

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7606506号
(P7606506)

(45)発行日 令和6年12月25日(2024.12.25)

(24)登録日 令和6年12月17日(2024.12.17)

(51)国際特許分類	F I			
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531			B
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53			D

請求項の数 9 (全19頁)

(21)出願番号	特願2022-512534(P2022-512534)	(73)特許権者	306008724 富士レピオ株式会社 東京都港区赤坂一丁目8番1号
(86)(22)出願日	令和3年3月30日(2021.3.30)	(74)代理人	110001656 弁理士法人谷川国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/013528	(72)発明者	顧 然 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富 士レピオ株式会社内
(87)国際公開番号	WO2021/200940	審査官	白形 優依
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)		
審査請求日	令和6年2月15日(2024.2.15)		
(31)優先権主張番号	特願2020-63156(P2020-63156)		
(32)優先日	令和2年3月31日(2020.3.31)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血中アミロイド の免疫測定方法及びそのためのキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液検体中のアミロイド を免疫測定する方法であって、前記免疫測定を、陰イオン性ポリマーの存在下で行う、アミロイド の免疫測定方法。

【請求項2】

前記陰イオン性ポリマーが、側鎖に硫酸基又はスルホ基を有する陰イオン性ポリマーである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記陰イオン性ポリマーが、デキストラン硫酸及びその塩、ポリスチレンスルホン酸及びその塩、並びにヘパリン硫酸及びその塩から成る群より選ばれる少なくとも一種である、請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記陰イオン性ポリマーが、デキストラン硫酸ナトリウムである、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記免疫測定がサンドイッチ法であり、前記陰イオン性ポリマーの存在下で、前記血液検体中の前記アミロイド と、固相に固相化した抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片とを接触させて、該アミロイド を測定することを含む、請求項1～請求項4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記アミロイド が、アミロイド 1 - 4 0 又はアミロイド 1 - 4 2 である、請求項

10

20

1 ~ 請求項 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

血液検体中のアミロイド を免疫測定するためのキットであって、抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片と、陰イオン性ポリマーを含むキット。

【請求項 8】

前記免疫測定がサンドイッチ法であり、抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片を固相化した固相と、陰イオン性ポリマーを含む、請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】

前記固相が粒子であり、該粒子と前記陰イオン性ポリマーを含む粒子液を具備する、請求項 8 記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血中アミロイド の免疫測定方法及びそのためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

アミロイド は、アルツハイマー病のバイオマーカーとして公知であり、免疫測定により検体中のアミロイド を測定することが知られており（特許文献 1）、そのためのキットも市販されている。市販されている多くのアミロイド の免疫測定キットは、検体として脳脊髄液(CSF)を使用するものである。一方、アルツハイマー病患者では、血液中にもアミロイド が存在することが知られている。CSFの採取は侵襲的であるので、血液検体中のアミロイド を免疫学的に測定できれば有利である。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】WO 2017/179611

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

CSF中であれ、血液中であれ、測定対象は同じアミロイド であるから、CSFと同様にして血液中のアミロイド を免疫測定することができると考えられた。しかしながら、血液検体中のアミロイド を免疫測定しようとする、CSFを検体とする場合と比較して感度が低くなるという問題があることがわかった。

30

【0005】

したがって、本発明の目的は、血液検体中のアミロイド を高感度に測定することができる免疫測定方法及びそのためのキットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本願発明者らは、血液中のアミロイド の測定に関する鋭意研究の結果、陰イオン性ポリマーの存在下で、血液検体中のアミロイド と抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片との抗原抗体反応を行うことにより、高感度に血液検体中のアミロイド を測定できることを見出し、本発明に到達した。

40

【0007】

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

【0008】

(1) 血液検体中のアミロイド を免疫測定する方法であって、前記免疫測定を、陰イオン性ポリマーの存在下で行う、アミロイド の免疫測定方法。

(2) 前記陰イオン性ポリマーが、側鎖に硫酸基又はスルホ基を有する陰イオン性ポリマーである、(1)記載の方法。

(3) 前記陰イオン性ポリマーが、デキストラン硫酸及びその塩、ポリスチレンスルホン酸

50

及びその塩、並びにヘパリン硫酸及びその塩から成る群より選ばれる少なくとも一種である、(2)記載の方法。

(4) 前記陰イオン性ポリマーが、デキストラン硫酸ナトリウムである、(3)記載の方法。

(5) 前記免疫測定がサンドイッチ法であり、前記陰イオン性ポリマーの存在下で、前記血液検体中の前記アミロイド と、固相に固相化した抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片とを接触させて、該アミロイド を測定することを含む、(1)~(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 前記アミロイド が、アミロイド 1 - 4 0 又はアミロイド 1 - 4 2 である、(1)~(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 血液検体中のアミロイド を免疫測定するためのキットであって、抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片と、陰イオン性ポリマーを含むキット。 10

(8) 前記免疫測定がサンドイッチ法であり、抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片を固相化した固相と、陰イオン性ポリマーを含む、(7)記載のキット。

(9) 前記固相が粒子であり、該粒子と前記陰イオン性ポリマーを含む粒子液を具備する、(8)記載のキット。

【発明の効果】

【0009】

本発明の方法によれば、血液検体中のアミロイド を高感度に測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】下記実施例において測定した、アルツハイマー病患者と健常人における、A₁₋₄₂ / A₁₋₄₀比を示す図である。 20

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の免疫測定方法に供する検体は、血液検体である。血液検体には、全血、血清、血漿のいずれも包含される。好ましくは、血清又は血漿である。

【0012】

下記実施例に具体的に記載するように、血漿及び緩衝液中に精製アミロイド を添加し、免疫測定を用いて、添加したアミロイド の回収レベル(カウント値)を比較する実験により、ゲルろ過クロマトグラフィーで300~400kDaの分子量に相当するフラクションに溶出される、アミロイド と抗アミロイド 抗体との反応を抑制する物質(被覆物質)が存在することが見出された。さらに研究の結果、陰イオン性ポリマーの存在下で免疫測定の抗原抗体反応を行うことにより、被覆物質による結合抑制を軽減できることが見出された。本発明は、この新知見に基づいており、免疫測定を、陰イオン性ポリマーの存在下で行うことを最大の特徴とする。 30

【0013】

陰イオン性ポリマーとしては、デキストラン硫酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチンA硫酸、コンドロイチンB硫酸及びコンドロイチンC硫酸並びにこれらの塩のような、側鎖に硫酸基を有するもの、ポリスチレンスルホン酸及びその塩のような、側鎖にスルホ基を有するもの、並びにポリ(メタ)アクリル酸及びその塩のような、カルボキシル基を有するものが好ましい。これらのうち、側鎖に硫酸基又はスルホ基を有するものが好ましく、デキストラン硫酸、ポリスチレンスルホン酸及びヘパリン硫酸並びにこれらの塩がより好ましく、特にデキストラン硫酸及びポリスチレンスルホン酸並びにこれらの塩が好ましく、とりわけ、デキストラン硫酸及びその塩が好ましい。塩としては、ナトリウム塩やカリウム塩等のアルカリ金属塩を挙げることができる。これらの陰イオン性ポリマーは、単独で用いることもできるし、2種以上を組み合わせることもできる。 40

【0014】

陰イオン性ポリマーの平均分子量は、質量平均分子量として、通常、1,000~5,000,000程度、2,000~4,000,000程度、3,000~2,000,000程度、4,000~1,000,000程度、好ましくは、5,000~700,000程度、 50

000程度、より好ましくは、5,000~50,000程度である。

【0015】

陰イオン性ポリマーは、被覆物質によるアミロイド と、抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片（以下、文脈上そうではないことが明らかな場合を除き、「抗体」という語は、「抗体又はその抗原結合性断片」を意味する）との抗原抗体反応の抑制を軽減するものであるから、いずれの免疫測定方法にも有効であることが明らかである。すなわち、免疫測定には、サンドイッチ法、競合法、凝集法、イムノクロマト法等が包含されるが、本発明は、これらの免疫測定のいずれをも包含する。これらの免疫測定方法自体は周知であり、ここで詳しく述べる必要はないが、それぞれ簡単に説明する。

【0016】

サンドイッチ法には例えば、化学発光酵素免疫測定法（chemiluminescent enzyme immunoassay; CLEIA）、酵素結合免疫吸着法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA）、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光免疫測定法（Electro Chemiluminescence Immunoassay; ECLIA）、蛍光免疫測定法（Fluorescence Immunoassay; FIA）等の各種の手法があり、本発明はいずれの手法をも包含する。本発明の免疫測定は、特に限定されないが、サンドイッチ法であってもよい。サンドイッチ法には例えば、1ステップサンドイッチ法と2ステップサンドイッチ法がある。

【0017】

2ステップサンドイッチ法では、例えば、まず固相に固相化された抗アミロイド 抗体または固相に固相化される抗アミロイド 抗体（固相抗体）と、血液検体中のアミロイド とを接触させて、固相抗体とアミロイド との抗原抗体反応を行う（一次反応）。固相抗体が、固相に固相化される抗アミロイド 抗体である場合は、一次反応後に、固相抗体を固相に固定化する。その後、B/F分離を行う。次いで、固相抗体に結合したアミロイド と、検出のための標識物質が結合した抗アミロイド 抗体（標識抗体）とを接触させて、アミロイド と標識抗体との抗原抗体反応を行う（二次反応）。次いで、B/F分離を行い、固相に結合したアミロイド に結合した標識抗体の標識由来のシグナルを検出することによって、血液検体中のアミロイド を測定することができる。B/F分離後に洗浄を行ってもよい。

【0018】

1ステップサンドイッチ法では、固相抗体と、検体中のアミロイド と、標識抗体とを接触させて、固相抗体とアミロイド との抗原抗体反応と、アミロイド と標識抗体との抗原抗体反応とを一つの工程で行う。固相抗体が、固相に固相化される抗アミロイド 抗体である場合は、抗原抗体反応後または抗原抗体反応と同時に、固相抗体を固相に固定化する。その後、B/F分離を行い、固相に結合したアミロイド に結合した標識抗体の標識由来のシグナルを検出することによって、血液検体中のアミロイド を測定することができる。

【0019】

直接競合法は、測定すべき標的抗原（本発明ではアミロイド ）に対する抗体を固相に固定化し（固相化）、非特異吸着を防ぐためのブロッキング処理（血清アルブミン等のタンパク質溶液で固相を処理）後、この抗体と、前記標的抗原を含む被検試料と、一定量の標識した抗原とを反応させ、洗浄後、固相に結合した標識を定量する方法である。被検試料中の抗原と標識抗原とが、抗体に対して競合的に結合するので、被検試料中の抗原量が多いほど、固相に結合する標識の量が少なくなる。種々の既知濃度の抗原標準液を作製し、それぞれについて固相に固定化された標識量（標識の性質に応じて、吸光度、発光強度、蛍光強度等、以下同じ）を測定して、抗原濃度を横軸、標識量を縦軸にとった検量線を作成する。未知の被検試料について、標識量を測定し、測定された標識量を検量線に当てはめることにより、未知の被検試料中の抗原量を測定することができる。直接競合法自体はこの分野において周知であり、例えば、US20150166678Aに記載されている。

【0020】

10

20

30

40

50

間接競合法では、標的抗原（本発明ではアミロイド）を固相化する。次いで、固相のブロッキング処理後、標的抗原を含む被検試料と、一定量の抗標的抗原抗体とを混合し、前記固相化抗原と反応させる。洗浄後、固相に結合された前記抗標的抗原抗体を定量する。これは、前記抗標的抗原抗体に対する標識した二次抗体を反応させ、洗浄後、標識量を測定することにより行うことができる。種々の既知濃度の抗原標準液を作製し、それぞれについて固相に固定化されて標識量を測定して、検量線を作成する。未知の被検試料について、標識量を測定し、測定された標識量を検量線に当てはめることにより、未知の被検試料中の抗原量を測定することができる。なお、標識二次抗体を用いずに、標識した一次抗体を用いることも可能である。間接競合法自体はこの分野において周知であり、例えば、上記したUS 20150166678Aに記載されている。

10

【0021】

上記した各種免疫測定のうち、化学発光酵素イムノアッセイ法（CLEIA）、化学発光イムノアッセイ（CLIA）、酵素イムノアッセイ法（EIA）、放射イムノアッセイ（RIA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）は、上記した直接競合法、間接競合法、サンドイッチ法等を行う際に用いる標識の種類に基づいて分類した免疫測定である。化学発光酵素イムノアッセイ法（CLEIA）は、標識として酵素（例えば、アルカリフォスファターゼ）を用い、基質として化学発光性化合物を生じる基質（例えば、AMPPD）を用いた、免疫測定である。酵素イムノアッセイ法（EIA）は、標識として酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ等）を用いる免疫測定である。各酵素の基質としては、吸光度測定等により定量可能な化合物が用いられる。例えば、ペルオキシダーゼの場合には、1, 2-フェニレンジアミン（OPD）や3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン（TMB）等、アルカリフォスファターゼの場合には、p-ニトロフェニルフォスフェート（pNPP）等、-ガラクトシダーゼの場合には、MG: 4-メチルウンベリフェリルガラクトシド、NG: ニトロフェニルガラクトシド等、ルシフェラーゼの場合には、ルシフェリン等が用いられる。放射イムノアッセイ（RIA）は、標識として放射性物質を用いる方法であり、放射性物質としては、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵I等の放射性元素が挙げられる。蛍光イムノアッセイ（FIA）は、標識として蛍光物質または蛍光タンパク質を用いる方法であり、蛍光物質または蛍光タンパク質としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質等が挙げられる。これらの標識を用いる免疫測定自体はこの分野において周知であり、例えば、US 8039223BやUS 20150309016A1に記載されている。

20

30

【0022】

免疫比濁法（TIA）は、測定すべき標的抗原（本発明ではアミロイド）と、該抗原に対する抗体との結合により生成された抗原抗体複合物により濁度が増大する現象を利用した免疫測定である。抗標的抗原抗体溶液に、種々の既知濃度の抗原を添加し、それぞれ濁度を測定し、検量線を作成する。未知の被検試料について、同様に濁度を測定し、測定された濁度を検量線に当てはめることにより、未知の被検試料中の抗原量を測定することができる。免疫比濁法自体は周知であり、例えば、US 20140186238A1に記載されている。ラテックス凝集法は、免疫比濁法と類似しているが、免疫比濁法における抗体溶液に代えて、表面に抗標的抗原抗体を固定化したラテックス粒子の浮遊液を用いる方法である。免疫比濁法及びラテックス凝集法自体はこの分野において周知であり、例えば、US 7, 820, 398Bに記載されている。

40

【0023】

イムノクロマトグラフィ法は、ろ紙、セルロースメンブレン、ガラス繊維、不織布等の多孔性材料で形成された基体（マトリックスやストリップとも呼ばれる）上で上記したサンドイッチ法や競合法を行う方法である。例えば、サンドイッチ法によるイムノクロマトグラフィ法の場合、抗標的抗原抗体を固定化した検出ゾーンを上記基体上に設け、標的抗原を含む被検試料を基体に添加し、上流側から展開液を流して標的抗原を検出ゾーンまで移動させ、検出ゾーンに固定化させる。固定化された標的抗原を、標識した二次抗体

50

でサンドイッチして、検出ゾーンに固定化された標識を検出することにより、被検試料中の標的抗原を検出する。標識二次抗体を含む標識ゾーンを検出ゾーンよりも上流側に形成しておくことにより、標的抗原と標識二次抗体との結合体が検出ゾーンに固定化される。標識が酵素の場合には、酵素の基質を含めた基質ゾーンも検出ゾーンよりも上流側に設けられる。競合法の場合には、例えば、検出ゾーンに標的抗原を固定化しておき、被検試料中の標的抗原と、検出ゾーンに固定化された標的抗原とを競合させることができる。検出ゾーンよりも上流側に標識抗体ゾーンを設けておき、被検試料中の標的抗原と標識抗体を反応させ、未反応の標識抗体を検出ゾーンに固定化して標識を検出又は定量することにより、被検試料中の標的抗原を検出又は定量することができる。イムノクロマトグラフィー法自体は、この分野において周知であり、例えばUS 6 210 898 Bに記載されている。

10

【0024】

上記した各種免疫測定のうち、検出感度及び自動化の容易性の観点から、サンドイッチ法、特に、固相として磁性粒子を用い、標識として酵素（例えば、アルカリフォスファターゼ）を用い、基質として化学発光性化合物を生じる基質（例えば、3 - (2' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3' - ホスホリルオキシ)フェニル - 1, 2 - ジオキセタン・2ナトリウム塩 (AMPPD)) を用いる免疫測定である化学発光酵素イムノアッセイ法 (CLEIA) が好ましい。

【0025】

陰イオン性ポリマーは、血液検体中のアミロイド と抗アミロイド 抗体とを接触させて、血液検体中のアミロイド と抗アミロイド 抗体との抗原抗体反応を行う反応の系中に存在させる。

20

【0026】

例えば、2ステップサンドイッチ法では、陰イオン性ポリマーは、固相抗体と、検体中のアミロイド とを接触させて、固相抗体とアミロイド との抗原抗体反応を行う反応系中に存在することが好ましい。1ステップサンドイッチ法では、陰イオン性ポリマーは、固相抗体と、検体中のアミロイド と、標識抗体とを接触させて、抗原抗体反応を行う反応系中に存在することが好ましい。

【0027】

固相は特に限定されず、公知の免疫測定で使用される固相を用いることができる。固相の材質の具体例としては、ポリスチレン、ポリエチレン、セファロース、ラテックス、デキストラン、アガロース、ゼラチン、ポリアクリルアミド等が挙げられるが、これらに限定されない。使用する固相は、その表面への抗体の固定化が容易で、測定中に形成される免疫複合体と未反応の成分を容易に分離できるものであることが好ましい。特に、通常の免疫測定法に使用されるプラスチックプレート、ラテックス粒子や磁性粒子が好ましい。取り扱い、保存、および分離の容易性等の観点から、前述のような材質の磁性粒子を使用することが最も好ましい。これらの固相への抗体の固相化は当業者に周知の常法によって行なうことができる。固相への抗体の固相化は、物理的吸着により行ってもよいし、共有結合を用いてもよい。固相への抗体の固相化はまた、ビオチン-ストレプトアビジンのような親和性物質の一方を固相に固相化し、他方を抗体に結合し、これらを混合することで、親和性物質を介して、抗体を固相に固相化してもよい。

30

40

【0028】

標識物質も特に限定されず、公知の免疫測定で使用されている標識物質と同様のものを用いることができる。具体例としては、酵素、蛍光物質、化学発光物質、染色物質、放射性物質などが挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ (ALP)、パーオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ等、公知のものを用いることができるが、これに限定されるものではない。

【0029】

アミロイド は、その前駆体から酵素による切断を受けて生成するが、切断酵素の相違により、1番～42番のアミノ酸から成るもの (アミロイド 1 - 42 (A 1 - 42))

50

、1番～40番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 1-40(A 1-40))、5番～42番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 5-42(A 5-42))、5番～40番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 5-40(A 5-40))、11番～42番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 11-42(A 11-42))、11番～40番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 11-40(A 11-40))、16番～42番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 16-42(A 16-42))、16番～40番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 16-40(A 16-40))、17番～42番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 17-42(A 17-42))、17番～40番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 17-40(A 17-40))、20番～42番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 20-42(A 20-42))、20番～40番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 20-40(A 20-40))、21番～42番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 21-42(A 21-42))、21番～40番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 21-40(A 21-40))、35番～42番のアミノ酸から成るもの(アミロイド 35-42(A 35-42))と呼ばれている)と、35番～40番のアミノ酸から成るもの(「アミロイド 35-40(A 35-40)」、等の複数の種類が存在する。A 1-42、A 5-42、A 11-42、A 16-42、A 17-42、A 20-42、A 21-42、A 35-42をまとめてアミロイド X-42と呼ぶ。また、A 1-40、A 5-40、A 11-40、A 16-40、A 17-40、A 20-40、A 21-40、A 35-40をまとめてアミロイド X-40と呼ぶ。本発明は、いずれのアミロイド の測定にも有用であり、これらのいずれを測定する場合も本発明の範囲に含まれるが、特に、アミロイド 1-42およびアミロイド 1-40の測定に用いることが好ましい。

10

20

【0030】

抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片は、アミロイド に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片であればよい。抗体は、モノクローナル抗体でもよいし、ポリクローナル抗体でもよい。一般的にはモノクローナル抗体が好ましく用いられる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製方法は、周知であるので、アミロイド 抗原を免疫原として用いて抗アミロイド 抗体を調製してもよい。「抗原結合性断片」は、もとの抗体の対応抗原に対する結合性(抗原抗体反応性)を維持している限り、いかなる抗体断片であってもよい。具体例としては、Fab、F(ab')₂、scFv等を挙げることができるが、これらに限定されない。FabやF(ab')₂は、周知の通り、抗体をパインやペプシンのようなタンパク分解酵素で処理することにより得ることができる。scFv(single chain fragment of variable region、単鎖抗体)の作製方法も周知であり、周知の方法に従って作製することができる。

30

【0031】

抗アミロイド 抗体又はその抗原結合性断片は、測定の対象となるアミロイド の種類に応じて、適宜選択することができる。このような抗体及び抗体の組み合わせは公知であり、市販されているものを用いることができる。

【0032】

例えば、サンドイッチ法によりアミロイド 1-42を測定するには、アミロイド x-42のC末端領域に特異的に結合する抗体(抗A 42抗体)と、アミロイド の1番目のアミノ酸を含むN末端領域に特異的に結合する抗体(抗A N末端抗体)と、を用いることができる。上記の通り、このような抗体は市販されている抗体を用いてもよいし、周知の方法により製造してもよい。固相抗体として抗A 42抗体を、標識抗体として抗A N末端抗体を用いてもよいし、その逆に固相抗体として抗A N末端抗体を、標識抗体として抗A 42抗体を用いてもよい。

40

【0033】

また、サンドイッチ法によりアミロイド 1-40を測定するには、アミロイド x-40のC末端領域に特異的に結合する抗体(抗A 40抗体)と、アミロイド の1番目のアミノ酸を含むN末端領域に特異的に結合する抗体(抗A N末端抗体)と、を用いる

50

ことができる。上記の通り、これら抗体は市販されている抗体を用いてもよいし、周知の方法により製造してもよい。固相抗体として抗 A₄₀ 抗体を、標識抗体として抗 A_N 末端抗体を用いてもよいし、その逆に固相抗体として抗 A_N 末端抗体を、標識抗体として抗 A₄₀ 抗体を用いてもよい。

【0034】

陰イオン性ポリマーは、抗原抗体反応系に別途添加することもできるし、抗体固相化粒子等の抗体固相化固相を含む溶液や、血液検体を希釈するための検体希釈液等の試薬類に予め添加しておくこともできる。また、血液検体に添加しておくことも可能である。

【0035】

抗原抗体反応系中の陰イオン性ポリマーの終濃度は、通常、0.01 g/L ~ 50 g/L 程度、0.02 g/L ~ 25 g/L 程度、0.03 g/L ~ 10 g/L 程度、0.04 g/L ~ 5 g/L 程度、好ましくは 0.05 g/L ~ 2.5 g/L 程度である。

10

【0036】

免疫測定方法自体は周知であり、上記の通り、本発明はいずれの免疫測定方法にも適用可能である。すなわち、本発明の免疫測定方法は、抗原抗体反応を、陰イオン性ポリマーの存在下で行うこと以外は、周知の免疫測定方法をそのまま用いることができる。さらに、上記したとおり、CSFを検体とする免疫測定は既に実施されているので、この免疫測定に用いられるキットをそのまま利用することもできる。

【0037】

なお、CSF中と同様、血液中にも A₁₋₄₂ と A₁₋₄₀ の両方が含まれていることが知られており、CSF中及び血液中の何れも、これらの比、すなわち、A₁₋₄₂ / A₁₋₄₀ をとることで診断特異度が上昇することが知られているため、A₁₋₄₂ と A₁₋₄₀ の両方を定量して、その比を算出することが行われている。この比が健常人よりも小さい場合、アルツハイマー病である可能性が高いと判定されている。一般に、血液検体の採取時から免疫測定までの経過時間が長くなると、免疫測定の感度が低下するが、下記実施例に具体的に記載するように、陰イオン性ポリマーの存在下で抗原抗体反応を行うことにより、検体採取時からの経過時間が長くても、感度はほとんど低下しない（すなわち、A₁₋₄₂ / A₁₋₄₀ が経時的にほとんど変化しない）という、予想外の効果も見出された。

20

【0038】

本発明のキットは、上記した本発明の免疫測定方法を行うためのキットであればよく、抗アミロイド抗体と、陰イオン性ポリマーを少なくとも含むものである。免疫測定がサンドイッチ法の場合、抗アミロイド抗体を固相化した固相も含まれる。該固相が磁性粒子のような粒子の場合、該粒子（通常、粒子液の形態にある）も含まれる。周知のアミロイド免疫測定用キットに陰イオン性ポリマーを含めることにより、本発明のキットとすることができる。上記のとおり、陰イオン性ポリマーは、抗アミロイド抗体固相化粒子液や、検体希釈液等の試薬類に含有させてもよいし、別途、単独でキットに含めてもよい。

30

【実施例】

【0039】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

40

【0040】

< 固相化粒子の調製 >

10 mM MES 緩衝液 (pH 5.0) 中で磁性粒子 0.01 g/mL に、アミロイド x-42 の C 末端領域に特異的に結合する、マウス抗 A₄₂ 抗体 0.2 mg/mL を添加し、25℃ で 1 時間ゆるやかに攪拌しながらインキュベートした。反応後、磁性粒子を磁石で集磁し、粒子を洗浄液 (50 mM トリス緩衝液、150 mM NaCl、2.0% BSA、pH 7.2) にて洗浄し、抗 A₄₂ 抗体固相化粒子を得た。得られた抗 A₄₂ 抗体固相化粒子を粒子希釈液 (50 mM Tris 緩衝液、1 mM EDTA 2Na、0.1% NaN₃、2.0% BSA、pH 7.2) に懸濁し、抗 A₄₂ 抗体固相化

50

粒子溶液を得た。

【0041】

アミロイド x - 40 の C 末端領域に特異的に結合する、マウス抗 A 40 抗体を用いて、同様に、抗 A 40 抗体固相化粒子及び抗 A 40 抗体固相化粒子溶液を調製した。

【0042】

< アルカリホスファターゼ標識抗体の調製 >

脱塩したアルカリホスファターゼ (ALP) と N - (4 - マレイミドブチリロキシ) - スクシンイミド (GMB S) (終濃度 0 . 3 m g / m L) を混合し、30 で1時間静置してマレイミド化を行った。次いで、カップリング用反応液 (100 m M リン酸緩衝液、1 m M E D T A 2 N a、p H 6 . 3) 中で、Fab ' 化した、アミロイド の1番目のアミノ酸を含むN末端領域に特異的に結合する、マウス抗 A N 末端抗体と、マレイミド化ALPを1 : 1のモル比で混合し、25 で1時間反応させた。Superdex 200 10 / 300 (GE社製)のカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、アルカリホスファターゼ標識抗体 (ALP標識抗体)を得た。ALP標識抗体を標識体希釈液 (50 m M M E S 緩衝液、150 m M N a C l、0 . 3 m M Z n C l 2、1 m M M g C l 2、0 . 1 % N a N 3、2 . 0 % B S A、p H 6 . 8) に懸濁し、ALP標識抗体溶液を得た。

【0043】

< アミロイド 1 - 42 (A 1 - 42) の測定方法 >

サンプル 50 μ L と抗 A 42 抗体固相化粒子溶液 50 μ L を反応槽に分注し、攪拌した。その後、37 で8分間インキュベートし、磁場を用いたB / F分離および洗浄を行った。この反応槽に、さらにALP標識抗体溶液 50 μ L を分注し、攪拌後、37 で8分間インキュベートし、磁場を用いたB / F分離および洗浄を行った。その後、化学発光基質である3 - (2 ' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3 '' - ホスホリルオキシ) フェニル - 1 , 2 - ジオキセタン・2ナトリウム塩 (AMPPD) を含むルミパルス (登録商標) 基質液 (富士レピオ社製) 200 μ L を反応槽に分注し、攪拌後37 で4分間インキュベートした後、発光量をルミノメーターで測定した。実際の測定は全自動化学発光酵素免疫測定システム (ルミパルスL2400 (富士レピオ社製)) にて行った。

【0044】

< アミロイド 1 - 40 (A 1 - 40) の測定方法 >

サンプル 30 μ L と抗 A 40 抗体固相化粒子溶液 50 μ L を反応槽に分注し、攪拌した。その後、37 で8分間インキュベートし、磁場を用いたB / F分離および洗浄を行った。この反応槽に、さらに酵素標識抗体溶液 50 μ L を分注し、攪拌後、37 で8分間インキュベートし、磁場を用いたB / F分離および洗浄を行った。その後、AMPPDを含むルミパルス基質液 (富士レピオ社製) 200 μ L を反応槽に分注し、攪拌後37 で4分間インキュベートした後、発光量をルミノメーターで測定した。実際の測定は全自動化学発光酵素免疫測定システム (ルミパルスL2400 (富士レピオ社製)) にて行った。

【0045】

実施例 1

血液サンプルを用いた A 1 - 42 および A 1 - 40 の測定におけるデキストラン硫酸ナトリウムの添加効果を検討した。

【0046】

サンプルとして、A 1 - 42 および A 1 - 40 が測定限界以下である血液サンプル (血清およびEDTA・2K血漿) 4 . 5 m L に、A 1 - 42 抗原および A 1 - 40 抗原をそれぞれ約 794 p g / m L の濃度および約 7744 p g / m L の濃度で含む脳脊髄液 (CSF) 500 μ L を添加し、抗原含有血清 (Serum 1、Serum 2) および抗原含有血漿 (EDTA 2K) を調製した。また、トリス緩衝生理食塩水 (TBS緩衝液、p H 7 . 4) に、血液サンプルと同濃度の A 1 - 42 抗原および A 1 - 40 抗原を添加して、抗原含有TBS緩衝液 (Buffer) を調製した。調製したサンプルを用いて、

上記の「A₁₋₄₂の測定方法」および「A₁₋₄₀の測定方法」に記載の方法に従って、A₁₋₄₂およびA₁₋₄₀をそれぞれ測定した。デキストラン硫酸ナトリウムとしては、デキストラン硫酸ナトリウム（質量平均分子量5000（以下、「分子量5000」と記載、他も同様））を抗体固相化粒子溶液に、0.5 g/Lになるように添加して、その添加効果を検討した。抗原抗体反応系中のデキストラン硫酸ナトリウムの終濃度は、A₁₋₄₂では0.25 g/L、A₁₋₄₀では0.31 g/Lである。また、ブランクとして、抗原を添加していない各サンプル（血清、EDTA・2K血漿及びTBS緩衝液）を同様に測定し、得られたカウントをブランク値とした。各抗原含有サンプルのカウントからブランク値を引いたものをカウント値とした。A₁₋₄₂の結果を表1に、A₁₋₄₀の結果を表2に示す。

10

【0047】

【表1】

Aβ1-42		デキストラン硫酸ナトリウム 5000	
		未添加	0.5 g/L
カウント値	Buffer	5396	5488
	Serum1	4311	4860
	Serum2	3071	4533
	EDTA2K	4434	5290
対Buffer(%)	Buffer	100.0	100.0
	Serum1	79.9	88.6
	Serum2	56.9	82.6
	EDTA2K	82.2	96.4

20

【0048】

【表2】

Aβ1-40		デキストラン硫酸ナトリウム 5000	
		未添加	0.5 g/L
カウント値	Buffer	360904	337955
	Serum1	338872	323636
	Serum2	371949	333830
	EDTA2K	131505	309068
対Buffer(%)	Buffer	100.0	100.0
	Serum1	93.9	95.8
	Serum2	103.1	98.8
	EDTA2K	36.4	91.5

30

【0049】

表1に示されるように、デキストラン硫酸ナトリウム未添加の条件では、血清サンプルおよび血漿サンプルのA₁₋₄₂のカウント値は、緩衝液サンプルのカウント値に比べて低い値であった。緩衝液サンプルのカウント値を100%とすると、血清サンプルであるSerum2のカウント値は56.9%と大幅に低下していた。

40

【0050】

一方、抗体固相化粒子溶液にデキストラン硫酸ナトリウムを添加して、A₁₋₄₂を測定すると、血清サンプルおよび血漿サンプル共にカウント値が上昇し、緩衝液サンプルのカウント値に対して80%以上にまでカウント値が回復した。

【0051】

また、表2に示されるように、A₁₋₄₀についても、デキストラン硫酸ナトリウム未添加の条件では、血漿サンプルのA₁₋₄₀のカウント値は、緩衝液サンプルのカウント

50

値に比べて低い値であった。緩衝液サンプルのカウント値を100%とすると、血漿サンプルEDTA2Kは36.4%と大幅に低下していた。一方、抗体固相化粒子溶液に、デキストラン硫酸ナトリウムを添加して、A₁₋₄₀を測定すると、血漿サンプルのカウント値が上昇し、緩衝液サンプルのカウント値に対して90%以上にまでカウント値が回復した。

【0052】

実施例2

血液中のA₁₋₄₂の測定におけるデキストラン硫酸ナトリウムの添加濃度を検討した。実施例1に記載の方法にて、抗原含有血清(Serum1、Serum2)、抗原含有血漿(EDTA2K)および抗原含有TBS緩衝液(Buffer)のA₁₋₄₂を測定した。デキストラン硫酸ナトリウムとしては、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量5000)を抗体固相化粒子溶液に、表3の濃度(0.1g/L~5.0g/L)になるように添加して、その添加効果を検討した。抗原抗体反応系中のデキストラン硫酸ナトリウムの終濃度は、0.05g/L~2.5g/Lである。また、実施例1と同様にブランク値を取得し、カウント値を算出した。結果を表3に示す。

10

【0053】

【表3】

Aβ1-42		デキストラン硫酸ナトリウム 5000						
		無添加	0.1 g/L	0.2 g/L	0.5 g/L	1 g/L	2 g/L	5 g/L
カウント値	Buffer	5396	5374	5452	5488	5301	5563	5743
	Serum1	4311	4494	4695	4860	4787	5055	5047
	Serum2	3071	4318	4387	4533	4633	4553	4574
	EDTA2K	4434	5154	5499	5290	5547	5294	5655
対Buffer(%)	Buffer	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	Serum1	79.9	83.6	86.1	88.6	90.3	90.9	87.9
	Serum2	56.9	80.3	80.5	82.6	87.4	81.8	79.6
	EDTA2K	82.2	95.9	100.9	96.4	104.6	95.2	98.5

20

【0054】

表3に示されるように、検討したデキストラン硫酸ナトリウムの濃度のすべての条件で、カウント値が、未添加の条件におけるカウント値に比べて上昇した。

30

【0055】

実施例3~5、比較例1~3

様々な陰イオン性ポリマーの添加による血液サンプル中のA₁₋₄₂測定への効果を検討した。実施例1および2において、デキストラン硫酸ナトリウム未添加条件にて特にカウント値の低下が著しい血清(抗原含有血清、Serum2)と、抗原含有TBS緩衝液(Buffer)を用いて、実施例1に記載の方法にて、A₁₋₄₂を測定した。陰イオン性ポリマーとしては、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量5,000)(実施例3)、ポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム)(分子量700,000)(実施例4)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(比較例1)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)(比較例2)、ポリアクリル酸ナトリウム塩(分子量5,100)(実施例5)、N-ラウロイルサルコシナトリウム(NLS)(比較例3)を用いた。これら陰イオン性ポリマーを、抗体固相化粒子溶液に、0.5g/Lになるように添加して、その添加効果を検討した。また、実施例1と同様にブランク値を取得し、カウント値を算出した。結果を表4に示す。

40

【0056】

50

【表 4】

Aβ1-42	性質 側鎖	未添加	デキストラン硫酸 酸钠トリウム	ポリ(4-スチレンス ルホン酸ナトリウム)		ポリアクリル酸ナ トリウム塩		SDS	SDBS	NLS
				ポリマー	スルホ基	ポリマー	カルボキシ基			
カウント値	Buffer	-	5488	4474	6726	5232	5274	5128		
	Serum2	-	4533	3462	4497	3025	3043	3096		
対 Buffer (%)	Buffer	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		
	Serum2	56.9	82.6	77.4	66.9	57.8	57.7	60.4		

【0057】

表 4 に示されるように、陰イオン性ポリマーの未添加の条件では、血清サンプル (Serum 2) のカウント値は、緩衝液サンプルのカウント値に比べて、56.9%であるのに対し、陰イオン性ポリマーであるデキストラン硫酸ナトリウム (実施例 3)、ポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム) (実施例 4)、およびポリアクリル酸ナトリウム塩 (実施例 5) を添加すると、それぞれ 82.6%、77.4% および 66.9% までカウント値が上昇した。特に側鎖に硫酸基又はスルホ基を有する陰イオン性ポリマーであるデキストラン硫酸ナトリウムおよびポリ(4-スチレンスルホン酸ナトリウム) では、カウント値の回復が大きく、特に効果があることが示された。一方で、側鎖に硫酸基を有する界

10

20

30

40

50

面活性剤である SDS (比較例 1)、側鎖にスルホ基を有する界面活性剤である SDBS (比較例 2)、または側鎖にカルボキシル基を有する NLS (比較例 3) を添加しても、カウント値は回復しなかった。

【 0 0 5 8 】

よって、反応液への陰イオン性ポリマーの添加は、血液サンプルにおけるアミロイド測定時のカウント値の低下を改善する効果があることが示された。また、陰イオン性ポリマーのうち、特に側鎖に硫酸基又はスルホ基を有する陰イオン性ポリマーの改善効果が大きいことが示された。

【 0 0 5 9 】

実施例 6

陰イオン性ポリマーの添加濃度による血液サンプル中の A_β1-42 測定への効果を検討した。A_β1-42 が測定限界以下である血液サンプル (血清および EDTA・2K 血漿) 5 mL に、50000 pg/mL の濃度の合成 A_β1-42 抗原を 50 μL 添加し、抗原含有血清 (Serum1、Serum2) および抗原含有血漿 (EDTA2K) を調製した。また、トリス緩衝生理食塩水 (TBS 緩衝液、pH 7.4) に、血液サンプルと同濃度の合成 A_β1-42 抗原を添加して、抗原含有 TBS 緩衝液 (Buffer) を調製した。調製した各サンプルを用いて、実施例 1 に記載の方法にて、A_β1-42 を測定した。陰イオン性ポリマーとしては、デキストラン硫酸ナトリウムの代わりに、側鎖に硫酸基を有する陰イオン性ポリマーであるヘパリン硫酸ナトリウムを、抗体固相化粒子溶液に、表 5 の濃度 (0.5 g/L、5.0 g/L) になるように添加して、その添加効果を検討した。抗原抗体反応系中のヘパリン硫酸ナトリウムの終濃度は、0.25 g/L、2.5 g/L である。また、実施例 1 と同様にブランク値を取得し、カウント値を算出した。結果を表 5 に示す。

【 0 0 6 0 】

【表 5】

Aβ1-42	添加剤	未添加	ヘパリン硫酸ナトリウム	
	濃度 (g/L)		0.5	5
カウント値	Buffer	24726	23413	22235
	Serum1	17121	18269	18226
	Serum2	15230	16667	16448
	EDTA2K	17566	18295	18454
対Buffer(%)	Buffer	100.0	100.0	100.0
	Serum1	69.2	78.0	82.0
	Serum2	61.6	71.2	74.0
	EDTA2K	71.0	78.1	83.0

【 0 0 6 1 】

表 5 に示されるように、検討したヘパリン硫酸ナトリウムを添加した濃度のすべての条件で、未添加の条件におけるカウント値に比べて、カウント値が上昇した。

【 0 0 6 2 】

実施例 7

分子量が異なるデキストラン硫酸ナトリウムの添加による血液サンプル中の A_β1-42 測定への効果を検討した。実施例 1 および 2 において、デキストラン硫酸ナトリウム未添加条件にて特にカウント値の低下が著しい血清 (Serum2) 5 mL に、50000 pg/mL の濃度の合成 A_β1-42 抗原を 50 μL 添加し、抗原含有血清を調製し、実施例 1 に記載の方法にて、A_β1-42 を測定した。また、TBS 緩衝液に、血液サンプルと同濃度の合成 A_β1-42 抗原を添加して、抗原含有 TBS 緩衝液 (Buffer) を調製し、同様に A_β1-42 を測定した。平均分子量が 5000 と 50000 である二種類のデキストラ

10

20

30

40

50

ン硫酸を使用し、抗体固相化粒子溶液への添加濃度は7 g / Lとした。抗原抗体反応系中のデキストラン硫酸ナトリウムの終濃度は、3.5 g / Lである。さらに、実施例1と同様にブランク値を取得し、カウント値を算出した。結果を表6に示す。

【0063】

【表6】

A β 1-42	添加剤	未添加	デキストラン硫酸ナトリウム	
	平均分子量		5000	50000
カウント値	Buffer	18610	19163	17952
	Serum2	12408	15501	16847
対Buffer(%)	Buffer	100.0	100.0	100.0
	Serum2	66.7	80.9	93.8

10

【0064】

表6に示されるように、デキストラン硫酸ナトリウムの未添加の条件では、血清サンプル(Serum2)のカウント値は、緩衝液サンプルのカウント値に比べて、66.7%であるのに対し、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量5000)、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量50000)を添加すると、それぞれ80.9%、93.8%までカウント値が上昇した。

【0065】

よって、平均分子量5000以上のデキストラン硫酸ナトリウムをはじめとした陰イオン性ポリマーを反応液への添加することは、血液サンプルにおけるアミロイド測定時のカウント値の低下を改善する効果があることが示された。

20

【0066】

実施例8

血液サンプルにおいて、緩衝液サンプルよりもカウント値が下がる原因を検討する目的で、EDTA・2K血漿、および脳脊髄液(CSF)を、ゲルろ過カラムを用いて分画した。条件は次のとおりである。装置はAKTAFPLC(GEヘルスケア製)、カラムはSuperose6 10x300(GEヘルスケア製)、流速は0.3 mL / 分、バッファーはD-PBS(-)、アプライ量は1 mL、各フラクションの液量は1 mLである。取得した各フラクションに対してA β 1-42抗原を1000 pg / mLになるように添加して、サンプルを調製した。調製したサンプルを用いて、実施例1に記載の方法でA β 1-42を測定した。抗体固相化粒子溶液に、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量5000)を2.5 g / Lになるように添加して、その添加効果を検討した。抗原抗体反応系中のデキストラン硫酸ナトリウムの終濃度は、1.3 g / Lである。コントロールサンプルとして、A β 1-42抗原を1000 pg / mLになるように添加したTBS緩衝液を用いて、同様に測定した。結果として、コントロールサンプルのカウント値に対する各サンプルのカウント値の比率(%)を表7に示す。分子量は、分子量マーカー(バイオラッド社製)を上記条件で操作し、近似式を作成して各フラクションでの分子量を算出した。

30

【0067】

40

50

【表 7】

			EDTA2K血漿		CSF	
デキストラン硫酸ナトリウム5000濃度			0 g/L	2.5 g/L	0 g/L	2.5 g/L
	フラクションNo.	分子量 (kDa)				
カウント 対緩衝液 (%)	1	72957.1	98.1	102.5	96.2	95.9
	2	37374.1	105.1	106.2	103.2	103.7
	3	19145.8	127.7	116.5	100.4	95.6
	4	9807.9	115.6	117.0	101.2	98.3
	5	5024.4	97.3	112.4	100.4	94.3
	6	2573.9	101.6	126.9	99.9	98.1
	7	1318.5	97.3	120.4	100.8	98.4
	8	675.4	88.3	111.1	99.1	99.8
	9	346	61.0	106.2	98.7	98.2
	10	177.3	90.8	102.3	99.3	97.6
	11	90.8	104.8	97.5	100.2	97.4
	12	46.5	105.8	98.0	127.4	121.7
	13	23.8	108.3	101.7	226.0	216.9
	14	12.2	102.6	101.2	106.9	107.1
	15	6.3	101.6	104.4	99.4	99.8
	16	3.2	93.4	101.5	105.9	102.8
	17	1.6	98.0	99.2	98.7	99.0
	18	0.8	104.4	105.5	100.2	99.9
	19	0.4	103.9	104.3	101.2	98.0

10

20

【0068】

表7に示されるように、EDTA2K血漿では、300 - 400 kDa付近のフラクションにおいてデキストラン硫酸ナトリウムの未添加の条件でカウント値の比率が61%にまで低下したが、デキストラン硫酸ナトリウムを添加することでカウント値がコントロールサンプルと同程度(106%)まで回復することが確認された。一方、CSFでは、いずれのフラクションにおいてもデキストラン硫酸ナトリウムの未添加の条件でカウント値がコントロールサンプルと比較して低下せず、デキストラン硫酸ナトリウムの添加の有無によってカウント値の比率が大きく異なるフラクションもみられなかった。

30

【0069】

よって、カウント値を低下させる成分は血液サンプルのみに存在し、この成分による影響が、陰イオン性ポリマーを添加することによって回避できると考えられる。

【0070】

実施例9

健常人由来の血清サンプル、およびEDTA2Na血漿サンプル中のA₁₋₄₂およびA₁₋₄₀測定における陰イオン性ポリマーの影響を検討した。血液サンプルは、それぞれプレーン(10mL採血管、テルモ製)、およびEDTA2Na(7mL採血管、テルモ製)を使用して採血し、30分間室温で静置し、1200×gで10分間遠心分離を行い、上清を回収することにより調製した。

40

【0071】

サンプルの保存による影響を評価するため、サンプル調製後4で、0日、1日、2日、および3日間保存したサンプルを用いて、上記の「A₁₋₄₂の測定方法」および「A₁₋₄₀の測定方法」に従って、A₁₋₄₂およびA₁₋₄₀を測定した。陰イオン性ポリマーとしては、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量5000)を、抗体固相化粒子

50

溶液に 0.5 g/L になるように添加して、その添加効果を検討した。測定値と、各条件における保存期間 0 日に対する測定値の比率を表 8 に示す。測定値の算出方法は、合成 A₁₋₄₂ ペプチドと合成 A₁₋₄₀ ペプチドをそれぞれ 0 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL となるように調製したものをキャリブレーターとして測定した。このキャリブレーターを測定して得られたカウント値をもとに近似式を作成し、各サンプルから得られたカウント値を近似曲線に当てはめて測定値を算出した。

【0072】

【表 8 - 1】

		Aβ1-42							
デキストラン硫酸ナトリウム5000		0 g/L				2.5 g/L			
4°Cでの保存日数		0	1	2	3	0	1	2	3
測定値	EDTA2Na血漿#1	13.3	12.2	10.8	10.8	19.2	17.0	15.2	16.4
	EDTA2Na血漿#2	12.6	12.9	11.4	12.2	19.6	16.0	15.2	14.9
	Serum血清#1	6.3	3.1	2.2	2.6	10.1	9.9	9.9	9.4
	Serum血清#2	2.5	2.4	2.2	2.1	10.5	9.7	9.7	8.3
対0day (%)	EDTA2Na血漿#1	100.0	91.7	81.2	81.2	100.0	88.5	79.2	85.4
	EDTA2Na血漿#2	100.0	102.4	90.5	96.8	100.0	81.6	77.6	76.0
	Serum血清#1	100.0	49.2	34.9	41.3	100.0	98.0	98.0	93.1
	Serum血清#2	100.0	96.0	88.0	84.0	100.0	92.4	92.4	79.0

10

20

【0073】

【表 8 - 2】

		Aβ1-40							
デキストラン硫酸ナトリウム5000		0 g/L				2.5 g/L			
4°Cでの保存日数		0	1	2	3	0	1	2	3
測定値	EDTA2Na血漿#1	147.3	146.1	129.9	128.8	171.2	163.2	152.9	145.5
	EDTA2Na血漿#2	141.0	137.7	126.7	124.5	164.5	153.7	144.1	138.9
	Serum血清#1	119.4	110.8	97.5	92.2	150.5	144.2	132.3	120.5
	Serum血清#2	123.8	113.7	97.3	94.6	153.4	141.1	129.1	118.3
対0day (%)	EDTA2Na血漿#1	100.0	99.2	88.2	87.4	116.2	110.8	103.8	98.8
	EDTA2Na血漿#2	100.0	97.7	89.9	88.3	116.7	109.0	102.2	98.5
	Serum血清#1	100.0	92.8	81.7	77.2	126.0	120.8	110.8	100.9
	Serum血清#2	100.0	91.8	78.6	76.4	123.9	114.0	104.3	95.6

30

【0074】

表 8 に示されるように、デキストラン硫酸ナトリウムを添加した試薬では、血清検体、血漿検体ともにカウント値および測定値が上昇した。経時的に測定すると、測定値は低下する傾向がみられた。

40

【0075】

アミロイド の測定では、A₁₋₄₂ と A₁₋₄₀ の比をとって比較することが行われている。そこで、本実施例で測定した各条件における A₁₋₄₀ に対する A₁₋₄₂ の比を算出した。結果を表 9 に示す。

【0076】

50

【表 9】

		Aβ1-42/1-40				Aβ1-42/1-40			
デキストラン硫酸ナトリウム5000		0 g/L				2.5 g/L			
4°Cでの保存日数		0	1	2	3	0	1	2	3
測定値	EDTA2Na血漿#1	0.090	0.084	0.083	0.084	0.112	0.104	0.099	0.113
	EDTA2Na血漿#2	0.089	0.094	0.090	0.098	0.119	0.104	0.105	0.107
	Serum血清#1	0.053	0.028	0.023	0.028	0.067	0.069	0.075	0.078
	Serum血清#2	0.020	0.021	0.023	0.022	0.068	0.069	0.075	0.070
対0day (%)	EDTA2Na血漿#1	100.0	92.5	92.1	92.9	100.0	92.9	88.6	100.5
	EDTA2Na血漿#2	100.0	104.8	100.7	109.7	100.0	87.4	88.5	90.0
	Serum血清#1	100.0	53.0	42.8	53.4	100.0	102.3	111.5	116.2
	Serum血清#2	100.0	104.5	112.0	109.9	100.0	100.4	109.8	102.5

10

【0077】

表9に示されるように、デキストラン硫酸ナトリウムを添加していない試薬で血清を測定すると経時的にA₁₋₄₂/A₁₋₄₀比の値が変化することが確認された。しかし、デキストラン硫酸ナトリウムを添加した試薬で血清を測定すると、経時的にA₁₋₄₂/A₁₋₄₀比の値が変化せず、保存期間に影響を受けずにA₁₋₄₂/A₁₋₄₀比が得られることが確認された。

20

【0078】

よって、デキストラン硫酸ナトリウムのような陰イオン性ポリマーを添加すると、A₁₋₄₂およびA₁₋₄₀のカウント値が上昇することに加えて、保存期間に影響を受けずに、A₁₋₄₂/A₁₋₄₀比が得られることが確認された。

【0079】

実施例10

デキストラン硫酸ナトリウム添加の試薬を用いて、アルツハイマー病(AD)患者と非AD患者の血清検体中のA₁₋₄₂およびA₁₋₄₀を測定した。

【0080】

AD患者(26例)と非AD患者(22例)の血清検体中のA₁₋₄₂およびA₁₋₄₀を以下の方法で測定した。まず、サンプル50μLと、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量5000)を0.5g/Lになるように添加した抗体固相化粒子溶液250μLを反応槽に分注し、攪拌した。抗原抗体反応系中のデキストラン硫酸ナトリウムの終濃度は、0.42g/Lである。その後、37°Cで8分間インキュベートし、磁場を用いたB/F分離および洗浄を行った。この反応槽に、さらに酵素標識抗体溶液250μLを分注し、攪拌後、37°Cで8分間インキュベートし、磁場を用いたB/F分離および洗浄を行った。その後、化学発光基質であるAMP-PDを含むルミパルス(登録商標)基質液(富士レピオ社製)200μLを反応槽に分注し、攪拌後37°Cで4分間インキュベートした後、発光量をルミノメーターで測定した。実際の測定は全自動化学発光酵素免疫測定システム(ルミパルスG1200(富士レピオ社製))にて行った。結果を図1に示す。実施例6と同様のキャリブレーターを用いて近似式を作成し、検体のカウントからA₁₋₄₂およびA₁₋₄₀の測定値を算出した。

30

【0081】

図1は、得られた各測定値から求めた、A₁₋₄₂/A₁₋₄₀比の箱ひげ図である。デキストラン硫酸ナトリウムが入った試薬を用いて測定した結果、AD患者のA₁₋₄₂/A₁₋₄₀比が、非AD患者群間のA₁₋₄₂/A₁₋₄₀比に対して有意に低い値となり(p値0.0022(Wilcoxon-Mann-Whitney test))、患者検体を用いたA₁₋₄₂の測定においても、陰イオン性ポリマーの反応液への添加が有用であることが確認された。

40

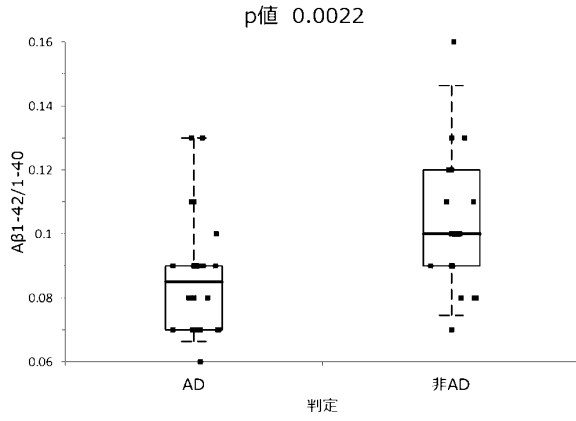
【0082】

50

よって、デキストラン硫酸ナトリウムなどの陰イオン性ポリマーを添加した試薬はアルツハイマー病の診断に有用であることが示された。

【図面】

【図 1】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2011-081011(JP,A)
特開2018-151162(JP,A)
特表2005-519088(JP,A)
米国特許第5164295(US,A)
特開平6-058935(JP,A)
特表2006-507488(JP,A)
国際公開第2015/052654(WO,A1)
TIMMER, N. M. et al. , Aggregation and cytotoxic properties towards cultured cerebrovascular cells of Dutch-mutated A_β40 (DA 1-40) are modulated by sulfate moieties of heparin , Neuroscience Research , 2009年12月30日 , Vol.66 , pp.380-389
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)
G01N 33/48 - 33/98
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
CAplus / REGISTRY (STN)