

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4264469号
(P4264469)

(45) 発行日 平成21年5月20日(2009.5.20)

(24) 登録日 平成21年2月27日(2009.2.27)

(51) Int.Cl. F1
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/53 D

請求項の数 2 (全 6 頁)

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-43452 (P2003-43452) | (73) 特許権者 | 592037055 |
| (22) 出願日 | 平成15年2月21日(2003.2.21) | | 株式会社日本医学臨床検査研究所 |
| (65) 公開番号 | 特開2004-251794 (P2004-251794A) | | 京都府久世郡久御山町大字大橋辺小字大橋 |
| (43) 公開日 | 平成16年9月9日(2004.9.9) | | 辺16番地10 |
| 審査請求日 | 平成17年12月28日(2005.12.28) | (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) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液中のアネキシンV濃度を測定することによる痴呆症の検査方法。

【請求項2】

血液が血漿である請求項1に記載の方法。

【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】

【従来の技術】

アルツハイマー病(AD)はおもに老年期に発病する進行性の神経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の治療法も乏しいのが現状である。ADの診断は診断基準によるところの除外診断および脳の画像診断を主とし、それ以外の客観的方法はほとんどない。すなわち、発症前或いは発症後の患者におけるAD鑑別診断のための簡便な検査法は存在しない。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、侵襲性の高い脳脊髄液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IV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用いることができる方法ではない。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IV抗体量がアルコール依存症の診断に有効であるという報告は、簡便な検査方法といえる。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、侵襲性が低くかつ簡単に患者より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。

10

【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）

20

【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】

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。

30

【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、血液中のアネキシンV濃度を測定することを特徴とする痴呆症の検査方法。2、血液が血漿である前記1に記載の方法。

40

3、前記1～2に記載の方法を用いる試薬又はキット。

【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。本発明は血液、より好ましくは血漿中のアネキシンVを特異的な抗体（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

50

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。

【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。

【0009】

本発明は、血液中のアネキシンVと他のアネキシン類、例えばアネキシンIVの濃度を組み合わせて検査してもよい。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、血液中のアネキシンVが測定されていれば、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、非特許文献2、3)。前述のようにアネキシンVとアネキシンIV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もアネキシン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。

【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

【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

10

20

30

40

50

漿 1 mL を P B S 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 1 0 0 μ g を加え、さらに終濃度で 6 m M 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 S D S - P A G E を行い、P V D F 膜に転写して、ウサギ由来の抗アネキシン V 抗体でウェスタンブロットを行い、血液中のアネキシン V の存在と痴呆の関連を調べた。コントロール群ではアネキシン 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 1 1 例中 1 0 例 (感度 9 0 . 9 %) において検出され血液中のアネキシン V 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。

【 0 0 1 4 】

【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 E L I S A 法で測定した。その結果を表 1 に示した。

【 0 0 1 5 】

【表 1】

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 |

【 0 0 1 6 】

E L I S A 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。

【 0 0 1 7 】

【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。

【 0 0 1 8 】

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

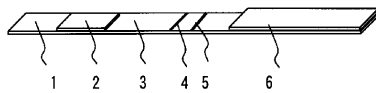
【図1】 イムノクロマト法による本発明の実施の1例図である。

【図2】 ウェ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。

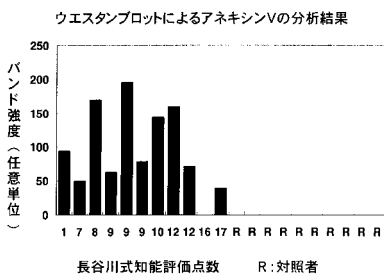
【符号の説明】

- 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】



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

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特開平 0 7 - 2 5 3 4 2 9 (J P , A)

国際公開第 9 6 / 0 1 5 1 5 2 (W O , A 1)

国際公開第 9 9 / 0 1 8 4 3 5 (W O , A 1)

Journal of Gerontology:Biological Sciences , 1 9 9 7 年 , Vol.52A, No.4 , p.B217-B220

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53

BIOSIS(STN)

BIOTECHABS(STN)

CA(STN)

CAOLD(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

WPIDS(STN)

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)

| | | | |
|---------------|---------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 测试痴呆症的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP4264469B2 | 公开(公告)日 | 2009-05-20 |
| 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 | | |
| 当前申请(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 | JP2004251794A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过使用容易收集的体液如血液来方便地检查痴呆的方法。ZSOLUTION：在痴呆的方法中，通过测量膜联蛋白的浓度，尤其是体液中的膜联蛋白V和/或膜联蛋白IV，作为标本的体液包括血液，唾液，尿液，脑脊液等。该方法得以实施通过使用对每种膜联蛋白特异的抗体（包括抗体总分子或具有抗体活性的部分区段），优选在血液或更优选在血浆中免疫测量膜联蛋白V和/或膜联蛋白IV。Z

| 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 |