

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年1月16日(16.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/010667 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/98 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/068965
- (22) 国際出願日: 2013年7月11日(11.07.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-156420 2012年7月12日(12.07.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人帝京大学 (TEIKYO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1738605 東京都板橋区加賀2丁目1番1号 Tokyo (JP). 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (TOKYO METROPOLITAN GERIATRIC HOSPITAL AND INSTITUTE OF GERONTOLOGY) [JP/JP]; 〒1730015 東京都板橋区栄町3番2号 Tokyo (JP). 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP). 旭化成ファーマ株式会社 (ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田

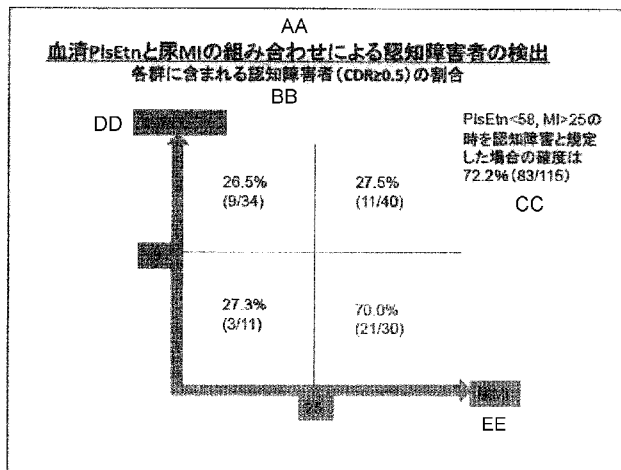
区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP). 国立大学法人福島大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION FUKUSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9601296 福島県福島市金谷川1番地 Fukushima (JP).

- (72) 発明者: 前場 良太 (MAEBA Ryouta); 〒1738605 東京都板橋区加賀2丁目1番1号 学校法人帝京大学内 Tokyo (JP). 荒木 厚 (ARAKI Atsushi); 〒1730015 東京都板橋区栄町3番2号 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター内 Tokyo (JP). 藤原 佳典 (FUJIWARA Yoshinori); 〒1730015 東京都板橋区栄町3番2号 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター内 Tokyo (JP). 小川 貴志子 (OGAWA Kishiko); 〒1730015 東京都板橋区栄町3番2号 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター内 Tokyo (JP). 原 博 (HARA Hiroshi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 西向 めぐみ (NISHIMUKAI Megumi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 酒瀬川 信一 (SAKASEGAWA Shinichi); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF EXAMINING COGNITIVE FUNCTION AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: 認知機能検査法、及びそのキット



- AA Examination of cognitive disability sufferers based on a combination of serum PlsEtn and urine MI
- BB Proportion of cognitive disability sufferers (CDR $\geq$ 0.5) contained in each group
- CC Accuracy when cognitive disability is identified as PlsEtn<58, MI>25 is 72.2% (83/115)
- DD Serum PlsEtn
- EE Urine MI

(57) Abstract: There are provided: a method of examination for identifying persons suffering from dementia or persons in the preliminary stage thereof, using a biomolecule as an index; a kit for use in this method of examination; an enzyme contained in this kit; and a method of manufacturing this enzyme. The method of inspection includes a step of assaying myoinositol (MI) in naturally excreted urine of the patient and a step of assaying ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) in serum or plasma of the same patient, and classifying patients whose MI content is at least a set threshold value and whose PlsEtn content is no more than a set threshold value as persons suffering from dementia or persons in the preliminary stage thereof.

(57) 要約: 生体分子を指標として認知症またはその前段階にある者を特定する検査方法、該検査方法に用いるキット、該キットに含有させる酵素、及び該酵素の製造方法を提供する。該検査方法は、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール (MI) を定量する工程と、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマロゲン (PlsEtn) を定量する工程とを含み、MI量が設定される閾値以上であり、PlsEtn量が設定される閾値以下である被験者を認知症患者またはその前段階にある者として分類する。



丁目 105 番地 Tokyo (JP). 松本 英之(MATSUMOTO Hideyuki); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 105 番地 Tokyo (JP). 松本優作(MATSUMOTO Yusaku); 〒9601296 福島県福島市金谷川 1 番地 国立大学法人福島大学内 Fukushima (JP). 杉森 大助(SUGIMORI Daisuke); 〒9601296 福島県福島市金谷川 1 番地 国立大学法人福島大学内 Fukushima (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK,

SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称： 認知機能検査法、及びそのキット

技術分野

[0001] 本発明は、生体分子を指標として認知症またはその前段階にある者を特定する検査方法、とその測定方法、該検査方法に用いるキット、該キットに含有させる酵素、及び該酵素の製造方法に関する。

[0002]

背景技術

[0003] 1. 認知症

認知症は後天的な脳の器質的障害により、正常に発達した知能が低下した状態をいう。記憶、判断力などの障害により社会生活が困難となる。近年では高齢化に伴い老人性認知症者が増加しており、その数は約200万人といわれ、さらに増加する傾向にある。

[0004]

認知症は症状が進行すると回復が困難になり、介護には多くの労力と金銭的負担が必要となるが、比較的軽度の段階で発見してリハビリ訓練等の治療を施すことにより発症予防やある程度の症状の回復が可能である。また抗認知症薬は症状の進行を抑制するための薬剤であることから、その処方は早ければ早いほど有効である。従って、認知症においては早期に治療対象者を特定することが重要となる。

[0005]

2. 認知症検査

従来、認知症の判定には、ウェクスラー成人知能検査（WAIS-R）、改訂長谷川式簡易知能評価スケール（HDS-R）、ミニメンタルステート検査（MMS、MMSE）、クリニカルデメンチアレーティング検査（CDR）、モントリオールコグニティブアセスメント検査日本語版（MOC-A-J）等の認知機能検査が利用されている。これらの検査は、専門の検査官が被

験者と対面して行うため、大規模なスクリーニングには不向きである。また被験者の意識状態、気分、意欲などが成績に影響を及ぼすことや、うつ病やせん妄、あるいは難聴との識別も別途に必要ななどの問題を有している。

[0006]

そこで、より客観的かつ簡便な認知症の検査方法として、生体分子（バイオマーカー）を指標とする方法が注目を集めている。例えば、代表的な認知症の一つであるアルツハイマー病の神経病理学的特徴は、アミロイド β （ $A\beta$ ）の沈着により形成される老人斑と、異常リン酸化タウ蛋白の出現に特徴付けられる神経原線維変化、そして大量の神経細胞脱落である。今日、アルツハイマー病の病態過程は $A\beta$ の産生により惹起されるというアミロイド仮説が提唱されている。これは、 $A\beta$ の産生に伴い神経細胞に酸化ストレスやカルシウム制御異常が誘導され、神経細胞死を引き起こす。また同時に、 $A\beta$ はタウ蛋白のリン酸化を誘導し、細胞骨格蛋白異常とそれに伴う細胞内輸送の障害を引き起こし、神経細胞を死に至らしめるというものである。 $A\beta$ はアミロイド前駆体蛋白から通常では作用しない β セクレターゼおよび γ セクレターゼにより切断されて生成する。 $A\beta$ には主に42個のアミノ酸から構成される $A\beta_{42}$ と40個のアミノ酸から成る $A\beta_{40}$ があり、前者が凝集能や神経毒性が高い点から、アルツハイマー病の発症により重要であると考えられている。脳脊髄液中の $A\beta_{42}$ の減少（脳内で $A\beta_{42}$ の沈着に起因）は、現状では最も信頼のできるアルツハイマー病診断指標の一つとされている。また、アルツハイマー病では脳脊髄液中のリン酸化タウ蛋白の増加も確認されており、病態と密接に関連した診断指標として位置づけられている。しかし、脳脊髄液は一般的な健康診断で扱う血液や尿とは異なり、その採取には特殊な技術を要し、また患者への負担も大きいことから、高齢者等のスクリーニング検査としては不向きである。

[0007]

その他にもさまざまな酸化ストレスマーカーや炎症マーカー、アポトーシス

関連マーカーなどが認知症の検査指標として検討されている。酸化により糖化修飾された *glycated protein* や核酸が酸化された *8-hydroxyguanosine* はアルツハイマー病の脳脊髄液中で増加することが報告されており、不飽和脂肪酸の酸化生成物である *F2-isoprostane* は脳脊髄液、血液、尿中で増加すると報告されている。また、炎症マーカーでは *IL-1 β* や *IL-6*、*TGF- β 1* などが脳脊髄液中で増加、アポトーシスに関連する *TRAIL* も脳脊髄液中での増加が報告されている。しかし、酸化ストレスや炎症、アポトーシスは、いずれもアルツハイマー病を含む認知症の病理・病態に深く関係する現象ではあるが、必ずしも特異的であるとは言えないことから、認知症のバイオマーカーとして好ましいものではない。

[0008]

3. エタノールアミン型プラスマローゲン（以下 *PlsEt n* と略す。）
プラスマローゲン（以下 *Pls* と略す。）はグリセロリン脂質のサブクラスの一つで、生体膜成分として人体を構成するリン脂質の約2割を占め、脳や心臓などに多く含まれている。この *Pls* は、生活習慣病（動脈硬化症、高脂血症、糖尿病、高血圧症、中心性肥満症）のバイオマーカーとして検討されている（特許文献1、2）。また、特に脳内のエタノールアミン型プラスマローゲン（*PlsEt n*）は、神経髄鞘を成すミエリン膜の主要構成成分であり、また神経細胞間でのシナプス形成などに関わるとされる。*PlsEt n* は膜モデュレーターとして機能し、細胞膜融合やエンドサイトーシス／エキソサイトーシスに関与するのに加え、膜結合酵素の活性調節などにも関わっている。また、*Pls* はその構造上の特徴を成すビニルエーテル結合にラジカル消去能があることから、生体内で抗酸化物質として作用すると考えられている。

[0009]

PlsEt n はアルツハイマー病やダウン症候群、脊髄損傷、多発性硬化症などで脳内レベルの特異的な減少が報告されている（非特許文献1）。特に

、アルツハイマー病では酸化ストレスがその発症の初期段階で重要であることを支持する生化学的・臨床的証拠が集積していることから、P l s E t n はアルツハイマー病の酸化ストレスマーカーとして注目されている（非特許文献2）。例えば、P l s E t n の一分子種であるP l s E t n 2 2 : 6 の血清または血漿中濃度の低下がアルツハイマー病の早期発見マーカーとなり得ることが報告されている（非特許文献3）。ただし、P l s E t n 2 2 : 6 の測定（定量）には液体クロマトグラフィー質量分析（L C - M S / M S ）などの高価な分析機器が必要であり、また定量のための内部標準物質の調整等も煩雑であることから、通常健康診断に付随させることのできる大規模スクリーニングには不向きである。一方、本発明者らは、特許文献1等に記載の簡便な方法で健康高齢者および認知障害者の血清または血漿中のP l s E t n 量（以下、「血清／血漿P l s E t n 量」と記載することがある）を測定（定量）し、認知機能検査（C D R）の結果別に比較したところ、P l s E t n 量は認知機能の低下を良く反映することを見出している（非特許文献4）。

[0010]

P l s E t n の測定方法としては、特許文献1に記載された放射性ヨウ素－高速液体クロマトグラフィー（1 2 5 I - H P L C）法、L C - M S 法（特許文献5）が公知である。

[0011]

4. ミオイノシトール（以下M I と略す場合がある。）

M I は9種類あるイノシトールの異性体の一つで、人体を含む天然に最も豊富に存在する。生体中のM I は食餌からの摂取に加え、体内でグルコースからも生合成される。M I は細胞内情報伝達物質のソースとなるイノシトールリン脂質や、カルシウムイオンの恒常性維持に関わるイノシトールリン酸の合成材料として重要である。さらに、M I 自身も脳内の有機性浸透圧調製物質として、また、おそらくミエリン形成への関与の可能性といった点から、中枢神経系の正常な機能維持に重要な役割をもつと考えられる。

[0012]

脳内M I 濃度は血中レベルの200倍程度もあり、うつ病などの感情障害やダウン症候群など様々な病態で脳内M I の増加が報告されている。またアルツハイマー病患者においても脳内M I 量の増加が報告されている。（非特許文献6）。脳内M I の一部は、脳血液関門を通過して循環血液に入るが、ほとんどが腎臓で再吸収されるか分解され、尿に排泄されるM I 量（以下、「尿M I 量」と記載することがある）はごくわずかである。再吸収過程が血糖と拮抗することから、高血糖状態ではそのレベルを反映して尿M I 量が増加するため、糖負荷試験による境界型糖尿病の検出の際に血糖値に代替できる測定項目として注目されており（非特許文献5）、糖尿病予備群の検査（特許文献3）あるいは軽症耐糖能異常やインスリン分泌不全の検出（特許文献4）のためのバイオマーカーとして使用されている。

[0013]

5. P I s とM I の関係

M I は体内（特に脳内）でのP I s 合成に於いて重要な役割を担うと考えられ、M I の体外ロス（長期の持続的な尿中排泄の増加）はP I s の体内（特に脳内）合成の低下を招くと推測される。M I の尿中排泄はグルコースと拮抗することから、高血糖状態はM I の尿中排泄量を増加させる一因と思われる。したがって、特に、糖尿病などの高血糖状態を有する者では、高血糖状態 → 尿M I 排泄の増加 → 脳内P I s E t n の減少 → 認知症発症という仮説が提唱できる。また、高血糖に限らず、何らかの原因で尿M I 排泄の増加がみられる場合も、脳内P I s E t n の減少 → 認知症発症に至るリスクが高いと考えられる。ただし、尿M I 量に関しては高齢健常者と認知症患者とで有意差は認められず、また認知機能検査の結果と尿M I 量にも有意な相関が得られないことが報告されている（非特許文献7）。

[0014]

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：特開2007-33410号公報（特許第4176749号）

特許文献2：特開2011-257148号公報

特許文献3：特開2001-190299号公報（特許第3975279号）

特許文献4：国際公開WO2003/083133（特許第4466912号）

特許文献5：特開2011-136926号公報

非特許文献

[0016] 非特許文献1：Lebig J. et al. : Plasmalogens in biological systems: Their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. Curr Med Chem 16: 2021-41, 2009

非特許文献2：Han X. et al. : Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. J Neurochem 77:1168-80, 2001

非特許文献3：Goodenowe DB. et al. : Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: A logical causative factor in alzheimer's disease and dementia. J Lipid Res 48: 2485-2498, 2007

非特許文献4：前場良太他、血清プラスマローゲンの認知機能評価のバイオマ

ーカーとしての有効性の検討 Dementia Japan Vol. 24 No. (3), p144-47, 2011

非特許文献5: Sarashina G. et al.: A study of urinary myo-inositol as a sensitive marker of glucose intolerance. Clinica Chimica Acta 344:181-8, 2004

非特許文献6: Zhu X. et al.: Effects of Alzheimer disease on fronto-parietal brain N-acetyl aspartate and myo-inositol using magnetic resonance spectroscopic imaging. Alzheimer Dis Assoc Disord 20: 77-85, 2006

非特許文献7: 前場良太他、自然排泄尿ミオイノシトールの臨床的意義に関する検討 第58回日本臨床検査医学会学術集会抄録集 p95-0025

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 前記のとおり、認知症を予防し、あるいはその進行を抑制するためには早期の発見が重要であり、客観的な指標であるバイオマーカーを用いた大規模なスクリーニングの実施が有効である。そしてバイオマーカーに求められることは、認知症患者またはその前段階にある者を的確に（すなわち他の疾患患者と混同することなく）特定できることであり、また通常健康診断の範囲内で実施できるような簡便な測定（定量）と判定が可能なことである。

[0018]

このような観点から、血清及び／又は血漿 P l s E t n 量は認知症検査、特にその大規模スクリーニングのためのバイオマーカーとして有望視されている。しかしながら、血清／血漿 P l s E t n 量を単独指標とした場合の判定精度は必ずしも十分なものではない。たとえば後記の実施例に示したように

、P l s E t n量がその平均的な値（58 μ M）を下回った被験者のうち、認知機能検査で認知症と判定された者の割合は60%未満である。

[0019]

本発明は、血清及び／又は血漿P l s E t n量をバイオマーカーとする認知症検査の精度をさらに向上させる手段を提供することを課題としている。

[0020]

また前記のとおり従来のP l s E t n測定法の125I-HPLC法は高額な装置や放射性ヨウ素を使用するので汎用性が劣る。LC-MS/MS法は高額な装置を使用するので汎用性が劣る。以上のような背景のもと本発明は、汎用自動分析機に応用でき、利便性高いP l s E t nの測定方法を提供することを目的とする。

[0021]

課題を解決するための手段

[0022] 本発明者らは、それ単独の定量では認知機能との関連性が存在しない尿M l量の定量値と血清及び／又は血漿P l s E t nの定量値を組み合わせることで、認知症検査の精度が向上することを見出し、P l s E t nに特異的に作用するリゾプラスマローゲナーゼ（L y s o p l a s m a l o g e n a s e、l y P l s a s eと略す場合がある）とホスホリパーゼ（以下PLと略す場合がある。）を新規に見出し、被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量するためのl y P l s a s eとPLを含有する認知症検査試薬キットを創出して本発明を完成させた。

[0023]

すなわち、本出願は前記の課題を解決する発明として以下を提供する。

[0024]

[1]

被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するための認知症検査方法であって、

被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M l）を定量する工程と、同

一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する工程とを含み、
健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、
自然排泄尿中のミオイノシトール（M l）の予め求められた閾値と、血清
または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）の予
め求められた閾値のそれぞれに対して、前記被験者のミオイノシトール（M
l）の定量値とエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）の定
量値を比較する工程を含む認知症検査方法。

[0025]

[1 - 1]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P
l s E t n）を定量する工程が、酵素を利用する反応により、最終的に過酸
化水素が生成され、該エタノールアミン型プラスマローゲンの存在量に対応
して発生する過酸化水素の量を検出して、血清または血漿中の P l s E t n
量を算出する工程を含む [1] の方法。

[0026]

[1 - 2]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P
l s E t n）を定量する方法が、以下の（１）～（３－４）の工程を含む [1] に記載の方法。

（１）エタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノール
アミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素
を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲ
ン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l
s E t n）に加水分解する工程：

（２）エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）をグ
リセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつ
エーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分

解酵素を用いて、前記（１）にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（L y P l s E t n）をグリセロー３－ホフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する工程：及び

（３－１）グリセロー３－ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにせしめる酵素にて、工程（２）で得られたグリセロー３－ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにする工程：

（３－２）エタノールアミンを酸化する酵素により、エタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

（３－３）過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

（３－４）前記被験者の血清または血漿中のP l s E t n量を算出する工程：

または前記（２）の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する方法が、前記（１）～（３－４）の工程に先立つか、少なくとも前記（２）工程の前までに、下記（４）及び（５）を含む工程を行うことを特徴とする方法。

（４）ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

（５）リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記（４）工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0027]

[1－3]

前記工程（２）の加水分解酵素が、下記（a）または（b）の酵素のいずれかである[1－2]に記載の方法。

（a）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列：

(b) 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (I y P I s E t n) を加水分解し、グリセロール 3-ホスホエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する。

[0028]

[1-4]

前記工程 (1) のエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (I y P I s E t n) に加水分解できる酵素、が下記 (c) または (d) のいずれかの酵素である [1-2] に記載の方法。

(c) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列：

(d) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (I y P I s E t n) に加水分解する作用を触媒する。

[0029]

[1-5]

前記 (2) の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) を定量する方法が、前記 (1) ~ (3-4) の工程に先立つか、少なくとも前記 (2) 工程の前までに、下記 (4) 及び (5) を含む工程を行うことを特徴とする [1-1] ~ [1-4] に記載の方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0030]

[1-6]

前記工程(4)のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ(PL)を使用し、該PLは、前記工程(1)のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P l s E t n)に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施と同時に、または前記工程(5)の実施後に、前記工程(1)が完了し、以後前記工程(2)～(3-4)を実施する[1-5]に記載の方法。

[0031]

[1-7]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)を定量する方法が、以下の(1)～(3-3)の工程を含む[1-1]に記載の方法。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P l s E t n)に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P l s E t n)に加水分解する工程：

(2) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P l s E t n)をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解でき、かつリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる加水分解酵素を用いて、前記(1)にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P

l s E t n) をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解する工程：及び

(3-1) ` エタノールアミンを酸化する酵素により、工程(2) ` で得られたエタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

(3-2) ` 過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

(3-3) ` 前記被験者の血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程。

[0032]

[1-8-1]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する方法が、前記(1)～(3-3) ` の工程に先立つか、少なくとも前記(2) ` 工程の前までに、下記(4)及び(5)を含む工程を行うことを特徴とする[1-7]に記載の方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0033]

[1-8-2]

前記工程(4)のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ(PL)を使用し、該PLは、前記工程(1)のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施

と同時、または前記工程（５）の実施後に、前記工程（１）が完了し、以後前記工程（２）～（３－３）'を実施する〔１－８－１〕に記載の方法。

[0034]

〔１－９〕

自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の予め求められた閾値が、 $21.6 \sim 63.3 \text{ mg/g Cr}$ の範囲から選択される値であり、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の予め求められた閾値が、 $50 \sim 64 \mu\text{M}$ の範囲から選択される値であって、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の定量値が、前記M I閾値を越え、かつ被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の定量値が、前記P I s E t n閾値を下回った場合に、認知症患者またはその前段階にある者と区分する〔１〕に記載の方法。

[0035]

〔１－１０〕

前記M I量の閾値が 25 mg/g Cr である〔１－９〕に記載の方法。

[0036]

〔１－１１〕

前記M I量の閾値が 33.2 mg/g Cr である〔１－９〕に記載の方法。

[0037]

〔１－１２〕

前記M I閾値が 36.6 mg/g Cr である〔１－９〕に記載の方法。

[0038]

〔１－１３〕

前記M I量の閾値が 44.8 mg/g Cr である〔１－９〕に記載の方法。

[0039]

〔１－１４〕

前記エタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）閾値が、 $58 \mu\text{M}$ である〔１－９〕に記載の方法。

[0040]

[1 - 1 5]

前記エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) 閾値が、 $61\mu\text{M}$ である [1 - 9] に記載の方法。

[0041]

[1 - 1 6]

前記エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) 閾値が、 $56\mu\text{M}$ である [1 - 9] に記載の方法。

[0042]

[1 - 1 7]

前記被験者の M l 量が $21.6 \sim 55.1\text{mg/gCr}$ の範囲から設定される閾値以上であり、 P l s E t n 量が $50 \sim 64\mu\text{M}$ の範囲から設定される閾値以下である [1 - 9] に記載の方法。

[0043]

[1 - 1 8]

前記被験者の M l 量が $21.6 \sim 55.1\text{mg/gCr}$ の範囲から設定される閾値以上であり、 P l s E t n 量が $52 \sim 61\mu\text{M}$ の範囲から設定される閾値以下である [1 - 9] に記載の方法。

[0044]

[1 - 1 9]

前記被験者の M l 量が $29.8 \sim 63.3\text{mg/gCr}$ の範囲から設定される閾値以上であり、 P l s E t n 量が $50 \sim 64\mu\text{M}$ の範囲から設定される閾値以下である [1 - 9] に記載の方法。

[0045]

[1 - 2 0]

前記被験者の M l 量が $29.8 \sim 63.3\text{mg/gCr}$ の範囲から設定される閾値以上であり、 P l s E t n 量が $52 \sim 61\mu\text{M}$ の範囲から設定される閾値以下である [1 - 9] に記載の方法。

[0046]

[1 - 2 1]

前記M I 量の閾値が3 6 . 6 m g / g C rであり、P l s E t n 量の閾値が5 8 μ Mである [1 - 9] 記載の方法。

[0047]

[1 - 2 2]

前記M I 量の閾値が3 6 . 6 m g / g C rであり、P l s E t n 量の閾値が5 6 μ M又は6 1 μ Mである [1 - 9] に記載の方法。

[0048]

[1 - 2 3]

前記M I を定量する尿が、特に被験者の空腹時随意尿である [1 - 9] に記載の方法。

[0049]

[2]

健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) の予め求められた閾値と、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する認知症検査に用いるものであって、

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) の、予め求められた閾値に対して、被験者のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) の定量値を比較する工程を含む、エタノールアミン型プラスマローゲンの定量方法。

[0050]

[2 - 1]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P

l s E t n) を定量する工程が、酵素を利用する反応により、最終的に過酸化水素が生成され、該エタノールアミン型プラスマローゲンの存在量に対応して発生する過酸化水素の量を検出して、血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程を含む [2] の方法。

[0051]

[2 - 2]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する方法が、以下の (1) ~ (3 - 4) の工程を含む [2] に記載の方法。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解する工程 :

(2) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をグリセロー 3 - ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素を用いて、前記 (1) にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をグリセロー 3 - ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する工程 : 及び

(3 - 1) グリセロー 3 - ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにせしめる酵素にて、工程 (2) で得られたグリセロー 3 - ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにする工程 :

(3 - 2) エタノールアミンを酸化する酵素により、エタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程 :

(3 - 3) 過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程 : 及び

(3 - 4) 前記被験者の血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程 :

または前記（２）の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する方法が、前記（１）～（３－４）の工程に先立つか、少なくとも前記（２）工程の前までに、下記（４）及び（５）を含む工程を行うことを特徴とする方法。

（４）ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

（５）リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記（４）工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0052]

[2－3]

前記工程（２）の加水分解酵素が、下記（a）または（b）の酵素のいずれかである [2－2] に記載の方法。

（a）配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列：

（b）配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）を加水分解し、グリセロー 3－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する。

[0053]

[2－4]

前記工程（１）のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素が、下記（c）または（d）のいずれかの酵素である [2－2] に記載の方法。

(c) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列：

(d) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解する作用を触媒する。

[0054]

[2 - 5]

前記 (2) の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する方法が、前記 (1) ～ (3 - 4) の工程に先立つか、少なくとも前記 (2) 工程の前までに、下記 (4) 及び (5) を含む工程を行うことを特徴とする [2 - 2] ～ [2 - 4] に記載の方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記 (4) 工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0055]

[2 - 6]

前記工程 (4) のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ (P L) を使用し、該 P L は、前記工程 (1) のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該 P L を添加することなく前記工程 (1) の工程を進行せしめ、前記工程 (5) を実施

と同時、または前記工程（５）の実施後に、前記工程（１）が完了し、以後前記工程（２）～（３－４）を実施する〔２－５〕に記載の方法。

[0056]

〔２－７〕

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する方法が、以下の（１）～（３－３）'の工程を含む〔２－１〕に記載の方法。

（１）エタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解する工程：

（２）'エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解でき、かつリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる加水分解酵素を用いて、前記（１）にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解する工程：及び

（３－１）'エタノールアミンを酸化する酵素により、工程（２）'で得られたエタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

（３－２）'過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

（３－３）'前記被験者の血清または血漿中のP l s E t n量を算出する工程。

[0057]

〔２－８〕

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する方法が、前記（１）～（３－３）'の工程に先立つ

か、少なくとも前記（２）工程の前までに、下記（４）及び（５）を含む工程を行うことを特徴とする〔２－７〕に記載の方法。

（４）ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

（５）リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記（４）工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0058]

〔２－９〕

前記工程（４）のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ（PL）を使用し、該PLは、前記工程（１）のエタノールアミン型プラスマローゲン（PlsEtn）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（LyPlsEtn）に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程（１）の工程を進行せしめ、前記工程（５）を実施と同時に、または前記工程（５）の実施後に、前記工程（１）が完了し、以後前記工程（２）～（３－３）'を実施する〔２－８〕に記載の方法。

[0059]

〔３〕

健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（PlsEtn）の予め求められた閾値と、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（PlsEtn）の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する認知症検査に用いるものであって、

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P

l s E t n) を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) の、予め求められた閾値に対して、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) の定量値を比較する工程を含む、ミオイノシトール (M I) の定量方法。

[0060]

[3 - 1]

自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) の予め求められた閾値が、 $21.6 \sim 63.3 \text{ mg/g Cr}$ の範囲から選択される値であり、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) の予め求められた閾値が、 $50 \sim 64 \mu\text{M}$ の範囲から選択される値であって、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) の定量値が、前記 M I 閾値を越え、かつ被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) の定量値が、前記 P l s E t n 閾値を下回った場合に、認知症患者またはその前段階にある者と区分する [3] に記載の方法。

[0061]

[3 - 2]

前記 M I 量の閾値が 25 mg/g Cr である [3 - 1] に記載の方法。

[0062]

[3 - 3]

前記 M I 量の閾値が 33.2 mg/g Cr である [3 - 1] に記載の方法。

[0063]

[3 - 4]

前記 M I 閾値が 36.6 mg/g Cr である [3 - 1] に記載の方法。

[0064]

[3 - 5]

前記 M I 量の閾値が 44.8 mg/g Cr である [3 - 1] に記載の方法。

[0065]

[3 - 6]

前記エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) 閾値が、 $58\mu\text{M}$ である [3 - 1] に記載の方法。

[0066]

[3 - 7]

前記エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) 閾値が、 $61\mu\text{M}$ である [3 - 1] に記載の方法。

[0067]

[3 - 8]

前記エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) 閾値が、 $56\mu\text{M}$ である [3 - 1] に記載の方法。

[0068]

[3 - 9]

前記被験者のM l 量が $21.6\sim 55.1\text{mg/gCr}$ の範囲から設定される閾値以上であり、P l s E t n 量が $50\sim 64\mu\text{M}$ の範囲から設定される閾値以下である [3 - 1] に記載の方法。

[0069]

[3 - 1 0]

前記被験者のM l 量が $21.6\sim 55.1\text{mg/gCr}$ の範囲から設定される閾値以上であり、P l s E t n 量が $52\sim 61\mu\text{M}$ の範囲から設定される閾値以下である [3 - 1] に記載の方法。

[0070]

[3 - 1 1]

前記被験者のM l 量が $29.8\sim 63.3\text{mg/gCr}$ の範囲から設定される閾値以上であり、P l s E t n 量が $50\sim 64\mu\text{M}$ の範囲から設定される閾値以下である [3 - 1] に記載の方法。

[0071]

[3 - 1 2]

前記被験者のM I量が29.8～63.3 mg/g Crの範囲から設定される閾値以上であり、P l s E t n量が52～61 μ Mの範囲から設定される閾値以下である〔3-1〕に記載の方法。

[0072]

〔3-13〕

前記M I量の閾値が36.6 mg/g Crであり、P l s E t n量の閾値が58 μ Mである〔3-1〕に記載の方法。

[0073]

〔3-14〕

前記M I量の閾値が36.6 mg/g Crであり、P l s E t n量の閾値が56 μ M又は61 μ Mである〔3-1〕に記載の方法。

[0074]

〔3-15〕

前記M Iを定量する尿が、特に被験者の空腹時随意尿である〔3-1〕に記載の方法。

[0075]

〔4〕

被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するための認知症検査方法に用いられる手段であって、

被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール(M I)を定量する手段と、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)を定量する手段とを含み、

健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール(M I)の予め求められた閾値と、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)の予め求められた閾値のそれぞれに対して、前記被験者のミオイノシトール(M I)の定量値とエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)の定量値を比較して用いる認知症検査手段。

[0076]

[4 - 1]

前記手段が試薬キットである [4] に記載の認知症検査手段。

[0077]

[4 - 2]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する試薬キットが、以下の (1 a) ~ (3 a) を含む [4 - 1] に記載の試薬キット。

(1 a) エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

(2 a) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をグリセロール 3 - ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

(3 a) グリセロール 3 - ホスフォエタノールアミンをエタノールアミンとグリセリン酸に変換する酵素、エタノールアミンをグリコールアルデヒド、アンモニア、及び過酸化水素に変換する酵素とその酵素反応を進めるにことのできる添加物、さらに必要により過酸化水素を定量するための過酸化水素定量手段。

または前記 (2 a) の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記 (1 a) に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む [4 - 1] に記載の試薬キット。

[0078]

[4 - 2 - 1]

前記 (2 a) の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記 (1 a) に、さらにリゾホスファチジルエ

タノールアミンを加水分解する酵素を含む〔４－２〕に記載の試薬キット。

[0079]

〔４－３〕

前記（２ a）の加水分解酵素が、下記（a）または（b）の酵素のいずれかである〔４－２〕または〔４－２－１〕に記載の試薬キット。

（a）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列：

（b）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（I y P I s E t n）を加水分解し、グリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する。

[0080]

〔４－４〕

前記（１）のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（I y P I s E t n）に加水分解できる酵素、が下記（c）または（d）のいずれかの酵素である〔４－２〕または〔４－２－１〕に記載の試薬キット。

（c）配列番号５に記載のアミノ酸配列：

（d）配列番号５に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（I y P I s E t n）に加水分解する作用を触媒する。

[0081]

〔５〕

健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の予め求められた閾値と、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者が

否かを分類する認知症検査に用いるものであって、
同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）の、予め求められた閾値に対して、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）の定量値を比較して用いる、エタノールアミン型プラスマローゲンの定量手段。

[0082]

[5 - 1]

前記手段が試薬キットである [5] に記載の定量手段。

[0083]

[5 - 2]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する試薬キットが、以下の（1 a）～（3 a）を含む [5 - 1] に記載の試薬キット。

（1 a）エタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物

（2 a）エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）をグリセロール 3 - ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物

（3 a）グリセロール 3 - ホスフォエタノールアミンをエタノールアミンとグリセロリン酸に変換し、エタノールアミンをグリコールアルデヒド、アンモニア、及び過酸化水素に変換する酵素とその酵素反応を進めるにことのできる添加物、さらに必要により過酸化水素を定量するための過酸化水素定量手段。

または前記（２ a）の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記（１ a）に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む〔５－１〕記載の試薬キット。

[0084]

〔５－２－１〕

前記（２ a）の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記（１ a）に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む〔５－２〕に記載の試薬キット。

[0085]

〔５－３〕

前記（２ a）の加水分解酵素が、下記（a）または（b）の酵素のいずれかである〔５－２〕または〔５－２－１〕に記載の試薬キット。

（a）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列：

（b）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）を加水分解し、グリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する。

[0086]

〔５－４〕

前記（１ a）のエタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）に加水分解できる酵素、が下記（c）または（d）のいずれかの酵素である〔５－２〕または〔５－２－１〕に記載の試薬キット。

（c）配列番号５に記載のアミノ酸配列：

（d）配列番号５に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型

プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解する作用を触媒する。

[0087]

[6]

健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）の予め求められた閾値と、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する認知症検査に用いるものであって、

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の、予め求められた閾値に対して、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の定量値を比較して用いる、ミオイノシトール（M I）の定量手段。

[0088]

[6 - 1]

前記手段が試薬キットである [6] に記載の定量手段。

[0089]

なお、本発明の実施の形態における認知症とは、知能、記憶、見当識含む認知の障害を指し、加齢に伴う現象は含まず、病的に能力が低下する障害を指す。「認知症患者」とは、記憶、判断力などの障害により社会生活が困難な者（特に高齢者）をいう。具体的には、認知機能検査によって認知障害を有するレベルと判定される者（例えば、C D Rスコアが1. 0以上）である。また「認知症の前段階にある者」とは、例えば日常生活において記憶、判断力に衰えが観察される者などであり、W A I S - R、H D S - R、M M S、M M S E、C D R、M o C A - J等の認知機能検査方法で検出できる最も軽

度な段階を含み、例えばCDRスコアが0.5以上、1.0未満のような者が好ましい。認知症の原因となる疾患は、例えば脳血管障害、アルツハイマー病、正常圧水頭症、代謝障害、栄養障害、甲状腺機能低下、鬱病などがあるが、一例としてアルツハイマー病が挙げられる。

[0090]

「手段」とは組成物、試薬、酵素あるいはそれらの組み合わせの総称を言う。組成物は組成物中の各成分を単一の組成物としてもよいが、2以上の組成物に分離する場合、このような2以上の組成物を合わせてキットという。

「定量」とは「測定」、「検出」等を含む概念をいう。

又本発明に関連する発明として以下が提示される。

[0091]

[7]

被験者の試料のPlsEtnを定量する方法であって、以下の(1)～(3-4)の工程を含む方法。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン(PlsEtn)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(lyPlsEtn)に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(PlsEtn)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(lyPlsEtn)に加水分解する工程：

(2) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン(lyPlsEtn)をグリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、エーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素を用いて、前記(1)にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(lyPlsEtn)をグリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する工程：及び

(3-1) グリセロー3-ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにせしめる酵素にて、工程(2)で得られたグリセロー3-ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにする工程：

(3-2) エタノールアミンを酸化する酵素により、エタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

(3-3) 過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

(3-4) 前記被験者の血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程：

または前記(2)の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する方法が、前記(1)～(3-4)の工程に先立つか、少なくとも前記(2)工程の前までに、下記(4)及び(5)を含む工程を行うことを特徴とする方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0092]

[8]

前記工程(2)の加水分解酵素が、下記(a)または(b)の酵素のいずれかである[7]に記載の方法。

(a) 配列番号1または2に記載のアミノ酸配列：

(b) 配列番号1または2に記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する。

[0093]

[9]

前記工程（１）のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素、が下記（c）または（d）のいずれかの酵素である〔７〕に記載の方法。

（c）配列番号５に記載のアミノ酸配列：

（d）配列番号５に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解する作用を触媒する。

[0094]

[1 0]

前記（２）に加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、被験者の試料のP l s E t nを定量する方法が、前記（１）～（３－４）の工程に先立つか、少なくとも前記（２）工程の前までに、下記（４）及び（５）を含む工程を行うことを特徴とする〔７〕に記載の方法。

（４）ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

（５）リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記（４）工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0095]

[1 1]

前記工程（４）のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ（P L）を

使用し、該PLは、前記工程（１）のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程（１）の工程を進行せしめ、前記工程（５）を実施と同時に、または前記工程（５）の実施後に、前記工程（１）が完了し、以後前記工程を（２）～（３－４）実施する〔１０〕に記載の方法。

[0096]

[1 2]

被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する試薬キットであって、以下の（１a）～（３a）を含む試薬キット。

（１a）エタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

（２a）エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

（３a）グリセロー３－ホスフォエタノールアミンをエタノールアミンとグリセロリン酸に変換する酵素、エタノールアミンをグリコールアルデヒド、アンモニア、及び過酸化水素に変換する酵素とその酵素反応を進めるにことのできる添加物、さらに必要により過酸化水素を定量するための過酸化水素定量手段。

[0097] または前記（２a）の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記（１a）に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む試薬キット。

[0098]

[1 2 － 1]

前記（２ a）の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記（１ a）に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む〔１ ２〕に記載の試薬キット。

[0099]

[1 3]

前記（２ a）の加水分解酵素が、下記（a）または（b）の酵素のいずれかである〔１ ２〕または〔１ ２－１〕に記載の試薬キット。

（a）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列：

（b）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（I y P I s E t n）を加水分解し、グリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する。

[0100]

[1 4]

前記（１ a）のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（I y P I s E t n）に加水分解できる酵素が、下記（c）または（d）のいずれかの酵素である〔１ ２〕または〔１ ２－１〕に記載の試薬キット。

（c）配列番号５に記載のアミノ酸配列：

（d）配列番号５に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（I y P I s E t n）に加水分解する作用を触媒する。

[0101]

[1 5]

下記（A）または（B）の塩基配列を含む遺伝子。

（A）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列からなる酵素をコードする

:

(B) 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (I y P I s E t n) を加水分解し、グリセロール 3-ホスホエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する酵素をコードする。

[0102]

[1 6]

[1 5] に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

[0103]

[1 7]

[1 6] に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

[0104]

[1 8]

前記酵素の製造方法であって：

[1 5] に記載の遺伝子をもつ微生物、または [1 7] に記載の形質転換体を培地で培養する工程：

培養物中に [1 3] に記載の酵素を生成蓄積させる工程：及び

該培養物から該蛋白質を採取する工程：

を含む方法。

[0105]

[1 9]

前記 P I s E t n を定量する試薬キットに含有させる下記 (c) または (d) の酵素：

(c) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列：

(d) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマロー

ゲン (l y P l s E t n) に加水分解する作用を触媒する。

[0106]

微生物の寄託

[0107] 本発明に係る以下の微生物をブダペスト条約に基づき国際寄託している。

[N A 2 9 7]

寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター

住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8

寄託日：2010年12月7日

受託番号：NITE BP-1014

[T h e r m o c r i s p u m s p .]

寄託機関：独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター

住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
122号

寄託日：2013年5月17日

受託番号：NITE BP-01628

発明の効果

[0108] 検査の実施形態および被験者への負担を実施的に増大させることなく、血清及び／又は血漿中 P l s E t n 量の定量による認知検査の精度を向上させることが可能となる。

[0109]

尿 M I 量の定量と血清及び／又は血漿 P l s E t n 量の定量を併用することで、認知機能の障害のレベルを高い確度で評価することもできる。従って、すでに認知症を発症している患者のみならず、認知症の前段階にある者をも特定することが可能となる。

[0110]

被験者の血清または血漿中の P l s E t n を定量するための l y P l s a s e と P L を含有する認知症検査試薬キットを提供することが可能となる。

[0111]

図面の簡単な説明

[0112] [図1]実施例において定量した全被験者を群別した場合の尿M I 量である。実測値は表5に示した。

[図2]実施例において、健常者群と「もの忘れ」群のそれぞれについて尿M I 量およびH b A 1 c 量がP l s E t n 量に及ぼす影響を検討した結果である。

[図3]実施例において、全高齢者（健常+「もの忘れ」群）を対象に血清P l s E t n（E P）量と尿M I 量の全定量値の平均値を境に4群に分割して、各群での認知機能検査結果を比較した結果である。実測値は表6に示した。

[図4]血清P l s E t n 量が $58\mu\text{M}$ 未満、尿M I 量が 25mg/gCr 以上をそれぞれの基準とした場合の認知症患者（ $\text{CDR} \geq 0.5$ ）の検出確度を検討した結果である。

[図5]全高齢者、尿M I 量 $>25\text{mg/gCr}$ 高齢者群および尿M I 量 $>36.6\text{mg/gCr}$ 高齢者群の3群について、血清P l s E t n 量の認知機能正常（ CDR 値：0）と認知機能非正常（ CDR 値：0.5以上）を分別する精度について、Receiver Operating Characteristic（ROC）解析によるROC曲線下の面積（Area under the curve：AUC）を求めることによって調べた結果である。

[図6]血清P l s E t n 量の認知機能評価能と既存の認知機能検査法との相関性を、対象者を全高齢者、尿M I 量 $>25\text{mg/gCr}$ 高齢者群および尿M I 量 $>36.6\text{mg/gCr}$ 高齢者群の3群について検討した結果である。実測値は表7に示した。

[図7]本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n 量を、P L 及び加水分解酵素を用いて定量する方法の一例を示す概略図。

[図8]本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n 量を、P L 及び加水分解酵素を用いて定量する方法の、図7と別異なる一例を示す概略図。

[図9]ホスファチジルエタノールアミンを実質的に消去する工程を示す概略図。

[図10]被験の、3日分の随時尿中MI定量値と空腹時二番尿中MI定量値の平均値を比較した相関図。

[図11]プール血清中PlsEtn（図中白丸）と0.9%食塩水中PlsEtn（図中黒丸）を、酵素を利用して定量した検量線。

[図12]125I-HPLC法と*Pseudomonas putida*由来lyPlsaseを利用した血清または血漿中のPlsEtnの定量値を比較した相関図。

[図13]125I-HPLC法と*Thermocrispum* sp. 由来lyPlsaseを利用した血清または血漿中のPlsEtnの定量値を比較した相関図。

[図14]125I-HPLC法とPLDを利用した血清または血漿中のPlsEtnの定量値を比較した相関図。

[図15]*Thermocrispum* sp. 由来lyPlsase*Streptomyces lividans*組換え体酵素を示す（図中矢印）SDS-PAGE。

[図16]粗蛋白質液中*Thermocrispum* sp. 由来lyPlsase大腸菌組換え体酵素を示す（図中矢印）SDS-PAGE。

[0113]

発明を実施するための形態

[0114] 本発明は、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（MI）を定量する工程と、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（PlsEtn）を定量する工程とを含み、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するための認知症検査方法である。該認知症検査方法は、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（PlsEtn）を定量する工程を含むものであって、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、MIとP

Is E t nとのそれぞれの、予め求められた閾値に対して、被験者のM IとP I s E t nの定量値を比較する工程を含む、前記の認知症検査方法に関する。

[0115]

被験者とは採尿及び／又は採血の対象となる健常人や患者を指し、年齢、性別、人種、基礎疾患などは限定せず、ヒト以外の実験動物なども含む。ヒトの場合、治験及び臨床試験に参加し治験薬の投与を受けるか又はその対象となる個人、すなわち治験モニター、医薬モニター、医薬ボランティア、創薬ボランティアなどの場合でも良く、W A I S - R、H D S - R、M M S、M M S E、C D R、M o C A - J等の認知機能検査で認知症が疑われた患者又は健常人、認知症の自覚及び／又は他覚症状がある患者又は健常人でも良い。被験者には、食事制限などは設けなくても良いが、健康診断の場合は通常食事制限がある。

[0116]

本発明の実施の形態における尿は、薬剤等により強制的に排泄されたものではない自然排泄尿である。この自然排泄尿は、尿意を感じた際に排泄された随時尿であってもよいが、好ましくは平均的な生活サイクルにおいて朝食前に排泄される早朝空腹時尿、さらに好ましくは早朝空腹時尿の後の空腹時に排泄される空腹時二番尿である。これらの尿は、連日あるいは適当な隔日（1ヶ月以内）の3日分を定量対象とする。3日分の採尿が困難な場合は、2日分あるいは1日分でもよいが、その場合の尿は空腹時二番尿であることが好ましい。また空腹時二番尿の採取が困難な場合は、早朝空腹時尿でよいが、その場合は3日以上以上の尿の採取が好ましい。

[0117]

本発明は被験者の自然排泄尿中のM Iを定量する工程を含む。本発明の実施の形態におけるM Iは背景技術に記載した公知のM Iを含む。M IはG C - M A S Sで定量する方法（T o s h i m i t s u N i w a, J. C h r o m a t o g r a p h y, 227（1983）, 25-39）、免疫測定法（

特開平 8-21835 号公報)、酵素法 [Roswitha Dolhofer, O. H. Wieland., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 25, 733-736 (1987)]、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 法や HPLC 法等の公知の方法で定量すれば良く、好ましくはミオイノシトールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.18) を用いる方法 (特許文献 3、4) であり、さらに好ましくはミオイノシトール測定試薬ルシカ M I (旭化成ファーマ株式会社) を用いて定量する。

[0118]

本発明の実施の形態における尿は定量まで冷蔵保存することが好ましい (1 年以上安定)。室温放置でも数日以内であれば問題はない。また、防腐剤として 0.05% アジ化ナトリウムあるいは 0.1% プロクリンを添加しても定量に影響しない。

[0119]

M I は定性反応により M I の存在を検出する方法により行ってもよいが、定量することが好ましい。M I を定量するとは、M I が含まれている可能性のある被験者の尿と、M I を既知の濃度で含む校正用の試料を、それぞれ単独に M I を公知の方法で検出し、M I が含まれている可能性のある被験者の尿中の M I の濃度は、M I が含まれている可能性のある被験者の尿についての検出量と、M I を既知の濃度で含む校正用の試料についての検出量とを比較することにより算出することである。尿 M I 量は、同時に測定するクレアチニン 1 g (g Cr) 値で標準化した値 (mg) として表示し、通常、複数検体の平均値として算出することが好ましく、3 検体以上の定量値の中で他の定量値と大きく異なる値を示す検体がある場合は、これを除外することが好ましい。また、2 検体しか定量されていない場合で、両者の定量値が大きく異なる場合は、再定量すれば良い。

[0120]

本発明は M I を定量する同一被験者の血清又は血漿中 (血清及び／又は血漿

) の P l s E t n を定量する工程を含む。M l を定量する同一被験者には M l を定量された被験者を含み、M l と P l s E t n の定量の順序は任意である。被験者から血液を通常通り採血し、できるだけ早期に遠心分離し、採取した血清または血漿は速やかに冷蔵 (4℃) あるいは凍結保存 (-20℃ ~ -80℃) する。血液の状態で一時的に保管する場合は冷蔵保存し、少なくとも採血日当日に血清あるいは血漿分離までの処理を施すことが好ましい。血漿を取得する場合には、分離剤や抗プラスミン剤等の使用の有無は特に限定されず、EDTA、フッ化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ヘパリンナトリウム、モノヨード酢酸等の抗凝固剤や解糖阻止剤の使用の有無も特に限定されない。

[0121]

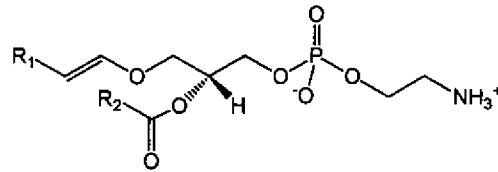
本発明の実施の形態における「検体」または「試料」は P l s E t n を含むと予想される試料であり、上記の被験者の尿、血清及び血漿を含み、P l s E t n を添加した溶液、血清及び血漿でもよい。本発明の実施の形態における「検体」または「試料」は P l s E t n を含むと予想される試料であれば限定されないが、被験者の尿、血清、及び/または血漿であれば好ましい。その他の試料の例としては、実験動物由来の尿、血清、血漿や植物組織、海水、天然水、果汁、飲料、廃液等が挙げられる。

[0122]

本発明の実施の形態における P l s E t n は、グリセロリン脂質の C 1 (s n - 1) 位に脂肪酸がビニルエーテル結合したアルケニルアシル型グリセロリン脂質 (アルケニルアシル型エーテルリン脂質) で塩基がエタノールアミンである、Journal of atherosclerosis and thrombosis、14 巻、1 号、2007 年、12-18 頁や J. Psychiatry Neurosci.、2010 年、35 巻、1 号、59-62 頁等で開示された公知の P l s E t n であり、以下の式の P l s E t n である。:

[0123]

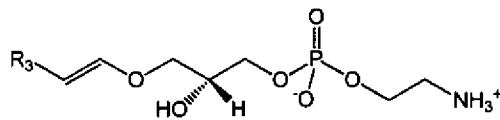
[化1]



[0124] (式中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、低級若しくは高級アルキル基又はアルケニル基である)

本発明の実施の形態におけるP l s E t nには以下の式のP l s E t nのリゾ体 (l y P l s E t n) を含む場合もある。

[0125] [化2]



[0126] (式中、 R_3 は、低級若しくは高級アルキル基又はアルケニル基である)

本発明は、被験者の自然排泄尿中のM l を定量する工程と、同一被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する工程とを含む、該被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するための認知症検査方法であって、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、M l とP l s E t nとのそれぞれの、予め求められた閾値に対して、被験者のM l とP l s E t nの定量値を比較する工程を含む、前記の認知症検査方法も含む。

[0127]

本発明の実施の形態において被験者を認知症またはその前段階にある者と分類する尿M l 量の基準は、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、M l とP l s E t nとのそれぞれの、予め求め

られた閾値に対して、被験者のM IとP l s E t nの定量値を比較する。尿M Iの閾値は、健常成人の平均値±標準偏差の上限值から、健常高齢者の平均値±標準偏差の上限值までの範囲から設定すれば良い。

[0128]

一例として、尿M Iの閾値は、健常成人の平均値±標準偏差（ $13.1 \pm 8.5 \text{ mg/g Cr}$ 、 $n=444$ 、平均年齢 39.6 ± 10.6 歳）の上限值である 21.6 mg/g Cr から、健常高齢者の平均値±標準偏差（ $33.0 \pm 22.1 \text{ mg/g Cr}$ 、 $n=76$ 、平均年齢 72.7 ± 5.6 歳）の上限值である 55.1 mg/g Cr までの範囲から設定できる。

[0129]

従って、本発明の実施の形態において被験者を認知症またはその前段階にある者と分類する尿M I量の基準は、空腹時二番尿の場合、 $21.6 \sim 55.1 \text{ mg/g Cr}$ の範囲から設定される閾値以上としても良い。また、下記の実施例に示したとおり、 25 mg/g Cr を尿M I量の閾値とすることにより、血清及び／又は血漿P l s E t n量の定量との併用による認知症の検出確度が向上することから、尿M I量の閾値として 25 mg/g Cr を採用することも好ましい。さらに、下記の実施例に示したとおり、 36.6 mg/g Cr を尿M I量の閾値とすることにより、血清及び／又は血漿P l s E t n量の定量との併用による認知症の検出確度が向上することから、尿M I量の閾値として 36.6 mg/g Cr を採用することも好ましい。下記の実施例に示したとおり、随時尿M I量は平均的に空腹時二番尿より 8.2 mg/g Cr 増加していることから、 $29.8 \sim 63.3 \text{ mg/g Cr}$ の範囲から設定される閾値以上としても良く、随時尿の場合 33.2 又は 44.8 mg/g Cr を閾値として採用することも好ましい。

[0130]

被験者の血清または血漿中のP l s E t nの閾値の下限值は、健常成人の平均値±標準偏差の下限值および健常高齢者の平均値±標準偏差の下限值より $1 \sim 2 \mu\text{M}$ 低く設定すれば良い。被験者の血清または血漿中のP l s E t n

の閾値の上限値は、全高齢者（健常＋認知障害）における尿M I量の平均値以上の高齢者を対象に作出されたC D RとP l s E t nの相関近似曲線式に、 $y = 0.5$ （C D R、認知障害疑い）を代入して得られる x とすれば良い。

[0131]

一例として、被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する工程が、後述する血清及び／又は血漿P l s E t n量を125 l-H P L C法を利用して定量したる場合の血清及び／又は血漿P l s E t n量の閾値の下限値は、健常成人の平均値±標準偏差（ $73.0 \pm 19.5 \mu\text{M}$ 、 $n = 439$ ）の下限値は53.5であり、健常高齢者の平均値±標準偏差（ $73.3 \pm 20.5 \mu\text{M}$ 、 $n = 97$ ）の下限値は52.8 μM なので、52 μM とすることもできる。また、被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する工程が、後述する血清及び／又は血漿P l s E t n量を125 l-H P L C法を利用して定量したる場合の血清及び／又は血漿P l s E t n量の閾値の上限値は、全高齢者（健常＋認知障害）における尿M I量の平均値である36.6 mg/g C r以上の高齢者を対象に作出されたC D RとP l s E t nの相関近似曲線式（ $y = -0.0197x + 1.690$ ）に、 $y = 0.5$ （C D R、認知障害疑い）を代入して得られる x （P l s E t n）の値60.4 μM と概算することもできる。

[0132]

従って、本発明の実施の形態において、被験者を認知症またはその前段階にある者と分類する血清及び／又は血漿P l s E t n量の基準は、被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する工程が、後述する血清及び／又は血漿P l s E t n量を125 l-H P L C法を利用した定量である場合、血清及び／又は血漿P l s E t n量が52～61 μM の範囲から設定される閾値以下としても良い。

[0133]

被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する工程が、後述する酵素

を利用した定量である場合、測定値の平均値は、125 l-HPLC法を利用した定量である場合の平均値 $-2\mu\text{M}$ から $+3\mu\text{M}$ の範囲である。したがって、本発明の実施の形態において、被験者を認知症またはその前段階にある者と分類する血清及び／又は血漿P l s E t n量の基準は、被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する工程が、後述する酵素を利用した定量である場合、血清及び／又は血漿P l s E t n量が50～64 μM の範囲から設定される閾値以下としても良い。

[0134]

さらに、下記の実施例に示したとおり、空腹時二番尿M l 量の閾値が36.6 mg / g C r、随時尿中であり、血清及び／又は血漿P l s E t n量を125 l-HPLC法により定量する場合、血清及び／又は血漿P l s E t n量の閾値が後述するように約58 μM である場合に認知症検出の確度が最適となっており、これらの閾値を採用することが特に好ましい。また、被験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する工程が、後述する酵素を利用した定量である場合、血漿P l s E t n量の閾値が約56または61 μM の閾値を採用することが特に好ましい。

[0135]

なお、実際の検査においては、尿M l 量と血清及び／又は血漿P l s E t n量は全ての被験者について定量し、前記の基準に基づいて分類判定を行うことができる。あるいは、血清及び／又は血漿P l s E t n量が閾値以下の被験者について尿M l 量を定量するか、または尿M l 量が閾値以上の被験者について血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量してもよい。好ましくは、定量の手順がより簡便である尿M l 量を全被験者について定量し、その結果に基づいて血清及び／又は血漿P l s E t n量の定量を行うことができるがこれに限定されない。

[0136]

本発明の実施の形態において血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量するとは、P l s E t nが含まれている可能性のある被験者の血清又は血漿と、

P l s E t n を既知の濃度で含む校正用の試料を、それぞれ単独に P l s E t n を公知の方法及び/または本発明の方法で検出し、P l s E t n が含まれている可能性のある被験者の血清又は血漿の P l s E t n の濃度は、P l s E t n が含まれている可能性のある被験者の血清又は血漿についての検出量と、P l s E t n を既知の濃度で含む校正用の試料についての検出量とを比較することにより算出することである。本発明の実施の形態においては、通常 1 モルの P l s E t n から 1 モルのグリセロー 3 - ホスフォエタノールアミン又はエタノールアミンが生成物として得られるのでグリセロー 3 - ホスフォエタノールアミン又はエタノールアミンを定量すれば P l s E t n 量を算出できる。本発明の実施の形態においては、通常 1 モルの P l s E t n から 1 モルの過酸化水素が生成物として得られるので過酸化水素を定量すれば P l s E t n 量を算出できる。

[0137]

本発明の実施の形態において血清及び/又は血漿 P l s E t n 量は、例えば特許文献 1 に記載された放射性ヨウ素-高速液体クロマトグラフィー (1 2 5 I - H P L C) 法により、定量できる。P l s E t n を 1 2 5 I - H P L C 法で定量する場合、血清及び/又は血漿は冷蔵保存あるいは速やかに凍結融解した血清及び/又は血漿を一定量 (通常、2 0 0 μ L) 使用し、脂質成分を規定の方法で抽出する。測定用試料 (抽出脂質成分) は速やかに P l s E t n の定量に供することが好ましいが、測定まで一時的に保管する場合はメタノールやジエチルエーテル中は避け、クロロホルム中で冷凍保存 (- 2 0 $^{\circ}$ C ~ - 8 0 $^{\circ}$ C) することが好ましい。

[0138]

本発明の実施の形態の血清及び/又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程は、酵素を利用した定量であっても良い。

[0139]

本発明の実施の形態の血清及び/又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程は、以下の (1) ~ (3 - 4) の工程のいずれかまたは複数を含んでもよく、

また、さらに（１）～（３－４）の全てを含んでもよい。

（１）エタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）に加水分解する工程：

（２）エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、エーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素を用いて、前記（１）にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（l y P l s E t n）をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する工程：及び

（３－１）グリセロー３－ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにせしめる酵素にて、工程（２）で得られたグリセロー３－ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにする工程：

（３－２）エタノールアミンを酸化する酵素により、エタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

（３－３）過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

（３－４）前記被験者の血清または血漿中のP l s E t n量を算出する工程：

または前記（２）の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P l s E t n）を定量する方法が、前記（１）～（３－４）の工程に先立つか、少なくとも前記（２）工程の前までに、下記（４）及び（５）を含む工程を行うことを特徴とする方法。

[0140]

上記工程（１）～（３－４）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する方法の一例を概略して図７に示した。工程（１

）はPLの作用で、P l s E t nをl y P l s E t nに加水分解する工程である。さらに必要によりリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素、好ましくはリゾホスホリパーゼ（l y s o p h o s p h o l i p a s e、LYPLと略す場合がある）を用いてリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する工程を含む場合があるがこれに限定されない。工程（2）は加水分解酵素の作用で、l y P l s E t nを加水分解する工程である。工程（3-1）は工程（2）で得られた生成物をG l y c e r o p h o s p h o c h o l i n e p h o s p h o d i e s t e r a s e（GPCP）とエタノールアミンオキシダーゼ（EAO）の作用で過酸化水素（ H_2O_2 ）とする工程である。工程（3-2）の過酸化水素は後述する公知の方法で定量すれば良い。

[0141]

図7に示した上記工程（1）の好適な例は、PLの作用により、P l s E t nをl y P l s E t nと脂肪酸に加水分解する工程である。図7に示した上記工程（2）の好適な例は、l y P l s a s eの作用により、l y P l s E t nをグリセロー3-ホスフォエタノールアミン（g l y c e r o - 3 - p h o s p h o e t h a n o l a m i n e）と対応するアルデヒド（a l d e h y d e）に加水分解する工程である。図7に示した上記工程（3-1）の好適な例は、工程（2）で得られたグリセロー3-ホスフォエタノールアミンをG l y c e r o p h o s p h o c h o l i n e p h o s p h o d i e s t e r a s e（GPCP）の作用により、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンをエタノールアミン（e t h a n o l a m i n e）とグリセロリン酸（s n - g l y c e r o l 3 - p h o s p h a t e）に加水分解し、エタノールアミンオキシダーゼの作用でエタノールアミンを過酸化水素（ H_2O_2 ）、アンモニア（ NH_3 、アンモニウム塩も含む）とグリコールアルデヒド（g l y c o l a l d e h y d e）に酸化する工程である。

[0142]

上記工程（1）～（3-4）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血

漿 P l s E t n 量を定量する方法において、被験者の血清及び／又は血漿中に P l s E t n のみ、又は P l s E t n と l y P l s E t n が混在する場合は、後述する本発明の l y P l s a s e 及び P L の作用を利用して血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量することが好ましいがこれに限定されない。被験者の血清及び／又は血漿中に l y P l s E t n のみが存在する場合は本発明の l y P l s a s e の作用を利用して血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量することが好ましいがこれに限定されない。

[0143]

上記工程（１）～（３－４）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法において、工程（１）で用いる P L は、P l s E t n を l y P l s E t n に加水分解する作用を触媒する酵素であれば限定されない。このような酵素の好ましい例として配列番号５のアミノ酸配列を有する P L が挙げられる。また、配列番号５に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、P l s を l y P l s に加水分解する作用を触媒する酵素も挙げられ、その例は後述する本発明の l y P l s a s e の場合と同様である。該 P L は *S t r e p t o m y c e s a l b i d o f l a v u s* に分類される N A 2 9 7 (N I T E B P - 1 0 1 4 として寄託済み) を用いて国際公開番号：W O 2 0 1 2 / 1 0 5 5 6 5 A 1 に記載の製造方法で製造できる新規なホスホリパーゼ A₁ である。

[0144]

上記工程（１）～（３－４）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法において、工程（１）で用いるその他の P L としてはホスホリパーゼ A₂ (p h o s p h o l i p a s e A₂、P L A₂ と略す場合がある)、ホスホリパーゼ A₁ (p h o s p h o l i p a s e A₁、P L A₁ と略す場合がある)、及びホスホリパーゼ B (P L B) が挙げられる。

[0145]

PLA₂は、EC 3. 1. 1. 4と分類される酵素を含む。PLA₂の好適な例としては、*Streptomyces violaceoruber*由来PLA₂（PLA₂（旭化成ファーマ株式会社（T-31））及びPLA₂ナガセ（ナガセケムテックス（株）））、*Aspergillus niger*由来PLA₂（マキサパールA₂及びケーキザイム（ともにディー・エス・エム ジャパン（株）））、豚の膵臓由来PLA₂（リポモッド699L（ジェネンコア協和（株）））、*Aspergillus*由来ホスホリパーゼ（レシターゼ（ノボザイムズ ジャパン（株））、*porcine pancreas*由来PLA₂（SIGMA（P223））が挙げられる。

[0146]

PLA₁は、EC 3. 1. 1. 32と分類される酵素を含む。PLA₁の好適な例としては*Aspergillus oryzae*由来（三菱化学フーズ（株））が挙げられる。

[0147]

PLBはPLA₁及びPLA₂の作用を均等に又は不均等に併せ持つ。PLBの好適な例としては、特許第5060666号で開示された酵素、WO2007-010892で開示された酵素、LPBP（旭化成ファーマ株式会社（T-63））及びCEBP（旭化成ファーマ株式会社（T-66））が挙げられる。

[0148]

上記工程（1）～（3-4）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿PlsEtn量を定量する方法において、工程（2）でlyPlsEtnを加水分解する酵素を用いる場合、該加水分解酵素はlyPlsEtnをグリセロー3-ホスフォエタノールアミンと対応するアルデヒド（単にアルデヒドと記載する場合がある）に加水分解する酵素を含む酵素であれば良いがこれに限定されない。

[0149]

また、工程（２）で *lyPlsEtn* を加水分解する酵素を用いる場合、該加水分解酵素は、少なくともエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解しない酵素であればさらに好ましい。後述の *Pseudomonas putida* 由来、ラット由来、及び *Thermocrispum* sp. 由来の *lyPlsEtn* の *lyPlsEtn* をグリセロ－３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する酵素はエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解しない。

[0150]

上記工程（１）～（３－４）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 *PlsEtn* 量を定量する方法において、工程（２）で用いる加水分解酵素には、EC 3.3.2.2 または EC 3.3.2.5 と分類される *lyPlsase* を含む。このような酵素の例としては THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 28, pp. 24916－24930 で開示されたラット由来の *lyPlsase* が挙げられ、好ましくは後述する本発明の *lyPlsase* である。

[0151]

上記工程（１）～（３－４）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 *PlsEtn* 量を定量する方法において、工程（３－１）では、グリセロホスホコリンホスホジエステラーゼ（*glycerophosphorylcholine phosphodiesterase*、GPCP と略す場合がある）を利用することができる。該 GPCP は EC 3.1.4.2 と分類される酵素を含み、グリセロ－３－ホスフォエタノールアミンをエタノールアミンとグリセロリン酸加水分解する作用を触媒する酵素であれば限定されない。GPCP の好適な例としては *Glicladium roseum* 由来 GPCP（旭化成ファーマ株式会社（T-33））が挙げられる。

[0152]

上記工程（１）～（３－４）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血

漿Plasma量を定量する方法において、工程（3-2）ではエタノールアミノキシダーゼを利用することができる。該エタノールアミノキシダーゼは、モノエタノールアミノキシダーゼ（EC 1.4.3.8）、モノアミノキシダーゼ（EC 1.4.3.4）、及び一級アミノキシダーゼ（EC 1.4.3.21）と分類される酵素を含み、エタノールアミンを H_2O_2 、 NH_3 とグリコールアルデヒドに酸化する作用を触媒する酵素であれば限定されない。エタノールアミノキシダーゼの好適な例としては*Arthrobacter*属由来の酵素（Narrod S. A. 及びJakoby W. B.、J. Biol. Chem.、239巻、2189-2193頁、1964年）、*Phormia regina*由来の酵素（Kulkarni A. P. 及びHodgson E.、Comp. Biochem. Physiol.、B44巻、407-422頁、1973年）、*Arthrobacter* sp.（FERM P-06240及びBP-0421）由来の一級アミノキシダーゼ（Ota H. ら、Biosci. Biotechnol. Biochem.、72巻、2732-2738頁、2008年）が挙げられ、エタノールアミンに対する基質特異性が高いという観点からは特開2005-52034号公報で開示された分析方法に用いられるモノアミノキシダーゼ（チラミンオキシダーゼ）が特に好ましい。上記工程（1）～（3-4）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿Plasma量を定量する方法は、前記（2）の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、上記（1）～（3-4）の工程に先立つか、少なくとも前記（2）工程の前までに、下記（4）及び（5）を含む工程を行う方法であれば好ましいがこれに限定されない。工程（4）及び（5）は図9に概略して示した。

（4）ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスフォリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程。

[0153]

ここで「前記(2)の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合」とは本実施の形態のP l s E t nの定量値において、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する目的に影響を与える程度にリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解することを意味する。例えば、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する程度が l y P l s E t n に対して15%以下、更には12%以下であり、10%以下の場合があるがこれに限定しない。

[0154]

例えば、後述のP s e u d o m o n a s p u t i d a由来とラット由来の l y P l s E t n をグリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する酵素はリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解しない酵素である。また、後述のT h e r m o c r i s p u m s p. 由来の l y P l s E t n をグリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する酵素は、リゾホスファチジルエタノールアミンを l y P l s E t n に対して12%加水分解するので、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素である。

[0155]

上記工程(1)～(3-4)を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n 量を定量する方法は、前記工程(4)のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてP L を使用し、該P L は、前記工程(1)のP l s E t n を l y P l s E t n に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該P L を添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施と同時に、または前記工程(5)の実施後に、前記工程(1)が完了し、

以後前記工程（２）～（３－４）を実施する方法でも良い。

[0156]

上記工程（４）及び（５）は、被験者の血清または血漿中にホスファチジルエタノールアミン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンが含まれない、または、前記工程（２）の *l y P l s E t n* をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解しない場合には、実施しなくても良い場合があるが、被験者の血清または血漿中にホスファチジルエタノールアミン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンが含まれ、かつ、前記工程（２）の *l y P l s E t n* をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する作用を有する場合には、実施することが好ましい。

[0157]

「実質的に消去する」の「消去する」とは消去対象を（例えば酵素の作用により）本実施の形態の *P l s E t n* の定量に関与しない物質へ分解（変換）することをいう。定量に関与しない物質は、用いる酵素の反応性や試薬等によっても異なるが、例えば上記工程（１）～（３－４）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 *P l s E t n* 量を定量する方法の場合、測定に関与しない物質の例としては、グリセロホスファチジン酸、グリコールアルデヒド、アンモニア、水、酸素などが挙げられる。例えば比色分析を用いた定量によって本実施の形態の *P l s E t n* の定量を行う場合には、消去対象を無色の物質に変換し、検出の対象外とすることも上記の「消去する」に含まれる。

[0158]

「実質的に消去する」とは、消去対象を、本実施の形態の *P l s E t n* の定量値において、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する目的に影響を与えない程度に消去することを意味する。例えば、本実施の形態の測定方法を、後述する認知症検査方法として用いる場合、消去対象

が、検査方法の正確性に影響を与えない程度まで消去されることを意味する。より具体的には、疾患によっても変動し得るが、消去対象が例えばホスファチジルエタノールアミン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンの場合、これらを消去する工程を行った後のホスファチジルエタノールアミンの総量が、消去する工程を行う前の10%以下となることが好ましく、更に好ましくは9%以下であり、最も好ましくは8%以下である。なお、上記の工程(4)及び(5)ではP l s E t nを含むエーテル型のエタノールアミン型リン脂質は消去しない。

[0159]

上記工程(4)で用いるPLは、上述の工程(1)の場合と同様であるが、上記の工程(4)及び(5)の「実質的に消去する」という観点からはPLA₂が好ましく、反応性が早いという観点から*Streptomyces violaceoruber*由来PLA₂がさらに好ましい。

[0160]

上記工程(5)で用いる酵素はリゾホスファチジルエタノールアミンをグリセロー3-ホスフォエタノールアミンと脂肪酸に加水分解する作用があれば限定されないが、リゾホスホリパーゼ(*lysophospholipase*、LYPLと略す場合がある)、及び／又はモノグリセリドリパーゼ(*monoglyceride lipase*、MGLPと略す場合がある)が好ましい。該LYPLはEC 3. 1. 1. 5と分類される酵素を含み、好適な例としては*Vibrio*属由来LYPL(旭化成ファーマ株式会社(T-32))が挙げられる。該MGLPはEC 3. 1. 1. 23と分類される酵素を含み、好適な例としては*Bacillus*属由来MGLP(旭化成ファーマ株式会社(T-59))が挙げられる。

[0161]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、過酸化水素の定量は、ペルオキシダーゼ(*peroxidase*、EC 1. 11. 1. 7)の作用を利用して、例

例えばトリンダー試薬等の色原体とカップラーとの酸化縮合により色素を生成させて比色分析により行うことができる。トリンダー型試薬の色原体としては、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等が使用可能であり、具体例としてN，N-ジメチルアニリン、N，N-ジエチルアニリン、2，4-ジクロロフェノール、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3，5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-3，5-ジメチルアニリン(MAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3，5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン(ADPS)、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン(ALPS)、N-エチル-N-スルホプロピル-3，5-ジメトキシアニリン(DAPS)、N-スルホプロピル-3，5-ジメトキシアニリン(HDAPS)、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(TOPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-m-アニシジン(ADOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン(ALOS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3，5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N-スルホプロピルアニリン(HALPS)、N，N-ビス-(4-スルホブチル)-3-メチルアニリン(TODB)、N-エチル-N-(2-サクシニルアミノエチル)-m-トルイジン(ESSET)等(以上株式会社同人化学研究所)が挙げられる。なかでもTOOSとTODBは吸光係数が大きいため好ましい。また過酸化水素はPODの存在下、ロイコ型試薬を用いても発色させることができる。この試薬の具体例としては、O-ジアニシジン、O-トリジン、3，3-ジアミノベンジジン、3，3，5，5-テトラメチルベンジジン(以上株式会社同人化学研究所)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4，4-ビス(ジメチルアミノ)ビフェニルアミン(DA64)、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3，7-ビス(ジメチルアミノ)フ

ェノチアジン（DA67）等が挙げられる。DA-64やDA-67など、不安定な試薬を用いる場合、公知の方法により、亜硫酸チオ硫酸を添加したり、紫外線や可視光線を吸収する効果のある色素を共存させたりすることで安定化させることができる。カップラーの例としては、4-アミノアンチピリン（4-AA）、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン（MBTH）が挙げられる。

[0162]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿Plasma量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、過酸化水素の定量は、上記の方法のほか、吸光法、KMnO₄等を利用する酸化還元法、蛍光法、発光法又は電極法等の公知の方法を用いて行うことができる。蛍光法には、酸化によって蛍光を発する化合物、例えばホモバニリン酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、チラミン、パラクレゾール、ジアセチルフルオレスシン誘導体等を用いることができる。発光法には、触媒としてルミノール、ルシゲニン、イソルミノール、ピロガロール等を用いることが出来る。電極法に用いる電極は、過酸化水素との間で電子を授受することの出来る材料である限り特に制限されないが、例えば白金、金、銀等が挙げられ、電極測定方法としては、アンペロメトリー、ポテンショメトリー、クーロメトリー等の公知の方法を用いることが出来る。更にオキシダーゼ又は基質と電極との間の反応に電子伝達体を介在させ、得られる酸化、還元電流又はその電気量を測定してもよい。電子伝達体としては、電子伝達機能を有する任意の物質が使用可能であり、例えばフェロセン誘導体、キノン誘導体等の物質が挙げられる。またオキシダーゼ反応により生成する過酸化水素と電極の間に電子伝達体を介在させ、得られる酸化、還元電流又はその電気量を測定してもよい。

[0163]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿Plasma量を定量する工程は、以下の（１）～（３－３）'の工程のいずれかまたは複数を含んでもよく、さらに（１）～（３－３）'の全てを含んでもよい。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解でき、かつリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解する工程：

(2) ` エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる加水分解酵素を用いて、前記 (1) にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解する工程：

(3-1) ` エタノールアミンを酸化する酵素により、工程 (2) ` で得られたエタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

(3-2) ` 過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

(3-3) ` 前記被験者の血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程。

[0164]

上記工程 (1) ~ (3-3) ` を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法の別異なる一例を概略して図 8 に示した。工程 (1) は P L の作用で、P l s E t n を l y P l s E t n に加水分解する工程である。工程 (2) ` は加水分解酵素の作用で、l y P l s E t n を加水分解する工程である。工程 (3-1) ` は工程 (2) ` で得られた生成物であるエタノールアミンを E A O の作用で過酸化水素とする工程である。過酸化水素は後述する公知の方法で定量すれば良い。

[0165]

上記工程 (1) ~ (3-3) ` を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法において、工程 (1) で用いる P L は、

上述の工程（１）の場合と同様である。

[0166]

上記工程（１）～（３－３）´を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法において、工程（２）´で l y P l s E t n を加水分解する酵素を用いる場合、該加水分解酵素は l y P l s E t n をプラズメニルホスファチジン酸とエタノールアミンに加水分解する酵素を含み、ホスホリパーゼ D（p h o s p h o l i p a s e D、PLDと略する場合がある）が好ましい。そのような PLD の例としては S t r e p t o m y c e s 属由来（旭化成ファーマ株式会社（T-07））、S t r e p t o m y c e s c h r o m o f u s c u s 由来（旭化成ファーマ株式会社（T-39））、キャベツ由来（S I G M A（P8398））、A c t i n o m a d u r a 属由来（名糖産業（株））PLD が挙げられる。l y P l s E t n に対する基質特異性が高いという観点からは、S t r e p t o m y c e s c h r o m o f u s c u s 由来 PLD が好ましい。

[0167]

上記工程（１）～（３－３）´を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法において、工程（３－１）´で用いる E A O は、上述の工程（３－２）の場合と同様である。

[0168]

上記工程（１）～（３－３）´を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法は、上記（１）～（３－３）´の工程に先立つか、少なくとも前記（２）´工程の前までに、上記の（４）及び（５）を含む工程を行う方法であれば好ましいがこれに限定されない。

[0169]

上記工程（１）～（３－３）´を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法は、前記工程（４）のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する

酵素としてPLを使用し、該PLは、前記工程(1)のPLsEt nをly PLsEt nに加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施と同時に、または前記工程(5)の実施後に、前記工程(1)が完了し、以後前記工程(2)′～(3-3)′を実施する方法でも良い。

[0170]

上記工程(4)及び(5)は、被験者の血清または血漿中にホスファチジルエタノールアミン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンが含まれない、または、前記工程(2)′のly PLsEt nをエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解できる加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解しない場合には、実施しなくても良い場合があるが、被験者の血清または血漿中にホスファチジルエタノールアミン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンが含まれ、かつ、前記工程(2)′のly PLsEt nをエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解できる加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する作用を有する場合には、実施することが好ましい。

[0171]

ここで、「実質的に消去する」の「消去する」とは上述と同様であり、定量に関与しない物質は、用いる酵素の反応性や試薬等によっても異なるが、例えば本実施の形態のPLsEt nの測定を、PLDで分解し、得られたエタノールアミンをさらに酸化して得られる過酸化水素を用いて定量する方法により行う場合、測定に関与しない物質の例としては、グリセロホスホエタノールアミン（ただし、用いるPLDがグリセロホスホエタノールアミンに作用しない場合）、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、ホスホリルエタノールアミン、脂肪酸、セラミド、グリセロール-3-リン酸、アンモニア、グリコールアルデヒド、水、酸素などが挙げられる。例えば比色分析を用いた定量によって本実施の形態のPLsEt nの定量を行う場合には、消去対象を無色の物質に変換し、検出の対象外とすることも上記の「消

去する」に含まれる。

[0172]

「実質的に消去する」とは、上述と同様であり、より具体的には、疾患によっても変動し得るが、消去対象が例えばホスファチジルエタノールアミン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンの場合である場合、これらを消去する工程を行った後のホスファチジルエタノールアミン及び／又はリゾホスファチジルエタノールアミンの場合の総量が、消去する工程を行う前の10%以下となることが好ましく、更に好ましくは9%以下であり、最も好ましくは8%以下である。

[0173]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量の酵素を利用した定量する工程は、特開2012-210179号に記載の方法でも良い。

[0174]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、酵素を利用した定量で使用し得るいずれの酵素についても、所望の活性が維持される限り、その変異体も同様に各酵素の範囲に含まれる。例えば、各酵素のアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有する酵素であっても、所望の活性が維持される限り、各酵素の範囲に含まれる。また、各酵素を塩基配列の翻訳によって得る場合にも、用いる塩基配列は、得られる酵素が所望の活性を有する限り特に限定されない。各酵素の二次構造、三次構造及び四次構造、性質、純度、由来、商品名並びに価格についても特に限定されない。

[0175]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、一態様において、試料中に含まれるアスコルビン酸を消去するためにアスコルビン酸オキシダーゼ（a s c o r b a t e o x i d a s e、A S O Mと略す場合がある）を使用することができる。A S O Mは、アスコルビン酸を実質的に消去する作用を有するものが好

ましく、EC 1. 10. 3. 3と分類される酵素がより好ましい。例えば、ウリ科植物由来のASOMを使用することができる。好適な例としては、酵素の安定性が高いという観点からはAcromonium属由来のアスコルビン酸オキシダーゼ（旭化成ファーマ株式会社（T-53））、アジ化ナトリウムによる阻害を受けないという観点からは天野エンザイム（株）社のアスコルビン酸オキシダーゼ（商品名ASO-3）が挙げられる。

[0176]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿PlsEtn量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、その量は下記のカタラーゼの量を除き、例えば、被験者の血清または血漿中のPlsEtnの濃度が300 μ M以下で、検体試薬比（試料の量：試薬の全量）が1：10の場合、下限値が0.1 U/mL以上、好ましくは1 U/mL以上、更に好ましくは5 U/mL以上であり、上限は特に設けないが、100 U/mL以下、好ましくは50 U/mL以下、更に好ましくは30 U/mL以下である。使用する酵素の量は、試薬の安定性という観点からは高い方が好ましく、経済性の観点からは低い方が好ましい。特にレートアッセイを行う場合には使用する酵素の量は低い方が好ましく、下限は0.01 U/mLである。

[0177]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿PlsEtn量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、一態様において、過酸化水素を消去するためにカタラーゼ（catalase）を使用する場合がある。カタラーゼは、過酸化水素を実質的に消去する作用を有するものが好ましく、EC 1. 11. 1. 6と分類される酵素がより好ましいがこれに限定されない。カタラーゼの使用量は限定されないが、通常10～5000 U/mLの範囲で使用する。カタラーゼの好適な例としては、純度が高いという観点からはArthrobacter属由来（旭化成ファーマ株式会社）、安価で入手が容易である観点からは動物由来（SIGMA（C1345等））のカタラーゼが挙げられる。

[0178]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、使用する酵素の反応性及び／又は安定性を維持及び／又は高めるという観点から、適宜 pH 緩衝剤を用いることが好ましい。pH 緩衝剤は、目的の pH を保つことができれば限定されないが、グッドの pH 緩衝液 (MES、B i s - T r i s、ADA、P I P E S、A C E S、B E S、M O P S、T E S、H E P E S、D I P S O、T A P S O、P O P S O、H E P P S O、E P P S、T r i c i n e、B i c i n e、T A P S、C H E S、C A P S 等)、T r i s 緩衝液、ジエタノールアミン緩衝液、炭酸緩衝液、グリシン緩衝液、硼酸緩衝液、リン酸緩衝液、グリシルグリシン緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、マレイン酸緩衝液、トリスエタノールアミン緩衝液、イミダゾール緩衝液等が例示できる。これらの緩衝液は、塩酸等の強酸や N a O H 等の強アルカリを用いて、緩衝剤として使用可能な pH 範囲に調整して使用することができる。

[0179]

pH は、用いる酵素によっても異なるが、弱アルカリ性の pH であることが好ましく、下限値として pH 7.0 以上、好ましくは pH 7.3 以上、更に好ましくは pH 7.5 以上が例示され、上限値としては pH 9.0 以下、好ましくは pH 8.4 以下、更に好ましくは pH 8.0 以下が例示される。例えば、l y P l s a s e、P L、L Y P L、G P C P を安定化及び／又は活性化するという観点からは、その pH は、下限値として pH 7.0 以上が例示され、上限値としては pH 9.5 以下、好ましくは pH 9 以下、更に好ましくは pH 8.5 以下が例示される。

[0180]

pH 緩衝剤の濃度は目的の pH を保つことができる限り特に限定されないが、下限値として 3 m M 以上、好ましくは 5 m M 以上、更に好ましくは 10 m M 以上が例示され、上限値としては 500 m M 以下、好ましくは 200 m M 以下、更に好ましくは 100 m M 以下が例示される。

[0181]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、該工程には界面活性剤を存在させられる。界面活性剤の種類は限定されないが、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンアルキルフェニルホルムアルデヒド縮合物、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレンステロール類、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンラノリン類、ポリオキシエチレンアルキルアミン・脂肪酸アミド類、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸・リン酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩類、ポリグリセリン脂肪酸エステル類、グリセリン脂肪酸エステル類、プロピレングリコール脂肪酸エステル類、ソルビタン脂肪酸エステル類、Nアシルアミノ酸塩類、アルキルエーテルカルボン酸塩類、アルキルリン酸塩、Nアシルタウリン酸塩、スルホン酸塩、アルキル硫酸、酢酸ベタイン型両性界面活性剤、イミダゾリン型両性界面活性剤、レシチン誘導体、ポリエチレングリコール類、ポリエチレングリコールラウリルエーテル、ポリエチレングリコールイソオクチルフェニルエーテル、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール等が例示される。好ましくは、非イオン性界面活性剤のエーテル型又はエステル型が挙げられ、更に好ましい例としては、HLB値が13以上15以下のポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、及びポリオキシエチレンアルキルアミンからなる群から選択される非イオン界面活性剤が挙げられ、更に好ましくは、ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキル(12-14)エーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルが挙げられる。界面活性剤の溶解性の観点からは、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系非イオン性界面活性剤が好ましい。商品名としてはトリトンX-100(TX-1

00)、Tween20、エマル20C(花王株式会社)、NIKKOL BT-9(日光ケミカルズ株式会社)、ノニオンHS-208、HS-210、HS-208、HS-208.5、NS210(日油株式会社)等が例示される。また、膜酵素安定化の観点からはn-Dodecyl-β-D-maltoside(DDM)、n-Octyl-β-D-glucoside、n-Nonyl-β-D-thiomaltoside、n-Octyl-β-D-thiogluconide、3-Oxatridecyl-α-D-mannosideのような親水部に糖鎖を持った非イオン性界面活性剤を使用する事もできる。界面活性剤は複数種混合して使用してもよい。

[0182]

極性をもつ界面活性剤は酵素などのタンパク質の変性作用を有することが知られているため、脂質を基質とする酵素を用いる場合、脂質を溶解するために中性（非極性）の界面活性剤存在下で実施することが好ましいがこれに限定されない。本実施の形態において、界面活性剤を用いる場合、その濃度は用いる酵素の所望の作用が得られる限り特に限定されない。例えば本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l a s m a 量を定量する工程が、酵素を利用した定量であり、さらに該酵素が本発明の l y s o s o m e 及び／または P L である場合の界面活性剤の濃度は、上限値としては 0.25 (w/v) % 以下、好ましくは 0.1 (w/v) % 以下、更に好ましくは 0.05 (w/v) % 以下が例示され、酵素の所望の作用が得られる限り、界面活性剤を用いなくてもよい。界面活性剤により酵素を安定化及び／又は活性化する、基質を分散させる、再現性等の酵素の作用を向上するという観点からは、通常、界面活性剤の濃度は、下限値としては 0.001 (w/v) % 以上、好ましくは 0.005 (w/v) % 以上、更に好ましくは 0.01 (w/v) % 以上が例示され、上限値としては 1 (w/v) % 以下、好ましくは 0.5 (w/v) % 以下が例示される。

[0183]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、該工程には N a C l、K C l、硫酸や N H₃ C l 等の塩を存在させられ、その量は、下限値として 0. 1 m M 以上、好ましくは 5 m M 以上、更に好ましくは 5 0 m M 以上が例示され、上限値は特に制限されないが、好ましくは 2 0 0 m M 以下、更に好ましくは 1 5 0 m M 以下、特に好ましくは 1 2 0 m M 以下が例示される。これらの塩は後述する認知症検査試薬キットの酵素の安定化剤として機能し得る。

[0184]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、該工程には糖を存在させることができ、その濃度は溶解可能な範囲内であれば限定されない。例えばシュクロースを含有する場合、下限値は後述する認知症検査試薬キットの 0. 0 5 (w / v) % 以上、好ましくは 0. 1 (w / v) % 以上、更に好ましくは 0. 3 (w / v) % 以上であり、上限値は 3 0 (w / v) % 以下、好ましくは 1 0 (w / v) % 以下、更に好ましくは 5 (w / v) % 以下である。例えばマンニトールを含有する場合、下限値は 0. 0 5 (w / v) % 以上、好ましくは 0. 1 (w / v) % 以上、更に好ましくは 0. 3 (w / v) % 以上であり、上限値は 3 (w / v) % 以下、好ましくは 2 (w / v) % 以下、更に好ましくは 2 (w / v) % 以下である。その他の糖としてはトレハロースやシクロデキストリン等が挙げられる。これらの糖は、後述する認知症検査試薬キットの酵素やキット内容物自体の安定化剤として、また、キット内容物を凍結乾燥する場合は凍結乾燥賦型剤として機能し得る。

[0185]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、該工程には防腐剤を存在させられ、その種類や濃度は限定されない。例えばアジ化ナトリウムの場合、下限値は後述する認知症検査試薬キットの 0. 0 0 5 (w / v) % 以上、好ましくは 0. 0 1 (w / v) % 以上、更に好ましくは 0. 0 3 (w / v) % 以上であり、

上限値は1 (w/v) %以下、好ましくは0.5 (w/v) %以下、更に好ましくは0.1 (w/v) %以下である。例えば抗生物質の場合、下限値は5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、好ましくは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、更に好ましくは30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であり、上限値は100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、好ましくは75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、更に好ましくは60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である。

[0186]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、該工程にはE D T A、E G T A、N A T 等のキレート剤を含有させられ、その種類や濃度は限定されない。例えばE D T Aを含有する場合、通常は0.05 mM以上10 mM以下の範囲である。キレート剤は、金属を活性発現に利用するプロテアーゼがキット内容物中に混在する場合、該活性を阻害する作用により、キット中の酵素の安定化剤として機能し得る。

[0187]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、該工程には牛アルブミン、卵アルブミン、ヒトアルブミン、クリスタリン等の触媒作用をもたないタンパク質を存在させられ、その種類や濃度は限定されない。例えば牛アルブミンを含有する場合、通常その含有量は0.01 (w/v) %以上5 (w/v) %以下の範囲である。これらのタンパク質はプロテアーゼの基質となるため、酵素の安定化剤となる場合がある。また、凍結乾燥に際しては凍結乾燥賦型剤となり得る。

[0188]

酵素反応を進めることのできる添加物とは、上記のような酵素の反応性及び／又は安定性を維持及び／又は高める目的の添加物を含み、その例としてはp H緩衝剤、界面活性剤、塩、糖、防腐剤、キレート剤、触媒作用をもたないタンパク質等が挙げられる。

[0189]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、その反応時間は、血清及び／又は血漿中の P l s E t n 量を特異的に測定することができる限り限定されないが、例えば後述する本発明の実施の形態の認知症検査試薬キット内容物の各成分を単一の容器のキットとして用いる場合、反応時間の下限値は 15 秒以上、好ましくは 1 分以上、更に好ましくは 3 分以上である。上限値は特に設けないが、好ましくは 30 分以下、更に好ましくは 15 分以下、特に好ましくは 10 分以下である。例えば後述する本発明の実施の形態の認知症検査試薬キット内容物の各成分を 2 以上の容器に分離して用いる場合、それぞれの容器の内容物を使用する反応時間の下限値は 15 秒以上、好ましくは 1 分以上、更に好ましくは 3 分以上である。上限値は特に設けないが、好ましくは 30 分以下、更に好ましくは 15 分以下、特に好ましくは 10 分以下である。それぞれの容器の内容物を使用する反応時間は同一でなくてもよい。一態様において、本発明の実施の形態の l y P l s a s e 及び／または P L の作用を利用する血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法の反応時間は、好ましくは 30 分以内、更に好ましくは 15 分以内、特に好ましくは 10 分以内に完了する。

[0190]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である場合、各工程を実施する温度は、血清及び／又は血漿中の P l s E t n 量を特異的に測定することができる温度であれば限定されず、各工程の温度は同一でなくてもよい。各工程に酵素を用いる場合、用いる酵素の作用温度の範囲内で行うことが好ましい。例えば、下限値は 15℃以上、好ましくは 20℃以上、更に好ましくは 25℃以上であり、上限値は 70℃以下、好ましくは 50℃以下、更に好ましくは 40℃以下であり、好適には 37℃付近である。

[0191]

血清及び／又は血漿 P l s E t n 量は、例えば特許文献 2 に記載された L C

—MS/MS法によってP l s E t nを各分子種ごとに定量することもできる。

[0192]

本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する方法において、125 l—HPLC法は高額な装置や放射性ヨウ素を使用するので汎用性が劣るが、従来多くの測定実績があり比較対象データが多いので好ましい。本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、酵素を利用した定量であり、さらに上記の(1)～(3-4)の工程を含む酵素を利用する方法(図7)は、汎用自動分析機に応用でき、利便性が良いので好ましい。本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、さらに上記の(1)～(3-3)の工程を含む酵素を利用する方法(図8)は、(1)～(3-4)の工程を含む酵素を利用する方法に比べて使用する酵素が多く経済性に劣るが、汎用自動分析機に応用でき、利便性が良いので好ましい。LC—MS/MS法は高額な装置を使用するので汎用性が劣るが、各分子種ごとに定量できるので好ましい。すなわち本発明の血清及び／又は血漿P l s E t n量の定量方法は、125 l—HPLC法、LC—MS/MS法、酵素法等に限定されず、例えば、測定感度、特異度、再現性、経済的な理由、安全性目的、適用法令等に応じて当業者であれば適宜変更し得る。

[0193]

本発明のl y P l s a s eとしては、P s e u d o m o n a s p u t i d a (K T 2 4 4 0) 又はT h e r m o c r i s p u m s p. (N I T E B P—0 1 6 2 8) 由来の配列番号1または2のアミノ酸配列を有するl y P l s a s eが挙げられる。また、水の存在下でl y P l s E t nを加水分解し、対応するアルデヒドとグリセロ-3-ホスフォエタノールアミンを得る反応を触媒する本発明のl y P l s a s eも挙げられる。

[0194]

本発明のl y P l s a s eが天然の微生物由来である場合、該微生物は、

lyPlsEtnを加水分解し、対応するアルデヒドとグリセロール-3-ホス
 フォエタノールアミンを得る反応を触媒する酵素を生産する微生物であれば
 特に限定されないが、例えば*Pseudomonas*属又は*Thermoc*
*rispum*属に属する微生物であり、好ましくは、*Pseudomona*
*s putida*又は*Thermocrispum* sp. に属する微生物
 であり、最も好ましくは*Pseudomonas putida* (KT24
 40) 又は*Thermocrispum* sp. (NITE BP-016
 28) である。*Pseudomonas putida* (KT2440) は
 DSM No. 6125としてLeibniz-Institut DSM
 Z (Deutsche Sammlung von Mikroorgan
 ismen und Zellkulturen GmbH) で購入できる
 。

[0195]

土壌、湖沼、海、生物の表面や体腔内等から分離した菌株が、*Pseudo*
*monas*属又は*Thermocrispum*属に属する微生物であるかど
 うかは、例えば「Bergey's Manual 第2版(2001年)
 」、「微生物の分類・同定実験法—分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に
 (Springer Lab Manual) シュプリンガー・フェアラー
 ク東京、2001年9月」等に記載の方法、市販の同定検査用製品(例えば
 BIOMERIEUX社)を使用する方法、「株式会社テクノスルガ・ラボ
 (静岡県静岡市)」等に委託する方法等により確認すればよい。さらにそれ
 らの菌株が、*Pseudomonas putida*又は*Thermocr*
ispum sp. であるかどうかは、「Stackebrandt E.
 、Ebers J. : Taxonomic parameters re
 visited: tarnished gold standards,
 Microbiology today, nov, 152-155頁
 、2006年」に記載の方法等により判断すればよい。すなわち、DNA-
 DNAハイブリダイゼーションで70%以上の相同性がある、又は16s

rRNAが98.5%以上同一であれば同属同種と判断できる。好ましくはDNA-DNAハイブリダイゼーションで70%以上の相同性があれば同属同種と判断することができる。28S rDNA-D1/D2及び／又はITS-5.8S rDNA塩基配列により*Pseudomonas putida*又は*Thermocrispum* sp. であるかどうかを判断する場合も同様である。

[0196]

天然の微生物の分離は、当業者に公知の手法を用いて行うことができ、例えば、日本生物工学会編生物学実験書（2002年改訂版、培風館）に記載の微生物分離方法を参考にして行うことができる。

[0197]

本発明の*lyPase*としては：配列番号1または2のアミノ酸配列を含み、*lyPase*を加水分解し、グリセロール-3-ホスホエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する*lyPase*：配列番号1または2に記載のアミノ酸配列において、*lyPase*を加水分解し、グリセロール-3-ホスホエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応の触媒作用に関与しない一部のアミノ酸を変異させたアミノ酸配列からなる*lyPase*：及び配列番号1または2のアミノ酸配列に各種のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列からなり、*lyPase*を加水分解し、グリセロール-3-ホスホエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する*lyPase*が挙げられる。本発明の*lyPase*のN末端側及び／又はC末端側にチオレドキシン蛋白質等機能性蛋白質やその他のアミノ酸配列からなる部分を付加する等により融合*lyPase*とすることも好ましい。また、該付加する部分により精製や確認等をせしめることのできるタグと呼ばれる部分を融合させてもよく、場合によっては、融合後、そのタグ部分の全部又は一部を削除してよい。例えば、本発明の*lyPase*を菌体外やペリプラズムへ輸送する為の約20個のシグナルペプチドや、効率的な精製を行う為の5～10個のHisを付加してもよく

、それらを直列して付加してもよい。それらのアミノ酸配列の間等に数個のプロテアーゼ認識アミノ酸配列を配置して付加してもよい。上述の付加の例と同様に、欠失、又は置換を行うことができ、例えば、配列番号1または2のアミノ酸配列において、*l y P l s E t n*を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する作用とは無関係の、数個のアミノ酸からなるドメインや、複数個のアミノ酸からなるギャップが存在する場合、それらの欠失を組み合わせることもできる。欠失、置換又は付加を適宜組み合わせてもよい。具体的には配列番号2のアミノ酸配列において配列番号6の27アミノ酸からなるシグナルペプチドを欠失しても本発明の*l y P l s E t n*である。配列番号5のアミノ酸配列において配列番号7の33アミノ酸からなるシグナルペプチドを欠失しても本発明のPLである。また、*B o t e c h n o l L e t t.* 2011年、33巻、727-731頁で開示された方法を参考に、*S t r e p t o v e r t c l l u m c i n n a m o n e u m*由来の*p h o s p h o l i p a s e D*のプロモーター、シグナルペプチド、ターミネーター配列も使用できる。

[0198]

本発明の*l y P l s a s e*は、配列番号3または4に記載の塩基配列に相補的な塩基配列と後述するストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされる蛋白質であって、*l y P l s E t n*を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する*l y P l s a s e*であってもよい。

[0199]

本発明は：配列番号1または2のアミノ酸配列からなる*l y P l s a s e*をコードする塩基配列を含む遺伝子：及び配列番号1または2に記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、*l y P l s E t n*を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子にも関する。

[0200]

そのような遺伝子としては、特に限定されないが、例えば：配列番号3または4に記載の塩基配列を含む遺伝子：及び配列番号3または4に記載の塩基配列において1又は複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、`l y P l s E t n`を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する蛋白質をコードする塩基配列が挙げられ、具体的には：配列番号3または4の塩基配列を大腸菌や放線菌等宿主のコドン使用頻度に合わせて変更した塩基配列を含む遺伝子：及び配列番号1または2のアミノ酸配列において、`l y P l s E t n`を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する作用に関与しない1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子が例示される。

[0201]

本発明の遺伝子は、配列番号3または4に記載の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、`l y P l s E t n`を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子であってもよい。

[0202]

上記のストリンジントな条件は、通常、完全ハイブリッドの融解温度（ T_m ）より約5℃～約30℃、好ましくは約10℃～約25℃低い温度であって、特異的なハイブリッドが形成される条件であり、例えばJ. S a m b r o o kら、M o l e c u l a r C l o n i n g, A L a b o r a t o r y M a n n u a l, S e c o n d E d i t i o n, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s (1989)に記載されている条件が挙げられる。また、例えば、90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件であってもよい。具体的には、例えば、完全ハイブリッ

ドの $T_m \sim (T_m - 30)^\circ\text{C}$ 、好ましくは $T_m \sim (T_m - 20)^\circ\text{C}$ の温度範囲で、かつ $1 \times \text{SSC}$ （1倍濃度のSSC溶液の組成は、 150mM 塩化ナトリウム、 15mM クエン酸ナトリウム）、好ましくは $0.1 \times \text{SSC}$ に相当する塩濃度でハイブリダイズを行う条件が挙げられる。

[0203]

本発明の遺伝子を組み込むベクターは特に限定されないが、宿主微生物体内で自律的に増殖しうるファージ又はプラスミドのうち遺伝子組換え用として構築されたものが適しており、ファージベクターとしては、例えば、大腸菌に属する微生物を宿主とする場合には $\lambda\text{gt} \cdot \lambda\text{C}$ 、 $\lambda\text{gt} \cdot \lambda\text{B}$ 等が使用できる。プラスミドベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、Novagen社のpETベクター、又はpBR322、pBR325、pACYC184、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pIN1、BluescriptKS+等、バチラス・サチリスを宿主とする場合にはpWH1520、pUB110、pKH300PLK等、放線菌を宿主とする場合にはpIJ680、pIJ702等、酵母、特にサッカロマイセス・セレビジアエを宿主とする場合にはYRp7、pYC1、YEp13等が使用できる。本発明の組換えベクターは、安全性が確認されているという観点から、遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成十六年財務省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省令第一号）別表第一号の規定に基づき経済産業大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物の、別表第一に掲げられたベクターに、上記の本発明の遺伝子が挿入された組換えベクターが好ましい。プロモーターは宿主中で発現できるものであれば特に限定されない。本発明の組換えベクターは、例えば本発明の遺伝子及び上記のベクターを用いて、当業者に公知の手法で作成することができる。

[0204]

本発明の上記の組換えベクターを含む形質転換体は、上記組換えベクターで形質転換された形質転換体であれば限定されず、宿主としては、大腸菌、バ

チラス・サチリス、ストレプトマイセス属やロドコッカス属に属する放線菌、サッカロマイセス・セレビジアエ、ピキア・パストリス、麹カビ等が挙げられる。本発明の形質転換体は、安全性が確認されているという観点から、遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成十六年財務省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省令第一号）別表第一号の規定に基づき経済産業大臣が定めるG I L S P 遺伝子組換え微生物の、別表第一に掲げられた宿主に形質転換したものが好ましい。本発明の形質転換体は、例えば本発明の組換えベクター及び上記の宿主を用いて、当業者に公知の手法で作成することができる。

[0205]

本発明はまた、本発明の I y P I s a s e を生成する微生物を培地で培養し、培養物中に本発明の I y P I s a s e を生成蓄積させ、該培養物から本発明の I y P I s a s e を採取することを特徴とする、本発明の I y P I s a s e の製造方法にも関連する。

[0206]

微生物の培養工程及び生成蓄積工程における培養条件はその栄養生理的性質を考慮して適宜選択すればよく、通常液体培養で行うが、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利であり得る。培地の栄養源としては、L B、P D A、M A、O A 又は L c A 培地等微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。培養温度は本発明の I y P I s a s e が生成される範囲で適宜変更し得るが、天然の微生物の場合、下限が 5℃ 以上、好ましくは 15℃ 以上、更に好ましくは 20℃ 以上、上限は、好熱性の古細菌やバクテリアの場合の約 100℃ となるが、通常は 55℃ 以下、好ましくは 45℃ 以下、更に好ましくは 40℃ 以下である。特に真菌の場合は、下限が 4℃ 以上、好ましくは 10℃ 以上、更に好ましくは 20℃ 以上、上限が 50℃ 以下、好ましくは 42℃ 以下、更に好ましくは 37℃ 以下である。培養時間は、培養条件によって変動し得るが、本発明の I y P I s a s e の生成が最高量に達

する時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、通常は下限が17時間以上、好ましくは20時間以上、更に好ましくは24時間以上、上限が80時間以下、好ましくは72時間以下、更に好ましくは48時間以下である。特に真菌の場合は、下限が1日以上、好ましくは2日以上、上限は約10日、好ましくは4日以下、更に好ましくは3日以下である。培地pHは微生物が発育し、本発明のI y P I s a s eを生成する範囲で適宜変更し得るが、下限が好ましくはpH4以上、更に好ましくはpH5以上、上限が好ましくはpH8.5以下、より好ましくはpH7.5以下である。特に真菌の場合は、低いpHが好ましい。

[0207]

本発明はまた、上記の本発明の形質転換体を培地で培養し、培養物中に本発明のI y P I s a s eを生成蓄積させ、該培養物から該I y P I s a s eを採取することを特徴とする、本発明のI y P I s a s eの製造方法にも関連する。

[0208]

形質転換体の培養工程及び生成蓄積工程における培養条件は、上記微生物の場合と同様であり、形質転換体の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、形質転換体が大腸菌の場合、培養温度は、下限が10℃以上、好ましくは20℃以上、更に好ましくは25℃以上、上限が45℃以下、好ましくは42℃以下、更に好ましくは37℃以下である。形質転換体が放線菌の場合、下限が4℃以上、好ましくは10℃以上、更に好ましくは20℃以上、上限が50℃以下、好ましくは42℃以下、更に好ましくは37℃以下である。培養時間は、条件によって変動し得るが、本発明のI y P I s a s eの生成が最高量に達する時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、形質転換体が大腸菌の場合、通常は下限が10時間以上、好ましくは12時間以上、更に好ましくは17時間以上、上限が60時間以下、好ましくは48時間以下、更に好ましくは30時間以下である。形質転換体が放線菌の場合、通常は下限が17時間以上、好ましくは20時間以上、更に好ま

しくは24時間以上、上限が80時間以下、好ましくは72時間以下、更に好ましくは48時間以下である。培地pHは、形質転換体が発育し、本発明のIyPIsaseを生成する範囲で適宜変更し得るが、大腸菌や放線菌の場合、下限が好ましくはpH5.8以上、更に好ましくはpH6.2以上、上限が好ましくはpH8.5以下、更に好ましくはpH7.5以下である。

[0209]

上記の培養物中に生成蓄積された本発明のIyPIsaseを採取する方法は特に限定されないが、簡便には殺菌、非殺菌を問わず菌体を含む細胞等のまま本発明のIyPIsaseを採取してもよい。培養不純物や細胞破砕物等を軽く除き、不純物が残存したまま、本発明のIyPIsaseを採取することも好ましい。目的や用途等によっては実質的に不純物を含まない本発明のIyPIsaseを採取することも好ましい。例えば50%以上、70%以上又は95%以上の純度で本発明のIyPIsaseを採取することが例示される。純度はSDS-PAGEやHPLC等の公知の方法を用いて確認することができる。

[0210]

本発明のIyPIsaseを精製する方法を以下に説明する。本発明のIyPIsaseが、菌体内に形成される場合には、培養終了後、得られた培養物から、濾過又は遠心分離等の手段により菌体を採集する。次いで、この菌体を機械的方法又はリゾチーム等の酵素的方法で破壊し、必要に応じてEDTA、及び／又は適当な界面活性剤等を添加して該IyPIsaseを濃縮し、アセトン、メタノール、エタノール等の有機溶媒による分別沈殿法、硫酸アンモニウム、食塩等による塩析法等を適用して本発明のIyPIsaseを沈殿させ回収することができる。この沈殿物について、必要に応じて透析、等電点沈殿を行った後、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等の吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーや疎水的クロマトグラフィーにより処理して、精製された本発明のIyPIsase

aseを得ることができる。上記の方法は適宜組み合わせて行うことができる。また、本発明のlyPlsaseが培養液中に形成される場合には、培養物から濾過又は遠心分離等の手段により菌体を除去して培養液を得て、前記菌体内に形成される場合と同様の処理を行うことにより、精製された本発明のlyPlsaseを得ることができる。

[0211]

上記の本発明のlyPlsaseの製造方法によって得られるlyPlsaseは、必要に応じて安定化剤として、各種の塩類、糖類、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え、限外濾過濃縮、凍結乾燥等の方法により、液状又は固形とすることができる。凍結乾燥を行う場合、安定化剤としてサッカロース、マンニトール、食塩、アルブミン、硫安等を0.5～10%程度添加してもよい。

[0212]

本発明のlyPlsaseは、従来公知のlyPlsaseとはアミノ酸配列において区別できる。例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列と相同性を有する公知のアミノ酸配列を、NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>))でProtein BLAST検索すると、平成25年6月29日時点で、Pseudomonas putida KT2440株由来のアミノ酸配列が検索できるものの、その定義 (Definition) はhypothetical proteinであり、機能未知の蛋白質でである。同様に配列番号2に記載のアミノ酸配列と相同性を有する公知のアミノ酸配列をNCBI BLASTでProtein BLAST検索すると、平成25年6月29日時点で、Stackebrandtia nassauensis由来のアミノ酸配列が検索できるものの、その定義 (Definition) はglycerophosphoryl diester phosphodiesteraseであり、全く異なることが明らかである。さらに

従来公知のラット由来の *lyPlsase* を開示した THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 28, の 24923 頁右 3 行目には「Tmem86b (発明者註: *lyPlsase* 遺伝子) has only been identified in vertebrates, including humans, mice, rats, cows, dogs, and zebrafish.」と記載されている。すなわち、従来、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、及びゼブラフィッシュを含む脊椎動物の *lyPlsase* が公知であった。本発明の *lyPlsase* は、上記のように微生物由来であり、本発明者らにより新規に発見された微生物由来の *lyPlsase* である。

[0213]

この様な *lyPlsase* は、本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 *PlsEtn* 量を定量する工程が、酵素を利用した定量であり、さらに該酵素が本発明の *lyPlsase* 及び／または PL である場合、*lyPlsEtn* を加水分解し、グリセロール-3-ホスホエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する酵素として利用できる。

[0214]

本発明はまた被験者の自然排泄尿中の *MI* の定量手段と、同一被験者の血清または血漿中の *PlsEtn* の定量手段とを含む、該被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するための認知症検査手段であって、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、*MI* と *PlsEtn* とのそれぞれの、予め求められた閾値に対して、被験者の *MI* と *PlsEtn* の定量値を比較して用いる、前記の認知症検査手段に関わる。前記手段としては、組成物、検査試薬、酵素キット等が挙げられるがこれに限定されない。

[0215]

本発明はまた、被験者の自然排泄尿中の *MI* を定量する為の酵素と、同一被

験者の血清または血漿中のP l s E t nを定量する為の酵素とを含む、該被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するための認知症検査試薬キットであって、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、M l とP l s E t nとのそれぞれの、予め求められた閾値に対して、被験者のM l とP l s E t nの定量値を比較して用いる、前記の検査試薬キットに関わる。

[0216]

P l s E t nを定量する試薬キットは、P l s E t nを1 2 5 l -H P L C法で定量する方法、上記工程（1）～（3-4）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する方法、L C-M S /M S法により定量する方法などを実施するための試薬キットであり、本発明のl y P l s a s e及び／またはP Lの作用を利用して定量するための試薬キットが好ましい。

[0217]

本実施の形態の認知症検査試薬キット（本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、酵素を利用した定量であり、さらに該酵素が本発明のl y P l s a s e及び／またはP Lである認知症検査試薬キット及び本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、さらに上記工程（1）～（3-4）又は（1）～（3-3）を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する方法を利用した定量である認知症検査試薬キット）は、本明細書に記載の各種酵素、P L、l y P l s a s e、G P C P、エタノールアミノキシダーゼ、P L A₁、P L A₂、P L B、L Y P L、M G L P、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、A S O M等を、上述の認知症検査方法の記載を参照して、適宜組み合わせて1以上含むことができる。それらの好ましい例は上述の本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿P l s E t n量を定量する工程が、酵素を利用した定量である方法の場合と同様である。

[0218]

本実施の形態の認知症検査試薬キットは、測定の感度、正確性、再現性、キットの安定性等の品質を向上する目的等で、塩、糖、防腐剤、キレート剤、タンパク質、界面活性剤等他の成分を含有してもよい。含有される成分の種類及び量は、認知症検査試薬キットの使用目的や測定用途に応じて適宜変更することができ、例えば、測定感度、特異度、再現性、経済的な理由、安全性目的、適用法令等に応じて当業者であれば適宜変更し得る。それらの好ましい例は上述の本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程が、酵素を利用した定量である方法の場合と同様である。

[0219]

本発明は、被験者の自然排泄尿中の M I を定量する酵素と、同一被験者の血清または血漿中の P l s E t n を定量する酵素とを含む酵素試薬キットであって、被験者を認知症患者またはその前段階にある者として分類することの特徴とする認知症検査試薬キットにも関する。被験者の自然排泄尿中の M I を定量する酵素を含む酵素試薬キットには少なくともミオイノシトールデヒドロゲナーゼを含むことが好ましい。

[0220]

本発明の実施の形態の認知症検査試薬キットは、自然排泄尿中の M I と血清及び／又は血漿中の P l s E t n 、それぞれの定量値に閾値を設定することによって被験者を認知症患者またはその前段階にある者として分類することも好ましく、そのような閾値は上述と同様である。また、本発明の実施の形態の認知症検査試薬キットで定量する被験者の自然排泄尿、血清及び／又は血漿中については上述と同様である。

[0221]

本発明の実施の形態の認知症検査試薬キットが、本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する工程を利用し、さらに上記工程（１）～（３－４）又は（１）～（３－３）'を含む本発明の実施の形態の血清及び／又は血漿 P l s E t n 量を定量する方法を利用したキットの場合、内容物の各成分を単一の容器のキットとしてもよいが、通常は２以上の容器

に分離することが好ましい。一態様において、本実施の形態の認知症検査試薬キットは、被験者の血清または血漿中の P l s E t n 以外の物質を消去するための消去用容器 1 と、P l s E t n を測定するための容器 2 とに分けられる。

[0222]

本発明の実施の形態の認知症検査試薬キットは、以下の (1 a) ~ (3 a) を含み、(1 a) ~ (3 a) は被験者の血清または血漿中の P l s E t n 以外の物質を消去するための消去用容器 1 と、P l s E t n を測定するための容器 2 とに分けることができる。

[0223]

(1 a) P l s E t n を l y P l s E t n に加水分解できる酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

(2 a) l y P l s E t n をグリセロー 3 -ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

(3 a) グリセロー 3 -ホスフォエタノールアミンをエタノールアミンとグリセロリン酸に変換する酵素、エタノールアミンをグリコールアルデヒド、アンモニア、及び過酸化水素に変換する酵素とその酵素反応を進めるにことのできる添加物、さらに必要により過酸化水素を定量するための過酸化水素定量手段。

または前記 (2 a) の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記 (1 a) に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む試薬キット。

[0224]

そのような試薬キットの好ましい例は、少なくとも上記 (1 a) 及び (3 a) を含有する容器 1 : 並びに少なくとも (2 a) を含有する容器 2 を含む、認知症検査試薬キットである。

[0225]

被験者の血清及び／又は血漿中にホスファチジルエタノールアミンが含まれ、かつ、 lyP l s E t n をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する作用を触媒する酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する作用を有する場合は、容器１にさらにリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する作用を有する酵素を内容物として含有する容器１とすれば良い。

[0226]

本発明の実施の形態の認知症検査試薬キットは、以下の（１ a）～（３ a）'を含み、（１ a）～（３ a）'は被験者の血清または血漿中の P l s E t n 以外の物質を消去するための消去用容器１と、 P l s E t n を測定するための容器２とに分けることができる。

[0227]

（１ a） P l s E t n を lyP l s E t n に加水分解できる酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

（２ a）' lyP l s E t n をプラズメニルホスファチジン酸とエタノールアミンに分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解でき、かつリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる加水分解酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

（３ a）' エタノールアミンをグリコールアルデヒド、アンモニア、及び過酸化水素に変換する酵素とその酵素反応を進めるにことのできる添加物、さらに必要により過酸化水素を定量するための過酸化水素定量手段。

[0228]

そのような試薬キットの好ましい例は、少なくとも上記（１ a）及び（３ a）'を含有する容器１：並びに少なくとも（２ a）'を含有する容器２を含む、認知症検査試薬キットである。

[0229]

被験者の血清及び／又は血漿中にホスファチジルエタノールアミンが含まれ

、かつ、 I y P l s E t n をプラズメニルホスファチジン酸とエタノールアミンに加水分解する作用を触媒する酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する作用を有する場合は、容器1にさらにリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する作用を有する酵素を内容物として含有する容器1とすれば良い。

[0230]

本実施の形態の認知症検査試薬キットは、少なくとも既知量の P l s E t n を含むキャリブレーション試薬とともに用いてもよい。上記のキャリブレーション試薬は、例えば、少なくとも既知量の P l s E t n 及び／又は I y P l s を含む試薬であり、好ましくはpH緩衝剤、アジ化ナトリウムや抗生物質等の防腐剤、糖等の安定化剤を含む。これらの種類や濃度等の条件等は上記認知症検査試薬キットに関して記載した条件を参照して当業者であれば適宜決定することができる。キャリブレーション方法は、一点検量その他、多点検量（折れ線やスプライン）や多点検量の直線回帰などが選択できる。

[0231]

キャリブレーション試薬中の P l s E t n の既知量は特に限定されず、被験者の血清または血漿中の P l s E t n を正確に測定することができるよう、適宜選択すればよい。

[0232]

また、本実施の形態の認知症検査試薬キットのキャリブレーション試薬の場合、 P l s E t n の既知量の下限值は $10\ \mu\text{M}$ 以上、好ましくは $50\ \mu\text{M}$ 以上、更に好ましくは $80\ \mu\text{M}$ 以上、上限値は $500\ \mu\text{M}$ 以下、好ましくは $300\ \mu\text{M}$ 以下、更に好ましくは $250\ \mu\text{M}$ 以下とすることができる。

[0233]

本実施の形態の認知症検査試薬キット及び上述のキャリブレーション試薬は、液状品、液状品の凍結物、液状品の凍結乾燥品又は液状品の乾燥品（加熱乾燥及び／又は風乾及び／又は減圧乾燥等による）等の形態で提供することができる。また、例えば、ポイントオブケア装置のキャピラリーへの使用又

は酵素センサーとしての使用の場合、各成分の濃度は通常よりも高い濃度が好ましく、例えば、固定化したり、紙や膜に染み込ませたり、ゲル・ゾル状認知症検査試薬キットとしたりして使用することが好ましい。

[0234]

以下、本発明を参考例及び実施例（実施例等）に基づいて説明するが、本発明の範囲は以下の実施例等に限定して解釈されるものではない。

[0235]

本実施例等において、被験者は、東京都健康長寿医療センター「もの忘れ」外来来院者および高齢健常者「脳画像診断」ボランティアの中で、同センター倫理委員会の承認下、インフォームドコンセントが得て血液および尿を採取した。

[0236]

血清プラスマローゲン（コリン型プラスマローゲン：P l s C h o、エタノールアミン型プラスマローゲン：P l s E t n）以外の他のバイオマーカー（WBC、RBC、Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、PLT、TP、Alb、T-Bil、Cre、UA、 $\beta 2$ -ub、AMY、GOT、GPT、LDH、Na、Cl、K、TSH、FreeT3、FreeT4、Glu、HbA1c、CRP、TNF- α 、IL-6、TG、TC、HDL-C、LDL-C、PL、VB9、VB12、 α -Toc、 β -Toc、 γ -Toc、A β 1-40およびA β 1-42）は、株式会社エスアールエル（東京都新宿区西新宿2-1-1）にて測定した。

[0237]

自然排泄尿MI（尿MI）はミオイノシトール測定試薬（ルシカMI、旭化成ファーマ株式会社、東京都千代田区神田神保町1丁目105）で測定し、1日あるいは3日分の平均値をCreで標準化した値（mg/gCr）で示した。

[0238]

認知機能検査はCDR、HDS-R、MMSEおよびMoCA-Jを行ない

、うつ状態の検査として「老年期うつ病評価尺度（GDS）」による検査を実施した。

[0239]

本実施例等で用いた試薬類としては、特に断らない限り、和光純薬工業株式会社、シグマアルドリッチ社等市販され容易に入手することができる任意のものを使用し、試薬メーカー、純度、価格等は特に限定されず、必要に応じて当業者であれば適宜選択して用いることができる。ヒトプール血清は、有限会社山久化成（東京都稲城市向陽台4-2-C-1007）から購入したものを使用した。本実施例等に使用した技術は、例えば本明細書に記載の先行技術文献、マニアティスらの方法（Maniatis, T. ら、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory、1982年及び1989年）、蛋白質・酵素の基礎実験法（改訂第2版、堀尾武一、1994年南光堂参照）及び市販の各種酵素又はキット類に添付された手順に従って、当業者であれば実施することができるものである。

[0240]

l y P l s a s e の酵素活性は以下の様にして測定した。

[0241]

石英製の1.0cmキュベットに反応試薬混合液を1mLとり、37℃で5分間予備加温する。120mM マンニトール及び70mMシュークロースを含む20mM Tris/HCl緩衝液（pH7.5）で適当な濃度に希釈した本発明のl y P l s a s e 20μLを反応試薬混合液に混和して反応を開始する。546nmにおける吸光度を10分間測定し、求められた吸光変化をA s / m i n、本発明の蛋白質溶液の代わりに精製水を用いた盲検をA b / m i nとして、1分間に1μmolのP l s E t nを酸化する酵素量を1Uとし、酵素活性（U/mL）を下記〔式〕により算出する。

[0242] 酵素活性（U/mL）

$$= \{ (A s / m i n - A b / m i n) / 18 \} \times 1.02 / 0.02 \times \text{希釈}$$

倍数・ ・ [式]

[反応試薬混合液]

50 mM BES / NaOH 緩衝液 pH 7.5
 5 U / mL GPCP (旭化成ファーマ株式会社 (T-33))
 5 U / mL POD (SIGMA (P8250))
 0.02 % TODB (同仁化学研究所 (OC22))
 0.03 % 4-AA (012-14471)
 8 mM lyPlisEtn
 (Avanti Polar Lipids, Inc. (850095))

本実施例等で用いた下記の「日立7080形自動分析機パラメーター」は、日立7080形自動分析機の取扱説明書等を参考にして、当業者であれば容易に設定し、該分析機を使用することができる。「日立7080形自動分析機パラメーター1」を例に、以下に簡単に分析機の使用方法を説明する。分析法（比色分析）は、10分反応の2ポイントエンド法で、反応開始後約10分後と5分後の吸光度の差を出力する（セルブランク、水ブランク、試薬量等の補正後に出力される）。測定波長は、主波長が660 nmであり、副波長は750 nmである。サンプル量（血清及び／又は血漿の量）は12 μ L、最初の工程のための検査試薬キット1はR1として160 μ L使用し、次の工程のための検査試薬キット2はR3として40 μ L使用する。なお、パラメーター中の空欄（[]）は、空欄にしておくという意味である。

[0243]

[日立7080形自動分析機パラメーター1]

分析法： [2ポイントエンド] [10] [16] [31] [0] [0]

波長（副波長／主波長）： [750] / [660]

検体量： 種別 1
 標準： [12.0] [0.0] [0]
 試薬分注量
 R1： [160] [0] [] [99]
 R2： [0] [0] [] [99]
 R3： [40] [0] [] [99]
 R4： [0] [0] [] [99]

[日立7080形自動分析機パラメーター2]

分析法： [2ポイントエンド] [10] [16] [31] [0] [0]

波長（副波長／主波長）： [750] ／ [660]

検体量： 種別 1
 標準： [6.0] [0.0] [0]

試薬分注量
 R1： [160] [0] [] [99]
 R2： [0] [0] [] [99]
 R3： [40] [0] [] [99]
 R4： [0] [0] [] [99]

以下に示した測定値等は、様々な条件、例えば、試薬の純度、測定の条件、使用機器の精度等、使用機器の置かれた温度や気圧等の雰囲気により変化し得るが、同条件で測定した場合には以下の実施例等で得られたものと同じ傾向を示す結果が得られることは当業者であれば理解できるであろう。

[0244]

実施例

[0245] [実施例1：尿M I 定量値と血清及び／又は血漿P l s E t n 定量値による認知症検査]

本実施例では、血清及び／又は血漿 P l s E t n 量は特許文献 1 に記載された放射性ヨウ素－高速液体クロマトグラフィー法（125I－HPLC法）で測定した。本実施例では、空腹時二番尿中の M l を測定した。

[0246]

1. 血清 P l s E t n 量

全測定データ（表 1－1、1－2）を基に、認知機能と相関性を示す項目を検索したところ、年齢、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、遊離トリヨードサイロニン（F r e e T3）、アルブミン（A l b）、グルコース（G l u）、インターロイキン 6（I L－6）に加えプラスマローゲン関連（P l s E t n、P l s C h o／P l s E t n 比、全リン脂質中の P l s E t n：P l s E t n／P L）項目で有意な相関を示すことが確認された（表 2）。これらの項目について C D R 別に有意差検定を行なったところ、C D R 3 群（0、0.5、1 ≤）すべてで有意差がみられた項目は認知機能検査（H D S－R、M M S E、M o C A－J）を除いては P l s E t n と P l s E t n／P L のみであった（表 3）。以上の解析から、血清 P l s E t n は認知症を分類するバイオマーカーとして機能することが確認された。

[0247]

[表1-1]

	Age	Sch	CDR	GDS	HDS-R	MMSE	MoCA-J	WBC/ μ l
健康モニター	mean $\pm$ SD	73.8 $\pm$ 5.4	13.2 $\pm$ 2.3	0 $\pm$ 0	29 $\pm$ 2	29 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2	5906 $\pm$ 1172
n (M/F=30/96)	126	126	126	-	126	126	125	119
もの忘れ	mean $\pm$ SD	78.9 $\pm$ 8.6	11.1 $\pm$ 3.0	0.8 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 2.9	21 $\pm$ 6	20 $\pm$ 5	5441 $\pm$ 1441
n (M/F=17/49)	66	66	64	66	66	66	66	66
入院	mean $\pm$ SD	77.9 $\pm$ 5.7	10.6 $\pm$ 1.5	-	3.9 $\pm$ 2.4	23 $\pm$ 5	20 $\pm$ 5	-
n (M/F=6/21)	27	27	-	27	27	27	27	-
PLT, $\times 10^4/\mu$ l T-Bil, mg/dl Cre, mg/dl TP, g/dl Alb, g/dl β 2-ub, mg/l TSH, μ U/ml Free T3, pg/ml								
健康モニター	mean $\pm$ SD	21.5 $\pm$ 6.0	0.5 $\pm$ 0.2	0.71 $\pm$ 0.20	7.5 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.2	3.61 $\pm$ 8.04	2.77 $\pm$ 0.36
n	119	114	114	114	114	114	114	114
もの忘れ	mean $\pm$ SD	20.6 $\pm$ 4.8	0.7 $\pm$ 0.2	0.75 $\pm$ 0.33	7.3 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.4	2.57 $\pm$ 2.56	2.41 $\pm$ 0.35
n	66	60	61	63	55	22	55	55
入院	mean $\pm$ SD	-	-	-	-	-	-	-
n	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu, mg/dl HbA1c, % TG, mg/dl TC, mg/dl HDL-C, mg/dl LDL-C, mg/dl PlsCho, μ M PlsEtn, μ M								
健康モニター	mean $\pm$ SD	95 $\pm$ 13	5.4 $\pm$ 0.5	120 $\pm$ 73	208 $\pm$ 29	64 $\pm$ 13	55.9 $\pm$ 12.2	73.3 $\pm$ 20.5
n	114	121	114	114	114	114	97	97
もの忘れ	mean $\pm$ SD	129 $\pm$ 43	5.7 $\pm$ 0.8	136 $\pm$ 80	214 $\pm$ 44	62 $\pm$ 18	51.5 $\pm$ 10.6	58.9 $\pm$ 15.7
n	59	58	63	63	60	57	51	51
入院	mean $\pm$ SD	-	-	-	-	-	34.5 $\pm$ 11.0	42.2 $\pm$ 14.1
n	-	-	-	-	-	-	10	10
ALP, U/l Na, mEq/l Cl, mEq/l K, mEq/l V.B12, pg/ml VB9, ng/ml α -Toc, μ M β -Toc, μ M								
健康モニター	mean $\pm$ SD	212 $\pm$ 60	141 $\pm$ 1	104 $\pm$ 2	4.5 $\pm$ 0.4	487 $\pm$ 202	7.5 $\pm$ 2.9	26.3 $\pm$ 10.0
n	114	114	114	114	107	114	48	48
もの忘れ	mean $\pm$ SD	256 $\pm$ 77	143 $\pm$ 3	104 $\pm$ 3	4.3 $\pm$ 0.5	644 $\pm$ 486	9.6 $\pm$ 5.0	27.1 $\pm$ 11.0
n	57	60	61	61	61	61	48	48
入院	mean $\pm$ SD	-	-	-	-	-	13.2 $\pm$ 3.6	0.3 $\pm$ 0.1
n	-	-	-	-	-	-	9	9

[表1-2]

		RBC, × 10 ⁴ /μl	Hb, g/dl	Ht, %	MCV, fl	MCH, pg	MCHC, g/dl
通常モニター	mean ± SD	441 ± 40	13.3 ± 1.3	42.3 ± 4.2	95.4 ± 4.3	30.3 ± 1.4	31.7 ± 0.8
	n (M/F=30/96)	119	119	119	119	119	119
もの忘れ	mean ± SD	415 ± 45	12.9 ± 1.3	39.2 ± 3.7	94.5 ± 4.7	31.0 ± 1.7	32.8 ± 0.9
	n (M/F=17/49)	66	66	66	66	66	66
入院	mean ± SD	-	-	-	-	-	-
	n (M/F=6/21)	-	-	-	-	-	-
		Free T4, ng/ml	UA, mg/dl	AMY, U/dl	GOT, U/l	GPT, U/l	LDH, U/l
通常モニター	mean ± SD	1.16 ± 0.18	5.0 ± 1.3	89 ± 36	26 ± 6	20 ± 8	252 ± 70
	n	114	114	114	114	114	114
もの忘れ	mean ± SD	1.17 ± 0.23	5.1 ± 1.3	91 ± 36	24 ± 7	19 ± 13	221 ± 44
	n	55	41	53	63	63	58
入院	mean ± SD	-	-	-	-	-	-
	n	-	-	-	-	-	-
		PLsCho+PlsEtn, μM	PLsCho/PlsEtn	PL, mM	PLsCho/PL, %	PlsEtn/PL, %	(PlsCho+PlsEtn)/PL, %
通常モニター	mean ± SD	125.7 ± 29.4	0.80 ± 0.15	3.48 ± 0.50	1.61 ± 0.32	2.13 ± 0.59	3.16 ± 1.42
	n	85	85	93	93	93	93
もの忘れ	mean ± SD	110.4 ± 23.7	0.90 ± 0.18	3.49 ± 0.64	1.18 ± 0.68	1.36 ± 0.79	2.54 ± 1.45
	n	51	51	59	58	58	58
入院	mean ± SD	76.7 ± 23.6	0.83 ± 0.16	2.12 ± 0.47	1.65 ± 0.47	2.04 ± 0.64	3.69 ± 1.04
	n	10	10	10	10	10	10
		v-Toc, μM	hsCRP, ng/dl	IL-6, pg/ml	TNF-α, ng/ml	AB1-40, pmol/l	AB1-42, pmol/l
通常モニター	mean ± SD	2.3 ± 1.2	1005 ± 1764	1.24 ± 0.85	1.27 ± 0.88	6.70 ± 1.34	0.85 ± 0.30
	n	48	114	73	71	74	74
もの忘れ	mean ± SD	2.4 ± 1.1	2785 ± 5746	2.74 ± 2.30	2.60 ± 2.28	7.84 ± 1.96	1.17 ± 0.36
	n	48	61	60	63	60	60
入院	mean ± SD	1.1 ± 0.8	-	5.04 ± 2.35	1.91 ± 0.84	8.89 ± 4.28	1.18 ± 0.56
	n	9	-	9	8	16	15

[表2]

	Age	MCHC	Free T3	Alb	Glu	PlsEtn	PlsCho/PlsEtn	PlsEtn/PL	IL-6
CDR	相関係数	0.510	-0.384	-0.516	0.468	-0.372	0.355	-0.438	0.353
	n	184	177	161	166	143	131	144	126
HDS-R	相関係数	-0.362	-0.476	0.326	-0.412	0.364	-0.334	0.376	-0.348
	n	218	184	168	172	156	144	158	140
MMSE	相関係数	-0.313	-0.433	0.328	-0.327	0.257	-0.307	0.266	-0.357
	n	218	184	168	172	156	144	158	140
MoCA-J	相関係数	-0.417	-0.384	0.277	-0.354	0.335	-0.325	0.311	-0.388
	n	216	182	166	170	155	143	157	138

[0250]

[表3]

CDR	Age	HDS-R	MMSE	MoCA-J	MCHC	Free T3	Alb	Glu	PlsEtn	PlsCho/PlsEtn	PlsEtn/PL	IL-6
0	平均	73.7	28.5	29.0	26.1	31.7	2.8	4.4	96.2	73.2	0.80	2.1
	SD	5.5	1.8	1.8	2.2	0.8	0.4	0.3	15.9	20.4	0.14	0.6
	n	128	129	129	128	121	116	116	116	98	86	95
	P*	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.006	0.027	0.184	0.036
0.5	平均	78.9	24.8	27.0	22.1	32.8	2.4	4.0	120.6	63.9	0.86	1.9
	SD	7.4	4.0	2.5	4.3	0.7	0.3	0.4	33.8	16.5	0.19	0.4
	n	24	28	28	28	24	17	19	19	22	22	21
	P**	0.065	0.000	0.000	0.000	0.605	0.884	0.369	0.452	0.027	0.141	0.030
1 ≤	平均	82.3	17.5	21.3	16.9	33.0	2.4	3.9	128.8	53.5	0.94	1.6
	SD	5.5	4.6	3.8	4.4	0.9	0.4	0.4	42.0	13.4	0.16	0.4
	n	32	33	33	32	32	29	26	31	23	23	20
	P***	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

* CDR 0vs0.5, ** CDR 0.5vs1 ≤, *** CDR 0vs1 ≤

2. 尿M I 量

尿M I量の世代別・性別測定データを基に、群間での有意差検定を行なったところ、男女とも高齢者群で尿M I量が有意に増加することが確認された。高齢者群の尿M I量は、若年および中年者群と比べて個人差がきわめて大きかった。また、高齢者の中の健常者と認知症患者の間では尿M I量に有意差を認めなかった（図1、表4）。

[0251] [表4]

		n	Age	尿 MI/Cr (mg/gCr)
健常若年	男	59	26.5±4.6	13.1±10.6
	女	32	23.9±4.0	19.1±14.3
健常中年	男	377	40.5±10.7	13.1±8.9
	女	67	34.7±10.1	13.0±6.1
健常老年	男	30	71.8±6.9	32.2±23.1
	女	46	73.3±4.7	33.5±21.4
認知老年	男	15	80.0±8.6	48.8±50.3
	女	44	78.1±9.4	38.4±24.7

全測定データ（表1）を基に、尿M I量と相関性を示す項目を検索したところ、「もの忘れ」群のみでプラスマローゲン関連（P I s E t n、P I s C h o + P I s E t n、P I s C h o / P I s E t n比）項目とヘモグロビンA 1 c（H b A 1 c）および腫瘍壊死因子 α （T N F - α ）で尿M Iと有意な相関を示すことが確認された（表5 - 1、5 - 2）。

[0252]

[表5-1]

		WBC	RBC	Hb	Ht	MCV	MCH	MCHC
健常	相関係数	-0.018	0.094	0.072	0.097	0.078	0.177	0.076
	有意確率(両側)	0.876	0.423	0.542	0.410	0.509	0.130	0.521
	N	74	74	74	74	74	74	74
もの忘れ	相関係数	-0.051	-0.078	-0.068	-0.084	0.086	0.116	-0.026
	有意確率(両側)	0.713	0.571	0.620	0.540	0.532	0.401	0.852
	N	55	55	55	55	55	55	55
		PLT	TP	Alb	T-Bil	Cre	UA	BUN
健常	相関係数	-0.021	0.195	0.141	0.225	0.016	-0.137	
	有意確率(両側)	0.861	0.092	0.224	0.051	0.888	0.237	
	N	74	76	76	76	76	76	
もの忘れ	相関係数	0.065	-0.002	0.052	-0.062	-0.016	0.021	0.335
	有意確率(両側)	0.638	0.991	0.730	0.872	0.912	0.905	0.017
	N	55	52	47	49	50	34	50
		β 2-ub	AMY	GOT	GPT	LDH	ALP	Na
健常	相関係数	0.052	-0.039	0.043	0.157	-0.056	0.069	0.088
	有意確率(両側)	0.655	0.741	0.710	0.174	0.630	0.554	0.449
	N	75	76	76	76	76	76	76
もの忘れ	相関係数	0.116	-0.113	-0.215	-0.150	-0.046	0.087	-0.083
	有意確率(両側)	0.636	0.469	0.126	0.288	0.761	0.567	0.571
	N	19	43	52	52	47	46	49
		Cl	K	TSH	Free T3	Free T4	Glu	HbA1c
健常	相関係数	-0.209	0.097	0.021	-0.085	0.165	0.078	0.160
	有意確率(両側)	0.070	0.404	0.857	0.466	0.157	0.504	0.169
	N	76	76	75	75	75	76	76
もの忘れ	相関係数	0.006	0.061	-0.122	0.025	0.151	0.126	0.449
	有意確率(両側)	0.969	0.672	0.424	0.872	0.323	0.389	0.001
	N	50	50	45	45	45	49	48

[0253]

[表5-2]

		CRP	TNF- α	IL-6	TG	TC	HDL-C	LDL-C
健常	相関係数	-0.122	-0.105	-0.032	0.074	-0.104	-0.061	-0.113
	有意確率(両側)	0.297	0.420	0.802	0.525	0.373	0.485	0.333
	N	75	61	62	76	76	76	76
もの忘れ	相関係数	0.249	~~-0.296~~	0.039	-0.018	-0.045	-0.133	-0.063
	有意確率(両側)	0.081	0.031	0.783	0.899	0.749	0.358	0.674
	N	50	53	52	52	52	50	47
		PlsCho	PlsEtn	Pls(Cho+Etn)	PlsCho/PlsEtn	PL	PlsCho/PL	PlsEtn/PL
健常	相関係数	-0.021	0.033	0.005	-0.103	0.040	-0.099	-0.019
	有意確率(両側)	0.866	0.785	0.969	0.394	0.748	0.424	0.880
	N	70	70	70	70	67	67	67
もの忘れ	相関係数	-0.255	~~-0.447~~	~~-0.404~~	0.314	-0.211	-0.009	-0.172
	有意確率(両側)	0.071	0.001	0.003	0.025	0.112	0.945	0.200
	N	51	51	51	51	58	57	57
		Pls(Cho+Etn)/PL	VB9	VB12	α -Toc.	β -Toc.	γ -Toc.	A β 1-40
健常	相関係数	-0.040	0.054	0.074	-0.054	-0.027	-0.102	0.222
	有意確率(両側)	0.749	0.643	0.538	0.741	0.867	0.530	0.101
	N	67	76	72	40	40	40	56
もの忘れ	相関係数	-0.135	0.162	0.059	0.107	-0.216	-0.126	0.086
	有意確率(両側)	0.315	0.255	0.683	0.504	0.175	0.434	0.547
	N	57	51	51	41	41	41	51
		A β 1-42	Sch	CDR	GDS	HDS-R	MMSE	MoCA-J
健常	相関係数	-0.075	-0.101			0.092	0.040	0.121
	有意確率(両側)	0.582	0.390			0.428	0.733	0.303
	N	56	75			76	76	75
もの忘れ	相関係数	0.220	0.041	0.144	0.117	-0.065	-0.008	-0.037
	有意確率(両側)	0.121	0.760	0.295	0.396	0.608	0.952	0.771
	N	51	59	55	55	64	64	64

P l s E t n量、尿M l量およびH b A 1 c量の3者の関係に注目して、尿M l量およびH b A 1 c量がP l s E t n量に及ぼす影響を検討した。健常者群と「もの忘れ」群ごとに、尿M l量およびH b A 1 c量を全測定値の平均値を境に4群に分割して、各群でのP l s E t n量を比較した。健常高齢者ではP l s E t n量に4群間で有意差を認めなかった。一方、「もの忘れ」群では、高H b A 1 c者(>5.5%)において高尿M l者(>36.6mg/gCr)と低尿M l者間でP l s E t n量に有意差を認めた。また、高尿M l者では健常者と「もの忘れ」群間でP l s E t n量に有意差を認

めた（図2）。以上の解析により、尿M I量を考慮する（高M I者を選択する）ことで、血清及び／又は血漿P I s E t n量の定量による認知症患者の検出確度（そして認知機能の評価能）が高まることが推測された。

[0254]

3. 尿M I量＋血清及び／又は血漿P I s E t n量

全高齢者（健常＋「もの忘れ」群）を対象に、血清P I s E t n（E P）量と尿M I量の全測定値の平均値を境に4群に分割して、各群での認知機能検査結果を比較した。認知機能検査（C D R、H D S－R、M M S E）の結果に対応させた場合、血清P I s E t n（E P）量（低レベル）かつ尿M I量（高レベル）群は他の3群と比較していずれも有意な認知機能低下を示した（図3、表6）。以上の解析から、血清P I s E t n量と尿M I量の測定を組み合わせることで、高精度で認知症患者を分類できることが確認された。

[0255]

[表6]

	Age	HbA1c	(原)MI	EP(PlsEtm)	CDR	HDS-R	MMSE	MoCA-J
EP>66.5	aver±SD	74.4±6.7	33.3±21.9	82.6±15.5	0.2±0.3	27.0±4.1	27.5±3.8	24.0±4.7
	n	80	76	57	102	89	95	94
EP<66.5	aver±SD	76.5±7.6	5.5±0.6	40.0±30.8	52.3±8.7	0.5±0.6	24.1±6.2	26.1±4.6
	n	90	83	64	115	103	111	111

EP>66.5, MI<36.6	aver±SD	74.6±6.1	5.5±0.5	22.7±7.1	80.5±13.2	0.2±0.3	26.8±4.1	27.8±3.2
	n	39	35	40	40	38	40	40
EP>66.5, MI>36.6	aver±SD	73.0±8.4	5.4±0.5	58.5±24.6	78.3±14.0	0.1±0.3	27.3±4.5	27.9±4.1
	n	15	16	17	17	16	17	16
EP<66.5, MI<36.6	aver±SD	74.4±8.4	5.3±0.4	23.7±6.8	53.6±9.7	0.3±0.4	25.5±5.5	27.4±3.3
	n	36	34	38	38	37	38	38
EP<66.5, MI>36.6	aver±SD	79.4±7.7	5.8±0.8	63.9±36.5	50.9±8.9	0.7±0.7	22.3±6.7	24.8±5.2
	n	24	23	26	26	24	26	26
EP<66.5, MI>36.6, Hb>5.5	aver±SD	80.1±8.1	6.3±0.7	83.8±44.3	51.1±8.1	0.9±0.8	21.5±7.2	24.5±5.0
	n	12	12	12	12	10	12	12

さらに、血清P l s E t n量が $58\mu\text{M}$ 未満、尿M l 量が 25mg/gCr 以上をそれぞれの基準とした場合の検出確度を調べたところ、 72.2% ($83/115$) の確度で認知症患者を検出することができた (図4)。

[0256]

また、全高齢者、尿M l 量 $>25\text{mg/gCr}$ 高齢者群および尿M l 量 $>36.6\text{mg/gCr}$ 高齢者群の3群について、血清P l s E t nの認知機能正常 (CDR値: 0) と認知機能非正常 (CDR値: 0.5以上) を分別する精度について、Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析によるROC曲線下の面積 (Area under the curve: AUC) を求めることによって調べた。その結果、尿M l 量が高レベルの高齢者を対象にするほど血清P l s E t nの分別能が高くなることが示された。すなわち、尿M l 量 $>36.6\text{mg/gCr}$ の高齢者を対象とした場合の血清P l s E t n量の分別能 (AUC) は0.838と、対面式認知機能検査 (HDS-R、MMSE、MoCA-J) のAUC (0.876~0.894) に匹敵した (図5)。

[0257]

さらに、血清P l s E t n量の認知機能評価能と対面式認知機能検査法との相関性を、対象者を全高齢者、尿M l 量 $>25\text{mg/gCr}$ 高齢者群および尿M l 量 $>36.6\text{mg/gCr}$ 高齢者群の3群について検討したところ、尿M l 量が高レベルの高齢者を対象にするほど血清P l s E t n量と認知機能検査結果との相関性が高くなることが示された (図6、表7)。以上の結果から、血清P l s E t n量の測定と尿M l 量の測定を組み合わせることで、高確度で認知症患者を分類できるようになり、さらには血清P l s E t n量を指標とした認知機能評価能が高まることが確認された。

[0258]

[表7]

<u>all</u>		CDR	HDS-R	MMSE	MoCA
PlsEtn	coefficient	-0.318	0.318	0.252	0.256
	p	0.000	0.000	0.000	0.000
	n	195	209	209	208
<u>MI>25</u>		CDR	HDS-R	MMSE	MoCA
PlsEtn	coefficient	-0.513	0.517	0.461	0.412
	p	0.000	0.000	0.000	0.000
	n	70	74	74	73
<u>MI>36.6</u>		CDR	HDS-R	MMSE	MoCA
PlsEtn	coefficient	-0.601	0.608	0.507	0.504
	p	0.000	0.000	0.001	0.001
	n	40	43	43	42

[実施例2：随時尿中と空腹時二番尿中のM I 定量値の比較]

本実施例では、随時尿中と空腹時二番尿中のM I 定量値を比較し、本発明の実施の形態の認知症検査方法において随時尿が空腹時二番尿に代替できることを確認した。

[0259]

50人の被験者から、連日あるいは適当な隔日（1ヶ月以内）の3日分の随時尿を採尿してM I を定量し平均値を随時尿中のM I 定量値（y 軸）とした。被験者から、連日あるいは適当な隔日（1ヶ月以内）の3日分の空腹時二番尿を採尿してM I を定量し平均値を空腹時二番尿のM I 定量値（x 軸）とした。それぞれの定量値の相関図を図10に示した。相関式は $y = 1.05x + 6.64$ 、相関係数 $r = 0.845$ と高い相関があったので、随時尿が空腹時二番尿に代替できることが確認できた。

[0260]

また、本実施例に用いた50人の被験者の随時尿中M I 量と空腹時二番尿中M I 量の平均はそれぞれ 32.3 mg/gCr と 40.5 mg/gCr であり、空腹時二番尿中M I 量 + $7.8 =$ 随時尿中M I 量の関係になる場合があ

ることが分かった。

[0261]

[実施例3：酵素を利用した血清、血漿等中のP l s E t nの定量]

[組成物1-1a]

20 mM B E S / N a O H 緩衝液 p H 7 . 5
0.05 mM A L P S (同仁化学研究所 (O C O 4))
2 mM C a C l ₂
70 mM S u c r o s e
120 mM M a n n i t o l
5 U / m L G P C P (旭化成ファーマ株式会社 (T - 3 3))
40 U / m L 特開2005-52034号公報のTOD
5 U / m L 国際公開番号：WO2012/105565 A1のPL
10 U / m L P O D (S I G M A (P 8 2 5 0))
5 U / m L A S O M (旭化成ファーマ株式会社 (T - 5 3))

[組成物2-1a]

20 mM B E S / N a O H 緩衝液 p H 7 . 5
1 mM N a ₂ S O ₄
0.12 mM D A - 6 7 (和光純薬工業株式会社 (O 4 6 - 2 2 3 4 1)
)
70 mM S u c r o s e
120 mM M a n n i t o l
5 U / m L P s e u d o m o n a s p u t i d a 由来 l y P l s a
s e
2% β - c y c l o d e x t r i n
0.1% D D M (同仁化学研究所 (D 3 8 2))

上記の[組成物1-1a]と[組成物2-1a]を調製し、それぞれR1、

R2として、[日立7080形自動分析機パラメーター1]で日立7080形自動分析機を用いて、0、25、50、・・・、125、150 μ Mの各濃度になるように、PlsEtn (Avanti Polar Lipids, Inc. Alabama, USA, 852804C) をプール血清と0.9%食塩水に添加した検体を測定した。

[0262]

結果を図11に示した。図中白丸はPlsEtnをプール血清に添加した検体の定量値の検量線であり、 $y = 2.10x + 164$ 、相関係数 $r = 0.997$ で酵素を利用した血清、血漿中のPlsEtnの定量ができた。黒丸はPlsEtnを0.9%食塩水に添加した検体の定量値の検量線であり、 $y = 2.28x - 54$ 、相関係数 $r = 0.998$ で試料のPlsEtnの定量ができた。血清中PlsEtnと0.9%食塩水中PlsEtnの定量値の検量線の傾きが同じでかつ相関係数が1に近かった。

[0263]

なお、血清中PlsEtnの検量線の定量値の、切片は元々血清に含まれていたPlsEtnの影響であり、0.9%食塩水中PlsEtnの定量値の検量線の切片は試薬ブランクの影響である。また、Pseudomonas putida由来lyPlsaseの製造方法は後述する。

[0264]

[組成物1-1b]

50 mM	BES-NaOH pH7.5
10 U/mL	Peroxidase
50 U/mL	Ethanolamine oxidase
5 U/mL	GPCP
1 U/mL	国際公開番号：WO2012/105565 A1のPL

[組成物1-1b]

50 mM BES-NaOH pH 7.5
 4.2 U/mL ラット由来の l y P l s a s e
 12 μM DA67

ここで、ラット由来の l y P l s a s e は The j o u r n a l o f
 b i o l o g i c a l c h e m i s t r y、2011年、286巻、2
 4916～24930頁に記載の方法でラット由来の l y P l s a s e を
 大腸菌組換え体として製造した。

[0265]

10% DDMに P l s E t n を 0～200 μM になるように添加して検体
 とした。検量線は相関式 $y = 2.27x - 53$ で表され、相関係数 $r = 0.998$
 であった。なお、切片が -53 となった理由は、上記と同様である。

[0266]

本実施例により酵素を利用した血清、血漿等中の P l s E t n が正確に定量
 できることが示された。

[0267]

[実施例4：125I-HPLC法と酵素を利用した血清または血漿中の P
 l s E t n の定量値の比較1]

47の血清検体を、次の2種類の方法で測定した：

(i) 125I-HPLC法、

(ii) P s e u d o m o n a s p u t i d a 由来 l y P l s a s e を
 使用した酵素法（[組成物1-1a]と[組成物2-1a]）。

[0268]

それぞれの検査試薬キットを R1、R2として、[日立7080形自動分析
 機パラメーター2]で日立7080形自動分析機を使用して測定した。

[0269]

それぞれの定量値の相関図を図12に示した。相関式は $y = 0.55x + 26.9$ 、
 相関係数 $r = 0.880$ と高い相関があり、P s e u d o m o n

asputida由来lypsaseを使用した酵素法で検体中のPlsEtnが測定できた。

[0270]

[実施例5：125I-HPLC法と酵素を利用した血清または血漿中のPlsEtnの定量値の比較2]

47の血清検体を、次の2種類の方法で測定した：

(i) 125I-HPLC法、

(iii) Thermocrispum sp. を使用した酵素法（[組成物1-2c]と[組成物2-2c]）。

[0271]

それぞれの検査試薬キットをR1、R2として、[日立7080形自動分析機パラメーター2]で日立7080形自動分析機を使用して測定した。

[0272]

[組成物1-2c]

20mM BES/NaOH緩衝液 pH7.5

0.05mM ALPS（同仁化学研究所（OC04））

2mM CaCl₂

70mM Sucrose

120mM Mannitol

5U/mL GPCP（旭化成ファーマ株式会社（T-33））

40U/mL 特開2005-52034号公報のTOD

5U/mL 国際公開番号：WO2012/105565 A1のPL

10U/mL POD（SIGMA（P8250））

5U/mL ASOM（旭化成ファーマ株式会社（T-53））

5U/mL LYPL（旭化成ファーマ株式会社（T-59））

[組成物2-2c]

20mM BES/NaOH緩衝液 pH7.5

1 mM Na_2SO_4
 0.12 mM DA-67 (和光純薬工業株式会社 (046-22341)
)
 70 mM Sucrose
 120 mM Mannitol
 5 U/mL Thermocrispum sp. 由来lyPlase
 e
 2% β -cyclodextrin

それぞれの定量値の相関図を図13に示した。相関式は $y = 0.78x + 16.8$ 、相関係数 $r = 0.858$ と高い相関があり、Thermocrispum sp. 由来lyPlaseを使用した酵素法で検体中のPlsEtnが測定できた。

[0273]

[実施例6：125I-HPLC法と酵素を利用した血清または血漿中のPlsEtnの定量値の比較3]

47の血清検体を、次の2種類の方法で測定した：

(i) 125I-HPLC法、
 (iv) PLDを使用した酵素法（[組成物1-3]と[組成物キ2-3]
 ）。

[0274]

それぞれの検査試薬キットをR1、R2として、[日立7080形自動分析機パラメーター2]で日立7080形自動分析機を使用して測定した。

[0275]

[組成物1-3]

20 mM Tris/HCl緩衝液 pH8.5
 0.05 mM ALPS (同仁化学研究所 (0C04))
 2 mM CaCl_2

2 mM $MgCl_2$
 2 U/mL GPCP (旭化成ファーマ株式会社 (T-33))
 40 U/mL TOD (旭化成ファーマ株式会社 (T-25))
 5 U/mL PLA₂ (旭化成ファーマ株式会社 (T-31))
 30 U/mL LYPL (旭化成ファーマ株式会社 (T-59))
 10 U/mL POD (SIGMA (P8250))
 5 U/mL ASOM (旭化成ファーマ株式会社 (T-53))
 0.1% TX-100

[組成物 2-3]

20 mM HEPES/NaOH 緩衝液 pH 7.5
 10 mM $CaCl_2$
 0.12 mM DA-67 (和光純薬工業株式会社 (046-22341))
)
 10 U/mL PLD (旭化成ファーマ株式会社 (T-39))
 2% β -cyclodextrin
 1% TX-100

それぞれの定量値の相関図を図 14 に示した。相関式は $y = 0.74x + 19.8$ 、相関係数 $r = 0.825$ と高い相関があり、PLD を使用した酵素法で検体中の PlsEn が測定できた。

[実施例 7 : 125I-HPLC 法と酵素を利用した血清または血漿中の PlsEn の定量値の比較 4]

47 の血清検体を、次の 4 種類の方法で測定した :

- (i) 125I-HPLC 法、
- (ii) *Pseudomonas putida* 由来 lyPlsase を使用した酵素法 ([組成物 1-1a] と [組成物 2-1a])、

(i i i) *Thermocrispum* sp. を使用した酵素法（〔組成物 1－2 c〕と〔組成物 2－2 c〕）、

(i v) P L D を使用した酵素法（〔組成物 1－3〕と〔組成物キ 2－3〕）。

[0276]

それぞれの検査試薬キットを R 1、R 2 として、〔日立 7 0 8 0 形自動分析機パラメーター 2〕で日立 7 0 8 0 形自動分析機を使用して測定した。

[0277]

各方法による測定値の平均値を表 8 に示した。

[0278] [表 8]

方法	4 7 の血清検体の P l s E t n 定量値の平均 (μ M)
(i)	6 3 . 9
(i i)	6 1 . 9
(i i i)	6 6 . 6
(i v)	6 7 . 0

1 2 5 I－H P L C 法による P l s E t n 定量値に比べて、(i i) *Pseudomonas putida* 由来 l y P l s a s e を使用した酵素法は約 2 μ M 低くなり、(i i i) *Thermocrispum* sp. を使用した酵素法と (i v) P L D を使用した酵素法は約 3 μ M 平均値が高くなる場合があることが分かった。

[0279]

[実施例 8 : *Pseudomonas putida* 由来 l y P l s a s e 組換え体酵素の製造方法]

Pseudomonas putida (K T 2 4 4 0) の染色体 D N A を、フェノール・クロロホルム法にて抽出した。染色体 D N A をテンプレートにし、配列番号 8 に記載の塩基配列をセンスプライマー、配列番号 9 に記載

の塩基配列をアンチセンスプライマーとして、KOD FX（東洋紡績株式会社、Code No. KFX-101）を用いてPCRし、PCR産物1を得た。得られたPCR産物1をZero Blunt PCR Cloning Kit（Invitrogen、製品番号K2700-20）を用いてpCR-Bluntにクローニングして、本発明の蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む組換えベクターPP_lyPlaase/pCR-Bluntを得た。pET-21a（+）ベクター（Novagen、Cat. No. 69740-3）をNdeIとEcoRIで切断して約5.4 kbpのDNAを精製した。PP_lyPlaase/pCR-Bluntを制限酵素NdeIとEcoRIで切断し、約0.7 kbpのDNAを精製した。得られたそれぞれの精製DNAを、DNA Ligation Kit Ver. 2.1（タカラバイオ株式会社、製品コード6022）でライゲーションして本発明の蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む組換えベクターPP_lyPlaase/pET-21a（+）を得た。PP_lyPlaase/pET-21a（+）を、One Shot BL21（DE3）Chemically Competent E. coli（Invitrogen、製品番号C6000-03）に形質転換して本発明の蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む組換えベクターを有する形質転換体PP_lyPlaase/pET-21a（+）/BL21（DE3）を得た。PP_lyPlaase/pET-21a（+）/BL21（DE3）を、50 µg/mlのアンピシリンを含む、1.6 L（2Lジャー）のOvernight Express Instant TB Medium（メルク、注文番号71757-5）に植菌した。34℃、pH6.8で30時間培養して培養液を遠心分離して集菌し、70 mM Sucrose、120 mM Mannitol、及び1.2% DDMを含む20 mM Tris/HCl緩衝液（pH7.5）で4℃1時間懸濁した。懸濁液を遠心分離し、上清の粗Pseudomonas putida由来lyPlisase

を約170Uを得た。本実施例で得た*Pseudomonas putida*由来lypaseは、適宜濃縮して実施例3、4、7、12で使用した。

[0280]

[実施例9：*Thermocrisum* sp. 由来lypaseの製造方法]

Thermocrisum sp. (NITE BP-01628として独立行政法人製品評価技術基盤機構、特許微生物寄託センターに寄託)を2.4LのIPS2培地(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、カタログ番号277010)へ常法に従い植菌し、45℃、180rpmで84h振とう培養した。培養上清のlypase活性は約0.058U/mL(総量104U)であった。遠心分離にて除菌して得た培養上清を0.45μmのフィルターで濾過し、85%飽和量硫酸でタンパク質を濃縮した。20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)に対して透析脱塩を行った濃縮液はTOYOPEARL GigaCup Q-650M(TOSOH BIOSCIENCE)にて次の条件で部分精製した：1.0M NaClを含む20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)と20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)を用いた20CV(column volume)のリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分に1.5Mとなるように硫酸アンモニウムを添加し、TOYOPEARL PPG-600M(TOSOH BIOSCIENCE)にて次の条件で部分精製した：1.5M (NH₄)₂SO₄を含む20mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)と20mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)を用いた20CV(column volume)のリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分はResource Q(GEヘルスケアバイオサイエンス)にて次の条件で部分精製した：0.5M NaClを含む20mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)と20mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)を用いた40CV(column

volume) のリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分に0.15 Mとなるように塩化ナトリウムを添加し、Superdex 200 (GEヘルスケアバイオサイエンス) でさらに部分精製した: 20 mM Tris/HCl緩衝液 (pH 8.0) + 0.15 M NaCl。活性画分は1.65 Mとなるように硫酸アンモニウムを添加し、Resource Iso (GEヘルスケアバイオサイエンス) にて次の条件でさらに部分精製した: 1.65 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む20 mM Tris/HCl緩衝液 (pH 8.0) と20 mM Tris/HCl緩衝液 (pH 8.0) を用いた40 CV (column volume) のリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分はMono Q (GEヘルスケアバイオサイエンス) にて次の条件でさらに部分精製した: 0.4 M NaClを含む20 mM Tris/HCl緩衝液 (pH 8.0) と20 mM Tris/HCl緩衝液 (pH 8.0) を用いた40 CVのリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分は培養上清から約285倍精製した部分精製lyPaseを1.55 U (比活性50.6 U mg^{-1}) 得た。

[0281]

[実施例10: Thermocrisum sp. 由来lyPase組換え体酵素の製造方法1 (Streptomyces lividans 組み換え体)]

Thermocrisum sp. の染色体DNAを、フェノール・クロロホルム法にて抽出した。配列番号10に記載の塩基配列をセンスプライマー、配列番号11に記載の塩基配列をアンチセンスプライマーとして、KOD FXを用いてPCRし、約900 bpのPCR産物2を得た。PCR産物2をNheIとBglIIで消化し、発現ベクターである放線菌プラスミドのNheI-BglII部位に挿入して、組換えプラスミドlyPlaase/Exを得た。lyPlaase/Exを「PRACTICAL STREPTOMYCES GENETICS (Kieserら、John

Innes Foundation、2000年)」に記載の方法に従い、プロトプラスト化された放線菌 *Streptomyces lividans* 1326 を形質転換し、組換え放線菌 *lyPla^{ase}/Ex/S. lividans* を得た。*lyPla^{ase}/Ex/S. lividans* を、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のチオストレプトン、1% グルコース及び1% トリプトンを含む0.8Lトリプチックソイ培地(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)で28℃、180回転で48時間培養した。培養後、遠心分離にて除菌して得た培養上清に、85%飽和量となるように硫酸アンモニウムを添加し、生じた沈殿を遠心分離(10,000rpm、10分、4℃)により回収した。この沈殿を可溶化し、20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)で透析し、粗酵素液を得た。粗酵素液は透析で20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)にbuffer交換し、TOYOPEARL GigaCap Q-650M(TOSOH BIOSCIENCE)にて次の条件で部分精製した: 1M NaClを含む20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)と20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)を用いた15CV(column volume)のリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分に1.5Mとなるように硫酸アンモニウムを添加し、TOYOPEARL PPG-600M(TOSOH BIOSCIENCE)にて次の条件で部分精製した: 1.5M 硫酸アンモニウムを含む20mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)と20mM Tris/HCl緩衝液(pH8.0)を用いた10CV(column volume)のリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分は透析で20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)にbuffer交換し、Mono Q(GEヘルスケアバイオサイエンス)にて次の条件で精製した: 0.5M NaClを含む20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)と20mM Tris/HCl緩衝液(pH9.0)を用いた40CV(column volume)のリニアグラジェントによるカラムクロマトグラフィー。活性画分は透析で25mM

Bis-Tris/NaOH緩衝液 (pH 6.3) に buffer 交換し、Mono P (GEヘルスケアバイオサイエンス) にて次の条件で精製した: 開始 buffer 25mM Bis-Tris/NaOH緩衝液 (pH 6.3)、溶出 Buffer ポリバッファー74 (10倍希釈、pH 4.0)。本実施例による精製結果を表9に、精製酵素のSDS-PAGE (図中矢印) を図15に示した。本実施例で得た *Thermocrisum* sp. 由来 *lyP*ase は、適宜濃縮して実施例5、7、12で使用した。

[0282] [表9]

精製段階	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
培養上清	9943	8.28	100
硫酸沈殿	8760	24.2	88
Giga Cap Q	6712	31.7	68
PPG-600M	5028	78.2	51
Mono Q	1133	347	11
Mono P	175	644	2

[実施例11: *Thermocrisum* sp. 由来 *lyP*ase 組換え酵素の製造方法2 (大腸菌組換え体)]

Thermocrisum sp. の染色体DNAを、フェノール・クロロホルム法にて抽出した。配列番号12に記載の塩基配列をセンスプライマー、配列番号13に記載の塩基配列をアンチセンスプライマーとして、KOD FXを用いてPCRし、約900bpのPCR産物3を得た。PCR産物3をNdeIとEcoRIで消化し、発現ベクターであるpET-21a (+) ベクターのNdeI-EcoRI部位に挿入して、T_*lyP*ase/pET-21a (+) を得た。T_*lyP*ase/pET-21a (+) を、One Shot BL21 (DE3) Chemically Competent *E. coli* に形質転換して本発明の蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む組換えベクターを有

する形質転換体 T_{lyPlase}/pET-21a (+) /BL21 (DE3) を得た。T_{lyPlase}/pET-21a (+) /BL21 (DE3) を、50 μ g/ml のアンピシリンを含む、50 mL (500 mL 三角フラスコ) の Overnight Express Instant TB Medium に植菌した。37℃、pH 6.8 で 24 時間振とう培養して培養液を遠心分離して集菌し、20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 8.5) に懸濁し超音波破碎して、遠心分離し、得られた上清を粗蛋白質液とした。粗蛋白質液中の Thermocrispum sp. 由来 lypase 組換え体酵素は 20 U で、粗蛋白質液の SDS-PAGE を図 16 に示した。lypase は矢印で示した。

[0283]

[実施例 12：本発明の lypase の基質特異性]

表 10 に、各種基質に対する本発明の lypase の作用を、上記の活性測定法に準じて測定した結果を示す。

[0284]

結果は、lypsEn を基質とした場合の測定値を 100 として、相対活性で示した。

[0285]

[表10]

基質(Avanti Polar Lipids, Inc. の製品番号)	<i>Pseudomonas putida</i> 由来lyPlsase	<i>Thermocrispum</i> sp. 由来lyPlsase
1,2-Dipalmitoleoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (850706)	0	0
1-Stearoyl-2-Hydroxy-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamine (856715)	0	8
1-Hexadecyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (110642)	0	0
1-(1Z-octadecenyl)-2-arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (852804)	0	12
L- α -lysophosphatidylethanolamine plasmalogen(lyPlsEtn) (850095)	100	100

表2から、本発明の蛋白質は、L- α -lysophosphatidylethanolamine plasmalogen(lyPlsEtn)に対して高い活性を有することが明らかになった。

[0286]

産業上の利用可能性

[0287] 血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (PlsEtn)

量をバイオマーカーとする、大規模スクリーニングに提起した認知症検査に利用できる。

請求の範囲

[請求項1] 被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するための認知症検査方法であって、

被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) を定量する工程と、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) を定量する工程とを含み、
健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール (M I) の予め求められた閾値と、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) の予め求められた閾値のそれぞれに対して、前記被験者のミオイノシトール (M I) の定量値とエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) の定量値を比較する工程を含む認知症検査方法。

[請求項2] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) を定量する工程が、酵素を利用する反応により、最終的に過酸化水素が生成され、該エタノールアミン型プラスマローゲンの存在量に対応して発生する過酸化水素の量を検出して、血清または血漿中の P I s E t n 量を算出する工程を含む請求項 1 の方法。

[請求項3] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) を定量する方法が、以下の (1) ~ (3-4) (枝番号を付したものも全て含む。以下同様) の工程を含む請求項 2 に記載の方法。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (I y P I s E t n) に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P I s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (I y P I s E t n) に加水分解する工程：

(2) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (I y P I s E t n

）をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素を用いて、前記（１）にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*LyP l s E t n*）をグリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する工程：及び

（３－１）グリセロー３－ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにせしめる酵素にて、工程（２）で得られたグリセロー３－ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにする工程：

（３－２）エタノールアミンを酸化する酵素により、エタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

（３－３）過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

（３－４）前記被験者の血清または血漿中の $P l s E t n$ 量を算出する工程：

または前記（２）の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（ $P l s E t n$ ）を定量する方法が、前記（１）～（３－４）の工程に先立つか、少なくとも前記（２）工程の前までに、下記（４）及び（５）を含む工程を行うことを特徴とする方法。

（４）ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

（５）リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記（４）工程により生成されるリゾホスファチジルエタノール

ルアミンを分解し、実質的に消去する工程：

[請求項4] 前記工程（２）の加水分解酵素が、下記（a）または（b）の酵素のいずれかである請求項３に記載の方法。

（a）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列：

（b）配列番号１または２に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）を加水分解し、グリセロー３－ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する：

[請求項5] 前記工程（１）のエタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）に加水分解できる酵素が、下記（c）または（d）のいずれかの酵素である請求項３に記載の方法。

（c）配列番号５に記載のアミノ酸配列：

（d）配列番号５に記載のアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）に加水分解する作用を触媒する：

[請求項6] 前記（２）の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）を定量する方法が、前記（１）～（３－４）の工程に先立つか、少なくとも前記（２）工程の前までに、下記（４）及び（５）を含む工程を行うことを特徴とする請求項３に記載の方法。

（４）ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノール

ールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程：

[請求項7]

前記工程(4)のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ(PL)を使用し、該PLは、前記工程(1)のエタノールアミン型プラスマローゲン(PlsEtn)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(LyPlsEtn)に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施と同時、または前記工程(5)の実施後に、前記工程(1)が完了し、以後前記工程(2)～(3-4)を実施する請求項6に記載の方法。

[請求項8]

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(PlsEtn)を定量する方法が、以下の(1)～(5)(枝番を付したものの、`を付したものも全て含む。以下同様)の工程を含む請求項2に記載の方法。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン(PlsEtn)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(LyPlsEtn)に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(PlsEtn)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(LyPlsEtn)に加水分解する工程：

(2) `エタノールアミン型リゾプラスマローゲン(LyPlsEtn)をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解でき、かつリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる加水分解酵素を用いて、前記(1)にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(LyPlsEtn)をエタノールアミンと

プラスメニルホスファチジン酸に加水分解する工程：

(3-1) エタノールアミンを酸化する酵素により、工程(2)で得られたエタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

(3-2) 過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

(3-3) 前記被験者の血清または血漿中のP l s E t n量を算出する工程：

[請求項9] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)を定量する方法が、前記(1)～(3-3)の工程に先立つか、少なくとも前記(2)工程の前までに、下記(4)及び(5)を含む工程を行うことを特徴とする請求項8に記載の方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程：

[請求項10] 前記工程(4)のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ(PL)を使用し、該PLは、前記工程(1)のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P l s E t n)に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施と同時、または前記工程(5)の実施後に、前記工程(1)が完了し、以後前記工程(2)～(3-3)を実施する請求項9に記載の方法。

- [請求項11] 自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の予め求められた閾値が、
21.6～63.3 mg / g C r の範囲から選択される値であり、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の予め求められた閾値が、50～64 μ M の範囲から選択される値であって、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の定量値が、前記M I 閾値を越え、かつ被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の定量値が、前記P I s E t n 閾値を下回った場合に、認知症患者またはその前段階にある者と区分する請求項1に記載の方法。
- [請求項12] 前記M I 閾値が36.6 mg / g C r である請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 前記エタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）閾値が、58 μ M である請求項11に記載の方法。
- [請求項14] 健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の予め求められた閾値と、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する認知症検査に用いるものであって、
同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の、予め求められた閾値に対して、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の定量値を比較する工程を含む、エタノールアミン型プラスマローゲンの定量方法。
- [請求項15] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲ

ン (P l s E t n) を定量する工程が、酵素を利用する反応により、最終的に過酸化水素が生成され、該エタノールアミン型プラスマローゲンの存在量に対応して発生する過酸化水素の量を検出して、血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程を含む請求項 14 の方法。

[請求項16] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する方法が、以下の (1) ~ (3-4) の工程を含む請求項 15 に記載の方法。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解する工程：

(2) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をグリセロール 3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素を用いて、前記 (1) にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をグリセロール 3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解する工程：及び

(3-1) グリセロール 3-ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにせしめる酵素にて、工程 (2) で得られたグリセロール 3-ホスフォエタノールアミンを加水分解してエタノールアミンにする工程：

(3-2) エタノールアミンを酸化する酵素により、エタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

(3-3) 過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

(3-4) 前記被験者の血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程：

または前記(2)の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)を定量する方法が、前記(1)～(3-4)の工程に先立つか、少なくとも前記(2)工程の前までに、下記(4)及び(5)を含む工程を行うことを特徴とする方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程：

[請求項17] 前記工程(2)の加水分解酵素が、下記(a)または(b)の酵素のいずれかである請求項16に記載の方法。

(a) 配列番号1または2に記載のアミノ酸配列：

(b) 配列番号1または2に記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P l s E t n)を加水分解し、グリセロー3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する：

[請求項18] 前記工程(1)のエタノールアミン型プラスマローゲン(P l s E t n)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(l y P l s E t n)に加水分解できる酵素が、下記(c)または(d)のいずれかの酵素である請求項16に記載の方法。

(c) 配列番号5に記載のアミノ酸配列：

(d) 配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解する作用を触媒する：

[請求項19] 前記(2)の加水分解酵素が、リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する方法が、前記(1)～(3-4)の工程に先立つか、少なくとも前記(2)工程の前までに、下記(4)及び(5)を含む工程を行うことを特徴とする請求項16に記載の方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程：

[請求項20] 前記工程(4)のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ (P L) を使用し、該P Lは、前記工程(1)のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該P Lを添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施と同時、または前記工程(5)の実施後に、前記工程(1)が完了し、以後前記工程(2)、(3-4)を実施する請求項19に記載の方法。

[請求項21] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲ

ン (P l s E t n) を定量する方法が、以下の (1) ~ (3-3) の工程を含む請求項 15 に記載の方法。

(1) エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素を用いて、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解する工程：

(2) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解でき、かつリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる加水分解酵素を用いて、前記 (1) にて生成されたエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をエタノールアミンとプラズメニルホスファチジン酸に加水分解する工程：及び

(3-1) エタノールアミンを酸化する酵素により、工程 (2) で得られたエタノールアミンから過酸化水素を発生せしめる工程：

(3-2) 過酸化水素を過酸化水素定量手段により定量する工程：及び

(3-3) 前記被験者の血清または血漿中の P l s E t n 量を算出する工程：

[請求項22] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) を定量する方法が、前記 (1) ~ (3-3) の工程に先立つか、少なくとも前記 (2) 工程の前までに、下記 (4) 及び (5) を含む工程を行うことを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

(4) ホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素を用いて、血清または血漿中に混

在するホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する工程：及び

(5) リゾホスホリパーゼ及び／又はモノグリセリドリパーゼを用いて、前記(4)工程により生成されるリゾホスファチジルエタノールアミンを分解し、実質的に消去する工程：

[請求項23] 前記工程(4)のホスファチジルエタノールアミンをリゾホスファチジルエタノールアミンと脂肪酸に分解する酵素としてホスホリパーゼ(PL)を使用し、該PLは、前記工程(1)のエタノールアミン型プラスマローゲン(PIsEt n)をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン(lyPIsEt n)に加水分解できる酵素としての作用を兼ねさせて新たな該PLを添加することなく前記工程(1)の工程を進行せしめ、前記工程(5)を実施と同時、または前記工程(5)の実施後に、前記工程(1)が完了し、以後前記工程(2)～(3-3)′を実施する請求項22に記載の方法。

[請求項24] 健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(PIsEt n)の予め求められた閾値と、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(PIsEt n)の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する認知症検査に用いるものであって、

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン(PIsEt n)を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール(MI)の、予め求められた閾値に対して、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール(MI)の定量値を比較する工程を含む、ミオイノシトール(MI)の定量方法。

[請求項25] 被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類するため

の認知症検査方法に用いられる手段であって、

被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）を定量する手段と、同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）を定量する手段とを含み、
健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の予め求められた閾値と、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の予め求められた閾値のそれぞれに対して、前記被験者のミオイノシトール（M I）の定量値とエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の定量値を比較して用いる認知症検査手段。

[請求項26] 前記手段が検査薬キットである請求項25に記載の認知症検査手段。

[請求項27] 健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の予め求められた閾値と、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（M I）の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する認知症検査に用いるものであって、

同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の、予め求められた閾値に対して、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（P I s E t n）の定量値を比較して用いる、エタノールアミン型プラスマローゲンの定量手段。

[請求項28] 該エタノールアミン型プラスマローゲンの定量手段が試薬キットである請求項27に記載の定量手段。

[請求項29] 同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲ

ン (P l s E t n) を定量する試薬キットが、以下の (1 a) ~ (3 a) を含む請求項 28 に記載の試薬キット。

(1 a) エタノールアミン型プラスマローゲン (P l s E t n) をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) に加水分解できる酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

(2 a) エタノールアミン型リゾプラスマローゲン (l y P l s E t n) をグリセロール 3-ホスフォエタノールアミンとアルデヒドに加水分解でき、かつエーテル型リゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できない加水分解酵素およびその酵素反応を進めることのできる添加物。

(3 a) グリセロール 3-ホスフォエタノールアミンをエタノールアミンとグリセロリン酸に変換する酵素、エタノールアミンをグリコールアルデヒド、アンモニア、及び過酸化水素に変換する酵素とその酵素反応を進めるにことのできる添加物、さらに必要により過酸化水素を定量するための過酸化水素定量手段。

または前記 (2 a) の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記 (1 a) に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む試薬キット。

[請求項30] 前記 (2 a) の加水分解酵素がリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解できる酵素である場合、前記 (1 a) に、さらにリゾホスファチジルエタノールアミンを加水分解する酵素を含む請求項 29 に記載の試薬キット。

[請求項31] 前記 (2 a) の加水分解酵素が、下記 (a) または (b) の酵素のいずれかである請求項 29 に記載の試薬キット。

(a) 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列：

(b) 配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列：

からなる酵素であって、エタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）を加水分解し、グリセロール-3-ホスホエタノールアミンとアルデヒドとを得る反応を触媒する：

[請求項32] 前記（1 a）のエタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）に加水分解できる酵素、が下記（c）または（d）のいずれかの酵素である請求項29に記載の試薬キット。

（c）配列番号5に記載のアミノ酸配列：

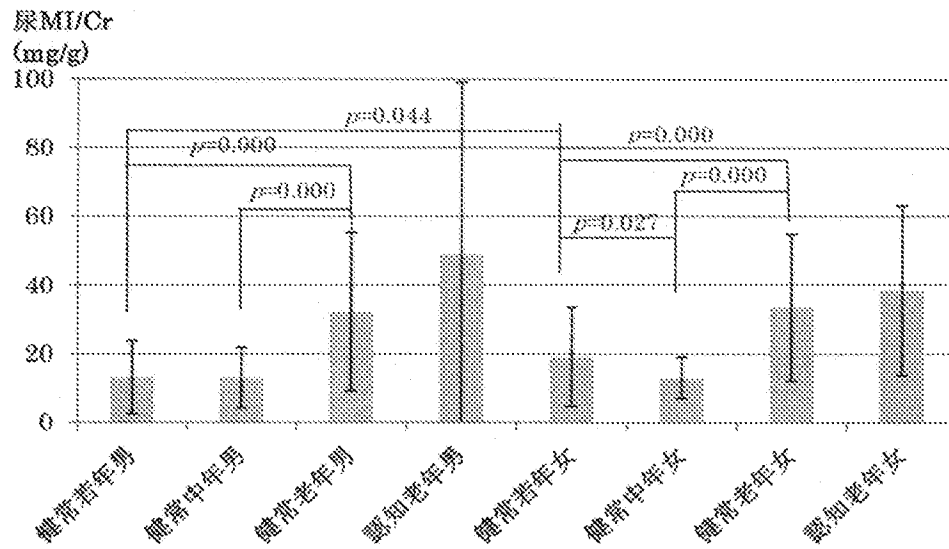
（d）配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であり、エタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）をエタノールアミン型リゾプラスマローゲン（*l y P l s E t n*）に加水分解する作用を触媒する：

[請求項33] 健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）の予め求められた閾値と、被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）の定量値とを比較する工程と組み合わせることにより、被験者を認知症患者またはその前段階にある者か否かを分類する認知症検査に用いるものであって、

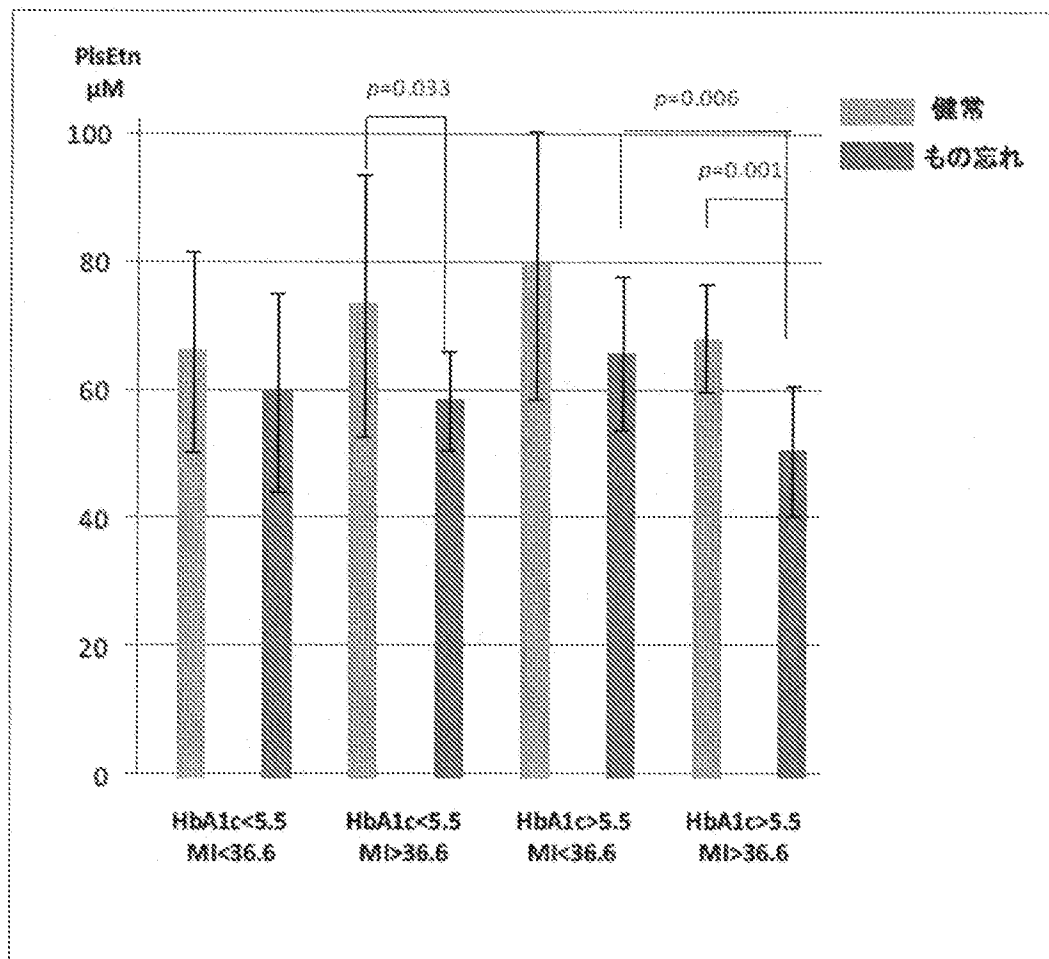
同一被験者の血清または血漿中のエタノールアミン型プラスマローゲン（*P l s E t n*）を定量する工程を含み、該工程中に、健常者と、認知症患者またはその前段階にある者とを区別することができる、自然排泄尿中のミオイノシトール（*M l*）の、予め求められた閾値に対して、被験者の自然排泄尿中のミオイノシトール（*M l*）の定量値を比較して用いる、ミオイノシトール（*M l*）の定量手段。

[請求項34] 前記手段が試薬キットである請求項33に記載の定量手段。

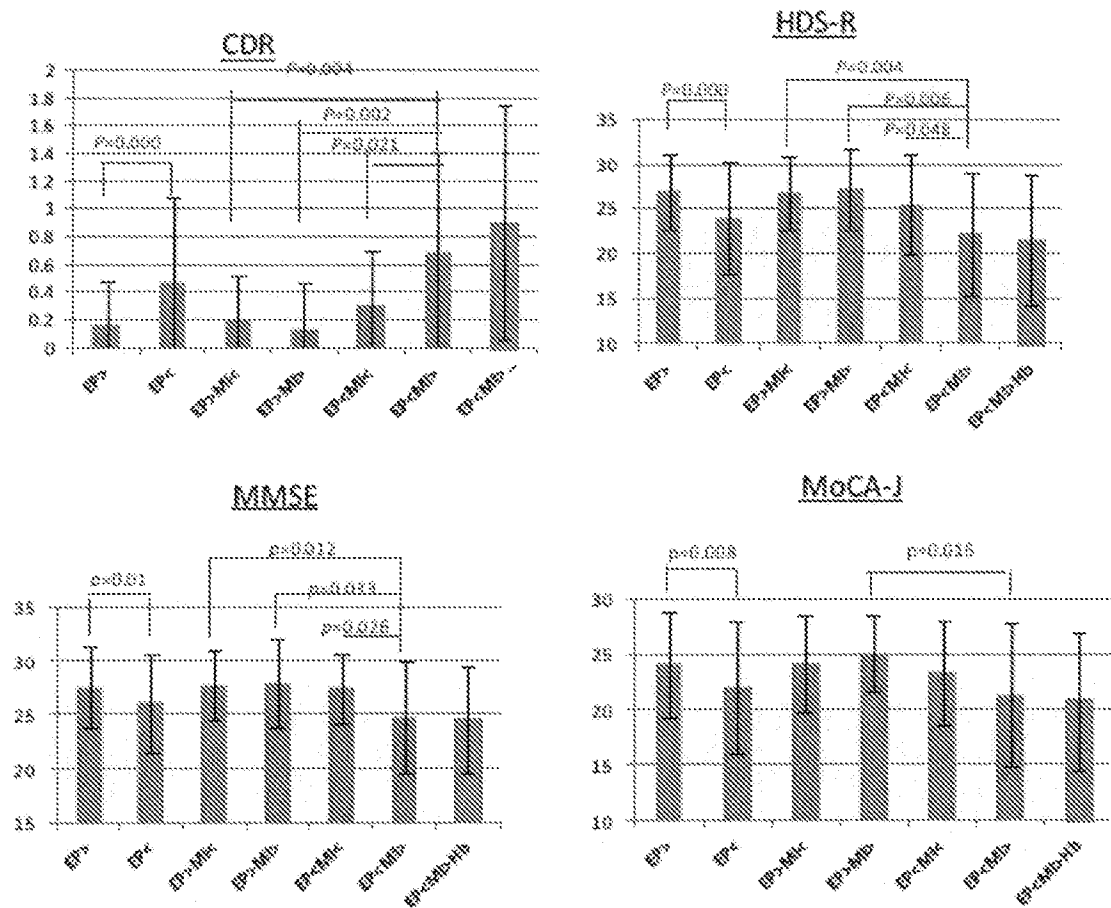
[図1]



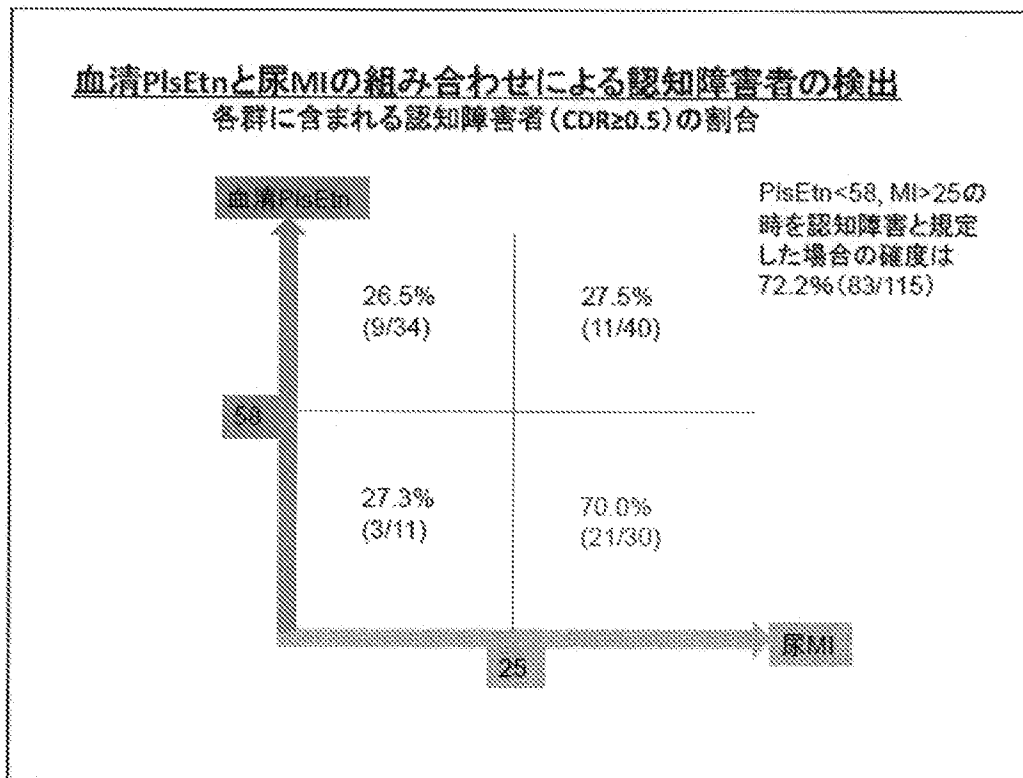
[図2]



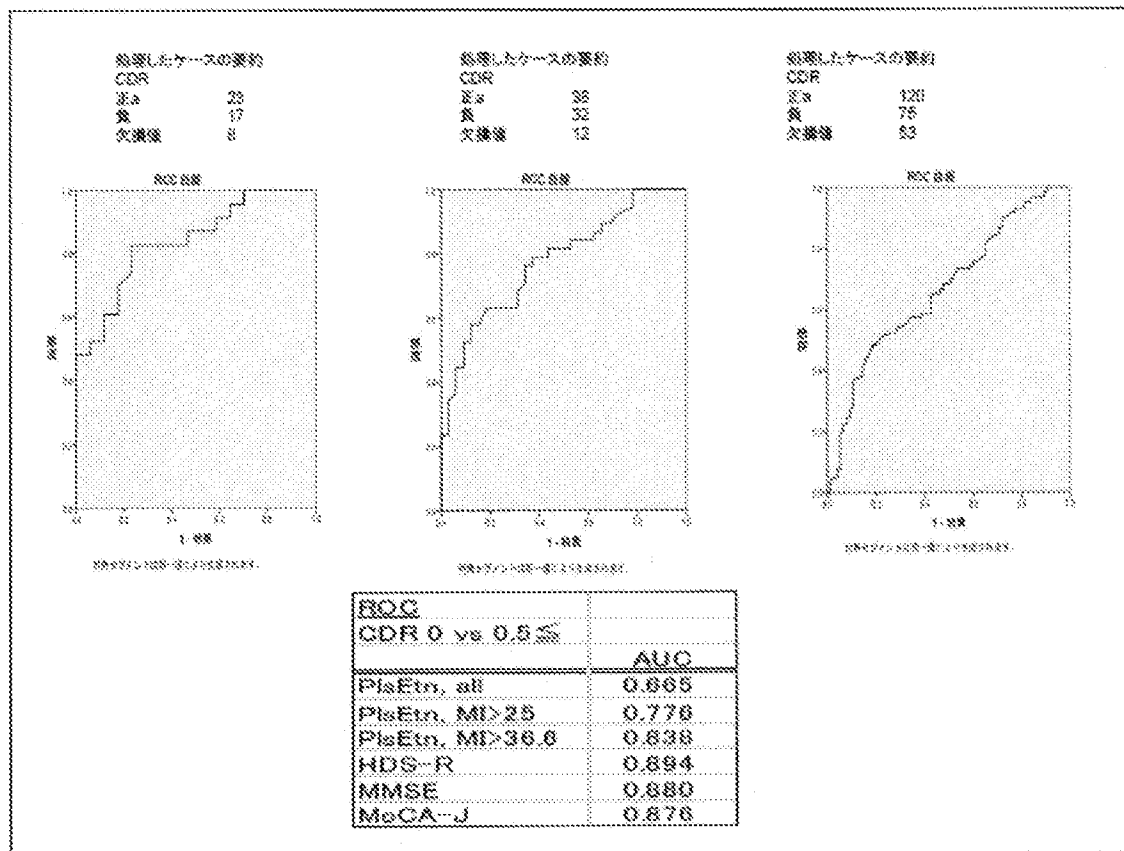
[図3]



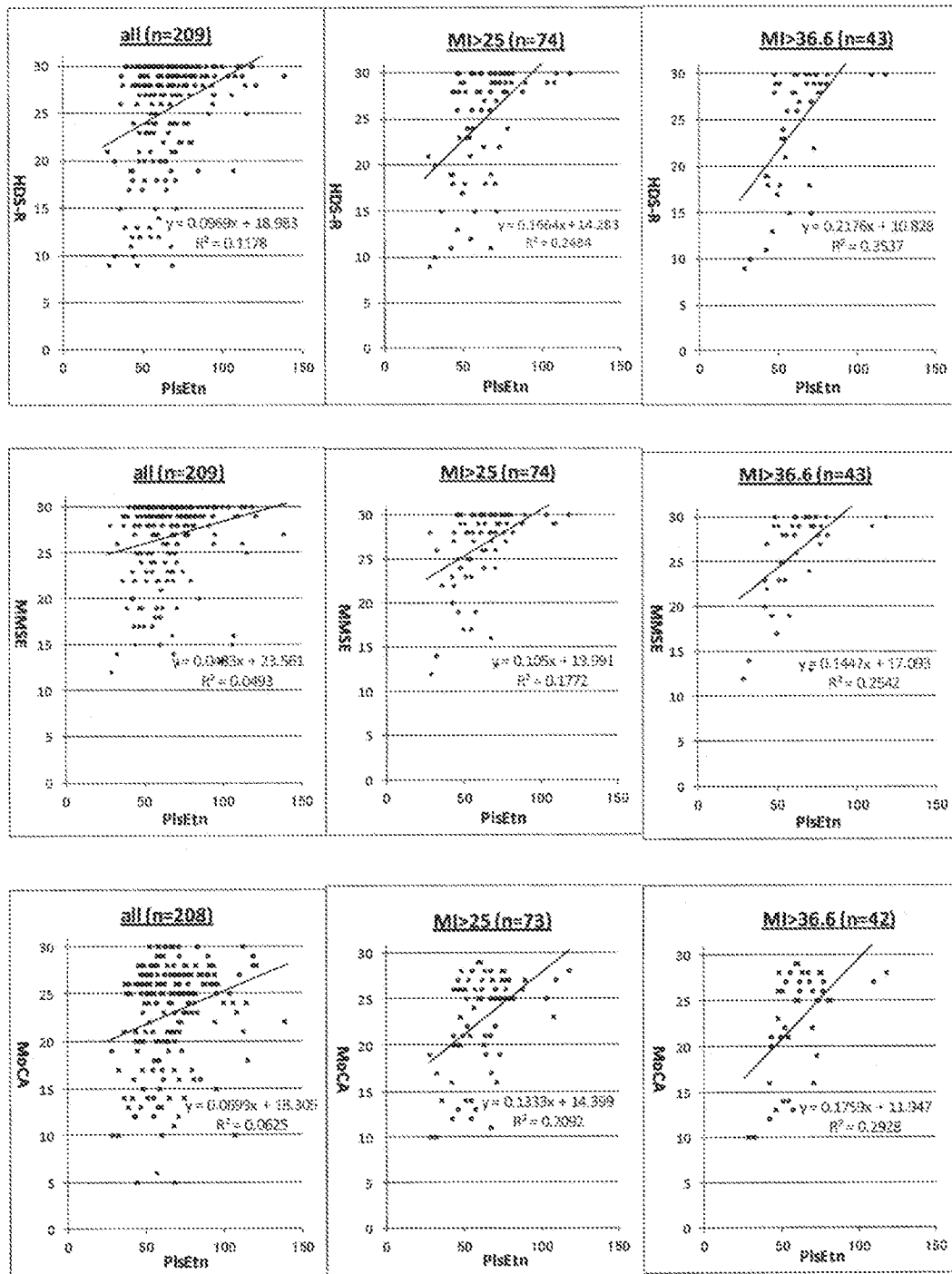
[図4]



[図5]

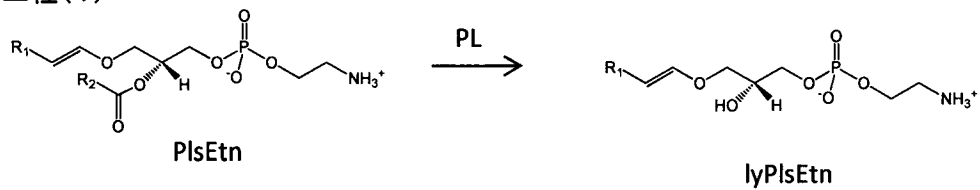


[図6]

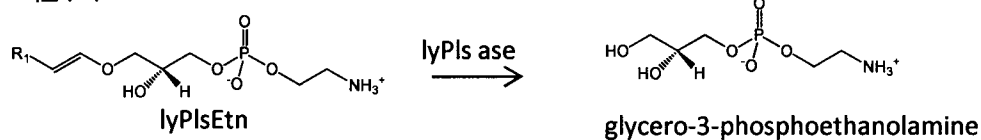


[図7]

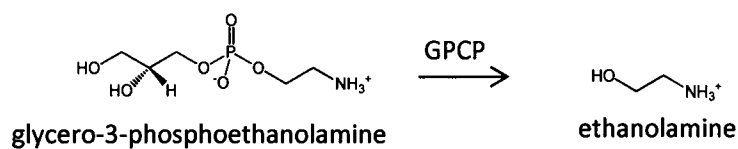
工程(1)



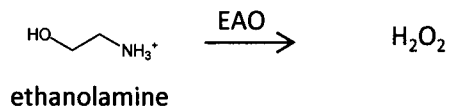
工程(2)



工程(3-1)

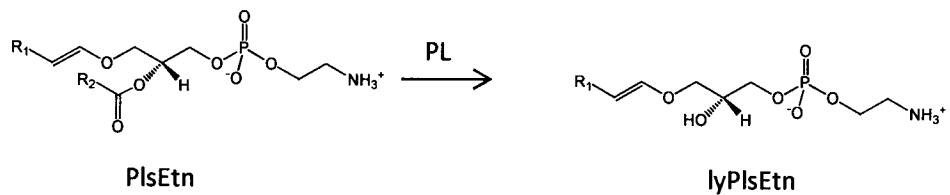


工程(3-2)

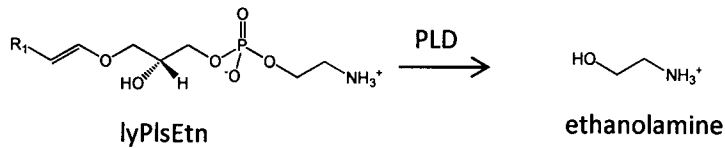


[図8]

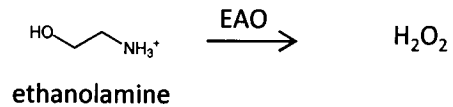
工程(1)



工程(2)'

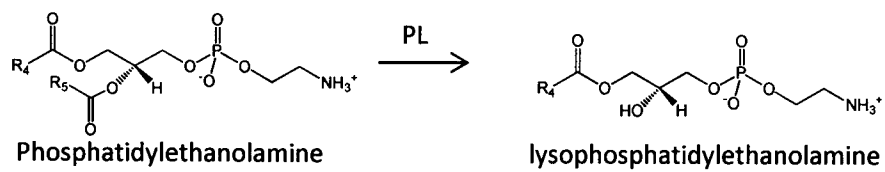


工程(3-1)'

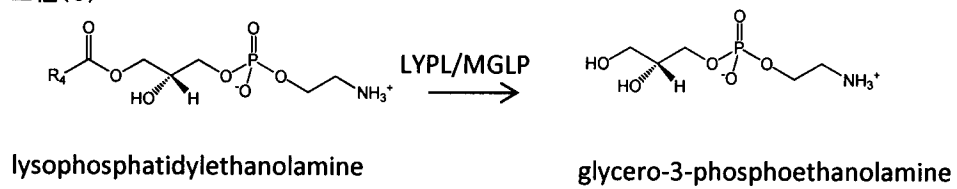


[図9]

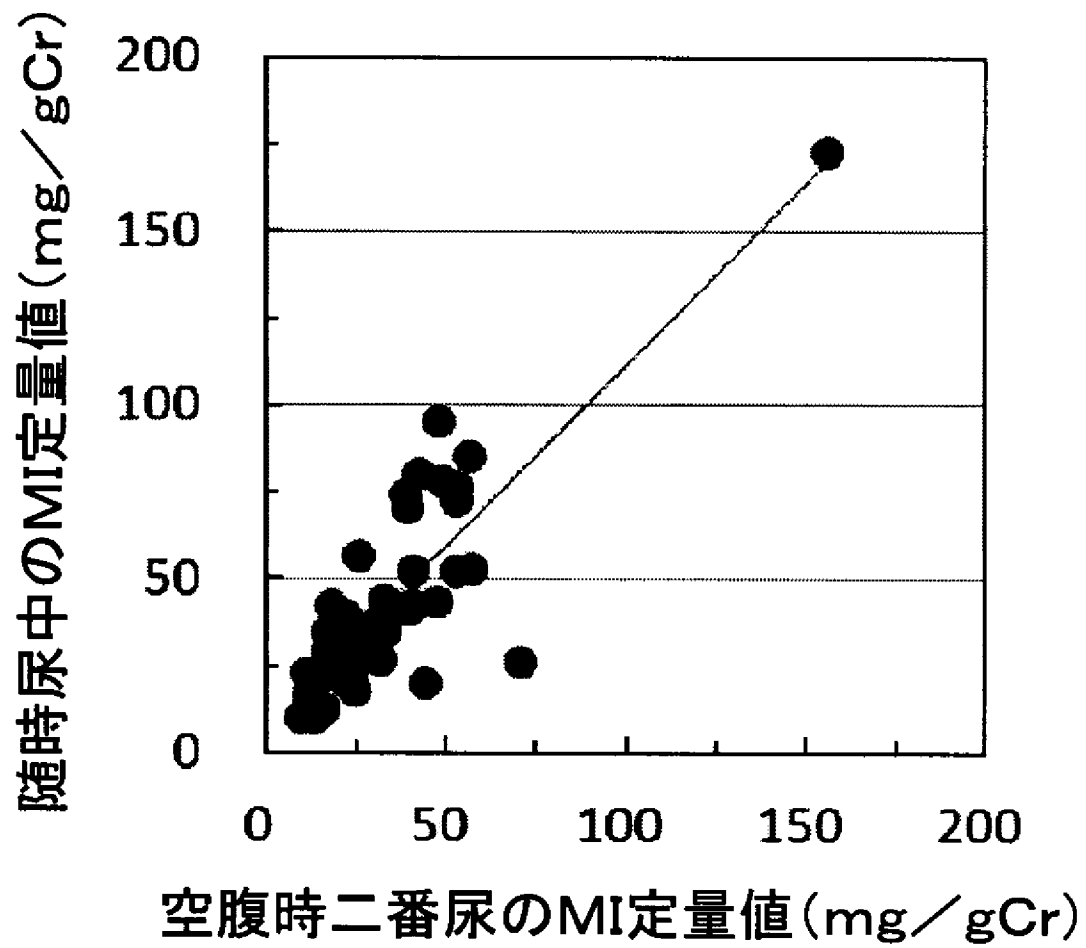
工程(4)



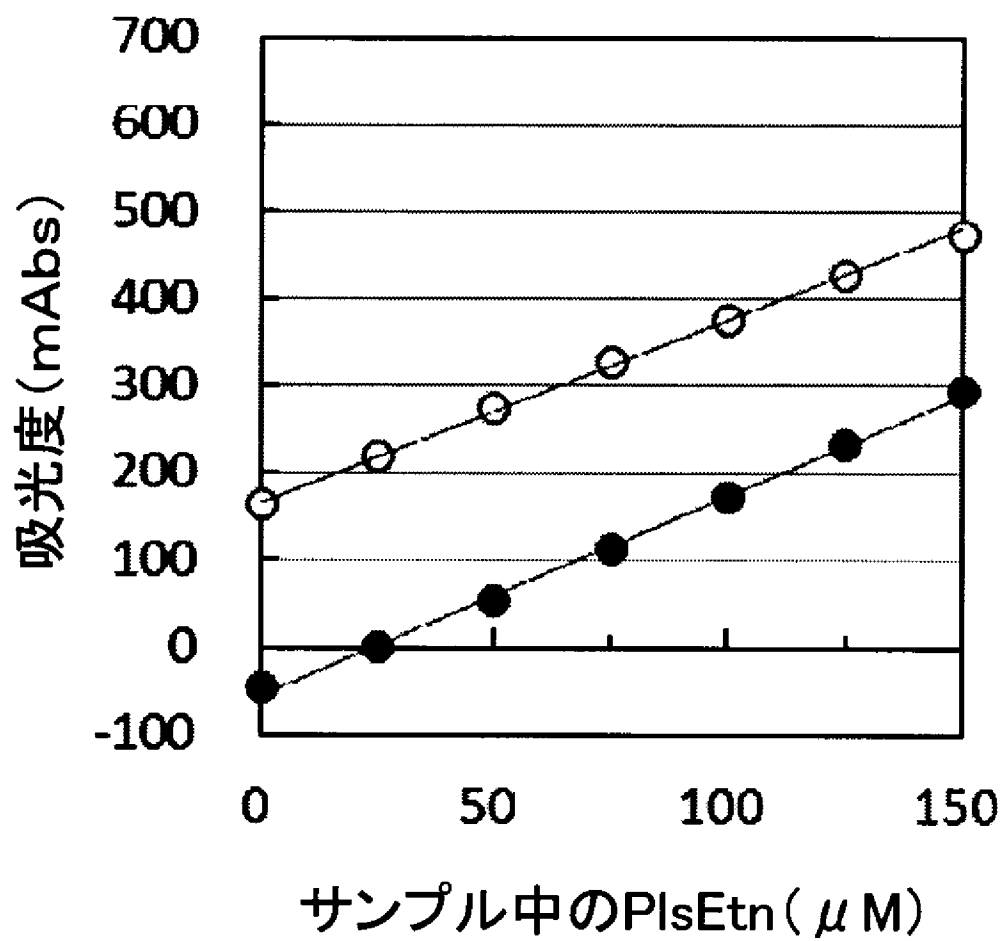
工程(5)



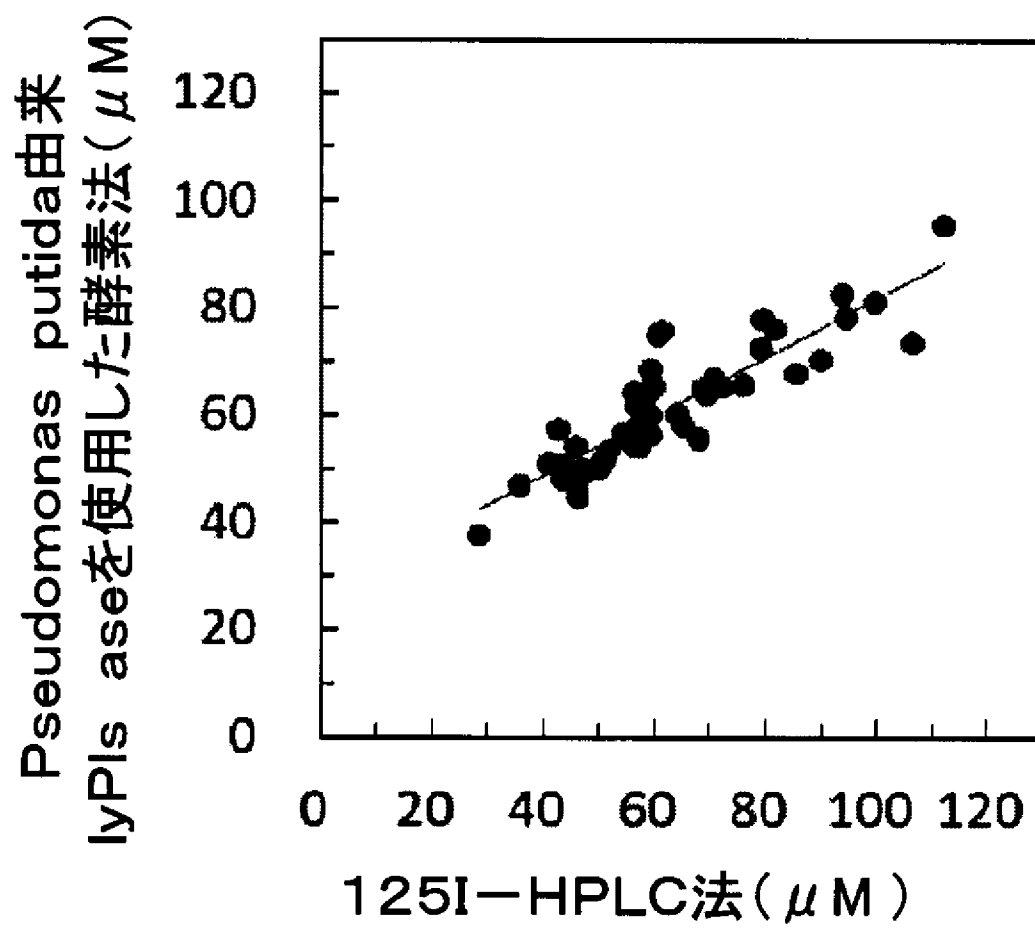
[図10]



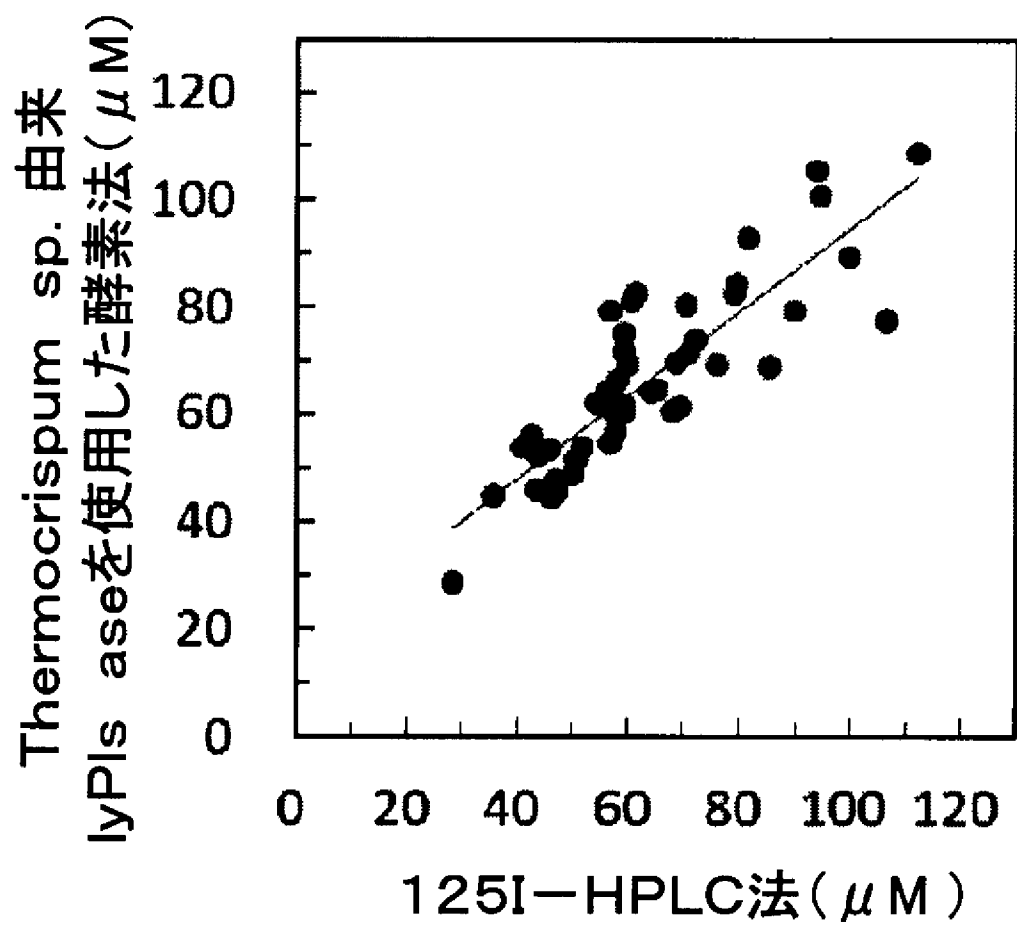
[図11]



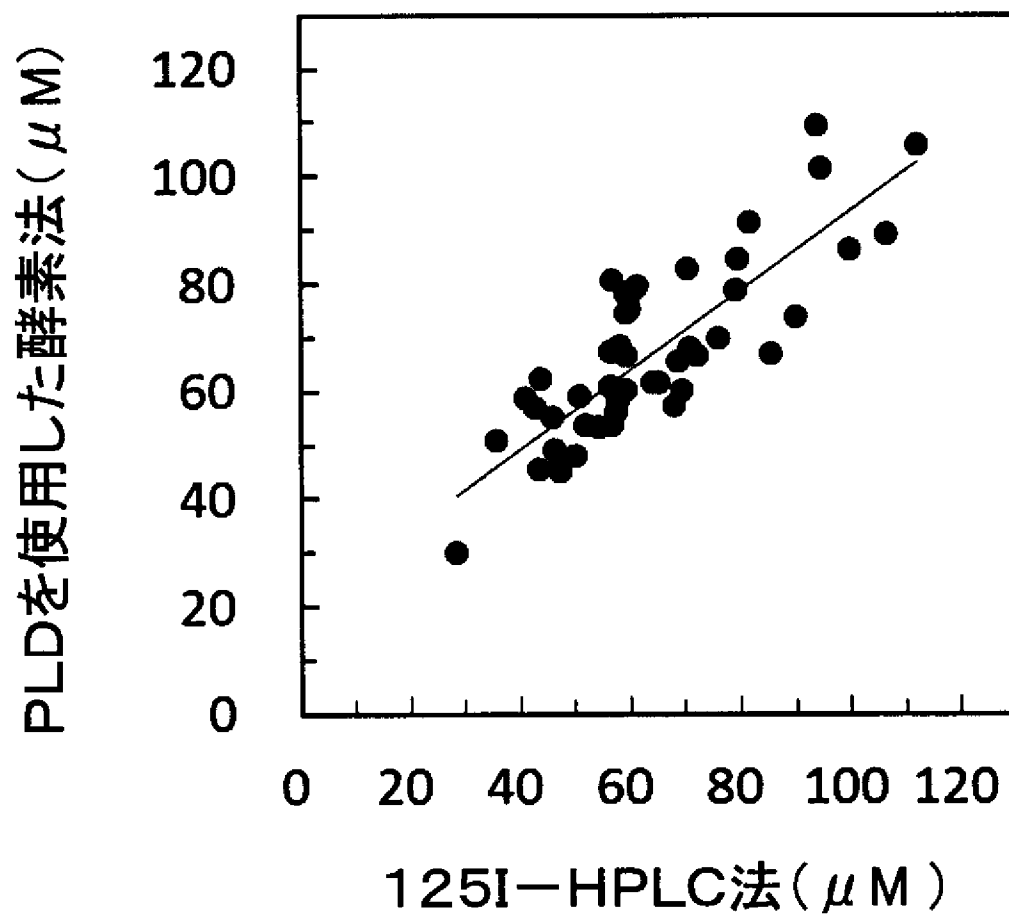
[図12]



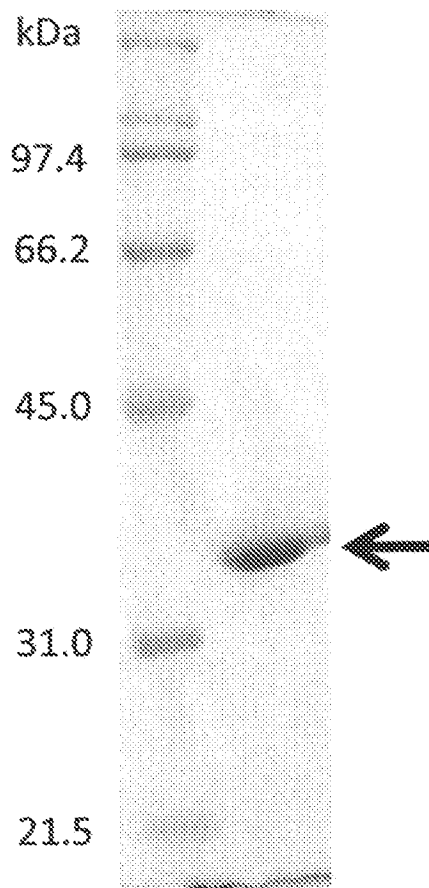
[図13]



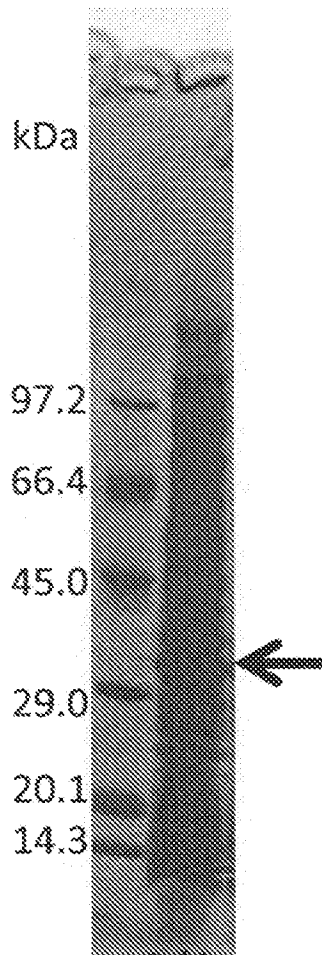
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/068965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/98 (2006.01) i

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)

G01N33/98

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Yoshinori FUJIWARA, Atsushi ARAKI, Kishiko OGAWA, Ryota MAEBA, "Nyo Myoinositol o Mochiita Ninchisho Koreisha no Soki Hakken ni Muketa Seikagaku Marker no Kaihatsu", Daiwa Securities Health Foundation Kenkyu Gyosekishu, 2011, vol.34, pages 62 to 65	1, 14, 24, 33, 34/2-13, 15-23, 25-32
Y/A	Ryota MAEBA, Yoshinori FUJIWARA, Atsushi ARAKI, Kishiko OGAWA, Masashi YASUNAGA, Hiroshi HARA, Megumi NISHIMUKAI, Tomoki OKAZAKI, Yuya YAMAZAKI, Toru NEZU, "Shizen Haisetsu Nyo Myoinositol no Rinshoteki Igi ni Kansuru Kento", The Japanese Journal of Clinical Pathology, Dai 58 Kai Japanese Society of Laboratory Medicine Gakujutsu Shukai, 2011, 0-025, page 95	1, 14, 24, 33, 34/2-13, 15-23, 25-32



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 application or patent 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

"I"

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

04 October, 2013 (04.10.13)

Date of mailing of the international search report

15 October, 2013 (15.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/068965

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Ryota MAEBA, Yoshinori FUJIWARA, Atsushi ARAKI, Kishiko OGAWA, Masashi YASUNAGA, Toru NAGANUMA, Kenji ISHII, Hiroshi HARA, Megumi NISHIMUKAI, Tomoki OKAZAKI, "Kessei Plasmalogen no Ninchi Kino Hyoka no Biomaker to shite no Yukosei no Kento", Dai 30 Kai Japan Society for Dementia Research Gakujutsu Shukai Program Shorokushu, vol.25, no.3, 13 October 2011 (13.10.2011), page 342	1, 14, 24, 33, 34/2-13, 15-23, 25-32
A	JP 2007-034410 A (Teikyo University), 08 February 2007 (08.02.2007), entire text (Family: none)	1-34
A	JP 2011-257148 A (Teikyo University), 22 December 2011 (22.12.2011), entire text & US 2013/0203176 A & EP 2579043 A & WO 2011/152519 A & WO 2011/152519 A1 & CN 102947708 A	1-34
A	JP 2011-136926 A (National University Corporation Hokkaido University), 14 July 2011 (14.07.2011), entire text (Family: none)	1-34
A	Ryota MAEBA, "Strange Phospholipids -Plasmalogen-", Oleoscience, 2005, vol.5, no.9, pages 405 to 415	1-34
A	JP 2011-093813 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 12 May 2011 (12.05.2011), entire text (Family: none)	1-34
A	WO 2007/010892 A1 (Asahi Kasei Pharma Corp.), 25 January 2007 (25.01.2007), entire text & JP 4933432 B & EP 1918371 A1 & AU 2006270921 A & CN 101223274 A	1-34

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/98(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. G01N33/98

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

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 請求項の番号
Y/A	藤原佳典、荒木厚、小川貴志子、前場良太、尿ミオイノシトールを用いた認知症高齢者の早期発見にむけた生化学マーカーの開発、大和証券ヘルス財団研究業績集、2011, Vol. 34, Page. 62-65	1, 14, 24, 33, 34 /2-13, 15-23, 2 5-32
Y/A	前場良太、藤原佳典、荒木厚、小川貴志子、安永正史、原博、西向めぐみ、岡崎具樹、山崎裕也、根津亨、自然排泄尿ミオイノシトールの臨床的意義に関する検討、臨床病理 第58回日本臨床検査医学会学術集会、2011, 0-025, Page. 95	1, 14, 24, 33, 34 /2-13, 15-23, 2 5-32

☒ 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」国際出願日前の出願または特許であるが、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

0 4 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 5 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

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）

草川 貴史

2 J

4 0 7 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

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 請求項の番号
Y/A	前場良太、藤原佳典、荒木厚、小川貴志子、安永正史、長沼亨、石井賢二、原博、西向めぐみ、岡崎具樹、血清プラスマローゲンの認知機能評価のバイオマーカーとしての有効性の検討、第30回日本認知症学会学術集会プログラム・抄録集、Vol. 25 No. 3, 2011. 10. 13, Page. 342	1, 14, 24, 33, 34 /2-13, 15-23, 25-32
A	JP 2007-034410 A (学校法人帝京大学) 2007. 02. 08, 全文等参照 (ファミリーなし)	1-34
A	JP 2011-257148 A (学校法人帝京大学) 2011. 12. 22, 全文等参照 & US 2013/0203176 A & EP 2579043 A & WO 2011/152519 A & WO 2011/152519 A1 & CN 102947708 A	1-34
A	JP 2011-136926 A (国立大学法人北海道大学) 2011. 07. 14, 全文等参照 (ファミリーなし)	1-34
A	前場良太、未知なるリン脂質-プラスマローゲン-, オレオサイエンス, 2005, Vol. 5 No. 9, Page. 405-415	1-34
A	JP 2011-093813 A (明治乳業株式会社) 2011. 05. 12, 全文等参照 (ファミリーなし)	1-34
A	WO 2007/010892 A1 (旭化成ファーマ株式会社) 2007. 01. 25, 全文等参照 & JP 4933432 B & EP 1918371 A1 & AU 2006270921 A & CN 101223274 A	1-34