

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5892169号
(P5892169)

(45) 発行日 平成28年3月23日(2016.3.23)

(24) 登録日 平成28年3月4日(2016.3.4)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	V
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 2
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88	N

請求項の数 24 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2013-528019 (P2013-528019)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月6日(2012.8.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/069957
 (87) 国際公開番号 W02013/021962
 (87) 国際公開日 平成25年2月14日(2013.2.14)
 審査請求日 平成27年2月13日(2015.2.13)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-173946 (P2011-173946)
 (32) 優先日 平成23年8月9日(2011.8.9)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 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
 (73) 特許権者 509240343
 株式会社ハイパーブレイン
 鳥取県米子市西町86 鳥取大学医学部ア
 レスコ棟6F
 (74) 代理人 110001139
 S K 特許業務法人
 (74) 代理人 100130328
 弁理士 奥野 彰彦
 (74) 代理人 100130672
 弁理士 伊藤 寛之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 補体C3タンパク質の糖鎖測定によるアルツハイマー型認知症の診断キット、診断マーカー及び検出方法

(57) 【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、
 被験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を定量的に検出するための糖鎖検出手段を有する診断キット。

【請求項2】

健常な哺乳動物における前記糖鎖の量に対する、前記健常な哺乳動物と同一種の前記被験体の前記糖鎖の量を、アルツハイマー病の病態指標として示す、請求項1記載の診断キット。

【請求項3】

前記糖鎖の量が、糖鎖中のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量を総合して得られる値である、請求項1又は2記載の診断キット。

【請求項4】

前記総合して得られる値が、乗算により得られる値である、請求項3記載の診断キット。

【請求項5】

既知のアルツハイマー病診断マーカーの量を定量的に検出する既知マーカー検出手段を更に有する、請求項1から4のいずれかに記載の診断キット。

【請求項6】

哺乳動物である被験体における前記糖鎖の量と前記既知マーカーの量との量比を、アル

ツハイマー病の病態指標として示す、請求項 5 記載の診断キット。

【請求項 7】

前記既知マーカーがアミロイド β タンパク質である、請求項 5 又は 6 記載の診断キット。

【請求項 8】

哺乳動物である被験体における前記糖鎖のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量との量比を、アルツハイマー病の病態指標として示す、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 9】

前記体液が髄液又は血液である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の診断キット。

10

【請求項 10】

前記被験体が、認知症重症度評価による診断結果が極軽度又は軽度の被験体である、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 11】

前記認知症重症度評価が臨床的認知症尺度である、請求項 10 記載の診断キット。

【請求項 12】

前記糖鎖がWGA及びConA結合性の糖鎖である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 13】

前記糖鎖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 から 12 のいずれかに記載の診断キット。

20

【請求項 14】

前記糖鎖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 から 12 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 15】

前記糖鎖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 から 12 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 16】

前記糖鎖検出手段が薄層クロマトグラフィー用のレクチン又は糖鎖の認識抗体を含む、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の診断キット。

30

【請求項 17】

前記糖鎖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 から 12 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 18】

前記レクチンがWGA及び/又はConAである、請求項 13 から 17 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 19】

前記糖鎖検出手段が補体C3タンパク質から切断された糖鎖を検出する液体クロマトグラフィーを含む、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の診断キット。

【請求項 20】

40

アルツハイマー病の病態指標の検出方法であって、

被験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を定量的に検出する工程と、

健常な哺乳動物における前記糖鎖の量に対して、前記哺乳動物と同一種の前記被験体の前記糖鎖の量が有意に変化しているか否かを判定する工程を含む、検出方法。

【請求項 21】

既知のアルツハイマー病診断マーカー物質の量を定量的に検出する工程を更に含む、請求項 20 に記載の検出方法。

【請求項 22】

前記糖鎖の量と前記既知マーカーの量との量比を算出する工程を更に含む、請求項 21

50

記載の方法。

【請求項 2 3】

前記糖鎖の量を定量的に検出する工程が、マンノース量とN-アセチルグルコサミン量を定量的に検出する工程である、請求項 2 0 から 2 2 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 2 4】

前記マンノース量と前記N-アセチルグルコサミン量との量比を算出する工程を更に含む、請求項 2 3 記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、補体C3タンパク質の糖鎖測定によるアルツハイマー型認知症の早期検出に関する。

【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。前者は血压管理や再発予防等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、進行性核上性麻痺等)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。

【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等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(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2回の切断を経て産生される。

【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等が知られているが、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、脳機能画像検査等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、人名の忘却等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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 0 6 】

現在アルツハイマー病の診断は神経心理学検査、画像診断、神経生理学的検査、生物学的検査等により総合的に行っている。神経心理学検査として、mini-mental state examination(MMSE)、改訂版長谷川式簡易認知機能評価スケール(HDS-R)、Alzheimer's disease assessment scale(ADAS-cog)等がある。画像診断として、computed tomography(CT)、magnetic resonance imaging(MRI)、single photon emission computed tomography(SPECT)、positron emission tomography(PET)等がある。アルツハイマー病においてSPECTやPETで早期から後部帯状回の脳血流低下、酸素代謝及び糖代謝の低下を確認することができ、進行とともに側頭葉、頭頂葉の脳血流、糖代謝が低下していく。

10

【 0 0 0 7 】

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、簡便且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。

【 0 0 0 8 】

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、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等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。

20

【 0 0 0 9 】

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、髄液中の補体C3タンパク質の量的変化について記載されている。

30

【 0 0 1 0 】

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、リン酸化タウタンパクとアミロイドβ42の2つのみが認められている。

【 0 0 1 1 】

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。

40

【 0 0 1 2 】

診断マーカーとして用いられるアミロイドβタンパク質は主にAβ42で、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Aβ42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。

【 0 0 1 3 】

【非特許文献1】Lisa R. Fodero, Javier Saez-Valero, Maria-Sagrario Barquero, Alb

50

erto 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

【非特許文献2】William TH et al., Biomarker discovery for Alzheimer's disease, frontotemporal lobar degeneration, and Parkinson's disease. Acta Neuropathol., 2010

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

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うリン酸化タウタンパクの増加による認知症は、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。

【0015】

また、診断マーカーとして用いられるアミロイドβタンパク質は、アルツハイマー病後期の重篤化には相関するものの、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。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点が課題となっていた。

【0016】

また、アルツハイマー病患者の髄液(CSF)中に含まれる糖タンパク質に修飾されているシアル酸が減少することを見出され(非特許文献1)、アルツハイマー病診断のための新しいマーカーとして期待されているが、タンパク質が同定されていない点や繰返しの凍結融解の際にシアル酸が不安定になる点が問題点として挙げられている。また、アルツハイマー病患者のCSF中における補体C3タンパク質の量が変化することが見出され(非特許文献2)、アルツハイマー病診断のための新しいマーカーとして期待されているが、CSF中における補体C3タンパク質の量的変化は、アルツハイマー病に特異的ではなく、様々な病気においても見出される変化であることから、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。

【0017】

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出されていない。

【0018】

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】

【0019】

本発明は、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、被験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を定量的に検出するための糖鎖検出手段を有する診断キットが提供される。体液中の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量が、アルツハイマー病を患う患者においては、変化していることが後述する実施例において実証されている。従って、この診断キットを用いることで、アルツハイマー病の早期診断や、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となる。

【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マーカーであって、被

10

20

30

40

50

験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を含む、診断マーカーが提供される。体液中の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量が、アルツハイマー病を患う患者においては、変化していることが後述する実施例において実証されている。従って、この診断マーカーは、アルツハイマー病の早期診断や、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マーカーとしての役割を果たすことが可能である。

【0021】

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、被験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を定量的に検出する工程を含む検出方法が提供される。体液中の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量が、アルツハイマー病を患う患者においては、変化していることが後述する実施例において実証されている。従って、この検出方法を用いることで、アルツハイマー病の早期検出や、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症とを区別して検出することが可能となる。

【0022】

なお、上記の診断キット、診断マーカー及び検出方法は、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】

【0023】

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。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、CSF中及び血液中におけるコントロール群及びアルツハイマー病患者(AD)群の補体C3タンパク質の濃度を測定した結果を示す図である。

【図2】図2は、CSF中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量を測定した結果を示す図である。

【図3】図3は、血液中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量を測定した結果を示す図である。

【図4】図4は、CSF中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質の糖鎖のWGA結合量とConA結合量を測定し、それぞれを乗算した結果を示す図である。

【図5】図5は、血液中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質の糖鎖のWGA結合量とConA結合量を測定し、それぞれを乗算した結果を示す図である。

【図6】図6は、臨床的認知症尺度(CDR)別に解析した、CSF中及び血液中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質の糖鎖のWGA結合量の結果を示す図である。

【図7】図7は、CDR別に解析した、CSF中及び血液中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質の糖鎖のConA結合量の結果を示す図である。

【図8】図8は、CDR別に解析した、CSF中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質の糖鎖のWGA結合量とConA結合量を測定し、それぞれを乗算した結果を示す図である。

【図9】図9は、CDR別に解析した、血液中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質の糖鎖のWGA結合量とConA結合量を測定し、それぞれを乗算した結果を示す図である。

【図10】図10は、CSF中におけるAD患者群のアミロイドβタンパク質42の量と補体C3タンパク質のWGA結合量又はConA結合量の相関図である。

【図11】図11は、AD患者群のCSF中におけるアミロイドβタンパク質42の量と血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量の相関図である。

【図12】図12は、CSF中におけるコントロール群及びAD患者群の補体C3タンパク質のWGA結合量とConA結合量との相関図である。

【図13】図13は、AD患者における、CSF中の補体C3タンパク質のWGA結合量と血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量との相関図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、体液中の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量を定量的に検出することでアルツハイマー病の確実な診断が可能になることを見出した。また、既知のアルツハイマー病診断マーカーと組み合わせることで、複合的なアルツハイマー病の診断が可能になることを見出した。更に、上記糖鎖中のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量を定量的に検出し、その量比から、簡易且つ迅速なアルツハイマー病の診断が可能になることを見出した。

【0026】

以下、本発明の実施形態について、詳細に説明する。なお、同様な内容については繰返し
10

【0027】

<診断キット>

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、被
験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を定量的に検出
するための糖鎖検出手段を有する診断キットであり、この診断キットによるとアルツハイ
マー病の早期診断や、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
可能となる。

【0028】

本実施形態における「補体C3タンパク質」とは、体液中に含まれる免疫反応を媒介する
一群のタンパク質の一つの成分である。補体C3タンパク質は、116 kDaの α 鎖と70 kDaの
20 β 鎖との二量体から構成されている糖タンパク質である。 α 鎖は、268番目のアスパラギン
に $\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$ のN-結合型糖鎖が修飾され、 β 鎖は、63番目のアスパラギンに $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$
のN-結合型糖鎖が修飾されている(Crispin MD et al., (2004) Monoglucosylated
glycans in the secreted human complement component C3: implications for protein
biosynthesis and structure. FEBS Lett 566, 270-274 及び Hase S et al., (1985) St
ructures of sugar chains of the third component of human complement. J Biochem 9
8, 863-874.)。補体C3タンパク質は、通常、不活性の前駆体型であるが、病原体の排除を
補助する際に、C3a(分子量9,000)とC3b(分子量185,000)とに分解され、活性型となる。補
体C3タンパク質は、様々な病気の原因となっていることが示唆されており、血中の補体C3
タンパク質を測定する検査は既に実用化されている。しかし、アルツハイマー病と補体C3
30 タンパク質との関連性は、その量と活性の観点から様々な研究が行われてきたが、補体C3
タンパク質とそれ由来の糖鎖との関連性については、これまで明らかにされていなかった
。

【0029】

後述する実施例において実証されている通り、体液中の補体C3タンパク質を由来とする
糖鎖の量が、アルツハイマー病を患う患者においては、その量が変化している。従って、
例えば、上記糖鎖の量を定量的に検出し、変化が確認された場合、アルツハイマー病の可
能性が高いと診断される。しかし、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
40 ある。

【0030】

本実施形態における「アルツハイマー病」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等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($A\beta$)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 $A\beta$ 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、 $A\beta$ 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
50

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2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。

【0031】

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、ウサギ等を含む。哺乳動物は、好ましくはヒトである。

【0032】

本実施形態における「定量的に検出」とは、例えば濃度、強度、泳動度、移動度等の数値データに基づく検出を意味する。また別の実施形態において、「定量的に検出」とは、例えば濃度の調節、検出感度の調節、閾値の設定等による数値データの有無に基づく検出を意味する。

【0033】

本実施形態において、「糖鎖検出手段」は、複数の糖鎖検出手段であってもよい。複数の糖鎖検出手段は、例えば多面的な解析のために互いに異なる糖鎖検出手段、例えば統計学的に信頼性のあるデータを得る目的で同一又は類似の糖鎖検出手段、又はそれらの組み合わせであってもよい。

【0034】

また、本発明の更なる実施形態は、健常な哺乳動物における上記糖鎖の量に対する、上記哺乳動物と同一種の上記被験体の上記糖鎖の量を、アルツハイマー病の病態指標として示す、上述の診断キットである。健常な哺乳動物における上記糖鎖の量をコントロールとして採用することで、確実にアルツハイマー病を診断することが可能となる。

【0035】

例えば、被験体における上記補体C3タンパク質の糖鎖の量が、上記被験体と同一種の健常な哺乳動物における上記糖鎖の量よりも、有意に減少していることが観察される場合、アルツハイマー病の可能性が高いと診断される。しかし、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。

【0036】

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等を含めたアルツハイマー病の状態に関する指標のことをいう。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、予後の予測等の指標を含む。また、アルツハイマー病の病態指標は、複数組み合わせることも可能である。これにより、より確実な診断結果を得ることができる。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。

【0037】

本実施形態における「有意」とは、p値(U検定、両側検定)が好ましくは<0.05、より好ましくは<0.01、最も好ましくは<0.001を意味する。

【0038】

本実施形態における「健常な哺乳動物における上記糖鎖の量」は、予め測定しておいたデータに基いてもよい。健常な哺乳動物に対して実施する測定方法及び条件は、特に限定しないが、被験体に対して実施する測定方法及び条件が同一であることが好ましい。また得られる診断結果に影響がない範囲であれば、健常な哺乳動物に対して実施する測定方法及び条件が被験体に対して実施する測定方法及び条件と異なることも本実施形態の範囲内

10

20

30

40

50

である。

【 0 0 3 9 】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖の量が、糖鎖中のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量を総合して得られる値である、上述の診断キットである。上記糖鎖中のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量を総合して得られる値をアルツハイマー病の病態指標とすることで、コントロールである健常な哺乳動物と被験体との差が明確となり、確実なアルツハイマー病を診断することが可能となる。上記総合して得られる値は、通常用いられる統計処理を行うことで得られる値であり、且つコントロールである健常体との差が明確となるような上記統計処理であることが好ましいが、特定の統計処理に限定はしない。

10

【 0 0 4 0 】

また、本発明の更なる実施形態は、上記総合して得られる値が、乗算により得られる値である上述の診断キットである。上記乗算により得られる値をアルツハイマー病の病態指標とすることで、容易な統計処理によりコントロールである健常体との差が明確となり、確実なアルツハイマー病を診断することが可能となる。

【 0 0 4 1 】

また、本発明の更なる実施形態は、既知のアルツハイマー病診断マーカーの量を定量的に検出する既知マーカー検出手段を更に有する上述の診断キットである。上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量とを組み合わせることで、確実なアルツハイマー病を診断することが可能となる。

20

【 0 0 4 2 】

上記既知マーカーとしては、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、バゾプレッシン等を例示することができる。また、上記既知マーカーの量は、活性量であってもよい。例えば、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等を例示することができる。しかし、上記糖鎖の量と組み合わせることでアルツハイマー病を診断することが可能であれば、いずれを採用してもよい。また、上記既知マーカーは、アルツハイマー病特異的なマーカーに限定はしない。上記糖鎖の量と組み合わせることで、確実なアルツハイマー病の診断が可能だからである。

30

【 0 0 4 3 】

また、上記既知マーカーは、複数の既知マーカーを採用することも可能であり、各既知マーカーに合わせた既知マーカー検出手段を複数用意することも可能である。検出手段としては、例えば、既知マーカー特異的な抗体を用いた酵素免疫測定法、ウェスタンブロット法、抗体アレイ等をあげることができ、また、複数組み合わせての使用も可能である。

【 0 0 4 4 】

また、本発明の更なる実施形態は、哺乳動物である被験体における上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量との量比を、アルツハイマー病の病態指標として示す、上述の診断キットである。上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量との量比をアルツハイマー病の病態指標とすることで、複合的にアルツハイマー病を診断することが可能になる。

40

【 0 0 4 5 】

例えば、この診断キットにおいては、被験体における上記糖鎖の量と、上記既知マーカーの量との間に正の相関がある場合、複合的な検出に基づいた結果としてアルツハイマー病の可能性が高いと診断される。しかし、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。

【 0 0 4 6 】

また、本発明の更なる実施形態は、上記既知マーカーがアミロイドβタンパク質である

50

、上述の診断キットである。アミロイドβタンパク質は、アルツハイマー病の診断マーカーとして、临床上の有用性が確認されている。従って、アミロイドβタンパク質の量と補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量との量比をアルツハイマー病の病態指標とすることで、高い信頼性及び精度でアルツハイマー病を診断することが可能となる。

【0047】

また、本発明の更なる実施形態は、哺乳動物である被験体における上記糖鎖のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量との量比を、アルツハイマー病の病態指標として示す、上述の診断キットである。上記マンノース量とN-アセチルグルコサミン量との量比をアルツハイマー病の病態指標とすることで、簡便且つ迅速にアルツハイマー病を診断することが可能になる。

10

【0048】

例えば、この診断キットにおいては、上記補体C3タンパク質の糖鎖のN-アセチルグルコサミン量に対するその糖鎖のマンノース量の比の減少が、被験体と同一種の哺乳動物から得られるその比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。しかし、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。また、上記N-アセチルグルコサミン量とマンノース量の検出は、いずれを先に実行してもよい。更には、ハイスループット法により、連続して検出することも可能である。

【0049】

20

また、本発明の更なる実施形態は、体液として髄液又は血液を用いた、上述の診断キットである。髄液又は血液の採取は、採取方法が確立していることから、患者に対して危険度の低い診断を行うことが可能となる。また、髄液は脳に近いため、より脳の症状と相関関係の高い診断結果を得ることも可能となる。また、血液は、より迅速且つ簡便に患者から採取することが可能な体液であることから、患者に対して非常に利便性の高い診断を行うことが可能となる。

【0050】

ここで髄液は、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、脊椎穿刺等の通常行われる髄液採取法を用いることができる。

30

【0051】

ここで、血液に関しては、適切な遠心分離操作を行い、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用いることも可能である。本実施形態においては、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る。

【0052】

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、補体C3タンパク質の糖鎖の量も総合した診断指標を用いることもできる。

40

【0053】

ここで、試料については、得られた髄液、血液、血清等の試料に対し、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、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、酵素処理や化学処理による糖鎖の分離、他の酵素処理、各種化学修飾等が挙げられるが、これに限られない。

【0054】

また、本発明の更なる実施形態は、上記被験体が、認知症重症度評価による診断結果が極軽度又は軽度の被験体である、上述の診断キットである。認知症重症度評価に基づくア

50

ルツハイマー病の診断結果を組み合わせることで、確実なアルツハイマー病を診断することが可能となる。また、アルツハイマー病の発病前診断や初期での診断に有利であり、効果的な予防や治療を可能にする。更には、認知症重症度評価の診断結果が極軽度であっても組み合わせることができるため、アルツハイマー病の早期診断が可能となる。認知症重症度テストとしては、例えば、臨床的認知症尺度(CDR)、高齢者うつスケール(GDS)、改訂長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R)、ミニメンタルステート(MMSE)検査、ウェックスラー成人知能検査(WAIS - R)、アルツハイマー病評価スケール(ADAS)等をあげることができる。

【 0 0 5 5 】

本実施形態に係る診断キットには、更に認知症重症度評価手段を有してもよい。上記評価手段を有することで、上記糖鎖の量の検出と上記評価を並行して又は連続して実施することが可能となる。

10

【 0 0 5 6 】

また、上記補体C3タンパク質の糖鎖の量の検出と認知症重症度評価による診断は、いずれを先に実行してもよい。好ましくは、被験体に対する負担が少ない認知症重症度評価を先に実行することである。認知症重症度の診断結果の段階で、アルツハイマー病の可能性が低いと診断された場合、被験体に対する体液採取の負担を回避できるためである。

【 0 0 5 7 】

また、本発明の更なる実施形態は、上記認知症重症度評価が臨床的認知症尺度(CDR)である、上述の診断キットである。CDRは、国際的にも広く用いられている認知症の評価法であり、家族情報に重点を置いている。評価は、0を正常、0.5を極軽度、1を軽度、2を中度、3を重度とする5段階評価である。CDRによる診断結果を組み合わせることで、確実なアルツハイマー病を診断することが可能となる。本発明に係る診断キットは、CDR 0.5(極軽度)又はCDR 1(軽度)であっても、アルツハイマー病の早期診断を可能とする。

20

【 0 0 5 8 】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖がWGA及びConA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。補体C3タンパク質を由来とするWGA及びConA結合性の糖鎖は、アルツハイマー病の患者において、より確実な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

【 0 0 5 9 】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖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、補体C3タンパク質を由来とする糖鎖を検出する、上述の診断キットである。この診断キットは、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、簡便かつ確実で安価に、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。

【 0 0 6 0 】

ここで、本願発明の実施形態において用いられるレクチンとしては、WGA結合性であってConA結合性の糖鎖を認識するレクチンであれば、特に限定しない。例えば、マンノースを認識するレクチンとしては、*Canavalia ensiformis* agglutinin(ConA)、*Lens culinaris* agglutinin(LCA)、*Pisum sativum* agglutinin(PSA)、*Bowringia milbraedii* agglutinin(BMA)、*Dolichos lablab* agglutinin(DLA)、*Galanthus nivalis* agglutinin(GNA)、*Gerardia savaglia* lectin(GSL)、*Machaerium biovulatum* agglutinin(MBA)、*Macharium lunatus* agglutinin(MLA)、*Narcissus pseudonarcissus* agglutinin(NPA)、*Epipactis helleborine* agglutinin(EHA)、*Listera ovata* agglutinin(LOA)、*Lablab niger* agglutinin(LNA)、*Narcissus lobularis* agglutinin(NLA)、*Vigna racemosa* agglutinin(VRA)及び*Pterocarpus rhorii* agglutinin(PRA)等を例示することができる。糖鎖に対する上記レクチンの結合量から、マンノース量を測定することも可能であり、好ましくはマンノースに対す

40

50

る結合親和性が高いConAの結合量からマンノース量を測定する方法である。また、N-アセチルグルコサミンを認識するレクチンとしては、Wheat germ agglutinin(WGA)、Datura stramonium agglutinin(DSA)、Oryza sativa agglutinin(OSA)、Phytolacca americana agglutinin(PWM)、Urtica dioica agglutinin(UDA)、Solanum tuberosum lectin(STL)、Lycopersicon esculentum agglutinin(LEA)、Datura stramonium agglutinin(DSA)、Pokeweed mitogen(PWM)及びそのアイソフォーム(PL-D1及びPL-D2)及びYm1等を例示することができる。糖鎖に対する上記レクチンの結合量から、N-アセチルグルコサミン量を測定することも可能であり、好ましくはN-アセチルグルコサミンに対する結合親和性を有し、入手が容易なWGAの結合量からN-アセチルグルコサミン量を測定する方法である。

【0061】

10

用いるレクチンは、精製された天然のレクチンに限定されるものではなく、例えば、大腸菌等の宿主内で発現し、精製したレクチンであってもよい。また、糖認識部位以外の配列(塩基配列又はアミノ酸配列)を、標準的な分子生物学的手法を用いて改変(例えば、変異、削除、挿入、付加)させてもよく、更には、糖認識部位であっても、その機能を最低限保持する、向上させる、又は新たな機能を付与する改変を与えてもよい。

【0062】

本願発明の実施形態において、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。

20

【0063】

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、抗体のFab'フラグメント又はレクチン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。

30

【0064】

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又はO-フェニレンジアミンと組み合わせさせて褐色又は黄色を生じる。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'-アシド-ジ-(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)等を用いることができる。

40

【0065】

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)等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。

【0066】

標識として呈色標識物質を使用する場合には、例えば、コロイド金属及び着色ラテックス等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等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

50

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、赤色及び青色等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等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、又は、それ自体公知の方法で製造することも可能である。

【0067】

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。

10

【0068】

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。

【0069】

糖鎖の認識抗体としては、例えば、糖タンパク質であるHIV-1 env gp120上の末端 $\alpha 1$, 2マンノースを認識する2G12抗体を用いてもよい。また、適当な化合物を付加した糖鎖に対する抗体を使用してもよい。例えば、2-アミノピリジンで標識したアセチルグルコサミンに対する抗体(生化学 Vol.75 No.8 (2003)を参照)を用いることも可能である。更には、糖鎖の認識抗体を作製して用いることも可能である。例えば、以下の方法によっても作製できる。

20

【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補体C3タンパク質又は部分ペプチド、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及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。

30

【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、RAS [MPL (Monophosphoryl Lipid A) + TDM (Synthetic Trehalose Dicorynomycolate) + 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。

40

【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、ウシ等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

50

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】

10

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。アフィニティ担体としては、例えば、抗原ペプチドをAffigel等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、硫酸アンモニウム又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補体C3タンパク質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。

20

【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。

30

【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日後に脾臓又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。

40

【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等が挙げられるが、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等が挙げられるが、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

50

胞融合を実施できる。

【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))等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。

10

【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(マイクロプレート等)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等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、放射性物質や酵素等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等が用いられる。

20

【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、通常の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等)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等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等〕に従って行なうことができる。

30

【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、通常の抗体作成法にならい、目的の糖鎖認識抗体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、上記糖鎖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、補体C3タンパク質を由来とする糖鎖を検出する、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度が低いため、糖鎖の少ない(レクチン結合力の弱い)補体C3タンパク質と、糖鎖が多く親和性の高い補体C3タンパク質を明確に分離することが可能となる。

40

【0085】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖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補体C3タンパク質を由来とする糖鎖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で、糖鎖の状態によって補体C3タンパク質を由来とする糖鎖を識別することが可能となる。

50

【0086】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖検出手段としてレクチン又は糖鎖の認識抗体を用いた薄層クロマトグラフィーを行うことにより補体C3タンパク質を由来とする糖鎖を検出する、上述の診断キットである。短時間で目的のサンプルを展開することが可能である薄層クロマトグラフィーを用いることで、補体C3タンパク質を他の夾雑タンパク質から分離することが可能となり、簡便且つ迅速にレクチン又は糖鎖の認識抗体による糖鎖の検出が可能となる。また、補体C3タンパク質に対する抗体や、その抗体が結合した担体を用いて、補体C3タンパク質の移動度を変更することは本実施形態に含まれる。

【0087】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖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補体C3タンパク質を由来とする糖鎖を検出する、上述の診断キットである。レクチンアレイ又は抗体アレイを用いることで、他のタンパク質等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。

【0088】

また、本発明の更なる実施形態は、上記レクチンとしてWGA及び/又はConAを用いて補体C3タンパク質を由来とする糖鎖を検出する、上述の診断キットである。レクチンとしてWGA及び/又はConAを用いることで、確実な補体C3タンパク質の糖鎖の状態の検出が可能となる。

【0089】

また、本発明の更なる実施形態は、検出手段として液体クロマトグラフィーを行うことにより、補体C3タンパク質から切断された糖鎖を検出する診断キットである。切断された糖鎖を、例えば2-アミノピリジン等で蛍光標識することで、蛍光検出器によりピコモルの糖鎖量であっても検出が可能となる。従って、少量の体液であっても補体C3タンパク質の糖鎖の状態を検出することが可能となる。また、補体C3タンパク質を精製した上でその糖鎖を切断することも本実施形態に含まれる。補体C3タンパク質から糖鎖を切断する方法は、特に限定されないが、好ましくは、タンパク質は分解されるが糖鎖は分解されない、無水ヒドラジンを用いたヒドラジン分解法である。

【0090】

<診断マーカー>

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マーカーであって、被験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を含む、診断マーカーであり、この診断マーカーは、アルツハイマー病の早期診断や、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マーカーとしての役割を果たすことが可能である。

【0091】

後述する実施例において実証されている通り、体液中の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量が、アルツハイマー病を患う患者においては、変化している。従って、例えば、上記補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量を診断マーカーとして利用することで、その糖鎖の量的変化からアルツハイマー病の可能性が高いことを示すマーカーとしての役割を果たすことが可能であり、この糖鎖の量的変化を基にアルツハイマー病の診断が可能となる。しかし、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の診断することは容易に可能である。

【0092】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖の量が、健常な哺乳動物における上記糖鎖の量に対する、上記哺乳類と同一種の上記被験体の上記糖鎖の量である、上述の診断マ

10

20

30

40

50

カーである。健常な哺乳動物における上記糖鎖の量をコントロールとして採用することで、確実なアルツハイマー病診断に用いることが可能な診断マーカーとなる。

【0093】

また、本発明の更なる実施形態は、既知のアルツハイマー病診断マーカーの量を更に含む、上述の診断マーカーである。上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量と組み合わせることで、より確実なアルツハイマー病診断に用いることが可能な診断マーカーとなる。

【0094】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量との量比を含む、上述の診断マーカーである。上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量との量比をアルツハイマー病の病態指標とすることで、多面的で精度の高いアルツハイマー病診断に用いることが可能な診断マーカーとなる。

10

【0095】

例えば、この診断マーカーによれば、被験体における上記糖鎖の量と上記マーカーの量との間に正の相関がある場合、アルツハイマー病の可能性が高いことを示すマーカーとしての役割を果たすことが可能であり、この相関関係を基にアルツハイマー病の確実な診断が可能となる。しかし、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の診断することは容易に可能である。

【0096】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖の量が、その糖鎖のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量との量比である、上述の診断マーカーである。上記マンノース量とN-アセチルグルコサミン量との量比をアルツハイマー病の病態指標とすることで、簡便且つ迅速なアルツハイマー病診断に用いることが可能な診断マーカーとなる。

20

【0097】

例えば、この診断マーカーによれば、上記糖鎖のN-アセチルグルコサミン量に対するその糖鎖のマンノース量の比の減少が、被験体と同一種の哺乳類から得られるその比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ことを示すマーカーとしての役割を果たすことが可能であり、この比の減少を基にアルツハイマー病の確実な診断が可能となる。しかし、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の診断することは容易に可能である。

30

【0098】

< 検出方法 >

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、被験体である哺乳動物の体液試料中の補体C3タンパク質に由来する糖鎖の量を定量的に検出する工程を含む検出方法であり、アルツハイマー病の早期検出や、アルツハイマー病と類似の症候を呈する他の認知症とを区別して検出することが可能となる。

【0099】

後述する実施例において実証されている通り、体液中の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量が、アルツハイマー病を患う患者においては、変化している。従って、例えば、上記糖鎖の量を定量的に検出することで、その量の変化を検出することが可能となる。その結果に基づいてアルツハイマー病の可能性が高いと判断される材料が得られる。しかし、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、本実施形態に係る検出方法を用いてそれらの判断とすることは容易に可能である。

40

【0100】

また、本発明の更なる実施形態は、健常な哺乳動物における上記糖鎖の量に対して、上記哺乳動物と同一種の上記被験体の上記糖鎖の量が有意に減少しているか否かを判定する工程を更に含む、上述の検出方法である。例えば、コントロールとして採用した健常な哺乳動物における上記糖鎖の量に対して、上記被験体の糖鎖の量が有意に減少している場合

50

は、アルツハイマー病の可能性が高いと判断される材料となる。従って、この検出方法を用いることで、確実にアルツハイマー病を診断することが可能となる。

【0101】

また、本発明の更なる実施形態は、既知のアルツハイマー病診断マーカー物質の量を定量的に検出する工程を更に含む、上述の検出方法である。上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量と組み合わせることで、より確実にアルツハイマー病の可能性が高いと判断される材料を得ることが可能となる。

【0102】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量との量比を算出する工程を更に含む、上述の検出方法である。上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量との量比をアルツハイマー病の病態指標とすることで、複合的な結果としてアルツハイマー病の可能性が高いと判断される材料を得ることが可能となる。

10

【0103】

例えば、この検出方法によれば、被験体における上記糖鎖の量と上記既知マーカーの量との間に正の相関がある場合、複合的な検出結果としてアルツハイマー病の可能性が高いと判断される材料となる。しかし、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、本実施形態に係る検出方法を用いてそれらの判断とすることは容易に可能である。

【0104】

また、本発明の更なる実施形態は、上記糖鎖の量を定量的に検出する工程が、マンノース量とN-アセチルグルコサミン量を定量的に検出する工程である、上述の検出方法である。上記マンノース量とN-アセチルグルコサミン量をそれぞれ検出することで、より詳細で確実なアルツハイマー病を検出することが可能となる。

20

【0105】

また、本発明の更なる実施形態は、上記マンノース量と上記N-アセチルグルコサミン量との量比を算出する工程を更に含む、上述の検出方法である。上記マンノース量とN-アセチルグルコサミン量との量比をアルツハイマー病の病態指標とすることで、簡便且つ迅速にアルツハイマー病の可能性が高いと判断される材料を得ることが可能となる。

【0106】

例えば、この検出方法によれば、上記補体C3タンパク質の糖鎖のN-アセチルグルコサミン量に対するその糖鎖のマンノース量の比の減少が、被験体と同一種の哺乳類から得られるその比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判断される材料となる。しかし、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、本実施形態に係る検出方法を用いてそれらの判断とすることは容易に可能である。

30

【0107】

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的変更が可能である。例えば、補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の検出を、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、二次元電気泳動法等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

【0108】

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等)と可溶性抗体に対する2次抗体等を用いて行う

50

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ェロメトリー等を用いることができる。

10

【0109】

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等の適切な素材から選択される。ラベル又はパッケージ挿入物は、本発明に係る診断キットがアルツハイマー病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(BWFI)等を含む付加的な容器を具備してもよい。

【0110】

20

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、グラスフィルター等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。

【0111】

さらに、上記の診断キット、診断マーカー及び検出方法は、本発明の実施形態の1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

【0112】

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、検出方法及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等も、本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0113】

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。

40

【0114】

実施例1

<被験者とサンプル>

被験者となる患者及びその家族には研究の趣旨を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た上で実施している。またこの研究は鳥取大学の倫理審査の承認を受けており、全ての被験者は専門医によって診断された。その診断には、病歴や家族歴の聴取、内科学的診察や神経学的診察、臨床検査、神経心理学検査、画像検査(CT 及び/又は MRI 及びSPECT)が実施された。

【0115】

50

AD患者はDSM-IVとNINCDS-ADRDAの診断基準に基づいて診断された58名(男性16名、女性42名、平均年齢 76.1 ± 3.6 歳)である。認知症のないコントロールとして、認知機能障害、自己免疫疾患がない他の疾患の患者(運動ニューロン疾患・脊髄小脳変性症・高脂血症・パーキンソン病・脳血管疾患等)を用いた。コントロール群は、CSFを採取した患者が32名(男性16名、女性16名、平均年齢 76.2 ± 7.5 歳)、血液を採取した患者が31名(男性9名、女性22名、平均年齢 75.2 ± 3.0 歳)である。

【0116】

CSFは腰椎穿刺により93名の患者から採取、血液は89名の患者から採取し、すぐに-80で保存した。コントロール群は、CSFと血液のデータは別々の方で、AD群のCSFと血液のデータは同一患者のもので検討を行った。また、2群間の年齢による有意差はなかった。

10

【0117】

実施例2

<ELISA法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)を用いたCSF、血液中補体C3濃度の測定>

CSF中の補体C3タンパク質と血清中の補体C3タンパク質の濃度は、Assay Max Human Complement C3 ELISA Kit(Assaypro,USA)を用いて測定した。抗ヒト補体C3タンパク質抗体(polyclonal antibody against human complement C3)が固相化されたプレートに、Mix Diluentで希釈した25 μ lの検体又はスタンダード(Human Complement C3 Standard, 30 μ g/ml)とBiotinylated補体C3タンパク質を25 μ lずつ入れて混合し、25 で2時間インキュベートした。反応後、各ウェルを200 μ lのWash Solutionで5回洗浄し、Streptavidin-Peroxidase Conjugateを50 μ lずつ入れ25 で2時間インキュベートした。反応後、各ウェルを200 μ lのWash Solutionで5回洗浄し、Chromogen Substrateを50 μ lずつ加えた。25 で8分発色させた後、Stop Solution(0.5N hydroxychloric acid)を50 μ lずつ加えて反応を停止させた。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、補体C3タンパク質スタンダードの吸光度で検量線を作成した。その検量線を基に検体の補体C3タンパク質濃度を算出した。

20

【0118】

図1は、髄液及び血液中における補体C3タンパク質の濃度を表している。髄液中においては、AD患者の方がコントロールよりも補体C3タンパク質の濃度が高いことが示された($p < 0.001$)。一方、血液中においては、コントロールとAD患者の間に有意な差が見られなかった。

30

【0119】

以上の結果から、AD患者においては、髄液中の補体C3タンパク質の濃度がコントロールよりも高くなっていることが明らかとなった。一方、血液中の補体C3タンパク質は、コントロール-AD患者問わず、一定濃度存在していることが示された。

【0120】

実施例3

<レクチン酵素免疫測定法を用いた、CSF及び血液中の補体C3タンパク質の糖鎖量測定>

CSF中の補体C3タンパク質と血清中の補体C3タンパク質の糖鎖量は、Assay Max Human Complement C3 ELISA Kit(Assaypro,USA)を一部改変して測定した。抗補体C3タンパク質抗体(polyclonal antibody against human complement C3)が固相化されたプレートに、Mix Diluentで希釈した検体又はスタンダード(Human Complement C3 Standard, 30 μ g/ml)を50 μ lずつ入れて、25 で2時間インキュベートした。反応後、各ウェルをWash Solution 200 μ lで5回洗浄し、ビオチン標識WGA又はビオチン標識Con A(J-Oil Mills, Japan)を50 μ lずつ入れ、25 で1時間インキュベートした。反応後、各ウェルを200 μ lのWash Solutionで5回洗浄し、Streptavidin-HRP(GE Healthcare,USA)を50 μ lずつ入れ、25 で1時間インキュベートした。反応後、各ウェルを200 μ lのWash Solutionで5回洗浄し、TMB Solution(Wako, Japan)を50 μ lずつ加えた。25 で5分発色させた後、2M H_2SO_4 を50 μ lずつ加えて反応を停止させた。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、補体C3タンパク質スタンダードの吸光度で検量線を作成した。その検量線を基に検体中の補体C3タンパク質のWGA結合糖鎖量と補体C3タンパク質のCon A結合糖鎖量を算出した。各

40

50

糖鎖量は、補体C3タンパク質1mg当たりの蛍光強度として表している。

【0121】

図2は、髄液中に含まれる補体C3タンパク質のWGA結合量とConA結合量を表したものである。コントロールとAD患者のWGA結合量を比較すると、AD患者のWGA結合量は、コントロールのWGA結合量よりも有意に減少していた($p < 0.001$)。コントロール群とAD群との識別に関して、カットオフ値を9.59に設定すると、感度が88.2%、特異度が75.0%になることが明らかとなった。

【0122】

また、ConAを用いて同様の実験を行ったところ、AD患者のConA結合量は、コントロールのConA結合量よりも有意に減少していた($p < 0.001$)。コントロール群とAD群との識別に関して、カットオフ値を1.70に設定すると、感度が82.0%、特異度が83.3%になることが明らかとなった。

【0123】

以上の結果から、AD患者においては、髄液中における補体C3タンパク質の糖鎖は、WGA結合性の糖鎖もConA結合性の糖鎖も減少していることが明らかとなった。

【0124】

図3は、血液中に含まれる補体C3タンパク質のWGA結合量とConA結合量を表したものである。コントロールとAD患者のWGA結合量を比較すると、AD患者のWGA結合量は、コントロールのWGA結合量よりも有意に減少していた($p < 0.001$)。コントロール群とAD群との識別に関して、カットオフ値を3.51に設定すると、感度が86.0%、特異度が75.0%になることが明らかとなった。また、ConAを用いて同様の実験を行ったところ、AD患者のConA結合量は、コントロールのConA結合量よりも有意に減少していた($p < 0.05$)。

【0125】

以上の結果から、AD患者においては、血液中における補体C3タンパク質の糖鎖は、WGA結合性及びConA結合性の糖鎖が減少していることが明らかとなった。従って、血液中であっても補体C3タンパク質の糖鎖量の減少を検出可能であることが明らかとなった。

【0126】

実施例4

<CSF及び血液中における補体C3タンパク質のWGA結合量×ConA結合量の結果>

図4は、CSF中の補体C3タンパク質のWGA結合量とConA結合量を乗算した値(WGA結合量×ConA結合量)を基に比較したものである。コントロールとAD患者のWGA結合量×ConA結合量を比較すると、AD患者のWGA結合量×ConA結合量は、コントロールのWGA結合量×ConA結合量よりも有意に減少していた($p < 0.001$)。コントロール群とAD患者群との識別に関して、カットオフ値を18.07に設定すると、感度が89.8%、特異度が83.3%になることが明らかとなった。

【0127】

以上の結果から、CSF中の補体C3タンパク質のWGA結合量とConA結合量を乗算することで、それぞれ単独の場合よりも、感度と特異度の両方が高い割合を示すことが可能であることが明らかとなった。

【0128】

図5は、血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量×ConA結合量を基に比較したものである。コントロールとAD患者のWGA結合量×ConA結合量を比較すると、AD患者のWGA結合量×ConA結合量は、コントロールのWGA結合量×ConA結合量よりも有意に減少していた($p < 0.001$)。コントロール群とAD患者群との識別に関して、カットオフ値を9.2に設定すると、感度が83.3%、特異度が78.6%になることが明らかとなった。

【0129】

以上の結果から、血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量とConA結合量を乗算することで、感度と特異度の両方が高い割合を示すことが可能であることが明らかとなった。

【0130】

実施例5

10

20

30

40

50

< CSF及び血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量又はCon A結合量と臨床的認知症尺度>

被験者となる患者とその家族には研究の趣旨を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た上で、認知症の重症度を評価する臨床的認知症尺度(CDR)を被験体に対して、常法に従って実施した。被験者を評価ごと(極軽度: CDR 0.5、軽度: CDR 1、中等度: CDR 2、重症度: CDR 3)に分類し、それぞれの評価に対してWGA結合量又はConA結合量を、コントロールと比較した。

【0131】

図6は、CDR別に解析した、CSF中及び血液中に含まれる補体C3タンパク質のWGA結合量を表したものである。コントロールのWGA結合量とAD患者群のWGA結合量に有意差があることは、上述した通りである。表1は、髄液におけるコントロール群とAD患者群との識別に関して、カットオフ値、感度及び特異度をCDRの評価毎(CDR 3は除く)にまとめた表である。極軽度であるCDR 0.5の患者においてカットオフ値を11.93に設定すると、感度が93.3%、特異度が62.9%になることが明らかとなった。また、軽度(CDR 1)の場合、カットオフ値を8.80に設定すると、感度が92.9%、特異度が75.3%になることが明らかとなった。

【0132】

【表1】

髄液 - WGA結合量単独のCDR別解析
(カットオフ、感度及び特異度)

CDR	0.5	1	2
Line	—————	— · · —	- - - -
カットオフ	11.93	8.80	10.68
感度	93.3%	92.9%	88.9%
特異度	62.9%	75.3%	65.7%

【0133】

表2は、血液におけるコントロール群とAD患者群との識別に関して、カットオフ値、感度及び特異度をCDRの評価毎(CDR 3は除く)にまとめた表である。極軽度であるCDR 0.5の患者においてカットオフ値を3.72に設定すると、感度が82.4%、特異度が71.4%になることが明らかとなった。また、軽度(CDR 1)の場合は、カットオフ値を3.55に設定すると、感度が88.2%、特異度が71.4%になることが明らかとなった。

【0134】

【表2】

血液 - WGA結合量単独のCDR別解析
(カットオフ、感度及び特異度)

CDR	0.5	1	2
Line	—————	— · · —	- - - -
カットオフ	3.72	3.55	3.17
感度	82.4%	88.2%	90.0%
特異度	71.4%	71.4%	89.3%

【0135】

以上の結果から、極軽度(CDR 0.5)や軽度(CDR 1)の認知症であっても、CSF中及び血液

中における補体C3タンパク質のWGA結合性糖鎖も減少していることが明らかとなった。

【0136】

図7は、CDR別に解析した、CSF中及び血液中に含まれる補体C3タンパク質のConA結合量を表したものである。コントロールのConA結合量とADの患者群のConA結合量に有意差があることは、上述した通りである。表3は、CSFにおけるコントロール群とAD患者群との識別に関して、カットオフ値、感度及び特異度をCDRの評価毎(CDR 3は除く)にまとめた表である。極軽度であるCDR 0.5の患者においてカットオフ値を2.38に設定すると、感度が93.8%、特異度が56.2%になることが明らかとなった。また、軽度(CDR 1)の場合は、カットオフ値を1.50に設定すると、感度が92.9%、特異度が87.5%になることが明らかとなった。

【0137】

【表3】

髄液 - ConA結合量単独のCDR別解析
(カットオフ、感度及び特異度)

CDR	0.5	1	2
Line	————	— · · —	- - - -
カットオフ	2.38	1.50	2.01
感度	93.8%	92.9%	94.1%
特異度	56.2%	87.5%	68.7%

【0138】

一方、図7右図は、血液中に含まれる補体C3タンパク質のConA結合量に関する、CDRの評価毎にまとめた図である。図3の結果の通り、血液中におけるコントロール群のConA結合量とAD患者群のConA結合量には有意差があることから、CDRの評価毎に分類した場合であっても有意差があると言える。ここで、CDR 1に関してカットオフ値を2.45に設定すると、感度が84.6%、特異度が67.9%になることが明らかとなった。

【0139】

以上の結果から極軽度(CDR 0.5)や軽度(CDR 1)の認知症であっても、CSF中における補体C3タンパク質のConA結合性糖鎖も減少していることが明らかとなった。また、血液中における補体C3タンパク質のConA結合性糖鎖も、少なくとも軽度(CDR 1)の段階においては減少していることが明らかとなった。

【0140】

実施例6

< CSF及び血液中における補体C3タンパク質のWGA結合量 × Con A結合量と臨床的認知症尺度 >

図8は、CDR別に解析した、CSF中に含まれる補体C3タンパク質のWGA結合量 × Con A結合量を表したものである。コントロールのWGA結合量 × Con A結合量とAD患者のWGA結合量 × Con A結合量には有意差があることは、上述した通りである。表4は、髄液におけるコントロール群とAD患者群との識別に関して、カットオフ値、感度及び特異度をCDRの評価毎(CDR 3は除く)にまとめた表である。極軽度であるCDR 0.5の患者においてカットオフ値を27.41に設定すると、感度が94.4%、特異度が70.0%になることが明らかとなった。また、軽度(CDR 1)の場合は、カットオフ値を12.57に設定すると、感度が100%、特異度が90.0%になることが明らかとなった。

【0141】

10

20

30

40

【表 4】

髄液 - CDR別にみるWGA×ConA
(カットオフ、感度及び特異度)

CDR	0.5	1	2
Line	————	— . . —	- - - -
カットオフ	27.41	12.57	30.68
感度	94.4%	100%	100%
特異度	70.0%	90.0%	70.0%

10

【 0 1 4 2 】

図 9 は、CDR別に解析した、血液中に含まれる補体C3タンパク質のWGA結合量×Con A結合量を表したものである。コントロールのWGA結合量×Con A結合量とAD患者のWGA結合量×Con A結合量には有意差があることは、上述した通りである。表 5 は、血液におけるコントロール群とAD患者群との識別に関して、カットオフ値、感度及び特異度をCDRの評価毎(CDR 3は除く)にまとめた表である。極軽度であるCDR 0.5の患者においてカットオフ値を13.25に設定すると、感度が90.9%、特異度が46.7%になることが明らかとなった。また、軽度(CDR 1)の場合は、カットオフ値を6.88に設定すると、感度が88.9%、特異度が90.0%になることが明らかとなった。

20

【 0 1 4 3 】

【表 5】

血液 - CDR別にみるWGA×ConA
(カットオフ、感度及び特異度)

CDR	0.5	1	2
Line	————	— . . —	- - - -
カットオフ	13.25	6.88	9.21
感度	90.9%	88.9%	91.7%
特異度	46.7%	90.0%	66.7%

30

【 0 1 4 4 】

以上の結果から、極軽度(CDR 0.5)や軽度(CDR 1)の認知症であっても、CSF中及び血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量とConA結合量とを乗算することで、感度と特異度の両方が高い割合を示すことが可能であることが明らかとなった。

【 0 1 4 5 】

実施例 7

40

<ELISA法を用いたCSFのアミロイドβタンパク質42の測定>

CSF中及び血液中のアミロイドβタンパク質42(Aβ42)は、Aβ42サンドウィッチELISAキット(Human Amyloid β(1-42)Assay kit(Immune Biological,Japan))を使用して測定した。抗Aβ42抗体(polyclonal antibody against human Aβ42)が固相化されたプレートに、希釈用緩衝液で希釈した検体又はスタンダード(Human Aβ42 Standard, 1,600pg/ml)を100μlずつ入れて、4℃で一晩インキュベートした。反応後、各ウェルを洗浄液300μlで7回洗浄し、標識抗体用溶解液で希釈したHRP標識抗Aβ42抗体(monoclonal antibody against human Aβ42)を100μlずつ入れ、4℃で1時間インキュベートした。反応後、各ウェルを300μlの洗浄液で9回洗浄し、TMB基質液を100μlずつ加えた。25℃で30分発色させた後、反応停止液(1N H₂SO₄)を100μlずつ加えて反応を停止させた。450nmにおける吸光度

50

をマイクロプレートリーダーで測定し、 $A\beta 42$ スタンダードの吸光度で検量線を作成した。その検量線を基に検体中の $A\beta 42$ 量を算出した。

【0146】

< $A\beta 42$ とWGA結合性糖鎖又はConA結合性糖鎖の相関>

図10は、CSF中における $A\beta 42$ の量と補体C3タンパク質のWGA結合性糖鎖又はConA結合性糖鎖の量との相関を表した図である。その結果、WGA結合性糖鎖もConA結合性糖鎖も、 $A\beta 42$ と正の相関を示し、それぞれ $p < 0.01$ の有意な相関を示した。

【0147】

AD患者のCSF中においては、 $A\beta 42$ が減少している一方で、この減少は、アルツハイマー病特異的ではないことが既に報告されている。しかし、AD患者における $A\beta 42$ の減少と補体C3タンパク質の糖鎖量(WGA及びConA結合性糖鎖の両方の量)の減少には正の相関を示すことが図10の結果より明らかとなった。よって、髄液中におけるアミロイド β タンパク質と補体C3タンパク質の糖鎖量(WGA及びConA結合性糖鎖の両方の量)を測定し、その量比からアルツハイマー病を検出できることが明らかとなった。

【0148】

図11は、CSF中における $A\beta 42$ の量と血液中における補体C3タンパク質のWGA結合性糖鎖の量との相関を表した図である。その結果、WGA結合性糖鎖の量とアミロイド β タンパク質42の量は正の相関を示し、 $p < 0.05$ の有意な相関を示した。

【0149】

図11の結果の通り、AD患者のCSF中における $A\beta 42$ は、血液中の補体C3タンパク質のWGA結合性糖鎖の量と正の相関($P < 0.05$ の有意な相関)を示す程度に減少することが明らかとなった。このことから、血液中における補体C3タンパク質のWGA結合性糖鎖量の減少からCSF中における $A\beta 42$ 量の減少を導き出すことが可能になる。よって、血液中における補体C3タンパク質のWGA結合性糖鎖量を測定し、その量の減少からアルツハイマー病を検出できることが明らかとなった。

【0150】

実施例8

<ConA結合量とWGA結合量の量比>

図12は、CSF中の補体C3タンパク質のConA結合量とWGA結合量との相関を表したものである。コントロールは、弱い相関(相関係数 $r = 0.29$)を示すのに対し、AD患者は、適度な相関($r = 0.66$)を示すことが明らかとなった。

【0151】

以上の結果から、AD患者のCSF中に存在する補体C3タンパク質の糖鎖は、コントロールと比較して、WGA結合性糖鎖に対してConA結合性糖鎖が減少していることが明らかとなった。

【0152】

実施例9

<CSF中のWGA結合量と血液中のWGA結合量の量比>

図13は、AD患者における、CSF中の補体C3タンパク質のWGA結合量と血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量との相関を表したものである。その結果、CSF中の補体C3タンパク質のWGA結合量と、血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量は、正の相関を示し、 $p < 0.05$ の有意な相関を示した。

【0153】

以上の結果、AD患者において、血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量が減少すると、CSF中の補体C3タンパク質のWGA結合量も減少することが明らかとなった。AD患者における血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量が健常な患者における血液中の補体C3タンパク質のWGA結合量に対して減少していると、AD患者におけるCSF中の補体C3タンパク質のWGA結合量も減少している。このことは、逆の場合も同様のことが言える。よって、図2と図3の結果を考慮すると、CSF又は血液のいずれかにおける補体C3タンパク質に対するWGAの結合量の減少が観察されるだけで、アルツハイマー病の検出が可能になることが明らかとなっ

た。

【 0 1 5 4 】

各実施例において用いた統計解析は、マン・ホイットニのU検定(両側検定)である。各変数間の相関はピアソンの積率相関係数を用いて評価した。receiver operating characteristic(ROC)解析は、感度、特異度、カットオフ値を算出するために実施した。

【 0 1 5 5 】

< 考察 >

本実施例の結果から、体液中の補体C3タンパク質を由来とする糖鎖の量を定量的に検出することで、アルツハイマー病の診断が可能となる。また、体液中の補体C3タンパク質の糖鎖の量を定量的に検出することで、従来のマーカーと異なり、アルツハイマー病の早期診断や、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となり、極軽度や軽度の段階でアルツハイマー病の治療を開始することが可能となる。

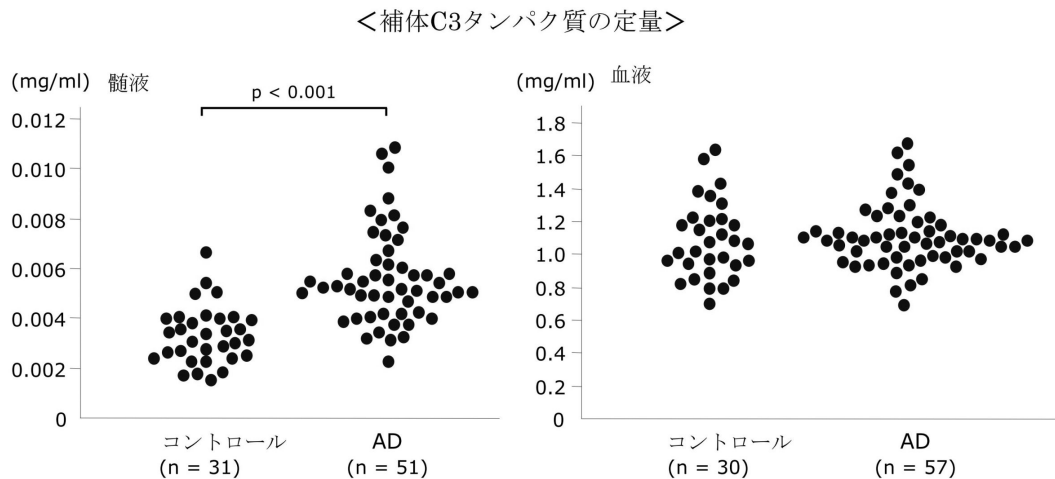
【 0 1 5 6 】

また、WGA結合量とConA結合量との乗算値を用いることで、よりコントロールとの差が明確となるアルツハイマー病の診断が可能となる。更には、上記糖鎖中のマンノース量とN-アセチルグルコサミン量との量比からより、簡便且つ迅速なアルツハイマー病の診断が可能となる。また、A β 42やCDRの評価結果を組み合わせた複合的な診断を行うことにより、確実なアルツハイマー病診断が可能となる。

【 0 1 5 7 】

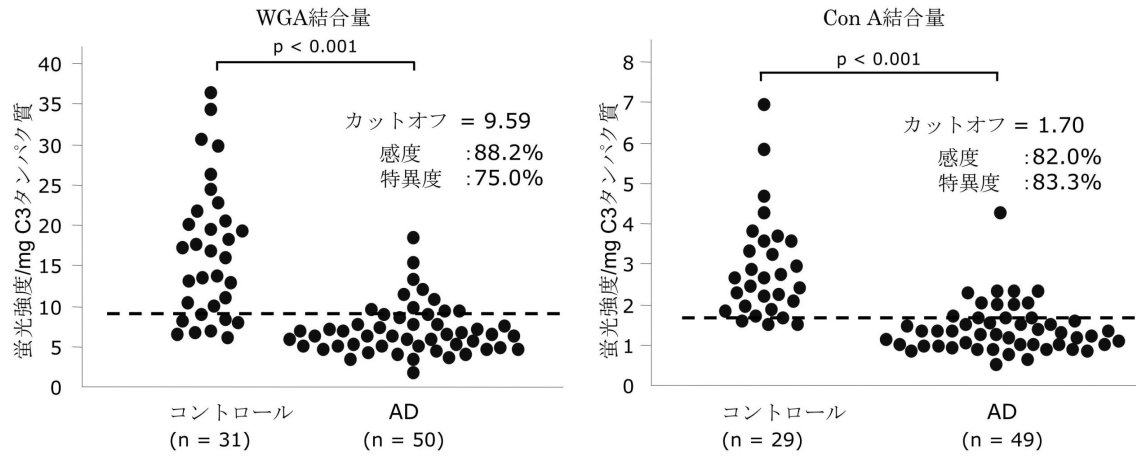
以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能で、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

【 図 1 】



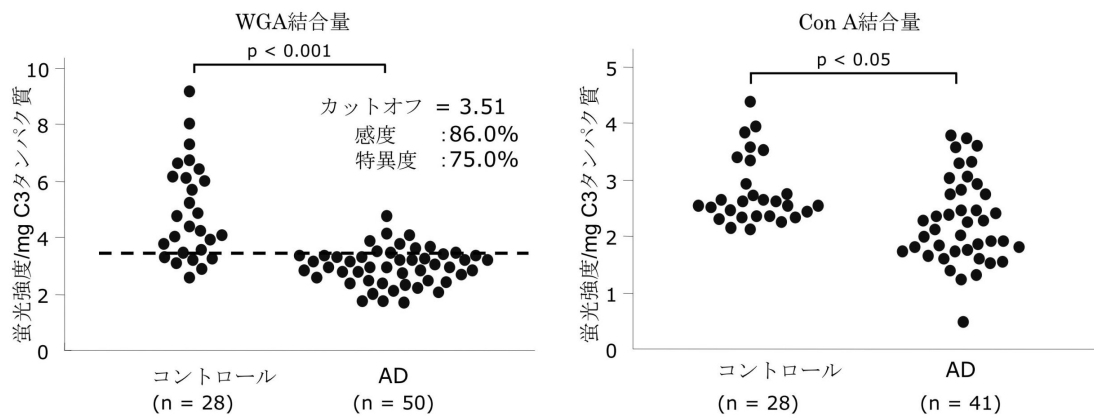
【図 2】

<髄液中の補体C3タンパク質>

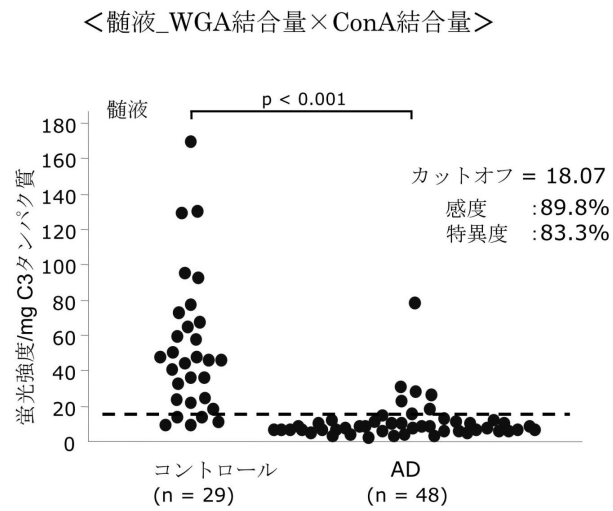


【図 3】

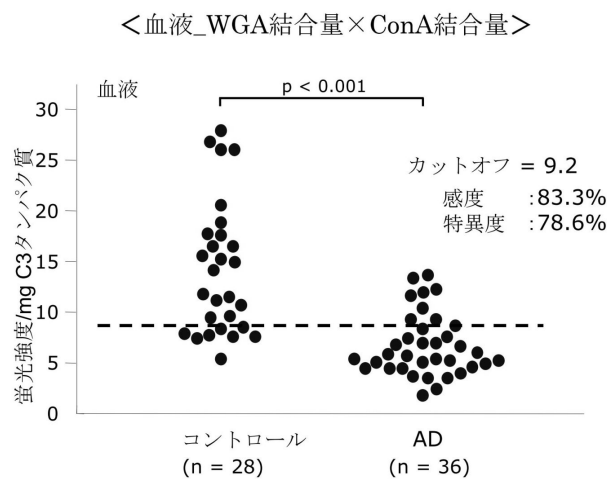
<血液中の補体C3タンパク質>



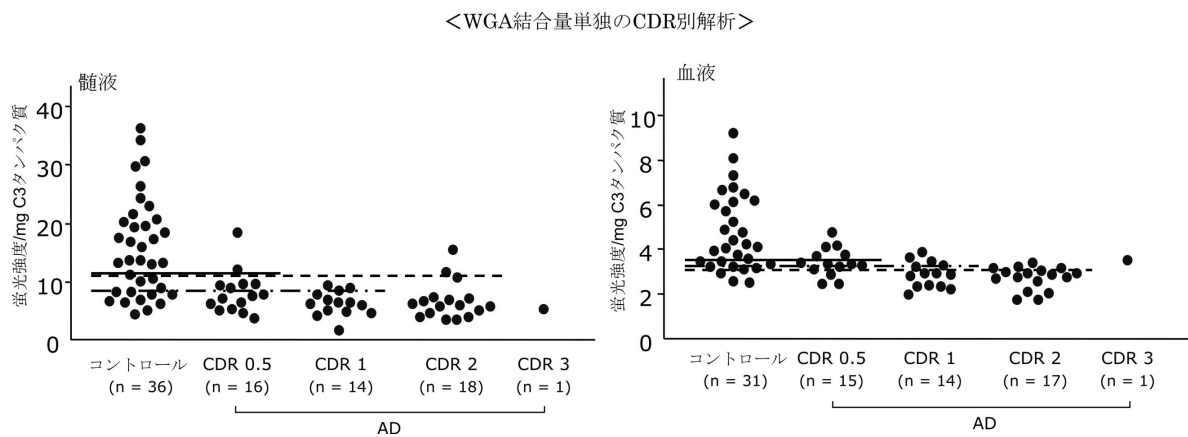
【図 4】



【図 5】

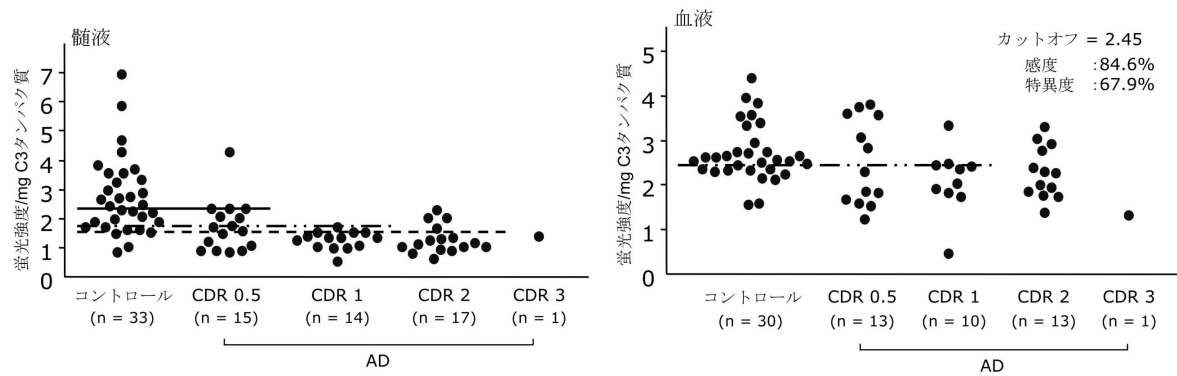


【図 6】



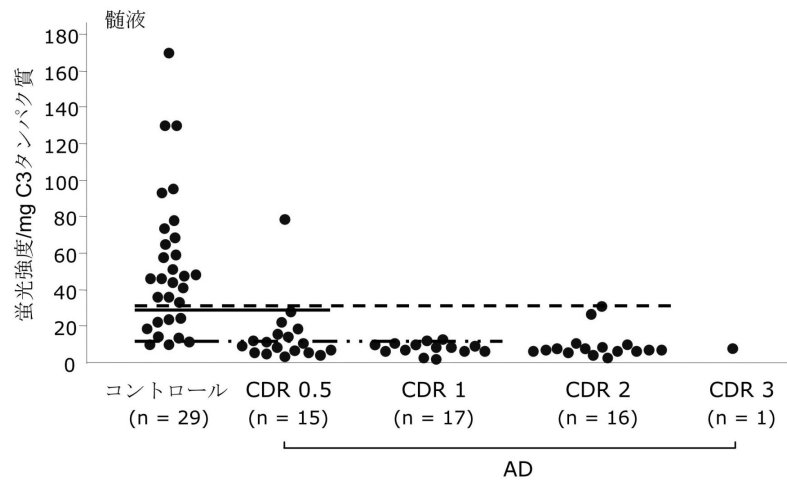
【図 7】

<Con A結合量単独のCDR別解析>



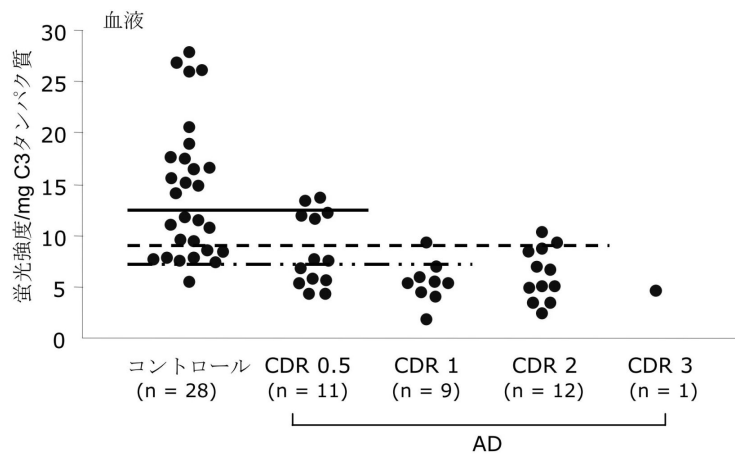
【図 8】

<髄液_CDR別にみる WGA × ConA>

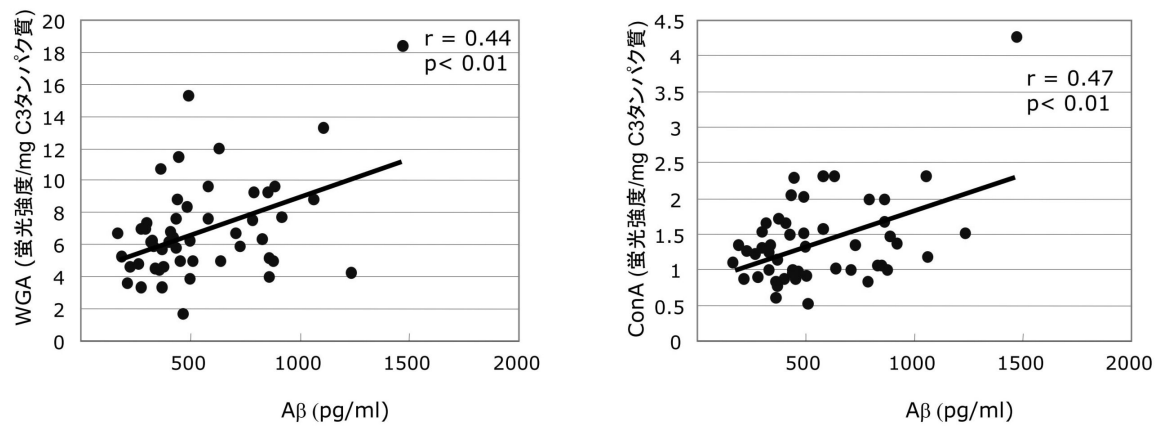


【図 9】

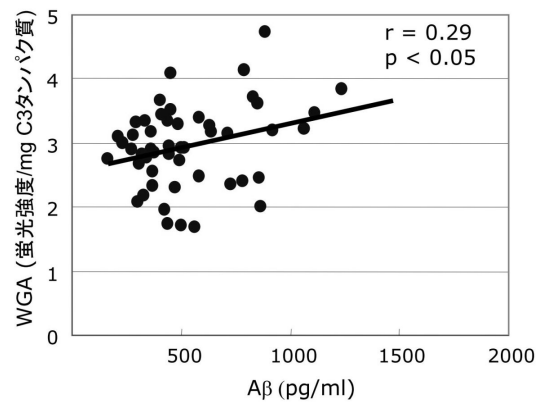
<血液_CDR別にみる WGA × ConA>



【図 10】

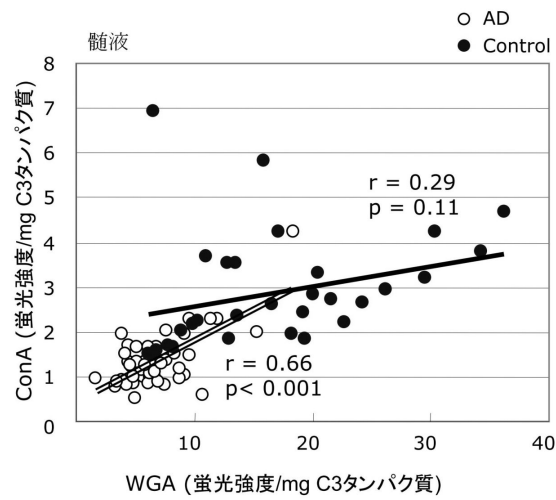
＜髄液中の補体C3タンパク質とアミロイド β タンパク質＞

【図 11】

＜血液中の補体C3タンパク質とCSF中のアミロイド β タンパク質＞

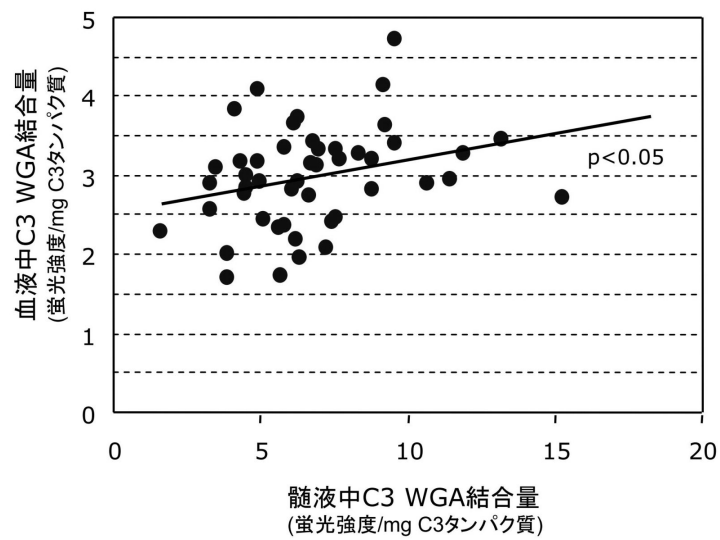
【図 1 2】

<Con A結合量とWGA結合量の相関>



【図 1 3】

<髄液中と血液中のWGA結合量の相関>



フロントページの続き

- (72)発明者 浦上 克哉
鳥取県米子市西町 8 6 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 8 6 番地 国立大学法人鳥取大学内

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 0 2 9 8 8 6 (WO , A 1)
VERGA Laura , Alzheimer patients and Down patients: cerebral preamyloid deposits differ ultrastructurally and hist , Neuroscience Letters , 1 9 8 9 年 , Vol.105/Iss.3 , 第294-299頁
谷口美也子 , アルツハイマー病新規診断マーカーとしての糖タンパク質 , 日本老年医学会雑誌 , 日本 , 2 0 0 7 年 5 月 2 0 日 , Vol.44 臨時増刊号 , 第40頁
HASE S. et al. , Structures of sugar chains of the third component of human complement , The Journal of Biochemistry , 1 9 8 5 年 , Vol.98, No.4 , 第863-874頁 , U R L , https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/98/4/98_4_863/_pdf
CRISPIN M.D.Max et al. , Monoglucosylated glycans in the secreted human complement component C3: implications for protein biosynthesis and structure , FEBS Letters , 2 0 0 4 年 5 月 , Vol.566 , 第270-274頁 , U R L , http://ac.els-cdn.com/S0014579304005125/1-s2.0-S0014579304005125-main.pdf?_tid=85b9be36-b4df-11e5-9ae7-00000aab0f27&acdnat=1452130961_8e57781b0ea13b70eef449620b5cbf0e

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	通过测量补体C3蛋白的糖链，诊断标记和检测方法诊断阿尔茨海默型痴呆的诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP5892169B2	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	JP2013528019	申请日	2012-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人鸟取大学 超布莱恩		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人鸟取大学 超有限公司大脑		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人鸟取大学 超有限公司大脑		
[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 G01N33/68 G01N37/00 G01N30/88		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/6896 G01N2333/4716 G01N2400/00 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/68 G01N37/00.102 G01N30/88.N		
代理人(译)	伊藤裕之		
优先权	2011173946 2011-08-09 JP		
其他公开文献	JPWO2013021962A5 JPWO2013021962A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供阿尔茨海默型痴呆的早期检测。 解决方案：这种用于诊断阿尔茨海默病的诊断试剂盒是用于检测糖链的诊断试剂盒，用于定量检测哺乳动物体液样品中补体C3蛋白衍生的糖链的量。提供了一种具有装置的诊断试剂盒。此外，提供了用于诊断阿尔茨海默氏病的诊断标记物，其包含来自作为受试者的哺乳动物的体液样品中的补体C3蛋白质的量的糖链。此外，提供了阿尔茨海默病的疾病状态指数的检测方法，其包括定量检测作为受试者的哺乳动物的体液样品中来自补体C3蛋白的糖链量的步骤。是的。

(21) 出願番号	特願2013-528019 (P2013-528019)	(73) 特許権者	504150461
(86) (22) 出願日	平成24年8月6日 (2012.8.6)		国立大学法人鳥取大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/069957		鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地
(87) 国際公開番号	WO2013/021962	(73) 特許権者	509240343
(87) 国際公開日	平成25年2月14日 (2013.2.14)		株式会社ハイパーブレイン
審査請求日	平成27年2月13日 (2015.2.13)		鳥取県米子市西町86 鳥取大学医学部ア
(31) 優先権主張番号	特願2011-173946 (P2011-173946)		レスコ棟6F
(32) 優先日	平成23年8月9日 (2011.8.9)	(74) 代理人	110001139
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		S K 特許業務法人
		(74) 代理人	100130328
			弁理士 奥野 彰彦
		(74) 代理人	100130672
			弁理士 伊藤 寛之