

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/119685

発行日 平成21年8月27日 (2009.8.27)

(43) 国際公開日 平成19年10月25日 (2007.10.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/37 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/37	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	D

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

<p>出願番号 特願2008-510925 (P2008-510925)</p> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/057663</p> <p>(22) 国際出願日 平成19年4月5日 (2007.4.5)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2006-110881 (P2006-110881)</p> <p>(32) 優先日 平成18年4月13日 (2006.4.13)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国 (JP)</p>	<p>(71) 出願人 000175892 三光純薬株式会社 東京都千代田区岩本町1-10-6</p> <p>(74) 代理人 100080230 弁理士 石原 詔二</p> <p>(74) 代理人 100147935 弁理士 石原 進介</p> <p>(72) 発明者 高山 茂雄 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</p> <p>Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ36 QR48 QR72 QS03 QS15 QS28 QS33 QS36 QX01</p>
--	--

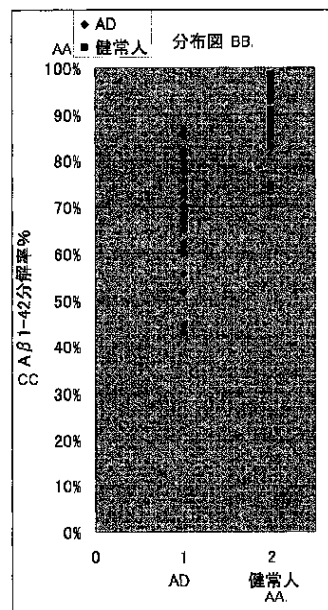
最終頁に続く

(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方法及び診断試薬

(57) 【要約】

血清又は血漿を検体としてアルツハイマー病の検定方法を提供することにある。

検体血液に添加した - アミロイドペプチドが分解することを見出し、その分解活性を健常者とアルツハイマー病患者の検体血液で比較したところ、有意に健常者血液の分解活性が強いことを見出した。



AA... NORMAL SUBJECT  
BB... DISTRIBUTION MAP  
CC...Aβ1-42 DEGRADATION RATE%

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

検体血液成分の、 $\beta$ -アミロイ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検定方法。

## 【請求項 2】

$\beta$ -アミロイド分解活性を測定する方法が、前記検体血液に、 $\beta$ -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を特徴とする、請求項 1 に記載のアルツハイマー病の検定方法。

## 【請求項 3】

前記検体血液に添加する  $\beta$ -アミロイドペプチドが、 $\beta$ -アミロイド 1 - 42 であることを特徴とする、請求項 2 に記載のアルツハイマー病の検定方法。

10

## 【請求項 4】

前記検体血液に添加した  $\beta$ -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  $\beta$ -アミロイドペプチドの分解活性を測定することを特徴とする、請求項 2 に記載のアルツハイマー病の検定方法。

## 【請求項 5】

前記免疫学的測定法が、前記検体血液に添加する  $\beta$ -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、請求項 4 に記載のアルツハイマー病の検定方法。

## 【請求項 6】

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 ~ 5 のいずれか 1 項記載のアルツハイマー病の検定方法。

20

## 【請求項 7】

検体血液に添加する  $\beta$ -アミロイドペプチド、該  $\beta$ -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  $\beta$ -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、検体血液に添加した該  $\beta$ -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  $\beta$ -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 8】

前記  $\beta$ -アミロイドペプチドが、 $\beta$ -アミロイド 1 - 42 であることを特徴とする、請求項 7 に記載のアルツハイマー病の診断試薬。

30

## 【請求項 9】

前記  $\beta$ -アミロイドペプチドの C 末端部分を認識する抗体が、21F12 であることを特徴とする、請求項 8 に記載のアルツハイマー病の診断試薬。

## 【請求項 10】

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 7 ~ 9 のいずれか 1 項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  $\beta$ -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  $\beta$ -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。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

$\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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

50

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<sub>β</sub>（以下、A<sub>β</sub>1-42と記す）である。A<sub>β</sub>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<sub>β</sub>の合成過程及びA<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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。これまでは脳脊髄液中のA<sub>β</sub>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<sub>β</sub>測定は、これまで行われてきた一般的な測定手法、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<sub>β</sub>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.

【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】

#### 【0004】

本発明は、検体血液中に添加したA<sub>β</sub>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<sub>β</sub>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。A<sub>β</sub>1-42の血中分解を確認する為、A<sub>β</sub>1-42合成ペプチドをヒト血清に添加し、経時的にA<sub>β</sub>1-42の残存量を測定した。測定法は、一次抗体としてA<sub>β</sub>1-42のN末端部分に特異性を有する抗体、第二抗体としてA<sub>β</sub>1-42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

10

20

30

40

50

)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A 1-42の測定は可能であるが、分解を受けて断片化したA 1-42は測定が不可能である測定系である。

測定の結果、添加したA 1-42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、A 1-42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A 1-42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 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A 1-42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A 1-42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。

#### 【0006】

次いで、AD患者と健常人血清検体にA 1-42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A 1-42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A 1-42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】

すなわち本発明のアルツハイマー病の検定方法は、検体血液成分の、A 分解活性を測定することを特徴とする。A 分解活性を測定する方法としては、検体血液にA 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挙げられる。

検体に添加するA ペプチドは、分解酵素ネプリライシンなどによる生体内でのA ペプチドの切断部位を考慮して、その切断部位を含むペプチドであれば特に限定はされず、好ましくは、A ペプチド1-42が挙げられる。添加したA ペプチドの残存量の測定方法は、該ペプチドを定量できる手法であれば特に限定はされないが、感度、簡便性に優れた免疫学的測定方法が好ましく、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が好ましい。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、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、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。

#### 【0009】

本発明の検定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。

10

20

30

40

50

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 A D 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 A D 診断に利用することにある。

#### 【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。

10

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、A D 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、A D に特異的に現れるピークが特定できれば、A D 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 A D 診断薬の開発につなげることが可能となる。

#### 【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、A D 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 A D を診断することが可能となる。

20

#### 【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。

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

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。

#### 【0014】

検体血液として血清を用い、検体血清に添加する A ペプチドとして A 1-42 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 1-42 合成ペプチドを添加して 25 で保温した後、その一定量を分取して残存する A 1-42 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。

40

二抗体サンドイッチ免疫測定法は、A 1-42 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 1-42 合成ペプチドを結合させた後洗浄する (BF 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 1-42 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。

50

## 【0015】

添加したA 1-42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 1-42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 1-42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 1-42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 1-42のアミノ酸1-5部位認識抗体である3D6抗体（イノジェネティクス社製）やアミノ酸10-16部位認識抗体である6E10抗体（ケミコン社製）、アミノ酸17-24部位認識抗体である4G8抗体（ケミコン社製）などが使用可能である。

A 1-42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21F12（イノジェネティクス社製）、8G7（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AB5078P（ケミコン社製）などが挙げられる。

A 1-40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 1-40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10-16部位認識抗体6E10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 1-42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 1-42合成ペプチドは、ヒト由来A 1-42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。

## 【0016】

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、2M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。

## 【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 1-42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 1-42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 1-42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

10

20

30

40

50

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髓腫細胞と融合し、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。

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 3 3 - 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。

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髓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。骨髓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。

#### 【 0 0 1 9 】

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 1 0 ）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 2 0 ~ 5 0 % 程度の濃度のポリエチレングリコール（平均分子量 1 0 0 0 ~ 4 0 0 0 ）を用いて 2 0 ~ 4 0 °C、好ましくは 3 0 ~ 3 7 °C の温度下、抗体産生細胞数と骨髓腫細胞数の比は通常 1 : 1 ~ 1 0 程度、約 1 ~ 1 0 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。

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、E L I S A 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、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 H A T （ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、1 0 ~ 2 0 % ウシ胎児血清を含む動物細胞用培地（例、R P M I 1 6 4 0 ）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 B A L B / C マウスの腹腔内へ移植し、1 0 ~ 1 4 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、P E G 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 - 4 2 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。

#### 【 0 0 2 0 】

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 A D 診断方法は、血液検体での A D 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 A D 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 - 4 2 の分解度合いを測定することで A D 診

10

20

30

40

50

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、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A1-42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。

【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。次にブロック剤として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(IGEN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(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)ブロックエース(大日本製薬社製)/0.15mol/L NaCl/0.01%(W/V)Tween 20/10mmol/L EDTA 2Na/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

10

20

30

40

50

応用溶液で1 mg / mL濃度に希釈した3 D 6抗体結合磁気ビーズを25  $\mu$  L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、50 mmol / L TrisHCl / tween 20 / 0.15 mol / L NaCl pH 7.5 (以下、洗浄液と記述) 350  $\mu$  L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4  $\mu$  g / mL濃度に希釈したルテニウム標識21 F 12抗体を200  $\mu$  L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、350  $\mu$  L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300  $\mu$  L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】

【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	-
A $\beta$ 1-42 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
A $\beta$ 1-40 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
A $\beta$ 1-11 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
A $\beta$ 34-42 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

【0027】

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A 1 -

10

20

30

40

50

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A<sub>1-42</sub>は測定不可能な測定系であることが確認された。

【0028】

(実験例2) 血清によるA<sub>1-42</sub>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90μLずつ分注した。2本の内の1本に9μL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9μL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10μLずつを抜き取り、200μLの反応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A<sub>1-42</sub>サンドイッチ免疫測定法にて測定を行った。

【0029】

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グラフである。

【0030】

【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

【0031】

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<sub>1-42</sub>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<sub>1-42</sub>を分解する酵素が存在し、添加したA<sub>1-42</sub>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<sub>1-42</sub>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<sub>1-42</sub>分解が阻害される為、A<sub>1-42</sub>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。

【0032】

(実施例1) AD患者及び健常人血清のA<sub>1-42</sub>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100μLずつ分注した。各分注検体に1μLの400ng/mL A<sub>1-42</sub>合成ペプチドを加えた。同時に血清検体の代わりに100μLの反応用溶液に1μLの400ng/mL A<sub>1-42</sub>合成ペプチドを加えたものを標準品として作製した。A<sub>1-42</sub>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。

保温開始20時間後の各サンプルから10μLずつを抜き取り、200μL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 】

A D 患者の E C L 発光強度の測定結果を表 3 に示し、健常人の E C L 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 1 0 0 % 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。

$$\text{分解率} = ( 1 - \text{サンプルの発光強度} \div \text{標準品の発光強度} ) \times 1 0 0 \cdot \cdot \cdot ( 1 )$$

また、A D 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、A D 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	69
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	
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	

【 0 0 3 5 】

【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	89
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	
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	
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	

10

20

30

## 【0036】

表3, 4及び図3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。このことは健常人群では血液中A 1-42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。

40

## 【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A 1-42分解速度比較

一次抗体としてA 1-42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。6E10抗体結合磁気ビーズの調製方法、ルテニウム錯体標

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

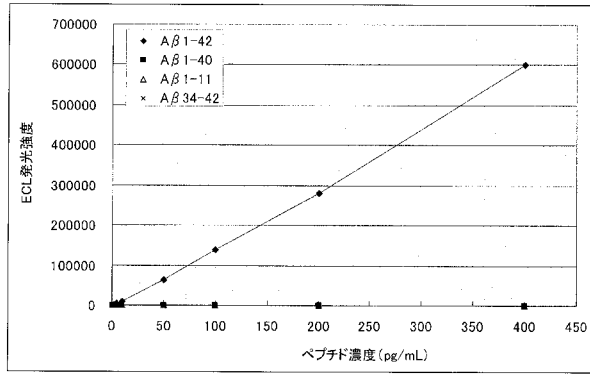
30

## 【産業上の利用可能性】

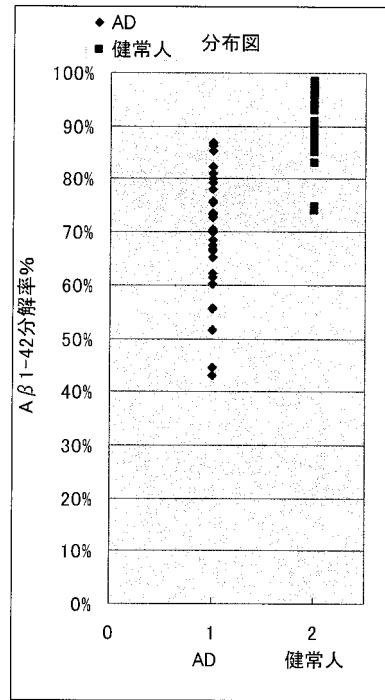
## 【0041】

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。

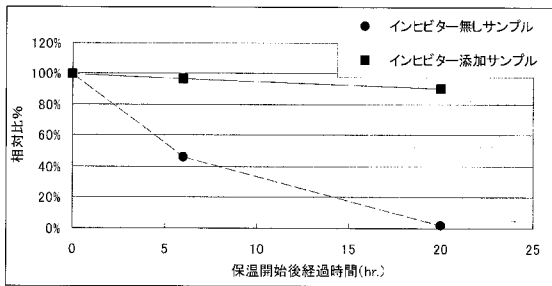
【 図 1 】



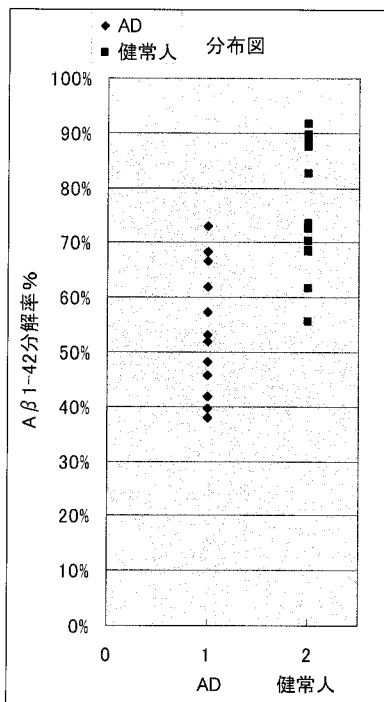
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/057663
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12Q1/37(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i  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) C12Q1/37, G01N33/53  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 practicable, search terms used) JSTPlus (JDream2), JMEDPlus (JDream2), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)		
<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 Y	JP 07-051096 A (Miles Inc.), 28 February, 1995 (28.02.95), Full text; Claims; Par. No. [0025] & EP 564946 A1 & AU 1993-033187 A & CA 2086165 A & ZA 1993-002554 A & NZ 247356 A & TW 253941 A & IL 105216 A & AU 672379 B & US 5981208 A & KR 282031 B & JP 3510902 B2	$\frac{1-2}{3}$
Y	DU, Yansheng, et al., alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein., Journal of neurochemistry. 1997, Vol.69, No.1, pages 299-305	3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 08 June, 2007 (08.06.07)		Date of mailing of the international search report 19 June, 2007 (19.06.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057663

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG, Deng-Shun, et al., beta-Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease., Journal of biomedicine & biotechnology. 2006(Published online 2006 April 6), Vol.2006, No.3, Article ID 58406, pages 1-12	3
Y	LAUER, D., et al., Alpha 2-macroglobulin-mediated degradation of amyloid beta 1--42: a mechanism to enhance amyloid beta catabolism., Experimental neurology. 2001, Vol.167, No.2, pages 385-392	3
A	CRAFT, Suzanne, et al., Insulin effects on plasma beta-amyloid levels in normal adults and patients with ad., Neurobiology of aging. 2004, Vol.25, No. suppl. 2, pages S35	1-3
A	KOVACS, D. M., et al., alpha2-macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease., Experimental gerontology. 2000, Vol.35, No.4, pages 473-479	1-3
A	Shinjiro FUKAMI et al., "Alzheimer's disease ni okeru Protease no Kan'yo to Rinsho Oyo", The Tissue Culture Engineering, 25 August, 2001 (25.08.01), Vol.27, No.9, pages 8 to 11	1-3
A	Takaomi SAIDO, "Tanpakushitsu Bunkai Hanno o Hosoku suru Atarashii Hoho o Mochiita Noikketsu oyobi Alzheimer's disease ni okeru Protease no Sayo no Kaiseki", Seikagaku, 25 September, 1996 (25.09.96), Vol.68, No.9, pages 1507 to 1522	1-3
P,A	WO 2006/046644 A1 (Sanko Junyaku Co., Ltd), 04 May, 2006 (04.05.06), (Family: none)	1-3

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/057663

**Box No. 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:
  
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 No. 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:

The requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) in an international application exists only when there is a technical relationship among a group of inventions described in claims involving one or more of the same or corresponding special technical features. This "special technical feature" means a technical feature that defines a contribution which each of inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2). Further, the determination of the requirement of unity of invention is made without regard to whether the inventions are claimed in separate claims or alternatives within a single claim (PCT Rule 13.3).

(continued to extra sheet)

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.:

Claims 1-3

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057663

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

First, in order to examine the requirement of unity of invention for inventions according to claims 1 and 7, which are independent claims, the matter common to the inventions according to claims 1 and 7 is examined. The matter common to the inventions according to claims 1 and 7 is a "test for Alzheimer's disease characterized by assaying  $\beta$ -amyloid degradation activity of a sample blood component".

However, with regard to the "test for Alzheimer's disease characterized by assaying  $\beta$ -amyloid degradation activity of a sample blood component", a contribution over the prior art cannot be found (in short, see document 1). Therefore, the "test for Alzheimer's disease characterized by assaying  $\beta$ -amyloid degradation activity of a sample blood component", which is the matter common to the inventions according to claims 1 and 7, is not a "special technical feature" under PCT Rule 13.2.

Subsequently, while novelty cannot be found in the invention according to claim 1 (in short, see document 1), with regard to the inventions according to claims 2 and 6, which are dependent claims directly referring to claim 1, whether or not the requirement of unity of invention is satisfied is examined. Also with regard to the "method of testing Alzheimer's disease according to claim 1", which is the matter common to claims 2 and 6, a contribution over the prior art cannot be found (in short, see document 1), therefore, it is not a "special technical feature" under PCT Rule 13.2.

Further, while novelty cannot be found in the invention according to claim 2 (in short, see document 1), with regard to the inventions according to claims 3 and 4, which are dependent claims directly referring to claim 2, whether or not the requirement of unity of invention is satisfied is examined. Also with regard to the "method of testing Alzheimer's disease according to claim 2", which is the matter common to claims 3 and 4, a contribution over the prior art cannot be found (in short, see document 1), therefore, it is not a "special technical feature" under PCT Rule 13.2.

Thus, this application includes 4 inventions in total, i.e., (i) one invention according to claims 1-3, (ii) one invention according to claims 4-5, (iii) one invention according to claim 6, (iv) one invention according to claims 7-10.

Document 1: JP 07-051096 A (Miles Inc.) 28 February, 1995 (28.02.95)  
Whole text, for example, claims; Par. No. [0025]

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 7 6 6 3	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/37(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/37, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus(JDream2), JMEDPlus(JDream2), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X Y	JP 07-051096 A (マイルズ インコーポレイティド) 1995.02.28, 全文、例えば、特許請求の範囲、【0025】 & EP 564946 A1 & AU 1993-033187 A & CA 2086165 A & ZA 1993-002554 A & NZ 247356 A & TW 253941 A & IL 105216 A & AU 672379 B & US 5981208 A & KR 282031 B & JP 3510902 B2	1-2 3	
Y	DU, Yansheng, et al., alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein., Journal of neurochemistry. 1997, Vol.69, No.1, pages 299-305	3	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 08.06.2007		国際調査報告の発送日 19.06.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 清水 晋治	4 B 3 5 3 5
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 4 8

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (2005年4月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 7 6 6 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WANG, Deng-Shun, et al., beta-Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease., Journal of biomedicine & biotechnology. 2006(Published online 2006 April 6), Vol.2006, No.3, Article ID 58406, pages 1-12	3
Y	LAUER, D., et al., Alpha 2-macroglobulin-mediated degradation of amyloid beta 1--42: a mechanism to enhance amyloid beta catabolism., Experimental neurology. 2001, Vol.167, No.2, pages 385-392	3
A	CRAFT, Suzanne, et al., Insulin effects on plasma beta-amyloid levels in normal adults and patients with ad., Neurobiology of aging. 2004, Vol.25, No. suppl. 2, pages S35	1-3
A	KOVACS, D. M., et al., alpha2-macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease., Experimental gerontology. 2000, Vol.35, No.4, pages 473-479	1-3
A	深見真二郎 他, アルツハイマー病におけるプロテアーゼの関与と臨床応用, 組織培養工学, 2001. 08. 25, 第27巻, 第9号, p. 8-11	1-3
A	西道隆臣, タンパク質分解反応を捕捉する新しい方法を用いた脳虚血およびア ルツハイマー病におけるプロテアーゼの作用の解析, 生化学, 1996. 09. 25, 第68巻, 第9号, p. 1507-1522	1-3
P, A	WO 2006/046644 A1 (三光純薬株式会社) 2006.05.04, (ファミリーなし)	1-3

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 7 6 6 3

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件 (PCT規則13.1) は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである (PCT規則13.2)。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる (PCT規則13.3)。

(特別ページに続く)

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1 - 3

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 7 6 6 3

先ず、独立請求項である請求の範囲1, 7に係る発明における発明の単一性の要件について検討するために、請求の範囲1, 7に係る発明に共通する事項について検討する。請求の範囲1, 7に係る発明に共通する事項は「検体血液成分のβ-アミロイ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検定」である。

しかしながら、当該「検体血液成分のβ-アミロイ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検定」について、先行技術に対する貢献を認めることができないので（要すれば、文献1を参照）、請求の範囲1, 7に係る発明に共通する事項である当該「検体血液成分のβ-アミロイ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検定」は、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

次に、請求の範囲1に係る発明について新規性を認めることができないところ（要すれば、文献1を参照）、請求の範囲1を直接引用する従属請求項である請求の範囲2, 6に係る発明について、発明の単一性の要件を満たしているか否かを検討する。請求の範囲2, 6に共通する事項の「請求項1に記載のアルツハイマー病の検定方法」についても、先行技術に対する貢献を認めることができないので（要すれば、文献1を参照）、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

さらに、請求の範囲2に係る発明についても新規性を認めることができないところ（要すれば、文献1を参照）、請求の範囲2を直接引用する従属請求項である請求の範囲3, 4に係る発明について、発明の単一性の要件を満たしているか否かを検討する。請求の範囲3, 4に共通する事項の「請求項2に記載のアルツハイマー病の検定方法」についても、先行技術に対する貢献を認めることができないので（要すれば、文献1を参照）、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

したがって、本願には、(i)請求の範囲1-3に係る1個の発明、(ii)請求の範囲4-5に係る1個の発明、(iii)請求の範囲6に係る1個の発明、(iv)請求の範囲7-10に係る1個の発明、合計4個の発明からなる。

文献1：JP 07-051096 A（マイルズ インコーポレイティド）1995.02.28,  
全文、例えば、特許請求の範囲、【0025】

---

フロントページの続き

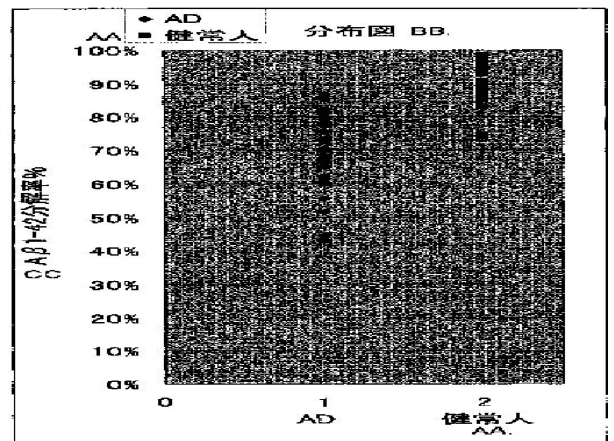
(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,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

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	通过测量血液中β-淀粉样蛋白降解率的阿尔茨海默氏病测定方法和诊断试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2007119685A1</a>	公开(公告)日	2009-08-27
申请号	JP2008510925	申请日	2007-04-05
申请(专利权)人(译)	三光有限公司		
[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		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QS03 4B063/QS15 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	石原伸介		
优先权	2006110881 2006-04-13 JP		
其他公开文献	JP4790013B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了一种使用血清或血浆作为样品测试阿尔茨海默氏病的方法。发现添加到血样中的β-淀粉样肽被降解。在正常受试者的血液样品和阿尔茨海默氏病患者之间比较了其降解活性，还发现正常受试者的血液中的降解活性明显更高。



AA... NORMAL SUBJECT  
 BB... DISTRIBUTION MAP  
 CC...Aβ1-42 DEGRADATION RATE%