

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4851052号
(P4851052)

(45) 発行日 平成24年1月11日(2012.1.11)

(24) 登録日 平成23年10月28日(2011.10.28)

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

請求項の数 4 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2002-508084 (P2002-508084)	(73) 特許権者	399044160
(86) (22) 出願日	平成13年6月21日 (2001. 6. 21)		イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ ンノートシャップ
(65) 公表番号	特表2004-502939 (P2004-502939A)		INNOGENETICS N. V.
(43) 公表日	平成16年1月29日 (2004. 1. 29)		ベルギー、ペー-9052ヘント、テヒノ ロギーパルク6番
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007029	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02002/003073		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002. 1. 10)	(74) 代理人	100084146
審査請求日	平成20年4月3日 (2008. 4. 3)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	00870151.8	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成12年6月30日 (2000. 6. 30)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100127638
(31) 優先権主張番号	60/218, 907		弁理士 志賀 美苗
(32) 優先日	平成12年7月18日 (2000. 7. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経学的疾患の分別診断

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体から得られた脳脊髄液試料中のホスホ - タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする、アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体とを識別検査するインビトロでの方法。

【請求項 2】

下記工程を含むことをさらに特徴とする請求項 1 記載の方法：

個体から得られた脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルを決定する工程；

該個体の脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとアルツハイマー病にかかっている個体の脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がレービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および/または進行性核上麻痺にかかっていることが示される工程。

【請求項 3】

ホスホ - タウを特異的に認識する抗体を用いてホスホ - タウのレベルが免疫学的に決定されることをさらに特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

個体からの脳脊髄液試料中のホスホ - タウを特異的に認識する抗体を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかの方法による、アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴

う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体との識別検査において使用するための診断キットまたは診断組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、神経学的疾患の診断の分野に関する。本発明は、アルツハイマー病と他の神経学的疾患とを分別診断する新規方法を提供する。より詳細には、本発明は、アルツハイマー病と、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮 (multi-system atrophy) および/または進行性核上麻痺 (progressive supranuclear palsy) とを分別診断する方法を提供する。

10

【0002】

発明の背景

神経学的疾患の診断において神経学的マーカーとしてのタウ (tau) およびホスホ - タウ (phospho-tau) の使用が要求されている (Blennow et al., 1995; Vigo-Pelfrey et al., 1995; Andreasen et al., 1998; Andreasen et al., 1999a; Ishiguro et al., 1999)。微小管結合蛋白タウは対になつたらせん状フィラメント (PHF) および神経原線維の絡み (NFT) の主要蛋白成分であり、アルツハイマー病に関連している (Brion et al., 1985; Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986; Kondo et al., 1988)。タウ蛋白は異なるイソフォームとして存在し、それらのうち4ないし6種は成人脳に見出されているが、胎児脳にはたった1種しか見出されていない。イソフォームの多様性はmRNAの別スプライシングによりヒト染色体17上の単一遺伝子から生じる (Himmler, 1989; Goedert et al., 1989; Andreadis et al., 1992)。分子クローニングから推論されるように、タウ蛋白の最も顕著な特徴は31または32個のアミノ酸の伸長部であり、それは当該分子のカルボキシ末端に生じ、3または4回の繰り返しを生じうる。さらなる多様性はタウ分子のNH₂末端部における29または58アミノ酸の長さの挿入部により生じる (Goedert et al., 1989)。インビボにおいて、タウは、そのリピート領域 (255 ~ 381) に局在化する微小管結合ドメインを用いる相互作用により、微小管のアッセムブリおよびニューロンの軸索コンパートメント中での安定性を促進する (Lewis et al., 1988)。正常な環境下において成人脳はタウ1モルあたり2 ~ 3モルのリン酸根を含む (Selden and Pollard, 1983; Ksiezak-Reding et al., 1992)。ラットおよびヒトにおいて研究されているように、正常タウ中の異なる部位のリン酸化は発達段階に依存する (Lee et al., 1991; Bramblett et al., 1993; Goedert et al., 1993)。神経原線維の絡みを示す脳領域において、リン酸化の結果として生じる60、64および68kDaのタウ変種が検出された (Delacourte et al., 1990; Goedert et al., 1992; Flament et al., 1990, Greenberg and Davies, 1990)。これらの脳はタウ1モルあたり6 ~ 8モルのリン酸根を含む (Ksiezak-Reding et al., 1992)。PHFから単離されたタウ (PHF - タウ) において、リン酸化は数個の位置で起こる (Iqbal et al., 1989; Lee et al., 1991; Hasegawa et al., 1992; Hanger et al., 1998; Buee et al., 1999)。

20

30

40

【0003】

アルツハイマー病 (AD) および前頭側頭骨痴呆 (FTD) はもっともありふれたタイプの、タウの異常に関連した初期の変性性痴呆であり、それぞれ42 ~ 75%および8 ~ 10%の罹病率である (Brun, 1993; Gustafson, 1993; Ebly et al., 1994)。フィラメント状タウの異常、すなわち神経原線維の絡み (neurofibrillary tangles) (NFT) は一貫してADにおいて見られる (Tomlinson and Corsellis, 1984) が、FTDにおいても見られうる (Spillantini and Goedert, 1998)。異常なタウ蛋白はADおよびFTDの両方に見られる (Vermersch et al., 1995; Delacourte et al., 1996)。しかしながら、脳組織に関する研究により、タウの異常はADとFTDとは異なり、おそらくリン酸化の程度に関連しているのだろうということが示唆された (Delacourte et al., 1996

50

)。タウの異常に関連した他の形態の痴呆は、家族性 F T D、進行性核上麻痺 (P S P)、皮質基底節変性 (C B D) および亜急性硬化性全脳炎を包含する。これらのタウオパチーの病理におけるリン酸化の役割はいまのところよくわかっていない。

【 0 0 0 4 】

レービー小体を伴う痴呆 (D L B) は、進行性の痴呆または精神病を示す病気である。発症期において存在しないかあるいは穏やかなパーキンソン病の徴候は、最終的には普通のものとなり、硬直性 (rigidity) は重大である。レービー小体は脳幹、基底前脳、視床下部核および新皮質において豊富に見られる。レービー小体を伴う痴呆は、脳における絡みおよび過剰リン酸化タウの相対的不存在により特徴付けられる。パーキンソン病 (P D) は、人生の中期または後期に起こるレービー小体疾患の 1 のタイプであり、非常にゆっくりと進行し、長い経過をたどる。それは神経系疾患の一例と考えられ、主として黒質線状体のドパミン作動性システムに関連している。最近、レービー小体を伴う痴呆は、異なった患者管理を必要とする特別な形態の痴呆であると定義された (Lebert et al., 1998; McKeith et al., 1999)。レービー小体を伴う痴呆は神経遮断薬に対して感受性があり、アルツハイマー病と区別することは臨床的に非常に困難である (McKeith et al., 1996; Ballard et al., 1998)。大部分の患者 (75% よりも多い) は神経病理学的にアルツハイマー病患者であると定義されるが、臨床的に診断されたアルツハイマー病患者の 15% ないし 25% はレービー小体を伴う痴呆を有している (Hooten et al., 1998)。レービー小体を伴う痴呆がアセチルコリンエステラーゼ療法に対してより感受性があるので、レービー小体を伴う痴呆とアルツハイマー病との区別は治療の最適化に必須である (Levy et al., 1994; Perry et al., 1994; Wilcock et al., 1994)。

【 0 0 0 5 】

脳脊髄液 (C S F) - - アミロイドおよび C S F - タウはアルツハイマー病と正常な老化、うつ病およびパーキンソン病との区別に有効であり (Galasko et al., 1998; Kanai et al., 1998; Hulstaert et al., 1999)、これらのマーカーはそのような疾病の分別診断に十分に適したものである (Andreasen et al., 1999b)。しかしながら、アルツハイマー病と、レービー小体を伴う痴呆のごとき密接に関連した症状、前頭側頭骨痴呆、多系統萎縮 (M S A) および / または進行性核上麻痺のごときタウの異常に関連した他の痴呆との区別におけるそれらの役割はさらに議論的である。

【 0 0 0 6 】

発明の目的

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾病にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体とレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と多系統萎縮にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と進行性核上麻痺にかかっている個体を分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾病にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体とレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と多系統萎縮にかかっている個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の 1 の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と進行性核上麻痺にかかっ

10

20

30

40

50

いる個体をインビトロで分別診断する方法を提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾病にかかっている個体を分別診断するための診断キットを提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体とレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体を分別診断するための診断キットを提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体を分別診断するための診断キットを提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と多系統萎縮にかかっている個体を分別診断するためのキットを提供することである。

本発明の1の目的は、アルツハイマー病にかかっている個体と進行性核上麻痺にかかっている個体を分別診断するためのキットを提供することである。

10

本発明の1の目的は、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および/または進行性核上麻痺を予防する化合物、あるいはレービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないパーキンソン病にかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体を治療する化合物をスクリーニングし、あるいはそれらの効果をモニターする方法を提供する。

【0007】

【表1】

表 1: 異なる診断群による人口統計学的データおよび CSF の結果

群	対象数	年齢, メジアン (男/女) (範囲)	MMSE	Aβ42, pM, メジアン(p25-p75)	Tau, pM, メジアン(p25-p75)	Ptau(181), pM, メジアン(p25-p75)
AD	80 (35/45)	72 (53-86)	78 22 (14-24)	69.2 (47.1-96.0)*	13.2 (9.4-17.0)*	14.7 (11.6-19.1)*
対照	40 (20/20)	70 (56-84)	20 30 (29-30)	99.3 (75.5-145.3)\$	3.0 (2.1-4.0)\$	7.8 (6.4-8.9)\$
FTD	69 (42/27)	67 (40-94)	61 22 (16-25)	90.3 (67.0-132.5)\$	7.5 (5.2-10.8)£,\$	9.4 (8.2-12.3)£,\$
LBD	43 (35/8)	72 (61-87)	37 19 (14-24)	72.2 (53-103)£	5.7 (1.6-9.0)\$	8.1 (6.1-10.0)\$
PD	15 (8/7)	70 (51-79)	1 23	72.3 (58.1-99.1)	4.2 (2.2-7.6)\$	7.4 (6.9-8.8)\$
MSA	16 (11/5)	64 (42-77)	3 20 (20-22)	91.5 (41.9-113.4)	5.3 (3.8-8.3)\$	7.6 (6.2-10.9)\$
PSP	15 (11/4)	67 (64-76)	4 26 (21-27)	96.6 (82.2-101.1)	2.8 (2.0-4.5)\$	6.9 (6.1-7.5)\$
CBD	5 (0/5)	70 (57-75)	4 13 (12-15)	70.2 (43.2-71.2)	12.9 (9.8-15.4)	12.7 (9.1-13.1)

AD = アルツハイマー病, FTD = 前頭側頭骨痲呆, DLB = d レービー小体を伴う痲呆, PD = パーキンソン病,

MSA = 多系統萎縮, PSP = 進行性核上痲痺, CBD = 皮質基底変性

*対照とは有意に異なる (p<0.001)

£対照とは有意に異なる (p<0.05)

\$ADとは有意に異なる (p<0.001)

表 2:

ROC分析を用いるCSF-タウとCSF-ホスホ-タウの分別力の比較

Groups	CSF-タウ (AUC ± SE)	CSF-ホスホ-タウ (AUC ± SE)	p-値
AD 対 対照 (n=40)	0.862 ± 0.038	0.897 ± 0.032	0.191
AD 対 FTD (n=69)	0.711 ± 0.045	0.754 ± 0.044	0.049
AD 対 DLB (n=43)	0.782 ± 0.048	0.839 ± 0.042	0.039
AD 対 パーキンソン病関 連症状 (n=46)	0.873 ± 0.035	0.864 ± 0.037	0.319

10

Hanley および McNeil に従って計算された曲線下の面積 (AUC) および標準偏差 (SE) を用いるレシーバーオペレイティング曲線 (ROC) 分析。

AD = アルツハイマー病, FTD = 前頭側頭骨痴呆, DLB = レービー小体を伴う痴呆, 痴呆を伴わないパーキンソン病を包含するパーキンソン病関連症状 (n=15), 多系統萎縮 (n=16) および 進行性核上麻痺 (n=15)

20

【0009】

発明の詳細な説明

本発明は、ホスホ-タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と別の神経学的疾患疾患にかかっている個体との分別診断方法に関する。より詳細には、本発明は下記工程:

該個体中のホスホ-タウのレベルを決定し;

該個体中のホスホ-タウのレベルとアルツハイマー病にかかっている個体中のホスホ-タウのレベルとを比較し、低下したホスホ-タウのレベルにより、該個体がアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていることが示されることにより、該個体がアルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっていると推論する

30

を含む上記方法に関する。

【0010】

本発明における「神経学的疾患にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断」は、個体におけるある種の神経学的疾患またはある種の神経学的疾患の原因が該個体のある種の神経変性症状に関連していることを根拠に、第1の神経学的疾患と第2の神経学的疾患とを識別することをいう。本発明の方法は、アルツハイマー病にかかっている個体と、アルツハイマー病以外の神経学的疾患にかかっている個体とを分別診断することを可能にする。特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆 (DLB) にかかっている個体との分別診断を可能にする。別の特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、痴呆を伴わないパーキンソン病 (PD) にかかっている個体との分別診断を可能にする。もう1つの特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、多系統萎縮 (MSA) にかかっている個体との分別診断を可能にする。もう1つの特別な具体例において、本発明は、アルツハイマー病 (AD) にかかっている個体と、進行性核上麻痺 (PSP) にかかっている個体との分別診断を可能にする。アルツハイマー病、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および進行性核上麻痺ならびに他の神経学的疾患は、Wilson et al. (1991) a

40

50

nd McKeith et al. (1999)により詳細に説明されている。

【0011】

本発明は、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないPD、MSAまたはPSPにかかっている個体からのCSF中のホスホ - タウのレベルが、アルツハイマー病にかかっている個体からのCSF中のホスホ - タウのレベルと比較して低下しているという知見に基づく。上記神経学的疾患間でホスホ - タウのレベルが異なるという知見は、個体における上記神経学的疾患の分別診断のための診断試験の開発の根拠を形成する。したがって、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体との分別診断方法に関するものであり、該方法は、ホスホ - タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする。

10

【0012】

よって、本発明の方法は、AD、DLB、痴呆を伴わないPD、MSAまたはPSPにかかっている疑いのある個体中のホスホ - タウのレベルを決定し、次いで、それを、前もって決定されているAD、DLB、痴呆を伴わないPD、MSAまたはPSPに特徴的なホスホ - タウのレベル範囲と比較する工程を含む。前もって決定されたアルツハイマー病に関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がADにかかっていることを示すものである。前もって決定されたDLBに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がDLBにかかっていることを示すものである。前もって決定された痴呆を伴わないPDに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体が痴呆を伴わないPDにかかっていることを示すものである。前もって決定されたMSAに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がMSAにかかっていることを示すものである。前もって決定されたPSPに関するホスホ - タウのレベルの範囲内のホスホ - タウのレベルは、該個体がPSPにかかっていることを示すものである。

20

【0013】

したがって、本発明は、ホスホ - タウが神経学的マーカーとして使用されることを特徴とする、アルツハイマー病にかかっている個体と、レービー小体を伴う痴呆にかかっている個体、痴呆を伴わないPDにかかっている個体、多系統萎縮にかかっている個体および/または進行性核上麻痺にかかっている個体との分別診断方法に関するものであり、該方法は下記工程：

30

該個体中のホスホ - タウのレベルを決定し；

該個体中のホスホ - タウのレベルとADにかかっている個体中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっていることが示されることにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっていると推論するを含む。

【0014】

インピトロならびにインピボにおいてホスホ - タウのレベルを検出することができる。個体中のホスホ - タウレベルのインピトロでの検出方法は、該個体から試料を得て、該試料中のホスホ - タウのレベルを決定し、次いで、それを、上記神経学的疾患に関する前もって決定されたホスホ - タウのレベルと比較する工程を含む。

40

【0015】

用語「試料」は生物学的材料の源をいい、例えば、体液、脳抽出物、末梢血またはホスホ - タウ蛋白を含有する他の試料をいう。好ましい具体例において、患者の体液試料中のホスホ - タウのレベルの分析によりホスホ - タウのレベルをインピトロで決定する。用語「体液」は、ホスホ - タウ蛋白を含有する血液、リンパ液、尿および脳脊髄液(CSF)(これらに限らない)を包含するヒト身体中に存在するすべての液体をいう。血液試料は血漿試料または血清試料を包含しうる。

【0016】

50

本発明の好ましい具体例において、患者から採取された脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルを決定する。したがって、本発明は、下記工程：

該個体からの脳脊髄液試料を得て、

該脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルを決定し；

該脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとADにかかっている個体からの脳脊髄液試料中のホスホ - タウのレベルとを比較し、低下したホスホ - タウのレベルにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPのごときAD以外の神経学的疾患にかかっていることが示されることにより、該個体がDLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPのごときAD以外の神経学的疾患にかかっていると推論するを含む上記方法に関する。

10

【0017】

DLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっている疑いのある個体のCSF中のホスホ - タウのレベルを、ADにかかっている個体のCSF中のホスホ - タウのレベルと比較する。低下したCSF - ホスホ - タウのレベルは、DLB、痴呆を伴わないPD、MSAおよび/またはPSPにかかっている個体であると解釈される。

【0018】

ホスホ - タウは、タウ蛋白配列のいずれかの位置においてリン酸化を有するすべての形態のタウを包含し、より詳細には、ホスホ - タウは、いずれの神経学的疾患にもかかっている成人個体から単離されたヒト正常タウにおいてリン酸化されていないアミノ酸位置におけるリン酸化を意味する。

20

【0019】

「低下したホスホ - タウのレベル」は、患者において測定されたホスホ - タウのレベルがADにかかっている患者において測定されたホスホ - タウのレベルよりも低いことを意味する。抗体の使用（これに限らない）を包含する当該分野で知られたいずれの方法によってもホスホ - タウを定量することができる。好ましい具体例において、少なくとも下記工程を含む免疫アッセイによりホスホ - タウを定量する：

患者から試料を得て；

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体に該試料を接触させ；

該抗体の該試料への免疫学的結合を検出する。

30

【0020】

もう1つの具体例において、下記工程を含むサンドイッチELISAによりホスホ - タウを定量することができる：

患者から試料を得て；

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、ホスホ - タウを認識する抗体（一次抗体または捕捉抗体）に該試料を接触させ；

抗原 - 抗体複合体の生成に適した条件下で、ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体（二次抗体またはディテクター抗体）に該試料を接触させ；

該二次抗体との特異的タグ付着またはカップリングのいずれかのためのマーカースタンに抗原 - 抗体複合体を接触させ、該マーカースタンは当業者に知られたいずれかのマーカースタンであり；

40

さらに可能ならば、標準化の目的で、両抗体と反応しうる精製ホスホ - タウ蛋白またはホスホ - ペプチドに両抗体を接触させる。

【0021】

有利には、二次抗体自体はマーカースタンあるいはマーカースタンとの直接または間接カップリングのための基を担持するものである。

【0022】

「認識」、「反応」、「免疫学的結合」あるいは「抗原 - 抗体複合体を生成」なる本明細書の表現は、抗体と抗原の免疫学的特性を考慮したすべての条件下で抗原と抗体との間の結合が起こることと解釈される。

【0023】

50

本明細書の用語「特異的に認識」は、該抗体がホスホ - タウと免疫学的複合体を形成できるが、ヒト正常タウとは形成できないことと解釈される。

【 0 0 2 4 】

ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体を上記方法に用いてホスホ - タウを定量することができる。ホスホ - タウの定量に使用されるモノクローナル抗体は A T 8 (W O 9 3 / 0 8 3 0 2)、A T 1 8 0 および A T 2 7 0 (W O 9 5 / 1 7 4 2 9) ならびに A T 1 0 0 (W O 9 6 / 0 4 3 0 9) を包含する。ホスホ - タウを認識する当該分野で知られた他の抗体も同様に使用することができる。

【 0 0 2 5 】

これらのモノクローナル抗体に由来するフラグメント、例えば、Fab、F(ab)'₂、ssFv (「1本鎖可変フラグメント」) ならびに抗体の可変領域を保持している他の抗体様構築物もまた、元の結合特性を保持しているかぎり、本発明の方法に使用することができる。かかるフラグメントは、通常には、例えば、抗体をパイン、ペプシンまたは他のプロテアーゼで消化することにより得られる。モノクローナル抗体またはそのフラグメントは種々の用途のために修飾することができる。また、ミニ - 抗体および2価抗体、3価抗体、4価抗体および5価抗体のごとき多価抗体を本発明の方法に用いることもできる。これらのフラグメントおよび多価抗体の調製および/または使用は国際特許出願公開 W O 9 8 / 2 9 4 4 2 に詳細に記載されている。

【 0 0 2 6 】

本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体は、HおよびL鎖をコードするマウスおよび/またはヒトゲノムDNAから、あるいはHおよびL鎖をコードするcDNAクローンから組換えDNA法により製造されるマウスモノクローナル抗体のヒト化バージョンであってもよい。あるいは、本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体であってもよい。用語「ヒト化抗体」は、免疫グロブリンのフレームワーク領域の少なくとも一部がヒト免疫グロブリン配列由来であることを意味する。

【 0 0 2 7 】

本発明の方法に使用される抗体を、酵素、蛍光またはラジオアイソトープ型の適当な標識で標識してもよい。

【 0 0 2 8 】

個体中のホスホ - タウのレベルのインピボでの検出方法は、該個体中のホスホ - タウのレベルを決定し、次いで、それを、前もって決定された A D、D L B、痴呆を伴わない P D、M S A または P S P に特徴的なホスホ - タウレベルと比較する工程を含む。本発明の1の具体例において、インピボにおけるイメージングによりホスホ - タウを定量することができる。Arbit et al. (1995), Tamada et al. (1995), Wakabayashi et al. (1995), Huang et al. (1996), Sandrock et al. (1996), Mariani et al. (1997) により記載された脳イメージング法(これらに限らない)を包含する非侵襲的方法によりホスホ - タウをインシトゥにて定量することができる。これらのインピボイメージング法は、例えば、ホスホ - タウを特異的に認識する標識抗体を用いることにより、ホスホ - タウの局在化を調べ、定量することを可能にするかもしれない。

【 0 0 2 9 】

よって、本発明は、A Dにかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための神経学的マーカーとしてのホスホ - タウの使用に関する。詳細には、本発明は、A Dにかかっている個体と、D L Bにかかっている個体、痴呆を伴わない P Dにかかっている個体、M S Aにかかっている個体および/または P S Pにかかっている個体との分別診断のための神経学的マーカーとしてのホスホ - タウの使用に関する。

【 0 0 3 0 】

また本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのマーカーとしてのホスホ - タウの使用にも関する。詳細には、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、D L Bにかかっている個体、痴呆を伴わない P Dにかかっている個体、M S Aにかかっている個

10

20

30

40

50

体および/またはP S Pにかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのマーカーとしてのホスホ - タウの使用にも関する。

【 0 0 3 1 】

また本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのホスホ - タウを特異的に認識する抗体の使用にも関する。詳細には、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と、D L Bにかかっている個体、痴呆を伴わないP Dにかかっている個体、M S Aにかかっている個体および/またはP S Pにかかっている個体との分別診断のための診断キットの製造のためのホスホ - タウを特異的に認識する抗体の使用にも関する。

【 0 0 3 2 】

したがって、本発明は、ホスホ - タウを特異的に認識する抗体を含む、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための診断キットにも関する。詳細には、本発明は、ホスホ - タウを特異的に認識する抗体を含む、アルツハイマー病にかかっている個体とD L Bにかかっている個体、痴呆を伴わないP Dにかかっている個体、M S Aにかかっている個体および/またはP S Pにかかっている個体との分別診断のための診断キットに関する。

【 0 0 3 3 】

本発明の方法を実施するための可能なキットはイムノアッセイに基づくものであり、以下のものを含む：

ホスホ - タウのエピトープを有する免疫学的複合体を形成する抗体（一次抗体）；

ホスホ - タウを特異的に認識するモノクローナル抗体（二次抗体）；

該二次抗体に特異的にタグを付すあるいはカップリングさせるためのマーカー；

一次抗体と試験試料との間、二次抗体と試験試料との間および/または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適当な緩衝液；

可能ならば、標準化目的で精製ホスホ - タウ蛋白またはホスホ - ペプチド。

【 0 0 3 4 】

さらに本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体と別の神経学的疾患にかかっている個体との分別診断のための上記診断キットの使用に関する。詳細には、本発明は、アルツハイマー病にかかっている個体とD L Bにかかっている個体、痴呆を伴わないP Dにかかっている個体、M S Aにかかっている個体および/またはP S Pにかかっている個体との分別診断のための上記診断キットの使用に関する。

【 0 0 3 5 】

また本発明は、アルツハイマー病、レービー小体を伴う痴呆、痴呆を伴わないパーキンソン病、多系統萎縮および/または進行性核上麻痺を予防または治療する化合物の、個体に対する効果をスクリーニングあるいはモニターする方法にも関する。

【 0 0 3 6 】

特別な事情がない限り、本明細書および特許請求の範囲において、「含む」および「特徴とする」は、記述された数または工程あるいは数または工程の群以外の数または工程あるいは数または工程の群を包含するものと理解される。

【 0 0 3 7 】

特に有利な具体例を示す下記実施例を参照して本発明を説明する。しかしながら、これらの実施例は説明であり、本発明を限定するものと解すことはできないといことに留意すべきである。

【 0 0 3 8 】

実施例 1

対象および方法

C S Fの研究に参与している14の大学のセンターに、多中心検定(multicenter study)に参加するようコンタクトした。各センターに、正確に10人のAD患者からの500 μ lのC S F (McKhann et al., 1984)ならびにD L B (McKeith et al., 1996)またはF T D (Anonymous, 1994)患者からの最少でも6つの試料を含めるよう要求した。8つ

10

20

30

40

50

のセンターがこれらの条件に従った。P S P (Golbe et al, 1993)、C B D ((Rinne et al., 1994))および多系統萎縮(M S A)(Colosimo et al., 1995)患者からのC S Fが利用可能な場合には、それらも研究に加えた。センター1箇所あたり10の試料が利用可能な場合には、神経学的問題および認識の問題および痴呆を伴わないパーキンソン病(P D)(Langston et al., 1992)を有しない年齢を合わせた対照を含めた。

【0039】

研究目的に利用可能なC S F試料に関して研究を行ない、必要な場合には、研究の開始に先立って地方のIndependent Ethics Committee/Institutional Review board (IEC/IRB)によりプロトコルが検閲され、承認された。

【0040】

腰椎穿刺を用いて試料をポリプロピレンチューブに集めた。凍結-融解は - アミロイド₄₂(A₄₂)レベルに重大な影響を及ぼすことが示されている((Andreasen et al., 1999; Vanderstichele et al., 1998))ので、凍結-融解サイクルの回数が付記された。1マイクロリットルあたり500個未満の赤血球を含むC S F試料を除外した。

【0041】

CSF-A₄₂(K-1080, Innogenetics)((Andreasen et al., 1999; Vanderstichele et al., 1998))、hTau(K-1032, Innogenetics)(Vandermeeren et al., 1993; Blennow et al., 1995; Van de Voorde et al., 1995))に関する標準キットならびにthe INNOTEST PHOSPHO-TAUの研究用バージョンを用いて、Innogenetics(Gent, Belgium)にてすべての決定を行なった。ホスホ-タウキットは、捕捉用ヒト-特異的抗体HT7および検出用ホスホ-スレオニン-181-特異的抗体AT270を用いて開発されたものである((Goedert et al., 1994; Vanmechelen et al., 2000))。標準物質として、対応スレオニン181がリン酸化された合成ペプチド(Ac-P₁₅₄RGAAPPQKQGANATRIPAKTPPAPKT(p)PPSSGE₁₈₇-NH₂)を用いた。アッセイの実行範囲をカバーする5つのプールされたC S F試料を用いてホスホ-タウアッセイの信頼性および品質をモニターした。

【0042】

統計学的方法

Shapiro-Wilk検定を用いてC S F - タウ、A₄₂およびホスホ-タウの正規分布を試験し、正規性が拒絶された場合には、非-パラメトリック(Kruskal-Wallis)検定を比較に使用した。A Dまたは対照群との比較のために、Dunnのマルチプルコンパリゾン検定(multiple comparison test)を用いてp-値を調節した。レシーバーオペレイティングカーブ(receiver operating curve)(R O C)分析を用いて、A Dと対照、D L B、F T Dまたはパーキンソン病関連症状との間におけるタウおよびホスホタウの分別力をそれぞれ試験した((Hanley and McNeil, 1983))。Spearman rank correlation coefficientを用いて正の相関を決定した。

【0043】

異なる神経学的疾患群におけるC S F - ホスホ-タウレベル

8つのセンターから全部で294のC S F試料を集めた。1のセンターからのC S F試料の輸送は5日よりも長くかかり、輸送中に試料が融解した。したがって、1のC S F試料(F T D)を除いてこれらのC S F試料の新たな部分試料が再輸送された。センター2からの5つの試料(5 F T D)およびセンター8からの5つの試料(5 P D)もアッセイしなかった。なぜなら、すべての試験を行なうには輸送されたC S F量が不十分であったからである。要約すると、異なる診断群からの283のC S F試料(40対照, 80AD, 43DLB, 69FTD, 15PD, 15PSP, 16MSAおよび5CBD)を、生化学的マーカーの少なくとも1つについてアッセイした(表1参照)。1985年から1999年にわたってC S F試料を集めた。予想したように、DLB患者群中の男性のパーセンテージが高い。

【0044】

ホスホ-タウ試験の品質をモニターするために使用された5つのQC試料についてホスホ-タウのレベルおよびそれらの信頼区間を決定した。すべてのQC試料に関する値は確立された判断基準中におさまった(結果示さず)。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

A 42およびタウに関してセンターの影響が観察されたが、AD群中のホスホ - タウについては観察されなかった。A 42に関して凍結 - 融解の影響が観察された ($p < 0.0001$) が、タウおよびホスホ - タウに関しては観察されず、このことはADおよびDLB群において特に顕著であった。センター03からのCSFの分析において影響がさらに確認された。これらの試料はタウおよびA 42の両方に関して前もってアッセイされ、2回の凍結 - 融解サイクル後にInnogenetics (Gent, Belgium)において再アッセイされた。10の対照試料のうち8つにおいてCSF - A 42の正味20%の減少が観察された。

【 0 0 4 6 】

異なるマーカーに対する年齢の影響はいずれの診断群においても観察されなかった。全群におけるタウおよびMMSEを除いて、男性または女性のAD群あるいは全AD群においてバイオマーカーとMMSEとの間に有意な相関は見られなかった (Spearman, $r = -0.275 [-0.491, -0.059]$, $p = 0.01$)。APOE遺伝子型はCSF - タウまたはCSF - ホスホ - タウレベルとは相関していなかったが、CSF - A 42に関しては有意な相関が観察された (Spearman, $r = -0.263 [-0.434, -0.093]$, $p = 0.003$)。

【 0 0 4 7 】

すべての群においてA 42、タウおよびホスホ - タウについて正規性が拒絶されたので、非 - パラメトリック検定を用いて分析を行なった (表1)。対照群と比較して有意に上昇したCSF - タウレベルがAD群 ($p < 0.001$) およびFTD群 ($p < 0.05$) に存在した。FTDにおいてCSF - タウレベルが上昇したが、AD群のレベルよりも有意に高かった ($p < 0.01$)。ADおよびFTDのほかにPSPをリファレンス群として用いた場合、CBDはCSF - タウレベルよりも有意に高かった ($p < 0.05$)。ADおよび対照を用いて比較した場合、ホスホ - タウに関して類似のパターンが観察された。対照群と比較した場合、有意に低下したA 42レベルがAD群 ($p < 0.001$) およびFTD群 ($p < 0.05$) においてのみ観察され、すべての群のA 42をAD群と比較すると、ADとFTDとの間の明らかに有意な相違が示される ($p < 0.001$)。CBDを除くすべてのパーキンソン病関連症状において、バイオマーカーの平均レベルは正常範囲内であったので、その後の分析においてこれらの群を1つの群として扱った。

【 0 0 4 8 】

診断群とは無関係な、すべての患者に関するタウとホスホ - タウとの間の強い相関 ($y = 0.75x + 4.6$, $r = 0.904$, $p < 0.001$) により、タウを用いて得られるADと他の群との間の分別は、ホスホ - タウを用いて得ることもできることが示唆される。ROC分析を用いて、全タウの分別力とホスホ - タウの分別力を比較した。ADとFTDとの分別およびADとDLBとの分別に関してタウとホスホ - タウとの間の有意な相違が観察されたが、対照またはパーキンソン病関連症状と比較した場合のADに関して相違は観察されなかった (表2)。DLBにおいて男性の例が多すぎるので、男性のADと男性のDLBに関してROC分析を行ったところAUCは 0.800 ± 0.057 であり、女性および男性を一緒にした場合と比肩しうるものであった。

【 0 0 4 9 】

CSF - タウとCSF - β - アミロイド42を結び合わせる、すでに確立されている分別基準線 ($A_{42} = 240 + 1.18 \text{ tau}$) を用いて、感度 (98% (CI 91-99%)) および対照集団に対する特異性 (73% (CI 56-85%)) を、以前の研究と比較した。この分別基準線の特異性はFTDに対して77% (CI 66-85%)、DLBに対して67% (CI 52-80%)、パーキンソン病関連症状に関して68% (CI 50-81%) であった。

【 0 0 5 0 】

文献

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

Andreasen N., Vanmechelen E., Van de Voorde A., Davidsson P., Hesse C., Tarvonen

10

20

30

40

50

- S., Raiha I., Sourander L., Winblad B., Blennow K. (1998) Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community-based follow-up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64: 298-305.
- Andreasen N., Minthon L., Clarberg A., Davidsson P., Gottfries J., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Winblad B., Blennow K. (1999a) Sensitivity, specificity and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology* 53: 1488-1494.
- Andreasen N., Hesse C., Davidsson P., Minthon L., Wallin A., Winblad B., Vanderstichele H., Vanmechelen E., Blennow, K. (1999b) Cerebrospinal fluid beta-amyloid (1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch. Neurol.* 56: 673-680. 10
- Anonymous (1994) Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57: 416-418.
- Arbit E., Cheung N.K., Yeh S.D., Daghighian F., Shang J.J., Cordon-Cardo C., Pentlow K., Canete A., Finn R., Larson S.M. (1995) Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialogangliosid GD2 in human brain tumors. *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 419-426.
- Ballard C., Grace J., McKeith I., Holmes C. (1998) Neuroleptic sensitivity in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 1032-3. 20
- Blennow K., Wallin A., Agren H., Spenger C., Siegfried J., Vanmechelen E. (1995) Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 231-245.
- Bramblett G., Goedert M., Jakes R., Merrick S., Trojanowski J., Lee V. (1993) The abnormal 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., Passareiro J., Nunez J., Flament-Durand J. (1985) Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* 95: 229-235. 30
- Brun A. (1993) Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type revisited. *Dementia* 4: 126-131.
- Buee L., Delacourte A. (1999) Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol.* 9: 681-693.
- Colosimo C., Albanese A., Hughes A.J., de Bruin V.M., Lees, A.J. (1995) Some specific clinical features differentiate multiple system atrophy (striatonigral variety) from Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 52: 294-298.
- Delacourte A., Defossez 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. 40
- 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., Buee L., Vermersch P. (1996) Immunocytochemistry in frontotemporal dementia. In: Pasquier F, Lebert F., Scheltens P. (eds.) *Frontotemporal dementia*. ICG Publications, Dordrecht, The Netherlands. pp. 115-124.
- Ebly E.M., Parhad I.M., Hogan D.B., Fung T.S. (1994) Prevalence and types of dementia in the very old: results from the Canadian Study of Health and Aging. *Neur* 50

ology 44: 1593-1600.

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

Galasko D., Chang L., Motter R., Clark C.M., Kaye J., Knopman D., Thomas R., Khododenko D., Schenk D., Lieberburg I., Miller B., Green R., Basherad R., Kertiles L., Boss M.A., Seubert P. (1998) High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. Arch. Neurol. 55: 937-945.

Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3: 519-526. 10

Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. Neuron 8: 159-168.

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

Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Cohen P., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Cras P. (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. Biochem. J. 301: 871-877. 20

Goedert M., Crowther R.A., Spillantini M.G. (1998) Tau mutations cause frontotemporal dementias. Neuron 21: 955-958.

Golbe L.I., Davis P.H. (1993) Progressive supranuclear palsy. Baltimore: Williams & Wilkins.

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.

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. 30

Gustafson L. (1993) Clinical picture of frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. Dementia 4: 143-148.

Hanger D.P., Betts J.C., Loviny T.L., Blackstock W.P., Anderton B.H. (1998) New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. J. Neurochem. 71: 2465-2476.

Hanley J.A., McNeil B.J. (1983) A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. Radiology 148: 839-843. 40

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.

Himmler A. (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts. Mol. Cell Biol. 9(4): 1389-96.

Hooten W.M., Lyketsos C.G. (1998) Differentiating Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: receiver operator characteristic curve analysis of four rating scales. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 9: 164-174.

Huang Q., He G., Lan Q., Li X., Qian Z. Chen J. Lu Z., Du Z. (1996) Target imaging diagnosis of human brain glioma. Clinical analysis of 40 cases. Nucl. Med. Co 50

mmun. 17: 311-316.

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., Vanderstichele H. (1999). Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52: 1555-1562.

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

Ishiguro K., Ohno H., Arai H., Yamaguchi H., Urakami K., Park J.M., Sato K., Kohno H., Imahori K. (1999) Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 270: 91-94. 10

Kanai M., Matsubara E., Isoe K., Urakami K., Nakashima K., Arai H., Sasaki H., Abe K., Iwatsubo T., Kosaka T., Watanabe M., Tomidokoro Y., Shizuka M., Mizushima K., Nakamura T., Igeta Y., Ikeda Y., Amari M., Kawarabayashi T., Ishiguro K., Harigaya Y., Wakabayashi K., Okamoto K., Hirai S., Shoji M. (1998) Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann. Neurol.* 44: 17-26.

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. 20

Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J. (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.

Ksiazek-Reding H., Liu W.K., Yen S.H. (1992) *Brain Res.* 597: 209-219.

Langston J.W., Widner H., Goetz C.G., Brooks D., Fahn S., Freeman T., Watts R. (1992). Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Mov. Disord.* 7: 2-13.

Lebert F., Pasquier F., Souliez L., Petit H. (1998) Tacrine efficacy in Lewy body dementia. *Int.J.Geriatr.Psychiatry* 13: 516-519.

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(4994): 675-8 30

Levy R., Eagger S., Griffiths M., Perry E., Honavar M., Daen A., Lantos P. (1994) Lewy bodies and response to tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet* 343: 176-178.

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

Mariani G., Lasku A., Pau A., Villa G., Motta C., Calcagno G., Taddei G.Z., Castellani P., Syrigos K., Dorcaratto A., Epenetos A.A., Zardi L., Viale G.A. (1997) A pilot pharmacokinetic and immunoscintigraphic study with the technetium-99m labeled monoclonal antibody BC-1 directed against oncofetal fibronectin in patients with brain tumours. *Cancer* 15: 2484-2489. 40

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., Edwardson 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.

McKeith I.G., O'Brien J.T., Ballard C. (1999) Diagnosing dementia with Lewy body 50

es. *Lancet* 354: 1227-1228.

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

Perry E.K., Haroutunian V., Davis K.L., Levy R., Lantos P., Eagger S., Honavar M., Dean A., Griffiths M., McKeith I.G., et al. (1994) Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5: 747-749.

Rinne J.O., Lee M.S., Thompson P.D., Marsden C.D. (1994). Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases. *Brain* 117 (Pt 5): 1183-1196. 10

Sandrock D., Verheggen R., Helwig A.T., Munz D.L., Markakis E., Emrich D. (1996) Immunoscintigraphy for the detection of brain abscesses. *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-316.

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

Spillantini M.G., Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 21: 428-433.

Tamada K., Fujinaga S., Watanabe R., Yamashita R., Takeuchi Y., Osano M. (1995) Specific deposition of passively transferred monoclonal antibodies against herpes simplex virus type 1 in rat brain infected with the virus. *Microbiol-Immunol.* 39: 861-871. 20

Tomlinson B.E., Corsellis J.A.N. (1984) Ageing and the demntias. In: Hume Adams J., Corsellis J.A.N., Duchen L.W. (eds.) *Greenfield's neuropathology*. Edward Arnold, London, UK. pp. 951-1025.

Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., Van de Voorde A., Martin J. J., Cras P. (1993) Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* 61: 1828-1834. 30

Van de Voorde A., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Dessaint F., Beeckman W., Cras P. (1995) Detection of tau in cerebrospinal fluid. In: Iqbal K., Mortimer J. A., Winblad B. and Wisniewski H. M. *Alzheimer's disease: Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. John Wiley & Sons, Ltd. Chicester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 189-195.

Vanderstichele H., Blennow K., D'Heuvaert N., Buyse M.-A., Wallin A., Andreasen N., Seubert P., Van de Voorde A., Vanmechelen, E. (1998) Development of a specific diagnostic test for measurement of β -amyloid(1-42) [A4(1-42)] in CSF. In: Fisher A., Hanin A. and Yoshida M. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Plenum Press, New York and London. pp. 773-778. 40

Vermersch P., Bordet R., Ledoze F., Ruchoux M.M., Chapon F., Thomas P., Destee A., Lechevallier B., Delacourte A. (1995) C R Demonstration of a specific profile of pathological Tau proteins in frontotemporal dementia cases. *Acad. Sci.* 318: 439-445.

Vigo-Pelfrey C., Seubert P., Barbour R., Blomquist C., Lee M., Lee D., Coria F., Chang L., Miller B., Lieverburg I., et al. (1995) Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 788-793.

Wakabayashi T., Yoshida J., Okada H., Sugita K., Itoh K., Tadokoro M., Ohshima M. (1995) Radioimaging of human glioma by indium-111 labelled G-22 anti-glioma mon 50

oclonal antibody. *Noshuyo-Byori* 12: 105-110.

Wilcock G.K., Scott M.I. (1994) Tacrine for senile dementia of Alzheimer's or Lewy body type. *Lancet* 344: 544-544.

Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (1991) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th Edition, McGraw-Hill Inc, NY, USA.

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

フロントページの続き

- (72)発明者 エウヘーン・ファンメヘレン
ベルギー、ベ－ 9 8 1 0 ナザレス - エケ、テン・エデストラート 1 0 1 番
- (72)発明者 フーホ・ファンデルスティヘレ
ベルギー、ベ－ 9 0 0 0 ヘント、タインウェイクストラート 4 3 番
- (72)発明者 フランク・フルスタート
ベルギー、ベ－ 9 0 5 0 ヘントブルッヘ、クラファープール 1 5 番

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特開平 0 7 - 1 3 2 0 3 3 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 2 5 3 7 7 4 (J P , A)
米国特許第 0 6 0 0 8 0 2 4 (U S , A)
米国特許第 0 5 6 0 1 9 8 5 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53

G01N 33/68