

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4580455号  
(P4580455)

(45) 発行日 平成22年11月10日(2010.11.10)

(24) 登録日 平成22年9月3日(2010.9.3)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/68 (2006.01)  
GO 1 N 33/53 (2006.01)GO 1 N 33/68  
GO 1 N 33/53

D

請求項の数 17 (全 62 頁)

(21) 出願番号 特願2009-247559 (P2009-247559)  
 (22) 出願日 平成21年10月28日 (2009.10.28)  
 (62) 分割の表示 特願2005-326503 (P2005-326503)  
 原出願日 平成11年6月29日 (1999.6.29)  
 (65) 公開番号 特開2010-19864 (P2010-19864A)  
 (43) 公開日 平成22年1月28日 (2010.1.28)  
 審査請求日 平成21年10月28日 (2009.10.28)  
 (31) 優先権主張番号 98870148.8  
 (32) 優先日 平成10年7月3日 (1998.7.3)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 98870236.1  
 (32) 優先日 平成10年11月3日 (1998.11.3)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 399044160  
 イノジエネティックス・ナムローゼ・フェ  
 ンノートシャップ  
 INNOGENETICS N. V.  
 ベルギー、バーー9052ヘント、テヒノ  
 ロギーパルク6番  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100116311  
 弁理士 元山 忠行  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】神経変性の分別診断

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体におけるアルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および / またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための方法であって、

該個体からの体液試料中の少なくとも 3 種の神経学的マーカーのレベルを、該神経学的マーカーを特異的に認識する抗体を用いて決定する工程を含み、

該神経学的マーカーがタウ、 $\beta$ -アミロイド<sub>(1-42)</sub>、ならびに Rab3a および S N A P 2 5 から選択されるシナプス蛋白である、方法。

## 【請求項 2】

該体液試料が、脳脊髄液試料である、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、

- 脳脊髄液試料中のタウ、 $\beta$ -アミロイド<sub>(1-42)</sub>、および Rab3a のレベルを決定する、または

- 脳脊髄液試料中のタウ、 $\beta$ -アミロイド<sub>(1-42)</sub>、および S N A P 2 5 のレベルを決定する、方法。

## 【請求項 4】

アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および / またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のためのキットであって、

異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する、少なくとも 3 種の抗体を含み、

20

該神経学的マーカーがタウ、-アミロイド(1-42)、ならびにRab3aおよびSNAP25から選択されるシナプス蛋白である、診断キット。

**【請求項5】**

該神経学的マーカーが、  
 - タウ、-アミロイド(1-42)、およびRab3a、または  
 - タウ、-アミロイド(1-42)、およびSNAP25、である、請求項4に記載の診断キット。

**【請求項6】**

アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および/またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための診断キットであって、

- 異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する、少なくとも3種の一次抗体（補足抗体）を一緒にあるいは別個に含む支持体、および  
 - 神経学的マーカー-一次抗体複合体の1つをそれぞれ認識する二次抗体（ディテクタ-抗体）を含み、

該神経学的マーカーがタウ、-アミロイド(1-42)、ならびにRab3aおよびSNAP25から選択されるシナプス蛋白である、診断キット。

**【請求項7】**

該神経学的マーカーが、  
 - タウ、-アミロイド(1-42)、およびRab3a、または  
 - タウ、-アミロイド(1-42)、およびSNAP25、である、請求項6に記載の診断キット。

**【請求項8】**

該2次抗体に特異的、にタグを付するまたはカップリングするためのマーカーをさらに含む請求項6または7に記載の診断キット。

**【請求項9】**

一次抗体と体液試料、二次抗体と神経学的マーカー-一次抗体複合体、および/または結合二次抗体とマーカー間の免疫学的反応を行うための適切な緩衝液をさらに含む請求項6~8のいずれか1項に記載の診断キット。

**【請求項10】**

標準化の目的のために、神経学的マーカーの検出に使用されるキットの抗体により特異的に認識される精製蛋白または合成ペプチドをさらに含む、請求項6~9のいずれか1項に記載の診断キット。

**【請求項11】**

請求項1~3のいずれか1項に記載の方法を行うために特異的に設計された請求項6~10のいずれか1項に記載の診断キット。

**【請求項12】**

アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および/またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための、タウ、-アミロイド(1-42)、ならびにRab3aおよびSNAP25から選択されるシナプス蛋白を特異的に認識する抗体の使用。

**【請求項13】**

該抗体が、  
 - タウ、-アミロイド(1-42)、およびRab3a、または  
 - タウ、-アミロイド(1-42)、およびSNAP25、を特異的に認識する、請求項12に記載の使用。

**【請求項14】**

アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および/またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための診断キットの製造のための、タウ、-アミロイド(1-42)、ならびにRab3aおよびSNAP25から選択されるシナプス蛋白を特異的に認識する抗体の使用。

**【請求項15】**

10

20

30

40

50

該抗体が、

- タウ、 - アミロイド (1 - 4<sub>2</sub>)、およびRab3a、または
- タウ、 - アミロイド (1 - 4<sub>2</sub>)、およびSNAP25、を特異的に認識する、請求項14に記載の使用。

【請求項16】

特定の治療の、治療モニタリングおよび／または有効性の決定のための、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法の使用。

【請求項17】

特定の治療の、治療モニタリングおよび／または有効性の決定のための、請求項4～11のいずれか1項に記載の診断キットの使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経変性の診断の分野に関する。本発明は、体液中の異なる神経学的マーカーを検出する組み合わせアッセイを使用する、神経変性の分別診断のための新たな方法に関する。また本発明は、脳脊髄液中のRab3a、SNAP25または - シヌクレイン (synuclein) を検出するための新たな方法ならびに神経変性の分別診断のための組み合わせアッセイにおけるこれらの方法の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

20

神経変性はいくつかの神経学的疾患の特徴となっている。神経変性は、軸索損傷、除々に広がるニューロンの死、神経伝達物質放出または受容体機能の異常、ミエリンの破壊、CNS血流の変化、血液／脳関門機能不全および／または変化した酸素代謝、他のCNS代謝経路における困難性および／またはCNSの機能不全を引き起こす可能性のある種々の他のしばしば不明な様相を包含しうる。今日では、異なる疾患は異なる神経機能不全の様相に関連している（概説としてはWilson et al., 1991参照）。例えば、アルツハイマー病は、大脳皮質中の神経細胞の死および消失が関与するすべての神経変性疾患のうち最も重要なものである。それは最も普通に起こる老人の痴呆であり、患者および家族の苦難ならびに当該疾病により完全に無能となった患者の長期のケアに必要なコストによる経済的損失を引き起こす。前頭側頭葉痴呆は初期の変性的痴呆の2番目にありふれたタイプであり、全痴呆患者の約3～10%を占める(Brun, 1993; Knopman, 1993)。臨床的特徴は優勢な前頭葉症候群の存在により特徴づけられ(Sjogren, 1997)、それは情緒障害および精神分裂病のような他の障害においても観察される(Abbruzzese et al, 1997)。レーピー小体疾患は、進行性の痴呆または精神病とともに存在する疾病である。発症時には不存在であるかまたは穏やかであるが最終的には通常の堅固なものとなるパーキンソン病の徵候は、一般的には重症である。レーピー小体は脳幹、基底核、視床下部核および新皮質に多く見られる。パーキンソン病は人生の半ば以降に起こるレーピー小体疾患の1つのタイプであり、非常にゆっくりと進行し、長い経過をたどる。それは、主に黒質線状体ドパミン作動性系に関連したニューロン系の疾患の一例と考えられる。一方、脳血管性疾患は、脳血管に関連したいくつかの病理学的プロセスの1つにより引き起こされる。それは発展途上国における心臓疾患および癌の後の3番目に主要な死亡原因であり、100000人につき794人の割合である。65歳以上の人口のうち5%が卒中、すなわちこれらの病理学的プロセスの1つの結果として生じる急性の神経学的傷害にかかる。神経変性はある種の化合物（表1）、放射線照射、化学療法または低酸素・虚血イベントに曝露されることによっても起こる。小児白血病および脳腫瘍に対する長期の治療（または予防）により併発される病気は、行動の変化、学業不振、記憶力低下、知能減退、成長遅延、ホルモン混乱、および異常なCTスキャン（脳萎縮、脳室拡張、脳内石灰化）を包含する。白血病生存者における知能遅れ（IQ、記憶力、注意力、視覚空間認識能の欠乏）(Fletcher et al., 1988)または認識機能低下(Ochus et al., 1991)は、それぞれ、放射線照射後あるいは頭蓋照射を行わない化学療法の後に観察された。さらに、4歳未満の小児は

30

40

50

、頭蓋放射および／または化学療法の神経毒性効果に対して特に感受性がある (Moore et al., 1986; Jannoun et al., 1983)。大部分の薬剤に関しては、高用量治療、組み合わせ化学療法、当該照射併用、および頸動脈内または鞘内注射が、標準的な経口または静脈内治療よりも神経学的合併症を引き起こす可能性が高い。神経系のいずれかの部分が損傷を受ける可能性がある。癌患者はより攻撃的に治療を受け、化学療法剤をより多く投与され、長く生き、新しい化学療法剤が開発され、現存している薬剤がより意図的または新規な方法で使用されるので、癌の化学療法による神経学的合併症はよりありふれたものとなり、重症で複雑なものとなるであろう。

#### 【 0 0 0 3 】

患者が一般的な医学的ケアを必要とする大部分の神経学的症状は、容易に示される疾病的プロセスによる。疾患部位およびその原因に関する正しい診断を行うための神経学的分析方法を開発することが臨床研究者の任務である。正確な診断後にのみ、疾病的効果的な管理および治療が可能である。能の機能および構造の研究を可能にするポジトロン放出核種トモグラフィー (PET) 、単一フォトン放出核種コンピューター計算トモグラフィー (SPECT) および核磁気共鳴スペクトル法 (NMR) のごとき患者における神経変性のいくつかの診断方法が開発されている。しかしながら、大部分の神経学的疾患は、疾患の他の形態の排除に基づいて臨床的に診断され、いくつかの場合には異なる神経学的疾患を区別することさえ不可能である。例えば、レービー小体タイプの痴呆あるいはレービー小体痴呆 (LBD) は神経弛緩剤に対して感受性があり、アルツハイマー病と区別することが臨床的に非常に困難である (McKeith et al., 1996; Ballard et al., 1998)。大部分の患者 (75%以上) は神経病理学的にアルツハイマー病であると決定されるが、臨床的にアルツハイマー病であると決定された患者の 15ないし 25% はレービー小体痴呆を有する (Hooten et al., 1998)。レービー小体痴呆はアセチルコリンエステラーゼでの治療により感受性があるので、アルツハイマー病からのレービー小体痴呆の分別は治療最適化にとり必須である (Levy et al., 1994; Perry et al., 1994; Wilcock et al., 1994)。

#### 【 0 0 0 4 】

前頭側頭葉痴呆は、その徴候が他の疾患においても観察されうるので、しばしば他のタイプの痴呆または他の精神病と誤診される。

#### 【 0 0 0 5 】

血管性疾患とアルツハイマー病との間に明確な相違はなく、誤診の危険性が明らかである。血管性疾患の薬理学的治療は可能なので、早期の正しい診断が重要である。

#### 【 0 0 0 6 】

ある種の化合物、放射線照射、化学療法または低酸素 - 虚血イベントのごとき誘発薬剤により引き起こされる脳の損傷に関する認識および治療は、大部分の神経学者に対して頻繁かつ重要な臨床的な問題を残す。臨床的診断が疑わしい場合、神経病理学的試験により最終的な診断を決定的に行うことができる。そのようなものとして、正確かつ分別的な神経変性に関する診断が死亡後にのみ可能となる。それゆえ、患者における神経学的疾患の早期検出ならびに異なる薬剤により誘導された神経学的变化のモニタリングのための方法は、誘発剤への曝露を継続できるかどうか、適当な用量および薬剤が個々の患者に使用され、正しい治療の開始のために使用されるかどうかを決定するための助けとなるであろう。

#### 【 0 0 0 7 】

最近になって、細胞死、軸索成長 / 再誘導、炎症および／または血液脳関門機能不全に関連した中枢神経系 (CNS) の症状を反映する多くの神経学的マーカーが利用できるようになつた。

#### 【 0 0 0 8 】

例えば、微小管関連蛋白タウ (tau) は対になった螺旋フィラメント (PHF) および神経原線維のもつれ (NFT) の主要蛋白成分である (Brion et al., 1985; Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbali et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al.

10

20

30

40

50

, 1986; Kondo et al., 1988)。タウ蛋白は異なるイソ形態として存在し、それらのうち 4 ないし 6 種は成人脳に見られるが、1 のイソ形態だけは胎児脳において検出される。イソ形態の多様性は、mRNA スプライシングによりヒト染色体 17 上の単一遺伝子から生じる (Himmeler, 1989; Goedert et al., 1989; Andreadis et al., 1992)。分子クローニングから推定されるタウ蛋白の最も著しい特徴は分子のカルボキシ末端部分に存在する 31 または 32 個のアミノ酸の並びであり、3 回または 4 回繰り返されることがある。さらなる多様性はタウ分子の NH<sub>2</sub> 末端における 29 ないし 58 個のアミノ酸の挿入により生じる (Goedert et al., 1989)。インビオにおいて、タウは、そのリピート領域 (255 ~ 381) 中に局在化する微小管結合ドメインに関連する相互作用によって微小管アッセンブリーおよびニューロンの軸索コンパートメントの安定性を促進する (Lewis et al., 1988)。正常な環境において、成人脳はタウ 1 分子あたり 2 ~ 3 分子のリン酸根を含む (Selden and Pollard, 1983; Ksieczak-Reding et al., 1992)。ラットおよびヒトにおいて研究された正常タウにおける異なる部位でのリン酸化は発達状態に依存している (Lee et al., 1991; Bramblett et al., 1993; Goedert et al., 1993)。リン酸化の結果として生じる 60、64 および 68 kDa のタウ変種が、神経原性線維のもつれを示す脳の領域において検出されている (Delacourte et al., 1990; Goedert et al., 1992; Flament et al., 1990; Greenberg and Davies, 1990)。これらの脳はタウ 1 分子あたり 6 ~ 8 個のリン酸根を含む (Ksieczak-Reding et al., 1992)。PHF から単離されたタウ (PHF - タウ) において、リン酸化は数個の位置において起こっている (Iqbal et al., 1989; Lee et al., 1991; Hasegawa et al., 1992)。今までのところ、脳抽出物中のホスホ - タウの検出は、抗体によって (Mab A1z50: Ghanbari et al., 1990; Mab Ab423: Harrington et al., 1991; Mab AT120: Vandermeeren et al., 1993; Mab AT180; Mab AT270: WO95/17429 として公開された国際特許出願ならびに Mab AT8: WO93/08302 として公開された国際特許出願) あるいは分子量の変化によって (Flament et al., 1990) あるいは機能のアッセイ (Bramblett et al., 1992) による他の方法により行われており、その検出により、変化した細胞骨格特性に関連した痴呆対象と正常な老人対象とを、あるいは他のタイプの痴呆患者とが識別されている。リン酸化されていないタウのエピトープを認識する個々のモノクローナル抗体の組み合わせを用いて、脳脊髄液中のタウおよび PHF - タウの存在が検出されている (Van de Voorde et al., 1995)。

## 【0009】

30

ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) のガンマサブユニットはニューロン細胞質の主要構成成分である (Kato et al., 1981)。NSE は可溶性脳蛋白の 3 % を占める。成人において、それは虚血、感染または腫瘍起源の活性ニューロンのダメージを評価することにおいて有用であると考えられている (Garcia et al., 1994)。小児血清中の NSE については研究されていない。Neraら (1988) は、脳脊髄液中または血清中の高レベルの NSE が昏睡状態の小児における効果の乏しさおよび死亡と関連性があることを示した。しかしながら、増加した血清 NSE は必ずしも CNS 起源ではない。末梢ニューロンを含むいくつかの組織、内分泌腺、リンパ球、赤血球、ならびに血小板は NSE を含み (Kaiser, 1989)、このマーカー単独での使用に対する妨げとなりうる。

## 【0010】

40

40 ~ 43 個のアミノ酸の長さの - アミロイドは、アミロイド前駆体蛋白または APP と呼ばれる大きな前駆体蛋白の蛋白分解的開裂により生じる。アミロイドは正常細胞の代謝の間に生成される。アミロイドペプチドは高度な異種性を示す。 - アミロイドの 2 つの主要な形態が同定されており、 - アミロイド (1 - 40) および - アミロイド (1 - 42) である。 - アミロイド (1 - 42) はアルツハイマー病、ダウン症候群および正常な老人の脳の神経突起ブラークの主要構成成分である。それは神経毒性であるかもしれませんず、他の損傷に対するニューロンの弱さを増すことが知られている。さらに、低濃度の可溶性アミロイドは、同時に生じる神経毒性に依存しないコリン作動性活性の低下を誘導しうる。アセチルコリンは認識プロセスにおいて重要な役割を果たしている (Auld et al., 1998)。十分に定義されたペプチドのエピトープを特異的に認識する高親和性モノ

50

クローナル抗体の開発により、未濃縮脳脊髄液中の $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ ペプチドに関する簡単な試験が可能となった(Citron et al., 1997; Johnson-Wood et al., 1997)。この試験は薬剤、放射線照射、またはAPPプロセッシングを妨害する化学物質のモニタリングにおいて価値を有することも証明されている。

#### 【0011】

ニューロモジュリンまたはB-50とも呼ばれる成長関連蛋白-43(GAP-43)は神経組織特異的蛋白であり、主に軸索および前シナップス末端に局在化している。GAP-43は、ニューロン成長、神経突起形成、ならびに再生およびニューロン新芽形成において役割を果たしていると考えられている(Skene and Woillard, 1981; Basi, 1987; Benowitz et al., 1989; Mercken et al., 1992a)。シナップス蛋白はシナップス機能において異なる役割を有している。シナプシンのごとき蛋白は、融合に利用可能な小胞の量を決定することにおいて重要であるが、Rab3およびラブフィリンは膜に対して小胞を標的化することにおいて重要である。ドッキングのプロセスはシナプトブレビン、SNAP25、Secおよびシンタクシンの分子複合体によって決定されているが、CSPおよびシナプトタグミンは小胞内容物のCa<sup>2+</sup>依存性放出において重要な役割を果たすと考えられている。アルファ-シヌクレイン(synuclein)は黒質および基底核のシナップスにおいて豊富であり、 $\alpha$ -シヌクレインおよび $\gamma$ -シヌクレインを包含する蛋白のファミリーに属している。

#### 【0012】

体液中に存在し、安定であり、中枢神経系におけるニューロンの代謝状態を反映するかかる細胞内マーカーは、臨床的徵候が存在する前でさえも、神経変性の早期認識において有用であるかもしれない。可能ならば他の診断方法と組み合わせて使用できるニューロン機能に関する生化学的指標は、神経変性の臨床的な診断の正確さおよび治療的モニタリングを改善することを大きく促進するであろう。

#### 【0013】

アルツハイマー病は豊富な老人斑、細胞内のもつれおよびシナップスの損失により特徴づけられる。タウおよび $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ はこれらのもつれおよびplaquesのそれぞれの必須成分であり、これらはADの神経病理学的試験における2つの診断構成要素である。タウおよび $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ は両方とも脳脊髄液(CSF)中において検出され、CSF-タウおよびCSF- $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ がアルツハイマー病の神経学的マーカーとして使用可能であるということは現在十分に確認されているが、CSFにおけるいかなる変化がアルツハイマー病の病理生理学に関係しているのかはまだ知られていない。CSF-タウは、同年齢の対象と比較するとアルツハイマー病患者において増加しており、脳におけるもつれの数に関連しているが、一方では、アルツハイマー病において $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ は減少している。老人性の、散在性のplaquesを伴わない痴呆、例えば前頭葉痴呆において $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ が減少していることが見出されているので、おそらく $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ はplaques形成には関連していないであろう。脳組織に関する研究は、plaquesともつれが痴呆の程度に関連していることを示唆しているが、Mini-Mental Stateにより決定したところCSF-タウおよびCSF- $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ のレベルは一貫して痴呆の程度に関連しているわけではなく、同様に存在している他のタイプの痴呆と重複している。アルツハイマー病患者におけるベータ-アミロイド $(1-40)$ のレベルは正常対照と比較して変わりがないので(Motter et al., 1995)、タウおよび $\beta$ -アミロイド $(1-42)$ に加えて $\beta$ -アミロイド $(1-40)$ を神経学的マーカーとして使用すること(Soji et al., 1998; 非特許文献1)は、アルツハイマー病の診断アッセイを改善するものではない。

#### 【0014】

脳のGAP-43に関する研究は、アルツハイマー病の前脳皮質においてそのレベルが低下するが、他の領域ではそのレベルが上昇することを示唆している(Coleman et al., 1992)。痴呆性疾患の患者の体液中のGAP-43に関する研究はまだ行われていない。

#### 【0015】

10

20

30

40

50

A D 患者の脳におけるもう 1 つの重要な構造上の変化はシナプスの損失である。実際に、もつれ、ブラークおよびシナプス損失を測定する最近の研究は、主にシナプス損失が痴呆の程度に関連していることを示唆している (Terry et al., 1991)。シナプス損失の研究において、シナプトフィシンの免疫反応性の低下が観察された。他のシナプス蛋白：シナプトタグミン、R ab 3 a、シナプトブレビンおよびシンタクシンについても同様の減少が報告されている (Blennow et al., 1996; Davidsson et al., 1996; Shimohama et al., 1997; Ferrer et al., 1998)。また、いくつかの形態のパーキンソン病に関して、シナプス蛋白が病理学的役割を果たしていることが強く示されている。2 種のまれな形態の家族性パーキンソン病の - シヌクレインにおいて 2 つの変異が検出され、 - シヌクレインはレーピー小体中の主成分として特徴づけられた。インビボにおけるレーピー小体の形成はシヌクレインの蓄積により生じる可能性があり、シヌクレイン蓄積は迅速な軸索輸送の減少またはシヌクレインの過剰発現に結果である可能性がある (Jensen et al., 1998)。シナプス蛋白は主に痴呆の程度と関連があるように思われる (Terry et al., 1991) ので、体液中のシナプス蛋白の検出および定量方法を提供することは有用であろう。

C S F 中のシナプス蛋白の存在および定量はまだ十分に開発されていない。クロモグラニンは C S F 中のシナプス損失のマーカーとしてすでに使用されているが、減少は「純粋」なまたはタイプ I のアルツハイマー病においてのみ示されている (Blennow et al., 1995)。その後まもなくシナプトタグミン I が C S F 中に存在することが示された (Davidsson et al., 1996)。この研究において、アルツハイマー患者の左側の海馬体および前頭皮質の Brodmann 領域 9 においてシナプトタグミンが選択的に減少することが示された。C S F の貯留物に基づいて、この減少が C S F にも存在する可能性が示唆されたが、定量されていない。Davidssonら (1996) は C S F 中の R ab 3 およびシナプトフォシンを検出することができなかった。

#### 【0016】

また、ある種の化合物、放射線照射、化学療法または低酸素 - 虚血イベントへの曝露により誘発される神経変性に関しては、正確な診断ツールが使用できない。周産期仮死は神経学的後遺症に関連している可能性がある。しかしながら、低酸素 - 虚血イベント後の早期の正確な評価は新生児ケアにおける最も困難な問題の 1 つとなっている。現在に至るまで、脳の血流の研究と組み合わされた臨床的な脳電図による評価、および神経放射線学的評価が最も容易に利用できる方法である。変化した脳の代謝活性が C S F 中の成分の変化に反映されるということが日々に明らかになってきたので、C S F の神経学的マーカーの検出は低酸素 - 虚血イベントの評価におけるデータを補うものとなる可能性がある (Garcia-Alix et al., 1994)。化学療法、放射線照射または低酸素 - 虚血イベント後の C S F の神経学的マーカーと行動の変化とのリンクについては全く調べられていない。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0017】

【非特許文献 1】 Soji M, Matsubara E, Kanai M, Watanabe M, Nakamura T, Tomidokoro Y, Shizuka M, Wakabayashi K, Igeta Y, Ikeda Y, Mizushima K, Amari M, Ishiguro K, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S (1998) J Neurol Sci 158: 134-140.

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0018】

本発明の目的は、個体における神経変性の特異的検出、定量、および / または分別診断のための方法を提供することである。

本発明のもう 1 つの目的は、個体におけるアルツハイマー病の、より特異的な検出、定量および / または分別診断のための方法を提供することである。

本発明のもう 1 つの目的は、個体におけるレーピー小体疾患の、より特異的な検出、定量および / または分別診断のための方法を提供することである。

10

20

30

40

50

本発明のもう1つの目的は、個体におけるパーキンソン病の、より特異的な検出、定量および／または分別診断のための方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、個体における前頭側頭葉痴呆の、より特異的な検出、定量および／または分別診断のための方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、パーキンソン病とアルツハイマー病との分別方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、レーピー小体疾患とアルツハイマー病との分別方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、アルツハイマー病における血管の問題の特異的検出または定量のための方法、ならびに異なる形態のアルツハイマー病の分別診断のための方法を提供することである。 10

本発明のもう1つの目的は、化学療法により、あるいは化合物または放射線照射に対する曝露により誘発された神経変性の診断方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、白血病または脳腫瘍の治療を受けた個体における、化学療法により誘発された神経変性の診断方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、周産期仮死により生じる神経変性の診断方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、脳脊髄液中のシナプス蛋白 R a b 3 a の新たな検出方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、個体における神経変性の、より特異的検出、定量および／または分別診断を可能にする、脳脊髄液中の R a b 3 a の新たな検出方法を提供することである。 20

本発明のもう1つの目的は、アルツハイマー病の、より特異的検出、定量および／または分別診断を可能にする、脳脊髄液中の R a b 3 a の新たな検出方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、脳脊髄液中のシナプス蛋白 - シヌクレインの新たな検出方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、個体におけるより特異的な検出、定量、および／または分別診断を可能にする、脳脊髄液中の - シヌクレインの新たな検出方法を提供することである。 30

本発明のもう1つの目的は、アルツハイマー病および／またはレーピー小体疾患の、より特異的な検出または定量を可能にする、ならびに／あるいはレーピー小体疾患とアルツハイマー病との分別診断を可能にする、脳脊髄液中の - シヌクレインの新たな検出方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、上記方法を行うための診断キットを提供することである。

本発明のもう1つの目的は、特定の治療の有効性の治療モニタリングおよび／または決定のための方法を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0019】

本発明者らは、上記課題を解決せんと鋭意研究を行い、体液中の特定の異なる神経学的マーカーを検出する組み合わせアッセイを用いると、正確かつ迅速な神経変性の特異的検出および分別検査ができるを見出し、本発明を完成させるに至った。 40

##### 【0020】

すなわち、本発明は、

(1) 個体におけるアルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および／またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための方法であって、

該個体からの体液試料中の少なくとも3種の神経学的マーカーのレベルを、該神経学的マーカーを特異的に認識する抗体を用いて決定する工程を含み、

該神経学的マーカーがタウ、 - アミロイド<sub>(1 - 42)</sub>、およびシナプス蛋白である、方法； 50

- (2) 該シナプス蛋白が、Rab3aまたはSNAP25である、(1)に記載の方法；
- (3) 該体液試料が、脳脊髄液試料である、(1)または(2)に記載の方法；
- (4) (1)～(3)のいずれか1に記載の方法であって、  
- 脳脊髄液試料中のタウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびRab3aのレベルを決定する、または  
- 脳脊髄液試料中のタウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびSNAP25のレベルを決定する、方法；
- (5) アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および／またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のためのキットであって、  
異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する、少なくとも3種の抗体を含み、  
該神経学的マーカーがタウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびシナプス蛋白である、診断キット；
- (6) 該シナプス蛋白が、Rab3aまたはSNAP25である、(5)に記載の診断キット；
- (7) 該神経学的マーカーが、  
- タウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびRab3a、または  
- タウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびSNAP25、である、(5)または(6)に記載の診断キット。
- (8) アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および／またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための診断キットであって、  
- 異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する、少なくとも3種の一次抗体（補足抗体）を一緒にあるいは別個に含む支持体、および  
- 神経学的マーカー-一次抗体複合体の1つをそれぞれ認識する二次抗体（ディテクタ-抗体）を含み、  
該神経学的マーカーがタウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびシナプス蛋白である、診断キット；
- (9) 該シナプス蛋白が、Rab3aまたはSNAP25である、(8)に記載の診断キット；
- (10) 該神経学的マーカーが、  
- タウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびRab3a、または  
- タウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびSNAP25、である、(8)または(9)に記載の診断キット；
- (11) 該2次抗体に特異的、にタグを付するまたはカップリングするためのマーカーをさらに含む(8)～(10)のいずれか1に記載の診断キット；
- (12) 一次抗体と体液試料、二次抗体と神経学的マーカー-一次抗体複合体、および／または結合二次抗体とマーカー間の免疫学的反応を行うための適切な緩衝液をさらに含む(8)～(11)のいずれか1に記載の診断キット；
- (13) 標準化の目的のために、神経学的マーカーの検出に使用されるキットの抗体により特異的に認識される精製蛋白または合成ペプチドをさらに含む、(8)～(12)のいずれか1に記載の診断キット；
- (14) (1)～(4)のいずれか1に記載の方法を行うために特異的に設計された(8)～(13)のいずれか1に記載の診断キット；
- (15) アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および／またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための、タウ、- アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびシナプス蛋白を特異的に認識する抗体の使用；
- (16) 該シナプス蛋白が、Rab3aまたはSNAP25である、(15)に記載の使用；
- (17) 該抗体が、

10

20

30

40

50

- タウ、 - アミロイド (1 - 4<sub>2</sub>)、およびRab3a、または  
- タウ、 - アミロイド (1 - 4<sub>2</sub>)、およびSNAP25、を特異的に認識する、(15)または(16)に記載の使用；

(18) アルツハイマー病の特異的検出または定量のため、および/またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別検査のための診断キットの製造のための、タウ、 - アミロイド (1 - 4<sub>2</sub>)、およびシナプス蛋白を特異的に認識する抗体の使用；

(19) 該シナプス蛋白が、Rab3aまたはSNAP25である、(18)に記載の使用；

(20) 該抗体が、

- タウ、 - アミロイド (1 - 4<sub>2</sub>)、およびRab3a、または  
- タウ、 - アミロイド (1 - 4<sub>2</sub>)、およびSNAP25、を特異的に認識する、(18)または(19)に記載の使用；

(21) 特定の治療の、治療モニタリングおよび/または有効性の決定のための、(1)～(14)のいずれか1に記載の方法または診断キットの使用；  
を提供するものである。

#### 【発明の効果】

#### 【0021】

本発明により、体液中の異なる神経学的マーカーを検出する組み合わせアッセイを使用する、神経変性の特異的検出および分別検査のための新たな方法が提供される。本発明により、正確かつ迅速な神経変性の特異的検出および分別検査を行うことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0022】

【図1】実施例1.3に記載のウエスタンプロットであり、アルツハイマー病および対照の脳の側頭皮質におけるRab3a免疫反応性を示す。1は12.8 μlの対照患者No.3；2は6.4 μlの対照患者No.3；3は3.2 μlの対照患者No.3；4は1.6 μgの対照患者No.3；5は1.0 μlの対照患者No.3；6は10 μlの対照患者No.3；7は10 μlの患者No.1；8は10 μlのAD No.2；9は10 μlの対照患者No.1；10は10 μlの対照患者No.2；11は10 μlのAD患者No.3；12は10 μlの対照患者No.4。

【図2a】脳脊髄液におけるシナプス蛋白Rab3a(a)およびSNAP25(b)の安定性。実施例1.5に記載のようにシナプス蛋白に対して特異的なサンドイッチELISAによりシナプス蛋白の分解を定量した。精製シナプス蛋白をCSFのプールに添加し、37度で一晩インキュベーションした(リジェンド: CSF中のRab3a)。対照として、シナプス蛋白を同じCSFのプールに添加し、直接定量した(リジェンド: Rab3a; SNAP25)。1%BSA中での安定性もアッセイした(結果示さず)。

【図2b】脳脊髄液におけるシナプス蛋白SNAP25(b)の安定性。実施例1.5に記載のようにシナプス蛋白に対して特異的なサンドイッチELISAによりシナプス蛋白の分解を定量した。精製シナプス蛋白をCSFのプールに添加し、37度で一晩インキュベーションした(リジェンド: CSF中のSNAP25)。対照として、シナプス蛋白を同じCSFのプールに添加し、直接定量した(リジェンド: SNAP25)。1%BSA中での安定性もアッセイした(結果示さず)。

【図3】Transduction Labs(Lexington, KY, USA; カタログ番号S63320)から得た抗体の - シヌクレインに対する特異性を示す。A: クーマシー染色ゲル；B: 抗HIsモノクローナル抗体で発色させてすべての生成物の発現が明らかとなったウエスタンプロット；C: Transduction Labs(Lexington, KY, USA; カタログ番号S63320)から得たモノクローナル抗体で発色したウエスタンプロット。レーン1: - シヌクレインを発現するイー・コリ；レーン2: - シヌクレインを発現するイー・コリ；レーン3: - シヌクレインを発現するイー・コリ；レーン4: ニューロン特異的エノラーゼを発現するイー・コリを用いた対照レーンレーン5: 分子量標準；レーン6: プラスミドを有しないイー・コリ株。

【図4】200 μlのCSF中の - シヌクレインの検出。実施例2.2に記載したよう

10

20

30

40

50

に分子量ならびにRotophorにより等電点によってプールしたCSFを分離した。M：分子量マーカー；R1：pI3；R2：pI4；R3：pI4.5；R4：pI4.5；R5：pI5；R6：pI5；R7：pI5.5；R8：pI6；R9：pI6；R10：pI6.5；R11：pI6.5；R12：pI7；R13：pI7；R14：pI7.5。

【図5】 -シヌクレインならびに -シヌクレインのカルボキシ末端に対するモノクローナル抗体3B5および9B6のマッピングに使用した重複ペプチドのアミノ酸配列。ペプチドの合成に使用したカルボキシ末端部分を太字で示す。モノクローナル抗体ならびに市販抗体(クローン42,IgG1,Transduction Labs, Lexington, KY, USA)により認識されるペプチドを示す。  
10

【図6】異なる -シヌクレインのカルボキシ末端ペプチドとモノクローナル抗体クローン42との反応後に得られた光学密度(OD)。実施例2.4に記載したイムノアッセイにおいて光学密度を測定した。X軸上の数(1～12)は図5に示すペプチドの番号に対応する。

【図6-1】異なる -シヌクレインのカルボキシ末端ペプチドとモノクローナル抗体3B5との反応後に得られた光学密度(OD)。実施例2.4に記載したイムノアッセイにおいて光学密度を測定した。X軸上の数(1～12)は図5に示すペプチドの番号に対応する。

【図6-2】異なる -シヌクレインのカルボキシ末端ペプチドとモノクローナル抗体9B6との反応後に得られた光学密度(OD)。実施例2.4に記載したイムノアッセイにおいて光学密度を測定した。X軸上の数(1～12)は図5に示すペプチドの番号に対応する。  
20

【図7】実施例1.6および3.1に記載のサンドイッチELISAを用いて測定した、32人のAD患者、20人の血管性痴呆(MID)患者、および11人の対照のCSF中のRab3aおよびタウのレベル。

【図8-1】実施例4.1に記載されたAD患者のCSFにおけるRab3aとSNAP25との間、Rab3aと -アミロイド<sub>(1-42)</sub>との間の関係。実施例1.6および3に記載しサンドイッチELISAを用いてRab3a、SNAP25、タウおよび -アミロイド<sub>(1-42)</sub>のレベルを測定した。  
30

【図8-2】実施例4.1に記載されたAD患者のCSFにおけるRab3aとタウとの間の関係。実施例1.6および3に記載しサンドイッチELISAを用いてRab3a、SNAP25、タウおよび -アミロイド<sub>(1-42)</sub>のレベルを測定した。

【図9】治療前の診断におけるタウ値。1はAML(3)；2はAML-CNS+(1)；3はダウンAML(2)；4は脊髄形成異常(2)；5はその他[髄芽細胞腫(2)、横紋筋肉腫(2)、頭蓋内胚細胞腫(1)]；6はB-NHL(8)；7はホジキン病(3)；8はダウンNB ALL(1)；9はNB ALL(21)；10はNB ALL-Brachman症候群(1)；11はNB ALL-CNS+(1)；12はNB ALL-VHR(4)；13は対照(6)(カッコ内は患者数)。

【図10a】1日目のCSF神経学的マーカー(タウ)濃度を示す。1はAML；2はAML-CNS+；3はダウンAML/MDS；4は脊髄形成異常；5は慢性骨髄性白血病；6はB-NHL；7はホジキン病；8はダウンNB ALL；9はNB ALL；10はNB ALL-Brachman症候群；11はNB ALL-CNS+；12はNB ALL-VHR；13はLCH、横紋筋肉腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、絨毛癌；14は対照、網膜芽細胞腫(健常者)、ヘモファゴサイトース(hemofagocytose)(gezond HLH)。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。  
40

【図10b】1日目のCSF神経学的マーカー(ニューロモジュリン)濃度を示す。1はAML；2はAML-CNS+；3はダウンAML/MDS；4は脊髄形成異常；5は慢性骨髄性白血病；6はB-NHL；7はホジキン病；8はダウンNB ALL；9はNB ALL；10はNB ALL-Brachman症候群；11はNB ALL-CNS+；12はNB ALL-VHR；13はLCH、横紋筋肉腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、絨毛癌；14は対照、網膜芽細胞腫(健常者)、ヘモファゴサイトース(hemofagocytose)(gezond HLH)。  
50

は対照、網膜芽細胞腫（健常者）、ヘモファゴサイトース（hemofagocytose）（gezond HLH）。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図10c】1日目のCSF神経学的マーカー（-アミロイド<sub>(1-42)</sub>）濃度を示す。1はAML；2はAML-CNS+；3はダウンAML/MDS；4は脊髄形成異常；5は慢性骨髓性白血病；6はB-NHL；7はホジキン病；8はダウンNBALL；9はNBALL；10はNBALL-Brachman症候群；11はNBALL-CNS+；12はNBALL-VHR；13はLCH、横紋筋肉腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、絨毛癌；14は対照、網膜芽細胞腫（健常者）、ヘモファゴサイトース（hemofagocytose）（gezond HLH）。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図10d】1日目のCSF神経学的マーカー（NSE）濃度を示す。1はAML；2はAML-CNS+；3はダウンAML/MDS；4は脊髄形成異常；5は慢性骨髓性白血病；6はB-NHL；7はホジキン病；8はダウンNBALL；9はNBALL；10はNBALL-Brachman症候群；11はNBALL-CNS+；12はNBALL-VHR；13はLCH、横紋筋肉腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、絨毛癌；14は対照、網膜芽細胞腫（健常者）、ヘモファゴサイトース（hemofagocytose）（gezond HLH）。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図10e】1日目のCSF神経学的マーカー（血清LDH）濃度を示す。1はAML；2はAML-CNS+；3はダウンAML/MDS；4は脊髄形成異常；5は慢性骨髓性白血病；6はB-NHL；7はホジキン病；8はダウンNBALL；9はNBALL；10はNBALL-Brachman症候群；11はNBALL-CNS+；12はNBALL-VHR；13はLCH、横紋筋肉腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、絨毛癌；14は対照、網膜芽細胞腫（健常者）、ヘモファゴサイトース（hemofagocytose）（gezond HLH）。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図10f】1日目のCSF白血球数を示す。1はAML；2はAML-CNS+；3はダウンAML/MDS；4は脊髄形成異常；5は慢性骨髓性白血病；6はB-NHL；7はホジキン病；8はダウンNBALL；9はNBALL；10はNBALL-Brachman症候群；11はNBALL-CNS+；12はNBALL-VHR；13はLCH、横紋筋肉腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、絨毛癌；14は対照、網膜芽細胞腫（健常者）、ヘモファゴサイトース（hemofagocytose）（gezond HLH）。測定方法は実施例3に記載されている。

【図11a】B細胞NHL患者の化学療法期間中の腰椎せん刺（LP）回数の関数としてCSF神経学的マーカー（タウ）のレベルを示す。X軸上の数は表7aに示すLP回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図11b】B細胞NHL患者の化学療法期間中の腰椎せん刺（LP）回数の関数としてCSF神経学的マーカー（ニューロモジュリン）のレベルを示す。X軸上の数は表7aに示すLP回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図11c】B細胞NHL患者の化学療法期間中の腰椎せん刺（LP）回数の関数としてCSF神経学的マーカー（ニューロン特異的エノラーゼ）のレベルを示す。X軸上の数は表7aに示すLP回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図12a】化学療法の異なるフェーズにおける13人の非B-ALL患者のCSF神経学的マーカー（タウ）のレベルを示す。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図12b】化学療法の異なるフェーズにおける13人の非B-ALL患者のCSF神経学的マーカー（ニューロモジュリン）のレベルを示す。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図13a】非B細胞ALL患者の化学療法期間中の腰椎せん刺（LP）の回数の関数としてCSF神経学的マーカー（タウ）のレベルを示す。X軸上の数は表7bに示すLP回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例3に記載されている。

【図13b】非B細胞ALL患者の化学療法期間中の腰椎せん刺（LP）の回数の関数としてCSF神経学的マーカー（-アミロイド<sub>(1-42)</sub>）のレベルを示す。X軸上の

10

20

30

40

50

数は表 7 b に示す L P 回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例 3 に記載されている。

【図 13 c】非 B 細胞 A L L 患者の化学療法期間中の腰椎せん刺 (L P) の回数の関数として C S F 神経学的マーカー (ニューロモジュリン) のレベルを示す。X 軸上の数は表 7 b に示す L P 回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例 3 に記載されている。

【図 13 d】非 B 細胞 A L L 患者の化学療法期間中の腰椎せん刺 (L P) の回数の関数として C S F 神経学的マーカー (ニューロン特異的エノラーゼ) のレベルを示す。X 軸上の数は表 7 b に示す L P 回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例 3 に記載されている。

【図 14 a】A M L 患者の化学療法期間中の腰椎せん刺 (L P) 回数の関数としてのタウのレベル。X 軸上の数は表 7 c に示す L P 回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例 3 に記載されている。

【図 14 b】A M L 患者の化学療法期間中の腰椎せん刺 (L P) 回数の関数としてのニューロモジュリンのレベル。X 軸上の数は表 7 c に示す L P 回数に対応する。マーカーの検出方法は実施例 3 に記載されている。

【図 15 a】実施例 7 に記載されたように、神経学的対照 (Guilain-Barre症候群、多発性硬化症等) (1 C O N T)、記憶障害の人 (2 M E M)、症候前家族性アルツハイマー患者 (P S 1 变異) (3 P F A D)、家族性アルツハイマー患者 (P S 1 变異) (4 F A D)、アルツハイマー患者 (5 A D) および血管性痴呆患者 (6 V A D) に分類される個体におけるタウの個体レベル。データを p g / m l で表す。

【図 15 b】実施例 7 に記載されたように、神経学的対照 (Guilain-Barre症候群、多発性硬化症等) (1 C O N T)、記憶障害の人 (2 M E M)、症候前家族性アルツハイマー患者 (P S 1 变異) (3 P F A D)、家族性アルツハイマー患者 (P S 1 变異) (4 F A D)、アルツハイマー患者 (5 A D) および血管性痴呆患者 (6 V A D) に分類される個体における - アミロイド (1 - 4 2) の個体レベル。実施例 3 に記載のごとく - アミロイド (1 - 4 2) のレベルを測定した。データを p g / m l で表す。

【図 15 c】実施例 7 に記載されたように、神経学的対照 (Guilain-Barre症候群、多発性硬化症等) (1 C O N T)、記憶障害の人 (2 M E M)、症候前家族性アルツハイマー患者 (P S 1 变異) (3 P F A D)、家族性アルツハイマー患者 (P S 1 变異) (4 F A D)、アルツハイマー患者 (5 A D) および血管性痴呆患者 (6 V A D) に分類される個体におけるニューロモジュリン (または成長関連蛋白 4 3) の個体レベル。データを p g / m l で表す。

【図 16】60人のアルツハイマー病 (A D) 患者および32人の年齢を合わせた対照におけるタウおよびニューロモジュリンの個体レベルの相関関係。実施例 3 に記載のごとくタウおよびニューロモジュリンのレベルを測定した。

【図 17】アルツハイマー病 (A D) 患者、パーキンソン病 (P A R K) 患者および対照患者 (C O N T) におけるタウ / n m および - アミロイド (1 - 4 2) の個体レベルの相関関係。実施例 3 に記載のごとくタウ、ニューロモジュリンおよび - アミロイド (1 - 4 2) のレベルを測定した。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0023】

本発明は、個体中の神経変性の特異的検出、定量および / または分別診断のための方法に関する。これらの方法は、該個体の 1 つまたはそれ以上の体液試料中の少なくとも 3 つの神経学的マーカーのレベルを決定することを包含するものであり、該方法により、神経変性のタイプおよび程度が、対照試料と比較した場合の該神経学的マーカーすべてのレベルの量的变化により反映される。

#### 【0024】

本願の実施例からわかるように、少なくとも 3 つの神経学的マーカーの使用により、より特異的かつ高感度な神経変性的症状の検出が可能となった。少なくとも 3 つの神経学的マーカーの使用により、臨床診断を基礎としては分別できなかった多くの神経学的症状間

10

20

30

40

50

の識別が可能となったことも明らかである。

【0025】

本明細書の用語「神経変性」および「神経変性的症状」は同じ意味であり、本明細書において混用される。これらの用語は、神経の機能不全に関連した脳症状を包含する。神経変性に関連した種々の疾病はWilson et al. (1991)において引用されている。それらはアルツハイマー病、卒中(集中性脳傷害)、散在性脳傷害、血管性疾患、パーキンソン病、レーピー小体疾患、クロイツフェルド・ヤコブ(Creutzfeld Jacob)病、前頭側頭葉痴呆、ギラン・バレ(Guilain Barre)症候群、多発性硬化症、正常圧水頭、筋萎縮性側索硬化症、分裂病、鬱病、神経ラチリズム、転換および仮死を包含する。しかしながら、このリストは完全なものではない。神経機能不全に関連していることが知られている他の疾患も包含される。神経変性は、神経機能不全に関連しており、薬剤を包含する特定の原因により引き起こされるいすれかの種類の脳のダメージまたは脳のいすれかの症状も包含する。本発明の好ましい具体例において、特に検出、定量および/または分別診断される神経変性的症状は、アルツハイマー病、レーピー小体疾患、パーキンソン病および前頭側頭葉痴呆からなる群より選択される。「レーピー小体疾患」は、脳幹、基底前脳、視床下部核および/または新皮質におけるレーピー小体を示すいすれかの疾患について用いる。レーピー小体疾患はパーキンソン病、多発性全身性萎縮症およびレーピー小体痴呆を包含する。

10

【0026】

本発明のもう1つの好ましい具体例において、特に検出、定量および/または分別診断される神経変性的症状は、低酸素-虚血イベント、化学療法、放射線療法により、あるいは化合物または放射線に対する曝露により誘導されるものである。より詳細には、神経変性は、白血病または脳腫瘍の治療の間に化学療法または放射線療法により誘導されうる。

20

【0027】

しかしながら、この神経変性的症状のリストは不完全である。脳の機能不全が起る他の症状も包含される。

【0028】

本明細書の「神経変性の特異的検出」なる表現は、3つ未満の神経学的マーカーを診断に使用した場合に得られるよりも、特定の神経変性的症状に対する関連性を有する特定の疾患または特定の神経学的疾患の原因に関して、より高い感度および特異性が得られることを意味する。

30

本明細書の表現「神経変性の定量」は、特定の神経変性的症状による神経の機能不全の程度が測定されることを意味する。

本明細書の表現「神経変性の分別診断」は、神経学的障害の特定の疾患または特定の原因が特定の神経変性的症状に関連している種々の神経変性的症状を識別することをいう。

【0029】

個体における神経変性の特異的検出、定量および/または分別診断は、下記工程を含むイムノアッセイを用いて、該個体の1またはそれ以上の体液試料中の少なくとも3つの異なる神経学的マーカーの検出により行われる：

該個体から1またはそれ以上の体液試料を得ること；および

40

抗原-抗体複合体の生成に適した条件下において、体液試料中の異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する少なくとも3種の抗体(一次抗体または捕捉抗体)に該体液試料を接触させること；および

該体液試料に対する該抗体の免疫学的結合を検出すること；

対照試料と比較して、該神経学的マーカーすべてのレベルの量的变化に反映される神経変性のタイプおよび程度を該体液中の該神経学的マーカーのレベルに基づいて推断すること。

【0030】

次いで、免疫学的結合の検出のための方法を行うことができ、該方法は、抗原および神経学的マーカーの1つを認識する抗体により形成された該抗原-抗体複合体を下記のもの

50

と混合することにより行われる：

a ) 二次抗体（またはディテクター抗体）

\* 該二次抗体は、抗原 - 抗体複合体の特異的エピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないモノクローナル抗体であってもよく、あるいは

\* 抗原 - 抗体複合体の特異的エピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないポリクローナル抗体であって、好ましくは固定化された神経学的マーカーまたは神経学的マーカー - 一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたポリクローナル抗体であってもよい

b ) 該二次抗体に特異的にタグを付する、あるいは特異的にカップリングするマーカーであって、当業者に知られたいずれかのマーカー

10

c ) 抗体と体液試料との間、二次抗体と神経学的マーカー - 一次抗体複合体との間および / または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応、を行うための適当な緩衝液；および

d ) また可能ならば、標準化する目的で、神経学的マーカーの検出に使用する抗体と反応する精製蛋白または合成ペプチド。

#### 【0031】

有利には、本発明に使用する抗体は適当な支持体上に固定化される。抗体は3つまでの（3つよりも多い神経学的マーカーを検出する場合には3つよりも多い）異なる支持体または同じ支持体上に存在していてもよい。抗体が同じ支持体上に（例えば、1のマイクロタイタープレートのウェル）に存在する場合、それらそれぞれの免疫学的結合を特異的マーカーにより検出してもよい。あるいはまた、抗体は同じ支持体の別々の位置に存在してもよい。その場合、これらの抗体のいずれかの免疫学的結合を検出する汎用マーカーを用いて検出を行ってもよい。有利には、二次抗体自身がマーカーとの直接または間接的カップリングのためのマーカーまたは基を担持しているものである。あるいはまた、当業者に知られた他のいずれかのイムノアッセイフォーマットを用いて本発明の方法を実施してもよい。

20

#### 【0032】

用語「エピトープ」は、抗体結合部位により特異的に結合される抗原 - 抗体複合体の部分をいう。エピトープは当該分野で知られた方法により決定でき、あるいは当該分野で知られた種々のコンピューター推定モデルにより推定できる。

30

本明細書の表現「認識」、「～と反応」、「免疫学的結合」または「抗原 - 抗体複合体」は、抗体および抗原の免疫学的特性を考慮したすべての条件下で抗原と抗体との間の結合が起こることと解釈すべきである。

用語「体液」は、血液、リンパ液、尿および脳脊髄液（CSF）（これらに限らない）を包含する人体に存在するすべての液体をいう。

#### 【0033】

特別な具体例において、本発明は、体液試料が脳脊髄液試料および血液試料からなる群より選択されるものである上記方法に関する。血液試料は患者から採取される全血試料を包含する。より好ましくは、血液試料は血漿試料または血清試料を包含する。

#### 【0034】

40

本発明の方法において、2つの異なる体液中の同じマーカーを検出すること（少なくとも他のマーカーの検出と組み合わせて）、あるいは3つの異なる体液試料中の同じマーカーを検出することも可能である。例えば、脳脊髄液中において2つの神経学的マーカーが検出され、これらの神経学的マーカーの一方が血漿中においても検出される。実施例に示すように、2つの異なる体液中の同じマーカーの検出は、1の体液中においてのみこのマーカーを検出する場合と比較して、より特異的かつ高感度な検出ならびに神経変性のより良い分別診断を可能にする。

#### 【0035】

本発明の方法において検出される神経学的マーカーは、特定のタイプの神経細胞または細胞機能に関連したいずれの蛋白であってもよく、神経変性の条件下において1またはそ

50

れ以上の体液中のそのレベルが疾病のプロセスまたは神経学的疾患の原因を示すものである。特定の神経学的条件下において、1またはそれ以上の体液中のある神経学的マーカーは増加し、またある神経学的マーカーは減少する。特定の神経学的条件下における特定の体液中において変化したレベルを有する3、4、5、6、7、8個またはそれ以上の神経学的マーカーの可能な組み合わせを、個体における該神経学的症状の特異的検出、定量および／または分別診断に使用することができる。神経変性の特異的検出、定量および／または分別診断に使用可能な神経学的マーカーは：タウ、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、-アミロイド（1-42）、-アミロイド（1-40）、ニューロモジュリン、シナプス蛋白（Rab3a、SNAP25、-シヌクレイン、シナプシン、シナプトタグミン、シナプトブレビン、シンタキシン、ラブフィリン、n-sec、システインストリング蛋白および他の蛋白）、グリア細線維酸性蛋白（GFAP）、100、IL6、TNF、IL1、IL2、ニューロフィラメント（NF）、ミエリン塩基性蛋白（MBP）および14-3-3を包含する。しかしながら、これらに限らない。特定の疾病プロセスまたは神経学的疾患の原因を示す他の神経学的マーカーを使用することもできる。異なる神経学的疾病および脳損傷にかかっている患者体液中のこれらの神経学的マーカーのうちいくつかの挙動を表2に示す。

### 【0036】

調製された、あるいは当該分野において存在するモノクローナル抗体であって、上記神経学的マーカーの1つを認識するモノクローナル抗体を神経学的マーカーの検出に使用することができる。タウを特異的に認識する抗体はAlz50 (Ghanbari et al., 1990), Ab423 (Harrington et al., 1991), AT8 (WO 93/08302として公開された国際出願), AT120 (Vandermeeren et al., 1993); AT180 および AT270 (WO 95/17429として公開された国際出願) および AT100 (WO 96/04309として公開された国際出願)を包含する。しかしながら、タウを特異的に認識する、当該分野で知られた他の抗体を用いることもできる。NSEを特異的に認識する抗体は10C1および2E7ならびにInnogenetics (Gent, Belgium)から入手できる他のもの、Dako (Glostrup, Denmark; Cat No BBS/NC/VI-H14)から入手できるような市販されている抗体、Biogenex (San Ramon, CA, USA; Cat Nos MA055-5C and AM055-5M)、RDI (Flanders, NJ, USA; Cat No RDI-TRK4N6)、Diagnostic Systems (Basel, Switzerland; Cat No 07 34373)、Immunosource (Brussels, Belgium; Cat Nos CLA 73/5 and CR7041M) および Cortex Biochem (San Leandro, CA, USA; Cat No CR7047)から入手できるもの等を包含する。NSEを認識する抗体のリストは完全でなく、当該分野において利用または記載されている抗体であって、NSEを認識するものを用いることができる。-アミロイドを特異的に認識する抗体は2H3, 8E5 (Johnson-Wood et al., 1997), 10H3 (Majocha et al., 1992; Friedland et al., 1994), 2G3 (Citron et al., 1996), BA-27 and BC-05 (Suzuki et al., 1994), BNT77 (Asami-Odaka et al., 1995), 369.2B (Koenig et al., 1996), 22C11 (Lannfelt et al., 1995), 6E10 (Kim et al., 1990) および AMY-33 (Stern et al., 1990)を包含する。しかしながら、当該分野において知られた、-アミロイドを特異的に認識する他の抗体を用いてもよい。ニューロモジュリンを特異的に認識する抗体は、NM2 (Oestreicher et al., 1994), NM4 (Six et al., 1992), NM1, NM3, NM6, NM7 および NM8 (Mercken et al., 1992a)を包含する。しかしながら、ニューロモジュリンを特異的に認識する、当該分野で知られた他の抗体を使用してもよい。Rab3aを特異的に認識する抗体は市販されている抗体を包含し、例えば、Transduction Labs (Lexington, KY, USA; カタログ番号R35520)から入手可能である。SNAP25を特異的に認識する抗体は市販抗体を包含し、例えば、Serotec (Oxford, UK; Cat No SP12)、Sternberger Monoclonals Inc. (Distributed by Affinity Research Products Lim., Mamhead, Exeter, UK; Cat No SMI-81)、Chemicon (Temecula, CA, USA; Cat No MAB331) および Transduction Labs (Lexington, KY, USA; Cat No S35020)から入手できる。SNAP25を認識する抗体のリストは完全でなく、市販されている、あるいはSNAP25を認識すると当該分野において記載されている他の抗体を用いてもよい。-シヌクレインを特異的に認識する抗体は市販抗体を包含し、例えば、Transduction Labs 50

(Lexington, KY, USA; カタログ番号S63320)から入手可能である。市販されている、あるいは - シヌクレインを認識すると当該分野において記載されている他の抗体を用いてもよい。神経学的マーカーとして使用できる他のシナプス蛋白の特異的検出のために、種々の抗体が市販されており、そして / あるいは当該分野において知られている。S 1 0 0 を特異的に認識する抗体は市販されており、例えば、Biogenex (San Ramon, CA, USA; Cat Nos MA058-C および AM058-5M) および Innogenetics (Gent, Belgium; Cat No M-011) から得られるものである。S 1 0 0 を認識する抗体のこのリストは完全でなく、市販されている、あるいは S 1 0 0 を認識すると当該分野において記載されている他の抗体を用いてもよい。1 4 - 3 - 3 を特異的に認識する抗体は市販抗体を包含し、例えば、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA; Cat No sc-1657) および Transduction Labs (Lexington, KY, USA; Cat No F46820) から得ることができる。1 4 - 3 - 3 を認識する抗体のこのリストは完全でなく、市販されている、あるいは 1 4 - 3 - 3 を認識すると当該分野において記載されている他の抗体を用いてもよい。ニューロフィラメントを特異的に認識する抗体は市販抗体を包含し、例えば、Innogenetics (Gent, Belgium; Cat Nos M-011 および M-005) および Alexis (Laeufelfingen, Switzerland; Cat Nos BC-4000-A-L001 および BC-4010-A-L001) から得ができる。ニューロフィラメントを認識する抗体のこのリストは完全でなく、市販されている、あるいはニューロフィラメントを認識すると当該分野において記載されている他の抗体を用いてもよい。

#### 【 0 0 3 7 】

Fab、F(ab)<sup>1</sup><sub>2</sub>、ssFv (1本鎖可変フラグメント) のごときこれらのモノクローナル抗体に由来するフラグメント、ならびに抗体の可変領域を保持している構築物のような他の抗体であって、元の結合特性を保持しているものを本発明の方法に使用することもできる。一般的には、かかるフラグメントは、例えばパパイン、ペプシンまたは他のプロテアーゼのような酵素での消化により得られる。モノクローナル抗体、またはそのフラグメントを種々の用途のために修飾できることが、当業者によく知られている。ミニ抗体およびジアボディー、トリアボディー、4価抗体およびペプタボディーのごとき多価抗体を本発明の方法に使用することもできる。これらのフラグメントおよび多価抗体の調製は国際特許出願WO 98 / 29442に詳述されている。

#### 【 0 0 3 8 】

本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体は、HまたはL鎖をコードするマウスおよび / またはヒトゲノムDNA配列から、あるいはHまたはL鎖をコードするcDNAクローンから組み換えDNA法によって作成されるマウスモノクローナル抗体のヒト化バージョンであってもよい。あるいはまた、本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体であってもよい。用語「ヒト化抗体」は、免疫グロブリンのフレームワークの少なくとも一部分がヒト免疫グロブリン配列に由来することを意味する。

#### 【 0 0 3 9 】

本発明の方法に使用される抗体を、酵素、蛍光または放射活性タイプの適当な標識で標識してもよい。

#### 【 0 0 4 0 】

本発明の特別な具体例において、上記方法において検出される神経学的マーカーの少なくとも1つは、タウ、ホスホ-タウ、 - アミロイド(1 - 42)、 - アミロイド(1 - 40)、ニューロモジュリン、ニューロン特異的エノラーゼおよび / またはシナプス蛋白からなる群より選択される。上記群から1つが選択される3、4、5、6、7、8つまたはそれ以上のマーカーの可能な組み合わせを、個体における神経変性の特異的検出、定量および / または分別診断に使用することができる。本発明の方法において使用される1つよりも多い(すなわち、2、3、4、5、6、7つまたはそれ以上またはすべての神経学的マーカー)を上記群から選択することができる。

#### 【 0 0 4 1 】

本発明のより特別な具体例において、上記方法において検出される1つ、より好ましくは2つ、最も好ましくは3つの神経学的マーカーを下記群から選択する：

タウ、 - アミロイド<sub>(1-42)</sub>、およびニューロモジュリン；あるいは  
タウ、ニューロン特異的エノラーゼおよびニューロモジュリン；あるいは  
タウ、ホスホタウおよび - アミロイド<sub>(1-42)</sub>。

#### 【0042】

より特別な具体例において、体液中、好ましくはCSF中においてタウを検出し、2種の異なる体積、好ましくはCSFおよび血漿において - アミロイド<sub>(1-42)</sub>を検出する。

#### 【0043】

もう1つのより特別な具体例において、上記方法において検出される少なくとも1つの神経学的マーカーは、Rab3a、SNAP25および - シヌクレインからなる群より選択されるシナプス蛋白である。上記シナプス蛋白の群からそのうち1つが選択されている3、4、5、6、7、8またはそれ以上のマーカーを、個体の神経変性の特異的検出、定量および/または分別診断に使用することができる。10

#### 【0044】

したがって、本発明は、脳脊髄液中のRab3aの検出方法にも関し、該方法は少なくとも下記工程を含む：

個体から脳脊髄液試料を得ること；次いで、

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、Rab3aを認識するモノクローナル抗体（一次抗体または捕捉抗体）に該脳脊髄液試料を接触させること；次いで、20

該脳脊髄液試料への該抗体の免疫学的結合を検出すること。

#### 【0045】

Rab3aを特異的に認識する抗体を脳組織中のRab3aの検出に利用することができるが、脳脊髄液中のRab3aの検出の証拠はない。Davidssonら（1996年）は彼らの方法を用いることによっては脳脊髄液中のRab3aを検出することができなかった。脳脊髄液中のRab3aの特異的検出を可能にするいずれの抗体をこの新しい方法に使用してもよい。本発明の方法において使用する好ましいモノクローナル抗体を、Transduction Labs (Lexington, KY, USA; カタログ番号R35520)から得ることができる。

#### 【0046】

有利には、本発明で使用するモノクローナル抗体は適當な支持体上に固定化された状態である。別法として、当業者に知られた他のいずれかのイムノアッセイフォーマットを用いることにより本発明方法を実施してもよい。30

#### 【0047】

次いで、抗原およびRab3a認識抗体により形成された該抗原 - 抗体複合体を、下記のものと一緒にすることにより免疫学的結合の検出方法を実行することができる：

a ) 二次抗体（またはディテクター抗体）

\* 該二次抗体（またはディテクター抗体）は、抗原 - 抗体複合体のエピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないモノクローナル抗体であってもよく、あるいは

\* 該二次抗体（またはディテクター抗体）は、抗原 - 抗体複合体のエピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないポリクローナル抗体であってもよく、該ポリクローナル抗体は、好ましくは、Rab3aまたはRab3a - 一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたものである40

b ) 該二次抗体に特異的にタグを付しあるいはカップリングするマーカーであって、当業者に知られたいずれかの使用可能なマーカー

c ) 抗体と脳脊髄液との間、二次抗体と神経学的マーカー - 一次抗体複合体との間、および/または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適當な緩衝液；および

d ) さらに可能ならば、標準化を目的として、Rab3aを認識する抗体と反応する精製蛋白または合成ペプチド。

#### 【0048】

本明細書の実施例に示すように、ポリクローナルRab3a血清をディテクター抗体と50

して使用してもよい。

**【0049】**

有利には、二次抗体自体がマーカーを担持しているか、あるいはマーカーに直接または間接的にカップリングする基を担持している。

**【0050】**

本発明は、脳脊髄液中のSNAP25を検出するための新たな検出方法にも関し、該方法は少なくとも下記工程を含む：

個体から脳脊髄液試料を得ること；次いで、

抗原-抗体複合体の生成に適した条件下で、SNAP25を認識するモノクローナル抗体（一次抗体または捕捉抗体）に該脳脊髄液試料を接触させること；次いで、

該脳脊髄液試料への該抗体の免疫学的結合を検出すること。

**【0051】**

SNAP25を特異的に認識する抗体を脳組織中のSNAP25の検出に利用することができるが、脳脊髄液中のSNAP25の検出の証拠はなく、これまで検出が示されていない。

**【0052】**

脳脊髄液中のSNAP25の特異的検出を可能にするいずれの抗体をこの新しい方法に使用してもよい。本発明の方法において使用する好ましいモノクローナル抗体を、Serotec (Oxford, UK; カタログ番号SP12)、Sternberger Monoclonals Inc. (Affinity Research Products Lim., Mamhead, Exter, UK; カタログ番号SMI-81)、Chemicon (Temecula, CA, USA; カタログ番号MAB331) またはTransduction Labs (Lexington, KY, USA, カタログ番号S35020) から得ることができる。

**【0053】**

有利には、本発明で使用するモノクローナル抗体は適當な支持体上に固定化された状態である。別法として、当業者に知られた他のいずれかのイムノアッセイフォーマットを用いることにより本発明方法を実施してもよい。

**【0054】**

次いで、抗原およびSNAP25認識抗体により形成された該抗原-抗体複合体を、下記のものと一緒にすることにより免疫学的結合の検出方法を実行することができる：

a ) 二次抗体（またはディテクター抗体）

\* 該二次抗体（またはディテクター抗体）は、抗原-抗体複合体のエピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないモノクローナル抗体であってもよく、あるいは

\* 該二次抗体（またはディテクター抗体）は、抗原-抗体複合体のエピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないポリクローナル抗体であってもよく、該ポリクローナル抗体は、好ましくは、SNAP25またはSNAP25-一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたものである

b ) 該二次抗体に特異的にタグを付しあるいはカップリングするマーカーであって、当業者に知られたいずれかの使用可能なマーカー

c ) 抗体と脳脊髄液との間、二次抗体と神経学的マーカー-一次抗体複合体との間、および/または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適當な緩衝液；および

d ) さらに可能ならば、標準化を目的として、SNAP25を認識する抗体と反応する精製蛋白または合成ペプチド。

**【0055】**

本明細書の実施例に示すように、ポリクローナルSNAP25血清をディテクター抗体として使用してもよい。

**【0056】**

有利には、二次抗体自体がマーカーを担持しているか、あるいはマーカーに直接または間接的にカップリングする基を担持している。

**【0057】**

10

20

30

40

50

本発明は、脳脊髄液中の - シヌクレインを検出するための新たな検出方法にも関し、該方法は少なくとも下記工程を含む：

個体から脳脊髄液試料を得ること；次いで、

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、 - シヌクレインを認識するモノクローナル抗体（一次抗体または捕捉抗体）に該脳脊髄液試料を接触させること；次いで、

該脳脊髄液試料への該抗体の免疫学的結合を検出すること。

#### 【0058】

- シヌクレインを特異的に認識する抗体を脳組織中の - シヌクレインの検出に利用することができるが、脳脊髄液中の - シヌクレインの検出の証拠はない。脳脊髄液中の

- シヌクレインの存在はこれまで報告されていないので、 - シヌクレインが C S F 中に存在するかどうかは疑わしいものであった。本発明は、はじめて - シヌクレインが脳脊髄液中に存在することを示すことができた。さらに、脳脊髄液中の - シヌクレインの定量的検出のための正確な方法が開発された。また本発明者は、レーピー小体疾患（これに限らない）を包含するある種の神経変性条件下において - シヌクレインが変化することも示した。

#### 【0059】

脳脊髄液中の - シヌクレインの特異的検出を可能にするいずれの抗体をこの新しい方法に使用してもよい。本発明の方法において使用する好ましいモノクローナル抗体を、 Transduction Labs (Lexington, KY, US, カタログ番号R35520) から得ることができる。

10

20

#### 【0060】

有利には、本発明で使用するモノクローナル抗体は適當な支持体上に固定化された状態である。可能ならば、この固定化状態は抗 I g G で被覆されたあるいは被覆されていないマイクロタイタープレートであってもよい。別法として、当業者に知られた他のいずれかのイムノアッセイフォーマットを用いることにより本発明方法を実施してもよい。

#### 【0061】

次いで、抗原および - シヌクレイン認識抗体により形成された該抗原 - 抗体複合体を、下記のものと一緒にすることにより免疫学的結合の検出方法を実行することができる：

a ) 二次抗体（またはディテクター抗体）

\* 該二次抗体（またはディテクター抗体）は、抗原 - 抗体複合体のエピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないモノクローナル抗体であってもよく、あるいは

30

\* 該二次抗体（またはディテクター抗体）は、抗原 - 抗体複合体のエピトープを認識するが、単独の一次抗体を認識しないポリクローナル抗体であってもよく、該ポリクローナル抗体は、好ましくは、 - シヌクレインまたは - シヌクレイン - 一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたものである

b ) 該二次抗体に特異的にタグを付しあるいはカップリングするマーカーであって、当業者に知られたいずれかの使用可能なマーカー

c ) 抗体と脳脊髄液との間、二次抗体と神経学的マーカー - 一次抗体複合体との間、および / または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適當な緩衝液；および

40

d ) さらに可能ならば、標準化を目的として、 - シヌクレインを認識する抗体と反応する精製蛋白または合成ペプチド。

#### 【0062】

有利には、二次抗体自体がマーカーを担持しているか、あるいはマーカーに直接または間接的にカップリングする基を担持している。

#### 【0063】

好ましい具体例において、 R a b 3 a 、 S N A P 2 5 および / または - シヌクレインを検出するためのこれら的方法を、 1 またはそれ以上の他の神経学的マーカーの検出方法と組み合わせて使用して、個体における神経変性を特異的に検出、定量および / または分別診断することができる。

50

## 【0064】

さらに好ましい具体例において、Rab3a、SNAP25および/または -シヌクレインを検出するためのこれらの方法を、タウ、ホスホタウ、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub>、 -アミロイド<sub>(1-40)</sub>、ニューロモジュリン、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)からなる群より選択される1またはそれ以上の神経学的マーカーの検出方法と組み合わせて使用することができる。

## 【0065】

より詳細には、神経変性の特異的検出、定量および/または分別診断に使用されるマーカーを下記の群から選択することができる：

タウ、ホスホタウ、NSE、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub>、 -アミロイド<sub>(1-40)</sub><sup>10</sup>  
)、ニューロモジュリンまたはRab3a；あるいは  
タウ、ホスホタウ、NSE、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub>、 -アミロイド<sub>(1-40)</sub>  
)、ニューロモジュリンまたはSNAP25；あるいは  
タウ、ホスホタウ、NSE、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub>、 -アミロイド<sub>(1-40)</sub>  
)、ニューロモジュリンまたは -シヌクレイン。

## 【0066】

上記群からの3、4、5、6または7つの可能なマーカーを、個体における神経変性の特異的検出、定量および/または分別診断に使用することができる。

## 【0067】

もう1つの具体例において、Rab3a、SNAP25および/または -シヌクレインを検出する方法を組み合わせて使用して、神経変性の特異的検出、定量および/または分別診断を行うことができる。したがって、本発明は、神経学的マーカーの2つまたは3つがRab3a、SNAP25および -シヌクレインからなる群より選択される方法に関する。<sup>20</sup>

## 【0068】

非常に特別な具体例は、アルツハイマー病および/またはレーピー小体疾患の特異的検出または定量のための、および/またはアルツハイマー病とレーピー小体疾患との分別診断のための上記方法に関し、該方法において、

脳脊髄液試料中の少なくとも -シヌクレインのレベルが決定され；および/または  
脳脊髄液試料中のタウ、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub> および -シヌクレインのレベル<sup>30</sup>  
が決定される。

## 【0069】

もう1つの非常に特別な具体例は、アルツハイマー病の特異的検出または定量のための、および/またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別診断のための方法に関し、該方法において、

脳脊髄液試料中のタウ、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub> およびRab3aのレベルが決定され；あるいは

脳脊髄液試料中のタウ、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub> およびSNAP25のレベルが決定される。

## 【0070】

もう1つの非常に特別な具体例は、アルツハイマー病および/またはパーキンソン病の特異的検出または定量のための、および/またはアルツハイマー病とパーキンソン病との分別診断のための方法に関し、該方法において、脳脊髄液試料中のタウ、 -アミロイド<sub>(1-42)</sub> およびニューロモジュリンのレベルが決定される。<sup>40</sup>

## 【0071】

もう1つの非常に特別な具体例は、化学療法、化合物への曝露および/または放射線照射により誘導された神経変性の特異的検出または定量のための方法に関し、該方法において、脳脊髄液試料中のタウ、ニューロン特異的エノラーゼおよびニューロモジュリンのレベルが決定される。

## 【0072】

もう 1 つの非常に特別な具体例は、脳腫瘍または白血病の治療を受けた個体において化学療法、化合物への曝露および / または放射線照射により誘導された神経変性の特異的検出または定量のための方法に関し、該方法において、脳脊髄液試料中のタウ、ニューロン特異的エノラーゼおよびニューロモジュリンのレベルが決定される。

#### 【 0 0 7 3 】

もう 1 つの非常に特別な具体例は、周産期仮死により誘導された神経変性の特異的検出または定量のための方法に関し、該方法において、少なくとも 3 つの神経学的マーカーが検出される。

#### 【 0 0 7 4 】

もう 1 つの非常に特別な具体例は、前頭側頭葉痴呆の特異的検出または定量、および / または前頭側頭葉痴呆と他の痴呆との分別診断のための方法に関し、該方法において、脳脊髄液試料中のタウ、ホスホタウおよび - アミロイド<sub>( 1 - 4 2 )</sub> のレベルが決定される。 10

#### 【 0 0 7 5 】

もう 1 つの非常に特別な具体例は、アルツハイマー病における血管の問題の特異的検出または定量のための、異なる形態のアルツハイマー病の分別診断のための、および / またはアルツハイマー病と他の痴呆との分別診断のための方法に関し、該方法において少なくとも :

脳脊髄液試料中のタウおよび - アミロイド<sub>( 1 - 4 2 )</sub> のレベルが定量的に決定され、血漿試料中の - アミロイド<sub>( 1 - 4 2 )</sub> のレベルが定量的に決定され ; あるいは 20

脳脊髄液試料中のホスホタウおよび - アミロイド<sub>( 1 - 4 2 )</sub> のレベルが定量的に決定され、血漿試料中の - アミロイド<sub>( 1 - 4 2 )</sub> のレベルが定量的に決定され ; あるいは

脳脊髄液試料中のタウおよびホスホタウのレベルが定量的に決定され、血漿試料中の - アミロイド<sub>( 1 - 4 2 )</sub> のレベルが定量的に決定され ; あるいは

脳脊髄液中のタウ、ホスホタウおよび - アミロイド<sub>( 1 - 4 2 )</sub> のレベルが定量的に決定される。

#### 【 0 0 7 6 】

個体の体液中の少なくとも 3 つの神経学的マーカーのレベルを決定することによる、個体における神経変性の特異的検出、定量および / または分別診断のための上記方法を単独で使用することができ、あるいは簡単にモニターされる神経学的終点（例えば、白血球カウント）と組み合わせて、あるいは血漿中の薬剤濃度の測定と組み合わせて使用することができる。 30

#### 【 0 0 7 7 】

また本発明は、個体における神経変性の特異的検出、定量および / または分別診断のための診断キットにも関し、該キットは該個体の 1 またはそれ以上の体液試料中の異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する少なくとも 3 つの抗体を含む。

#### 【 0 0 7 8 】

より詳細には、本発明は、個体における神経変性の特異的検出、定量および / または分別診断のためのキットに関し、該キットは少なくともマイクロタイタープレートのごとき支持体を含み、該支持体は該個体の 1 またはそれ以上の体液試料中の異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する、一緒にされたあるいは別個のウェル中にある少なくとも 3 つの抗体を有している。 40

#### 【 0 0 7 9 】

また本発明は、個体における神経変性の特異的検出、定量および / または分別診断のためのキットにも関し、該キットは下記のものを含む :

異なる神経学的マーカーをそれぞれ認識する、一緒にされたあるいは別個のウェル中にある少なくとも 3 つの抗体（一次抗体または捕捉抗体）を含むマイクロタイタープレートのごとき支持体、

神経学的マーカー - 一次抗体複合体の 1 つをそれぞれ認識する二次抗体（ディテクター 50

抗体 )

\* 該二次抗体は神経学的マーカー - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないモノクローナル抗体であつてもよく、あるいは

\* 該二次抗体は神経学的マーカー - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないポリクローナル抗体であつてもよく、該ポリクローナル抗体は、好ましくは、固定化された神経学的マーカーまたは神経学的マーカー - 一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたものである

可能ならば、該二次抗体に特異的にタグを付するあるいはカップリングするためのマーク - 10

可能ならば、一次抗体と体液試料との間、二次抗体と神経学的マーカー - 一次抗体複合体との間、および / または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適当な緩衝液、

可能ならば、標準化を目的として、神経学的マーカーの検出に使用されるキットの抗体により特異的に認識される精製蛋白または合成ペプチド。

#### 【 0080 】

特別な具体例において、本発明は、上記方法の 1 つまたはそれ以上を行うためにそれぞれ設計された上記診断キットに関する。

#### 【 0081 】

より詳細には、本発明は、下記のものを特異的に認識する抗体を少なくとも含む上記診断キットに関する :

- シヌクレイン ; あるいは

タウ、 - アミロイド ( 1 - 4 2 ) および - シヌクレイン ; あるいは

タウ、 - アミロイド ( 1 - 4 2 ) および R a b 3 a ; あるいは

タウ、 - アミロイド ( 1 - 4 2 ) および S N A P 2 5 ; あるいは

タウ、 - アミロイド ( 1 - 4 2 ) およびニューロモジュリン ; あるいは

タウ、ニューロン特異的エノラーゼおよびニューロモジュリン ; あるいは

タウ、ホスホタウおよび - アミロイド ( 1 - 4 2 ) ; あるいは

タウおよび - アミロイド ( 1 - 4 2 ) 。

#### 【 0082 】

また本発明は、脳脊髄液中の R a b 3 a を検出するためのキットにも関し、該キットは R a b 3 a を認識するモノクローナル抗体を少なくとも含む。

#### 【 0083 】

また本発明は、脳脊髄液中の R a b 3 a を検出するためのキットにも関し、該キットは R a b 3 a を認識するモノクローナル抗体を含むマイクロタイタープレートのごとき支持体を少なくとも含む。

#### 【 0084 】

より詳細には、本発明は、脳脊髄液中の R a b 3 a を検出するためのキットに関し、該キットは下記のものを含む :

少なくとも、R a b 3 a を認識するモノクローナル抗体（一次抗体または捕捉抗体）を含むマイクロタイタープレートのごとき支持体

二次抗体（またはディテクター抗体）

\* 該二次抗体は R a b 3 a - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないモノクローナル抗体であつてもよく、あるいは

\* 該二次抗体は R a b 3 a - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないポリクローナル抗体であつてもよく、該ポリクローナル抗体は、好ましくは、固定化された R a b 3 a または R a b 3 a - 一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたもの

10

20

30

40

50

である

可能ならば、該二次抗体に特異的にタグを付するあるいはカップリングするためのマークー、

可能ならば、一次抗体と体液試料との間、二次抗体と R a b 3 a - 一次抗体複合体との間、および / または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適当な緩衝液、

可能ならば、標準化を目的として、R a b 3 a の検出に使用されるキットの抗体により特異的に認識される精製蛋白または合成ペプチド。

#### 【 0 0 8 5 】

また本発明は、脳脊髄液中の S N A P 2 5 を検出するためのキットにも関し、該キット 10 は S N A P 2 5 を認識するモノクローナル抗体を少なくとも含む。

#### 【 0 0 8 6 】

また本発明は、脳脊髄液中の S N A P 2 5 を検出するためのキットにも関し、該キット 10 は S N A P 2 5 を認識するモノクローナル抗体を含むマイクロタイタープレートのごとき支持体を少なくとも含む。

#### 【 0 0 8 7 】

より詳細には、本発明は、脳脊髄液中の S N A P 2 5 を検出するためのキットに関し、該キットは下記のものを含む：

少なくとも、S N A P 2 5 を認識するモノクローナル抗体（一次抗体または捕捉抗体） 20 を含むマイクロタイタープレートのごとき支持体

二次抗体（またはディテクター抗体）

\* 該二次抗体は S N A P 2 5 - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないモノクローナル抗体であってもよく、あるいは

\* 該二次抗体は S N A P 2 5 - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないポリクローナル抗体であってもよく、該ポリクローナル抗体は、好ましくは、固定化された S N A P 2 5 または S N A P 2 5 - 一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたものである

可能ならば、該二次抗体に特異的にタグを付するあるいはカップリングするためのマークー、

可能ならば、一次抗体と体液試料との間、二次抗体と S N A P 2 5 - 一次抗体複合体との間、および / または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適当な緩衝液、

可能ならば、標準化を目的として、S N A P 2 5 の検出に使用されるキットの抗体により特異的に認識される精製蛋白または合成ペプチド。

#### 【 0 0 8 8 】

また本発明は、脳脊髄液中の - シヌクレインを検出するためのキットにも関し、該キットは - シヌクレインを認識するモノクローナル抗体を少なくとも含む。

#### 【 0 0 8 9 】

また本発明は、脳脊髄液中の - シヌクレインを検出するためのキットにも関し、該キットは - シヌクレインを認識するモノクローナル抗体を含むマイクロタイタープレートのごとき支持体を少なくとも含む。

#### 【 0 0 9 0 】

より詳細には、本発明は、脳脊髄液中の - シヌクレインを検出するためのキットに関し、該キットは下記のものを含む：

少なくとも、- シヌクレインを認識するモノクローナル抗体（一次抗体または捕捉抗体）を含むマイクロタイタープレートのごとき支持体

二次抗体（またはディテクター抗体）

\* 該二次抗体は - シヌクレイン - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形

10

20

30

40

50

成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないモノクローナル抗体であつてもよく、あるいは

\* 該二次抗体は - シヌクレイン - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成できるが、単独の一次抗体とは免疫学的複合体を形成できないポリクローナル抗体であつてもよく、該ポリクローナル抗体は、好ましくは、固定化された - シヌクレインまたは - シヌクレイン - 一次抗体複合体を用いる免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたものである

可能ならば、該二次抗体に特異的にタグを付するあるいはカップリングするためのマークター、

可能ならば、一次抗体と体液試料との間、二次抗体と - シヌクレイン - 一次抗体複合体との間、および / または結合二次抗体とマークターとの間の免疫学的反応を行うための適当な緩衝液、

可能ならば、標準化を目的として、 - シヌクレインの検出に使用されるキットの抗体により特異的に認識される精製蛋白または合成ペプチド。

#### 【0091】

また本発明は、特定の治療の治療モニタリングおよび / または有効性の決定のための上記いずれかの方法またはキットの使用にも関する。開示したマークターのいずれかに特異的な抗体を記載するすべての文献の内容を、参照により本明細書に一体化させる。

#### 【0092】

以下の実施例は本発明を説明するためにだけ役立つ。

#### 【0093】

#### 【表1】

表1. 化学療法の神経学的合併症(部分リスト)

脳障害	脳の症候群	骨髄障害	末梢神経障害	筋障害	卒中様症候群
BCNU	シタラビン	IT メトレキセート	シスブラチン ビンクリスチン (シタラビン)	コルチコステロイド*	L-アスパラギナーゼ*
シスブラチン	5-F-ウラシル	プロカルバジン	チオテハ <sup>*</sup>		mtx
シタラビン			(プロカルバジン)		(ic) BCNU
5-FA-ウラシル			)		(ic) シスブラチン
イフオスファミド <sup>*</sup>					
L-アスパラギナーゼ*					
メトレキセート					
プロカルバジン					
コルチコステロイド*					
生物学的応答修飾剤:IL-2, インターエフェロン					

10

20

30

#### 【0094】

40

【表2】

神経学的疾患	CSF										血漿 BA <sub>(1-42)</sub>
	tau	P-tau	NSE	βA <sub>(1-42)</sub>	βA <sub>(1-40)</sub>	NM	Rab3a	SNAP25	NF	14-3-3	S100
AD	+		-		+	-	-	-			+
血管性疾患	=		-		-	-	-	-	+		+
PD	=		=		-						
CJD	+	+	-						+	+	
GBS	+	+	-								
ALS	+		=								
MS	+	+									+
白血病の治療	+	+	=								
FTD	+	+	-								

+: 神経学的マーカー量の増加

-: 神経学的マーカー量の減少

=: 神経学的マーカー量の変化なし

略号: AD: アルツハイマー病; PD: パーキンソン病; CJD: Creutzfeld Jacob 病; GBS: Guillain Barre 症候群; ALS: 筋萎縮性側索硬化症; MS: 多発性硬化症; P-tau: ホスホ-タウ; NSE: ニューロン特異的エヌローゼ; βA(1-42); βA(1-40); β-アミロイド<sub>(1-40)</sub>; NM: ニューロモジュリン; NF: 神経フィラメント

【0095】

## 【表3】

表3. マウス $\alpha$ -シヌクレインの免疫後に得られた力価

動物	抗原	直接被覆において評価された力価
312 (m3)	5 $\mu$ g $\alpha$ -シヌクレイン蛋白	>512000
312 (m2)	5 $\mu$ g $\alpha$ -シヌクレイン蛋白	100000
309 (m2)	1°: 50 $\mu$ g $\alpha$ -シヌクレイン 2°: 5 $\mu$ g ペプチド (IGP1463 )	512000 (ペプチドに関する力価2000)
309 (m4)	1°: 50 $\mu$ g $\alpha$ -シヌクレイン 2°: 5 $\mu$ g ペプチド (IGP1463 )	128000
313 (m2)	1°: 50 $\mu$ g 蛋白 2°: 5 $\mu$ g 蛋白	2500000
308 (m4)	50 $\mu$ g 蛋白	250000

【0096】

## 【表4】

表4. CSF中の細胞内蛋白のレベル(平均値±標準偏差)

マーカー	AD	VAD	対照
	n = 32	n = 20	n = 11
年齢	75 ± 7*	81 ± 7*	68 ± 5
Rab3a (pg/ml)	16 ± 5*	16 ± 4*	23 ± 4
SNAP25 (AU)	164 ± 12*	169 ± 12*	183 ± 10
タウ (pg/ml)	829 ± 440*	512 ± 209*	225 ± 128
$\beta$ -アミロイド <sub>(1-42)</sub> (pg/ml)	310 ± 115	343 ± 107	**

AU = 任意の単位

\*対照とは有意に異なる ( $p \leq 0.05$ ; Whitney検定).\*\*対照患者のCSF中の $\beta$ -アミロイド<sub>(1-42)</sub>に関するデータは使用できなかつた

【0097】

【表5】

表5. 個別マーカーおよびマーカーの組み合わせに関する公算比

	カットオフ	感度	特異性	確度比	
Rab3a	230 mOD	90.4%	81.8%	5.0	
SNAP25	170 mOD	69.2%	91.7%	8.3	
タウ	262 pg/ml	92.9%	71.4%	3.3	
$\beta$ -アミロイド <sub>(1-42)*</sub>	629 pg/ml	98.5%	28.6%	1.4	
タウ- $\beta$ -アミロイド <sub>(1-42)*</sub>		91.5%	79.6%	4.5	
タウ-Rab3a		83.9%	94.8%	16.2	
タウ-SNAP25		64.3%	97.6%	27.0	10
$\beta$ -アミロイド <sub>(1-42)</sub> -Rab3a*		89.1%	87.0%	6.9	
$\beta$ -アミロイド <sub>(1-42)</sub> -SNAP25*		68.2%	94.0%	11.5	
タウ- $\beta$ -アミロイド <sub>(1-42)</sub> -Rab3a*		82.7%	96.3%	22.3	
タウ- $\beta$ -アミロイド <sub>(1-42)</sub> -SNAP25		63.3%	98.3%	37.2	
*					

\*対照患者から得たCSF中の $\beta$ -アミロイド<sub>(1-42)</sub>に関するデータを別の研究から得た

【0098】

【表6】

タイプ	サブタイプ	詳細	全数 (長期)	年齢 (範囲)	男／女	
					男	女
非-B ALL/NHL	通常	CD10+ ダウン症候群	15(8) 2(1) 2(2) 1(1) 1(0) 8(7) 1(1) 6(3)	8(2-17) 6, 9 3, 12 6 5 6(1-16) 5 8(2-17)	7/8 1/1 1/1 0/1 0/1 5/3 0/1 4/2	
VHR	通常	通常-B細胞 プロ-B細胞 プレ-B細胞 T細胞	1(1) 1(1) 1(1) 2(1)	7 7 12 3, 9	1/0 1/0 1/0 1/1	
	Brachmann-de Lange		1(0)			

【0099】

表6. 続き

タイプ	サブタイプ	詳細	全数 (長期)	年齢 (範囲)	男／女
B-NHL	B-細胞	4 (4)	9 (7 - 12)	4/0	
	Burkitt	3 (2)	5 (3 - 7)	3/0	
	ALCL	2 (2)	13, 13	2/0	
AML	M0	1 (1)	2	1/0	
	ダウノン症候群	2 (2)	1, 2	0/2	
	M1	1 (1)	13	0/1	
	M2	1 (1)	13	0/1	
	M7	CNS+	1 (1)	3	0/1

表7a. B-細胞 cell NHL を有する患者のための治療プロトコル (UKCCSG 9602)

治療フェーズ	薬剤	用量	投与経路	何日目か
COP (7日間)	プレドニソロン ビンクリスチン シクロホスファミド MTX ヒドロコルチゾン	60 mg/m <sup>2</sup> /d 1 mg/m <sup>2</sup> 300 mg/m <sup>2</sup> 年齢に応じて 年齢に応じて	PO IV IV IT IT	1 - 7 1 1 <u>LP1</u> <u>LP1</u>
*** 患者の状態に応じて開始				
COPADM 1 および COPADM 2 (5日間)	プレドニソロン ビンクリスチン シクロホスファミド ドキソルビシン MTX ヒドロコルチゾン	60 mg/m <sup>2</sup> /d 2 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup> /d 60 mg/m <sup>2</sup> 年齢に応じて 3000 mg/m <sup>2</sup> 年齢に応じて	PO IV IV IV IT IV IT	1 - 5 1 2 - 4 2 <u>LP2</u> , 6 ( <u>LP3</u> ) 1 2 ( <u>LP2</u> , 6 ( <u>LP3</u> )
*** 患者の状態に応じて開始				

【表9】

表7a. 続き 治療フェーズ		薬剤	用量	投与経路	Days
CYM 1 および CYM 2 (6日間)	MTX	年齢に応じて 3000 mg/m <sup>2</sup>	IT IV	2 (LP4) 1	
	ヒドロコルチゾン	年齢に応じて	IT	2 (LP4), 7 (LP5)	
	Ara-C	年齢に応じて	IT	7 (LP5)	
		100 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	2~6	
*** 患者の状態に応じて開始					

COPADM 3 (5日間)	プレドニソロン ビンクリスチン シクロホスファミド ドキソルビシン MTX	60 mg/m <sup>2</sup> /d 2 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup> /d 60 mg/m <sup>2</sup> 年齢に応じて 3000 mg/m <sup>2</sup>	PO IV IV IV IT IV	1~5 1 2~3 2 2 1
	ヒドロコルチゾン	年齢に応じて	IT	2

IT = 鞘内; IV = 静脈内, PO = 経口, LP = 腰椎せん刺, MTX = メトトレキセート, Ara-C = アラビノシド

【表10】

表7b：非-B細胞 ALL/NHL 患者のための治療プロトコル (EORTC 58881).

治療フェーズ	薬剤	用量	投与経路	何日目か
プレフェーズ	プレドニソロン MTX	60 mg/m <sup>2</sup> /d 年齢に応じて	PO IT	1 - 7 1 ( <i>LP1</i> ), 8 ( <i>LP2</i> ), 22 ( <i>LP3</i> )
プロトコルI: 誘導 (37日間)	プレドニソロン	60 mg/m <sup>2</sup> /d 20 mg/m <sup>2</sup> /d 10 mg/m <sup>2</sup> /d 5 g/m <sup>2</sup> /d 1.5 mg/m <sup>2</sup> 30 mg/m <sup>2</sup> 10000 U/m <sup>2</sup>	PO PO PO IV IV IV	8 - 28 29 - 31 32 - 34 35 - 37 8, 15, 22, 29 8, 15, 22, 29 12, 15, 19, 22, 25, 29, 32, 35
プロトコルI: 強化 (26日間)	シクロホスファミド 6-メルカブトプリン Ara-C MTX	1000 mg/m <sup>2</sup> 60 mg/m <sup>2</sup> 75 mg/m <sup>2</sup> 年齢に応じて (14日間)	IV PO IV IT	36, 63 36 - 63 38 - 41, 45 - 48, 52 - 55, 59 - 62 38 ( <i>LP4</i> ), ( <i>LP5</i> )

【0103】

【表 1-1】

表 7 b. 続き  
治療フェーズ

治療フェーズ	薬剤	用量	投与経路	何日目か、 (LP8), 51 (LP9)
インター-バル治療 (56日間)	6-メルカブトプリン MTX	25 mg/m <sup>2</sup> 5000 mg/m <sup>2</sup> 年齢に応じて	PO IV IT	1 - 56 8, 22, 36, 50 9 ( <u>LP6</u> ), 23 ( <u>LP7</u> ), 37 ( <u>LP8</u> ), 51 ( <u>LP9</u> )
<b>(14 days)</b>				
プロトコル II: 誘導 (35日間)	デキサメタゾン ビンクリスチン アドリアマイシン E coli アスハラギナーゼ シクロホスファミド 6-チオグアニン Ara-C MTX	6 mg/m <sup>2</sup> /d 3 mg/m <sup>2</sup> /d 1 mg/m <sup>2</sup> /d 1.5 mg/m <sup>2</sup> 30 mg/m <sup>2</sup> 10000 U/m <sup>2</sup> 1000 mg/m <sup>2</sup> 60 mg/m <sup>2</sup> 75 mg/m <sup>2</sup> 年齢に応じて	PO PO IV IV IV IV IV PO IV IT	1 - 21 22 - 35 26 - 29 8, 15, 22, 29 8, 15, 22, 29 8, 11, 15, 18 36 36 - 49 38 - 41, 45 - 48 38 ( <u>LP10</u> )
<b>(14日間)</b>				
メンテナンス	6-メルカブトプリン MTX	50 mg/m <sup>2</sup> /d 20 mg/m <sup>2</sup> 毎週	PO PO	合計治療期間 = 2年

【0104】

【表 1 2】

表 7 c : AML患者のための治療プロトコル (EORTC 58921).

治療フェーズ	薬剤	用量	投与経路	何日目か、
誘導	Ara-C	100 mg/m <sup>2</sup>	IV	1, 2
	Ara-C	200 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	3 - 8
	ミトキサントロン	10 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	3 - 5
	VP16	150 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	6 - 8
第 1 強化	Ara-C	年齢に応じて	IT	1 ( <u>LP1</u> ), 8 ( <u>LP2</u> )
	Ara-C	3000 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	1 - 4
	ミトキサントロン	10 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	5 - 7
第 2 強化	ダウノルビシン	20 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	1 - 4
	Ara-C	200 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	1 - 4
	VP16	100 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	1 - 4
	6-チオグアニン	100 mg/m <sup>2</sup> /d	PO	1 - 4
	デキサメタソン	6 mg/m <sup>2</sup> /d	PO	1 - 4
第 3 強化	Ara-C	年齢に応じて	IT	1 ( <u>LP3</u> ), 4 ( <u>LP4</u> )
	Ara-C	2000 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	1 - 3
	メンテナンス	125 mg/m <sup>2</sup> /d	IV	2 - 5
	6-チオグアニン	40 mg/m <sup>2</sup>	PO	1 年間
	Ara-C	40 mg/m <sup>2</sup>	SC	1 カ月に 4 日

IT = 脊内; IV = 静脈内, PO = 経口, SC = 腹腔せん刺, Ara-C = アラビノシド, VP16=

【0 1 0 5】

## 【表13】

表8. 実施例7に記載した4群の患者に関するタウ、 $\beta$ -アミロイド(1-42)およびニューロモジュリンの平均脳脊液レベル

群	n	男/女	年齢	タウ	$\beta$ -アミロイド <sup>*</sup> (1-42)	ニューロモジュリ
対照	70	36/34	45 ± 16	120 ± 78	466 ± 168	504 ± 283
記憶障害	7	05/02	61 ± 10	253 ± 139*	184, 184, 550	518 ± 168
AD	27	16/11	71 ± 12	316 ± 186*	244 ± 74*	927 ± 391*
VAD	5	02/03	68 ± 5	235 ± 82	272, 413	737 ± 514

\*対照とは有意に異なる ( $p < 0.01$ ; two-tailed Wilcoxon検定).

pg/mlでレベルを表す、平均値 ± 標準偏差

## 【0106】

【表14】

表9. アルツハイマー病患者、ペーキンソン病患者および年齢を合わせた対照患者におけるタウ、 $\beta$ -アミロイド<sub>(1-42)</sub>およびニューロモジュリンの平均脳脊髄液レベル

診断	N	年齢	タウ	NM	A $\beta$ 42	A $\beta$ 42x (NM/タウ)	タウ/NM
AD	60	62.5±	18.1±12.3**	66.2±32.8	84.4±28.2**	0.356±0.236**	0.269±0.077**
		8.2					
PD	23	70.7±	7.6±3.0	38.8±13.7* <sup>++</sup>	135.1±37.0* <sup>++</sup>	0.730±0.291** <sup>++</sup>	0.196±0.051** <sup>++</sup>
		9.0					
C	32	71.5±	7.5±4.1	56.5±28.6	171.0±54.0	1.369±0.618	0.134±0.032
		5.2					

\*\*対照患者とは有意に異なる ( $p<0.01$ )； \*対照患者とは有意に異なる ( $p<0.05$ )；<sup>++</sup> AD患者とは有意に異なる ( $p<0.01$ )； <sup>\*</sup> AD患者とは有意に異なる ( $p<0.05$ )

生物学的パラメータに関する結果をPMで表す (平均 ± 標準偏差)

NM = ニューロモジュリン； AD = アルツハイマー病； PD = パーキンソン病； C = 対照患者

## 【実施例1】

## 【0107】

## 実施例1：CSF中のRab3aおよびSNAP25の検出

## 1.1 Rab3aおよびSNAP25のクローニング

製造者の增幅プロトコルに従ってQuick-Screen™ヒトcDNAライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA, USA; カタログ番号K1003-1) からRab3aおよびSNAP25コード

イング配列を増幅するために特別なプライマーを使用した。簡単に説明すると、94で45秒、60で45秒アニーリング、次いでTaqポリメラーゼ( Stratagene, Amsterdam, The Netherlands; カタログ番号600131)を用いて72で2分伸長からなるサイクルを35サイクル行った。72で7分間のポリメラーゼ伸長反応にてプログラムを終了した。Perkin-Elmer (Ueberlingen, Germany) DNAサーマルサイクラー(480型)にて反応を行った。Rab3aを増幅するためのプライマーの配列はヒトRab3a配列(Zahraoui et al., 1989)に基づくものであった: ATG プライマーとしてATG GCA TCG G CC ACA GAC TCG CGC TAT GGG ( $T_m=76$ ) および逆プライマーとしてCGCG TCTAG AGG CTC T CA GCA GGC GCA GTC CTG GTG CGG ( $T_m=77$ )。SNAP25を増幅するためのプライマーの配列はヒトSNAP25配列(Zhao et al., 1994)に基づくものであった: ATG プライマーとしてATG GCC GAA GAC GCA GAC ATG CGC AAT GAG ( $T_m=75$ ) および逆プライマーとしてCGCG CTAG ACA CTT AAC CAC TTC CCA GCA TCT TTG TTG ( $T_m=59$ )。

PCR生成物を再増幅して十分な量のPCR生成物を得て、T4DNAポリメラーゼで仕上げを行い、XbaIで切断し、NcoIで平滑末端化され、XbaIで切断されたpIGRHISA (Innogenetics, Gent, Belgium; カタログ番号2075)中に連結した。これにより、Rab3aに関してpIGRHISARab3a (Innogenetics, Gent, Belgium; カタログ番号3008)を、SNAP25に関してpIGRH6SNAP25a (Innogenetics, Gent, Belgium; カタログ番号2941)を得た。連結生成物をDH1( ) (Bachmann, 1987)中に形質転換し、テトラサイクリン耐性コロニーをインサートの存在について分析した。インサートを配列決定し、正しい配列(Zahraoui et al., 1989; Zhao et al., 1994)を含むプラスミドをさらに使用した。Rab3aに関しては、PCRによるいくつかの人工的要因が存在した。2つのクローンから正しい配列を組み立てた。

#### 【0108】

##### 1.2 Rab3aおよびSNAP25の発現および精製

PLに基づく発現系pIGRHISARab3aおよびpIGRH6SNAP25aを用いてRab3aおよびSNAP25をそれぞれイー・コリにおいて発現させた。温度感受性cIリプレッサーを有するMC1061pAC1 (Wertman et al., 1986)中に正しいプラスミドを形質転換した。約25kDaのクーマシー染色可能なバンドが12.5%アクリルアミドゲル上に可視化され、合理的な発現レベルが示された。組み換え蛋白は、NiIMACカラムでの精製を迅速ならしめる6個の付加ヒスチジン残基を含む融合蛋白として得られた。3リットルの熱誘導イー・コリ(Houchi, 1988; Van Gelder et al., 1993)を用いて、10mgよりも多い組み換えRab3aおよびSNAP25を精製し、少なくとも95%の均質性であった。

#### 【0109】

##### 1.3 Rab3aおよびSNAP25に特異的な抗体の取得および特徴付け

Rab3aおよびSNAP25に対する抗体をウサギにおいて生成させた。50μgの精製蛋白を2匹のウサギに腹腔内注射した(100μg/ウサギ1匹)。4週間ごとに注射を行い、ELISAで力価を測定した。抗体は脳抽出物により特徴づけられた。Rab3a免疫反応性に関する結果を図1に示す。アルツハイマー病患者および対照患者からの組織試料を、5倍体積の1%SDS、1%バナジン酸ナトリウム、10mMTris pH7.4中で迅速にホモジナイズし、次いで、水浴にて5分間煮沸することにより調製した。ホモジネートを5分間遠心分離(12000g、室温)して不溶性物質を除去した。少量の上清を用いてBCA法(Pierce, Rockford, Illinois, USA)により蛋白濃度を測定した。上清を水で希釈して蛋白濃度を2mg/mlとし、同体積の2×試料緩衝液(250mM Tris pH6.8、3% SDS、10%グリセロール、0.006%ブロモフェノールブルーおよび2% -メルカプトエタノール)を添加した。10~12.5%ゲルのLaemmli系によりゲル電気泳動を行った。半乾燥プロッティング法により蛋白をニトロセルロース(Schleicher and Schull, Dassel, Germany; カタログ番号401196)に移行させた。10mM Tris pH7.5, 150mM NaCl中の1%BSAでニトロセルロースフィルターをブロックした。1%BSA中適当濃度(±1μg/ml)10

1) の一次抗体および二次抗体を添加した。

**【0110】**

**1.4 Rab3a および SNAP25 に特異的な抗体の免疫アフィニティー精製**

0.3M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6 中で精製組み換え抗原を透析した。透析前後においてOD<sub>280</sub>値を測定して蛋白量を評価した。Mini-Leak-Medium (KEM-EN-TEC Biozyme, Vancouver, BC, Canada; カタログ番号10127、ロット番号60232-5) を用い、製造者の指示に従って免疫精製を行った。抗体の一部をビオチン化させた (Amersham, Place Little Chalfont ]Buckinghamshire, UK; カタログ番号RPN 2202)。銀染色およびウエスタンブロットにより精製および標識化をモニターした (データ示さず)。

**【0111】**

10

**1.5 CSF 中の Rab3a および SNAP25 の安定性および存在の評価**

特異的モノクローナル抗体 (Transduction Labs, Lexington, KY, USA; R35520 および S35020) を捕捉抗体として用い、免疫精製されたポリクローナルウサギ抗血清をディテクター抗体として用いて、CSF 中に添加したシナプス蛋白 Rab3a および SNAP25 の安定性を、37℃ で一晩インキュベーションした後に評価した。濃度 500 pg/ml において、SNAP25 および Rab3a に対する組み換え体の免疫反応性は試験した CSF 中で一晩置いても変化しなかった (図 2)。

50 ml の CSF からのアルブミンおよび IgG の抽出ならびにカラムでの分画により、両蛋白が CSF 中に存在するという直接的証拠を得た。フラクションを乾燥させ、試料緩衝液に溶解し、12% アクリルアミドゲルで泳動し、プロッティングした。Rab3a および SNAP25 モノクローナル抗体を用いて PVDF 膜をプローブした。予想分子量および pI の免疫反応性バンドが検出された。

20

**【0112】**

**1.6 Rab3a および SNAP25 の検出および CSF レベルの定量的測定のための ELSA の開発**

モノクローナル Rab3a または SNAP25 抗体を捕捉抗体とし、免疫アフィニティー精製されたビオチン化ポリクローナル抗体をディテクター抗体とするサンドイッチ ELSA を開発した。Maxisorp マイクロタイタープレートを Affini Pure ヤギ抗マウス IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA; カタログ番号115-035-144) で被覆した。PBS 中 1% BSA (臨床用グレード 98% 脂肪酸不含; ICN, Biomedical Research Products, Costa Mesa, CA, USA; カタログ番号 105033, ロット番号 6p384) をプロッキング緩衝液として使用した。プロッキング緩衝液で 1/1000 に希釈したマウス抗 Rab3a (Transduction Labs, Lexington, KY, USA; カタログ番号 R35520, IgG2a, クローン 9, ロット番号 606-259-1550 ロット 2) または抗 SNAP25 (Transduction Labs, Lexington, KY, USA; カタログ番号 S35020, IgG1, クローン 20) を添加した。インキュベーション後、組み換え抗原を異なる濃度で添加した (濃度範囲 40000 ~ 2.56 pg/ml)。同時に、アフィニティー精製されたウサギ抗 Rab3a または抗 SNAP25 抗血清を最適バックグラウンドシグナル比となるように選択した濃度で添加した。次いで、1/2000 に希釈したセイヨウワサビ標識ストレプトアビシン (Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA; カタログ番号 016-030-084) によりビオチン化ウサギ抗体を検出した。カッピングしたペルオキシダーゼを、TMB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 基質溶液により検出した。30 分後に 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止し、吸光度を 450 nm で測定した。この ELSA に基づいて 10 pg/ml 程度の Rab3a を検出することができた。SNAP25 のアッセイは同じ原理に基づくものであった。

30

**【実施例 2】**

40

**【0113】**

**実施例 2 : 脳脊髄液中の - シヌクレインの存在および検出**

**2.1 - シヌクレインに対する特異性に関する市販抗体の評価**

異なるシヌクレインのイソ形態 (isoform) に対する市販モノクローナル抗体 (Transdu

50

ction Labs, Lexington, KY, USA; カタログ番号 S63320, IgG1) の特異性を評価した。公表された配列のデータ ( -synuclein: accession number L08850; -synuclein: accession number S69965; -synuclein: accession number AF010126) に基づくプライマーを用いて、 - シヌクレイン、 - シヌクレイン、 - シヌクレインのオープンリーディングフレーム ( A T G から停止コドンまで) をヒト脳 c D N A ライブラリー ( HL5018; Clontech, Palo Alto, CA, USA ) から増幅した。報告されたように、いくつかの重要なアミノ酸変化が - シヌクレインのオリジナル配列に存在した：このクローンには K 1 2 E および K 6 8 E があり、このクローンのアミノ酸 1 0 9 の多型性は E 1 0 9 V であった。アミノ末端に 6 個のさらなるヒスチジンを付加する P L ベースの発現系 ( ICCG 3307; Innogenetics, Gent, Belgium ) 中にインサートをサブクローンした。 H i s タグを付したシヌクレイン融合蛋白をイー・コリにおいて発現させた。次いで、イー・コリ蛋白を S D S - P A G E で泳動し、 Transduction Labs ( Lexington, KY, USA ) から市販されているモノクローナル抗体を用いてイムノプロッティングした。このモノクローナル抗体は - シヌクレインに対して特異性を示し、シヌクレイン蛋白のカルボキシ末端半分をマッピングしている ( 図 3 )。

#### 【 0 1 1 4 】

##### 2 . 2 脳脊髄液中の - シヌクレインの存在についての評価

数人の患者からの C S F をプールした。 Rotophor を用いて 2 0 0 m l のプールした C S F を等電点により分離した。次いで、得られたフラクションを S D S - P A G E で泳動し、 Transduction Labs ( Lexington, KY, USA ) から市販されているモノクローナル抗体を用いてイムノプロッティングした。 2 つの免疫反応性バンドが 1 9 k D a の範囲に検出され、 p I は 4 ないし 6 の範囲であった ( 図 4 )。いくつかの負に荷電したアミノ酸 ( 最後の 2 0 個のアミノ酸中に 6 つの E ) は p I をより塩基性のほうへシフトさせてるので、低い方のバンドは C 末端切断形態である可能性があった。この免疫反応性に基づいて、 - シヌクレインの濃度範囲を p g / m l の範囲で評価した。

#### 【 0 1 1 5 】

##### 2 . 3 - シヌクレイン特異的抗体の取得および特徴づけ

3 リットルの誘導イー・コリ培養から - シヌクレインを精製したところ、 1 0 m g よりも多い - シヌクレインが精製された ( クーマシーおよび銀染色ゲルから評価すると純度は 9 0 % より高い ) 。いくつかの免疫スキーム ( 表 3 ) に従って蛋白をマウスに注射した。 4 回注射後、コーティング E L I S A において - シヌクレインに対する力値を評価した。 6 匹のマウスは 1 0 0 0 0 0 以上 の力値を有していた ( バックグラウンドの 2 倍の O D が得られる血清の希釈率として力値を定義 ) 。

最後の注射から 3 日後、動物 3 1 2 ( m 3 ) から脾臓細胞を取り、 Koehler and Milstein ( 1975 ) により記載された方法に大まかに準じて細胞融合に使用した。最初のスクリーニングラウンドでは、直接コーティングアッセイにおいて特異的抗体の存在についてハイブリドーマを試験した。次いで、 - 、 - 、 - シヌクレインおよび - シヌクレイン由来の欠失変異体を含有するイー・コリ溶解物のドットプロットによりそれらを再試験して、シヌクレイン蛋白上の異なるエピトープを認識する抗体を生成するハイブリドーマを選択した。

#### 【 0 1 1 6 】

##### 2 . 4 - シヌクレイン特異的抗体の特徴づけ

ドットプロットにおいて - シヌクレインに特異的であった 2 つのハイブリドーマ 3 B 5 ( I g G 2 a ) および 9 B 6 ( I g G 1 ) を単離した。その正確なエピトープを決定するために、カルボキシ末端部分 ( 位置 6 4 から 1 4 0 まで ) を、 1 0 個の重複するペプチドとして合成した ( 図 5 )。それらのペプチドはアミノ酸 1 4 個の長さで、 7 個のアミノ酸が重複していた。ビオチン化ペプチドを、 1 μ g / m l の濃度でストレプトアビシン被覆プレート上に捕捉した。これらのペプチド上で - シヌクレイン特異的抗体をインキュベーションし、次いで、抗マウス酵素結合抗体を用いて検出した。トリメチルベンジンを基質として用いて酵素セイヨウワサビペルオキシダーゼを定量した。 3 B 5 および 9 B

6は両方とも、配列LEDMPVDPDNEAYE（位置113～126）を含むペプチドを認識し、このモノクローナル抗体に対する直鎖状エピトープが示唆された（図6）。同じセットの実験において、-シヌクレインを認識することがすでに示されている市販抗体(Clone 42, IgG1, Transduction Labs, Lexington, KY, USA; カタログ番号S63320)もまた、直鎖状エピトープ（配列AGSIAATGFVKKD）（図6）にマップできた。

#### 【0117】

##### 2.5 -シヌクレイン特異的抗体の精製およびビオチン化

第2および第3ラウンドのサブクローニング後、10～20mgの抗体を精製するために抗体の生成を1～2リットルまでスケールアップする。Mini-Leak-Medium (KEM-EN-TEC Biozyme, Vancouver, BC, Canada; カタログ番号10127, ロット番号60232-5)を用いて、製造者により提供される説明に従って抗体を免疫精製する。  
10

十分に確立された方法(Bonhard et al., 1984)に従って、D-ビオチニル-エタ-アミノカプロン酸N-ヒドロキシサクシンイミドエステル(Boehringer-Mannheim, Brussels, Belgium; カタログ番号1008960)を用いてビオチン化を行う。

#### 【0118】

##### 2.6 脳脊髄液中の -シヌクレイン検出および定量的測定のためのサンドイッチELISAの開発

-シヌクレイン抗体を捕捉抗体とし、ビオチン化モノクローナル抗体の1つをディテクター抗体とするサンドイッチELISAを開発する。MaxisorpマイクロタイタープレートをAffini Pureヤギ抗マウスIgG (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA; カタログ番号115-035-144)で被覆する。PBS中1%BSA(臨床用グレード98%脂肪酸不含; ICN, Biomedical Research Products, Costa Mesa, CA, USA; カタログ番号105033, ロット番号6p384) + 1%マウス血清をプロッキング緩衝液として使用する。プロッキング緩衝液で1/1000に希釈した抗-シヌクレイン(Transduction Labs, Lexington, KY, USA)を添加する。インキュベーション後、組み換え抗原を異なる濃度で添加する(濃度範囲1000～2pg/ml)。同時に、1%マウス抗体の存在下においてビオチン化抗-シヌクレインモノクローナル抗体を最適バックグラウンドシグナル比となるように選択した濃度で添加する。次いで、1/2000に希釈したセイヨウワサビ標識ストレプトアビシン(Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA; カタログ番号016-030-084)によりビオチン化ワサギ抗体を検出する。カップリングしたペルオキシダーゼを、TMB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>基質溶液により検出する。30分後に2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を停止し、吸光度を450nmで測定する。  
20  
30

#### 【実施例3】

#### 【0119】

##### 実施例3：脳脊髄液中の他の神経学的マーカーの検出

##### 3.1 タウおよびホスホタウ

AT120を捕捉抗体とし、ビオチン化HT7-BT2をディテクター抗体として用いて、タウ抗原試験(INNOTESt hTau antigen, Innogenetics, Gent, Belgium)により全タウを測定した。モノクローナル抗体AT120は、正常ヒトタウ蛋白および過剰にリン酸化されたヒトタウ蛋白の両方と等しく十分に反応し(Vandermeeren et al., 1993)、モノクローナル抗体HT7もまた、正常ヒトタウ蛋白および過剰にリン酸化されたヒトタウ蛋白の両方と等しく十分に反応するが、モノクローナル抗体BT2は優先的に正常タウを認識する(Goedert et al., 1994)。すでに記載されたようにして(Mercken et al., 1992b)調製された、アフィニティー精製されたタウ蛋白を標準物質として使用した。  
40

HT7を捕捉抗体とし、ビオチン化AT270をディテクター抗体として用いるサンドイッチELISA(INNOTESt phospho-tau(181), Innogenetics, Gent, Belgium)を用いてホスホタウを測定した。AT270はホスホタウを特異的に認識する(国際公開WO 95/17429)。

#### 【0120】

3.2 - アミロイド<sub>(1-42)</sub>

Innotest -amyloid<sub>(1-42)</sub> (Innogenetics, Gent, Belgium) を用いて -アミロイド<sub>(1-42)</sub> 濃度を測定した。アッセイはサンドイッチ型 E L I S A であり、該アッセイにおいて第1のモノクローナル抗体 21 F 12 (アミロイドのカルボキシ末端に特異的) を捕捉抗体として使用し、ビオチン化抗体 3 D 6 (アミノ末端に特異的) をディテクター抗体として使用する。21 F 12 / 3 D 6 の組み合わせはアミロイド<sub>(1-42)</sub> ペプチドの特異的検出を可能にする。いくぶんかの交差反応性がアミロイド<sub>(1-42)</sub> に関して観察されるが、短いペプチドに関しては観察されない (Citron et al., 1997; Johnson-Wood et al., 1997)。簡単に説明すると、21 F 12 抗体を 10 mM Tris - 10 mM NaCl に懸濁し、4 度で一晩かけて Nunc Maxisorbs マイクロタイタープレートを被覆した。1回洗浄工程を行った後、25 度で 2 時間、PBS - 0.1% カゼインでプレートをブロックした。75 μl のビオチン化 3 D 6 および 25 μl の CSF または標準物質を同時インキュベーション (25 度で 1 時間) することにより試験を行った。数回洗浄工程を行った後、100 μl の HRP - ストレプトアビジン (RDI, Flanders, New York, NY, USA) を添加することにより結合抗体量を調べた。インキュベーションを 25 度で 30 分継続した。次いで、100 μl の 0.42 mM 3',5',5' - テトラメチルベンジジンをペルオキシダーゼ基質として添加した。30 分後に 50 μl の 0.9 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止した。

## 【0121】

3.3 - アミロイド<sub>(1-40)</sub>

Quality Controlled Biochemicals (QCB, Hopkinton, MA, USA) から得た、C 末端に特異的な、アフィニティー精製されたポリクローナル抗体を捕捉抗体として用い、3 D 6 (Citron et al., 1997; Johnson-Wood et al., 1997) をディテクター抗体として用いて、 -アミロイド<sub>(1-40)</sub> 濃度を測定した。10 mM Tris - 10 mM NaCl 緩衝液中で 25 度で 2 時間かけて Nunc Maxisorbs マイクロタイタープレートを 5 μg / ml のアフィニティー精製されたヤギ抗ウサギ IgG (H + L) (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA; カタログ番号 111-005-144) で被覆した。その後、4 度で一晩、プレートを PBS - 0.1% カゼインでブロックした。ウサギポリクローナル抗体 (QCB, Hopkinton, MA, USA; カタログ番号 44-348-20) を 0.5 μg / ml の濃度で添加し、25 度で 1 時間置いた。数回洗浄工程を行った後、100 μl の CSF または標準物質を 25 度で 2 時間インキュベーションした。100 μl のビオチン化 3 D 6 抗体を添加 (抱合体希釈物中 0.1 μg / ml の濃度で添加) して 25 度で 1 時間置くことにより結合アミロイド量を調べた。プレートをさらに 5 回洗浄した。100 μl の SV - AP (Gibco, Rockville, MD, USA; カタログ番号 JK-4410) を添加することにより結合抗体量を調べた。インキュベーションを 25 度で 1 時間継続した。最後の洗浄工程 (5 回) の後、基質緩衝液に溶解した 100 μl の TMB をペルオキシダーゼ基質として添加した。30 分後に 50 μl の 0.9 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止した。

## 【0122】

3.4 ニューロモジュリン

2種のエピトープ特異的モノクローナル抗体 (NM 2、NM 4; Oestreicher et al., 1994) を用いてニューロモジュリンについても測定した。捕捉抗体として NM 2 を選択し、ディテクター抗体としてビオチン化 NM 4 を選択した。組み換えニューロモジュリンを標準物質として使用した。

## 【0123】

3.5 ニューロン特異的エノラーゼ

NSE の測定は、抗 NSE モノクローナル抗体 2 E 7 を捕捉抗体として用い、ペルオキシダーゼ標識抗 NSE モノクローナル抗体 10 C 1 をディテクター抗体として用いるサンドイッチ E L I S A の測定は、抗 NSE モノクローナル抗体 2 E 7 を捕捉抗体として用い、ペルオキシダーゼ標識抗 NSE モノクローナル抗体 10 C 1 をディテクター抗体として用いるサンドイッチ E L I S A に基づくものであった。ヒト脳から精製した NSE を標準

物質として使用した (Vanmechelen et al., 1997)。

B C A 蛋白試薬 (Pierce, Rockford, Illinois, USA) を用いて蛋白濃度を決定した。

#### 【実施例 4】

##### 【0124】

実施例 4 : アルツハイマー病の特異的検出および年齢を合わせた対照に対するアルツハイマー病の分別のための神経学的マーカーとしての C S F - R a b 3 a、C S F - S N A P 2 5、C S F - タウおよび C S F - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> を用いる組み合わせアッセイ

##### 4.1 患者および対照患者

アルツハイマー病 (A D ) 群は 32 人の患者からなり、男性 15 人、女性 17 人で、平均年齢  $\pm$  S D は  $75.0 \pm 6.6$  歳であった。血管性痴呆 (V A D ) 群は 20 人の患者からなり、男性 10 人、女性 10 人で、平均年齢  $\pm$  S D は  $81.0 \pm 7.0$  歳であった。対照群は 18 個体を含み、男性 7 人、女性 11 人で、平均年齢  $\pm$  S D は  $67.5 \pm 5.5$  歳であった。N I N C D S - A D R D A 判断基準 (McKhann et al., 1984) に従って排除を行うことにより可能性のある A D の診断を行った。痴呆の進展、および / または大規模な梗塞および / または多発性裂口の C T 所見、および / または重症の血管性疾患の臨床的所見、例えば、合併症を伴う動脈高血圧または糖尿病に関連した一時的な虚血発作および / または卒中エピソードを有する患者において V A D を診断した。対照群は精神病または神経学的疾患、悪性疾患、または全身性疾患 ( 例えば、リューマチ性関節炎、感染性疾患 ) の病歴、症状または徵候のない個体からなっていた。60 歳以上の個体において、Multi-Mental state examination (Folstein et al., 1975) を用いて認識状態を試験した。28 点以下のスコアを有する患者は参加させなかった。University of Goeteberg (Goeteberg, Sweden) のEthic Committeeにより当該研究は承認された。患者 ( または彼らに最も近い親類 ) および対照群の個体は研究に参加するためのインフォームドコンセントを受けた。

##### 【0125】

##### 4.2 脳に特異的な脳脊髄液の単離

手順はDavidsson et al., 1996 に詳述されている。簡単に説明すると、5 ~ 10 ml の C S F をBlue Sepharoseカラム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に供してアルブミンを選択的に除去した。次いで、アルブミン不含フラクションを、Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に共有結合したスタフィロコッカス蛋白 G のカラムに供して I g G を吸着させた。m R P C C<sub>2</sub> / C<sub>18</sub> カラム (内径 2.1 × 100 mm、ゲル体積 0.35 ml、粒子サイズ 3 mm) を装備した S M A R T システム (Pharmacia LKB technology) を用いる m R - H P L C により未吸着蛋白を分離した。2 回のトリフルオロ酢酸のグラジエントにより蛋白を溶離した。全部で 40 個のフラクションを Savant Speed Vac Concentrator で乾燥させた。フラクションを S D S - P A G E 試料緩衝液に溶解し、超音波処理し、15 分煮沸して、12 % ポリアクリルアミドゲルで分離した。

##### 【0126】

##### 4.3 アルツハイマー病の特異的検出のための組み合わせアッセイの評価

サンドイッチ E L I S A を用いることにより、C S F - R a b 3 a、C S F - S N A P 2 5、C S F - タウおよび C S F - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> を 32 人の A D 患者、20 人の V A D 患者および 11 人の対照の C S F 試料中で測定した。すべてのマーカーの平均レベルを表 4 にまとめた。個体のタウおよび R a b 3 a 値を図 7 に示す。

A D 患者に関する最高感度および対照患者に関する最高特異性により決定されたカットオフ値に基づいて、確度比を決定した (表 5)。R a b 3 a レベルと S N A P 2 5 レベルとが相関関係を有しているので、R a b 3 a または S N A P 2 5 のいずれかをタウおよび - アミロイドと組み合わせるだけでよい (図 8)。かくして、R a b 3 a と S N A P 2 5 の組み合わせに関する確度比を調べなかつた。個々のマーカー 1 つだけあるいは 2 つだけの組み合わせに関する確度比と比較した場合の、3 つの神経学的マーカーの組み合わせ、タウ - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> - R a b 3 a ならびにタウ - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> - R a b 3 a の組み合わせに関する確度比を調べた。

<sup>4 2 ) - S N A P 2 5 の増加した確度比は、これらの3つのマーカーの組み合わせによりアルツハイマー病のより特異的かつ感度の良い検出が可能になることを示す。</sup>

依存的変数、因子としての性別、共分散としての年齢および最小精神的スコア (MMSE; Folstein et al., 1975) のようなすべてのマーカーを有する、十分に階乗的な変数の多數分析 (ANOVA) は、異なる群において、これらのパラメーターが共分散しないことを示した。さらに、タウ、<sup>-</sup>アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> および Rab3a / SNAP25 の間の有為な相関関係は、各群においても、全群を一緒にしても検出できなかった。

Rab3a および SNAP25 に対するさらなる抗体を単離する。CSF - Rab3a 、CSF - SNAP25 、CSF - タウ および CSF - <sup>-</sup>アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> のレベルを、許容される試料のサイズにより統計学的に有意な比較が可能な十分に定義された臨床診断群において研究する。  
10

#### 【実施例5】

#### 【0127】

実施例5：白血病の治療を受けた小児において化学療法により誘導された神経のダメージを診断するための、CSF - タウ、CSF - ニューロモジュリンおよびCSF - ニューロン特異的エノラーゼを用いる組み合わせアッセイ

#### 5.1 患者および対照患者

1996年8月から1998年9月までの間、the Pediatric Hemato-oncology Department of the Catholic University of Leuven, Belgiumにおいて癌の治療を受けた83人の小児から448のCSF試料を得た。すべての患者は診断時点において完全に臨床的評価を受けていた。親のインフォームドコンセントが得られた。  
20

悪性疾患の分類および治療のために、計画された腰椎せん刺 (LP) のコースに試料を供した。血液学的悪性疾患有する患者の異なる群を本研究に参加させた(表6)。第1群は、United Kingdom Children Cancers group (UKCCSG 9602) NHL protocolに従って治療された9人のB細胞非ホジキンリンパ腫患者 (B-NHL) からなっていた(表7a)。この群において、4人の患者がB細胞リンパ腫を有し、3人の患者がBurkittリンパ腫を、2人の患者が未分化ラージ細胞リンパ腫 (ALCL) を有していた。これらの患者のうち8人は長期にわたり研究された。第2および最後の群は、'European Organization for Research and Treatment of Cancer' (EORTC) protocol 58881に従って治療された非B細胞急性リンパ芽球白血病 / 非ホジキンリンパ腫 (NB ALL / NHL) の42人の患者からなっていた(表7b)。この第2群において、18人の小児はCD10 (+) ブラストまたは通常のNB ALLを有し、2人の患者はダウント症候群 (DS) を有し、1人の患者はBrachmann-de Lange症候群を有し、3人の患者は通常のB細胞ブラストを有し、1人の患者はT細胞ブラストを有し、2人の患者はプロB細胞ブラストを有し、9人の患者はプレB細胞ブラストを有し、8人の患者はT細胞ブラストを有していた。38人の小児が白血病を有し、5人の患者が非ホジキンリンパ腫段階I (1人)、段階II (3人) または段階 (IV) (1人) であり、それらのうち1人の患者は、CSF中の悪性細胞に関する研究プロトコル、眼底検査およびコントラストカプテーション (contrast adaptation) により定義された明らかなCNSの疾病 (CNS+) を有していた。5人の患者は、治療プロトコルにおいて定義された判断基準によれば非常に危険性の高い (VHR) 患者であった (2人の患者はT細胞ブラスト、3人の患者はコルチコイド耐性)。この群中の患者のうち27人は長期にわたり追跡できた。第3の患者群は急性骨髓性白血病 (AML) の6人の小児からなっており、そのうち1人の患者はCNSの疾病を有し、2人の患者はダウント症候群であった。M0表現型を有する3人の患者、およびM1、M2またはM7表現型が1人ずついた。これらすべての患者はEORTC 58921プロトコルにより治療され、長期にわたり追跡された。他の患者は異種の小児群 (n = 18) からなり、治療前後の感染の診断および段階分けのために臨床的理由により腰椎せん刺を行った。この群は5人の髄芽細胞腫の小児 (3人が段階分け中、1人が治療中、1人がフォローアップ中)、3人のホジキン病の小児 (段階分け中)、3人の横紋筋肉腫 (2人が段階分け中、1人が治療中)、2人の脊髄形成異常 (MDS) の小児 (段階分け中)、2人のランゲルハン  
30  
40  
50

ス細胞組織球炎（LCH / HLH、段階分け中）、1人の若年性慢性骨髓性白血病（CML）の小児（治療中）、絨毛癌（フォローアップ中）の小児、または胚細胞腫（段階分け中）の小児であった。健康な新生児の大きな群は利用できなかった。なぜなら、これらの患者から脳脊髄液を採取することは倫理に反するからである。対照として、髄膜炎を有する疑いがあるが陰性である小児（n = 4）、局所的網膜芽細胞腫（n = 1）の小児および家族性ヘモファゴサイティックリンパ組織炎球增多症（n = 1）の小児を参加させた。親のインフォームドコンセンサスが得られた。

#### 【0128】

##### 5.2 研究計画

見込のある、かつ長期の単一中心研究計画を用いた。研究に入る前に患者は治療を受けなかった。今回の調査研究において、58人の小児から得たCSF試料を治療前に利用した（診断的腰椎せん刺またはLP1）（さらなる詳細は表7参照）。大部分の患者に関してすべての時点において残りの試料が利用できなかった。失われた値は小児の疾病の状態によるのではなく、サンプリングまたは試料の保存の間の人為的要因によるものであった。

診断ワークアップのためのベースラインまたは化学療法のIT投与直前のいずれかにおいて、ルーチンな分析のために腰椎せん刺を行った。別々のポリプロピレンチューブに5mlのCSFを集めた。1の試料を即座に1500rpmで2分間遠心分離して細胞および他の不溶性物質を除去した。引き続いて行う分析のために上清を -70°で保存した。凍結 / 融解サイクルの数を最小限とした。ルーチンなCSF測定は、細胞学的項目、蛋白濃度、グルコース等を含む。

診断群にかかわらずすべての神経学的マーカーのデータに関する正規化が拒否されたので、非パラメトリック統計を分析に使用した。Kruskal-Wallis検定を用いて、エフェクト変数（タウ、ニューロモジュリン、蛋白等）に関する群の差異を調べた。Wilcoxonサインドランクス検定、マッチドペア（Wilcoxon signed ranks test, matched-pairs）を用いて、最初の診断LPとその後のLPとの間の相違をチェックした。Prismソフトウェアv2.01（Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA）、Systatバージョン7（SPSS, Chicago, IL, USA）を用いて分析を行った。

#### 【0129】

##### 5.3 化学療法により誘導された神経ダメージの診断のための組み合わせアッセイの評価

###### 治療前の神経学的マーカーのレベル

まず、感染性疾患（しかしながら、ウイルスおよび細菌培養陰性）（n = 4）の小児から得たCSF試料についてタウの正常な上限を調べた。1人の患者は非常に局部的な網膜芽細胞腫を有し、1人の小児は家族性HLHについてスクリーニングされた者であった。対照小児における平均タウ値は106.2pg/ml（95% CI = 34.3 ~ 178.0）であった。任意のカットオフ正常値は312pg/ml（平均 + 3SD）であり、それは成人において観察される値の範囲内である。正常成人対照の80%が352pg/ml未満のタウ値を有するが、425pg/ml（p25-p75: 274 - 713, n = 150）がアルツハイマー病患者のメジアンタウレベルである（Hulstaert et al., 1999）。まず、患者数に関係なく試料を分析し、その後、1の患者から得たすべての試料を1のイムノプレート上でさらに分析した。104個の試料のセットに関する第1のアプローチと第2のアプローチとの間の相関係数は0.901（95% CI : 0.856 - 0.933）であった。

診断時のタウレベルを患者の各サブグループについて分析した（図9）。診断時のタウレベルは66から1500pg/mlの範囲であった。タウ、ニューロモジュリン、-アミロイド（1 - 42）、-アミロイド（1 - 40）、血清LDHおよびCSF白血球カウントに関するデータ（図10）は、ダウン症候群を有するまたは有しない患者群において、あるいは診断群間において、明らかな相違を示さない。さらに、タウレベルとWB CまたはLDHレベルとの間にも相関関係が見出されなかった。タウ濃度と小児の年齢と

10

20

30

40

50

の間にも有意な相関関係が見出されなかった。2人のMDS患者、明らかなCNS侵襲(CNS+)であるがAMLでない小児は、診断時においてタウレベルが著しく上昇していた。また、後方窩における髄芽細胞腫のために頭蓋内圧が上昇して入院した3人の患者から、段階分けのためにCSFを取ったところ、非常に高いCSF-タウ濃度であった(823、1397、1500)。しかしながら、非B-ALL/NHLを有する21人中7人の小児、非常に高い危険性を有する非B-ALL/NHL患者4人のうち1人、AMLの患者4人のうち2人、およびB細胞NHLの患者8人のうち2人が312pg/ml以上のタウレベルを有していたが、古典的な診断手順を用いるとCNS侵襲は検出されなかった。

非B-ALL/NHLを有する27人の患者あるいはB細胞NHLを有する9人の患者に関しては(データ示さず)、白血球カウント( $p = 0.935$ ,  $n = 40$ )または血清LDH( $p = 0.855$ ,  $n = 39$ )によって反映されるように、診断時のタウレベルは腫瘍負荷と相関関係がなかった。LP1において、タウとニューロモジュリンとの間に非常に有意な相関関係が存在し [ $r = 0.793$ ; 95% CI: 0.658 - 0.928,  $n = 50$ ]、両方の蛋白の分泌がある程度相互関係があることが示された。タウとアミロイド(1-42)との間には相関関係が見られなかった( $p = 0.1032$ ,  $n = 52$ )。

#### 【0130】

#### B-NHL患者の治療期間中における神経学的マーカーのレベル

化学療法により誘導されたCSF中のタウの増加に関する最も明確な相違がB細胞NHL患者において検出された。ベースライン試料および9日目のLP(=LP2)におけるフォローアップ試料の両方が利用可能であった3人の患者に関する結果を図11aに示す。9日目、すなわちIVMTXおよびピンクリスチンとともにMTXおよびヒドロコルチゾンをIT投与した後には、すでに最大タウ增加が測定可能であった。タウのさらなる増加はその後測定されなかった。ニューロモジュリン(図11b)およびニューロン特異的エノラーゼ(図11c)に関する同様の知見によても、化学療法により誘導された神経代謝活性に対する効果が確認された。さらに、タウとニューロモジュリンとの間( $r=0.722$ , 95% CI: 0.553-0.834,  $n=49$ )あるいはニューロモジュリンとニューロン特異的エノラーゼとの間( $r=0.622$ , 95% CI: 0.247-0.835,  $n=20$ )に明確な相関関係があった。

#### 【0131】

#### 非B細胞ALL/NHL患者の治療期間中における神経学的マーカーのレベル

全治療期間にわたるデータ(前後試料)が、EORTCプロトコル58881により治療を受けた13人の非B細胞ALL患者について利用可能であった。個々の患者について、異なるフェーズまたは治療に関するメジアンタウ値を図12aに示す。治療前(LP1)と比較して( $p = 0.048$ )、あるいはメンテナンス期間と比較して( $p = 0.040$ )、誘導期間中にタウレベルが有意に増加した。1人の患者は治療開始前からすでにタウレベルが上昇しており(893pg/ml)、おそらく神経学的機能不全がすでに開始していたことを反映するものであろう。また、治療前と誘導期間との間のニューロモジュリンレベルの増加傾向もあった(図12b)。治療開始時に高いタウレベルが存在した患者もまた、化学療法開始時において高いニューロモジュリンレベルを示した。LP1およびLP2に関するNSEのデータが利用可能であった2人の患者において[LP1(4.0ng/ml, 3.4ng/ml); LP2(11.7ng/ml, 9.6ng/ml)]、NSEの明確な増加が観察された。

非B細胞ALL患者からのすべてのデータの分析により、誘導期間において最高タウ濃度が見られることが明らかとなった。誘導期間中、分析した試料の41%(28/68)が500pg/mlよりも高かった。その後、インターバル期間においてこのパーセンテージは18.9%(14/74)まで低下し、再誘導期間中に16.7%(3/18)となり、最後に、メンテナンス期間中に9.7%(7/72)となった(図13a)。治療開始前にすでに上昇したタウ(>500pg/ml)を有していた3人の患者におけるタウ値は化学療法後に正常化した。-アミロイド(1-42)、非B-ALL患者におけるニューロモジュリンおよびNSEレベルに関するデータを図13b、図13cおよび図

10

20

30

40

50

13 d にそれぞれ示す。ここでもやはりタウとニューロモジュリン ( $r=0.658$ , 95% CI = 0.580-0.725, n=251) またはNSE ( $r=0.589$ , 95% CI = 0.363-0.749, n=47)との間に明確な相関関係があった。

非常に高い危険性を有する5人の非B-ALL小児を、本研究において長期にわたり試験した。最初の治療フェーズはEORTC 58881と同様であった。同様の化学療法により誘導されたタウレベルの変化が5人中4人の患者において観察され、タウとニューロモジュリンとの間の高く有意な相関関係も観察された (n=55;  $r=0.880$ , 95% CI: 0.802-0.929)。

1人のダウン症候群 - 非B-ALL患者は診断時に  $70 \text{ pg}/\text{ml}$  のタウ濃度を有していた。すべての非B-ALL患者における平均タウ増加は、長期研究の8日目で 250% (95% CI = 130%-370%, n=13)、21日目で 200% (95% CI = 150%-260%, n=8) であったが、ダウン症候群患者のタウ増加パーセンテージは8日目および21日目においてそれぞれ 820% および 1200% であった。  
10

高い白血球負荷 ( $610000 \text{ WBC}/\text{mm}^3$ ) のため、1人の特別な患者を、1日目にIT-MTXを使用せずにプレドニソロンで8日間治療した。治療8日後にタウレベルは低いままで、すなわち  $155 \text{ pg}/\text{ml}$  であった。その後、この患者は他の非B-ALL患者と同様にEORTCプロトコル（次の週からMTXをIT注射することを含む）に入った。タウレベルは急激に増加し、12、15、18、22および44日目にはそれぞれ  $744$ 、 $948$ 、 $1120$ 、 $861$  および  $1023 \text{ pg}/\text{ml}$  となった。別のセンターで治療を受け、MTXでの治療後に明らかな神経毒性に苦しんでおり、しかも両側麻痺であった小児から1のCSF試料が利用可能であった。この小児のタウおよびニューロモジュリンのレベルは使用した最高標準値（タウについて  $1500 \text{ pg}/\text{ml}$ 、ニューロモジュリンについて  $8000 \text{ pg}/\text{ml}$ ）を超え、大規模な神経変性を反映していた。  
20

### 【0132】

#### AMLの治療期間中における神経学的マーカーのレベル

図14aは、AMLを有する個々の患者におけるタウの消長を示す。患者11、12および23は治療期間中有意なタウの増加を示さなかった（表7c）。1日目および8日目にLPを取った患者12は激しい疾病を有しており、骨髄移植後間もなく死亡した。ダウン症候群の2人の患者のうち1人から、長期にわたるデータが利用可能であり、この患者は  $300 \text{ pg}/\text{ml}$  をわずかに上回るタウレベルを有しており、患者11および23のCSF中のタウレベルの消長とは対照的であった。診断時にCNS侵襲の証拠があった患者69はCSF中のタウおよびニューロモジュリンの劇的な増加を示した（図14b）。この小児はまだ治療中であり、現在完全に軽快している。  
30

### 【0133】

#### 結論

我々は、長期の研究において、体液中のタウ、ニューロモジュリンおよびNSEレベルの有意な増加を見出し、それは化学療法に関連した神経のダメージを反映している可能性が最も高く、主にIVコルチコステロイドおよび化学療法剤と組み合わせてIT-MTXを投与した場合に誘導されたが、インターバル治療期間中の高用量のIVおよびIT-MTX投与期間中には誘導されなかった。  
40

### 【実施例6】

#### 【0134】

#### 実施例6：周産期仮死により生じた脳損傷の診断のための組み合わせアッセイ

周産期仮死は神経損傷に関連している可能性がある。脳図および神経放射線学的データに加えて、CSF神経学的マーカーは低酸素-虚血イベントを評価する際の臨床データを補完しうるものである (Garcia-Alix, 1994)。変化した脳の代謝活性はCSF中の成分の変化を反映するものであるという証拠が増えつつある。CSFマーカーの周産期レベルおよび仮死による変化の分布を評価する。

### 【実施例7】

#### 【0135】

#### 実施例7：アルツハイマー病の特異的検出および対照患者とアルツハイマー患者との分別

10

20

30

40

50

のための、神経学的マーカーとして C S F - ニューロモジュリン、C S F - タウおよび C S F - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> を用いる組み合わせアッセイ

7 . 1 患者および対照患者

10<sup>9</sup> の個体から C S F を得た。個体を 4 群に分けた：( i ) 痴呆に関する神経学的対照と定義される群 ( n = 70 )。この群は、多発性硬化症、Guillan-Barre 症候群、多発性ニューロパシーおよびてんかんの患者を含んでいた。他の群は、( i i ) 記憶障害の老人患者 ( n = 7 )、( i i i ) アルツハイマー病 ( A D ) 患者 ( n = 27 )、および ( i v ) 血管性痴呆 ( V A D ) の患者 ( n = 5 ) からなっていた。International Classification of Diseases, version 9 (Manual of the international statistical classification of diseases, injuries, and causes of death: based on recommendations of the Ninth Revision Conference; 1975, and adopted by the Twenty-Ninth World Health Assembly. Geneva: World Health Organization, 1977) により決定された判断基準に従ってすべての患者を診断した。A D 群において、2 人の患者は 1 の家族からの者であり、プレセニリン変異により疾病の早期発症がわかっている。これらの患者のうち 1 人は徵候前であった。

神経学的試験の一環として C S F をルーチンに採取した。C S F の残りについてすべての試験を行った。ポリプロピレンチューブ中に正しく保存され、1 回だけ凍結された C S F 試料においてのみ - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> を測定した。

**【 0 1 3 6 】**

7 . 2 アルツハイマー病の特異的検出および対照患者とアルツハイマー患者との分別のための組み合わせアッセイの評価

これらの患者の C S F 中のタウ、 - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> およびニューロモジュリン ( G A P - 43 ) を調べた。各群の平均 C S F レベルを表 8 に示す。 - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> 、タウおよびニューロモジュリンの個人レベルを図 15 a 、 15 b および 15 c にそれぞれ示す。

A D 患者において C S F - タウおよび C S F - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> が有意に変化していた。また、 A D において C S F - ニューロモジュリンが有意に増加していた。対照的に、老人性記憶障害患者においては C S F - ニューロモジュリンにおける有意な影響は観察されなかったが、対照患者と比較して C S F - タウレベルが有意に増加していた。7 人の記憶障害患者のうち 3 人が対照群により決定された最大レベル ( 280 pg / ml ) よりも高い C S F - タウレベルを有していた。正しくない保存のため、 C S F - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> レベルは 3 人の記憶障害の患者においてしか調べることができなかつた。3 人の患者のうち 2 人において、 300 pg / ml 未満のレベルがみられた。これらの患者のうち 1 人は上昇した C S F - タウレベルも有していた。他の患者は 278 pg / ml の C S F - タウレベルを有しており、すなわち、対照群により決定された最大レベルよりもわずかに低かった。徵候前の家族性 A D 患者において、 327 pg / ml の C S F - タウレベルにまで増加しており、 - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> レベルは 300 pg / ml 未満であった。少ない記憶障害個体の試料についてのこの分析は、タウ、 - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> およびニューロモジュリンの組み合わせ使用はアルツハイマー病の存在に関するより良いインジケーターであることを示す。統計学的に有意であるように、 1 群あたりより多数の試料を分析中である ( 1 の診断群あたり少なくとも 50 の試料 ) 。

**【 実施例 8 】**

**【 0 1 3 7 】**

実施例 8 : アルツハイマー病の特異的検出、対照患者とアルツハイマー患者との分別、パーキンソン病の特異的検出、対照患者とパーキンソン病患者との分別のための、およびアルツハイマー患者とパーキンソン病患者の分別のために、神経学的マーカーとして C S F - ニューロモジュリン、C S F - タウおよび C S F - - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> を用いる組み合わせアッセイ

8 . 1 患者および対照患者

60 人のアルツハイマー病患者、 23 人のパーキンソン病患者および年齢の合った 32

10

20

30

40

50

人の対照患者から C S F を得た。これらの患者の C S F 中のタウ、 - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> およびニューロモジュリン ( G A P - 4 3 ) を調べた。各群の平均 C S F レベルを表 9 に示す。

#### 【 0 1 3 8 】

##### 8 . 2 アルツハイマー病の特異的検出および対照患者とアルツハイマー病患者との分別のための組み合わせアッセイの評価

対照と比較すると、 A D 患者においてタウが有意に増加していたが、 - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> レベルが減少していた。 N M レベルは両群間で有意には異ならなかった。しかしながら、 N M とタウのレベルは有意に相関関係があった ( 図 1 6 ) 。図 1 6 は、 A D 患者に関する値が対照患者に関する値とは異なる可能性を示す。後退判別分析 ( backward discriminant analysis ) ( Morrisonら, 1976 年 ) を用いて、タウ、 - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> 、ニューロモジュリンまたはタウ / ニューロモジュリンのいずれの変数が最も良くアルツハイマー病患者を対照患者から識別するものであるかを調べた。変数タウ / ニューロモジュリンおよび - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> を選択し、アルツハイマー患者 58 人中 55 人 ( 感度 94.8% 、 C I 85.6% ~ 98.9% ) および対照患者 31 人中 30 人 ( 特異性 96.8% 、 C I 83.3% ~ 99.9% ) を正しく分類した ( 図 1 7 ) 。より多くの試料をさらに分析すれば、これら 3 つのマーカーを用いることによるアルツハイマー病の診断の統計学的に有意な改善が可能になるであろう。

#### 【 0 1 3 9 】

##### 8 . 3 パーキンソン病の特異的検出および対照患者とパーキンソン病患者との分別のための組み合わせアッセイの評価

後退判別分析 ( Morrison, 1976 ) を用いて、いずれの変数がパーキンソン病患者と対照患者とを最適に識別するものであるかを調べた。変数タウ / ニューロモジュリンおよび - アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> を選択した。パーキンソン病患者 23 人中 14 人が正しく分類され ( 感度 60.9% 、 C I 38.6% ~ 80.3% ) 、対照患者 31 人中 27 人が正しく分類された ( 特異性 87.1% 、 C I 70.2% ~ 96.4% ) ( 図 1 7 ) 。より多くの試料をさらに分析すれば、これら 3 つのマーカーを用いることによるパーキンソン病の診断の統計学的に有意な改善が可能になるであろう。

#### 【 0 1 4 0 】

##### 8 . 4 アルツハイマー病患者とパーキンソン病患者とを分離するための組み合わせアッセイの評価

- アミロイド<sub>(1 - 4 2)</sub> およびニューロモジュリンを選択して、アルツハイマー病患者をパーキンソン病患者から分離し、アルツハイマー病患者について感度 94.8% ( C I 85.6 ~ 98.9% ) 、パーキンソン病患者について特異性 78.3% ( C I 56.3% ~ 92.5% ) であった。より多くの試料をさらに分析すれば、これら 3 つのマーカーを用いることによるアルツハイマー病とパーキンソン病の分離の統計学的に有意な改善が可能になるであろう。

#### 【 実施例 9 】

#### 【 0 1 4 1 】

##### 実施例 9 : レーピー小体痴呆とアルツハイマー病との間の分離を行うための神経学的マーカーとしての C S F - - シヌクレインの使用

##### 9 . 1 患者および対照患者

30 ~ 40 人のアルツハイマー患者、 10 ~ 20 人のレーピー小体痴呆患者および 10 ~ 20 人の年齢の合った対照から C S F を得る。

#### 【 0 1 4 2 】

##### 9 . 2 アルツハイマー病とレーピー小体痴呆との分離診断のためのアッセイ

患者群および対照群からの C S F 中の - シヌクレイン濃度を定量する。レーピー小体痴呆群の - シヌクレインレベルに関する値の平均値とアルツハイマー病群の - シヌクレインレベルに関する値の平均値との有意な相違により、両方のタイプの痴呆を分離することが可能である。 - シヌクレインの定量と少なくとも 2 種の他の神経学的マーカー (

10

20

30

40

50

タウおよび - アミロイド<sub>(1-42)</sub>のごとき)の定量を組み合わせることにより、アルツハイマー病とレーピー小体痴呆との分別がさらに改善される。

**【実施例 10】**

**【0143】**

実施例 10 : 前頭側頭葉痴呆の特異的検出および前頭側頭葉痴呆と他の痴呆との分別のために C S F - - アミロイド<sub>(1-42)</sub>、C S F - タウおよび C S F - ホスホタウを神経学的マーカーとして使用する組み合わせアッセイ

**10.1 患者および対照患者**

30 ~ 40 人の前頭側頭葉痴呆患者および 10 ~ 20 人の年齢の合った対照から C S F を得る。

10

**【0144】**

**10.2 前頭側頭葉痴呆患者と対照患者との分別診断のための組み合わせアッセイ**

前頭側頭葉痴呆患者および対照患者の C S F 中の - アミロイド<sub>(1-42)</sub>、タウおよびホスホ - タウのレベルを定量する。対照患者のタウおよびホスホ - タウのレベルの平均値と比較した場合、前頭側頭葉痴呆患者のタウおよびホスホ - タウのレベルの平均値が有意に増加している。前頭側頭葉痴呆患者は、対照患者と比較すると、 - アミロイド<sub>(1-42)</sub>のレベル低下を示す。

**【実施例 11】**

**【0145】**

実施例 11 : アルツハイマー病における血管の問題の特異的検出および他の形態のアルツハイマー病と血管の問題との分別のために C S F - - アミロイド<sub>(1-42)</sub>、C S F - タウおよび血漿 - ベータ - アミロイド<sub>(1-42)</sub>を神経学的マーカーとして使用する組み合わせアッセイ

20

**11.1 患者および対照患者**

アルツハイマー病の血管性疾患の患者 30 ~ 40 人、他の形態のアルツハイマー病患者 30 ~ 40 人および年齢の合った対照 10 ~ 20 人から C S F および血漿を得る。

**【0146】**

11.2 血管性疾患と他の形態のアルツハイマー病との分別診断のための組み合わせアッセイ

血管性疾患の患者、他の形態のアルツハイマー病の患者、ならびに対照患者の C S F 中のタウおよび - アミロイド<sub>(1-42)</sub>のレベルならびに血漿中の - アミロイド<sub>(1-42)</sub>のレベルを定量する。血漿 - - アミロイド<sub>(1-42)</sub>、C S F - タウおよび C S F - - アミロイド<sub>(1-42)</sub>の定量的に異なるレベルは、血管性疾患の患者と他の形態のアルツハイマー病の患者との分別を可能にする。

30

**【0147】**

文献

Abbruzzese M, Ferri S, Scarone S (1997) Neuropsychologia 35: 907-912.

Asami-Odaka A, Ishibashi Y, Kikuchi T (1995) Biochemistry 34: 10272-10278.

Auld DS, Kar S, Quirion R (1998) Trends Neurosci 21: 43-49.

Andreadis A, Brown W, Kosik K (1992) Biochem 31: 10626-10633.

40

Bachmann BJ (1987) In: E. coli and S. typhimurium, Cellular and molecular biology. Ed. Neidhardt FC et al., ASM 1190-1219.

Ballard C, Grace J, McKeith I, Holmes C (1998) Lancet 351: 1032-1033.

Basi GS (1987) Cell 49: 785-791.

Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI, Finklestein SP, Bird ED (1989) J Neurosci 9: 990-995.

Blennow K, Davidson P, Wallin A, Ekman R (1995) Dementia 6: 306-311.

Blennow K, Bogdanovic N, Alafuzoff I, Ekman R, Davidson P (1996) J Neural Transm 103: 603-618.

Bonhard C et al (1984) In: Immunolabeling for Electron Microscopy. Eds. Polak JM

50

- , Varndell JM. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, p. 95.
- Bramblett G, Trojanowski J, Lee V (1992) Lab Invest 66: 212-222.
- Bramblett G, Goedert M, Jakes R, Merrick S, Trojanowski J, Lee V (1993) Neuron 10: 1089-1099.
- Brion J, Passareiro J, Nunez J and Flament-Durand J (1985) Arch Biol 95: 229-235.
- .
- Brun A (1993) Dementia 4: 126-131.
- Citron M, Diehl TS, Gordon G, Biere AL, Seubert P, Selkoe DJ (1996) Proc Natl Acad Sci 93: 13170-13175.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Suebert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, StGeorge Hyslop P, Selkoe DJ (1997) Nature Medicine 3: 67-72. 10
- Coleman PD, Kazee AM, Lapham L, Eskin T, Rogers K (1992) Neurobiol aging 13: 631-639.
- Davidsson P, Jahn R, Bergquist J, Ekman R, Blennow K (1996) Mol Chem Neuropathol 27: 195-210.
- Delacourte A, Defossez A (1986) J. Neurol. Sci. 76: 173-180.
- Delacourte A, Flament S, Dibe E, Hublau P, Sablonniere B, Hemon B, Sherrer V, Defossez A (1990) Acta Neuropathol 80: 111-117. 20
- Ferrer I, Marti E, Tortosa A, Blasi J (1998) J Neuropathol Exp Neurol 57: 218-225.
- Flament S, Delacourte A, Mann D (1990) Brain Res 516: 15-19.
- Fletcher JM, Copeland DR (1988) J Clin Exp neuropsychol 10: 495-537.
- Folstein M, Folstein S, McHugh P. (1975) J Psychol Res 12: 189-198.
- Friedland RP, Majocha RE, Reno JM, Lyle LR, Marotta CA (1994) Mol Neurobiol 9: 107-113.
- Ghanbari H, Kozuk T, Miller B, Riesing S (1990) J Clin Laboratory Anal 4: 189-192.
- Garcia-Alix A, Cabanas F, Pellicer A, Hernanz A, Stiris TA, Quero J (1994) Pediatrics 93: 234-240. 30
- Goedert M, Spillantini M, Jakes R, Rutherford D, Crowther R (1989) Neuron 3: 519-526.4055.
- Goedert M, Cohen E, Jakes R, Cohen P (1992) FEBS Lett. 312: 95-99.
- Goedert M, Jakes R, Crowther R, Six J, Lubke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee V (1993) Proc Natl Acad Sci (USA) 90: 5066-5070.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994) Biochem J 301: 871-877.
- Greenberg S, Davies P (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87: 5827-5831.
- Grundke-Iqbali I, Iqbal K, Quinlan M, Tung Y, Zaidi M, Wisniewski H (1986) J Biol Chem 261: 6084-6089. 40
- Harrington C, Mukaeova E, Hills R, Edwards P, Montejo de Garcini E, Novak M, Wienschik C (1991) Proc Natl Acad Sci (USA) 88: 5842-5846.
- Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) J Biol Chem 267: 17047-17054.
- Himmler A (1989) Mol Cell Biol 9: 1389-1396.
- Hooten WM, Lyketsos CG (1998) Dement Geriatr Cogn Disord 9: 164-174.
- Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, Bancher C, Cras P, Wiltfang J, Mehta PD, Iqbal K, Pottel H, Vanmechelen E, Vanderstichele H (1999) Neurology 52: 1555-1562. 50

- Hochuli E (1988) J Chromatogr 444: 293-302.
- Iqbal K, Grundke-Iqbali I, Smith A, George L, Tung Y, Zaidi T (1989) Proc Natl Acad Sci (USA) 86: 5646-5650.
- Jannoun L 1983 Arch Dis Child 58: 953-958.
- Jensen PH, Nielsen MS, Jähn R, Dotti CG, Goedert M (1998) J Biol Chem 273: 2629 2-26294.
- Johnson-Wood K, Lee M, Motter R, Hu K, Gordon G, Barbour R, Khan K, Gordon M, Tan H, Games D, Lieberburg I, Schenk D, Seubert P, McConlogue L (1997) Proc Natl Acad Sci 94: 1550-1555.
- Kaiser E, Kuzmits R, Pregant P, Burghuber O, Worofka W (1989) Clin Chim Acta 183 10 : 13-32.
- Kato K, Suzuki F, Umeda Y (1981) J Neurochem 36: 793-797.
- Kim KS, Wen GW, Bancher C, Chen CMJ, Sapienza HH, Hong H, Wisniewski HM (1990) N eurosci Res Comm 7: 113-122.
- Knopman DS (1993) Dementia 4: 132-136.
- Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M, Ihara Y (1988) Neuron 1: 82.
- Kohler G, Milstein C (1975) Nature 256: 495-497.
- Konig G, Graham P, Bushnell A, Webster S, Wunderlich D, Perlmutter LS (1996) Ann NY Acad Sci 777: 344-355. 20
- Kosik K, Joachim C, Selkoe (1986) Proc Natl Acad Sci (USA) 83: 4044-4048.
- Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH (1992) Brain Res 597: 209-219.
- Lannfelt-L, Basun-H, Wahlund-LO, Rowe-BA, Wagner-SL (1995) NatMed 1: 829-832.
- Lee V, Balin B, Otvos L, Trojanowski J (1991) Science 251: 675-678.
- Levy R, Eagger S, Griffiths M, Perry E, Honavar M, Daen A, Lantos P (1994) Lance t 343: 176-178.
- Lewis S, Wang D, Cowan N (1988) Science 242: 936-939.
- Majocha RE, Reno JM, Friedland RP, VanHaight C, Lyle LR, Marotta CA (1992) J Nuc l Med 33: 2184-2189.
- McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH (1996) Neurology 47: 1113-1124. 30
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Neurology 34: 939-944.
- Mercken M, Lubke U, Vandermeeren M, Gheuens J, Oestreicher AB (1992a) J Neurobio l 23: 309-321.
- Mercken M, Vandermeeren M, Lubke U, Six J, Boons J, Vanmechelen E, Van De Voorde A, Gheuens J (1992b) J Neurochem 58: 548-553.
- Moore I, Kramer JH, Ablin A (1986) Oncol Nurs Forum 12: 45-51. 40
- Morrison DF (1976) Multivariate statistical methods. McGraw-Hill, New York, NY, USA.
- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, Olson D, Southwick P, Wolfert R, Munroe B, Lieberburg I, Seubert P, Schenk D (1995) Ann Neurol 38: 643-648.
- Nara T, Nozaki H, Nakae Y, Arai T, Ohashi T (1988) AJDC 142: 173-174.
- Ochs J, Mulhern R, Fairclough D, Parvey L, Whitaker J, Ch'ien L, Mauer A, Simone J (1991) J Clin Oncol 9: 145-151.
- Oestreicher AB, Hens JJH, Marquart A (1994) J Neurochem. 62: 881-889.
- Perry EK, Haroutunian V, Davis KL, Levy R, Lantos P, Eagger S, Honavar M, Dean A 50

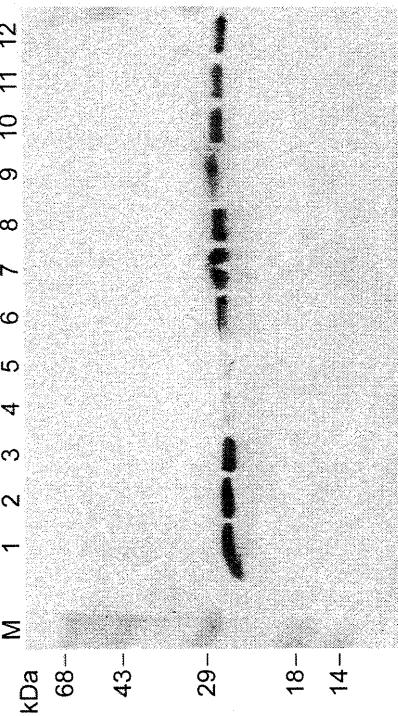
- , Griffiths M, McKeith IG, et al (1994) Neuroreport 5: 747-749.
- Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH (1995) Comput Methods Programs Biomed 48: 257-62.
- Selden S, Pollard T (1983) J Biol Chem 258(11): 7064-7071.
- Shimohama S, Kamiya S, Taniguchi T, Akagawa K, Kimura J (1997) Biochem Biophys Res Comm 236: 239-242.
- Skene JH, Willard M (1981) J Neurosci 1: 419-26.
- Six J, Lubke U, Lenders M-B, Vandermeeren M, Mercken M, Villanova M, Van de Voorde A, Gheuens J, Martin J-J, Cras P (1992) Neurodegeneration, impairment of neuronal function 1: 247-255. 10
- Sjogren M, Edman A, Wallin A (1997) Psychiatry 12: 656-661.
- Soji M, Matsubara E, Kanai M, Watanabe M, Nakamura T, Tomidokoro Y, Shizuka M, Wakabayashi K, Igeta Y, Ikeda Y, Mizushima K, Amari M, Ishiguro K, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S (1998) J Neurol Sci 158: 134-140.
- Stern RA, Trojanowski J.; Lee VM (1990) FEBS-Lett. 264: 43-7.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai X-D, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994) Science 264: 1336-1340.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Ann Neurol 30: 572-580.
- Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, Van de Voorde A, Martin J, Cras P (1993) J Neurochem 61: 1828-1834. 20
- Van de Voorde A, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Dessaix F, Beeckman W, Cras P (1995) Detection of tau in cerebrospinal fluid. Research Advances in Alzheimer's disease and related disorders, Ed. Iqbal, Mortimer, Winblad & Wisniewski, John Wiley & Sons Ltd.
- Van Gelder P, Bosman F, de Meuter F, van Heuverswyn H, Herion P (1993) J Clin Microbiol 31: 9-15.
- Vanmechelen E, Blennow K, Davidsson P, Cras P, Van De Voorde A (1997) Alzheimer's Disease: biology, diagnosis and therapeutics. Edited by K Iqbal, B Winblad, T Nishimura, M Takeda, HM Wisniewski, John Wiley & Sons, Ltd. pp.197-203. 30
- Wertman KF, Wyman AR, Botstein D (1986) Gene 49: 253-262.
- Wilcock GK, Scott MI (1994) Lancet 344: 544-544.
- Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (1991) Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th Edition, McGraw-Hill Inc, NY, USA.
- Wood J, Mirra S, Pollock N, Binder L (1986) Proc Natl Acad Sci (USA) 83: 4040-4043.
- Zahraoui A, Touchot N, Chardin P and Tavitian A (1989) J Biol Chem 264: 12394-12401.
- Zhao N, Hashida H, Takahashi N and Sakaki Y (1994) Gene 145: 313-314. 40

## 【産業上の利用可能性】

## 【0148】

本発明は、例えば、神経変性疾患の診断試薬の製造分野、神経変性の研究用試薬の製造分野などにおいて利用可能である。

【図1】



【図2 b】

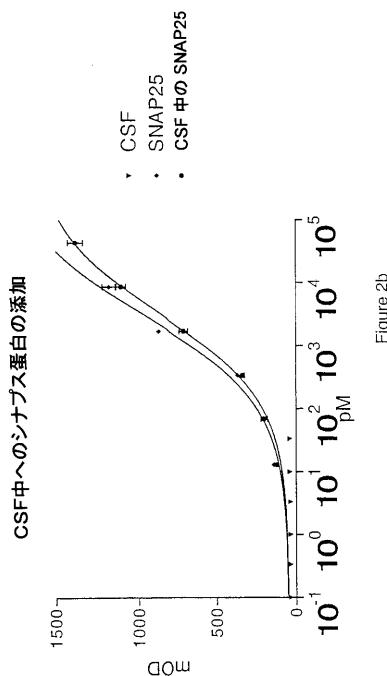


Figure 2b

【図2 a】

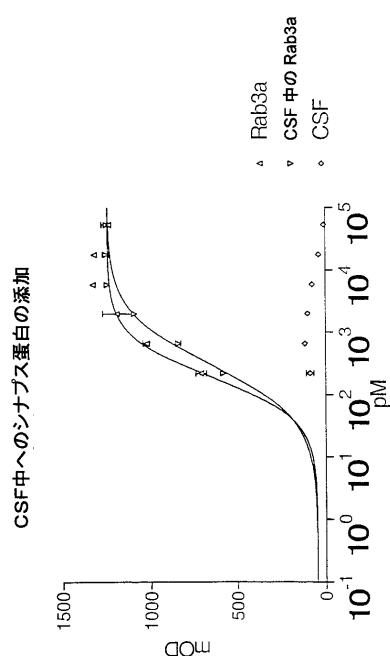
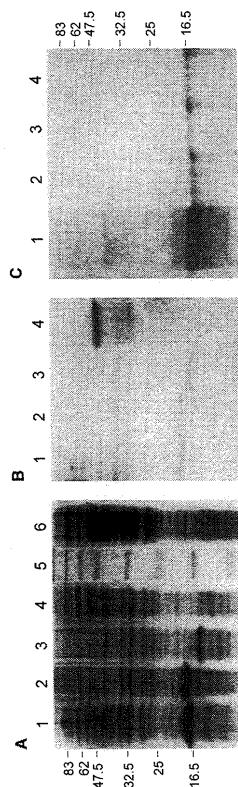
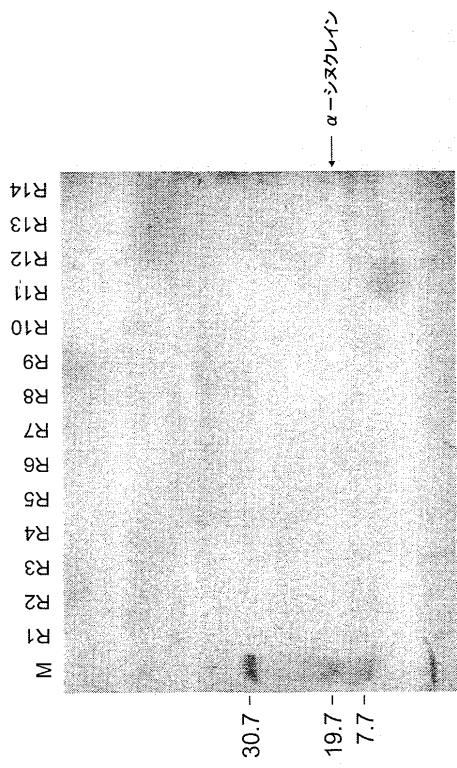


Figure 2a

【図3】



【図4】



【図5】

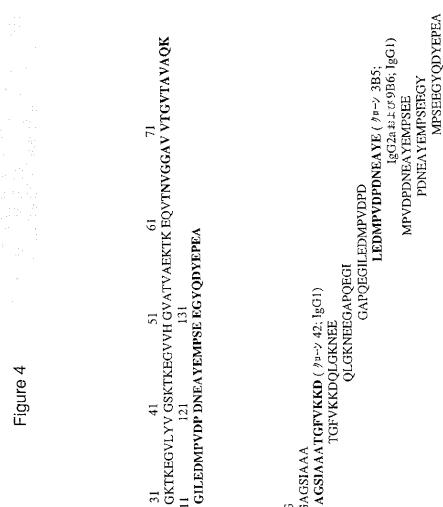
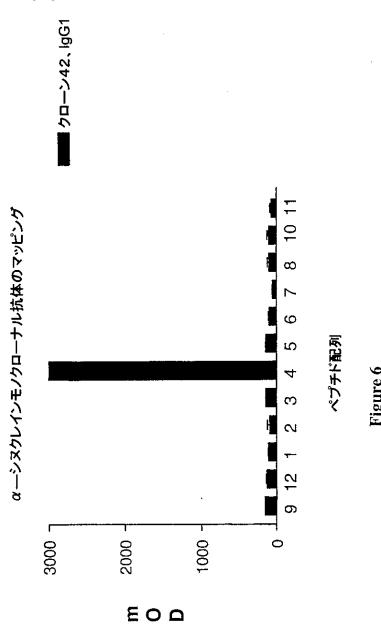


Figure 5

【図6】



【図6-1】

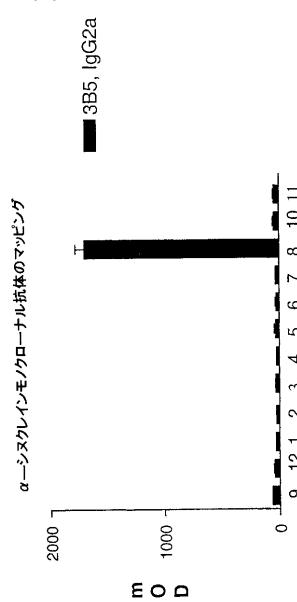


Figure 6 - cont'd-1

【図6-2】

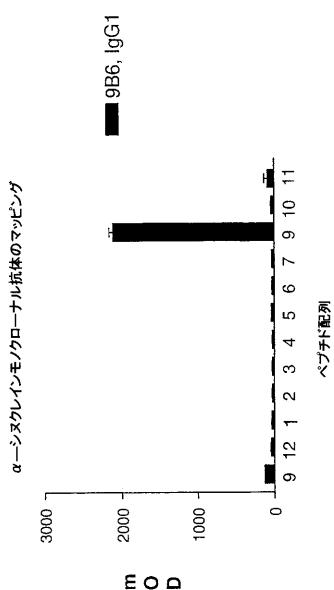


Figure 6 - cont'd-2

【図7】

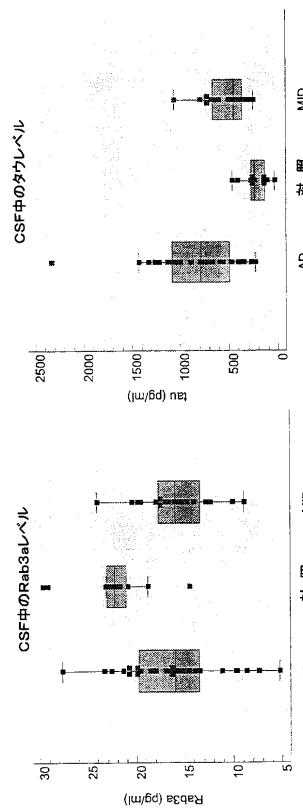


Figure 7

【図8-1】

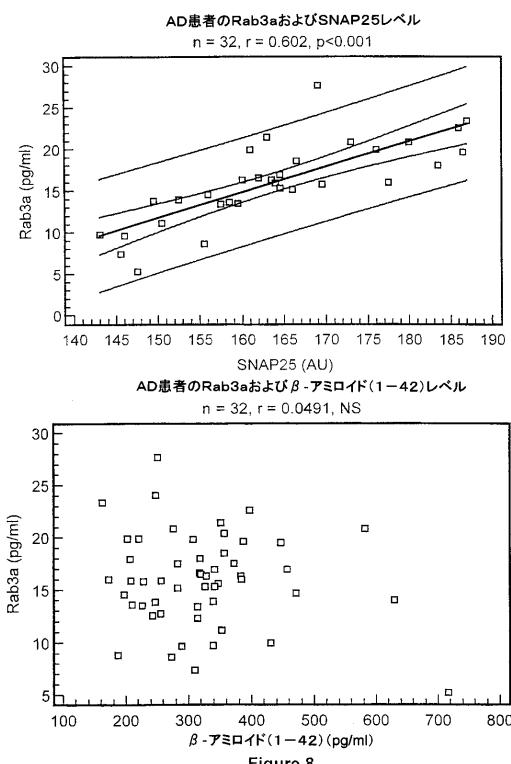


Figure 8

【図8-2】

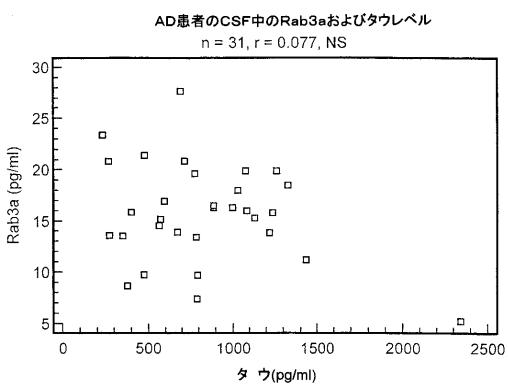


Figure 8 - cont'd

【図9】

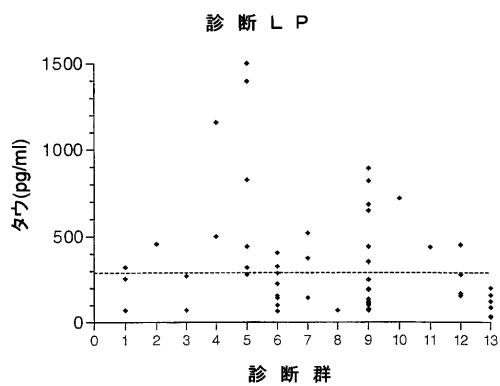


Figure 9

【図10 a】

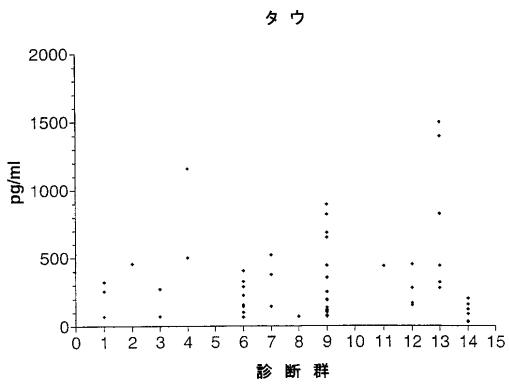


Figure 10a

【図10 b】

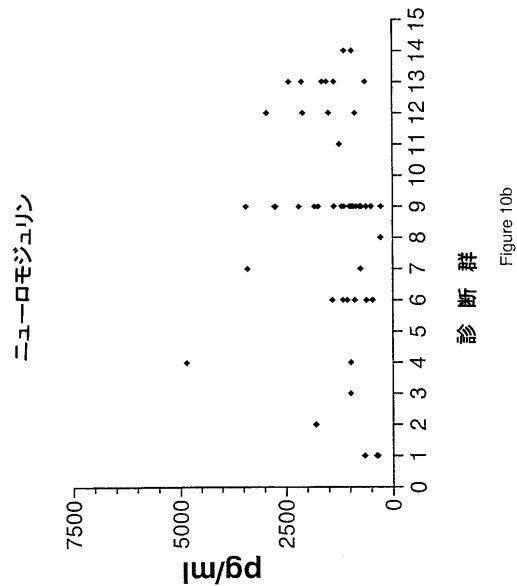
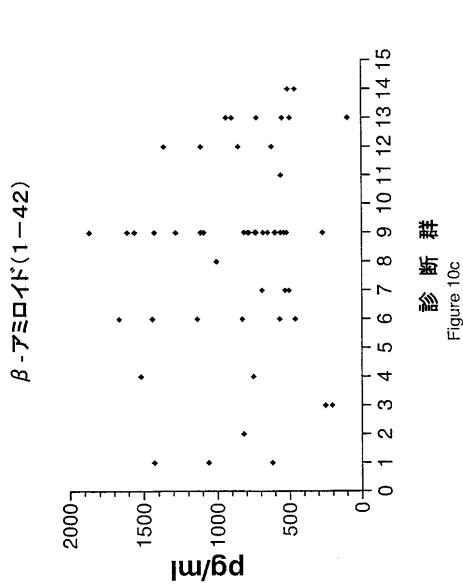
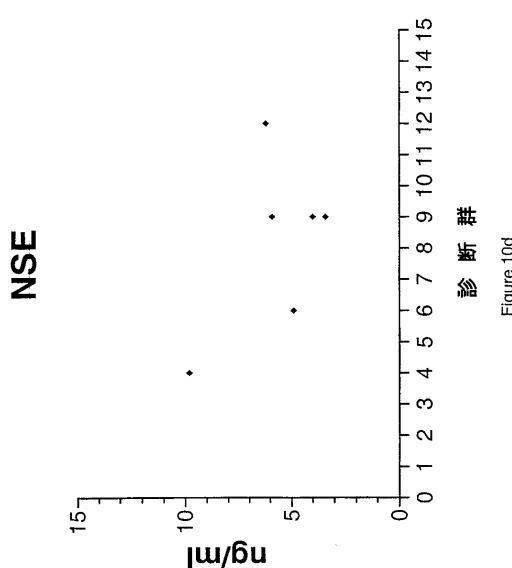


Figure 10b

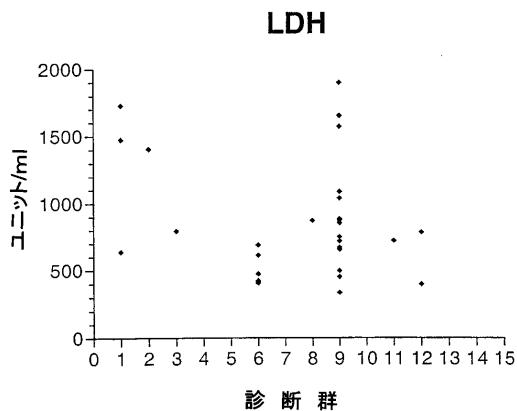
【図10 c】



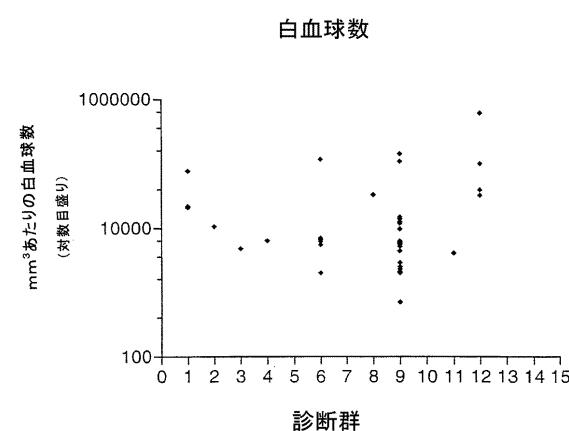
【図 10d】



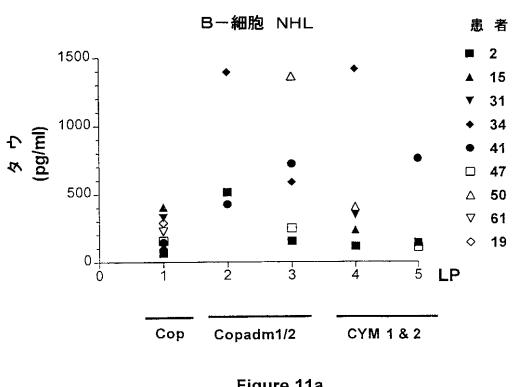
【図 10e】



【図 10f】



【図 11a】



【図 11b】

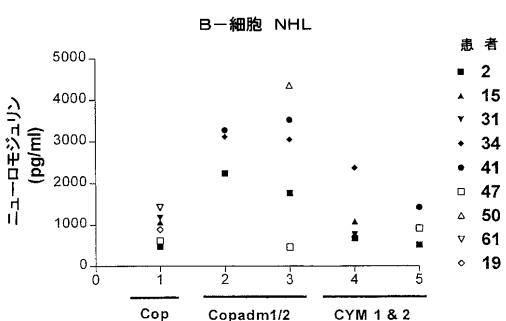


Figure 11b

【図 1 1 c】

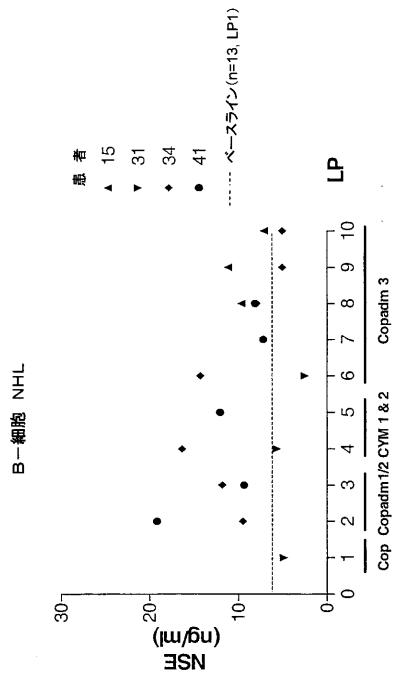


Figure 11c

【図 1 2 a】

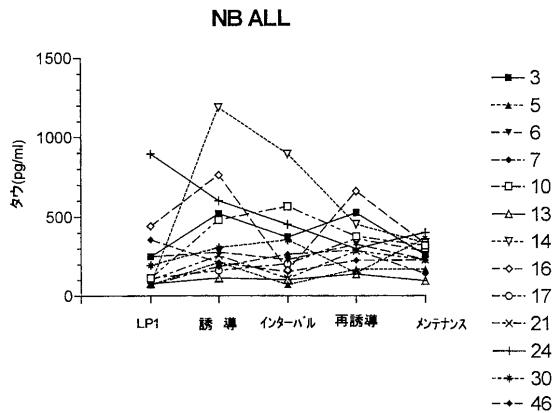


Figure 12a

【図 1 2 b】

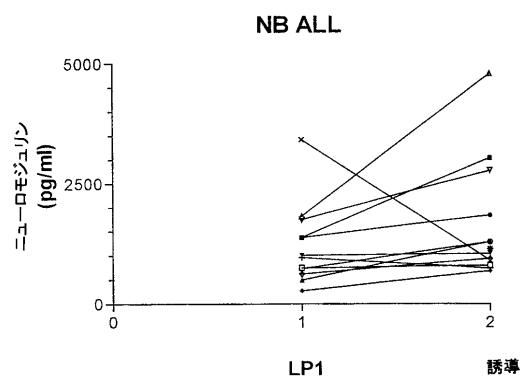


Figure 12b

【図 1 3 a】

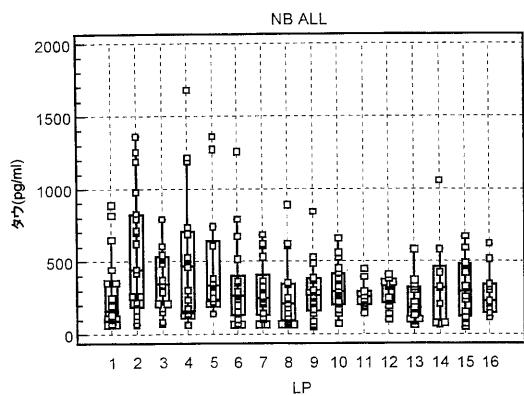
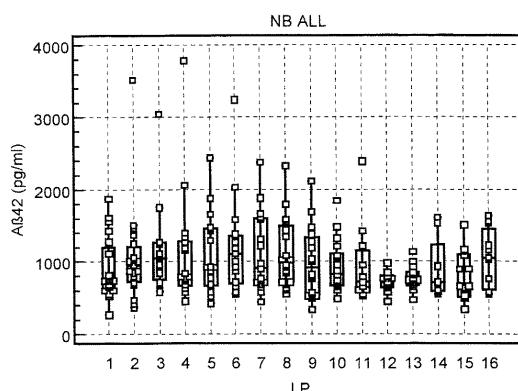


Figure 13a

【図 1 3 b】



【図 1 3 c】

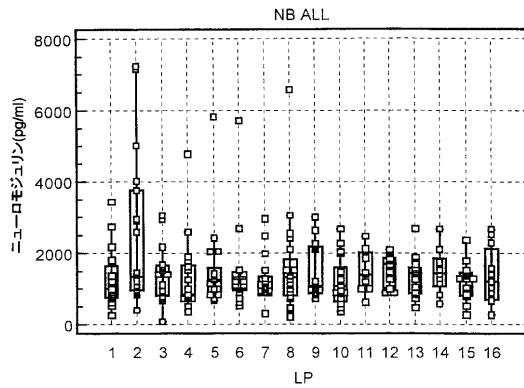


Figure 13c

【図 1 3 d】

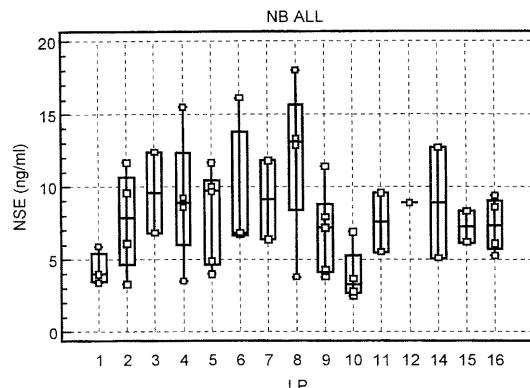


Figure 13d

【図 1 4 a】

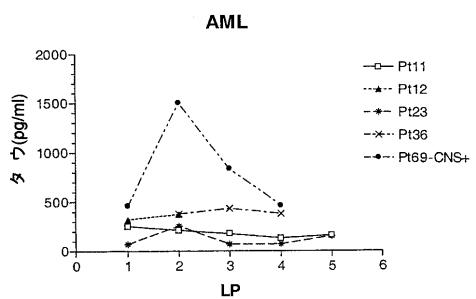


Figure 14a

【図 1 4 b】

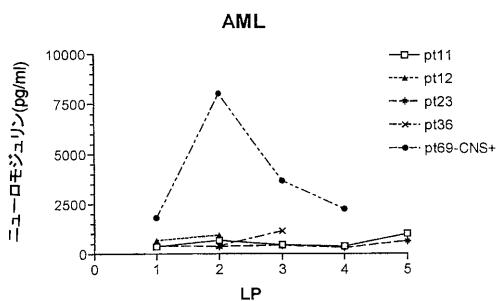


Figure 14b

【図 1 5 b】

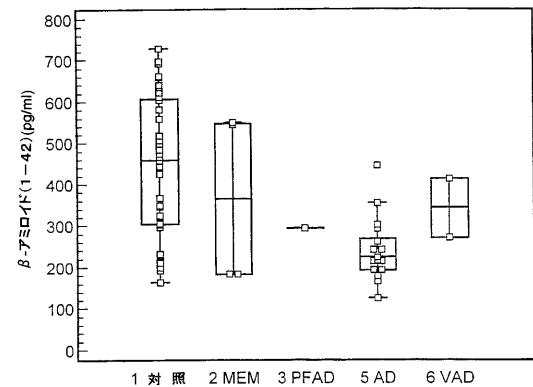


Figure 15b

【図 1 5 a】

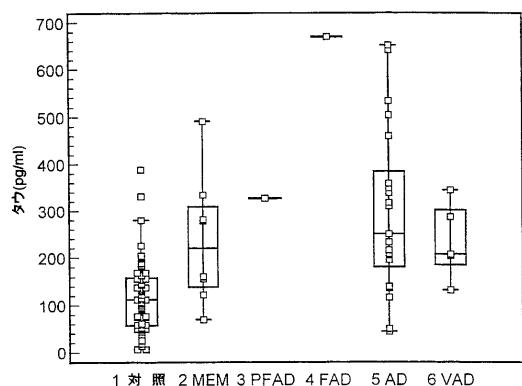
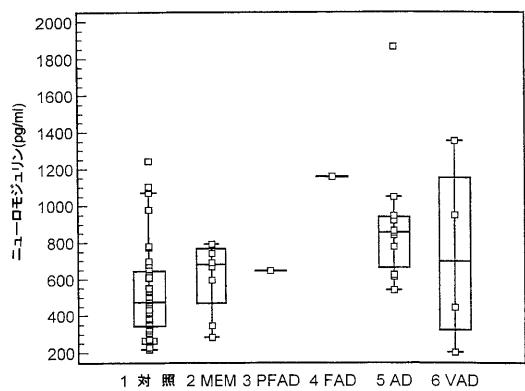
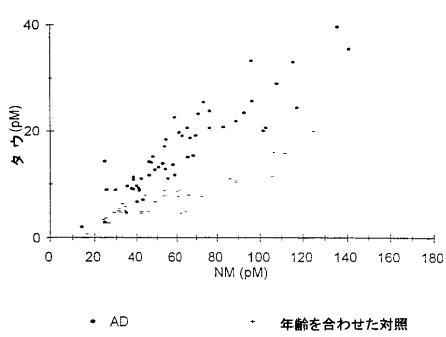


Figure 15a

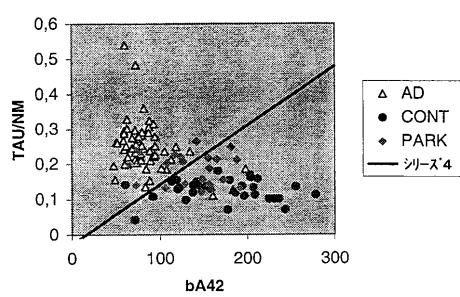
【図 15c】



【図 16】



【図 17】



---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 99870069.4  
(32)優先日 平成11年4月9日(1999.4.9)  
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(72)発明者 エウヘーン・ファンメヘレン  
ベルギー、ベー - 9 8 1 0 ナザレス - エケ、テン・エデストラート 1 0 1 番  
(72)発明者 フーホ・ファンデルスティヘレ  
ベルギー、ベー - 9 0 0 0 ヘント、タインウェイクラーン 4 3 番  
(72)発明者 アンドレ・ファン・デ・フルデ  
ベルギー、ベー - 9 1 6 0 ロケレン、フルンストラート 2 2 番

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 Journal of the Neurological Sciences , 1998年 , Vol.158 , p134-140  
TAKEDA A , AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY , 1998年12月 1日 , V152 N12 , P367-372

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

专利名称(译)	神经退行性疾病的鉴别诊断		
公开(公告)号	<a href="#">JP4580455B2</a>	公开(公告)日	2010-11-10
申请号	JP2009247559	申请日	2009-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司南玫瑰汾笔记本闭嘴 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司 , Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
当前申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司 , Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	エウヘーンファンメヘレン フーホファンデルスティヘレ アンドレファンデフルデ		
发明人	エウヘーン·ファンメヘレン フーホ·ファンデルスティヘレ アンドレ·ファン·デ·フルデ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/28 G01N2800/2835 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/531.B G01N33/543.501.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25		
代理人(译)	田中 , 三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	1998870148 1998-07-03 EP 1998870236 1998-11-03 EP 1999870069 1999-04-09 EP		
其他公开文献	<a href="#">JP2010019864A</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

要解决的问题：为神经变性的特异性检测和鉴别试验提供新方法。  
 ŽSOLUTION：这种新方法用于个体神经变性的特异性检测，定量和/或鉴别诊断，并使用组合分析检测一种体液或更多个体中的至少三种神经学标志物，以及神经变性的类型和程度进一步反映在与对照样品相比较的所有神经学标志物水平的定量变化中。 Ž

表1. 化学療法の神経学的合併症(部分リスト)

脳障害	脳の症候群	骨髄障害	末梢神経障害	筋障害	卒中様症候群
BCNU シスプラチナ シタラビン 5-F-ウラシル 5-FA-ウラシル イフォスファミド L-アスパラギナーゼ メトレキセート プロカルバシシン コルチコステロイド 生物学的癌 答修飾剤:IL-2, インターゲフェロン	シタラビン 5-F-ウラシル プロカルバシシン シタラビン チオテバ acc. IT ピンク リスチン ecc. IT ドキソ ルビシン	IT メトレキセート シスプラチナ ビンクリスチン (シタラビン) (プロカルバシシン) ecc. IT ピンク リスチン ecc. IT ドキソ ルビシン	シスプラチナ ビンクリスチン (シタラビン) (プロカルバシシン) ecc. IT ピンク リスチン ecc. IT ドキソ ルビシン	コルチコステロイド L-アスパラギナーゼ mtx (ic) BCNU (ic) シスプラチナ	L-アスパラギナーゼ mtx (ic) BCNU (ic) シスプラチナ