

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-251794

(P2004-251794A)

(43) 公開日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 GO 4 5
// GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	T

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-43452 (P2003-43452)	(71) 出願人	592037055 株式会社日本医学臨床検査研究所 京都府久世郡久御山町大字大橋辺小字大橋 辺16番地10
(22) 出願日	平成15年2月21日 (2003.2.21)	(72) 発明者	相馬 仁 札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科 大学内
		(72) 発明者	齋藤 利和 札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科 大学内
		(72) 発明者	村上 新治 札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科 大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 痴呆症の検査方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】血液等の簡単に採取できる体液を用いて簡便に痴呆症の検査ができる方法を提供する。

【解決手段】体液中のアネキシン類、とりわけアネキシンV及び/又はアネキシンIVの濃度を測定することによる痴呆症の検査方法に関する。被検試料となる体液には血液、唾液、尿、脳脊髄液等が含まれるが、好ましくは血液、より好ましくは血漿中のアネキシンV及び/又はアネキシンIVをそれぞれのアネキシンに特異的な抗体(抗体全分子又は抗体活性を有する部分断片を含む)を用いて免疫学的に測定することにより実施される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

体液中のアネキシン濃度を測定することを特徴とする痴呆症の検査方法。

## 【請求項 2】

血液中のアネキシン V 濃度及び / 又はアネキシン I V 濃度を測定する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 ~ 2 に記載の方法に用いる試薬又はキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は臨床検査の分野で用いられ、とりわけ痴呆症の検査方法として用いられる。

## 【0002】

## 【従来技術】

アルツハイマー病 (AD) は初老期に発病する進行性の変性疾患で認知機能障害を特徴とする。AD における痴呆症の程度は AD 患者の大脳皮質に見出される老人斑 (SP) の数に関連づけられてきた (例えば非特許文献 1)。そして組織学的には、SP は退化性神経突起及び活性の星状膠細胞に囲まれ、また生化学的には、SP は アミロイドと呼ばれる小分子の不溶性繊維状タンパク質を含んでいる

(例えば非特許文献 2)。AD の原因は不明であり、AD の治療もなく、更には発症前或いは発症している患者における AD の検査法も脳の CT による観察以外にほとんどない。特許文献 1 によれば脳脊髄液中の分子量 33000 の蛋白質を免疫学的に測定する方法が開示されているが、脳脊髄液といった特殊な試料を用いなければならないといった問題がある。脳血管障害及び AD 患者の脳において数種のアネキシンが多量に発現している報告もある (例えば、非特許文献 3)。さらにアルコール依存症の患者の脳にはアネキシン I V が正常群よりも多く発現していることも報告されている (非特許文献 4)。以上の例はすべて死後患者から採取された脳脊髄液や脳組織の分析が行われているが、これらは診断治療に有用ではない。非特許文献 4 に示されているように、アルコール依存症患者において血中の抗アネキシン I V 抗体量がアルコール依存症の診断に有効である報告は、簡便な検査方法として有用である。しかしながら、前にも述べたように AD の簡便な診断検査の方法は実用化されておらず、患者より簡単に採取できる血液等の体液を用いる AD の簡便な検査方法の開発が望まれている

## 【0003】

## 【特許文献 1】

特開平 7 - 253429 号。

## 【特許文献 2】

特開平 7 - 72147 号。

## 【非特許文献 1】

Nature、1966、209 巻、109 頁。

## 【非特許文献 2】

Biochem Biophys Res Commun. 120 巻、885 - 890 頁 (1984)

## 【非特許文献 3】

Am J Pathol, 145, 640 - 649 (1994)

## 【非特許文献 4】

Alcohol Clin Exp Res, 25, 55S - 58S (2001)

## 【0004】

## 【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

本発明の課題は痴呆症の検査方法であって、血液等の簡単に採取できる体液を用いて簡便に検査できる方法を提供することである。

【0005】

【課題を決するための手段】

本発明者らは、痴呆症の簡便な検査方法を鋭意研究した結果、血液中のアネキシン類、とりわけアネキシンV及びアネキシンIVの濃度が痴呆の発症と深く関連することから簡便な痴呆症の検査が可能であることを見出し本発明を完成させた。

【0006】

本発明は以下の構成からなる。

- 1、体液中のアネキシン濃度を測定することを特徴とする痴呆症の検査方法。
- 2、血液中のアネキシンV濃度及び/又はアネキシンIV濃度を測定する前記1に記載の方法。
- 3、前記1～2に記載の方法を用いる試薬又はキット。

10

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明は、痴呆症の検査に関するものであり、体液中のアネキシン類、とりわけアネキシンV及び/又はアネキシンIVの濃度を測定することによる痴呆症の検査方法に関するものである。本発明は、被検試料となる体液には血液、唾液、尿、脳脊髄液等が含まれるが、好ましくは血液、より好ましくは血漿中のアネキシンV及び/又はアネキシンIVをそれぞれのアネキシンに特異的な抗体（抗体全分子又は抗体活性を有する部分断片を含む）を用いて免疫学的に測定することにより実施される。用いる抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれも用いることが可能であり、特に限定されるものではない。免疫学的測定法は、EIA、RIA、ラテックス凝集反応、免疫沈降法、ウエスタンブロット、ドットブロット、イムノクロマト法等公知の方法が適用される。アネキシンV測定のためのEIA法を例にとれば、固相に固定化された被検試料中のアネキシンVを反応させ、さらに酵素標識した抗アネキシンV抗体を反応させ、固相に捕獲された標識抗体の量を検出することにより試料中のアネキシンVの濃度を測定することができる。

20

【0008】

またアネキシンVの生物学的性質を利用して、例えばリン脂質、好ましくはホスファチジルセリンを固定化した固相に被検試料中のアネキシンVを捕獲した後、標識抗アネキシンV抗体を反応させ、その反応量を検出することによっても測定できる。アネキシンIVについても、アネキシンIVに特異的な抗体を用いることにより同様に測定できる。

30

【0009】

本発明は、アネキシンVとアネキシンIVの濃度を組み合わせて検査することも含まれる。例えば両者の比を算出すること、両方の測定値について、それぞれ閾値を設定しておき、その閾値を両方が超える、どちらか片方が超える、どちらも超えない等の判定結果から、その診断的有用性を検討することにより行われる。さらにアネキシンVとアネキシンIVの測定は必ずしも同一被検試料である必要はなく、例えば血清と血漿、脳脊髄液と血漿等の異なる試料の組合せでも可能である。

【0010】

アネキシン分子種は、痴呆やアルコール依存症などの神経精神疾患で発現変化することが報告されている（例えば、特許文献2、3）。本発明のように両者を組み合わせて用いることにより、アネキシンV濃度の上昇が痴呆症によるものか、あるいは他の疾患によるものかを的確に鑑別できる。逆にアネキシンIVの上昇がアルコール依存性か否かを検証するのにアネキシンVとの組み合わせが有効である。以上のように、アネキシンV濃度及びアネキシンIV濃度を組み合わせて検査することにより特異的な痴呆症の検査が期待できる。

40

【0011】

アネキシンVとアネキシンIVの測定を組み合わせて行う方法は、前述のようにそれぞれ個々に構築された免疫学的手法、例えばEIA、ラテックス比濁法等を用いてそれぞれの

50

濃度を測定することはもちろんのことであるが、それ以外にも、それぞれの抗体（そのフラグメントを含む）をひとつの反応容器に固定化しておき、そして被検試料を反応させ、ひとつの反応容器内にアネキシンⅤとアネキシンⅣの２種類の分子を捕獲し、それらを、それぞれの分子に対する抗体（そのフラグメントを含む）を異なる標識物質で標識した標識抗体で検出することによる方法も可能である。さらにはイムノクロマト法を利用して、同時に２種類の抗原を検出することも可能である（図１）。

【００１２】

【実施例】

本発明の実施例を以下に示すが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【実施例１】（アネキシンⅤ濃度測定用ＥＬＩＳＡの構築）

ヒト胎盤より精製したアネキシンⅤを免疫原としてマウスモノクローナル抗体を調製した。調製したモノクローナル抗体（クローンＮｏ．２３）を９６穴のＥＬＩＳＡ用マイクロタイタープレートに固相化し、抗アネキシンⅤ抗体固相プレートを調製した。固相プレートに用いたクローンと異なるモノクローナル抗体（クローンＮｏ．４９）をビオチン標識して標識抗体を調製した。これらを組み合わせてアネキシンⅤ測定用ＥＬＩＳＡ試薬を構築した。

【００１３】

【実施例２】（ウエスタンブロットでの検討）

痴呆患者１１名（アルツハイマー病患者：男性３名、女性６名、脳血管性痴呆患者：女性２名）及びコントロール１０名（男性５名、女性５名）の血漿中のアネキシンをウエスタンブロットで検出した。各患者は予め長谷川式簡易知能評価スケールにて知能得点を調べた。各血漿１ｍＬをＰＢＳ緩衝液で１０倍に希釈し、ホスファチジルセリンとホスファチジルコリンの混合比を１：９（モル比）のリポソーム１００μｇを加え、さらに終濃度で６ｍＭ塩化カルシウムを加え１５分間インキュベートした。その後遠心操作により沈殿画分を集め、洗浄後ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、ＰＶＤＦ膜に転写して、ウサギ由来の抗アネキシン抗体でウエスタンブロットを行い、血液中のアネキシンⅣ及びアネキシンⅤの存在と痴呆の関連を調べた。その結果を図２及び図３に示したように、コントロール群ではアネキシンⅣ及びアネキシンⅤのいずれも検出されなかったのに対して、痴呆症ではアネキシンⅤは１１例中１０例において検出され、アネキシンⅣは１１例中６例において検出され、血液中のアネキシンの検出又は測定が痴呆症の検査に有用であることがわかった。

【００１４】

【実施例３】（酵素免疫測定法での検討）

実施例２で検討した検体中のアネキシンⅤ濃度を実施例１で調製したＥＬＩＳＡ法で測定した。その結果を表１に示した。

【００１５】

【表１】

10

20

30

表1 ELISA法によるアネキシン類の検出結果

検体	知能評価得点	アネキシンV 濃度 (ng/mL)
アルツハイマー型痴呆患者1	1	13.58
アルツハイマー型痴呆患者2	7	13.08
脳血管性痴呆患者1	8	9.86
アルツハイマー型痴呆患者3	9	3.23
アルツハイマー型痴呆患者4	9	15.50
アルツハイマー型痴呆患者5	9	3.38
アルツハイマー型痴呆患者6	10	9.65
脳血管性痴呆患者2	12	11.32
アルツハイマー型痴呆患者7	12	4.59
アルツハイマー型痴呆患者8	16	2.70
アルツハイマー型痴呆患者9	17	3.38
コントロール1	未試験	3.30
コントロール2	未試験	2.86
コントロール3	未試験	3.15
コントロール4	未試験	2.55
コントロール5	未試験	2.88
コントロール6	未試験	1.48
コントロール7	未試験	1.85
コントロール8	未試験	1.87
コントロール9	未試験	1.94
コントロール10	未試験	1.50

10

20

30

40

## 【0016】

ELISA法で測定において、痴呆症の患者血漿中のアネキシンV濃度はコントロール群に比べて有意に高い値を示し、血漿中のアネキシンV濃度の測定が痴呆症の検査に有用であることがわかった。

## 【0017】

## 【発明の効果】

本発明は、血液を用いて痴呆症の検査を簡単に行うことができる方法を提供する。

## 【0018】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】イムノクロマト法による本発明の実施の1例図である。

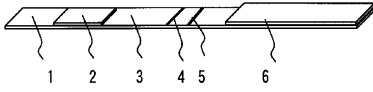
【図2】ウエスタンブロット法によるアネキシンVの検出結果である。

【図3】ウエスタンブロット法によるアネキシンVの検出結果である。

## 【符号の説明】

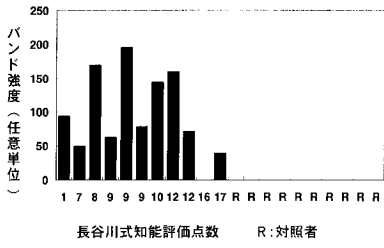
- 1、試料添加部
- 2、標識抗体保持部
- 3、展開部
- 4、抗アネキシンV抗体（抗アネキシンV抗体）固定部
- 5、抗アネキシンIV抗体（抗アネキシンV抗体）抗体固定部
- 6、吸収パッド

【 図 1 】



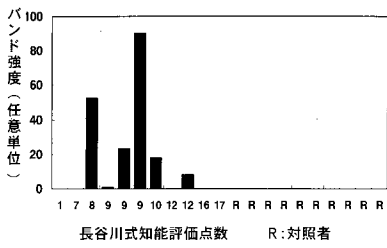
【 図 2 】

ウエスタンブロットによるアネキシンVの分析結果



【 図 3 】

ウエスタンブロットによるアネキシンIVの分析結果



---

フロントページの続き

(72)発明者 松本 恭一

京都府久世郡久御山町大橋辺 1 6 - 1 0 株式会社日本医学臨床検査研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA13 DA36

专利名称(译)	测试痴呆症的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004251794A</a>	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2003043452	申请日	2003-02-21
申请(专利权)人(译)	日本医科大学临床检验实验室		
[标]发明人	相馬仁 齋藤利和 村上新治 松本恭一		
发明人	相馬 仁 齋藤 利和 村上 新治 松本 恭一		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/50.T		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/DA36		
其他公开文献	JP4264469B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够使用容易收集的体液（例如血液）轻松测试痴呆症的方法。本发明涉及一种通过测量体液中膜联蛋白，特别是膜联蛋白V和/或膜联蛋白IV的浓度来测试痴呆的方法。待测样品的体液包括血液，唾液，尿液，脑脊髓液等，但优选血液，更优选血浆中的膜联蛋白V和/或膜联蛋白IV是每种膜联蛋白的特异性抗体（包括具有抗体活性的完整抗体分子或部分片段）用于免疫学测量。[选择图]无

検体	知能評価得点	アネキシンV濃度 (ng/mL)
アルツハイマー型痴呆患者1	1	13.58
アルツハイマー型痴呆患者2	7	13.08
脳血管性痴呆患者1	8	9.86
アルツハイマー型痴呆患者3	9	3.23
アルツハイマー型痴呆患者4	9	15.50
アルツハイマー型痴呆患者5	9	3.38
アルツハイマー型痴呆患者6	10	9.65
脳血管性痴呆患者2	12	11.32
アルツハイマー型痴呆患者7	12	4.59
アルツハイマー型痴呆患者8	16	2.70
アルツハイマー型痴呆患者9	17	3.38
コントロール1	未試験	3.30
コントロール2	未試験	2.86
コントロール3	未試験	3.15
コントロール4	未試験	2.55
コントロール5	未試験	2.88
コントロール6	未試験	1.48
コントロール7	未試験	1.85
コントロール8	未試験	1.87
コントロール9	未試験	1.94
コントロール10	未試験	1.50