

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/016655

発行日 平成17年12月2日 (2005. 12. 2)

(43) 国際公開日 平成16年2月26日 (2004. 2. 26)

(51) Int.C1.⁷

F I

C O 7 K 16/18

C O 7 K 16/18

Z N A

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/53

D

		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)
出願番号	特願2004-528876 (P2004-528876)	(71) 出願人 000005968 三菱化学株式会社 東京都港区芝五丁目33番8号
(21)国際出願番号	PCT/JP2003/010340	(71) 出願人 000138277 株式会社三菱化学ヤトロン 東京都新宿区西五軒町13番1号
(22)国際出願日	平成15年8月14日 (2003. 8. 14)	(74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之
(31)優先権主張番号	特願2002-236472 (P2002-236472)	(74) 代理人 100090516 弁理士 松倉 秀実
(32)優先日	平成14年8月14日 (2002. 8. 14)	(74) 代理人 100089244 弁理士 遠山 勉
(33)優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者 大野 英人 日本国東京都千代田区東神田一丁目11番 4号 株式会社 三菱化学ヤトロン内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】中枢性タウ蛋白質特異的抗体

(57) 【要約】

本発明は、中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ、末梢性タウ蛋白質を認識しない抗体を提供する。より詳しくは、中枢組織において主たる部分を占めているタウ蛋白質のアイソフォームに特異的なエピトープとして、タウ蛋白質をコードする遺伝子のExon 4によりコードされるアミノ酸配列とExon 5によりコードされるアミノ酸配列の連結部分のアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原として得られる抗体を提供する。さらに、これらの抗体を用いたアルツハイマー病の検出方法及び試薬キットを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ、末梢性タウ蛋白質を認識しないことを特徴とする中枢性タウ蛋白質特異的抗体。

【請求項 2】

中枢性タウ蛋白質が、アルツハイマー病患者の体液において特異的に増加する蛋白質であることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原として得られることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗体。 10

【請求項 4】

中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列が、タウ蛋白質をコードする遺伝子の $E \times o n$ 4 によりコードされるアミノ酸配列と $E \times o n$ 5 によりコードされるアミノ酸配列の連結部分のアミノ酸配列を含む配列であることを特徴とする請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

連結部分のアミノ酸配列を含む配列が、配列表の配列番号： 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 2 1 ~ 1 2 8 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とする請求項 4 に記載の抗体。 20

【請求項 6】

中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原として動物を免疫し、得られた抗体と中枢性タウ蛋白質及び末梢性タウ蛋白質との反応性を解析し、中枢性タウ蛋白質に対して特異的な反応性を有する抗体を選択することを特徴とする中枢性タウ蛋白質特異的抗体の製造方法。 20

【請求項 7】

タウオパチーの疑いのある個体から得られた試料中の中枢性タウ蛋白質の存在を、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体を用いて解析することを特徴とするタウオパチーの検出方法。 30

【請求項 8】

タウオパチーがアルツハイマー病である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料が、蛋白質可溶化剤の存在下で変性処理して夾雜蛋白質を除去する処理を行ったものであることを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載の方法。 30

【請求項 10】

前記試料が、さらに濃縮処理を行ったものであることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。 40

【請求項 11】

試料が血液であることを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

中枢性タウ蛋白質の存在の解析が酵素免疫測定法により行われることを特徴とする請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 13】

少なくとも請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体を含むことを特徴とするアルツハイマー病の検出を行うための試薬キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

本発明は、中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ、末梢性タウ蛋白質を認識しない抗体に関する。また、本発明は、試料中の中枢性タウ蛋白質の存在を解析することを特徴とするタウオパチーの検出方法、その中でも特にアルツハイマー病の検出方法、及び、試薬キットに関する。

【背景技術】

アルツハイマー病は初老期（45～65才）に発病する進行性の痴呆であり、病的な変化として神経細胞の変質及び神経細胞数の減少による大脳皮質の萎縮が認められ、また、病理学的にはその脳内に多数の老人斑と神経原線維変化が認められる。65才以上の老年期に発症するいわゆる自然老化による老年痴呆も、病理学的に何ら本質的な差は認められないため、アルツハイマー型老年痴呆と呼ばれている。この疾患の患者数は、高齢者人口の増加とともに増大し、社会的に重要な疾患となっている。しかし、この疾患の原因については諸説あるものの結果的には未だ不明であり、早期の解明が望まれている。

アルツハイマー病の病理変化のひとつである老人斑の主要成分は、アミロイド プロテインであることが解明されている（Ann. Rev. Neurosci., 12, 463 - 490 (1989)）。また、もうひとつの病理変化である神経原線維変化は、神経細胞内にペアード・ヘリカル・フィラメント（Paired Helical Filament；以下、これを「PHF」と称することがある）が蓄積してくるものであり、その構成成分のひとつとしてリン酸化タウ蛋白質が同定された（J. Biochem., 99, 1807 - 1810 (1986)；Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913 - 4917 (1986)）。

タウ蛋白質は、通常 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量 48 ~ 65 kD に数本のバンドを形成する一群の近縁蛋白質であり、微小管の形成を促進する蛋白質であるが、アルツハイマー病患者の脳中の PHF に組み込まれたタウ蛋白質については、健常者の脳中のタウ蛋白質よりも異常にリン酸化されていることが、PHF に対するポリクローナル抗体（抗 p-tau；J. Biochem., 99, 1807 - 1810 (1986)）やタウ蛋白質に対するモノクローナル抗体（tau-1；Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913 - 4917 (1986)）を用いて証明されている。さらに、PHF 中に組み込まれたリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位も決定される（特開平 6 - 239893 号公報）等、アルツハイマー病におけるタウ蛋白質の挙動の解明は進みつつある。

タウ蛋白質に関しては、既に、脳脊髄液中のタウ蛋白質濃度を測定するキット（日本国内の名称「フィノスカラー hTAU」、欧米における名称「INNOTESt hTAU Ag」；Innogenetics 社製）が市販され、臨床的に用いられている。また他方では、PHF 中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位に着目してアルツハイマー病を検出する方法も開発されている（Neurosci. Lett., 270, 91 - 94 (1999)、Ann. Neurol., 50, 150 - 156 (2001)）。これらの方法はいずれも試料として脳脊髄液を用いることとしており、試料採取時の患者への侵襲度の大きさが問題となっていた。そこで、患者への侵襲度の軽減や簡便さ等の面からも、脳脊髄液に限らず、血液をはじめとする種々の試料を用いても中枢性タウ蛋白質の解析が可能な、特異的かつ高感度のアルツハイマー病の検出方法が強く求められていた。

しかし、タウ蛋白質には数種のアイソフォームが存在し、脳等の中核組織と筋肉等の末梢組織とでは、それぞれ主たる部分を占めるタウ蛋白質のアイソフォームが異なることが明らかになっている（J. Neurochem., 67, 1235 - 1244 (1996)）。例えば、末梢組織において主たる部分を占めているタウ蛋白質のアイソフォーム（以下、これを「末梢性タウ蛋白質」と称することがある）は、中枢組織において主たる部分を占めているアイソフォーム（以下、これを「中枢性タウ蛋白質」と称することがある）に比べて大きな分子量を有しており、血液試料等にはこの大きな分子量を有する末梢性タウ蛋白質が多量に含まれていることが示唆されている。

本発明者らは、血液を試料としたアルツハイマー病の検出方法を先に提案した（特開 2002 - 040023 号公報）。しかし、この方法はタウ蛋白質のアイソフォームの区別無くその全量を検出する方法であり、アルツハイマー病患者の脳で生じている中枢性タウ蛋白質の変化を特異的に解析できるものではなかった。例えば、これらの方法を用いて血液試料等を解析しようとすると、血液試料中に多量に含まれる分子量の大きな末梢性タウ蛋白質も強く反応して、中枢性タウ蛋白質の検出を妨害してしまい、十分な感度を得ることができないことがあった。

つまり、総蛋白質濃度が非常に高く夾雑物による妨害の大きい血液試料等については、微量にしか存在していない中枢組織由来のタウ蛋白質の解析が特に困難であり (*Dement. Geriat. Cong. Disord.* , 10 , 442 - 445 (1999) ; *Neurosci. Lett.* , 275 , 159 - 162 (1999)) 、特異的かつ高感度のアルツハイマー病の検出方法は未だ確立されているとは言えなかった。

また、物忘れ等の自覚症状を有する軽度認知障害 (*Mild Cognitive Impairment* : 以下、これを「 MCI 」と略記することがある) は、近年、アルツハイマー病の前駆症状であるとして注目されている。 MCI であると判定された患者のうち、年に 10 ~ 15 % 、数年では約 50 % がアルツハイマー病に移行すると言われており、 MCI 患者に早期アルツハイマー病患者が含まれることが広く認識されつつある。しかし、現在 MCI については、問診や知的機能検査を中心とする Petersen, R. C. 等の基準 (*Arch. Neurol.* 56 : 303 - 308 , 1999) 等の診断基準に従った判定が行われており、客観的かつ明確な診断方法は確立されていない。さらには、このような従来法で MCI と判定される患者群に含まれる早期アルツハイマー病患者を検出できるような方法はなく、これらの患者も含めたアルツハイマー病の明確な検出方法の確立が強く求められている。

【発明の開示】

本発明は、特異性に優れ、高感度かつ簡便なアルツハイマー病の検出方法を提供するためになされたものである。

本発明者は、上記課題を達成するために鋭意検討を進めた結果、中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ、末梢性タウ蛋白質を認識しない抗体を用いて解析を行えば、アルツハイマー病の検出が特異的かつ簡便に行えることを見いだした。さらに詳しくは、中枢組織において主たる部分を占めているタウ蛋白質のアイソフォームに特異的なエピトープとして、タウ蛋白質をコードする遺伝子の *Exon 4* によりコードされるアミノ酸配列と *Exon 5* によりコードされるアミノ酸配列の連結部分のアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原として得られる抗体を用いれば、中枢性タウ蛋白質を確実に解析することができ、かくして解析される中枢性タウ蛋白質の濃度は、アルツハイマー病患者から得られた試料において有意に変化していることを見いだした。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

すなわち本発明によれば、

(1) 中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ、末梢性タウ蛋白質を認識しないことを特徴とする中枢性タウ蛋白質特異的抗体、

(2) 中枢性タウ蛋白質が、アルツハイマー病患者の体液において特異的に増加する蛋白質であることを特徴とする上記 (1) に記載の抗体、

(3) 中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原として得られることを特徴とする上記 (1) 又は (2) に記載の抗体、

(4) 中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列が、タウ蛋白質をコードする遺伝子の *Exon 4* によりコードされるアミノ酸配列と *Exon 5* によりコードされるアミノ酸配列の連結部分のアミノ酸配列を含む配列であることを特徴とする上記 (3) に記載の抗体、

(5) 連結部分のアミノ酸配列を含む配列が、配列表の配列番号： 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 121 ~ 128 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とする上記 (4) に記載の抗体、及び

(6) 中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原として動物を免疫し、得られた抗体と中枢性タウ蛋白質及び末梢性タウ蛋白質との反応性を解析し、中枢性タウ蛋白質に対して特異的な反応性を有する抗体を選択することを特徴とする中枢性タウ蛋白質特異的抗体の製造方法

が提供される。

また、本発明の別の態様によれば、

(7) タウオパチーの疑いのある個体から得られた試料中の中枢性タウ蛋白質の存在を、上記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の抗体を用いて解析することを特徴とするタウオパ

チーの検出方法、

(8) タウオパチーがアルツハイマー病である、(7) に記載の方法、

(9) 前記試料が、蛋白質可溶化剤の存在下で変性処理して夾雜蛋白質を除去する処理を行ったものであることを特徴とする(7) 又は(8) に記載の方法、

(10) 前記試料が、さらに濃縮処理を行ったものであることを特徴とする上記(9) に記載の方法、

(11) 試料が血液であることを特徴とする上記(7) ~ (10) のいずれかに記載の方法、及び

(12) 中枢性タウ蛋白質の存在の解析が酵素免疫測定法により行われることを特徴とする上記(7) ~ (11) のいずれかに記載の方法、
10
が提供される。

さらに、本発明の別の態様によれば、

(13) 少なくとも上記(1) ~ (5) のいずれかに記載の抗体を含むことを特徴とするアルツハイマー病の検出を行うための試薬キットが提供される。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の抗体の特異性を解析するために行ったドットプロット分析の結果を示す写真図である。作製した4種類の抗体それぞれを、PVDF膜にドットした8種類の抗原ポリペプチドと反応させ、発色反応により検出したものである。

図2は、本発明の抗体の中中枢性タウ蛋白質に対する特異性を解析したウエスタンプロットの写真図である。図中、「anti - Exon 4 - 5」は抗Exon 4 - 5 (118 - 131) 抗体 (121 - 128 精製)、「anti - Exon 4 A」は抗Exon 4 A 抗体、「HT 7」は抗タウ蛋白質モノクローナル抗体 HT 7 である。また、試料の「M」はヒト筋肉組織抽出液、「B」はアルツハイマー病患者の脳組織抽出液、「C」は陽性コントロールを示す。また、「big tau (exon 4 A +)」は末梢性タウ蛋白質のバンド位置を、「tau (Exon 4 A -)」は中枢性タウ蛋白質のバンド位置を示す。
20

【発明を実施するための最良の形態】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

1. 中枢性及び末梢性タウ蛋白質

本発明のタウオパチーの検出方法、その中でもアルツハイマー病の検出方法は、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料中の中枢性タウ蛋白質の存在を、中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ、末梢性タウ蛋白質を認識しない抗体（以下、これを「中枢性タウ蛋白質特異的抗体」と称することがある）を用いて解析することを特徴としている。
30

本明細書において、中枢性タウ蛋白質とは、脳等の中中枢組織において主たる部分を占めているタウ蛋白質のアイソフォームを意味し、例えばヒトの場合には、主に6種類のアイソフォームを含む（Neuron, 3, 519 - 526 (1989)）。これらの中中枢性タウ蛋白質のアイソフォームは、共通する特徴として、例えば、配列表の配列番号：1に記載のアミノ酸番号124 (Gln) と125 (Ala) の間に挿入配列を有していない。ここで、アミノ酸番号124と125の間とは、タウ蛋白質をコードする遺伝子のExon 4 によりコードされるアミノ酸配列（配列番号：1のアミノ酸番号103 ~ 124）とExon 5 によりコードされるアミノ酸配列（配列番号：1のアミノ酸番号125 ~ 143）の連結部分の配列 (Gln Ala)（以下、これを「Exon 4 - 5 連結部分」と称することがある）である。なお、本明細書において示す中枢性タウ蛋白質の配列（配列番号：1）は、Neuron, 3, 519 - 526 (1989) に記載されているヒト中枢組織において最長のタウ蛋白質アイソフォームの配列であり、本明細書中のアミノ酸番号は該配列におけるアミノ酸番号を用いる。
40

また、末梢性タウ蛋白質とは、筋肉等の末梢組織において主たる部分を占めているタウ蛋白質のアイソフォームを意味し、具体的には、例えば、配列表の配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、アミノ酸番号124と125の間に挿入配列を有するアイソフォームを意味する。例えばヒトの場合では、末梢性タウ蛋白質が有する前記挿入配列として
50

は、タウ蛋白質をコードする遺伝子の Exon 4 A によりコードされるアミノ酸配列（配列番号：2； Biotech., 31, 10626 - 10633 (1992)）が挙げられる。

ここで、中枢性タウ蛋白質及び末梢性タウ蛋白質は、リン酸化されたものでもリン酸化されていないものでもよく、また、それらの部分断片を含む。

アルツハイマー病患者の脳等の中核組織では、上記中枢性タウ蛋白質が高度にリン酸化されて本来の機能を失い、そのままもしくは断片化されて遊離し、脳脊髄液に入る。脳脊髄液は、血液やリンパ液等の体液と相互に輸送がある（入門ビジュアルサイエンス「脳のしくみ」、新井康允・著、日本実業出版社）ことから、中枢性タウ蛋白質は血液やリンパ液等の体液にも流れ込むことがある。特に血液では、末梢性タウ蛋白質が多量に含まれているために、これを試料とする場合には末梢性タウ蛋白質と区別して中枢性タウ蛋白質のみを解析する必要がある。上述のとおり、中枢性タウ蛋白質及び末梢性タウ蛋白質は配列表の配列番号：1に記載のアミノ酸番号124と125の間の挿入配列の有無によって区別されるが、例えば、Exon 4 - 5 連結部分のアミノ酸配列をエピトープとする抗体を用いて区別することが好ましい。

また、上記したようなアルツハイマー病患者の中核組織から体液へのタウ蛋白質の逸脱は、中核組織において前記中枢性タウ蛋白質が高度にリン酸化されるような他の疾患の患者においても、類似の機序で起こり得る。そのような疾患としては、例えば、中核組織にタウ蛋白質が蓄積して神経変性を生じるタウオパチーに分類される疾患群等が挙げられ、アルツハイマー病以外のタウオパチーの例としては、例えば、ダウン症、パーキンソン症候群、Pick病、進行性核上性麻痺（PSP）、皮質基底核変性症（CBD）等が挙げられる。

2. 中枢性タウ蛋白質特異的抗体

本発明の抗体は、中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ、末梢性タウ蛋白質を認識しないものであればいかなるものでも用い得るが、例えば、抗原として中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下、これを「抗原ポリペプチド」と称することがある）を用いて得られるもの等が挙げられる。すなわち、抗原ポリペプチドとしては、中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いて動物を免疫して得られる抗体が、中枢性タウ蛋白質と末梢性タウ蛋白質とを識別し得、中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し得るものであればいかなる配列を有するものであってもよい。本発明において、中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列とは、中枢性タウ蛋白質のアミノ酸配列に存在し、末梢性タウ蛋白質のアミノ酸配列には存在しないアミノ酸配列をいう。

具体的には、中枢性タウ蛋白質に特異的なアミノ酸配列として、例えば、タウ蛋白質をコードする遺伝子の Exon 4 によりコードされるアミノ酸配列と Exon 5 によりコードされるアミノ酸配列の連結部分（Exon 4 - 5 連結部分）のアミノ酸配列（例えば、配列番号：1のアミノ酸番号124（G1n）と125（A1a））等が挙げられる。抗原ポリペプチドとして、例えば、この連結部分のアミノ酸配列（アミノ酸番号124（G1n）と125（A1a）のアミノ酸）を含む5アミノ酸残基以上のポリペプチドを用いることが好ましく、より好ましくは8残基以上、最も好ましくは10残基以上のポリペプチドが用いられる。抗原ポリペプチドの長さの上限は、中枢性タウ蛋白質特異的抗体が得られるものであれば特に限定されないが、通常20残基以下、好ましくは15残基以下である。本発明で用いる抗原ポリペプチドの好ましい配列としては、少なくとも Exon 4 - 5 連結部分のアミノ酸配列（G1n A1a）を含み、その両端に付加される配列は特に限定されないが、配列番号：1に示すヒトタウ蛋白質の配列そのものを用いるのが好ましい。Exon 4 - 5 連結部分のアミノ酸配列の位置は特に限定されないが、該配列が中央部に位置することが好ましい。すなわち、抗原ポリペプチドとしては、連結部分のアミノ酸配列（G1n A1a）の両末端に1～8残基、好ましくは3～6残基程度のヒトタウ蛋白質の配列そのものを有するポリペプチドを含むものが好ましい。

その好ましい配列としては、具体的には、配列表の配列番号：1に記載のアミノ酸番号

121～128で表される配列を含むポリペプチドが挙げられる。さらに、配列番号：1のアミノ酸番号118～131で表される配列を有するポリペプチド（配列番号：3；以下、これを「ポリペプチド118-131」と称することがある）、配列番号：1のアミノ酸番号121～128で表される配列を有するポリペプチド（配列番号：4；以下、これを「ポリペプチド121-128」と称することがある）、配列番号：1のアミノ酸番号121～129で表される配列を有するポリペプチド（配列番号：5；以下、これを「ポリペプチド121-129」と称することがある）等がより好ましい具体的な配列として挙げられる。

本発明の抗体は、モノクローナル抗体でもポリクロナール抗体でもよいが、ポリクロナール抗体が好ましく用いられる。抗体調製の方法としては、それ自体公知の通常用いられる方法を用いることができる。例えば、ポリクローナル抗体を作製する場合には、B S A（牛血清アルブミン）、豚甲状腺グロブリン、K L H（キーホール・リンペット・ヘモシアニン）等の担体蛋白に、カルボジイミド、マレイミド等の適当な縮合剤を用いて前記抗原ポリペプチドを結合させ、免疫用の抗原（免疫原）を作製する。ここで、担体蛋白への抗原ポリペプチドの結合は、それ自体公知の通常用いられる方法により行えばよいが、例えばK L Hを担体蛋白として用いて、マレイミド化して抗原ポリペプチドを結合させる。この方法の場合には、K L Hに、好ましくはS u l f o - S M C C (S u l f o s u c c i m i d y l 4 - (N - m a l e i m i d o m e t h y l) c y c l o h e x a n e - 1 - c a r b o x y l a t e) 等の二官能性の縮合剤を反応させてマレイミド化し、これにアミノ末端又はカルボキシル末端のうち結合を生じさせたい方の末端にシステインを付加した抗原ポリペプチドを反応させれば、チオールを介して容易に結合して免疫用の抗原を調製することができる。また、カルボジイミドを用いた場合には、K L Hと抗原ポリペプチドとの脱水縮合によりペプチド結合を形成させて結合させることができる。

このように調製した免疫原を含む溶液を、必要に応じてアジュバントと混合し、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ等の、通常抗体の製造に用いられる動物の皮下又は腹腔に2～3週間毎に繰り返し免疫する。免疫した動物から採血し、血清を分離することによって抗血清が得られる。本発明においては、得られた抗血清を精製することなくそのまま用いることもできるが、以下の方法により精製して用いることもできる。抗体の精製方法としては、血清を熱処理して補体を失活させた後、硫酸アンモニウムを用いた塩析による方法、イオン交換クロマトグラフィー等によって、イムノグロブリン画分を精製する方法、あるいは、特定のポリペプチドを固定化したカラムを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製する方法が挙げられるが、このうち、アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いる方法が好ましい。ここで、カラムに固定化する精製用のポリペプチド（以下、これを「精製用ポリペプチド」と称することがある）としては、用いた抗原ポリペプチドのアミノ酸配列に応じて、それと同じ配列、もしくはその一部の配列を含むポリペプチドを選択して用いればよい。

抗原ポリペプチドと精製用ポリペプチドの組み合わせとしては、例えば、ポリペプチド118-131とポリペプチド121-128、ポリペプチド118-131とポリペプチド118-131、ポリペプチド121-128とポリペプチド121-129、ポリペプチド121-129とポリペプチド121-128等の組み合わせが挙げられ、これらの中でもポリペプチド118-131とポリペプチド121-128の組み合わせが好ましい。具体的には、まず、化学合成した抗原ポリペプチドを用い、上述の方法で免疫原を調製して、ウサギ等の動物を免疫する。該動物から、上述の方法に従って得られた抗血清を、精製用ポリペプチドを固定化したアフィニティーカラムにより精製すればよい。最も好ましい組み合わせとして、ポリペプチド118-131を抗原ポリペプチドとし、ポリペプチド121-128を精製用ポリペプチドとしてアフィニティ精製された抗体を調製する場合を例に挙げて、本発明の抗体の調製方法をより詳細に説明する。まず、キーホール・リンペット・ヘモシアニン（K L H）にS u l f o - S M C C (S u l f o s u c c i m i d y l 4 - (N - m a l e i m i d o m e t h y l) c y c l o h e x a n e - 1 - c a r b o x y l a t e) を反応させ、適当な緩衝液等で透析を行って、マレイ

ミド化 K L H を調製する。これに、アミノ末端にシステインを付加したポリペプチド 118 - 131 を化学合成により調製して反応させた後、生理的食塩水等で透析を行って免疫原とする。これをウサギ等に繰り返し免疫して抗血清を得て、ポリペプチド 121 - 128 を固定化したアフィニティーカラムに通して吸着させ、吸着した画分を適当な elution buffer 等で溶出させれば、アフィニティ精製された本発明の抗体を得ることができる。

また、モノクローナル抗体を作製する場合には、上記と同様の方法で免疫した動物の脾臓から抗体産生細胞を採取し、常法によって、ミエローマ細胞等の培養細胞と融合させてハイブリドーマを作製 (Koehler and Milstein, Nature, 256, 495 - 497 (1975)) し、そのハイブリドーマの培養液等から目的のエピトープを認識するモノクローナル抗体を選択すればよい。

かくして得られる抗体は、いずれも上記 Exon 4 - 5 連結部分のアミノ酸配列を認識する抗体であり、リン酸化の有無によらず中枢組織由来のタウ蛋白質と特異的に結合し、末梢組織由来のタウ蛋白質とは結合しない。このことは、脳等の中枢組織と、筋肉等の末梢組織の抽出物を用いて反応性を比較したり、もしくは、前記 Exon 4 - 5 連結部分に挿入される挿入配列、例えば、タウ蛋白質をコードする遺伝子の Exon 4A によりコードされるアミノ酸配列（配列番号：2）を有するポリペプチドとの反応性を解析すること等によって確認できる。

3. アルツハイマー病の検出を行う試料の調製

本発明において解析対象となる試料としては、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られる血液、脳脊髄液、尿等の体液等が挙げられるが、中でも特に血液が好ましい。試料の取得は、例えば、血液の場合には、アルツハイマー病の疑いのある個体の肘静脈等から採血管等によって採血し、好ましくは遠心分離等の方法により血漿又は血清を分離することによって得られる。また、脳脊髄液を試料とする場合は、アルツハイマー病の疑いのある個体から、例えば麻酔下の腰椎穿刺によって採取し、好ましくは遠心分離することによって得られる。

また、前記したアルツハイマー病以外の中枢組織から体液への中枢性タウ蛋白質の逸脱が起こり得る疾患についても、各疾患の疑いのある個体から同様に試料を得て、これ用いることができる。例えば、ダウン症、パーキンソン症候群、Pick 病、進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD) 等の疑いのある個体から得られる血液、脳脊髄液、尿等の体液等を用いることができる。

取得された試料は、試料中のタウ蛋白質の変化（分解、脱リン酸化等）や、血液の凝固等を防止するために、酵素阻害剤を試料採取時又は試料採取後に加えるのが好ましい。酵素阻害剤としては、脱リン酸化酵素阻害剤として、例えば、EDTA、EGTA、オカダ酸、ピロリン酸、リン酸塩、フッ化ナトリウム、-グリセロリン酸、及びシクロスボリン A 等が用いられ、また蛋白質分解酵素阻害剤として、例えば、アプロチニン、アンチペイント、ペプスタチン、ロイペプチジン、EDTA、EGTA、PMSF (フェニルメタンスルフォニルフルオリド)、TLC (トリシリルリシンクロロメチルケトン) 等が用いられる。

脱リン酸化酵素阻害剤としては、EDTA、EGTA が好ましい。また、試料へ添加する脱リン酸化酵素阻害剤の濃度は、試料中に存在する脱リン酸化酵素活性に対して阻害効果を有する濃度であれば特に制限されないが、脱リン酸化酵素阻害剤の種類によって、至適濃度の組み合わせを決定して用いればよい。例えば、EDTA、EGTA の場合には、通常 1 ~ 1000 mM、好ましくは 1 ~ 100 mM の範囲で用いる。蛋白質分解酵素阻害剤としては、アプロチニンが好ましい。また、試料へ添加する蛋白質分解酵素阻害剤の濃度は、試料中に存在する蛋白質分解酵素活性に対して阻害効果を有する濃度であれば特に制限されないが、例えば、アプロチニンの場合には、通常 0.1 μM ~ 1000 mM、好ましくは 1 μM ~ 100 mM の範囲で用いる。

これらのうち、本発明の試料として最も好ましくは、EDTA 及びアプロチニンが添加された採血管等を用いて採血を行い、得られた血液を遠心分離等で分離して取得した血漿

が用いられる。また、脳脊髄液を試料とする場合は、EDTA及びアプロチニンが添加されたサンプル管等を用いて採取された脳脊髄液を、そのまま中枢性タウ蛋白質の解析に供することもできる。これらの試料は、採取後、中枢性タウ蛋白質の解析に供するまで、例えば4℃以下で保存することが好ましく、より好ましくは-20℃以下で凍結保存するのが好ましい。

さらに、所望により、当該試料を蛋白質可溶化剤の存在下で変性処理をして夾雜蛋白質を除去（以下、これを「除蛋白」と称することがある）してから、これを試料として用いることも好ましい。特に試料として血液を用いる場合には、高濃度の夾雜蛋白質により抗原抗体反応が妨害される等の理由から、除蛋白を行うことが好ましい。少量の血液試料を用いる場合には、夾雜蛋白質による妨害が小さいために除蛋白の操作を省くことができるが、多量の血液試料を用いるために夾雜蛋白質の妨害が問題となる場合には、除蛋白の操作を行うことが好ましい。また、必要に応じてさらに濃縮を行った試料も本発明の方法の試料として用いることができる。10

上述の処理方法に用いられる蛋白質可溶化剤としては、水に溶けにくい蛋白質を溶かす作用を有するものであれば特に制限されないが、具体的には、例えばグアニジンもしくはその塩、スルフヒドリル基含有剤（以下、これを「SH基含有剤」と称することがある）、尿素、及び界面活性剤等が挙げられ、これらの物質は単独又は混合して用いられる。中でも、グアニジンの塩とSH基含有剤を組み合わせて用いるのが好ましい。用いられるグアニジンの塩としては、例えば、イソチオシアノ酸塩、塩酸塩、及び過塩素酸塩等の各種酸塩が挙げられ、これらの中で、グアニジンイソチオシアノ酸塩、グアニジン過塩素酸塩が好ましい。SH基含有剤としては、例えば、-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、及びN-アセチルシステイン等が挙げられ、中でも-メルカプトエタノールが好ましい。血液試料に含まれる蛋白質可溶化剤としての好ましいグアニジンの塩とSH基含有剤の組み合わせとしては、グアニジン過塩素酸塩と-メルカプトエタノール、グアニジンイソチオシアノ酸塩と-メルカプトエタノールの組み合わせが挙げられる。20

また、界面活性剤としては、Tween 20 (ICI Americas Inc.社製)、Triton X-100 (Rohm & Haas社製)、Nonidet P40 (Shell International Petroleum Company Ltd.社製)等が挙げられる。

本発明で用いられる蛋白質可溶化剤の濃度は、下限が通常0.01M、好ましくは0.1M、上限が10M、好ましくは6M程度が適当である。濃度範囲は、これら下限と上限の組み合わせから選ばれるが、通常0.01~10M、好ましくは0.1~6M程度の濃度が適当である。これらの濃度範囲は一つの目安であり、具体的には、蛋白質可溶化剤の種類及びその組合せによって至適濃度を決定して用いるのが好ましい。例えば、グアニジンの塩の濃度としては、通常1mM~6M、好ましくは0.5~1Mである。SH基含有剤の濃度としては、通常1mM~1M、好ましくは50~500mMである。界面活性剤の濃度としては、通常0.001~0.5% (v/v)、好ましくは0.01~0.2% (v/v)である。また、尿素の濃度は、通常2~10M、好ましくは5~7Mである。なお、本明細書において、濃度等の数値範囲は、特に明記しない限り上記と同様に例示されている数値範囲の下限と上限のそれぞれの組み合わせの範囲であってもよい。30

上記の蛋白質可溶化剤を血液試料に添加して、試料を2倍以上、好ましくは2~10倍に希釈した後、混合攪拌することにより、試料中の蛋白質を可溶化することができる。試料の希釈には、TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5))等の溶液が用いられる。40

次に、かくして蛋白質を溶解させた試料溶液中の夾雜蛋白質を変性させて、試料溶液から除去する。夾雜蛋白質を変性処理する方法としては、例えば、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、硫酸アンモニウム、尿素、有機溶媒等の蛋白質変性剤で処理する方法、界面を利用する方法、及び、加熱による方法等が単独又は組み合わせて用いられる。各々の処理条件は、試料溶液中に含まれる夾雜蛋白質が変性し、タウ蛋白質が変性しないような条件であればよい。これらの中でも、本発明においては、加熱による方法が好ましく用いら50

れ、特に好ましくは煮沸、即ち 100 °C に煮沸して加熱する方法が用いられる。また、0.2 M 以上の濃度の NaCl の存在下で煮沸を行うことがより好ましい。煮沸（加熱）時間は、通常 1 ~ 15 分、好ましくは 3 ~ 10 分である。煮沸の方法としては、温浴が好ましい。

可溶化及び変性処理された夾雜蛋白質は、それ自体既知の通常用いられる固液分離方法、例えば、膜分離法、遠心分離法等により分離し、除蛋白を行なうことができるが、遠心分離により分離を行うのが好ましい。煮沸により加熱して変性処理し、遠心分離を行なった場合には、タウ蛋白質は加熱による変性を受けず、遠心分離後の上清に回収される。

かくして取得される試料は、さらに必要に応じて、既知の方法に従って濃縮することによりタウ蛋白質の検出感度を上昇させることができる。濃縮の方法としては、例えば、限外濾過法、透析、ゲル濾過等により塩濃度を低下させた後、抗タウ蛋白質抗体を固定化した磁気ビーズ等を用いた免疫沈降によって特異的に濃縮する方法等が挙げられる。あるいは、固相抽出法によって濃縮することもできる。具体的には例えば、低分子量の炭化水素をシリカゲル等に固定化した一般的な抽出用固相に該試料を加え、固相にタウ蛋白質を保持させた後、洗浄によって塩等の夾雜物を除去する。次に有機溶媒もしくは水と有機溶媒との混合溶媒を流してタウ蛋白質を流出させて回収し、溶媒を除去することにより濃縮することができる。また、カラムクロマトグラフィー等によりイムノグロブリン - G を除去する行程も必要に応じ行なうことができる。カラムクロマトグラフィーには Protein G - Sepharose カラム等を用いるのが好ましい。

4. 中枢性タウ蛋白質の検出方法

本発明はまた、タウオパチーの疑いのある個体から得られた試料中の中枢性タウ蛋白質の存在を、本発明の抗体を用いて解析することを特徴とするタウオパチーの検出方法に関する。タウオパチーとは、中枢組織にタウ蛋白質が蓄積して神経変性を生じる疾患であるが、例えばアルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン症候群、Pick 病、進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD) 等が挙げられる。本発明の検出方法は、より好適にはアルツハイマー病の検出に用いられる。

以下、アルツハイマー病の検出を例に挙げて説明する。すなわち、アルツハイマー病の疑いのある個体から取得され、所望により蛋白質の可溶化及び夾雜蛋白質の変性処理、除蛋白、濃縮等の処理を施された試料溶液について、本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体を用いて中枢性タウ蛋白質の存在を解析する。中枢性タウ蛋白質の存在の解析は、本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体を用いて行われるものであれば特に限定されず、試料と中枢性タウ蛋白質特異的抗体との反応性、すなわち試料中に含まれる蛋白質と該抗体との免疫反応を、陽性コントロールと該抗体との免疫反応と比較することのできる方法であればよい。濃度既知の陽性コントロールを用いて得られる結果と、試料を用いて得られる結果を比較することにより、試料中の中枢性タウ蛋白質量を求めることができる。

本発明の抗体とアルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料中の蛋白質の免疫反応による解析は、生化学実験法 11 「エンザイムイムノアッセイ」 (Tijssen P. 著、東京化学同人)、"Antibodies: A LABORATORY MANUAL" (Ed Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) 等の実験書に記載のそれ自体既知の通常用いられる方法で行なうことができる。具体的には、例えば、免疫プロット法、酵素免疫測定法 (ELISA 法) 等のサンドイッチ法、競合法等が挙げられる。

サンドイッチ法等により中枢性タウ蛋白質を解析する場合に、本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体と組み合わせて用いる抗体としては、本発明の抗体とは異なるエピトープを認識する抗体であって、タウ蛋白質をアイソフォーム非特異的に認識する抗体（以下、これを「非特異的抗タウ蛋白質抗体」と称することがある）が好ましく用いられる。具体的には、例えば、Innogenetics 社より市販されている抗タウ蛋白質モノクローナル抗体 HT7 (タウ蛋白質のアミノ酸番号 159 - 163 に結合)、及び BT2 (タウ蛋白質のアミノ酸番号 193 - 198 に結合) 等が挙げられる。

非特異的抗タウ蛋白質抗体は、リン酸化非特異的にタウ蛋白質を認識する抗体であるこ

とが好ましい。該抗体とアルツハイマー病に特異的なリン酸化部位がリン酸化されているタウ蛋白質を認識する抗体とを組み合わせて用いれば、さらにアルツハイマー病に特異的な変化を検出することができる。そのような抗体としては、例えば、WO 97 / 34145号公報に記載されている抗リン酸化タウ蛋白質抗体、又は該公報の記載に準じて調製される抗タウ蛋白質抗体として、抗PS199、抗PS202、抗PT205、抗PT231、抗PS235、抗PS262、抗PS396、抗PS404、抗PS413、抗PS422、抗タウ154-168等を挙げることができる。

免疫プロット法等により、本発明の抗体が中枢性タウ蛋白質を特異的に認識し、かつ末梢性タウ蛋白質を認識しないことを利用して中枢性タウ蛋白質の存在を解析する場合には、例えば、末梢性タウ蛋白質を特異的に認識する抗体（以下、これを「末梢性タウ蛋白質特異的抗体」と称することがある）を用いて得られる結果と比較すればさらに確実な解析を行うことができる。末梢性タウ蛋白質特異的抗体としては、例えば、タウ蛋白質をコードする遺伝子のExon4Aによりコードされるアミノ酸配列（配列番号：2）の全部もしくは一部を有するポリペプチドを抗原として得られる抗体が挙げられる。具体的には、例えば、配列表の配列番号：6に記載のアミノ酸配列のアミノ末端にシステインを導入したポリペプチドをKLHに結合させた免疫原を用いて得られる抗体（以下、これを「抗Exon4A抗体」と称することがある）を挙げることができる。抗体の作製方法としては、前記した中枢性タウ蛋白質特異的抗体と同様に、それ自体公知の通常用いられる方法を用いることができる。かくして作製される抗Exon4A抗体は、リン酸化の有無によらず、Exon4Aによりコードされるアミノ酸配列を挿入配列として有する末梢性タウ蛋白質と特異的に結合する。

ここで、ELISA法により試料中の中枢性タウ蛋白質の存在を解析する場合を例に挙げて、以下に説明する。

まず、本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体又は非特異的抗タウ蛋白質抗体のいずれかを固相化用抗体として96穴ELISAプレートに固相化し、上記3.に記載の方法により得られる試料を加えて、試料中のタウ蛋白質を固相に結合させる。次に、結合したタウ蛋白質を検出するための検出用抗体として、非特異的抗タウ蛋白質抗体又は本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体のうち、固相化した抗体と別のものを加えてインキュベートする。ここで用いられる抗体の組み合わせとしては、前記したようなものが挙げられるが、通常、目的の測定対象に対してより特異性の高い抗体、すなわちここでは中枢性タウ蛋白質特異的抗体を固相化し、特異性が低く反応性が広範な抗体、すなわちここでは非特異的抗タウ蛋白質抗体を検出用として用いることが好ましい。ただし、用いる各抗体のアフィニティ（親和性）の高さ等を鑑みて、逆にして用いることもできる。

インキュベートを行った後、洗浄液で洗浄し、検出用の抗体を認識し、かつ標識物質で標識化された抗体、例えば酵素標識抗ウサギIgG抗体等を反応させる。又は、検出用抗体にあらかじめビオチン等を結合させておき、これに酵素標識ストレプトアビジン等を反応させる。洗浄液で洗浄後、固相に結合した標識物質の活性を測定し、濃度既知の陽性コントロールを用いて得られた結果と比較することによって、試料中の中枢性タウ蛋白質量を測定することができる。

次に、解析法の他の例として、免疫プロット法により試料中の中枢性タウ蛋白質の存在を検出する方法を例に挙げて以下に説明する。

上記3.に記載の方法により得られる試料に、適当な処理液、例えばLaemmeliのサンプル処理液(0.125M Tris-HCl(pH 6.8)、4% SDS、20%グリセロール、20μg/mL BPPB、0.7M -メルカプトエタノール)等を加えて加熱処理する。これを7~15%程度のポリアクリラミドゲルでLaemmeliの方法(Nature, 227, 680-685 (1970))により電気泳動し、セミドライプロッター等の通常用いられる蛋白質転写装置により、PVDF(Polyvinylidene difluoride)膜等の通常蛋白質の転写に用いられる膜に転写する。

得られた膜をスキムミルク等の蛋白溶液でブロッキングした後、これに、中枢性タウ蛋白質特異的抗体を用いてインキュベートする。

10

20

30

40

50

白質特異的抗体を反応させる。膜を洗浄して未反応の該抗体を除去した後、あらかじめ標識物質を結合させた二次抗体を反応させる。標識物質が、例えば、酵素等のそれ自体はシグナルを発する性質を有していない物質の場合には、反応後の膜を洗浄して未反応の二次抗体を除去した後、標識物質と特異的に反応してシグナルを発する基質等の物質を反応させ、該物質より発せられるシグナルを検出する。その検出結果と、濃度既知の陽性コントロールを用いて得られた結果とを比較することにより、試料中のタウ蛋白質の存在量を知ることができる。標識物質として用いられる酵素としては、アルカリフェオヌクターゼ、Horse radish peroxidase (以下、これを「HRP」と称することがある) 等が挙げられる。また、シグナルの検出方法としては、化学発光法、発色法等が挙げられ、中でも化学発光法が好ましく用いられる。

10

標識物質が、例えば、蛍光物質、放射性物質等のそれ自体シグナルを発する性質を有する物質の場合には、反応後の膜を洗浄して未反応の二次抗体を除去した後、標識物質より発せられるシグナルを検出し、その検出結果と濃度既知の陽性コントロールを用いて得られた結果とを比較することにより、試料中のタウ蛋白質の存在量を知ることができる。

また、このような検出において、試料等から持ち込まれる抗体による影響を除くために、抗原抗体反応ではない特異的結合能を持つ物質による反応を利用することもできる。特異的結合能を持つ物質としては、例えば、ビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン抗体等の組み合わせが用いられ、ビオチンとストレプトアビジンの組み合わせが特に好ましい。

20

本発明の検出方法において用いられる陽性コントロールとしては、本発明の中核性タウ蛋白質特異的抗体と特異的に結合するものであればいずれのものであってもよく、例えば、配列表の配列番号：1に記載のアミノ酸番号124と125の間に挿入配列を有しないタウ蛋白質等が挙げられる。また、タウ蛋白質をコードする遺伝子のExon4によりコードされるアミノ酸配列とExon5によりコードされるアミノ酸配列の連結部分（Exon4-5連結部分）のアミノ酸配列を含む部分断片等でもよい。具体例としては、ヒト、ラット等の中核組織より精製したタウ蛋白質、遺伝子組み換えによって調製したタウ蛋白質、それらの部分断片、合成されたペプチド等が挙げられる。

組織からのタウ蛋白質の精製方法としては、それ自体公知の通常用いられる方法を用いることができるが、例えば、脳組織からは、Journal of Neuroscience Research, 25, 412-419 (1990) に記載の方法等に準じて行うことができる。また、遺伝子組み換えタウ蛋白質についても、それ自体公知の方法に従って調製されるが、例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列の全長を有するものでも、その一部を有するものでも、本発明の抗体と特異的に結合するものであれば用い得る。その一部のアミノ酸配列としては、例えば、タウ蛋白質のアミノ末端側1-249（配列番号：1のアミノ酸番号1～249）を有する部分断片、また該部分断片のアミノ酸番号45-102に相当する挿入配列を有さない部分断片（配列番号：7；これを「最短タウN側フラグメント」と称することがある）等、Exon4-5連結部分を含むものが好ましく用いられる。さらに、必要に応じて市販のキット（フィノスカラーhTAU又はINNOTESt hTAU Ag；Innogenetics社製）に含まれる標準品を用いることもできる。

30

陽性コントロールとして用いるタウ蛋白質あるいはペプチドは、例えば、凍結乾燥粉末として保存したり、適当な緩衝液等に溶解し、小分けして凍結保存が好ましい。例えば、該粉末1mgを100μLのTBST (150mM NaCl、0.05% Tween 20を含有する20mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5))に溶解し、10～20μLずつ小分けして凍結保存することができる。

40

このようにして、アルツハイマー病の疑いのある個体について、該個体から得られた試料中の中核性タウ蛋白質の量を測定し、健常者から得られる試料中の該蛋白質の量と比較して有意に多い場合に、その個体はアルツハイマー病であると判定することができる。また、健常者から得られる試料において測定された中核性タウ蛋白質の量と、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料中の該蛋白質の量とに差がない場合、その個体は

50

アルツハイマー病ではないと判定することができる。このような比較は、比較に用いるそれぞれの個体から得られる同種の試料を用いて行うことが好ましい。

アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料中の中枢性タウ蛋白質の量と、健常者から得られる試料中の該蛋白質の量との比較において、健常者から得られる試料中の該蛋白質の量としては、あらかじめ複数の試料を用いて測定を行って得られた平均値を用いてもよい。このような平均値は、試料を得た個体の年齢を加味した値であることが望ましい。ここで、「有意に多い」とは、例えば、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料中に含まれる中枢性タウ蛋白質の量が、健常者から得られる試料中に含まれる該タウ蛋白質の量に比較して、例えば2倍以上である場合に、その個体はアルツハイマー病であると判定される。また、標準偏差等を求めて、統計学的解析により有意差があるか否かを判定してもよい。10

また、例えば、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られる試料と、健常者から得られる試料のそれぞれに含まれる中枢性タウ蛋白質の量の平均的な数値が得られている場合には、判定のための閾値を設定し、測定した試料にこの値を超える量の中枢性タウ蛋白質が含まれていた場合には、その個体はアルツハイマー病であると判定することができる。このような閾値は、試料を得た個体の年齢を加味して設定されることが望ましい。さらに、同一の年齢群の健常者から得られる試料の中枢性タウ蛋白質の量が検出限界以下であり、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料中に中枢性タウ蛋白質が検出された場合に、その個体はアルツハイマー病であると判定することができる。

また、同様にして、前記したようなアルツハイマー病以外の各種疾患についても、検出された中枢性タウ蛋白質の量に基づいて判定を行うことができる。20

5. 試薬キット

本発明の試薬キットは、少なくとも、中枢性タウ蛋白質特異的抗体を含み、通常の免疫反応を利用したキットに準じた構成によって提供される。さらに任意の要素として、洗浄液、検出用標識化抗体、蛋白質可溶化剤を含有する前処理液、陽性コントロール、希釈液、蛋白質変性剤、濃縮用器具又は試薬等を含む。

具体的には、例えば、ELISA法に適用されるキットの場合、少なくとも、本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体を含み、さらに、固相化抗タウ蛋白質抗体、標識化抗IgG抗体を含み、任意の要素として蛋白質可溶化剤を含有する前処理液等を含む。また、競合法に適用されるキットの場合には、標識化タウ蛋白質、中枢性タウ蛋白質特異的抗体等を含み、任意の要素として蛋白質可溶化剤を含有する前処理液等を含む。ラテックスを用いたサンドイッチ法に適用されるキットの場合には、少なくとも、中枢性タウ蛋白質特異的抗体又は抗タウ蛋白質抗体が固相化された磁性ラテックスを含み、標識化された検出用抗体を含み、任意の要素として蛋白質可溶化剤等を含む。ラテックスを用いた競合法に適用されるキットの場合、少なくとも、中枢性タウ蛋白質特異的抗体が固相化された磁性ラテックス、標識化タウ蛋白質を含み、任意の要素として蛋白質可溶化剤を含む前処理液を含む。30

このような試薬キットを用いることにより、本発明のアルツハイマー病の検出方法をより迅速、簡便に行うことができる。

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

なお、下記の実施例において、「TBS」は、150 mM NaClを含有する20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)、「TBST」は0.05% Tween 20を含有するTBSである。

また、下記の実施例において調製した中枢性タウ蛋白質特異的抗体については、特に明記しない限り、ポリペプチド118-131を抗原としポリペプチド121-128によりアフィニティ精製された抗体を「抗Exon 4-5(118-131)抗体(121-128精製)」、ポリペプチド118-131を抗原としポリペプチド118-131によりアフィニティ精製された抗体を「抗Exon 4-5(118-131)抗体(118-131精製)」40

- 131 精製)」、ポリペプチド 121 - 128 を抗原としポリペプチド 121 - 129 によりアフィニティ精製された抗体を「抗 Exon 4 - 5 (121 - 128) 抗体 (121 - 129 精製)」、ポリペプチド 121 - 129 を抗原としポリペプチド 121 - 128 によりアフィニティ精製された抗体を「抗 Exon 4 - 5 (121 - 129) 抗体 (121 - 128 精製)」と表記する。さらに、抗タウ蛋白質モノクローナル抗体 HT7 (タウ蛋白質のアミノ酸番号 159 - 163 に結合) は、Innogenetics 社から購入して用いた。

実施例 1 . 抗体の調製及び評価

中枢性タウ蛋白質特異的抗体は、WO 97 / 34145 号公報の記載に準じて次の通り調製した。抗原ポリペプチドとして、ポリペプチド 118 - 131 (配列番号 : 3)、121 - 128 (配列番号 : 4)、121 - 129 (配列番号 : 5) の 3 種を用いた。得られた抗血清は、それぞれ特定の精製ポリペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて精製して、各抗体の特異性をドットプロット分析によって確認した。

(1) 抗 Exon 4 - 5 (118 - 131) 抗体

ポリペプチド 118 - 131 (配列番号 : 3) のアミノ末端にシステインを付加したものを抗原ポリペプチドとして化学合成し、キーホール・リンベットのヘモシアニン (KLH) に結合させ、ウサギに繰り返し免疫することで抗血清を得た。具体的には、まず、KLH (凍結乾燥品 ; Pierce 社製) 35 mg を 7 mL の純水に溶解して緩衝液 (83 mM リン酸緩衝液、0.9 M NaCl (pH 7.2)) とし、これに Sulfo-SMCC (Sulfonyl succimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate ; Pierce 社製) 43.75 mg を DMSO (dimethyl sulfoxide) 0.4 mL に溶解したものを加えた。室温 (25°) で 1 時間反応させ、100 mM EDTA、0.9 M NaCl を含有する 83 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 4° で一晩透析して未反応及び分解した試薬を除去することにより、マレイミド化 KLH を調製した。次に、透析内液 (マレイミド化 KLH) に抗原ポリペプチド (ポリペプチド 118 - 131 のアミノ末端にシステインを付加したポリペプチド) 16.2 mg を加えて室温 (25°) にて 1 時間反応させた。これを生理的食塩水にて、4° で一晩透析した後、生理的食塩水で 17.5 mL に調整して免疫用の抗原 (免疫原) とした。

得られた免疫原をウサギに繰り返し免疫して抗血清を得て、これを 2 種類の精製用ポリペプチド (ポリペプチド 121 - 128、及び、ポリペプチド 118 - 131 のアミノ末端にシステインを付加したもの) がそれぞれ固定化されたカラムに通して吸着させ、吸着した画分を Pierce 社の gentle elution buffer で溶出することで、アフィニティ精製された中枢性タウ蛋白質特異抗体 (抗 Exon 4 - 5 (118 - 131) 抗体 (121 - 128 精製)、及び、抗 Exon 4 - 5 (118 - 131) 抗体 (118 - 131 精製)) を得た。得られた抗体の特異性の確認は、酵素免疫測定法 (ELISA) 及び後述するドットプロット分析によって、各抗原ペプチドや陽性コントロールへの結合を確認することにより行った。

ELISA は、抗タウ蛋白質モノクローナル抗体 HT7 (Innogenetics 社製) を固定化した 96 穴プレートに、Brain Res., 737, 119 - 132 (1996) に記載の方法に準じて調製した組換え最短タウ N 側フラグメント (配列番号 : 7) を加えてインキュベーションした後、洗浄した。次に、上記のようにして得られた 2 種類の抗体をそれぞれ加えてインキュベーションした後、洗浄した。さらに、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (山羊) を二次抗体として反応させた後、洗浄した。固相の HRP 活性を測定した結果、組換最短タウ N 側半分の濃度に応じて酵素活性 (HRP 活性) が増加したことによって、得られた 2 種の抗体がいずれも組換最短タウ N 側半分と結合することを確認した。

(2) 抗 Exon 4 - 5 (121 - 128) 抗体

ポリペプチド 121 - 128 (配列番号 : 4) を化学合成し、抗体の調製に用いた。まず、豚甲状腺グロブリン (凍結乾燥品 ; Sigma 社製) 39 mg を 4 mL の純水に溶解

し、これに合成したポリペプチド 121-128 を 1.4 mg 加え、0.1 標定水酸化ナトリウムを適量加えて pH 6.5 に合わせた。これにさらに水溶性カルボジイミド塩酸塩 76.7 mg を加えて、4 度で一晩反応させた。生理的食塩水にて、4 度で一晩透析した後、生理的食塩水で 19.5 mL として免疫用の抗原（免疫原）を得た。これをウサギに繰り返し免疫して、得られた抗血清を、ポリペプチド 121-129（配列番号：5）にアミノ末端にシステインを付加したポリペプチドを固定化したカラムに通して吸着させ、吸着された画分を Pierce 社の gentle elution buffer で溶出して、アフィニティ精製された抗体（抗 Exon 4-5 (121-128) 抗体 (121-129 精製)）を得た。得られた抗体の特異性は、後述するドットプロット分析によって確認した。

10

(3) 抗 Exon 4-5 (121-129) 抗体

ポリペプチド 121-129（配列番号：5）のアミノ末端にシステインを付加したポリペプチドを化学合成し、これをマレイミド活性化 K L H（凍結乾燥品； Pierce 社製）20 mg を 4 mL の純水に溶解して調製した溶液（83 mM リン酸緩衝液、0.9 M NaCl、0.1 M EDTA (pH 7.2)）に 6.5 mg 加えた。室温（25 度）で 1 時間反応させ、4 度で一晩さらに反応させた後、生理的食塩水にて、4 度で一晩透析した。生理的食塩水で 10 mL に調整して免疫用の抗原（免疫原）とした。これをウサギに繰り返し免疫して得られた抗血清を、ポリペプチド 121-128（配列番号：4）を固定化したカラムに通して吸着させ、吸着された画分を Pierce 社の gentle elution buffer で溶出して、アフィニティ精製された抗体（抗 Exon 4-5 (121-129) 抗体 (121-128 精製)）を得た。得られた抗体の特異性は、後述するドットプロット分析によって確認した。

20

(4) ドットプロット分析による抗体の評価

上記（1）～（3）で調製した 4 種の抗体について、ドットプロット分析による特異性の評価を行った。

まず、PVDF 膜に、組換え最短タウ N 側フラグメント及び各種ポリペプチドの DMSO 溶液（10 pmol / 0.5 μL）を抗原としてドットした。用いた抗原は、組換え最短タウ N 側フラグメント、化学合成したポリペプチド 24-36（配列番号：8）、ポリペプチド 118-131（配列番号：3）のアミノ末端にシステインを付加したもの、ポリペプチド 121-128（配列番号：4）、ポリペプチド 121-129（配列番号：5）のアミノ末端にシステインを付加したもの、タウ蛋白質の Exon 4A によりコードされるアミノ酸配列の部分配列を有するポリペプチド（配列番号：6）、ポリペプチド 134-144（配列番号：9）のアミノ末端にチロシンを付加したもの、ポリペプチド 154-156（アミノ酸配列； Pro - Arg - Gly）のアミノ末端にシステインを付加したもののが 8 種類である。

30

膜を風乾後、5% スキムミルクを含む TBS 10 mL で 1 時間ブロッキングしてから、膜を TBS-T 20 mL で 5 回洗浄した。得られた膜に、上記（1）～（3）で調製した抗体を 5% スキムミルクを含む TBS-T 5 mL に 500 ng / mL になるように溶解して加えて、湿箱中で 4 度で一晩反応させた。用いた抗体は、抗 Exon 4-5 (118-131) 抗体 (121-128 精製)、抗 Exon 4-5 (118-131) 抗体 (118-131 精製)、抗 Exon 4-5 (121-128) 抗体 (121-129 精製)、及び抗 Exon 4-5 (121-129) 抗体 (121-128 精製) の 4 種類である。

40

反応後の膜を TBS-T 20 mL で 5 回洗浄し、5% スキムミルクを含む TBS-T 10 mL にアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体溶液（シンプルステイン MAX-AP；ニチレイ社製）を 0.25 mL 加えて、湿箱中で 1 時間室温で反応させた。膜を TBS-T 20 mL で 5 回洗浄して未反応の標識抗体を除去した。さらに膜を TBS 20 mL で 2 回洗った後、湿箱中に膜を入れ、アルカリフォスファターゼ基質用緩衝液（100 mM Tris-HCl (pH 9.5)、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂）10 mL に浸漬した。これに、基質として、NBT 溶液（50 mg / mL nitro

50

o b l u e t e t r a z o l i u m / 7 0 % d i m e t h y l f o l m a m i d e 溶液 ; P r o m e g a 社製) 6 6 μ L を加えて混合し、さらに B C I P 溶液 (5 0 mg / mL 5 - b r o m o - 4 - c h l o r o - 3 - i n d o l y l - p h o s p h a t e / 7 0 % d i m e t h y l f o l m a m i d e 溶液 ; P r o m e g a 社製) 3 3 μ L を加えて混合した。室温で 30 分間反応させた後、膜を T B S T 2 0 mL で 3 回洗浄して未反応の基質を除去した。その結果、図 1 に示したように各抗体の特異性が確認された。

ここで、図 1 から明らかなように、抗 E x o n 4 - 5 (1 1 8 - 1 3 1) 抗体 (1 2 1 - 1 2 8 精製) が組み換えタウ蛋白質と最も強く反応していた。 E x o n 4 - 5 連結部分に対する特異性がより高いと考えられた抗 E x o n 4 - 5 (1 2 1 - 1 2 8) 抗体 (1 2 1 - 1 2 9 精製) は、組み換えタウ蛋白質との反応性が低かった。一方、抗 E x o n 4 - 5 (1 2 1 - 1 2 9) 抗体 (1 2 1 - 1 2 8 精製) は、抗原ペプチドよりも組み換えタウ蛋白質との反応性が高く、有望な抗体と考えられた。以下の検討においては、組み換えタウ蛋白質と最も良く反応した抗 E x o n 4 - 5 (1 1 8 - 1 3 1) 抗体 (1 2 1 - 1 2 8 精製) を用いることとした。

実施例 2 . ヒト脳脊髄液中の中枢性タウ蛋白質の E L I S A による検出

上記実施例 1 . で選択した抗 E x o n 4 - 5 (1 1 8 - 1 3 1) 抗体 (1 2 1 - 1 2 8 精製) を用いて、脳脊髄液を試料とし、酵素免疫測定法 (E L I S A) による解析を行った。また、 I nn o g e n e t i c s 社から市販されているタウ蛋白質測定キット (フィノスカラー h T A U 又は I N N O T E S T h T A U A g) を用いて測定を行い、本発明の抗体を用いた方法と比較した。

(1) ヒト脳脊髄液 (C e r e b r o s p i n a l F l u i d ; C S F) の取得

試料となる脳脊髄液としては、アルツハイマー病 (A D) の疑いのある個体、及び、痴呆ではない神経疾患 (コントロール ; C T L) の個体から、インフォームドコンセントの後に麻酔下の腰椎穿刺によって採取されたものを、遠心分離を行って上清を用いた。

(2) 抗ヒトタウ蛋白質抗体の固相化

9 6 穴 E L I S A プレートに、抗ヒトタウ蛋白質モノクローナル抗体 H T 7 の 0 . 1 M 炭酸ナトリウム緩衝溶液 (p H 9 . 0) を各ウェルに 0 . 1 mL ずつ加え、湿潤箱中で 4 、 3 時間インキュベートして固相化した。溶液を除去した後、 0 . 1 M 炭酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、 1 % B S A 、 1 % スキムミルク、 0 . 5 % ゼラチンを含む P B S (1 0 mM リン酸ナトリウム、 1 5 0 mM N a C l (p H 7 . 4)) 溶液を 0 . 2 mL 加えて、 4 で 2 時間ブロッキングした。プレートは、洗浄液 (2 0 mM T r i s - H C l (p H 7 . 4) 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0) で洗浄後、直ちに用いた。すぐに使わない場合にはさらに純水で洗浄し、真空乾燥してラミネート袋に入れ、 4 に保存した。

(3) 本発明の抗体を用いた E L I S A による脳脊髄液中の中枢性タウ蛋白質の測定

W O 9 7 / 3 4 1 4 5 号公報に記載の方法に準じて、次の通り中枢性タウ蛋白質を測定し、市販のタウ蛋白質測定キット (I nn o g e n e t i c s 社製 : 日本国内の名称「フィノスカラー h T A U 」、欧米における名称「 I N N O T E S T h T A U A g 」) を用いて測定したタウ蛋白質の濃度と比較した。

タウ蛋白質のアミノ酸番号 1 - 2 4 9 をコードする遺伝子のうち、アミノ酸番号 4 5 - 1 0 2 で表される挿入配列を含まない部分を大腸菌に組み込んで得られた遺伝子組換え最短タウ N 側フラグメント (配列番号 : 7) を市販のタウ蛋白質測定キット (I nn o g e n e t i c s 社製 : 日本国内の名称「フィノスカラー h T A U 」、欧米における名称「 I N N O T E S T h T A U A g 」) によって測定し、値付けをした。この最短タウ N 側フラグメントを陽性コントロールとし、アッセイ緩衝液 (0 . 1 % B S A 、 1 mM E D T A 、 1 mM E G T A 、 2 0 mM T r i s - H C l (p H 7 . 4) 、 0 . 1 5 M N a C l 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0) で各種濃度に希釈して、各濃度の溶液 5 0 μ L ずつを上記 (2) で調製した E L I S A プレートのウェルに加えた。また、上記 (1) で得られた脳脊髄液を、同様にそれぞれ 5 0 μ L ずつ E L I S A プレートのウェルに加えた。次いで、濃度既知の陽性コントロール又はヒト脳脊髄液が入った各ウェルに、上記実施例 1 . で調製した抗 E x o n 4 - 5 (1 1 8 - 1 3 1) 抗体 (1 2 1 - 1 2 8 精製) を、

100 ng / mL (1% 正常山羊血清、1% 正常マウス血清含有アッセイ緩衝液) の濃度で 50 μL 加え、プレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、4℃ で一晩インキュベートした。

プレートを洗浄液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、0.05% Tween 20) で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体溶液 (シンプルステインMAX-PO; ニチレイ社製) を 1% 正常山羊血清、5% スキムミルク、1% 正常マウス血清含有のアッセイ緩衝溶液で希釈し、各ウェルに 100 μL ずつ加えて、プレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、さらに 4℃ で 1 時間インキュベートした。再び上記洗浄液で洗浄後、TMB (3', 3', 5', 5' - Tetramethylbenzidine) 2.64 mg を秤取し、DMSO 0.1 mL に溶解してから 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.4) 10 mL に加え、これに 30% 過酸化水素水を 3.3 μL 添加して基質溶液を調製し、この基質溶液を各ウェルに 0.1 mL ずつ加えて、固相に結合した HRP と室温で 30 ~ 40 分間反応させて発色させた。1 規定硫酸 0.1 mL ずつを加えて反応を停止させ、プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定して、中枢性タウ蛋白質の濃度を求めた。

(4) 市販キットを用いた脳脊髄液中のタウ蛋白質の測定

次に、市販されているタウ蛋白質測定キット (Innogenetics 社製：日本国内の名称「フィノスカラー hTau」、欧米における名称「INNOTESt hTau Ag」) を用いて測定を行った。上記(3)で使用したものと同一のサンプル各 25 μL を使用し、手順は全てキットに収載の方法に従ってタウ蛋白質濃度を測定した。

(5) 測定結果の解析

上記(3)及び(4)で得られた結果を解析し、表1に示した。

表1. アルツハイマー病患者(AD)と非痴呆者(CTL)の脳脊髄液(CSF)中の中枢性タウ蛋白質(a)及びタウ蛋白質(b)の濃度(fmol/ml; pM)

患者 No.	中枢性タウ蛋白質(a)	タウ蛋白質(b)	a/b
AD1	32.74	5.1	6.42
AD2	48.94	10.0	4.89
AD3	74.64	11.4	6.55
AD4	52.07	11.1	4.69
CTL1	10.41	検出せず(<0.5)	—
CTL2	13.67	検出せず(<0.5)	—

表1から明らかなように、抗Exon 4-5 (118-131) 抗体 (121-128 精製) は、アルツハイマー病(AD)の疑いのある個体と、痴呆ではない神経疾患(コントロール; CTL)の個体から得た試料とを明確に識別することができた。その測定結果は市販キットと一致していたが、中枢性タウ蛋白質を検出する感度は該キットに比べて非常に高いことがわかった。これらのことから、本発明の抗体は、アルツハイマー病の検出に非常に有用であることが示された。

実施例3. ヒト脳及び筋肉組織中の中枢性タウ蛋白質のELISAによる検出

(1) 試料の調製

脳組織の試料としては、アルツハイマー病患者の剖検時に得られた脳組織(東京都老人医療センター・嶋田裕之博士から 1990 年に分与された)から、WO97/34145 号公報に記載の方法 (H. Ksieczak-Reding et al., Journal of Neuroscience Research, 25, 412-419, 420-430 (1990) に記載の方法に準じた方法) に従ってタウ蛋白質の抽出及び精製を行ったものを用いた。筋肉組織の試料としては、市販のヒト筋肉組織抽出物 (Cat No. #7804-1; CLONTECH Laboratories, Inc. 製) を

用いた。

これらの試料を用いて、上記実施例2と同様にして酵素免疫測定法(ELISA)による測定を行うこととした。

(2) 抗ヒトタウ蛋白質抗体の固相化

実施例2(2)と同様にして、96穴ELISAプレートに抗ヒトタウ蛋白質モノクローナル抗体HT7を固相化した。

(3) 本発明の抗体を用いたELISAによる脳及び筋肉組織中の中枢性タウ蛋白質の測定

実施例2(3)と同様にして、次の通り中枢性タウ蛋白質を測定し、Innogenetic社製タウ蛋白質測定キットを用いて測定した結果と比較した。

陽性コントロールとしては、上記実施例2(3)において値付けされた遺伝子組換え最短タウN側フラグメント(配列番号:7)を用いた。値付けされた最短タウN側フラグメントを、アッセイ緩衝液(0.1%BSA、1mM EDTA、1mM EGTA、20mM Tris-HCl(pH 7.4)、0.15M NaCl、0.05% Tween 20)で各種濃度に希釈して希釈系列を調製し、50μLずつ上記(2)で調製したELISAプレートのウェルに加えた。また、上記(1)において調製した脳及び筋肉組織抽出液についてもそれぞれアッセイ緩衝液にて系列希釈し、同様に50μLずつELISAプレートのウェルに加えた。

試料として、濃度既知の陽性コントロール又は組織抽出液のいずれかが入った各ウェルに、抗Exon4-5(118-131)抗体(121-128精製)(100ng/mL; 1%正常山羊血清、1%正常マウス血清含有アッセイ緩衝液中)を50μLずつ加え、プレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、4℃で1晩インキュベートした。反応後、洗浄液(20mM Tris-HCl(pH 7.4)、0.15M NaCl、0.05% Tween 20)で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(シンプルスティンMAX-PO;ニチレイ社製)を前記アッセイ緩衝液で希釈したものを各100μL加えて、プレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、4℃で1時間インキュベートした。

洗浄液で洗浄後、TMB(3,3',5,5'-Tetramethyl Benzidine)2.64mgを秤取し、DMSO(Dimethyl sulfoxide)0.1mLに溶解後、0.1Mクエン酸緩衝液(pH 4.4)10mLに加え、30%過酸化水素水を3.3μL添加して基質溶液を調製したものを0.1mLずつ加えて、固相に結合したHRPと室温で30~40分間反応させて発色させた。1規定硫酸0.1mLを加えて反応を停止させ、プレートリーダーで450nmの吸光度を測定して、中枢性タウ蛋白質の濃度を求めた。

(4) 市販のキットを用いた脳及び筋肉組織中のタウ蛋白質の測定

上記(1)において調製した試料について、市販のタウ蛋白質測定キット(Innogenetics社製:日本国内の名称「フィノスカラ-hTau」、欧米における名称「INNOTEST hTau Ag」)を用いてタウ蛋白質濃度を測定した。試料は各25μL使用し、キット収載の方法に従って測定した。

(5) 測定結果の解析

上記(3)及び(4)の結果を解析し、表2に示した。

10

20

30

40

表2. アルツハイマー病患者(AD)の脳抽出液と健常者(CTL)の筋肉抽出液中の中枢性タウ蛋白質(a)及びタウ蛋白質(b)の濃度(pmol/ml; nM)

	中枢性タウ蛋白質(a)	タウ蛋白質(b)	a/b
AD脳抽出液	412	35	11.8
CTL筋肉抽出液	1.8	1.0	1.8
脳/筋肉	229	35	—

表2から明らかなように、本発明の抗Exon4-5(118-131)抗体(121-128精製)を用いた測定法は、タウ蛋白質への反応性は従来の市販キットと同程度であるのに対し、中枢性タウ蛋白質との非常に強い反応を示した。中枢性タウ蛋白質に対する反応性は従来のキットの10倍以上であった。この結果から、本発明の抗体が筋肉や血液等の末梢組織中に含まれる末梢性タウ蛋白質には反応せず、これらの妨害を受けずに、中枢性タウ蛋白質を特異的に高感度で検出できることが示された。

実施例4.ヒト脳及び筋肉組織中の中枢性タウ蛋白質の免疫プロットによる検出 (1)抗体の調製

抗タウ蛋白質モノクローナル抗体HT7は、Innogenetics社から購入して用いた。抗Exon4-5(118-131)抗体(121-128精製)は、上記実施例1.で調製したもの用いた。

末梢性タウ蛋白質を特異的に認識する抗体(末梢性タウ蛋白質特異的抗体)として、タウ蛋白質をコードする遺伝子のExon4Aによりコードされるアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドを抗原として得られる抗体を、WO97/34145号公報の記載に準じて次の通り調製した。

タウ蛋白質をコードする遺伝子のExon4Aによりコードされるアミノ酸配列の部分配列(配列番号:6)のアミノ末端にシステインを導入した配列を有するポリペプチドを化学合成し、これを抗原ポリペプチドとしてキーホール・リンペットのヘモシアニン(KLH)に結合させ、免疫原を調製した。まず、マレイミド化KLH(凍結乾燥品; Pierce社製)1.5mgを0.15mLの純水に溶解し(50mMリン酸緩衝液、0.15M NaCl、100mM EDTA(pH7.2))、上記ポリペプチド3.0mgを加えて室温(25)にて2時間反応させた。これを生理的食塩水にて、4、一晩透析した後、生理的食塩水で1.0mLに調製して免疫用の抗原(免疫原)とした。得られた免疫原をウサギに繰り返し免疫して得られた抗血清を、上記抗原ポリペプチドを固定化したカラムに通して吸着させ、吸着された画分をPierce社製のgentle elution bufferで溶出することで、アフィニティ精製された抗体(以下、これを「抗Exon4A抗体」と称することがある)を得た。

この抗Exon4A抗体の特異性は、上記実施例1.の(4)で抗Exon4-5抗体の評価を行ったのと同様にして、各種合成ペプチドに対する反応性をドットプロットによって解析し、前記抗原ポリペプチドに対して特異的に反応することを確認した。

(2)試料の調製

試料としては、実施例3の(1)と同じアルツハイマー病患者由來の脳組織抽出物、及び、市販のヒト筋肉組織抽出物を用いた。陽性コントロールとしては、Goedert博士(MRC Laboratory of Molecular Biology, UK)から分与された遺伝子組換えタウ蛋白質(配列番号:1)を用いた。

(3)免疫プロット法による解析

上記(2)で調製した各組織抽出物及び陽性コントロールを、9%ポリアクリルアミドゲルにアプライしてLaemmliの方法(Nature, 227, 680-685(1970))により電気泳動し、セミドライプロッターによりPVDF膜に転写した。このようなPVDF膜を3枚調製し、次の通り、抗Exon4-5(118-131)抗体(

121-128精製)、抗Exon4A抗体(ウサギ)、及び、抗タウ蛋白質モノクローナル抗体HT7による免疫プロットを行った。

5%スキムミルクを含むTBS 20mLをブロッキング液として、得られたPVDF膜を1時間ブロッキングした。次に、このブロッキング液に抗Exon4-5(118-131)抗体(121-128精製)は540ng/mL、抗Exon4A抗体は1,300ng/mL、抗タウ蛋白質モノクローナル抗体HT7は2,000ng/mLとなるようにそれぞれ添加し、各15mLをそれぞれ1枚の膜に加えて、湿箱中で一晩4で反応させた。反応後、膜をTBST 20mLで10分間3回洗浄して未反応の抗体を除去した。

5%スキムミルクを含むTBS 15mLに、アルカリフォスファターゼ標識二次抗体として、抗Exon4-5(118-131)抗体(121-128精製)と抗Exon4A抗体に対しては抗ウサギIgG抗体液(シングルスティンMAX-AP;ニチレイ社製)を0.75mL、抗タウ蛋白質モノクローナル抗体HT7に対しては抗マウスIgG抗体液(Promega社製)を3μL加えて、湿箱中で1時間室温で反応させた。反応後、膜をTBST 20mLで10分間3回洗浄して、未反応の二次抗体を除去した。

再び湿箱中に膜を入れ、それぞれアルカリフォスファターゼ基質用緩衝液(100mM Tris-HCl(pH9.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)15mLに浸漬した。これに、基質として、NBT溶液(50mg/mL nitro blue tetrazolium/70% dimethylfолмamide溶液; Promega社製)100μLを加えて混合し、さらにBCIP溶液(50mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/70% dimethylfолмamide溶液; Promega社製)50μLを加えて混合した。室温で30分間反応させた後、膜をTBST 20mLで10分間3回洗浄して未反応の基質を除去した。

結果を図2に示す。図2において、Mレーンはヒト筋肉組織抽出液、BレーンはAD患者脳組織抽出液、Cレーンは陽性コントロールとしての遺伝子組換えタウ蛋白質(中枢性タウ蛋白質)を電気泳動したものである。

免疫プロットの結果、ヒト筋肉組織抽出液中にはExon4Aによりコードされるアミノ酸配列を挿入配列として有する分子量110kDの末梢性タウ蛋白質(図中、「big tau(exon4A+)」と示す)及びその断片が存在し、それらは抗Exon4A抗体及び抗タウ蛋白質モノクローナル抗体HT7により検出されるが、脳組織抽出液中には殆ど存在しないことが確認された。一方、抗Exon4-5(118-131)抗体(121-128精製)はヒト筋肉抽出液とは一切反応せず、ヒト脳組織抽出液及び陽性コントロールに含まれる、分子量48~65kDの中枢性タウ蛋白質(図中、「tau(Exon4A-)」と示す)とその重合物及び断片とのみ特異的に反応することが確認された。

これらの結果から明らかなように、本発明の抗体は、脳等の中枢組織由来の中枢性タウ蛋白質と筋肉等の末梢組織由来の末梢性タウ蛋白質を明確に識別することができる。よって、従来は大きな分子量を有する末梢性タウ蛋白質の妨害を受けて高い特異性を得ることができなかつた血液や筋肉等の末梢組織由来の試料を用いても、特異的に高感度で中枢性タウ蛋白質を検出することができる事が示唆された。

実施例5.ヒト血液中の中枢性タウ蛋白質のELISAによる検出

上記実施例4.において、本発明の抗体が、脳等の中枢組織由来の中枢性タウ蛋白質と筋肉等の末梢組織由来の末梢性タウ蛋白質を明確に識別できることが示されたので、該抗体を用いて、末梢性タウ蛋白質を多量に含むヒト血液中の中枢性タウ蛋白質の検出を行った。

(1) 試料の調製

試料となる血液としては、アルツハイマー病(AD)の疑いのある個体、及び健康なボランティアの個体(コントロール)から、インフォームドコンセントの後、肘静脈から採血し、血漿を分離後、-40で保存されたものを用いた。アルツハイマー病の疑いのあ

10

20

30

40

50

る個体から得られた血液は、スクリップス・ラボラトリーズ・ジャパン株式会社より購入した。

(2) 抗ヒトタウ蛋白質抗体の固相化

96穴ELISAプレート(蛍光/発光測定用)に、抗ヒトタウ蛋白質モノクローナル抗体HT7の0.1M炭酸ナトリウム緩衝溶液(pH9.0)を各ウェルに0.1mLずつ加え、湿潤箱中で4℃、3時間インキュベートして固相化した。溶液を除去した後、0.1M炭酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、1%BSA、1%スキムミルクを含むPBS(10 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl(pH7.4))溶液を0.2 mL加えて、4℃で2時間ブロッキングした。プレートは、洗浄液(20 mM Tris-HCl(pH7.4)、0.05%Tween 20)で洗浄後、直ちに用いた。すぐに使わない場合にはさらに純水で洗浄し、真空乾燥してラミネート袋に入れ、4℃に保存した。
10

(3) 本発明の抗体を用いたELISAによる血液中の中枢性タウ蛋白質の測定

WO97/34145号公報に記載の方法に準じて、次の通りヒト血液中の中枢性タウ蛋白質を測定した。

まず、上記(2)で調製したELISAプレートの各ウェルに抗Exon 4-5(118-131)抗体(121-128精製)(100 ng/mL; 5%スキムミルク、1%正常山羊血清、1%正常マウス血清を含有するアッセイ緩衝液(0.1%BSA、1 mM EDTA、1 mM EGTA、20 mM Tris-HCl(pH7.4)、0.15 M NaCl、0.05%Tween 20)中)を75 µLずつ加えた。この各ウェルに、上記(1)において調製した血液試料を25 µLずつ加えた。また、別のウェルには、陽性コントロールとして上記実施例2(3)で市販のタウ蛋白質測定キット(INNOCENTICS社製:日本国内の名称「フィノスカラーhTau」、欧米における名称「INNOTESt hTau Ag」)を用いて測定して値付けをされた遺伝子組換え最短タウN側フラグメント(配列番号:7)を、アッセイ緩衝液で各種濃度に希釈して希釈系列を調製して25 µLずつ加えた。これをプレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、4℃で1晩インキュベートした。
20

反応後、洗浄液(20 mM Tris-HCl(pH7.4)、0.15 M NaCl、0.05%Tween 20)で洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体(シンプルステインMAX-AP;ニチレイ社製)を前記5%スキムミルク、1%正常山羊血清、1%正常マウス血清を含有するアッセイ緩衝液(0.1%BSA、1 mM EDTA、1 mM EGTA、20 mM Tris-HCl(pH7.4)、0.15 M NaCl、0.05%Tween 20)で希釈したものを各100 µL加えて、再度プレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、4℃で1時間インキュベートした。
30

洗浄液で洗浄後、アプライドバイオシステム社製の発光基質液「CDP-star™」(Disodium 2-chloro-5-(4-metoxySpiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan]-4-yl)-1-phenyl phosphate)を各ウェルに0.1 mLずつ加えて、固相に結合したアルカリフォスファターゼと室温で40~50分間反応させて発光させた。発光プレートリーダー(LUMINUS CT9000:DIA-IATRON社製)で発光強度を測定して、中枢性タウ蛋白質の濃度を求めた。
40

(4) 測定結果の解析

上記(3)で得られた結果を解析し、表3に示した。

表3. アルツハイマー病患者(AD)と健常者(CTL)の血液中の中枢性タウ蛋白質濃度(fmol/ml; pM)

試料 No.	中枢性タウ蛋白質の濃度
AD1	1.30
AD2	1.91
AD3	5.88
AD4	1.43
CTL1	0.41
CTL2	1.05
CTL3	0.81
CTL4	0.48

表3から明らかなように、本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体を用いれば、従来未梢性タウ蛋白質が多量に含まれるために中枢性タウ蛋白質の検出が困難であったヒト血液を用いても、中枢性タウ蛋白質の存在を解析することができ、アルツハイマー病の検出を行うことができる事が示された。

20

実施例6. ヒト血液中の中枢性タウ蛋白質のELISAによる検出

上記実施例5.において、本発明の抗体が、ヒト血液を用いても中枢性タウ蛋白質の存在を解析することができ、アルツハイマー病の検出を行うことができる事が示された。そこでさらに、該抗体を用いて、従来法でアルツハイマー病又はMCIと判定される患者群について血液を試料とする解析を行った。

従来法でMCIであると判定された患者のうち、年に10~15%、数年では約50%がアルツハイマー病に移行すると言われており、MCI患者には早期アルツハイマー病患者が含まれることが広く認識されつつある。このような患者群を本法の対象とすることにより、従来法では判定が困難な早期アルツハイマー病を本法により検出できる可能性について検討した。

30

(1) 試料の調製

試料となる血液としては、アルツハイマー病(AD)の疑いのある個体、MCIの疑いのある個体、及び健康なボランティアの個体(コントロール)から、インフォームドコンセントを得た後に採取されたものを用いた。肘静脈から採血を行い、血漿を分離後、-40で保存されたものを用いた。

アルツハイマー病の診断は、「精神疾患の診断・統計マニュアル、第4版、テキスト改訂版(DSM-IV-TR)」(American Psychiatric Association刊、2000年)、MCIの診断は、Petersen, R. C. 等の基準(Arch. Neurol. 56: 303-308, 1999)に基づいて行った。

(2) 抗ヒトタウ蛋白質抗体の固相化

40

96穴ELISAプレート(蛍光/発光測定用)に、抗ヒトタウ蛋白質モノクローナル抗体HT7の0.1M炭酸ナトリウム緩衝溶液(pH9.0)を各ウェルに0.1mLずつ加え、湿潤箱中で4、3時間インキュベートして固相化した。溶液を除去した後、0.1M炭酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、1%BSA、1%スキムミルクを含むPBS(10 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl(pH7.4))溶液を0.2mL加えて、4で2時間ブロッキングした。プレートは、洗浄液(20 mM Tris-HCl(pH7.4)、0.05%Tween 20)で洗浄後、直ちに用いた。すぐに使わない場合にはさらに純水で洗浄し、真空乾燥してラミネート袋に入れ、4に保存した。

(3) 本発明の抗体を用いたELISAによる血液中の中枢性タウ蛋白質の測定

WO 97 / 34145号公報に記載の方法に準じて、次の通りヒト血液中の中枢性タウ

50

蛋白質を測定した。

まず、上記(2)で調製したELISAプレートの各ウェルに抗E_{xon}4-5(118-131)抗体(121-128精製)(50ng/mL; 1%正常山羊血清、1%正常マウス血清を含有するアッセイ緩衝液(0.1%BSA、1mM EDTA、1mM EGTA、20mM Tris-HCl(pH7.4)、0.15M NaCl、0.05%Tween20)中)を80μLずつ加えた。この各ウェルに、上記(1)において調製した血液試料を20μLずつ加えた。また、別のウェルには、陽性コントロールとして上記実施例2(3)で市販のタウ蛋白質測定キット(Innogenetics社製:日本国内の名称「フィノスカラーハタウ」、欧米における名称「INNOTECH hTau Ag」)を用いて測定して値付けをされた遺伝子組換え最短タウN側フラグメント(配列番号:7)を、アッセイ緩衝液で各種濃度に希釈して希釈系列を調製して20μLずつ加えた。これをプレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、4で1晩インキュベートした。

反応後、洗浄液(20mM Tris-HCl(pH7.4)、0.15M NaCl、0.05%Tween20)で洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体(シンプルステインMAX-AP;ニチレイ社製)を前記5%スキムミルク、1%正常山羊血清、1%正常マウス血清、1mM MgCl₂を含有する緩衝液(0.1%BSA、20mM Tris-HCl(pH7.4)、0.15M NaCl、0.05%Tween20)で希釈したものを各100μL加えて、再度プレートシーラーでシールし、振り混ぜながら、4で1時間インキュベートした。

洗浄液で洗浄後、アプライドバイオシステム社製の発光基質液「CDP-star™」(Disodium 2-chloro-5-(4-metoxySpiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate)を各ウェルに0.1mLずつ加えて、固相に結合したアルカリフォスファターゼと30で30~50分間反応させて発光させた。発光プレートリーダー(LUMINUS CT9000: DIA-IATRON社製)で発光強度を測定して、中枢性タウ蛋白質の濃度を求めた。

(4) 測定結果の解析

上記(3)で得られた結果を解析し、表4に示した。

10

20

30

表4. アルツハイマー病患者(AD)、軽度認知障害患者(MCI)及び健常者(CTL)の血液中の中枢性タウ蛋白質濃度 (fmol/mL; pM)

試料 No.	中枢性タウ蛋白質濃度	試料 No.	中枢性タウ蛋白質濃度
AD1	0	MCI8	0.37
AD2	0.39	MCI9	0.16
AD3	33.94	MCI10	6.7
AD4	3.11	MCI11	8.57
AD5	0.17	MCI12	4.66
AD6	3.17	MCI13	9.12
AD7	7.8	MCI14	3.19
AD8	0.18	MCI15	3.2
AD9	0	MCI16	12.02
AD10	0.58	CTL1	0.5
AD11	0.29	CTL2	0.26
AD12	0.08	CTL3	0
MCI1	6.82	CTL4	0.12
MCI2	25.84	CTL5	0.29
MCI3	4.06	CTL6	0.33
MCI4	0	CTL7	0
MCI5	0	CTL8	0.14
MCI6	0.36	CTL9	0.51
MCI7	4.58	CTL10	0.91

表4から明らかなように、本発明の中枢性タウ蛋白質特異的抗体を用いれば、従来法ではMCIと判定される患者群についてもヒト血液を試料とした中枢性タウ蛋白質の存在の解析を行えることが示された。また、少量の試料を用いて、前処理の必要なく解析が行えること、及び化学発光法を用いることによりさらに高い感度が達成されることが確認された。すなわち、本発明の抗体および検出方法の感度の高さが確認された。

【産業上の利用の可能性】

本発明の抗体を用いれば、血液等の末梢組織由来の試料を用いても、特異的に中枢性タウ蛋白質を解析することができる。これにより、患者への侵襲度の大きい脳脊髄液等を採取することなく、より簡便に高感度でアルツハイマー病の検出を行うことができ、治療方針の決定、治療効果の判定、及び介護基準決定等の補助手段になる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> Anti-CNS specific tau antibodies and the use thereof

<130> A30680P1636

<150> JP 2002-236472

<151> 2002-08-14

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1

5

10

15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20

25

30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu

35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val

65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu

85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro

100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val

115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly

130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro

145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro

165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly

180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys

210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys

225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val

245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly

260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln

275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly

290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser

305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gln

325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser

340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn

355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala

370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser

385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser

405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val

420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu

435 440

<210> 2

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Glu Ser Gly Lys Val Val Gln Glu Gly Phe Leu Arg Glu Pro Gly

1 5 10 15

Pro Pro Gly Leu Ser His Gln Leu Met Ser Gly Met Pro Gly Ala Pro

20 25 30

Leu Leu Pro Glu Gly Pro Arg Glu Ala Thr Arg Gln Pro Ser Gly Thr

35 40 45

Gly Pro Glu Asp Thr Glu Gly Arg His Ala Pro Glu Leu Leu Lys

50 55 60

His Gln Leu Leu Gly Asp Leu His Gln Glu Gly Pro Pro Leu Lys Gly

65 70 75 80

Ala Gly Gly Lys Glu Arg Pro Gly Ser Lys Glu Glu Val Asp Glu Asp

85 90 95

Arg Asp Val Asp Glu Ser Ser Pro Gln Asp Ser Pro Pro Ser Lys Ala

100 105 110

Ser Pro Ala Gln Asp Gly Arg Pro Pro Gln Thr Ala Ala Arg Glu Ala

115 120 125

Thr Ser Ile Pro Gly Phe Pro Ala Glu Gly Ala Ile Pro Leu Pro Val

130 135 140

Asp Phe Leu Ser Lys Val Ser Thr Glu Ile Pro Ala Ser Glu Pro Asp

145 150 155 160

Gly Pro Ser Val Gly Arg Ala Lys Gly Gln Asp Ala Pro Leu Glu Phe

165 170 175

Thr Phe His Val Glu Ile Thr Pro Asn Val Gln Lys Glu Gln Ala His

180 185 190

Ser Glu Glu His Leu Gly Arg Ala Ala Phe Pro Gly Ala Pro Gly Glu

195 200 205

Gly Pro Glu Ala Arg Gly Pro Ser Leu Gly Glu Asp Thr Lys Glu Ala

210 215 220

Asp Leu Pro Glu Pro Ser Glu Lys Gln Pro Ala Ala Ala Pro Arg Gly

225 230 235 240

Lys Pro Val Ser Arg Val Pro Gln Leu Lys

245 250

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser

1

5

10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Val Thr Gln Ala Arg Met Val

1

5

.

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser

1 5

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ala Pro Arg Gly Lys Pro Val Ser Arg Val Pro Gln Leu Lys

1 5 10 15

<210> 7

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala

35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val

50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp

65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro

85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg

100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly

115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser

130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro

145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys

165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro

180 185 190

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu

1

5

10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly

1

5

10

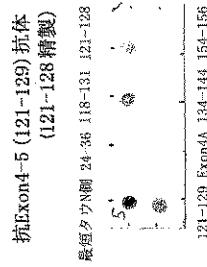
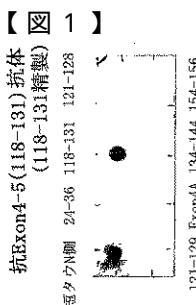


Fig. 1

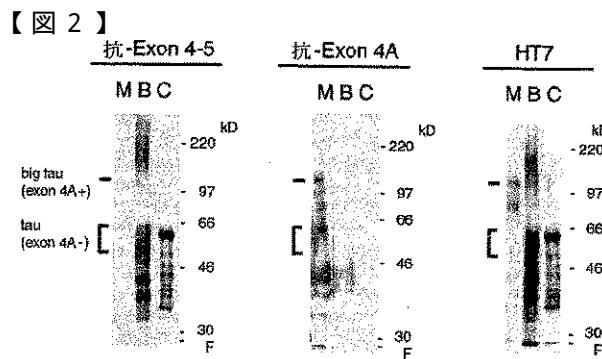


Fig. 2

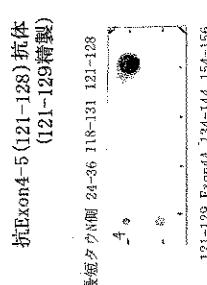
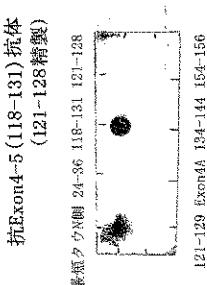


Fig. 1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP03/10340
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C07K16/18, G01N33/53		
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) Int.Cl ⁷ C07K16/18, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTplus (JOIS), WPIDS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GU Yongjun et al., 'τ Is Widely Expressed in Rat Tissues', Journal of Neurochemistry 67(3), 1235-1244, (1996)	1-13
A	GOEDERT M. et al. 'Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease', Neuron 3, 519-526, (1989)	1-13
A	WO 97/34145 A1 (Mitsubishi Chemical Corp.), 18 September, 1997 (18.09.97), & US 2002/0086009 A & JP 9-532450 A	1-13
A	JP 2002-40023 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 06 February, 2002 (06.02.02), (Family: none)	1-13
<input 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 September, 2003. (10.09.03)		Date of mailing of the international search report 24 September, 2003 (24.09.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP03/10340														
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. C1' C07K16/18, G01N33/53</p>																
<p>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. C1' C07K16/18, G01N33/53</p>																
<p>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 日本国実用新案公報 1926-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2003年 日本国登録実用新案公報 1994-2003年 日本国実用新案登録公報 1996-2003年</p>																
<p>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) JST Plus (JOIS), WPIDS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN)</p>																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>GU Yongjun et al., 'τ Is Widely Expressed in Rat Tissues' Journal of Neurochemistry 67(3), 1235-1244(1996)</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GOEDERT M. et al.'Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau:Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease' Neuron 3, 519-526(1989)</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 97/34145 A1 (三菱化学株式会社) 1997.09.18</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>					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	GU Yongjun et al., 'τ Is Widely Expressed in Rat Tissues' Journal of Neurochemistry 67(3), 1235-1244(1996)	1-13	A	GOEDERT M. et al.'Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau:Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease' Neuron 3, 519-526(1989)	1-13	A	WO 97/34145 A1 (三菱化学株式会社) 1997.09.18	1-13
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	GU Yongjun et al., 'τ Is Widely Expressed in Rat Tissues' Journal of Neurochemistry 67(3), 1235-1244(1996)	1-13														
A	GOEDERT M. et al.'Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau:Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease' Neuron 3, 519-526(1989)	1-13														
A	WO 97/34145 A1 (三菱化学株式会社) 1997.09.18	1-13														
<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。														
<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「I」優先権主張に意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</p> <p>の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</p>																
国際調査を完了した日 10.09.03		国際調査報告の発送日 24.09.03														
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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)  植原 克典 4B 9840 電話番号 03-3581-1101 内線 3448														

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP03/10340
C(続き)引用文献の カテゴリ*	関連すると認められる文献 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	& US 2002/0086009 A & JP 9-532450 A JP 2002-40023 A (三菱化学株式会社) 2002. 02. 06 (ファミリーなし)	1-13

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

フロントページの続き

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

(72)発明者 石黒 幸一

日本国東京都町田市南大谷11号 株式会社 三菱化学生命科学研究所内

(72)発明者 今川 正樹

日本国大阪府大阪市福島区福島六丁目4番10号

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

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2004016655A5	公开(公告)日	2006-08-17
申请号	JP2004528876	申请日	2003-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社 株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社 三菱化学Yatoron		
[标]发明人	大野英人 石黒幸一 今川正樹		
发明人	大野 英人 石黒 幸一 今川 正樹		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/567 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/28 G01N2800/2821 Y10S435/962 Y10S435/975 Y10T436/25 Y10T436/25125		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	2002236472 2002-08-14 JP		
其他公开文献	JP4393382B2 JPWO2004016655A1		

摘要(译)

本发明提供了特异性识别CNS tau蛋白但不是外周tau蛋白的抗体。更具体而言，本发明提供了一种抗体，其可以通过使用包含编码tau蛋白的基因的外显子4的编码氨基酸序列与由其外显子5编码的氨基酸序列之间的连接部分的氨基酸序列的多肽来获得，特异于tau蛋白异构体的表位主要存在于中枢神经组织中。本发明还提供了检测阿尔茨海默病的方法和使用该抗体的试剂盒。