

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

**特開2003 - 12700**

( P2003 - 12700A )

(43)公開日 平成15年1月15日 (2003.1.15)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* ( 参考 )
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
33/53		33/534	
33/534		33/577	B
33/577		C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 請求項の数 20 O L ( 全 73数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002 - 171495(P2002 - 171495)

(22)出願日 平成14年6月12日(2002.6.12)

(31)優先権主張番号 01114192.6

(32)優先日 平成13年6月12日(2001.6.12)

(33)優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71)出願人 502211308

イエンス・ヴィルトファング

ドイツ連邦共和国、37120ボーヴェンデン/  
エディゲハウゼン、ジューデクムヴェーク、  
12

(72)発明者 イエンス・ヴィルトファング

ドイツ連邦共和国、37120ボーヴェンデン/  
エディゲハウゼン、ジューデクムヴェーク、  
12

(74)代理人 100069556

弁理士 江崎 光史 ( 外 3 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 m A b 1 E 8 で表わされるモノクロナール抗体及び A - ペプチド及び ( 又は ) s A P P の検出にこの抗体を使用する方法

(57)【要約】

【課題】 mAb 1E8 で表わされるモノクロナール抗体及び A - ペプチド及び ( 又は ) sAPP の検出にこの抗体を使用する方法

【解決手段】本発明は、mAb 1E8 で表わされるモノクロナール抗体 (これは2000年12月19日に微生物及び細胞培養物に関する D S M Z - ドイツ ザンメルング G m b H ( ブラウンシュバイク ) に寄託され、 D S M Z 寄託番号 D S M A C C 2 4 8 5 が付与されている。 ) を A - ペプチド A 1 - x 及び ( 又は ) A 2 - x 及び ( 又は ) sAPP の検出に使用する方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 mAb 1E8 で表わされるモノクローナル抗体（これは2000年12月19日に微生物及び細胞培養物に関するDSMZ - ドイツ ザンメルング GmbH（ブラウンシュバイク）に寄託され、DSMZ寄託番号DSM ACC 2485が付与されている。）。

【請求項2】 放射能標識されている、請求項1記載のモノクローナル抗体mAb 1E8。

【請求項3】 A - ペプチドA 1 - x及び（又は）A 2 - x及び（又は）sAPP の検出に、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 を使用する方法。

【請求項4】 ウェスタン - 免疫ブロットで請求項3記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 を使用する方法。

【請求項5】 非特異結合部位を予め遮断剤で遮断する、請求項4記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項6】 A - ペプチド及び（又は）sAPP を予めラウリル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミド - ゲル電気泳動（SDS-PAGE）によって相互に分離し、その際尿素の添加によってA - ペプチドのアミノ酸プライマー配列 - 特異的コンフォメーション変化を誘発させることを特徴とする、請求項3～5のいずれかに記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項7】 A - ペプチドを予め等電点電気泳動によって分離する、請求項7記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項8】 液体、脳ホモジネート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブ中でA - ペプチドA 1 - 42の濃度を測定する、請求項6又は7のいずれかに記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項9】 液体、脳ホモジネート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブで、A - ペプチドA 2 - 42の検出可能な濃度（100 pg / ml以上である）の存在を調べる、請求項6又は7記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項10】 プローブ中でA - ペプチド1 - 42の濃度に対するA - ペプチドA 2 - 42の濃度の割合を測定する、請求項8又は9記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項11】 液体、脳ホモジネート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブ中でA - ペプチドA 1 - 40の濃度に対するA - ペプチドA 1 - 42の濃度の割合、A - ペプチドA 1 - 38の濃度に対するA - ペプチドA 1 - 42の濃度の割合及びA - ペプチドA 1 - 40の濃度に対するA - ペプチドA 1 - 38の濃度の割合を含む群から選ばれた、少なくとも1つの濃度割合を測定する、請求項6又は7のいずれかに記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

\*【請求項12】 液体、脳ホモジネート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブ中で、A - ペプチドA 1 - xの濃度に対するA - ペプチドA 1 - nの濃度の比率A 1 - n%の少なくとも1つを測定し、その際比率A 1 - n%がA - ペプチドA 1 - 42の濃度の比率A 1 - 42%、A - ペプチドA 1 - 40の濃度の比率A 1 - 40%及びA - ペプチドA 1 - 38の濃度の比率A 1 - 38%を含む群から選ばれ、そしてA - ペプチドA 1 - xの濃度がA - ペプチドA 1 - 37、A 1 - 38、A 1 - 39、A 1 - 40及びA 1 - 42からの少なくともペプチドA 1 - 38、A 1 - 40及びA 1 - 42の濃度を含む、請求項6又は7のいずれかに記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項13】 A - ペプチドを予め界面活性剤の処理によって分解させる、請求項1～12のいずれかに記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項14】 A - ペプチドを予めSDS熱変性によって分解させる、請求項13記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項15】 プローブを少なくとも2つの部分プローブに分け、第一部分プローブを沈降処理の前に又はその代わりに界面活性剤でプローブ処理し、この沈降処理は少なくともA - ペプチドA 1 - 42の部分量に対して行われ、そしてこの沈降処理は第二部分プローブに対して界面活性剤でのプローブ処理の前に又はその代わりに行われ、ついで2つのプローブ部分中で測定されるA - ペプチドA 1 - 42の濃度間の差異A 1 - 42を測定する、請求項8、13又は14のいずれかに記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項16】 抗体mAb 1E8 が結合するA - ペプチドが、抗体mAb 1E8に照準された二次抗体で標識される、請求項1～15のいずれかに記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項17】 抗体mAb 1E8 に照準された二次抗体に、すでに定量的に記録可能なマーカが付付けられているか又は抗体mAb 1E8 とのその免疫反応の後に定量的に記録可能なマーカが付付けられる、請求項16記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項18】 標識された抗体mAb 1E8 の量を吸光分光分析でCCDカメラを用いて測定する、請求項16又は17記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項19】 A - ペプチドA 1 - x及びA 2 - xを濃縮するために、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

【請求項20】 A - ペプチドA 1 - x及びA 2 - xとA - ペプチドA n - x (n > 2) とを識別するために、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体mAb 1E8 の使用方法。

\*50 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、モノクローナル抗体及びA - ペプチド及び(又は)sAPP の検出にこのモノクローナル抗体を使用する方法に関する。その際特にA - ペプチド濃度の分析下で神経精神医学の神経化学診断、更に特に体液プローブ又は組織プローブによる痴呆症診断に関する。

## 【0002】

【従来の技術】DE - Z : P s y c h o , 2 4 ( 1 9 9 8 )、7 2 6 - 7 3 1 から、アルツハイマー病を患う患者において液体中での減少したA 1 - 4 2 の濃度が検出されることが知られている。これらの患者の場合、N - 末端変性されたA - ペプチドA x - 4 2 の濃度は増加する傾向にもある。これに対して、アルツハイマー病に基づく濃度変化はA - ペプチドA 1 - 4 0 で生じてはならない。アルツハイマー病を患う患者の液体中のA 1 - 4 2 及びA 1 - 4 0 の濃度は、これが個体内で極めて一定でなければならないとはいえ、痴呆症の重さの度合を示す臨床上の又は試験精神上パラメーターと絶対相関(absolute Korrelation)を示してはならない。

【0003】アルツハイマー - 痴呆症の場合液体中のsAPP も減少するという知見は周知である。

【0004】痴呆症及び場合によりその他の神経精神医学疾患と体液(koerperfluessigkeit)プローブ又は体組織プローブ中のすべての又は特定のA - ペプチドの濃度の相関に関するさらに詳しい情報を得るために、つぎのような剤を調製しなければならない。すなわちこの剤を用いてA - ペプチドの濃度が極めて正確にかつ再現可能で測定され、同時に存在する相関は濃度測定での避けられないエラーによって消滅しない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明は体液プローブ又は体組織プローブ中のA - ペプチド濃度の正確かつ再現可能な測定用剤を調製することを第一の課題とする。更にこの課題は、この剤の使用を最適化し、そしてこれを用いて測定可能な、A - ペプチド濃度と神経精神医学疾患の間の相関から神経精神医学疾患の将来の神経化学診断に利用することができる予測を導くことにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の課題を解決する剤は、mAb 1E8 (細胞培養UM 1998クローン1E8)として表わされるモノクローナル抗体(これは2000年12月19日に微生物及び細胞培養物に関するDSMZ - ドイツ ザンメルング GmbH、ブラウンシュバイク [DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig] に寄託され、DSMZ寄託番号DSM ACC 2485が付与されている。)である。

【0007】抗体mAb 1E8 は放射能標識されていてよい。しかしこれは二次抗体と一緒にその標識化に使用することもできる。

【0008】高い選択性及び特異性を伴う抗体mAb 1E8 は、 - セクレターゼ切断(sAPP)後にA - ペプチドA 1 - x 及び(又は)A 2 - x に及び可溶性 - アミロイド前駆体蛋白質に結合させることで製造される。したがってこれらのペプチドの濃度は抗体mAb 1E8 を用いて測定することができるという前提が生じる。

【0009】抗体mAb 1E8 の使用はウエスタン - 免疫ブロットで行うことができる。その場合、この抗体の使用前に非特異結合部位を遮断剤で遮断するので、抗体mAb 1E8の有効な選択性を増加することができる。市販名“Roti-Block”で入手される合成試剤はこれに関連して遮断剤としてのミルク粉末の通常の使用に比べて極めて有利であることが明らかである。というのはこれが十分に得られる選択性で抗体mAb 1E8 の有効な結合活性及び同時に検出感受性を増加させるからである。このことは一般的とはいえない。というのはたとえばその他の市場で入手できるmAb (6E10)はこの方法に適合しないからである。

【0010】抗体mAb 1E8 はA - ペプチドA 1 - x も、A 2 - x も、sAPP も識別するので、このペプチドを選択的検出のために相互に分離しなければならない。これはラウリル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミド - ゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって可能である。ただし慣用のSDS-PAGEの場合、A - ペプチドA 1 - x 及び(又は)A 2 - x 全体しかsAPP から分離しない。というのはA - ペプチドA 1 - x 及び(又は)A 2 - x の有効な分子サイズが十分に識別されないからである。しかし尿素の添加によって及び界面活性剤濃度、ゲル小孔サイズ、pH値及び温度の更なる関与によって、A - ペプチドのアミノ酸プライマー配列 - 特異的コンフォメーション変化を誘発させることができる。この変化によってSDS-PAGEにおいてカルボキシ末端が異なる長さのA - ペプチドA 1 - x 及び(又は)A 2 - x の伸長(Lauflaengen)を識別することができる。この場合この方法はA - SDS - PAGEとしても表わされる。それぞれの体液プローブ又は体組織プローブ中に含有されるその他の物質のうち、A - ペプチドを予め等電点電気泳動によってSDS - PAGEの方向に対して垂直の方向で分離することができる。

【0011】したがって抗体mAb 1E8 の使用下で液体、脳ホモジネート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブ中でA - ペプチドA 1 - 4 2 の濃度を測定することができる。このことから、脳ホモジネート中での濃度の無制限の増加及び液体中での濃度の減少はたとえばアルツハイマー病との相関で現れることは周知である。

【0012】しかし抗体mAb 1E8 の使用下で液体、脳ホ

モジナート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブをA - ペプチドA 2 - 42の検出可能な濃度の存在について調べることも可能である。このような検出限界は100pg/ml以上である。この限界を越えた場合、これからプローブが採取された患者において蛋白質ホールディング疾患(Protein folding diseases)のグループから痴呆症の存在について推論することができる。蛋白質ホールディング疾患のグループにアルツハイマー病の他にレーヴィ小体・痴呆及びクロイツフェルト - ヤコブ - 病が属する。これらの疾患を患う多くの患者の場合、液体プローブ中のA - ペプチドA 2 - 42の高濃度を確認することができた。

【0013】この場合血漿プローブの分析は抗体mAb 1E8の前述の使用とは対照的に困難である。というのは液体中ですでにA - ペプチドA 2 - 42の濃度が検出限界にあり、血漿中のA - ペプチドの本来の濃度が液体中よりも明らかに低いからである。したがってプローブ中で同一の高い濃度を得るために、本来の濃度測定前に、血漿中で常に濃縮処理をたとえば抗体mAb 1E8を用いる免疫沈降によって実施しなければならない。

【0014】蛋白質ホールディング疾患のグループからの痴呆の存在に関してそれぞれのプローブ中でA - ペプチドA 1 - 42の濃度に対するA - ペプチドA 2 - 42の濃度の割合の増加が特に著しく明らかとなる。この痴呆症ではA - ペプチドA 2 - 42の産生を促進してA - ペプチドA 1 - 42の産生を圧迫するという過程が明らかとなる。

【0015】抗体mAb 1E8の使用によって、さらに別の神経化学診断可能性が開発された。液体、脳ホモジネート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブ中でA - ペプチドA 1 - 40の濃度に対するA - ペプチドA 1 - 42の濃度の割合、A - ペプチドA 1 - 38の濃度に対するA - ペプチドA 1 - 42の濃度の割合及びA - ペプチドA 1 - 40の濃度に対するA - ペプチドA 1 - 38の濃度の割合を含む群から選ばれた、少なくとも1つの濃度割合を測定することができる。この濃度比率の測定は新しい知見に基づいている。それは異なる神経精神医学疾患の場合標準患者集団に比べてこのA - ペプチド相対濃度の著しい相違が生じることである。

【0016】濃度商(Konzentrationsquotient)  $A_{1-38} / A_{1-40}$ と上記境界値を比較すると、境界値を下回る場合アルツハイマー病が存在すると断定される。この境界値は液体中で典型的に0.285 ~ 0.300である。この数値記載は、その他のすべての数値記載と同様に個々に明記しない限り、液体プローブを取得した後にそれぞれ1度保存のために凍結された液体プローブに対するものである。

【0017】逆に、濃度商  $A_{1-38} / A_{1-40}$ とその他の境界値を比較すると境界値を上回る場合中枢

神経系の慢性炎症疾患が存在すると断定される。この境界値は液体中で典型的に0.250 ~ 0.260である。したがってこの境界値は確かにその境界値を下回る場合にアルツハイマー病の存在が断定される境界値より下方にある。しかし重複はほんの僅かである。その際これに関連する診断は識別のつく診断法の範囲内で観察されねばならないことも分かる。したがってアルツハイマー病に対する境界値を上回る場合このような疾患の存在を比較確実に(relativ sicher)除外することができる。逆に中枢神経系の慢性炎症疾患に対する境界値を下回る場合このような疾患の存在がないと断定することができる。

【0018】濃度商  $A_{1-42} / A_{1-40}$ もまた上記境界値を下回る場合アルツハイマー病の存在を示す。この際境界値は液体中で典型的に0.130 ~ 0.145である。

【0019】濃度商  $A_{1-42} / A_{1-38}$ において、これは濃度商  $A_{1-38} / A_{1-40}$ と一緒に不等式：

$$A_{1-42} / A_{1-38} - 38 + B > A_{1-38} / A_{1-40}$$

を満たす場合アルツハイマー病の存在を示すことが明らかとなる。この際A及びBは一定であり、これは液体中で

$$0.2 < A < 0.8 \text{ 及び} \\ 0.5 < A < 2 \cdot A \text{ 及び} \\ B < 0.9$$

に相当する。

【0020】これまで記載した及び以下に記載される神経化学診断可能性はまさに抗体mAb1E8の使用下に開発された。しかしこれは同様に個々のA - ペプチドA 1 - x及びA 2 - xの濃度を測定するためのその他の剤で置き換えることができる。この際記載した境界値のずれは、抗体mAb 1E8の特異性に相対する個々のA - ペプチドに関する検出剤の異なる特異性によって得ることができる。

【0021】今まで述べてきた、個々のA - ペプチド濃度間の濃度商と共に、個々のA - ペプチドと全体に存在するA - ペプチドの比率(relativ Anteil)は同様に神経精神医学疾患に関して診断分析することができることが明らかである。したがって液体、脳ホモジネート、血漿及びこれらの混合物を含む群から選ばれたプローブ中で、A - ペプチドA 1 - xの濃度に対するA - ペプチドA 1 - nの濃度の比率  $A_{1-n} \%$ の少なくとも1つを測定することができ、その際比率  $A_{1-n} \%$ はA - ペプチドA 1 - 42の濃度の比率  $A_{1-42} \%$ 、A - ペプチドA 1 - 40の濃度の比率  $A_{1-40} \%$ 及びA - ペプチドA 1 - 38の濃度の比率  $A_{1-38} \%$ を含む群から選ばれ、そしてA - ペプチドA 1 - xの濃度はA - ペプチドA 1 -

37、A 1-38、A 1-39、A 1-40及びA 1-42からの少なくともペプチドA 1-38、A 1-40及びA 1-42の濃度を含む。

【0022】抗体mAb 1E8を用いて適当な処理法で上記A -ペプチド全部の濃度をsAPPの濃度と共に測定することができる。最高濃度はA -ペプチドA 1-38、A 1-40及びA 1-42で確認される。これらのA -ペプチドの場合、神経精神医学的疾患の発生で比率の著しい変化がある。その際A -ペプチドA 1-38、A 1-40及びA 1-42の優性の故に、その比率を3つのプライマー産生A -ペプチドのこの集団について測定するので十分である。しかしまた比率の標準の大きさに関して5つすべての上記A -ペプチドを考慮に入れることも可能であり、重要である。主として産生する3つのA -ペプチドのみの濃度は、その他の濃度測定法を用いる上記診断法を実施することを可能にする。したがって3つのA -ペプチドA 1-38、A 1-40及びA 1-42の濃度をたとえばこの3つのA -ペプチドのための特異アッセイを用いて調べることができる。

【0023】比率A 1-38%の分析において、これが上記境界値を上回る場合中枢神経系の慢性炎症疾患の存在を示し、この際この上記境界値は典型的に及び液体中のA -ペプチドの濃度測定に抗体mAb 1E8を使用した場合15.0~15.7%である。

【0024】比率A 1-42%の分析において、上記境界値を下回ることがアルツハイマー病の存在を示すことが明らかである。

【0025】この上記境界値は8~9%である。液体中のA -ペプチドの濃度測定に抗体mAb 1E8の使用下で、この境界値を8.3~8.8%の範囲に制限することができる。

【0026】同時に比率A 1-42%で上記境界値を上回るとは、中枢神経系の慢性炎症疾患の存在を示す。この境界値は液体中で9.1~9.6%である。

【0027】比率A 1-40%は、液体中で典型的に59~61%である上記境界値を上回る時にアルツハイマー病の存在を示す。

【0028】ミニメンタルテスト(Mini-Mental-Test)[MMSE, 0-30点; 27-20:軽度の痴呆; 19-11点:中程度の痴呆; 10-0点:重度の痴呆]によって表わされるアルツハイマー-痴呆症の重さと比率A 1-40%の間に正の相関がある。A 1-40% 60の痴呆症患者は、平均して、A 1-40% < 60 (MMSE 19-20)に比べて痴呆症患者(MMSE 15-16)の明らかに高い重さの度合を伴う。A 1-38% < 17の痴呆症患者は平均して、A 1-38% 17 (MMSE 19-20)に比べて痴呆症患者(MMSE 14-15)の明らかに高い重さの度合を伴う。

【0029】表示(A 1-38% & A 1-40% =痴呆症の重さの度合)によつてたとえば商A 1-38/A 1-40が痴呆症の重さの度合と負に相関することが予期されうる:商A 1-38/A 1-40 < 0.28の痴呆症患者は平均して、A 1-38/A 1-40 0.28 (MMSE 19-20)の痴呆症患者に比べて痴呆症患者(MMSE 14-15)の明らかに高い重さの度合を伴う。

【0030】抗体mAb 1E8の使用で、この抗体に関してプローブ前処理に関与するA -ペプチドA 1-x及びA 2-xの分画が入手可能であることが明らかである。検出可能なA 濃度を、プローブ中のA -ペプチドを界面活性剤(Detergenz)での処理によって分解させることによって最大にすることができる。これにはSDS熱変性が有効である。

【0031】これに関連して、更に界面活性剤を用いる分解の前に行われるプローブの冷却保存は、引き続き界面活性剤を用いる分解の後でもA -ペプチドの測定可能な濃度を減少させることを確認することができた。

20 これからプローブを冷却保存及びその他の冷却保存のそれぞれの前にすでに界面活性剤を用いるプローブ処理を行うことが要求される。

【0032】更に、冷却処理の後界面活性剤を用いるプローブ分解によつても、もはや抗体mAb 1E8による検出に到達することができないA -ペプチドA 1-42の部分量は蛋白質ホールディング疾患である患者及びこの疾患でない患者において大きい相違があることが明らかである。あるプローブ中にA -ペプチドA 1-42の明らかに異なる分画があり、この際これらの分画は冷却処理及び界面活性剤を用いる分解で異なって反応し、同時にその濃度で蛋白質ホールディング疾患の存在につれて変動する。冷却に対するこれらの分画の異なる挙動は冷却沈降で示され、したがって2つの分画を識別するその他の沈降法も可能である。

【0033】したがってプローブは少なくとも2つの部分プローブに分けることができる。これらのうち第一部分プローブを沈降処理の前に又はその代わりに界面活性剤でプローブ処理し、一方第二部分プローブを界面活性剤でのプローブ処理の前に又はその代わりに沈降処理を行う。ついで2つのプローブ部分中で測定されたA -ペプチドA 1-42の濃度を相互に比較する。上記沈降処理は冷却処理と共に免疫親和性法(Immunoaffinitätverfahren)も包むことができる。2つのプローブ部分中で測定されたA -ペプチドA 1-42の濃度間の差異A 1-42を測定するのが特に重要である。この値は蛋白質ホールディング疾患の存在について極めて顕著な指標である。

50 【0034】抗体mAb 1E8の実際の使用において、抗体mAb 1E8に結合するA -ペプチドを抗体mAb 1E8に照準された二次抗体で標識することができる。抗体mAb 1E

8に照準された二次抗体は、すでに定量的に記録可能なマーカーを付けているか又はこれと抗体mAb 1E8の免疫反応の後に定量的に記録可能なマーカーを付けることができる。

【0035】マーカーを定量的に記録する場合、この記録を吸光分光分析でCCDカメラを用いて行うのが好ましい。というのはこの手段がCCDカメラのシグナルと標識された抗体mAb 1E8の記録量の間の極めて高い直線性を保証するからである。

【0036】新規抗体は従来記載される診断可能性と共にA-ペプチドA<sub>1-x</sub>及び(又は)A<sub>1-x</sub>及び(又は)A<sub>2-x</sub>及び(又は)SAPPの純粋な濃縮にも適する。

【0037】別の使用可能性はA-ペプチドA<sub>1-x</sub>及びA<sub>2-x</sub>とA-ペプチドA<sub>n-x</sub>( $n > 2$ )との識別にある。というのは抗体mAb 1E8は顕著なN-末端特異性を示し、そしてA-ペプチドA<sub>n-x</sub>( $n > 2$ )に明らかにより僅かに結合するからである(<5%)。その場合この抗体はA-SDS-PAGE/免疫プロットの特異結合下で使用される。

【0038】本発明を以下に抗体mAb 1E8の製造方法の記載及び説明によって並びに抗体mAb 1E8の使用の説明形式で詳述する。

【0039】添付の図面は以下の通りである：

図1：A-ペプチドを液体又は血漿中でA-SDS-PAGE/免疫プロットによって測定された患者集団のフローシート。単線で囲まれた患者集団はその二重線で囲まれた上方のグループの部分量である。数人の患者は同時に多数の集団にいる(表5a-d参照)。NDC-3サブグループIP-血漿-3( $N=5$ )、IP-C SF-3( $n=5$ )及びSDS-CSF-3( $n=5$ )は記載されない(2.9.1参照)。

【0040】図1の凡例：

AD：アルツハイマー-痴呆症

NDC：ADのない神経精神医学的疾患

NDC<sup>KP</sup>、AD<sup>KP</sup>：腰椎液中でA-ペプチドの冷却沈降検査

CID：慢性炎症性ZNS疾患

OND：非炎症性、非痴呆性神経精神医学的疾患

OND<sup>4<sup>plus</sup></sup>、AD<sup>4<sup>minus</sup></sup>：1又は2個の対立因子ApoF<sub>4</sub>を伴う患者

OND<sup>4<sup>minus</sup></sup>、AD<sup>4<sup>minus</sup></sup>：ApoF<sub>4</sub>対立因子のない患者

AD-3<sup>KP</sup>は2つの入手可能な患者のAD-3部分量にいたるまでである。

【0041】図2：合成A-ペプチド、ヒト液体及び合成A-ペプチドが添加された液体のA-IPG-2D-PAGE/免疫プロット-2(パネルA、C)及びA-SDS-PAGE/免疫プロット-2(パネルB)。

【0042】図3：A-SDS-PAGE/免疫プロット-2を用いてNDC-3での液体中でA-ペプチドの測定及び尿素含有分離ゲル(パネルA)と尿素不含分離ゲル(パネルB)の比較。その際1~8欄は、患者1一人につき10µLに相当する。液体を自然に凍結させ、ついでSDS-熱変性させる。a~e欄は合成A-ペプチドの混合(一連の希釈)に相当する。

【0043】図4：A-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びデンシトメータフィルム判定を用いて測定された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>1-42</sub>を示す。

【0044】図5：A-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びデンシトメータフィルム判定を用いて測定された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>1-42</sub>/A<sub>1-40</sub>を示す。

【0045】図6：A-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びデンシトメータフィルム判定を用いて測定された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>1-42</sub>/A<sub>1-38</sub>を示す。

【0046】図7：免疫沈降(界面活性剤不含のIP、mAb 6E10)及びデンシトメータフィルム判定と共にA-SDS-PAGE/免疫プロット-1を用いて測定された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>1-42</sub>を示す。

【0047】図8：OND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA-SDS-PAGE/免疫プロット-2を用いて測定された、A-ペプチド濃度を示す。

【0048】図9：ApoE<sub>4</sub>対立因子のないOND-3患者(OND<sup>4<sup>minus</sup></sup>)に比べて1又は2個の対立因子ApoE<sub>4</sub>を伴う患者(AD-3<sup>4<sup>plus</sup></sup>、OND-3<sup>4<sup>plus</sup></sup>)を伴うグループOND-3及びAD-3の患者における液体中のA-SDS-PAGE/免疫プロット-2を用いて測定された、A-ペプチド濃度を示す。

【0049】図10：NDC-3における液体中のA<sub>1-38</sub>及びA<sub>1-40</sub>の相関及びA-ペプチドの相関マトリックス。

【0050】図11：OND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>1-40</sub>%対A<sub>1-38</sub>%を示す。回帰度は集団AD-3に關係する。矢印の方向に痴呆症の重さの度合は上昇する。境界値線(A<sub>1-38</sub>% = 15.5、A<sub>1-42</sub>% = 9.6)は集団CID-3に關係する。個々の患者はそのコード番号によって識別される。

【0051】図12：OND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>1-42</sub>%対A<sub>1-40</sub>%を示す。回帰度は集団AD-3に關係する。矢印の方向に痴呆症の重さの度合は上昇する。境界値線(A<sub>40</sub>% = 63.0、A<sub>42</sub>% = 8.5)は集団AD-3に

関係する。個々の患者はそのコード番号によって識別される。

【0052】図13：OND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>1-38</sub>%対A<sub>1-40</sub>%を示す。回帰度は集団AD-3に関する。矢印の方向に痴呆症の重さの度合は上昇する。境界値線(A<sub>38</sub>% = 15.5、A<sub>40</sub>% = 60.0)は集団CID-3に関する。中断された境界値線(A<sub>38</sub>% = 16.0、A<sub>40</sub>% = 63.0)は集団AD-3に関する。個々の患者はそのコード番号によって識別される。

【0053】図14：A<sub>1-38</sub> - ペプチド全濃度に対するA<sub>1-40</sub> - ペプチド百分率割合に基づくAD-3における液体中のMMSEテスト結果のボックス-プロット(Box-Plot)。

【0054】図15：AD-3におけるA<sub>1-38</sub> - ペプチド全濃度に対する液体中のA<sub>1-40</sub> - ペプチド百分率割合に基づくMMSEテスト結果。

【0055】図16：OND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>1-42</sub>/A<sub>1-38</sub>対A<sub>1-38</sub>/A<sub>1-40</sub>を示す。回帰度は集団AD-3に関する。破線の境界値線は回帰度に対して平行である。矢印の方向に痴呆症の重さの度合は上昇する。境界値線(A<sub>1-38</sub>/A<sub>1-40</sub> = 0.26、A<sub>1-42</sub>/A<sub>1-38</sub> = 0.57)は集団CID-3に関する。個々の患者はそのコード番号によって識別される。

【0056】図17：OND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>1-42</sub>/A<sub>1-40</sub>対A<sub>1-38</sub>/A<sub>1-40</sub>を示す。回帰度は集団AD-3に関する。矢印の方向に痴呆症の重さの度合は上昇する。境界値線(A<sub>1-38</sub>/A<sub>1-40</sub> = 0.26、A<sub>1-42</sub>/A<sub>1-40</sub> = 0.16)は集団CID-3に関する。個々の患者はそのコード番号によって識別される。

【0057】図18：商A<sub>1-38</sub>/A<sub>1-40</sub>に基づくAD-3における液体中のMMSEテスト結果のボックス-プロット(Box-Plot)。

【0058】図19：A<sub>1-42</sub>%対NCD-3KP及びAD-3KPにおける、すなわち冷却沈降に起因するA<sub>1-42</sub>の低下に基づく液体中の先天因子A<sub>1-42</sub>(nativ)を示す。境界値線(A<sub>1-42</sub> = 2100、A<sub>1-42</sub>% = -17)は集団AD-3KPに関する。ゼロ軸(すなわち冷却沈降に起因するA<sub>1-42</sub>の低下のない)は1つの線で表わされる。ApoE-遺伝子型をNCD-3KP患者に関して記載する。9/11AD-3KP患者は少なくとも1個の対立因子ApoE<sub>4</sub>を伴う。2/11AD-3KP患者に関して、ApoE<sub>4</sub>遺伝子型は存在しない。

【0059】図20：A<sub>1-42</sub>%対NCD-3K

P及びAD-3KPにおける、すなわち冷却沈降に起因するA<sub>1-42</sub>の低下に基づく液体中のA<sub>1-42</sub>SDSを示す。境界値線(A<sub>1-42</sub> = 2100、A<sub>1-42</sub>% = -17)は集団AD-3KPに関する。ゼロ軸(すなわち冷却沈降に起因するA<sub>1-42</sub>の低下のない)は1つの線で表わされる。ApoE-遺伝子型をNCD-3KP患者に関して記載する。9/11AD-3KP患者は少なくとも1個の対立因子ApoE<sub>4</sub>を伴う。2/11AD-4患者に関して、ApoE<sub>4</sub>遺伝子型は存在しない。

【0060】図21a：A<sub>1-38</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2：前頭側頭の痴呆症(FID)に比べてADの側頭大脳皮質(temporale Kortex)のホモジネートからのRIPA-可溶性A<sub>1-38</sub>-ペプチドの免疫沈降物(RIPA-IP、mAb<sub>1E8</sub>)。装填容量4μL。a~b欄：合成A<sub>1-38</sub>-ペプチドの混合(一連の希釈)。1~4及び5欄：ADの側頭大脳皮質。(ADの免疫沈降物を数人の患者で20倍に希釈する。)8~10欄：FTDの側頭大脳皮質。

【0061】図21b：A<sub>1-38</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2：前頭側頭の痴呆症(FID)、レーヴィ小体痴呆症(LBD)及び痴呆でないコントロール患者(NDC)に比べてADの側頭大脳皮質のホモジネートからのRIPA-可溶性A<sub>1-38</sub>-ペプチドの免疫沈降物(RIPA-IP、mAb<sub>1E8</sub>)。装填容量4μL。

【0062】a~b欄：合成A<sub>1-38</sub>-ペプチドの混合(一連の希釈)。

【0063】5及び6欄：ADの側頭大脳皮質。

【0064】11及び12欄：FTDの側頭大脳皮質。

【0065】13~15欄：LBDの側頭大脳皮質；(13)LBDCERADA、(14)LBDCERADC、(15)LBDCERADC

16欄：NDCの側頭大脳皮質。

【0066】\*ADの免疫沈降物を数人の患者で20倍に希釈する。

【0067】図22：合成A<sub>1-38</sub>-ペプチドA<sub>1-38</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2：種々の脳領域の脳ホモジネートからのADのRIPA-可溶性A<sub>1-38</sub>-ペプチドの免疫沈降物(mAb<sub>1E8</sub>)。小脳及び側頭大脳皮質の個々の内部比較。装填容量4μL。

【0068】a~c欄：合成A<sub>1-38</sub>-ペプチドの混合(一連の希釈)。

【0069】1~7欄：小脳。

【0070】1'~7'欄：側頭大脳皮質、免疫沈降物を20倍に希釈する。

【0071】図23a：合成A<sub>1-38</sub>-ペプチドの混合(1)と比較してA<sub>1-38</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2を示す；(2)ヒトAPP751Sw導入遺伝子H4神経膠腫細胞のSDS-/熱変性された細胞上澄み(装填容量4μL)、(3)NDC患者の液体10μL

及び(4) AD患者の液体10 $\mu$ L。

【0072】図23b:合成A - ペプチドの混合(1)と比較されるA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2を次の脳ホモジネートのRIPA - 可溶性A - ペプチドの免疫沈降物(mAb 1E8)を用いて示す:

(2) ADの側頭大脳皮質

(3) 前頭側頭性痴呆症の側頭大脳皮質

(4) 痴呆症ではないコントロール患者の側頭大脳皮質、

\* ADの免疫沈降物を20倍に希釈する。

【0073】図24: A - IPG - 2D - PAGE / 免疫プロット - 2:

上図: 合成A - ペプチドの二次元分離。アスパルタートでのN - 末端短縮によって等電点(Ip)はpH単位で塩基性になる。

中図: ADの患者の液体の免疫沈降(mAb 1E8)及び二次元分離。これはA - SDS - PAGEでA<sub>2</sub> - 4<sub>2</sub>に関するRf - 値を伴うバンドを示す。

下図: RIPA - 可溶性A - ペプチドの免疫沈降物(mAb 1E8)及びADの側頭大脳皮質から二次元分離。A - SDS - PAGEでのA<sub>2</sub> - 4<sub>2</sub>に関するRf - 値を伴うバンドをまたA<sub>2</sub> - 4<sub>2</sub>として二次元で識別する。

【0074】図25a: モルモットからの液体中でA - ペプチドのA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2。この液体を凍結前にSDS - / 熱変性させる。

【0075】1~3欄: モルモット1, 2及び3の液体10 $\mu$ L。

【0076】a~d欄: 合成A - ペプチドの一連の希 30 釈。

【0077】図25b: 家ウサギからの液体中でA - ペプチドのA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2。この液体を凍結前にSDS - / 熱変性させる。

【0078】1~3欄: 液体10 $\mu$ L。

【0079】a欄: 合成A - ペプチド。

【0080】図26: 成人モルモットからの短時間培養(0~8時間)を用いて海馬組織フラグメントのA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2。2つのフラグメントそれぞれ(厚み500 $\mu$ m)をプールし(gepool 40 t)、RIPA界面活性剤の存在下に均質化し、ついで免疫沈降(mAb 1E8)させる。関連する培養上澄み(2 $\times$ 500 $\mu$ L)を同様にプールし、RIPAの存在下に免疫沈降(mAb 1E8)させる。

【0081】0~8欄、細胞内: 採取(0)直後から短時間培養で8時間(8; 二重測定)まで海馬組織フラグメント中のA - ペプチドの細胞内濃度の時間経過。

【0082】1~8欄、上澄み: 培養上澄み中で遊離したA - ペプチドの時間経過。

【0083】synth. A 欄: 合成A<sub>1</sub> - 4<sub>0</sub>及びA<sub>50</sub>

1 - 4<sub>2</sub>。

【0084】図27: 2つのA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2。これはヒト751APPSw導入遺伝子H4神経膠腫細胞系の種々のプロテアーゼ阻害剤(23a)による処理及びカルパイン阻害剤 - 1(23b)の投与量に基づく効果を示す。遊離したA - ペプチドをそれぞれSDS - / 熱変性された培養上澄み4 $\mu$ L中で定量化する(図23a, b参照)。比較としてsAPP濃度を細胞培養上澄み中で測定する。

10 【0085】パネルa: (1) DMSO - コントロール; (2) 50 $\mu$ Mカルパイン阻害剤 - 1; (3) 100 $\mu$ Mカルパイン阻害剤 - 3; (4) 5 $\mu$ MMG123; (5) 25 $\mu$ Mカルペチン; (a - d) 合成A - ペプチドの混合。

【0086】パネルb: (1、1<sup>ˆ</sup>) DMSO - コントロール; (2、2<sup>ˆ</sup>) 12.5 $\mu$ Mカルパイン阻害剤 - 1; (3、3<sup>ˆ</sup>) 25 $\mu$ Mカルパイン阻害剤 - 1; (4、4<sup>ˆ</sup>) 50 $\mu$ Mカルパイン阻害剤 - 1; (a - d) 合成A - ペプチドの混合。二重測定。

20 【0087】図28a: A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2。これはヒト751APPSw導入遺伝子H4神経膠腫細胞系の種々の濃度のカルパイン阻害剤 - 1(23b)による処理を示す(図23a, b参照)。遊離したA - ペプチドをそれぞれSDS - / 熱変性された培養上澄み4 $\mu$ L中で定量化する。DMSO - コントロールと比較として、カルパイン阻害剤 - 1の投与量に基づく効果をA - ペプチド濃度について上澄み中で調べる。

【0088】図28b: A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2。これはヒト751APPSw導入遺伝子H4神経膠腫細胞系の種々の濃度のカルパイン阻害剤 - 1(23b)による処理を示す(図23a, b参照)。遊離したA - ペプチドをそれぞれSDS - / 熱変性された培養上澄み4 $\mu$ L中で定量化する。DMSO - コントロールと比較として、カルパイン阻害剤 - 1の投与量に基づく効果を、A - ペプチド全濃度に対するA - ペプチド種の百分率割合について調べる。

【0089】更に21個の表を添付する。

【0090】0 モノクローナルanti A - 抗体1E8の製造

モノクローナル抗体mAb 1E8の製造は、Denzlingenの委託会社“nano Tools Antikoerpertechnik”でその標準法にしたがってSchering AGの委託によって行われる。免疫化及びスクリーニング計画の調製はSchering AGとの協定にしたがって行われる。

【0091】簡単な説明: Balb/cマウスの免疫化にA - 蛋白質全部(1 - 4<sub>2</sub>)を使用する(10 $\mu$ g / 免疫化)。初期免疫化及び3回連続したブースター免疫化を行う。免疫化はそれぞれ2週間おきに行われる。その後動物を殺し、脾臓をマウス脊髄細胞系との細胞融合に使

用する。融合された細胞を96-孔-組織培養プレートに入れ、フィ-ダーマクロファージの存在下で培養する。

【0092】N-末端特異抗体の識別に、ペプチド1-16を適当な活性化されたELISA-プレートと共有結合させ、ハイブリドーマ細胞上澄みを用いるスクリーニングに使用する。A 11-16-陽性(positive)クローンをその後再クローン化し、繰り返しテストする。クローンの発現の後、凍結保存を行う。抗体の精製(Anreicherung)をイオン交換クロマトグラフィーによ

って非変性条件下で実施する。  
【0093】抗体の特異性を制限するために、エピトープマッピング(Epitop-Mapping)をセルロース結合する線状ペプチドから実施する(スポット合成)。更に連続して重複するA-ペプチドのプライマー配列を“スポット”の形でセルロース膜上で合成し、そしてこの膜をウエスタン-プロット-法にしたがってモノクロナール抗体と共にインキュベートする。特異的に結合する抗体の検出は二次抗体を用いて行われる。

【0094】分析によって、抗体1E8(サブクラスIgG1カップに属する)が、A-配列の最初の8つのN-末端アミノ酸から生じるN-末端線状エピトープを検出することを明らかにする。これらの抗体は下記実験でウエスタン-プロット、免疫沈降、免疫組織化学及びELISAでの先天性Aの検出に相当であることが分かる。

## 【0095】1. 通覧

### 1.1 方法論の説明

-アミロイド前駆体蛋白質(APP)及びその代謝物、特に-アミロイドペプチド(A-ペプチド)の分離用ナトリウム-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動(SDS-PAGE)を記載する。特定のSDS-PAGE(以下A-SDS-PAGEと呼称する。)を多層緩衝系(ピシン(Bicin)/ピストリス(Bistris)/トリス/スルフェート)を使用し、そして分離メカニズムは分離区画の開始時にA-ペプチドの尿素誘発されたコンフォメーション変化にある。コンフォメーション変化はそれぞれのA-ペプチドのアミノ酸プライマー配列に高度に特異的であり、有効な分子半径の再現性可能な変化を生じる。したがって多数のA-ペプチドが分離され、これらはN-及びC-末端で一部は1個のアミノ酸しか異ならず、そして僅かな質量相違によって通常のSDS-PAGEを用いて分離することができない。コンフォメーション変化を多層緩衝系の条件下で6M濃度以上の尿素の添加によって引き起こす。A-ペプチド特異性コンフォメーション変化は、使用される尿素のモル濃度と共に限定されたpH-値及びイオン強度で、使用されるポリアクリルアミドゲルの孔サイズ、界面活性剤(SDS)の濃度及び分離の間の温度によって決定される。N-及びC-末端(Nt, Ct)で変化し

たA-ペプチドの幅広いスペクトルの分離のための最適な分離ゲルマトリックスを12%T/5%C/8M尿素/0.25%SDSを用いて見出した。

【0096】A-SDS-PAGEを第一分析範囲内で担体両性電解質又は二次元の電気泳動のための固定化されたpH-勾配(IPG)の使用下で等電点分画電気泳動(IEF)と組み合わせる(A-2D-PAGE及びA-IPG-2D-PAGE)。A-SDS-PAGE及びA-IPG-2D-PAGEを用いて、合成A-ペプチドA 1-33、A 1-34、A 1-35、A 1-37、A 1-38、A 1-39、A 1-40、A 1-42、A 2-40、A 3-40、A 3p-40、A 2-42、A 3-42及びA 3p-42の電気泳動流動割合が特徴づけられる。

【0097】検出はウエスタン-免疫プロット(PVDF-膜)及び“エンハスト化学発光”(ECL)(A-SDS-PAGE/免疫プロット, A-2D-PAGE/免疫プロット, A-IPG-2D-PAGE/免疫プロット)を用いて行われる。これに非常に高いN-末端特異性を検出するためのモノクロナール抗体mAb 1E8を使用する。使用されるウエスタン-免疫プロットの条件下で、mAb 1E8はN-末端アスパルタートの欠失でA-ペプチドA 1-x(たとえばA 1-40、A 1-42)と同様に良好な検出感受性を伴う対応するA-ペプチドA 2-x(たとえばA 2-40、A 2-42)を識別する。合成A-ペプチドA 3-40又はA 3-42はその付加的なN-末端でアミノ酸アラニンを欠失し、これに対してそのピログルタマート誘導体を生理学的に適切な濃度でもはや検出しない。ウエスタン-免疫プロットでの検出感受性はmAb 1E8に対して選択的に改良することができる。この場合その他に主に使用されるミルク粉末(免疫プロット-1)の代わりに合成界面活性剤を非特異結合部位の遮断に使用する(免疫プロット-2)。市場で入手されるN-末端特異性モノクロナール抗体(6E10)(これはその他にしばしばウエスタン-免疫プロットによるA-ペプチドの検出に使用される)は免疫プロット-2と適合しない。A-SDS-PAGE/免疫プロット-2と高感度CCDカメラによるAPP-代謝物の検出の組み合わせによって定量的ウエスタン-免疫プロットはA 1-40に関して1pg及びA 1-42に関して2pgで生じることができる。CCD検出を伴うA-SDS-PAGE/免疫プロット-2に関しては、20pg A-ペプチドに対して10%より少ないイントラ-及びインターアッセイ変動係数を実現することができる。フルム検出を伴うA-SDS-PAGE/免疫プロット-2に関しては、A 1-40に対して0.3pg及びA 1-42に対して0.6pgの検出感受性である。A-ペプチド検出に対して同様に良好な検出

感受性及び変動係数を伴うその他のウエスタン - 免疫プロット法は従来知られていない。A - ペプチドが SDS - / 熱変性直後にウエスタン - 免疫プロット及び CCD カメラを用いて、すなわち免疫沈降によって予め選択的に精製せずに、定量化されねばならない場合、上記検出感受性は液体中での神経化学痴呆症診断にとって必須条件である。更に SDS - / 熱変性が液体プローブの凍結の前に行われる場合、神経化学痴呆症診断に対する A - SDS - PAGE / 免疫プロットの分離精度をこのプローブ前処理によってすらもう一度著しく上昇させることができる。

【0098】1.2 A - SDS - PAGE / 免疫プロット及び神経化学による痴呆症診断

A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2 (上記参照) は、ほんの  $10 \mu\text{L}$  のヒト又は動物 (モルモット、家ウサギ) の液体プローブ中に CCD カメラを用いて sAPP 及び A - ペプチドの直接定量化を一度で実現する。この方法によって、A 1 - 40 及び A 1 - 42 の他に、3つの別のカルボキシ末端 (C - 末端) で短縮された A - ペプチド (A 1 - 37、A 1 - 38、A 1 - 39) がヒト及び動物液体中に高い割合で一定にあることを初めて検出することができた。この場合従来のように二次的にしばしば起こる A - ペプチドは A 1 - 40 から A 1 - 42 に液体中で変わるのでなく、A 1 - 38 に変わる。更に、3つの付加的な、C - 末端で短縮された A - ペプチドもヒト血漿中で著しく僅かな濃度及びその他の相対分布でもって検出されることが分かった。特に比率 A 1 - 42 / A 1 - 38 は ZNS - 特異的に異なるようである。

【0099】A<sub>d</sub>を患う数人の患者の場合、液体中で更に A<sub>d</sub>を患う患者の脳ホモジネート中に規則的に広範に増加する N - 末端で短縮された A - ペプチド 2 - 42 を検出することができる。

【0100】液体中の A - ペプチドの絶対濃度と対照的に、その全量 A 1 - x に対して A - ペプチド A 1 - n (n = 37, 38, 39, 40 又は 42) の百分率割合 A 1 - n % が AD 及び慢性炎症性 ZNS - 疾患 (CID) の患者の高い選択性及び特異性によって識別されることを始めて証明することができた。絶対濃度と対照的に、相対 A - ペプチド割合はまた痴呆症の重さの度合いと著しく相関を示す。更に AD を患う患者にとって特定の A - ペプチドの百分率割合間の特異的な相関を示すことができる。これは特定の A - ペプチド商に対してあてはまり、対応する相関は改良された痴呆症診断に利用することができる。特に A 1 - 38 % 及び A 1 - 42 % の関係又は A - ペプチド商 A 1 - 38 / A 1 - 40 及び A 1 - 42 / A 1 - 38 の相関は AD において比較すると高い相関を示し、診断上期待がもてる。神経化学的痴呆症診断に対するその適性の点で、A - ペプチド種の絶対及び部分濃度間の驚異

的で明白な相違は、セクレターゼ活性の疾患特異的变化が生じ、これが相対 A - ペプチド割合の変化についてより良好に表わすことによって恐らく制限される。

【0101】A - SDS - PAGE / 免疫プロット用プローブ調製のために、A - ペプチド及びその他の APP - 代謝物質を SDS - / 熱変性させる。あるいは A - ペプチドの選択的濃縮のために予め免疫沈降 (IP) を実施することができる。その結果から、プローブ調製に基づき生体液体中にある A - ペプチドの種々の割合を測定できることが分かる。その場合 A - ペプチド分画の界面活性剤 (SDS) で解離された割合は識別することができ、免疫沈降又は ELISA 法の範囲内の抗体は直ちに、すなわち界面活性剤で同時に処理することなく得ることができる。この判別は A - ペプチドのその他の蛋白質又は A - 自動凝集体への高い親和結合によって恐らく説明される。その際 SDS - 解離可能な割合は抗体 - 解離可能な分画に比べて明らかに高い。この現象は A 1 - 42 に対して特異的に特に著しく際立っている。

【0102】A 1 - 42 に関して、A 1 - 40 とは対照的に冷却沈降 (KP) に起因する低下は液体プローブの凍結によって検出可能である。KP に起因する低下は恐らく主に凝集体に結合する A 1 - 42 分画から示され、アルツハイマー - 痴呆症 (NDC) ではない患者のかなりの割合で A 1 - 42 の液体レベルの AD - 典型的低下を生じる。この作用は少なくとも 1 個の対立因子 A<sub>poE</sub> 4 を伴う患者で特に明らかであり、AD ではなく、しかし対立因子 4 を伴う患者においても予め凍結された液体中で比較してみると A 1 - 42 の濃い濃度がなぜ測定されるかを恐らく説明する。

【0103】プローブの凍結前の“保護的” SDS - / 熱変性によって A 1 - 42 の KP に起因する低下を AD ではない患者において効果的に妨害することができる。これに対して AD を患う患者は凍結前の SDS - / 熱変性によって液体プローブを前処理した場合でも液体中で A 1 - 42 の低い濃度を示す。したがって神経化学痴呆症診断に関する A - SDS - PAGE / 免疫プロットの診断分離精度は凍結処理前の液体プローブの SDS - / 熱変性によって極めて著しく改善される。上記プローブ調製を伴う A - SDS - PAGE / 免疫プロットは、AD の初期及び前もつての臨床診断にも期待がもてる。というのは初期の AD が KP 依存低下によって説明することができない場合、境界値の低い A 1 - 42 液体レベルが特に初期の AD を示すことが予測されるからである。あるいは軽い認識障害を患う患者において予想される研究によって、すでに A 1 - 42 それ自体の顕著な KP 依存低下が AD のより遅い発現に関する前兆となる値を有しないかどうかを調べることができる。

【0104】AD において液体中の A 1 - 42 の KP 依存低下は次の仮説によって説明することができる：

1. ADを患う患者の液体は非変化のA<sub>β</sub>-ペプチド全濃度で選択的によい少ないA<sub>β</sub> 1-42を含有する。

2. A<sub>β</sub> 1-42のKPに起因する低下はSDS-ノ熱変性にもかかわらず妨害されない。

3. A<sub>β</sub> 1-42はADの液体中で低下せず、担体蛋白質又はA<sub>β</sub>-ペプチド凝集体へのSDS安定結合によってのみ計測可能な状態で減少する。

【0105】後者(3)の場合、A<sub>β</sub> 1-42のこの分画をまた酵素異化物から除き、したがって病態生理学的に適切でかつ有効に有効物質認知プロジェクトのための分子“ターゲット”である。その際A<sub>β</sub> 1-42結合する蛋白質の組成又は分子一次構造はその複合体の範囲内で無制限に変化してはならず、同一の一次構造で結合の親和性はA<sub>β</sub> 1-42のコンフォメーションに基づいておびただしく異なることができる。

【0106】ADである又はADではない患者の場合液体中のA<sub>β</sub> 1-42の界面活性剤解離可能な分画の特異的相違を検出することができる知見は神経化学痴呆症診断のその他の方法にも利用することができる(ELISA、蛍光相関分光分析)。

【0107】ELISA-トリプレットA<sub>β</sub> 1-38、A<sub>β</sub> 1-40及びA<sub>β</sub> 1-42の使用はA<sub>β</sub>-ペプチド商(38/40, 42/38, 42/40)の算定及び異なるプローブ前処理によるA<sub>β</sub>-ペプチドのKP-依存低下の測定と共に特に期待がもてる。

【0108】1.3A<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット及び神経病理学的診断

A<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロットを痴呆症の神経病理学的死後診断に使用することができる。ADを患う患者の脳ホモジネート中のA<sub>β</sub>-ペプチドの界面活性剤(RIPA)-可溶性分画の分析で、その他の痴呆症及びコントロールはA<sub>β</sub>-ペプチド1-37、1-38、1-40、1-42及び2-42の疾患及び脳領域-特異的発現パターンを示すことができる。AD及びレーヴィ小体痴呆症(LBD)の患者で脳ホモジネートのRIPA-可溶性分画中のA<sub>β</sub> 2-42の多大な増加が特に注目すべきことである。LBDにおいて、患者が同時に際立った $\alpha$ -アミロイド病理学を示す場合(LBD, CERADC)、A<sub>β</sub> 2-42の高い濃度が観察される。A<sub>β</sub> 1-42もAD及びLBD(CERADC)で規則的にかつ明らかに増加する。その際その他のA<sub>β</sub>-ペプチドの濃度は高い個体内変化を示す。これは散発型ADの表現型サブタイプを示すか又は時の経過に依存して痴呆症の重さの度合を示すことができる。

【0109】ここで使用されるRIPA-界面活性剤混合物は一般に成熟神経炎性 $\alpha$ -アミロイドブラークを溶解することができない。したがってA<sub>β</sub> 2-42の広範に高められた濃度によって、この $\alpha$ -アミロイドブラーク分画からのA<sub>β</sub> 2-42について説明することができない。対応してA<sub>β</sub> 2-42が非特異性 $\alpha$ -アミロイド

ブラークに関連するポストトランスレーション修飾(posttranslational Modification)によって主に生じることありえない。A<sub>β</sub> 2-42の高い脳内濃度は病態生理学的に当を得たものである。とういのはアスパルタートの欠失がA<sub>β</sub> 1-42の凝集傾向を高め、このN-末端修飾が成熟 $\alpha$ -アミロイドブラークの結合を外見上先導するからである。

【0110】1.4 細胞培養実験及び動物実験でのA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロットを用いるAPP-代謝物の定量化

カルボキシ末端で短縮されたA<sub>β</sub>-ペプチドA<sub>β</sub> 1-37、1-38及び1-39を規則的にモルモット及び家ウサギの槽液体(cisternalen Liquor)中で検出することもできる。更に、その検出は成熟モルモットの海馬組織切片のホモジネート及び上澄み(短時間培養)中で行われる。

【0111】更に若いニワトリの新しいニューロンの(終脳の)初代培養を調製し、そしてこの場合もまたヒト液体中におけるように比較可能な相対分布を伴う5つのA<sub>β</sub>-ペプチドを上澄み中に遊離することを示すことができる。

【0112】5つのA<sub>β</sub>-ペプチド-及び付加的にA<sub>β</sub> 2-42-によって、神経膠腫症腫瘍細胞系(H4)の上澄み中に、ヒトAPP751がスウェーデン人の二重突然変異(human APP751<sub>sw</sub>)によって過発現することを検出することができる。 $\alpha$ -セクレターゼの潜在的な阻害剤であるプロテアーゼ阻害剤で細胞を処理した後、A<sub>β</sub> 1-40及びA<sub>β</sub> 1-42の公知の投与量依存減少と共にC-末端で短縮されたA<sub>β</sub>-ペプチドA<sub>β</sub> 1-37、1-38及び1-39の減少も検出することができる。更にA<sub>β</sub> 2-42の産生は阻害される。これに関連して、C $\alpha$ -短縮されたA<sub>β</sub>-ペプチド(特に明らかにA<sub>β</sub> 1-37)の産生は別の動力学を伴うA<sub>β</sub> 1-40及びA<sub>β</sub> 1-42と比べて、そしてより早く阻害されることが重要である。この効果は、その全濃度に対する個々のA<sub>β</sub>-ペプチド種の割合を考察することで特に明らかとなる。この際液体中でのA<sub>β</sub>-ペプチドの上記疾患特異的变化に対する重要な類似性が分かる。この類似性は液体中で百分率のペプチド割合を著しく敏感に感知することができることである。対応して $\alpha$ -セクレターゼ活性の異質性が変化の間5つのA<sub>β</sub>-ペプチドの相対的構成で表わすことができると推定することができる。これはイソホルム(isoform) 特異性 $\alpha$ -セクレターゼ阻害剤を識別する有効物質認知プロジェクトに適切である。

【0113】カルパイン阻害剤-1で導入遺伝子H4神経膠原病細胞培養を処理する場合、プロテアーゼ阻害剤の低い濃度でA<sub>β</sub> 1-42の上記初期(逆説)濃度増加を証明することができる。この場合A<sub>β</sub> 1-42の増加がA<sub>β</sub> 2-42の濃度増加と相関にないことが重要であ

る。この知見はA 1 - 4 2からのA 2 - 4 2の二次的産生に反して、A 2 - 4 2が組み合わせ - / - セクレターゼによって産生されることを証明する。ADにおいて脳ホモジネート中のA 2 - 4 2の明らかにかつ規則的に高められた濃度とADを患う患者の液体プローブ中のA 2 - 4 2の検出との関係で、ADにおいて - セクレターゼ ( B A C E ) の特定のイソホルムを過発現させるか又はADにおいて生理学的に産生するA 2 - 4 2を減少させて物質分解代謝させるかが問題である。

#### 【0114】2. 背景

ADの分子原則、痴呆症の新規医薬調合物及び神経化学の痴呆症診断方法に対するその関連性は、2つのまとまった操作に要約される (Wiltfang 等、1998及び2000)。

【0115】以前からヒト腰椎液体中でのA 1 - 4 0及びA 1 - 4 2 / 1 - 4 3の分析に関するその他のSDS - PAGE / 免疫プロット法は記載されている (Ida 等、1996)。しかしこの際A - ペプチドの識別は電気泳動分離によって行うことができないが、C - 末端選択性モノクロナール抗体によってプロット - 膜上で行われる。同時にA 1 - 4 2を分離前にプローブの濃縮によって濃厚にしなければならない。この濃縮は予めのSDS - 変性せずに行われる。このことはA 1 - 4 2の高い凝集傾向が原因となって方法上問題あると考えられる。A 1 - 4 0及び1 - 4 2の測定のために、この方法で分離される電気泳動を実施しなければならない。

【0116】A - SDS - PAGE / 免疫プロットに使用される多層緩衝系 (Wiltfang等、1991) は、蛋白質 (Laemmli, 1970)及びペプチド (Schagger及びvon Jago 30 w, 1087)に対する特定の緩衝系の利点を組み合わせる。対応して、このSDS - PAGE法を用いて蛋白質もペプチドも高い溶解性 (Auflösung) を伴う均質なポリアクリルアミド分離系中で分離することができる。更に、上記SDS - PAGE法の尿素バージョン (Wiltfang等、1991)の使用下でのA 1 - 4 0及びA 1 - 4 2の電気泳動分離が記載されている (Klafki等、1996)。阻害剤を用いてAPP - 分離酵素 (spaltender Enzyme) ( - セクレターゼ) で前処理された家族性ADの細胞培養実験でこの方法を使用した場合、生体内放射能標識されたA - ペプチドA 1 - 4 0及び1 - 4 2の検出によって種々の - セクレターゼがA 1 - 4 2の酵素による産生に関与することが示される (Klafki等、1996)。この系を変更した場合、A 1 - 4 2及びA 1 - 4 3の分離も実現することができる (Wiltfang等、1997)。上記方法の最大免疫学的検出感受性は50 pg A 1 - 4 2である。これはここに示した適用にとってまだまだ十分ではない。同時にここに提案された方法で分離ゲルマトリックスは付加的なN - 末端及びC - 末端で修飾されたA - ペプチドを分離するために最適化され 50

る。

【0117】このSDS - PAGEを第二分析法として等電点分画電気泳動 (IEF) と2D - PAGEとしての第一法において組み合わせることができる (O'Farrell, 1975; O'Farrell 等、1977)。したがって等電点及び有効な分子半径にしたがってポリペプチドと蛋白質の二次元分離は成功する。高い度合で支え固定化されたpH - 勾配 (IPG) の使用下で (Gorg等、1995; Gorg等、1997; Righetti及び Bossi, 1997) 等電点分画電気泳動は最小の負荷相異を明らかにすることができる。したがって2つ方法A - SDS - PAGE / 免疫プロットをAPP - 代謝物のポストトランスレーション修飾によって高い分離性分析にも使用することができる。同時に検出感受性は上記フェムトグラム (femtogramm) 範囲内に示すことができる。ポストトランスレーション修飾は特異的方法でA - ペプチドの凝集挙動を左右し、それによって病態生理学的にかつ診断上適合する (Thome等、1996; Thome J., 1996; Kuo等、1997; Russo 等、1997; Tamaoka 等、1997)。神経化学痴呆症診断にとって、選択的にN - 末端修飾されたA x - 4 2 / 4 3のA 1 - 4 2 / 4 3に対する割合が増加するが、N - 末端修飾されたA x - 4 0のA 1 - 4 0に対する割合は増加しないことが重要である (Tamaoka等、1997)。A - ペプチド測定に加えて、A - SDS - PAGE / 免疫プロットは、ADにおいて液体中で低下するのを測定するsAPPの定量化も可能にする (Sennvik 等、2000)。sAPPの測定に尿素含有分離ゲルコンパートメントを上記 (陰極性) 分離ゲルと尿素及びより大きな孔サイズの不在下で組み合わせる。

【0118】定量A - SDS - PAGE / 免疫プロットはAPP - 代謝物スペクトルの同時のかつ超感受性測定 (これはADの神経化学初期診断法及び病因に高い関連性を伴う) を可能にする。この方法はA - ペプチドの物質代謝又は物質分解代謝に関与する新規の薬品の動物実験による及び臨床の判定に基づいて使用することができる。

#### 【0119】3 材料及び方法

##### 3.1 A - SDS - PAGE

##### 3.1.1 材料及び試薬

Bio-RAD (リッチモンド, CA, 米国): Mini Protean II 電気泳動システム、アクリルアミド (Best.-No.161-0101), N, N' - メチレン - ビス - アクリルアミド (Best.-No.161-0201); Merk (ダルムシュタット、ドイツ): ペルオキシ二硫酸アンモニウム (AMPS, Best.-No.1201.1000), ブロムフェノールブルー (Best.-No.8122), 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Best.-No.1.09072.1000), 水酸化ナトリウム小片 p.A. (NaOH, Best.-No.6498), 活性炭 p.A. (Best.-No.1.02186.0250), サッカロース (Best.-No.1.07654.1000)。

【0120】Paesel+Lorei (ハナウ、ドイツ): トリス

ウルトラレイン(Tris ultra rein) (Best.-No.100840)。

【0121】Biomol (ハンブルグ、ドイツ)：ラウリル硫酸ナトリウム、ウルトラレイン、2×結晶(SDS、Best.-No.51430)、ビス-(2-ヒドロキシエチル)-イミノ-トリス(ヒドロキシメチル)メタン(ビス-トリス、Best.-No.50003)、N,N'-ビス-(2-ヒドロキシエチル)グリシンp.A.(Bicine,Best.-No.01848)；GibcoBRL/Life Technologies (カールスルーエ、ドイツ)：尿素(Best.-No.15716-012)；Serva (ハイデルベルグ、ドイツ)：N,N,N',N'-テトラメチルエチレン-ジ-アミン(TEMED、Best.-No.35925)；Sigma (シュタインハイム、ドイツ)：2-メルカプトエタノール(Best.-No.M-7154)；Bachem (ブベンドルフ、スイス)：A1-38、A1-40、A1-42；Forschungsinstitut fuer Molekulare Pharmakologie (ベルリン、ドイツ)：A1-33、A1-34、A1-35、A1-37、A1-39、A2-40、A2-42、A3-40、A3-42、A3p-40、A3-42；Amersham Pharmacia Biotech AB (バッキンガムシャー、英国)及びServa(ハイデルベルグ、ドイツ)：トリプシン阻害剤牛肺(Mr6500)、メルリチン(Mr2847)及びMet-Lys-ブラディキニン(Mr1320)をServaから取り寄せ、Amersham Pharmaciaの“低分子量(LMW)マーカーキット”に加える。LMWキットには下記のものと一緒に並べられる：ホスホリラーゼb(Mr94000)、ウシ血清アルブミン(Mr67000)、オボアルブミン(Mr43000)、カルボニックアンヒドラーゼ(Mr30000)、トリプシン阻害剤、大豆(Mr20100)及びラクトアルブミン(Mr14400)。

\*【0122】3.1.2ゲル組成及び電気泳動 SDS-PAGEをBio-Rad Mini Protean II電気泳動システムによって実施する。使用されるゲルコンパートメントの大きさは次の通りである：分離ゲルの長さ約54mm；収集ゲルの長さ約5mm(容量250µLに相当)；カムゲル(Kammgel)の高さ約12-15mm；ゲルの厚さそれぞれ0.50mm、ゲル幅それぞれ85mm。A2D-PAGE内の第二分析法のための分離及び収集ゲルはゲルの厚み1.0mmを伴う。

【0123】プローブ装填のために、15-鋸歯状プローブ装填カムを使用する(歯幅約3mm、歯間隔2mm)。カムゲル中の生じるプローブ装填室は約3×10mmをとる。最大プローブ装填量は、プローブ空洞の間に移動するのを確実に阻止するために10µLを超えてはならない。プローブを陰極緩衝液の充填後に下層となす。電気泳動：a)2時間以上一定の流速で12mA/0.5mmゲルの厚さ、b)第二分析法のゲル1.0mm：10分間60ボルト/1.0mmゲルの厚さ、1時間45分以上120ボルト/1.0mmゲルの厚さ。

【0124】分離ゲルコンパートメントにWiltfang等によるピシン(Bicin)/トリスSDS-PAGE法の尿素バージョンを使用し(Wiltfang等、1991)、設置されたアプリケーションを実施態様により変更する。表1に、ゲルコンパートメント用濃縮された緩衝液、陰極緩衝液、陽極緩衝液及びアクリルアミド基準溶液をまとめて示す。ヒト又は動物の生物学的プローブ中でAPP-代謝物及びA-ペプチドの最適化された分離のためのA-SDS-PAGE用ゲル組成を表2に示す。

【0125】

表1：A-SDS-PAGE用基準溶液及び緩衝液  
溶液 組成

分離ゲル緩衝液	1.6Mトリス、0.4MH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
収集ゲル緩衝液	0.8Mピストリス、0.2MH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
カムゲル緩衝液	0.72Mピストリス、0.32M Bicin
陰極緩衝液	0.2M Bicin、0.1MNaOH 0.25%w/vSDS
陽極緩衝液	0.2Mトリス、0.05MH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1%SDS	1%(w/v)SDS
10%SDS	10%(w/v)SDS
アクリルアミド/Bis	58.2%(w/v)アクリルアミド、
60%T/3%C <sup>1</sup>	1.8%(w/v)Bis
アクリルアミド/Bis	57%(w/v)アクリルアミド、
	所収保存する)Bis

<sup>1</sup> アクリルアミド基準溶液を35分間AG501-X8D混合床イオン交換体マトリックス(Bio-RAD、リッチモンドCA、米国)を用いて攪拌し、濾過し、室温で暗

【0126】

表2：A-SDS-PAGE用ジャムゲル、収集ゲル及び分離ゲルの組成

溶液	カムゲル 9%T/5%C	収集ゲル 9%T/5%C	分離ゲル 12%
T/5%C/8M尿素			
カムゲル緩衝液	2000 $\mu$ l		
収集ゲル緩衝液		2000 $\mu$ l	
分離ゲル緩衝液			2500 $\mu$ l
アクリルアミド / Bis 60%T / 3%C	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	
アクリルアミド / Bis 60%T / 5%C			2000 $\mu$ l
尿素			4.80g
1% (w/v) SDS	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	
10% (w/v) SDS			25
0 $\mu$ l			
H <sub>2</sub> O	600 $\mu$ l	600 $\mu$ l	全量10ml( 約1.51ml)
10% APS	24 $\mu$ l	24 $\mu$ l	40 $\mu$ l 26

3.1.3A - SDS - PAGE用プローブ調製

3.1.3.1 液体プローブの採取 8  $\mu$  l

2 -メルカプトエタノールを含むSDB-3のアリコート(表3)300  $\mu$  lをSpeed Vacを用いてエペンドルフプローブ容器1.5ml("safe lock")中で乾燥物質になるまで蒸発させ、使用するまで室温で保存する。液体プローブを分割し、エペンドルフプローブ容器中に乾燥物質として存在するSDS-SB-3によって別個に後処理する。

【0127】(a)得られたままの(nativ)凍結された液体

遠心分離された液体330  $\mu$  lをそのまま-80で1.5mlエペンドルフ容器中で凍結させ、保存する。解凍及び渦工程の後、液体300  $\mu$  l及び2.5%v/v2-メルカプトエタノールで存在するSDS-SB-3を採取し、渦工程の後5分間95で加熱する。次いでA-SDS-PAGEを行う。

(b)SDS-熱変性による前処理

乾燥物質として存在するSDS-SB-3を遠心分離された液体300  $\mu$  lで採取し、渦工程の後5分間95で加熱する(2-メルカプトエタノールは添加されない)。ついでSDS-熱変性された液体を-80で保存する。A-SDS-PAGEの前に、プローブを2.5%v/v2-メルカプトエタノールの添加後に新たに5分間95で加熱する。

\*【0128】(c)A-ペプチドの測定用液体プローブの蒸発

SDS-熱変性後、しかし2-メルカプトエタノールの添加前に、液体プローブ又はその他の生物学的プローブをSpeed Vacを用いて乾燥物質になるまで蒸発させ、100  $\mu$  l H<sub>2</sub>O及び2.5%v/v2-メルカプトエタノールで採取する(3倍濃縮)。A-SDS-PAGEの前に新たに95に5分間加熱する。

【0129】プローブ蒸発前にSDS-熱変性によって、蛋白質分解、A-ペプチドの沈降及び自動凝集を濃縮の間避けなければならない。

【0130】SDS-SB-3中の減少されたSDS-濃度が必要である。というのはより高いSDS-濃度はプローブの3倍濃縮後、約10  $\mu$  lの装填容量で、尿素含有分離ゲルの陽極末端でA-ペプチドの流動速度に悪影響を与えるからである。しかし同時にSDS-SB-3中で0.5%w/vのSDS-濃度はプローブの完全なSDS-熱変性にとってまだ十分に高い。

【0131】3.1.3.2その他の生物学的プローブの採取

プローブは液状で存在し(たとえば細胞培養上澄み、細胞ホモジネート)、A-ペプチド濃度は十分に高いので、容量単位プローブを2倍濃縮されたSDS-SB-2の容量単位で採取する(表3)。

\*【0132】

表3: プローブ採取用緩衝液の組成(SDS-SB)

試薬	SDS - SB - 1	SDS - SB - 2	
SDS - SB - 3			
ピストリス .120M	0.36M	0.72M	0
ピシン .053M	0.16M	0.32M	0
サッカロース 5.0%(w/v)	15.0%(w/v)	30.0%(w/v)	
SDS	1.0%(w/v)	2.0%(w/v)	

ブルー	0.004%(w/v)	0.008%(w/v)
v)	0.002%(w/v)	
プロテイナーゼ阻害剤		
カクテル錠剤		1錠剤/10
ml	27	28

3.1.3.3 免疫沈降 (5D)後のプロビエの直接採取  
 マグネットダイナビーズ (下記参照) を用いて固定された A P P - 代謝物を密閉洗浄容器内で煮る。10分間超音波浴中で SDS - S B - 1 又は SDS - P B - 3 (それぞれ 2 - メルカプトエタノール不含) の使用下で抗原結合から溶離する。2.5% w / v 2 - メルカプトエタノールの添加後 95 に 5 分間加熱する。SDS - P B - 3 を使用する場合は、ついでプローブを Speed Vac によって乾燥物質にまで蒸発させ、H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> を用いて採取することによってもう一度 3 倍濃縮することができる。

【0133】3.2 通常の A - 2 D - P A G E (担体両性電解質 I E F)

第一分析法の球形ゲル(rundgel) 中の担体両性電解質及び第二分析法の垂直の(vertikale) A - S D S - P A G E を Bio-Rad の Mini - Protean II 2 - D 細胞系を用いて実施する。

【0134】3.2.1 担体両性電解質 I E F 用材料及び試薬

Bio-RAD (リッチモンド, CA, 米国): Mini Protean II 20 細胞系、ガラス小管 (直径 (1 mm) アガロース (162 - 0017); Merk (ダルムシュタット, ドイツ): C H A P S (Best.-No.11662.0010), 水酸化ナトリウム小片 p.A. (NaOH, Best.-No.6498), プロムフェノールブルー (Best.-No.8122), リン酸 8.5% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Best.-No. \*

表 4 a : I E F - S B の組成

試薬	IEF - SB
尿素	8 M
C H A P S	0.27% (w/v)
N P - 40	0.13% (v/v)
Serval ty pH3-10(40%)	1% (v/v)
Serval ty pH4-7又はpH5-6	1% (v/v)

3.2.3 第一分析法 球形ゲル中の担体両性電解質 I E F

ガラス小管 (直径 1 mm) をゲル重合のために表 4 b からのモノマー溶液で満たす。I E F 球形ゲルを 60 mm の長さで重合する。I E F - S B 中で直接採取後のプローブ 20 μ L (10 μ L 液体 + 10 μ L I E F - S B) 40

表 4 b : 担体両性電解質 I E F - 球形ゲルの組成

溶液	容量	IEF - 球形ゲル
アクリルアミド / Bis (60%T/3%C)	89 μ l	
5.4%T/3%C		
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	280 μ l	

5.573/1000); Servalyt (ドイツ): Servalyt (R)

【0135】pH 5-6 (Best.-No.42924)pH 4-7 (Best.-No.42948)pH 3-10 (Best.-No.42951); Fluka (ブーヒス、スイス): Igepal CA 630 (NP 40, Best.-No.56741); GibcoBRL/Life Technologies (カールスルーエ、ドイツ): 尿素 (Best.-No.15716-012); Sigma (シュタインハイム、ドイツ): 2 - メルカプトエタノール (Best.-No.M-7154); Biomol (ハンブルグ、ドイツ): ラウリル硫酸ナトリウム、ウルトラレイン、2 x 結晶 (SDS, Best.-No.51430)、ビス - (2 - ヒドロキシエチル) - イミノ - トリス (ヒドロキシメチル) メタン (ビス - トリス, Best.-No.50003)、N, N' - ビス - (2 - ヒドロキシエチル) グリシン p . A . (Bicine, Best.-No.01848)。

【0136】3.2.2 担体両性電解質 I E F のためのプローブ採取

プローブ採取は I E F - S B で行われる (表 4 a)。乾燥物質及び M S P を用いてマグネット固定されたダイナビーズ (下記参照) を I E F 直前に I E F - S B で直接採取し、10分間超音波浴中で 37 でインキュベートする。プローブの採取のために、容量単位液体を容量単位 I E F - S B で採取し、10分間超音波浴中で 37 でインキュベートする。

【0137】

又は I E F - S B (表 4 a) 中で免疫沈降からの溶離液 10 μ L を装填し、陰極電解質で層状にする。ガラス小管のこの側を上記陰極電解質室と連結させる。担体両性電解質 I E F の陽極液及び陰極液の組成を表 4 b に示す。

【0138】

尿素	480mg	8M
2%(w/v)CHAPS	135 μ l	
0.27%		
2%(w/v)NP-40	65 μ l	
0.13%		
Servalty pH3-10(40%)	25 μ l	
1%		
Servalty pH5-6又はpH4-7	25 μ l	
1%		
1%(w/v)AMPS	20 μ l	
10%(w/v)TEMED	10 μ l	30

ついで以下のように室温で電気泳動担体両性電解質をE時 - 陽極液及び陰極液の組成集ゲル(上記参照)にのせ、IEF間、200V×11時間、500V×2時間、組成00 - アガロース溶液(表4d)でその位置に固定する。合V×1時間(430陰極液時間)。20mM NaOAcA - ペプチド又はMrマーカ-蛋白質の比較装填用

【0139】IEF後陽極液ゲルを水圧でガラス小瓶が。P<sub>4</sub>ロ-ーブバッグをテフロン<sup>(R)</sup>鋸で熱アガロース中で成ら排除し、5分間IEF - 平衡緩衝液(表4d)中で室形する。

温でインキュベートする。その後IEFゲルをA - S\* 【0140】

表4d: IEF - 平衡緩衝液及びIEF - アガロース溶液の組成

試薬	IEF - 平衡緩衝液	IEF - アガロース溶液
ピシン	0.16 M	0.16 M
ピストリス	0.36 M	0.36 M
SDS	1% (w/v)	1% (w/v)
ブロムフェノール ブルー		0.004% (w/v)

3.2.4 第二分析法: A - SDS - PAGE  
A - SDS - PAGEを表1及び2に記載したように  
行う(分離ゲル: 12%T/5%C/8M 尿素)。カムゲルを重合  
しない。使用される分離ゲルのゲルの厚みは1mmであ  
る。電気泳動を室温で行う: 10分/60V、90分/  
120V。

【0141】3.3 A - IPG - 2D - PAGE 20  
3.3.1 材料及び試薬  
GibcoBRL/Life Technologies (カールスルーエ, ドイ  
ツ): 尿素 (Best.-No.15716-012);Merk (ダルムシュタ  
ット, ドイツ): CHAPS (AMPS, Best.-No.11662.00  
10), ブロムフェノールブルー (Best.-No.8122), グリセ  
リン (100%) (Best.-No.1.04092.1000);Biomol  
(ハンブルグ, ドイツ): ラウリル硫酸ナトリウム、ウ  
ルトラレイン、2×結晶 (SDS, Best.-No.51430); S  
erva (ハイデルベルグ, ドイツ): Serdolit MB  
B - 1 (Best.-No.40701), Dithiotreitol (DTT, Best.-  
No.20710);Amersham Pharmacia Biotech AB (AB(パッキ  
ンガムシェアー, 英国): Pharmalyte pH3-10 (Best.-  
No.17-0456-01), Pharmalyte pH4-6.5 (Best.-No.17-04  
52-01), Immobiline DryStrip 70 ×3 ×0.5mm, pH4-7L \*

\* (Best.-No.17-60001-10);Sigma (シュタインハイム、  
ドイツ): ヨードアセトアミド (Best.-No.1-6125); Bi  
o-RAD (リッチモンド, CA, 米国): アガロース (162-00  
17)。

【0142】3.3.2 プローブ採取  
プローブ採取はIPG - SBで行われる(表5a)。乾  
燥物質及びMSPを用いてマグネット固定されたダイナ  
ピ-ズ(下記参照)をIEF直前にIPG - SBで直接  
採取し、10分間超音波浴中で37 でインキュベート  
する。液状生物学的プローブ: 混合床イオン交換体 (Se  
rdolit MB-1)の除去後、IPS - SBをエッペンドルフ  
プローブ容器中で分割し(たとえば100 μ L)、Sp  
eed Vacによって室温で蒸発させて乾燥物質とす  
る。乾燥物質として存在するIPG - SBをプローブと  
の容量割合1: 1で採取し(たとえば100 μ L)、渦  
工程(1分)後に10分間超音波で37 でインキュベ  
ートする。プローブの採取のために、容量単位液体を容  
量単位IEF - SBで採取し、10分間超音波浴中で3  
7 でインキュベートする。

【0143】

表5a: IEF - SBの組成

試薬	IPG - SB	IPG- 再水素添加溶液
尿素	9.0 M	8.0 M
Serdolit MB-1 (w/v)	1.0% (w/v)	1.0%
CHAPS	2.0% (w/v)	0.5% (w/v)

D T T

1 . 0 % (w/v)

1 . 0 % (w/v)

Pharmalyt<sup>®</sup> pH3-10(40%) 0 . 8 % ( v/v)

3 . 3 . 3 I P G - I E F 8 % ( v/v)

市販のIPG “Dry Strips”を用いるIEFは、製造者のプロトコルにしたがって行われる (Amersham Pharmacia Biotech / Kurzleitung 17-5009-57, Ausgabe AA, 99-04)。IPG “Dry Strips” (4-7、線状pH勾配、長さ7cm)を一晩室温で表5aからの再水素添加溶液の使用下でゲルの厚み0.5mmで再水素添加する。プローブ装填装置 (“サンプルカップ”)をIPG細片の塩基性部位 (ほぼpH6.5)の上にのせ (陰極性装填)、プローブ30μLを装填する。IPG-IEFを30分/300V、30分/800V、30分/1400V及び5時間/2000V (12500V×時間) 行う。

【0144】3.3.4

IPG-IEFの後、“Dry Strips”を2×10分間平衡させる (表5b)。第一平衡溶液はDTT (50mg/5ml)を含有し、第二溶液はゲルの銀色呈色 (Silberfaerbung)の際にさらに色の人工産物を生じる過剰DTTを中和するためにヨードアセトアミド (240mg/5ml)を含有する。ウエスタン-免疫プロットで、第二平衡工程は除かれる。平衡されたIPG “Dry Strips”をA-SDS-PAGEの収集ゲル上でアガロース溶液 (表5c)を用いて固定する。合成A-ペプチド又はMrマーカ-蛋白質の比較装填用プローブバッグをテフロン<sup>(R)</sup>鋸で熱アガロース中に置く。電気泳動は3.1.2に対応して行う。

【0145】

表5b: IPG-平衡緩衝液の組成

試薬	IPG-平衡緩衝液
尿素	6.0 M
Glycerol (100%)	20.0 % (w/v)
SDS	2.0 % (w/v)
ピストリス	0.36 M
ピシン	0.16 M

1. 軽い振とう下で室温で1% (w/v) DTTを用いてIPG-平衡緩衝液中で10分間。

【0146】2. 軽い振とう下で室温で4.8% (w/v) ヨードアセトアミドを用いてIPG-平衡緩衝液中で10分間。

【0147】

表5c: IPG-アガロース<sup>32</sup>の組成

試薬	IPG-アガロース溶液
アガロース	1.0 % (w/v)
SDS	0.25 % (w/v)
ブロムフェノールブルー	0.002 % (w/v)
ピストリス	0.36 M
ピシン	0.16 M

3.4 免疫沈降

3.4.1 材料及び試薬、抗体

Biochrom KG (ベルリン、ドイツ): HEPES (Best.-No. L1603), PBS Dulbecco, Ca<sup>++</sup>不含有、Mg<sup>++</sup>不含有 (Best.-No. L182-50); Merk (ダルムシュタット、ドイツ): 水酸化ナトリウム小片 p.A. (NaOH, Best.-No. 6498), 塩化ナトリウム (NaCl, Best.-No. 1.01540.0500); Fluka (ブーヒス、スイス): Igepal CA 630 (NP 40, Best.-No. 56741); ナトリウムデソキシコラート (Na-DOC, Best.-No. 30968); Biomol (ハンブルグ、ドイツ): ラウリル硫酸ナトリウム、ウルトラレイン、2×結晶 (SDS, Best.-No. 51430); Boehringer (マンハイム、ドイツ): プロテイナーゼ阻害剤カクテル錠剤、complate<sup>TM</sup> Mini (Best.-No. 1836153); Deutsche Dynal GmbH (ハンブルグ、ドイツ): Dynabeads<sup>(R)</sup> M280 Schaf anti-マウス IgG (Best.-No. 112.02); Biometra (ゲッチンゲン、ドイツ): Magnetic Separation Stand (MPS); Sigma (シュタインハイム、ドイツ): ウシアルブミン (BSA, Best.-No. A-4378), 2-メルカプトエタノール (Best.-No. M-7145), ナトリウムアジド (Na-Azid, Best.-No. A-2002); Paesel+Lorei (ハナウ、ドイツ): トリスウルトラレイン (Best.-No. 100840); Schering AG (ベルリン、ドイツ): mAb 1E8 (マウス IgG); Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc. (セントルイス、MO, 米国): mAb 6E10、僅かに少ないマウス IgG (Best.-No. 320-02)。

【0148】3.4.2 ダイナビーズM-280 (Schaf Anti-マウス IgG) の調製

懸濁液 (6.7×10<sup>8</sup> ビーズ/ml) 250μLを泡形成せずに十分に振とうし、3×5分PBS/BSA (0.01Mリン酸ナトリウム中に0.15M NaCl、0.1% w/v BSA) 1mlで洗浄する。Biometra (ゲッチンゲン、ドイツ) 社のMagnetic Separation Stand (MPS) 中のビーズを固定し、上澄みを除去する。

【0149】3.4.3 生物学的プローブの前処理

0.75容量単位のプローブを0.25容量単位の蛋白質阻害剤-カクテル基準溶液 (PI-基準溶液) で採取する。PI-基準溶液: H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> 1.5ml中で1錠のComplate<sup>TM</sup> Miniを溶解する。

【0150】3.4.4 直接IP-法を用いる磁性微粒子(“ビーズ”)のmAb-活性化  
 約 $1.675 \times 10^8$  “ビーズ”(予め調製されたビーズ懸濁液 $250 \mu\text{L}$ 、上記参照)をMSP中で $1.5 \text{ mL}$ のエッペンドルフカップで壁的に磁性固定させ、mAb $6 \text{ E } 107.5 \mu\text{g}$ (Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc.、セントルイス、MO, 米国)及びmAb $1 \text{ E } 810 \mu\text{g}$ (Schering AG、ベルリン、ドイツ)と共にPBS/BSA $250 \mu\text{L}$ 中で4で20時間インキュベートする。ついで $4 \times 30$ 分間PBS/BSA $1 \text{ mL}$ で洗浄し、最後に $250 \mu\text{L}$ のPBS/BSA/0.01%Na-アジド中で採取し、4で免疫沈降に使用するまで保存する。このように活性化されたビーズを述べるに値する容積損失なしに3ヶ月まで貯蔵することができる。生物学的プローブの免疫沈降に使用する直前、活性化されたビーズを $3 \times 3$ 分間、Na-アジド無添加のPBS/BSA $250 \mu\text{L}$ を用いて洗浄する。

【0151】3.4.5 ヒト液体からの免疫沈降  
 a) 界面活性剤不含有  
 活性化されたダイナビーズ(約 $1.675 \times 10^8$ ) $25 \mu\text{L}$ を液体/PI-基準溶液(液体 $200 \mu\text{L}$ +PI-基準溶液 $68 \mu\text{L}$ ) $286 \mu\text{L}$ と混合し、 $50 \text{ mM}$  HEPES-緩衝液(pH $7.4$ ) $732 \mu\text{L}$ を用いてエッペンドルフカップに $1 \text{ mL}$ を取る。インキュベーション\*

表6: RIPA緩衝液の組成

試薬	RIPA <sub>1x</sub>	RIPA <sub>0.5x</sub>
HEPES/NaOH pH 7.4 50mM	50mM	
NP40 .5%(v/v)	1.0%(v/v)	0
Na-デオキシコラート .25%(w/v)	0.5%(w/v)	0

【0154】3.4.5 SD<sub>5</sub> ヒト脳組織からの免疫沈降(R $0.1\%$ (w/v)を伴う細胞培養上澄み $800 \mu\text{L}$ )及び活性化されたIP<sub>1x</sub>-IP) $0.05\%$ (w/v)脳組織(約 $50 \text{ mg}$  Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> RIPA<sub>1x</sub>緩衝液(表6) $1 \text{ mL}$ と1と共にエッペンドルフ反応容器 $1.5 \text{ mL}$ 中で超音波フィンガーを用いて均質化物:  $10 \text{ mg}$  RIPA<sub>1x</sub>緩衝液 $10 \text{ mL}$ を装填する。 $0.000 \text{ g}$ で遠心分離を中止し、上澄みを取り、ホモジネート上澄みの蛋白質含量混合物R<sub>1x</sub>緩衝液を用いて $3 \text{ mg/mL}$ に調整し、ホモジネート $1 \text{ mL}$ を活性化されたダイナビーズ(約 $3.35 \times 10^7$  ビーズ) $50 \mu\text{L}$ と一緒に(a)に記載したように免疫沈降させる。RIPA<sub>1.0x</sub>緩衝液はプロテアーゼ阻害剤(表6)を含有する。

【0155】3.4.7 細胞培養上澄みの免疫沈降(RIPA<sub>0.5x</sub>-IP)  
 細胞培養液 $400 \mu\text{L}$ を5倍濃縮されたRIPA<sub>0.5x</sub>緩衝液 $100 \mu\text{L}$ (あるいはRIPA<sub>0.5x</sub>緩衝液 $200 \mu\text{L}$

\*Nを20時間4で振とうミキサー上で行う(プローブの一定の攪拌)。ついでビーズをMSP-スタンドで固定させ、上澄みを除去する。その後ビーズを $4 \times 5$ 分間、室温でPBS/0.1%BSA $1 \text{ mL}$ を用いて洗浄する。ついでビーズを $1 \times 3$ 分間、室温で $10 \text{ mM}$  トリス/HCl (pH $7.5$ ) $1 \text{ mL}$ 中で洗浄する。A-SDS-PAGEのために、磁性固定されたビーズのプローブ採取をSDS-PB- $125 \mu\text{L}$ を用いて5分間95で行う。A-2D-PAGEのために、IEF-SB又はIPG-SB $25 \mu\text{L}$ を用いて採取し、10分間37で超音波浴でインキュベートする。A-SDS-PAGEのために、液体容量 $32 \mu\text{L}$ 中に存在するプローブ $4 \mu\text{L}$ (A-ペプチド量に相当)を装填する。A-2D-PAGEのために、液体容量 $80 \mu\text{L}$ 中に存在するプローブ $10 \mu\text{L}$ (A-ペプチド量に相当)を装填する。

【0152】b) 界面活性剤(RIPA<sub>0.5x</sub>-IP)を用いる

液体 $200 \mu\text{L}$ を5倍濃縮されたRIPA<sub>0.5x</sub>緩衝液(表6) $200 \mu\text{L}$ と混合し、H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> $600 \mu\text{L}$ を用いてエッペンドルフカップに $1 \text{ mL}$ を取る。免疫沈降の実施は下記Aに記載する方法に相当する。RIPA<sub>0.5x</sub>緩衝液はプロテアーゼ阻害剤(表6)を含有する。

【0153】

【0154】3.4.5 SD<sub>5</sub> ヒト脳組織からの免疫沈降(R $0.1\%$ (w/v)を伴う細胞培養上澄み $800 \mu\text{L}$ )及び活性化されたIP<sub>1x</sub>-IP) $0.05\%$ (w/v)脳組織(約 $50 \text{ mg}$  Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> RIPA<sub>1x</sub>緩衝液(表6) $1 \text{ mL}$ と1と共にエッペンドルフ反応容器 $1.5 \text{ mL}$ 中で超音波フィンガーを用いて均質化物:  $10 \text{ mg}$  RIPA<sub>1x</sub>緩衝液 $10 \text{ mL}$ を装填する。 $0.000 \text{ g}$ で遠心分離を中止し、上澄みを取り、ホモジネート上澄みの蛋白質含量混合物R<sub>1x</sub>緩衝液を用いて $3 \text{ mg/mL}$ に調整し、ホモジネート $1 \text{ mL}$ を活性化されたダイナビーズ(約 $3.35 \times 10^7$  ビーズ) $50 \mu\text{L}$ と一緒に(a)に記載したように免疫沈降させる。RIPA<sub>1.0x</sub>緩衝液はプロテアーゼ阻害剤(表6)を含有する。

【0156】3.5 固定及び銀色呈色  
 3.5.1 試薬

Merk (ダルムシュタット、ドイツ): チオ硫酸ナトリウム5水和物 pA (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Best.-No.1.0651.6.0500)、炭酸ナトリウム pA (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Best.-No.1.06392.1000)、グリセリン緩衝物質 (Best.-No.1.04169.0250)、ホルムアルデヒドmin.37% pA (Best.-No.1.04003.1000)、グルタルジアルデヒド2.5% (Best.-No.8.20603.0100)、無水酢酸ナトリウム (Best.-No.1.06268.1000); Paesel+Lorei (ハナウ、ドイツ): 硝酸銀 p.A. (Best.-No.27-100-601); Zentralapetheke der

Universitaet Goettingen: エタノール99.9%、変性される。

【0157】3.5.2実施 A - SDS - PAGE 又は A - 2D - PAGE の後、ペプチド及び蛋白質を45分間室温でグルタルジア\*

\*ルデヒドを用いてボラート/ホスフェート緩衝液中でWiltfang等(Wiltfang等、1997)にしたがって固定する。銀色呈色をHeueshoven等(Heueshoven and Dernik, 1998)にしたがって少し変更して実施する(表7)。

【0158】

表7: グルタルジアルデヒド固定後の銀色呈色

溶液	時間(分)
冷たい(4℃) H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 30%(v/v)EtOH, 10%(v/v)Hac <sup>1</sup>	3 x 10
1 x 60 30%(v/v)EtOH, 0.5M 酢酸ナトリウム, 0.5%(v/v) グルタルジアルデヒド, 0.2%(v/v)Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 x 60
冷たい(4℃) H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 0.1%(w/v)AgNO <sub>3</sub> , 0.02%ホルムアルデヒド	3 x 15 1 x 60

<sup>1</sup> グルタルジアルデヒド固定後の0.02%ホルムアルデヒド; Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (サンフランシスコ、CA、米国); SemiPhor semi-dry transfer unit (Best.-No.80-6231086); Biochrom KG (ベルリン、ドイツ); PBS Dulbecco, Ca<sup>++</sup>不含、Mg<sup>++</sup>不含 (Best.-No.L182-50); Schering AG (ベルリン、ドイツ); mAb 1E8 (マウスIgG); Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc. (セントルイス、MO、米国); 精製されたmAb 6E10、少ないマウスIgG (Best.-No.320-02); Roth (カールスルーエ、ドイツ); Rotilack (Best.-No.A 151.1)。

【0159】3.6 ウェスタン - 免疫プロット 3.6.1 材料及び試薬、抗体 Paesel+Lorei (ハナウ、ドイツ): トリスウルトラレイン (Best.-No.100840); Sigma (シュタインハイム、ドイツ): ホウ酸 (ホウ酸、Best.-No.B-7901), ナトリウムアジド (Na - Azid, Best.-No.A-2002); J.T. Baker (Deventer, オランダ): メタノール (Best.-No.A 30-9263); BioRad Laboratories (Hercules, CA, 米国): フィルターペーパーエクストラディック (Best.-No.1703960)、無脂肪ドライミルク (Best.-No.170-6404); Millipore Coporation (ベッドフォード、MA、米国); Immobilon-P トランスファー膜 (Best.-No.IPVH0001)\*

【0160】3.6.2 ウェスタン - 免疫プロットの実施 A - SDS - PAGE 又は A - 2D - PAGE の後、トランスファーはセミドライウェスタンプロット及びPVDf検出膜上での多層緩衝系を用いて行われる。プロット緩衝液を表8にまとめて示す。

【0161】

表8: ウェスタン - 免疫プロット用プロット緩衝液の組成

試薬	プロット緩衝液A	プロット緩衝液B	プロット緩衝液C
トリス	0.21M	25mM	25mM
メタノール	30%(v/v)	30%(v/v)	
SDS			0.025%(v/v)

陽極から陰極へのプロットサンドウイッチの合成は次の通りである: 緩衝液Aを伴う濾紙、緩衝液Bを伴う濾紙及びPVDf-膜、ゲル及び10%の緩衝液Cを調整2つの濾紙。ゲルを電気泳動の直後に約10秒間緩衝液中でインキュベートする。濾紙として特に強い濾紙(BioRad社)を使用する。異なる製造元のPVDf-膜の検査後、Immobilon-P膜(Millipore社)が生じる。これは免疫プロットプロトコル内でA-ペプチド、特にA

10.442の最も僅かな目立たない着色及び最も有効な固定が得られる。Immobilon-P膜をメタノールの使用前に製造元の指示に対応して湿らし、ついで1分間H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>中でインキュベートし、ついで緩衝液B中に移す。トランスファーはA-SDS-PAGE(直径0.5mm)に対して30分間又はA-2D-PAGEゲル(直径1.0mm)に対して45分間室温で1nA/cm<sup>2</sup>によって行われる。

【0162】ウエスタンブロットの終了後、Immobilon-P膜を約30秒間H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>中で洗浄し、3分間マイクロウエル(Mikrowelle)中でPBS(トウイン不含)で煮る。この煮る工程は最大の検出感受性を実現させるのに重要である。

【0163】3.6.2.1免疫プロット-1(混合粉末-遮断工程)

免疫プロット-1に使用される緩衝液、溶液及び抗体を表9a及びbにまとめて示す。

・遮断工程：1時間、室温で4mlのPBS-T-M / 10 cm<sup>2</sup>膜。

・一次mAbとのインキュベーション：15時間、4で、ついで30分間室温でmAb 1E8の1：4000希釈(Schering AG, ベルリン、ドイツ)又はmAb 6E10の1：1000希釈(精製：Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc.(セントルイス、MO, 米国)中で0.074mlのPBS-T-M / cm<sup>2</sup>膜で(合成樹脂箔に流出、回転ミキサーで高い頻度の攪拌)。

・洗浄工程1：3×10分、室温でPBS-T(4ml / cm<sup>2</sup>)を用いて。

・二次mAbとのインキュベーション：1時間、室温で二次mAbの1：3000希釈(ビオチンanti-マウスIgG、馬、H+L; Vector Laboratories, パーミンガム、CA、米国)を用いて0.074mlのPBS-T-M / cm<sup>2</sup>膜で(合成樹脂箔に流出、回転ミキサーで高い頻度の攪拌)中で。

・洗浄工程2：洗浄工程1と同様。

・Streptavidin-Avidin強化：1時間、室温で“Streptavidinビオチン化ホースラディッシュ(西洋ワサビ)ペルオキシダーゼ複合体RPN1051”(Amersham、バッキンガムシャー、英国)の1：3000希釈を用いて0.26ml / cm<sup>2</sup>膜を伴うPBS-T中で(合成樹脂箔に流出、回転ミキサーで高い頻度の攪拌)。

・洗浄工程3：洗浄工程1と同様。

・ECL-展開：製造元の指示にしたがって5分間室温で0.1ml / cm<sup>2</sup>

ECL Plus<sup>TM</sup>溶液(RPN2132; Amersham、パ

表9a：免疫プロット用基準溶液

溶液	組成
PBS <sub>10x</sub> (10x濃度) ホスフェート	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 1000ml に対して 緩衝されていないNaCl 95.5g
PBS-T (PBS中にトウイン-20 0.075%v/v)	トウイン-20 75ml 全量 PBS <sub>1x</sub> 1000ml
PBS-T-M	ミルク粉末 2.5g 全量 PBS-T 100ml

表9b：免疫プロット-1及び-2用緩衝液、溶液及び抗体

免疫プロット工程	時間 (h)	ウエスタン - 免疫プロット - 1	ウエスタン - 免疫プロット

\*ツッキングムシャー、英国)。ついで過剰の試薬の除去(2つの箔濾紙間で5秒)及び新鮮に保たれた箔で湿った膜を包む。

【0164】3.6.2.2免疫プロット-2(Roti-Block)

免疫プロット-2に使用される緩衝液、溶液及び抗体を表9a及びbにまとめて示す。

・遮断工程：1時間、室温で25mlの1：10 Roti-Block / H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>。

・一次mAbとのインキュベーション：15時間、4で、ついで30分間室温でmAb 1E8の1：4000希釈(Schering AG, ベルリン、ドイツ)又はmAb 6E10はRoti-Blockと適合しない、高い目立たないシグナルによって制限される。

・洗浄工程1：3×10分、室温でPBS-T(4ml / cm<sup>2</sup>)を用いて。

・二次mAbとのインキュベーション：1時間、室温で二次mAbの1：3000希釈(ビオチンanti-マウスIgG、馬、H+L; Vector Laboratories, パーミンガム、CA、米国)を用いて0.074mlのPBS-T-M / cm<sup>2</sup>膜で(合成樹脂箔に流出、回転ミキサーで高い頻度の攪拌)中で。

・洗浄工程2：洗浄工程1と同様。

・Streptavidin-Avidin強化：1時間、室温で“Streptavidinビオチン化ホースラディッシュ(西洋ワサビ)ペルオキシダーゼ複合体RPN1051”(Amersham、バッキンガムシャー、英国)の1：3000希釈を用いて0.26ml / cm<sup>2</sup>膜を伴うPBS-T中で(合成樹脂箔に流出、回転ミキサーで高い頻度の攪拌)。

・洗浄工程3：洗浄工程1と同様。

・ECL-展開：製造元の指示にしたがって5分間室温で0.1ml / cm<sup>2</sup>

ECL Plus<sup>TM</sup>溶液(RPN2132; Amersham、バッキンガムシャー、英国)。ついで過剰の試薬の除去(2つの箔濾紙間で5秒)及び新鮮に保たれた箔で湿った膜を包む。

【0165】

非特異的結合 中で	PBS-T 中で	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
部位の遮断	1h 2.5%w/v ミルク粉末	10%v
<u>/vRoti-Block</u>		
一晚4で	a)mAb 1E8, ミルク粉末-	a)mA
b 1E8, 10%v/v		
一次mAb と	PBS-Tで1:4000; mAb 6E10	
, Roti-Block/H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> で		
インキュベーション	15h ミルク粉末-PBS-Tで1:1000	1
:4000		
洗浄工程	3 × 10分	PBS-T
<u>PBS-T</u>		

室温で二次Abと anti-マ インキュベーション	ビオチン化anti-マウス- 抗体、ミルク粉末 -PBS-Tで1:3000	ビオチン化 ウス-抗体、ミルク 粉末 40
-PBS-Tで 39		

3.6.3 デンシトメトリーフィルム判定による ECL 行われる。ついで平均値(N = 3)及び変動係数(V  
-シグナルの定量化) K)を算出する。イントラアッセイ-変動係数を、それ  
3.6.3.1 材料洗浄工程 3 × 10分 PBSを別の分離ゲルについて同一の実験で同一の基準溶液の  
Amersham Pharmacia Biotech AB (バッキンガムシャー 使用下に測定する3つの簡単な測定を用いて算出する。  
一、英国): ECL<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロット検出システ インターアッセイ-変動係数を、独立した実験(すなわ  
ム(Best.-No.RPN213)室温でStreptavidin ECL<sup>TM</sup>(Streptavidin-PC)との検査(Untersuchungstagen))で調べられたA  
No.RPN2103H); Schleicher und Schuell (ドイツ) 1-42 平均値を用いて測定する。  
ドイツ): ゲル-ブロットとインキュベーション(Best.-No.複合体、PESOT1中) 3回測定複合って調べられた域外値は2つ  
690); Tropix(ベドホ体、PBS-T, 中米国): Development の変動係数の算出で除かれない。すなわちすべての技術  
Folder, 14 cm × 17 cm (Best.-No.XF030); Biome 上評価できるA-ペプチドバンドは計算に取り込まれ  
tra(ゲッチング、ドイツ); BioDoc software 1:3000 る。 1:3000  
on Deutschland GmbH (デュッセルドルフ、ドイツ): 【0169】更に、A 1-40、A 1-42及びA  
レーザーキャナー 洗浄工程 GT9000 3 × 10分 PBS-T - 38 に関して、痕跡あたり3つのバンドの未修正  
【0166】3.6 S-B. 2 ECL-展開(ECL-Entwick 値(面積単位)を記入し、商として相互に関連する(A  
lung)t 1-42/A 1-40、A 1-42/A 1-3  
PBS-T 中で最後の洗浄工程後、PVDF-膜をテ 8)。  
フロン<sup>(R)</sup>土台上に置き、過剰の洗浄緩衝液を一締め KIMWIPES<sup>(R)</sup> Lite 200 Laborwischtaeucher の設置によ  
の除去する。5分間、室温で0.1 ml/cm<sup>2</sup> ECL Plus<sup>TM</sup>溶液を用いてインキュベートする。過剰の 20  
ECL Plus<sup>TM</sup>溶液を除去するために、2締めのゲル 【0170】ウェスタン-免疫プロット(一次mAb :  
-プロットングペーパー間に膜を置き、シグナル検出 1E8)後のECL-検出は、5分かけてHyperfi  
のために“Development Folder”に移す。これは最適な 定はレーザーキャナー(エプソンGT9000)及び  
検出を保証し、膜の乾燥を防ぐ。 評価ソフトウェア(Biometra社、BioDoc  
ソフトウェア)を用いて行われる。  
【0167】3.6.3.3 定量化 【0171】3.6.4 CCDカメラを用いてECL-  
それぞれ8 µLの液体プローブを装填する。各ゲルは合 シグナルの定量化  
成A-ペプチド1-40及び1-42の混合物の一連 3.6.4.1 材料及び装置  
の希釈を伴う(A 1-42:5、10、15、25 pg; A 1-40:20、50、75、100 pg)。 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, 米国): Flour-S  
測定を3回測定として実施する。A-ペプチド濃度の 算出は各ゲルに関してその検量系(Eichreihe)を用いて  
算出は各ゲルに関してその検量系(Eichreihe)を用いて

【0173】3.6.4.3実施  
それぞれ10 $\mu$ Lの液体プローブを装填する。各ゲルは合成A - ペプチド1-37、1-38、1-39、1-40及び1-42の混合物の一連の希釈を伴う(A 1-37:5、10、20、40、80pg; A 1-38:15、30、60、90、12pg; A 1-39:5、10、20、30、60pg; A 1-40:25、50、100、200、300pg; A 1-42:5、10、20、40、60pg)。CCDカメラを用いるECL検出は5、20、60及び120秒間の一連の露光時間によって80 $\times$ 80 $\mu$ mの分解(Aufloesung)で行われる。各ゲルそれぞれの検量系に相対してゲルの定量化のために、評価ソフトウェア“Quantity One”(Bio-Rad Laboratories社、Hercules, CA,米国)を使用する。

【0174】測定を4回測定として実施する。A - ペプチド濃度の算出は各ゲルに関してその検量系を用いて行われる。ついで平均値(N=4)及び変動係数(VK)を算出する。イントラアッセイ - 変動係数を、それぞれの分離ゲルについて同一の実験で同一の基準溶液の使用下に測定する4つの簡単な測定を用いて算出する。インターアッセイ - 変動係数を、独立した実験(すなわち日ごとの検査)で調べられたA 1-42平均値を用いて測定する。4回測定によって調べられた域外値は2つの変動係数の算出で除かれない。すなわちすべての技術上評価できるA - ペプチドバンドは計算に取り込まれる。

【0175】3.7若いニワトリの終脳初代培養  
ニワトリ種 White Leghornの卵を37 $^{\circ}$ でふ化棚で10週間かけてふ化する。10日目にニワトリ胚を滅菌条件下で取り出し、脳を遊離させる(freipraepariert)。前部下垂体を分離し、密着する髄膜を除き、HEPES - 緩衝されたDMEM中に集める。得られた組織を15分かけてトリプシンで消化させ、DMEMで3回洗浄した後、数回カニューレによって吸収する(aufziehen)。ホモジネートを550gで5分間の遠心分離した後、上澄みをデカンテーションし、ペレットを培地(DMEM+5%Fetal血清+5%ニワトリ血清)中に取り、新たにカニューレによって吸収する。Neubauer-Zählkammerを用いて細胞数測定の後、懸濁液の細胞密度を1.5Mio.細胞/mlに調整し、これを培養容器中に細胞密度375.000細胞/cm<sup>2</sup>が得られるよ

うに植菌する。細胞付着の改善のために培養容器に予め24時間かけてポリ-L-溶液(0.1Mボラート/NaOH - 緩衝液中にポリ-L-リジン0.1mg/mlで滅菌、pH8.4)を積層させる。培養2日目に、50%培地交換を行い、そして培養5日目に、被試験物質の同時の添加下で100%培地交換を行う。培養時間は48時間までであることができる。

【0176】3.8液体の取得  
3~10mlの腰椎液を腰椎液穿刺によって得、ポリプロピレンプローブ容器に入れる。遠心分離(1000g、10分間、4 $^{\circ}$ )後、プローブを24時間以内150 $\mu$ Lのアリコートとして測定まで-80 $^{\circ}$ Cでポリプロピレン容器(エッペンドルフ、1.5ml)中で保存する。プローブを何回も凍結し、解凍する必要がない。

【0177】3.9患者  
全体で患者130人の腰椎液を調べる。これらの患者のうち5人について、A - ペプチドをさらに血漿中で測定する。患者は2つの診断上部グループ(Obergruppe)、すなわち神経精神医学的疾患、専らアルツハイマー - 痴呆症(“神経精神医学的疾患調節”、NDC)及び臨床上恐らく(散發型)アルツハイマー - 痴呆症(AD)の患者に分ける。それぞれ別々の患者を伴う多数のNDC - 及びAD - グループを条件付きの方法で調べる。その場合相対する患者集団を連続のアラビア数字によるナンパーリングによって表わす(たとえばNDC - 1, AD - 1)。集団NDC - 1及びNDC - 2はADとは別の遺伝子の痴呆症の患者も含む。集団NDC - 3は非痴呆症神経精神医学疾患の患者しか含まない。この集団はZNS(“慢性炎症性CNS疾患”、CID - 3)の慢性炎症性疾患の患者と別の神経精神医学疾患(“その他の神経精神医学疾患”、OND - 3)の残りの患者に識別される。OND - 3グループとAD - 3グループ内で更にApoE 4遺伝子型にしたがって識別する。図1に、患者グループ及びその段階順の一覧を示す。表10a - dは多数の患者グループに同時にいる患者を挙げる。

【0178】表10a - d:共有の患者の振分け数(Schnittmenge)を含む集団の集計。NDC - 3<sup>KP</sup>はNDC - 3の完全な部分集団である。AD - 3<sup>KP</sup>はAD - 3の主たる部分集団である。

【0179】

【表1】

表 5 a)	<b>NDC1 (n=30)</b>
<b>NDC-2<sup>KP</sup> (n=10)</b>	振分け数 (n=2): NP55, NP57

表 5 b)	<b>NDC-3 (n=47)</b>
<b>NDC-3<sup>KP</sup> (n=15; NDC-3の部分数)</b>	振分け数 (n=15): NP213, NP344, NP345, NP352, NP355, NP356, NP364, NP374, NP402, NP412, NP419, NP421, NP457, NP490, NP 526

表 5 c)	<b>AD-1 (n=35)</b>
<b>AD-3 (n=12)</b>	振分け数 (n=3): NP37, NP52, NP66
<b>AD-3<sup>KP</sup> (n=11)</b>	振分け数 (n=3): NP52, NP66, NP69

表 5 d)	<b>AD-3 (n=12)</b>
<b>AD-3<sup>KP</sup> (n=11; 振分け数+ NP69/NP197)</b>	振分け数 (n=9): NP45, NP52, NP58, NP66, NP111, NP143, NP190, NP319, NP320

表 11 : フィルム露光による SDS - PAGE - プローブ緩衝液及び E L C - 検出でプローブの直接採取の後合成 A - ペプチドの A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 1 : インター及びイントラアッセイ変動係数

【 0 1 8 0 】

【 表 2 】

(1) A $\beta$ -Peptide	(2) (3)	
	Interassay-VK*	Intraassay-VK*
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (100 pg)	8,5	4,8
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (75 pg)	8,7	6,1
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (50 pg)	10,8	5
A $\beta$ <sub>1-40</sub> (20 pg)	15,4	8,8
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (25 pg)	10,9	11,1
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (15 pg)	11,7	16,5
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (10 pg)	19,6	16,4
A $\beta$ <sub>1-42</sub> (5 pg)	15,1	22,4
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (25pg/100pg)	6,9	7,5
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (15pg/75pg)	11	12,5
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (10pg/50pg)	15,6	14,3
A $\beta$ <sub>1-42</sub> /A $\beta$ <sub>1-40</sub> (5pg/25pg)	16,7	19,1

10

20

V K : 変動係数 ( MW / S D x 1 0 0 ; % ) ; 域外値

は除かれない。

【0181】(1) A - ペプチド、(2) インターアッセイ - V K<sup>\*</sup>、(3) イントラアッセイ - V K<sup>\*</sup>。

臨床診断は I C D - 10 にしたがって行われる。アルツハイマー痴呆症の診断は “Work Group of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS)” の国際的に主に使用される基準及び “Alzheimer's Diseases and Related Disorders Association (ARDA)” 指針にしたがって実施される (McKhann 等、1984)。プローブは専ら臨床の通常決まった診断内で得られる。ここに提示された測定に関して、更なる液体容量は取得しない。完成した通常の決まった診断にしたがって分割された液体を今まで通りに用いる場合、対応して遡及的 (retrospective) 検査しか行うことができない。

【0182】3.9.1 NDC - 1 及び AD - 1  
A - ペプチドを患者65人の腰椎液中で A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 1 及びデンストメトリーフィルム判定によって定量化する。予め液穿刺及び遠心分

離した後そのまま凍結されたプローブのプローブ採取は 3.2.2a にしたがって行われる。患者の診断法及び測定値を表12に示し、表13にまとめる。同時に別の集団にいる患者は表10a及び10cに見出される。

・ NDC - 1 : n = 30, 年齢 = 59.2 ± 12.6 (MW ± SD), 性別 : 19 / 11 (女 / 男)。

・ AD - 1 : n = 35, 年齢 = 69.2 ± 8.8 (MW ± SD), 性別 : 18 / 17 (女 / 男)。

【0183】AD - 110人及びNDC - 120人の患者を免疫沈降 (mAb 6E10、界面活性剤不含IP) 及び A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 1 によって比較試験する (表12及び13参照)。集団AD - 1のすべての患者を市販のELISA 1 - 42を用いて比較試験する (表13参照)。

【0184】表12 : NDC - 1 及び AD - 1 のヒト液体中の A - ペプチドの A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 1

【0185】

【表3】

(A) Diagnose	P-CDDE	D-Code	Alter (a)	Geschl. (c)	Ag-Abs (ng/ml)	AD-1 (ng/ml)	Ag-Abs (ng/ml)	AD-1 (ng/ml)	Ag-Abs (ng/ml)	AD-1 (ng/ml)
1	Tonisch-klonischer epileptischer Anfall	NP6	NDC	49	weibl.	10,24	1616,3	499,6	0,2895	0,4637
2	Tonisch-klonischer epileptischer Anfall	NP7	NDC	77	weibl.	12,97	1203,3	268,3	0,1863	0,295
3	Tonisch-klonischer epileptischer Anfall	NP9	NDC	71	männl.	14,71	2744,2	815,7	0,3406	0,6239
4	Entzündl. ZNS-Prozess unkl. Genese	NP10	NDC	72	männl.	13,21	2658,3	696,7	0,2998	0,42
5	Hämorrhagisch-ischämie	NP12	NDC	79	männl.	12,61	2579,2	604,2	0,2567	0,4065
6	Zerebrale Ischämie	NP13	NDC	69	weibl.	14,36	1970,4	312,8	0,1506	0,2356
7	Neuropathie unkl. Genese	NP17	NDC	61	weibl.	6,61	2009,2	669,6	0,2599	0,4919
8	Depression	NP21	NDC	69	weibl.	11	3217,5	736,3	0,4164	0,7197
9	Chlamydien-assoziierte Vasculitis	NP22	NDC	66	weibl.	6,01	1952,9	350,2	0,2785	0,6004
10	Depression mit psychotischen Merkmalen	NP25	NDC	67	weibl.	6,61	1844,2	362,1	0,2803	0,6099
11	Entzündl. ZNS-Prozess unkl. Genese	T17	NDC	37	weibl.	3,38	602,6		0,1023	0,2575
12	Akute organische Psychose	T27	NDC	42	männl.	2,93	1237,1		0,109	0,3376
13	Katatonie Schizophrenie	T28	NDC	42	weibl.	2,36	979,2		0,1041	0,3071
14	vesikuläre Demenz	T29	NDC	62	männl.	6,32	2631,3		0,2356	0,4547
15	Zerebrale Ischämie	T38, NP56	NDC	69	weibl.	7,28	3350,8		0,2498	0,4824
16	Katatonie Syndrom	T40, NP57	NDC	69	weibl.	3,19	1356,3		0,1267	0,3424
17	Parinson-Demenz-Komplex	A56	NDC	78	weibl.	10,36	734,2	230,4	0,0891	0,1446
18	Parinson-Demenz-Komplex	A185	NDC	74	männl.	5,5	1007,1	376,6	0,2123	0,4624
19	Pseudodemenz bei Depression	A209	NDC	36	weibl.	9,01	1475,8	619,5	0,2501	0,4627
20	Demenz bei subkortikaler Enzephalopathie	A266	NDC	68	männl.	7,48	699,6	222,5	0,076	0,1649
21	Parinson-Demenz-Komplex	A340	NDC	75	weibl.	10,32	1645,4	387	0,1608	0,2753
22	Parinson-Demenz-Komplex	A368	NDC	67	männl.	8,36	907,9	354,3	0,1114	0,209
23	Pseudodemenz bei Depression	A456	NDC	67	weibl.	4,9	1328,6	302,1	0,1428	0,3944
24	Parinson-Demenz-Komplex	A473	NDC	44	weibl.	6,6	1690,8	431	0,1633	0,4916
25	Parinson-Demenz-Komplex	A546	NDC	77	weibl.	6,1	1602,9	618,9	0,1919	0,4066
26	Parinson-Demenz-Komplex	A562	NDC	77	weibl.	10,79	2918,3	490	0,3774	0,8543
27	vesikuläre Demenz	T5	NDC	97	männl.	6,09	1040,6		0,1331	
28	vesikuläre Demenz	T13	NDC	73	männl.	4,85	646,7		0,0697	0,1237
29	Demenz bei Pick-Krankheit	T23	NDC	63	männl.	2,65	1084,2		0,1112	0,3901
30	vesikuläre Demenz	T24	NDC	61	weibl.	4,44	1248,8		0,1065	0,2968
31	Alzheimer-Demenz	A72	AD	60	weibl.	2,89	620	120,3	0,1301	0,4299
32	Alzheimer-Demenz	A130	AD	75	weibl.	6,02	611,7	131,4	0,0627	0,1799
33	Alzheimer-Demenz	A139	AD	63	weibl.	6,99	696,7	208,3	0,1204	0,2879
34	Alzheimer-Demenz	A193	AD	71	weibl.	2,44	274,6	336,2	0,0427	0,2047
35	Alzheimer-Demenz	A257	AD	67	männl.	6,86	615,4	296,6	0,0685	0,1535
36	Alzheimer-Demenz	A279	AD	66	weibl.	9,42	1868,6	363,5	0,1899	0,3681
37	Alzheimer-Demenz	A291	AD	61	weibl.	3,55	411,9	530,5	0,047	0,2108
38	Alzheimer-Demenz	A361	AD	76	männl.	6,85	654,6	599,1	0,0612	0,1525
39	Alzheimer-Demenz	A454	AD	69	männl.	11,67	706,3	287,6	0,123	0,2307
40	Alzheimer-Demenz	A477	AD	65	weibl.	27,84	1367,9	373	0,1784	0,3132
41	Alzheimer-Demenz	T1	AD	70	männl.	5,21	636,7		0,0626	0,1145
42	Alzheimer-Demenz	T2	AD	70	männl.	5,99	1106,8		0,0668	0,162
43	Alzheimer-Demenz	T3	AD	72	weibl.	4,53	440		0,0639	0,1542
44	Alzheimer-Demenz	T4	AD	68	weibl.	6,97	925,8		0,1153	0,2101
45	Alzheimer-Demenz	T6	AD	66	weibl.	5,66	486,1		0,081	
46	Alzheimer-Demenz	T7	AD	77	männl.	3,91	319,2		0,0361	0,0934
47	Alzheimer-Demenz	T8	AD	78	männl.	6,22	607,1		0,0607	0,1438
48	Alzheimer-Demenz	T9	AD	63	männl.	6,35	1844,2		0,192	0,3362
49	Alzheimer-Demenz	T10	AD	65	männl.	2,34	419,2		0,0746	0,1616
50	Alzheimer-Demenz	T11	AD	61	weibl.	4,85	481,3		0,0555	0,1032
51	Alzheimer-Demenz	T12	AD	76	weibl.	4,57	356,3		0,0535	0,1038
52	Alzheimer-Demenz	T14	AD	71	männl.	2,97	377,6		0,0656	0,2175
53	Alzheimer-Demenz	T15	AD	63	männl.	3,75	290		0,0506	0,1134
54	Alzheimer-Demenz	T16	AD	65	weibl.	4,21	615,8		0,0647	0,139
55	Alzheimer-Demenz	T18	AD	66	weibl.	6,66	542,9		0,0577	0,1007
56	Alzheimer-Demenz	T19	AD	76	männl.	4,03	669,6		0,0465	
57	Alzheimer-Demenz	T20	AD	82	weibl.	5,43	1628,3		0,1186	0,2001
58	Alzheimer-Demenz	T21	AD	69	weibl.	4,87	1036,3		0,0774	0,1445
59	Alzheimer-Demenz	T22	AD	66	männl.	2,33	780		0,0697	0,1393
60	Alzheimer-Demenz	T26	AD	78	männl.	4,43	735,4		0,0509	0,1012
61	Alzheimer-Demenz	T30, NP52	AD	68	weibl.	4,49	1065,6		0,0773	0,1607
62	Alzheimer-Demenz	T32, NP68	AD	66	weibl.	4,32	1208,7		0,0609	0,2132
63	Alzheimer-Demenz	T33, NP69	AD	65	männl.	1,93	476		0,0553	
64	Alzheimer-Demenz	T34, NP35	AD	76	männl.	3,77	300		0,0253	
65	Alzheimer-Demenz	T35, NP37	AD	70	männl.	3,56	378,8		0,0222	0,0624

免疫沈降後にA - SDS - PAGE / 免疫プロット。

【0186】面積単位の商。

(a) Diagnose = 診断。

(b) Alter = 年齢。

(c) Geschl. = 性別。

【0187】weibl. = 女。 maennl. = 男。

1~3: 強直間代性癲癇発作、4: 炎症性ZNS系、不明瞭な発生、5: ヒスタミン - 虚血、6: 大脳虚血、7: 神経障害、不明瞭な発生、8: うつ病、9: クラミジアが関連する脈管炎、10: 精神病性徴候のあるうつ病、11: 炎症性ZNS系、不明瞭な発生、12: 急性

気質精神病 (akute organische Psychose)、13: 緊張性精神分裂症、14: 血管性痴呆症、15: 大脳虚血、16: 緊張症候群、17及び18: パーキンソン - 痴呆症 - 複合症、19: うつ病での擬似痴呆症、20: 皮質下脳症、21及び22: パーキンソン - 痴呆症 - 複合症、23: うつ病での擬似痴呆症、24~26: パーキンソン - 痴呆症 - 複合症、27及び28: 血管性痴呆症、29: ピック病での痴呆症、30: 血管性痴呆症、31~65: アルツハイマー病 - 痴呆症。

表13: SDS - PAGE - プロブ緩衝液中でプロブの直接採取の後又は予め免疫沈降した後、NDC - 1及びAD - 1の腰椎液中のA - ペプチドのA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 1 (部分集団)。更にA

D - 1 の液体中の A<sub>1-42</sub> 濃度を市販の ELISA \* ターバル、(6) 中間、(7) 下位及び(8) 上位四分  
A<sub>1-42</sub> を用いて測定する： 位点、(9) 標準偏差。(1) 集団。

統計学的特有値：(2) 有効な N、(3) 平均値、 【0188】

(4) - 95% 及び(5) + 95% コンフィデントイン\* 【表4】

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
	Kollektiv	GBL. N	Mittelw.	Konfid. -95%	Konfid. +95%	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Stufabw.	
ALTER	AD	35	69,7	66,7	72,7	68,0	64,7	76,0	8,7	
	NDC	30	63,5	58,2	68,9	66,9	56,3	74,4	14,2	
Aβ <sub>1-40</sub> (ng/ml)	AD	35	5,6	4,1	7,1	4,6	3,7	6,0	4,4	
	NDC	30	7,6	6,2	9,0	6,6	4,9	10,4	3,7	
Aβ <sub>1-42</sub> (pg/ml)	AD	35	721,2	575,0	867,5	607,1	419,2	925,8	425,7	
	NDC	30	1677,5	1384,0	1970,9	1533,3	1040,6	2009,2	785,9	
Aβ <sub>1-42</sub> IP, (pg/ml) <sup>§</sup>	AD	10	320,7	215,0	426,4	317,4	206,3	373,0	147,7	
	NDC	20	457,5	380,4	534,6	411,6	356,1	557,8	164,8	
Aβ <sub>1-42</sub> ELISA <sup>1</sup> (pg/ml)	AD	35	412,4	361,1	463,7	371,0	316,0	445,0	149,3	
Aβ <sub>1-37</sub> (FE*)	AD	35	1031,8	794,0	1269,6	840,3	660,0	1243,3	692,3	
	NDC	30	1517,8	1173,1	1862,5	1299,7	759,7	2375,0	923,1	
Aβ <sub>1-38</sub> (FE*)	AD	35	3975,3	3445,1	4505,5	3931,7	2977,3	4907,7	1543,5	
	NDC	30	5123,3	4420,2	5826,3	5035,3	3421,7	6658,3	1882,8	
Aβ <sub>1-39</sub> (FE*)	AD	35	942,8	749,5	1136,2	923,0	545,7	1186,7	562,7	
	NDC	30	1389,1	1101,9	1676,2	1178,7	726,0	2115,0	769,0	
Aβ <sub>1-40</sub> (FE*)	AD	35	8499,1	7841,0	9157,3	8293,0	7545,5	9335,0	1916,0	
	NDC	30	9740,3	9007,0	10489,5	9689,8	8556,0	11384,0	1985,2	
Aβ <sub>1-42</sub> (FE*)	AD	35	732,7	539,7	925,6	563,3	416,3	811,7	561,6	
	NDC	30	2003,1	1556,7	2449,5	1864,2	908,7	2593,7	1195,5	
Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> **	AD	35	0,0803	0,0657	0,0948	0,0656	0,0535	0,0897	0,0424	
	NDC	30	0,1947	0,1603	0,2291	0,1848	0,1112	0,2569	0,0922	
Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>38</sub> **	AD	31	0,1847	0,1532	0,2163	0,1616	0,1145	0,2132	0,0861	
	NDC	29	0,3853	0,3302	0,4404	0,4065	0,2753	0,4919	0,1448	

§ 免疫沈降後に A<sub>1-42</sub> - SDS - PAGE / 免疫プロット (mAb 6E10)。

【0189】 面積単位、 \*\* 面積単位の商、 <sup>1</sup>Hulstae

rt 等、1999, Neurology 52: 1555-62. 表14: Ma

nn - Whitney U - テストによる患者集団 AD - 1 及び NDC - 1 の比較

【0190】

【表5】

	AD-1 (n)	NDC-1 (n)	p-Niveau
ALTER	35	30	0,1098
Aβ <sub>1-40</sub>	35	30	0,0055
Aβ <sub>1-42</sub>	35	30	1,23E-07
Aβ <sub>1-42</sub> IP <sup>§</sup>	10	20	0,0387
Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> *	35	30	4,77E-08
Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>38</sub> *	31	29	3,49E-07

§ 免疫沈降後に A<sub>1-42</sub> - SDS - PAGE / 免疫プロット (mAb 6E10)。

【0191】 面積単位の商。

【0192】 表15: 患者集団 AD - 1 及び NDC - 1

の識別に A<sub>1-42</sub> 及び固有の A<sub>1-42</sub> - ペプチド商に関 50

する診断特有値 (特異性、感受性、最大 Youden イ  
ンデックス、境界値濃度) の一覧

【0193】

【表6】

	(1) Grenzwert	(2) Spezifität	(3) Sensitivität	(4) maximaler Youden-Index
Aβ <sub>1-42</sub> (pg/ml)	802.5	0.74	0.87	0.61
Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> *	0.086	0.71	0.93	0.65
Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>38</sub> *	0.231	0.84	0.86	0.70

面積単位の商。

(1) 境界値、(2) 特異性、(3) 感受性、(4) 最大 Youden インデックス。

【0194】3.9.2 NDC - 2<sup>KP</sup>

患者10人において、A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 1 及びデンシオメトリフィルム判定によってプローブ前処理に従う A 1 - 4 0 及び A 1 - 4 2 の濃度を調べる。その際 A - ペプチドの冷却沈降 (KP) による低下の程度を調べる。患者のプローブを液穿刺及び遠心分離した後分ける。アリコートを凍結前に 3.2.2 a にしたがう SDS - / 熱変性で前処理する。以下 A 1 - 4 0 SDS 又は A 1 - 4 2 SDS と呼ぶ。別のアリコートを - 8 0 で前処理することなく\*

\*凍結させる。以下 A 1 - 4 0 nativ 又は A 1 - 4 2 nativ と呼ぶ。患者の診断及び測定値は表 1 6 a 及び 1 6 b にまとめて示す。同時に別の集団にいる患者は表 1 0 a に見出される。

・NDC - 2<sup>KP</sup> : n = 10 , 年齢 = 45.8 ± 13.4 (MW ± SD) , 性別 : 6 / 4 (女 / 男)。

【0195】表 1 6 a : 集団 NDC - 2<sup>KP</sup> の液体中の A 1 - 4 2 及び A 1 - 4 0 の A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 1 : 未処理の液体プローブの凍結後に冷却沈降 (nativ) 対 SDS - / 熱変性による前処理 (SDS) 。

【0196】

【表 7】

(1) Patienten	(2) Diagnose	Aβ <sub>1-42</sub> SDS** pg/ml	Aβ <sub>1-42</sub> SDS** pg/ml	Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> SDS**	Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> nativ** pg/ml	Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> nativ** pg/ml	Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> nativ**
NP51	1 Angsterkrankung	1543,0	7830,0	0,1971	856,3	7473,0	0,1146
NP53	2 Epilepsie	1888,0	7869,0	0,2399	1348,3	7714,0	0,1748
NP47	3 Horner-Syndrom	1588,7	7753,3	0,2049	991,7	7156,7	0,1386
NP48	4 Depression	1926,3	7911,3	0,2435	1128,0	6821,7	0,1654
NP54	5 Discusprolaps (BWS)	1387,3	5257,0	0,2639	1277,0	5032,7	0,2537
NP55	6 Zerebrale Ischämie	2578,0	7985,0	0,3229	1707,0	8103,7	0,2106
NP56	7 Depression	2183,3			1437,7		
NP57	8 Katatonies Syndrom	1477,7	4292,0	0,3443	1261,7	4744,3	0,2659
NP59	9 primär progrediente Demenz ungekl. Genese	2285,3	8377,7	0,2728	1734,7	7942,0	0,2184
NP60	10 Neurosarkoidose	965,7	6818,0	0,1416	653,0	6411,7	0,1018
MW		1782,3	7121,5	0,2479	1239,5	6822,2	0,1827
SD		457,1	1332,6	0,0592	328,8	1150,6	0,0553
VK		25,6	18,7	23,9	26,5	16,9	30,3

(1) : 患者、(2) : 診断。1 : 不安病、2 : 癲癇、3 : ホルナー症候群、4 : うつ病、5 : ディスク逸脱 (BWS)、6 : 大脳虚血、7 : うつ病、8 : 緊張症候群、9 : 不明瞭な発生の一次進行性痴呆症、10 : 神経サルコイドーシス。

表 1 6 b : 集団 NDC - 2<sup>KP</sup> に関する A 1 - 4 0 、 A 1 - 4 2 及び A - ペプチド商の絶対及び百分率の冷却沈降が原因の低下 (表 1 0 a に対する差異値表)

【0197】

【表 8】

Patients	Diagnose	$\Delta A\beta_{1-42}$	$\Delta A\beta_{1-42}\%$	$\Delta A\beta_{1-40}$	$\Delta A\beta_{1-40}\%$	$\Delta A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	$\Delta A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}\%$
NP51	1 Angsterkrankung	-686,7	-44,5	-357,0	-4,6	-0,0825	-41,9
NP53	2 Epilepsie	-539,7	-28,6	-155,0	-2,0	-0,0651	-27,1
NP47	3 Horner-Syndrom	-597,0	-37,6	-596,7	-7,7	-0,0663	-32,4
NP48	4 Depression	-798,3	-41,4	-1089,7	-13,8	-0,0781	-32,1
NP54	5 Discusprolaps (BWS)	-110,3	-8,0	-224,3	-4,3	-0,0102	-3,8
NP55	6 Zerebrale Ischämie	-871,0	-33,8	118,7	1,5	-0,1122	-34,8
NP56	7 Depression	-745,7	-34,2				
NP57	8 Katatonies Syndrom	-216,0	-14,6	452,3	10,5	-0,0784	-22,8
NP59	9 primär progrediente Demenz ungekl. Genese	-550,7	-24,1	-435,7	-5,2	-0,0544	-19,9
NP60	10 Neurosarkoidose	-312,7	-32,4	-406,3	-6,0	-0,0398	-28,1
MW		-542,8	-29,9	-299,3	-3,5	-0,0652	-27,0
SD		241,8	10,9	410,0	6,3	0,0272	10,2
VK		44,5	36,6	137,0	180,8	41,7	37,9

$A_{peptid}\% = (A_{peptid}^{Nativ} - A_{peptid}^{SDS}) / A_{peptid}^{SDS} \cdot 100$  : 負(正)の  $A_{1-42}$  又は  $A_{1-40}$  は、 $SDS$ - / 熱変性でプローブの前処理に対して、そのまま (nativ) 凍結された液体プローブの低下した (高められた)  $A$ -ペプチドを意味する。

(1) 患者、(2) 診断。1 : 不安病、2 : 癲癇、3 : ホルナー症候群、4 : うつ病、5 : ディスク逸脱 (BW S)、6 : 大脳虚血、7 : うつ病、8 : 緊張症候群。\*

\* 9 : 不明瞭な発生の一次進行性痴呆症、10 : 神経サルコイドーシス。

【0198】表17 : 冷却沈降に起因する  $A$ -ペプチドの低下の有意水準を、一対のプローブに対する Wilcoxon Test による集団  $NDC - 2^{KP}$  に関して測定する (表10a参照) :  $p - Niveau = p - 水準$ 。

【0199】  
【表9】

$A\beta_{1-42}^{SDS}$ versus $A\beta_{1-42}^{Nativ}$	$A\beta_{1-40}^{SDS}$ versus $A\beta_{1-40}^{Nativ}$	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}^{SDS}$ versus $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}^{Nativ}$	n
10	9	9	n
0,0051	0,0858	0,0077	p-Niveau

3.9.3 サブグループの  $NDC - 3$  及び  $AD - 3$  集団  $NDC - 3$  の患者 49 人及び集団  $AD - 3$  の患者 12 人を、 $A - SDS - PAGE$  / 免疫プロット - 2 及び CCD カメラによって腰椎液中の  $A$ -ペプチドの濃度を調べる。液穿刺及び遠心分離後そのまま凍結された 20 プローブの採取は 3.2.2 a にしたがって行われる。患者の診断及び測定値は表19に示し、表20にまとめて示す。同時に別の集団にいる患者は表10b、c 及び d に見出される。

・  $NDC - 3$  :  $n = 47$ , 年齢 =  $45.2 \pm 15.8$  (MW  $\pm$  SD). 性別 : 19 / 28 (女 / 男)。

\*  $AD - 3$  :  $n = 12$ , 年齢 =  $73.0 \pm 7.9$  (MW  $\pm$  SD), 性別 : 9 / 3 (女 / 男)。

【0200】表18a : CCD カメラを用いて Roti block 及び ELC - 検出の使用下で  $A - SDS - PAGE$  / 免疫プロット - 2 のイントラアッセイ - 変動係数。  $A$ -ペプチドをウエスタン - 免疫プロット (M1 - M4) 1つあたりそれぞれ数回装填する。(mean) Intraassay = (平均) イントラアッセイ。

【0201】  
【表10】

	50pg					20pg				
	$A\beta_{1-38}$	$A\beta_{1-40}$	$A\beta_{1-42}$	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-38}$	$A\beta_{1-38}$	$A\beta_{1-40}$	$A\beta_{1-42}$	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-38}$
Intraassay-VK M1	5,47	4,47	4,28	2,32	2,14	5,34	5,92	3,15	6,22	7,48
Intraassay-VK M2	6,19	4,05	5,90	4,02	4,68	4,41	8,88	8,97	3,67	7,92
Intraassay-VK M3	5,75	5,39	2,59	5,43	5,52	12,82	4,12	1,27	3,01	12,21
Intraassay-VK M4	6,16	6,79	2,87	4,28	4,53	2,20	4,90	4,86	2,63	5,27
Mean Intraassay-VK	5,89	5,18	3,91	4,01	4,22	6,19	5,95	4,56	3,88	8,22
SD Intraassay-VK	0,30	1,05	1,32	1,11	1,26	3,99	1,80	2,84	1,40	2,51

表18b : CCD カメラを用いて Roti block 及び ELC - 検出の使用下で  $A - SDS - PAGE$  / 免疫プロット - 2 のインターアッセイ - 変動係数。平均値はバックグランド補正後バンドの容量データ値を示し、

ウエスタン - 免疫プロット 1つあたり数回測定の平均値 (MW) に相当する (表20参照)。ウエスタン - 免疫プロット (M1 - M4) は独立して実施される電気泳動に相当する。Intraassay = インターアッセイ。Total Me

an = 全平均。  
【0202】

【表11】

	90pg					20pg				
	AD <sub>1-28</sub>	AD <sub>1-40</sub>	AD <sub>1-42</sub>	AD <sub>1-28</sub> /AD <sub>1-40</sub>	AD <sub>1-28</sub> /AD <sub>1-42</sub>	AD <sub>1-28</sub>	AD <sub>1-40</sub>	AD <sub>1-42</sub>	AD <sub>1-28</sub> /AD <sub>1-40</sub>	AD <sub>1-28</sub> /AD <sub>1-42</sub>
MW M1	46452,20	52114,60	28568,20	0,55	0,62	6817,50	7106,25	2963,50	0,42	0,44
MW M2	46415,80	51925,00	27217,20	0,52	0,59	6622,50	6774,00	3253,75	0,48	0,49
MW M3	51619,25	55606,75	30266,50	0,55	0,59	7430,75	7544,25	3028,00	0,40	0,41
MW M4	45169,00	50431,50	29304,00	0,58	0,65	7511,00	8251,60	3767,60	0,46	0,50
Total Mean	47414,06	52519,46	28836,98	0,55	0,61	7095,44	7419,03	3253,21	0,44	0,46
SD	2482,22	1897,91	1113,28	0,02	0,03	382,77	552,89	315,93	0,03	0,04
Interassay-VK	5,24	3,61	3,86	3,81	4,23	5,39	7,45	9,71	7,09	8,02

表19 : NDC - 3 及び AD - 3 のヒト液体中の A - ( 3 ) : 性別、( 4 ) : 診断。  
 ペプチドの A - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2 【0203】  
 ( 1 ) 及び ( 5 ) : P - コード、( 2 ) : 年齢、 【表12】



(転換神経症)発作、34:広場恐怖を伴う苦痛発作、35:脳性移行虚血発作、36:移行虚血発作を伴う真性赤血球増加症、37:癲癇、39:偏頭痛、40及び47:皮質下性動脈硬化性脳障害でのうつ発作、42:一次進行性失語症、45及び46:慢性炎症性ZNS-プロセス、48~59:アルツハイマー-痴呆症。集団NDC-3内で、プローブの種類及びプローブ前処理にしたがって別の検査を行う:一对の液体-及びEDTA血漿プローブをNDC-3のうちの5人から得る。このプローブを免疫沈降(RIPA-IP, 1E8)に10よって調べ、以下のIP-CSF-3及びIP-血漿-3が得られる。比較として、予め免疫沈降せずに測定されたA-ペプチドの濃度を集団SDS-CSF-3として後者の5人の患者に対してまとめて示す(表20参照)。

【0204】NDC-3患者27人で、液体中のA<sub>1-42</sub>の濃度を市販のELISA(Hulstaert等、1999)と比較して測定する。集団NDC-3内で、慢性炎症性ZNS疾患の患者(“chronic inflammatory CNS diseases”, CID)とその他の神経精神医学的疾患(“other neuropsychiatric diseases”, OND)の患者とを識別する。

・OND-3: n=37, 年齢=45.3±16.4 (MW±SD), 性別: 15/22(女/男)。

・CID-3: n=10, 年齢=44.9±14.2 (MW±SD), 性別: 4/6(女/男)。

【0205】CID-3集団は多発性硬化症の患者5人

及び慢性炎症性ZNS-プロセスの不明瞭な病因の患者5人から構成される。

【0206】集団OND-3はApoE<sub>4</sub>遺伝子型に依存してOND-3<sup>4<sup>plus</sup></sup>(n=6)及びOND-3<sup>4<sup>minus</sup></sup>(n=30)のグループでさらに識別される。グループOND-3<sup>4<sup>plus</sup></sup>の患者は1又は2個の対立因子<sub>4</sub>を伴い、グループOND-3<sup>4<sup>minus</sup></sup>の患者はこれらの対立因子を欠失する。AD-3患者11/12は1又は2個の対立因子ApoE<sub>4</sub>を伴うので、A-ペプチドの液体基準への対立因子<sub>4</sub>の影響は除かれないが、<sub>4</sub>は独立して、そしてしたがって多数のAD-特異効果を患者グループAD-3<sup>4<sup>plus</sup></sup>(n=11)とOND-3<sup>4<sup>plus</sup></sup>(n=6)との比較によって評価する。

【0207】患者のMMSEテスト結果に対する値、対立因子ApoE<sub>4</sub>の頻度並びに絶対及び相対A-ペプチド液体濃度を、グループNCD-3、AD-3、IP-血漿-3、IP-CSF-3及びSDS-CSF-3に関して表20にまとめて示す。

【0208】表20:固有のサブグループを伴う患者集団NDC-3及びAD-3の液体中のA-ペプチド、ApoE-遺伝子型化及びMMSEテスト結果(1):グループ、(2):患者数、(3):スコア中央値、(5):IP-血漿-3°。

【0209】

【表13】

Gruppen	Patienten	MMSE <sup>a</sup>	Aβ <sub>1-42</sub> <sup>b</sup> (pg/ml)		Aβ <sub>1-40</sub> <sup>b</sup> (pg/ml)		Total Aβ <sup>b</sup> (pg/ml)		Aβ <sub>1-42</sub> <sup>c</sup> (%)		Aβ <sub>1-40</sub> <sup>c</sup> (%)		Aβ <sub>1-42</sub> <sup>d</sup> (%)		Aβ <sub>1-40</sub> <sup>d</sup> (%)		Aβ <sub>1-42</sub> <sup>e</sup> (%)		Aβ <sub>1-40</sub> <sup>e</sup> (%)		n
			Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median	
NDC-3 <sup>a</sup>	47	30	0.720	1.230	2.763	1.416	11.622	2.067	16.656	6.721	15.024	7.311	59.786	10.933	0.184	0.725	0.251	37			
	28	29	0.545	1.119	2.440	1.107	9.319	1.660	16.664	6.438	14.367	6.861	59.206	9.977	0.167	0.627	0.238	9			
	19	30	0.813	1.602	3.489	1.766	14.240	2.880	24.447	7.268	15.972	7.668	60.908	11.581	0.166	0.802	0.272	1			
AD-3 <sup>b</sup>	12	16.0	n.a.	1.303	3.083	1.354	1.489	19.925	7.129	16.216	7.783	62.422	6.732	0.108	0.423	0.280	1				
	3	9.5	n.a.	1.022	2.412	1.149	1.912	16.069	6.383	15.450	6.796	61.536	5.766	0.063	0.353	0.241	11				
	9	22.5	n.a.	1.809	4.115	2.128	1.669	25.383	7.331	16.575	8.401	64.113	7.848	0.119	0.498	0.271	0				
IP-plasma-3 <sup>c</sup>	5	30	n.a.	0.064	0.047	0.050	0.330	0.080	0.540	5.877	8.722	9.161	61.804	14.568	0.237	1.708	0.142	4			
	3	29	n.a.	0.031	0.045	0.046	0.076	0.627	0.627	8.218	8.948	61.328	14.559	0.237	1.895	0.133	1				
	2	30	n.a.	0.037	0.057	0.057	0.384	0.091	0.628	6.185	8.769	9.410	61.714	14.861	0.241	1.762	0.143	0			
IP-CSF-3 <sup>d</sup>	5	30	n.a.	1.345	2.805	1.928	2.730	13.250	6.494	13.729	8.728	60.032	12.387	0.208	0.785	0.221	4				
	3	29	n.a.	1.272	2.688	1.544	2.041	12.192	6.104	13.562	7.882	53.550	10.786	0.173	0.793	0.218	1				
	2	30	n.a.	2.299	4.735	2.638	3.763	15.250	8.041	16.048	8.750	62.248	13.185	0.247	0.820	0.308	0				
SDS-CSF-3 <sup>e</sup>	5	30	n.a.	1.620	4.530	2.280	18.400	3.400	30.230	5.928	14.960	6.037	60.885	11.238	0.185	0.732	0.246	4			
	3	29	n.a.	1.230	3.300	1.940	14.240	2.380	25.020	5.351	14.330	7.556	59.541	10.434	0.171	0.722	0.232	1			
	2	30	n.a.	1.930	5.080	2.580	18.810	3.720	32.130	6.013	15.829	8.443	60.949	11.581	0.168	0.740	0.271	0			

n . a . : 得られない。 MMSEテスト結果はNDC-3患者47人のうちの5人にない。 <sup>1)</sup> A - ペプチド全濃度。

【0210】<sup>2)</sup>全濃度に対するA - ペプチド種それぞれの百分率割合。 <sup>3)</sup> A - ペプチド商。

<sup>a)</sup> 非痴呆の神経精神医学的コントロール患者。 <sup>b)</sup> アルツハイマー - 痴呆症。 <sup>c)</sup> Hulstaert 等、1999 Neurology 52:1555-62。 グループNDC-3の患者5人の一対の <sup>c)</sup> 血漿 / <sup>d)</sup> 液体プローブの <sup>c, d)</sup> 免疫沈降及びA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2。

【0211】<sup>e)</sup> 一対の血漿 / 液体プローブに関してN

DC - 3の患者5人の液体プローブのA - SDS - PAGE / 免疫プロットを伴うSDS - / 熱変性。 3 .

4 . 9 NDC - 3<sup>KP</sup>及びAD - 3<sup>KP</sup>

グループNDC - 3の患者15人及びグループAD - 3の患者10人において、腰椎液中の冷却沈降に起因するA<sub>1-42</sub>の低下 (KP) をA - SDS - PAGE / 免疫プロット - 2及びCCDカメラによって比較して調べる。 これらの集団を以下NDC - 3<sup>KP</sup>及びAD - 3<sup>KP</sup>と呼ぶ。 NDC - 3<sup>KP</sup>はNDC - 3の完全な部分集団である。 AD - 3<sup>KP</sup> (n = 1) は集団AD - 3の新規患者の他に付加的に2つの別の患者 (NP 69、NP 19

7)を伴う。A<sub>1-42</sub>nativ及びA<sub>1-42</sub>SDSの測定用プローブ前処理は集団NDC-2<sup>KP</sup>に関して記載したように行われる。

【0212】患者の診断及び測定値は表21にまとめて示す。同時に別の集団にいる患者は表10b、c及びdに見出される。

- ・NDC-3<sup>KP</sup> : n = 15, 年齢 = 44.6 ± 15.0 (MW ± SD), 性別 : 5 / 10 (女 / 男)。
- ・AD-3<sup>KP</sup> : n = 11, 年齢 = 70.9 ± 9.0 (MW ± SD), 性別 : 9 / 2 (女 / 男)。

\*【0213】表21 : CCDカメラ及びA<sub>1-42</sub>SDS-PAGE / 免疫プロット-2による液体中のA<sub>1-42</sub>の測定 : 集団NDC-3<sup>KP</sup>及びAD-3<sup>KP</sup>に関して未処理の液体プローブの凍結後に冷却沈降 (nativ) 対 SDS- / 熱変性による前処理 (SDS)。

【0214】(1)及び(5) : P-コード、(2) : 年齢、(3) : 性別、(4) : 診断。

【0215】  
【表14】

P-CODE <sup>(1)</sup>	Alter <sup>(2)</sup>	Geschlecht <sup>(3)</sup>	Diagnose <sup>(4)</sup>	D-Code <sup>(5)</sup>	MMSE <sup>*</sup>	Aβ <sub>1-42</sub> nativ <sup>*</sup> pg/ml	Aβ <sub>1-42</sub> SDS <sup>**</sup> pg/ml	ΔAβ <sub>1-42</sub> % <sup>§</sup>	ApoE <sup>§</sup>	
NP45	76	F	1	Alzheimer Demenz	AD	5	1464,00	1431,75	2,25	3/4
NP52	68	F	2	Alzheimer Demenz	AD	11	1586,00	1390,50	14,06	3/4
NP58	83	F	3	Alzheimer Demenz	AD	20	2074,00	1775,50	16,81	3/4
NP66	67	F	4	Alzheimer Demenz	AD	1	1498,25	1572,00	-4,69	3/4
NP69	62	M	5	Alzheimer Demenz	AD	n.a.	960,75	901,75	6,54	n.a.
NP111	84	F	6	Alzheimer Demenz	AD	15	2020,00	2182,50	-7,45	3/4
NP143	55	M	7	Alzheimer Demenz	AD	27	886,00	965,00	-8,19	2/4
NP190	79	F	8	Alzheimer Demenz	AD	19	657,50	716,50	-8,23	3/4
NP197	64	F	9	Alzheimer Demenz	AD	n.a.	699,75	825,00	-15,18	n.a.
NP213	32	M	10	Depressive Störung mit psychotischen Merkmalen	NDC (OND)	30	2066,50	2166,25	-4,60	3/3
NP319	72	F	11	Alzheimer Demenz	AD	28	872,25	913,00	-4,46	4/4
NP320	70	F	12	Alzheimer Demenz	AD	25	1551,25	1705,00	-9,02	2/4
NP344	36	F	13	Somatiforme (konversionsneurotische) Störung	NDC (OND)	28	2012,00	2688,00	-25,15	3/3
NP345	34	M	14	Panikstörung mit Agoraphobie	NDC (OND)	n.a.	2879,75	3788,75	-23,99	3/3
NP352	45	F	15	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung	NDC (CID)	29	4589,75	5878,75	-21,93	3/3
NP355	31	F	16	zerebrale transitorisch ischämische Attacke	NDC (OND)	30	4931,75	5266,75	-6,36	3/3
NP356	65	F	17	Polyzythämie vera mit transitorisch ischämischen Attacken	NDC (OND)	30	1285,50	2858,00	-55,02	3/4
NP364	58	M	18	Epilepsie	NDC (OND)	28	2450,25	2982,50	-17,85	2/3
NP374	43	M	19	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung	NDC (CID)	30	1562,75	3326,25	-53,02	3/4
NP402	66	F	20	Hemicranie	NDC (OND)	30	1714,50	3004,50	-42,94	3/4
NP412	48	M	21	Depressive Störung bei subkortikaler arteriosklerotischer Enzephalopathie	NDC (OND)	30	1560,25	2961,75	-47,32	3/3
NP419	46	M	22	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung	NDC (CID)	n.a.	1411,75	2154,50	-34,47	3/3
NP421	60	M	23	chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung mit primär progressiver Aphasie	NDC (CID)	30	2145,50	2967,75	-27,71	3/3
NP457	24	M	24	Depressive Episode bei bipolar effektiver Psychose, Typ I	NDC (OND)	30	2164,67	2156,67	0,37	2/3
NP490	20	M	25	chronisch entzündlicher ZNS-Prozeß	NDC (CID)	30	4349,50	4789,75	-9,19	3/3
NP526	61	M	26	Depressive Störung bei subkortikaler arteriosklerotischer Enzephalopathie	NDC (OND)	29	3397,00	3412,75	-0,46	3/3

A<sub>peptid</sub>% = (A<sub>peptid</sub>Nativ - A<sub>peptid</sub>SDS) / A<sub>peptid</sub>SDS \* 100 :  
負(正)の A<sub>1-42</sub>又はA<sub>1-40</sub>は、SDS- / 熱変性でプローブの前処理に対して、そのまま (nativ)凍結された液体プローブの低下した(高められた)A<sub>1-42</sub>-ペプチドを意味する。§ ApoE-遺伝子型化。

\* ミニメンタルステータス試験。 n.a. = 存在しない

い。1~9、11及び12 : アルツハイマー痴呆症、10 : 精神病徴候を伴ううつ障害、13 : 身体表現性障害(転換神経症)発作、14 : 広場恐怖を伴う苦痛発作、15、19及び22 : 慢性炎症性ZNS-疾患、16 : 脳性移行虚血発作、17 : 移行虚血発作を伴う真性赤血球増加症、18 : 癲癇、20 : 偏頭痛、21及び26 : 皮質下性動脈硬化性脳障害でのうつ発作、23 : 一次進

行性失語症、24：双極性情動精神病で精神病徴候を伴う躁病エピソード、タイプI、25：慢性炎症性ZNS - プロセス。

【0216】3.10統計(Statistik)  
独立した穿刺プローブ(Stichproben)間の有意差に対するテストをMann-Whitney-Uテストによって及び関連する(一対の)穿刺プローブに対してはWilcoxonテストによって行う。非パラメーター回帰分析はSpearmanにしたがって行われる(相関係数rho又はR)。統計ソフトウェアとして、Statistika(バージョン5.10)を使用する。種々のA - ペプチド境界値に依存して診断見解ADに対する診断特異性及び感受性のインタラクティブ計算を、“receiver operating characteristic (ROC) curve”(Metz, 1978)によって行う。2方向(zweiseitig)有意水準は $p < 0.05$ に固定する。

#### 【0217】4.結果

##### 4.1 sAPP 及びA - ペプチドの分離及び検出

##### 4.1.1 A - SDS - PAGE

A - SDS - PAGEを用いて次ぎの合成A - ペプチドを陰極(上)から陽極(下)への尿素誘発されたコンフォメーション変化によって分離する：

1 - 33 / 1 - 34

1 - 35

1 - 37

1 - 38

1 - 39

1 - 42 / 2 - 40 / 3 - 40

2 - 42 / 3 - 42

3p - 42 / 3p - 40

p = ピログルタマート誘導体

欠失又はほんの一部の分離されたA - ペプチドを一列に置く。検出を分離ゲルの銀色呈色によって行う。

【0218】A - SDS - PAGEによって、A 1 - 42からA 2 - 40 / 3 - 40を分離することができる。というのはアスパルタートの欠失が等電点をpH単位5.37から6.37付近に移動するからである(図2a&6c及び図24a参照)。

【0219】同一pH - 遷移はA 1 - 42に関連してA 2 - 42 / A 3 - 42に対して示す。2 - 40 / 2 - 42と3 - 40 / 3 - 42の間に、N - 末端で選択されるmAb s 1 E 8及び6 E 1 0を識別することができる(3.1.2参照)。注目すべきことはA - ペプチドのN - 及びC - 末端変化である。これは高められた凝集挙動を生じ(N - 末端：アスパルタート及びピログルタマート形成；C - 末端：疎水性アミノ酸の延長)、また尿素含有分離系での高められた電気泳動運動性を生じる。したがって試験管内及び生体内で構造活性官能基の間で相似が生じる。

【0220】比較として分離マトリックスの些細な変化

(ポリアクリルアミド孔サイズ、尿素のモル量、pH値、温度及びイオン濃度)及び陰極SDS - 濃度は、A - ペプチドの絶対及び相対流動挙動を有意に変化させる。これに対してその他は一定の条件でほんの1 - 2%程度のアクリルアミドモノマーの全濃度(T%)の変化又は全濃度に対するビスアクリルアミドの割合(C%)の変化で十分である。同様に8から7モル/lへの尿素濃度の選択的低下又は0.25%(w/v)から0.1%への陰極SDS - 濃度の低下は変化された分離を生じる。

【0221】A - SDS - PAGEによって上部(陰極)コンパートメントで尿素含有分離ゲル中でウエスタン - 免疫プロット - 1 / 2 (mAb 1 E 8)を用いて検出することができるsAPP を分離する(図3参照)。質量>100000の場合、sAPP イソホルムを検出膜上で小孔の尿素含有分離ゲルからA - ペプチドに比べて僅かに有効に、そして著しく大きい変化でプロットする(液体中でのイントラッセイ - 変動係数>20%)。

【0222】しかし尿素含有分離系がより大きい孔サイズの陰極性非尿素含有分離コンパートメントと、しかしそしての他は同一の緩衝液組成物と組み合わせされた場合(10%T、5C%、尿素不含)、sAPP イソホルムのプロット効率及び分離を著しく改善することができる。尿素含有分画の分離ゲルの長さが変わらない場合、A - ペプチド分離の特性は妨害されない。というのはA - ペプチドが大きい孔の分画を更に濃縮して“移動境界線(moving boundary)”内に通過させるからである。

【0223】A - SDS - PAGE / 免疫プロット及びCCDカメラを用いるsAPP の定量化は神経化学的痴呆症診断に期待をもたせる。というのはsAPP がADの場合液体中で低下するのが分り、 - セクレターゼ断片を生じるからである。したがってA - SDS - PAGE / 免疫プロットは、sAPP / A - ペプチド商( - セクレターゼと - / - セクレターゼの比率に対する尺度である)の計算を可能にする。

【0224】4.1.2 ウエスタン - 免疫プロット - 1 / 2

mAb 1 E 8はウエスタン - 免疫プロット - 1 / 2で驚くべきN - 末端特異性を示す。というのは下方のpg - 範囲でN - 末端がアミノ酸(アスパルタート)付近で最大に短縮されたA - ペプチドしか検出できないからである。対応してA - ペプチド3 - 40、3p - 40、3 - 42及び3p - 42をmAb 1 E 8によって検出することができない。この場合検出は市販されているN - 末端特異化されたmAb 6 E 1 0によって、しかしプロット条件に依存して、約20 ~ 30倍少ない感受性で検出することができる。

【0225】ウエスタン - 免疫プロット - 1の検出感受

性(ミルク粉末-遮断、mAb 1E8)はフィルム露光で1 pg (A 1-40)~2 pg (A 1-42)にあり、CCDカメラを用いるシグナル吸収で3 pg (A 1-40)~6 pg (A 1-42)にある。ウエスタン-免疫プロット-2の検出感受性(Roti-Block、mAb 1E8)はフィルム露光で0.3 pg (A 1-40)~0.6 pg (A 1-42)にあり、CCDカメラを用いるシグナル吸収で1 pg (A 1-40)~2 pg (A 1-42)にある。ウエスタン-免疫プロット-2の発達によってフィルム露光に比べて約3倍少ないCCDカメラの感受性を埋め合わせることができた。市販のN-末端選択性mAb 1E8の検出感受性はミルク粉末を用いるウエスタン-免疫プロットのフィルム露光で10 pg (A 1-40)~20 pg (A 1-42)にあり、CCDカメラを用いるシグナル吸収で30 pg (A 1-40)~60 pg (A 1-42)にある。mAb 6E10はRoti-Blockで使用することができない。したがって検出感受性はmAb 6E10に比べて30倍まで上げることができた。

【0226】ほぼすべての患者プローブにおいて最適の電気泳動分離が実現されねばならない場合、SDS-PAGE分離ゲル系に8M尿素を使用されるゲルサイズに関係なくゲル表面1mm<sup>2</sup>あたり最大約5μlで装填することができる。それはそのままの(nativ)凍結され、ついでSDS-ノ熱変性された液体又は凍結される前にSDS-ノ熱変性された液体である。1mm<sup>2</sup>あたり5μlは使用されるミニゲル系において約10μlの液体容量に相当する。したがって200pg/mlの感受性がA-SDS-PAGE/免疫プロット-2及びCCDカメラによるヒト液体中でのA 1-42の検出に対して生じる。少なくとも200pg/mlの検出感受性は液体でのA-ペプチド測定によってADの神経化学痴呆症診断に対する前提条件であり、これはたとえば市販のmAb 6E10を用いて実現することができない。

【0227】免疫沈降(RIPA-界面活性剤、mAb 1E8)とA-SDS-PAGE/免疫プロット-2及びCCDカメラの組み合わせはA 1-42の検出感受性を<10pg/mlに増加させる。これはA-SDS-PAGE/免疫プロットによる血漿中でのA-ペプチドの定量化に対する前提条件である。デンストメトリーフィルム判定を伴うA-SDS-PAGE/免疫プロット-1のイントラ-及びインターアッセイ変動係数は表11に示される。CCDカメラを伴うA-SDS-PAGE/免疫プロット-2の変動係数は表18a及びbに示される。A-ペプチド20pgの定量化に、それぞれ10%より少ないイントラ-及びインターアッセイ変動係数が測定された。

【0228】CCDカメラを用いる定量化はフィルム露

光に比べて著しい利点を有する。光シグナルは3.8の10乗(3.8 Zehnerpotenz)以上で線状で吸収され、さらにシグナル吸収の持続時間は広い範囲にわたって正確にコントロールすることができる。そのシグナル強度の大きい差異を有する対応してAPP-代謝物、たとえばsAPP 及びA 1-42を2つの測定時間(たとえば10秒及び3分)にわたって定量化することができる。

#### 【0229】4.2 患者プローブ

A 1-40及びA 1-42が規則的にかつより高い濃度でヒト液体中にあることは以前から周知である。これに反してSDS-ノ熱変性後の直接装填においても、N-末端選択性抗体の使用下で予め免疫沈降においても、A-SDS-PAGE/免疫プロット-1/2によってヒト腰椎液中の特有のA-ペプチド商を規則的に検出することができる(図3)。A 1-40の上方に(陰極側)3つの別のA-ペプチドを示す。これらは初めA 1-x<sup>a</sup>、A 1-x<sup>b</sup>及びA 1-x<sup>c</sup>として表示され、A-SDS-PAGE/免疫プロットによって合成A-ペプチドと組み合わせてA 1-37/1-38/1-39として識別することができた(図2)。A 1-37、1-38及び1-39は、液体中での1-40及び1-42に対するカルボキシ末端選択性免疫沈降でA-SDS-PAGE/免疫プロットによって検出することができない。A-ペプチド1-33、1-34及び1-35と共に、ヒト液体中のA-ペプチド1-37/38/39をMALDI-TOFによって検出することができた。A-ペプチド1-33、1-34及び1-35はA-SDS-PAGE/免疫プロットにおいて1-37の上方に(陰極側)患者の液体中に一般に検出限界でのみ検出されるか又は全く検出されない。図10から推論されるように、A-ペプチド1-37、1-38、1-39、1-40及び1-42は高い度合で及び有意に相関される。これはこれらの発生の狭い酵素調節を証明する。合成A-ペプチド1-37、1-38及び1-39は最初の患者集団(NCD-1、AD-1、NCD-2<sup>KP</sup>)の検査でまだ使用されない。したがってここでA 1-38に対するA 1-42の比率はデンストメトリーで測定された、ゲル痕跡のそれぞれのバンドの面積単位の商によって調べる。比較として、商A 1-42/A 1-40も面積単位によって表わす。A 1-38、A 1-40及びA 1-42がウエスタン-免疫プロットにおいて同一濃度及び同一条件でECL-シグナルの異なる強度を示すので、面積単位の商は標準度合以上で測定されたA-ペプチド濃度の対応する商と同等であるとみなすことはできない。

【0230】ADの患者の一部で、A 1-42の下方(陽極)でA-SDS-PAGE/免疫プロット-2及びDDCカメラによって付加的なバンドをA 1-4

2の回帰ファクター(Rf)を用いて検出することができる(図23a)。これらのバンドをADの液体中で予めの免疫沈降(RIPA-IP, mAb 1E8)後A-IPG-2D-PAGE/免疫プロット-2及びCCDカメラを用いてA 2-42として識別することができる(図24b)。非痴呆症のコントロール患者の場合、A 2-42は以前から検出されなかった。A 2-42は散発性ADの患者において典型的な脳領域分布でも脳内でかなり増加した(4.2.5参照)。3.9で述べた患者集団の液体中でA-ペプチドの側定のた

めに、合成A 2-42はまだ使用されない。対応してこれらの患者に関してA 2-42に対する定量データはない。しかしその間に別の患者集団は3.9でまだ述べられていない患者を評価する。AD-4の患者の2~3人において、AD以外の痴呆症患者(nAD-4)の2~3人において及び非痴呆症患者(NDC-4)の2~3人においてA 2-42は検出することができた。更に商A 1-42/A 1-40はA 2-42陽性患者において残りの患者に比べて著しく低下する。

【0231】4.2.1 NDC-1及びAD-1

表12に患者の臨床データ及び個々の測定値を、そして表13に患者集団AD-1及びNDC-1の統計学特有用値をまとめて示す。液体プローブの分析はA-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びデンシトメトリーフィルム判定を用いて行われる。

【0232】NDC-1に比べてAD-1の患者のヒト腰椎液中のA 1-42の顕著な低下は図4から明らかである。同様にA 1-40はAD-1の場合著しく低下するが、これらと同様な程度でA 1-42に関しては明らかではない(表14参照)。対応して商A 1-42/A 1-40も非常に著しく低下する(図5、表14参照)。商A 1-42/A 1-38の同様に非常に著しい低下は以前示されなかった(図6、表14)。グループ比較AD-3対NDC-3の境界値はA 1-42に関して測定され、そして2つの上記A-ペプチド商はそれぞれの“receiver operating characteristic (ROC)”によって測定される(表15)。A 1-42 1mlあたり802.5pgの境界値での患者集団AD-1対NDC-1の識別は、特異性74%及び感受性71%で実施することができた。商A 1-42/A 1-40は、集団AD-1対NDC-1の識別に対して診断特異性71%及び感受性93%を有した。商A 1-42/A 1-38の対応する特異性及び感受性は84%及び0.86%であった。

【0233】比較としてA 1-42を免疫沈降(界面活性剤不含IP, mAb 6E10)及びA-SDS-PAGE/免疫プロット-1の後デンシトメトリーフィルム判定を用いて調べた。図7及び表14から明らかのように、予めのIP後のA 1-42は、患者集団AD-1及びNDC-1を僅かに良好に識別した。免疫沈降

及びA-SDS-PAGE/免疫プロット-1の後デンシトメトリーフィルム判定を用いて測定された、AD-1の患者の部分集団の液体中のA 1-42濃度は、AD-1において市販のELISA A 1-42 (HuIstaert等、1999)を用いて測定された濃度と十分に一致した(表13)。同時にAD-1のELISA平均値(412pg/ml)はADのELISA中央値(428及び427pg/ml)に一致した。この中央値は国際マルチセンター研究所で測定されたものである(HuIstaert等、1999)。

【0234】測定法に依存して液体中のA 1-42濃度の比較(A-SDS-PAGE/免疫プロット-1を伴うSDS-/熱変性対A-SDS-PAGE/免疫プロット-1又はELISA A 1-42を伴う免疫沈降)は、SDS-/熱変性によって抗体依存法(免疫沈降及びELISA)に関するよりも著しく多いA 1-42が液体から抽出されることが明白となる。免疫沈降(界面活性剤不含IP, mAb 1E8)に比べて、SDS-/熱変性後、平均2.3倍及びELISA(界面活性剤不含)に比べて1.8倍高い、ADの液体中のA 1-42濃度が測定された。更に下記から、NDC-患者においてELISAとA-SDS-PAGE/免疫プロットの差異はより一層高いことが分かる。

【0235】4.2.2 NDC-3及びAD-3

表19に患者の臨床データ及び個々の測定値を、そして表20に患者集団AD-1及びNDC-1の統計学特有用値をまとめて示す。液体プローブの分析はA-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びCCDカメラを用いて行われる。

【0236】4.2.2.1 プローブ予備調製の方法に液体中のA-ペプチド濃度の依存

NDC-3集団の患者5人において、液体のアリコートと比較として予めの免疫沈降(RIPA-IP, mAb 1E8)を用いて又は直接のプローブ採取(SDS-/熱変性)を用いて調べる(表20参照)。SDS-/熱変性の後、僅かに高いA-ペプチド濃度が生じる。この作用はA 1-38及びA 1-42で強調されるが、有意水準に達しない。対応してプローブ前処理の2つの方法で、免疫沈降が界面活性剤を用いて行われた場合、同等のA-ペプチドレベルが液体中で測定される。これとは対照的に、市販のELISA A 1-42(界面活性剤不含)によるNDC-3患者27人の場合、CCDカメラを伴うA-SDS-PAGE/免疫プロット-2と比べて約3倍低いA 1-42レベルが測定される。

【0237】さらに上記したように、AD-1の患者集団に関して、免疫沈降を界面活性剤不含で実施した場合、免疫沈降(mAb 1E8)及びA-SDS-PAGE/免疫プロット-1を用いて明らかにより低いかつELISA A 1-42と同等の濃度が測定されるこ

とが示される(4.2.1参照)。

【0238】したがってヒト液体中のA<sub>1-42</sub>は分画(fraction)として存在し、モノクロナール抗体は界面活性剤による予めの処理なしに部分的にしか得られないという知見が生じる。

【0239】使用された界面活性剤は、非共有蛋白質-ペプチド結合(たとえば疎水性交換作用に起因する)からペプチドを遊離することができる。対応して、界面活性剤の使用(SDS-ノ熱変性、RIPA-IP)後界面活性剤の不使用方法(界面活性剤不含、ELISA A<sub>1-42</sub>)に比べて高められた液体レベルは、別の蛋白質又はA<sub>1-42</sub>-ペプチド凝集体へのA<sub>1-42</sub>の高い親和性結合及びエピトームマスクングによって恐らく左右される。界面活性剤を使用する場合、高められた濃度(0.5%w.v)及び温度(95℃)でのイオン型界面活性剤SDSの使用は、RIPA-界面活性剤混合物に比べて一層有効である。

【0240】さらに下記に示すように、A<sub>1-42</sub>はA<sub>1-40</sub>に比べて特に冷却沈降感受性であって、疾患特異的にAD及びNDCの患者で異なる冷却沈降挙動を示すことが検出される(4.2.4参照)。これに反して、同等の濃度で水に溶解された合成A<sub>1-42</sub>は明らかにより僅かな冷却沈降を示す。したがってヒト液体中での冷却沈降に起因するA<sub>1-42</sub>の低下は、ペプチドの凝集体結合割合に主に関係しないらしい。比較として疎水性凝集体(たとえばリポ蛋白質含有複合体)の場合、冷却沈降が原因の損失は驚くべきほどではないであろう。これに関連して、下記に示すように(4.2.4)、NDC-3KP集団の4陽性患者はA<sub>1-42</sub>のKPによる低下の格別高い割合を示し、4陽性AD-3KP患者とほぼ同一の低い液体レベルを有することが分かる。ほぼ同一の低いA<sub>1-42</sub>液体レベルは下記に示すようにグループOND-34Plus及びAD-34Plusの患者にも検出される。

【0241】4.2.2.2血漿中にA<sub>1-42</sub>-ペプチドCCDカメラを伴う免疫沈降及びA<sub>1-42</sub>-SDS-PAGE/免疫プロットによって、A<sub>1-42</sub>-ペプチド商を血漿中でも検出することができる。液体に比べて、血漿中の濃度は30~60倍少なく、2つの分画(Kompartimente)はA<sub>1-42</sub>-ペプチド百分率割合のそれぞれ特異的パターンを示す。とくに比率A<sub>1-42</sub>/A<sub>1-38</sub>はZNS-特異的に異なる:液体0.80(0.72-0.92)、血漿1.70(1.69-1.75);中央値(四分の一)。

【0242】4.2.2.3 液体中の疾患特異的A<sub>1-42</sub>-ペプチドパターン及びApoE遺伝子型の影響

図8に、A欄に患者グループOND-3、CID-3及びAD-3のヒト液体中のA<sub>1-42</sub>-ペプチド1-37/38/39/40/42の濃度を示す。B欄に、すべてのA<sub>1-42</sub>-ペプチドの合計に対するそれぞれのA<sub>1-42</sub>-ペプチ

ド種の百分率割合を表わす。明らかに異なる液体レベルを比較として示すことができるように対数表記を選ぶ。A<sub>1-42</sub>-ペプチドの液体濃度において、A<sub>1-40</sub>の次にヒト液体中に二番目に頻発するA<sub>1-42</sub>-ペプチドはA<sub>1-42</sub>ではなく、A<sub>1-38</sub>であることが注目される。さらにAD-3においてA<sub>1-42</sub>は低下する。調べられたグループのA<sub>1-42</sub>-ペプチド全体濃度は十分に同一である。これに反して集団間の実質上明白な相異はA<sub>1-42</sub>-ペプチドの百分率割合を考慮した場合に明らかである:

- ・CID-3及びAD-3はOND-3に比べてA<sub>1-38</sub>%及びA<sub>1-39</sub>%の増加した割合を示す。
- ・A<sub>1-40</sub>%はAD-3で高い有意性で増加し、
- ・A<sub>1-42</sub>%はAD-3で高い有意性で低下し、ADの患者を固有のA<sub>1-42</sub>-ペプチド濃度に比べて明らかに良好に識別する。

【0243】文献から、家族性AD型の場合 - セクレターゼ切断部位の付近でのAPP-P点突然変異で増加したA<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>が過発現し、これに反して - セクレターゼ切断部位の付近での突然変異で増加したA<sub>1-42</sub>が存在し、A<sub>1-40</sub>に対するA<sub>1-42</sub>の割合は明らかに増加することは公知である。したがってA<sub>1-42</sub>-ペプチドの百分率割合を考慮した場合増加した - セクレターゼ活性の疾患特異的变化が表わされると考えることができる。

【0244】図9A及びBに図8の記載されている様を下位グループOND-34minus、OND-34plus及びAD-34plusを比較する。液体中のA<sub>1-42</sub>-ペプチドパターンへの4及びAD-依存効果は識別することができる。OND-34minusに比べてOND-34plusの場合、傾向的に液体中のすべてのA<sub>1-42</sub>-ペプチドを低下させ、対応してA<sub>1-42</sub>-ペプチド全濃度も低下させる(図9A)。5つのA<sub>1-42</sub>-ペプチドのうち、A<sub>1-42</sub>の低下が特に明白である。これに反してAD-34plusの場合選択的にA<sub>1-42</sub>は当然OND-34plusにおける同一の程度に低下する。A<sub>1-42</sub>-ペプチド全量はこの際低下しない(図9A)。したがって4陽性NDC-3患者は4陽性AD-3患者の液体中のA<sub>1-42</sub>単独測定によって分けることができない。しかしこれはA<sub>1-42</sub>-ペプチド百分率割合によって可能である(図9B)。AD-34plusにおいてA<sub>1-42</sub>の選択的低下が原因でA<sub>1-42</sub>%が特に著しく低下し、集団AD-34plusはグループOND-34plus及びOND-34minusの交わることなくこれらのパラメーターによって分けることができる。同時にAD-34plusでのA<sub>1-40</sub>の百分率割合は特に著しく高い。

【0245】図10の相関マトリックスから明らかのように、液体中のA<sub>1-42</sub>-ペプチド商は狭く相互に関連し、

A - ペプチド及びその全濃度の百分率割合は生物学的パラメーターにとって非常に僅かな変動係数を有する。この知見は - 及び - セクレターゼによって5つのA - ペプチドの濃度の狭い酵素による調節を示唆する。これに関連して、更に下記に示しようにA 1 - 40及びA 1 - 42と共に - 及び - セクレターゼの合成阻害によってカルボキシ末端が短縮されたA - ペプチドの発生は特に著しく顕著に低下することが示される(4.5.2)。

【0246】4.2.2.4 A - ペプチド百分率割合 10の疾患特異的パターン：患者集団の個々のケースについて。

【0247】図11~13からA 1 - 38%、A 1 - 40%及びA 1 - 42%によってAD - 3及びCID - 3の患者とODN - 3の患者を識別することができることが明らかである。

【0248】図11は、AD - 3患者に関してA 1 - 38%とA 1 - 42%との間の有意な負の相関を示す。AD - 3患者143は回帰度の算出の際に考慮にいれず、この場合以下に示すように(図12&13参 20照)、域外値(Ausreisser)として識別する。临床上、これらの患者はADの初期段階(MMSE 27/30)を示す。鑑別診断上、病歴中でうつ性擬似痴呆症を論じる。

【0249】回帰度の矢印の方向に痴呆症の重さの度合は上昇する。A - ペプチドの百分率割合と痴呆症の重さの度合の間系について、更に以下に詳述する(図14&15参照)。A 1 - 42% = 8.5の境界濃度で、交わることなくAD - 3集団はグループCID - 3及びOND - 3から分離される。しかしADにおいて、A 30 1 - 38%とA 1 - 42%の間の特異的関係は、ADの患者がA 1 - 38%とA 1 - 42%の間の回帰度と同様に関数によってより一層良好に識別されうること示唆させる。これは神経化学的AD - 診断に直接関係する。というのは境界線としての回帰度によってたとえばA 1 - 42% = 9.5の患者は同時にA 1 - 38%の値が13.5である場合、回帰度から予測されるようにまだADとみなされるからである(図11参照)。対応して商A 1 - 38/A 1 - 40とA 1 - 42/A 1 - 38との間の下記に示される関係に対しても 40いえる(図16)。CID - 3集団の識別のための境界値濃度は次の通りである：A 1 - 38% = 15.5及びA 1 - 42% = 9.6%。この方法で患者6人がCID - 3として誤って分類される。これらの患者はそのコード番号によって識別される。これらの患者のうちの幾人(3/6)における臨床知見の正確な分析で遡及的慢性炎症過程がありうるということが注目される。

【0250】図12はA 1 - 42%に依存するA 1 - 40%を示す。これらのパラメーター間のAD - 特異的相関は有意である(患者143不含)が、僅かに密接

したい。痴呆症の重さの度合は矢印の方向に上昇する。

【0251】AD - 3に対する境界値濃度は次の通りである：A 1 - 40% = 63及びA 1 - 42% = 8.5。

【0252】図13はA 1 - 38に依存するA 1 - 40を示す。

【0253】境界値線A 1 - 38% = 15.5及びA 1 - 40% = 60.0は集団CID - 3に関係する。これらのパラメーター間のAD - 特異的相関は有意である(患者143不含)。痴呆症の重さの度合は矢印の方向に上昇する。境界値線A 1 - 38% = 16.0及びA 1 - 40% = 63は重い痴呆症のAD - 3患者を限定する。A 1 - 40% = 63以上のNDC - 3患者はおらず、この境界値線と回帰直線との交点は同時に境界値線A 1 - 38% = 16を予測されることが重要である。

【0254】図14からA 1 - 38% < 16.0又はA 1 - 40% > 63のAD - 3患者は主に重い痴呆症状(Demenzausgraegung)を示し(MMSE 10)、そうでなければ中程度~軽い程度の痴呆症の重さの度合(MMSE > 10)を示す。同時に2つの境界値を下回る又は上回る患者の場合この関係が特に顕著である(図14; 図13も参照)。

【0255】A - ペプチド百分率割合と痴呆の重さの度合の関係に対する相関マトリックスは図15に示される。有意な関係はA 1 - 37%及びA 1 - 40%に見られる。カルボキシ末端が短縮されたA - ペプチドのグループがA 1 - 40とは対照的に上記関係に対して正の相関係数を示すことは注目すべきである。液体中のA - ペプチドの絶対濃度と痴呆の重さの度合の間に、有意な関係はみいだされなかった。すなわちこの際疾患特異的関係はA - ペプチド百分率割合を顧慮した場合に初めて明らかとなる。

【0256】4.2.2.5 A - ペプチド商の疾患特異的パターン：患者集団の個々のケースについて。

【0257】A - ペプチド商A 1 - 38/A 1 - 40, A 1 - 42/A 1 - 38及びA 1 - 42/A 1 - 40は集団AD - 3, CID - 3及びOND - 3間の識別を示す。これは3つの患者集団を識別するために3つのA - ペプチドしか定量化する必要がないのが利点であるが、診断上の分離精度に一定の損失を生じる。したがって慢性炎症性ZNS - 疾患の患者の神経化学的痴呆診断及び識別のためにELISA - トリプレットを開発して提供する(A 1 - 38, A 1 - 40, A 1 - 42)。この方法(Ansatz)は界面活性剤依存プローブ予備調製と組み合わせねばならない(4.2.4参照)。

【0258】図16はA 1 - 42/A 1 - 38に依存するA 1 - 38/A 1 - 40を示す。ADの場

合、これらの2つのパラメーターの間の有意かつ特異的関係が生じる。回帰直線の矢印の方向に、痴呆症の重さは上昇する(図18参照)。境界値  $A_{1-38}/A_{1-40} = -0.5 (A_{1-42}/A_{1-38}) + 0.52$  以上で新たに患者143を域外値として識別する。残りのAD-3患者を正しく分類し、NDC-3患者は集団AD-3に誤って配属されない。境界値  $A_{1-38}/A_{1-40} = 0.26$  及び  $A_{1-42}/A_{1-38} = 0.57$  はCID-3集団に關係する。

【0259】図17は  $A_{1-42}/A_{1-40}$  に依存する  $A_{1-38}/A_{1-40}$  を示す。ADにおいてこれらの2つのパラメーターの間の有意かつ特異的関係を生じる。回帰直線の矢印の方向に、痴呆症の重さは上昇する(図18参照)。境界値  $A_{1-42}/A_{1-40} = 0.14$  以上でAD-3患者すべてを正しく分類し、NDC-3患者は集団AD-3に誤って配属されない。境界値  $A_{1-38}/A_{1-40} = 0.26$  及び  $A_{1-42}/A_{1-38} = 0.16$  はCID-3集団に關係する。

【0260】図18から、平均0.26より少ない  $A_{1-38}/A_{1-40}$  の商を有するAD-3患者は重度のADを示し(MMSE 10)、これに対してその他は痴呆症の中程度~軽い程度の重さの度合を示す(MMSE > 10)ことが明らかである。

【0261】4.2.3 NDC-2<sup>KP</sup>  
ADの患者で液体中の  $A_{1-42}$  の低下された濃度は以前から予めすでに凍結されたプローブ中に見出される。したがってまず集団NCD-2<sup>KP</sup>の患者に関して、液体中の  $A_{1-42}$  がその他のA-ペプチドに比べて冷却沈降に特に敏感であるかどうかを調べる。これに関連して、新たに得られた液体を分割する。1つのアリコート进行处理することなく-80で凍結させる。別のアリコートを用いて乾燥物質としてエッペンドルフ容器中にあるSDS-SBを採取する。このアリコートをSDS-熱変性後に凍結する。-80で少なくとも24時間保存した後、A-SDS-PAGE/免疫ブロット-1及びデンシトメトリーフィルム判定による比較分析を行う。アルツハイマー-痴呆症ではない神経精神医学のコントロール患者10人を調べる。これらの患者であらためて  $A_{1-40}$  及び  $A_{1-42}$  を調べることができる。ある患者で  $A_{1-40}$  のみを判定することができる。

【0262】表16aから、高い個体内変化を有する  $A_{1-42}$  に関して冷却沈降によってペプチドの割合が選択的に著しく失われることが明らかである。そのまま凍結された液体中の  $A_{1-42}$  の百分率割合(これは冷却沈降がSDS-熱変性での前処理によって制限されない場合に減少する)は次のように算出される:

$$\% A_{1-42} = \frac{([A_{1-42nativ}]_{conc.} - [A_{1-42SDS}]_{conc.}) / [A_{1-42SDS}]_{conc.} \times 100}$$

“-10”の%  $A_{1-42}$ の値は、たとえば  $A_{1-42}$  がそのままの液体の凍結によって生じる冷却沈降の故にSDS-熱変性での“保護的”前処理に比べて10%減少することを意味する。プローブを凍結の前に測定することができないので、プローブ中での冷却沈降の故に  $A_{1-42}$  の付加的な割合が減少することを排除することができず、これをSDS-熱変性での前処理によっても阻止することができない。

【0263】表16bから、  $A_{1-42}$  がそのままの液体の凍結後KPによって平均約30%減少することが明らかである(  $A_{42}\% : -29.9 \pm 10.9$ 、 $MW \pm SD$ ;  $p = 0.005$ )。  $A_{1-42}$  の観察される絶対及び百分率の最大降下は  $-798.3 \text{ pg}$  又は  $-44.5\%$  である。これに対して  $A_{1-40}$  の僅かな降下(  $A_{40}\% : -3.5 \pm 6.3$ 、 $MW \pm SD$ ;  $p = n.s.$ )は有意ではないが、対応して  $A_{1-42}/A_{1-40}$  の比率(  $A_{42}/40\% : -27.0 \pm 10.2$ 、 $MW \pm SD$ ;  $p = 0.008$ )は有意である。

【0264】4.2.4 NDC-3<sup>KP</sup>及びAD-3<sup>KP</sup>  
ついて患者集団NDC-3<sup>KP</sup>及びAD-3<sup>KP</sup>を用いて、液体中の疾患特異的相異が  $A_{1-42}$  の冷却沈降の点で示されるかを調べる。液体中の  $A_{1-42}$  の定量化はA-SDS-PAGE/免疫ブロット-2及びCCDカメラによって行われる。種々のプローブ前処理を集団NDC-2<sup>KP</sup>に対して示したように行う。

【0265】プローブ前処理に依存する  $A_{1-42}$  の濃度を2つの患者集団に対して表21にまとめて示す。

【0266】図19に、冷却沈降に依存する(  $A_{1-42nativ}$ )そのままの液体の凍結後の  $A_{1-42}$  濃度を示す。そのままの凍結された液体中の  $A_{1-42}$  の測定によって患者集団NDC-3<sup>KP</sup>及びAD-3<sup>KP</sup>は有意に分けることができる( $p = 0.0013$ )。それにもかかわらず図19よれば2つの患者集団が明らかに交わっている。それによればNDC-3<sup>KP</sup>患者6/15はAD-3<sup>KP</sup>集団の境界濃度(2100 pg/ml)以下の  $A_{1-42}$  液体レベルを有する。これに反して  $A_{1-42}\%$ の境界濃度を更に考慮に入れるならば( $-17\% \sim -20\%$ )、やっとNDC-3<sup>KP</sup>患者を誤ってAD-3<sup>KP</sup>集団に所属させる。同時にAD-3<sup>KP</sup>集団のすべての患者を正しく配属させる。冷却沈降に起因する  $A_{1-42}$  の低下はNDC-3<sup>KP</sup>で  $-24.6\% \pm 18.8$  ( $MW \pm SD$ )である。これはNDC-2<sup>KP</sup>患者に対する上記データと十分に一致する( $-29.9 \pm 10.9$ 、 $MW \pm SD$ )。その際新たにNDC-3<sup>KP</sup>患者において冷却沈降に起因する  $A_{1-42}$  の低下の程度に対してかなりの個体内変化が明らかになる。その場合、NDC-3<sup>KP</sup>患者において冷却沈降に起因する  $A_{1-42}$  の低下の程度を対立因子  $A_{poE-4}$  の存在によって十分に実質的に測定する: KPが原因であるA

1 - 4 2 の最高の低下を有する患者 4 人のうち患者 3 人は対立因子 ApoE 4 を保持する (図 19 参照)。  
 【0267】これに反して AD 患者は冷却沈降に起因する A 1 - 4 2 の低下をさほど示さず、図 19 から % A 1 - 4 2 値が 0 軸付近に広がることが明らかである ( $-1.6 \pm 10.2$ , MW  $\pm$  SD)。対応してグループ比較 NDC - 3<sup>KP</sup> 対 AD - 3<sup>KP</sup> は A 1 - 4 2 % に関して有意である ( $p = 0.0025$ )。患者の 9 / 11 が 4 陽性であるにも拘わらず、AD - 3<sup>KP</sup> での KP に起因する A 1 - 4 2 の低下はないことは注目される。さらに少なくとも 1 個の対立因子 4 を有する AD - 3<sup>KP</sup> 及び NDC - 3<sup>KP</sup> 患者はほぼ同一の低い A 1 - 4 2 液体レベルを有することが目立つ。この関係は更に集団 OND - 3 4 plus 及び AD - 3 4 plus の A 1 - 4 2 液体レベルの比較においても上記したように明らかである (4.2.2.3 参照)。  
 【0268】同時にこの 2 つの患者下位グループはその KP に起因する A 1 - 4 2 の低下の点で特に明らかに相異なる。これは 4 陽性 NDC - 3 KP 患者においても特に著しく、そして 4 陽性 AD - 3 KP 患者においてほとんど完全でない。したがって AD - 3<sup>KP</sup> 集団からの 4 陽性患者は NDC - 3<sup>KP</sup> 集団からの 4 陽性患者と対照的に凍結前の “保護的” SDS - / 熱変性にもかかわらず A 1 - 4 2 の低い液体レベルを有する。対応して 2 つの AD - 3<sup>KP</sup> 及び NDC - 3<sup>KP</sup> 患者集団は SDS - / 熱変性による前処理の後液体中の A 1 - 4 2 の測定 (A 1 - 4 2 SDS) によって著しく良好に識別することができる。図 20 からこの程度が確認される: KP に起因する A 1 - 4 2 の低下を “保護的” SDS - / 熱変性によって阻止することができる割合に減少させる。それによってその時 NDC - 3<sup>KP</sup> 患者は平均して明らかに高い A 1 - 4 2 液体レベル (A 1 - 4 2 SDS) を有する。これに反して AD - 3 KP での A 1 - 4 2 液体レベルは広範に変化せずに低く保たれる。  
 【0269】対応してグループ比較 NDC - 3<sup>KP</sup> 対 AD - 3<sup>KP</sup> の有意水準は、集団の識別において A 1 - 4 2 によって明らかに改善される ( $p = 1.81 \times 10^{-6}$ )。すべての NDC 患者 (15 / 15) 及び僅かに 1 人の AD 患者 (1 / 11) はその時 A 1 - 4 2 SDS = 2100 pg / ml の境界濃度以上にいる。  
 【0270】上述したように、この作用は NDC - 3<sup>KP</sup> 集団内の対立因子 4 のキャリアーで特に著しく顕著である。しかし図 19 及び 20 から、この作用が対立因子 4 の存在についてののみを測定しないことが明白である。同様にたとえば ApoE 遺伝子型 3 / 3 を有する個々の患者は、顕著な KP に起因する A 1 - 4 2 の低下を示す。この低下は凍結前に SDS - / 熱変性によって減少させることができる。まとめて次の A - ペプチド境界値を記載する: A 1 - 4 2 nativ = 2100 pg

/ ml & % A 1 - 4 2 = - 17% : すべての AD 患者 (11 / 11) を正しく分類し、NDC 患者 1 人 (1 / 15) を誤って分類する。A 1 - 4 2 nativ = 2300 pg / ml & % A 1 - 4 2 = - 20% : すべての AD 患者 (11 / 11) を正しく分類し、NDC 患者 2 人 (2 / 15) を誤って分類する。及び A 1 - 4 2 SDS = 2100 pg / ml & % A 1 - 4 2 = - 17% : AD - 3<sup>KP</sup> 患者 (10 / 11) を正しく分類し、どの NDC - 3<sup>KP</sup> 患者 (0 / 15) も誤って分類されない。A 1 - 4 2 SDS = 2300 pg / ml & % A 1 - 4 2 = - 20% : すべての AD - 3<sup>KP</sup> 患者 (11 / 11) を正しく分類し、NDC - 3<sup>KP</sup> 患者 2 人 (2 / 15) を誤って分類する。  
 【0271】A 1 - 4 2 SDS に加えて % A 1 - 4 2 の測定は神経化学 AD - 診断を恐らくさらに改善する: 2100 pg / ml の代わりに 2300 pg / ml の A 1 - 4 2 SDS 境界値で、NDC 患者 3 人 (3 / 15) が誤って、すべての AD 患者は正しく分類される。付加的に境界値 % A 1 - 4 2 = 20% を考慮した場合、NDC 患者 2 人 (2 / 15) しか誤って分類されず、すべての AD 患者は正しく分類される。したがって A 1 - 4 2 SDS 限界濃度を、同時に診断特異性を低下させることなく、200 pg / ml 増加させることができる。  
 【0272】KP に起因する A - ペプチドの低下に対する上記知見から以下の仮説を導くことができる: A 1 - 4 2 はヒト液体中で A 1 - 40 に比べて増加された分画中に存在し、KP - 依存して低下させることができる。界面活性剤の使用によって A 1 - 4 2 を少なくとも一部この分画から遊離することができ、KP に起因する低下を軽減させることができる。この A 1 - 4 2 結合分画は A 1 - 4 2 及び恐らく他の蛋白質 (たとえばリポ蛋白) の関与下で比較的疎水性のより高分子の複合体であると思われる。(脚注: A - SDS - PAGE / 免疫プロットによってヒト液体のゲル濾過 (SEC - FPLC) から分画を分析することによって、A 1 - 4 2 に関してかなりの割合が高分子分画に選択的著しく移行することを示すことができた。)  
 AD NDC とは対照的に の場合、A 1 - 4 2 は強い界面活性剤によってもほとんどこの分画から排除されない。このことはこの複合体の AD - 特異的組成を指し示す。この場合 AD の液体中の A 1 - 4 2 がプローブを界面活性剤処理後ただちに、すなわち予めの凍結なしに測定した時、特異的に低下することを予想することができる。したがってプローブは SDS 及びプロテアーゼの存在下に室温で界面活性剤処理の後 (3.1.3.1b, SDS - SB - 3)、測定するまで保存することができる。というのはこのプローブが自動凝集、沈降、非特異的プロテアーゼ活性及び微生物の生息から極めて有効に守られるからである。

【0273】あるいはADの液体が全体でより僅かのA 1-42を含有することでADのA 1-42低下が実質上制限されると推定することができる。

【0274】A 1-42のある複合体への高い親和性界面活性剤安定結合において、ペプチドはこの結合中で酵素による物質分解代謝をより一層抑制する。したがってこの複合体もまたアルツハイマー-痴呆症に対する薬剤の開発の目標である。というのはA -ペプチドとこの複合体の結合に競合する物質がA -ペプチドを酵素による物質分解代謝により一層供給されうからである。クロイツ-ヤコブ-痴呆症、別のアミロイド症又はZNSの蛋白質ホールディング疾患の患者の一部で液体のA 1-42の低下は、この複合体が2つの疾患で同等の組成を有することができることを示唆する。

【0275】上記の知見はADの初期診断又は症状発現前の診断にも適切である。この場合“保護的”SDS- /熱変性(A 1-42 SDS)にもかかわらず低いA 1-42液体レベルを示し、同時にKPに起因する僅かなA 1-42の減量によって際立つ患者がADの発病に格別高いリスクを有するかどうかの問題である。この問題提起は軽い認識障害の患者(ICD10F06.7)の将来性のある検査によって答えることができる。というのはこれらの患者が事例の30%まで2年以内にADを発病するからである。この場合1回の液穿刺は引き続き経過判定(Klinik, Neuropsychologie, Bildgebung)に十分である。というのはパラメーターの予測値が避的に測定できるからである。

【0276】したがって原則的に各々の患者において、液体プローブのA - (そのまま凍結された)及びB - アリコート(凍結前にSDS- /熱変性)が得られることを示唆する。場合によりプローブを個々のプローブの温度の調節下で標準化しながらたとえば0 に冷却するのが十分である。一般に上記の異なるプローブ前調製を液体中のA 1-42の測定のためにELISA法又は蛍光相関分光法(FCS)と組み合わせることもできる。

【0277】ヒト液体中のA 1-42の測定用BioSource社のELISAの検出感受性はたとえば10pg/mlである。この検出感受性はプローブ100µLの装填で測定前にSDS- /熱変性された液体を少なくとも5倍希釈することができる。生じる濃度0.1%SDS (w/v)は、本来の結果によればこのELISAで最初のフラグメント中に使用されるN-末端捕獲抗体(Fantikoerper)を妨害しない。同様にこのことはRIPA-IP内で使用されるN-末端選択的抗体mAb6E10に関しても裏付けることができる。

【0278】蛍光標識されたN-及びC-末端選択的抗体の使用下で交差相関(Kreuzkorrelation)するFCSの場合、このような凝集体内に結合するA -ペプチドシグナル強度は比例する。この際方法の感受性はSDS- /熱変性後のプローブをたとえば0.1%w/vのSD

S濃度に希釈することも可能にする。A 1-42がADの場合界面活性剤安定により高分子の凝集体に選択的に結合して存在すなければならない場合、液体プローブの界面活性剤による前処理によって測定の特異性を増加させる。といのはNDC患者のA -ペプチドがAD患者と対照的により高分子の凝集体から遊離されるからである。したがってNDC患者と比べてADの患者の場合界面活性剤処理後にFCS(交差相関)の蛍光シグナルの縮小された低下は神経化学的AD診断にとって重要である筈である。

【0279】4.2.5 ADの患者の脳ホモジネート、前頭側頭の痴呆症、レーヴィ小体痴呆症及びコントロール

ADの患者の脳組織(前頭側頭大脳皮質(frontotemporal cortex), 小脳)、前頭側頭の痴呆症(FID)、レーヴィ小体痴呆症(LBD)及び非痴呆症コントロールをRIPA界面活性緩衝液の存在下でホモジネートする(3.4.6)。ついで免疫沈降をRIPAの存在下に実施する。RIPA-界面活性剤中で抽出されたA -ペプチドの分画はA 1-38、A 1-40、A 1-42及びA 2-42を検出することができる(図21a, b)。A 2-42をMALDI-YOF分析によって直ちにプロット膜(データは示されず)、A -SDS-PAGE/免疫プロット-2(図23b)及びA -IPG-2D-PAGE/免疫プロット-2(図24c)から識別する。A 2-42をADの液体プローブ中で(図23a)及び細胞培養上澄み中でも検出する(図23a, 図28a, b)。

【0280】ADの患者は非痴呆症コントロール及びFTDの患者に比べてA 1-42及びA 2-42のかなりの増加が特徴である。この増加は前頭側頭大脳皮質中で小脳におけるよりもはるかに顕著である(図22)。LBDの患者は付加的に存在するアルツハイマー型-アミロイドプラークの数(これはCERAD分類によって認識される)に依存してA 1-42及びA 2-42の増加を示す(図21b)。LBD CERADの患者はLBD CERAD Cの患者よりも明らかに少ないA 1-42及びA 2-42を有する。

【0281】アルツハイマー-痴呆症の場合、A 1-38の比較的に高い濃度が特徴である(図21a, b)。同時にADでのA 1-38の組織特異性発現が注目される。というのは小脳で前頭側頭大脳皮質に相対してA 1-38が明らかに僅かであるか又は全く検出されず、そして更に数人の患者において以前は非特徴的なバンドがA 1-38の下方で測定されるからである(図22)。カルボキシ末端切断を-セクレターゼで行うので、-セクレターゼの場合により組織特異的に異なる発現が示唆される。ADでの別の脳領域に比べて小脳中に明らかに僅かなアルツハイマー型神経精神医学的变化が示されるので、この知見は精神生理学に重要で

あることができる。

【0282】RIPA - 抽出可能な脳調製物中でA<sub>2-42</sub>の極めて高い濃度(一部A<sub>1-42</sub>の高さ)は以前に記載されていなかった。数人の患者で、付加的にA<sub>1-40</sub>が比較すると著しく高い。

【0283】したがってA - SDS - PAGE / 免疫ブロットを痴呆症の神経精神医学的識別診断に使用することができ、そして場合により散発性ADのサブグループの識別に生化学の発現型化(Phaenotypisierung)に寄与することができる。

【0284】4.3家うさぎ及びモルモットの槽液体成熟モルモット(図25a)及び家うさぎ(図25b)の槽液体(cisternalerLiquor)中でもA - ペプチドA<sub>1-37/38/39</sub>をA<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>と共に検出することができる。プローブの凍結前の患者プローブと同様にSDS - / 熱変性を実施した場合、測定値の変化は明らかに低下する。このプローブ前処理は動物モデルとしてのモルモット及び家うさぎの使用下に有効物質認知プロジェクトに重要である。というのは特定の物質効果(たとえばセクレターゼ阻害)をこの方法で1つの処理グループ及びコントロールグループあたり明らかに少ない動物を用いてさえ検出することができるからである。

【0285】4.4 短時間培養による成熟モルモットの海馬組織フラグメント

短時間培養された成熟モルモットの海馬組織フラグメントにおいて、上澄み中のA<sub>1-37/38/39</sub>をA<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>と共に分離させ、細胞内で検出することができる(図26)。

【0286】4.5 細胞培養

4.5.1 若いニワトリの終脳初代培養

若いニワトリのA - ペプチドアミノ酸配列及びヒト配列は一致しているので、ニューロン性初代細胞培養系をワトリ胚の前脳のう胞(Vorderhinblaeschen)から作成する(3.7参照)。その際A<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>と共にC - 末端で短縮されたA - ペプチド1 - 37 / 38 / 39を細胞培養上澄み中に遊離させ、A - ペプチドの相対分布はヒト液体の分布と十分に一致する。

【0287】4.5.2 導入遺伝子APP751sw神経膠腫細胞系

比較として<sup>human</sup>APP751swが導入された神経膠腫細胞(H4)中でA - ペプチドパターン(A - peptidmuster)を調べる。図28a & bから、A<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>と共にC - 末端が短縮されたA - ペプチド1 - 37 / 38 / 39を細胞培養上澄み中に遊離することが分かる。更にA<sub>2-42</sub>を識別することができる。 / - セクレターゼ(Calpain-Inhibitor I & II, Calpeptin, MG 132, Leupeptin)の阻害で処理した後、A<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>と共にC - 末端が短縮されたA - ペプチド1 - 37 / 38 / 39及びN -

末端が短縮されたA<sub>2-42</sub>が減少される(図28a & b)。図28bはカルpain阻害剤 - 1下で投与量依存性低下を示す。

【0288】対応してA - ペプチド1 - 37 / 38 / 39が1 - 40 / 42に対するように組み合わせられた / - セクレターゼ切断によっても生じると考えられる。2 - 42の低下は / - セクレターゼ活性の阻害によってか又は連結されたN - 末端アミノペプチダーゼに対する減少された物質供給(A<sub>1-42</sub>)によって制限することができる(以下参照)。

【0289】図28a & bから、C - 末端が短縮されたA - ペプチド1 - 37 / 38 / 39はA<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>とは別の動力学(Kinetic)によって阻害されることが明白である。動力学の点での相異は特にA<sub>1-37</sub>に対して顕著である。この知見は、A - ペプチドパターンによって / - セクレターゼ活性の異種性が表わされることを示す。このことは選択的 / - セクレターゼ阻害剤の有効物質発現に重要である。更に文献から周知のA<sub>1-42</sub>の矛盾した増加が低い阻害濃度でA<sub>2-42</sub>の増加と相関しないことが注目になる。これはA<sub>1-42</sub>からA<sub>2-42</sub>の二次発生が偽りであることを証明する。

【0290】A<sub>1-37</sub>の発生に関して、別の代替物を考慮しなければならない。最近、中性エンドペプチターゼ(NEP)を組み合わせられた切断10 / 11及び37 / 38によってA - ペプチドの物質分解代謝に関与させることが記載されている(Iwata等,2000)。したがってA<sub>1-37</sub>はBASE - 切断及びNEP - 切断の組み合わせによって37 / 38を生じることができる。

【0291】略字リスト:

A : - ペプチド

AD : アルツハイマー痴呆症

APP : アミロイド前駆体蛋白質

FAD : 家族型AD、すなわち遺伝に起因する。

PS - 1 : プレセニリン1

PS - 2 : プレセニリン2

Bis : N, N' - メチレンビスアクリルアミド

Bicin : N, N' - ビス - [2 - ヒドロキシエチル] - グリシン

%T : 全アクリルアミドモノマー濃度(w/v)

%C : アクリルアミドモノマーの全量に対するBisの比率(w/w)

A - SDS - PAGE : - アミロイドラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動

A - 2D - PAGE : - アミロイド - 二次元 - ポリアクリルアミド電気泳動

IPG : 固定化pH勾配

A<sub>1-n</sub> : A<sub>1..n</sub>

5 . 文献

【0292】

Görg A., Boguth G., Obermaier C., Posch A. and Weiss W. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**, 1079-86.

Görg A., Obermaier C., Boguth G., Csordas A., Diaz J.J. and Madjar J.J. (1997) Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* **18**, 328-37.

Heukeshoven J. and Dernick R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.

Hulstaert F., Blennow K., Ivanoiu A., Schoonderwaldt H.C., Riemenschneider M., De Deyn P.P., Bancher C., Cras P., Wiltfang J., Mehta P.D., Iqbal K., Pottel H., Vanmechelen E. and Vanderstichele H. (1999) Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* **52**, 1555-62.

Ida N., Hartmann T., Pantel J., Schroder J., Zerfass R., Forstl H., Sandbrink R., Masters C.L. and Beyreuther K. (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* **271**, 22908-14.

Klafki H., Abramowski D., Swoboda R., Paganetti P.A. and Staufenbiel M. (1996) The carboxyl termini of beta-amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct gamma-secretase activities. *J Biol Chem* **271**, 28655-9.

Klafki H.W., Wiltfang J. and Staufenbiel M. (1996) Electrophoretic separation of betaA4 peptides (1-40) and (1-42). *Anal Biochem* **237**, 24-9.

Kuo Y.M., Emmerling M.R., Woods A.S., Cotter R.J. and Roher A.E. (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3- pyroglutanyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 188-91.

Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D. and Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939-44.

Metz C.E. (1978) Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* **8**, 283-98.

O'Farrell P., Goodman H. and O'Farrell P. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-41.

O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-21.

Righetti P.G. and Bossi A. (1997) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: recent analytical and preparative developments. *Anal Biochem* **247**, 1-10.

Russo C., Saido T.C., DeBusk L.M., Tabaton M., Gambetti P. and Teller J.K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett* **409**, 411-6.

Schagger H. and von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79.

Tamaoka A., Sawamura N., Fukushima T., Shoji S., Matsubara E., Shoji M., Hirai S., Furiya Y., Endoh R. and Mori H. (1997) Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 148, 41-5.

Thome J., Kornhuber J., Munch G., Schinzel R., Taneli Y., Zielke B., Rosler M. and Riederer P. (1996) [New hypothesis on etiopathogenesis of Alzheimer syndrome. Advanced glycation end products (AGEs)]. *Nervenarzt* 67, 924-9.

Thome J. M.G., Schinzel R., Kornhuber J., Blum-Degen D., Sitzmann L., Rösler M., Heidland A., Riederer P. (1996) Advanced glycation endproducts- associated parameters in the peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci* 59, 679-685.

Wiltfang J., Arold N. and Neuhoff V. (1991) A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* 12, 352-66.

Wiltfang J., Smirnov A., Schnierstein B., Kelemen G., Matthies U., Klafki H.W., Staufenbiel M., Huther G., Ruther E. and Kornhuber J. (1997) Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18, 527-32.

Wiltfang J., Otto M., Ruther E., Kornhuber J. (1998) Klinisch-chemische Früh- und Differentialdiagnostik der Alzheimer Demenz, *psycho* 24, 726-31.

Wiltfang J., Esselmann H., Smirnov A., Maler M.J., Bleich S., Otto M., Bibl M., Ruther E., Kornhuber J. (2000) Therapieansätze in der Alzheimer-Demenz, *Notfallmedizin* 26, 246-51.

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1はA<sub>β</sub>-ペプチドを液体又は血漿中でA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロットによって測定された患者集団のフローシートを示す。

【図2】図2は合成A<sub>β</sub>-ペプチド、ヒト液体及び合成A<sub>β</sub>-ペプチドが添加された液体のA<sub>β</sub>-IPG-2D-PAGE/免疫プロット-2(パネルA、C)及びにA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2(パネルB)を示す。

【図3】図3はA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2を用いてNDC-3での液体中でA<sub>β</sub>-ペプチドの測定及び尿素含有分離ゲル(パネルA)と尿素不含分離ゲル(パネルB)の比較を示す。

【図4】図4はA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びデンストメータフィルム判定を用いて測定された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>β</sub>1-42を示す。

【図5】図5はA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びデンストメータフィルム判定を用いて測定された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>β</sub>1-42/A<sub>β</sub>1-40を示す。

【図6】図6はA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-1及びデンストメータフィルム判定を用いて測定された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>β</sub>1-42/A<sub>β</sub>1-38を示す。

【図7】図7は免疫沈降(界面活性剤不含のIP、mAb 6E10)及びデンストメータフィルム判定と共にA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-1を用いて測定

された、患者集団NDC-1及びAD-1における液体中のA<sub>β</sub>1-42を示す。

【図8】図8はOND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2を用いて測定された、A<sub>β</sub>-ペプチド濃度を示す。

【図9】図9はApoE<sub>4</sub>対立因子のないOND-3患者(OND<sup>4 minus</sup>)に比べて1又は2個の対立因子ApoE<sub>4</sub>を伴う患者(AD-3<sup>4 plus</sup>, OND-3<sup>4 plus</sup>)を伴うグループOND-3及びAD-3の患者における液体中のA<sub>β</sub>-SDS-PAGE/免疫プロット-2を用いて測定された、A<sub>β</sub>-ペプチド濃度を示す。

【図10】図10はNDC-3における液体中のA<sub>β</sub>1-38及びA<sub>β</sub>1-40の相関及びA<sub>β</sub>-ペプチドの相関マトリックスを示す。

【図11】図11はOND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>β</sub>1-40%対A<sub>β</sub>1-38%を示す。

【図12】図12はOND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>β</sub>1-42%対A<sub>β</sub>1-40%を示す。

【図13】図13はOND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA<sub>β</sub>1-38%対A<sub>β</sub>1-40%を示す。

【図14】図14はA<sub>β</sub>-ペプチド全濃度に対するA<sub>β</sub>-ペプチド百分率割合に基づくAD-3における液体中のMMSEテスト結果のボックス-プロット(Box-Plot)。

【図15】図15はAD-3におけるA $\beta$ -ペプチド全濃度に対する液体中のA $\beta$ -ペプチド百分率割合に基づくMMSEテスト結果を示す。

【図16】図16はOND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA $\beta$  1-42/A $\beta$  1-38対A $\beta$  1-38/A $\beta$  1-40を示す。

【図17】図17はOND-3、CID-3及びAD-3における液体中のA $\beta$  1-42/A $\beta$  1-40対A $\beta$  1-38/A $\beta$  1-40を示す。

【図18】図18は商A $\beta$  1-38/A $\beta$  1-40に基づくAD-3における液体中のMMSEテスト結果のボックス-プロット(Box-Plot)を示す。

【図19】図19はA $\beta$  1-42%対NCD-3KP及びAD-3KPにおける、すなわち冷却沈降に起因するA $\beta$  1-42の低下に基づく液体中の先天因子A $\beta$  1-42(nativ)を示す。

【図20】図20：A $\beta$  1-42%対NCD-3KP及びAD-3KPにおける、すなわち冷却沈降に起因するA $\beta$  1-42の低下に基づく液体中のA $\beta$  1-42 SDSを示す。

【図21】図21のaはA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2：前頭側頭の痴呆症(FID)に比べてADの側頭大脳皮質(temporale Kortex)のホモジネートからのRIPA-可溶性A $\beta$ -ペプチドの免疫沈降物(RIPA-IP、mAb 1E8)を示す。図21のbはA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2：前頭側頭の痴呆症(FID)、レーヴィ小体痴呆症(LBD)及び痴呆でないコントロール患者(NDC)に比べてADの側頭大脳皮質のホモジネートからのRIPA-可溶性A $\beta$ -ペプチドの免疫沈降物(RIPA-IP、mAb\*30

\*1E8)を示す。

【図22】図22は合成A $\beta$ -ペプチドA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2：種々の脳領域の脳ホモジネートからのADのRIPA-可溶性A $\beta$ -ペプチドの免疫沈降物(mAb 1E8)を示す。

【図23】図23のaは合成A $\beta$ -ペプチドの混合(1)と比較してA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2を示す。図23のbは合成A $\beta$ -ペプチドの混合(1)と比較されるA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2を次の脳ホモジネートのRIPA-可溶性A $\beta$ -ペプチドの免疫沈降物(mAb 1E8)を用いて示す。

【図24】図24はA $\beta$ -IPG-2D-PAGE/免疫プロット-2を示す。

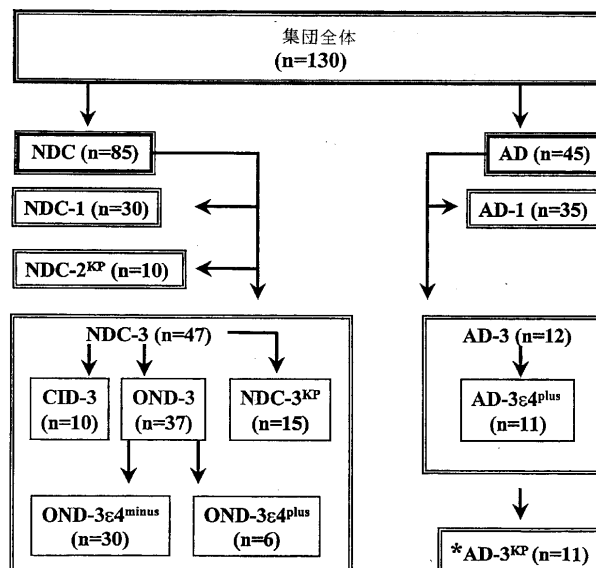
【図25】図25のaはモルモットからの液体中でA $\beta$ -ペプチドのA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2を示す。図25のbは家ウサギからの液体中でA $\beta$ -ペプチドのA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2を示す。

20 【図26】図26は成人モルモットからの短時間培養(0~8時間)を用いて海馬組織フラグメントのA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2を示す。

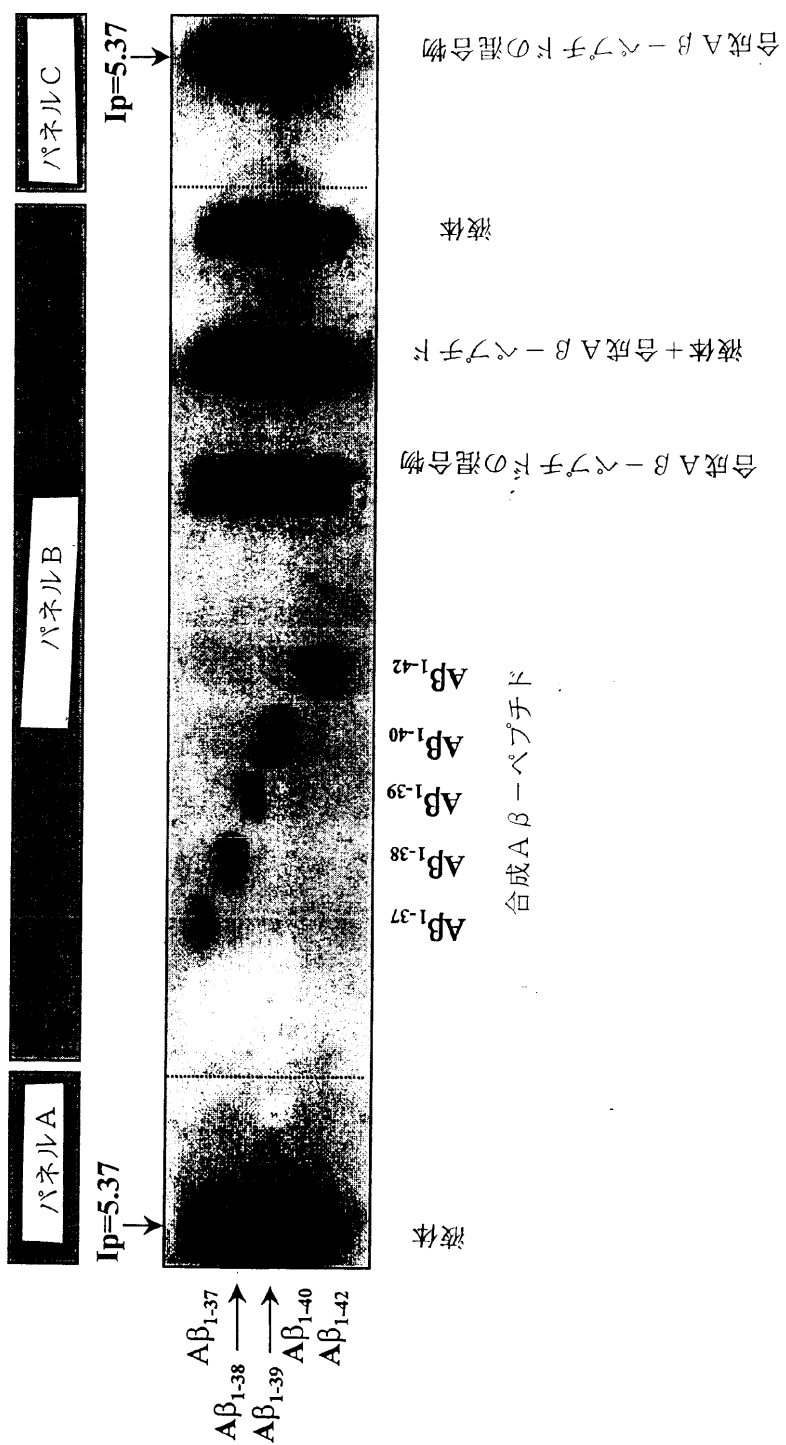
【図27】図27は2つのA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2。これはヒト751APPSw導入遺伝子H4神経膠腫細胞系の種々のプロテアーゼ阻害剤(23a)による処理及びカルパイン阻害剤-1(23b)の投与量に基づく効果を示す。

【図28】図28のaはA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2を示す。図28のbはA $\beta$ -SDS-PAGE/免疫プロット-2を示す。

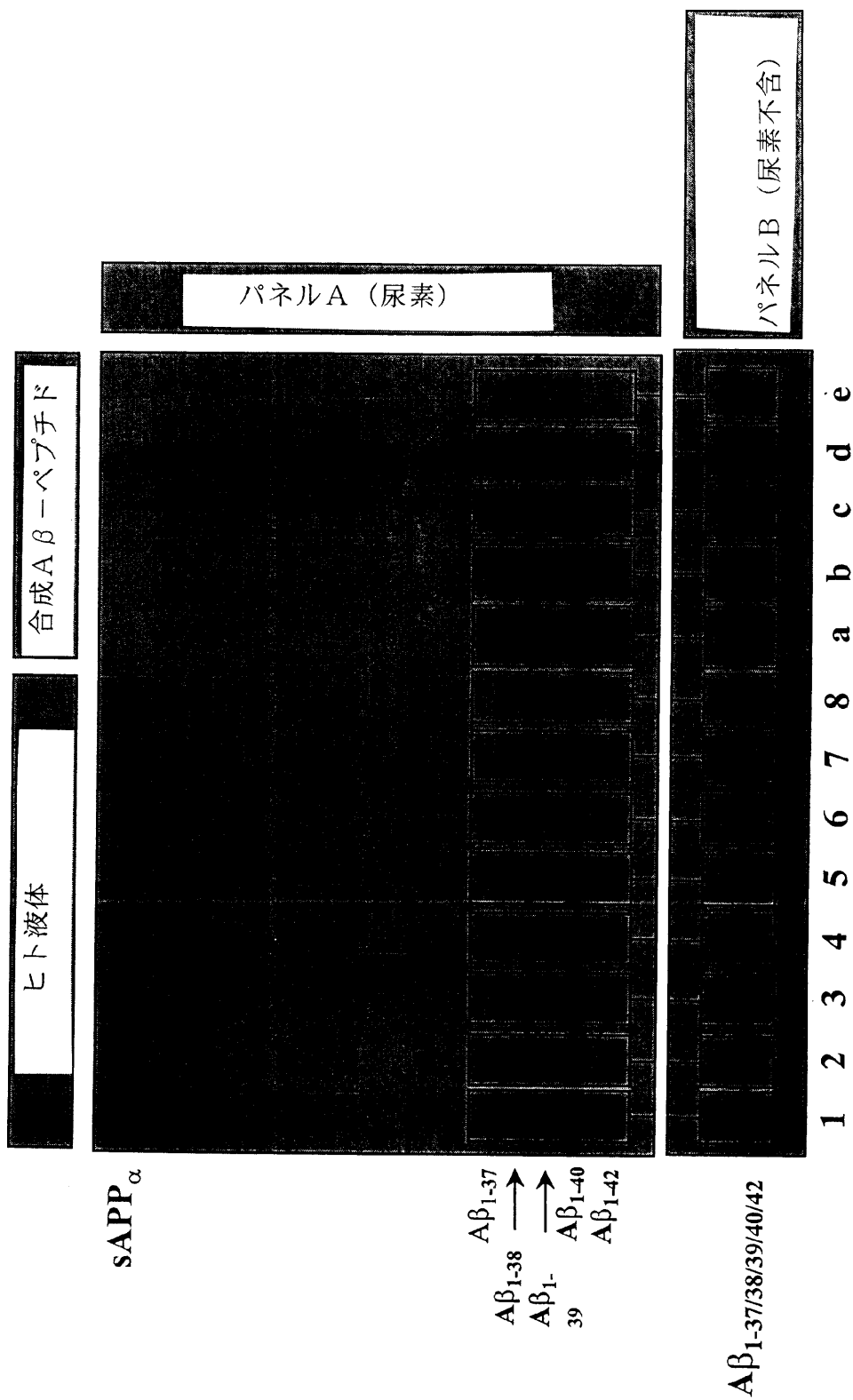
【図1】



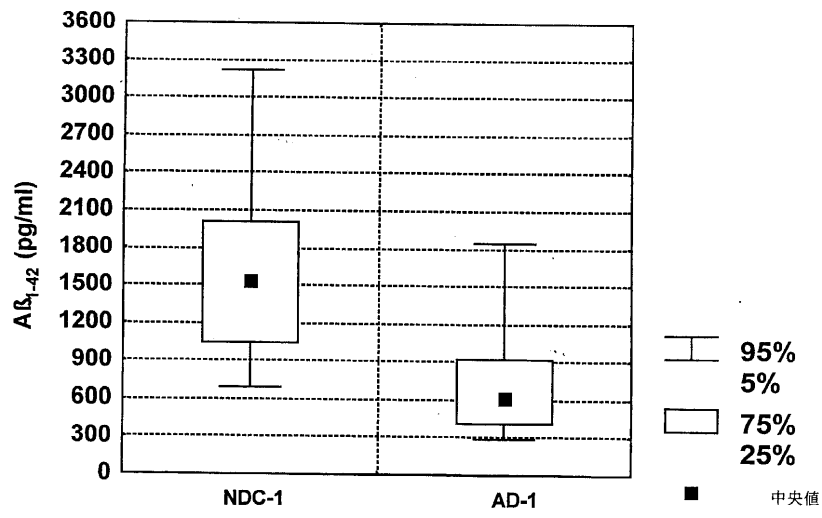
【図2】



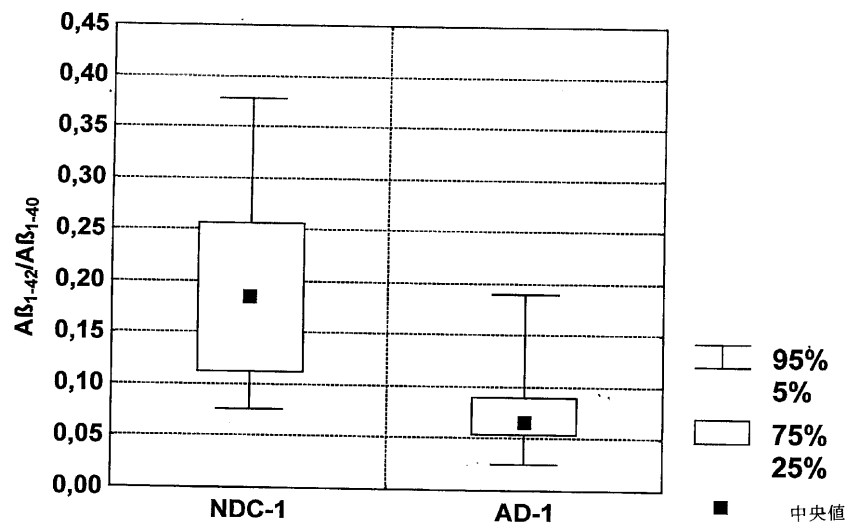
【図3】



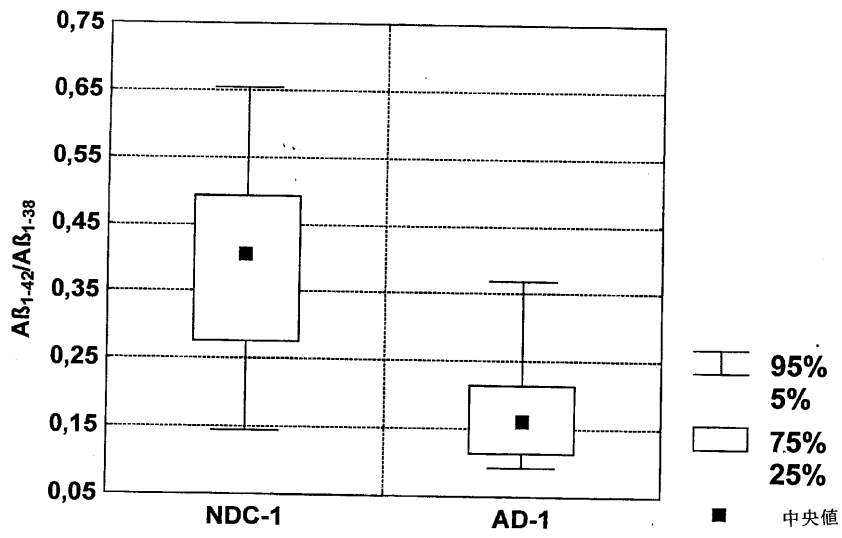
【図4】



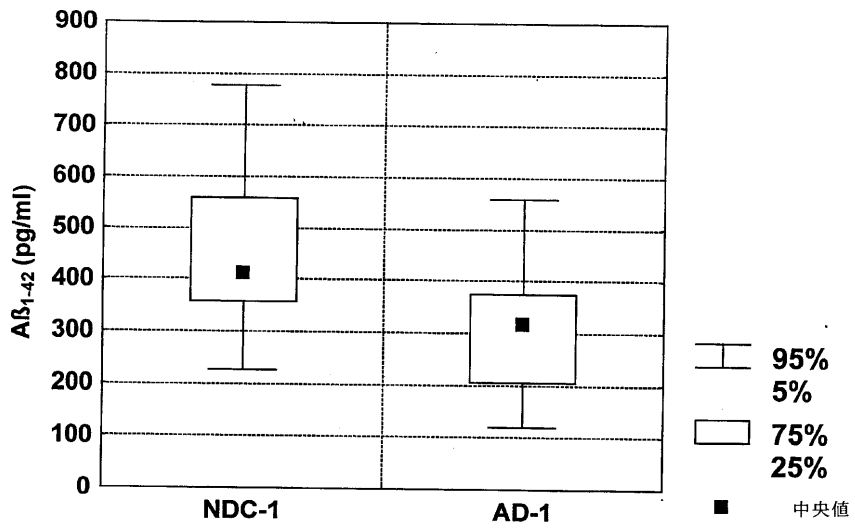
【図5】



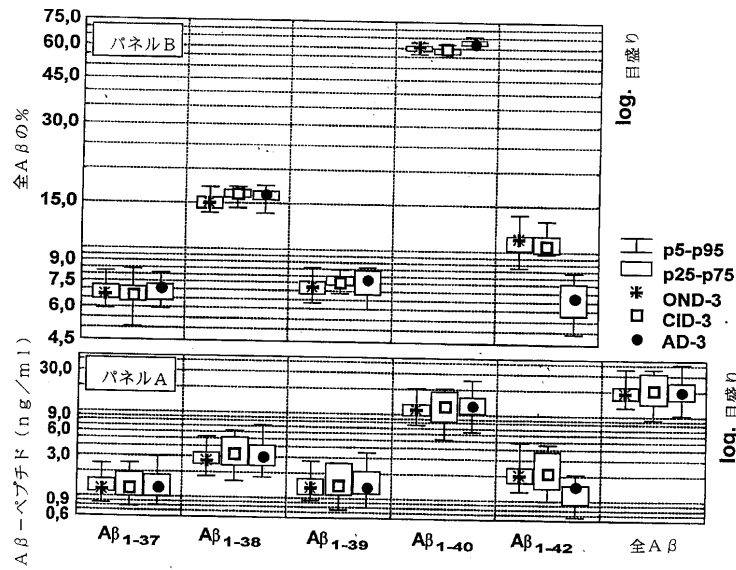
【図6】



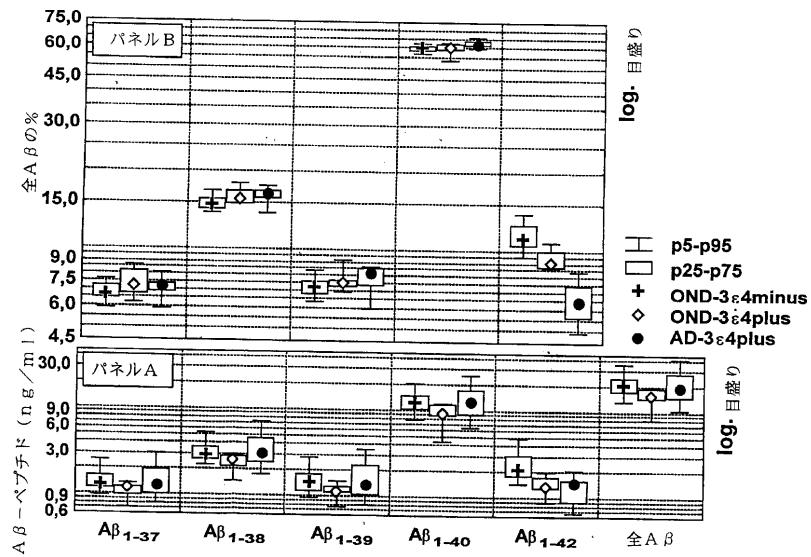
【図7】



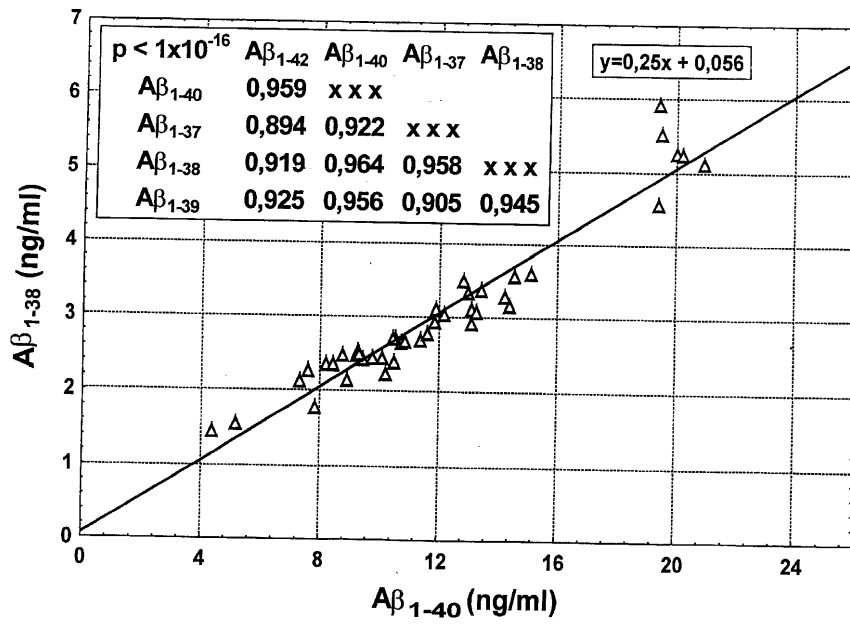
【図8】



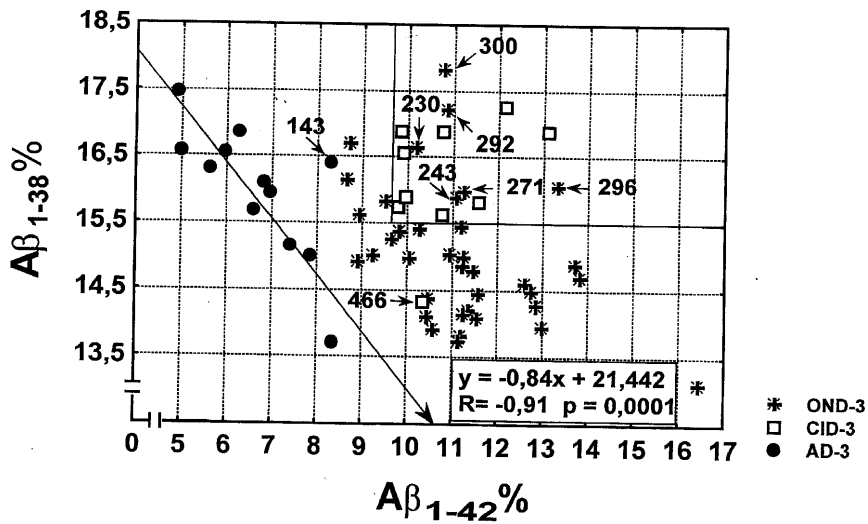
【図9】



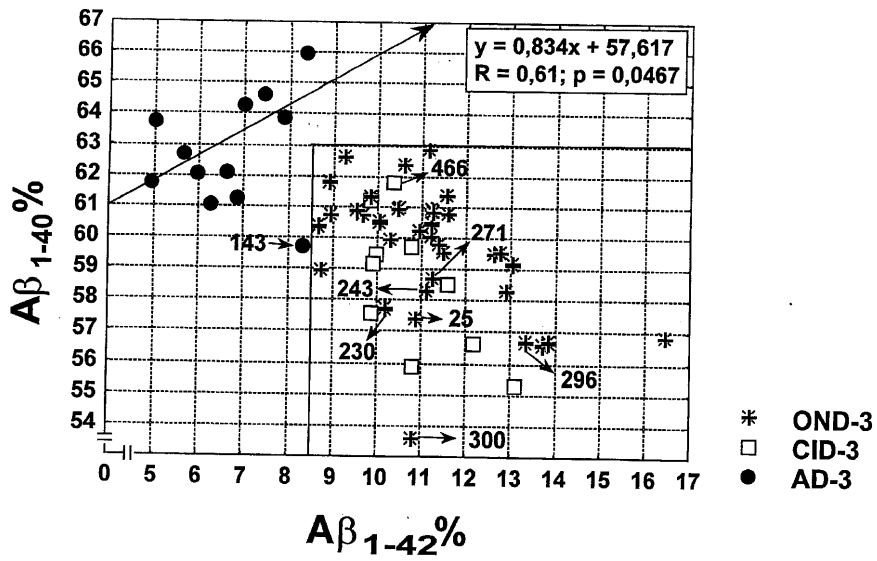
【図10】



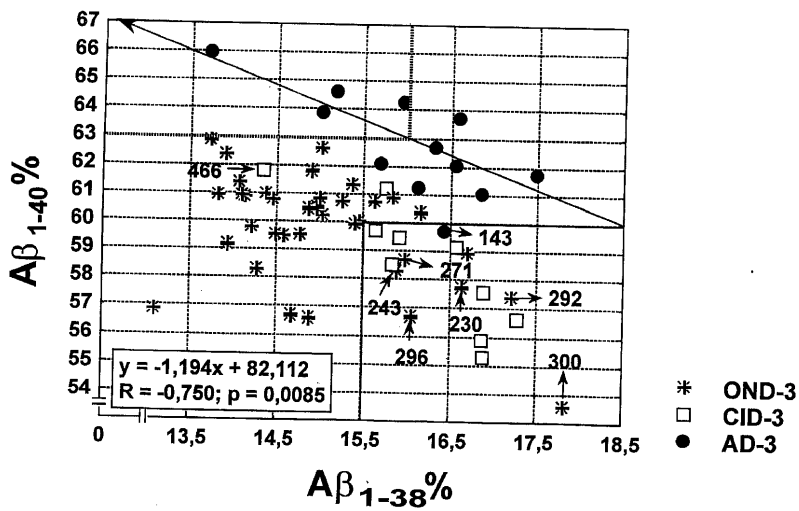
【図11】



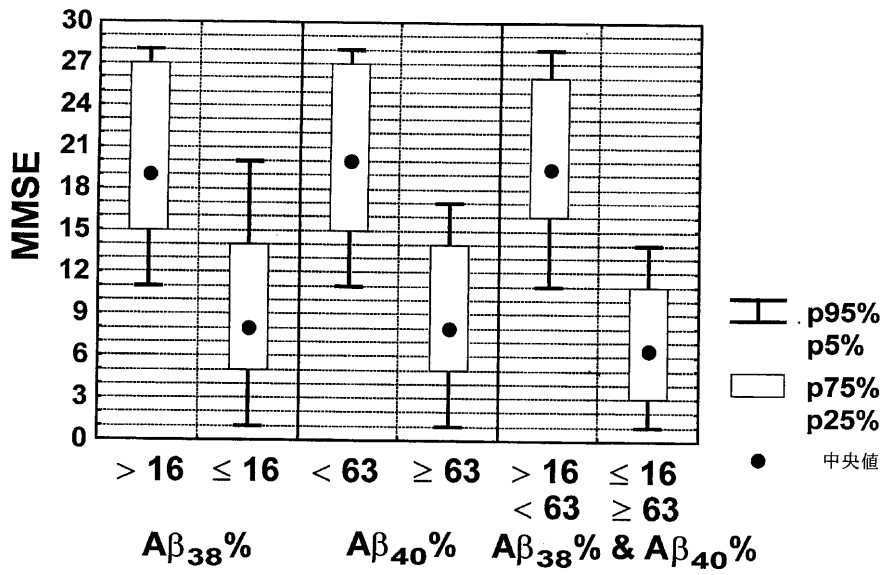
【図12】



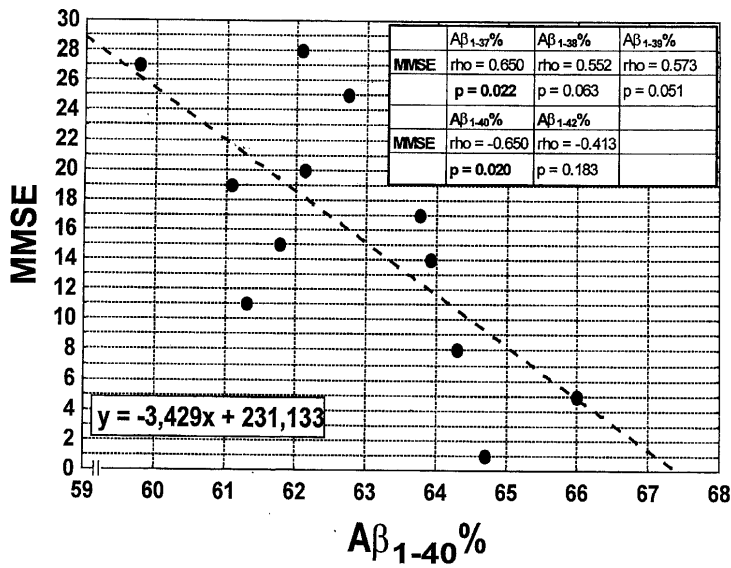
【図13】



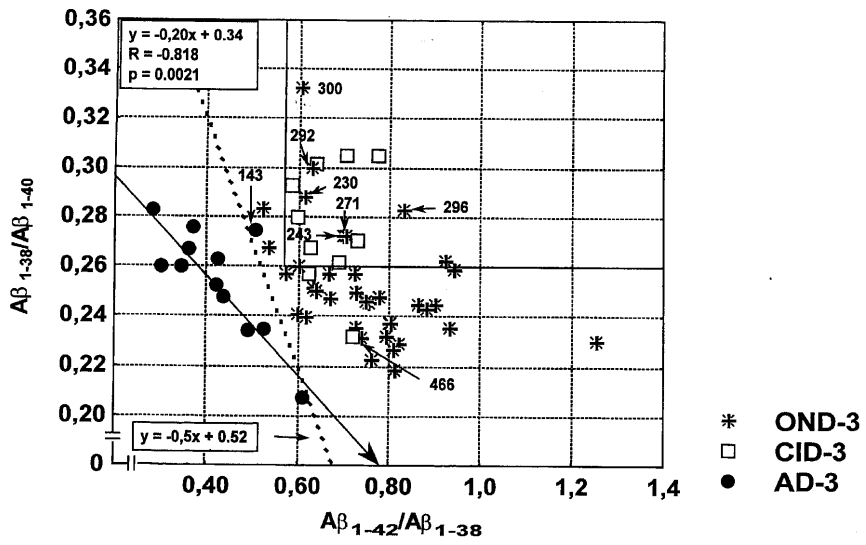
【図14】



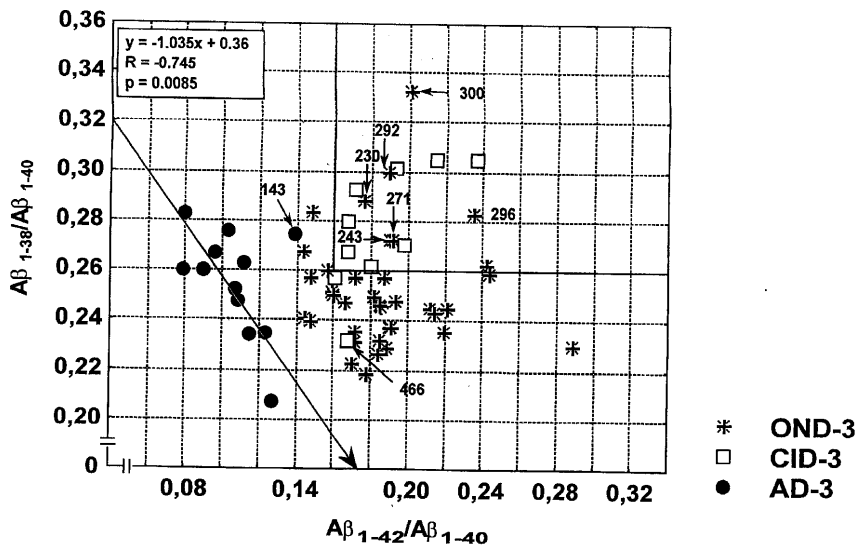
【図15】



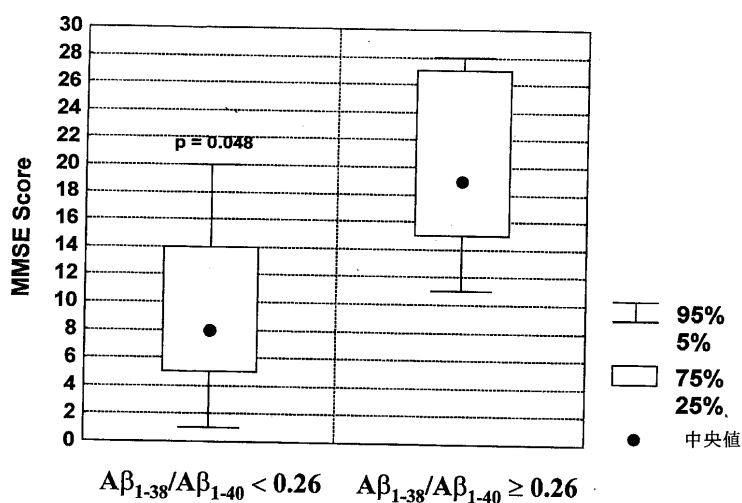
【図16】



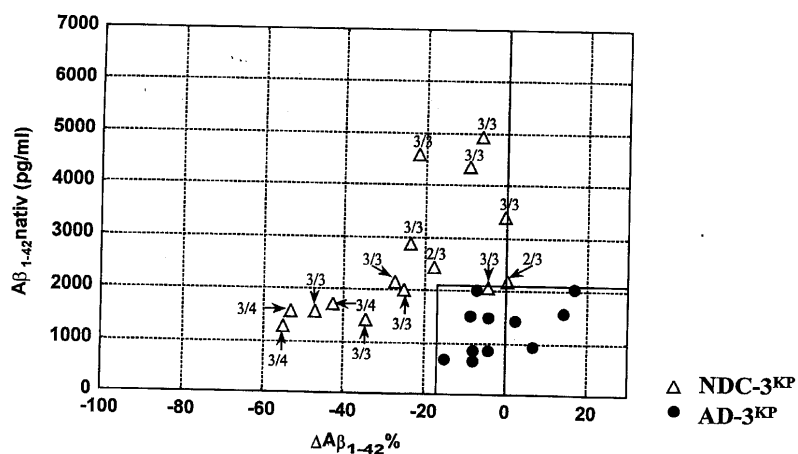
【図17】



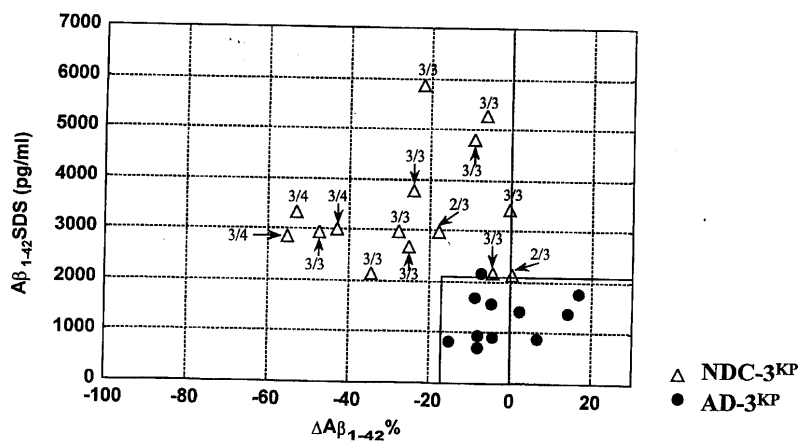
【図18】



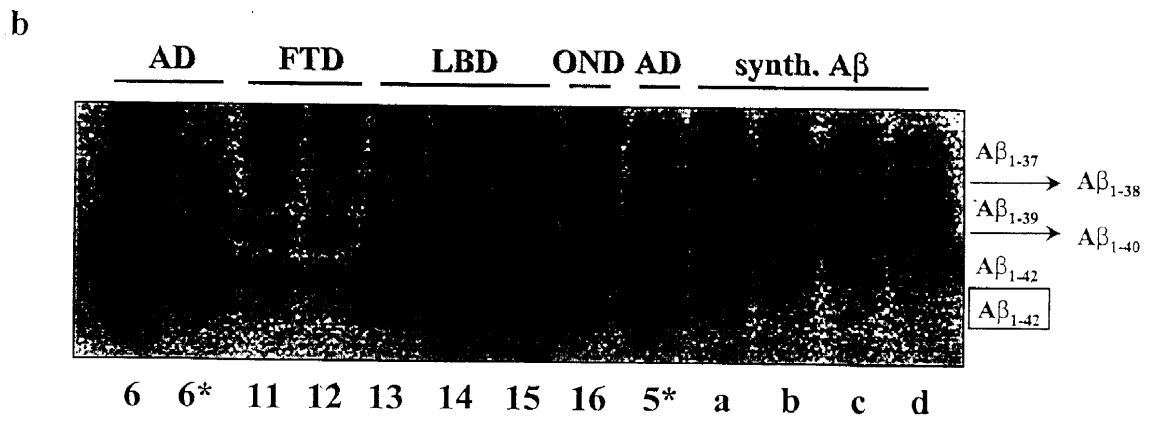
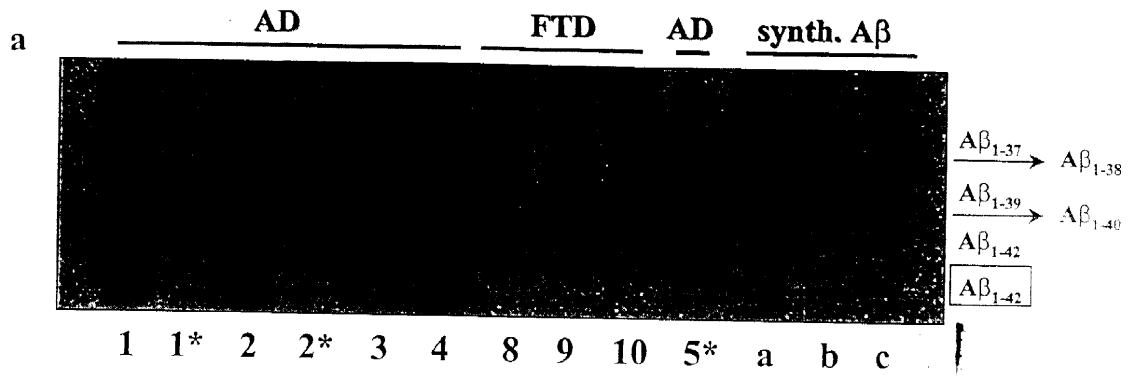
【図19】



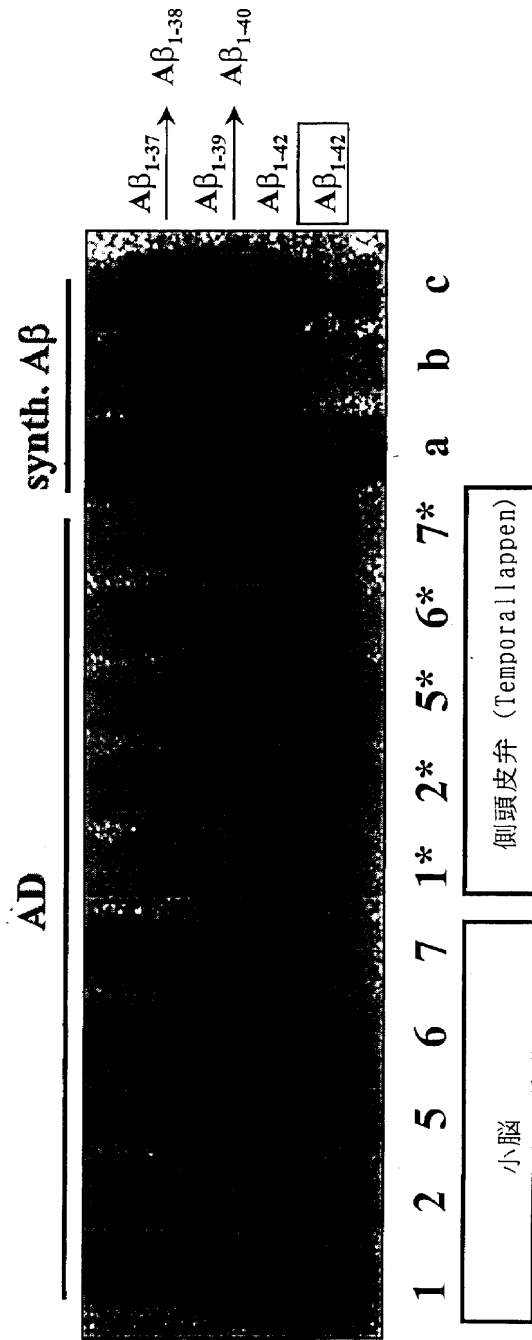
【図20】



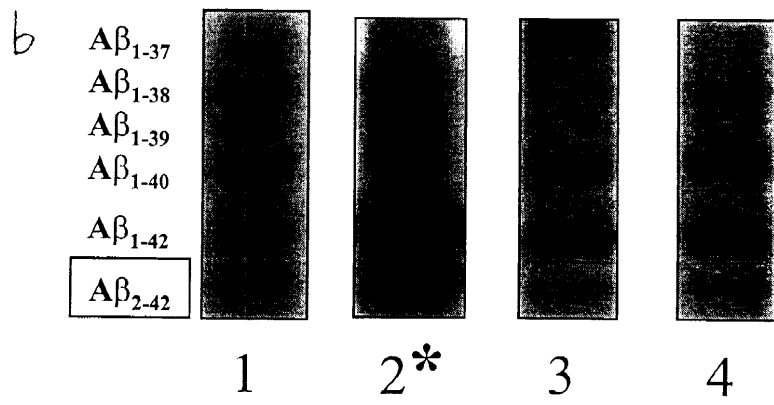
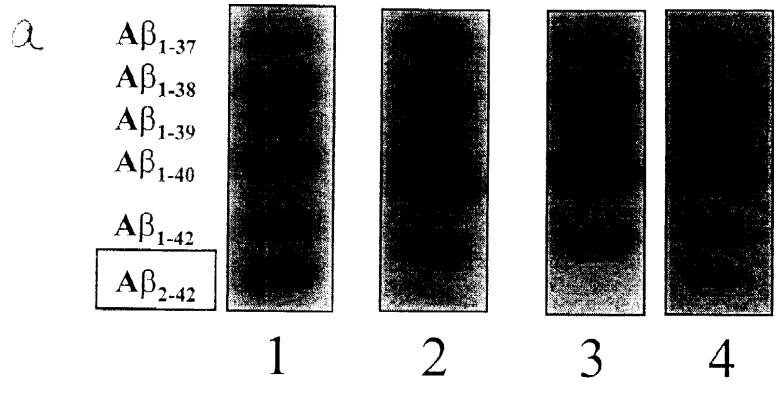
【図21】



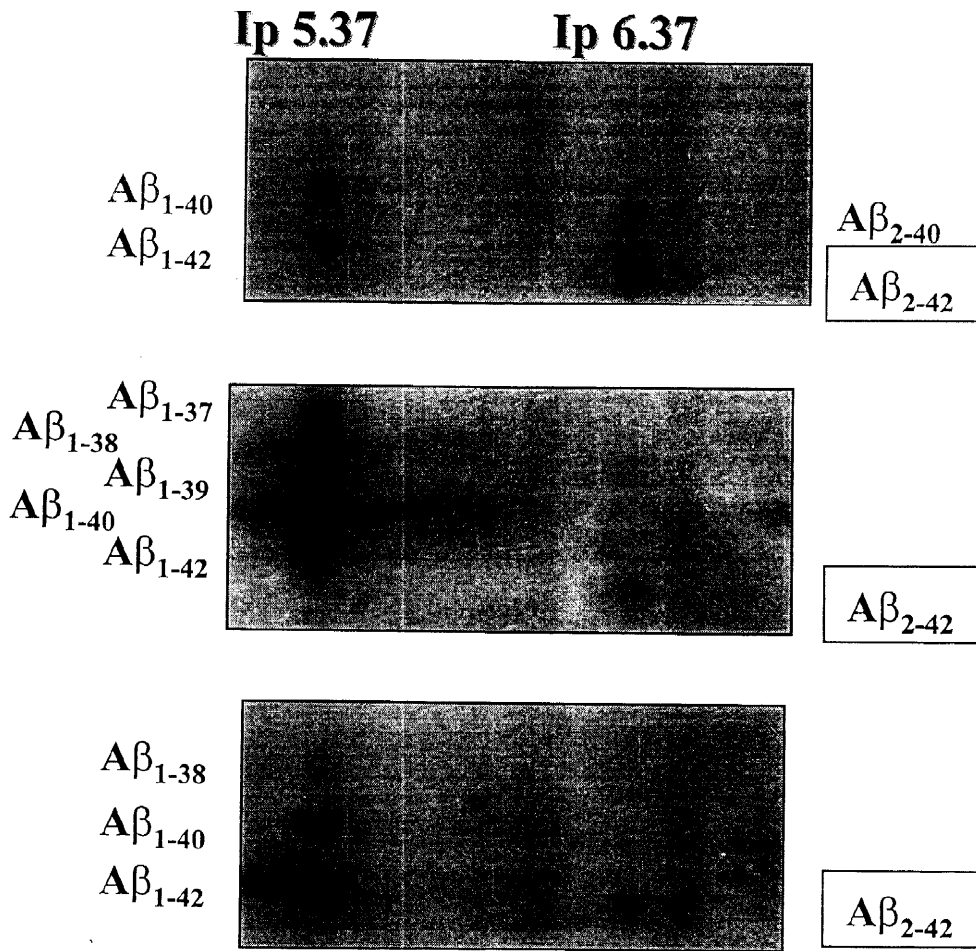
【図22】



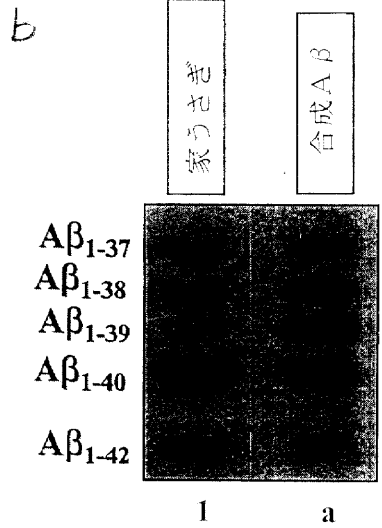
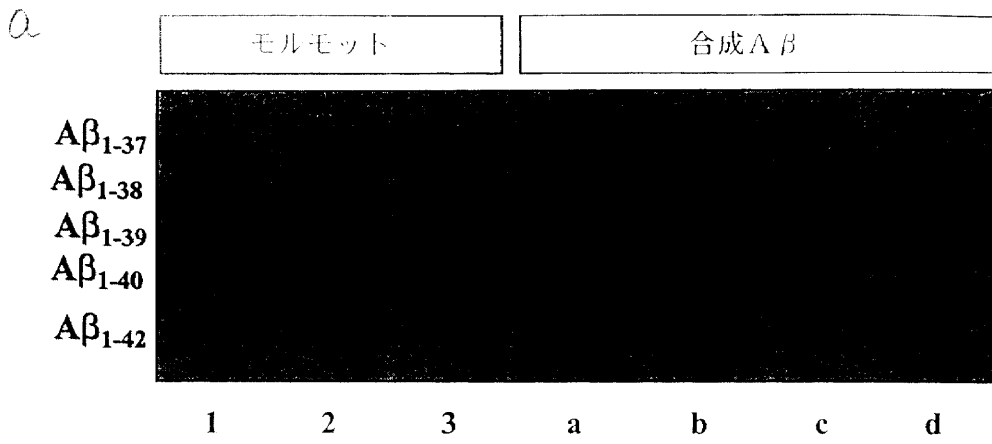
【図23】



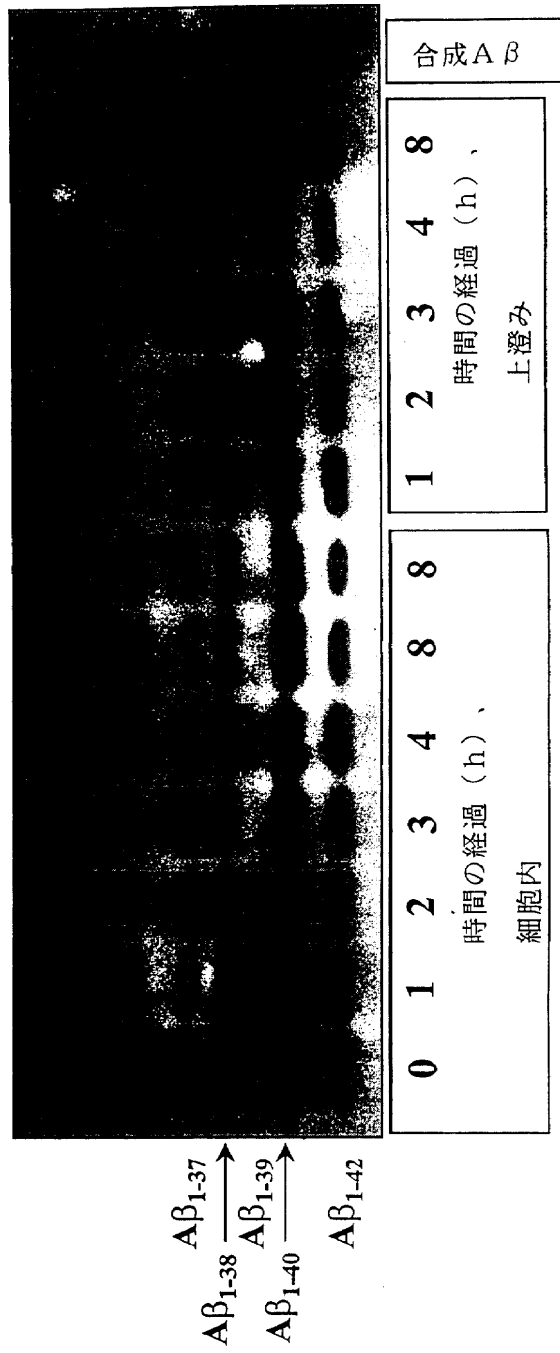
【図24】



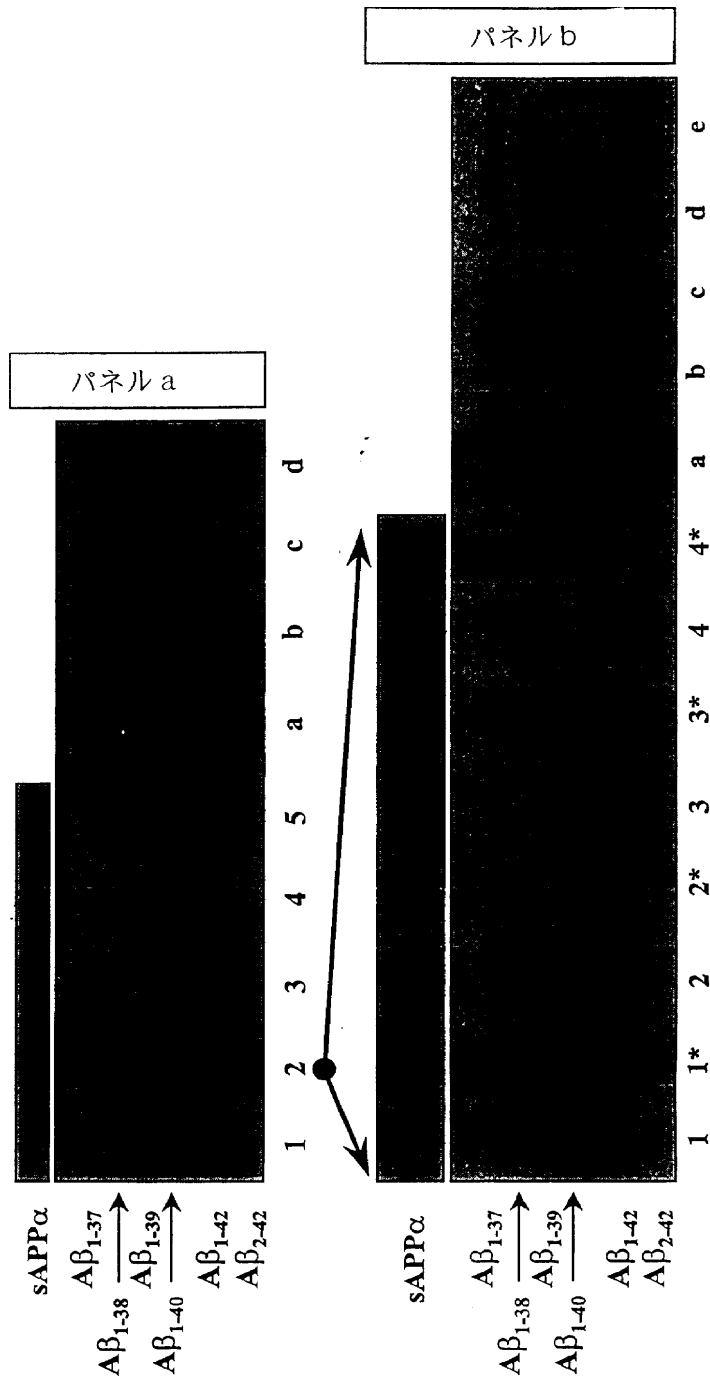
【図25】



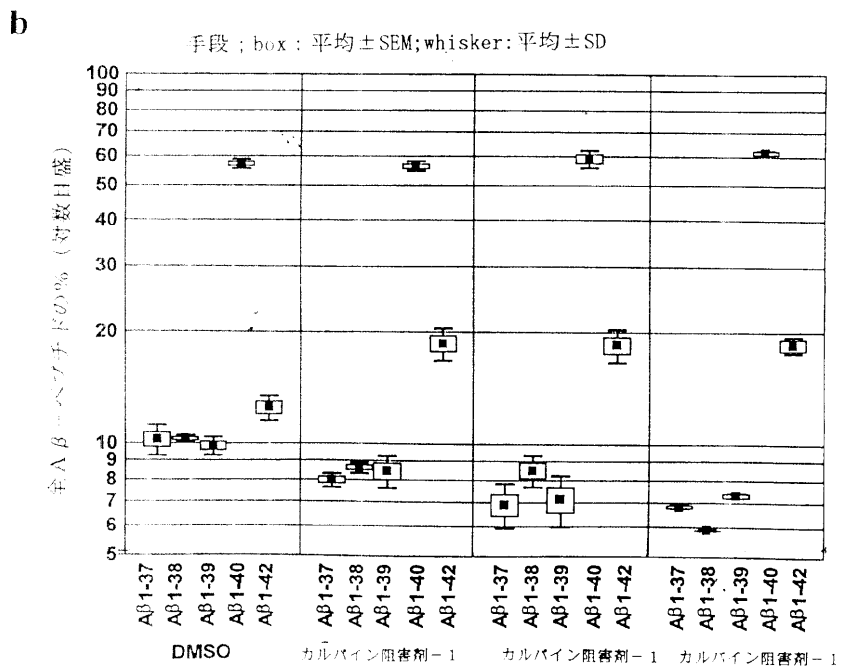
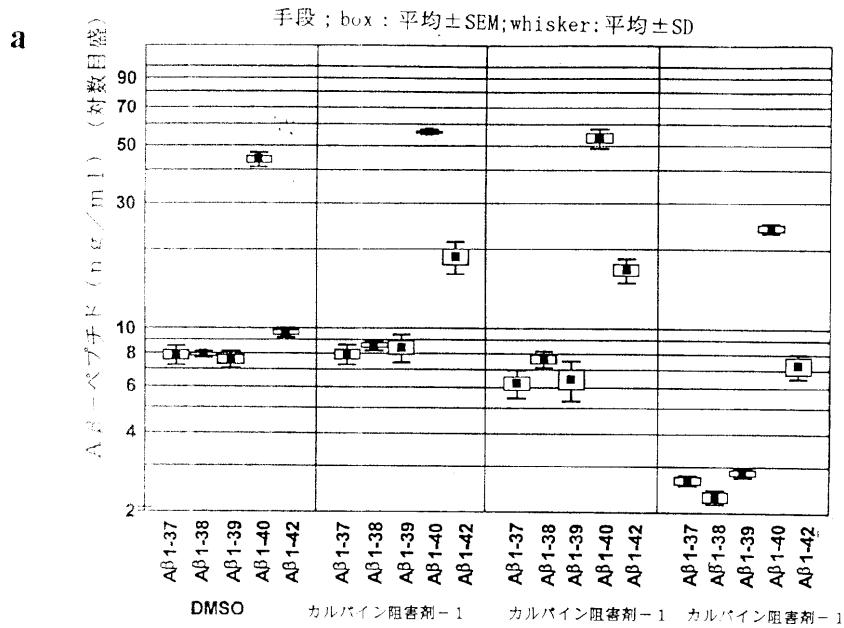
【図26】



【図27】



【図28】



【手続補正書】

【提出日】平成14年8月7日(2002.8.7)

【補正方法】変更

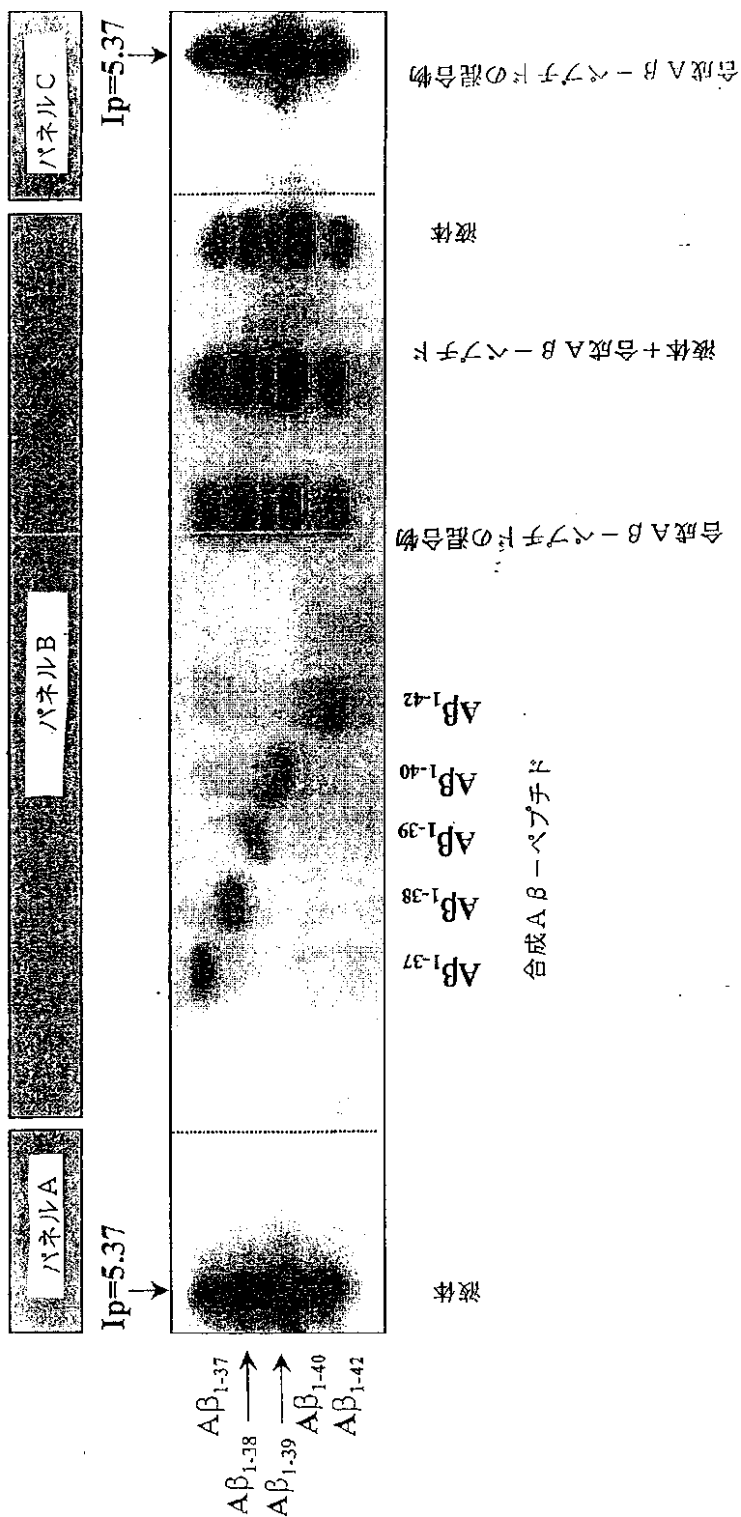
【補正内容】

【手続補正1】

【図2】

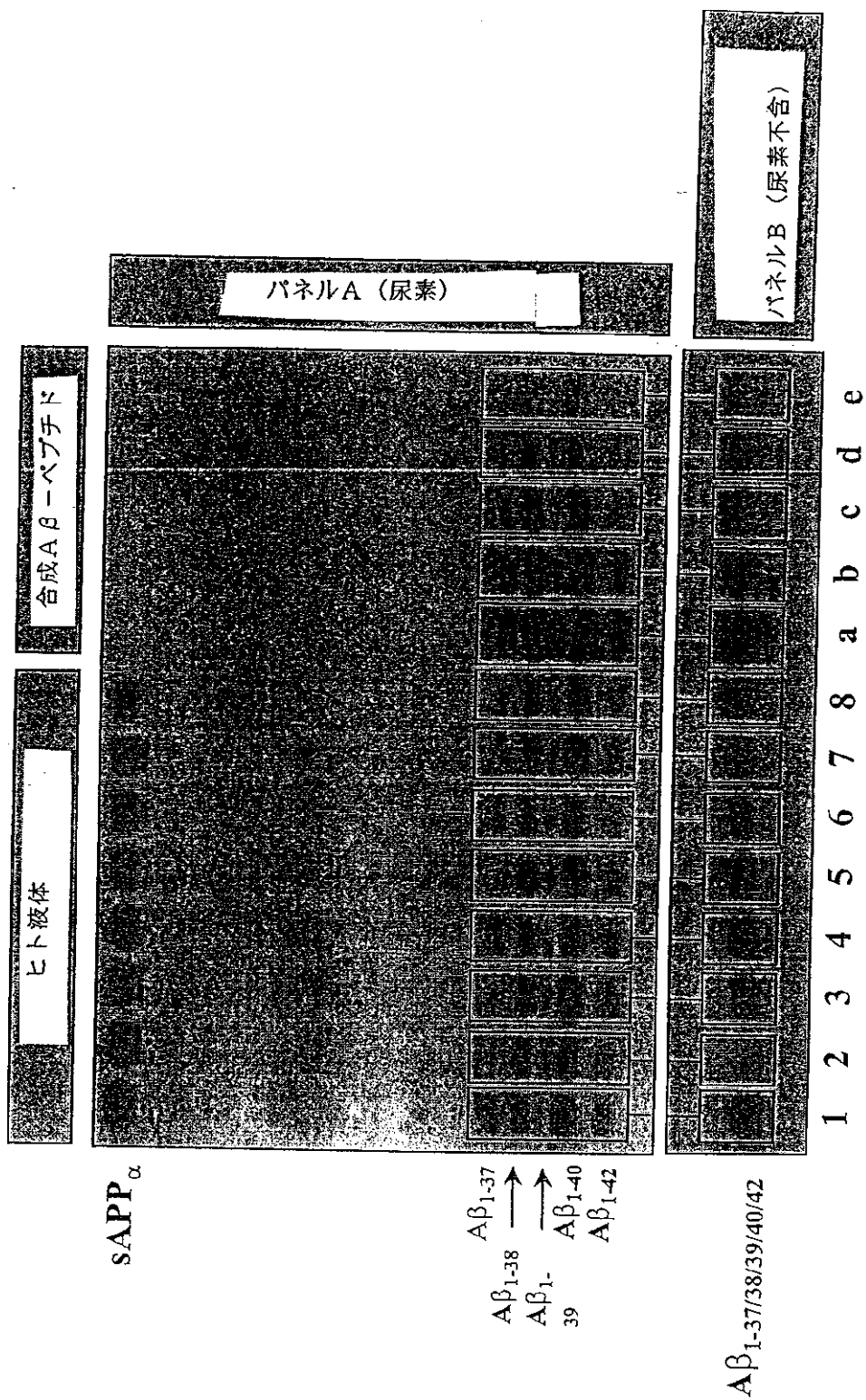
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2



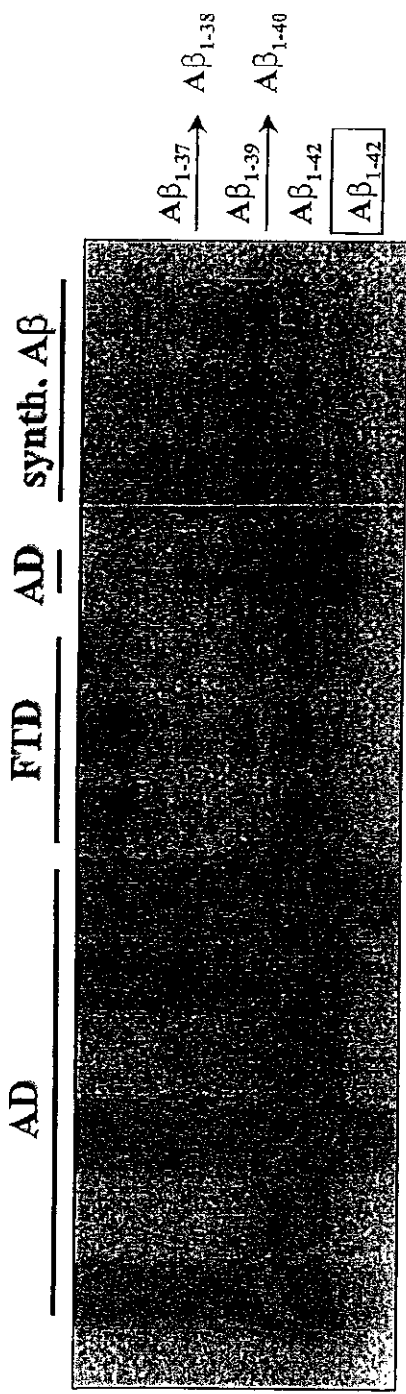
【手続補正2】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図3】



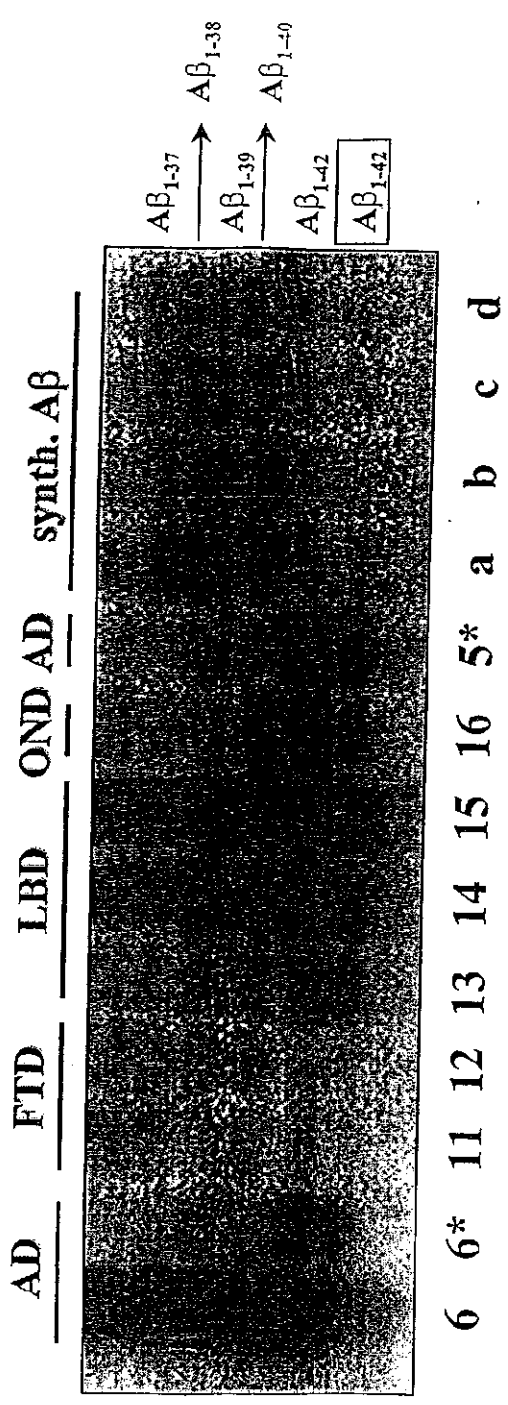
【手続補正3】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図2 1

【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図2 1】



a

1 1\* 2 2\* 3 4 8 9 10 5\* a b c



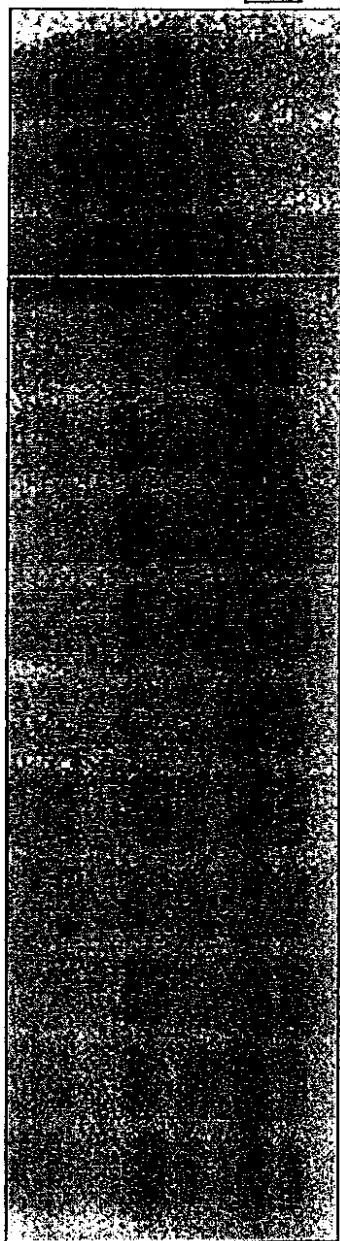
b

6 6\* 11 12 13 14 15 16 5\* a b c d

【手続補正4】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図2 2  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図2 2】

synth. Aβ

AD



Aβ<sub>1-37</sub> → Aβ<sub>1-38</sub>

Aβ<sub>1-39</sub> → Aβ<sub>1-40</sub>

Aβ<sub>1-42</sub>

Aβ<sub>1-42</sub>

1 2 5 6 7 1\* 2\* 5\* 6\* 7\* a b c

小脳

側頭皮弁 (Temporal lappen)

【手續補正5】

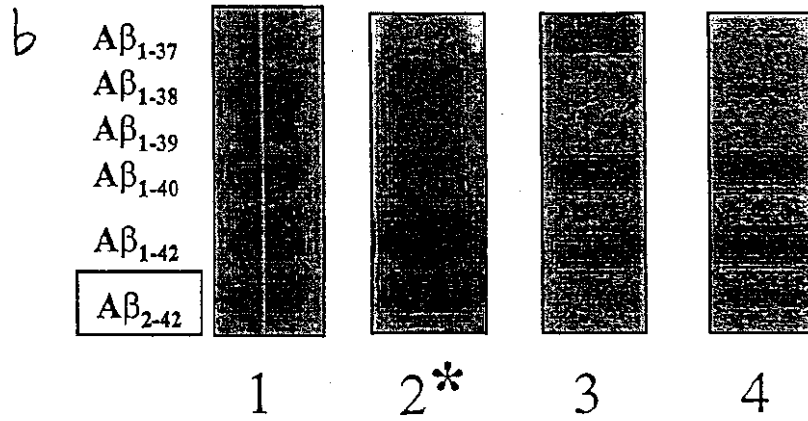
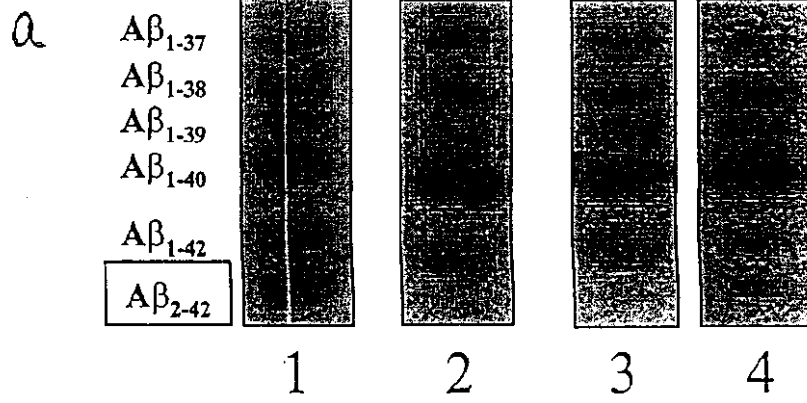
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図23

【補正方法】変更

【補正内容】

【図23】



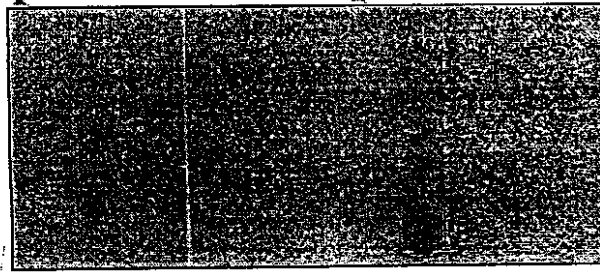
【手続補正6】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図24

【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図24】

Ip 5.37

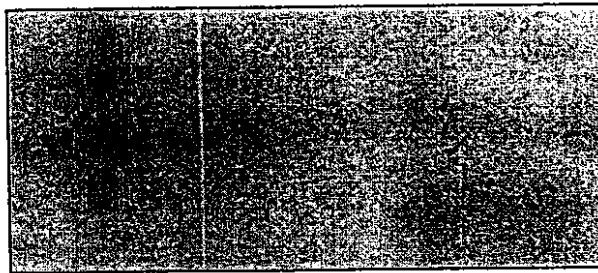
Ip 6.37

Aβ<sub>1-40</sub>  
Aβ<sub>1-42</sub>



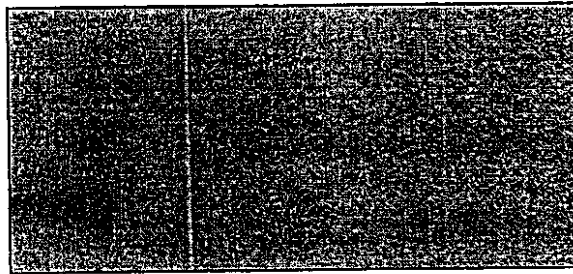
Aβ<sub>2-40</sub>  
Aβ<sub>2-42</sub>

Aβ<sub>1-37</sub>  
Aβ<sub>1-38</sub>  
Aβ<sub>1-39</sub>  
Aβ<sub>1-40</sub>  
Aβ<sub>1-42</sub>



Aβ<sub>2-42</sub>

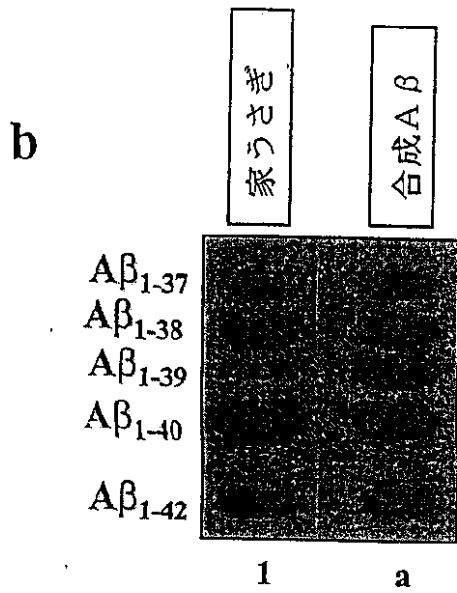
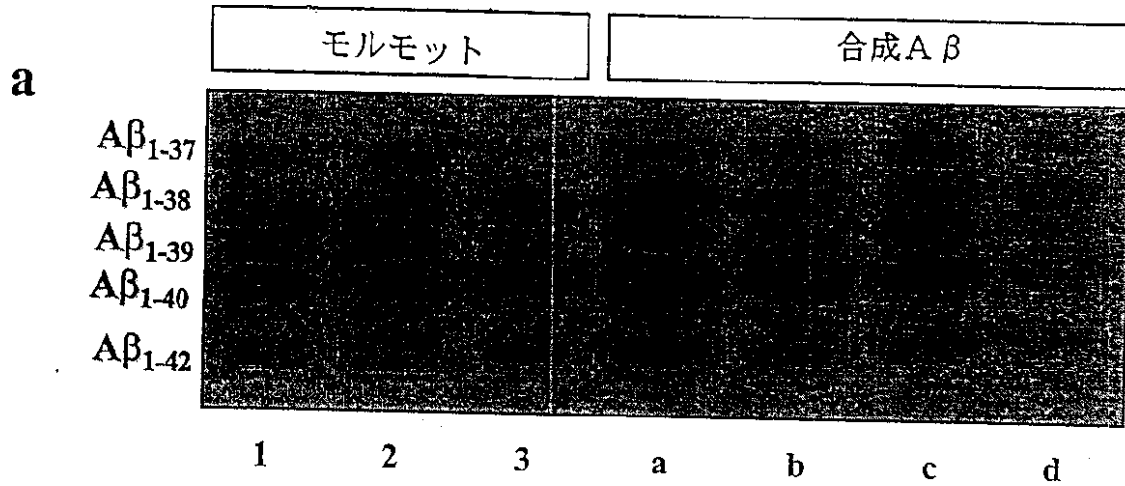
Aβ<sub>1-38</sub>  
Aβ<sub>1-40</sub>  
Aβ<sub>1-42</sub>



Aβ<sub>2-42</sub>

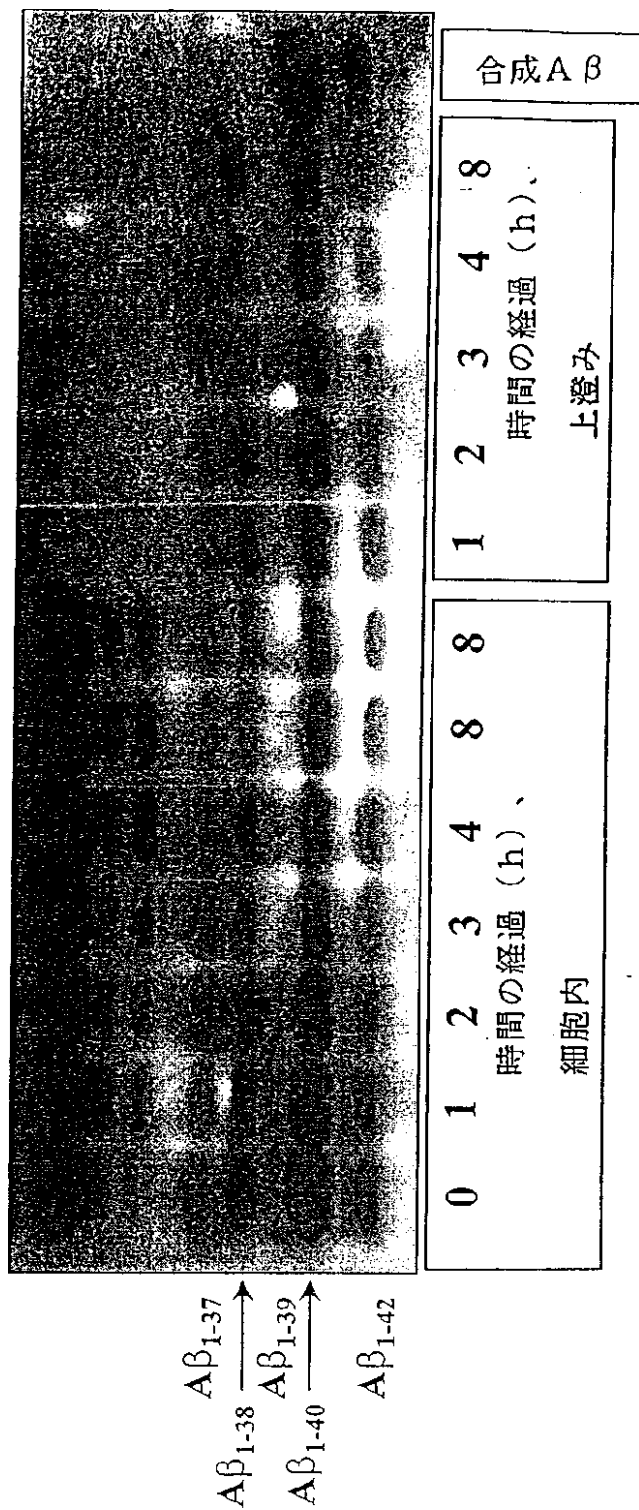
【手続補正7】  
【補正対象書類名】図面  
【補正対象項目名】図25

【補正方法】変更  
【補正内容】  
【図25】



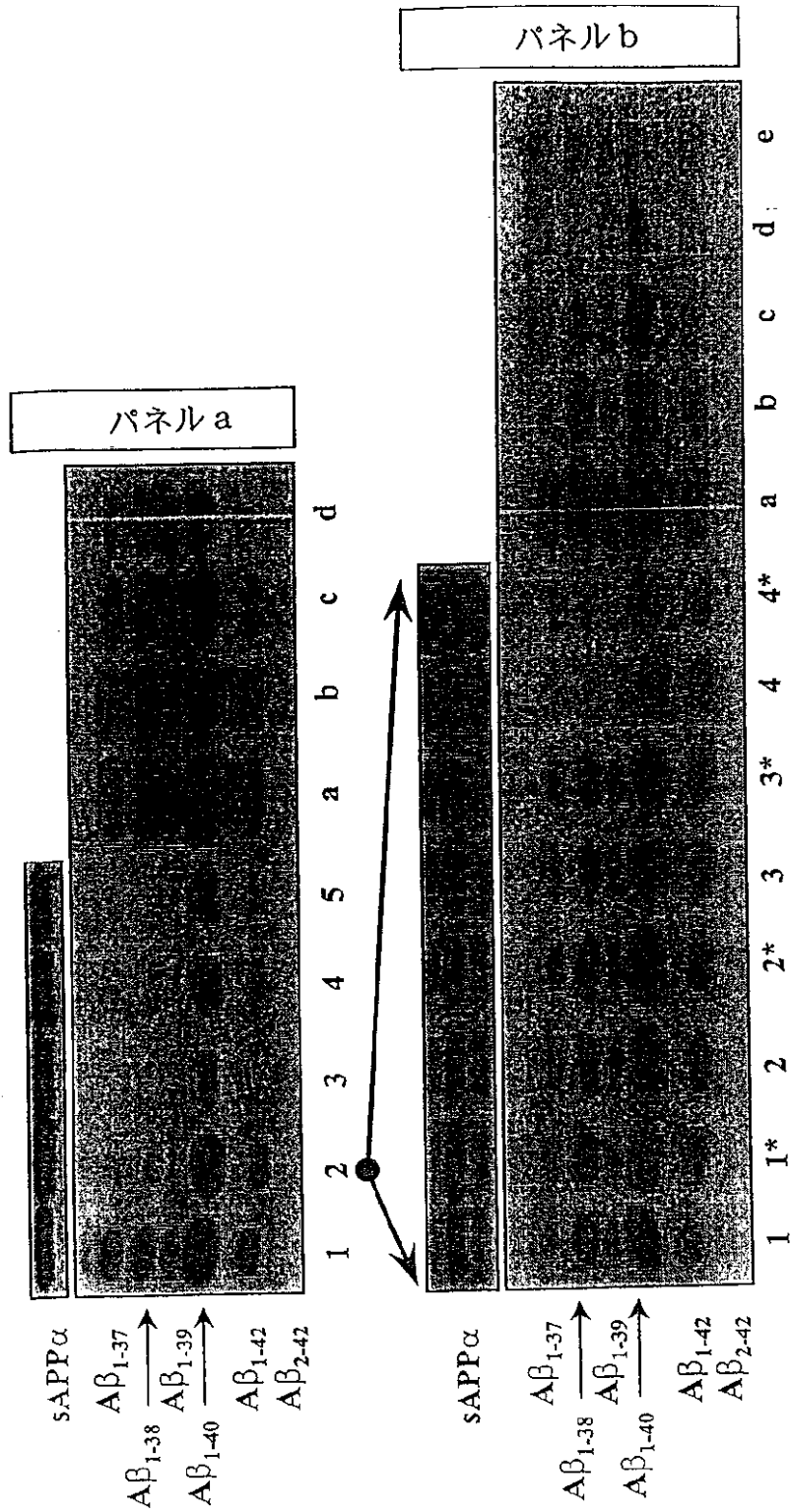
【手続補正8】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図26

【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図26】



【手続補正9】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図27

【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図27】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

// C 1 2 P 21/08

識別記号

F I

G 0 1 N 27/26

テ-マ-コ-ト (参考)

3 1 5 K

3 1 5 F

3 0 1 A

(72)発明者 トーマス・ディルクス  
ドイツ連邦共和国、ベルリン シエリン  
グ・アクチエンゲゼルシャフト内

(72)発明者 ウルズラ・メンニング  
ドイツ連邦共和国、ベルリン シエリン  
グ・アクチエンゲゼルシャフト内  
Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	使用该抗体检测由mAb 1 E 8和Aβ-肽和/或sAPPα代表的单克隆抗体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003012700A</a>	公开(公告)日	2003-01-15
申请号	JP2002171495	申请日	2002-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	严扫描NV故障胡安变灰		
申请(专利权)人(译)	延Vuirutofuangu		
[标]发明人	イエンスヴィルトファング トーマスディルクス ウルズラメンニング		
发明人	イエンス・ヴィルトファング トーマス・ディルクス ウルズラ・メンニング		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08 G01N27/447 G01N33/534 G01N33/561 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/561 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/534 G01N33/577.B C12P21/08 G01N27/26.315.K G01N27/26.315.F G01N27/26.301.A G01N27/447.301.A G01N27/447.315.F G01N27/447.315.K		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	2001114192 2001-06-12 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)	溶液	時間(分)
解决的问题：提供一种以mAb 1E8为代表的单克隆抗体以及使用该抗体检测Aβ-肽和/或sAPPα的方法。DSMZ-德国Zammmlung GmbH(不伦瑞克)于12月19日进行了微生物和细胞培养，保藏号为DSMACC2485。)Aβ-肽Aβ1-x和/或Aβ2-x和/或用于检测sAPPα的方法。	冷たい(4°C)H <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	3×10
	30%(v/v)EtOH 10%(v/v)Hac <sup>1</sup>	
	1×60	
	30%(v/v)EtOH 0.5M酢酸ナトリウム, 0.5%(v/v)グルタルジアルデヒド, 0.2%(v/v)Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1×60
	冷たい(4°C)H <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	3×15
0.1%(w/v)AcN 0.02%(w/v)グルタルジアルデヒド	1x	