	30025.9	62	38	

10

20

【 0 0 3 9 】

【表 6】

実施例2の健常人サンプルの結果

サンプル	ECL 発光強度	ブランク 差引値	残存率 (%)	分解率 (%)	平均値 (%)
ブランク	199.8	-	-	-	-
標準品	48543.4	48343.7	100	0	-
健常人					
31	14591.8	14392.1	30	70	76
32	5206.2	5006.5	10	90	
33	15326.9	15127.2	31	69	
34	12944.4	12744.7	26	74	
35	13526.9	13327.2	28	72	
36	18627.1	18427.4	38	62	
37	5636.7	5437.0	11	89	
38	21588.1	21388.4	44	56	
39	13439.9	13240.2	27	73	
40	8579.5	8379.8	17	83	
41	15473.5	15273.8	32	68	
42	14528.0	14328.3	30	70	
43	6204.2	6004.5	12	88	
44	8663.9	8464.2	18	82	
45	4189.1	3989.4	8	92	

10

20

【0040】

表5, 6及び図4に示した如く、健常人群ではA 1-42の分解率がAD群と比較して高いことが確認された。また、実施例1と同様に、t検定においてAD患者と健常人の二群の間には有意差があると判定された($P < 0.01$)。このことからA 1-42のN末端の1-5アミノ酸部位を認識する3D6抗体の代わりに、10-16アミノ酸部位を認識する抗体である6E10抗体を使用してサンドイッチ測定法を行っても、AD診断

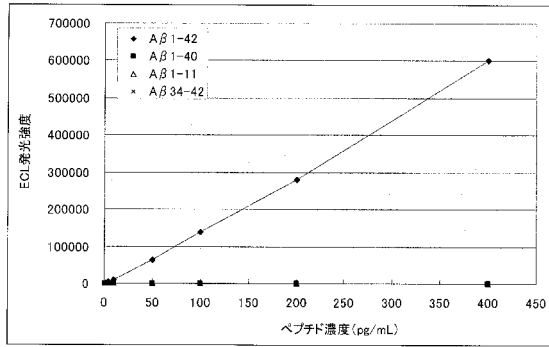
30

【産業上の利用可能性】

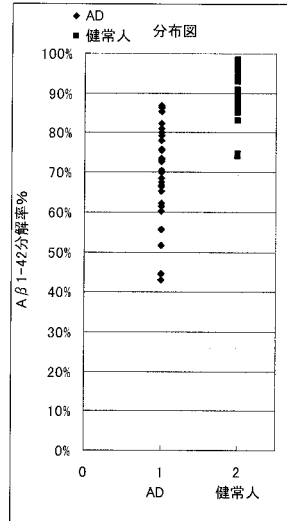
【0041】

血液中のA 1-42分解酵素活性を確認できる本方法によって、血液検体(血清、血漿)でのアルツハイマー病を診断することにある。

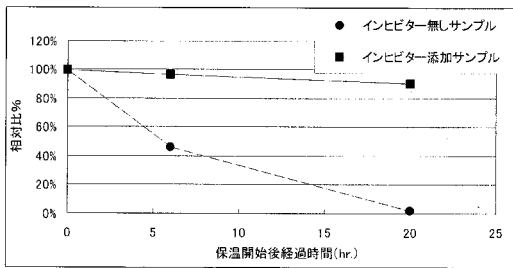
【 図 1 】



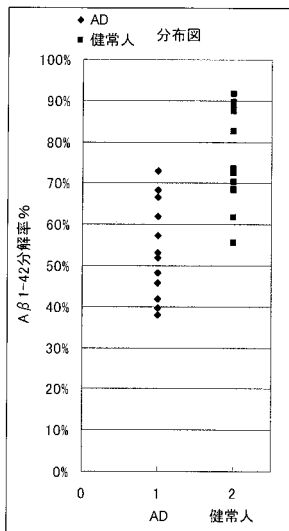
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平07-051096(JP,A)

Journal of neurochemistry. 1997, Vol.69, No.1, pages 299-305

Journal of biomedicine & biotechnology. 2006(Published online 2006 April 6), Vol.2006, No.3, Article ID 58406, pages 1-12

Experimental neurology. 2001, Vol.167, No.2, pages 385-392

難波祐三郎、外4名、電気化学発光法(Electrochemiluminescence: ECL)による高感度免疫学的測定法の検討,日本臨床検査自動化学会誌,1996年,Vol.21, No.5, p.680-686

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/37

G01N 33/53

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

专利名称(译)	用于通过测量血液中β-淀粉样蛋白的分解速率来测定阿尔茨海默病的方法和诊断试剂		
公开(公告)号	JP4790013B2	公开(公告)日	2011-10-12
申请号	JP2008510925	申请日	2007-04-05
申请(专利权)人(译)	三光有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	イーディア株式会社		
[标]发明人	高山茂雄		
发明人	高山 茂雄		
IPC分类号	C12Q1/37 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 C12Q1/37 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
FI分类号	C12Q1/37 G01N33/53.D		
代理人(译)	石原伸介		
审查员(译)	清水慎		
优先权	2006110881 2006-04-13 JP		
其他公开文献	JPWO2007119685A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种使用血清或血浆作为样品测定阿尔茨海默病的方法。发现添加到样品血液中的β-淀粉样肽被降解，并且当比较健康受试者的样品血液和患有阿尔茨海默氏病的患者的降解活性时，发现健康受试者血液的降解活性显著更强。

実験例1の結果

サンプル	サンプル濃度 (pg/mL)	ECL 発光強度	ブランク差引値
ブランク	0	286.1	-
Aβ1-42 ペプチド	1	771.0	484.9
	5	4124.5	3838.4
	10	9027.1	8741.0
	50	62800.0	62513.9
	100	138701.6	138415.5
	200	281159.2	280873.1
Aβ1-40 ペプチド	1	302.1	16.0
	5	297.8	11.7
	10	280.3	-5.8
	50	311.2	25.1
	100	290.1	4.0
	200	287.9	1.8
Aβ1-11 ペプチド	1	267.5	-18.6
	5	296.1	10.0
	10	288.3	2.2
	50	367.1	81.0
	100	290.4	4.3
	200	311.0	24.9
Aβ34-42 ペプチド	1	302.1	16.0
	5	277.1	-9.0
	10	293.7	7.6
	50	295.0	8.9
	100	290.2	4.1
	200	298.1	12.0
400	287.3	1.2	