

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6205175号  
(P6205175)

(45) 発行日 平成29年10月4日(2017. 10. 4)

(24) 登録日 平成29年9月8日(2017. 9. 8)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 N

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 P

CO 7 K 16/00 (2006. 01)

GO 1 N 33/543

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

CO 7 K 16/00 Z N A

C 1 2 Q 1/02

請求項の数 16 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2013-104124 (P2013-104124)  
 (22) 出願日 平成25年5月16日(2013. 5. 16)  
 (65) 公開番号 特開2014-224759 (P2014-224759A)  
 (43) 公開日 平成26年12月4日(2014. 12. 4)  
 審査請求日 平成28年5月13日(2016. 5. 13)

(73) 特許権者 515262155  
 株式会社 R E S V O  
 東京都大田区大森北3丁目15番5号  
 (74) 代理人 100097456  
 弁理士 石川 徹  
 (74) 代理人 100180563  
 弁理士 澤田 晃  
 (72) 発明者 大西 新  
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号  
 独立行政法人放射線医学総合研究所内  
 (72) 発明者 南本 敬史  
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号  
 独立行政法人放射線医学総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精神・神経疾患バイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリン遊離 鎖、及びその断片からなる群から選択される少なくとも1種を含む、精神・神経疾患バイオマーカーであって、

該精神・神経疾患が、統合失調症又は自閉症である、前記精神・神経疾患バイオマーカー。

【請求項 2】

前記免疫グロブリン遊離 鎖が、配列番号：2又は3のアミノ酸配列を含む、請求項1記載の精神・神経疾患バイオマーカー。

【請求項 3】

前記免疫グロブリン遊離 鎖が、配列番号：1のアミノ酸配列を含む、請求項1又は2記載の精神・神経疾患バイオマーカー。

【請求項 4】

さらに、免疫グロブリン遊離 鎖、及びその断片からなる群から選択される少なくとも1種を含む、請求項1～3のいずれか1項記載の精神・神経疾患バイオマーカー。

【請求項 5】

前記免疫グロブリン遊離 鎖が、配列番号：6のアミノ酸配列を含む、請求項4記載の精神・神経疾患バイオマーカー。

【請求項 6】

さらに、炎症性サイトカインを含む、請求項1～5のいずれか1項記載の精神・神経疾

患バイオマーカー。

【請求項 7】

前記炎症性サイトカインが、IL-6、IL-1ベータ、及びTNF-アルファからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項6記載の精神・神経疾患バイオマーカー。

【請求項 8】

前記精神・神経疾患が、統合失調症である、請求項1～7のいずれか1項記載の精神・神経疾患バイオマーカー。

【請求項 9】

前記精神・神経疾患が、自閉症である、請求項1～7のいずれか1項記載の精神・神経疾患バイオマーカー。

10

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか1項記載の精神・神経疾患バイオマーカーを検出することができる物質を含む、統合失調症又は自閉症の検査用キット。

【請求項 11】

前記物質が、抗体である、請求項10記載の検査用キット。

【請求項 12】

前記抗体が、配列番号：5のアミノ酸配列に結合する抗体である、請求項11記載の検査用キット。

【請求項 13】

前記物質が、固相支持体上に固定されている、請求項10～12のいずれか一項記載の検査用キット。

20

【請求項 14】

対象の血液サンプル中の、請求項1～9のいずれか1項記載の精神・神経疾患バイオマーカーの量を指標として用いる、統合失調症又は自閉症の検査方法。

【請求項 15】

(a)対象の血液サンプル中の、請求項1～9のいずれか1項記載の精神・神経疾患バイオマーカーの量を測定する工程；及び

(b)該量を、正常な対象のものと比較する工程；を含む、統合失調症又は自閉症の検査方法。

【請求項 16】

30

前記血液サンプルが血清である、請求項14又は15のいずれか1項記載の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、精神・神経疾患バイオマーカー、特に、精神・神経疾患を診断するためのバイオマーカーに関する。また、本発明は、該バイオマーカーを検出するための精神・神経疾患の検査用キット、及び該バイオマーカーを利用する精神・神経疾患の検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

40

現在、統合失調症、自閉症、及びアルツハイマー病などの精神・神経疾患を診断する際の指標として、DMSIV-TR、ICD-10、及びPANSSなどの診断基準が用いられている。しかしながら、これらの基準を用いた診断は、患者との問診等により行われるため、評価者によりばらつきが生じるという問題があった。このため、客観的な生物学的指標としてのバイオマーカーが必要とされていた。

【0003】

これまでも、精神・神経疾患を診断するためのバイオマーカーを探索する試みがなされてきた。例えば、特許文献1は、統合失調症マーカーを開示している。また、特許文献2は、精神障害を診断及び監視するためのバイオマーカーを開示している。しかしながら、精度、実施容易性、費用などの面から実用化されるまでに至っていない。

50

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0004】

【特許文献1】特開2012-013415号公報

【特許文献2】特表2011-506995号公報

【非特許文献1】Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. Clin Chem. 2002 Sep;48(9):1437-44.

【非特許文献2】Assessment of proliferating cell nuclear antigen and its relationship with proinflammatory cytokines and parameters of disease activity in multiple myeloma patients. Tsirakis G, Pappa CA, Kaparou M, Katsomitrou V, Hatzivasili A, Alegakis T, Xekalou A, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Eur J Histochem. 2011;55(3):e21.

10

【非特許文献3】Serum proinflammatory mediators at different periods of therapy in patients with multiple myeloma. Kuku I, Bayraktar MR, Kaya E, Erkurt MA, Bayraktar N, Cikim K, Aydogdu I. Mediators Inflamm. 2005 Aug 14;2005(3):171-4.

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

20

本発明は、精神・神経疾患バイオマーカー、特に、精神・神経疾患を診断するためのバイオマーカー、該バイオマーカーを検出するための精神・神経疾患の検査用キット、及び該バイオマーカーを利用する検査方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者らは、上記課題に鑑み、精神・神経疾患バイオマーカーを同定するための研究を行った。その結果、本発明者らは、健常者に比べ精神・神経疾患患者において、免疫グロブリン遊離鎖（定常領域を含む）及び免疫グロブリン遊離鎖（定常領域を含む）の血中濃度が有意に増加していることを発見した。したがって、本発明は、該免疫グロブリン遊離鎖、該免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1種を含む、精神・神経疾患バイオマーカーを提供する。該バイオマーカーを用いることにより、対象の血液サンプルから容易に精神・神経疾患の検査及び診断等を行うことができる。

30

## 【0007】

一実施態様において、免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：1のアミノ酸配列（定常領域）を含み、かつ該免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：6のアミノ酸配列（定常領域）を含む。一実施態様において、免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：2又は3のアミノ酸配列を含み、かつ該免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：6のアミノ酸配列を含む。

## 【0008】

40

免疫グロブリン遊離鎖は、多発性骨髄腫を有する患者においても血清中で増加することが知られている（非特許文献1）。このとき、炎症性サイトカインも同時に増加することが知られている（非特許文献2及び3）。本発明者らは、意外にも、精神・神経疾患患者においては、免疫グロブリン遊離鎖の増加にもかかわらず、炎症性サイトカインは増加しないことを発見した。したがって、本発明は、前記バイオマーカーに加え、さらに炎症性サイトカインを含む、精神・神経疾患バイオマーカーを提供する。一実施態様において、該炎症性サイトカインは、IL-6、IL-1ベータ、及びTNF-アルファからなる群から選択される少なくとも1種である。

## 【0009】

また、本発明は、前記精神・神経疾患バイオマーカーを検出することができる物質を含

50

む、精神・神経疾患の検査用キットを提供する。さらに本発明は、前記バイオマーカーを指標として用いる、精神・神経疾患の検査方法を提供する。一実施態様において、本発明の精神・神経疾患の検査方法は、(a)対象の血液サンプル中の、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量を測定する工程；及び(b)該量を、正常な対象のものと比較、若しくは正常な対象のものの中央値と比較する工程を含む。

#### 【発明の効果】

##### 【0010】

本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、対象の血液サンプルから容易に採取でき、かつ定量も容易であるので、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーを利用して、精神・神経疾患の迅速かつ簡便な診断等が可能になる。

10

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0011】

【図1】免疫グロブリン鎖の説明を示す図である。図1(a)は、免疫グロブリン鎖の構成及びおおよその分子量を示す。また、図1(b)は、免疫グロブリン鎖の発現場所及び存在場所を示す。免疫グロブリン鎖(Ig)は、約12kDaの免疫グロブリン鎖C領域(Ig-C)と呼ばれる定常領域と約12kDaの可変領域からなり(図1(a))、遊離(free)のものとIgG(IgA、IgMも含む)又はB細胞に発現しているものが確認されている。(図1(b))。

【図2】母体にPoly IC投与して作成した母体免疫活性化モデルラット(統合失調症及び自閉症モデル動物)群(MIAラット)(図中、「Poly IC」と示す。)、及び母体に生理食塩水を投与して作成したコントロールラット群(図中、「Saline」と示す。)から得られた血清タンパク質を、2次元電気泳動法により分離した結果を示す。約25kDaのスポット(Ref. Spot 1115)に差が見られた。

20

【図3】図2に示す2次元電気泳動ゲルイメージにおいて、差の見られたスポット(Ref. Spot 1115 分子量：約25kDa)のLC MS/MS測定結果を示す。この結果から、MIAラット群とコントロールラット群との血清中において、Ig-Cの発現量に各群3個体で一致した差があることが分かった。

【図4】MIAラット群(図中、「Poly IC」と示す。)とコントロールラット群(図中、「Saline」と示す。)との血清をSDSのみで変性(100℃、5分)し、抗Ig-C抗体でウェスタンブロットした結果を示す。MIAラットとコントロールラットとの間で、約25kDaのバンド(図中、(2))に有意差が見られた。このバンドは、S-S結合、水素結合の切断なしで検出されることから、免疫グロブリン遊離鎖と考えられる。

30

【図5】統合失調症患者(SZ)群及び正常(Normal)群の血清中の免疫グロブリン遊離鎖(図中A)及び免疫グロブリン遊離鎖(図中B)の濃度(mg/l)を比較した結果を示す。統合失調症患者(SZ)において、免疫グロブリン遊離鎖(定常領域を含む)、及び免疫グロブリン遊離鎖(定常領域を含む)の濃度が有意に増加していた。また、免疫グロブリン遊離鎖+免疫グロブリン遊離鎖の濃度を比較した結果(図中C)は、更に有意な差が見られた(P=0.00063)。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0012】

##### (1. 定義)

本願明細書中において、用語「精神・神経疾患」とは、当業界において一般的に用いられている意味を有し、例えば、統合失調症(精神分裂病)、自閉症、アルツハイマー病、認知異常、双極性障害(躁鬱病)、脳神経発達障害、妊娠中の感染症による神経障害に起因する認知機能障害、免疫障害に起因する精神障害、てんかん、脳器質性精神障害、中毒性精神障害、知的障害(精神遅滞)、精神病質、及び神経症などを含む。さらに、「精神・神経疾患」は、梅毒性精神障害、老年期精神障害、脳血管性精神障害、頭部外傷による精神障害、非定形内因性精神病、内分泌性精神障害及び外因反応型、及び退行期精神障害も含む。本発明において、精神・神経疾患は、好ましくは、統合失調症、自閉症、又はアルツハイマー病である。最も好ましくは、統合失調症である。

50

## 【0013】

本明細書中において、用語「精神・神経疾患バイオマーカー」とは、精神・神経疾患を発症しているか又は発症する可能性があるか否か、又は発症後の予後予測の判断の指標となり得る生体物質のことを言う。例えば、精神・神経疾患バイオマーカーは、その量を測定することで、精神・神経疾患の診断等を行うことができるものである。精神・神経疾患バイオマーカーは、複数であってもよい。例えば、精神・神経疾患において、2種以上の生体物質が量的に増減している場合、その2種以上の生体物質を組み合わせたものは、精神・神経疾患バイオマーカーになり得る。また、例えば、精神・神経疾患以外の別の疾患又は状態においてある2種の生体物質が同時に増加するが、精神・神経疾患においては、そのうちの1種が増加し他の1種の増加しない場合も、その2種の生体物質を組み合わせたものは、精神・神経疾患バイオマーカーになり得る。精神・神経疾患バイオマーカーは、その量を測定することにより、精神・神経疾患の診断及び検査、精神・神経疾患を有する対象のスクリーニング、効率的な治療法の確立、精神・神経疾患に有用な候補薬剤のスクリーニング、及び精神・神経疾患のモデル動物の開発などに用いることができる。

10

## 【0014】

用語「免疫グロブリン鎖」及び用語「免疫グロブリン鎖」は、それぞれ、免疫グロブリンL鎖の2つのタイプ（型及び型）のことを意味する。本明細書中において、これらを、それぞれ、「Ig」及び「Ig」ともいう。免疫グロブリン鎖（Ig）は、約12kDaの免疫グロブリン鎖C領域（Ig-C）と呼ばれる定常領域と約12kDaの可変領域からなるポリペプチド（図1(a)参照）であり、遊離（free）のものとIgG又はB細胞に発現しているものが知られている（図1(b)参照）。免疫グロブリン鎖（Ig）は、免疫グロブリン鎖（Ig）のアイソフォームであり、免疫グロブリン鎖（Ig）と同様に、定常領域と可変領域とからなる。

20

## 【0015】

用語「免疫グロブリン鎖C領域」は、免疫グロブリン鎖又は免疫グロブリン遊離鎖の定常領域を構成するポリペプチドである。本明細書中において、該ポリペプチドを、「Ig chain C」又は「Ig-C」ともいう。本明細書中において、「免疫グロブリン鎖C領域」は、免疫グロブリン鎖又は免疫グロブリン遊離鎖の定常領域を構成するポリペプチドである。該ポリペプチドを、「Ig chain C」又は「Ig-C」ともいう。

## 【0016】

本明細書中において、用語「免疫グロブリン遊離鎖」及び用語「免疫グロブリン遊離鎖」は、それぞれ、遊離（Free）の免疫グロブリン鎖、及び免疫グロブリン鎖を意味する（図1(b)参照）。用語「遊離（Free）」は、IgG又はB細胞などに発現しておらず、単独で存在していることを意味する。免疫グロブリン遊離鎖は、免疫グロブリン鎖C領域を含む。本明細書中において、免疫グロブリン遊離鎖を、Free Igともいう。また、免疫グロブリン遊離鎖を、Free Igともいう。免疫グロブリン遊離鎖は、免疫グロブリン鎖C領域を含む。

30

## 【0017】

本明細書中、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの文脈において、「断片」とは、全長タンパク質（又はポリペプチド）の一部のアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。したがって、「断片」とは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの全長の範囲内で、そのアミノ酸残基数が、全長から少なくとも1アミノ酸残基短いポリペプチド、例えば、1~100、1~50、1~20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1アミノ酸残基短いポリペプチドをいう。好ましくは、免疫グロブリン遊離鎖の断片は、免疫グロブリン鎖C領域又は抗体で検出する際に抗原になりうる部位である。好ましくは、免疫グロブリン遊離鎖の断片は、免疫グロブリン鎖C領域又は抗体で検出する際抗原になりうる部位である。

40

## 【0018】

本明細書中において、用語「測定」は、検出及び定量を含む。また、用語「定量」は、半定量を含む。本明細書中において、用語「血液サンプル」は、対象から採取された血液

50

をいい、血清、血漿、全血を含む。

【0019】

本願明細書中において、用語「対象」とは、任意の哺乳動物、例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、サル（例えば、マーモセット、特にコモンマーモセット、又はアカゲザルなど）、イヌ、ネコ、又はミニブタなどを意味する。好ましくは、対象は、ヒトである。本願明細書中において、用語「正常な対象」とは、精神・神経疾患を発症していない又は発症する可能性のない対象、例えば、精神・神経疾患を発症していない又は発症する可能性のないヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、サル（例えば、マーモセット、特にコモンマーモセット、又はアカゲザルなど）、イヌ、ネコ、又はミニブタなどを意味する。好ましくは、正常な対象は、ヒトである。本明細書中において、「正常な対象」と「正常対照」とは同義的に使用され得る。本明細書中において、正常な対象がヒトである場合、正常な対象を、健常者ともいう。

10

【0020】

（2．本発明の精神・神経疾患バイオマーカー）

本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1種を含む。好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1種からなる。より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片を含む。あるいは、より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片からなる。より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片を含む。あるいは、より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片からなる。さらにより好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片を含む。あるいは、さらにより好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片からなる。

20

【0021】

他の実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1種、及び炎症性サイトカインを含む。好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1種、及び炎症性サイトカインからなる。より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片、及び炎症性サイトカインを含む。あるいは、より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片、及び炎症性サイトカインからなる。より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片、及び炎症性サイトカインを含む。あるいは、より好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖又はその断片、及び炎症性サイトカインからなる。さらにより好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び炎症性サイトカインを含む。あるいは、さらにより好ましくは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び炎症性サイトカインからなる。

30

40

【0022】

一実施態様において、炎症性サイトカインは、IL-6、IL-1ベータ、及びTNF-アルファからなる群から選択される少なくとも1種である。好ましくは、該炎症性サイトカインは、IL-6、IL-1ベータ、及びTNF-アルファからなる群から選択される少なくとも2種である。より好ましくは、該炎症性サイトカインは、IL-6、IL-1ベータ、及びTNF-アルファである。

50

一実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、対象から採取された血液サンプル中に存在する。

【0023】

免疫グロブリン遊離鎖のアミノ酸配列は、当業者に公知である。ヒト由来の免疫グロブリン遊離鎖は、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）を含む。例えば、免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：1のアミノ酸配列（C領域）を含む。好ましくは、免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：2又は3のアミノ酸配列を含む。当業者であれば、免疫グロブリン遊離鎖は、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）又はその抗原部位を認識できる物質を用いて、検出及び定量することができる。該物質には、例えば、Anti-Ig light chain 抗体（MAR-C8）（Abcam社）、及びFREELITE チェーン（MBL社、コード番号：BS-LK016BD）などがある。

10

【0024】

定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）は、好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列を含む。あるいは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）は、好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列からなる。より好ましくは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）は、配列番号：2又は3のアミノ酸配列を含む。定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）の抗原部位は、好ましくは、配列番号：2又は3のアミノ酸配列を含む。あるいは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）の抗原部位は、好ましくは、配列番号：2又は3のアミノ酸配列からなる。免疫グロブリン遊離鎖の断片は、好ましくは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）又はその抗原部位を含む。あるいは、免疫グロブリン遊離鎖の断片は、好ましくは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）又はその抗原部位からなる。

20

【0025】

配列番号：4（ラット由来）又は配列番号：5（ラット由来）のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン遊離鎖は、精神・神経疾患モデル動物、特に、ラットにおいて、精神・神経疾患を発症しているか又は発症の可能性があるか否かを検査、診断、及び/又は判定するために用いることができる。これは、特に、精神・神経疾患モデル動物の作成又は品質管理等に有用である。該検査方法は、下記の「精神・神経疾患の検査方法」の項目に示す方法と同じように行うことができる。したがって、他の実施態様において、免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：4のアミノ酸配列（C領域）を含む。好ましくは、免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：5のアミノ酸配列を含む。定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）は、好ましくは、配列番号：4のアミノ酸配列を含む。あるいは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）は、好ましくは、配列番号：4のアミノ酸配列からなる。定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）の抗原部位は、好ましくは、配列番号：5のアミノ酸配列を含む。あるいは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）の抗原部位は、好ましくは、配列番号：5のアミノ酸配列からなる。免疫グロブリン遊離鎖の断片は、好ましくは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）又はその抗原部位を含む。あるいは、免疫グロブリン遊離鎖の断片は、好ましくは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）又はその抗原部位からなる。

30

【0026】

免疫グロブリン遊離鎖のアミノ酸配列も、当業者に公知である。免疫グロブリン遊離鎖は、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）を含む。例えば、免疫グロブリン遊離鎖は、配列番号：6のアミノ酸配列を含む。好ましくは、免疫グロブリン遊離鎖は、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）の抗原部位を含む。当業者であれば、免疫グロブリン遊離鎖は、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）又はその抗原部位を認識できる物質を用いて、容易に検出及び定量することができる。該物質には、例えば、Anti-Ig light chain (Human) pAb-FITC（MBL社）、及びFREELITE チェーン（MBL社、コード番号：BS-LK018BD）などがある。

40

【0027】

定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）は、好ましくは、配列番号：6のアミノ酸配列を含む。あるいは、定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）は、好ましくは、配列番号：

50

6のアミノ酸配列からなる。免疫グロブリン遊離鎖の断片は、好ましくは、免疫グロブリン鎖C領域又はその抗原部位を含む。あるいは、免疫グロブリン遊離鎖の断片は、好ましくは、免疫グロブリン鎖C領域又はその抗原部位からなる。

【0028】

配列番号と免疫グロブリン鎖C領域又は免疫グロブリン鎖C領域との関係は、次のとおりである。

- 配列番号：1 - 免疫グロブリン鎖C領域（ヒト由来）
- 配列番号：2 - 抗原部位（ヒト由来）
- 配列番号：3 - 抗原部位（ヒト由来）
- 配列番号：4 - 免疫グロブリン鎖C領域（ラット由来）
- 配列番号：5 - 抗原部位（ラット由来）
- 配列番号：6 - 免疫グロブリン鎖C領域（ヒト由来）

10

【0029】

免疫グロブリン遊離鎖は、約12kDaの定常領域（免疫グロブリン鎖C領域）と約12kDaの可変領域からなるポリペプチドである（図1(a)参照）。したがって、免疫グロブリン鎖C領域のポリペプチド量を測定することは、免疫グロブリン遊離鎖の量を測定することと同等の意味を有するであろう。また、同様に、免疫グロブリン鎖C領域のポリペプチド量を測定することは、免疫グロブリン遊離鎖の量を測定することと同等の意味を有するであろう。

【0030】

20

他の実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖の抗原部位を含むポリペプチド若しくはその断片を含む。あるいは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖の抗原部位を含むポリペプチド若しくはその断片からなる。さらに他の実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖C領域を含むポリペプチド若しくはその断片を含む。あるいは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖C領域を含むポリペプチド若しくはその断片からなる。他の実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖の抗原部位を含むポリペプチド若しくはその断片を含む。あるいは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖の抗原部位を含むポリペプチド若しくはその断片からなる。さらに他の実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖C領域を含むポリペプチド若しくはその断片を含む。あるいは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、免疫グロブリン遊離鎖C領域を含むポリペプチド若しくはその断片からなる。

30

【0031】

当業者であれば、上記アミノ酸配列を有するポリペプチドの独自性、すなわち該ポリペプチドを特徴づける特異的なアミノ酸配列（例えば、モチーフ、ドメイン又はボックス配列など）などが保持されることを条件として、該ポリペプチドにおけるアミノ酸配列の欠失、付加、変異又は置換が許容され得ることは理解されるであろう。そのような欠失、付加、変異又は置換の数は、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの独自性が保持されることを条件として、限定されない（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上）。一般的に、同じ性質を有するアミノ酸相互間での変異又は置換は、該ポリペプチドの機能に全くあるいはほとんど影響を与えないので、該変異又は置換を含むポリペプチドは、元ポリペプチド（例えば、上記配列番号で特定されるポリペプチド）と同等であるとみなすことができる。そのようなアミノ酸の性質としては、例えば以下のようなカテゴリーを挙げることができる：例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リジン、ヒスチジン及びアルギニン）、疎水性（脂肪族）アミノ酸（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン）、含硫アミノ酸（メチオニン及びシステイン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、酸性アミノ酸アミド（アスパラギン及びグルタミン）、又は中性アミノ酸（グリシン、

40

50



アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン及びグルタミン)。

例えば、配列番号：1のアミノ酸配列のうち、第105番目のGlu及び第106番目のCysが欠失したアミノ酸配列も、本発明の範囲内に含まれる。

また、当業者であれば、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーには、例えばリン酸化、糖鎖付加、アミド化、ユビキチン化及びアセチル化などにより修飾されたものも含まれることを理解するであろう。

#### 【0032】

本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、対象の血液若しくは尿、脊髄液サンプル中に存在し得る。好ましくは、血液サンプル(血清、血漿、又は全血)である。より好ましくは、血液サンプルは、血清である。対象からの血液サンプルの採取は、当業者に公知の一般的な方法により行うことができる。例えば、注射器などを用いて、血液サンプルを採取することができる。

#### 【0033】

対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片は、いずれも有意に増加する。したがって、これらの増減を測定すれば、精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があると判定することができる。

#### 【0034】

なお、免疫グロブリン遊離鎖は、多発性骨髄腫患者などにおいても増加する場合がある。しかしながら、このとき同時に炎症性サイトカインも増加することが知られている(非特許文献1~3)。一方で、本発明者らは、精神・神経疾患においては、免疫グロブリン遊離鎖が増加するが、炎症性サイトカインの増加は見られないことを発見した。したがって、免疫グロブリン遊離鎖と炎症性サイトカインとを組み合わせることにより、すなわち、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片の量と炎症性サイトカインの量とを指標として用いることにより、精神・神経疾患をより明確に判定することができる。これは、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片の量と炎症性サイトカインの量とを指標として用いてもよい。最も好ましくは、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び炎症性サイトカインの量の3つを指標として用いる。

#### 【0035】

本発明の精神・神経疾患バイオマーカーは、好ましくは、統合失調症、自閉症、脳神経発達障害、妊娠中の感染症による神経障害に起因する認知機能障害、又は免疫障害に起因する精神障害のバイオマーカーである。最も好ましくは、統合失調症バイオマーカーである。

精神・神経疾患を発症又は発症の可能性の判定の詳細については、下記「精神・神経疾患の検査方法」に記載する。

#### 【0036】

##### (3. 精神・神経疾患の検査用キット)

本発明は、精神・神経疾患の検査用キットを提供する。該検査用キットを用いて、対象の血液サンプル中における、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量を測定し、該対象が精神・神経疾患を発症しているか又は発症するおそれがあることを判定することができる。

#### 【0037】

本発明の検査用キットは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーを検出することができる物質を含む。精神・神経疾患バイオマーカーが複数である場合は、その複数の精神・神経疾患バイオマーカーを検出することができるそれぞれの物質を含むことができる。該物質は、特に制限されないが、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーに親和性を有する任意の分子であることができる。該物質は、免疫グロブリン遊離鎖C領域又はその抗原部位を検出することができる物質であることができる。該物質は、免疫グロブリン遊離

10

20

30

40

50

鎖C領域又はその抗原部位を検出することができる物質であることができる。該物質は、例えば、抗体、低分子化合物、高分子化合物、タンパク質、ペプチド及び核酸などを含む。該物質は、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーを検出することができるように、色素若しくは蛍光色素、放射性同位体、及び酵素などの任意の標識体により標識されていることが好ましい。より好ましくは、該物質は、抗体である。好ましくは、該抗体は、抗IgG抗体、抗IgG-C抗体、抗IgM抗体、又は抗IgM-C抗体である。該抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であってもよい。

#### 【0038】

本発明の精神・神経疾患バイオマーカーを検出することができる物質の例を挙げると、例えば、Anti-IgG light chain 抗体 (MAR-C8) (Abcam社)、FREELITE チェーン (MBL社、コード番号: BS-LK016BD)、Anti-IgG light chain (Human) pAb-FITC (MBL社)、及びFREELITE チェーン (MBL社、コード番号: BS-LK018BD) などがある。

#### 【0039】

また、抗体は、当業者に公知の方法により調製してもよい。例えば、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーを、ラビットなどの哺乳動物に投与して免疫し、その血清から抗体を調製することができる。抗IgG抗体は、免疫グロブリン鎖C領域、又はその抗原部位のポリペプチドを、ラビットなどの哺乳動物に投与して作成することができる。例えば、配列番号: 1~5のいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは、配列番号: 1~5のいずれか1つのアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与して作成される。抗IgM抗体は、免疫グロブリン鎖C領域、又はその抗原部位のポリペプチドを、ラビットなどの哺乳動物に投与して作成することができる。例えば、配列番号: 6のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは、配列番号: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与して作成される。抗体を、色素、例えば、蛍光色素、放射性同位体、及び酵素などの任意の標識体で標識してもよい。

本発明の精神・神経疾患の検査用キットは、さらに、標識化された二次抗体を含むことができる。標識は、例えば、色素、例えば、蛍光色素、放射性同位体、及び酵素などの任意の標識体であることができる。

#### 【0040】

特定の実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーを検出することができる物質、例えば、抗体は、固相支持体上に固定されている。該固相支持体は、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエチレン樹脂、又はポリプロピレン樹脂などのプラスチック、或いはガラスなど任意の適切な材質から作成されてもよい。また、該固相支持体は、ディッシュ、ウエル、ストリップ又はチップなどの任意の形状の基板であってもよい。該基板の表面は、任意に被覆修飾されたものでよい。

#### 【0041】

また、本発明の精神・神経疾患の検査用キットは、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量を測定するための方法を示した指示書を含むことができる。

さらに、本発明の精神・神経疾患の検査用キットは、精神・神経疾患の検査方法に使用するための試薬 (例えば、緩衝液、ブロッキング用試薬、酵素基質、蛍光試薬) 及び/又は装置若しくは器具 (例えば、容器、反応装置、蛍光測定器) などを含むことができる。

#### 【0042】

本発明の精神・神経疾患の検査用キットは、好ましくは、統合失調症、自閉症、脳神経発達障害、妊娠中の感染症による神経障害に起因する認知機能障害、又は免疫障害に起因する精神障害の検査用キットである。最も好ましくは、統合失調症の検査用キットである。

本発明の精神・神経疾患の検査用キットは、精神・神経疾患の発症又は発症の可能性、発症後の予後予測を判定するのに用いることができる。判定の詳細については、下記「精神・神経疾患の検査方法」の項目に記載する。本発明の精神・神経疾患の検査用キットは、精神・神経疾患の診断のために用いることができる。本発明の精神・神経疾患の検査用キットは、下記に示す精神・神経疾患の検査方法に用いることができる。

## 【 0 0 4 3 】

## ( 4 . 精神・神経疾患の検査方法 )

本発明は、精神・神経疾患の検査方法を提供する。該検査方法は、対象の血液サンプル中における本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量を指標として用いる。本発明の検査方法は、精神・神経疾患の発症又は発症の可能性、発症後の予後予測を判定するのに有用である。また、本発明の検査方法は、精神・神経疾患の診断に用いることができる。本発明の検査方法により、精神・神経疾患の治療、予防、診断、鑑別、又は予後推定に必要なデータを取得することができる。また、本発明の検査方法は、精神・神経疾患の発症又は発症の可能性、発症後の予後予測を判定するのに有用な情報を提供することができる。さらに、本発明の検査方法により得られた結果から、対象の治療方法、又は治療計画を決定することができる。さらに、本発明の検査方法により、健康診断などでの精神・神経疾患の1次スクリーニングを行うことができる。また、精神科における初診患者において、精神・神経疾患のスクリーニングを行うこともできる。

10

本発明の精神・神経疾患の検査方法は、好ましくは、統合失調症、自閉症、脳神経発達障害、妊娠中の感染症による神経障害に起因する認知機能障害、又は免疫障害に起因する精神障害の検査方法である。最も好ましくは、統合失調症の検査方法である。

## 【 0 0 4 4 】

本発明の検査方法は、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量を測定する工程、及び測定された本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量を、正常な対象のものと比較する工程を含むことができる。本発明の検査方法は、( a ) 対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1種の量を測定する工程：及び( b ) 該量を、正常な対象のものと比較する工程を含むことができる。好ましくは、( a ) 対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片の量を測定する工程：及び( b ) 該量を、正常な対象のものと比較する工程を含むことができる。該比較する工程は、正常対照群の中央値と比較工程を含む。該量は、対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片の量を組み合わせた量、すなわち、足し合わせた量であることが好ましい。

20

## 【 0 0 4 5 】

他の実施態様において、本発明の検査方法は、( a ) 対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1種の量、及び炎症性サイトカインの量を測定する工程：及び( b ) 該量を、正常な対象のものと比較する工程を含むことができる。より好ましくは、( a ) 対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片の量、及び炎症性サイトカインの量を測定する工程：及び( b ) 該量を、正常な対象のものと比較する工程を含む。該比較する工程は、正常対照群の中央値と比較工程を含む。該量は、対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片、及び免疫グロブリン遊離鎖若しくはその断片の量を組み合わせた量、すなわち、足し合わせた量であることが好ましい。

30

精神・神経疾患、免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片、並びに炎症性サイトカインの詳細については、「本発明の精神・神経疾患バイオマーカー」の項目で説明したので省略する。

40

## 【 0 0 4 6 】

本発明の検査方法の工程( a )において、該測定は、検出及び定量を含む。該定量は、精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があることや、発症後の予後を判定することが可能な程度で足り得る。該定量は、半定量であってもよい。免疫グロブリン遊離鎖の測定は、免疫グロブリン遊離鎖C領域、及び/又はその抗原部位を検出又は定量することであってもよい。免疫グロブリン遊離鎖の測定は、免疫グロブリン遊離鎖C領域、及び/又はその抗原部位を検出することであってもよい。該測定は、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーをコードするmRNAの量を測定してもよい。

50

## 【 0 0 4 7 】

本発明の検査方法の工程(a)において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量の測定は、当業者に公知の一般的方法で行うことができる。例えば、一次元若しくは二次元電気泳動法、ウェスタンブロット法、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、サンドイッチELISA、免疫電気泳動法、一元放射免疫拡散法(SRID)、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、ラテックス免疫測定法(LIA)、又は蛍光免疫測定法(FIA)などがある。本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量の測定は、本発明の精神・神経疾患の検査用キットを用いて行うこともできる。また、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量の測定は、当業者に周知の装置(例えば、放射線測定器、光学的測定器、又は蛍光強度測定器など)及び画像解析ソフトなどを用いて行うことができる。本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量の測定は、1回又は複数回であってもよい。

10

## 【 0 0 4 8 】

本発明の検査方法の工程(a)において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量は、濃度(例えば、mg/l、 $\mu$ g/l、又はpg/mlなど)、放射線強度、又は蛍光強度などであることができる。本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量の単位は、測定方法に依存するであろう。ある実施態様において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量は、正常な対象におけるものに対する相対比であることができる。

## 【 0 0 4 9 】

血液サンプルは、血清、血漿、又は全血であってもよい。好ましくは、血液サンプルは血清である。血液サンプルの採取方法は、対象から注射器等を用いて採取するなど、一般的方法でよく、特に制限されない。対象から採取された血液サンプルは、当業者の公知の方法により変性、及び/又は保管することができる。

20

## 【 0 0 5 0 】

血液サンプルの測定前に、対象から採取した血液サンプルを、当業者に公知の試薬及び手段を用いて調製することができる。該試薬は、例えば、酢酸-酢酸塩、リン酸-リン酸塩、クエン酸-クエン酸塩、又はトリスヒドロキシメチルアミノメタン(トリス)などの緩衝剤、尿素及び/又はチオ尿素などの変性剤、ジチオスレイトール(DTT)などの還元剤、及びラウリル硫酸ナトリウム(SDS)などの界面活性剤などがある。該手段は、例えば、濾過、限外濾過、遠心分離、ホモジナイズ、インキュベーション、振盪、及び凍結乾燥などがある。

30

## 【 0 0 5 1 】

本発明の検査方法において、対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片を測定する場合、DTTによる変性(S-S結合の切断)は行わなくてもよい。また、尿素及び/又はチオ尿素も使用しなくてもよい。例えば、血液サンプルをSDSのみで変性させてもよい。これは、IgG、IgA、IgMなどに発現している免疫グロブリン鎖及び免疫グロブリン鎖を排除し、免疫グロブリン遊離鎖、免疫グロブリン遊離鎖、及びそれらの断片のみを効率的に測定するためである。

## 【 0 0 5 2 】

本発明の検査方法の工程(a)において、対象は、特に制限されない。好ましくは、対象は、ヒトである。例えば、該対象は、精神・神経疾患を発症している否かを判断する必要のある対象である。該対象は、DMSIV-TR及びICD-10、PANSSなどの従来の診断基準により、精神・神経疾患を発症していると判断された対象であってもよい。また、該対象は、DMSIV-TR及びICD-10、PANSSなどの従来の診断基準により、精神・神経疾患を発症していると判断されなかった対象であってもよい。さらに、該対象は、精神・神経疾患について何ら情報を有していない対象であってもよい。対象が癌及び/又は炎症性疾患を有しているか否かを予め確認しておいてもよい。

40

## 【 0 0 5 3 】

血液サンプルの調製において、血液サンプルを、約60、約70、約80、約90、約100、約110、又は約120で、約1分間、約2分間、約3分間、約4分間、約5分間、約6分間、約7分間、約8分間、約9分間、又は約10分間、インキュベートすることが好ましい

50

。最も好ましくは、約100 で約5分間、インキュベートしても良い。

【0054】

工程(b)において、正常な対象とは、精神・神経疾患を発症していない又は発症する可能性のない対象である。例えば、DMSIV-TR、ICD-10、及びPANSSなどの従来の診断基準により、精神・神経疾患を発症していないと判断された対象である。従来の工程(b)における比較する方法は、当業者に公知の方法であってよく、特に制限されない。例えば、工程(a)において得られた測定値と、予め測定しておいた正常な対象における本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの測定値を比較することができる。好ましくは、二次元電気泳動法又は酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)により得られた結果を比較する。本発明の精神・神経疾患バイオマーカーが複数である場合、それぞれにおいて測定された値を足し合わせて比較してもよい。正常な対象における本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの測定は、工程(a)において説明した前記測定方法と同じでよい。

10

【0055】

正常な対象において、大半は炎症性サイトカインが検出限界以下である。したがって、炎症性サイトカインに関して、正常な対象のものと比較するとは、単に、炎症性サイトカインが検出されたか否かであってもよい。炎症性サイトカインが検出されない場合、正常な対象のものと比較して変化がないと判断することができる。

【0056】

本発明の検査方法により、対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるか否かは、次のように判定することができる。対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖又はその断片の量が正常な対象と比較して増加、若しくは正常対照群の中央値より大きいとき、該対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるとして判定することができる。あるいは、対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖又はその断片の量が正常な対象と比較して増加しているとき、該対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるとして判定することができる。あるいは、対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖又はその断片、及び免疫グロブリン遊離鎖又はその断片の量が、正常な対象と比較して増加、若しくは正常対照群の中央値より大きいとき該対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるとして判定することができる。

20

【0057】

また、本発明の検査方法により、対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるか否かは、次のように判定することができる。対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖又はその断片の量が正常な対象と比較して増加、若しくは正常対照群の中央値より大きく、かつ炎症性サイトカインの量が正常な対象と比較して変化していない又は検出されないとき、該対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるとして判定することができる。あるいは、対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖又はその断片の量が正常な対象と比較して増加、若しくは正常対照群の中央値より大きく、かつ炎症性サイトカインの量が正常な対象と比較して変化していない又は検出されないとき、該対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるとして判定することができる。あるいは、対象の血液サンプル中の免疫グロブリン遊離鎖又はその断片及び免疫グロブリン遊離鎖又はその断片の量が正常な対象と比較して増加し、かつ炎症性サイトカインの量が正常な対象と比較して変化していない又は検出されないとき、該対象が精神・神経疾患を発症している又は発症の可能性があるとして判定することができる。

30

40

【0058】

増加しているとは、例えば、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約30倍、約50倍、約100倍又はそれ以上、増加していることであり得る。また、変化がないとは、工程(a)における対象と工程(b)における正常な対象において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの量が同じであるか、又は有意差がないことをいう。有意差がないとは、例えば、p値が0.05以下、又は約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約20%、又は約30%程度の差であることをいう。

50

中央値より大きいとは、例えば正常対照群における中央値よりも大きいことを意味する。正常対象群の中央値は、非特許文献 1 などに記載されている既知の中央値を用いても、実際に測定した正常対照群から算出した値でも良い。

#### 【実施例】

#### 【0059】

##### (5. 実施例)

以下に本発明の実施例を記載する。下記実施例は、本発明の特許請求の範囲に関する理解を深めるために記載しているものであり、本発明の特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。

#### 【0060】

10

##### (実施例 1)

妊娠15日目のウイスターラットの腹腔内に生理食塩水に溶解したPoly IC (ポリリボイノシン酸-ポリリボシチジル酸(polyriboinosinic-polyribocytidilic acid)) (Sigma社) を4mg/kgで投与し、正常分娩させ、統合失調症及び自閉症モデル動物である母体免疫活性化モデルラット (Maternal immune activation model rat: MIAラット) を作成した。MIAラットは、精神・神経疾患モデル動物の1種である (Limin Shi et al, J Neurosci. 2003 Jan 1;23(1):297-302、及びArata Oh-Nishi et al, Brain Research, Volume 1363, 6 December 2010, Pages 170-179参照)。また、コントロール群として、別の妊娠15日目のウイスターラットの腹腔内に生理食塩水のみを同量投与し、正常分娩させ、コントロールラット (以下、該ラットを「コントロール」ラット) を作成した。MIAラットは、コントロールラットに比べ、PPIが有意に減衰しており、該ラットが精神・神経疾患モデル動物として使用できることを確認した。

20

#### 【0061】

MIAラット (12週齢) 及びコントロールラット (12週齢) の血清を採取し、それぞれ、尿素・チオ尿素、DTT、及びSDSで変性させ、2次元電気泳動法によりタンパク質を分離した。電気泳動ゲルイメージを図2に示す。該イメージを、画像解析ソフト (Progenesis PG220; SHIMADZU社製) により解析した結果、スポット1115 (約25kDa) において、MIAラット (図中、「Poly IC」と記載) の方が、コントロールラット (図中、「Saline」と記載) に比べて有意に増加していることを見出した。該スポットを切り出し、LC MS/MS測定法によりタンパク質を同定したところ、免疫グロブリン 鎖C領域 (Ig -C) であることが分かった (図3)。

30

#### 【0062】

免疫グロブリン遊離 鎖は、約12kDaの定常領域 (免疫グロブリン 鎖C領域) と約12kDaの可変領域からなる。可変領域は、アミノ酸配列が頻繁に変化するため、質量分析計 (MS) では検出されない。有意差の見られたスポットは約25kDa付近で観察されたため、実際は、免疫グロブリン遊離 鎖であったものと考えられる。

#### 【0063】

##### (実施例 2)

ラット由来の免疫グロブリン 鎖C領域 (配列番号: 4) を抗原として用い、ラビットに投与して免疫し、抗体を作成した (抗Ig -C抗体)。実施例1と同じ方法により、MIAラット及びコントロールラットを作成した。MIAラット (12週齢、N=7) 及びコントロールラット (12週齢、N=7) の血清を、SDSのみで変性 (100、5分間) し、SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、タンパク質を分離した。その後、ウェスタンブロットした (ゲル10~20%、一次抗体 (1:1000)、二次抗体 (1:5000)) (図4)。一次抗体として抗Ig -C抗体を、二次抗体として、anti-rabbit IgG-HRP (ケミコン社製) を使用した。

40

#### 【0064】

約25kDaのバンドにおいて、MIAラット (図4中、「Poly IC」) は、コントロールラット (図4中、「Saline」) に比べて有意に増加していた (図4中、(2))。約25kDaのバンドは、S-S結合、水素結合の切断なしで検出されることから、免疫グロブリン遊離 鎖で

50

ある。この結果は、免疫グロブリン遊離鎖が、精神・神経疾患バイオマーカーとなることを明確に示している。

【0065】

(実施例3)

実施例2のMIAラット(表中「Poly IC」、12週齢、N=7)及びコントロールラット(表中「Saline」、12週齢、N=7)において、血清中の炎症性サイトカイン量を測定した。炎症性サイトカイン量の測定には、Quantikine ELASA Rat IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  (R&D社製)を使用した。

【表1】

10

表1. 血清中の炎症性サイトカイン濃度

	IL-6 (pg/ml)	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
Saline	N.D	N.D	N.D
Poly IC	N.D	N.D	N.D
	(N.D<250)	(N.D<96)	(N.D<25)

MIAラット(表中、「Poly IC」)及びコントロールラット(表中、「Saline」)共に、血清中の炎症性サイトカインの上昇は見られなかった。

20

【0066】

(実施例4)

統合失調症患者(SZ)群及び健常者(Normal)群において、本発明の精神・神経疾患バイオマーカーの有用性を試験した。

十分に倫理配慮されたIRB承認プロトコルに従い採集されたSZ群及びNormal群血清サンプルをPrecisionMed社(アメリカ)(輸入代行;和光純薬社)から購入した。

【0067】

血清中の免疫グロブリン遊離鎖、及び免疫グロブリン遊離鎖の量は、FREELITE チェーン(MBL社、コード番号:BS-LK016BD)、及びFREELITE チェーン(MBL社、コード番号:BS-LK018BD)を用いて、提供先の指示書に従い測定した。炎症性サイトカインはAlphaLASA Human IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  Kit (パーキンエルマー社製コード番号:AL223 C/F、AL220 C/F、AL208 C/F)により測定した。

30

【0068】

統合失調症患者(SZ)群及び正常(Normal)群の基礎データ及び平均値をまとめたデータを、下記表2及び3に示す(精神病理スコア;PANSSスコア)。

【表 2】

表 2. 統合失調症患者 (SZ) 及び正常 (Normal) 群の基礎データ

ID(#)	人種	年齢	発症 年齢	陽性 症状	陰性 症状	一般精神 病理	IL-6(pg/ml)	IL-1 ベータ (pg/ml)	TNF- アルファ (pg/ml)	
SZ										
10226006	コーカシアン	36	21	19	16	34	ND	ND	ND	10
10226007	コーカシアン	35	16	18	16	36	ND	ND	ND	
10226029	コーカシアン	36	16	17	22	45	ND	ND	ND	
10226046	コーカシアン	51	20	20	19	41	ND	ND	ND	
10226066	コーカシアン	61	26	8	15	25	ND	ND	ND	
10226067	コーカシアン	41	27	24	20	44	ND	ND	ND	
10226016	コーカシアン	45	45	26	24	53	ND	ND	ND	
10226047	コーカシアン	58	23	17	14	33	ND	ND	ND	
10226063	コーカシアン	41	20	23	12	44	ND	ND	ND	
10226084	コーカシアン	36	17	15	12	27	ND	ND	ND	
10226089	コーカシアン	38	18	18	19	39	ND	ND	ND	
Normal										
7516	コーカシアン	25	-	-	-	-	ND	ND	ND	20
7520	コーカシアン	55	-	-	-	-	ND	ND	ND	
7538	コーカシアン	44	-	-	-	-	ND	ND	ND	
7543	コーカシアン	62	-	-	-	-	ND	ND	ND	
7551	コーカシアン	49	-	-	-	-	ND	ND	ND	
7522	ヒスパニック	39	-	-	-	-	ND	ND	ND	
7552	ヒスパニック	40	-	-	-	-	ND	ND	ND	
							(ND<10)	(ND<3)	(ND<10)	

【表 3】

表 3. 基礎データまとめ

	Normal (N=7)	SZ (N=11)
年齢	44.8±4.8	43.45±2.79
発症年齢		22.6±2.7
陽性症状スコア		18.6±1.4
陰性症状スコア		17.1±1.1
一般精神病理スコア		38.2±2.5

平均±S.E.M

年齢に統計的有意差は無く、SZ群及びNormal群のいずれにおいても、炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1ベータ、及びTNF-アルファ) は、検出されなかった。

【 0 0 6 9 】

図 5 及び表 4 に、統合失調症患者 (SZ) 群及び正常 (Normal) 群の血清中の免疫グロブリン遊離鎖 (図 5 中、A) 及び免疫グロブリン遊離鎖 (図 5 中、B) の濃度を比較した結果を示す。統合失調症患者 (SZ) において、免疫グロブリン遊離鎖、及び免疫グロブリン遊離鎖の濃度は有意に増加していた (それぞれ、 $P=0.0012$ 、及び $P=0.04$ )。この結果は、免疫グロブリン遊離鎖、及び免疫グロブリン遊離鎖が、それぞれ、単独で、精神・神経疾患バイオマーカーとなることを明確に示している。また、統合失調症患者 (SZ) 群及び正常 (Normal) 群について、免疫グロブリン遊離鎖 + 免疫グロブリン遊離鎖



の濃度を比較した結果（図 5 中、C）は、更に有意差が見られた（ $P=0.00063$ ）。この結果は、精神・神経疾患の判断には、免疫グロブリン遊離鎖と免疫グロブリン遊離鎖とを組み合わせる判断することが特に有用であることを示している。

【表 4】

表 4. 統合失調症患者血清中のFree Ig $\kappa$  及び $\lambda$  濃度

	Normal	SZ
Free Ig $\kappa$ (mg/l)	7.89 $\pm$ 0.46 (N=6)	14.09 $\pm$ 1.41** (N=11)
Free Ig $\lambda$ (mg/l)	10.89 $\pm$ 0.94 (N=7)	14.04 $\pm$ 0.99* (N=11)
Free Ig $\kappa$ + Free Ig $\lambda$ (mg/l)	17.79 $\pm$ 1.16 (N=6)	28.14 $\pm$ 2.07*** (N=11)

(平均 $\pm$ S.E.M)

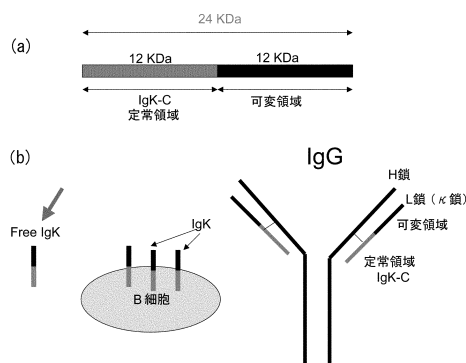
更に、非特許文献 1 に記載されている 40～49 歳の健常者血清中のfree Ig 濃度の中央値7.5mg/lと比較してSZ群では11人全員がこの中央値より高い値を示した（最小；9.1mg/l 最大23.8mg/l）。一方、40～49歳の健常者血清中のfree Ig 濃度の中央値は12.8mg/lであり、SZ群では11人中8人がこの中央値より高い値を示した（最小；9.05mg/l 最大；20.8mg/l）。

【産業上の利用可能性】

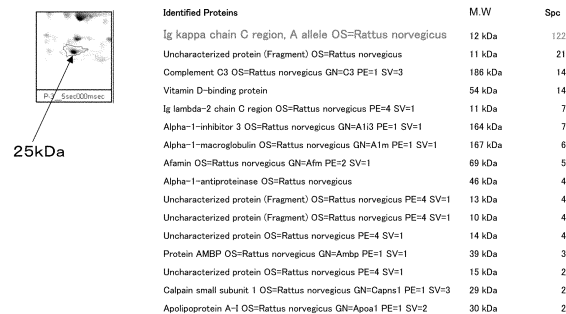
【0070】

血液サンプル中の本発明のバイオマーカーを測定することにより、健康診断などでの精神・神経疾患の1次スクリーニングを行うことができる。また、精神科における初診患者において、精神・神経疾患のスクリーニングを行うこともできる。

【図 1】

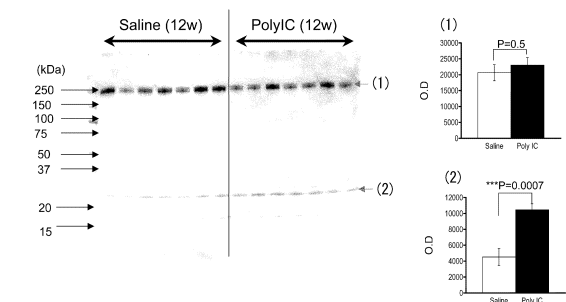
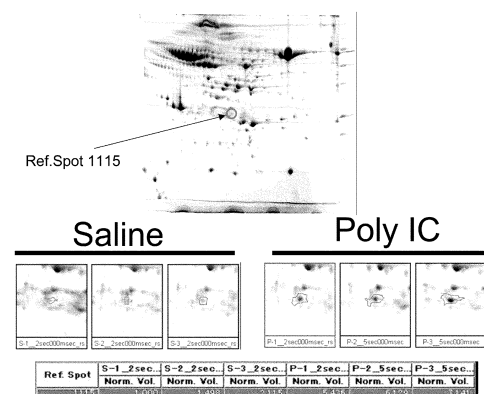


【図 3】

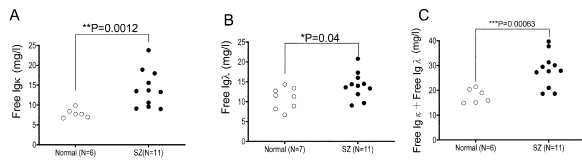


【図 4】

【図 2】



【図 5】



【配列表】

0006205175000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 須原 哲也

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 国際公開第2007/094472(WO, A1)

米国特許出願公開第2012/0251553(US, A1)

国際公開第2011/144934(WO, A1)

米国特許出願公開第2012/0238936(US, A1)

O.C. Fagnart et al., Free kappa and lambda light chain levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases, Journal of Neuroimmunology, 1988年 8月, Volume 19, Issues 1-2, 119-132

I.V.L. Narasimha Rao et al., SERUM IMMUNOGLOBULINS AND SCHIZOPHRENIA, Indian J Psychiatry, 1985年, 27(4), 325-328

Popovic M et al., Light chain deposition disease restricted to the brain: The first case report, Hum Pathol., 2007年 1月, 38(1), 179-184

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)