

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580036804.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 10 月 3 日

[11] 公开号 CN 101048662A

[22] 申请日 2005.10.27

[21] 申请号 200580036804.6

[30] 优先权

[32] 2004.10.28 [33] JP [31] 314639/2004

[32] 2005.2.25 [33] JP [31] 052003/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2005/019787 2005.10.27

[87] 国际公布 WO2006/046644 日 2006.5.4

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.26

[71] 申请人 三光纯药株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 高山茂雄 山田雄二

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 李贵亮

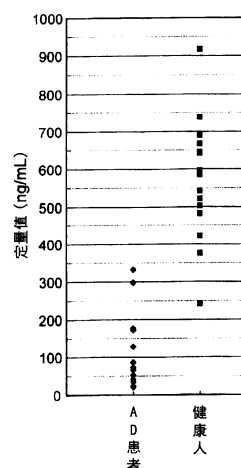
权利要求书 4 页 说明书 32 页 序列表 2 页
附图 11 页

[54] 发明名称

阿尔茨海默氏病的检验方法及诊断试剂

[57] 摘要

本发明的目的在于，设法提供一种血中等生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白的测定方法，并应用于阿尔茨海默氏病的诊断。利用使用识别 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部分的抗体的免疫测定法，通过测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部分的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量，来检验阿尔茨海默氏病。上述免疫测定法优选为竞争性免疫测定法。



1. 一种阿尔茨海默氏病的检验方法，其特征在于，
利用使用 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的特异抗体的免疫测定法，测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量。

2. 根据权利要求 1 所述的阿尔茨海默氏病的检验方法，其特征在于，
所述免疫测定法为竞争性免疫测定法。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的阿尔茨海默氏病的检验方法，其特征在于，

所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

4. 根据权利要求 3 所述的阿尔茨海默氏病的检验方法，其特征在于，
所述单克隆抗体为识别 β -淀粉样蛋白 1-42 而不识别 β -淀粉样蛋白 1-40 的抗体。

5. 根据权利要求 1~4 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的检验方法，其特征在于，

所述抗体是将 β -淀粉样蛋白 1-42 的 33-42 氨基酸部位作为免疫原、对 A β 1-42 的 C 末端部分具有特异性的小鼠单克隆抗体。

6. 根据权利要求 2 所述的阿尔茨海默氏病的检验方法，其特征在于，
所述竞争性免疫测定法包括下述 (a) 及 (b) 的工序，即

(a) 使已对保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽进行固相化的担体与生物体样品样本以及用标记物质标记的识别 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的抗体发生反应的工序，和

(b) 清洗后，测定在已固相化的保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽上结合的标记抗体量，测定 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量的工序。

7. 根据权利要求 2 所述的阿尔茨海默氏病的检验方法，其特征在于，
所述竞争性免疫测定法包括下述 (a) 及 (b) 的工序，即

(a) 使已对识别 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的抗体进行固相

化的担体与生物体样品样本以及用标记物质标记的保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽发生反应的工序, 和

(b) 清洗后, 测定在已固相化的抗体上结合的保有标记 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽量, 测定 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量的工序。

8. 根据权利要求 7 所述的阿尔茨海默氏病的检验方法, 其特征在于, 用所述标记物质标记的保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽是使载体物质结合的肽复合体。

9. 根据权利要求 8 所述的阿尔茨海默氏病的检验方法, 其特征在于, 所述载体物质为聚赖氨酸、葡聚糖、牛血清白蛋白或保有很多游离氨基的多肽。

10. 根据权利要求 6~9 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的检验方法, 其特征在于, 所述标记物质为钆配位化合物。

11. 根据权利要求 6~10 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的检验方法, 其特征在于, 所述担体为磁珠。

12. 根据权利要求 1~11 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的检验方法, 其特征在于, 所述生物体样品样本为血清或血浆。

13. 一种阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于, 以 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的特异抗体为必须构成成分, 是用于通过测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量, 来检验阿尔茨海默氏病的试剂。

14. 根据权利要求 13 所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

以已固相化的保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽和用标记物质标记的 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的特异抗体为必须的构成成分, 用于竞争性免疫测定法中。

15. 根据权利要求 13 所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

以已固相化的 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的特异抗体和用标记物质标记的保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽为必须的构成成分, 用于竞争性免疫测定法中。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述进行固相化的担体为磁珠。

17. 根据权利要求 15 所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述用标记物质标记的保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽为使载体物质结合的肽复合体。

18. 根据权利要求 17 所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述载体物质为聚赖氨酸、葡聚糖、牛血清白蛋白或保有很多游离氨基的多肽。

19. 根据权利要求 14~17 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述标记物质为钆配位化合物。

20. 根据权利要求 13~19 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

21. 根据权利要求 20 所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述单克隆抗体为识别 β -淀粉样蛋白 1-42 而不识别 β -淀粉样蛋白 1-40 的抗体。

22. 根据权利要求 13~21 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述抗体是将 β -淀粉样蛋白 1-42 的 33-42 氨基酸部位作为免疫原、对 A β 1-42 的 C 末端部分具有特异性的小鼠单克隆抗体。

23. 根据权利要求 13~22 中任意一项所述的阿尔茨海默氏病的诊断试剂, 其特征在于,

所述生物体样品为血清或血浆。

24. 一种 β -淀粉样蛋白 1-42 的测定方法, 其特征在于,

利用使用 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的特异抗体的免疫测定法, 测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量, 由此来测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 含量。

25. 根据权利要求 24 所述的测定方法, 其特征在于,

所述生物体样品样本为血清或血浆。

阿尔茨海默氏病的检验方法及诊断试剂

技术领域

本发明涉及一种通过测定生物体样品特别是血液中的 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量来检验阿尔茨海默氏病等与 β -淀粉样蛋白相关的疾病的检验方法及诊断试剂。

背景技术

β -淀粉样蛋白（以下写为 $A\beta$ ）是阿尔茨海默氏病（AD）患者脑中
被特征性识别的淀粉样斑（amyloid plaque）的主要构成成分，已知 $A\beta$ 是
利用切断其前体蛋白质（APP）N-末端的 β 部位的 β 分泌酶（secretase）
作用和切断在细胞膜内存在的 APP-C-末端的早老蛋白（presenilin）的
 γ -分泌酶作用而产生的。

已知 $A\beta$ 的分子物种有各种分子量大小，其中，与神经细胞毒性相关的
的最有名的是 40 个氨基酸构成的 $A\beta$ （以下写成 $A\beta 1-40$ ）和 42 个氨基
酸构成的 $A\beta$ （以下写成 $A\beta 1-42$ ）。 $A\beta 1-42$ 已知具有容易纤维化的性质，
从 AD 早期开始沉积形成淀粉样蛋白斑。

如上所述， $A\beta$ 的沉积是 AD 患者脑的特征性病理学特征，同时还在
脑脊髓液或血中被检出。已有报道在 AD 患者中，脑脊髓液中的 $A\beta 1-42$
浓度降低（非专利文献 1~4）。另外，有报道家族性 AD 患者血浆中存在的
 $A\beta 1-42$ 增加，散发性 AD 患者的血浆中 $A\beta 1-40$ 或 $A\beta 1-42$ 浓度增
加（非专利文献 5、6），相反，还有报道称几乎与健康人群为同等水平（非
专利文献 7~9），其行为不明。

迄今为止的生物体样品中的 $A\beta$ 测定，主要实施的是双抗体三明治法。
有报道铃木等将 $A\beta$ 的各种肽片段作为免疫原，制作识别部位不同的多个
单克隆抗体，组合了这些抗体的三明治测定法（专利文献 1）。公开了利

用该手法测定 AD 患者的脑脊髓液中的 $A\beta$, $A\beta 1-40$ 为主要成分, 在 AD 患者脑的甲酸提取物中, $A\beta 1-40$ 、 $A\beta 1-42$ 及 $A\beta 3-42$ 为主要成分。

还有采用竞争性免疫测定法的报道。非专利文献 18 公开了通过使用对 $A\beta 1-40$ 特异性的兔多克隆抗体的竞争性免疫测定法, 测定高脂血浆患者的血清中的 $A\beta$, 随着年龄增长, $A\beta 1-40$ 有增加趋势。另外, グラハムポール等公开了制作不与 $A\beta 1-40$ 及 $A\beta 1-43$ 反应而对 $A\beta 1-42$ 为特异性的单克隆抗体, 该抗体可以对 AD 患者脑组织的纤维淀粉样蛋白或血管淀粉样蛋白等的斑进行免疫组织染色 (专利文献 2)。

对脑脊髓液中的 $A\beta$ 浓度进行定量的双抗体 ELISA 试剂在 2 个公司有售, 尽管这些利用 ELISA 的定量值是相关的, 但各自的定量值极为不同 (非专利文献 10)。作为这些定量值不同的理由, 可以举出成为测定对象的临床样本、测定中使用的抗体、测定法、测定法的灵敏度、校正曲线中使用的 $A\beta 1-42$ 的调整法等不同等。

进而, 在临床样本为血浆或血清的情况下, 已知存在与 $A\beta$ 分子相互作用的血浆或血清中的干扰物质, 有必要预先除去或分离这些物质 (非专利文献 11~13)。但是, 在将血浆或血清用作临床样本的情况下, 可以很容易地推测这些干扰物质的除去法、除去操作引起的测定误差、稀释的影响、使用的抗体的效价、测定灵敏度等对测定值的影响很大。

脑脊髓液中的 $A\beta$ 可以利用通常的测定方法, 例如使用特异性结合 $A\beta$ 的抗体的双抗体三明治测定法来测定, 尤其也发现了 $A\beta 1-42$ 的测定在临床上的有用性 (非专利文献 1、3、4、7 及 15~17)。但是, 如果将脑脊髓液作为样本, 在采取样本时, 对患者的身体上的负担・身体功能损伤的风险大, 实际上将脑脊髓液作为样本使用是不现实的。

作为体外诊断药的最普通而且身体上的负担・风险低的样本, 可以考虑血液样本 (血清或血浆)。但是, 血清中的 $A\beta$ 测定, 在目前进行的普通的测定手法例如双抗体三明治测定法中, 几乎无法从血液中检测出, 也未见临床上的有用性 (非专利文献 7)。这是因为, $A\beta$ 从脑脊髓液中向血中移行的 $A\beta$ 量为极微量。

这样, 与健康人相比, AD 患者的脑脊髓液中的 $A\beta 1-42$ 量存在降低的趋势, 但至今未对血中的 $A\beta 1-42$ 量有一定的认识, 在 AD 的病理学、

诊断学研究中成为大的课题。

专利文献 1: WO94/17197

专利文献 2: WO96/25435

非专利文献1: Tamaoka A, et al. , J. Neurol. Sci. 1997; 148: 41—45.

非专利文献2: Andreasen N, et al., Arch. Neurol. 1999; 56: 673—680.

非专利文献3: Galasko D, et al., Arch. Neurol. 1998; 55: 937—945.

非专利文献4: Motter R, et al. , Ann Neurol 1995; 38: 643—648.

非专利文献5: Mayeux R, Ann. Neurol. 1999; 46: 412—416.

非专利文献6: Mehta PD, Arch. Neurol. 2000; 57: 100—105.

非专利文献7: Tamaoka A, et al. , J. Neurol. Sci. 1996; 141: 65—68.

非专利文献8: Vanderstichele H, et al. , Amyloid 2000; 7: 245—258.

非专利文献9: Fukumoto H, et al. , Arch. Neurol 2003; 60:958—964.

非专利文献10: Suzuki N, et al., Science 1994; 264: 1336—1340.

非专利文献11: Chan W, et al., Biochemsty 1996; 35: 7123—1230.

非专利文献12: Biere Al, et al., J. Biol. Chem. 1996 271; 32916—32922.

非专利文献13: Kuo YM et al., Biocem Biophys Res Commun. 2000, 268; 750—756.

非专利文献14: 难波et al.、电化学发光法 (Electrochemiluminescence: ECL) 高灵敏度免疫学测定法的探讨、日本临床自动学会 (JJCLA)、1996, Vol. 21 No.5

非专利文献15: Tero T, et al., Neurobiology of Aging 21 (2000) 735—740

非专利文献16: Kanai M, et al. , Ann Neurol 1998; 44: 17—26.

非专利文献17: Schro der J, et al., Mol Psychiatry 1997; 2:505—7.

非专利文献18: Christopher C. T. Smith et al., Neuroscience Letters, 362(2004)48—50

非专利文献19: G. Zhu et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 24, 281—

290(2000)

发明内容

本发明正是鉴于上述问题而提出的发明，通过设法提供一种 AD 患者血中的 A β 测定手法，应用于阿尔茨海默氏病的诊断。

为了解决上述课题，本发明人等进行了潜心研究。本发明人等首先探讨是否可以使用利用具有高灵敏度·宽测定范围的电化学发光法（非专利文献 14）的双抗体三明治法，以高灵敏度测定 AD 患者血清中的 A β 1-42。作为一次抗体，使用对 A β 1-42 的 C 末端部分具有特异性的抗体 21F12（Innogenetics 公司制），作为二次抗体，使用 A β 1-42 的 1-5 氨基酸部位的特异抗体，测定 AD 患者及健康人血清中的 A β 1-42。其结果，与以往的方法相比，灵敏度极为出色，但在 AD 患者与健康人之间，血清中的 A β 1-42 量未见统计学差异（参照下述实验例 1、2 及图 4）。

因此，本发明人等为了确认 A β 1-42 合成肽在血清中的稳定性，使 A β 1-42 合成肽与血清共存，结果确认了 A β 1-42 含量随着时间的推移而降低。另外，在使 A β 1-42 合成肽与血清共存时，确认了如果预先向血清中投入蛋白酶抑制剂（protease inhibitor），则随着时间的经过不会发生 A β 1-42 含量的降低（参照下述实验例 3 及图 5）。该事实意味着 A β 在脑脊髓液或血液中等生物体液中被蛋白酶快速分解·片段化，因而表明并不是因为 A β 向血中的移行量为微量而不能测定，而是由于在血液中等被片段化，全长 A β 1-42 的正确测定变成不可能。

这意味着从脑脊髓液向血液中移行的 A β 1-42 在血中在短时间内被分解，进而在血清样本的保存过程中，A β 1-42 的分解也在推进，表明这是不可能正确测定的主要原因。即，A β 1-42 在血液中等断片化，所以在双抗体三明治法中，不能正确地进行 A β 1-42 的测定。

但是，虽然 A β 1-42 被分解，含量降低，但还存在被分解的 A β 1-42 片段。因此，用 2 种测定法即利用识别 A β 1-42 的 C 末端部分的抗体的竞争性免疫测定法及上述电化学发光双抗体三明治法，测定已被蛋白酶处理的 A β 1-42 样品试样，结果确认了用双抗体三明治法几乎未检测出（参照下述实验例 4 及表 2），用竞争性免疫测定法显示出与初期的

A β 1-42 量接近的值（参照下述实验例 5 及表 3）。即，首次发现通过利用竞争性免疫测定法测定 A β 1-42 和保有 A β 1-42 的 C 末端部的 A β 1-42 片段的总量（以下将该总量写为 A β x-42），可以正确地测定 A β 1-42 含量。

接着，测定 AD 患者与健康人血清中的 A β x-42，其结果确认了在两者的测定值之间存在统计学差异，有可以用于 AD 诊断的可能性，以至完成了本发明。

作为本发明之一的利用竞争性免疫测定法的 AD 检验方法，是不需要除去血浆或血清中的与 A β 1-42 相互作用的物质的操作，而且可以有效地检测出 A β x-42 的出色的方法。目前有使用识别 A β 1-40 的抗体的竞争性免疫测定法的报道（非专利文献 18），但没有对使用本发明的识别 A β 1-42 的 C 末端部分的抗体的免疫测定法的相关记载及其效果的报道，进而本发明人等首次发现，本发明的方法发挥出正确反映血中的 A β 1-42 含量的出色效果，在 AD 诊断中是有用的。

此外，本发明人等首次发现通过测定 A β x-42 可以用于 AD 诊断，所以 A β x-42 的测定方法不限于上述竞争性免疫测定法，也可以任意使用例如使用 A β 1-42 的 C 末端部的特异抗体的表面胞质团（plasmon）共振法检测（非专利文献 19）、通过使用 A β 1-42 的 C 末端部的特异抗体的亲和层析（affinity chromatography）分离并测定保有 A β 1-42C 末端部的肽的方法等。本发明的主旨在于通过测定 A β x-42 而用于 AD 诊断。

本发明利用识别 A β 1-42 的 C 末端部位的抗体，确认 A β x-42 的测定的有用性，同样也对测定 A β 1-x 的有用性进行了确认。A β 1-x 是指 A β 1-40、A β 1-37 等保有 A β 的 N 末端部的各种 A β 同种型（isotype）的片段的总量。通过将识别 A β 的 N 末端部位的抗体用于本发明的竞争测定法，关于这些 A β 同种型，可以不分类型地一并测定。具体而言，通过使用免疫 A β 1-5 制作的单克隆抗体 3D6（Innogenetics 公司制）或免疫 A β 1-17 制作的单克隆抗体 6E10（Chemicon 公司制）的竞争性免疫测定法来进行测定。结果，在 AD 患者与健康人血清的测定值中未见统计学差异。这表明在 AD 诊断中特异测定血中 A β x-42 片段的重要性。

因此，本发明通过测定 A β x-42 来正确地反映血中 A β 1-42 量，进

而通过证明了 AD 患者与健康人的血清样本之间的临床有用性,使 AD 的利用血液样本的诊断成为可能。另外,还可以用于 $A\beta$ 为原因之一的疾病的诊断。

即,本发明的阿尔茨海默氏病的检验方法的特征在于,通过使用识别 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的特异抗体的免疫测定法,测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量,由此来检验阿尔茨海默氏病。

保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段为 β -淀粉样蛋白 1-42 片段中特别是保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的肽,优选是保有从 β -淀粉样蛋白 1-42C 末端部开始 1 个氨基酸残基以上、更优选 2 个氨基酸残基以上、进而优选 3 个氨基酸残基以上的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段。保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段优选与 $A\beta$ 1-42 的 C 末端部的特异抗体结合。以下有时写成 $A\beta$ 1-42C 末端部保有肽,另外,有时还将 β -淀粉样蛋白 1-42 与 $A\beta$ 1-42C 末端部保有肽总称为 $A\beta$ x-42。

上述免疫测定法优选为竞争性免疫测定法。该竞争性免疫测定法的手法例如可以通过使用已固相化的 $A\beta$ 1-42C 末端部保有肽或固相化抗体的下述 2 种手法来实施。

利用竞争性免疫测定法的本发明方法的第 1 例,其特征在于,包括下述 (a) 及 (b) 的工序。

(a) 使已固相化 $A\beta$ 1-42C 末端部保有肽的担体与生物体样品样本及用标记物质标记的抗体(识别 $A\beta$ 1-42 的 C 末端部的抗体),发生反应的工序,和

(b) 清洗后,测定在已固相化的 $A\beta$ 1-42C 末端部保有肽上结合的标记抗体量,对 $A\beta$ x-42 进行定量的工序。

上述工序还可以进一步包括

(c) 将生态样品中的 $A\beta$ x-42 定量值与健康人的 $A\beta$ x-42 定量值进行比较,检验是否为阿尔茨海默氏病的工序。

利用竞争性免疫测定法的本发明方法的第 2 例,其特征在于,包括下述 (a) 及 (b) 的工序。

(a) 使已对识别 $A\beta 1-42$ 的 C 末端部的抗体进行固相化的担体与生物体样品样本及用标记物质标记的 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽, 发生反应的工序, 和

(b) 清洗后, 测定在已固相化的抗体上结合的标记 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽量, 对 $A\beta x-42$ 进行定量的工序。

上述工序还可以进一步包括

(c) 将生态样品中的 $A\beta x-42$ 定量值与健康人的 $A\beta x-42$ 定量值进行比较, 检验是否为阿尔茨海默氏病的工序。

标记的 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽, 可以使用合成肽本身, 也可以使用在 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽结合了载体物质的 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽复合体(以下称为肽复合体)。载体物质是指可以标记钆配位化合物等标记物质的化合物, 可以举出聚赖氨酸(poly-L-Lysine)、葡聚糖(dextran)、牛血清白蛋白或保有很多游离氨基的多肽等。载体物质只要不损坏与上述抗体的结合性即可, 可以加在上述肽的任意位置, 优选 N 端部。

本发明的 AD 诊断试剂(试剂盒)是将识别 $A\beta 1-42$ 的 C 末端部的抗体作为必须的构成成分的测定生物体样品样本中的 $A\beta x-42$ 的 AD 诊断试剂。该诊断试剂根据采用的免疫测定方法不同而试剂的构成不同, 在是竞争性免疫测定法的情况下, 例如使用已固相化的 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽或已固相化的抗体。在使用已固相化的 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽的情况下, 将用标记物质标记的抗体作为构成成分; 在使用已固相化的抗体的情况下, 将用标记物质标记的 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽作为构成成分。标记的 $A\beta 1-42$ C 末端部保有肽也可以使用使载体物质结合的肽复合体。作为载体物质, 可以举出聚赖氨酸、葡聚糖、牛血清白蛋白、保有很多游离氨基的多肽等。载体物质只要不损坏与上述抗体的结合性即可, 可以加在上述肽的任意位置, 优选 N 端部。

在本发明的检验方法及试剂中, 作为上述抗体, 可以使用多克隆抗体或单克隆抗体。另外, 上述抗体优选为识别 $A\beta 1-42$ 而不识别 $A\beta 1-40$ 的抗体, 更优选将 β -淀粉样蛋白 1-42 的 33-42 氨基酸部位作为免疫原、对 $A\beta 1-42$ 的 C 末端部分具有特异性的小鼠单克隆抗体。具体而言, 可以举出 21F12 (Innogenetics 公司制)、AB5078P (Chemicon 公司制)、

8G7 (Nanotool 公司制) 等。

所述生物体样品样本优选为血清或血浆。

作为标记物质, 可以举出荧光物质、酶、色素、发光物质等, 优选钆配位化合物。固定化的担体优选为磁珠 (beads)。

本发明的 β -淀粉样蛋白 1-42 的测定方法, 其特征在于, 通过利用使用 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的特异抗体的免疫测定法, 测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 和保有 β -淀粉样蛋白 1-42 的 C 末端部的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段的总量, 来测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白 1-42 含量。所述生物体样品样本优选为血清或血浆。

本发明通过利用使用特异性识别 $A\beta$ 1-42 的 C 末端部分的抗体的免疫测定法, 测定生物体样品中的 $A\beta$ x-42, 使诊断 AD 成为可能。利用本发明, 不需要除去血浆或血清中与 $A\beta$ 1-42 相互作用的物质的操作, 而且可以正确有效地检测出 $A\beta$ x-42。

附图说明

图 1 是表示本发明的阿尔茨海默氏病的检验方法的第 1 例的概要说明图。

图 2 是表示本发明的阿尔茨海默氏病的检验方法的第 2 例的概要说明图。

图 3 是表示实验例 1 的结果的曲线图。

图 4 是表示实验例 2 的结果的曲线图。

图 5 是表示实验例 3 的结果的曲线图。

图 6 是表示在血中的 $A\beta$ 1-42 的代谢概念的概要说明图。

图 7 是表示实验例 6 及 7 的结果的曲线图。

图 8 是表示实施例 1 的结果的曲线图。

图 9 是表示实施例 2 的结果的曲线图。

图 10 是表示利用实施例 3 的标准品的校正曲线的曲线图。

图 11 是表示实施例 3 的结果的曲线图。

图 12 是表示利用实验例 8 的标准品的校正曲线的曲线图。

图 13 是表示实验例 8 的电泳结果的照片。

图 14 是表示实验例 9 的第一次结果的图表。

图 15 是表示实验例 9 的第一次结果的曲线图。

图 16 是表示在实验例 9 得到的校正曲线的曲线图。

图 17 是表示实验例 9 的第二次结果的图表。

图 18 是表示实验例 10 的结果的图表。

图中：10、20—担体、磁珠，12、24— $A\beta 1-42$ 合成肽，13— $A\beta 1-42$ 合成肽结合担体、 $A\beta 1-42$ 合成肽结合磁珠，14、22— $A\beta 1-42$ 的 C 末端的特异抗体，16、26—标记物质，17—标记抗体，23— $A\beta 1-42$ 抗体结合担体、 $A\beta 1-42$ 抗体结合磁珠，27—标记 $A\beta 1-42$ 合成肽，30—生物体样品样本中的 $A\beta x-42$ ，32—反应容器，34—反应液，40—标记物质的发光。

具体实施方式

以下说明本发明的实施方式，当然，只要不脱离本发明的技术思想，可以进行各种变形。

本发明的阿尔茨海默氏病的检验方法是利用使用 $A\beta 1-42$ 的 C 末端部的特异抗体的免疫测定法，测定生物体样品样本中的 $A\beta 1-42$ 和保有 $A\beta 1-42$ 的 C 末端部的 $A\beta 1-42$ 片段的总量 ($A\beta x-42$)，由此来检验是否患有阿尔茨海默氏病。

作为本发明方法中使用的免疫测定法，只要是测定生物体样品中的 $A\beta x-42$ 的方法即可，没有特别限定，例如可以任意使用例如竞争性免疫测定法、利用表面胞质团共振法的检测（非专利文献 19）、利用亲和层析分离保有 $A\beta 1-42$ C 末端部的肽并进行测定的方法等，优选使用竞争性免疫测定法。

上述生物体样品样本例如包括血清、血浆、脑脊髓液、骨髓液、组织及细胞提取物、细胞培养液等，优选血清、血浆。

在本发明中使用的上述抗体，只要是特异识别 $A\beta 1-42$ 的 C 末端部分的抗体即可，可以任意使用单克隆抗体及多克隆抗体。优选与 $A\beta 1-42$ 反应而不与 $A\beta 1-40$ 反应的抗体，作为市售品，例如可以举出将 $A\beta 1-42$ 的 33-42 氨基酸部位作为免疫原，对 $A\beta 1-42$ 的 C 末端部分具有特异

性的小鼠单克隆抗体 21F12 (Innogenetics 公司制)、AB5078P (Chemicon 公司制)、8G7 (Nanotool 公司制) 等, 优选 21F12。不与 A β 1-40 反应的抗体还包括为弱反应性且对 A β 1-42C 末端部总量的测定没有实质性影响的抗体。另外, 即便对 A β 1-43 具有反应性也没有关系。

本发明使用的上述抗体可以利用常规方法配制。

单克隆抗体的配制是将保有 A β 1-42 的 C 末端部的肽作为抗原, 根据需要制作与载体蛋白质的复合体, 将其接种于动物, 进行免疫。通过使从上述免疫动物的脾脏或淋巴结中得到的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合, 选择产生对 A β 1-42 的 C 末端部显示出强特异性的抗体的杂交瘤细胞 (hybridoma) 来配制。该操作只要按照以往已知的方法。

免疫抗原也可以使用 A β 1-42, 但由于目的抗体是对 A β 1-42 的 C 末端部具有特异性的抗体, 所以可以适当选择保有 A β 1-42 的 C 末端部的肽, 例如 A β 33-42 等。通常, 将与载体蛋白质的复合体用作抗原, 其配制使用各种缩合剂, 例如戊二醛、碳二亚胺 (carbodiimide)、马来酰亚胺活性酯等。载体蛋白质使用牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)、血蓝蛋白 (hemocyanin) 等, 通常使用以 1~5 倍量的比例使其偶联的方法。

作为被免疫的动物, 可以举出小鼠、豚鼠等, 接种方法为向皮下、肌肉或腹腔内给予。在给予时, 也可以与完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂混合给予, 通常每 2~5 周进行一次给予。从已被免疫的动物的脾脏或淋巴结得到的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合, 作为杂交瘤细胞被分离。作为骨髓瘤细胞, 使用小鼠、大鼠、人等来源的细胞, 优选与抗体产生细胞为同种来源的细胞, 有时也可以为不同种。

细胞融合的操作可以按照已知的方法例如ケーラー与ミルスタイン的方法 (Nature, 256, 495-497 (1975)) 实施。作为融合促进剂, 可以举出聚乙二醇或仙台病毒等, 通常使用 20~50% 左右的浓度的聚乙二醇 (平均分子量 1000~4000), 可以在 20~40℃、优选为 30~37℃ 的温度下, 抗体产生细胞数与骨髓瘤细胞数的比通常为 1: 1~10 左右, 使其反应约 1~10 分钟左右, 来实施细胞融合。

产生对 A β 1-42 的 C 末端部具有特异性的抗体的杂交瘤细胞的筛选

(screening), 可以使用各种免疫化学方法。例如可以举出 ELISA 法、Western blot 法、竞争法等。另外, 通过使用 A β 1-42 肽及 A β 1-40 肽, 可以选择与 A β 1-42 反应而不与 A β 1-40 反应的抗体。

从这样选择后的孔, 可以进一步例如利用界限稀释法进行克隆, 得到目的克隆。杂交瘤细胞的选择、育种通常在添加了 HAT (次黄嘌呤、氨基喋呤、胸苷)、含有 10~20% 胎牛血清的动物细胞用培养基 (例如 RPMI1640) 中进行。这样得到的克隆可以移植到已预先给予了姥蛟烷 (ブリスタン) 的 BALB/C 小鼠的腹腔内, 10~14 天之后, 采取高浓度含有单克隆抗体的腹水, 作为抗体纯化的原料。另外, 也可以培养该克隆, 将其培养液作为抗体纯化的原料。单克隆抗体的回收可以使用已知的方法作为免疫球蛋白纯化法, 例如, 可以通过硫酸铵分区分离法、PEG 分区分离法、乙醇分区分离法、阴离子交换剂的利用, 进而通过亲和层析等手段来实现。

多克隆抗体也可以利用常规方法配制。抗原可以采用将 A β 1-42 的 C 末端部作为主要构成的肽, 可以利用与上述同样的手法, 作为复合体, 免疫兔、豚鼠等动物来配制。可以适当表決测定抗体效价, 将高效价的血清作为抗体的纯化原料, 通过利用上述手法进行纯化, 得到多克隆抗体。

以下, 对本发明的阿尔茨海默氏病的检验方法, 以使用竞争性免疫测定法作为免疫测定法的情况为例进行说明。

对使用竞争性免疫测定法的本发明方法进行说明。本发明方法使用的竞争性免疫测定法 (competitive immunological assay) 是使用 A β 1-42 的 C 末端部分的特异抗体和 A β 合成肽的、以血液样本等生物体样品样本中的保有 A β 1-42C 末端部的 A β 1-42 肽和 A β 合成肽的对抗体的竞争结合反应作为反应基础的竞争性免疫测定法。

在本发明方法中, 使用的 A β 合成肽只要是与识别 A β 1-42 的 C 末端部的抗体反应的肽, 就可以任意使用, 具体而言, 可以使用保有 A β 1-42 的 C 末端部的肽。作为该 A β 1-42C 末端部保有肽, 不仅是全长 A β 1-42, 例如也可以使用 A β 33-42 或 A β 17-42 等合成肽等, 没有特别限定。上述肽可以按照固相合成法等常规方法合成。以下, 作为 A β 合成肽, 将使用 A β 1-42 合成肽的情况作为例子进行具体说明。

图 1 是表示本发明的阿尔茨海默氏病的检验方法的第 1 例的概要说明

图，是作为免疫测定法，使用将 A β 1-42C 末端部保有肽固相化在担体上的竞争性免疫测定法的情况的例子。

在图 1 中，10 是担体，12 是 A β 1-42 合成肽，32 是反应容器（反应杯），34 是反应液（例如缓冲液等）。如图 1（a）所示，使 A β 1-42 合成肽 12 结合于担体 10（固相化），配制 A β 1-42 合成肽结合担体 13。

作为上述担体 10 的材料，例如可以举出玻璃、塑料（例如聚苯乙烯、聚酰胺、聚乙烯、聚丙烯等）、金属等。担体的形状为杯型、平板、颗粒等，没有特别限定。上述担体 10 优选为磁微珠（magnetic microbeads）（磁珠）。

在担体上固相化 A β 合成肽的方法，按照常规方法即可。在使用磁珠作为担体的情况下，优选使该珠与 A β 1-42 合成肽在缓冲液中发生反应，然后用封闭（blocking）剂处理磁珠，然后在封闭剂下进行保存。以下，将使用磁珠作为担体的情况为例进行说明。

对上述已配制的 A β 1-42 合成肽结合磁珠 13，一起混合用标记物质 16 标记 A β 1-42 的 C 末端部的特异抗体 14 的抗体 17（以下称为标记抗体）与生物体样品样本，使结合于磁珠的 A β 1-42 合成肽 12 与样本中的 A β 1-42 及保有 A β 1-42C 端部的片段 30 竞争性地与标记抗体 17 反应，使其竞争地结合[图 1（b）]。

本发明中使用的标记物质 16 可以是酶、发光物质、荧光物质、同位素等，没有特别限定，优选为钆配位化合物。

标记抗体的配制方法按照常规方法。例如在缓冲液中使抗体与钆配位化合物（IGEN 公司制，ORIGEN TAG-NHS ESTER）反应，然后加入 2M 甘氨酸，使其进一步反应。接着，可以通过利用凝胶过滤柱层析（column chromatography）纯化标记抗体，由此来配制。

上述竞争反应之后，吸取反应液，清洗磁珠，由此除去未与磁珠结合的游离的反应液中物质（BF 分离）。

接着，测定与磁珠结合的标记物质。标记物质的测定方法按照常规方法。例如在将钆配位化合物用作标记物质的情况下，如图 1（c）所示，在三丙胺（トリプロピルアミン）的存在下，通过向结合于磁珠的钆配位化合物标记抗体施加电能，使其发光，测定钆配位化合物发光 40 的强度

(非专利文献 14)。

此时, 如果样本中的 $A\beta_{x-42}$ 多, 通过竞争反应, 标记抗体向珠结合肽的结合量降低, 所以与没有竞争物质的情况下的发光强度相比, 发光强度降低。可以根据该发光强度的降低程度(在下述实施例中表示为抑制率(%)), 定量样本中的 $A\beta_{x-42}$ 。与健康人的样本相比, 阿尔茨海默氏病患者的样本中特别是血中的 $A\beta_{x-42}$ 量显著减少, 所以利用本发明方法测定样本中的 $A\beta_{x-42}$, 可以检验阿尔茨海默氏病。

图2是表示本发明的阿尔茨海默氏病的检验方法的第2例的概要说明图, 是作为免疫测定法, 使用将特异性识别 $A\beta_{1-42}$ 的 C 末端部的抗体固相化在担体上的竞争性免疫测定法的情况的例子。

在图2中, 20 是担体, 22 是特异性识别 $A\beta_{1-42}$ 的 C 末端部的抗体。如图2(a)所示, 使上述 $A\beta_{1-42}$ 抗体 22 结合于磁珠等担体 20 (固相化) 上, 配制 $A\beta_{1-42}$ 抗体结合担体 23。抗体向担体的固相化手法按照常规方法即可。以下以使用磁珠作为担体的情况为例进行说明。

向上述配制的抗体结合磁珠内, 一起混合用标记物质 26 标记 $A\beta_{1-42}$ 合成肽 24 的标记 $A\beta_{1-42}$ 合成肽与生物体样品样本, 使其发生竞争反应, 使其竞争性地结合[图2(b)]。

竞争反应之后, 可以进行与上述第1例相同的操作, 测定结合于磁珠上的标记物质[图2(c)], 定量样本中的 $A\beta_{x-42}$ 。

上述标记的 $A\beta_{1-42}$ 合成肽可以使用其自身, 也可以使用使载体物质与 $A\beta_{1-42}$ 结合的肽复合体。载体物质是指标记物质可以结合的化合物, 例如可以举出聚赖氨酸 (poly-L-Lysine)、葡聚糖、牛血清白蛋白、保有很多游离氨基的多肽等, 优选聚赖氨酸。通过使用载体物质, 可以增加每个 $A\beta_{1-42}$ 肽的标记物质的量, 灵敏度可以上升, 所以优选使用这些肽复合体。

已标记的肽复合体例如可以借助交联剂等使通过标记物质标记的载体物质与 $A\beta_{1-42}$ 合成肽结合。此时, 根据需要, 可以预先在 $A\beta_{1-42}$ 的 N 端部结合间隔部 (spacer) 例如由 15 个赖氨酸构成的赖氨酸肽等。另外, 也可以在制作肽复合体之后, 用标记物质进行标记, 可以自由地采用任意手法而没有限定。

本发明的基于免疫测定法的诊断试剂（试剂盒），以对 A β 1-42 的 C 末端部分具有特异性的抗体作为必须的构成成分，进而将 A β 1-42C 末端部保有合成肽作为构成成分。

可以根据采用的免疫测定法适当设计试剂的构成成分的形态。例如，在竞争性免疫测定法中，如上所述，优选以固相化 A β 1-42C 末端部保有合成肽的担体（优选磁珠）和标记抗体为构成成分，或者以固相化抗体的担体（优选磁珠）和已标记的 A β 1-42C 末端部保有合成肽为构成成分。如上述本发明方法的第 2 例的项目中所记载，已标记的 A β 1-42C 末端部保有合成肽优选以在 A β 1-42C 末端部保有肽上结合有载体物质的肽复合体为构成成分。

此外，可以将反应中使用的缓冲液、测定器具等附加在试剂中。

实施例

以下，基于实施例对本发明进行具体说明，但本发明在不超出其要旨的范围内，不被以下实施例所限定。

（实验例 1 及 2）电化学发光双抗体三明治测定法

实验例 1 及 2 是利用使用了 2 种 A β 的特异抗体的电化学发光双抗体三明治测定法的分析。作为一次抗体，使用将 A β 1-42 的 33-42 氨基酸部位免疫小鼠制作的、作为 A β 1-42 特异反应抗体的 21F12 小鼠单克隆抗体（Innogenetics 公司制），作为二次抗体，用钌配位化合物标记将 A β 1-42 的 1-5 氨基酸部位免疫小鼠制作的 3D6 小鼠单克隆抗体（Innogenetics 公司制）并使用。

以下对试剂的各构成成分的配制方法进行记述。

（1）21F12 抗体结合磁珠的配制方法

用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液（pH7.8），将 21F12 小鼠单克隆抗体稀释成 1mg/mL 抗体浓度，将 0.5mL 的该抗体与 0.5mL 的 30mg/mL 磁珠（DYNAL 公司制，DYNABEADS M-450 Epoxy）混合。25℃下搅拌混合液 16 小时，使抗体与磁珠结合。然后，通过从该磁珠溶液仅去掉溶液，除去溶液中残存的磁珠未结合的游离抗体。接着，向抗体结合磁珠中加入 1mL 的作为封闭剂的 4%Block Ace 试剂（大日本制药公司制），25℃下搅

拌 3 小时。然后,用上述 4%Block Ace 试剂 10mL 清洗 (2mL 的 4%Block Ace/ 清洗 5 次)磁珠。混合清洗后的 21F12 抗体结合磁珠与上述 4%Block Ace 试剂 0.5mL, 在 4℃下保存, 直到使用时。

(2) 钉配位化合物标记 3D6 抗体的配制方法

用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.8) 将 3D6 小鼠单克隆抗体 (Innogenetics 公司制) 稀释成 1mg/mL 抗体浓度。向 0.5mL 的 1mg/mL 抗体中加入 10mg/mL 的钉配位化合物 (IGEN 公司制, ORIGIN TAG-NHS ESTER) 17.6μL, 25℃下搅拌 30 分钟。然后, 添加 30μL 的 2mol/L 甘氨酸, 25℃下搅拌 30 分钟。

接着, 向填充于直径 1cm、高 30cm 的玻璃管的凝胶过滤柱层析 (Amarsham • Bioscience 公司制, sephadexG-25) 中填入 (apply) 钉配位化合物标记抗体液, 分离纯化未标记的钉配位化合物和钉配位化合物标记抗体。用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 进行洗脱。

(实验例 1) Aβ1-42 合成肽的测定

向 500μL 容积聚苯乙烯杯 (以下记述为反应杯) 中加入 150μL 的反应应用溶液[50mmol/L Tris HCl, 1%BSA, 0.15mol/L NaCl, 0.01% (W/V) Tween20, 10mmol/L EDTA2Na, 0.1%正常小鼠血清, pH7.5] (以下记述为三明治测定反应应用溶液), 准备 7 份, 在该各反应杯中, 分别混合用三明治测定反应应用溶液将 Aβ1-42 合成肽稀释成 0、0.5、1、5、10、25、50 或 100pg/mL 的样品各 50μL。向其中添加用三明治测定反应应用溶液稀释成 2mg/mL 浓度的 21F12 抗体结合磁珠各 25μL, 使其在 30℃下反应 9 分钟 (第一反应)。

然后, 用磁石俘获 (trap) 磁珠之后, 去掉反应杯中的液体, 用清洗液 [50mmol/L Tris HCL, 0.01%(W/V)tween20, 0.15mol/L NaCl, pH7.5]350μL 清洗磁珠 2 次, 除去抗原抗体反应以外的非特异结合物质 (BF 分离)。

接着, 加入 200μL 用三明治测定反应应用溶液稀释至 4μg/mL 浓度的钉配位化合物标记 3D6 抗体, 在 30℃下使其反应 9 分钟 (第二反应)。用磁石俘获反应后的磁珠, 然后去掉反应杯中的液体, 用 350μL 清洗液清洗 2 次磁珠, 除去抗原抗体反应以外的非特异结合物质 (BF 分离)。

然后，向反应杯中加入 300 μ L 的三丙基胺（トリプロピルアミン），与磁珠混合。在该状态下，通过给予电能，钕配位化合物发光，用检测机检测出其发光强度。此外，在向上述反应杯中的磁珠添加测定操作以后，在作为钕配位化合物发光自动测定机的ピコルミ 8220（三光纯药（株）制）上进行。结果见表 1 及图 3 所示。此外，图 3 将从钕配位化合物发光强度测定值减去 A β 1-42 合成肽浓度 0 时的测定值所得的值表示为 ECL 值。

[表 1]

实验例 1 的测定结果

样品浓度 (pg/mL) (A β 1-42 合成肽)	ECL 值	与空白的差值
0 (空白)	469.9	-
0.5	1083.9	614.0
1	1835.9	1366.0
5	10805.4	10335.5
10	22857.5	22387.6
25	75796.0	75326.1
50	160254.4	159784.5
100	345037.0	344567.1

ECL 值：钕配位化合物发光强度测定值

空白差值：ECL 值一样品浓度 0 时的 ECL

如表 1 及图 3 所示，电化学发光双抗体三明治测定法是可以测定 A β 1-42 合成肽到 0.5pg/mL 的测定系统。与目前通常已知的 A β 1-42 三明治测定试剂中灵敏度最高的部类的试剂相比，是可以得到 10 倍以上的灵敏度的测定系统。

（实验例 2）AD 患者及健康人血清的利用电化学发光双抗体三明治测定法的测定

向反应杯中加入 150 μ L 三明治测定反应用溶液，准备必要量，在该各反应杯中分别混合用三明治测定反应用溶液将 A β 1-42 合成肽稀释至 0、0.5、1、5、10、25、50 或 100pg/mL 得到的样品（校正曲线制作用标准品）、AD 患者血清样本 25 例、及健康人血清样本 25 例各 50 μ L。向其

中添加用三明治测定反应用溶液稀释成 2mg/mL 浓度的 21F12 抗体结合磁珠各 25 μ L，使其在 30℃下反应 9 分钟（第一反应）。

然后，用磁石俘获磁珠之后，去掉反应杯中的液体，用清洗液 [50mmol/L Tris HCL, 0.01%(W/V)tween20, 0.15mol/L NaCl, pH7.5] 350 μ L 清洗磁珠 2 次，除去抗原抗体反应以外的非特异结合物质（BF 分离）。

接着，加入 200 μ L 用三明治测定反应用溶液稀释至 4 μ g/mL 浓度的钆配位化合物标记 3D6 抗体，在 30℃下使其反应 9 分钟（第二反应）。

用磁石俘获反应后的磁珠，然后去掉反应杯中的液体，用 350 μ L 清洗液清洗磁珠 2 次，除去抗原抗体反应以外的非特异结合物质（BF 分离）。

然后，向反应杯中加入 300 μ L 的三丙基胺（トリプロピルアミン），与磁珠混合。在该状态下，通过给予电能，钆配位化合物发光，用检测机检测出其发光强度。此外，在向上述反应杯中的磁珠添加测定操作以后，在作为钆配位化合物发光自动测定机的ピコルミ 8220（三光纯药（株）制）上进行。利用标准品 A β 1-42 合成肽的测定结果制作校正曲线，使用该校正曲线，算出 AD 患者及健康人的 A β 1-42 浓度。结果见图 4 所示。

如图 4 所示，AD 患者中 25 例有 8 例、健康人中 25 例有 3 例为测定最低灵敏度的 0.5pg/mL 以上的值，其余样本均为测定灵敏度以下的结果。另外，利用可以测定的样本的 t 检验，判断 AD 与健康人的两种人群之间没有统计学差异（ $p>0.05$ ）。

（实验例 3）利用血清的 A β 1-42 的片段化实验

将 1mL 健康人血清分成 0.5mL 小份，在其中一份混合 10 μ L 蛋白酶（protease）溶液[在 1mL 缓冲液（10mmol/L Tris HCl, pH7.5）中溶解 1 片蛋白酶抑制剂混合物（protease inhibitor cocktail）（Roche 公司制，complete mini）的溶液]（实验例 3-1）。向另一份的血清中，混合 10 μ L 作为对照的缓冲液（10mmol/L Tris HCl, pH7.5）（实验例 3-2）。

向各血清中添加 5 μ L 的 1000ng/mL 的 A β 1-42 合成肽（（株）肽研究所制）。添加有各物质的血清在 20℃下静置，随着时间的推移用上述电化学发光双抗体三明治测定法，测定随时间经过的 A β 1-42 合成肽的测定值变化。

图 5 是表示在将向血清中添加 A β 1-42 合成肽之后立即测定的测定值设为 100% 时, 用相对比表示随时间经过的测定值的变化率的曲线图。如图 5 所示, 与作为对照的实验例 3-2 相比, 加入实验例 3-1 的蛋白酶抑制剂之后添加 A β 1-42 合成肽的血清的一方, 得到显著抑制随时间经过的测定值的降低的结果。由此表明, 即使在血清中, 生物体内的 A β 1-42 也会被血中蛋白酶迅速片段化。

图 6 是表示血中的 A β 1-42 的代谢概念图的概要说明图, (a) 表示 A β 1-42 的氨基酸序列(序列编号 1), (b) 表示血中的 A β 1-42 的代谢。A β 1-42 在脑内表达, 向脑髓液(CSF)中移行。然后, 漏出到血中的 A β 1-42 被血中的蛋白酶迅速片段化。

(实验例 4 及 5)

利用电化学发光双抗体三明治测定法(实验例 4)及固相化抗原(A β 1-42 合成肽)的竞争性免疫测定法(实验例 5), 测定 A β 1-42 合成肽的酶分解物。

(a) 各样品的配制方法

作为酶处理样品, 向用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)配制成 10 μ g/mL 的 A β 1-42 合成肽((株)肽研究所制)20 μ L 中, 添加用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)配制成 1mg/mL 的胰蛋白酶(trypsin)(SIGMA 公司制, 1: 250 胰蛋白酶)5 μ L, 配制样品。另外, 作为对照样品, 准备向同一浓度的 A β 1-42 合成肽((株)肽研究所制)中添加 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)5 μ L 的样品。进而, 作为空白样品, 使用未添加 A β 1-42 合成肽的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)。

(b) A β 1-42 合成肽的酶分解物的测定

将各样品保温 30 分钟之后, 用与实验例 1 同样的电化学发光双抗体三明治测定法(实验例 4)及下述所示的竞争性免疫测定法(实验例 5)进行测定。

实验例 5 的竞争性免疫测定法的步骤如下所示。

(1) 试剂的各构成成分的配制方法

(1-1) A β 1-42 合成肽结合磁珠的配制方法

混合 50ng/mL 的 A β 1-42 合成肽((株)肽研究所制)0.3ml 和 30mg/mL

的磁珠（DYNAL 公司制，DYNABEADS M-450 Epoxy）0.3ml。在 25℃ 下搅拌混合液 16 小时，使磁珠与合成肽结合。然后，通过从该磁珠溶液仅去掉溶液，除去溶液中残存的珠未结合的游离合成肽。接着，作为封闭剂，向肽结合磁珠中加入 1mL 的磷脂聚合物试剂（日本油脂公司制，S101E），25℃ 下搅拌 3 小时。然后，用上述的 10mL 磷脂聚合物试剂清洗（2mL 磷脂聚合物/清洗 5 次）磁珠。清洗后的 A β 1-42 合成肽结合磁珠与上述磷脂聚合物试剂 0.3mL 混合，在 4℃ 下保存直至使用。

（1-2）钆配位化合物标记 21F12 抗体的配制方法

用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液（pH7.8）将 A β 1-42 的 C 末端部的特异抗体 21F12 小鼠单克隆抗体（Innogenetics 公司制）稀释至 1mg/mL 抗体浓度。向 1mg/mL 抗体 0.5mL 中加入 10mg/mL 的钆配位化合物（IGEN 公司制，ORIGEN TAG-NHS ESTER）17.6 μ L，25℃ 下搅拌 30 分钟。然后，添加 30 μ L 的 2mol/L 甘氨酸，在 25℃ 下搅拌 30 分钟。

接着，向填充于直径 1cm、高 30cm 的玻璃管的凝胶过滤柱层析（Amersham • Bioscience 公司制，sephadexG-25）中填入（apply）钆配位化合物标记抗体液，分离纯化未标记的钆配位化合物和钆配位化合物标记抗体。用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液（pH6.0）进行洗脱。

（2）样品中的 A β x-42 的测定方法

向反应杯中加入 50 μ L 的反应用溶液[50mmol/L Tris HCl, 10%BSA, 0.15mol/L NaCl, 0.01%（W/V）Tween20, 10mmol/L EDTA2Na, 0.1% 正常小鼠血清, pH7.5]，准备必要量，在其中混合 A β 1-42 合成肽的酶处理样品及对照样品各 50 μ L。向其中添加用反应用溶液稀释成 1.5mg/mL 浓度的 A β 1-42 合成肽结合磁珠 25 μ L，进而添加用反应用溶液稀释成 0.1 μ g/mL 浓度的钆配位化合物标记 21F12 小鼠单克隆抗体（以下记述为标记抗体）200 μ L。在 30℃ 下搅拌 26 分钟，使样品中的 A β 1-42 及 A β 1-42 片段与磁珠结合 A β 1-42 合成肽竞争性地与钆配位化合物标记 21F12 小鼠单克隆抗体反应。

然后，用磁石俘获（trap）磁珠之后，去掉反应杯中的液体，用清洗液[50mmol/L Tris HCL, 0.01%(W/V)tween20, 0.15mol/L NaCl, pH7.5]350 μ L 清洗磁珠 2 次，除去抗原抗体反应以外的非特异结合物质（BF 分离）。然

后，向反应杯中加入 300 μ L 的三丙基胺（トリプロピルアミン），与珠混合。在该状态下，通过给予电能，钌配位化合物发光，用检测机检测出其发光强度。此外，在向上述反应杯中的磁珠添加测定操作以后，在作为钌配位化合物发光自动测定机的ピコルミ 8220（三光纯药（株）制）上进行。

（c）结果

将实验例 4 的利用电化学发光双抗体三明治测定法的测定结果显示于表 2，将实验例 5 的利用竞争性免疫测定法的测定结果显示于表 3。表中，“ECL 值”是钌配位化合物发光强度测定值，“％”是对照样品的测定值为 100％时的测定值的相对比。另外，在表 3 中，以在样品中没有竞争物质时的值（空白值）为 100％时由竞争反应引起的测定值降低的相对比表示为抑制率。

[表 2]

实验例 4（电化学发光双抗体三明治测定法）的测定结果

样品	ECL 值	％
空白	692.5	—
对照	12794.8	100％
酶处理	1092.3	9％

[表 3]

实验例 5（竞争性免疫测定法）的测定结果

样品	ECL 值	抑制率	％
空白	34375.8	0％	—
对照	20842.7	39％	100％
酶处理	19560.6	43％	94％

如表 2 所示，利用双抗体三明治测定法，用胰蛋白酶处理过的 A β 1—42 合成肽相对于未进行胰蛋白酶处理的对照样品，只能检测出 1/10 量的 A β 1—42。但是，如表 3 所示，用竞争性免疫测定法测定同一样品的结果证明，可见与未进行胰蛋白酶处理的对照样品大致相同的竞争反应，即使为片段化的 A β 1—42，也可以与全长 A β 1—42 同样进行测定。即，确认了竞争性免疫测定法也可以正确反映样品中的片段化的 A β 1—42 的量。

（实验例 6 及 7）抗体 21F12 的特性试验

用竞争性免疫测定法测定用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液（pH7.8）分别配制成 0（空白）、10、100、1000 或 10000ng/mL 的 A β 1-42 合成肽（（株）肽研究所制）（实验例 6）及 A β 1-40 合成肽（（株）肽研究所制）（实验例 7）。竞争性免疫测定法按照实验例 5 记载的步骤进行。将结果显示于图 7。此外，图 7 的曲线图中的抑制率是利用相对比表示样品中没有竞争物质时的值（空白值）设为 100%时由竞争反应引起的测定值降低。

结果如图 7 所示，实验例 6 的 A β 1-42 合成肽伴随浓度的增加而竞争反应增加，与此相对，即使实验例 7 的 A β 1-40 合成肽的浓度增加，也不会产生竞争反应。因而，明确了在本发明的竞争性免疫测定法中使用的抗体 21F12 是对 A β 1-42 特异反应的抗体，是对 A β 1-40 几乎不反应的抗体。

（实施例 1）AD 患者及健康人血清的用竞争性免疫测定法的测定

向反应杯中加入 50 μ L 的反应用溶液，准备必要量。向其中分别混合作为样本的 AD 患者血清 25 例、健康人血清 15 例及反应用溶液（空白）各 50 μ L。向其中添加用反应用溶液稀释成 1.5mg/mL 浓度的 A β 142 合成肽结合磁珠 25 μ L，按照实验例 5 中记载的步骤，利用竞争性免疫测定法进行测定。结果显示于图 8。

测定的结果，就得到的每个样本的发光强度而言，只要样本中的 A β x-42 多，竞争反应就会引起钆配位化合物标记抗体向磁珠结合肽的结合量降低，所以与使用反应用溶液作为没有竞争物质的样本的情况下的发光强度相比，发光强度降低。

得到的发光强度按照以下的计算式换算成抑制率。

抑制率（%）= [1 - 各样本的发光强度 ÷ 以反应用溶液为样本时的发光强度（没有竞争反应时的发光强度）] × 100

其结果如图 8 所示，在 t 检验中，判断为在 AD 患者与健康人的两种人群之间以 95% 以上的概率存在统计学差异（p < 0.0002）。

（实施例 2）使用多克隆抗体的竞争性免疫测定

使用用钆配位化合物标记对 A β 1-42 的 C 末端部分特异反应的多克隆抗体 AB5078P（Chemicon 公司制）的钆配位化合物标记 AB5078P 抗体，

来代替钉配位化合物标记 21F12 抗体,除此以外,利用与实施例 1 相同的手法的竞争性免疫测定法,测定 AD 患者 20 例及健康人 18 例的血清样本。结果显示于图 9。

结果,与实施例 1 相同,在 t 检验中,判断为在 AD 患者与健康人的两种人群之间以 95% 以上的概率存在统计学差异 ($p < 0.0002$)。从该结果判断,只要是 A β 1-42 的 C 末端部的特异抗体,单克隆抗体及多克隆抗体均可以使用。

(实施例 3) 固相化抗体的竞争性免疫测定法

(a) 试剂的各构成成分的配制方法

(1) 钉配位化合物标记的 A β 1-42C 末端部保有肽的配制方法

(1-1) 硫醇化 SPDP 结合钉配位化合物标记聚赖氨酸的配制

将 2.5ml 的聚赖氨酸 (poly-L-Lysine, 平均分子量: 38000, Sigma 公司制) 溶解于 2mL 磷酸缓冲液 (pH7.8) 中,向其中加入 450 μ L 的 10mg/mL 钉配位化合物 (IGEN 公司制, ORIGIN TAG-NHS ESTER), 在 25 $^{\circ}$ C 下混合 60 分钟。向混合物中加入 200 μ L 的 2mol/L 甘氨酸, 在 25 $^{\circ}$ C 下混合 30 分钟。向填充于直径 2cm、高 40cm 的玻璃管的凝胶过滤柱层析 (Amarsham • Bioscience 公司制, sephadexG-25) 中填入 (apply) 混合物, 分离纯化未标记的钉配位化合物和钉配位化合物标记聚赖氨酸。用 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 进行洗脱。

向该钉配位化合物标记聚赖氨酸 2mg/mL 中混合 20mmol/L 的蛋白质交联剂 (Pierce 公司制, SPDP) 8.3 μ L, 边吹入氮气, 边在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时。搅拌后, 向填充于直径 2cm、高 40cm 的玻璃管的凝胶过滤柱层析 (Amarsham • Bioscience 公司制, sephadexG-25) 中填入 (apply), 分离纯化未结合 SPDP 和 SPDP 结合钉配位化合物标记聚赖氨酸。用含有 1mmol/L 的乙二胺四乙酸 2 钠的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 进行洗脱。

向该 SPDP 结合钉配位化合物标记聚赖氨酸中加入含有 1mol/L 的二硫苏糖醇和 1mmol/L 的乙二胺四乙酸 2 钠的 10mmol/L 的磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 55 μ L, 边吹入氮气, 边在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 30 分钟, 这样, 使 SPDP 的 2-吡啶基-二硫基进行硫醇化。搅拌后, 向填充于直径 1cm、高 30cm

的玻璃管的凝胶过滤柱层析(BioLad 公司制, Bio-Gel P-4)中填入(apply), 分离纯化二硫苏糖醇及作为硫醇化的副产物的吡啶-2-硫酮(チオン)和硫醇化 SPDP 结合钌配位化合物标记聚赖氨酸。用含有 1mmol/L 的乙二胺四乙酸 2 钠的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.5)进行洗脱。

(1-2) SPDP 结合 15L- β 33-42 肽的配制

将在 N 末端侧结合 15 个赖氨酸的形式的 A β 33-42 合成肽(氨基酸序列: KKKKKKKKKKKKKKKGLMVGGVIA(序列编号 2), 以下标记为 15L- β 33-42) 0.5mg 溶解于 50 μ L 的 DMSO 中, 进而, 稀释于 0.45mL 的含有 1mmol/L 的乙二胺四乙酸 2 钠的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.5) 作为 15L- β 33-42 肽液。

向该 15L- β 33-42 肽液中混合 20mmol/L 的蛋白质交联剂(Pierce 公司制, SPDP) 50 μ L, 边吹入氮气, 边在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时。搅拌后, 向填充于直径 1cm、高 30cm 的玻璃管的凝胶过滤柱层析(BioLad 公司制, Bio-Gel P-4)中填入(apply), 分离纯化未结合 SPDP 和 SPDP 结合 15L- β 33-42 肽。用含有 1mmol/L 的乙二胺四乙酸 2 钠的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.5)进行洗脱。

(1-3) SPDP 结合 15L- β 33-42 肽与硫醇化 SPDP 结合钌配位化合物标记聚赖氨酸的结合

向 0.2mg 的 SPDP 结合 15L- β 33-42 肽中加入 0.3mg 的硫醇化 SPDP 结合钌配位化合物标记聚赖氨酸, 通过在 4 $^{\circ}$ C 下静置 16 小时, 借助 15L- β 33-42 肽结合 SPDP 的 2-吡啶基-二硫基与硫醇化 SPDP 结合钌配位化合物标记聚赖氨酸的硫醇基, 使 15L- β 33-42 肽与钌配位化合物标记聚赖氨酸结合。向填充于直径 1cm、高 30cm 的玻璃管的凝胶过滤柱层析(Amarsham • Bioscience 公司制, sephadexG-25)中填入(apply)混合物, 分离纯化游离的 SPDP 结合 15L- β 33-42 肽及游离的硫醇化 SPDP 结合钌配位化合物标记聚赖氨酸与 15L- β 33-42 肽+钌配位化合物标记聚赖氨酸结合体(以下称为标记肽复合体。)。用含有 1mmol/L 的乙二胺四乙酸 2 钠的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.5)进行洗脱。

此外, 使用的肽除了上述 15L- β 33-42 肽以外, A β 1-42 合成肽或保有 A β 1-42C 端部的其他片段肽也可以用同样的方法制作肽与钌配位化

合物标记聚赖氨酸的结合体。

(2)使其结合 A β 1-42 的 C 末端部分的特异抗体的磁珠的配制方法利用与实验例 1 同样的步骤, 配制 21F12 抗体结合磁珠。

此外, 除了 21F12 抗体以外, 只要是 A β 1-42 的 C 末端部分的特异抗体, 都可以同样地使用。

(b) AD 患者及健康人血清的测定

向 500 μ L 容积聚苯乙烯杯(以下记述为反应杯)中加入 50 μ L 的反应用溶液[10mmol/L 磷酸钠, 1%Block Ace, 0.15mol/L NaCl, 0.01% (W/V) Tween20, 10mmol/L EDTA2Na, 0.25%海藻糖, 0.1%正常小鼠血清, pH7.2], 准备必要量。在该各反应杯中, 作为校正曲线制作用标准品, 混合 0、31.25、62.5、125、250、500、1000ng/mL 浓度的 A β 1-42 合成肽各 20 μ L, 或者作为测定样本, 混合 AD 患者 15 例及健康人 15 例的血清各 20 μ L。向其中添加用反应用溶液稀释成 0.3mg/mL 浓度的 21F12 抗体结合磁珠各 25 μ L, 进而加入用反应用溶液稀释成 1 μ g/mL 浓度的标记肽复合体 200 μ L, 使其在 30 $^{\circ}$ C 下反应 26 分钟。

然后, 用磁石俘获(trap)磁珠之后, 去掉反应杯中的液体, 用清洗液[50mmol/L Tris HCl, 0.1%(W/V)tween20, 0.15mol/L NaCl, pH7.5]350 μ L 清洗磁珠 2 次, 除去非特异结合物质。

然后, 向反应杯中加入 300 μ L 的三丙基胺(トリプロピルアミン), 与磁珠混合。在该状态下, 通过给予电能, 钆配位化合物发光, 用检测机检测出其发光强度。此外, 在向上述反应杯中的磁珠添加测定操作以后, 在作为钆配位化合物发光自动测定机的ピコルミ 8220(三光纯药公司制)上进行。

表 4 表示标准品 A β 1-42 合成肽的竞争反应引起的抑制率, 图 10 表示校正曲线($y = -3107.3\ln(x) + 26227$ $R^2 = 0.9909$)。另外, AD 患者及健康人的血清的测定结果显示于表 5、表 6 及图 11。此外, 定量值是套用图 10 的校正曲线中各样本的 ECL 值而算出。结果, 就血清中的 A β 1-42C 末端部总量而言, AD 患者与健康人相比其降低具有统计学差异, 确认了本发明的手法可以用于 AD 的诊断。

[表 4]

实施例 3 的标准品的测定结果

A β 1-42 合成肽 (ng/mL)	ECL值	抑制率 (%)
1000	4912.7	71
500	6523.8	62
250	9385.7	45
125	11437.7	33
50	13427.0	21
25	16583.3	3
0 (空白)	17024.9	0

*表中的抑制率是在没有抑制（投入 A β 1-42 肽浓度 0，空白）的钆配位化合物发光强度测定值（ECL 值）为 100% 时，用 % 表示投入各浓度 A β 1-42 时的 ECL 值的降低率。

[表 5]

实施例 3 的 AD 患者血清的测定结果

样品编号	ECL值	定量值 (ng/mL)	定量值平均 (ng/mL)
1	8177.0	333.1	107
2	10132.0	177.6	
3	8510.2	299.2	
4	16509.6	22.8	
5	14690.0	41.0	
6	15315.1	33.5	
7	16859.0	20.4	
8	11183.0	126.6	
9	13187.3	66.4	
10	13964.6	51.7	
11	12901.8	72.8	
12	14652.2	41.5	
13	10213.5	173.0	
14	13876.8	53.2	
15	12331.5	87.5	

[表 6]

实施例 3 的健康人血清的测定结果

样品编号	ECL值	定量值 (ng/mL)	定量值平均 (ng/mL)
1	6373.8	595.1	570
2	9165.9	242.3	
3	7037.7	480.6	
4	6793.5	519.9	
5	6031.1	664.5	
6	7804.0	375.6	
7	5717.6	735.0	
8	6681.6	539.0	
9	5920.4	688.6	
10	6433.4	583.8	
11	6152.4	639.1	
12	5036.9	915.0	
13	7445.8	421.5	
14	6910.4	500.7	
15	6138.2	642.0	

此外,本手法中的校正曲线使用 A β 33-42 合成肽作为标记抗原,但确认了将 A β 1-42 合成肽作为标记抗原使用的情况下的校正曲线也显示出与图 10 同样的结果。另外,使用的抗体由于与实施例 1 相同,为 21F12,所以 A β 1-42 合成肽及 A β 33-42 合成肽之间显示出竞争反应,但确认了不与 A β 1-40 合成肽反应。

(实验例 8) A β 1-42 的血清中片段化确认实验

使用 SDS-PAGE 电泳法,对向血清中添加的 A β 1-42 合成肽的添加后分子变化进行探讨。

1. 样品的配制

在实验例 8-1 中,准备 50 μ L 健康人血清样本,向其中混合 50 μ g/mL 浓度的 A β 1-42 合成肽(肽研究所公司制)500 μ L,充分搅拌之后,在 25 $^{\circ}$ C 下保温 90 小时,用下述方法纯化、脱盐浓缩得到的样品,配制纯化脱盐样品(30 μ L)。

在实验例 8-2 中,向 50 μ L 健康人血清样本中混合 50 μ g/mL 浓度的 A β 1-42 合成肽(肽研究所公司制)500 μ L,充分搅拌之后,立即用下述方法纯化、脱盐浓缩得到的样品,配制纯化脱盐样品(30 μ L)。

在实验例 8-3 中, 为了确认在血清中的生物体内 A β 成为何种程度的分子量, 准备 1mL 健康人 pool 血清, 用下述方法纯化、脱盐浓缩该血清, 配制纯化脱盐样品 (30 μ L)。

样品的纯化·脱盐浓缩方法如下所述。利用使识别 A β 1-42 的 C 末端的 21F12 抗体 (Innogenetics 公司制) 结合于琼脂糖凝胶 (Sephacrose Gel) (CNBr-activated sepharose4B: Pharmacia·Bioscience 公司制) 的亲合凝胶纯化样品。纯化是将 0.2mL 的 21F12 抗体亲合凝胶填充于 Ultrafree-MC (Millipore 公司制) 而使用, 填上添加了 A β 1-42 合成肽的样品。然后, 使 10mM 磷酸钠/0.15M NaCl (pH7.8) 流进柱中, 进行清洗直至从柱流出的排出液的 A280nm 的吸光度成为 0.000。然后, 使 0.1M 柠檬酸 (pH5.0) 流入柱, 进行清洗直至从柱流出的排出液的 A280nm 的吸光度成为 0.000。用 0.6mL 的 4M 胍进行结合于 21F12 柱的 A β 的洗脱, 洗脱液利用 Zip-Tip C18 (Millipore 公司制) 进行脱盐和浓缩, 得到 30 μ L 的纯化样品。

2. 利用竞争性免疫测定法的测定

脱盐浓缩后的样品用实施例 3 记载的竞争性免疫测定法来测定。测定是用反应用溶液 10 倍稀释纯化样品 2 μ L, 将该稀释液 20 μ L 作为样本进行测定。各纯化脱盐样品的测定结果显示于表 8。另外, 标准品 A β 1-42 合成肽的测定结果显示于表 7, 校正曲线 ($y = -3545.7 \ln(x) + 30507$ $R^2 = 0.9856$) 显示于图 12。

测定的结果, 在实验例 8-1 中, 可以得到 452ng/mL 的定量值。由于预先稀释 10 倍, 所以纯化样品中 A β x-42 浓度为 4520ng/mL, 纯化样品为 30 μ L, 所以样品中含有的 A β x-42 的量算出为 136ng。

[表 7]

实验例 8 的标准品的测定结果

A β 1-42 合成肽 (ng/mL)	ECL值
1000	6270.0
500	8411.9
250	10226.7
125	13950.9
62.5	15788.9
0 (空白)	18133.2

[表 8]

	ECL值	定量值 (ng/mL)	浓度变换 (10 倍)	产量 (ng)
实验例8-1	8829.1	452	4521	136
实验例8-2	7589.1	641	6414	192
实验例8-3	11305.6	225	2248	67

实验例 8-1: 向血清添加 A β 1-42 合成肽, 经过 90 小时之后纯化的样品

实验例 8-2: 向血清添加 A β 1-42 合成肽之后, 立即纯化的样品

实验例 8-3: 纯化 1mL 血清的样品

3. 电泳法

接着, 对纯化脱盐样品进行电泳, 确认出现带。电泳用凝胶使用 4-12% 梯度 (gradient) 的 Nu-PAGE Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen 公司制), 分子量标记物使用 Mark12 (Invitrogen 公司制)。脱盐纯化样品根据用竞争性免疫测定法得到的定量值, 任何样品与作为样品稀释缓冲液的 LDS 上样缓冲液 (sample buffer) (Invitrogen 公司制) 混合后上胶, 并使任意样品上胶的量为 50ng。同时, 对于 A β 1-42 合成肽 (肽研究所公司制) 及 A β 34-42 合成肽 (SIGMA 公司制) 而言, 用任意量与 LDS 上样缓冲液混合后上胶, 分子量标记物上胶 5 μ L。在 15mA 下进行泳动, 继续泳动, 直至 LDS 上样缓冲液中含有的蓝色色素到达凝胶下端为止。泳动后的凝胶使用银染色 II 试剂盒ワコー (和光纯药公司制) 进行通过银染色法的蛋白质带染色。染色的电泳的凝胶照片见图 13 所示。

电泳的结果, 根据分子量标记物的结果, A β 1-42 合成肽可以在分子

量 4.5KDa 附近得到带。另一方面,关于作为分子量 0.8581KDa 的 A β 34-42 合成肽,未见带。根据分子量标记物的泳动结果,可以检测出直至分子量 3.5KDa,但由于更小分子量的 A β 34-42 在凝胶下端流失,所以在凝胶上不能作为带检测出。

对于向血清中添加 A β 1-42 之后,立即用 21F12 抗体亲和柱纯化的样品(实验例 8-2),检测出了与 A β 1-42 合成肽相同移动位置的带。而且,在 4.5KDa 附近以外的分子量区域根本未检测出带,所以可以确认利用使用 21F12 抗体亲和柱的本纯化法,可以从血清中纯化添加的 A β 1-42 直至单一。

另一方面,关于在添加并保温 90 小时之后用 21F12 抗体亲和柱纯化的样品(实验例 8-1)及纯化 1mL 血清得到的样品(实验例 8-3),在 4.5KDa 附近未出现带,在其以外的分子量区域也不能检测出带。可能是因为,所有的样品根据在竞争性测定方法中测定的测定值,向凝胶上 50ng,所以在向血清中添加 A β 1-42 合成肽之后,血清中的合成肽随着时间的经过而片段化、低分子化,可能出于与 A β 34-42 合成肽未出现带一样的原因,不能作为凝胶上的带检测出。

(实验例 9)

作为确认不能用 SDS-PAGE 检测出的 3.5KDa 以下的分子量区域的 A β x-42 片段的有无的方法,对使用低分子肽分离凝胶过滤柱的方法进行了探讨。

将作为凝胶过滤柱的 BiogelP-4gel (BioLad 公司制)填充于 ϕ 1.0、高 120cm 的玻璃柱管(BioLad 公司制)凝胶容积 84mL。将 8M Urea/50mM Tris (pH7.5) 作为移动相,用 HPLC 泵 CCPM (东洋 soda 公司制),以流速 0.1mL/分送液。从柱的洗脱液,用 SPD-6AV 分光器(岛津制作所公司制),测定 A225nm 的吸收,测定数据用 C-R3AChromatopack (岛津制作所公司制)制作图表。此外,设定成 SPD-6AV 分光器为透镜 0.005、响应(Response)为 STD 模式。C-R3AChromatopack 将峰值检测灵敏度(SLOPE)设定成 193.68,将最小峰面积设定值设定成 10,图表记录速度(chart speed)设定成 1mm/分。

依次向该凝胶过滤柱装置填上溶解于二甲亚砜(以后写成 DMSO)。

Sigma 公司制)的胃蛋白酶(pepsin) A (分子量 35KDa, Sigma 公司制)、A β 1-42 (分子量 4.514KDa, 肽研究所公司制)、A β 1-28 (分子量 3.2625KDa, BACHEM 公司制)、A β 12-28 (分子量 1.9552KDa, Sigma 公司制)、A β 1-11 (分子量 1.3253KDa, BACHEM 公司制)、A β 34-42 (分子量 0.8581KDa, Sigma 公司制)、Suc-D-Asp-MCA (分子量 0.3903KDa, 肽研究所公司制)、E-64-c (分子量 0.31438KDa, 肽研究所公司制)及 DMSO 单品(分子量 0.0781KDa, Sigma 公司制),从洗脱液的 A225nm 的吸收,在 Chromatopack 上制作图表。该图表见图 14 所示。另外,图表的峰出现时间与由已知分子量制作的曲线图如图 15 所示。

利用如图 15 所示的曲线图的直线性,关于胃蛋白酶 A(分子量 35KDa)及 A β 1-42 (分子量 4.514KDa),用柱的排除临界值(Void Volume)进行洗脱,将本过滤柱装置的分区分子量设为 3.2625KDa (A β 1-28)~0.0781KDa (DMSO),在该分子量范围内制作校正曲线。制作的校正曲线曲线图($y = -3545.7 \ln(x) + 30507$, $R^2 = 0.9856$)见图 16。

另外,为了探讨装置的再现性,重新将 A β 1-28、A β 1-11、Suc-D-Asp-MCA 上到柱上,确认第一次与第二次的洗脱时间的差,可以得到良好的再现性。图表见图 17。另外,重复性数据见表 9。

[表 9]

实验例 9 的结果

样品	洗脱时间(分钟)		相对比 (%)
	第一次	第二次	
A β 1-28	287.622	286.467	99.60
A β 1-11	342.513	343.367	100.25
Suc-D-Asp-MCA	494.522	492.400	99.57

在表 9 中,相对比用%表述第一次的测定值为 100 时的第二次测定值。

(实验例 10)

为了确认在血清中的生物体内 A β 成为何种程度的分子量,准备 1mL 健康人 pool 血清,利用使识别 A β 1-42 的 C 末端的 21F12 抗体结合于琼脂糖凝胶(CNBr-activated sepharose4B)而成的亲合凝胶进行纯化。纯化是将 0.2mL 的抗体亲合凝胶填充于 Ultrafree-MC (Millipore 公司制)

而使用，填上样品，然后，在 -20°C 下保存直通（pass through）组分。然后，使 10mM 磷酸钠/0.15M NaCl（pH7.8）流进柱中，进行清洗直至从柱流出的排出液的 A280nm 的吸光度成为 0.000。然后，使 0.1M 柠檬酸（pH5.0）流入柱，进行清洗直至从柱流出的排出液的 A280nm 的吸光度成为 0.000。用 0.4mL 的 8M 尿素/50mM Tris（pH7.5）进行 21F12 柱结合组分的洗脱。

纯化样品在加入 5 μL DMSO 之后，加到凝胶过滤柱装置中，从洗脱液的 A225nm 的吸收，在 Chromatopack 上制作图表。得到的图表见图 18。

向样品中添加的 DMSO 峰出现时间为 678.8 分钟，与作为制作校正曲线时的 DMSO 的峰出现时间的 676.567 分钟相比，确认了可以得到良好的再现性。得到的样品的主峰（main peak）为 512.167 分钟。另外，在主峰的前侧存在与主峰分离不充分的肩峰（shoulder peak），其出现时间如果从图表记录速度与直到肩峰的距离来换算，约为 470 分钟。另外，尽管除此以外目视不能确认，但也检测出多个用 Chromatopack 的峰自动检测机构检测出的极微小的检测峰。将主峰及肩峰的出现时间代入到预先制作的图 19 的校正曲线的式子，算出洗脱物质的分子量，结果主峰为分子量 0.357KDa，肩峰为分子量 0.526KDa。

另外，利用实施例 3 记载的竞争性免疫测定法测定回收的亲合柱的直通组分及未纯化处理的健康人 pool 血清（与纯化的为同一品）。测定的结果，亲合纯化处理前的血清的测定值为 875ng/mL，而将该血清通过 21F12 柱之后的直通组分的测定值为 293ng/mL，通过过柱，降低约 3 成左右。由此，认为残留的约 7 成（582ng）与 21F12 亲合柱结合，凝胶过滤柱装置的图表中出现的低分子峰可能反映了上述约 7 成（582ng），即利用竞争性免疫测定法的值的降低部分。

根据这些结果，通过主峰预测的 A β x-42 片段在其 C 末端肽为 Val-Ile-Ala（分子量 0.33742KDa）、通过肩峰预测的 A β x-42 片段在其 C 末端肽为 Gly-Val-Val-Ile-Ala（0.52964KDa）。

另外，在 Chromatopack 的自动峰检测中，从检测出多个微小峰可知，在用 21F12 抗体亲合柱从血清纯化的样品中，除了主峰、肩峰以外，可能存在多个 A β x-42 片段。

以上，从利用实验例 8 的 SDS-PAGE 的探讨、利用实验例 9 及 10 的凝胶过滤柱装置的探讨及实验例 3 中记载的使用蛋白酶抑制剂的代谢确认实验的结果，可以得出强烈支持 A β 1-42 在血液中被酶分解、片段化的结果。这初次证明了在血清·血浆等血液样本中测定 A β x-42 的有效性，不仅是本发明所公开的竞争性测定法，而且用血清·血浆等血液样本测定 A β 片段的所有方法，本发明均具有有效性。

产业上的可利用性

利用使用对 A β 1-42 的 C 末端部分具有特异性的抗体的免疫测定法，可以通过测定生物体样品中的 A β 1-42 及保有 A β 1-42C 末端部的肽片段的总量 (A β x-42)，用于阿尔茨海默氏病的诊断。

序列表

<110> 三光纯药株式会社

<120> 阿尔茨海默氏病的检验方法及诊断试剂

<130> 76926-PCT-CN

<140> PCT/JP2005/19787

<141> 2005-10-27

<150> JP 2004-314639

<151> 2004-10-28

<150> JP 2005-052003

<151> 2005-02-25

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列描述;合成

<400> 2

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly

1 5 10 15

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

20 25

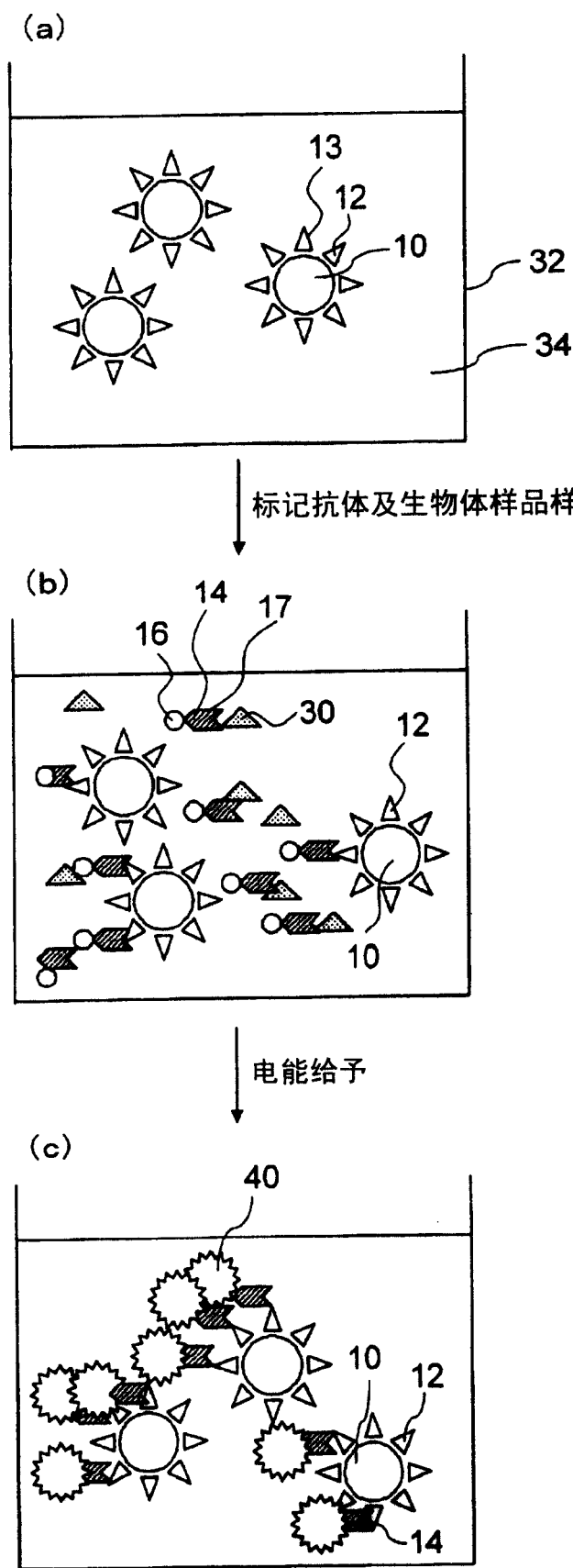
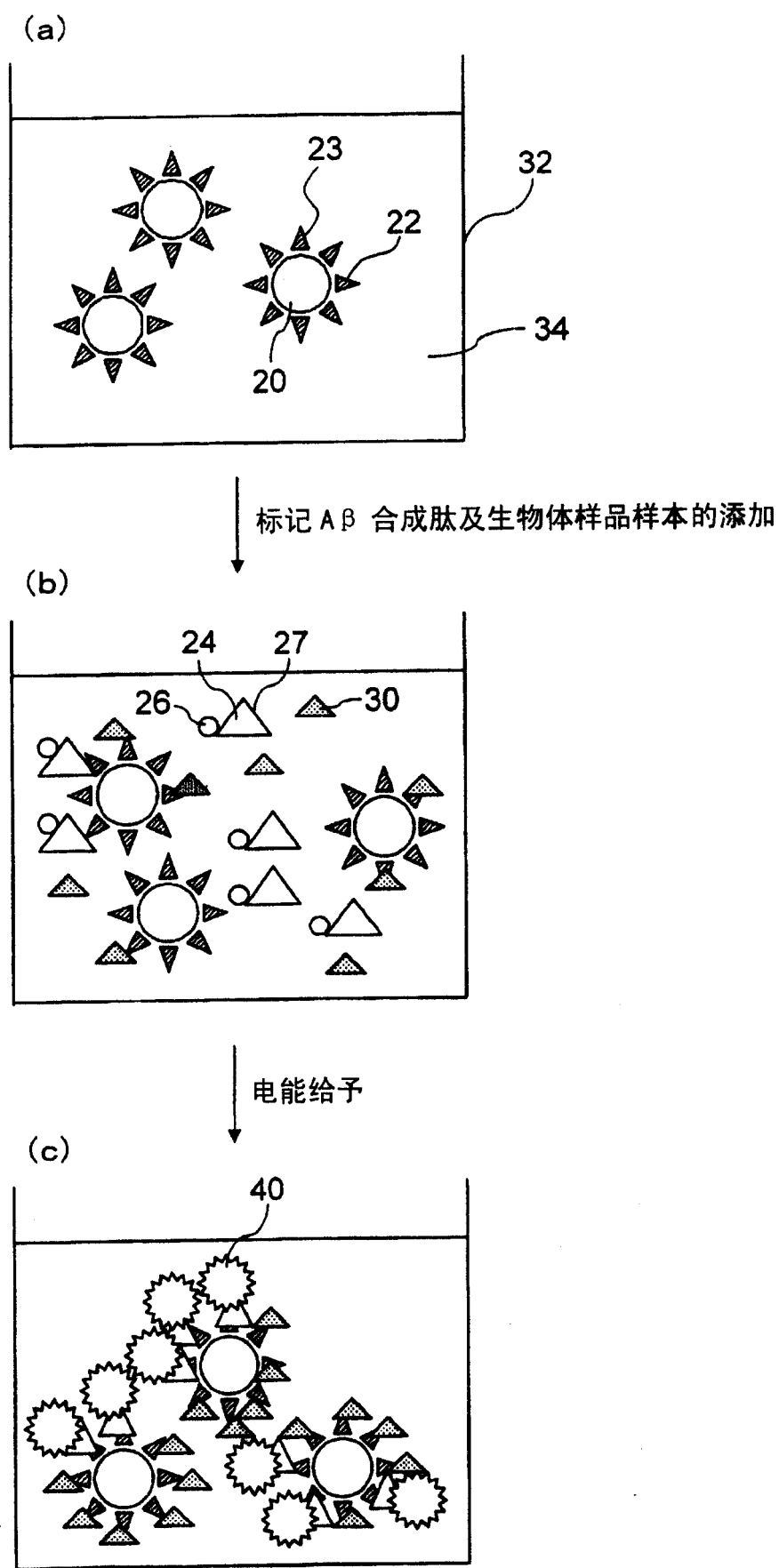


图 1



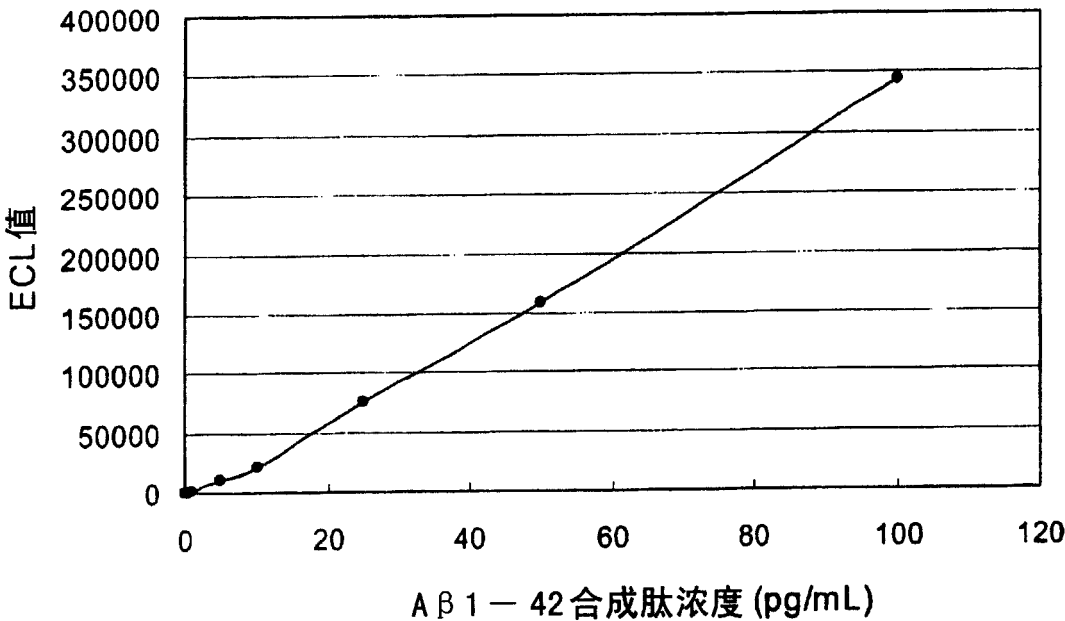


图 3

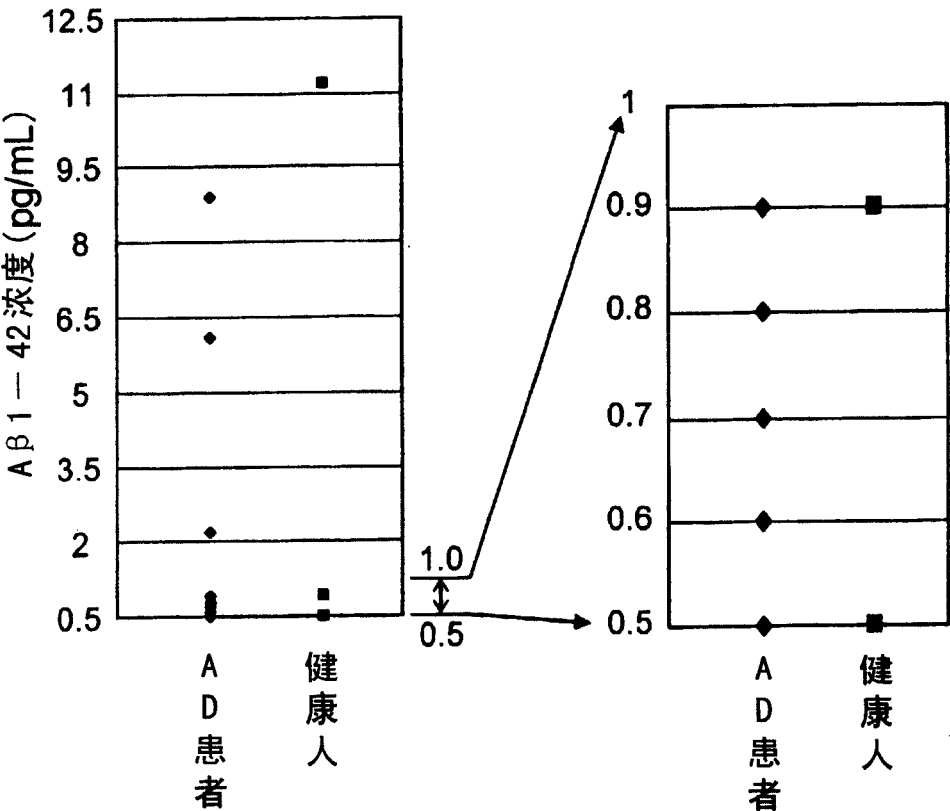


图 4

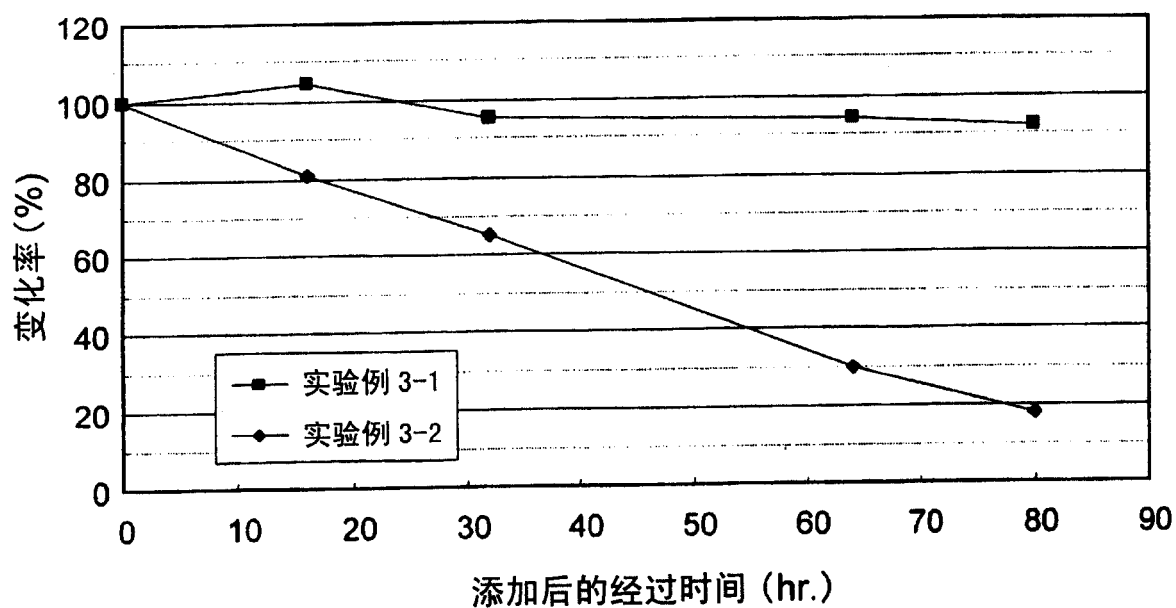
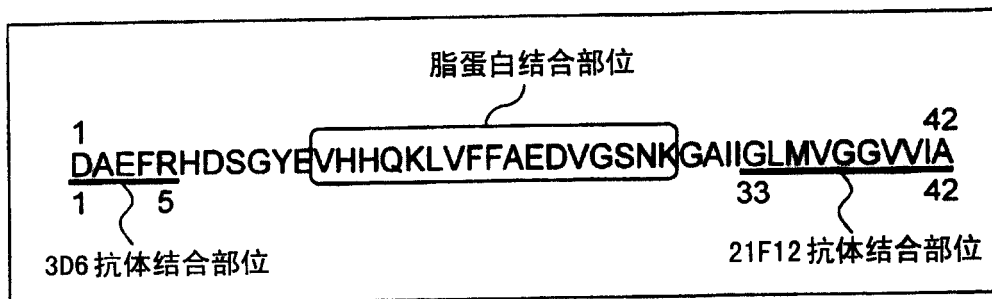


图 5

(a) A β 1-42 的氨基酸序列 (序列编号 1)

从脑脊髓液向血中

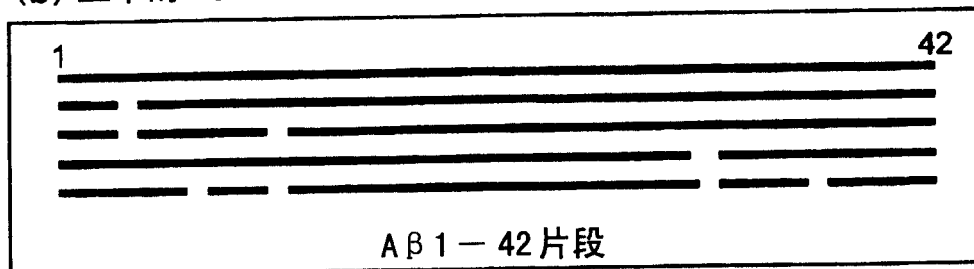
(b) 血中的 A β 1-42 的代谢

图 6

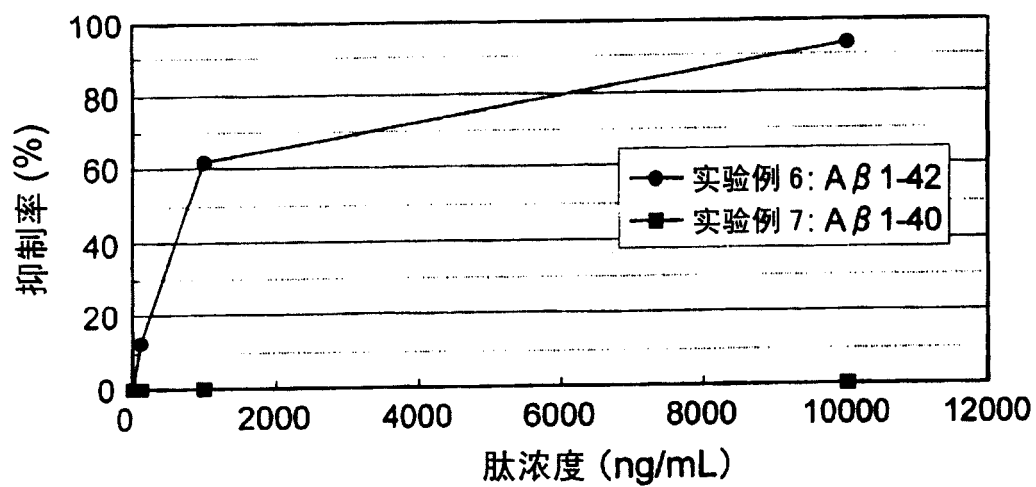


图 7

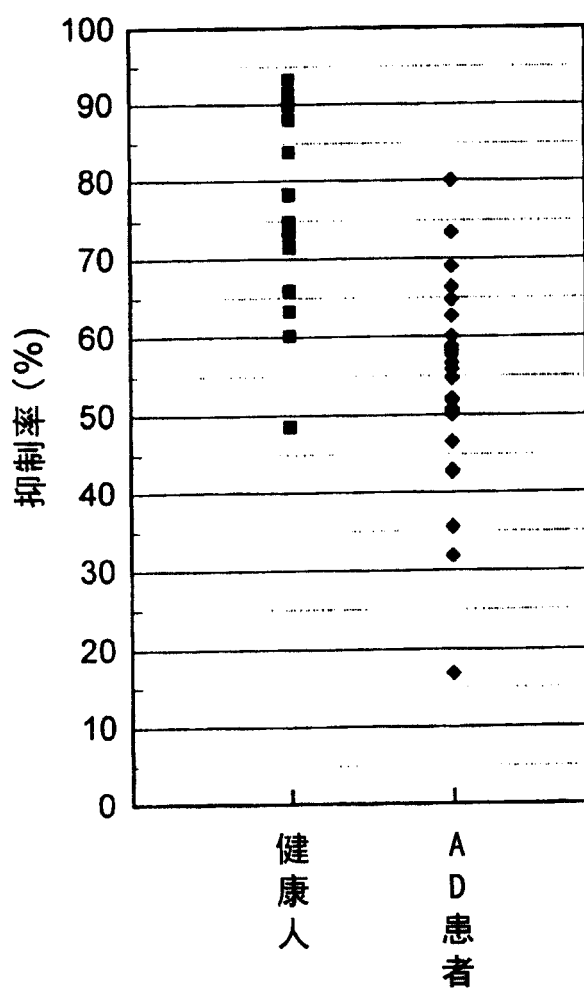


图 8

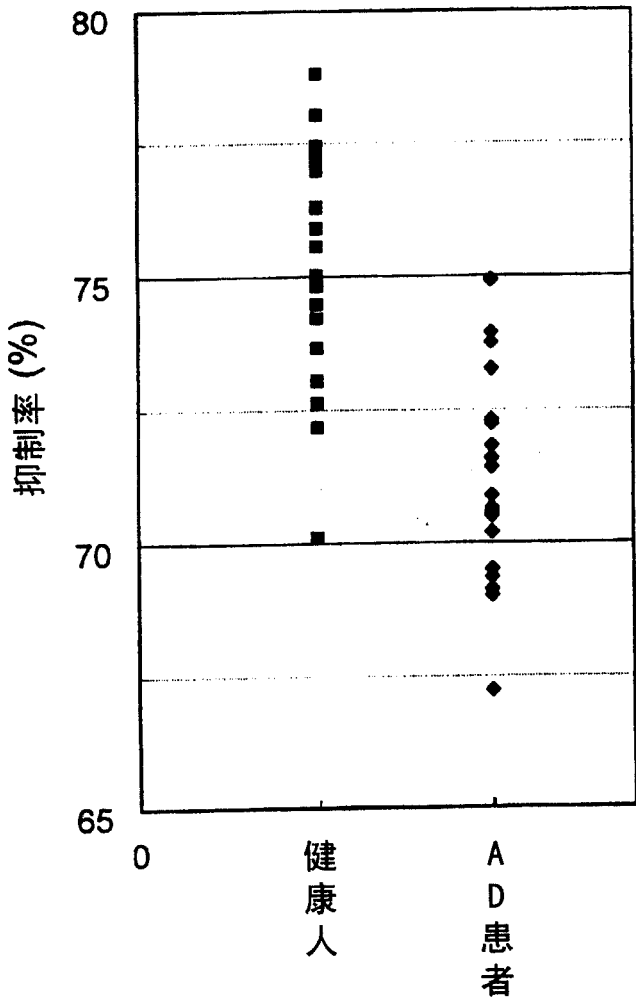


图 9

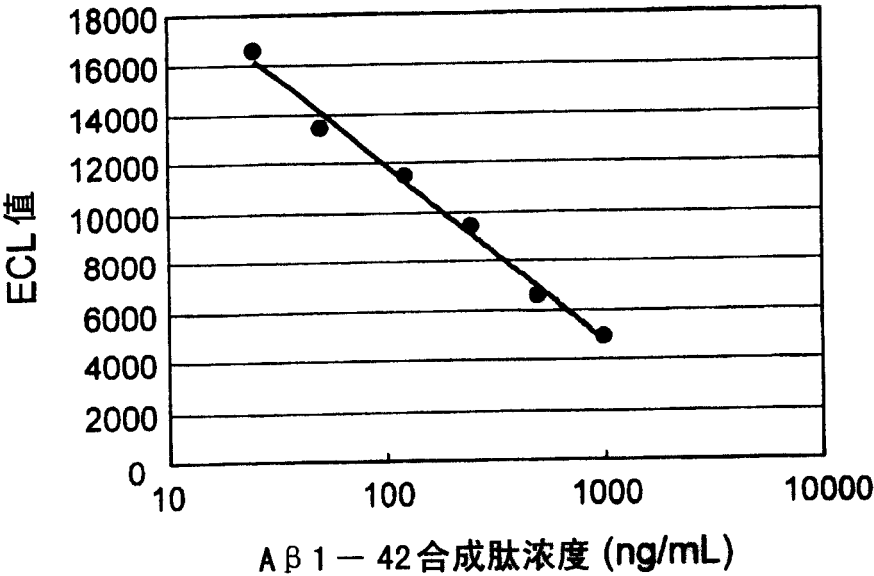


图 10

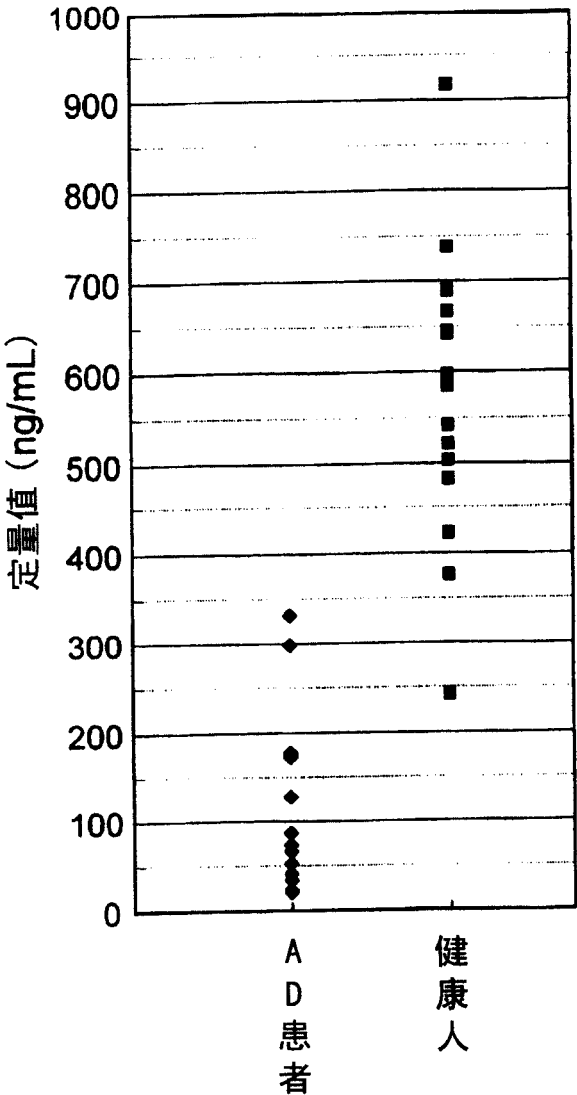


图 11

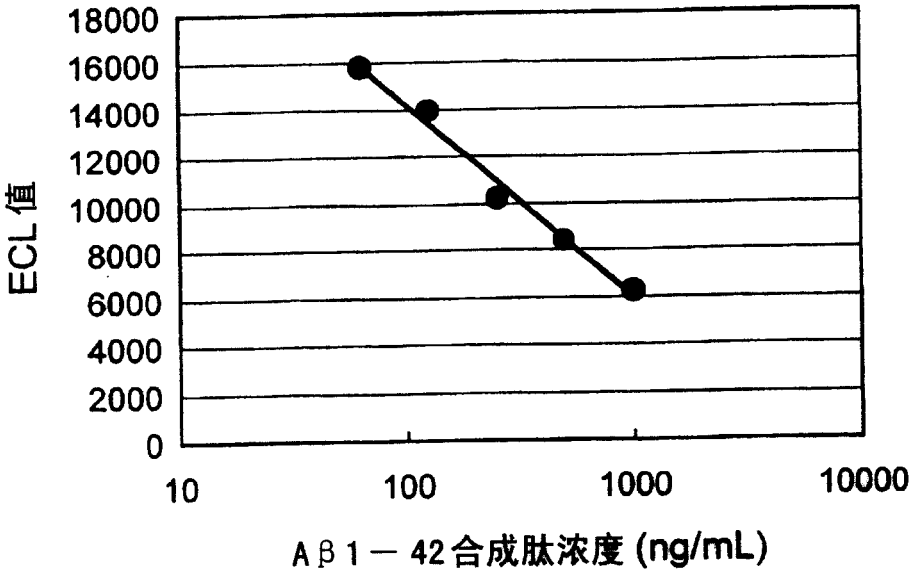
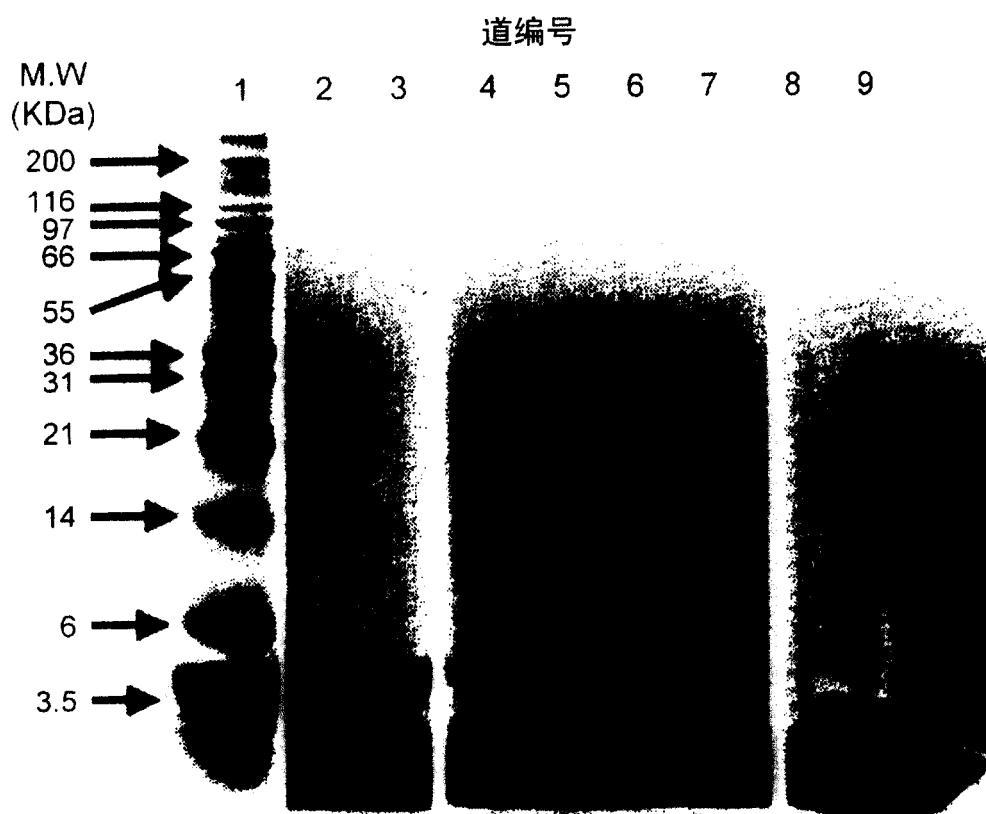


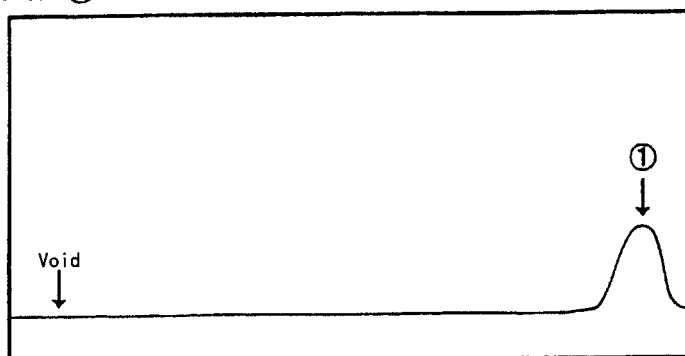
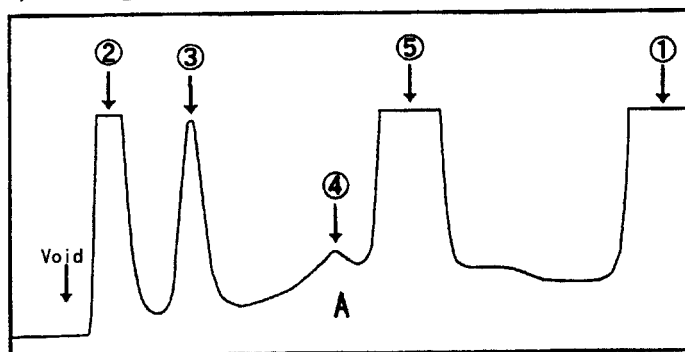
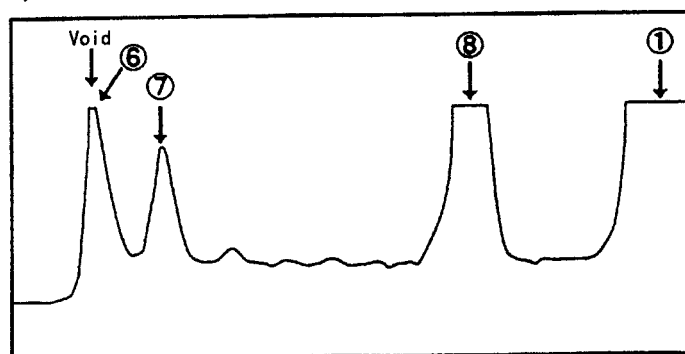
图 12



道	样品	上 Aβ 量
1	分子量标记物	-
2	Aβ 1—42 合成肽	500 ng
3	Aβ 1—42 合成肽	50 ng
4	Aβ 1—42 合成肽	10 ng
5	Aβ 1—42 合成肽	5 ng
6	Aβ 34—42 合成肽	100 ng
7	实验例 8—2	50 ng
8	实验例 8—3	50 ng
9	实验例 8—1	50 ng

图 13

(a) DMSO①

(b) $A\beta$ 1-28②, $A\beta$ 1-11③, $A\beta$ 34-42④, Suc-D-Asp-MCA⑤(c) $A\beta$ 1-42⑥, $A\beta$ 12-28⑦, E-64-c⑧

(d) 胃蛋白酶 A ⑨

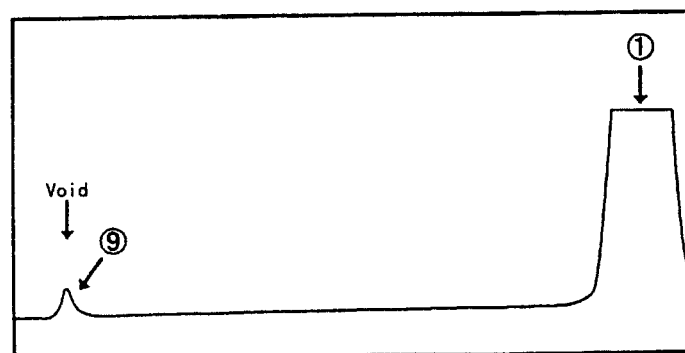


图 14

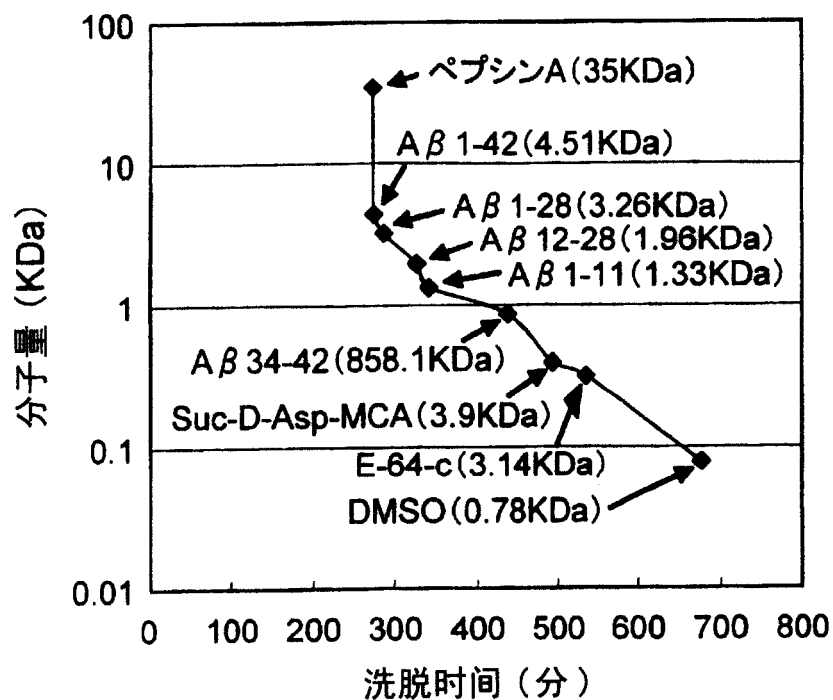


图 15

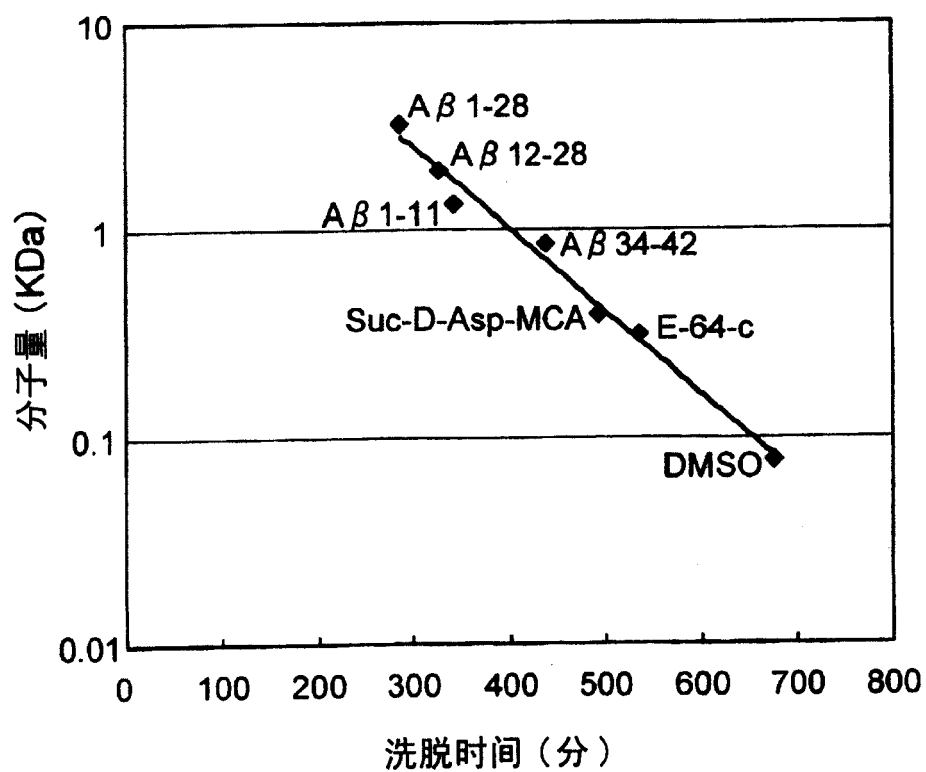


图 16

DMSO①, A β 1-28②, A β 1-11③, Suc-D-Asp-MCA⑤

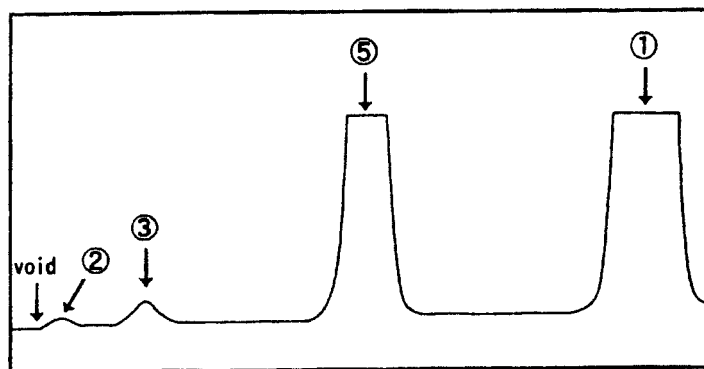


图 17

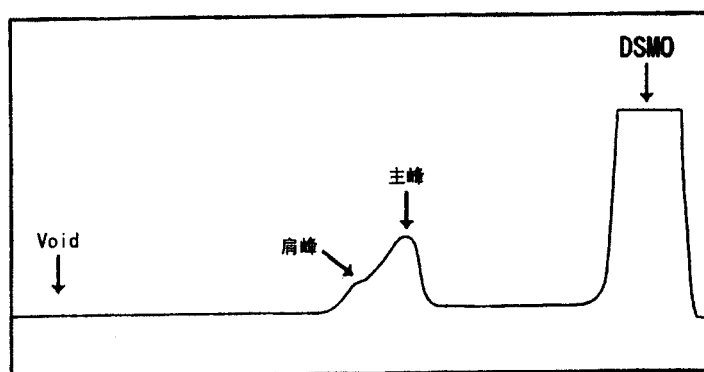


图 18

专利名称(译)	阿尔茨海默氏病的检验方法及诊断试剂		
公开(公告)号	CN101048662A	公开(公告)日	2007-10-03
申请号	CN200580036804.6	申请日	2005-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	三光纯药株式会社		
申请(专利权)人(译)	三光纯药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	三光纯药株式会社		
[标]发明人	高山茂雄 山田雄二		
发明人	高山茂雄 山田雄二		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/541		
CPC分类号	G01N2800/2821 G01N2333/4709 G01N33/6896 C07K16/18		
代理人(译)	李贵亮		
优先权	2005052003 2005-02-25 JP 2004314639 2004-10-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于，设法提供一种血中等生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白的测定方法，并应用于阿尔茨海默氏病的诊断。利用使用识别 β -淀粉样蛋白1-42的C末端部分的抗体的免疫测定法，通过测定生物体样品样本中的 β -淀粉样蛋白1-42和保有 β -淀粉样蛋白1-42的C末端部分的 β -淀粉样蛋白1-42片段的总量，来检验阿尔茨海默氏病。上述免疫测定法优选为竞争性免疫测定法。

