(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-4354
(P2018-4354A)
(43)公開日　平成30年1月11日(2018.1.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/68	***(2006.01)***	G01N	33/68		2G045
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	D	

審査請求 未請求　請求項の数 5　ＯＬ　（全 16 頁）

(21)出願番号　特願2016-129018 (P2016-129018)
(22)出願日　平成28年6月29日 (2016.6.29)

(71)出願人　505246789
学校法人自治医科大学
東京都千代田区平河町二丁目６番３号
(74)代理人　100097113
弁理士　堀　城之
(74)代理人　100162363
弁理士　前島　幸彦
(74)代理人　100194146
弁理士　長谷川　明
(74)代理人　100194283
弁理士　村上　大勇
(74)代理人　100141324
弁理士　小河　卓

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脳症の検出方法、バイオマーカー、診断用組成物、及び診断用キット

(57)【要約】
【課題】けいれん重積型（二相性）急性脳症（ＡＥＳＤ）を検出する検出方法を提供する。
【解決手段】Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種のタンパク質の髄液中での発現量変化を指標として、けいれん重積型（二相性）急性脳症であることを検出する。この検出は、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４については発現量が増加し、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎについては発現量が減少することに基づく。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
脳症の検出方法であって、
Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質の髄液中での発現量変化を指標として、けいれん重積型（二相性）急性脳症であることを検出する
ことを特徴とする脳症の検出方法。
【請求項２】
前記指標は、
Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４については発現量が増加し、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎについては発現量が減少することに基づく
ことを特徴とする請求項１に記載の脳症の検出方法。
【請求項３】
けいれん重積型（二相性）急性脳症の診断用のバイオマーカーであって、
髄液中のＭｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質マーカーである
ことを特徴とするバイオマーカー。
【請求項４】
けいれん重積型（二相性）急性脳症を診断するための診断用組成物であって、
Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質に特異的に結合する抗体を含む
ことを特徴とする診断用組成物。
【請求項５】
けいれん重積型（二相性）急性脳症を診断するための診断用キットであって、
Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質に特異的に結合する抗体を含む
ことを特徴とする診断用キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、特に脳症の検出方法、バイオマーカー、診断用組成物、及び診断用キットに関する。
【背景技術】
【０００２】
急性脳症は、小児期に多く発症する脳症である。我が国における急性脳症の定義は、Ｊａｐａｎ Ｃｏｍａ Ｓｃａｌｅ ２０以上（Ｇｌａｓｇｏｗ Ｃｏｍａ Ｓｃａｌｅ １０～１１以下）の意識障害が急性に発症し、２４時間以上持続することである。急性脳症は、（１）ほとんどは、インフルエンザ、ＨＨＶ－６（突発性発疹）、ロタウィルス、ＲＳウィルス等の感染症の経過中に発症する、（２）多くは頭部ＣＴ、ＭＲＩで脳浮腫が描出される、（３）脳炎、髄膜炎等の他の疾患が否定される（髄液中の細胞数増加がない）という特徴がある。
急性脳症では、多くが死亡したり後遺症を生じたりするため、医学的、社会的に大きな

問題を生じている。
【０００３】
ここで、急性脳症には、重篤な脳症である急性壊死性脳症（Ａｃｕｔｅ Ｎｅｃｒｏｔｉｚｉｎｇ Ｅｎｃｅｐａｈｌｏｐａｔｈｙ、以下「ＡＮＥ」と記載する。）、予後が比較的良好な脳梁膨大部脳症（Ｃｌｉｎｉｃａｌｌｙ ｍｉｌｄ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ／ｅｎｃｅｐｈａｌｏｐａｔｈｙ ｗｉｔｈ ａ ｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ ｓｐｌｅｎｉａｌ ｌｅｓｉｏｎ、以下、「ＭＥＲＳ」と記載する。）、及び、けいれん重積型（二相性）急性脳症（Ａｃｕｔｅ ｅｎｃｅｐｈａｌｏｐａｔｈｙ ｗｉｔｈ ｂｉｐｈａｓｉｃ ｓｅｉｚｕｒｅｓ ａｎｄ ｌａｔｅ ｒｅｄｕｃｅｄ ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ、以下「ＡＥＳＤ」と記載する。）と呼ばれる症候群が存在する。また、症候群として確立していないが、「一相性脳症」と考えられる、感染症による発熱後、けいれんを発症し、その後長時間（概ね２４時間以上）にわたり意識障害が遷延するが、時間経過とともに意識障害が改善する脳症が存在する。
【０００４】
これらのうち一相性脳症及びＡＥＳＤでは、感染症により急激に発症して、けいれん及び意識障害を呈する１回目の発作が生じる。その後、一相性脳症では、自然軽快することが期待できるのに対し、ＡＥＳＤでは、１回目の発作からの数日後に、２回目のけいれん及び意識障害を呈する発作を起こすことが、臨床的な特徴である。すなわち、発作が１回だけ（一相性）の一相性脳症に対して、ＡＥＳＤ（二相性）では２回目の発作が起こる。そして、ＡＥＳＤは、罹病率が我が国で年間４００～７００人と少ないものの、患者には、その後、麻痺、知的障害、てんかん等の厳しい神経学的後遺症が生じることが多いという問題があった。
【０００５】
ここで、従来の急性脳症の診断方法として、特許文献１を参照すると、（１）脳症が疑われる患者から採取した血液中のキノリン酸含有量及び／又はキヌレニン含有量を測定する、及び（２）前記キノリン酸含有量及び／又はキヌレニン含有量を、脳症非発症者又は脳症発症者の基準レベルと比較することで脳症を簡易かつ迅速に検出する技術が開示されている（以下、従来技術１とする。）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】特開２０１４－１９４３９６号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
ここで、上述のように、病初期の１回目の発作では一相性脳症及びＡＥＳＤ共に、発熱、けいれん、意識障害を呈するものの、上述のように、予後が比較的良好な一相性脳症と異なり、ＡＥＳＤは、重篤な後遺症を残すことが多い。
しかしながら、ＡＥＳＤ用の診断用マーカーは知られておらず、従来技術１の診断方法でも、一相性脳症とＡＥＳＤとを区別することはできなかった。
このため、病初期にＡＥＳＤであることを検出することは難しかった。
【０００８】
本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、上述の問題を解消することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本発明の脳症の検出方法は、脳症の検出方法であって、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質の髄液中での発現量変化を指標として、けいれん重積型（

二相性）急性脳症であることを検出することを特徴とする。
本発明の脳症の検出方法は、前記指標は、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４については発現量が増加し、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎについては発現量が減少することに基づくことを特徴と。
本発明のバイオマーカーは、けいれん重積型（二相性）急性脳症の診断用のバイオマーカーであって、髄液中のＭｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質マーカーであることを特徴とする。
本発明の診断用組成物は、けいれん重積型（二相性）急性脳症を診断するための診断用組成物であって、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質に特異的に結合する抗体を含むことを特徴とする。
本発明の診断用キットは、けいれん重積型（二相性）急性脳症を診断するための診断用キットであって、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質に特異的に結合する抗体を含むことを特徴とする。
【発明の効果】
【００１０】
本発明によれば、Ｍｏｎｏｃｙｔｅｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、ＡｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎＥ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質の髄液中での発現量変化を指標とすることで、病初期にＡＥＳＤであることを検出することが可能な脳症の検出方法を提供することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】本発明の実施例に係る髄液の２Ｄ－ＤＩＧＥ法のプロット結果を示す写真である。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
＜実施の形態＞
本発明の発明者らは、一相性脳症と、二相性のＡＥＳＤとを病初期に判別するバイオマーカーを探索するため、鋭意実験を行った。その結果、髄液中に発現するタンパクのうち、いくつかのものの発現量が変化することを早期診断マーカーとして用いることで脳症を検出する方法を見いだし、本発明を完成するに至った。
【００１３】
具体的には、本発明の発明者らは、ＡＥＳＤ患者３名と一相性脳症患者３名の病初期に採取したヒト髄液中で、プロテオーム解析を行った。髄液は１回目の発作から１０時間以内に集められた。この髄液について、ゲル電気泳動法（２Ｄ－ＤＩＧＥ）を使用し、発現が変化しているタンパク質を２Ｄ－ＤＩＧＥ法によって確認した。この結果として、ＡＥＳＤ患者からの髄液では、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４及び免疫グロブリンの発現が上昇していた。これらは、免疫応答に関連するタンパク質であった。また、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎの発現が減少していた。これら発現が減少したタンパク質は、後述するようにアポトーシス、免疫学的応答、及び神経修復に関係していた。
患者の髄液中で、これらのタンパク質をバイオマーカーとして発現の定性、定量を行う

ことでＡＥＳＤの早期診断、早期治療が可能となることが期待される。

【００１４】

より具体的に説明すると、本発明の実施の形態に係る脳症の検出方法、バイオマーカー、診断用組成物、及び診断用キットの対象となる脳症は、けいれん重積型（二相性）急性脳症（ＡＥＳＤ）である。上述したように、ＡＥＳＤは、発熱に伴い、けいれん重積（１回目の発作）を起こした後に、一時的に意識状態が改善した後、２～４日後に、再度けいれん発作や意識障害（２回目の発作）を起こす二相性の経過を示し、麻痺、知的障害やてんかん等の後遺症を残すことが多い疾患である。

本実施形態に係る脳症の検出方法の被験者は、急性脳症が疑われる患者であり、脳症非発症者、急性でない脳症発症者、及び脳症を引き起こす各種感染症の患者を含む。

【００１５】

また、本実施形態においては、上述のように、初回けいれん発症（１回目の発作）後、早期に髄液を採取し、この髄液中内で発現が変化しているタンパク質の発現量を、プロテオーム解析にて同定した。プロテオームは、特定の細胞若しくは生体試料が特定条件下に置かれた時に、その中に存在する全てのタンパク質を意味する。プロテオーム解析は、タンパク質の機能や各タンパク質が構築する機能ネットワークを明らかにする研究手法であり、こうして得られた知見は、疾病の早期診断や病態の解明、さらには創薬研究へと応用されている。

【００１６】

本発明の実施の形態に係るプロテオーム解析には、二次元電気泳動（Ｔｗｏ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ、２－ＤＥ）と質量分析（ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ、ＭＳ）を基礎としたプロテオーム解析を用いることが可能である。二次元電気泳動は、個々のタンパク質が持つ等電点の違いを利用した等電点電気泳動と、分子量の違いを利用したポリアクリルアミド電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）とを組み合わせることによって、タンパク質を分離する方式である。これにより数百から数千種類のタンパク質を同時に分離し、タンパク質スポットとして可視化することができる。このタンパク質スポットは、酵素処理を行いペプチド断片とした後に、後述する質量分析にて、ペプチド断片の質量データ（ＭＳスペクトル）を計測する。ペプチドフィンガープリント法により、このＭＳスペクトラムを、既存のデータベースに登録されているタンパク質のＭＳスペクトラムと照合し、タンパク質の同定を行うことが可能である。また、タンデムマス質量分析（ＭＳ／ＭＳ）装置を用いることでより詳細な情報（ＭＳ／ＭＳスペクトル）を取得でき、高精度にタンパク質の同定が可能となる。

【００１７】

また、本発明の実施の形態に係るプロテオーム解析には、特に、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動（２－Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ　Ｇｅｌ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ、２Ｄ－ＤＩＧＥ法）を用いることが好適である。２Ｄ－ＤＩＧＥ法では、異なる蛍光波長を持つ色素（ＣｙＤｙｅ：Ｃｙ２，Ｃｙ３，Ｃｙ５）を用い、泳動する前に各サンプルのタンパク質をあらかじめ標識（Ｃｙ３，Ｃｙ５）することで、同一のゲルで２群の発現量比較を行う。また、比較するサンプルを等量ずつ混合した内部標準（Ｃｙ２）を用いる。これにより、従来の二次元電気泳動法に比べて、２Ｄ－ＤＩＧＥ法では、ゲル間での泳動誤差が改善され、高感度で高精度に発現差異を解析可能である。さらに、２Ｄ－ＤＩＧＥではタンパク質を直接蛍光色素標識することで、比較的少量のタンパク質量でもスポットとして検出することが可能である。

本実施形態において、２Ｄ－ＤＩＧＥ法による急性脳症患者髄液を用いたプロテオーム解析により、初回けいれん後、早期に二相性の脳症を発症するリスクを判定するバイオマーカーを同定することが可能となった。

これにより、髄液内で変化している分子を測定することで、ＡＥＳＤの発症機序と病態を解明することが可能となる。

なお、本実施形態のプロテオーム解析として、その他の高性能な分析機器を駆使した解

析法を用いてもよい。

【００１８】

具体的には、本発明の実施の形態に係る脳症の検出方法は、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質の髄液中での発現量変化を指標として、けいれん重積型（二相性）急性脳症であることを検出することを特徴とする。

また、本発明の実施の形態に係る脳症の検出方法は、指標として、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４については発現量が増加し、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎについては発現量が減少することに基づくことを特徴とする。

なお、本実施形態において、「一種以上」とは、各構成のうち一つ又は複数の組み合わせのいずれかであることを示す。すなわち、いずれか一つを用いてもよいし、これらのうち二つ～全てについての任意の組み合わせを含む。

つまり、上述の脳症の検出方法の例においては、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群のタンパク質については、一つ又は複数のタンパク質の組み合わせのいずれかの変動を検出する。

【００１９】

また、本発明の実施の形態に係るバイオマーカーは、けいれん重積型（二相性）急性脳症の診断用のバイオマーカーであって、髄液中のＭｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上であることを特徴とする。

【００２０】

ここで、本発明の実施の形態に係るバイオマーカーとして、ＡＥＳＤで発現量が増加していたＭｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４（以下、「ＣＤ１４」と記載する。）は、中枢神経系の感染及び傷害に対するマイクログリア応答に対応する重要なタンパクである。具体的に、ＣＤ１４は、ＴＬＲ（トール様受容体）４の補助受容体であり、ＬＰＳ（リポ多糖類）に対する応答を促進する。また、ＣＤ１４は、ＴＬＲ４及び関連する免疫受容体の機能を組み合わせて、ＴＬＲ及び非ＴＬＲの系により制御される。これにより、ＣＤ１４は、中枢神経系の感染及び無感染時のミクログリアのダメージ検出の機能を微調整し、ミクログリア活性化を補助する。

【００２１】

また、本発明の実施の形態に係るバイオマーカーとして、ＡＥＳＤで発現量が減少していたＡｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ（以下、「ＡｐｏＥ」と記載する。）は、アストロサイトやミクログリアでも産生、分泌されるタンパクである。また、ＡｐｏＥ受容体は、ニューロン、アストロサイト及びミクログリアの中で広く発現している。ＡｐｏＥは、髄液中のリポタンパクと結合し、神経細胞内に取り込まれる。すなわち、ＡｐｏＥは、神経細胞損傷後の修復期に必要なコレステロール等の脂質の神経細胞への輸送に関与している。また、コレステロール及び他の脂質はシナプス構造及び修復に重要な役割を果たす。具体的に、コレステロールは、薄膜とミエリン鞘の需要な原料であり、シナプスの完全性及び神経機能には必須の化合物である。

また、本発明の実施の形態に係るバイオマーカーとして、ＡＥＳＤで発現量が減少していたＧｅｌｓｏｌｉｎは、細胞分化や接着、アポトーシスに関係しているタンパクである。

また、本発明の実施の形態に係るバイオマーカーとして、ＡＥＳＤで発現量が減少していたＣｌｕｓｔｅｒｉｎ（以下、「ＣＬＵ」と記載する。）は、免疫グロブリンや補体等

と複合体を形成する糖タンパク質である。ＣＬＵは、脳を含む多くの組織で広く発現され、マクロファージの誘引、補体攻撃抑制、アポトーシス阻害、膜の再形成等に関連する。また、ＣＬＵは、けいれん誘発性の神経細胞障害に対する保護に関連している。

【００２２】

これらをまとめると、従来、ＡＥＳＤの病理的な機構は、ニューロンの興奮毒性であると考えられていた。

これに対して、本実施形態によれば、ＡＥＳＤの免疫学的応答の関与が機構のうちの１つであることを示唆した。すなわち、脳症の初期で大量のステロイドを投与するステロイドパルス療法及び免疫抑制療法により、ＡＥＳＤの２回目の発作を抑える療法の開発が期待できる。

一方、本実施形態によれば、ＡＥＳＤでは、発現量減少したタンパク質はアポトーシス、免疫学的応答及び神経修復に関係していた。このため、ＡＥＳＤ患者においては、神経修復能力が他の脳症患者より低い可能性が示唆される。このため、各種の神経修復を促進する薬剤による治療により、ＡＥＳＤの後遺症を抑制することが期待できる。

なお、本実施形態のバイオマーカーは、患者がＡＥＳＤを発症していることを確認する発症マーカー、又は患者がＡＥＳＤを発症していないことを確認する健常マーカーのいずれとしても使用可能である。

【００２３】

また、本発明の実施の形態に係る診断用組成物は、けいれん重積型（二相性）急性脳症を診断するための診断用組成物であって、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質に特異的に結合する抗体を含むことを特徴とする。

また、本発明の実施の形態に係る診断用キットは、けいれん重積型（二相性）急性脳症を診断するための診断用キットであって、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎからなる群の一種以上のタンパク質に特異的に結合する抗体を含むことを特徴とする。

【００２４】

ここで、従来、ＡＥＳＤにおいては、二相性の経過を見ないと診断が困難であるが、２回目のけいれん、意識障害の発症後に治療しても、予後の改善が見られないことが多かった。

これに対して本実施形態の診断用組成物、診断用キットにより、病初期の１回目のけいれん等の発作後に、髄液中のＭｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ、及びα２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎの一種以上の発現変化を診断し、早期治療を行うことで、予後の改善が得られる可能性がある。すなわち、髄液を取得して、本実施形態のバイオマーカーを計測することで、ＡＥＳＤの早期診断により適切な治療が行われ、後遺症が抑えられる可能性がある。

また、従来、ＡＥＳＤの治療は大量のステロイドを投与するステロイドパルス療法が適応であるものの、本実施形態の診断用組成物、診断用キットによりＡＥＳＤでなく「一相性脳症」であると診断された場合、自然軽快が期待される。このため、副作用の可能性のあるステロイドパルス療法をしなくてもよくなる。

【００２５】

ここで、本実施形態の診断用組成物及び診断用キットにおいて、バイオマーカーの各タンパク質の含有量は、公知の測定方法で測定可能である。この測定方法は、抗体を用いた方法及び質量分析法を用いることが可能である。

【００２６】

本実施形態のバイオマーカーの含有量を測定する際に抗体を用いる方法としては、例えば、一般的な、ウェスタンブロッティングやＥＬＩＳＡ（酵素免疫吸着測定法）を用いる

ことが可能である。ウェスタンブロッティングは、髄液を必要に応じ緩衝液で希釈し、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を含むバッファーで溶解し、髄液をＳＤＳ－ＰＡＧＥで電気泳動して分子量に応じて分離する方式である。ゲル上の分離したタンパク質をニトロセルロース膜やＰＶＤＦ膜等に転写し、転写した膜をこれに一次抗体および二次抗体を添加し、二次抗体の識別標識を検出することにより、本実施形態のバイオマーカーのタンパク質を検出することが可能である。

また、ＥＬＩＳＡ法は、検出対象タンパク質について、特異的に結合する一次抗体と、この一次抗体に特異的に結合し、かつ標識（ラベル）する二次抗体により検出する方式である。検出は、例えば、それぞれの基質を加えた後、蛍光若しくは化学発光物質または酵素反応による可視光を計測する。

【００２７】

ここで、本実施形態のバイオマーカーのタンパク質を検出する抗体は、ポリクローナル抗体でも、モノクローナル抗体でも、ＶＨ領域やＶＬ領域のみ合成された抗体、ＶＨ領域や接着部位だけ合成された抗体様ペプチド等であってもよい。また、動物由来の抗体の場合には、例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、イヌ、トリ、昆虫、その他の脊椎動物及び無脊椎動物等のものであってもよい。また、植物、酵母、古細菌、及び真正細菌、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの合成系等により合成された抗体を用いてもよい。また、抗体の作製は、本実施形態のバイオマーカーのタンパク質を用い、一般の方法で、動物を免疫して作成可能である。また、抗体としてモノクローナル抗体を用いる場合には、ハイブリドーマやファージディスプレイ法等により、一般的な方法で作成することが可能である。

【００２８】

また、本実施形態のバイオマーカーの含有量を測定する際に質量分析法を用いる場合には、高速液体クロマトグラフィー－質量分析計（ＬＣ－ＭＳ）法、ガスクロマトグラフィー－質量分析計（ＧＣ－ＭＳ）法、キャピラリー電気泳動－質量分析計（ＣＥ－ＭＳ）法、ＭＳ／ＭＳ分析、ＭＡＬＤＩ／ＴＯＦＭＳ分析、ＮＭＲ分析、酸アルカリ中和滴定、アミノ酸分析、酵素法、比色定量法、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等の各種の手法を用いることが可能である。

【００２９】

また、本実施形態のバイオマーカーの含有量は、上述の各タンパク質の濃度が上昇しているか、減少しているかについて、特定の閾値や統計的有意性を基に判定することが可能である。この判定により、ＡＥＳＤとして２回目の発作が生じるか否かの危険性を推定することも可能である。

【００３０】

この本実施形態のバイオマーカーの特定の閾値は、例えば、ＬＣ－ＭＳ法を用いた測定で得られるグラフのピーク面積を標準化した値について、ＡＥＳＤと診断された患者が閾値以上に特定の割合で含まれ、一相性の患者が閾値未満に特定の割合で含まれ、カイ二乗検定値が最も有意となるような値を、各種統計分析プログラム等で算出可能である。また、本実施形態のバイオマーカーの各タンパク質の統計的有意差がある組み合わせについて算出し、この組み合わせについての閾値を設定してもよい。

【００３１】

また、本実施形態の特定の閾値の設定により、バイオマーカーの感度及び特異度を算出してもよい。この場合の感度とはＡＥＳＤを正常に検出する割合であり、特異度は偽陽性の割合である。感度が低いと実際にＡＥＳＤである患者を正常と判定し辛くなり、得意度が低いとＡＥＳＤを誤判定することが多くなる。また、閾値、感度及び偽陽性率から、受診者動作特性（ＲＯＣ）曲線を求めてもよい。ＲＯＣ曲線の曲線下面積（ＲＯＣ－ＡＵＣ）は、バイオマーカーの性能を示す値である。このＲＯＣ－ＡＵＣのｐ値をｚ検定により算出してもよい。

【００３２】

なお、本実施形態のＡＥＳＤを発症する実験動物（モデル動物）により、ＡＥＳＤの治

療に効果がある低分子の化合物等の薬剤をスクリーニングすることも可能である。すなわち、このモデル動物に治療薬の候補である化合物を投与し、投与前後で髄液を取得し、バイオマーカーの各タンパク質の発現量を測定し、比較する。そして、化合物の投与後に、バイオマーカーの各タンパク質の発現量が非ＡＥＳＤの患者の範囲に近づけば、投与した化合物は脳症の治療に効果的に用いられる可能性がある。

このように、本実施形態のバイオマーカーを用いることで、効果がある化合物を容易にスクリーニングすることも可能となる。

【実施例】

【００３３】

次に図面に基づき本発明を実施例によりさらに説明するが、以下の具体例は本発明を限定するものではない。

【００３４】

〔実験方法〕

（髄液サンプル）

対象は、患者の親権者のインフォームドコンセントを得たＡＥＳＤが３例（年齢：１１か月～１歳３か月）の髄液（Ｓ１～Ｓ３）であった。また、比較対象（ｃｏｎｔｒｏｌ）は、一相性脳症が３例（年齢：１１か月～２歳０か月）の髄液（Ｃ１～Ｃ３）であった。髄液は、初回けいれん後、１０時間以内（２時間～１０時間）に採取した。髄液のタンパク濃度は採取直後に計測した。

各患者の臨床症状の特徴は、下記の表１の通りであった。

【００３５】

【表１】

		年齢	初回けいれん持続時間	病因	脳波異常	治療	後遺症	2 相目けいれん（初回後日数）
AESD	S1	1y3m	60 分	不明	高振幅徐波	チオペンタール	脳萎縮	3 日後
AESD	S2	1y	90 分	RSV	高振幅徐波	ステロイドパルス療法	発達障害	６日後
AESD	S3	11m	80 分	HHV-6	高振幅徐波		てんかん	3 日後
Control	C1	11m	75 分	突発性発疹	なし	抗けいれん薬	なし	なし
Control	C2	11m	60 分	気管支炎	なし	抗けいれん薬	なし	なし
Control	C3	2y	3 分	突発性発疹	なし	抗けいれん薬	なし	なし

【００３６】
（２Ｄ－ＤＩＧＥ用タンパク質サンプルの調整）
２Ｄ－ＤＩＧＥに適したタンパク質サンプルとするため、タンパク質３０μｇ分の髄液を２－Ｄ Ｃｌｅａｎ－ｕｐ Ｋｉｔ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）を用いて、塩等の夾雑物を除去した。タンパク質サンプルは６μｌのＬｙｓｉｓ Ｂｕｆｆｅｒ［３０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ ８．５），７Ｍ Ｕｒｅａ，２Ｍ Ｔｈｉｏｕｒｅａ，４％（ｗ／ｖ）ＣＨＡＰＳ］で再溶解し、タンパク濃度５μｇ／μｌとした。
【００３７】
（タンパク質サンプルの蛍光標識）
蛍光試薬として、ＣｙＤｙｅ ＤＩＧＥ ｆｌｕｏｒ ｍｉｎｉｍａｌ ｄｙｅ －ｆｏｒ ２－Ｄ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ ｇｅｌ ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）を用い、標準的なプロトコルに従って、タンパク質サンプルの蛍光標識を行った。各１５μｇ（３μｌ）のタンパク質サンプルに対して、４００ｐｍｏｌのＣｙ３標識試薬乃至Ｃｙ５標識試薬を０．３μｌずつ混合し、暗所、氷上で３０分間静置して標識反応を行った。さらに内部標準として、全てのタンパク質サンプルから５μｇずつ集めた内部標準サンプルプールを作製し、内部標準サンプル３０μｇ（６μｌ）に対して、４００ｐｍｏｌのＣｙ２標準試薬を０．６μｌ混和し、同様に標識反応を行った。標識反応後のサンプルは、１０ｍＭリジンを蛍光標識

試薬と等量添加し、氷上で１０分以上静置して反応を停止した。
同一ゲルに添加するタンパク質サンプルを、下記の表２のように混合した。
【００３８】
【表２】

Gel	Cy3	Cy5	Cy2
1	C１&C３ (0.5μl ずつ)	S１&S３ (0.5μl ずつ)	内部標準 (1μl)
2	S２ (1μl)	C２ (1μl)	内部標準 (1μl)

【００３９】
（２Ｄ－ＤＩＧＥ法）
標識反応後、混合した２Ｄ－ＤＩＧＥサンプルは、２ｘ ｓａｍｐｌｅ ｂｕｆｆｅｒ［７Ｍ Ｕｒｅａ，２Ｍ Ｔｈｉｏｕｒｅａ，４％（ｗ／ｖ）ＣＨＡＰＳ，１％（ｖ／ｖ）ＩＰＧ Ｂｕｆｆｅｒ ｐＨ ３－１１ ＮＬ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製），２％（ｗ／ｖ）ＤＴＴ］を添加し、氷上で１０分間静置した。これに膨潤ｂｕｆｆｅｒ［７Ｍ Ｕｒｅａ，２Ｍ Ｔｈｉｏｕｒｅａ，４％（ｗ／ｖ）ＣＨＡＰＳ，０．５％（ｖ／ｖ）ＩＰＧ Ｂｕｆｆｅｒ ｐＨ ３－１１ ＮＬ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製），０．２％（ｗ／ｖ）ＤＴＴ，０．０００４％ＢＰＢ］を添加し、総タンパク質量１５０μｇに対して、総液体量が３５０μｌとなるように調整した。
このサンプルを固定化ｐＨ勾配（ＩＰＧ）ゲルであるＩｍｍｏｂｉｌｉｎｅ Ｄｒｙｓｔｒｉｐ １８ｃｍ ｐＨ ３－１１ ＮＬ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）に添加し、等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動には、Ｅｔｔａｎ ＩＰＧｐｈｏｒ Ｉｓｏｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｆｏｃｕｓｉｎｇ Ｕｎｉｔ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を用い、サンプルを添加したＩＰＧゲルを２０℃、１２時間膨潤させた後、（１）５００Ｖ，１時間、（２）１０００Ｖ，１時間、（３）８０００Ｖ，８時間のプログラムで３７．５ｋＶｈｒに達するまで泳動した。
等電点電気泳動を行ったＩＰＧゲルは、ＳＤＳ化／還元処理Ｂｕｆｆｅｒ［５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，６Ｍ Ｕｒｅａ，３０％（ｖ／ｖ）Ｇｌｙｃｅｒｏｌ，１％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ，０．２５％（ｗ／ｖ）ＤＴＴ］中で、１５分間、振盪した後、さらにＳＤＳ化／アルキル化処理Ｂｕｆｆｅｒ［５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ，６Ｍ Ｕｒｅａ，３０％（ｖ／ｖ）Ｇｌｙｃｅｒｏｌ，１％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ，４．５％（ｗ／ｖ）Ｉｏｄｏａｃｅｔａｍｉｄｅ，０．００１％（ｖ／ｖ）ＢＰＢ］中で１５分間振盪し、ＳＤＳ化と還元アルキル化を行った。
２次元目のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動には、ＳＥ６００ Ｖｅｒｔｉｃａｌ Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｈｏｅｆｅｒ社製）を用いた。無蛍光ガラスプレート（１８ｃｍ×１６ｃｍ）を用いて作製した１２％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル上に一次元展開したＩＰＧゲルを設置し、０．５％アガロースゲルで封入した。（１）８００Ｖ，２０ｍＡ，１５分間、（２）１０００Ｖ，６０ｍＡ，５時間のプログラムで、泳動の先端がゲルの底面に達するまで泳動を行った。
【００４０】
（画像解析及び発現差異解析）
２Ｄ－ＤＩＧＥゲルは、Ｔｙｐｈｏｏｎ ９４１０（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を用いて、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５の蛍光色素に対応する励起光／蛍光フィルター（Ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ／Ｅｍｉｓｓｉｏｎ Ｃｙ２＝４８８／５２２ｎｍ，Ｃｙ３＝５３２／５８０ ｎｍ，Ｃｙ５＝６３３／６７０ｎｍ）で蛍光標識タンパク質ゲル画像を取得した（Ｐｉｘｅｌ Ｓｉｚｅ＝１００μｍ）。

画像解析には、二次元電気泳動ゲル画像解析ソフトウェアであるＰｒｏｇｅｎｅｓｉｓ ＳａｍｅＳｐｏｔｓ（Ｎｏｎｌｉｎｅａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ社製）を用い、ゲル画像の歪み補正とゲル間のスポットマッチングを行った。スポットマッチングとは、複数のゲルで同一位置に存在するスポットを検出することであり、対応するスポットがないものや適切なスポットの形態をなしていないものは解析から除外した。最終的にすべてのスポットについて、適切なマッチングができているか手動で確認した。そして、すべてのゲル画像に共通して存在するスポットを同定し、内部標準サンプルを介した定量値の標準化、Ａｎｏｖａによる有意差検定を行った。

【００４１】

（質量分析用サンプルの調整とゲル内消化）

２Ｄ－ＤＩＧＥ解析に使用したサンプルと同様に調整したタンパク質サンプル１５０μｇを用いて、上述の方法で二次元電気泳動を行い、質量分析用ゲルを作成した。質量分析用ゲルは、固定液［４０％（ｖ／ｖ）ｅｔｈａｎｏｌ、１０％（ｖ／ｖ）ａｃｅｔｉｃ ａｃｉｄ］中で１８時間振盪し、固定した後、Ｆｌａｍｉｎｇｏ Ｆｌｕｏｒｓｃｅｎｔ Ｇｅｌ Ｓｔａｉｎ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）染色液（１ｘ）中で３時間、遮光、振盪して、染色した。次に染色後の質量分析用ゲルから、ＦｌｕｏｒｏＰｈｏｒｅｓｔａｒ ３０００（Ａｎａｔｅｃｈ社製）を用いて、タンパク質スポットの切り出しを行った。発現差異のあったタンパク質スポットを直径１．８ｍｍのゲルピッカーで切り出し、回収した。ゲル片は超純水とアセトニトリルで洗浄した後、減圧下で乾燥させた。次にゲル片に１０ｍＭ ＤＴＴ／１００ｍＭ NH_4HCO_3溶液を加え、５６度で４５分間反応させた後、５５ｍＭ Ｉｏｄｏａｃｅｔａｍｉｄｅ／１００ｍＭ NH_4HCO_3溶液を加え、室温で３０分間反応させ、還元アルキル化を行った。ゲル片を再度、超純水、アセトニトリル、１００ｍＭ NH_4HCO_3で洗浄、乾燥させた後、トリプシン溶液（１２．５ｎｇ／μｌ トリプシン、５０ｍＭ NH_4HCO_3）を添加し、氷上で４５分間静置した。続いて溶液を除去し、５０ｍＭ NH_4HCO_3を加えて、３７℃で１６時間反応させた。トリプシンによってゲル内で消化されたペプチド断片は、２５ｍＭ NH_4HCO_3、アセトニトリル、５％（ｖ／ｖ）ギ酸で回収し、減圧下で乾燥させた。

【００４２】

（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳとＭＳ／ＭＳ ｉｏｎ ｓｅａｒｃｈによるタンパク質同定）

ペプチド断片抽出液は、液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置として高速液体クロマトグラフ Ｐａｒａｄｉｇｍ ＭＳ４（Ｍｉｃｈｒｏｍ ＢｉｏＲｅｓｏｕｒｃｅｓ社製）及び質量分析装置 Ｆｉｎｎｉｇａｎ ＬＴＱ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を使用して、抽出液に含まれるペプチド断片の質量分析を行った。サンプルは、トラップカートリッジ（Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｃａｐ Ｔｒａｐ，Ｍｉｃｈｒｏｍ ＢｉｏＲｅｓｏｕｒｃｅｓ社製）によりオンラインで脱塩・濃縮処理を行った後、ＬＣ部に導入した。ＬＣ部では、流速１５０μｌ／ｍｉｎで、固定相にＬ－ｃｏｌｕｍｎ Ｍｉｃｒｏ（０．１×５０ｍｍ、３μｍ、１２ｎｍ、化学物質評価研究機構社製）、移動相にＡ溶媒（２％アセトニトリル、０．１％ギ酸）とＢ溶媒（９０％アセトニトリル、０．１％ギ酸）を使用し、Ｂ溶媒の濃度を５％（０ｍｉｎ）から４５％（２０ｍｉｎ）まで直線勾配で上げ、ペプチド断片を連続的に溶出した。ペプチド断片は、ＭＳ部において、エレクトロスプレー法によるイオン化を行った後、イオントラップによって分離し、ＭＳスペクトル（質量範囲ｍ／ｚ ４５０－２０００）を取得した。さらに特定のｍ／ｚのイオン（プリカーサーイオン）を選択し、このイオンの衝突誘起解離によって生じるプロダクトイオンのＭＳ／ＭＳスペクトル（ＭＳ／ＭＳ解析）を取得した。得られたＭＳスペクトル及びＭＳ／ＭＳスペクトルについては、タンパク質同定解析ソフトＭＡＳＣＯＴＴＭ（Ｍａｔｒｉｘ Ｓｃｉｅｎｃｅ社製）に供し、ＭＳ／ＭＳ ｉｏｎ ｓｅａｒｃｈによるタンパク質同定を行った。なおタンパク質データベースとして、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔを使用した。

【００４３】

（候補タンパク質抽出）

同定タンパク質をＡＥＳＤで増加したタンパク質、減少したタンパク質に分け、Ｓｃａｆｆｏｌｄ（Ｐｒｏｔｅｏｍｅ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｐｒｏｔｅｏｍｅｓｏｆｔｗａｒｅ．ｃｏｍ）を用いて、ＧＯ（Ｇｅｎｅ Ｏｎｔｏｌｏｇｙ）解析を行いこれらがどのような機能、特徴を有するかを検討し、バイオマーカーの候補となるタンパク質を抽出した。

【００４４】

〔結果〕

（２Ｄ－ＤＩＧＥを用いた網羅的なタンパク質発現解析と有意差を示すタンパク質スポットの同定）

図１に示すように、上記方法にてＡＥＳＤ症例の髄液、一相性脳症症例の髄液から抽出したタンパク質を２Ｄ－ＤＩＧＥによって分離し、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５の蛍光色素に対応する励起画像を取得した結果、それぞれのゲル画像においてタンパク質スポットを検出した。この検出スポットについて、スポットマッチングを行い、すべてのゲル画像において共通して存在するタンパク質スポット（マッチングスポット）を１１６３個同定した。

このマッチングスポットについて、発現差異解析を行ったところ、ＡＥＳＤと一相性脳症との間に１．３倍以上の発現量の有意差を認めたタンパク質スポットを２１個同定した。また、目視で２群に差があると思われたタンパク質スポットを２個、計２３個を同定した。

【００４５】

（ＡＥＳＤ髄液で発現差異を認めたタンパク質の同定）

発現差異を認めたタンパク質スポットについては、質量分析用ゲルからスポットの切り出しを行い、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳとＭＳ／ＭＳ ｉｏｎ ｒｅｓｅａｒｃｈによるタンパク質同定を行った。発現差異を認めた２３個のタンパク質スポットのうち、１６個のスポットで解析が可能であった。同定したタンパク質の重複を除いた１１種類のタンパク質について、解析ソフトウェア「Ｓｃａｆｆｏｌｄ」を用いてＧＯ解析を行った。７種類はＡＥＳＤで発現が増加し、他の４種類のタンパク質はＡＥＳＤで発現が減少していた。

これらのタンパク質、発現増加の割合、ａｎｏｖａの算出結果等を、下記の表３に示す：

【００４６】

【表３】

発現上昇タンパク質	倍率	anova	発現低下タンパク質	倍率	anova
Monocyte differentiation antigen CD14	2.5	0.07	Apolipoprotein E	3.6	0.03
Ig-λ2 chain C region	1.3	0.16	Gelsolin	1.3	
Ig-γ2 chain C region	1.4	0.14	Clusterin	2.3	0.34
Ig-γ1 chain C region	1.5	0.29	α2-Macroglobulin	2	0.20
Ig-κ chain V-Ⅰ region	1.3				
Ig-κ chain V-Ⅲ region	1.3				

【００４７】

具体的には、ＡＥＳＤで発現が上昇したタンパク質は、Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ１４（図１の符号Ｅ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０８５７１）、Ｉｇ γ－１ ｃｈａｉｎ Ｃ ｒｅｇｉｏｎ（図１の符号Ａ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０１８５７．１）、

Ｉｇ γ－２ ｃｈａｉｎ Ｃ ｒｅｇｉｏｎ（図１の符号Ｂ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０１８５９．２）、Ｉｇ κ ｃｈａｉｎ Ｖ－Ｉ ｒｅｇｉｏｎ（図１の符号Ｃ）、Ｉｇ κ ｃｈａｉｎ Ｖ－ＩＩＩ ｒｅｇｉｏｎ（図１の符号Ｃ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０１６２０．１）、Ｉｇ λ－２ ｃｈａｉｎ Ｃ ｒｅｇｉｏｎ（図１の符号Ｄ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０ＣＧ０５．１）、Ｉｇ ｈｅａｖｙ ｃｈａｉｎ Ｖ－ＩＩＩ ｒｅｇｉｏｎ（ＰＩＲ：Ｓ３４０１２）であった。

また、ＡＥＳＤで低下したタンパク質は、Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ（図１の符号ａ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０２６４９）、Ｇｅｌｓｏｌｉｎ（図１の符号ｂ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０６３９６）、Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ（図１の符号ｃ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ１０９０９）、α２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎ（図１の符号ｄ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：Ｐ０１０２３）であった。

【００４８】

以下に同定されたタンパク質の特徴を示す。

いずれのタンパク質も細胞外に局在する性質を有した。特にＡＥＳＤで上昇したタンパク質群は、炎症（免疫応答）に関連するタンパク質であった。一方、ＡＥＳＤで低下するタンパク質群として、ＧＳＮ（Ｇｅｌｓｏｌｉｎ）は繊毛形成に関与し、ＣＬＵ（Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ）は細胞外シャペロンとして働き、ストレス誘導性のタンパク質凝集を阻害する。ＡｐｏＥ（Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ）は抗酸化作用を示し、アミロイドβやｔａｕの重合を阻害する。Ａ２Ｍ（α２－Ｍａｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）はプロテアーゼの阻害作用を有する。興味深いことにＡｐｏＥとＡ２Ｍは同じレセプターＬＲＰ－１（ＵｎｉＰｒｏｔ ＩＤ： Ｑ０７９５４）を共有している。ＬＲＰ－１は肝臓、肺臓以外に脳にも多く発現しており、神経機能にも関与している。

【００４９】

なお、上記実施の形態の構成及び動作は例であって、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で適宜変更して実行することができることは言うまでもない。

【産業上の利用可能性】

【００５０】

本発明の脳症の検出方法、バイオマーカー、診断用組成物、及び診断用キットは、医師以外の検査技師等がＡＥＳＤの検出に用いることができ、産業上に利用することができる。

【図１】



フロントページの続き

(72)発明者　小島　華林
栃木県下野市薬師寺３３１１－１　学校法人自治医科大学医学部内
(72)発明者　山形　崇倫
栃木県下野市薬師寺３３１１－１　学校法人自治医科大学医学部内
(72)発明者　黒岩　憲二
栃木県下野市薬師寺３３１１－１　学校法人自治医科大学医学部内
(72)発明者　遠藤　仁司
栃木県下野市薬師寺３３１１－１　学校法人自治医科大学医学部内

Ｆターム(参考) 2G045 AA25　DA36　FB03　FB13