世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 G01N 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/18560 (43) 国際公開日 1994年8月18日(18.08.94)

(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00196
(22) 国際出願日 1994年2月10日(10. 02. 94)

(30) 優先権データ
特願平5/46133 1993年2月12日(12. 02. 93) JP

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
帝人株式会社(TEIJIN LIMITED)〔JP/JP〕
〒541 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
細田健治(HOSODA, Kenji)〔JP/JP〕
〒193 東京都八王子市千人町4-7-26-306 Tokyo, (JP)
江口広志(EGUCHI, Hiroshi)〔JP/JP〕
〒192-03 東京都八王子市堀之内2169-1-305 Tokyo, (JP)
中本忠克(NAKAMOTO, Tadakatsu)〔JP/JP〕
〒191 東京都日野市多摩平3-18-4-115 Tokyo, (JP)
小林慎治(KOBAYASHI, Shinji)〔JP/JP〕
〒191 東京都日野市多摩平5-20-2-208 Tokyo, (JP)
窪田貴明(KUBOTA, Takaharu)〔JP/JP〕
〒191 東京都日野市平山6-24-18 Tokyo, (JP)
森 啓(MORI, Hiroshi)〔JP/JP〕
〒185 東京都国分寺市東元町2-3-24 Tokyo, (JP)

(74) 代理人
弁理士 大島正孝(OHSHIMA, Masataka)
〒160 東京都新宿区四谷四丁目3番地 福屋ビル
大島特許事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AU, CA, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: METHOD OF ASSAYING HUMAN TAU PROTEIN, KIT THEREFOR, AND DIAGNOSTIC METHOD

(54) 発明の名称 ヒトタウ蛋白の測定方法、そのためのキットおよび診断方法

(57) Abstract

A method of immunoassaying a human tau protein present in a human cerebrospinal fluid by using an antibody immobilized on an insoluble support and a labeled antibody, each antibody having a recognition site in the amino acid sequence region ranging from the 251st to the 441st amino acid residues of a human tau protein; and an immunoassay kit therefor. These method and kit enable the concentration of a human tau protein of a normal man and that of a patient with central nerve cytopathy to be determined discriminatively at high sensitivity. Hence the assay results can be utilized for the test, study or diagnosis of patients with central nerve cytopathy.

(57) 要約

本発明はヒト脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法において、該方法は不溶性担体固定化抗体および標識化抗体を使用し且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第２５１番目～第４４１番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とする方法およびそのための免疫学的測定キットである。

本発明の方法およびキットは、ヒト脳脊髄液の少ない量を使用して、健常人と中枢神経細胞障害を患っているヒトとのヒトタウ蛋白の濃度を区別して感度よく測定できる。従って、その測定結果は、中枢神経細胞障害を患っている人の検査、研究或いは診断に役立てることができる。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CS チェッコスロヴァキア
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GE グルジア
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリー
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドバ
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア共和国
SN セネガル
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
US 米国
UZ ウズベキスタン共和国
VN ヴィエトナム

明 細 書

ヒトタウ蛋白の測定方法、そのためのキットおよび診断方法

[産業上の利用分野]

本発明はヒト脳脊髄液中のタウ蛋白の測定方法、そのためのキットおよびそれに関連する利用に関するものである。さらに詳しくはヒト脳脊髄液中のタウ蛋白を、中枢神経細胞障害を患っている人とそうでない健常人とを区別して正確に測定しうる免疫学的方法、そのためのキットおよびそれに関連する利用に関するものである。

[従来の技術]

タウ蛋白は、神経原繊維（ＰＨＦ：paired helical filament）の構成成分であり、その神経原繊維の変化は神経細胞を死に導くので、アルツハイマー病の診断に有用である可能性が知られているが、その測定は、主に免疫組織学的に剖検サンプルで検討されてきた。しかし、アルツハイマー病の診断マーカーとするには、生体内の体液中の存在量を知ることが効果的である。またその測定のためには抗体を用いることが考えられる。

タウ蛋白の測定に抗体を用いる方法として、例えば、脳脊髄液を硫安により処理し、粗生成した分画中のタウ蛋白を抗体を用いてウエスタンブロッティングしてその存在を確認する方法が提案されている [Peter Davis et al., Annals of Neurology Vol.22,(4),P.521(1987)]。しかし、この提案において用いられている抗体（Ａ１ｚ－５０）は、燐酸化された異常なタウ蛋白（Ａ－６８）を含むアルツハイマー病患者の脳ホモジネート粗画分を免疫原として得られた抗体であり、またこれを用いる検出法はウエスタンブロッティングを用いる複雑な方法である。

また、C. R. Harrington らは、J. Immunol. Methods ,134(1990) p.261～271において、タウ蛋白に対する２種の抗体を得たことを報

告している。しかし、かれらの採取した２種の抗体（ｍＡｂ４２３、７／５１）のうち、前者は通常のタウ蛋白を認識せず、後者はギ酸で抽出したタウ蛋白のみを認識し、両者とも生体内の体液中に存在する、天然型のタウ蛋白を認識しないものであり、その測定には用いることができない。

米国特許第５，１３４，０６２号明細書には、ヒトから生きた繊維芽細胞を取り出し、その細胞を培地中で培養し、その細胞からのアルツハイマー病の代謝産物の指標物質を免疫学的に検出することによるアルツハイマー病を鑑別（screening）する方法が記載されている。この米国特許には、繊維芽細胞として皮膚細胞が示され、アルツハイマー病の代謝産物の指標物質としてＰＨＦ（paired helical filament）およびタウ蛋白が示されている。この方法は皮膚細胞を取り出し、培養する必要があり、指標物質の所定量を得るまでに煩雑な手段と長い時間を必要とする。その上前記米国特許には、ＰＨＦ又はタウ蛋白がどの程度の量検出されたのか示す具体例は全く記載されていない。

さらにカナダ特許第１，３０２，２５０号明細書には、脳脊髄液中のＰＨＦまたは異常リン酸化タウ蛋白を測定しアルツハイマー病の治療に役立てる方法が記載されている。この方法はＰＨＦと反応するモノクローナル抗体が使用される。

［発明が解決しようとする課題］

本発明の第１の目的は、生体からの体液、特に脳脊髄液中に存在する可溶性のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法およびそのためのキットを提供することにある。

本発明の第２の目的は、脳脊髄液中の可溶性のヒトタウ蛋白を早期に且つ簡単に測定しうる方法およびそのためのキットを提供することにある。

本発明の第３の目的は、中枢神経細胞障害を患っている人の脳脊

髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を、健常人のそれと区別して、正確に測定しうる免疫学的方法およびそのためのキットを提供することにある。

本発明の他の目的は、脳脊髄液の少ない量を使用してその中の可溶性ヒトタウ蛋白を正確に測定しうる免疫学的方法を提供することにある。

[課題を解決するための手段]

本発明者らの研究によれば、前記本発明の目的は、ヒト脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法において、該方法は不溶性担体固定化抗体および標識化抗体を使用し且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第２５１番目～第４４１番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とする方法によって達成されることが見出された。

さらに本発明者らの研究によれば、前記本発明の目的は、

（ａ－１）不溶性担体に固定化されたヒトタウ蛋白に対する抗体、

（ａ－２）標識物質により標識化したヒトタウ蛋白に対する抗体、

（ｂ）溶解剤

（ｃ）洗浄剤および

（ｄ）標識物質が酵素である場合には、酵素活性を測定するための基質および反応停止剤

を組合せたヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の免疫学的測定キットであって、前記（ａ－１）および（ａ－２）の抗体は、いずれもヒトタウ蛋白の第２５１番目～第４４１番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とするキットによって達成されることが見出された。

さらに本発明者らの研究によれば、前記本発明の目的は

(i) ヒトからヒト脳脊髄液を準備し、

(ii) 不溶性担体固定化抗体および標識化担体であり且ついずれの

抗体もヒトタウ蛋白の第２５１番目～第４４１番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有している抗体を準備し、

(iii) 前記(i)のヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を前記(ii)の２種の抗体を使用して免疫学的に測定し、

(iv) その測定した値より、ヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の量を決定し、そして

(v) その量よりそのヒトの中枢神経細胞障害の病症を診断する、

ことを特徴とするヒトの中枢神経細胞障害の病症の診断方法によって達成されることが見出された。

前記本発明の測定方法およびそのためのキットは、固定化抗体および標識化抗体のいずれの抗体も、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列において第２５１番目（Pro.）から第４４１番目（Leu.）までの領域に認識部位を有する抗体を使用する点に特徴を有している。このような抗体の組合せによって、脳脊髄液を何等の処理を要することなく、そのままでその中に含有される可溶性のヒトタウ蛋白を高い感度で測定でき、その測定結果は、中枢神経細胞障害を患っている人と健常人とでは明らかに異なっている。すなわち本発明の免疫学的測定方法に従えば中枢神経細胞障害を患っている人からの脳脊髄液中のヒトタウ蛋白の量は、健常人のそれよりも明確に高い濃度で検出される。

従って本発明の測定結果は中枢神経細胞に障害を有する人或いはその疑いを有する人の臨床、或いは病理的観点からの検査、研究または診断に役立てることができる。

中枢神経細胞障害とは、中枢神経細胞に何らかの障害によって引き起される病気または症状であり、例えば脳血管障害、アルツハイマー病および一酸化炭素中毒などによって起る病気或いは病症を云う。特に本発明はアルツハイマー病またはその疑いのある人の検査、研究または診断に利用されることが期待できる。前記した中枢神経細胞の障害に基づく病症は、いずれも脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ

蛋白の濃度が健常人のそれと比べて高い値を示す。

本発明において、固定化抗体および標識化抗体の２つの抗体が、いずれもヒトタウ蛋白の４４１個のアミノ酸配列において、第２５１番目から第４４１番目の領域である中間部からＣ末端のアミノ酸配列領域に認識部位を有するものであり、それによって何故高感度で可溶性のヒトタウ蛋白が測定できるかはわからない。

本発明者らは、ヒトタウ蛋白を特異的に認識するいくつかのモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作成し、それらを使用して脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の免疫学的測定を試みた。例えば、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の前記中間部よりもＮ末端側の領域に認識部位を有するいくつかのモノクローナル抗体を得た。そのいくつかのモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組合せて免疫学的測定を行った。このような抗体の組合せでは検量線を作成することは出来たが、実際に脳脊髄液を検査試料として測定すると感度が不充分で安定した測定結果を得ることができず、検査、研究或いは診断に利用できるものは見出せなかった。

しかし本発明のように、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の前記中間部よりもＣ末端側に認識部位を有する抗体を固定化抗体および標識化抗体の両抗体共、使用する場合には、安定して且つ高感度に可溶性ヒトタウ蛋白を測定できた。

本発明で使用される抗体は、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の第２５１番目～第４４１番目の領域にその認識部位を有する限り、モノクローナル抗体であっても或いはポリクローナル抗体であってもよい。またその組合はいずれでよいが、固定化抗体および標識化抗体共にポリクローナル抗体の使用が好ましい。

本発明の抗体は、前記したようにポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体の場合には、アジュバンドとしてFreund Complete Adjuvantまたは、Ａｌ（ＯＨ）$_3$（アラム）などを用い、精製したヒトタウ蛋白を公知の方

法で動物に免疫することにより、その抗血清として得ることができる。

一方、モノクローナル抗体の場合には、ケラーとミルシュタインによる細胞融合法 [G. Koeller and Milstein, Nature (Londa), 256, 495-497 (1975)] により作成されたハイブリドーマを培養し、その培養液からヒトタウ蛋白と反応する抗体を分離することにより調製される。細胞融合に用いられる細胞としてはＰ３Ｕ１などを挙げることができる。

抗体の作成にあたり、免疫原として用いるヒトタウ蛋白としては、ヒトの脳から精製された、ｐＨ６．５～８．５（中性）のＴｒｉｓ ｓａｌｉｎｅに溶解するものが好ましい。このようにして得られたヒトタウ蛋白を免疫して得られる抗体のうち、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の［２５１－４４１］の蛋白を認識するものを選び出して使用する。

本発明の抗体を用いて、免疫学的測定法により、脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を修飾することなくそのまま、特異的かつ感度よく測定することができる。免疫学的定量法としては、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、放射免疫定量法（ＲＩＡ）、蛍光免疫定量法などを挙げることができ、ＥＩＡとしては、例えば「酸素免疫測定法」（第２版、石川栄治他著、医学書院１９８２）などに記載されているそれ自体公知の方法を用いることができる。ＥＩＡとしては、サンドイッチ法および競合法と称される方法のいずれでもよい。

サンドイッチ法によるＥＩＡにおいては、本発明のヒトタウ蛋白に対する抗体を用い、例えば次のような手順に従い定量する。すなわち、２つの抗体のうちの一方の抗体（第１抗体）を適当な不溶性担体（例えばプラスチック容器）に固定化する（以下これを“固定化抗体”という）。次いで不溶性担体と測定しようとする試薬または検体試料との非特異的結合を避けるために適当な物質（例えば牛血清アルブミン）で不溶性担体の表面を被覆する。このようにして

得られた第１抗体が固定化された不溶性担体を検体試料と一定時間および温度で接触させ反応させる。この間に固定化抗体（第１抗体）と検体試料中のヒトタウ蛋白が結合する。次いで不溶性担体を適当な洗浄液で洗った後、適当な標識物質（例えば酵素）で標識したヒトタウ蛋白に対する他方の抗体（第２抗体）の溶液（例えば水溶液）と一定時間および温度で接触させ、固定化抗体に結合したヒトタウ蛋白と第２抗体を反応させる。これを適当な洗浄液で洗い、次いで不溶性担体上の固定化抗体とタウ蛋白を介して結合して存在する第２抗体に標識された標識物質の量を測定する。

なお上記サンドイッチ法は、固定化抗体、標識化抗体およびタウ蛋白を含有する検体試料を同時に混合し、一定時間および温度でこれら三者を同時に接触させ反応させて行うこともできる。

かくしてその値から検査試料中のタウ蛋白の量を算出することができる。通常、サンドイッチ法では、第１抗体と第２抗体とが双方ともモノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよいし、また一方をモノクローナル抗体とし、他方をポリクローナル抗体として用いることもできる。しかし前述したように第１抗体および第２抗体が共にポリクローナル抗体であるのが感度の点で好ましい。

競合法としては、例えば担体に固定した抗原と測定すべき抗原とに対し、一定量の標識化抗体を競争的に反応させて担体固定化抗原・標識化抗体複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、担体に結合した標識化抗体の標識物質の量を測定する方法や、担体に抗体を固定し、標識化抗原と測定すべき抗原とを競争的に反応させて担体固定化抗体・標識化抗原複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、担体に結合した標識化抗原の標識物質の量を測定する方法を挙げることができる。

前記サンドイッチ法および競合法のそれぞれにおいて、抗体は完全抗体であってもよく、また抗体をペプシンで消化して得られたＦ（ａｂ'）$_2$、Ｆ（ａｂ'）$_2$を還元して得られたＦａｂ'または抗体を

パパインで消化して得られたＦａｂなどの、抗原に結合しうる抗体フラグメントを抗体として、また、これらを標識して標識抗体として使用することができる。

本発明のヒトタウ蛋白の測定方法において使用される不溶性担体としては、通常免疫学的測定に使用されるものであればよく、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、弗素樹脂、架橋デキストラン、アガロース、ポリサッカライドなどの高分子の他、紙、ガラス、金属およびこれらの組合せなどを例示することができる。不溶性担体の形状は、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管などの種々の形状であることができる。

また、標識化抗体の標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質および放射性物質等を使用することができる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼなどを、蛍光物質としてはフルオレッセインイソチオシアネート、フイコビリプロテインなどを、発光物質としてはイソルシノール、ルシゲニンなどを、そして放射性物質としては^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{14}Ｃ、^{3}Ｈなどを使用することができるが、これらは例示したものに限らず、免疫学的測定法に使用し得るものであれば、他のものでもよい。

標識剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質および必要により発色剤が用いられる。これらの例としては、例えば、酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素を用い、発色剤として２，２'－アジノジー（３－エチルベンズチアゾリンスルホン酸）アンモニウム塩（ＡＢＴＳ）、５－アミノサリチル酸、ｏ－フェニレンジアミン、４－アミノアンチピリンまたは３，３'，５，５'－テトラメチルベンジジンなどを、酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、基質としてｏ－ニトロフェニルフォスフェートなどを、酵素としてβ－Ｄ－ガラクトシダ

ーゼを用いる場合には基質としてフルオレセインージー（β－Dーガラクトピラノシド）または4－メチルウンベリフェリルーβ－Dーガラクとピラノシドなどを組み合わせて用いられる。

本発明の測定キットにおいて（b）溶解剤としては、免疫学的測定に通常使用されるものであればよく、例えばリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液などを含んだｐＨが６．０～８．０の範囲のものが好適な例として示される。さらに（ｃ）洗浄剤としては、同様に免疫学的測定に一般的に使用されているものがそのまま使用される。その例としては、生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液及びこれらの混合液が挙げられる。これら洗浄剤にはさらにトリトンＸ１００、Ｔｗｅｅｎ２０またはＢｒｉｇ３５の如き非イオン系界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウムの如きイオン系界面活性剤を加えられていてもよい。

［実施例］

以下、実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例１（抗ヒトタウ蛋白抗体の取得）

（１）ヒトタウ蛋白の精製

凍結したヒト脳を４倍容のＴＳ Buffer（２０ｍＭトリス、１５０ｍＭ ＮａＣℓ；ｐＨ７．６）に溶解した。溶解液を遠心（１０Ｋ ｒ．ｐ．ｍ×５０分間）し、上清を硫安を用いて分画した（３３～５０％硫安）。得られた沈澱をＴＢＳ Buffer（５０ｍＭトリス、５００ｍＭ ＮａＣｌ；ｐＨ７．６；脳重量の１／６容）に溶解し、均一にホモジナイズして、１０分間煮沸処理を行った。次いで遠心（１０ｋｒ．ｐ．ｍ×１０分間）し、上清をSephadex G-25を用いて分画した（平衡液０．１Ｍ ＭＥＳ：ｐＨ６．５）。次いでホスホセルロースを用いて食塩濃度の変化により溶出させ、再度飽和硫安を使用して濃

縮した。得られた沈澱をＴＳ Buffer １ｍℓに懸濁し、溶解させて、ミリポアフィルターＨＶ（０．４５μｍ）にて濾過して次いでＨＰＬＣをかけた（カラム；Ｊ．Ｔ．Bakerbond Ｃ４ ４．６×２５０ｍ／ｍ）。溶出した２番目のピークを採取した。これが精製ヒトタウ蛋白である。

（２）ヒトタウ蛋白に対する抗体の作成

前記（１）にて精製したヒトタウ蛋白を、Freundのcomplete adjuvantとまぜＷ／Ｏ／Ｗエマルジョンを作成した。家兎を３回、２月おきに免疫を行った。３回免疫後、７日後に全採血を行った。次いで０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）で平衡化したプロテインＡ－セファロースカラムに抗血清を流し、洗浄後ｐＨ３．０の０．１Ｍクエン酸Ｎａを流し、カラムから抗ヒトタウ蛋白抗体（ＩｇＧ）を溶出し、精製抗体（ＩｇＧ）を得た。

実施例２（抗ヒトタウ蛋白抗体の認識部位の決定）

ヒトとウシのタウ蛋白は、高度に類似した一次構造を有し、検疫反応上の交叉反応性も認められることが知られている。そこで、大量調製の容易なウシタウ蛋白を用いて、以下のように、実施例１で得られた抗ヒトタウ蛋白抗体の認識部位を決定した。

すなわち、ウシタウ蛋白をギ酸の存在下、ＣＮＢｒ（Baker bond C4、カラム）により切断した。この反応物を逆相ＨＰＬＣを用いて分離して（４０分にてアセトニトリル０→８０％のｇｒａｄｉｅｎｔ、流速１ｍℓ／分）、８０のフラクションを得た。図１に逆相ＨＰＬＣのパターンを示す。

得られた各フラクション（１～８０）の一部をポリスチレン製のマイクロプレートに加え、風乾させて固定した。風乾後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳでアフターコートし、実施例１で得られた精製抗体（ＩｇＧ）を希釈して加え、１時間反応させた。次いで、ここに、抗ウサギＩｇＧ抗体のＦ（ａｂ'）$_2$－ＨＲＰ標識を加え、１時間反応後、

発色基質（ＡＢＴＳ）を加え、実施例１で得られた精製抗体（ＩｇＧ）がどのフラクションと反応するか調べた。

その結果、フラクションＮｏ.３４とＮｏ.４４に高い反応性が示された。すなわち、これらのフラクションに含まれているペプチドが、実施例１において得られた抗ヒトタウ蛋白抗体と特異的に結合することが明らかとなった。フラクションＮｏ.３４ピークのＮ末端は、Ｐｒｏ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓであり、Ｎｏ.４４ピークのＮ末端もＰｒｏ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓであることが判明した。

ウシタウ蛋白のアミノ酸配列（Himmler et al.,MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY,Apr.1989,p.1381-1388）より、ＣＮＢｒによりメチオニン（Ｍｅｔ）のＣ末端が切断されることを考慮すると、Ｎｏ.３４ピークは［２５８－Ｃ末］、Ｎｏ.４４ピークは［２５８－４２６］と推定される。対応するヒトの蛋白のアミノ酸配列（配列表参照 Goedert et al.,1989, Neuron, 3, 519-526）は、［２５１－４４１］と言える。従って、本抗体の認識するヒトタウ蛋白のエピトープは、そのアミノ酸配列の［２５１－４４１］ということができる。

実施例３（抗ヒトタウ蛋白抗体を用いたサンドイッチ法ＥＩＡによるヒトタウ蛋白の測定）

（１）抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ（直径６ｍｍ）をよく洗浄してから、実施例１で得た抗体の２０μｇ／ｍℓの濃度を有するＰＢＳ溶液中に４℃の温度で１昼夜放置した後、ＰＢＳで洗浄し、１％牛血清アルブミン（ＢＳＡ）のＰＢＳ溶液中に、４℃の温度で１昼夜放置してポストコーティング処理して、抗ヒトタウ蛋白抗体固定化ビーズを得た。

（２）ＨＲＰ標識化抗体の調製

実施例１で採取した抗ヒトタウ蛋白抗体の２.０ｍｇ／ｍℓのＰＢ

S溶液1mℓに、1Mの酢酸緩衝液（pH4.2）100μℓと、40μgのペプシンを20μℓの同緩衝液に溶解して加え、37℃、4時間反応させた。反応終了後、PBSにて平衡化したセファデックスG25カラム（φ2cm×45cm）を用いて分離し、F（ab'）$_2$を採取した。F（ab'）$_2$の1mg／mℓ 0.01Mリン酸0.15M NaCl（pH7.4）溶液2mℓに、MBS 10mg／mℓの濃度のジメチルホルムアミド溶液50μℓを添加し、25℃の温度で30分間反応させた。次いでセファデックスG－25を充填したカムラを用い、0.1Mリン酸緩衝液（0.1M PB）（pH6.0）でゲル濾過を行い、マレイミド化抗体と未反応MBSとを分離した。

一方、HRPの10mg／mℓの0.1M PB（pH6.5）溶液2mℓにS－アセチルメルカプト無水コハク酸の60mg／mℓジメチルホルムアミド溶液120μℓを加え、25℃で2時間反応させた。次に0.1Mトリス－塩酸緩衝液（pH7.0）を800μℓ、0.1M EDTA160μℓ、1Mヒドロキシルアミン 1.6mℓを加え、37℃で4分間反応させた。その後、反応液をコロジオンバッグに入れ、0.1M PB（pH6.0）、5mM EDTA含有溶液を用いて、4℃で3日間透析し、チオール化HRPを得た。

次に、マレイミド化抗体2mgとチオール化HRP 4mgとを混合し、コロジオンバッグを用いて氷冷下に4～10mg／mℓの蛋白濃度になるまで濃縮し、15～20℃で一夜放置した。その液を、ウルトロゲルAcA44（LKB社）を充填したカラムでゲル濾過し、HRP標識化抗ヒトタウ蛋白抗体を得た。

（3）サンドイッチEIA測定系

（1）で調製した抗タウ蛋白抗体固定化ビーズ1個と、精製したヒトタウ蛋白（標準物質）を0～20ng／mℓの範囲で含有する1%BSA含有0.05M TBS（pH8.0）200μℓと、（2）で作成したHRP標識ヒトタウ蛋白抗体の1%BSA含有0.05M

ＴＢＳ（ｐＨ８．０）溶液２００μℓとを、各試験管に添加して、２５℃の温度で２時間インキュベートした。次に試験管内の溶液を吸引除去した後、０．０５Ｍ ＴＢＳ（ｐＨ８．０）で洗浄してから、３，３'，５，５'－テトラメチルベンジジン塩酸塩０．０２％及びH_2O_2 ２．５ｍＭを含有する０．１Ｍリン酸／クエン酸緩衝液（ｐＨ４．３）を０．４ｍℓずつ各試験管に加え、２５℃の温度で３０分間反応させた後、反応停止剤として１Ｎ硫酸水溶液を１ｍℓずつ加えて酵素反応を停止させた。

次いで、分光光度計を用いてこの溶液の４５０ｎｍの波長における吸収強度を測定した。これを標準物質濃度０～２０ｎｇ／ｍℓに対応してプロットして検量線を得た。この検量線を図２に示す。図２より、本発明の測定方法を用いれば、０．０５ｎｇ／ｍℓまで精度よく測定可能であることがわかる。

実施例４（患者脳脊髄液中のタウ蛋白の測定）

実施例３の手法および実施例３で得た検量線を用いて、アルツハイマー病患者９名の脳脊髄液中のタウ蛋白の濃度を測定した。コントロールとして健常人１４名の脳脊髄液を測定した。結果を図３に示す。図３のとおり、アルツハイマー病患者脳脊髄液中のタウ蛋白レベルの有意の高値が見られる。（Ｐ＜０．００１）

この図３より０．５ｎｇ／ｍℓ以上のヒトタウ蛋白濃度の場合アルツハイマー病と診断しうる可能性を有している。

実施例５（脳血管障害および一酸化炭素中毒の患者のタウ蛋白の測定）

実施例３の手法および実施例３で得た検量線を用いて脳血管障害患者および一酸化炭素中毒患者の脳脊髄液中のタウ蛋白の濃度を測定した。その結果を図４に示した。一酸化炭素中毒患者は神経細胞が破壊されることが知られており、その患者の脳脊髄液中のタウ蛋

白の濃度の上昇は、神経細胞の破壊の結果を示しているものと考えられる。このことから推論すると、脳血管障害患者もその神経細胞の破壊が一部出現したものと考えられる。

参考例１（ヒトタウ蛋白に対するモノクローナル抗体の作成と認識部位の決定）

ケラーとミルスタイン（Koeller & Milstein）の方法に従って、ヒトタウ蛋白に対するモノクローナル抗体を作成した。すなわち、ヒトタウ蛋白を５０ｎｇ／ｈｅａｄ、フロイントcomplete adjvantと混合し、マウスに免疫した。４回免疫後、３日後に fusion を行った。ハイブリドーマの出現を確認して後、固相タウ蛋白（２μｇ／ｍℓにて固定）を用いて抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。

その結果、固相タウ蛋白に反応性が positive な８クローンを得た。これら確立した８クローンの認識部位を決定するため、これら８クローンの上清を用いて、ヒトタウ蛋白とウシタウ蛋白との反応性の違いを検討した。その結果、これら８クローンは全てヒトタウ蛋白のみに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するクローンであった。このことを検討するため、ヒトタウ蛋白とウシタウ蛋白の一次構造を比較した。ヒトタウ蛋白とウシタウ蛋白とは、ヒトタウ蛋白の１番目から２４８番目のアミノ酸配列領域において異なる部分が存在し、他の領域は全く同じ一次構造を有していることがわかった。このことから、前記８クローンが産生する抗体の認識部位は、全て１番目から２４８番目の領域に存在することは明らかである。

参考例２（モノクローナル抗体および実施例１で得られたポリクローナル抗体を使用したＥＩＡ測定系）

参考例１において確立した８クローンを培養し、上清からモノク

ローナル抗体を精製した。８種のモノクローナル抗体の全てを、それぞれ１０μｇ／ｍℓの溶液とし、各々の溶液にポリスチレンボールを浸漬し、モノクローナル抗体を固定化した。各々の固定化モノクローナル抗体と実施例３のＨＲＰ標識抗ヒトタウ蛋白抗体とを用いたサンドイッチ測定系を構築した。前記８種のモノクローナル抗体のうち２種のみが良好な検量線を得ることができた。この２種のモノクローナル抗体とＨＲＰ標識抗ヒトタウ蛋白抗体とのサンドイッチ測定系をＭＣＡ（Ｆ－$Ｆ_{11}$）－ＰＣＡおよびＭＣＡ（Ｆ－$Ｈ_{5}$Ｈ）－ＰＣＡと略称する。一方、実施例１で得られたポリクローナル抗体を同様に固定化し、ＨＲＰ標識抗ヒトタウ蛋白抗体と組合せて作成したサンドイッチ測定系を“ＰＣＡ－ＰＣＡ”と略称する。前記３つのサンドイッチ測定系を使用して得られた検量線を図５に示した。図５から明らかなようにＭＣＡ（Ｆ－$Ｆ_{11}$）－ＰＣＡ、ＭＣＡ（Ｆ－$Ｈ_{5}$）－ＰＣＡおよびＰＣＡ－ＰＣＡのいずれも同様の検量線を作成することができた。

実施例６（脳脊髄液中のヒトタウ蛋白の測定）

参考例２で得られた３つの測定系を用いて、サンドイッチ法により健常人およびアルツハイマー病患者の脳脊髄液中のヒトタウ蛋白の濃度を測定した。その結果を図６にまとめて示す。

図６中のＡ、ＢおよびＣはそれぞれ下記測定系の結果を示す。

Ａ：ＰＣＡ－ＰＣＡ

Ｂ：ＭＣＡ（Ｆ－$Ｆ_{11}$）－ＰＣＡ

Ｃ：ＭＣＡ（Ｆ－$Ｈ_{5}$）－ＰＣＡ

図６から明らかなように、Ａ（ＰＣＡ－ＰＣＡ）の場合は健常人（Normal）とアルツハイマー病患者（ＡＤ）とは、ヒトタウ蛋白の量において良好に区別されたのに対して、モノクローナル抗体を用いたＢおよびＣの場合はいずれも区別は不充分であった。すなわち、Ｂの場合は健常人のヒトタウ蛋白濃度が０（ゼロ）である例が５例

中２例存在し、健常人と区別できないアルツハイマー病患者の濃度が１例（６例中）存在した。またCの場合、ヒトタウ蛋白濃度が健常人の４例において０（ゼロ）を示し、このこと自体測定法に問題があると云うことができる。

この図６から明らかなようにヒトタウ蛋白のアミノ酸配列のの第２５１番目～第４４１番目の領域に認識部位を有する２つのポリクローナル抗体を使用した測定系（A）が臨床意義を有する優れた測定系であることがわかる。

［配列表］（ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列）

配列の長さ：４４１

配列の型：アミノ酸

配列の種類：蛋白

配列

```
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1               5                  10                  15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
            20                  25                  30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
        35                  40                  45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
    50                  55                  60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65                  70                  75                  80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
                85                  90                  95
```

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

[図面の簡単に説明]

図１は、ウシタウ蛋白のＣＮＢｒ分解物のＨＰＬＣパターンである。

図２は、実施例３（３）サンドイッチＥＩＡ測定系において得られた検量線である。

図３は、実施例４において行った、アルツハイマー病患者および健常人の脳脊髄液中のタウ蛋白濃度の測定結果を示す。

図４は、実施例５において脳血管障害および一酸化炭素中毒の患者の脳脊髄液中のタウ蛋白を測定した結果を示す。

図５は、参考例２において３種のサンドイッチ測定系を使用して得られたそれぞれの検量線を示すものである。

図６は、実施例６において、３種のサンドイッチ測定系を使用して得られた健常人とアルツハイマー病患者の脳脊髄液中のタウ蛋白の測定結果を示すものである。

［発明の効果］

本発明によれば、脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を簡便に且つ高感度で測定できる。その測定は、取り出されたヒト脳脊髄液を、何等の処理することなくそのまま実施することができ、中枢神経細胞の障害を有する人と健常人とは明確に異った値として測定される。しかも検査試料としての脳脊髄液は僅かな量で充分である。かくして本発明は、中枢神経細胞の障害を有する患者の検査、研究或いは診断に効果的に利用しうる。

請 求 の 範 囲

1．ヒト脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法において、該方法は不溶性担体固定化抗体および標識化抗体を使用し且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第２５１番目～第４４１番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とする方法。

2．ヒト脳脊髄液中の測定すべきヒトタウ蛋白は可溶性の蛋白であるクレーム１記載の方法。

3．該不溶性担体固定化抗体および標識化抗体は、いずれもポリクロナール抗体であるクレーム１記載の方法。

4．該ポリクロナール抗体は、ヒトの脳から分離された可溶性ヒトタウ蛋白を免疫源として免疫することにより得られた抗体であるクレーム３記載の方法。

5．（ａ－１）不溶性担体に固定化されたヒトタウ蛋白に対する抗体、
（ａ－２）標識物質により標識化したヒトタウ蛋白に対する抗体、
（ｂ）溶解剤、
（ｃ）洗浄剤および
（ｄ）標識物質が酵素である場合には、酵素活性を測定するための基質および反応停止剤、
を組合せたヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の免疫学的測定キットであって、前記（ａ－１）および（ａ－２）の抗体は、いずれもヒトタウ蛋白の第２５１番目～第４４１番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とするキット。

6．前記（ａ－１）および（ａ－２）の抗体は、いずれもポリクローナル抗体であるクレーム５記載のキット。

7．該ポリクローナル抗体は、ヒト脳から分離された可溶性ヒトタウ蛋白を免疫原として免疫することにより得られた抗体であるクレーム６記載のキット。

8.(i) ヒトからヒト脳脊髄液を準備し、

(ii) 不溶性担体固定化抗体および標識化抗体であり且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第２５１番目～第４４１番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有している抗体を準備し、

(iii)前記(i)のヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を前記(ii)の２種の抗体を使用して免疫学的に測定し、

(iv) その測定した値より、ヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の量を決定し、そして

(v) その量よりそのヒトの中枢神経細胞障害の病症を診断する、

ことを特徴とするヒトの中枢神経細胞障害の病症の診断方法。

9. 中枢神経細胞障害がアルツハイマー病（Alzheimer's disease）であるクレーム８記載の診断方法。

10. ヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白量が少なくとも０.５ｎｇ／ｍℓの濃度で含有されることによって、健常人と区別してアルツハイマー病を診断するクレーム９記載の診断方法。

11. 該不溶性担体固定化抗体および標識化抗体はいずれもポリクローナル抗体であるクレーム８記載の診断方法。

12. 該ポリクローナル抗体は、ヒトの脳から分離された可能性ヒトタウ蛋白を免疫源として免疫することにより得られた抗体であるクレーム11記載の診断方法。

図 1

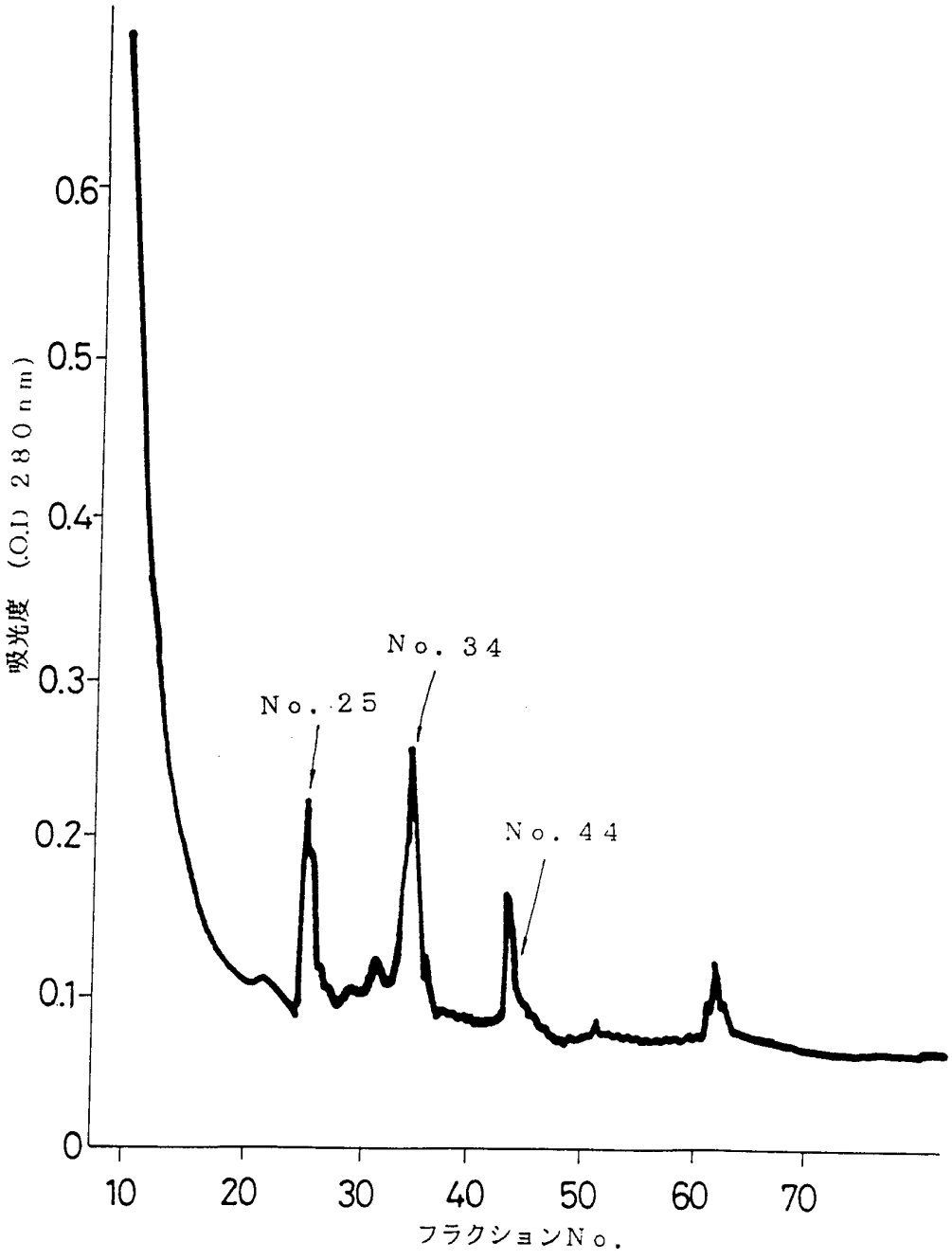

吸光度 (O.D) 280nm
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
No. 25
No. 34
No. 44
10
20
30
40
50
60
70
フラクションNo.

図 2

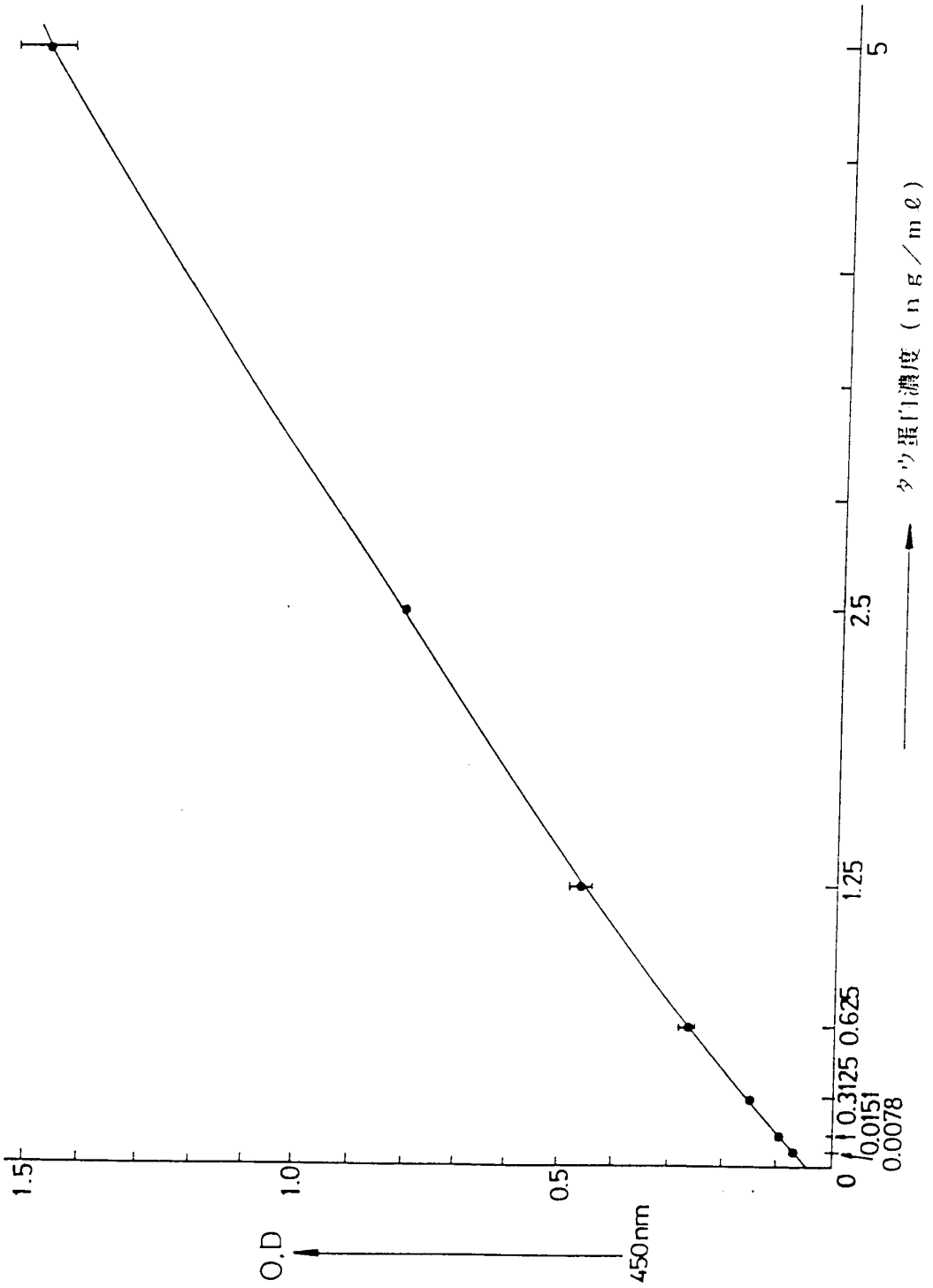

O.D
450nm
1.5
1.0
0.5
0
0.0078
0.0151
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
タンパク質濃度（ng/mℓ）

図 3

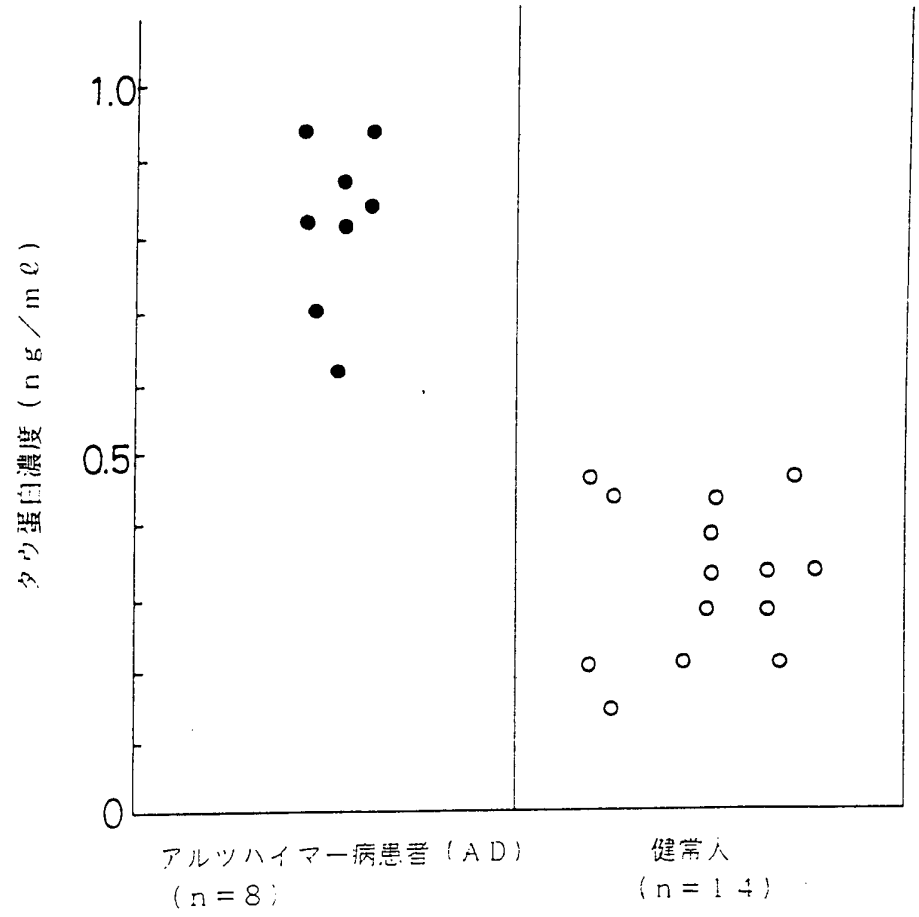


図4

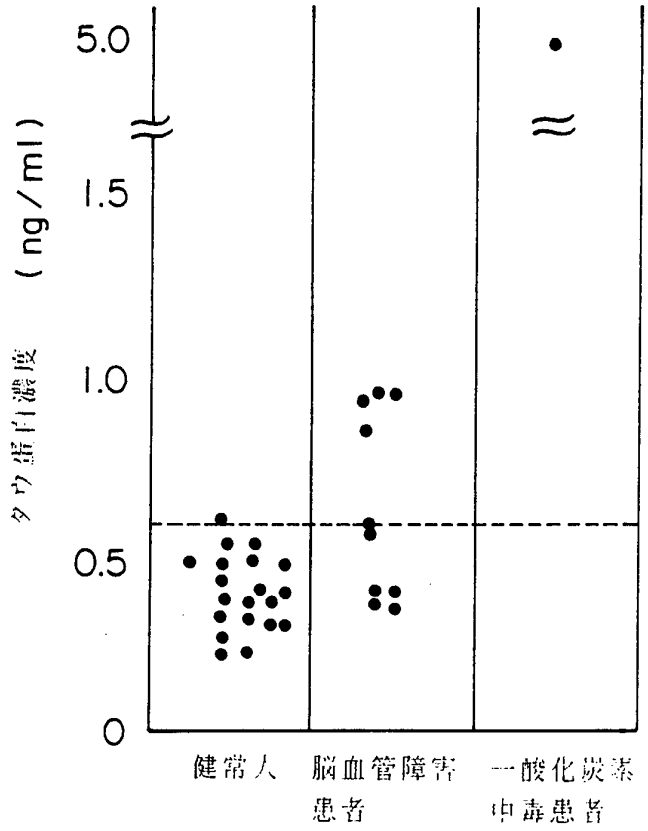


図 5

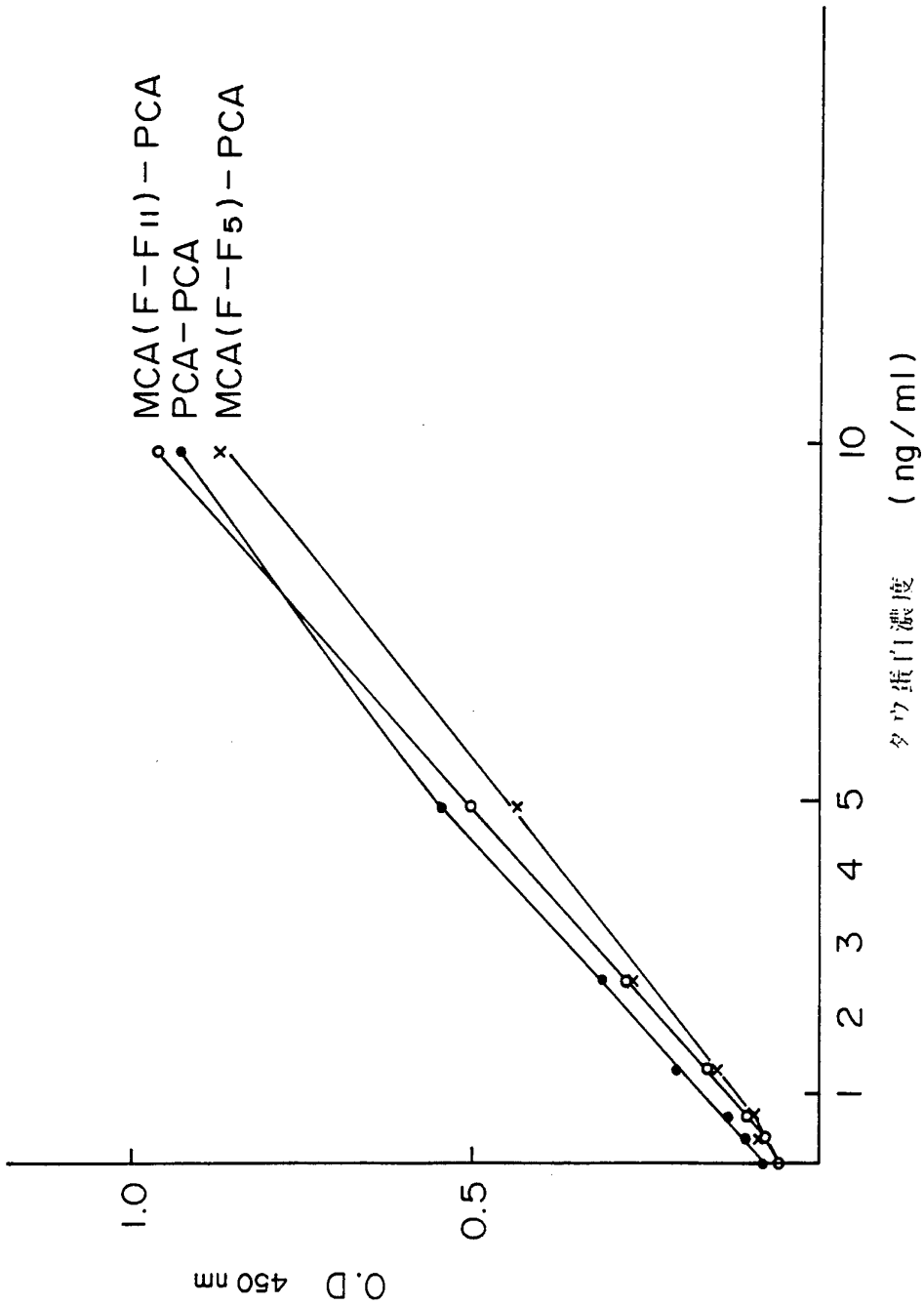


図 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/00196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^5 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl^5 G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Journal of Neuroscience, Vol. 10, No. 10, (1990) Ueda K et. al., "Alz-50 recognizes a phosphorylated epitope of tau protein" P. 3295-3304	1-7
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 88, No. 13, (1991) Novak M. et. al., "Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7. 51" P. 5837-5841	1-7
Y	Biochemical Journal, Vol. 273, No. 1, (1991) Brion J-P et. al., "Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles amino and carboxyl-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site" P. 127-134	1-7

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
April 20, 1994 (20. 04. 94)	May 24, 1994 (24. 05. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/00196

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Acta Neuropathologica, Vol. 80, No. 2, (1990) Delacourte A. et. al., "Pathological proteins tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease demonstration with a panel of antigodies against tau proteins" P. 111-117	1-7
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 89, No. 12, (1992) Lichtenberg-Kraag B. et. al., "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau" P. 5384-5388	1-7
P, Y	Brain Research, Vol. 629, No. 1, (1993) Kenessey A. et. al., "The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments" P. 40-46	1-7
Y	Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol. 86, No. 14, (1989) Iqbal K. et. al., "Identification and paired helical filaments of Alzheimer disease" P. 5646-5650	1-7
Y	Neuroscience, Vol. 37, No. 1, (1990) Nieto A. et. al., "Characterization of tau protein present in microtubules and paired helical filaments of Alzheimer's disease patient's brain" P. 163-170	1-7
Y	Alzheimer Disease and Associated Disorders, Vol. 6, No. 4, (1992) Caputo C. B. et. al., "Immunoreactivity of an antibody to a beta-A4 sequence with Alzheimer paired helical filaments and tau protein" P. 225-235	1-7
P, Y	Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, No. 13, (1993) Poulter L. et. al., "Locations and immunoreactivities of phosphorylation sites on bovine and porcine tau proteins and a PHF-tau fragment" P. 9636-9644	1-7
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 88, No. 13, (1991) Harrington C. R. et. al., "Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease" P. 5842-5846	1-7
Y	Journal of Immunological Methods, Vo. 134, No. 2, (1990) Harrington C. R. et. al., "Competitive ELISA for the measurement of tau	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/00196

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	protein in Alzheimer's disease" P. 261-272	
A	FR, A, 2678638 (Bayer Ag.), January 8, 1993 (08. 01. 93), Abstract, (Family: none)	1-7
A	US, A, 5134062 (Cornell Res. Found Inc.), July 28, 1992 (28. 07. 92), Abstract, (Family: none)	1-7
P, A	WO, A, 9308302 (Innogenetics Nv. Sa.), April 29, 1993 (29. 04. 93), Abstract & AU, A, 9228002	1-7
P, A	WO, A, 9311231 (Max Planck Ges. Foerderung Wissenschaften), June 10, 1993 (10. 06. 93), Abstract & AU, A, 9332560	1-7
Y	EP, A, 155224 (Chromagenics. Inc.), September 18, 1985 (18. 09. 85), Abstract, (Family: none)	1-7
Y	JP, A, 57-16355 (F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.), January 27, 1982 (27. 01. 82), Claim & SE, A, 8102558 & AU, A, 6981181 & FR, A, 2481318 & GB, A, 2074727 & DE, A, 3115115	1-7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94/00196

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[5] G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[5] G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926－1994年
日本国公開実用新案公報 1971－1994年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Journal of Neuroscience, vol. 10, no. 10, (1990) Ueda K et al., "Alz-50 recognizes a phosphorylated epitope of tau protein" p. 3295-3304	1－7
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, no. 13, (1991) Novak M. et al. "Difference between the tau protein of Alzheimer paired	1－7

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
20.04.94

国際調査報告の発送日
24.05.94

名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）
柏崎康司 印
2J8310

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1992年7月）

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 4 2 3 and 7. 5 1 " p.5837—5841	
Y	Biochemicl Journal, vol. 273, no. 1, (1991) Brion J—P et al., "Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles amino and carboxyl—terminal regions are differentially associated associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site " p. 127—134	1—7
Y	Acta Neuropathologica, vol. 80, no. 2, (1990) Delacourte A. et al., "Pathological proteins tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease demonstration with a panel of antigodies against tau proteins " p. 111—117	1—7
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 89, no. 12, (1992) Lichtenberg—Kraag B. et al., "Phosphorylation—dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau " p. 5384—5388	1—7
P, Y	Brain Research, vol. 629, no. 1, (1993) Kenessey A. et al., "The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable that of PHF—tau from Alzheimer paired helical filaments " p. 40—46	1—7
Y	Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, vol. 86, no. 14, (1989) Iqbal K. et al., "Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease " p. 5646—5650	1—7
Y	Neuroscience, vol. 37, no. 1, (1990) Nieto A. et al., "Characterization of tau protein present in microtubules and paired helical filaments of Alzheimer's disease patient's brain " p. 163—170	1—7
Y	Alzheimer Disease and Associated Disorders, vol. 6, no. 4, (1992) Caputo C. B. et al., "Immunoreactivity of an antibody to a beta—A4 sequence with Alzheimer	1—7

C（続き）．関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	paired helical filaments and tau protein " p. 225—235	
P, Y	Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 13, (1993) Poulter L. et al., "Locations and immunoreactivities of phosphorylation sites on bovine and porcine tau proteins and a PHF—tau fragment " p. 9636—9644	1—7
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, no. 13, (1991) Harrington C. R. et al., "Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease " p. 5842—5846	1—7
Y	Journal of Immunological Methods, vol. 134, no. 2, (1990) Harrington C. R. et al., "Competitive ELISA for the measurement of tau protein in Alzheimer's disease " p. 261—272	1—7
A	FR, A, 2678638 (Bayer Ag.), 8. 1月. 1993 (08. 01. 93), 抄録部分（ファミリー無し）	1—7
A	US, A, 5134062 (Cornell Res. Found Inc.), 28. 7月. 1992 (28. 07. 92), 抄録部分（ファミリー無し）	1—7
P, A	WO, A, 9308302 (Innogenetics Nv. Sa.), 29. 4月. 1993 (29. 04. 93), 抄録部分＆AU, A, 9228002	1—7
P, A	WO, A, 9311231 (Max Planck Ges. Foerderung Wissenschaften), 10. 6月. 1993 (10. 06. 93), 抄録部分＆AU, A, 9332560	1—7
Y	EP, A, 155224 (Chromagenics. Inc.), 18. 9月. 1985 (18. 09. 85), 抄録部分（ファミリー無し）	1—7
Y	JP, A, 57—16355 (エフ・ホフマンーラ・ロシュ・ウント・コンパニー・アクチェンゲゼルシャフト), 27. 1月. 1982 (27. 01. 82), 特許請求の範囲＆SE, A, 8102558	1—7

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	&AU, A, 6981181&FR, A, 2481318 &GB, A, 2074727&DE, A, 3115115	