

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/029886

発行日 平成22年1月21日 (2010.1.21)

(43) 国際公開日 平成20年3月13日 (2008.3.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	V
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 2
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26	3 O 1 A
	GO 1 N 27/26	3 1 5 J

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁)

出願番号 特願2008-533201 (P2008-533201)	(71) 出願人 504150461 国立大学法人鳥取大学 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/067428	
(22) 国際出願日 平成19年9月6日 (2007.9.6)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-242044 (P2006-242044)	(74) 代理人 100130328 弁理士 奥野 彰彦
(32) 優先日 平成18年9月6日 (2006.9.6)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 浦上 克哉 鳥取県米子市西町86番地 国立大学法人 鳥取大学内
	(72) 発明者 木村 美也子 鳥取県米子市西町86番地 国立大学法人 鳥取大学内

最終頁に続く

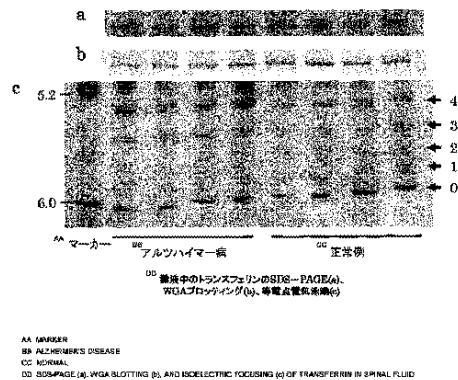
(54) 【発明の名称】 アルツハイマーの診断キット、診断マーカー及び病態指標の検出方法

(57) 【要約】

【課題】他の認知症と区別してアルツハイマー病を鑑別診断すること、や、神経細胞死が進行しない早期の段階でアルツハイマー病を診断することは、アルツハイマー病の治療の上で重要である一方、問診などを中心とした診断や、リン酸化タウ、アミロイドβタンパクを指標とした診断技術でアルツハイマー病を早期に鑑別診断することは困難であり、新規の診断技術の開発が望まれていた。

【解決手段】本発明によれば、糖鎖の付加したトランスフェリンに着目することで、アルツハイマー病の病態を早期に鑑別診断することを可能にする、診断キット、診断マーカー及び検出法が提供される。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、
シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段を有し、

哺乳動物から得られた髄液試料中における、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンと、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キット。

【請求項 2】

アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、
シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段を有し、

哺乳動物から得られた髄液試料中における、同一種の正常な哺乳動物から得られた髄液に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、の何れかをアルツハイマー病の病態指標として示す診断キット。

【請求項 3】

アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、
トランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、
糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、を有し、

哺乳動物から得られた血液試料中における、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合して得られる指標を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キット。

【請求項 4】

前記糖鎖が、WGA又はSSA結合性の糖鎖である、請求項3に記載の診断キット。

【請求項 5】

前記指標が、トランスフェリンと糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比である、請求項3に記載の診断キット。

【請求項 6】

アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、
トランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、
糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、
シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、を有し、

哺乳動物から得られた血液試料中におけるトランスフェリンの量と、
前記血液試料中における糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、
前記哺乳動物から得られた髄液試料中における、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリン、および/または、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、
を総合して得られる指標を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キット。

【請求項 7】

前記検出手段がレクチン親和電気泳動のためのレクチンを含む、請求項1ないし6の何れか一項に記載の診断キット。

【請求項 8】

前記検出手段がレクチンブロット解析のためのレクチン又はウェスタンブロット解析のための糖鎖の認識抗体を含む、請求項1ないし6の何れか一項に記載の診断キット。

【請求項 9】

前記検出手段がレクチン酵素免疫測定法のためのレクチン又は酵素免疫測定法のための糖鎖の認識抗体を含む、請求項1ないし6の何れか一項に記載の診断キット。

【請求項 10】

前記検出手段がレクチン酵素免疫測定法のためのレクチン又は酵素免疫測定法のための糖鎖の認識抗体を含む、請求項1ないし6の何れか一項に記載の診断キット。

10

20

30

40

50

前記検出手段がレクチンアレイ用チップ又は糖鎖の認識抗体を用いた抗体アレイ用チップを含む、請求項 1 ないし 6 の何れか一項に記載の診断キット。

【請求項 1 1】

前記レクチンがWGA又はSSAである、請求項 8 に記載の診断キット。

【請求項 1 2】

前記糖鎖の認識抗体がシアル酸の認識抗体である、請求項 8 に記載の診断キット。

【請求項 1 3】

前記糖鎖の認識抗体が糖鎖の付加したトランスフェリンの認識抗体である、請求項 8 に記載の診断キット。

【請求項 1 4】

10

アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンをレクチン酵素免疫測定法により定量的に検出するためのレクチンを含む診断キット。

【請求項 1 5】

前記レクチンがWGA又はSSAである、請求項 1 4 に記載の診断キット。

【請求項 1 6】

3 又は 4 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンと、1 又は 2 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比を含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカー。

【請求項 1 7】

20

1 又は 2 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリン、あるいは、3 又は 4 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンを含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカー。

【請求項 1 8】

血液試料中における、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合して得られる指標を含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカー。

【請求項 1 9】

アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、3 又は 4 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンに対する、1 又は 2 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量比を算出する工程とを含む検出方法。

30

【請求項 2 0】

アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、同一種の正常な哺乳動物から得られた髄液に対する、1 又は 2 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、あるいは、3 又は 4 のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量を算出する工程とを含む検出方法。

40

【請求項 2 1】

アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた血液試料に対して、トランスフェリンを定量的に検出する工程と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、前記トランスフェリンの量と、前記糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合した指標を算出する工程とを含む検出方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマーの診断キット、診断マーカー及び病態指標の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

我が国では、近年、人口の高齢化とともに老年期の認知症が大きな社会問題となっている。現在、65歳以上の10人に1人は認知症であり、認知機能に障害のある高齢者は現時点で130万人を数え、2035年には300万人に達するものと予想されている。認知症のうち多くは脳血管性認知症とアルツハイマー病（AD）であるが、そのうちの約半数をアルツハイマー病が占める。前者は血圧管理や再発予防などの医学的対処が可能となってきたが、アルツハイマー病では未だに原因、治療法、予防法が明らかでなく、早急な医学的解決が求められている。また、アルツハイマー病以外の認知症には、前述の脳血管性認知症以外に、特にタウオパチーと総称される認知症（前頭側頭葉変性症、レビー小体型認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺など）も存在し、これらはアルツハイマー病と類似の症状を呈しているために、アルツハイマー病との鑑別が困難な認知症である。障害となるような認知症状が出現する前に、他の認知症と区別してアルツハイマー病を鑑別診断できれば、現在試みられている治療法をより早期に開始することができ、認知症の進行を遅らせることが可能であるため、アルツハイマー病の早期診断法の確立は社会的急務といえる。

10

20

【0003】

アルツハイマー病患者では大脳皮質の萎縮が見られ、病理学的には高度の神経細胞脱落に加え、老人斑や神経原線維変化などの特徴的病変が観察される。これらのうち、老人斑が最も早期に出現し、アルツハイマー病に特徴的な変化であることから、アルツハイマー病における最も重要な変化と考えられている。老人斑の主要構成成分はアミロイド β タンパク質（A β ）であり、常染色体優性遺伝を示す家族性アルツハイマー病でA β の前駆体遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質（ β APP）に変異があることなどから、A β の産生あるいは分解の異常がアルツハイマー病の発症・進展に深く関わっていると考えられている。A β は、アミロイド前駆体タンパク質からアスパラギン酸プロテアーゼに属する β -セクレターゼと γ -セクレターゼ（プレセニリン複合体）による二回の切断を経て産生される。

30

【0004】

アルツハイマー病の治療薬としては、不足しているアセチルコリンを補う作用のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤などが知られているが、他にも上記メカニズムに基づいた各種のシグナル伝達標的薬が開発されつつある。

【0005】

アルツハイマー病（アルツハイマー型認知症）の診断は、臨床的に各種の診断基準を満たすかどうか、で診断されている。そのために、臨床症状、神経心理学的検査、生理学的検査、脳機能画像検査などの種々の検査と詳細な問診が行われている。しかし、病初期のアルツハイマー病は特異的な異常検査所見がほとんどなく、徹底的な本人と家族への問診と診察による除外診断が必要であるため、専門医に拠るところが大きいのが現状である。実際に、アルツハイマー病初期では、人格の変化、言葉の発声の困難、記憶喪失、物体の置き忘れ、人名の忘却などの症候が見られるが、病初期の病的な“もの忘れ”と加齢によるもの忘れ（生理的健忘）とを正確に見分けることは非常に困難である。このようなことも、アルツハイマー病を早期に発見することを困難にしている、大きな問題点である。

40

【0006】

また、早期に、多人数をスクリーニングするという目的のためには、簡便かつ確実にアルツハイマー病を検出できる生物学的診断マーカーが最も有効と考えられる。アルツハイマー病の診断マーカーの確立により、早期診断・発症前診断が可能となれば、確定診断に基づいた投薬や治療を計画し、更には、アルツハイマー病の予防への道を切り開くことも

50

可能となる。同時に、これらの早期診断により、アルツハイマー患者の医療と介護に必要な多大の費用を抑えることも可能となる。そのため、簡便かつ確実にアルツハイマー病を検出できる診断マーカーの発明・開発が強く望まれている。

【0007】

診断マーカーは、アルツハイマー病の病態を反映するものであることに加え、アルツハイマー病を検出する感度・特異度が共に高いものでなければならない。アルツハイマー病の診断マーカーとしては、現在までに国内外の多くのグループにより種々のものが提唱されている。例えば、アミロイドβタンパク質、糖鎖化アセチルコリンエステラーゼ、インターロイキン-6、サブスタンス-P、シスタチンC、血清アポリポプロテイン、血清ホモシステイン、APPアイソフォーム、インターロイキン-6、α1-アンチキモトリプシン (ACT)、オキシゲナーゼ-1、24S-ヒドロキシコレステロール、アセチルコリン、ソマトスタチン、バゾプレッシン、WGA (小麦胚芽凝集素; Wheat Germ Agglutinin) 結合タンパク質、アセチルコリントランスフェラーゼ活性、アセチルコリンエステラーゼ活性の測定などがアルツハイマー病の診断マーカーとして提唱されてきた。

10

【0008】

非特許文献1には、アルツハイマー病におけるWGA結合タンパク質の量的変化について記載されている。また、非特許文献2においては、トランスフェリンの糖鎖とアルツハイマー病について検討されている。

【0009】

20

しかし、これら多数報告されている診断マーカーの多くは病理変化との関係が不明であり、診断的価値が必ずしも確立していないものであった。現時点では、臨床上的有用性が確認されているアルツハイマー病の診断マーカーとしては、脳脊髄液中タウタンパク質とアミロイドβ42の2つのみが知られている。

【0010】

タウタンパクは、アルツハイマー病患者の脳で生じている神経原繊維変化という病理学的変化の原因物質である。アルツハイマー病の髄液中では、リン酸化タウタンパク (あるいは総タウタンパク) が増加しており、このタンパクを測定することによって、アルツハイマー病の診断の手助けになるとされている。

【0011】

30

診断マーカーとして用いられるアミロイドβタンパクは、42アミノ酸からなるアミロイドβペプチドの一種であり、アルツハイマー病患者の脳で起こっている老人斑という病理学的変化の原因物質である。アルツハイマー病患者の脳ではアミロイドβタンパク質が凝集して老人斑を形成するため、髄液中のアミロイドβタンパク質は逆に減少しており、これを測定することによって、アルツハイマー病の診断の手助けとなるとされている。

【0012】

【非特許文献1】 Lisa R. Fodero, Javier Saez-Valero, Maria-Sagrario Barquero, Alberto Marcos, Catriona A. McLean and David H. Small; "Wheat germ agglutinin-binding glycoproteins are decreased in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid.", *Journal of Neurochemistry*, 2001, 79, 1022-1026

40

【非特許文献2】 Susan J. van Rensburg, Peter Berman, Felix Potocnik, Pam MacGregor, Dinie Hon and Nico de Villiers; "5- and 6-glycosylation of transferrin in patients with Alzheimer's disease.", *Metabolic Brain Disease*, 2004, Vol.19, 89-96

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

タウタンパクを用いたアルツハイマー病の診断に関しては、神経原繊維変化を伴い、リン酸化タウタンパクの増加する認知症は、アルツハイマー病に限らないため、それらの他

50

の認知症（タウオパチー）との区別が課題であった。また、リン酸化タウが上昇している時期には神経細胞死が既に進行しており、この時期に治療を開始しても完全な神経機能の回復は望めないことも課題の一つであった。

【0014】

また、診断マーカーとして用いられるアミロイド β タンパクは、アルツハイマー病後期の重篤化には相関するものの、発病前の病期（mild cognitive impairment: MCI）や病初期においては正常との差がほとんど認められていない。また、アミロイド β タンパク質の減少は、アルツハイマー病特異的ではない。更には、個体差も大きく、アルツハイマー病で一様に減少している訳でもない点が課題となっていた。

【0015】

理想的なマーカーとしては、神経細胞が死に至る前に診断可能であり、好ましくはアルツハイマー病発症前の診断が可能であり、また、正常な脳や他の認知症との鑑別診断も可能で、かつ簡便に多数をスクリーニングできるものが望ましい。しかしながら、前述のように、これまでに提唱されているマーカーはいずれも理想的なマーカーからは程遠く、アルツハイマー病の確定診断には不十分であり、現在まで決定的なアルツハイマー病診断のためのマーカーは見いだされていない。

10

【0016】

また、WGA結合タンパク質がアルツハイマー病診断のための新たなマーカーとして期待されていたが、その詳細は不明であった（〔非特許文献1〕）。また、6のシアル酸を有する糖鎖の付加した特定の多型のトランスフェリンのみ増加が見られ、それ以外の種類の糖鎖に関しては有意な変化が見られないとの報告（〔非特許文献2〕）から、（6のシアル酸のもの以外の）トランスフェリンの糖鎖がアルツハイマー病の診断に用いることのできる可能性は低いと考えられていた。

20

【0017】

本発明は、斯かる状況に鑑みてなされたものであり、アルツハイマー病の診断のための有効性の高い新たな診断キット、診断マーカー及び検出法の開発を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明によれば、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段を有し、哺乳動物から得られた髄液試料中における、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンと、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キットが提供される。この診断キットは、アルツハイマー病で特異的に量的変化の見られるトランスフェリンの特定の糖鎖を指標とすることにより、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断の上で有利である。

30

【0019】

また、本発明によれば、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段を有し、哺乳動物から得られた髄液試料中における、同一種の正常な哺乳動物から得られた髄液に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、の何れかをアルツハイマー病の病態指標として示す診断キットが提供される。この診断キットは、アルツハイマー病で特異的に量的変化の見られるトランスフェリンの特定の糖鎖を指標とすることにより、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断の上で有利である。

40

【0020】

また、本発明によれば、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、トランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段とを有し、哺乳動物から得られた血液試料中における、

50

トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合して得られる指標を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キットが提供される。この診断キットは、アルツハイマー病で特異的に量的変化の見られる糖鎖の付加したトランスフェリンの量を用いた指標により、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断の上で有利である。

【0021】

また、本発明によれば、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、トランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段とを有し、哺乳動物から得られた血液試料中におけるトランスフェリンの量と、その血液試料中における糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、その哺乳動物から得られた髄液試料中における、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリン、および/または、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、を総合して得られる指標を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キットが提供される。この診断キットは、アルツハイマー病で特異的に量的変化の見られるトランスフェリンの特定の糖鎖及び血液中の糖鎖の付加したトランスフェリンの量を総合して指標とすることにより、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断の上で特に有利となる。

10

【0022】

また、本発明によれば、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンをレクチン酵素免疫測定法により定量的に検出するためのレクチンを含む診断キットが提供される。この診断キットは、アルツハイマー病に特異的に量的変化の見られるトランスフェリンの糖鎖を、ELISAの改変法であり、簡便なレクチン酵素免疫測定法で定量的に検出することにより、大量の試料を簡便、安価、又は確実に、数値化して処理することを可能にする。

20

【0023】

また、本発明によれば、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンと、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比を含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカーが提供される。この診断マーカーは、アルツハイマー病特異的に量的変化の見られるトランスフェリンの特定の糖鎖を指標とすることにより、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断が可能な診断マーカーとして用いることができる。

30

【0024】

また、本発明によれば、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリン、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンを含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカーが提供される。この診断マーカーは、アルツハイマー病で特異的に量的変化の見られるトランスフェリンの特定の糖鎖を指標とすることにより、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断が可能な診断マーカーとして用いることができる。

【0025】

また、本発明によれば、血液試料中における、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合して得られる指標を含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカーが提供される。この診断マーカーは、アルツハイマー病で特異的に量的変化の見られる糖鎖の付加したトランスフェリンの量を用いた指標によって、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断が可能な診断マーカーとして用いることができる。

40

【0026】

また、本発明によれば、アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンに

50

対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量比を算出する工程を含む検出方法が提供される。この検出方法は、アルツハイマー病で特異的に変化の見られるトランスフェリンの特定の糖鎖を測定対象とすることで、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断を可能とする病態指標の検出を可能とする。

【0027】

また、本発明によれば、アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量を算出する工程を含む検出方法が提供される。この検出方法は、アルツハイマー病で特異的に変化の見られるトランスフェリンの特定の糖鎖を測定対象とすることで、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断を可能とする病態指標の検出を可能とする。

10

【0028】

また、本発明によれば、アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた血液試料に対して、トランスフェリンを定量的に検出する工程と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合した指標を算出する工程とを含む検出方法が提供される。この検出方法は、アルツハイマー病で特異的に変化の見られる血液中の糖鎖の付加したトランスフェリンの量を指標として用いることで、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症との鑑別診断を可能とする病態指標の検出を可能とする。

20

【0029】

なお、上記の診断キット、診断マーカーおよび検出方法は、本発明の実施形態の一つに過ぎず、本発明によれば、これらを用いたアルツハイマー病の診断方法も提供される。

【発明の効果】

【0030】

本発明は、アルツハイマーの病態と相関性の高い診断を行うことを可能にする。

30

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】 図1は、トランスフェリンの糖鎖構造を示した図である。

【図2】 図2は、レクチン酵素免疫測定法の模式図である。

【図3】 図3は、髄液のWGAによるレクチンブロットにより、髄液中のWGA結合性糖タンパク質を示す図である。図中、Mはマーカーを示し、Nは非認知症由来の試料、Aはアルツハイマー病由来の試料、Tはタウオパチー由来の試料を示す。図中、最上段の矢印は約75kDaの糖タンパク質aを示し、二番目の矢印は30-33kDa付近の糖タンパク質、一番下の矢印は約25kDaの糖タンパク質を示す。

【図4】 図4は、図3のレクチンブロットで得られたWGA結合性の75kDaのタンパク質aのバンドを定量化したグラフである。図中aはバンドの濃さをそのまま定量化したグラフ、bはバンドの濃さをリン酸化タウタンパク(pS199)の量で規格化した後のグラフである。

40

【図5】 図5は、トランスフェリンの等電点電気泳動による解析の結果である。図中aはSDS-PAGE後のトランスフェリン量をウェスタンブロットにより検出した図、bはWGAを用いたレクチンブロットにより75kDaの糖タンパク質aを検出した図、そしてcは等電点電気泳動によりトランスフェリンの各アイソフォームを分離した図である。cにおいて、左側の0-4の数字は、各トランスフェリンアイソフォームに付加した糖鎖中のシアル酸の数を示す。

【図6】 図6は、血液中のトランスフェリンを定量化したグラフである。

50

【図7】 図7は、血液のWGAによるレクチンブロットで得られたWGA結合性のトランスフェリン（75 kDaのタンパク質）についての図である。図中aは、血液のWGAによるレクチンブロットで得られたWGA結合性のトランスフェリン（75 kDaのタンパク質）のバンドの図であり、図中bはそれを定量化したグラフである。

【図8】 図8は、図7に示した血液中のWGA結合性のトランスフェリンを、図6に示したトランスフェリン量で規格化したグラフである。

【発明の実施の形態】

【0032】

本実施形態における「アルツハイマー病」（AD）とは、大脳皮質の萎縮が見られ、病理学的には高度の神経細胞脱落に加え、老人斑や神経原線維変化などの特徴的病変が観察される認知症のことをいい、アルツハイマー病によって引き起こされる認知症をアルツハイマー型認知症という。これらの病変のうち、老人斑が最も早期に出現し、アルツハイマー病に特徴的な変化であることから、アルツハイマー病における最も重要な変化と考えられている。老人斑の主要構成成分はアミロイド β タンパク質（A β ）であり、常染色体優性遺伝を示す家族性アルツハイマー病でA β の前駆体遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質（APP）に変異があることなどから、A β の産生あるいは分解の異常がアルツハイマー病の発症・進展に深く関わっていると考えられている。A β は、アミロイド前駆体タンパク質からアスパラギン酸プロテアーゼに属する β -セクレターゼと γ -セクレターゼ（プレセニリン複合体）による二回の切断を経て産生される。アルツハイマー病の診断は、臨床症状、神経心理学的検査、生理学的検査、脳機能画像検査から各種の診断基準を満たすかどうか、で診断されている。

【0033】

本実施形態における「アルツハイマー病の病態指標」とは、例えば、アルツハイマー病あるいはアルツハイマー型認知症の発症などを含めたアルツハイマー病の状態に関する指標のこと。ここで、アルツハイマー病の病態指標とは、例えば、アルツハイマー型認知症の発症危険度の予測、アルツハイマー病の早期診断・早期予知、脳機能障害程度の推定、病態把握、経過の予測、治療結果の観察・評価、予後の予測などの指標を含む。上記の症状及びその症状を表すパラメーター等に関しては、この技術分野の医師にとってよく知られている日常的手法によって容易に測定が可能である。

【0034】

本実施形態における「哺乳動物」とは、任意の哺乳動物をいい、ヒト、家畜用動物、ペット用動物、動物園用動物、又はスポーツ用動物、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ウサギなどを含む。哺乳動物は、好ましくはヒトである。

【0035】

本実施形態における「トランスフェリン（Tf）」とは、一般にトランスフェリンと称されている679個のアミノ酸からなる糖タンパク質と実質的に同一のタンパク質をいい、その遺伝子多型体、遺伝子変異体あるいはスプライシングバリエーションも含む。トランスフェリンは、主に肝臓で産生され、1分子のトランスフェリンは2原子の鉄と結合し、その運搬体として働く血漿タンパク質であり、生体内においては、鉄代謝や造血機能に関与していることが知られている。アルツハイマー病とトランスフェリンとの関連性は、トランスフェリン遺伝子の多型との関連から様々な研究が行われてきたが、遺伝子多型とアルツハイマー病との関連性の有無に決着はついていない。

【0036】

本実施形態における「糖鎖」とは、タンパク質にグリコシド結合で結合した1又は2以上の糖からなる多糖類のことであり、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、D-マンノース、D-ガラクトース、L-フコース、シアル酸などの糖を主成分とする。糖鎖は、主に、タンパク質中のセリン/スレオニンに結合するO結合型糖鎖と、アスパラギンに結合するN結合型糖鎖に大別され、それぞれ特徴的な糖構成のものが知られている。糖鎖の機能としては、主に分子間の接着・相互作用（結合）に関するものが最もよく知られており、免疫系・神経系・細胞接着などで重要な働きを有して

いる。

【0037】

トランスフェリンの糖鎖に関しては、413番目と611番目のアスパラギンにN-アセチルグルコサミン、マンノース、ガラクトース、シアル酸を含むN結合型複合糖鎖がそれぞれ付加していることが知られている(図1)。トランスフェリンは、糖鎖付加の最終段階で付加されるシアル酸の数によって、幾つかのアイソフォームに分類されており、通常の血清のトランスフェリンはシアル酸を4つ有するテトラシアロトランスフェリンである。髄液中では、0~4のシアル酸を有するトランスフェリン全てが存在している。アルツハイマー病でのトランスフェリンの糖鎖について解析した報告は幾つか知られている。例えば、6のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの増加が見られる一方、5のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの増減では有意差が見られない(〔非特許文献2〕)、などの報告が挙げられるが、何れも、タウオパチーなどの鑑別実験などによる診断マーカーとしての有効性の検討や示唆はされておらず、実用化もされていない。

10

【0038】

本実施形態における「レクチン」とは、糖鎖を特異的に認識し、糖タンパク質や糖脂質と結合・架橋形成をするタンパク質のことをいい、その修飾体及び変異体も含む。さらに、本実施形態における「レクチン」は、糖鎖又は糖鎖を有する分子に対する受容体などの、糖鎖と特異的に結合するあらゆるタンパク質を広く含み、その範囲は狭義のレクチンに限られない。レクチンは、好ましくは、糖タンパク質と結合するタンパク質である。それぞれのレクチンにより、結合する糖鎖の構造的特徴が異なり、様々な糖鎖、糖タンパク質、糖脂質に対応するレクチンが知られている。哺乳動物由来のものに加え、植物、昆虫などの由来のものも多く知られ、WGA(小麦胚芽凝集素; Wheat Germ Agglutinin)、SSA(Sambucus sieboldiana(ニホンイワトコレクチン):シアル酸(特に α -2, 6-シアル化シアル酸)を特異的に認識するレクチン)、LCA(Lens culinaris agglutinin:マンノースを特異的に認識するレクチン)などが知られている。

20

【0039】

本実施形態における「抗体」とは、特定のペプチドや多糖類、低分子化合物などの様々な分子を認識し、結合・架橋形成する「抗体」と総称されるタンパク質のことをいい、その改変体、修飾体も含む。マウス、ウサギ、ヒツジ由来のものなど様々なものが知られており、また特定のモノクローナル抗体を培養細胞で生産することや、遺伝子組み替え技術を用いて大腸菌や真核生物細胞で生産させることも可能であり、そのような組替え体も含む。また、上記の各種抗体の断片も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント等が挙げられる。また、抗体がモノクローナル抗体の場合、グロブリンタイプは特に限定されず、例えばIgG、IgM、IgA、IgE、IgDなどが挙げられる。また、モノクローナル抗体は、ヒト化抗体でもよい。

30

【0040】

また、本願発明の各実施形態において、抗体又はレクチンを検出又は測定するために、シグナルを発生させることができる標識物質と抗体及びレクチン自体を結合させた標識抗体及び標識レクチンを用いてもよい。その際は、直接結合させたもの以外にも、抗体又はレクチンと標識物質とをアビジン-ビオチン又はストレプトアビジン-ビオチン系、又は二次抗体により結合させたものを用いることも可能であり、本発明の技術的範囲に含まれる。ここで用いる二次抗体としては、一次抗体又はレクチンと結合できる抗体を使用することができる。

40

【0041】

標識として酵素を使用する場合には、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、炭酸脱水素酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、マロン酸エステルデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ等を標識として使用することができ

50

る。これらの酵素で標識する方法としては、酵素の糖鎖を過ヨウ素酸で酸化し、生成したアルデヒド基に抗体又はレクチンのアミノ酸を結合させる方法や、酵素にマレイミド基あるいはピリジルスルフィド基等を導入し、抗体又はレクチンのF a b' フラグメントに存在するチオール基と結合させる方法等を挙げることができる。

【0042】

標識として酵素を使用する場合、試験試料と標識抗体又はレクチンとをインキュベートした後、遊離した標識抗体又はレクチンを洗浄して除去してから、上記の標識酵素の基質を作用させて発色等で反応を測定することによって標識抗体又はレクチンを検出することができる。例えば、ペルオキシダーゼで標識される場合には、基質として過酸化水素、発色試薬としてジアミノベンジジンまたはO-フェニレンジアミンと組み合わせさせて褐色または黄色を生じる。グルコースオキシダーゼで標識される場合には、基質として、例えば 2, 2'-アジド-ジ- (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS)) などをを用いることができる。

10

【0043】

標識として蛍光色素を使用する場合には、例えば、FITC (フルオレセインイソチオシアネート) 又はTRITC (テトラメチルローダミンBイソチオシアネート) などの蛍光色素で抗体又はレクチンを標識することができる。抗体又はレクチンと蛍光色素との結合は常法によって行うことができる。

【0044】

標識として呈色標識物質を使用する場合には、例えば、コロイド金属および着色ラテックスなどを標識として使用できる。コロイド金属の代表例としては、金ゾル、銀ゾル、セレンゾル、テルルゾル又は白金ゾルなどのそれぞれの分散粒子である金属コロイド粒子を挙げることができる。コロイド金属の粒子の大きさは、通常は、直径3~60nm程度が好ましい。また、着色ラテックスの代表例としては、赤色および青色などのそれぞれの着色料で着色されたポリスチレンラテックスなどの合成ラテックスが挙げられる。ラテックスとして天然ゴムラテックスのような天然ラテックスを用いてもよい。着色ラテックスの大きさは、直径数十nm~数百nm程度から選択することができる。これらの呈色標識物質は市販品をそのまま使用することができるが、さらに加工し、または、それ自体公知の方法で製造することも可能である。

20

【0045】

抗体又はレクチンと呈色標識物質との結合は常法によって行うことができる。例えば、呈色標識物質が金ゾルの分散粒子である金コロイド粒子の場合には、通常は、抗体と金ゾルとを室温下で混合することにより両者を物理的に結合することが可能である。

30

【0046】

なお、標識としては、上記以外にも放射性同位体標識 (例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等) 等を使用することも可能であり、本発明の範囲内に含まれる。

【0047】

本実施形態における「酵素免疫測定法」(ELISA)とは、酵素標識した抗体を用いて、抗体に対する抗原を定量的に検出する方法であり、定量性、簡便性、確実性(再現性)に優れ、臨床検査などで広く用いられている。酵素免疫測定法は広くよく知られた技術であり、一般的な技術手段の詳細については、公知の総説、成書などを参照することができる。酵素免疫測定法としては、幾つかの方法が知られており、中でもサンドイッチELISAと称される、抗体を固定化したプレートに抗原を結合させ、結合した抗原をまた別の抗体で検出するという方法が最も広く用いられている。

40

【0048】

本実施形態における「レクチン酵素免疫測定法」(レクチンELISA)とは、酵素免疫測定法の抗体の代わりにレクチンを用い、糖鎖を含む物質を検出する酵素免疫測定法の改変法であり、酵素標識したレクチンを用いて、糖タンパク質などの糖鎖を含む物質を定量的に検出することができる(図2)。レクチン酵素免疫測定法は、酵素免疫測定法と同様に、定量性(数値化可能)、簡便性、確実性(再現性)に優れた測定法である。酵素免

50

疫測定法は広くよく知られた技術であるため、その改変法であるレクチン酵素免疫測定法に関しても、酵素免疫測定法と共通する一般的な技術手段の詳細については、酵素免疫測定法に関する公知の総説、成書などを参照にすることができる。

【0049】

レクチン酵素免疫測定法では、サンドイッチELISAの改変法であるサンドイッチレクチンELISAを用いることも可能であり、その場合は、レクチン同士の組み合わせを用いても、レクチンと抗体の組み合わせを用いてもよい。抗体と組合わせて使う際には、用いる抗体によっては、レクチンに反応性の糖鎖を有する場合があるため、そのような場合は、酵素処理等を行った後に本実施形態に用いる。

【0050】

上記の酵素免疫測定法（ELISA）およびレクチン酵素免疫測定法（レクチンELISA）は、標識として酵素を用いたELISA又はレクチンELISAのみに限られず、放射性同位体を標識として用いたラジオイムノアッセイ（RIA）や蛍光物質を標識として用いた蛍光イムノアッセイなどの改変法も含む。これら個々の免疫化学的測定法を適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされず、公知の総説、成書などを参照することができる。

【0051】

〔実施形態〕

以下、本発明の実施形態について説明する。

【0052】

本発明のある実施形態は、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段を有し、哺乳動物から得られた髄液試料中における、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンに対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量比を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キットであり、この診断キットによるとアルツハイマー病の病態を把握することが可能となる。例えば、この診断キットにおいては、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンに対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの比の減少が同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対して観察される場合、アルツハイマー病の可能性が高いと診断されるが、これに限られず、アルツハイマー病に関する他の症状・状態に関しても、この技術分野の医師にとってよく知られている日常的手法によって測定し、本実施形態に係る診断キットを用いてそれらの病態指標を得ることは容易に可能である。

【0053】

また、本発明の他の実施形態は、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段を有し、哺乳動物から得られた髄液試料中における、同一種の正常な哺乳動物から得られた髄液に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、の何れかをアルツハイマー病の病態指標として示す診断キットであり、この診断キットによるとアルツハイマー病の病態を把握することが可能となる。

【0054】

好ましくは、上記の診断キットの変動量については、同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの減少量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの増加量を用いることも可能である。例えば、この診断キットにおいては、同一種の正常な哺乳動物から得られた髄液に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの減少、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの増加が観察される場合、アルツハイマー病の可能性が高いと診断されるが、これに限られず、アルツハイマー病に関する他の症状・状態に関しても、この技術分野の医師にとってよく知られている日常的手法によって測定し、本実施形態に係る診断キットを用いてそれらの

病態指標を得ることは容易に可能である。

【0055】

また、本発明の他の実施形態は、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、トランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段とを有し、哺乳動物から得られた血液試料中における、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合して得られる指標を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キットであり、この診断キットによるとアルツハイマー病の病態を把握することが可能となる。

【0056】

このキットで用いられる指標は、アルツハイマー病において大きな変化の見られる血中の糖鎖の付加したトランスフェリンの量を、同じくアルツハイマー病において変化の見られる血中のトランスフェリンの量を用いて、好ましくは差が明確となるように、通常用いられる統計処理を行うことで得られる。このような指標は、臨床診断に関わる技術分野の医師や研究者にとってよく知られている日常的手法によって算出することができるが、例えば、トランスフェリンと糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比（高い方がアルツハイマーの可能性が高いと診断される）を用いることができるが、当然のことながら、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量の双方の実測値を用いた有効な指標であればこれに限られない。

10

【0057】

従来、生物学的な診断マーカーを用いた場合においても、タウオパチーなど他の認知症との鑑別診断は困難であったが、上述の診断キットによりアルツハイマー病と特異性の高い診断が可能となり、より有効な治療法を提供することが可能となる。また、従来の診断キットと異なり、アルツハイマー病初期でも観察される変化を用いての診断が可能であるため、特に、アルツハイマー病を発病前診断や初期での診断の上で有利であり、効果的な予防や治療を可能にする。

20

【0058】

また、髄液を用いた上述の診断キットにおいては、非侵襲的な検査が可能となり、迅速・簡便かつ大量の試料の処理が可能となる。また、髄液は脳に近いため、より脳の病状と相関性の高い診断結果を得ることも可能となる。髄液は脳室性脳脊髄液に限らず、腰椎性脳脊髄液を使用することも可能であり、腰椎性脊髄液を使用した場合、生存している被験者において更に危険度の低い診断を行うことが可能となる。髄液の採取に関しては、状況に応じて、脳槽穿刺、腰椎穿刺、脳室穿刺、脊椎穿刺などの通常行われる髄液採取法を用いることができる。

30

【0059】

また、血液を用いた上述の診断キットにおいては、より迅速・簡便で、患者に非常に利便性の高い診断が可能となる。その際は、血液に適切な遠心分離操作を行うことで、リンパ球の存在を無視できる量になるまで減少させた血清を得、その血清に対して検出試薬を反応させることも可能であり、本実施形態に含まれる。

【0060】

更に、より迅速・簡便で患者にも利便性の高い、血液試料を用いた上述の診断キットによる診断を一次スクリーニングとして行い、二次的な診断として、髄液を用いた上述の診断キットによる診断を行うことも可能であり、本実施形態に含まれる。その際には、二次的な診断の際に、一次スクリーニングとして用いた、血液中のトランスフェリン及び糖鎖の付加したトランスフェリンの量も総合した診断指標を用いることもできる。

40

【0061】

ここで、試料については、得られた髄液、血液、血清などの試料に対し、任意の処理工程を一又は複数追加してもよい。このような処理工程としては、例えば、トランスフェリンを鉄イオンで飽和させる処理、各種カラムや免疫沈降法による不純物の除去・目的物の精製処理、トリプシン等によるタンパク質の断片化処理、酵素による特定の糖鎖の除去、他の酵素処理、各種化学修飾などが挙げられるが、これに限られない。

50

【0062】

なお、本発明の実施態様の全てにおいて、“タンパク質”との記載は、試料中のタンパク質に上記のような断片化処理、酵素処理、化学処理などを行った後の、ペプチド断片や、時には糖鎖断片などをも含むもののことをいい、これらの試料の前処理により検出対象等がタンパク質以外のものに変化した場合も、当然のことながら、本発明の技術的範囲に含まれる。

【0063】

また、本発明の他の実施形態は、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、トランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段と、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出するための検出手段とを有し、哺乳動物から得られた血液試料中におけるトランスフェリンの量と、その血液試料中における糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、その哺乳動物から得られた髄液試料中における、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリン、および/または、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、を総合して得られる指標を、アルツハイマー病の病態指標として示す診断キットであり、この診断キットによるとアルツハイマー病の病態を把握することが可能となる。

10

【0064】

このキットは、アルツハイマー病において変化の見られる、髄液試料中における1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量および/または3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、血液試料中での糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、血中でのトランスフェリンの量とを合わせた指標を用いることにより、さらに精度の高い診断を行うことが可能となる。この指標は、髄液試料中における1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量および/または3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、血液試料中での糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、血液試料中でのトランスフェリンの量とを用いて、好ましくは差が明確となるように、統計処理することで得られる。このような指標は、臨床診断に関わる技術分野の医師や研究者にとってよく知られている日常的手法によって求めることができる。

20

【0065】

また、本発明の更なる実施形態は、トランスフェリンの糖鎖がWGA又はSSA結合性の糖鎖である上述の診断キットであり、この診断キットによるとアルツハイマー病の病態をより正確に把握することが可能となる。WGAもしくはSSA結合性の糖鎖を有するトランスフェリンは、アルツハイマー病でより確実に量的変動が観察されるため、これらを用いることでより確実な診断が可能となる。

30

【0066】

また、本発明の更なる実施形態は、検出手段としてレクチンを含むゲルを用いたレクチン親和電気泳動を行うことにより、糖鎖付加されたトランスフェリンを検出する上述の診断キットである。レクチンを含むゲルでの電気泳動では、目的のレクチンに結合する糖鎖を持ったタンパク質は、そのレクチン親和性（結合力）の強いものほどアプライした点からの移動が低いため、糖鎖の少ない（レクチン結合力の弱い）トランスフェリンと、糖鎖が多く親和性の高いトランスフェリンを明確に分離することが可能となる。好ましくは、レクチンはシアル酸を有する糖鎖を認識するレクチンである。本実施形態においては、例えば、試料をレクチン親和電気泳動後、更にトランスフェリン抗体でウェスタンブロット解析しても、先にトランスフェリン抗体で免疫沈降した試料をレクチン親和電気泳動後、更にレクチンブロット解析、ウェスタンブロット解析あるいはクマシー・ブリリアント・ブルーなどのタンパク質染色試薬による染色を行ってもよく、当業者であれば、公知の手法に基づき、種々の設計変更、諸条件の調節は容易に可能である。

40

【0067】

レクチン親和電気泳動は、例えば以下のような手順で行うことが可能である。レクチン

50

を含むアガロースゲルを作製し、試料を電気泳動する。試料は、髄液、血液あるいは血清を電気泳動し、その後ゲルから、タンパク質を電氣的にP V D F膜へ転写する。タンパク質が転写された膜を1次抗体に抗トランスフェリン抗体、2次抗体に抗I g G抗体を用いて検出する。2次抗体は、ペルオキシダーゼ標識、あるいはアルカリホスファターゼ標識のI g Gを用い、さらにそれぞれの発色基質を用いて発色させて可視化する。あるいは、髄液、血液はあらかじめ抗トランスフェリン抗体による免疫沈降によって精製したものを試料として用いてもよい。その場合、電気泳動後の検出は、ゲルそのものをクマシー・ブリリアント・ブルーあるいは銀染色などのタンパク質染色法によって可視化することで行う。または、ゲル中のタンパク質を電氣的にP V D F膜に転写し、転写された膜をタンパク質染色法によって可視化し、検出する。タンパク質染色法では、免疫沈降時の他のタンパク質のコンタミネーションも考えられるため、更に膜を抗トランスフェリン抗体によって検出する方法も検出精度を上げる方法の一つとして挙げることができる。以上は、具体的な手順の一例であり、本実施形態はこれに限るものではない。

10

【0068】

また、本発明の更なる実施形態は、検出手段としてレクチンを用いたレクチンプロット解析又は糖鎖の認識抗体を用いたウェスタンプロット解析を行うことにより糖鎖付加されたトランスフェリンを検出する上述の診断キットである。糖鎖と特異的に結合するレクチン又は抗体でプロットすることにより、糖鎖の状態によりトランスフェリンを識別することが可能となる。好ましくは、レクチンは、シアル酸を有する糖鎖を認識するレクチンである。更に、等電点電気泳動、免疫沈降、クロマトフォーカシングなどと組み合わせることにより、より確実に糖鎖の状態の異なるトランスフェリンの識別を可能とする。検出の際には、例えば、各種酵素で標識したレクチン又は抗体を用いても、酵素標識した二次抗体を用いてもよく、当業者であれば、公知の手法に基づき、種々の設計変更、諸条件の調節は容易に可能である。

20

【0069】

糖鎖の認識抗体としては、例えば、佐藤ら、Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 1999 November, Vol.11, No.62, pp.371-390、又は、佐藤ら、Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2004 September, Vol.16, No.91, pp.331-344に記載されているような公知の糖鎖の認識抗体を用いてもよく、あるいは、糖鎖の認識抗体を作製して用いてもよい。糖鎖の認識抗体を作製する場合は、上記2文献中の、抗体に関する引用文献に記載の作製法を参考にしてもよく、あるいは、例えば、以下の方法によっても作製できる。

30

【0070】

糖鎖認識ポリクローナル抗体を作成する場合は、例えば、糖鎖やその一部、又は糖鎖の付加したトランスフェリン又は部分ペプチド、あるいはそれらと別のキャリアー分子やキャリアータンパク質との複合体を温血動物に免疫を行い、その免疫動物からポリクローナル抗体を含む血液を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより作製することができる。

【0071】

作製方法の一例を以下に示す。キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーと抗原との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫した抗原に対して抗体が効率良くできるならば、任意の条件でよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比で抗原1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合で結合させる方法が用いられる。また、抗原とキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、例えば、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。小分子を抗原として用いる場合、キャリアータンパク質を利用することが特に好ましい。

40

【0072】

抗原又は抗原—キャリアー複合体は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは適当な担体、緩衝液、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能

50

を高めるため、例えば、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、R A S [MPL (Monophosphoryl Lipid A) + TDM (Synthetic Trehalose Dicotrynomycolate) + CWS (Cell Wall Skeleton)アジュバントシステム]、水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを投与してもよい。これらのアジュバントと抗原は、希釈剤を用いた懸濁液もしくは乳化液の形で投与してもよい。ここで、アジュバントとは、抗原とともに投与したとき、非特異的にその抗原に対する免疫反応を増強する物質のことをいう。

【0073】

免疫する温血動物としては、例えば、ウサギ、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどの哺乳動物を用いることができる。例えば、免疫感作の方法としては、当業者に公知の通常の免疫感作の方法を用いて、例えば、抗原を1回以上投与することにより行うことができる。具体的には、抗原投与は、通常約1~6週毎に1回ずつ、計約2~10回程度行なうことができる。投与量は1回につき、例えば、抗原約0.05から2mg程度を目安とすることができる。投与経路も特に限定されず、例えば、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。免疫感作した哺乳動物を0.5から4ヶ月間飼育した後、該哺乳動物の血清を耳静脈等から少量試料採取し、抗体価を測定することができる。抗体価が上昇してきたら、状況に応じて抗原の投与を適当回数実施する。例えば10 μ g~1000 μ gの抗原を用いて追加免疫を行なうことができる。抗体価の測定は、例えば、標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。

【0074】

最後の投与から1~2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から通常の方法により血液あるいは腹水を採取して、56℃で30分間処理して補体系を不活性化した後、アフィニティークロマトグラフィーで特異抗体の分離・精製を行ない、ポリクローナル抗体を得る。アフィニティー担体としては、例えば、抗原ペプチドをAffigelなどに固相化したものを用いることができる。あるいは、得られた血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等の通常の方法によって分離・精製してもよい。

【0075】

糖鎖認識モノクローナル抗体を作製する場合は、例えば、糖鎖やその一部、又は糖鎖の付加したトランスフェリンやその部分ペプチド、あるいはそれらと別のキャリアー分子やキャリアータンパク質との複合体を温血動物に免疫を行い、その免疫動物から脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を採取し、得られた細胞とミエローマ細胞株との細胞融合により、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得、そのハイブリドーマからモノクローナル抗体を単離することで作製できる。

【0076】

作製方法の一例を以下に示す。温血動物の免疫工程までは、前述のポリクローナル抗体の作製と同様の方法で行うことができる。免疫する温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、好ましくは、マウス又はラットが用いられる。免疫感作の方法としては、当業者に公知の通常の免疫感作の方法を用いて、例えば、抗原を1回以上投与することにより行うことができる。具体的には、抗原投与は、通常約1~6週毎に1回ずつ、計約2~10回程度行なうことができる。投与量は1回につき、例えば、抗原約0.05から2mg程度を目安とすることができる。投与経路も特に限定されず、例えば、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。

【0077】

抗原を免疫された温血動物から、抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球

等などの抗体産生細胞を得る。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。

【0078】

ついで、これらの抗体産生細胞とミエローマ（骨髄腫細胞）の融合を行うが、融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法（G. Kohler et al., Nature, 1975, 495, 256）に従い実施できる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。ミエローマとしては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、マウスでは特にP3U1、SP2/0、P3X63Ag8が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞数とミエローマ数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間培養することにより効率よく細胞融合を実施できる。

10

【0079】

ハイブリドーマのスクリーニングを兼ねた選別的な培養は、通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。また、育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI-1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。また、細胞融合により得られたハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングすることができる。

20

【0080】

各ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体のスクリーニングには種々の方法が使用可能であるが、一例としては、抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（マイクロプレートなど）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられた抗体産生細胞と同じ種の免疫グロブリンと反応する抗体）、プロテインA又はプロテインGを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、免疫グロブリン抗体、プロテインA又はプロテインGを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した抗原を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが用いられる。

30

【0081】

このようにして選別されたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常細胞培養法や腹水形成法によりハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水からモノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔塩析法、硫酸分画、アルコール沈澱法、等電点沈澱法、電気泳動法、イオン交換体（DEAEなど）による吸脱着法・クロマトグラフィー、超遠心法、ゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー、抗原結合固相あるいはプロテインA又はプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など〕に従って行なうことができる。

40

【0082】

また、糖鎖に対するモノクローナル抗体としては、IgM抗体が得られる場合が多く、得られたIgM抗体をそのまま用いることも、当業者によく知られた遺伝子工学的手法でIgG抗体に改変して用いることも可能である。

【0083】

以上は例示であり、当業者であれば、通常抗体作成法にならい、目的の糖鎖認識抗体

50

を得るために種々の設計変更・改変、諸条件の調節は容易に可能である。

【0084】

また、本発明の更なる実施形態は、検出手段としてレクチンを用いたレクチン酵素免疫測定法又は糖鎖の認識抗体を用いた酵素免疫測定法を行うことにより、糖鎖付加されたトランスフェリンを検出する上述の診断キットである。本実施形態に係る診断キットは、既に確立されている技術であり実際に臨床でも数多く使われている酵素免疫測定法、あるいは酵素免疫測定法のレクチンを用いた改変法であるレクチン酵素免疫測定法を行うことで、簡便かつ確実に、数値化された測定を行うことを可能とし、大量の試料の処理も可能とする。好ましくは、レクチンは、シアル酸を有する糖鎖を認識するレクチンである。

10

【0085】

本実施形態に係るレクチン酵素免疫測定法又は酵素免疫測定法は、一例としては、以下のような手順で実施することができる(図2)。まず、ELISA用マイクロプレートに、抗トランスフェリン抗体を固相化する。ついで、Bovine Serum Albuminでブロッキングした後、溶液状の試料(髄液、血液など)を加え、試料中のトランスフェリンを抗体に結合させる(1次反応)。非結合抗体を洗い流した後、ビオチン標識レクチン(SSAやWGAなど)もしくは糖鎖の認識抗体を反応させる(2次反応)。さらに、HRP(horseradish peroxidase)標識ストレプトアビジンを結合させ、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジン)試薬で発色させて、反応停止液(硫酸等)を加え、450nmの吸光度を測定する。あらかじめ既知の濃度の目的糖鎖を含む標準試料によって検量線を作製しておき、上記で得られた吸光度を基に定量値を算出することができる。

20

【0086】

また、上記のようなサンドイッチ法によるレクチン酵素免疫測定法又は酵素免疫測定法において、固相抗体あるいは標識用抗体に用いられるレクチン又は糖鎖の認識抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上のレクチン又は抗体の混合物を用いてもよい。サンドイッチ法による本実施形態の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられるレクチン又は抗体は、糖鎖あるいは抗原に対して結合する部位が相異なるものが好ましく用いられる。

30

【0087】

以上の手順はあくまで例示であり、当業者であれば、通常の酵素免疫測定法の手順に従って、種々の改変が可能である。このような改変としては、例えば、ブロッキングをBSA以外の公知のブロッキング剤(ブロックエース等の大日本製薬社やGEヘルスケアバイオサイエンス社などによる市販品を含む)を用いて行うこと、マイクロプレートにレクチン又は抗体を固相化し、検出を(別の)抗体で行うこと、あるいは、マイクロプレートに試料を直接固相化し、検出をレクチン又は抗体で行うこと、あるいは、検出の際にアビジン-ビオチン系ではなく、レクチンや抗体に対する二次抗体や直接レクチンや抗体にHRPを結合したものをを用いること、あるいは、HRPやTMBの代わりに、他の公知の酵素や基質を用いて、発色・発光・蛍光などを検出に用いることが挙げられ、これらも本実施形態に含まれる。

40

【0088】

また、本発明の更なる実施形態は、検出手段としてレクチンが備え付けられたレクチンアレイ用チップを用いたレクチンアレイ又は糖鎖の認識抗体が備え付けられた抗体アレイ用チップを用いた抗体アレイを行うことにより糖鎖付加されたトランスフェリンを検出する診断キットである。レクチンアレイ又は抗体アレイを用いることで、他のタンパク質など多くの因子を含めた多面的な同時解析、及び簡便な解析が可能となる。特に、他の因子を認識する抗体とレクチン又は糖鎖の認識抗体とを組み合わせることにより、多くの因子の糖鎖の付加状態を一度に測定することが可能となり、より詳細な病態・病因の解析が可能となる。好ましくは、レクチンはシアル酸を有する糖鎖を認識するレクチンである。本実施形態に係るレクチンアレイ用チップは、抗体アレイの製造方法を応用して、レクチン

50

をチップに固定する工程を含む方法で提供することができる。

【0089】

アレイ用チップに用いるレクチン又は抗体としては、トランスフェリンの糖鎖を認識するレクチン（SSA、WGAなど）又は抗体を用い、マイクロアレイ用チップの1つのスポット当たり1種または2種以上の任意のプローブ（レクチン又は抗体に限らない）を含み、何れかのスポットに1種又は2種以上のトランスフェリンの糖鎖を認識するレクチン又は抗体が含まれているものとする。このレクチン又抗体とプローブとはマイクロアレイ用チップに物理的結合または化学的結合によって固定されていてもよく、その際には、ビーズへの固定化や多孔質基盤等の感度を上げる操作を更に追加してもよい。

【0090】

アレイ用チップの素材は公知の全ての種類の物質であってもよく、好ましくは通常のマイクロアレイで使用される物質であり、チップ表面にレクチン又は抗体や他のプローブを固定することができる反応基やニトロセルロースまたは3次構造形成物が更に含まれていてもよい。例えば、シリコンウエハー、ガラス、ポリカーボネート、膜、ポリスチレンまたはポリウレタンのような高分子フィルム及び多孔性物質が用いられる。レクチン又は抗体や他のプローブの固定は、通常のマイクロアレイ製造方法で使用する方法を用いることができ、例えば、フォトリソグラフィ法、圧電印刷法、マイクロピペッティングまたはスポットティングなどの方法を用いてスポットの作成を行うことができる。

【0091】

アレイ用チップ上のスポットは、例えば、直径 $50\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ 、スポットの間隔は $10\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ であってもよいが、スポットの大きさ及び稠密度はアレイ分析システムの解像度によって適切に調節することが好ましい。本実施形態に係るアレイは、マイクロウェルプレート、例えば96ウェルプレートのウェルに設置し、既存の96ウェルプレートを利用した自動装置（Biomex、Genetix roboなど）を用いて、試料分子、標識、混成化及び洗浄過程を機械的に処理することも可能である。

【0092】

アレイの実施及び測定に関しては、従来の抗体アレイとほぼ同じ操作を用いてよい。例えば、トランスフェリンをあらかじめCy3やCy5などの蛍光物質で標識しておき、専用の検出機器によって結合量は標識の蛍光量として検出する。解析ソフトによってその蛍光標識量（レクチンとの結合量）を定量し、トランスフェリンの糖鎖構造を解析、測定する。レクチンと糖鎖の結合量は、その親和性の強弱によって、弱いものは検出が難しい。そのため、タンパク質を標識した蛍光プローブの検出方法として、基盤に結合したプローブのみを高感度に検出できるネバエッセント波励起法などによって、高感度に標識物質あるいは結合量を検出できる方法を試みる。以上はあくまで例示であり、トランスフェリンを直接標識する以外に、標識抗体等で標識してもよく、当業者であれば、公知の手法に基づき、種々の設計変更・改変、諸条件の調節は容易に可能である。

【0093】

また、本発明の更なる実施形態は、レクチンとしてWGA又はSSAを用い糖鎖付加されたトランスフェリンを検出する上述の診断キットである。レクチンとしてWGA又はSSAを用いることで、確実なトランスフェリンの糖鎖の状態の検出が可能となる。

【0094】

また、本発明の更なる実施形態は、シアル酸を有する糖鎖の認識抗体を用いて、糖鎖付加されたトランスフェリンを検出する上述の診断キットである。シアル酸を有する糖鎖の認識抗体を用いることで、より詳細な糖鎖の状態の検出が可能となり、詳細な病態の診断が可能となる。

【0095】

シアル酸を有する糖鎖の認識抗体としては、例えば、佐藤ら、Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 1999 November, Vol.11, No.62, pp.371-390、又は、佐藤ら、Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2004 September, Vol.16, No.91, pp.331-344に記載されているような公知の糖鎖の認識抗体を用いてもよく、あるいは、糖鎖の認

10

20

30

40

50

識抗体を作製して用いてもよい。

【0096】

シアル酸を有する糖鎖の認識抗体を作製する場合は、前述の、糖鎖の認識抗体の作製法とほぼ同様の方法で作製することができる。その際に、抗原として、シアル酸を含む糖鎖を含む抗原を用いることで、目的の抗体を得ることが可能となる。

【0097】

また、本発明の更なる実施形態は、糖鎖の付加したトランスフェリンの認識抗体を用いて、糖鎖の付加したトランスフェリンを検出する上述の診断キットである。糖鎖の付加したトランスフェリンの認識抗体を用いることで、他の抗体やレクチンを組み合わせることなく特異的かつ簡便にトランスフェリンの糖鎖状態の検出が可能となる。

10

【0098】

糖鎖の付加したトランスフェリンの認識抗体を作製する場合は、前述の、糖鎖の認識抗体の作製法とほぼ同様の方法で作製することができる。その際に、抗原として、例えば化学修飾・酵素修飾・細胞からの精製などで得られた、糖鎖の付加したトランスフェリンを抗原として用いることで、目的の抗体を得ることが可能となる。あるいは、例えば、トランスフェリンの413番目のアスパラギン残基又は611番目のアスパラギン残基と実質的同一のアミノ酸の付近のペプチドに糖鎖が付加されたものを抗原として用いてもよい。また、糖タンパク質に対するモノクローナル抗体としては、IgM抗体が得られる場合が多く、得られたIgM抗体をそのまま用いることも、当業者によく知られた遺伝子工学的手法でIgG抗体に改変して用いることも可能である。また、この場合の糖鎖は、好適には、シアル酸を有する糖鎖であり、これは抗原としてシアル酸を有する糖鎖が付加したものを

20

【0099】

また、本発明の他の実施形態は、アルツハイマー病を診断するための診断キットであって、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンをレクチン酵素免疫測定法により定量的に検出するためのレクチンを含む診断キットであり、この診断キットによると、アルツハイマー病の早期診断、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の疾病との鑑別診断を簡便に行うことが可能となる。また、大量の試料の簡便な処理や数値化した測定も可能とする。

【0100】

30

また、本発明の更なる実施形態は、レクチンとしてWGA又はSSAを用いたレクチン酵素免疫測定法により、糖鎖付加されたトランスフェリンを定量的に検出する上述の診断キットである。WGA又はSSAを用いたレクチン酵素免疫測定法により、確実なトランスフェリンの糖鎖の状態の検出が可能となる。

【0101】

なお、上記実施の形態とは別に、トランスフェリンの糖鎖の付加状態の検出手段として質量分析や種々のインビボアッセイも利用可能である。質量分析は、タンパク質の糖鎖状態の解析方法として広く知られており、公知の手法に基づき、種々の設計変更・改変、諸条件の調節を行い、トランスフェリンの糖鎖状態を検出することは容易に可能であり、本発明の技術的範囲に含まれる。質量分析を用いて検出することにより、簡便な検出が可能となる。また、試薬を用いる他の方法に比べ、自動化の点でも有利である。

40

【0102】

また、インビボアッセイとしては、例えば、患者の体内の体液（髄液、血液）を、放射性同位元素のような検出可能な標識物質で標識したレクチンあるいは抗体に曝し、その細胞又は体液へのレクチンあるいは抗体の結合を、例えば、放射性的外部スキanningや生検によって評価することも可能であり、当然ながら本発明の技術的範囲に含まれる。生存する患者をリアルタイムで解析することで、より詳細な病態の解明、診断を行うことができる。

【0103】

また、本発明の更なる他の実施形態は、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したト

50

ランスフェリンと、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンとの比を含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカーである。この診断マーカーを用いることで、アルツハイマー病の病態を把握することが可能となる。例えば、この診断マーカーにおいては、同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対する、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンに対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの比の減少が観察される場合、アルツハイマー病の可能性が高いと診断されるが、これに限られず、アルツハイマー病に関する他の症状・状態に関しても、この技術分野の医師にとってよく知られている日常的手法によって測定し、本実施形態に係る診断マーカーを用いてそれらを診断することは容易に可能である。

【0104】

10

また、本発明の更なる他の実施形態は、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリン、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンを含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカーである。この診断マーカーを用いることで、アルツハイマー病の病態を把握することが可能となる。好ましくは、この診断キットにおいては、同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの変動量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの変動量をアルツハイマー病の病態指標とすることができる。また、好ましくは、変動量については、同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの減少量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの増加量を用いることも可能である。

20

【0105】

例えば、この診断マーカーにおいては、同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの減少量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの増加量が観察される場合、アルツハイマー病の可能性が高いと診断されるが、これに限られず、アルツハイマー病に関する他の症状・状態に関しても、この技術分野の医師にとってよく知られている日常的手法によって測定し、本実施形態に係る診断マーカーを用いてそれらを診断することは容易に可能である。

【0106】

30

また、本発明の他の実施形態は、哺乳動物から得られた血液試料中における、ランスフェリンの量と糖鎖の付加したランスフェリンの量とを総合して得られる指標を含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカーであり、この診断マーカーを用いることで、アルツハイマー病の病態を把握することが可能となる。この診断マーカーで用いられる指標は、アルツハイマー病において大きな変化の見られる血中での糖鎖の付加したランスフェリンの量を、同じくアルツハイマー病において変化の見られる血中でのランスフェリンの量を用いて、好ましくは差が明確となるように、統計処理することで得られる。このような指標は、臨床診断に関わる技術分野の医師や研究者にとってよく知られている日常的手法によって算出することができるが、例えば、ランスフェリンと糖鎖の付加したランスフェリンとの量比（高い方がアルツハイマーの可能性が高いと診断される）などが挙げられる。当然のことながら、ランスフェリンの量と糖鎖の付加したランスフェリンの量の双方の実測値を用いた有効な指標であればこれに限られない。

40

【0107】

また、当然のことながら、これらの診断マーカーを組み合わせ、髄液試料中における1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの量および／または3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したランスフェリンの量と、血液試料中での糖鎖の付加したランスフェリンの量と、血液試料中でのランスフェリンの量とを用いて、好ましくは差が明確となるように、統計処理することで得られた指標を含む診断マーカーを用いることも可能であり、本発明の技術的範囲に含まれる。

【0108】

50

従来、生物学的な診断マーカーを用いた場合においても、タウオパチーなど他の認知症との鑑別診断は困難であったが、これらの診断マーカーによりアルツハイマー病と特異性の高い診断が可能となり、より有効な治療法を提供することが可能となる。また、従来の診断マーカーと異なり、アルツハイマー病初期でも観察される変化に由来するマーカーであるため、症状の進行する前に効果的な治療を計画することが可能となる。

【0109】

また、本発明の他の実施形態は、アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンに対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量比を算出する工程とを含む検出方法である。本実施形態に係る検出方法は、アルツハイマー病に特異的なトランスフェリンの糖鎖のシアル酸数の変化を検出し、その量比を算出することにより、他の認知症との鑑別診断やアルツハイマー病の早期診断を可能とする。

10

【0110】

また、本発明の他の実施形態は、アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、同一種の正常な哺乳動物から得られた髄液に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量を算出する工程とを含む検出方法である。本実施形態に係る検出方法は、アルツハイマー病に特異的なトランスフェリンの糖鎖のシアル酸数の変化を検出し、その中でも1又は2、あるいは3又は4のシアル酸の付加した糖鎖の量を検出することにより、他の認知症との鑑別診断やアルツハイマー病の早期診断を可能とする。

20

【0111】

また、本発明の他の実施形態は、アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、哺乳動物から得られた血液試料に対して、トランスフェリンを定量的に検出する工程と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンとの量を総合した指標を算出する工程とを含む検出方法である。本実施形態に係る検出方法は、アルツハイマー病に特異的な血中の糖鎖の付加したトランスフェリンの量を主に検出することにより、他の認知症との鑑別診断やアルツハイマー病の早期診断を可能とする。この検出方法で算出される指標は、アルツハイマー病において大きな変化の見られる血中での糖鎖の付加したトランスフェリンの量を、同じくアルツハイマー病において変化の見られる血中でのトランスフェリンの量を用いて、好ましくは差が明確となるように、通常用いられる統計処理することで得られる。このような指標は、臨床診断に関わる技術分野の医師や研究者にとってよく知られている日常的手法によって算出することができるが、例えば、トランスフェリンと糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比（高い方がアルツハイマーの可能性が高いと診断される）などが挙げられる。当然のことながら、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量の双方の実測値を用いた有効な指標であればこれに限られない。

30

【0112】

なお、上記の実施形態により説明される診断キット、診断マーカー及び検出方法は、本願発明を限定するものではなく、例示することを意図して開示されているものである。本願発明の技術的範囲は、特許請求の範囲の記載により定められるものであり、当業者は、特許請求の範囲に記載された発明の技術的範囲において種々の設計の変更が可能である。例えば、糖鎖付加されたトランスフェリンの検出を、各種の免疫化学的手法、スロット或いはドットプロットアッセイ、もしくは、二次元電気泳動法などの各種改変電気泳動法により達成してもよく、このような態様の診断キット、診断マーカー及び検出法が本願発明の技術的範囲に含まれることはいうまでもない。

40

【0113】

上記の各種の免疫化学的手法としては、例えば、試料液中の抗原と標識抗原とを抗体に

50

対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B又はFの何れかの標識量を測定し、試料液中の抗原量を定量する方法が挙げられる（競合法）。B/F分離の方法としては、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離を高分子液相（ポリエチレングリコールなど）と可溶性抗体に対する2次抗体などを用いて行う液相法、及び、1次抗体として固相化抗体、又は、可溶性の1次抗体と固相化した2次抗体を用いる固相化法とが挙げられる。また、他の免疫化学的手法としては、試料液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、又は、試料液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離し、いずれかの相の標識量を測定し試料液中の抗原量を定量する方法も挙げられる（イムノメトリック法）。また、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する方法も挙げられる（ネフロメトリー法）。試験液中の抗原量が僅かで、少量の沈降物しか得られない場合にも、レーザー光の散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどを用いることができる。

10

【0114】

また、例えば、検出手段としてクロマトフォーカス用のカラムを用いたクロマトフォーカシングを行うことにより、糖鎖付加されたトランスフェリンを検出してもよい。カラムの中にpH勾配を形成させてタンパク質を等電点によって分離するクロマトグラフィー手法であり、電荷に応じた物質の分離の可能なクロマトフォーカシングを行うことにより、糖鎖中に存在する、負に帯電したシアル酸の数に応じて、糖鎖の異なるトランスフェリンを明確に分離することが可能となる。また、クロマトフォーカシング処理後の試料は、更なる処理を行うことが容易に可能であり、複数の連続した処理を容易に行うことができる。クロマトフォーカシングの具体的な手順は、公知の手法、あるいはGEヘルスケアバイオサイエンス社、ベックマン・コールター社などのカラムの製造・販売会社からの技術文書を参照にすることで容易に実施可能であり、種々の設計変更、諸条件の調節も容易に可能である。

20

【0115】

具体的には、例えば、高いpHのバッファーで平衡化したカラムに試料を添加後、多段階的に低いpHの溶出液に切り変えてカラムの中にpH勾配を形成することにより、試料中の物質を等電点の高い順に溶出させる。カラムとしては、例えば、数種類の陰イオン交換基が導入された担体を含む専用のカラムを使用し、溶出液には広いpH範囲にわたり均一な緩衝能を持つ両性バッファーを使用する。専用のカラムとしては、例えばGEヘルスケアバイオサイエンス社のMono P Columnsなどが知られているが、当業者であれば、対象物や条件などに応じたカラムを適宜選択、使用することができる。クロマトフォーカシングの手順等についても、クロマトフォーカシングはよく知られた技術であるため、一般的な技術手段の詳細については、公知の総説又は成書にすることができ、それ以外にも、上記のMono P Columnsなどのクロマトフォーカシング用カラムに関する技術文書を参照にすることができる。

30

【0116】

本実施形態においては、例えば、試料をクロマトフォーカス後、更に通常の電気泳動を行い、トランスフェリン抗体でウェスタンブロット解析を行っても、先にトランスフェリン抗体で免疫沈降した試料をクロマトフォーカス後、更に通常の電気泳動を行い、レクチンブロット解析、ウェスタンブロット解析あるいはクマシー・ブリリアント・ブルーなどのタンパク質染色試薬による染色を行っても、あるいは、クロマトフォーカス後の試料を、更にレクチンアレイ・抗体アレイ、レクチン酵素免疫測定法・酵素免疫測定法で解析してもよく、当業者であれば、公知の手法に基づき、種々の設計変更は容易に可能である。

40

【0117】

また、例えば、検出手段として等電点電気泳動用ゲルを用いた等電点電気泳動を行うことにより、糖鎖付加されたトランスフェリンを検出してもよい。電荷に応じた物質の分離の可能な等電点電気泳動を行うことにより、糖鎖中に存在する、負に帯電したシアル酸の

50

数に応じて、糖鎖の異なるトランスフェリンを明確に分離することが可能となる。本実施形態においては、例えば、試料を等電点電気泳動後、更にトランスフェリン抗体でウェスタンブロット解析を行っても、先にトランスフェリン抗体で免疫沈降した試料を等電点電気泳動後、更にレクチンブロット解析あるいはクマシー・ブリリアント・ブルーなどのタンパク質染色試薬による染色を行ってもよく、当業者であれば、公知の手法に基づき、種々の設計変更、諸条件の調節は容易に可能である。

【0118】

さらに、本発明に係る実施形態は、本発明に係る診断キットを含む製造品である。この製造品は容器及び容器に備え付けられるラベル又はパッケージ挿入物を含む。容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等を含み、ガラス又はプラスチックなどの適切な素材から選択される。容器は、本発明に係る診断キットを含む組成物を収容し、場合によっては無菌のアクセスポートを有し得る形態も可能である（例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バイアルであってよい）。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が肝炎の診断のために使用されることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、診断に用いる際の注意書きを更に含む。製造品はさらに、コントロール試料、各種緩衝液、希釈液、フィルター、針、シリンジ及び注射用の静菌水(BWF I)等を含む付加的な容器を具備してもよい。

10

【0119】

上述の製造品に含まれる診断キットにおいては、その実施形態に応じて、抗体又はレクチンはあらかじめ固相化されていてもよく、あるいは予め標識されていてもよい。本発明の実施形態に係る診断キットにおいて用いることができる固相は特に限定されず、例えば、ポリスチレン等のポリマー、ガラスビーズ、磁性粒子、マイクロプレート、イムノクロマトグラフィー用濾紙、ガラスフィルターなどの不溶性担体を挙げることができる。上述の製造品には、更に他の任意成分を含めることができる。他の任意成分としては、例えば、標識に用いる酵素、その基質、放射性同位元素、発光物質、蛍光物質、着色物質、緩衝液、プレート等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

20

【0120】

さらに、上記の診断キット、診断マーカーおよび検出方法は、本発明の実施形態の一つに過ぎず、本発明によれば、これらを用いたアルツハイマー病の診断方法も提供され、この診断方法によりアルツハイマーの病態と相関性の高い診断を行うこともできる。

30

【0121】

このような、診断方法としては、例えば、アルツハイマー病の診断方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、その髄液試料中における、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンに対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量比を算出する工程を含む診断方法が提供される。

【0122】

また、アルツハイマー病の診断方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、同一種の哺乳動物から得られた正常組織に対する、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量、あるいは、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの変動量を算出する工程を含む診断方法も提供される。

40

【0123】

また、アルツハイマー病の診断方法であって、哺乳動物から得られた血液試料中に対して、トランスフェリンを定量的に検出する工程と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合した指標を算出する工程とを含む診断方法も提供される。

【0124】

また、アルツハイマー病の診断方法であって、哺乳動物から得られた血液試料中に対して、トランスフェリンを定量的に検出する工程と、糖鎖の付加したトランスフェリンを定

50

量的に検出する工程と、哺乳動物から得られた髄液試料に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、その血液試料中におけるトランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量と、その髄液試料中における、1又は2のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリン、および／または、3又は4のシアル酸を有する糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合した指標を算出する工程とを含む診断方法も提供される。

【0125】

また、上記の指標がトランスフェリンと糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比である、上述の診断方法も提供される。

また、上記の糖鎖がWGA又はSSA結合性の糖鎖である上述の診断方法も提供される 10

また、レクチンを用いたレクチン親和電気泳動により、糖鎖の付加したトランスフェリンおよび／またはシアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する、上述の診断方法も提供される。

【0126】

また、レクチンを用いたレクチンブロット解析または糖鎖の認識抗体を用いたウェスタンブロット解析により、糖鎖の付加したトランスフェリンおよび／またはシアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する、上述の診断方法も提供される

また、レクチンを用いたレクチン酵素免疫測定法または糖鎖の認識抗体を用いた酵素免疫測定法により、糖鎖の付加したトランスフェリンおよび／またはシアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する、上述の診断方法も提供される。 20

また、レクチンアレイ用または抗体アレイ用により、糖鎖の付加したトランスフェリンおよび／またはシアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する、上述の診断方法も提供される。

【0127】

また、上記の糖鎖の認識抗体がシアル酸の認識抗体である、上述の診断方法も提供される。

また、上記の糖鎖の認識抗体が糖鎖の付加したトランスフェリンの認識抗体である、上述の診断方法も提供される。 30

また、アルツハイマー病の診断方法であって、哺乳動物から得られた髄液試料中に対して、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンをレクチン酵素免疫測定法により定量的に検出する工程含む診断方法も提供される。

また、上記のレクチンがWGAまたはSSAである、上述の診断方法も提供される。

【0128】

なお、上記実施の形態により説明される診断キット、診断マーカー、検出方法および診断方法等を用い、ヒトあるいは哺乳動物において、アルツハイマー病の治療薬や悪性化物質をスクリーニングする方法、病態を解析する方法なども、本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】 40

【0129】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これは一例であり、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。

【0130】

実施例1 髄液中のWGA反応性糖タンパク質の検出

2003年12月－2006年3月の期間、鳥取大学病院に許可された、アルツハイマー病（AD）50例、認知症のない症例（非認知症例：non-AD）43例、AD以外の認知症であるタウオパチー14例を対象に試験を行った。一部の実施例では、認知症のない症例の43例中の、更に異常のない正常例6例を用いた。また、タウオパチー14例 50

は、進行性核上性麻痺 5 例、レビー小体型認知症 4 例、大脳皮質基底核変性症 5 例を含む。対象の構成を表 1 に示した。

【0131】

【表 1】

	患者数 (男/女)	年齢, 平均 + 標準偏差 (男/女), 年
アルツハイマー病	50 (19 / 31)	73 ± 8 (74 ± 8 / 72 ± 8)
タウオパチー (詳細)	14 (10 / 4)	72 ± 7 (73 ± 3 / 68 ± 14)
進行性核上性麻痺	5 (3 / 2)	67 ± 9
レビー小体型認知症	4 (3 / 1)	76 ± 5
大脳皮質基底核変性症	5 (5 / 0)	71 ± 7
認知症のない比較群	38 (21 / 17)	71 ± 10 (71 ± 8 / 72 ± 12)
(正常例を含む)	6 (1 / 5)	64 ± 14

10

患者の人数構成

【0132】

20

各疾患の診断は、詳細な問診、内科学的診察、神経学的診察、高次脳機能検査、画像検査 (CT、MRI、SPECT) などにより、以下の判断基準を参考にして行った。アルツハイマー病では DSM-IV 及び NINCDS-ADRDA の診断基準、進行性核上性麻痺は NINDS-SPSP の診断基準、レビー小体型認知症はレビー小体型認知症のコンセンサスガイドライン、大脳皮質基底核変性症では Rinne、森松らの診断基準を満足するものとした。

【0133】

この試験を行うに際し、患者からインフォームドコンセントを得て、且つ、研究プロトコル (計画案) は、1975 年のヘルシンキ宣言の倫理的ガイドラインに従ったものとし、鳥取大学の倫理委員会の承認の下、試験を行った。

30

【0134】

本実施例では、対象から常法により髄液を採取し、髄液中に存在する、WGA 結合性の糖タンパク質を電気泳動で分離して検出した。以下に、手順をより具体的に説明する。

【0135】

髄液サンプルは、サンプルバッファー (60mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM 2-ME, 0.1% BPB) と共に沸騰浴中で 5 分間加熱処理した。電気泳動には、5-20% のグラジエントゲルを用い、サンプルをアプライした後泳動バッファー (25mM Tris-HCl, 192mM glycine, 0.1% SDS) 中で泳動した。泳動終了後、ゲル中のタンパクは PVD F メンブレンに電氣的にブロッティングした。メンブレンをブロッキング液に浸してブロッキング後、糖鎖の検出にはビオチン標識 WGA 20mg/ml と一晩反応させ、糖鎖と結合させた。次いでアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン (1:1000) を室温で 2 時間反応させ、BCIP/NBT 発色基質を用いて WGA 結合糖タンパク質を検出した。代表的な検出像を図 3 に示した。図中、M はマーカーを示し、N は非認知症例由来の試料、A はアルツハイマー病由来の試料、T はタウオパチー例由来の試料を示す。図中左側の数字は、マーカーに用いたタンパクの分子量をそれぞれ示す。単位は kDa (キロダルトン)。また、図中、最上段の矢印は約 75 kDa の糖タンパク質 a を示し、二番目の矢印は 30-33 kDa 付近の糖タンパク質、一番下の矢印は約 25 kDa の糖タンパク質を示す。

40

【0136】

WGA 結合性糖タンパク質は、アルツハイマー病由来の試料とそれ以外の試料との間で差が見られ、アルツハイマー病患者の髄液中のタンパク質に関して、糖鎖の付加機構に

50

何らかの異常があると考えられた。アルツハイマー病由来の試料においては、約75 kDa (a)、30-33 kDa、約25 kDa付近にWGA結合量の減少したタンパク質が検出された。これらのことから、以下に示すタンパク質をはじめとする様々なタンパク質の糖鎖付加を測定することが、アルツハイマー病の新たな診断方法につながると考えられた。

【0137】

実施例2 髄液中のWGA結合性糖タンパク質(約75 kDa糖タンパク質a)の量の比較

実施例1の結果から、最も有意に変化していた約75 kDaの糖タンパク質aの量的変化に着目し、75 kDaの糖タンパク質の、アルツハイマー病例、正常例、タウオパチー 10
例間の量を比較した。

【0138】

検討は、実施例1及びそれと同様の実験を行うことで得られたレクチンプロット像を解析することにより行った。レクチンプロットの結果をコンピューターに取り込んだ後、定量ソフト(デンストメーター)を用いてバンドの濃さを定量化し、グラフにプロットした。結果のグラフを図4に示した。図4のaはバンドの濃さをそのまま定量化したグラフ、bはバンドの濃さをリン酸化タウタンパク(pS199)の量で規格化した後のグラフである。リン酸化タウの測定は、ヒトリン酸化タウELISAキット(BioSource社)を用いて測定した。

【0139】

約75 kDaの糖タンパク質はアルツハイマー病で有意に減少しており、単独でアルツハイマー病を感度74.6%、特異度76.6%で検出可能であり、従来、リン酸化タウタンパクなどの指標では鑑別の困難であったタウオパチーとの間にも鑑別可能であった。また、この減少は初期のアルツハイマー病の患者でも観察されたことから、特に病初期ADの発見・診断に貢献できると考えられた。

【0140】

さらに、この糖タンパク質に対するリン酸化タウタンパクの比を指標として検討したところ、アルツハイマー病では有意に($p < 0.001$)低値を示し、カットオフ値184で、感度85.1%、特異度80.6%でアルツハイマー病を検出可能であった。更に、タウオパチーとアルツハイマー病の間の比較では、カットオフ値205で、感度89.4 30
%、特異度92.3%であり、タウオパチーとの鑑別にも有効なタンパク質であることが分かった。(特にカットオフ値200以上では極めて有効に鑑別が可能。)

【0141】

実施例3 髄液中の約75 kDa糖タンパク質aの同定

有意な量的変化の見られた約75 kDaの糖タンパク質aの同定を以下のように行った。

【0142】

75 kDaの糖タンパク質を電気泳動後のゲルから切り出し、トリプシンで消化してペプチド断片を作成した。同定には、MALDI-TOF質量分析計を用いて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法:Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)と飛行時間型質量分析:time-of-flight (TOF) MS analysisによって各ペプチドの質量を測定した。さらにペプチドのアミノ酸解析を行って、ペプチド質量とアミノ酸配列を元に、データベース検索ソフトであるMASCOTを用いて既存のデータベースと照会(PMF法:Peptide mass fingerprint法)し、同定した。

【0143】

以上の同定作業の結果、約75 kDaのタンパク質aはトランスフェリンであることが明らかとなった。また、このことは、抗トランスフェリン抗体を用いたウェスタンブロットによっても確認された。

【0144】

実施例4 髄液中のトランスフェリン量の定量

WGAで検出したトランスフェリンが、WGA結合量に低値を示した原因は、トランスフェリンタンパク自体の減少、あるいはWGAに結合する糖鎖の変化の何れかであると考えられたため、実際のトランスフェリン量を測定する実験を行った。

【0145】

トランスフェリン量の測定は、ヒトトランスフェリンELISA測定キット (Bethyl Laboratories Inc.) を用いた。結果を表2に示した。

【0146】

【表2】

	人数	トランスフェリン μg/ml
アルツハイマー病	40	24.6 ± 10.6
タウオパチー	10	22.8 ± 8.2
認知症のない比較群	29	25.0 ± 12.5

10

20

髄液中のトランスフェリンレベル

【0147】

アルツハイマー病、タウオパチー、認知症のない比較群のいずれの群間に関しても有意差は見られなかった。WGAで検出されたトランスフェリンの低値は、トランスフェリンのタンパク質量自体の変化ではなく、WGAとの結合に必要な糖鎖の変化であることが明らかとなった。

【0148】

実施例5 髄液中のトランスフェリンの糖鎖の解析

トランスフェリンの糖鎖について解析するために、マンノースに特異的に結合するLCAを用いて検討を行った。N結合型糖鎖付加の初期段階ではマンノースが付加されるため、マンノースの存在状況を調べることにより、糖鎖の初期段階での付加機能を検討することができる。髄液のトランスフェリンのLCA結合量は、アルツハイマー病群とコントロール群で差がなく、アルツハイマー病の髄液中における糖鎖の異常は、マンノース以降、特にシアル酸付加に異常があるのではないかと推定された。また、トランスフェリンの糖鎖は診断マーカーとなるだけでなく、糖鎖付加の異常自体をアルツハイマー病の新たな病態として解析することでアルツハイマー病の病態解明に役立つと期待された。

30

【0149】

実施例6 トランスフェリンアイソフォームの分離

トランスフェリンの糖鎖のより詳細な解析をするために、以下のように等電点電気泳動を行い、シアル酸数の異なる糖鎖の付加したトランスフェリンを分離した。

40

【0150】

トランスフェリンの等電点電気泳動には、鉄イオンによって飽和させた試料 (髄液) を用いた。泳動ゲルは、pH 4-6.5で分離できるように調整した両性担体を含む、ポリアクリルアミドゲル(5%T, 3%C)を用い、鉄飽和トランスフェリンをその等電点によって分離した。泳動終了後、ゲルは両性担体を除去した後、クマシー・ブリリアント・ブルーにより染色し、タンパク質 (トランスフェリン) を検出した。結果を図5に示した。図中、aはSDS-PAGE後のトランスフェリン量をウェスタンブロットにより検出した図、bはWGAを用いたレクチンブロットによりトランスフェリン (約75 kDaの糖タンパク質a) を検出した図、そしてcは等電点電気泳動によりトランスフェリンの各アイソフォーム

50

を分離した図である。cにおいて、左側の0～4の数字は、各トランスフェリンアイソフォームに付加している糖鎖中のシアル酸の数を示す。

【0151】

トランスフェリンの糖鎖は、アルツハイマー病とそれ以外で組成が異なっていることが明らかとなった。特に、本実施例においては、シアル酸が1～2付加したものはアルツハイマー病で減少し、3～4付加したものは増加していることが観察された。また、このことがWGA結合性の減少につながっていることも明らかとなった。このことから、シアル酸が3～4付加したトランスフェリンとシアル酸が1～2付加したトランスフェリンとをアルツハイマー病の病態指標として用いることができると考えられた。

【0152】

10

実施例7 髄液中のSSA結合性糖タンパク質(約75kDa糖タンパク質：トランスフェリン)の量の比較

実施例1と同様の手法で、レクチンとしてWGAの代わりにSSAを用いて、トランスフェリンに相当する約75kDa糖タンパク質のレクチンブロット解析を行った。その後、実施例2と同様の手法で、レクチンブロットの結果を定量化した後、実施例3のようにして求めたトランスフェリンの重量で規格化した後の結果を表3に示した。

【0153】

【表3】

	Number	シアル酸量 (nmol/mg Tf)	
AD	26	20.82 ± 2.63	} p<0.01
非認知症群	11	17.78 ± 2.20	

20

SSAによる髄液トランスフェリン糖鎖の測定

・・・これは、等電点電気泳動の結果と一致する

【0154】

30

アルツハイマー病群において、トランスフェリン(約75kDaの糖タンパク質)のうち、WGA結合性のもの全体は低下しているにも関わらず、SSA結合性のもの(シアル酸の付加したものは有意に増加しており、アルツハイマー病における、髄液中のトランスフェリンの糖鎖付加の重要性、特に糖鎖中のシアル酸の重要性が確認された。

【0155】

以上の結果から、髄液中のトランスフェリンについて、特定の数のシアル酸の糖鎖したトランスフェリンを指標として用いることで、アルツハイマー病の鑑別診断が可能であることが明らかとなった。

【0156】

実施例8 血液中のトランスフェリン量の定量

40

実施例1～7で対象とした臨床例のうち、アルツハイマー病27例、非認知症17例について、常法により対象より血液を採取して調製した血液試料について、以下の分析を行った。

最初に、実施例4と同様の手法で、血液中のトランスフェリンの測定を行った。結果のグラフは図6に示した。

【0157】

アルツハイマー病群と認知症の無い比較群(非認知症)を比較すると、アルツハイマー病群での血液中のトランスフェリンの量は有意に低下していた(p<0.05)。アルツハイマー病においては、血液中のトランスフェリンの量が有意に減少していることが明らかとなった。

50

【0158】

実施例9 髄液中のWGA糖タンパク質（約75kDa糖タンパク質：トランスフェリン）の量の比較

【0159】

実施例1と同様の手法で、トランスフェリンに相当する約75kDa糖タンパク質のレクチンプロット解析を行い、実施例2と同様の手法で、レクチンプロットの結果を定量化した。結果のグラフを図7に示した。

実施例2における髄液を用いた実験の結果と異なり、血液中では、非認知症群に比べ、アルツハイマー病群において、WGA結合性のトランスフェリンの有意な増加が認められた（ $p < 0.05$ ）。

10

【0160】

さらに、血液中のトランスフェリン量、血液中のWGA結合性のトランスフェリン量の双方共に有意な変動がみられたため、それらの量比で規格化した数値を算出し、結果のグラフを図8に示した。血液中のトランスフェリン量と血液中のWGA結合性トランスフェリン量の双方を総合した指標（量比）では、アルツハイマー病と非認知症群の間で、より大きな有意差が観察された。

【0161】

以上の結果から、血液中のトランスフェリンについて、例えばWGA結合性で表されるような、糖鎖の付加したトランスフェリンの量をトランスフェリンの総量と総合した指標を用いることで、アルツハイマー病の診断が可能であることが明らかとなった。

20

【0162】

以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

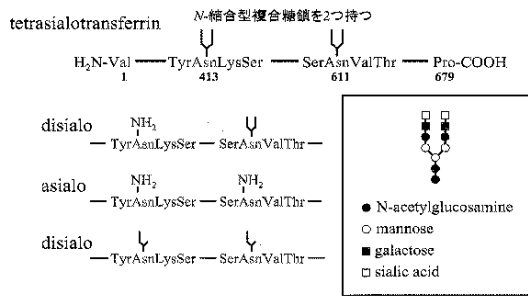
【産業上の利用可能性】

【0163】

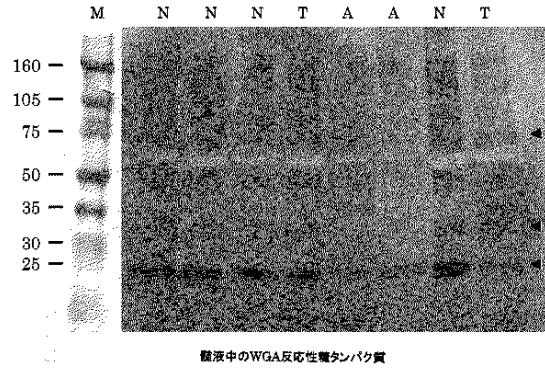
以上のように、本発明に係る診断キット、診断マーカー及び病態指標の検出方法は、アルツハイマーの病態と高い相関性で診断可能な診断キット、診断マーカー及び病態指標の検出方法として有用である。

【図1】

トランスフェリンの糖鎖構造

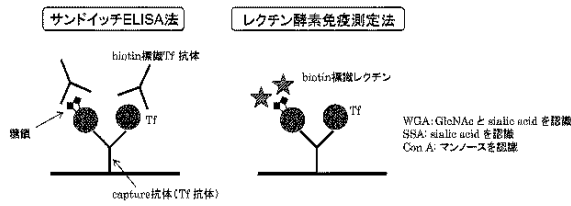


【図3】

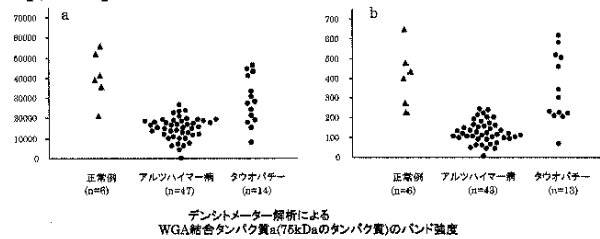


【図2】

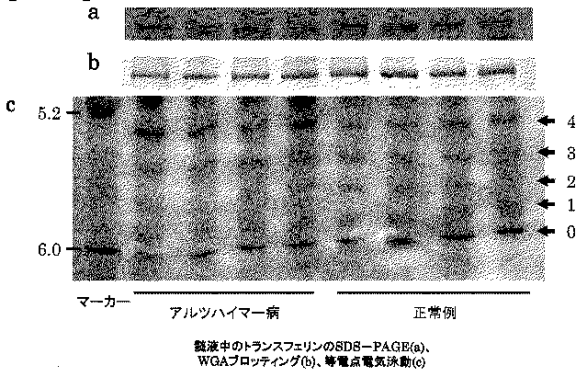
トランスフェリンの糖鎖変化を定量的に測定する方法の開発(単単・数値化)



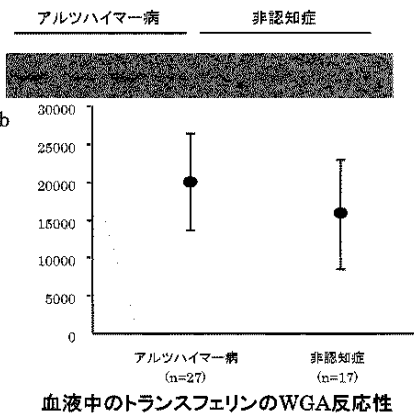
【図4】



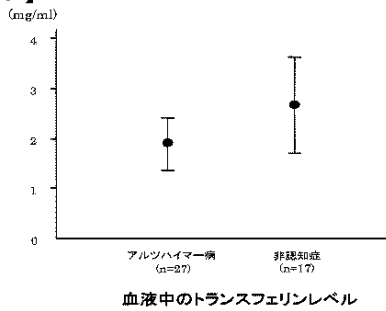
【図5】



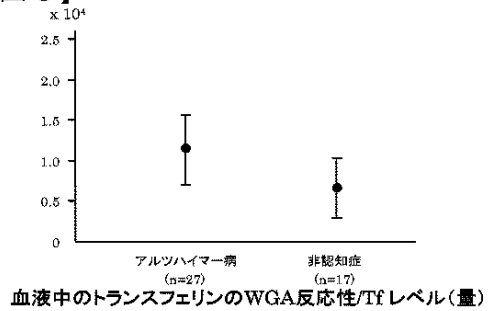
【図7】



【図6】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成20年6月4日(2008.6.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(削除)

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

(削除)

【請求項10】

(削除)

【請求項11】

(削除)

【請求項12】

(削除)

【請求項13】

(削除)

【請求項14】

(削除)

【請求項15】

(削除)

【請求項16】

(削除)

【請求項17】

(削除)

【請求項18】

血液試料中における、トランスフェリンの量と糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合して得られる指標を含む、アルツハイマー病を診断するための診断マーカー。

【請求項19】

(削除)

【請求項20】

(削除)

【請求項21】

アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、
哺乳動物から得られた血液試料に対して、
トランスフェリンを定量的に検出する工程と、
糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程と、
前記トランスフェリンの量と、前記糖鎖の付加したトランスフェリンの量とを総合した
指標を算出する工程と
を含む検出方法。

【請求項 2 2】

前記指標が、トランスフェリンと糖鎖の付加したトランスフェリンとの量比である、請求項 2 1 に記載の検出方法。

【請求項 2 3】

前記糖鎖が W G A 又は S S A 結合性の糖鎖である、請求項 2 1 に記載の検出方法。

【請求項 2 4】

前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程が、レクチンプロット解析又は糖鎖の認識抗体を用いたウェスタンプロット解析により、前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程を含む、請求項 2 1 に記載の検出方法。

【請求項 2 5】

前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程が、レクチン親和電気泳動により、前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程を含む、請求項 2 1 に記載の検出方法。

【請求項 2 6】

前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程が、レクチン酵素免疫測定法又は糖鎖の認識抗体を用いた酵素免疫測定法により、前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程を含む、請求項 2 1 に記載の検出方法。

【請求項 2 7】

前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程が、レクチンアレイ又は糖鎖の認識抗体を用いた抗体アレイにより、前記糖鎖の付加したトランスフェリンを定量的に検出する工程を含む、請求項 2 1 に記載の検出方法。

【請求項 2 8】

前記レクチンが W G A 又は S S A である、請求項 2 4 ないし 2 7 の何れか一項に記載の検出方法。

【請求項 2 9】

前記糖鎖の認識抗体がシアル酸の認識抗体である、請求項 2 4、2 6、2 7 の何れか一項に記載の検出方法。

【請求項 3 0】

前記糖鎖の認識抗体が糖鎖の付加したトランスフェリンの認識抗体である、請求項 2 4、2 6、2 7 の何れか一項に記載の検出方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 2】

の付加したものは有意に増加しており、アルツハイマー病における、髄液中のトランスフェリンの糖鎖付加の重要性、特に糖鎖中のシアル酸の重要性が確認された。

【0 1 5 5】

以上の結果から、髄液中のトランスフェリンについて、特定の数のシアル酸の糖鎖したトランスフェリンを指標として用いることで、アルツハイマー病の鑑別診断が可能であることが明らかとなった。

【0 1 5 6】

実施例 8 血液中のトランスフェリン量の定量

実施例 1-7 で対象とした臨床例のうち、アルツハイマー病 27 例、非認知症 17 例について、常法により対象より血液を採取して調製した血液試料について、以下の分析を行った。

最初に、実施例 4 と同様の手法で、血液中のトランスフェリンの測定を行った。結果のグラフは図 6 に示した。

[0157]

アルツハイマー病群と認知症の無い比較群（非認知症）を比較すると、アルツハイマー病群での血液中のトランスフェリンの量は有意に低下していた ($p < 0.05$)。アルツハイマー病においては、血液中のトランスフェリンの量が有意に減少していることが明らかとなった。

[0158]

実施例 9 血液中の WGA 糖タンパク質 (約 75 kDa 糖タンパク質：トランスフェリン) の量の比較

[0159]

実施例 1 と同様の手法で、トランスフェリンに相当する約 75 kDa 糖タンパク質のレクチンブロット解析を行い、実施例 2 と同様の手法で、レクチンブロットの結果を定量化した。結果のグラフを図 7 に示した。

実施例 2 における髄液を用いた実験の結果と異なり、血液中では、非認知症群に比べ、アルツハイマー病群において、WGA 結合性のトランスフェリンの有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。

[0160]

さらに、血液中のトランスフェリン量、血液中の WGA 結合性のトランスフェリン量の双方共に有意な変動がみられたため、それらの量比で規格化した数値を算出し、結果のグラフを図 8 に示した。血液中のトランスフェリン量と血液中の WGA 結合性トランスフェリン量の双方を総合した指標 (量比) では、アルツハイマー病と非認知症群の間で、より大きな有意差が観察された。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/067428
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/561(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, G01N33/561, G01N37/00(2006.01)i Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CPlus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2) ALZHEIMER?,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Katsuya URAGAMI, "Alzheimer-byo Shindan Marker to Shite no WGA Ketsugo Totanpaku no Dotei to Kensa Hoho no Kakurutsu", Kosei Rodo Kagaku Kenkyuhi Hojokin Choju Kagaku Sogo Kenkyu Jigyō Chiho no Screening Oyobi Soki Shindanho no Kakurutsu ni Kansuru Rinsho Kenkyu Heisei 16 to 17 Nendo Sogo Kenkyu Hokokusho, 2006.03, pages 20 to 28	1-17, 19, 20 18, 21
A	SUSAN J. VAN RENSBURG, et al., 5- and 6-glycosylation of transferrin in patients with Alzheimer's disease., Metabolic Brain Disease, 2004, Vol.19, No.1/2, p.89-96	1-21
<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 22 October, 2007 (22.10.07)		Date of mailing of the international search report 30 October, 2007 (30.10.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067428

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAN-LING YU, et al., Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma., <i>Proteomics</i> , 2003, Vol.3, No.11, p.2240-2248	1-21
A	S.J.VAN RENSBURG, et al., Glycosylation of transferrin in Alzheimer's disease and alcohol-induced dementia., <i>Metabolic Brain Disease</i> , 2000, Vol.15, No.4, p.243-247	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067428

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

TRANSFERRIN, GLYCOSYLAT?, SUGAR (W) CHAIN, CARBOHIDRATE (W) CHAIN

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 7 4 2 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/561(2006.01)i, G01N37/00(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. G01N33/53, G01N33/561, G01N37/00(2006.01)i											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007年										
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) BIOSIS (STN), CAplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2) ALZHEIMER?, TRANSFERRIN, GLYCOSYLAT?, SUGAR (W)CHAIN, CARBOHYDRATE (W)CHAIN											
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	浦上克哉, アルツハイマー病診断マーカーとしてのWGA結合糖タンパクの同定と検査方法の確立, 厚生労働科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業 痴呆のスクリーニング及び早期診断法の確立に関する臨床研究 平成16~17年度総合研究報告書, 2006.03, P.20-28	1-17, 19, 20									
A	SUSAN J. VAN RENSBURG, et al., 5- and 6-glycosylation of transferrin in patients with Alzheimer's disease., Metabolic Brain Disease, 2004, Vol.19, No.1/2, p.89-96	18, 21									
A		1-21									
<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 22.10.2007		国際調査報告の発送日 30.10.2007									
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) 吉田 佳代子	2 J 9 5 1 6								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/067428
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
A	HAN-LING YU, et al., Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma., Proteomics, 2003, Vol.3, No.11, p.2240-2248	1-21
A	S.J.VAN RENSBURG, et al., Glycosylation of transferrin in Alzheimer's disease and alcohol-induced dementia., Metabolic Brain Disease, 2000, Vol.15, No.4, p.243-247	1-21

フロントページの続き

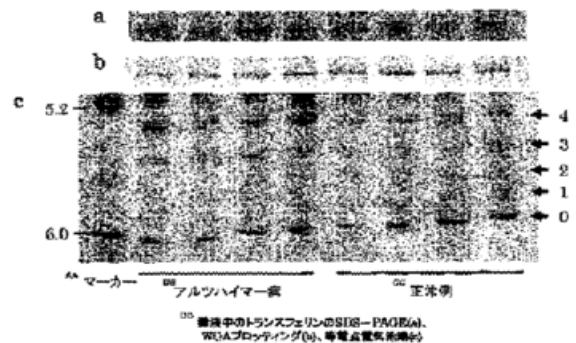
(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, 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, DO, 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, ME, 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（W I P O）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)	用于阿尔茨海默病的诊断试剂盒，诊断标记物和用于检测疾病状况指数的方法		
公开(公告)号	JPWO2008029886A1	公开(公告)日	2010-01-21
申请号	JP2008533201	申请日	2007-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人鸟取大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人鸟取大学		
[标]发明人	浦上克哉 木村美也子		
发明人	浦上 克哉 木村 美也子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N27/447		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.V G01N37/00.102 G01N27/26.301.A G01N27/26.315.J		
优先权	2006242044 2006-09-06 JP		
其他公开文献	JP5207469B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

尽管区别于其他类型痴呆的阿尔茨海默氏病的鉴别诊断和早期神经元凋亡尚未进行的阿尔茨海默氏病的诊断对阿尔茨海默氏病的治疗很重要，但很难在早期就对阿尔茨海默氏病进行鉴别诊断 阶段主要是通过医生的质疑或使用磷酸化tau或淀粉样蛋白β-蛋白作为指示剂的诊断技术进行的诊断。因此，期望开发新的诊断技术。因此，根据本发明，通过着眼于其上连接有糖链的转铁蛋白，提供了诊断试剂盒，诊断标记物和用于在早期阶段区别诊断阿尔茨海默氏病的疾病状况的检测装置。



AA: MARKER
 BB: ALZHEIMER'S DISEASE
 CC: NORMAL
 (D) SDS-PAGE (a), WGA GELTING (b), AND ISOELECTRIC FOCUSING (c) OF TRANSFERRIN IN SPINAL FLUID