

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4837734号
(P4837734)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl. F I
 GO 1 N 33/68 (2006.01) GO 1 N 33/68
 GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 10 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2008-521892 (P2008-521892)	(73) 特許権者	501154389
(86) (22) 出願日	平成18年7月19日 (2006.7.19)		ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・ゲ
(65) 公表番号	特表2009-501917 (P2009-501917A)		ーエムペーハー
(43) 公表日	平成21年1月22日 (2009.1.22)		ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/007141		ルフ・ノイエンドルフシュトラーセ・25
(87) 国際公開番号	W02007/009789	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成19年1月25日 (2007.1.25)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成21年4月10日 (2009.4.10)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	102005034174.8		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成17年7月21日 (2005.7.21)	(74) 代理人	100108453
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 痴呆及び神経炎症性疾患の検出のためのCSF検出in vitro方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アルツハイマー痴呆 (AD)、レヴィー小体を有する痴呆 (DLB)、前頭側頭型痴呆 (FTD)、及び各種の形態の血管痴呆を含む群から選択される痴呆及び非感染性の病因の慢性神経炎症性疾患の検出、重篤さの測定、並びにモニター及び予後のための痴呆の示差的検出の一部として実施される脳脊髄液 (CSF) 検出in vitro方法であって、プロカルシトニンの免疫活性 (PCT免疫活性) の測定を、痴呆または神経炎症性疾患に罹患している患者、あるいはそのような疾患に罹患する疑いのある患者のCSFのサンプルで実施し、痴呆または神経炎症性疾患の存在、過程、重篤さ、及び治療の成功についての結論を、測定したPCT免疫活性から引き出し、それが健康なコントロール患者について典型的な値の閾値を超えるものであることを特徴とする方法。

10

【請求項2】

前記PCT免疫活性が、1当たり100ng (100ng/lまたは100pg/ml) のPCTを超える機能的なアッセイ感度 (FAS) を有する高感度PCT免疫アッセイの補助で測定されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

健康なコントロール患者について測定され、50pg/mlである平均値が、「神経炎症性疾患の疑いがある」との検出についての閾値として使用されることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

20

前記 P C T 免疫活性の測定のための P C T 免疫アッセイが、カルシトニンの形成で P C T のタンパク質溶解性のプロセッシングにおいて形成された各種のメンバーの P C T 部分ペプチドに位置する、またはカルシトニン配列を含まない P C T 部分ペプチドに位置する完全 P C T ペプチドのセグメントに結合する二種類の抗体を使用するサンドイッチ免疫アッセイであることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体の一方がカルシトニン配列のセグメントに結合し、前記抗体の他方がカタカルシン配列のセグメントに結合し、二種類の抗体の少なくとも一つがアフィニティー精製ポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

測定された P C T 免疫活性の値が、痴呆の個々の形態について典型的な値の範囲に関連する示差的検出方法として実施され、考え得る痴呆の形態の一つの存在の可能性が測定されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

各臨床像について有益な少なくとも一つの更なる生化学的または生理学的なパラメーターが同時に測定され、測定された結果が痴呆または神経炎症性疾患の細かい検出のために評価される少なくとも二つの測定された変数のセットの形態で得られるマルチパラメーター測定の一部として実施されることを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

P C T 免疫活性に加えて、前記マルチパラメーター測定の一部として、補体成分、サイトカイン、ケモカイン、血液凝固成分及び線維素溶解性因子、急性期のタンパク質、並びにフリーラジカル化合物からなる群から選択される、少なくとも一つの更なる炎症メディエーターが測定されることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記マルチパラメーター測定が、チップテクノロジー測定装置または免疫クロマトグラフィ測定装置によって同時の測定として実施されることを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記マルチパラメーター測定の複雑な測定結果の評価が、コンピュータープログラムの補助で実施されることを特徴とする、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、痴呆及び神経炎症性疾患の診断のための新規な C S F 診断 in vitro 方法に関する。

【0002】

本発明の文脈では、用語「診断」は、測定が実施される患者の臨床上的状態に依存して、各種の問題に基づいてよく、特に検出及び早期検出、重篤さの測定、及び治療の間のモニターを含むモニター、並びに疾患の更なる過程の予後のために機能する医学的測定のための一般用語として使用される。

【0003】

本発明に係る方法は、C S F 診断 in vitro 方法である。C S F 診断方法は、神経学的疾患の診断の過程で通常実施され、診断目的のために有益である脳脊髄液 (C S F) と称されるものの特性を測定することが重要である方法を意味するように解される。本発明の場合、特定の特性は、C S F における生体分子の免疫診断的に測定可能な内容である。

【0004】

本発明によって診断される疾患は、特に初老期の痴呆 (本願でより詳細に議論されるであろう)、及び更に非感染性の病因の慢性神経炎症性疾患である。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

痴呆は、共通の特徴が後天的な知能、特に記憶の損失、及び脳損傷の結果としての通常レベルの人格の損失である疾患として一般的に規定されている。痴呆は一般的に、慢性的な特徴の疾患に比較的ゆっくりと進行するものである。痴呆の症状が高齢前の中年の人に現れたら、それらは初老期の痴呆として称され、それらの典型的な症状と脳の病理学的な変化に基づいて、以下の四種の疾患または疾患の群の間で特に分類がなされる：

【 0 0 0 6 】

アルツハイマー痴呆 (A D) (アルツハイマー病) は、最も頻出の神経変性痴呆であり、痴呆の全てのケースの 2 / 3 を数える。 A D は、アミロイドプラークの形成、神経原線維束の形成、及び神経細胞の損失という三種の重要な病理学的特徴によって分類される (概要として非特許文献 2 4 を参照) 。アミロイドプラークは、アミロイド - タンパク質のニューロン外の凝集物からなり、神経原線維束は、タウ - タンパク質と神経線維を主に含む。プラークと神経原線維束の形成は、神経細胞の死の原因であると推測されている。

10

【 0 0 0 7 】

A D の最も重要な症状は、比較的永久的な情動の反応性を有する記憶と知性の増大していく機能不全であり、これらの症状は、他の形態の痴呆から A D を区別することを困難とする更により不特定の混乱を伴う。

【 0 0 0 8 】

レヴィー小体を有する痴呆 (D L B) は、アルツハイマー痴呆に次いで二番目に痴呆の主たる原因となるものである (非特許文献 1 1 及び 1 8) 。神経病理学的に、 D L B は、脳幹及び大脳皮質におけるレヴィー小体と称されるものの出現によって特徴づけされる。これらのレヴィー小体は、主にシナプス前タンパク質 (- シヌクレイン) とユビキチンの凝集物からなる。レヴィー小体の病理は、アルツハイマー病とパーキンソン病に典型的な神経病理学的変化と異なる度合いに関連している。かくして、 D L B においても、アミロイドと老年プラークの形成が存在するが、神経原線維束は存在しない (概要として非特許文献 6 参照) 。レヴィー小体はまた、異なる分布であったとしても、パーキンソン病を有する患者の脳にも存在する (概要として非特許文献 1 9 参照) 。

20

【 0 0 0 9 】

D L B の鍵となる症状は、進行性の認識障害、不安定な注意力と自覚を伴う混乱の出現、パーキンソン病、頻発する転倒と失神 (短い発作的無意識) である (非特許文献 1 7) 。診断指標の感度及び特異性 (非特許文献 1 7) は、全体に高い特異性を示すが、ある場合に非常に低い感度を示す。これは、 D L B がしばしば臨床上のルーチンであまり診断されていないことを意味する。特にアルツハイマー病との区別は、更に改良されなければならない。

30

【 0 0 1 0 】

前頭側頭型痴呆 (F T D) はピック病とも称され、初老性痴呆の約 2 0 % を数える。 F T D はある場合に遺伝的であり、タウオプシーとも称されるものであり、タウ - タンパク質の過剰発現または抑制発現によって (非特許文献 3 4) 、あるいは突然変異したタウ - タンパク質の発現によって (非特許文献 2 3) 区別される。神経病理学的症状は、前頭及び/または側頭皮質、及び黒質、及び脳底神経節の局所的萎縮である。これは、各種の段階の言語障害、人格の変化、挙動の異常を引き起こす。全体として、 F T D は 9 3 % の感度とわずか 2 3 % の特異性で診断されており、 A D が最も頻繁な誤診である (非特許文献 3 0) 。

40

【 0 0 1 1 】

用語「血管痴呆」 (V A D) は、痴呆が引き金となって脳の血流が破壊された疾患を包含する。各種のタイプの V A D が存在し、その中では多不完全骨折痴呆 (M I D) 及び皮質下 V A D (ビンスヴァンガー病とも称される) が最も頻繁な形態である。

【 0 0 1 2 】

ビンスヴァンガー病は、白脳物質における脳血管性病変によって病理学的に特徴づけさ

50

れるゆっくりと進行性の痴呆である。臨床的にこれは、挙動の異常、例えば興奮、癲癇、鬱及び多幸症、並びにわずかな記憶障害を引き起こす（非特許文献4）。

【0013】

多不完全骨折痴呆は、一過性虚血性侵襲（TIA）とも称される数回の小さな発作の結果として次第に生じ、それは大脳皮質及び/または皮質下領域における脳組織の破壊を導く（非特許文献9）。この発作は完全に無意識的であり続けても良く、この場合痴呆は第一の知覚可能な結果である。MIDの存在では、重篤な鬱、気分の揺らぎ、及び癲癇と関連する認識能力の減少が徐々に生じる。

【0014】

痴呆の診断は今日では、精神神経学的な調査、及び疾患の発達の観察、特定形態の痴呆についての排除指標を使用する過程に基づいて主に実施されている。非常の多数の場合で、これらの調査は不明確な結果を与え、それは痴呆の診察された形態についての前述の数、及び不正確に診断された場合を説明している。疾患に典型的な大脳の変化は、生きている患者で直接的に確立することはもちろんできず、例えばX線撮影またはMRIによる脳機能の技術的に医学的な調査が完成しているが高価である。

【非特許文献1】AKIYAMA H. AND THE NEUROINFLAMMATION WORKING GROUP (2000). Inflammation and Alzheimer. *Neurobiology of Aging* 21 : 383-421

【非特許文献2】ASSICOT M., GENDREL D., CARSIN H., RAYMOND J., GUILBAUD J., BOHUON C. (1993). High serum Procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 341: 515-518

【非特許文献3】BECKER K. L., NYLEN E. S., WHITE J. C, MUELLER B., SNIDER R. H. (2004) . Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 1512-1525

【非特許文献4】CAPLAN L., SCHOENE W. C. (1978). Clinical features of subcortical arteriosclerotic encephalopathy (Binswanger's disease) . *Neurology* 28: 1206-1215

【非特許文献5】DANDONA P., NIX D., WILSON M. F., ALJADA A., LOVE J., ASSICOT M., BOHUON C. (1994). Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79: 1605-1608

【非特許文献6】GELDMACHER D. S. (2004). Dementia with lewy bodies : diagnosis and clinical approach. *Cleveland clinic Journal of Medicine* 71: 789-800

【非特許文献7】GENDREL D., ASSICOT M., RAYMOND J., MOULIN F., FRANCOUAL C, BADOUAL J., BOHUON C. (1996). Procalcitonin as a marker for the early diagnosis of neonatal infection. *Journal of Pediatrics* 128: 570-573

【非特許文献8】GENDREL D., RAYMOND J., ASSICOT M., MOULIN F., INIGUEZ J.L., LEBOUN P., BOHUON C. (1997). Measurement of Procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clinical Infectious Diseases* 24: 1240-1242

【非特許文献9】HACHINSKI V. C, LASSEN N. A., MARSHALL J. (1974). Multi-infarct dementia: a cause of mental deterioration in the elderly. *Lancet* 2: 207-209

【非特許文献10】HAN Y. Y., CARCILLO J. A., RUPPELL R. A., ADELSON P. D., WISNIEWSKI S. R., BELL M. I., JANESKO K. L., MARION D. W., KOCHANNEK P. M. (2002). Cerebrospinal fluid Procalcitonin and severe traumatic brain injury in children. *Pediatric Critical Care Medicine* 3: 39-44

【非特許文献11】HOLMES C, CAIRNS N., LANTOS P., MANN A. (1999). Validity of current clinical criteria for Alzheimer's disease, vascular dementia and dementia with lewy bodies. *British Journal of Psychiatry* 174: 45-50

【非特許文献12】JEREB M., MULOVIC I., HOJKER S., STRLE F. (2001). Predictive value of serum and cerebrospinal fluid Procalcitonin levels for the diagnosis of bacterial meningitis. *Infection* 29: 209-212

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 3】KATSUSE O., ISEKI E., KOSAKA K. (2003). Immunohistochemical study of the expression of cytokines and nitric oxide synthases in brains of patients with dementia with lewy bodies. *Neuropathology* 23: 9-15
- 【非特許文献 1 4】LOTRIC-FURLAN S., MARASPIN-CARMAN V., CIMPERMAN J., ORINE K., STOPAR T., STRLE F. (2002). Procalcitonin levels in patients with Lyme borreliosis. *Wiener Klinische Wochenschrift* 114: 530-532
- 【非特許文献 1 5】MACKENZIE I. R. (2000). Activated microglia in dementia with lewy bodies. *Neurology* 55: 132-134
- 【非特許文献 1 6】MACKENZIE I. R. (2001). Cortical Inflammation in Dementia With Lewy Bodies, *Arch. Neurol.* 58: 519-520 10
- 【非特許文献 1 7】MCKEITH I. G., GALASKO D., KOSAKA K., PERRY E. K., DICKSON D. W., HANSEN L. A., SALMON D. P., LOWE J., MIRRA S. S., BYRNE E. J., LENNOX G., QUINN N. P., EDWARDS J. A., INCE P. G., BERGERON C., BURNS A., MILLER B. L., LOVESTONE S., COLLERTON D., JANSEN E. N., BALLARD C., DE VOS R. A., WILCOCK G. K., JELLINGER K. A., PERRY R. H. (1996). Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international Workshop. *Neurology* 47: 1113-1124
- 【非特許文献 1 8】MCKEITH I. G., O'BRIEN J. T., BALLARD C. (1999). Diagnosing dementia with lewy bodies. *Lancet* 354: 1227-1228
- 【非特許文献 1 9】MCKEITH I. G. (2002). Dementia with lewy bodies. *British Journal of Psychiatry* 180: 144-147 20
- 【非特許文献 2 0】MORGENTHALER N. G., STRUCK J., FISCHER-SCHULZ C, BERGMANN A. (2002). Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin. *Clinical Chemistry* 48: 788-789
- 【非特許文献 2 1】MUELLER B., BECKER K. L., SCHACHINGER H., RICKENBACHER P. R., HUBER P. R., ZIMMERLI W., RITZ R. (2000). Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Critical Care Medicine* 28: 977-983
- 【非特許文献 2 2】O'CONNOR E., VENKATESH B., LIPMAN J., MASHONGONYIKA C, HALL J. (2001). Procalcitonin in critical illness. *Critical Care and Resuscitation* 3: 236-243 30
- 【非特許文献 2 3】RIZZU P., VAN SWIETEN J. C, JOOSSE M., HASEGAWA M., STEVENS M., TIBBEN A., NIERMEIJER M. F., HILLEBRAND M., RAVID R., OOSTRA B. A., GOEDERT M., VAN DUUN C. M., HEUTINK P. (1999). High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *American Journal of Human Genetics* 64: 414-421
- 【非特許文献 2 4】SELKOE D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81: 741-766
- 【非特許文献 2 5】SHIMETANI N., SHIMETANI K., MORI M. (2001). Levels of three inflammation markers, C-reactive protein, serum amyloid A protein and procalcitonin, in the serum and cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 61: 567-574 40
- 【非特許文献 2 6】SJOGREN M., FOLKESSON S., BLENNOW K., TARKOWSKI E. (2004). Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications. *Journal of Neurology and Neurosurgical Psychiatry* 75: 1107-1111
- 【非特許文献 2 7】SNIDER R. H. JR., NYLEN E. S., BECKER K. L. (1997). Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *Journal of Investigative Medicine* 45: 552-560
- 【非特許文献 2 8】TARKOWSKI E. (2002). Cytokines in dementias. *Current Drug Targets* 50

ets - Inflammation and Allergy 1: 193-200

【非特許文献 2 9】TARKOWSKI E., LILJEROTH A. M., MINTHON L., TARKOWSKI A., WALLI N A., BLENNOW K. (2003). Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. Brain Research Bulletin 61: 255-260

【非特許文献 3 0】C. E. TEUNISSEN, J. DE VENDE, H. W. M. STEINBUSCH, C. DE BRUIJ N (2002) , Biochemical markers related to Alzheimer' s dementia in serum and cerebrosoinal fluid. Neurobiology of Aging 23, 485-508

【非特許文献 3 1】VARMA A. R . , SNOWDEN J . S . , LLOYD J . J . , TALBOT P . R . , MANN D. M., NEARY D. (1999). Evaluation of the NINCDS-ADRDA criteria in the differentiation of Alzheimer' s disease and frontotemporal dementia. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 66: 184-188

10

【非特許文献 3 2】WHANG K. T., STEINWALD P. M., WHITE J. C, NYLEN E. S., SNIDER R. H., SIMON G. L., GOLDBERG R. L., BECKER K. L. (1998) . Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83: 3296-3301

【非特許文献 3 3】WHICHER I., BIENVENU J., MONNERET G. (2001). Procalcitonin as an acute phase marker. Annals of Clinical Biochemistry 38: 483-493

【非特許文献 3 4】ZHUKAREVA V., VOGELSBURG-RAGAGLIA V., VAN DEERLIN V. M., BRUCE J., SHUCK T., GROSSMAN M., CLARK C. M., ARNOLD S. E., MASLIAH E., GALASKO D., T ROJANOWSKI J. Q., LEE V. M. (2001) . Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. Annals of Neurology 49: 165 -175

20

【非特許文献 3 5】SPENCER CA, LOPRESTI JS, PATEL A, GUTTLER RB, EIGEN A, SHEN D, GRAY D, NICOLOFF JT (1990) . Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. J Clin Endocrinol Metab. 1990, 70(2) :453- 60

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

痴呆の診断を可能にし、特に同様なまたはおぼろげな臨床上的症状を有する各種の形態の痴呆の区別を容易にする予備的な調査方法に対して必要性が存在しており、適切な特異性と感度のバイオマーカーの免疫診断的測定が特に所望されている。

30

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、請求項 1 によれば、痴呆及び神経炎症性疾患の検出及び早期検出のための、重篤さの測定のための、並びにモニター及び予後のための C S F 診断 in vitro 方法の形態のそのような調査方法を提供し、プロカルシトニンの免疫活性 (P C T 免疫活性) の測定を、痴呆または神経炎症性疾患に罹患している患者、あるいはそのような疾患に罹患する疑いのある患者の脳脊髄液 (C S F) のサンプルで実施し、痴呆または神経炎症性疾患の存在、タイプ、過程、重篤さ、及び治療の成功についての結論を、測定した P C T 免疫活性から引き出し、それが健康なコントロール患者について典型的な値の閾値を超えるものである。

40

【0017】

特に、C S F における P C T 測定は、請求項 2 に強調されているように、1 当たり 1 0 0 n g を超える、特に 5 0 n g / l を超える、特に好ましくは 1 0 n g / l を超える P C T の機能的なアッセイ感度 (F A S) を有する高感度 P C T 免疫アッセイの補助で実施される。

【0018】

請求項 1 及び 2 に係る方法の有利な発展型は、従属請求項 3 から 1 2 に記載されている。

【0019】

50

以下により詳細に記載される測定は、CSFにおけるPCT免疫活性が、敗血症の診断について利用可能な市販のPCT免疫アッセイのものよりかなり好適である機能的なアッセイ感度(FAS)を有する高感度免疫アッセイによって、高い精度と信頼性で測定され得る一方、以下に説明されるように、既知のアッセイによるCSFにおけるPCT測定に関するデータに対する単独の試みは、ほとんど情報を提供しない矛盾した結果を導くことが示され、本発明は更に非常に一般的に、請求項13によれば、脳脊髄液(CSF)におけるプロカルシトニン免疫活性の測定のための、50ng/l以上、特に10ng/l以上の機能的なアッセイ感度(FAS)を有するプロカルシトニン測定のための高感度免疫アッセイの使用に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0020】

機能的なアッセイ感度(FAS;機能的な内部アッセイ感度とも称される)は、20%以下の内部アッセイ精度(内部アッセイ変動係数)を有する各方法によって測定される分析物濃度を示すパラメーターとして規定される(非特許文献35)。

【0021】

本発明は、痴呆の診断、特に最初により詳細に説明された既知の形態の初老期の痴呆が、痴呆の発達、症状、及び過程について必須であると考慮される炎症工程を各種の度合いで伴うという発見を適用することにより、各種の形態の初老期の痴呆を区別するための示差的分析を改良するための本発明者らによる考察に基づく。

【0022】

20

かくしてアルツハイマー病は、補体因子、急性期のタンパク質、及び炎症後サイトカインのような各種の炎症性タンパク質の関与を有する脳における慢性の局所的炎症反応の出現によって、それ自体特徴づけられる(非特許文献1及び30)。

【0023】

炎症工程はまた、血管痴呆(VAD)の起源において役割を果たす。TNF、TGF、IL-6、及びGM-CSF(顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)のレベルは、VADを有する患者において実質的に上昇する(非特許文献28及び29)。

【0024】

ADの場合とVADの場合の両者で、同様のサイトカイン生産カスケードがニューロン損傷にตอบสนองして開始するが、これら二つの形態の神経変性の誘引因子は異なり、脳における各種の神経病理学的変化を導くと推測される(非特許文献28)。

30

【0025】

DLBでも、炎症工程は役割を果たすようである。かくして、DLBを有する患者の脳における活性化ミクログリア細胞の数が増大し(非特許文献15)、TNFのような炎症後サイトカインは、小脳扁桃及び海馬のような脳の特定の領域で過剰発現する(非特許文献13)。

【0026】

FTD患者の脳における炎症反応の出現については、わずかにのみ散在する指標しか存在しない。Sjogren等の研究では、あるFTD患者の脳脊髄液において、炎症後サイトカインTNF、及び抗炎症性サイトカインTGFの有意に上昇した濃度が測定可能であった(非特許文献26)。

40

【0027】

敗血症患者及び他の患者の血清及び血漿におけるペプチドプロカルシトニン(PCT)の出現に関する本出願人の一部についての過度の臨床上的材料及び過度の経験の背景に反し、本発明者らは、痴呆及び他の神経炎症性疾患に対して診断学的に関連した態様で関連することができるPCT濃度の変化が、CSFにおいて測定できるかどうかを測定することが注目し得る問題であると考えた。

【0028】

プロカルシトニン(PCT)は、116アミノ酸からなり、重要なホルモンカルシトニン(チレオカルシトニン)の前駆体として最初に議論され、その完全アミノ酸配列が知ら

50

れているペプチドであり、成熟ホルモンカルシトニン、並びに特にカタカルシン（プロカルシトニン 96 - 116）及び n - 末端ペプチド（n - プロカルシトニン 1 - 57）を含む他の短いペプチド（ここで「PCT部分ペプチド」と称される）の均衡を導くタンパク質溶解性分解について詳細に議論されている。より詳細に説明すると、例えば特許EP 0 656 121 B1及びUS 5,639,617、並びに非特許文献 2 では、全身性の反応を有する重篤な細菌性炎症が、循環中に PCT の放出を導き、非常に高い容易に測定可能な量で見出される（非特許文献 2；非特許文献 22 の要約も参照；非特許文献 33；非特許文献 3）。本明細書を補足するために、前記特許及び文献で記録された一般的技術的知見に対して明らかに参照がなされる。他方で、ウイルス、自己免疫、及びアレルギー疾患は、血液中の PCT 濃度の有意な増大を導かない。PCT は細菌感染の重篤性を反映し、敗血症、重篤敗血症、及び敗血性ショックの診断及び治療モニターのためのマーカーとして使用される（火特許文献 5；非特許文献 7；非特許文献 27；非特許文献 32；非特許文献 21）。

10

【0029】

感染性の病因の炎症性疾患は、血清及び血漿中の測定可能な PCT 濃度に基づいて、非感染性の病因のものとは区別できるため、PCT の測定は示差的診断目的のためにも使用されて良い（EP 0 880 702 B1参照）。

【0030】

上述の特許及び文献に記載された通り、カルシトニンの放出で完全にプロセッシングされた PCT は検出しないが、全ての未プロセッシング PCT、及び任意にアッセイで使用される抗体のための両結合部位を有する PCT 部分ペプチドより長いものは検出するように、完全 PCT ペプチドのアミノ酸配列に結合する二つの抗体を使用するサンドイッチタイプの免疫アッセイにより、適切な態様で PCT は測定される。使用されるサンドイッチアッセイは完全な未プロセッシング PCT を排他的に検出するようなものではないため、完全 PCT 配列を有する分子の排他的測定のための操作の出現を避けなければならないという結果を有する PCT 測定の変わりに、PCT 免疫活性の測定を参照することが、本願では好ましい。一般的に、PCT 免疫活性の測定は、カルシトニンの形成で PCT のタンパク質分解性のプロセッシングにおいて、形成された PCT 部分ペプチドの各種のメンバーに位置する、またはカルシトニン配列を含まない PCT 部分ペプチドに位置する完全 PCT ペプチドのセグメントに結合する、二つの抗体を使用するサンドイッチ免疫アッセイによる測定としてデザインできる。

20

30

【0031】

敗血症の場合に血清または血漿で測定される完全 PCT 1 - 116 ではなく、二つのアミノ酸によって短くされた PCT 3 - 116 であるという事実は、EP 1 121 600 A1、及び EP 1 48 334 A1、または US 6,756,483 において説明されており、これらは本明細書を補足するものとして参照される。

【0032】

血清 / 血漿におけるプロカルシトニン免疫活性の測定のために、例えば市販の化学発光アッセイ LUMI test (登録商標) PCT (B.R.A.H.M.S. AG) が存在し、それは 300 ng / l の機能的なアッセイ感度 (FAS) を有し、非常に高い PCT 濃度が出現できる敗血症における PCT 測定用に作られている。より高感度の PCT 測定のために、アフィニティー精製ポリクローナル抗体で操作し、非特許文献 20 により詳細に記載されており、LUMI test (登録商標) PCT sensitiv (B.R.A.H.M.S. AG) として入手可能である修飾サンドイッチ免疫アッセイが最近開発された。このアッセイは 7 ng / l の明らかに好適な FAS を有する (非特許文献 20)。このアッセイの補助で、健康な患者で 13.5 ng / l (13.5 pg / ml) の平均 PCT 血清濃度を測定することが可能であり、< 7 から 63 ng / l の値が見出され、97.5% の百分位数が 42.5 ng / l である。

40

【0033】

CSF における PCT を測定するための実験のデータも、科学文献でわずかにのみであるが存在し、記載された全ての測定は、本発明に係る痴呆及び更なる免疫炎症性疾患の診断のための CSF 中の PCT の測定に理論的に関連することはできない前提で実施されて

50

いた。

【 0 0 3 4 】

感染マーカーとしてのPCTの妥当性から開始して、髄膜炎（非特許文献8；非特許文献12；非特許文献25）またはライムボレリア症（非特許文献14）を有する患者のCSF中のPCT濃度が測定可能であり、細菌性髄膜炎とウイルス性髄膜炎の区別が可能であるか測定する試みが実施された。増大した測定値が全く得られなかったか（非特許文献8；非特許文献25）、わずかにのみ弱い指標が可能であった（非特許文献12）という点で、この発見は矛盾していた。

【 0 0 3 5 】

PCTとペプチドGRP（カルシトニン遺伝子関連ペプチド）と外傷性脳損傷（TBI）を有する子供のCSFで上昇したレベルで測定されるアドレノメデュリンに対するホモログ配列指標との間の遺伝的關係から開始して、上昇したPCT濃度が、そのような子供の場合でもCSFで見出せるかが更に調査された（非特許文献10）。全体としての観察の有意性は依然として明らかではないとしても、外傷に対する急性期の反応に関連する上昇したPCT濃度を見出すことができた。本発明の主題を形成する痴呆及び更なる神経炎症性疾患の場合の測定といずれかの認識可能な論理的關係を見出すことはできない。

【 0 0 3 6 】

CSFにおけるPCTを測定する試みがなされた全ての場合で、わずか300ng/lのFASしか有さない、血清または血漿における敗血症診断のために開発された市販の assays が使用された。

【 0 0 3 7 】

本発明の基礎を形成し、実施例で記載された測定の場合で使用されたように、例えば非特許文献8及び非特許文献12に記載された測定を、非特許文献20に従って高感度PCT assayにより実施するならば、例えば細菌性髄膜炎のような感染性疾患の場合でも、好適な診断有意性を有するかなり改良された測定結果が得られると推測する理由を本出願人は有する。記載された条件下でのそのような高感度 assay によって、健康な患者に対する明らかな標準濃度が測定できることが指摘されるべきである。それ故本願は更に、診断目的のための高感度免疫 assay による、CSF中のPCTの測定に非常に一般的に関する。

【 0 0 3 8 】

以下では、測定結果と図面を参考にして、より詳細に本発明が説明される。

【実施例】

【 0 0 3 9 】

assay の記載

脳脊髄液におけるプロカルシトニンの測定を、非特許文献20に記載されたように実施した。しかしながら、凍結乾燥スタンダードを、ゼロの血清ではなくPBSに溶解した（1%BSAを有する）。

【 0 0 4 0 】

健康なコントロールと初老期の痴呆を有する患者の脳脊髄液におけるPCT免疫活性の測定

健康なコントロール患者の脳脊髄液で、LUMItest(登録商標)PCTsensitiv(非特許文献20参照)を使用してプロカルシトニンを検出した。濃度は12から133ng/l(平均濃度50ng/l)の間の範囲に存在することを示すことが可能であった。健康な患者の血清における平均PCT濃度はわずか13.5ng/lとして測定されたため(非特許文献20)、健康な患者では約1:4の血液とCSFの間のPCT濃度勾配が存在する。

【 0 0 4 1 】

健康な患者と、各種の形態の初老期の痴呆を有する患者の脳脊髄液中の測定されたPCT濃度が図1に示されている。

【 0 0 4 2 】

各種の初老期の痴呆の診断の高感度LUMItest PCTsensitiv assay の各感度と特異性が

10

20

30

40

50

、表 1 に示されている。

【 0 0 4 3 】

表 1：各種の痴呆を有する患者の C S F における P C T 免疫活性の測定の特異性と感度
【表 1】

痴呆	特異性 (%)	感度 (%)
主観的認識障害	1 0 0	5 0
前頭側頭骨痴呆	1 0 0	2 5
アルツハイマー痴呆*	1 0 0	6 0
血管痴呆	1 0 0	5 9
レヴィー小体を有する痴呆	1 0 0	7 5

10

*「恐らくアルツハイマー病」(p A D) と診断された患者の群、診断の慣例は、9 0 % のアルツハイマー診断についての平均統計的信頼性を有する。

【 0 0 4 4 】

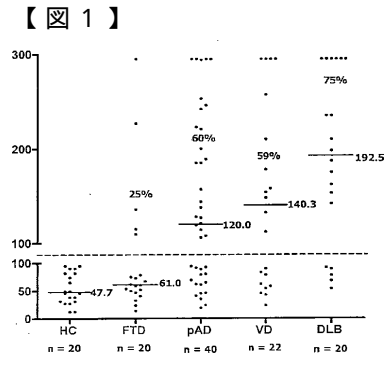
図 1 によれば、各患者群についての各種の平均濃度を測定結果は示しており、F T D 患者の群(主観的認識障害を有する患者)は、健康な患者よりわずかにのみ高く、他の患者群とは実質的に異なる平均的測定値を与え、他の患者群では、平均 P C T 濃度は健康な患者と比較してかなり上昇しており(i)、群によっても異なっている(i i)。D L B 患者は最も高い測定可能な P C T 濃度を有し、7 5 % の高感度でポジティブであると見出された(臨床的に事前に仕分けられた群; 特異性 1 0 0 %)。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 5 】

【図 1】図 1 は、健康な正常患者の C S F (H C) と、四種の異なる診断タイプの初老期の痴呆、特に前頭側頭型痴呆(F T D)、アルツハイマー痴呆(A D)、血管痴呆(V A D)、及びレヴィー小体を有する痴呆(D L B)を有する患者の C S F における、P C T 免疫活性の測定結果が、患者の測定群についての個々の形態の痴呆についての平均濃度と感度と共に示されている。



FIGUR 1

フロントページの続き

- (72)発明者 アンドレアス・ベルクマン
ドイツ・D - 1 2 3 5 1 ・ベルリン・バウムロイファーヴェーク・4 7
- (72)発明者 アンドレア・エルンスト
ドイツ・D - 1 6 7 6 1 ・ヘーニッヒスドルフ・ファルケンセーレ・シュトラッセ・4
- (72)発明者 ハラルト・ハンベル
ドイツ・D - 8 0 3 3 1 ・ミュンヘン・ヴェステンリーデルシュトラッセ・2 1

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開2001-231555(JP,A)
特表2005-512059(JP,A)
国際公開第2004/059293(WO,A1)
国際公開第2004/033448(WO,A1)
JEREB M. et al., Predictive value of serum and cerebrospinal fluid procalcitonin levels for the diagnosis of bacterial meningitis, infection, 2001年 8月, Vol.29, No.4, P.209-212
MORGENTHALER N. G. et al., Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin, CLINICAL CHEMISTRY 2002 UNITED STATES, 2002年, Vol.48, No.5, P.788-790
MORGENTHALER N. G. et al., Detection of Procalcitonin(PCT) in healthy controls and patients with local infection by a sensitive ILMA, Clin. Lab., 2002年, Vol.48, P.263-270

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53
G01N 33/68
CAplus(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用于检测痴呆和神经炎症疾病的CSF检测方法		
公开(公告)号	JP4837734B2	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	JP2008521892	申请日	2006-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン アンドレアエルンスト ハラルトハンベル		
发明人	アンドレアス・ベルクマン アンドレア・エルンスト ハラルト・ハンベル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/6896 G01N2333/585 G01N2800/2814 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	102005034174 2005-07-21 DE		
其他公开文献	JP2009501917A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

检测痴呆和神经炎症性疾病，测量严重程度，并在体外诊断脑脊液（CSF）用于监测和预后，其中测定降钙素原免疫反应性（PCT免疫活性）进行患有痴呆或神经炎症性疾病的患者或怀疑患有此类疾病的患者的CSF样品以及痴呆或神经炎症性疾病的存在，过程，严重程度和治疗来自测量的PCT免疫活性，其特征在于它超过健康对照患者的典型值阈值。

痴呆	特异性 (%)	感度 (%)
主観的認識障害	100	50
前頭側頭骨痴呆	100	25
アルツハイマー痴呆*	100	60
血管痴呆	100	59
レヴィー小体を有する痴呆	100	75