(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4110057号
(P4110057)

(45)発行日　平成20年7月2日(2008.7.2)　(24)登録日　平成20年4月11日(2008.4.11)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	ZNAD
C07K 16/18	*(2006.01)*	C07K	16/18	
G01N 33/577	*(2006.01)*	G01N	33/577	B

請求項の数 2　(全 39 頁)

(21)出願番号	特願2003-297400 (P2003-297400)
(22)出願日	平成15年8月21日 (2003.8.21)
(62)分割の表示	特願平7-517150の分割
原出願日	平成6年12月14日 (1994.12.14)
(65)公開番号	特開2004-45417 (P2004-45417A)
(43)公開日	平成16年2月12日 (2004.2.12)
審査請求日	平成15年8月26日 (2003.8.26)
(31)優先権主張番号	93403133.7
(32)優先日	平成5年12月21日 (1993.12.21)
(33)優先権主張国	オーストリア(AT)

(73)特許権者　502152193
インノジェネティクス・エヌ・ブイ
ＩＮＮＯＧＥＮＥＴＩＣＳ　Ｎ．Ｖ．
ベルギー国、ビー－９０５２　ゲント、ボックス　４、インダストリーパーク・ツウィナード　７
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100075225
弁理士　篠田　文雄
(72)発明者　ファンデルメーレン，マルク
ベルギー国、ベー－２４４０　ヘール、アルマンド・プルードムストラート　１０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＰＨＦ－タウに特異的なモノクローナル抗体、これらを分泌するハイブリドーマ、これらの抗体による抗原認識及びこれらの応用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

異常にリン酸化されたタウタンパク質の測定方法であって、以下の工程：

（ａ）患者から単離された脳脊髄液における、異常にリン酸化されたタウタンパク質のレベルを検出する工程；

（ｂ）（ａ）で得られたレベルを、アルツハイマー病の患者から得られた脳脊髄液の指標として予め定められたレベルの範囲、及び対照患者から得られた脳脊髄液の指標として予め定められたレベルの範囲と比較する工程；及び

（ｃ）アルツハイマー病の患者から得られた脳脊髄液の指標として予め定められたレベルがアルツハイマー病陽性を示し、対照患者から得られた脳脊髄液の指標として予め定められたレベルがアルツハイマー病陰性を示すという区別の下に、（ｂ）における比較から、（ａ）におけるレベルがどちらのレベルに属するかを決定する工程；

を含み、異常にリン酸化されたタウタンパク質のレベルが、ＡＴ１８０及び／又はＡＴ２７０抗体を用いて検出される、測定方法。

【請求項２】

異常にリン酸化されたタウタンパク質の測定方法であって、以下の工程：

（ａ）患者から単離された脳脊髄液における、異常にリン酸化されたタウタンパク質のレベルを検出する工程；

（ｂ）（ａ）で得られたレベルを、予め定められた切り捨てレベルと比較する工程；及び

（ｃ）切り捨てレベルを超えるレベルがアルツハイマー病陽性を示し、切り捨てレベルを

下回るレベルがアルツハイマー病陰性を示すという区別の下に、（ｂ）における比較から、（ａ）におけるレベルが切り捨てレベルを超えているか下回っているかを決定する工程；

を含み、異常にリン酸化されたタウタンパク質のレベルが、ＡＴ１８０及び／又はＡＴ２７０抗体を用いて検出される、測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ＰＨＦ－タウに特異的な新規なモノクローナル抗体、これらのモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ、及びこれらのモノクローナル抗体の抗原認識パターン及びこれらの応用に関する。本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体が関与する脳疾患の診断方法、更に詳しくは脳脊髄液（ＣＳＦ）試料における診断方法に関する。本発明はまた、アルツハイマー病又は他の型の痴呆症に関連することが見い出され、また本発明のモノクローナル抗体により特異的に認識される、リン酸化によりインビボ（生体内）で修飾可能なタウ分子の領域に関する。

【背景技術】

【０００２】

アルツハイマー病（ＡＤ）は、成人発病性痴呆症の最も一般的な型である。現在のところ、ＡＤの生前診断に利用可能な信頼できる生化学的試験はない。したがって、この疾患は、他の型の痴呆症の除外に基づいて臨床的に診断される。この診断は、特定の脳の領域における大量の神経炎斑（老人斑）及び神経原線維錯綜（neurofibrillary tangles; ＮＦＴ）の証明により、神経病理学的に確認することができる（McKhann et al., 1984）。

【０００３】

神経原線維錯綜は、らせんフィラメント対(paired herical filament; ＰＨＦ）よりなる。免疫細胞化学的証拠は、微小管結合蛋白タウがＰＨＦ及びＮＦＴの主要な蛋白成分であることを示唆している（Brion et al., 1985b; Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986)。タウのチューブリン結合ドメインがＰＨＦのコアと堅く結合している明確な証拠は、アミノ酸配列決定により得られた（Kondo et al., 1988）。それにも拘らず、タウペプチドがＰＨＦの主要な成分の小さな部分のみを表す可能性があることが示唆された（Wischik et al., 1988）。

【０００４】

タウ蛋白は、異なるイソフォームで存在し、このうち４～６個は成人脳で見い出されるが、胎児脳では１個のイソフォームのみが検出される。このイソフォームの多様性は、ヒト第１７染色体の単一遺伝子から、選択的ｍＲＮＡスプライシングにより生成される（Andreadis et al., 1992）。

分子クローニングから推定されるタウ蛋白の最も著しい特徴は、分子のカルボキシ末端部分に存在する３１又は３２個のアミノ酸のストレッチであり、これは３回又は４回繰り返されることがある。更なる多様性は、タウ分子のNH_2末端部分の長さ２９又は５８アミノ酸の挿入により生成される（Goedert et al., 1989）。簡単にするため、本特許出願の全ての番号付けは、Goedert et al.（1989）による全てのエキソンを含有するタウ変異体ｈｔａｕ４０（４４１アミノ酸の長さ）を参照する。

【０００５】

正常な環境下で、タウは、ニューロンの軸索区画における微小管の会合と安定性を促進する。タウの微小管結合ドメインは、タウの反復領域（２５５～３８１）に局在し（Lewis et al., 1990）、隣接領域〔カルボキシ末端尾部（３８２～４１４）とプロリン豊富領域（１４３～２５４）〕により調節される（Drubin and Kirschner, 1991）。微小管の安定性と束形成は、タウのカルボキシ末端尾部にある短い疎水性ジッパー（hydrophobic zipper）により媒介される（Lewis et al., 1989）。集合及び安定性は両者とも、選択的ｍＲＮＡスプライシング及びリン酸化により調節される。

【０００６】
正常な環境下で、成人の脳は、タウ１mol 当り、特にセリン４０４に存在する（Poulter et al., 1993）リン酸２～３mol を含有する（Selden and Pollard, 1983; Ksiezak-Reding et al., 1992)。一方、他の結果により、正常タウの異なる部位のリン酸化が、異なる発生のプロフィールに従うことが証明されている（Lee et al., 1991; Bramblett et al., 1993; Goedert et al., 1993a)。６０、６４及び６８kDa の異常タウ変異体は、神経原線維の変化及び老人斑を示す脳領域のみに検出された（Delacourte et al., 1990)。これらのタウ分子をアルカリホスファターゼで処理すると分子量が正常タウなみに変化するため、タウの異常な電気泳動挙動は、リン酸化によるものである（Goedert et al., 1992; Flament et al., 1990b; Greenberg and Davies, 1990)。現在、異常リン酸化部位は、ＰＨＦ－タウで４６、２３１、２３５、２６３及び３９６位に検出されている（Iqbal et al., 1989; Lee et al., 1991; Hasegawa et al., 1992)。これらの部位の４つで、リン酸化残基の後にプロリン残基があり、これは、タウの異常リン酸化の幾つかにプロリン指向キナーゼが関与することを示している。これらの部位に加えて、他の１０個の部位がｈｔａｕ４０には存在し、抗体反応性により示されるように、このうち２個が異常にリン酸化されている（Ｍａｂタウ２：Watanabe et al., 1992;Ｍａｂ　ＡＴ８：Biernat et al., 1992; Goedert et al., 1993）。

【０００７】
アルツハイマー病におけるタウの異常リン酸化は、ホスファターゼ／　キナーゼ平衡のシフトによる。インビトロで、幾つかのキナーゼ〔ｃｄｃ２－キナーゼ（Vulliet et al., 1992; Ledesma et al., 1992）、ＭＡＰキナーゼ（Drewes et al., 1992; Roder and Ingram, 1991)、グリコー　ゲンシンターゼキナーゼ（Mandelkow et al., 1992）、及びＴＰＫＩとＴＰＫII（Ishiguro et al., 1992)〕はタウをリン酸化することができる。ホスファターゼはアルツハイマー病であまり研究されておらず、これまでのところ、ただ１つのホスファターゼ（即ち、蛋白ホスファターゼ２A_1)が、異常にリン酸化された部位をインビトロで脱リン酸化できたにすぎない（Goedert et al., 1992）。

【０００８】
これまで、抗体を介する（Ｍａｂ　Ａｌｚ５０：Ghanbari et al., 1990;Ｍａｂ　Ａｂ４２３：Harrington et al., 1991)か、分子量の変化を介する（Flament et al., 1990; Delacourte et al., 1993)か、又は機能測定による脳抽出物中のＰＨＦ－タウの検出は、正常加齢被験者又は他の型の痴呆症の患者から、細胞骨格の性質が変化した痴呆症を識別するのに非常に有用であった。それにも拘らず、ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウの検出は、セリン２０２のような異常にリン酸化された部位の１つに対する抗体を使用しても、不可能なままであった（Goedert et al., 1993）。これは、下記の理由のいずれか又は複数に帰することができる：１）ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウの濃度が低いこと、２）全てのリン酸化可能部位中でリン酸化部位が均等に使用されないこと、３）これらの部位のホスファターゼ感度に差があること、及び、４）使用された抗体の親和性定数が低すぎること。

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
したがって、本発明の目的は、脳脊髄液中に存在する異常にリン酸化されたタウの信頼できる高感度の検出を可能にするモノクローナル抗体を提供することである。

【００１０】
本発明はまた、上記モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを提供することを目的とする。

【００１１】
本発明は更に、上記モノクローナル抗体により認識される、脳ホモジネート、又は脳脊髄液のような体液中に存在する異常にリン酸化されたタウ蛋白のエピトープを提供することを目的とする。

【００１２】

最後に、本発明は、異常にリン酸化されたタウ蛋白に関連する脳疾患のインビトロの検出又は診断のための方法を提供することを目的とする。

【００１３】

更に詳しくは、本発明は、下記アミノ酸配列：

【表１】

```
        143                                 150
NH2- Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg

                160                                         170
Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg

                                        180
Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser

                190                                         200
Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro

                                        210
Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu

                220                                         230
Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg

                                        240
Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr

                250
Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys COOH
```

（配列番号１）

【００１４】

を有する１４３～２５４位にわたる領域に存在する、異常にリン酸化されたタウ（ＰＨＦ－タウ）に属する抗原のリン酸化エピトープとの免疫複合体を形成するモノクローナル抗体に関し、このモノクローナル抗体は、脳脊髄液（ＣＳＦ）中の異常にリン酸化されたタウ蛋白（ＰＨＦ－タウ）を特異的に検出することができることを特徴とする。

本発明のモノクローナル抗体は、アルツハイマー病患者由来のヒト脳組織から抽出されたＰＨＦ－タウで直接免疫することにより得られた、一連のモノクローナル抗体から選択された。更に詳しくは、本発明のモノクローナル抗体は、天然に存在する異常にリン酸化されたタウに特異的に結合することを特徴とする。これらのエピトープの更なる分析により、本発明のモノクローナル抗体が、タウ分子の特定の領域（即ち、ＳＰ及びＴＰに対するキナーゼにより使用されるＴ１５３やＳ２３５のような幾つかの可能なリン酸化部位を含む１４３と２５４との間の領域）に限定されたリン酸化エピトープに対するものであることが示された。本発明のモノクローナル抗体は、更に、Goedert et al.(1993)に定義されたモノクローナル抗体ＡＴ８のエピトープとは異なるエピトープを認識し、ＡＴ８抗体と比較してＣＳＦ中のＰＨＦ－タウの検出が可能であることを特徴とする。これらは、脳切片、免疫ブロット又はＥＬＩＳＡにおいて優先的にＰＨＦ－タウを認識し、そして驚くべきことに、これらは、単独で又は他のＰＨＦ－タウ特異的抗体と組合せて、ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウを検出することができる。

【００１５】

結論として、本発明のモノクローナル抗体は、リン酸化状態が上述のタウ分子の特定の領域に限定される天然に存在する異常にリン酸化されたタウに特異的に結合するか、又はプロリン指向キナーゼ（上述の領域中の特にＳｅｒ－Ｐｒｏ又はＴｈｒ－Ｐｒｏ部位のリン酸化を誘発することができる）による処理後の組換え非リン酸化タウに結合することを特徴とする。ＭＡＰキナーゼ（Sturgill et al., 1991)、ｃｄｃ２キナーゼ（Labbe et a

l., 1991）及びグリコーゲンシンターゼキナーゼ（Vandenheede et al., 1980）のようなプロリン指向キナーゼは、種々の組織から精製することができるか、又は脳抽出物に存在しうる。これらのキナーゼによるタウのリン酸化は、下記の１つ以上のセリン／トレオニンがＡｌａのようなアミノ酸に突然変異すると、完全に消滅するか大きく減少する：Ｔ１５３、Ｔ１７５、Ｔ１８１、Ｓ１９９、Ｓ２０２、Ｔ２０５、Ｔ２１２、Ｔ２１７、Ｔ２３１、又はＳ２３５。したがって、これらの抗体に関するエピトープは、このような突然変異体タウにより、又は原核生物で発現された組換えタウのような非リン酸化タウやこれらのリン酸化相同体（ホモログ）により、又はヒトタウ４０蛋白の上述の領域の部分と同じアミノ酸配列を有する合成ペプチド（このペプチドは、上記キナーゼによりリン酸化されることができるか、又はペプチドの合成時にリン酸化され得ない）により性状解析することができる。このように、本発明のエピトープは、タウの１４３位と２５４位との間のプロリン豊富領域として定義され、これらの抗体に関するエピトープ（以後「ＰＨＦ－タウエピトープ」と呼ぶ）に含まれるトレオニン１５３（Ｔ１５３）、Ｔ１７５、Ｔ１８１、Ｓ１９９、Ｓ２０２、Ｔ２０５、Ｔ２１２、Ｔ２１７、Ｔ２３１及びＳ２３５又はこれらの部位の組合せで、異常にリン酸化されることができる。

【００１６】

「異常にリン酸化されたタウ蛋白を特異的に検出する」という表現は、本発明のモノクローナル抗体が、ＣＳＦ中に存在する正常タウと交差反応することなく、ＣＳＦ中の異常にリン酸化されたタウを検出するという事実に対応する。

【００１７】

「～と免疫複合体を形成する」という表現は、本発明のモノクローナル抗体が、下記方法の１つに述べられる条件下で上記抗原と結合することを意味する：

【課題を解決するための手段】

【００１８】

－　免疫光学顕微鏡法

脳組織試料（例えば、手術又は剖検で得られたアルツハイマー患者のもの）を、４％ホルマリン又はブアン固定液（Bouin's fixative）に浸漬することにより固定し、切片作成のためにパラフィンに包埋する。本発明のモノクローナル抗体を、発色のため３，３’－ジアミノベンジジン四塩酸塩を用いるアビジン－ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体法（Hsu et al., 1981）のような、生成された免疫複合体を可視化する方法と組合せて適用する。ハリス（Harris）ヘマトキシリン染色により切片をカウンター染色する。

【００１９】

－　組織切片の免疫電子顕微鏡法

脳組織試料（例えば、手術又は剖検でアルツハイマー患者から得られたもの）を、ブアン固定液又は１０％緩衝化ホルマリンで固定して、包埋することなく切片を作成する〔ビブラトーム（Vibratome)〕。全て当業者に公知の標準法（Brion et al., 1985a)により、本発明のモノクローナル抗体を、間接金免疫法（indirect immunogold method）による免疫染色に使用して、次に切片を固定し、包埋して電子顕微鏡用に切片を作成する。

【００２０】

－　免疫ブロッティング法

免疫ブロッティングのために、記載（Greenberg and Davies, 1990）されたようにＰＨＦ－タウ濃縮画分を調製する。典型的には、大部分前頭及び側頭皮質からの灰白質よりなる死後組織を、組織学的に確認されたアルツハイマー患者から得た。このアルツハイマー灰白質脳試料（５～１０ｇ）を、冷緩衝液Ｈ（１０mMトリス／１mMＥＧＴＡ／０．８Ｍ ＮａＣｌ／１０％蔗糖、pH７．４）１０容量と共に、テフロン／ガラスのポッターＳ（Potter S）〔ブラウン（Braun)、ドイツ〕ホモジナイザー中でホモジナイズした。６０Ｔｉ ＭＳＥローター中で２７，０００×ｇで４℃で２０分間遠心分離後、ペレットを除き、上澄液を１％（重量／容量）Ｎ－ラウロシルサルコシン及び１％（容量／容量）２－メルカプトエタノールに調整して、ミキサー〔スウェラブ（Swelab）、スウェーデン〕で回転させながら３７℃で２．５時間インキュベートした。上澄液混合物を１０８，０００×ｇで

２０℃で３５分間遠心分離した。このＰＨＦ－タウ含有ペレットをＰＢＳで穏やかに洗浄して、最後に同じ緩衝液１mlに懸濁した。

【００２１】

ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動を、１２％ゲルで還元条件下で行う（Laemmli, 1970)。電気泳動後、蛋白を、固定してクーマシーブリリアントブルーで染色するか、又はニトロセルロースシート〔ハイボンド－Ｃ（Hybond-C）、アマーシャム（Amersham）〕若しくはイモビロン（Immobilon)フィルター〔ミリポア（Millipore)〕に移す（Towbin et al., 1979)。

【００２２】

移した後、このフィルターを、０．０５％（v/v)ツイーン（Tween)２０を含有するＰＢＳ(Tween－ＰＢＳ）に前もって浸漬し、次に５％（w/v)乾燥スキムミルク及び１０％（v/v)ウシ新生児血清を含有する Tween－ＰＢＳ（ブロッキング緩衝液）中で１時間インキュベートする。次に、このフィルターを、４℃で一晩、ブロッキング緩衝液で適切に希釈した本発明のモノクローナル抗体で処理する。

【００２３】

次に、このフィルターを Tween－ＰＢＳ中で３回洗浄して、ブロッキング緩衝液で１／３，０００に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識　ウサギ抗マウスＩｇＧ〔ダコパッツ（Dakopatts)、デンマーク〕で室温で１．５時間処理する。 Tween－ＰＢＳ中で３回洗浄後、ブロッキング緩衝液で１／２５０に希釈したストレプトアビジン－ビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体〔アマーシャム（Amersham）〕を、室温で１．５時間適用する。次に、このフィルターを Tween－ＰＢＳ中で３回、ＰＢＳ中で１回洗浄する。次いでバックグラウンドが染色されるまで、このフィルターを、０．０５％（w/v)ジアミノベンジジン及び０．０３％（v/v)過酸化水素を含有するＰＢＳ中でインキュベートする。

【００２４】

モノクローナル抗体と抗原との間の免疫複合体の形成は上述された正確な条件に限定されず、抗体と抗原の結合の免疫化学的性質に関係する全ての方法が免疫複合体の同様な形成を引き起こすことは明白であろう。

【００２５】

更に詳しくは、本発明は、下記のいずれかとの免疫複合体を形成することを特徴とする上記と同義のモノクローナル抗体に関する：

－　上記と同義の配列（配列番号１）内に位置するリン酸化エピトー　プ；又は

－　それ自体配列番号１に示されるヒトタウ蛋白領域に位置するリン酸化エピトープと複合体を形成することができるモノクローナル抗体との複合体を形成することができる任意の他のリン酸化ペプチド。

【００２６】

本発明の好適なモノクローナル抗体であるＡＴ１８０及びＡＴ２７０は、１９９２年１２月２２日に第９２１２２２０４号として又は１９９３年７月７日に第９３０７０７７４号として、ＥＣＡＣＣ〔動物細胞培養物のヨーロッパ寄託機関（European Collection of Animal Cell Cultures)、ワクチン研究及び生産研究所（Vaccine Research and Production Laboratory）、公衆衛生及び実験室サービス（Public Health and Laboratory Service；ＰＨＬＳ）、応用微生物学及び研究センター（Centre for Applied Microbiology and Research）、ポルトンダウン（Porton Down)、英国ソールズベリー、ウィルトシア州ＳＰ４　ＯＪＧ〕に寄託したハイブリドーマにより産生される。

【００２７】

上述のモノクローナル抗体は、これらのモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを取得し単離する方法により得られる。

【００２８】

本発明の好適なモノクローナル抗体は、コーティング相にこれらのモノクローナル抗体を用いて、異なる量のリン酸化タウ及び非リン酸化タウを加えたＣＳＦと共に増幅することなくこれらをインキュベートして、ＥＬＩＳＡで測定する場合、少なくとも１、５、１

０又は２０pg/ml のリン酸化タウを検出することができる。リン酸化タウは、アルツハイマー病で死亡した患者由来の脳組織のタウ抽出物に見い出されるような、タウの異常なリン酸化の部位に対応する位置のＳｅｒ及びＴｈｒアミノ酸をリン酸化することができるラット脳抽出物と共に、組換え非リン酸化タウをインキュベートすることにより調製される（Goedert et al., 1993）。

【００２９】

本発明のハイブリドーマを得るための方法は、以下の工程を含む：

－　抗原、好適には以下に開示される本発明のモノクローナル抗体により認識される、異常にリン酸化されたタウ（ＰＨＦ－タウ）、若しくはリン酸化ヒトタウペプチド若しくは免疫親和性精製した異常にリン酸化したタウである抗原で、前もってインビボ免疫した動物（例えば、マウス又は　ラット）の脾臓細胞から、又は、同抗原で前もってインビトロ免疫したこのような動物の脾臓細胞から出発して；

－　上記の免疫された細胞を、ハイブリドーマ形成条件下でミエローマ細胞と融合させて；そして－　脳脊髄液（ＣＳＦ）中の異常にリン酸化されたタウ（ＰＨＦ－タウ）のリン酸化エピトープを特異的に認識することができるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択する。

【００３０】

リン酸化ヒトタウペプチドとは、そのアミノ酸配列中に、ヒトタウのアミノ酸１４３～２５４位にわたる領域に含まれるリン酸化配列を含むペプチドのことをいい、このペプチドは、本発明の抗体と免疫複合体を形成することができることを特徴とする。

【００３１】

本発明の抗原は、有利には、アルツハイマー病、ダウン症候群、ピック病、亜急性硬化性全脳炎（ＳＳＰＥ）、又は異常にリン酸化されたタウ蛋白が関係している他の神経疾患を有する患者の、脳、脳脊髄液又は血清に含まれる；この抗原は、本発明のモノクローナル抗体との免疫反応を引き起こす。

【００３２】

更に詳しくは、本発明はまた、上述のような方法により得られ、以下の工程を含むことを特徴とする、上述のモノクローナル抗体に関する：

－（実施例の項で開示するように）アルツハイマー病の患者のヒト脳試料から抽出し精製した異常にリン酸化されたタウ（ＰＨＦ－タウ）、又はリン酸化ヒトタウペプチド、又は本発明のモノクローナル抗体と反応することができる免疫親和性精製した異常にリン酸化されたタウで前もって免疫したマウスの脾臓細胞から出発して；

－　上記の免疫された細胞を、ハイブリドーマ形成条件下でミエローマ細胞と融合させて；

－（実施例の項に詳細に説明するように）ＰＨＦ－タウを特異的に認識し、ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウを特異的に検出することができるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択する。

【００３３】

本発明のモノクローナル抗体を生産する方法は、以下の工程を含む：

－　上述の選択されたハイブリドーマを適切な培地で培養し；そして

－　この選択されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体を回収するか；又は代わりに

－　選択されたハイブリドーマをマウスの腹腔中に注入し、そしてマウスに腹水が産生された時；

－　この腹水から、生成されたモノクローナル抗体を回収する。

【００３４】

本発明のモノクローナル抗体は、インビトロの従来法（例えば、中空繊維又はマイクロカプセルを使用する固定化細胞の培養、あるいは、例えば、エアリフト反応器又は撹拌バイオリアクターを使用する均質な懸濁液中での細胞の培養）により調製することができる。

【００３５】
本発明はまた、本発明の任意のモノクローナル抗体と免疫複合体を形成することができるペプチドに関し、このペプチドは、リン酸化型であり、そして、
－　このペプチドの配列は、配列番号１に示される配列のリン酸化部分を含むか、又はこの部分よりなるか、あるいは、
－　このペプチドの配列は、本発明のモノクローナル抗体の任意の１つと免疫複合体を形成することができる任意のペプチドの配列を含むか、又はこの配列よりなる。
このリン酸化ペプチドは、好適には６～１００アミノ酸の長さである。本発明のこの実施態様のペプチドは、古典的な化学合成により調製することができる。この合成は、当該分野で公知の任意の方法により、均質な溶液又は固相中で行うことができる。
【００３６】
リン酸化ペプチドは、当該分野で公知の任意の方法により調製される（例えば、de Bont et al., 1990a; de Bont et al., 1990b; Perich, 1991; Otvos et al., 1989）。
【００３７】
好適な実施態様によれば、本発明は、以下の配列：
Ｖａｌ－Ａｒｇ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ（アミノ酸２２９～２３３；　ヒトタウ４０の番号付け、配列番号２）
よりなるか、又はそのアミノ酸配列中にこの配列を含む上述のリン酸化　ペプチドに関し、このＴｈｒ（２３１）は、リン酸化されており、このペプチドは、１９９２年１２月２２日に第９２１２２２０４号としてＥＣＡＣＣに寄託したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体ＡＴ１８０と免疫複合体を形成することができることを特徴とする。
【００３８】
別の好適な実施態様によれば、本発明はまた、以下の配列：
Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ（アミノ酸１７９～１８３；ヒトタウ４０の番号付け；配列番号３）
よりなるか、又はそのアミノ酸配列中にこの配列を含む上述のリン酸化ペプチドに関し、このＴｈｒ（１８１）は、リン酸化されており、このペプチドは、１９９３年７月７日に第９３０７０７７４号としてＥＣＡＣＣに寄託したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体ＡＴ２７０と免疫複合体を形成することができることを特徴とする。
【００３９】
更に別の実施態様によれば、本発明は、免疫することにより請求項１　～４のいずれか１項記載のモノクローナル抗体を作成することができる、上述のリン酸化ペプチドに関する。
【００４０】
免疫に使用されるペプチドは、好適には、良好な免疫原性応答を達成するために、担体分子に結合された型である。このような担体分子は、当該分野で公知であり、リンカー基（これも当該分野に含まれる）によりペプチドにカップリングされる。
【００４１】
本発明はまた、アルツハイマー病のようなＰＨＦ－タウが関与する脳／神経疾患の死後のインビトロの検出又は診断の方法に関し、この方法は、少なくとも以下の工程を含む：
－　本発明のモノクローナル抗体を、抗原抗体複合体の生成に適した条件下で、アルツハイマー病、又は異常にリン酸化されたタウ蛋白（ＰＨＦ－タウ）が関与する任意の他の疾患であった患者から単離したＮＦＴの調製物又は界面活性剤で抽出した脳ホモジネートと接触させて；
－　この脳ホモジネートへのこの抗体の免疫学的結合を検出し、そして場合によってはこの複合体を分離して、精製された形で目的の抗原を回収する。
目的の抗原の回収は、最初に、形成された固定化抗体抗原複合体を洗浄し；
－　この複合体を、抗原抗体複合体の解離を引き起こすことのできる溶液（例えば、３Ｍ チオシアン酸カリウム、２．５Ｍ 塩化マグネシウム、０．２Ｍ クエン酸塩－クエン酸、

pH３．５又は０．１Ｍ 酢酸）で処理し；
そして
－　この抗原を精製された形で回収する
ことにより行うことができる。
【００４２】
本発明はまた、アルツハイマー病におけるような異常にリン酸化したタウ蛋白が関与する脳／神経疾患のインビトロの検出又は診断の方法に関し、この方法は、
－　ＣＳＦの試料、より好適には未濃縮ＣＳＦ、又はＰＨＦ－タウが関与する脳疾患、より詳しくはアルツハイマー病に罹患していることが疑われる患者からの血清の試料、又は脳組織、脳脊髄液若しくは血清から出発する当業者に公知の抽出手順の結果としての蛋白若しくはポリペプチド（Ibqal et al., 1984; Greenberg and Davies, 1990）の試料を、抗原抗体複合体の生成に適したインビトロ条件下で本発明のモノクローナル抗体と接触させて；そして
－　脳抽出物、脳脊髄液又は血清、又は蛋白若しくはポリペプチドの試料へのこの抗体の免疫学的結合を検出することを含む。
【００４３】
有利には、本発明のモノクローナル抗体は、樹脂のような適切な支持体上に固定化された状態にある。あるいは、本発明の方法は、当業者に公知の他の任意の免疫測定法を使用することにより実施することができる。
【００４４】
次いで、抗原の検出方法は、例えば以下のとおり行うことができる：
－　抗原と本発明の抗体とにより形成されたこの抗原抗体複合体を、以下のもの：
－　二次抗体
〔＊　異常にリン酸化されたタウ蛋白のエピトープ、又はエピトープを有する任意のリン酸化タウペプチドのエピトープ（これらのエピトープは本発明のエピトープとは異なる）を認識するモノクローナル抗体であり得るか、あるいは
＊　異常にリン酸化されたタウを認識するポリクローナル抗体、又はＰＨＦ－タウのエピトープを有するペプチドを認識するポリクローナル抗体（このポリクローナル抗体は、本発明のエピトープとは異なるエピトープと免疫複合体を形成することができ、好適には固定化タウ蛋白を使用する免疫親和性クロマトグラフィーにより精製されている）であり得る〕；
－　特異的標識付けのため又は二次抗体とカップリングするためのマーカー（このマーカーは、当業者に公知の任意の可能なマーカーである）；
－　一方では本発明のモノクローナル抗体と試料との間の、他方では　結合した二次抗体とマーカーとの間の免疫反応を行うための適切な緩衝液、
と一緒にする。
【００４５】
免疫学的に結合したモノクローナル抗体の検出は、当該分野に含まれる従来法により達成することができる。有利には、二次抗体自体が、マーカーを有するか、マーカーと直接又は間接にカップリングする基を有する。
【００４６】
本発明のモノクローナル抗体はまた、アルツハイマー病（ＡＤ）、及び領域１４３～２５４内の異常にリン酸化されたタウの形成が関与する任意の疾患の、ＣＳＦに基づく診断を可能にする（即ち、ＣＳＦ中の修飾型タウを検出する）。これに関連した問題は、この抗原がＣＳＦ中に非常に少量で存在し、このため検出法は非常に高感度である必要があることである。この感度の問題は、（ｉ）本発明のモノクローナル抗体の組合せを使用すること、又は（ii）本発明のモノクローナル抗体と、当該分野で公知の他の正常及び／又は異常にリン酸化されたタウモノクローナル抗体との組合せを使用すること、及び／又は（iii)より高感度のＰＨＦ－タウ特異的ＥＬＩＳＡを可能にする触媒レポーター固着増幅法（catalyzed reporter deposition amplification technique ；ＣＡＲＤ、Bobrow et al

., 1989)のような増幅法との組合せで、本発明のモノクローナル抗体又はモノクローナル抗体の組合せを使用することにより、更に克服することができる。

【００４７】

本発明のモノクローナル抗体により得られた結果は、上昇したＰＨＦ－タウレベルがＡＤで見出されることを示しているが、アミノ酸１４３～２５４に含まれるタウの領域にタウの異常なリン酸化が生じる他の神経疾患でもこれが起こる可能性がある。

【００４８】

別の実施態様によれば、本発明は、次の１つの疾患、すなわちアルツハイマー病、ダウン症候群、ピック病、及び異常にリン酸化されたタウ蛋白又はらせんフィラメント対が関係する他の神経疾患のインビトロの診断用キットに関し、このキットは、

－　マイクロプレートに入れた少なくとも１つの本発明のモノクローナル抗体；

－　インビトロ診断すべき試料（ＣＳＦ、血清又はこれらから抽出した蛋白）を含む調製物；

－　二次抗体

〔＊　異常にリン酸化されたタウ蛋白のエピトープ、又はエピトープを有する任意のリン酸化タウペプチドのエピトープ（これらのエピトープは本発明のエピトープとは異なる）を認識するモノクローナル抗体であり得るか、あるいは

＊　異常にリン酸化されたタウを認識するポリクローナル抗体、又はＰＨＦ－タウのエピトープを有するペプチドを認識するポリクローナル抗体（このポリクローナル抗体は、本発明のエピトープとは異なるエピトープと免疫複合体を形成することができ、好適には固定化タウ蛋白を使用する免疫親和性クロマトグラフィーにより精製されている）であり得る〕；

－　特異的標識付けのため又は二次抗体とカップリングするためのマーカー；

－　一方では本発明のモノクローナル抗体と試料との間の、他方では結合した二次抗体とマーカーとの間の免疫反応を行うための適切な緩衝液；

－　場合によっては、標準物質の目的のため、又は目的抗原に関する競合物質の目的のための、アミノ酸１４３～２５４にわたる領域に含まれるＰＨＦ－タウのエピトープを有するペプチドを含むことを特徴とする。

【００４９】

アルツハイマー病のような、異常にリン酸化されたタウ蛋白が関与する脳／神経疾患のインビトロ検出又は診断のための本発明の好適な実施態様は、本発明のモノクローナル抗体の混合物（組合せ）、又は少なくとも１つの本発明のモノクローナル抗体と、ヒトタウ４０の１４３～２５４位にわたる領域（配列番号１）に存在するＰＨＦ－タウの領域を特異的に認識することのできる他の抗体との組合せを含む、上述のような方法又はキットに関し、上記のモノクローナル抗体は、好適には以下のもの：

＊（１）１９９２年１２月２２日に第９２１２２２０４号としてＥＣＡＣＣに寄託したハイブリドーマにより産生される、モノクローナル抗体ＡＴ１８０；

＊（２）１９９３年７月７日に第９３０７０７７４号としてＥＣＡＣＣに寄託したハイブリドーマにより産生される、モノクローナル抗体ＡＴ２７０；

＊（３）１９９１年１０月８日に第９１１００８０６号としてＥＣＡＣＣに寄託したハイブリドーマにより産生される、モノクローナル抗体ＡＴ８；

から選択され、そして上記混合物は、好適には以下のリスト：

＊モノクローナル抗体（１）及び（２）を含むモノクローナル抗体の混合物；

＊モノクローナル抗体（１）及び（３）を含むモノクローナル抗体の混合物；

＊モノクローナル抗体（２）及び（３）を含むモノクローナル抗体の混合物；

＊モノクローナル抗体（１）、（２）及び（３）を含むモノクローナル抗体の混合物；

から選択され、上記の方法又はキットは、更に、

－　インビトロ診断すべき試料を含む調製物；

－　二次抗体

〔＊　異常にリン酸化されたタウ蛋白のエピトープ、又はエピトープを有する任意の

リン酸化タウペプチドのエピトープ（これらのエピトープは本発明のエピトープとは異なる）を認識するモノクローナル抗体であり得るか、あるいは

＊　異常にリン酸化されたタウを認識するポリクローナル抗体、又はＰＨＦ－タウのエピトープを有するペプチドを認識するポリクローナル抗体（このポリクローナル抗体は、本発明のエピトープとは異なるエピトープと免疫複合体を形成することができ、好適には固定化タウ蛋白を使用する免疫親和性クロマトグラフィーにより精製されている）であり得る〕；

－　特異的標識付けのため又は二次抗体とカップリングするためのマーカー；

－　一方では本発明のモノクローナル抗体と試料との間の、他方では結合した二次抗体とマーカーとの間の免疫反応を行うための適切な緩衝液；

－　場合によっては、標準物質の目的のため、又は目的抗原に関する競合物質の目的のための、ＰＨＦ－タウのエピトープを有するペプチドを含むか、あるいは使用することを特徴とする。

【００５０】

更に別の実施態様によれば、本発明は、抗体をコーティングし検出することを含むサンドイッチＥＬＩＳＡ検出フォーマットに関係する、アルツハイマー病のような、異常にリン酸化されたタウ蛋白が関与する脳／神経疾患をインビトロで検出又は診断するための方法又はキットに関し、上記のコーティング抗体は、少なくとも１つの本発明のモノクローナル抗体よりなり、そして上記の検出抗体は、エピトープが本発明のモノクローナル抗体に対するどのエピトープとも異なる正常及び／又は異常にリン酸化されたヒトタウを検出することができる少なくとも１つのモノクローナル抗体よりなる。このような好適なサンドイッチＥＬＩＳＡフォーマットは、本発明の実施例の項で詳細に説明される。

【００５１】

表の凡例

第１表

ＰＨＦ－タウ特異的モノクローナル抗体ＡＴ１８０及びＡＴ２７０を使用するＰＨＦ－タウ及び正常タウの検出。ＰＨＦ－タウを特異的に認識する飽和量のモノクローナル抗体でコーティングしたマイクロプレートを、

異なる量の非リン酸化又はリン酸化タウ〔後者は、組換え非リン酸化タウを、タウの異常なリン酸化部位に対応する位置のＳｅｒ及びＴｈｒアミノ酸をリン酸化することができるラット脳抽出物と共にインキュベートすることにより調製した（Goedert et al., 1993）〕を加えたＣＳＦと共にインキュベートした。結合した抗原を実施例の項に記載のように検出した。

第２表

ＡＤ患者、対照患者及び種々の非ＡＤ神経疾患の患者からのＣＳＦ試料を、記載（実施例III)のように異なる組合せの捕獲用抗体を使用するＥＬＩＳＡで試験した。イノテストｈｔａｕ〔Innotest htau （インノジェネティクス（Innogenetics）、ベルギー〕を使用して行い、pg/ml ＣＳＦで表した総タウの測定を除いて、全ての値は、mOD 単位として表した。

各構成で使用した実験条件が異なるため、レーン内比較のみが可能である。

第３表

対照患者、ＡＤ患者及び種々の非ＡＤ神経疾患（ＯＮＤ）のＣＳＦ試料を、イノテストｈｔａｕ（Innotest htau)〔インノジェネティクス（Innogenetics）、ベルギー〕を使用して測定した。記載（実施例IV）のように、捕獲用抗体としてＡＴ８、ＡＴ１８０及びＡＴ２７０を使用し、

検出用抗体としてＡＴ１２０及びＨＴ７を使用したＰＨＦ－タウ特異的ＥＬＩＳＡを用いる更なる試験のために、ＡＤ患者とＯＮＤ患者のコホートから、高い総タウ値を有する患者を選択した。結果は、総タウ〔イノテストｈｔａｕ（Innotest htau)〕についてはＣＳＦ中のpg/ml タウで、ＰＨＦ－タウ特異的ＥＬＩＳＡについてはmOD 単位として表した。

【実施例】
【００５２】
実施例Ｉ
抗原としてＰＨＦ－タウを使用するモノクローナル抗体ＡＴ１８０及び　ＡＴ２７０の調製
１．免疫用抗原の調製
Greenberg and Davies（1990）の変法によりＰＨＦ－タウを部分精製した。大部分が前頭及び側頭皮質からの灰白質よりなる死後組織を、組織学的に確認されたアルツハイマー患者から得た。このアルツハイマー灰白質脳試料（５～１０ｇ）を、冷緩衝液Ｈ（１０mMトリス／１mMＥＧＴＡ／０．８M ＮａＣｌ／１０％蔗糖、pH７．４）１０容量と共に、テフロン／ガラスのポッターＳ（Potter S）〔ブラウン（Braun)、ドイツ〕ホモジナイザー中でホモジナイズした。ホモジネートを、６０Ｔｉ　ＭＳＥローター中で２７，０００×ｇで４℃で２０分間遠心分離後、ペレットを除き、上澄液を１％（重量／容量）Ｎ－ラウロシルサルコシン及び１％（容量／容量）２－メルカプトエタノールに調整して、ミキサー〔スウェラブ（Swelab）、スウェーデン〕で回転させながら、３７℃で２．５時間インキュベートした。上澄液混合物を１０８，０００×ｇで２０℃で３５分間遠心分離した。このＰＨＦ－タウ含有ペレットをＰＢＳで穏やかに洗浄して、最後に同じ緩衝液１mlに懸濁した。
抗原調製物を、１０％ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、続いてポリクローナルウサギ抗ヒト正常タウ抗血清を使用するウェスタンブロッティングにより評価した（Mercken et al., 1992a)。
【００５３】
２．免疫プロトコール及び融合手順
Ｂａｌｂ／ｃマウスを完全フロイントアジュバント中のＰＨＦ－タウ調製物１００μｇで皮下投与により初回免疫し、その後、不完全フロイントアジュバント中の同じ抗原１００μｇで3週間の間隔で3回腹腔内投与により追加免疫した。融合の前3日目と2日目に、マウスを生理食塩水中のＰＨＦ－タウ１００μｇで追加免疫した。
Kohler and Milstein （1975）の変法を使用して、ＰＥＧ４０００を用いてマウス脾臓細胞をＳＰ２／０ミエローマ細胞と融合させた。
融合実験の細胞を、フィーダー層としてマウス腹腔マクロファージを前もって接種した９６ウェルプレートに、４．５×10^4 脾臓細胞／ウェルの密度で懸濁した。これらのウェルを、連続増殖１２日後、以下に詳述するサンドイッチＥＬＩＳＡにより、抗ＰＨＦ－タウ抗体産生についてスクリーニングした。
２０％ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム（１mM）、Ｌ－グルタミン（２mM）、ペニシリン（１００U/ml）、ストレプトマイシン（１００mg/ml)、及び非必須アミノ酸を補足したダルベッコー改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で、ハイブリドーマの増殖を行った。全ての製品はギブコ（Gibco)（ペーズリー、英国）から購入した。細胞は、加湿したCO_2 空気インキュベーター中でインキュベートした。
【００５４】
３．抗ＰＨＦ－タウ抗体スクリーニングのためのサンドイッチＥＬＩＳＡ
抗ＰＨＦ－タウモノクローナル抗体の検出に使用したスクリーニングＥＬＩＳＡは、コーティング相に親和性精製したポリクローナルウサギ抗ヒトタウ抗体（Mercken et al., 1992a)を用いるサンドイッチＥＬＩＳＡ系であった。このために、臭化シアンで活性化したセファロース〔ファルマシア社（Pharmacia, LKB）スウェーデン〕への共有結合による固定を用いる免疫親和性カラムの調製に、Mercken et al.(1992a）に記載されたように調製した精製したヒト正常タウを使用した。親和性結合した抗タウ画分を、このカラムからpH２．５の０．１M クエン酸緩衝液で溶出した。中和後、抗タウ含有画分をプールして、コーティング緩衝液（１０mMトリス、１０mMＮａＣｌ、１０mMNaN_3 、pH８．５）中で高結合性マイクロタイタープレート〔ヌンク（Nunc）、ギブコ（Gibco)、ペーズリー、英国〕上に４℃で一晩コーティング（１μg/ml）した。非特異的結合を低下させるため、Ｐ

ＢＳ中の１０％飽和カゼイン１２５μｌで３０分間オーバーコーティングした後、このプレートを、適切に希釈したＰＨＦ－タウ調製物１００μｌと共に３７℃で６０分間インキュベートした。このプレートをＰＢＳ－０．０５％ Tween２０（v/v)で３回洗浄し；ハイブリドーマ上澄液１００μｌを添加して、３７℃で１時間インキュベーションを続けた。洗浄後、結合したモノクローナル抗体を、ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウス血清〔ダコパッツ（Dakopatts)、グロストルップ（Glostrup）、デンマーク〕で検出した。全ての試薬は、１０％カゼインを含むＰＢＳで希釈した。最後の洗浄後、０．４２mM３，５，３’，５’－テトラメチルベンジジン、１００mMクエン酸中０．００３％（v/v)H_2O_2、１００mMリン酸水素二ナトリウム、pH４．３を１００μｌ、ペルオキシダーゼの基質として添加した。２M H_2SO_4 溶液５０μｌで反応を停止させた。タイターテク・マルチスキャン（Titertek Multiscan）〔フローラボラトリーズ（Flow Laboratories)、エフラブ社（Eflab, Oy)、フィンランド〕で４５０nmで吸光度を読んだ。

【００５５】

このような融合実験から、上記３に記載されたスクリーニング方法を使用して、２８個の陽性培養物（即ち、抗ＰＨＦ－タウモノクローナル抗体を分泌する培養物）を、全１，４４０培養物の中から選び出した。これらの陽性培養物を、任意にＡＴ１～ＡＴ２８と名付けた（これらのハイブリドーマ培養物の幾つか、即ち、ＡＴ１～ＡＴ１４は、Mercken et al., 1992b により記載されている）。この最初のスクリーニングにおけるように、ウェルの肉眼観察によると、陽性培養物は、大部分混合クローンよりなることが判った（ウェル当り通常１～４クローンの間）。全てのハイブリドーマ培養物を、当業者に公知の方法である限界希釈法によりサブクローン化して、最終的に均一なイディオタイプを有する抗体を分泌する純粋なハイブリドーマクローンを得た。これらの純粋なハイブリドーマクローンの幾つかを、実施例IIに記載されるようにＥＬＩＳＡで正常及びＰＨＦ－タウへのこれらの反応性パターンに関して、及び実施例IIに開示されるようにタウ突然変異体を使用するウェスタンブロット解析によりこれらのエピトープの位置に関して、更に試験した。

【００５６】

後者の手順は以下のとおり行った：精製した正常ヒトタウ及びＰＨＦ－タウを１０％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルにのせて、Laemmli(1970)
による変性条件下で泳動した。

【００５７】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、ニトロセルロース〔ハイボンド－Ｃ（Hybond- C)、アマーシャム（Amersham）、ブリュッセル、ベルギー〕への移行を、１０mM$NaHCO_3$、３mMNa_2CO_3、pH９．９中で、冷却しながら　５５Ｖで１２０分間行った。ブロッティング後、このニトロセルロースをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で平衡化して、蛋白結合部位をブロット緩衝液〔５％（w/v)乾燥スキムミルク及び１０％（v/v)ウシ新生児血清を補足したＰＢＳ〕でブロッキングした。ブロットした蛋白を各ハイブリドーマの抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。ＰＢＳ－０．０５％ Tween２０（v/v)で３回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン〔ダコパッツ（Dakopatts)、グロストルップ（Glostrup）、デンマーク〕を１／３，０００希釈で使用して、室温で９０分間インキュベートした。全ての抗血清はブロット緩衝液で希釈した。次に、ブロットをＰＢＳ／Tween で３回洗浄して、基質溶液〔ＰＢＳ、０．０５％（w/v)３，３’－ジアミノベンジジン、０．０３％（v/v)H_2O_2〕で発色させ、次いでH_2O中で反応を停止させた。

【００５８】

これらの解析の結果として、２８個のうちで８個のハイブリドーマ（ＡＴ１８０とＡＴ２７０を含む）が真にＰＨＦ－タウ特異的であることが判った。これらのＰＨＦ－タウ特異的モノクローナル抗体を、ＥＬＩＳＡを使用して脳脊髄液中のＰＨＦ－タウ検出能力について最終的に試験した（実施例IVに説明する）。後の実施例に説明されるように、ＡＴ２７０とＡＴ１８０と呼ばれる２つのモノクローナル抗体が、増幅技法を適用することな

く、異なる量のリン酸化及び非リン酸化タウを加えたＣＳＦ中で測定すると、少なくとも１０pg/ml 以上のリン酸化タウの特異的検出を可能にすることが判った（リン酸化タウは、Goedert et al., 1993に記載されるように、組換え非リン酸化タウを、タウの異常なリン酸化部位に対応する位置のＳｅｒ及びＴｈｒアミノ酸をリン酸化することができるラット脳抽出物と共にインキュベートすることにより調製した）。更に、モノクローナル抗体ＡＴ２７０は、未濃縮ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウを検出することができた（後述参照）。ＡＴ１８０の使用に基づく測定では、５倍濃縮ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウを検出することができたが、一方ＡＴ８では、１０倍濃縮ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウを検出できなかった。これらの評価基準に基づき、これらのエピトープの更なる性状解析のためにハイブリドーマＡＴ１８０とＡＴ２７０を選択し、第９２１２２１０４号と第９３０７０７７４号としてＥＣＡＣＣに寄託した。

【００５９】

４．抗体クラス及びサブクラスの決定

イノ－ＬＩＡ（Inno-LIA）〔イノジェネティクス（Innogenetics）、ゲント、ベルギー〕により抗体クラス及びサブクラスを決定した。抗体　ＡＴ１８０及びＡＴ２７０は、ＩｇＧ１、カッパサブタイプであるらしいことが判った。

【００６０】

実施例II

ＰＨＦ－タウ特異的抗体及びこれらのエピトープの性状解析

１．ＥＬＩＳＡにおける正常タウからの異常にリン酸化したタウの識別

親和性精製した正常タウの調製はMercken et al.(1992b）に記載されており、ＰＨＦ－タウについてはGreenberg and Davies（1990）；Mercken et al.(1992a）に本質的に記載されている。正常タウ及びＰＨＦ－タウ標準物質の純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定した。また、試料を、製造業者の指示通りに４２０Ａ／Ｈアミノ酸分析機〔アプライドバイオシステムズ社（Applied Biosystems B.V.)、マーセン（Maarssen）、オランダ〕で分析した。正常タウ及びＰＨＦ－タウの両方とも、予想されたアミノ酸組成を示した。親和性精製した正常タウ及びＰＨＦ－タウ両者の正確な蛋白濃度を、内部標準ペプチドを使用して測定した。

ハイブリドーマＡＴ１８０又はＡＴ２７０に由来し、プロテインＧカラムクロマトグラフィーにより無血清ならし培地から精製したＰＨＦ－タウモノクローナル抗体を、コーティング緩衝液（１０mMトリス、１０mMＮａＣｌ、１０mMNaN_3、pH８．５）中３μg/mlで、高結合性マイクロタイタープレート〔ヌンク（Nunc）、ギブコ（Gibco)、ペーズリー、英国〕上に４℃で一晩コーティングした。非特異的結合を低下させるため、ＰＢＳ中の１０％飽和カゼイン１５０μｌで３０分間オーバーコーティングした後、このプレートを、適切に希釈したタウ又はＰＨＦ－タウ標準物質１００μｌと共に３７℃で６０分間インキュベートした。このプレートをＰＢＳ－０．０５％ Tween２０（v/v)で５回洗浄し、２つのビオチン化抗体（ＡＴ１２０及びＨＴ７、Vandermeeren et al., 1993; Mercken, 博士論文）１００μｌを最終濃度０．２μg/mlで添加して、室温で１時間　インキュベートした。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン〔ジャクソン（Jackson)、インノジェネティクス（Innogenetics）、ベルギー〕を１／１０，０００希釈で室温で３０分間添加した。ＰＢＳ／ Tween２０での最終洗浄後、０．４２mM３，５，３’，５’－テトラメチルベンジジン、１００mMクエン酸中０．００３％ (v/v)H_2O_2、１００mMNa_2HPO_4、pH４．３を１００μｌ、室温で３０分間、ペルオキシダーゼの基質として添加した。2M H_2SO_4 溶液５０μｌでこの反応を停止させた。タイターテク・マルチスキャン（Titertek Multiscan）〔フローラボラトリーズ（Flow Laboratories)、エフラブ社（Eflab, Oy)、フィンランド〕で４５０nmで吸光度を読んだ。

ＡＴ１８０及びＡＴ２７０のＰＨＦ－タウに対する特異性を示した（第１表、第１図及び第２図）。これらから、正常タウ１μg でも反応性がないことが判る。

【００６１】

２．組換えタウ突然変異体による選択したＰＨＦ－タウ特異的抗体のエピトープのマッピ

ング

タウの４回反復型イソフォームに対応し、ＮｄｅＩ部位がイニシエーターコドンの中にある全長ｃＤＮＡクローン（ヒトタウ２４；ｈｔａｕ　２４）（Goedert and Jakes, 1990)を、Ｍ１３ｍｐ１８のＥｃｏＲＩ部位にサブクローン化した。部位特異的突然変異導入法を使用し、以下のアミノ酸を表すコドンをＡｌａに変えた：Ｔ１５３、Ｔ１７５、Ｔ１８１、Ｔ１９９、Ｔ２０５、Ｔ２１２、Ｔ２１７、Ｔ２３１、Ｓ２３５。これらを、以降、Ｔ１５３Ａなどの突然変異体と呼ぶ。これらの部位の組合せを有する構築物も評価した。ＮｄｅＩとＥｃｏＲＩによる切断後、生じた断片を発現プラスミドｐＲＫ１７２（Mc Leod et al., 1987）中のＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターの下流にサブクローン化して、この組換えプラスミドで大腸菌（E. coli)ＢＬ２１（ＤＥ３）（Studier et al., 1990）細胞を形質転換した。細菌培養物を増殖させ、誘導をかけて、記載（Goedert and Jakes, 1990)されるようにタウ蛋白を精製した。

１０mMオカダ酸、１mMＰＭＳＦ、２０μg/mlロイペプチン、２０μg/mlアプロチニン及び２０μg/mlペプスタチン中で成熟ラット脳（１ｇ／２．５ml）をホモジナイズすることにより、脳プロテインキナーゼ活性物を調製し、４０，０００rpm で４℃で１時間遠心分離した。この上澄液を直接リン酸化に使用した（Goedert et al., 1993）。３７℃で、４０mM　ＨＥＰＥＳ、pH７．２、２mMＡＴＰ、２mMＭｇＣｌ$_2$、タウ蛋白（１μM)、ラット脳抽出物（１μl)、５mMＥＧＴＡ、２mMＤＴＴ、１μM オカダ酸、１mMＰＭＳＦ、２０μg/mlアプロチニン及び２０μg/mlペプスタチンを含むインキュベーション（０．０５ml）を行った。脳抽出物の添加により反応を開始し、２４時間インキュベートして、アリコートをＳＤＳ－ＰＡＧＥに使用した。対照は、脳抽出物を除いた他は同じ条件下でインキュベートした。

結果

正常なｈｔａｕ２４クローン又はｈｔａｕ２４突然変異体を、ラット　脳抽出物の含有するプロテインキナーゼによりリン酸化して（Goedert et al., 1993）、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、ＡＴ１８０、ＡＴ２７０又は　タウ抗血清１３４（リン酸化に非依存性）を使用して免疫ブロットした（Goedert et al., 1989）。ＡＴ２７０及びＡＴ１８０は、脳抽出物によるリン酸化前には野生型又は突然変異型タウ蛋白を染色しなかった。しかし、脳抽出物と２４時間インキュベーションした後、ＡＴ２７０は野生型タウを認識したが、Ｔ１８１Ａタウを認識しなかった（第３図）。これにより、ＡＴ２７０による染色には、少なくともＴ１８１がリン酸化されていることが必要であることが確定した。モノクローナル抗体ＡＴ１８０は、同程度にリン酸化野生型タウを認識したが、リン酸化Ｔ２３１Ａ突然変異体を認識できず、これは、ＡＴ１８０エピトープが認識のためにはＴ２３１のリン酸化を要することを示す（第４図）。Ｓ２３５Ａ突然変異体のやや弱い染色は、脳抽出物中の幾つかの因子が、この型の測定を制限しており、このため、リン酸化剤として活性化組換えプロテインキナーゼを使用することにより確認したように、Ｓ２３５部位がそのリン酸化状態に必ずしも完全に変換されなかったという事実による（データは示していない）。組換えタウを活性化組換えＭＡＰキナーゼ単独又はＧＳＫ３キナーゼ単独で処理した場合、ＡＴ１８０エピトープは生成されず、一方、
ＭＡＰキナーゼとＧＳＫ３キナーゼの混合物で同じ実験を行うと、正しくリン酸化が起こり、ＡＴ１８０と免疫反応した。

【００６２】

実施例III

未濃縮ＣＳＦ中のＰＨＦ－タウを検出するためのＰＨＦ－タウ抗体の異なる組合せの使用

我々は、検出物質としてＡＴ８抗体の単独使用に基づく異常にリン酸化されたタウを検出するための測定法が、未濃縮のＣＳＦでも濃縮ＣＳＦでもＡＴ８エピトープを検出することができなかったことを、以前に示した（Vandermeeren et al., 1993)。ＡＴ１８０及びＡＴ２７０による継続的な実験では、異常にリン酸化されたタウに存在するＡＴ２７０のエピトープがほとんどの未濃縮アルツハイマーＣＳＦ試料中で検出することができるのに対して、ＡＴ１８０エピトープは高レベルの総タウを含有するＣＳＦ試料中の異常にリ

ン酸化されたタウを検出できるにすぎず、全てのアルツハイマーＣＳＦ試料中のＰＨＦ－タウを検出することはないことが判った。次に、ＡＴ２７０を単独で又は他の抗体（ＡＴ８、ＡＴ１８０）との異なる組合せで使用した。異常にリン酸化されたタウが記述されている異なる神経疾患（例えば、ピック病、クロイツフェルド－ヤコブ病、及びパーキンソン病）に罹患している患者のＣＳＦ中のＰＨＦ－タウの存在を調べるために、固相結合コーティング抗体として、抗体の組合せを使用した（第２表参照）。

好適なＰＨＦ－タウ特異的測定法は、以下のように行うことができた：３つのモノクローナル抗体、ＡＴ８、ＡＴ１８０、ＡＴ２７０を、１０mMトリス、pH８．６、１０mMＮａＣｌ、１０mMＮａＡｚ中、最終濃度５μg/mlで、４℃で一晩、高結合性マイクロタイタープレート〔ヌンク（Nunc）、ギブコ（GIBCO)、ペーズリー、英国〕にコーティングした。非特異的結合を低下させるため、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中１０％飽和カゼイン１５０μｌで1時間オーバーコーティングした後、プレートを、適切に希釈した組換えリン酸化タウ標準物質１００μｌと共に、又は５％ Tween２０を補足した未濃縮ＣＳＦ試料と共に、室温で一晩インキュベートした。このプレートをＰＢＳ／０．０５％ Tween２０（容量／容　量）で５回洗浄し、最終濃度０．２μg/mlで２つのビオチン化抗体（ＡＴ１２０及びＨＴ７；Vandermeeren et al., 1993; Mercken, 博士論文）１００μｌを添加して、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン〔ジャクソン（Jackson)、インノジェネティクス（Innogenetics）、ベルギー〕を１／１０，０００希釈で室温で３０分間添加した。ＰＢＳ／ Tween２０での最後の洗浄後、０．４２mM３，５，３’，５’－テトラメチルベンジジン、１００mMクエン酸中０．００３％（容量／容量）H_2O_2、１００mMNa_2HPO_4、pH４．３を１００μｌ、室温で３０分間ペルオキシダーゼの基質として添加した。２M H_2SO_4 溶液５０μｌでこの反応を停止させた。タイターテク・マルチスキャン（Titertek Multiscan）〔フローラボラトリーズ（Flow Laboratories)、エフラブ社（Eflab, Oy)、フィンランド〕で４５０nmで吸光度を読んだ。

【００６３】

実施例IV

選択したＰＨＦ－タウ特異的モノクローナル抗体による脳脊髄液試料中のＰＨＦ－タウの検出

脳脊髄液試料

患者からの生前のＣＳＦ試料を、アントワープ大学病院神経科（the department of Neurology of the University Hospital of Antwerp)で集めた。全ての試料は、通常の診断目的で行った腰椎穿刺により得たものであった。ＣＳＦ試料は凍結して使用時まで－７０℃で保存した。試料は、アルツハイマー患者、神経症の合併がない患者及び種々の神経疾患の患者から採取した。これらの試料を、イノテストｈｔａｕ（Innotest htau)〔インノジェネティクス（Innogenetics）、ベルギー〕を使用して総タウ濃度を測定して、実施例III で詳述した好適なＰＨＦ－タウ測定法によりＰＨＦ－タウの存在について更に分析するため、総タウが高値を示す試料を残した。

結果

この測定法と記載したＣＳＦ試料とを使用して、第３表に要約した結果を得た。この表から、対照とＯＮＤ患者については平均ＰＨＦ－タウレベルはむしろ低いままであった（対照：３８１mOD ；ＯＮＤ、退行性：４２３mOD ＯＮＤ、炎症性：３９２mOD ；ＯＮＤ、血管性：３４０mOD)が、一方、アルツハイマー患者の平均は８１４mOD 単位であったことは明らかである。更に、第３表からわかるように、ＯＮＤ群の総タウの高値は、ＰＨＦ－タウの平行した上昇を常に伴っているわけではないが、一方、ＡＤ患者の総タウの高レベルは、常にＰＨＦ－タウ濃度の上昇を引き起こしている。したがって、対照群、ＯＮＤコホート及びＡＤ患者からの集積した証拠は、ＡＤ及びＡＤ関連症候群〔例えば、多発梗塞性痴呆症（multiple infarct dementia)、パーキンソン病合併痴呆症及びある種の特定されない痴呆症〕についてのＰＨＦ－タウ測定法の診断特異性を強く示した。

【表２】

第１表

タウ (pg/ml)	ＡＴ１８０ 非リン酸化	ＡＴ１８０ リン酸化	ＡＴ２７０ 非リン酸化	ＡＴ２７０ リン酸化
2,000	95	449	98	2653
500	92	179	94	1044
100	94	125	96	158
25	85	105	92	113
5	90	106	87	86
1	87	97	90	83
0.2	85	95	91	89
0	89	94	92	94

【表３】

第2表

番　号	診　断	タ　ウ	AT270	AT180，270	AT8，270	AT8，180，270
		pg/ml	mOD	mOD	mOD	mOD
3	ＡＤ（早期発症性）	56.5	185	613	126	916
5	ＡＤ	62	132	410	105	636
6	ＡＤ	71	107	310	87	678
38	ＡＤ	68.7	257	685	169	1251
73	ＡＤ	27.7	84	96	44	570
88	ＡＤ	25.3	124	261	68	705
276	ＡＤ	43	106	325	76	612
281	ＡＤ	46	184	406	100	199
874	ＡＤ	51	128	353	88	777
61	対照	17.3	53	80	87	
1435	水頭症	18	62	38	53	297
401	対照	20.1	77	73	53	
242	ＰＮＰ（心因性夜間煩渇症）	20.8	109	169	77	276
1424	対照	21	96	79	61	304
85	対照	22	54	52	43	83
153	ＣＮＳ（中枢神経系）リンパ腫	22.2	55	111	47	301
1337	水頭症	29	45	68	47	124
1337	水頭症	29	43	75	45	124
1381	ＮＰＨ	32	78	156	75	366
1470	ＮＰＨ	33	77	152	60	148
641	対照	35	64	135	67	515
349	髄膜炎	35.6	76	95	68	367
109	ピック病	40.5	89	131	60	398
1467	偽腫瘍(Pseudotumor)	44	111	149	64	373
193	ＧＢＳ	44.1	158	238	107	295
114	小脳萎縮症	51.5	90	97	56	203
130	External afralmoplegia	53.6	102	99	60	229
131	髄膜出血	66.7	65	82	49	338
214	ＣＪＤ	92	82	204	70	387
53	ＰＤ	57	249	682	137	836
150	対照	79	284	848	207	1557
137	ピック病	77.4	423	987	220	1571

【表４】

第３表

アルツハイマー患者

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ (pg/ml)	PHF-タウ (mOD)
304	F		ＡＤ（＝Ａ１ｚ２１）	86	517
3	F	?	ＡＤ（早期発症性）	56.5	916
874	F	42	ＡＤ	51	777
113	F	44	ＡＤ	42.6	627
1085	M	46	ＡＤ	543	3049
265	F	47	ＡＤ（？）	62	441
161	F	57	ＡＤ、クロイツフェルド・ヤコブ（？）	33.8	682
326	F	58	ＡＤ	34	394
1499	F	60	ＡＤ	147	1425
220	M	60	ＡＤ	126	1614
6	M	61	ＡＤ	71	678
718	M	62	ＡＤ	53	588
335	F	63	ＡＤ（おそらく）	83	656
720	M	64	ＡＤ	170	1573
174	F	64	ＡＤ	66	609
338	F	64	ＡＤ	51.2	593
262	F	65	ＡＤ	221	2224
254	F	66	ＡＤ	80.2	923
73	M	67	ＡＤ	27.7	570
209	M	67	ＡＤ	74.4	1341
722	M	67	ＡＤ	71	433
383	M	67	ＡＤ	32.5	691
38	M	67	ＡＤ	68.7	1251
1259	F	68	ＡＤ（？）	65	698
723	M	69	ＡＤ	54	614
721	M	70	ＡＤ	99	947
17	F	70	ＡＤ	37	582
1	F	72	ＡＤ＋ＭＳ	33	222
229	M	73	ＡＤ	70.9	1043
278	F	75	ＡＤ	54	1069
719	M	75	ＡＤ	70	884
88	F	76	ＡＤ	25.3	705
132	F	76	ＡＤ	51.9	1187
65	F	77	ＡＤ	80.1	1284
287	M	78	ＡＤ（？）	58	423

【表５】

第３表（つづき１）

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
737	F	78	ＡＤ	43	330
71	F	78	ＡＤ	53.9	741
28	M	78	ＡＤ	48.7	476
760	F	78	ＡＤ	36	299
5	M	81	ＡＤ	62	636
281	F	81	ＡＤ	46	199
13	F	81	ＡＤ	13	179
289	M	83	ＡＤ	29	502
96	F	84	スティール・リチャードソン・オルスゼフスキー症候群（？）、ＡＤ（？）	41	295
223	M	84	ＡＤ	52	487
185	F	85	ＡＤ	59	724
276	F	85	ＡＤ	43	612
39	F	86	ＡＤ	150	2205
343	F	86	ＡＤ（？）	44	413
14	F	86	ＡＤ	57	825
606	F	86	ＡＤ	43	680
724	M	88	ＡＤ	31	487

第３表（つづき２）

対照患者

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
145	F	40		31.9	363
	F	68		39	436
	F	72		84	718
709	F	56		29	259
1508	M	64		21	155
1100	M	71		31	313
1424	M	64		21	304
	F	66		35	515
	F	77		43.5	447
544	M	69		17	304

【表６】

第３表（つづき１）

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
737	F	78	ＡＤ	43	330
71	F	78	ＡＤ	53.9	741
28	M	78	ＡＤ	48.7	476
760	F	78	ＡＤ	36	299
5	M	81	ＡＤ	62	636
281	F	81	ＡＤ	46	199
13	F	81	ＡＤ	13	179
289	M	83	ＡＤ	29	502
96	F	84	スティール・リチャードソン・オルスゼフスキー症候群（？）、ＡＤ（？）	41	295
223	M	84	ＡＤ	52	487
185	F	85	ＡＤ	59	724
276	F	85	ＡＤ	43	612
39	F	86	ＡＤ	150	2205
343	F	86	ＡＤ（？）	44	413
14	F	86	ＡＤ	57	825
606	F	86	ＡＤ	43	680
724	M	88	ＡＤ	31	487

第３表（つづき２）

対照患者

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
145	F	40		31.9	363
	F	68		39	436
	F	72		84	718
709	F	56		29	259
1508	M	64		21	155
1100	M	71		31	313
1424	M	64		21	304
	F	66		35	515
	F	77		43.5	447
544	M	69		17	304

【表７】

第３表（つづき３）
他の神経疾患（退行性タイプ）

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
196	F	71	パーキンソン病＋痴呆	84	421
167	M	61	小脳萎縮症	14	433
75	M	71	アルコール誘発性痴呆	26	763
53	F	69	混合型痴呆、パーキンソン病	55	589
53	F	85	パーキンソン病、混合型痴呆	59.3	1083
137	F	57	ピック病	77.4	1571
946	F	75	皮質性萎縮、脳室周囲	57	814
713	F	48	ＦＬＤ	39	341
186	M	66	ＡＬＳ	21.2	208
344	F	68	パーキンソン病、痴呆	28	205
22	F	65	スティール・リチャードソン・オルスゼフスキー症候群	13	203
114	M	51	小脳萎縮症	51.5	203
334	M	57	パーキンソン病＋運動異常症	22	218
1527	M	61	パーキンソン病＋梅毒	17	277
772	F	70	スティール・リチャードソン・オルスゼフスキー症候群	26	244
169	F	27	痴呆（？）	37.5	337
794	F	61	スティール・リチャードソン・オルスゼフスキー症候群	24	149
214	F	59	クロイツフェルド・ヤコブ	292	387
109	M	63	ピック病；ＡＬＳ	40.5	393
33	M	63	ピック病	61	395
230	F	66	パーキンソン病	21.1	157

【表８】

第３表（つづき４）
他の神経疾患（炎症性タイプ）

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
668	F	79	脳炎	16	282
673	F	72	脳炎	16	281
710	F	28	ＭＳ	14	186
405	M	29	ギラン・バレー（ＧＢＳ）	47.6	278
1395	M	67	ＡＬＳ	150	289
1261	M	28	ＣＩＤＰ	24	293
193	M	68	ＧＢＳ	44.1	295
279	F	70	ＭＳ	17	113
314	F	69	ＧＢＳ	34	292
716	M	54	ＡＬＳ	15	220
1477	M	67	ＡＬＳ	150	797
717	M	53	ＡＬＳ	18	158
163	M	71	髄膜炎	150	1891
93	M	85	多発性神経障害	61.9	764
327	F	66	ＡＬＳ	20	127
708	F	33	Neurocystercosis	20	249
149	M	56	梅毒	4	176
1493	M	22	ＳＳＰＥ	18	236
207	M	50	ギラン・バレー	70.3	466
706	F	75	ＧＢＳ	21	309
64	M	58	ＭＳ	40.7	512
1447	F	58	ＡＬＳ	38	340
360	M	54	Lyme病	34.7	515
532	M	64	ＴＢＣ	28	470
7	M	17	ＳＳＰＥ	48.1	403
363	F	47	脳炎	35.9	424
133	M	24	ＭＳ	37.1	397
208	M	68	多発性神経障害	28.8	325
398	M	58	髄膜脳炎	117.8	367
715	F	63	ＡＬＳ	40	333

【表９】

第３表（つづき５）
他の神経疾患（血管性タイプ）

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
131	F	59	髄膜出血	66.7	338
219	F	58	Pseudobullar症候群	39.6	231
101	M	55	梗塞	52.8	352
228	M	22	虚血性大脳梗塞	150	392
294	F	71	ＣＶＡ、糖尿病、てんかん	54	347
409	M	65	多発性脈管障害	208	222
1492	M	47	梗塞、後頭	69	213
712	F	44	発作、新規発症	14	309
21	M	70	血管障害	15	322
457	M	68	梗塞	24	280
42	M	78	多発梗塞性痴呆	38.9	614
320	M	76	糖尿病、ＭＩＤ	27	318
714	M	82	ＭＩＤ	29	286
98	F	68	ＴＩＡ（一過性脳虚血発作）	34.9	577
23	F	82	痴呆	31	303

【表１０】

第３表（つづき６）

他の神経疾患（未特定）

番　号	性　別	年齢	診　　断	タウ	PHF-タウ
115	M	68	亜急性変性	15	561
419	M	1	水頭症	150	2765
275	M	66	ＰＮＰ	19	448
226	F	54	進行性ｐｙｒ慢患	18	445
111	M	67	水頭症	64.2	549
91	F	81	ＰＮＰ	31.2	355
1467	M	43	偽腫瘍(Pseudotumor)	44	373
153	F	62	ＣＮＳ	22.2	301
1435	M	65	外傷性水頭症	18	297
150	F	82	精神障害	79	1557
274	M	78	頸部 medullopathy	69	160
1454	M	73	水頭症	30	124
268	M	63	ＰＮＰ、アルコール	23	500
711	F	31	偽腫瘍、脳	16	234
170	M	66	てんかん性かんしゃく	24.2	632
195	F	64	平衡透析	14	239
242	M	72	多発性神経障害	20.8	276
330	M	69	ｐｙｒ？？	14	246
1478	M	43	偽腫瘍	42	337
1364	M	65	狭窄症	32	475
152	F	66	髄質症(medullar)	33	450
438	M	71	多発性神経障害	34	205
1087	F	65	狭窄症	24	1086
251	F	77	外傷性脳震とう症	14	209
1576	F	70	コルサコフ症候群	82	863
312	M	72	meta adeno？？	37	471
1442	F	70	歩行障害	39	615

【００６４】

【表１１】

参考文献

Andreadis A, Brown W, Kosik K (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. Biochem 31:10626-10633.

Bramblett G, Trojanowski J, Lee V (1992) Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau isoforms (A68 proteins). Lab Invest 66:212-222.

Bramblett G, Goedert M, Jakes R, Merrick S, Trojanowski J, Lee V (1993) The abnoramal phosphorylation of tau at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development and contributes to reduced microtubule binding. Neuron 10:1089-1099.

Brion J, Couck A, Passareiro E, Flament-Durand J (1985a) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. J Submicrosc Cytol 17:89-96.

Brion J, Passareiro J, Nunez J and Flament-Durand J (1985) Mise en evidence immunologique de la proteine tau au niveau des lesions de degenerescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. Arch Biol 95:229-235.

Biernat J, Mandelkow M, Schoter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren M, Mandelkow E, The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. EMBO J, 1992, 11:1593-1597.

Bobrow M, Harris T, Shaughnessy K, Litt G (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Meth 125:279-285.

【表１２】

Butner K, Kirschner (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. J Cell Biol 115:717-730.

de Bont H, van Boom J, Liskamp R (1990a) Automatic synthesis of phosphopeptides by phosphorylation on the solid phase. Tetrahedron Letters 31:2497-2500.

de Bont H, van Boom J, Liskamp R (1990b) N,N-diiopropyl-bis(4-chlorobenzyl)phosphoramidite: A versatile phosphitylating agent for the phosphorylation of hydroxy amino acids and preparation of protected phosphopeptides. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-bas 109:27-28.

Delacourte A, Flament S, Dibe E, Hublau P, Sablonniere B, Hemon B, Sherrer V, Defossez A (1990) Pathological proteins Tau64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 80:111-117.

Delacourte A, Défossez A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. J. Neurol. Sci. 76:173-180.

Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow E-M, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. EMBO J 11:2131-2138.

Flament S, Delacourte A, Hemon B, Defossez A (1989) Characterization of two pathological Tau protein variants in Alzheimer brain cortices. J Neurol Sci 92:133-141.

Flament S, Delacourte A (1990) Tau Marker? Nature 346:6279.

【表１３】

Flament S, Delacourte A, Mann D (1990) Phosphorylation of tau proteins: a major event during the process of neurofibrillary degeneration. A comparitive study between Alzheimer's disease and Down's syndrome. Brain Res 516:15-19.

Ghanbari H, Kozuk T, Miller B, Riesing S (1990) A sandwich enzyme immunoassay for detecting and measuring Alzheimer's disease-associated proteins in human brain tissue. J Clin Laboratory Anal 4:189-192.

Goedert M, Jakes R (1990) Expression of seperate isoforms of human tau protein: correlation with the tau protein in brain and effects on tubulin polymerization. EMBO J 9:4225-4230.

Goedert M, Jakes R, Crowther R, Six J, Lübke U,
Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee V (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at serine 202 in Alzheimer's disease recpitulates phosphorylation during development. Proc Natl Acad Sci (USA) 90:5066-5070.

Goedert M, Wishik C, Crowther R, Walker J, Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease : identification as the microtubuli-associated protein tau. Proc Natl Acad Sci (USA) 85:4051-4055.

Goedert M, Spillantini M, Jakes R, Rutherford D, Crowther R (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3:519-526.

Goedert M, Spillantini M, Jakes R (1991) Localization of the Alz-50 epitope in recombinant human microtubule-associated protein tau. Neurosci Lett. 126:149-154.

【表１４】

Goedert M, Cohen E, Jakes R, Cohen P (1992) p42 Map kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau one dephosphorylated by protein phosphatase 2A1 : implications for Alzheimer's disease. FEBS Lett. 312:95-99.

Greenberg S, Davies P (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA 87:5827-5831.

Greenberg S, Davies P, Schein J, Binder L (1992) Hydrofluoric acid-treated tauPHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. J Biol Chem 267:564-569.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y, Quinlan M, Wisniewski H Binder L (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer's cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci (USA) 83:4913-4917.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung Y, Zaidi M, Wisniewski H (1986) Microtubule-associated protein tau. J Biol Chem 261:6084-6089.

Harrington C, Mukaetova E, Hills R, Edwards P,
Montejo de Garcini E, Novak M, Wischik C (1991) Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci (USA) 88:5842-5846.

Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. J Biol Chem 267:17047-17054.

Hsu S, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29:577-580.

【表１５】

Iqbal K, Zaidi T, Thompson C, Merz P, Wisniewski H (1984) Alzheimer paired helical filaments: bulk isolation, solubility, and protein composition. Acta Neuropathol 62:167-177.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Smith A, George L, Tung Y, Zaidi T (1989) Identification and localization of a Tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci (USA) 86:5646-5650.

Ishiguro K, Takamatsu M, Tomizawa K, Omori A, Takahashi M, Arioka M, Uchida T, Imahori K (1992) Tau protein kinase I converts noraml tau protein into AA68-like component of paired helical filaments. J Biol Chem 267:10897-10901.

Kanai Y, Chen J, Hirokawa N (1992) Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. EMBO J 11:3953-3961.

Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M, Ihara Y (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. Neuron 1:827-834.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497.

Kosik K, Joachim C, Selkoe (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci (USA) 83:4044-4048.

Labbé J, Cavadore J and Dorée M (1991) M phase-specific cdc2 kinase: preparation from starfish oocytes and properties. Meth Enzymol 200:291-301.

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

【表１６】

Ledesma M, Correas I, Avila J, Diaz-Nido J (1992) Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. FEBS Letters 308:218-224.

Lee V, Balin B, Otvos L, Trojanowski J (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. Science 251:675-678.

Lewis S, Wang D, Cowan N (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with Tau protein. Science 242:936-939.

Mandelkow E-M, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede J, Mandelkow E (1992) Glycogen-synthase kinase-3 and the Alzheimer's-like state of microtubule-associated protein tau. FEBS Letters 314:315-321.

Martin J, Gheuens J, Bruyland M, Cras P, Vandenberghe A, Masters C, Beyreuther K, Dom R, Ceuterick C, Lubke U, Van Heuverswijn H, De Winter G, Van Broeckhoven C (1991) Early-onset Alzheimer's disease in 2 large Belgian families. Neurology 41:62-68.

McKahn G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan E (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. Neurology 34:939-944.

Mc Leod M, Stein M, and Beach D (1987) The product of the mei3+ gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fision yeast. EMBO J 6:729-736.

Mercken M, Ph. D. thesis: De neurofibrillaire degeneratie bij de ziekte van Alzheimer: een benadering met monoklonale antistoffen. Antwerp, 1991.

【表１７】

Mercken M, Vandermeeren M, Lubke U, Six J, Boons J, Vanmechelen E, Van de Voorde A, Gheuens J (1992a) Affinity purification of human tau proteins and the construction of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human tau detection. J Neurochem 58:548-553.

Mercken M, Vandermeeren M, Lubke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A, Martin JJ, Gheuens J (1992b) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. Acta Neuropathol 84:265-272.

Otvos L, Elekes I, Lee V (1989) Solid phase synthesis of phosphopeptides. International Journal of Peptide and Protein Research 34:129-133.

Perich J (1991) Synthesis of O-phosphoserine and O-phosphothreonine-containing peptides. Methods in Enzymology 201:225-233.

Poulter L, Barrat D, Scott C, Caputo C (1983) Localizations and immunoreactivities of phosphorylation sites on bovine and porcine tau proteins and a PHF-tau fragment. J Biol Chem 268:9636-9644.

Roder H, Ingram V (1991) Two novel kinases phosphorylate tau and the KSP site of heavy neurofilament subunits in high stoichiometric ratios. J Neurosci 11:3325-3343.

Sturgill T, Ray L, Anderson N, Erickson A (1991) Purification of activated protein kinase from epidermal growth factor treated 3T3 - L1 fibroplasts. Meth Enzymol 200:342-351.

Selden S, Pollard T (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. J Biol Chem 258(11):7064-71.

Steiner B, Mandelkow E, Biernat J, Gustke N, Meyer H, Schmidt B, Mieskes G, Soling H, Drechsel D, Kirschner M, Goedert M, Mandelkow E (1990) Phophorylation of

【表１８】

microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca^{2+}-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. The EMBO J 9:3539-3544.

Studier F, Rosenberg A, Dunn J, Dubbendorf J (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol 185:60-89.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins form polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350-4354.

Vandenheede J, Yang S, Goris J, Merlevede W (1980) ATP x Mg-dependent protein phosphatase from rabbit skeletal muscle. Purification of the activating factor and its characterization as a bifunctional protein also displaying synthase kinase activity. J Biol Chem 255: 11768-11774.

Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, Van de Voorde A, Martin J, Cras, P (1993) Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease fluid with a sensitive sandwich enzyme linked assay J Neurochem 61:1828-1834.

Vulliet R, Halloran S, Braun R, Smith A, Lee, G (1992) Proline-directed phosphorylation of human tau protein. J Biol Chem 267:22570-22574.

Watanabe N, Takio K, Hasegawa M, Arai T, Titani K, Ihara Y, (1992) Tau 2: a probe for a ser conformation in the amino terminus of tau. J Neurochem 58:960-966.

Wischik C, Novak M, Edwards P, Klug A, Tichelaar W, Crowther R (1988) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA 85:4884-4888.

【表１９】

Wolozin B, Davies P (1987) Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. Ann Neurol 22:521-526.

Wolozin B, Pruchnicki A, Dickson D, Davies P (1986) A neurological antigen in the brains of Alzheimer's patients. Science 232:648-650.

Wood J, Mirra S, Pollock N, Binder L (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease share antigenic determinants with the axonal mirotubule-associated protein tau. Proc Natl Acad Sci (USA) 83:4040-4043.

【００６５】

【表２０】

配列表

（１）一般的情報：

（ｉ）出願人：

(A) 名：Innogenetics sa.

(B) 通り：Industriepark-Zwijnaarde 7, box 4

(C) 市：ゲント

(E) 国：ベルギー

(F) 郵便番号 (ZIP)：B-9052

(G) 電話：00 32 9 241 07 11

(H) ファクシミリ：00 32 9 241 07 99

（ii）発明の名称：ＰＨＦ－タウに特異的なモノクローナル抗体、これらを分泌するハイブリドーマ、これらの抗体による抗原認識及びこれらの応用

（iii）配列の数：３

(iv) コンピュータ読取り形態：

(A) 媒質タイプ：フロッピーディスク

(B) コンピュータ：IBM PC互換機

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

（２）配列番号１の情報：

（ｉ）配列の特徴：

(A) 長さ：１１２アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

【表２１】

（ii）配列の種類：ペプチド

（xi）配列：配列番号１：

```
Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala
1               5                  10                  15

Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys
            20                  25                  30

Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys
        35                  40                  45

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro
    50                  55                  60

Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
65                  70                  75                  80

Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys
            100                 105                 110
```

（２）配列番号２の情報：

（i）配列の特徴：

(A) 長さ：５アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：ペプチド

（xi）配列：配列番号２：

```
Val Arg Thr Pro Pro
1               5
```

（２）配列番号３の情報：

（i）配列の特徴：

(A) 長さ：５アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：ペプチド

（xi）配列：配列番号３：

```
Pro Lys Thr Pro Pro
1               5
```

【図面の簡単な説明】

【００６６】

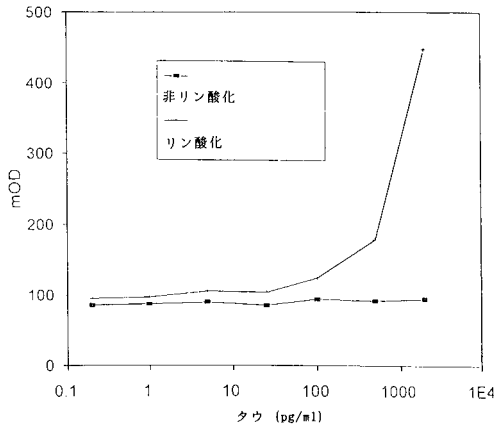
【図１】モノクローナル抗体ＡＴ１８０を使用するＰＨＦ－タウ及び正常タウの検出。ＰＨＦ－タウを特異的に認識する飽和量のモノクローナル抗体ＡＴ１８０でコーティングしたマイクロプレートを、異なる量の非リン酸化又はリン酸化タウ〔後者は、組換え非リン酸化タウを、タウの異常なリン酸化部位に対応する位置のＳｅｒ及びＴｈｒアミノ酸をリン酸化することができるラット脳抽出物と共にインキュベートすることにより調製した（Goedert et al., 1993）〕を加えたＣＳＦと共にインキュベートした。結合した抗原を実施例の項に記載のように検出した。

【図２】モノクローナル抗体ＡＴ２７０を使用するＰＨＦ－タウ及び正常タウの検出。ＰＨＦ－タウを特異的に認識する飽和量のモノクローナル抗体ＡＴ２７０でコーティングしたマイクロプレートを、異なる量の非リン酸化又はリン酸化タウ〔後者は、組換え非リン酸化タウを、タウの異常なリン酸化部位に対応する位置のＳｅｒ及びＴｈｒアミノ酸をリン酸化することができるラット脳抽出物と共にインキュベートすることにより調製した（Goedert et al., 1993）〕を加えたＣＳＦと共にインキュベートした。結合した抗原を実施例の項に記載のように検出した。

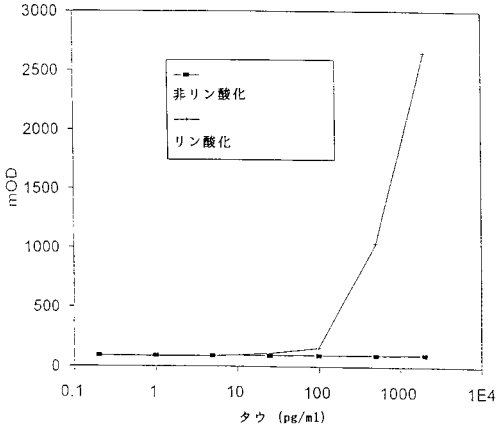
【図３】ラット脳からのプロテインキナーゼ活性による野生型及び突然変異型　組換えタウ（ヒトタウ２４クローンから発現させた；Goedert and Jakes, 1990)のリン酸化。抗タウ抗血清１３４、及びモノクローナル抗体ＡＴ８及びＡＴ１８０を用いた免疫ブロット。レーン１、タウ２４；レーン２、タウ２４＋脳抽出物；レーン３、Ｔ２３１　Ａタウ２４；レーン４、Ｔ２３１　Ａタウ２４＋脳抽出物；レーン５、Ｓ２３５　Ａタウ２４；　レーン６、Ｓ２３５　タウ２４＋脳抽出物。

【図４】ラット脳からのプロテインキナーゼ活性による野生型及び突然変異型組換えタウ（ヒトタウ２４クローンから発現させた）のリン酸化。抗タウ抗血清１３４及びモノクローナル抗体ＡＴ８及びＡＴ２７０を用いた免疫ブロット。レーン１、タウ２４；レーン２、タウ２４＋脳抽出物；レーン３、Ｔ１７５　Ａタウ２４；レーン４、Ｔ１７５　Ａタウ２４＋脳抽出物；レーン５、Ｔ１８１　Ａタウ２４；レーン６、Ｔ１８１　Ａタウ２４＋脳抽出物。

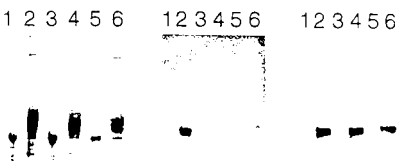
【図１】



【図２】

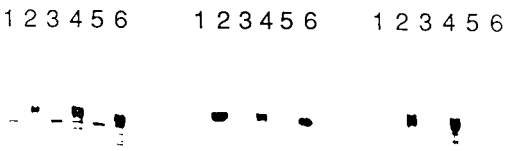


【図３】



134 AT180 AT8

【図４】



134 AT8 AT270

フロントページの続き

(72)発明者　ファンメヒェーレン，エウヘーン
ベルギー国、ベー－９８１０　ナザレト、テン・エーデストラート　１０１
(72)発明者　ファン・デ・フォールデ，アンドレ
ベルギー国、ベー－９１６０　ローケレン、フルンストラート　２２

審査官　竹中　靖典

(56)参考文献　国際公開第９３／００８３０２（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／５３
Ｃ０７Ｋ　１６／１８
Ｇ０１Ｎ　３３／５７７

专利名称(译)	对PHF-tau特异的单克隆抗体，分泌这些的杂交瘤，通过这些抗体识别抗原及其应用		
公开(公告)号	JP4110057B2	公开(公告)日	2008-07-02
申请号	JP2003297400	申请日	2003-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	酒店卢武铉遗传学NV 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	酒店卢武铉遗传学NV		
当前申请(专利权)人(译)	酒店卢武铉遗传学NV		
[标]发明人	ファンデルメーレンマルク ファンメヒェーレンエウヘーン ファンデフォールデアンドレ		
发明人	ファンデルメーレン,マルク ファンメヒェーレン,エウヘーン ファン·デ·フォールデ,アンドレ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 G01N33/577 C07K7/06 C07K14/47 C12N5/20 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/4711		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K16/18 G01N33/577.B G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	93403133.7 1993-12-21 AT		
其他公开文献	JP2004045417A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性检测脑脊液（CSF）中异常磷酸化的τ-蛋白（PHF-τ）的方法，并提供一种使用单克隆抗体等形成免疫复合物的方法。属于τ-蛋白质（PHF-τ）的磷酸化抗原表位存在于（143-254）位置的区域中并且在其中异常磷化。解决方案：测量异常磷化的τ-蛋白质的方法包括步骤（a），其中检测CSF中异常磷化的τ-蛋白质的水平，步骤（b），其中步骤（a）获得的水平是与具有预定范围的水平相比较，并且步骤（c）确定通过步骤（a）获得的水平是否属于预先确定的水平，作为从阿尔茨海默病患者获得的CSF的指标。Ž

タウ (pg/ml)	ＡＴ１８０ 非リン酸化	ＡＴ１８０ リン酸化	ＡＴ２７０ 非リン酸化	ＡＴ２７０ リン酸化
2,000	95	449	98	2653
500	92	179	94	1044
100	94	125	96	158
25	85	105	92	113
5	90	106	87	86
1	87	97	90	83
0.2	85	95	91	89
0	89	94	92	94