

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4223681号
(P4223681)

(45) 発行日 平成21年2月12日(2009.2.12)

(24) 登録日 平成20年11月28日(2008.11.28)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/68 (2006.01)

GO 1 N 33/68

GO 1 N 33/566 (2006.01)

GO 1 N 33/566

請求項の数 21 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2000-513150 (P2000-513150)	(73) 特許権者	500367403
(86) (22) 出願日	平成10年9月18日 (1998.9.18)		エボテック・アーゲー
(65) 公表番号	特表2001-517800 (P2001-517800A)		E v o t e c A G
(43) 公表日	平成13年10月9日 (2001.10.9)		ドイツ連邦共和国、ハンブルグ、D-22
(86) 国際出願番号	PCT/EP1998/005958		525、シュナッケンブルガリー 114
(87) 国際公開番号	W01999/015903	(74) 代理人	110000109
(87) 国際公開日	平成11年4月1日 (1999.4.1)		特許業務法人特許事務所サイクス
審査請求日	平成16年4月13日 (2004.4.13)	(72) 発明者	リースナー デトレフ
(31) 優先権主張番号	197 41 486.9		ドイツ連邦国、ドーマゲン D-4154
(32) 優先日	平成9年9月19日 (1997.9.19)		1、オーベルシュトラッセ 52
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(72) 発明者	ポスト カリン
(31) 優先権主張番号	197 52 712.4		ドイツ連邦国、デュッセルドルフ D-4
(32) 優先日	平成9年11月28日 (1997.11.28)		0223、ブリュンネンシュトラッセ 1
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原性タンパク質沈着の基礎構造の会合の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ターゲットとしての病原性タンパク質沈着を引き起こす凝集体に対して、プローブとしての病原性タンパク質沈着の基礎構造の会合を測定することによる病原性タンパク質沈着を引き起こす凝集体の検出方法であって、前記ターゲットが液相中で検出され、該液相は、体液から得られるか、又はそれ自体が体液であり、かつ、前記検出方法は、前記測定を前記プローブの自己凝集が優勢になる前に行うことができる測定時間を決定する工程を含み、前記測定時間内に前記ターゲットに対する前記プローブの会合が測定される前記検出方法。

【請求項 2】

病原性タンパク質沈着の基礎構造及び/又は病原性タンパク質沈着を引き起こす凝集体が、少なくとも一つの検出可能な性質を有する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも一つの検出可能な性質が、前記病原性タンパク質沈着の基礎構造及び/又は病原性タンパク質沈着を引き起こす凝集体に固有であるか、あるいは後に導入されるか、のいずれかである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも一つの検出可能な性質が、大きさ、すなわち寸法、分子量、構造、円偏光二色性、光学的性質、光の吸収、又は放射性である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

光学的性質がルミネッセンスである請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ルミネッセンスが蛍光性である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも一つの検出可能な性質の測定が、分光法で行われる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも一つの検出可能な性質の測定が、蛍光法により行われる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

蛍光法が共焦点蛍光分光法、蛍光相関分光法 (F C S)、又は相互相関と組合せた F C S である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

並進拡散率又は粒子の数もしくは濃度が、前記検出可能な性質から定められる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

プローブとしての病原性タンパク質沈着の基礎構造が、病原性タンパク質沈着を引き起こす凝集体のモノマー若しくはオリゴマー単位であるか、又は病原性タンパク質沈着のモノマー又はオリゴマー単位の、組み換えタンパク質、タンパク質断片、もしくはペプチドである請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記プローブが、病原性タンパク質沈着を引き起こす凝集体を物理的方法又は化学的方法を用いて処理することにより得られる請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記基礎構造が、超音波、温度変化、作用の異なるイオン強度の溶液での処理、カオロピックイオン溶液での処理、又は洗浄剤及び / もしくは酵素での処理を用いて病原性タンパク質沈着を処理することにより得られる請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

酵素がプロテアーゼである請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

抗体又はアビジン / ビオチンが、診断検出の特異性又は選択性を増大させるために使用される請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

病原性タンパク質沈着が、神経系に由来し、かつ、神経変性疾患に関連するニューロフィブリラフィラメント (N F T) 及び / もしくはアミロイドプラークである請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

神経変性疾患がアルツハイマー病、伝染性海綿状脳障害、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、遺伝性脳アミロイドアンギオパシーからなる群から選択される請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記病原性タンパク質沈着が、アミロイドプラークであり、かつ、原発性全身性アミロイドーシス (A L アミロイドーシス)、反応性全身性アミロイドーシス (A A アミロイドーシス)、家族性アミロイド多発性ニューロパシー、II 型糖尿病、注射限局性アミロイドーシス、甲状腺髄様癌、 α 2 ミクログロブリンアミロイドーシス、遺伝性非神経障害アミロイドーシス、および先天性遺伝性家族性アミロイドーシスからなる群から選択される疾患に関連する請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記プローブが、アミロイドプラーク及び / もしくはニューロフィブリラフィラメントに相同的な配列を有する組換え体タンパク質、タンパク質の断片、又はペプチドである請求項 1

10

20

30

40

50

から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

体液、分泌液、又は組織から採取された検体を、前記プローブと接触させてインキュベートし、かつ、ターゲットに対する前記プローブの会合が測定される請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

体液が脳脊髄液、血液、リンパ液、又は尿であり、分泌液が唾液である請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、病原性タンパク質沈着に関連した疾患を診断的に検出するための方法に関する。

【0002】

いくつかの疾患は、病原性タンパク質沈着の発生に関連付けられる。タンパク質沈着が臨床像の表示のみであるか否か、又はそのようなタンパク質沈着自体が病原体であり、故に疾患の原因であるか否かは、しばしば明らかではない。よって、例えば、アラミドプラークと呼ばれるタンパク質沈着が、罹患した人々の脳において検出され得る、神経変性 (neurodegenerative) 疾患が知られている。そのような疾患は、例えば、アルツハイマー症、ウシ海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy) (BSE)、クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt Jakob disease) (CJD)、笑死症候群 (laughing death syndrome)、スクレピー (scrapie)、及び、おそらく、過去に “スローウイルス (slow virus)” 疾患と呼ばれたその他の疾患が包含される。より近年には、とりわけ、BSE 疾患は、BSE が、ヒトにおいてクロイツフェルト・ヤコブ病と関連付けられたという事実によって、特に公衆の注目の的となった。今日、タンパク質沈着が病原性過程に影響を及ぼすことによるメカニズムは、未だに明らかではない。感染性と、羊における神経変性疾患であるスクレピーの病原性過程において役割を果たす一定のタンパク質の濃度とのブルジナー (Prusiner) によって観察された関連は、注目すべきである。病原性タンパク質沈着は、神経系の疾患において現われるだけでなく、II 型糖尿病の疾患のような、他の器官においてもなお観察される。

【0003】

プリオン疾患の概説は、D. Riesner により、“Chemie in unserer Zeit (1996), p66-74” において発表された。とりわけ、生物学的安全性を保証するためだけでなく、プリオンの複製及び疾病発生論に関する、多くの頻発する疑問を包含する基礎研究を促進するためにも、信頼性が高く、かつ素早い診断が、プリオン研究の優先課題であることがその中に述べられている。特にアルツハイマー症のために、その臨床像は、比較的良好に説明された。凝集したアミロイド-タンパク質から実質的に成る “老人斑 (senile plaques) ”、及び異常変性されたタウタンパク質から成る “対ヘリカルフィラメント (paired helical filaments) ” は、アルツハイマー症と密接に関連付けられる。アルツハイマー症の生物学的診断技術の現在の状態は、可溶性 A β ペプチド類 (Mottet ら、アルツハイマー症の患者の脳脊髄液中の A β -アミロイドペプチド₁₋₄₂の減少、Ann. Neurol. 38:643;1995)、及び可溶性タウタンパク質 (Vadermeeren ら、高感度サンドイッチ酵素結合免疫吸着剤 (immunosorbent) 分析を用いた正常な、及びアルツハイマー症の脳脊髄液中のタウタンパク質の検出、J. Neurochemistry 61:1828-1834;1993) の免疫学的濃度測定である。米国特許第 5,593,846 号において、可溶性アミロイド-タンパク質の濃度決定のための方法が記載されている。しかし、実際の病原性成分であるタンパク質沈着自体は、この方法を用いて測定できない。

【0004】

脳脊髄液が濃縮された後、タウンSEND (Townsend) は、その中でタンパク質凝集体に特異的である長期間既知の色素であるチオフラビン (thioflavine) S により着色され得る構造を見出した (Townsend et al., 1987, Neurochemical Pathology, 6, 213-229)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

対応する米国特許第5,486,460号において、濃縮された脳脊髄液が、ガラス表面上に塗布され、そして乾燥された後にチオフラビンSを用いて着色される、アルツハイマー症の診断のための方法が記載されている。しかし、この方法は実用上不便である。さらに、チオフラビンSを用いた着色法は、アルツハイマー症（前記参照）に関連した病原性タンパク質沈着のためには、不確かである。記載された方法は、関連する技術におけるいずれのさらなる注目も受けず、対応する発表もされなかった。

【 0 0 0 6 】

米国特許第5,434,050号において、マッジオ（Maggio）は、固体結合構造として、例えば脳切片材料として存在するA_β凝集体へA_βペプチド類が会合することによる、アルツハイマー症の診断のための方法を記載している。しかし、この診断方法は、死後にのみ行うことが可能で、生存中の患者においては、脳生検材料を得るための厳しい外科的介入が必要とされ得る。

10

【 0 0 0 7 】

それ故、脳脊髄液のような体液中での測定を行うことが、長期間望まれていた。

【 0 0 0 8 】

驚くべきことに、上記の目的は、請求項1の特徴を有する診断方法により達成される。

【 0 0 0 9 】

図1は、病原性タンパク質沈着の診断のための本発明による方法のスキームを示す。

【 0 0 1 0 】

図2は、蛍光相関分光法によるプリオンタンパク質凝集体の検出のための実験の結果を示す。

20

【 0 0 1 1 】

図3は、蛍光標識された可溶性プリオンタンパク質（PrP-Cy2）による、組織試料から分離されたプリオン類の検出のための実験の結果を示す。

【 0 0 1 2 】

図4は、組織試料からのプリオンタンパク質凝集体への、蛍光標識された可溶性プリオンタンパク質の相同性会合の感度及びSDS濃度の影響を示す。

【 0 0 1 3 】

図5は、蛍光標識された可溶性A_β（1-42）ペプチドを用いた、アルツハイマー症におけるアミロイド沈着の大多数に相当するペプチド凝集体の相同性検出を示す。

30

【 0 0 1 4 】

図6は、蛍光標識された可溶性プリオンタンパク質（PrP-Cy2）を用いた、アルツハイマー症におけるアミロイド沈着の大多数に相当するペプチド凝集体の相同性検出のための実験の結果を示す。

【 0 0 1 5 】

図7は、アルツハイマー症が、診断されている患者のための、患者の脳脊髄液における凝集体の特異的検出のための実験の結果を示す。

【 0 0 1 6 】

図8は、活性物質のためのスクリーニングのスキームを示す。

40

【 0 0 1 7 】

図9は、蛍光標識されたプリオンタンパク質(90-231)の相互相関関数を示す。

【 0 0 1 8 】

図10は、組換え体プリオンタンパク質のプロープ及びプリオンタンパク質凝集体に対するモノクローナル抗体の会合を示す。

【 0 0 1 9 】

図11は、脳脊髄液のCJD-陽性（左）及びCJD-陰性（右）試料のための蛍光性フォトンの度数分布を示す。

【 0 0 2 0 】

図12は、脳脊髄液のCJD-陽性及びCJD-陰性試料における150カウント/チャンネルより多

50

い度数を有するチャンネルからの蛍光性フォトンを示す。

【 0 0 2 1 】

図 1 3 は、特異的プローブ A 1-42CY2の会合におけるコンゴレッド (Congo red) の影響を示す。

【 0 0 2 2 】

疾患を診断検出するための本発明による方法は、ターゲットとしての病原性タンパク質沈着の基礎構造、病原性タンパク質沈着を形成する構造、病原性タンパク質沈着に相当する構造及び / 又は病原性タンパク質沈着に対して、プローブとしての病原性タンパク質沈着の基礎構造、病原性タンパク質沈着を形成する構造、病原性タンパク質沈着に相当する構造及び / 又は病原性タンパク質沈着の会合の測定を含む。

10

【 0 0 2 3 】

本発明による方法は、ターゲットが液相中で検出され、該液相はアルツハイマー病の場合、体液から得られるか、又はそれ自体が体液であることを特徴としている。プローブの自己凝集が優勢になる前に、ターゲットに対するプローブの会合が測定され得る。

もしもプローブの自己凝集の前にターゲットに対するプローブの会合がバックグラウンドより減少した場合には、信頼性の高い測定はもはや保証されない。通常、数分から数時間の範囲内で測定が可能であり、そのためこの方法は、日常的実験室での使用には十分であろう。測定が完了するまでの時間は、当然にそれぞれの測定条件に依るが、予備実験において比較的容易に定められ得る。測定時間に影響を及ぼす可能性のあるパラメーターとして、言及すれば、特にターゲットの濃度 / プローブの濃度がある。例えば、もしもプローブの濃度がターゲットの濃度に比べてかなり高い場合には、該プローブが低い濃度で存在するか、あるいは該プローブ濃度がターゲットの濃度と同程度又は低い場合よりも、プローブの自己凝集は早く始まる。1時間以内の測定時間、特に30分以内の測定時間が望ましい。そのような測定時間は、日常的方法で診断を行うために有利である。

20

【 0 0 2 4 】

本発明によれば、前記プローブ及び / 又は前記ターゲットが検出可能な性質を有するのが望ましい。

【 0 0 2 5 】

好ましくは、病原性タンパク質沈着の基礎構造は、病原性タンパク質沈着のモノマー又はオリゴマー単位を有するのが望ましい。この基礎構造体は、病原性タンパク質沈着のモノマー又はオリゴマー単位と相同的(homologous)、特に構造的に相同的であることもできる。

30

【 0 0 2 6 】

プローブは、ターゲットとして使用された病原性タンパク質沈着の同型 (相同的検出) 又は異型 (非相同的検出) から誘導されてもよい。したがって、例えば、スクレピーや B S E のようなプリオン病に由来した病原性タンパク質沈着を形成する構造、病原性タンパク質沈着に相当する構造及び / 又は病原性タンパク質沈着それ自体は、ターゲットとして用いられる。その一方で、プローブは、例えば前述した構造とは別の構造から誘導されてもよい。したがって、例えば、アルツハイマー病と関連したタンパク質沈着に対する B S E によるアミロイド沈着から誘導された基礎構造 (プローブ) の会合を測定することが可能である。

40

【 0 0 2 7 】

本発明により用いられる基礎構造は、超音波、温度変化の作用のような物理的方法を用い、又は異なるイオン強度の溶液での処理、カオロピックイオン溶液での処理、洗浄剤及び / 又は酵素、特にプロテアーゼでの処理のような化学的方法を用いて病原性タンパク質沈着を処理することにより望ましくは得られる。したがって、例えば、酵素分解及びそれに次ぐ洗浄剤の存在下での超音波処理により、スクレピーを罹患した神経組織からのアミロイドプラークを基礎構造に分裂させることができる。続いてこれらの基礎構造は、再び原線維構造を形成し得る。また病原性タンパク質沈着の基礎構造体は、種々な起源やタイプの相応するアミロイドプラークに相同的な配列を有するであろう組換え体タンパク質、タン

50

パク質の断片、又はペプチドであってもよい。また病原性タンパク質付着は、プローブとしても使用され得る。そのような構造は、実際の病原性タンパク質沈着の領域とよく似ており、かつターゲットと会合的に (associatively) 相互作用する。

【0028】

病原性タンパク質沈着を形成する構造は、それに対するプローブの会合が測定される、ターゲットとしても使用できる。これは、それら自身は実際の病原性タンパク質沈着でないが、病原性タンパク質沈着のモノマー若しくはオリゴマー単位であるか、又はその会合が測定されるべき、病原性タンパク質沈着の基礎構造のより大きな凝集体である構造を意味する。代わりとして、病原性タンパク質沈着それら自身も使うことができる。

【0029】

プローブ及び/又はターゲットは、好ましくは検出可能な性質を有する。前記検出可能な性質は、上記構造又はタンパク質沈着、特に基礎構造に固有であるか、あるいは後に導入されることもできる。前記少なくとも1つの検出可能な性質は、特に、物理的方法、好ましくは分光法により確立される。上記構造又はタンパク質沈着、特に基礎構造の検出可能な性質は、例えば、それらの大きさ、即ち寸法を用いることができる。円偏光二色性によって測定可能な構造のような性質、ルミネッセンス、蛍光性又は吸収のような光学的性質も、ターゲットに対するプローブの会合を測定するために用いることができる。したがって、例えば、構造の固有の蛍光性及び蛍光性を有する後に標識した構造の蛍光性の両方を使うことができる。

【0030】

診断検出の特異性又は選択性を増大させるために、前記ターゲットと相互作用する他の物質も使用できる。例えば、ターゲットへのアフィニティーを有する物質、例えば、抗体又はアビジン/ビオチンをターゲットと相互作用させることができる。

【0031】

前記構造又は会合の前記少なくとも一つの検出可能な性質を測定する方法として、それぞれ適切な評価法を用いた、同焦点蛍光分光法、蛍光相関分光法 (FCS)、相互相関と組合せた FCS のような蛍光法が好ましくは用いられる。参照として、DE 44 38 341 及び WO-A-96/13744, WO-A-94/16313 及び EP-A-96 116 373 及び EP-A-97 109 353 を含める。特に、FCS 相互相関 の使用が、この方法により方法の特異性を向上させることができるため有利である。生物媒体中の凝集体の不正確な陽性検出は、異なる基礎構造をプローブとして用いること、又は特異的抗体のような病原性タンパク質沈着のための他のプローブと共に組み合わせで用いることにより、抑制できる。

【0032】

検出の感度を増大させ、かつ分析の速度を増大させるために、測定溶液を通して動く共焦容量要素 (confocal volume element) を介して測定溶液を「スクリーニング」する方法を繰り返すことが好ましいことがある。

相互相関 が用いられる場合、異なる蛍光性を有する2つの種がそれぞれ観測される。

【0033】

検出可能な性質は、例えば、低分子量基であることも、高分子量であることもできる蛍光性標識により生成される。したがって、ターゲットと結合した標識化抗体は後に標識されることができる。次いで、プローブの結合は適切に測定できる。異なるプローブは異なる色に標識され、そのため次に 相互相関 が行われる。低分子量蛍光リガンド及び/又は相当する標識コンジュゲートである適当な標識を有するプローブを提供することもできる。

【0034】

本発明による病原性タンパク質沈着は、アルツハイマー症、ウシ海綿状脳症 (BSE)、クロイツフェルト・ヤコブ病、スクレピー、ハンチントン舞蹈病 (Huntington's chorea)、パーキンソン病 (Parkinson's disease) のような神経萎縮症を伴うアミロイドプラークに、又は糖尿病に関連したタンパク質沈着のような神経系とは別の器官からのアミロイドプラークに、好ましくは由来する。病原性タンパク質沈着のための適当な供給源は、器官抽出物、好ましくは罹患した動物の脳抽出物である。これは、例えばプリオン感染シリア

10

20

30

40

50

ンゴールドハムスター (Syrian gold hamsters) であることがある。以下の概略は、アミロイド現象に関連付けられた疾患を表にしたものである。

【 0 0 3 5 】

【表 1】

アミロイド疾患	発生	アミロイド形成タンパク質
アルツハイマー症	神経	アミロイド- β タンパク質
伝染性海綿状脳症	神経	プリオンタンパク質
ハンチントン舞踏病*	神経	ハンチンチン (huntingtin) *
パーキンソン病	神経	シヌクレイン (synuclein) *
遺伝性脳アミロイドーシス	神経	シスタチン C
原発性全身性アミロイドーシス (AL アミロイドーシス)	全身	免疫グロブリン
反応性全身性アミロイドーシス (AA アミロイドーシス)	全身	リポプロテイン類
家族性アミロイドーシス	全身	トランスチレチン (transthyretin)
II 型糖尿病	膵臓	島アミロイドポリペプチド
注射限局性アミロイドーシス		インシュリン
甲状腺髄様癌	甲状腺	カルシトニン
ベータ-2 ミクログロブリン アミロイドーシス	骨格 筋肉	ベータ-2 ミクログロブリン
遺伝性非神経障害 アミロイドーシス	全身	リソザイム (lysozyme)
先天性遺伝性全身性 アミロイドーシス	全身	ゲルソリン (gelsolin)

(*Sipe からの修正、1992 Annual Reviews in Biochemistry 61;947-975)

【 0 0 3 6 】

病原性タンパク質沈着の基礎構造は、アミロイドブランクと配列相同性を有する組換え体タンパク質、タンパク質フラグメント又はペプチド類であることもできる。よって、例えば高保存領域における保存アミノ酸置換は、以下のものであることができる。イソロイシン、バリン及びロイシンのいずれかのアミノ酸が、これらのアミノ酸の他のいずれかと交換されることがあり、アスパラギン酸塩がグルタミン酸塩と交換されることがあり、逆もまた同様であり、グルタミンがアスパラギンに、又はその逆に、セリンがトレオニンに、又はその逆に交換されることがある。より低い保存領域における保存アミノ酸置換は、以下のものであることができる。イソロイシン、バリン及びロイシンのいずれかのアミノ酸がこれらのアミノ酸の他のいずれかと交換されることがあり、アスパラギン酸塩がグルタミン酸塩に、又はその逆に、グルタミンがアスパラギンに、又はその逆に、セリンがトレオニンに、又はその逆に、グリシンがアラニンに、又はその逆に、アラニンがバリンに、又はその逆に、メチオニンがロイシン、イソロイシン若しくはバリンのいずれかのアミノ

酸に、又はその逆に、リジンがアルギニンに、又はその逆に、アスパラギン酸塩又はグルタミン酸塩のいずれかのアミノ酸がアルギニン又はリジンのいずれかのアミノ酸に、ヒスチジンがアルギニン又はリジンのいずれかのアミノ酸に、グルタミンがグルタミン酸塩に、又はその逆に、及びアスパラギンがアスパラギン酸塩に、又はその逆に交換されることがある。

【0037】

本発明の方法による診断試験が行われる材料のための供給源として、脳脊髄液、血液、リンパ、尿のような体液、又は唾液のような分泌物が特に使用されることがある。記載された体液又は分泌物から、試料が採取され、そしてプローブに接触され、そしてこれらの試料中に含有されているであろう病原性タンパク質沈着を形成する構造、病原性タンパク質沈着に相当する構造及び/又は病原性タンパク質沈着の会合を測定するためにインキュベートされる。関連する疾患を暗示する病原性タンパク質沈着の存在は、次いで、添加されたプローブの会合により媒介されて、陽性診断シグナルを与えるであろう。体液は、組織よりも有利である。何故なら、それらは、組織が概して最初に溶解されなければならないのに対して、直接インキュベートされ得るためである。これは、例えば機械的若しくは化学的処理又はそれらの組み合わせによって行われ得る。

【0038】

記載された構造及び沈着、特に基礎構造の検出可能な性質から定められるパラメーターは、特に、並進拡散率、回転拡散率、励起状態の寿命、放射性分極、エネルギー伝達、量子収量、粒子の数又は濃度、強度差であり得る。

並進拡散率が定められる場合、走査法 (scanning process) を用いる多数の検出器によりそれらを検出することが、ゆっくりと拡散する会合のために、望ましいことがある。

【0039】

脳脊髄液を得るための腰椎穿刺 (lumbar puncture) の患者に対する負担は低い。感度の著しい増加は、核形成 (nucleated) 重合過程が、アミロイド疾患のための、ジャレット (Jarret) 及びランスバリー (Lansbury) によって理論的に説明された (Cell 73, 1055-1058, 1993) ように包含される場合に、達成され得る。このモデルにおいて、アミロイド沈着の凝集は、2つの動的反応に分類される。アミロイドタンパク質のオリゴマーサブユニットへの自己凝集の動力学 (kinetics) において、平衡は、明らかに抽出物側である。凝集体は、延長された反応時間後にのみ形成される。核形成依存性重合は、アミロイドタンパク質が既に存在する凝集体と会合することを引き起こす。ここで、その平衡は、明らかに生成物側である。会合は、時間遅延なしに起こる。2つの動的反応間のこの時間枠は、自然のタンパク質沈着の検出のために有用である。重合過程を支持し得るプローブを添加した後、細胞核として働く病原性タンパク質沈着が存在する場合には、前記凝集体から区別できないであろうプローブのより遅い自己凝集により形成された凝集体の形成と比較して、プローブのそのようなタンパク質沈着中への明らかに促進された取り込みが発生する。

【0040】

核として働く病原性タンパク質沈着への、多数の標識化プローブの核に起因する会合と、共焦点光学系による極めて高感度な検出法との組み合わせは、測定シグナルの相応する大きな増幅を与える。よって、腰椎穿刺により得られた脳脊髄液中で (Neumeister et al., Klinikleitfaden Labordiagnostik, Fischer-Verlag 1998)、病原性タンパク質沈着の個々の分子は、明らかに検出され得た。

【0041】

本発明による方法と類似する、病原性タンパク質沈着に関連した疾患の治療のための活性物質の検出のためのスクリーニング方法は、ターゲットとしての病原性タンパク質沈着の基礎構造、病原性タンパク質沈着を形成する構造、病原性タンパク質沈着に相当する構造への、病原性タンパク質沈着の基礎構造、病原性タンパク質沈着を形成する構造、病原性タンパク質沈着に相当する構造及び/又は病原性タンパク質沈着の会合は、疑わしいと思われる (suspected) 活性物質の存在下で測定されるという事実に基づく。あるいは、ターゲットとしての病原性タンパク質沈着の基礎構造、病原性タンパク質沈着を形成する構

造、病原性タンパク質沈着に相当する構造への、病原性タンパク質沈着の基礎構造、病原性タンパク質沈着を形成する構造、病原性タンパク質沈着に相当する構造及び／又は病原性タンパク質沈着の会合が、まず行われ、そしてその後疑わしいと思われる活性物質の作用の下での会合の逆転が観察される。その後、それらの化合物は、重要な方法における会合の逆転を引き起こし得る活性物質として同定される。第3の代りは、疑わしいと思われる活性物質の作用の下での、タンパク質沈着自体の解離 (dissociation) の測定である。

【0042】

本発明の方法は、以下の実施例によりさらに説明される。

【0043】

図1のスキームは、以下の実施例1～6、8～10の実験手順を示す。

【0044】

試験7～10は、組換え体プリオンタンパク質(90-231)に関連するのに対し、試験1～3及び5は、可溶性プリオンタンパク質を用いて行われた。

【0045】

可溶性(可溶化)プリオンタンパク質(PrP)の調製は、シリアンゴールドハムスターの伝染性脳組織から単離されたプリオン凝集体の、pH7.2、0.2%のSDS含有10mM燐酸ナトリウム中での超音波処理により行われた(Riesner, D.; Kellings, K.; Post, K.; Wille, H.; Serban, H.; Groth, D.; Baldwin, M.A.; 及び Prusiner, S.B.; 1996, Journal of Virology, Vol. 70, No. 3, 1714-1722頁)。超音波のエネルギーにより、以下に記載された実施例のために蛍光標識されたモノマーからオリゴマーのPrPフラクションが形成された(Pitschke, M.; Post, K.; 及び Riesner, D.; 1997, Progress in Colloid & Polymer Science, Vol. 107, 72-76頁)。蛍光標識化のために、色素Cy2 (Amersham) が使用された。

【0046】

可溶性A (1-42)は、0.2%のSDSを含有するpH7.0の10mM燐酸ナトリウムバッファー中で安定化され得た。前記色素Cy2 (Amersham) もまた、A の蛍光標識化のために使用された。

【0047】

会合測定のため、SDSを0.2%SDSに希釈して用い、可溶性のモノマーからオリゴマーの蛍光標識されたタンパク質又はペプチド類が、アミロイド凝集体(伝染性プリオン粒子: 実施例1～3; A : 実施例4～5)とともにインキュベートされ、そしてその蛍光シグナルが、蛍光相関分光法により検出された。

【0048】

実施例1

蛍光相関分光法(FCS)によるプリオンタンパク質凝集体の検出

蛍光標識された可溶性PrPの会合を通じたFCSによる感染性プリオン粒子(PrP)の検出。

材料:

-10mM燐酸ナトリウムバッファー(pH 7.0、0.2% SDS)中約25ng/μlの可溶性PrP-Cy2;
(溶液1)

-10mM燐酸ナトリウムバッファー(pH7.0)中のプリオン粒子(約200ng/μl); (溶液2)

操作:

2つのパッチが調製された。

【0049】

【表2】

10

20

30

40

A)	1 μ l の溶液 1 (1:10) 19 μ l の 10mM 磷酸ナトリウムバッファ、 pH 7.0
B)	1 μ l の溶液 1 (1:10) 17 μ l の 10mM 磷酸ナトリウムバッファ、 pH 7.0 2 μ l の溶液 2 (1:100)

2つのチャージの各々が混合され、1分間インキュベートされ、試料チャンバー中にチャージされ、そしてFCSにより測定された。

10

【 0 0 5 0 】

図 2 に、60秒間に渡る蛍光強度（相対単位；RU）の測定結果を示す。図2aにおいて、可溶化PrP-Cy2の揺らぎシグナルが観察される。それは、110～130RUの間のシグナル強度を有する。自己相関を用いたシグナル値は、単量体タンパク質の典型的な値である、約250 μ s の拡散時間をもたらす。図2bにおいて、約950RUの蛍光強度を有するシグナルピークが、さらに観察される。それは、事前に可溶化された蛍光標識されたPrP-Cy2が会合される、より大きな凝集体の遅い拡散に起因する。これは単一の事象であるので、自己相関による拡散時間又は分子量の決定は、可能ではない。しかし、明白なシグナル検出及び個々の凝集体への割り当ては、蛍光強度の急激な増加を伴う単離されたピークの出現を通じて、首尾よく達成される。

20

【 0 0 5 1 】

実施例 2

蛍光標識された可溶化プリオンタンパク質（PrP-Cy2）を使用した組織試料からの単離プリオンの相同性検出

FCSを用いた蛍光標識された可溶化プリオンタンパク質（PrP-Cy2）による標識化後の脳抽出物におけるプリオンタンパク質（PrPロッド（rods））の感染性凝集体の検出。

材料：

- 10mM 10mM 磷酸ナトリウムバッファ（pH 7.0、0.2%SDS）中約25ng/ μ l の可溶化PrP-Cy2；
（溶液1）

-非感染性（溶液2）及びプリオン感染性シリアンゴールドハムスター（Syrian gold hamsters）（溶液3）からの脳抽出物

30

操作：

2つのパッチが調製された。

【 0 0 5 2 】

【表 3】

A)	1 μ l の溶液 1 (1:10) 17 μ l の 10mM 磷酸ナトリウムバッファ、 pH 7.0 2 μ l の溶液 2 (1:10)
B)	1 μ l の溶液 1 (1:10) 17 μ l の 10mM 磷酸ナトリウムバッファ、 pH 7.0 2 μ l の溶液 3 (1:10)

40

2つのチャージの各々が混合され、1分間インキュベートされ、試料チャンバー中にチャージされ、そしてFCSにより測定された。

コントロールとして、脳抽出物を添加しない可溶化PrP-Cy2が、同濃度において測定された。

【 0 0 5 3 】

図 3 において、個々のチャージのためのピーク数が、図に示されたようにプロットされる。共焦点容量要素（confocal volume element）を通じて、高分子量凝集体の拡散に起因

50

したピークの数が増加された（実施例 1 参照）。プリオン感染性組織試料が、非感染性脳抽出物と比べ、はるかに多いピーク数を有することが示され得る。

【 0 0 5 4 】

存在するプリオンに対する可溶化PrP-Cy2の会合を介しての感染性材料の検出は、ピーク数が、非感染性組織細胞の実験においてバックグラウンドを示す場合でさえ、この実験的デザインにより可能である。

【 0 0 5 5 】

実施例 3

蛍光標識された可溶化プリオンタンパク質（PrP-Cy2）の相溶性会合の、及び組織試料から単離されたプリオンタンパク質凝集体の感度

感染性脳組織から単離されたプリオンに対するPrP-Cy2の相溶性会合の感度が、FCSにより分析される。

材料：

- 10mM 磷酸ナトリウムバッファー（pH 7.0、0.2% SDS）中約25ng/ μ l の可溶化PyP-Cy2；（溶液1）

- 10mM 磷酸ナトリウムバッファー（pH 7.0）中のPrPロッド（約200ng/ μ l）；（溶液2）

操作：

2つ続きの実験が準備された。

【 0 0 5 6 】

【表 4】

<p>A) 1 μl の溶液 1 (1:10)</p> <p>17 μl の磷酸ナトリウムバッファー、pH 7.0</p> <p>2 μl の溶液 2 (1:x ; PrP 量は図 4 参照)</p>	<p>B) 1 μl の溶液 1 (1:10)</p> <p>17 μl の磷酸ナトリウムバッファー、pH 7.0 ; 0.2% SDS</p> <p>2 μl の溶液 2 (1:x ; PrP 量は図 4 参照)</p>
---	--

実験チャージにおけるPrPロッドの量は、検出限界へ段階的に減少された。0.2%のSDSにおける測定が、コントロールとされた。

【 0 0 5 7 】

1つ1つのバッチは混合され、1分間インキュベートされ、試料チャンバー中にチャージされ、そしてFCSにより測定された。

測定時間10分当たりのピークにおいて現されたピーク数は、図 4 において実験チャージ中のPrP量に対してプロットされた。40ng ~ 400pgの測定濃度域に渡り、ピーク数の直線依存性が観察され得る。よって、ピーク数の評価は、測定されるべき試料中のプリオン濃度の直接的な定量を可能にする。0.2%のSDSにおいて、存在するPrP構造における組み込みは可能ではない。

【 0 0 5 8 】

実施例 4

蛍光標識された可溶A (1-42) ペプチドを用いたアルツハイマー症におけるアミロイド沈着の大多数に相当するペプチド凝集体の相溶性検出

実施例 1 ~ 3 において使用された検出方法が、病原性タンパク質沈着を含むその他の疾患に転用されることができると否か、かつそれにより、いずれのアミロイド構造の検出のためにも適当であるか否かの疑問に答えるための、FCSを使用し、蛍光標識された可溶A (1-42)を使用するアルツハイマー症からの凝集体の検出。

材料：

- 10mM 磷酸ナトリウムバッファー（pH 7.0、0.2% SDS）中100ng/ μ l のCy2により蛍光標識された可溶A ペプチド1-42；（溶液1）

-10mM 磷酸ナトリウムバッファー中 (pH 7.0) のA アミロイド原繊維 (90ng/ μ l) ; (溶液2)

操作:

2つのバッチが調製された。

【0059】

【表5】

A) 1 μ l の溶液1 (1:10)	B) 1 μ l の溶液1 (1:10)
10 μ l の溶液2	10 μ l の溶液2
9 μ l の磷酸ナトリウムバッファー	9 μ l の磷酸ナトリウムバッファー、
pH 7.0	0.2% SDS、pH 7.0

10

2つのチャージはそれぞれ混合され、1分間インキュベートされ、試料チャンバー中にチャージされ、そしてFCSにより測定された。

コントロールとして、可溶A (1-42)-Cy2が、同濃度において測定された。

【0060】

図5において、実験の結果が図表に要約されている。ピーク数の評価 (1-3参照) は、0.01%のSDSにおけるインキュベーションとともに、アルツハイマー症におけるアミロイド沈着の主成分を表すA 原繊維の標識化 (PrP凝集物のために使用されるものと同一のSDS濃度) は、この方法により可能である。増加したSDS濃度 (0.1%) の存在下でのA -Cy2(1-42)の組み込みは、可能ではない。(原繊維構造よりも)可溶構造において存在するA の標識化もまた、可能ではない。前記実験は、アルツハイマー症を伴うアミロイド沈着の検出が可能であることを示す。

20

【0061】

実施例5

蛍光標識された可溶化プリオンタンパク質 (PrP-Cy2) を用いたアルツハイマー症におけるアミロイド沈着の大多数に相当するペプチド凝集体の相溶性検出

それに対して会合が生じる試料と同一ではない蛍光標識化可溶プローブを用いた相溶性標識化が可能か否かの疑問に答えるための、FCSを使用し、蛍光標識された可溶PrP-Cy2を使用するアルツハイマー症からの凝集体の検出。

30

材料:

-10mM 磷酸ナトリウムバッファー (pH 7.0、0.2% SDS) 中約25ng/ μ lの可溶化PrP-Cy2 ; (溶液1)

-10mM 磷酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) 中のA (1-42)アミロイド原繊維 (90ng/ μ l) ; (溶液2)

-10mM 磷酸ナトリウムバッファー (pH 7.0、0.2% SDS) 中の非原繊維 (non-fibrillar) A (1-42) (90ng/ μ l) ; (溶液3)

-10mM 磷酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) 中のA (1-40)アミロイド原繊維 (90ng/ μ l) ; (溶液4)

40

-10mM 磷酸ナトリウムバッファー (pH 7.0、0.2% SDS) 中の非原繊維A (1-40) (90ng/ μ l) ; (溶液5)

操作:

以下のバッチが調製された。

【0062】

【表6】

<u>Aβペプチド(1-42):</u>	
A) 1μlの溶液1 (1:10) 2.5μlの溶液2 16.5μlのリン酸ナトリウムバッファー、 pH 7.0	B) 1μlの溶液1 (1:10) 2.5μlの溶液3 16.5μlのリン酸ナトリウムバッファー、 pH 7.0
C) 1μlの溶液1(1:10) 2.5μlの溶液2 16.5μlのリン酸ナトリウムバッファー、 pH 7.0、0.2% SDS	

10

【0063】

【表7】

<u>Aβペプチド(1-40):</u>	
A) 1μlの溶液1 (1:10) 2.5μlの溶液4 16.5μlのリン酸ナトリウムバッファー、 pH 7.0	B) 1μlの溶液1 (1:10) 2.5μlの溶液5 16.5μlのリン酸ナトリウムバッファー、 pH 7.0
C) 1μlの溶液1(1:10) 2.5μlの溶液4 16.5μlのリン酸ナトリウムバッファー、 pH 7.0、0.2% SDS	

20

30

1つ1つのバッチは混合され、1分間インキュベートされ、試料チャンバー中にチャージされ、そしてFCSにより測定された。

コントロールとして、可溶PrP-Cy2が、0.01%のSDSと同濃度において測定された。

【0064】

ピーク数（実施例2参照）は、前述の各バッチのために測定された（図6）。A（1-42）及びA（1-40）の両者が、それらが原繊維構造において存在する場合、及び標識化反応が0.01%のSDSにおいて行われる場合に、明らかに標識され得ることが見出された。会合が、非原繊維構造にもたらされ、又は前記SDS濃度が増加されるとき、低バックグラウンドのみが観察され得る。

40

【0065】

この結果は、アミロイドタンパク質凝集体の標識化は、標識化のために用いられる可溶蛍光標識されたタンパク質が、凝集体を形成するタンパク質と同一であることを強制的に要求しないことを示す。

【0066】

実施例6

アルツハイマー症を罹患した患者の脳脊髄液における凝集体の検出

凝集体の特異的検出は、アルツハイマー症に関連した。よって、脳脊髄液（脊髄液）は、

50

特異的検出が、アルツハイマー症を罹患した患者と、健康なコントロールグループとの間で行われ得る試料として使用される。

材料：

-10mM 磷酸ナトリウムバッファー (pH 7.0、0.2% SDS) 中 100ng/μl の Cy2 により蛍光標識された可溶 A ペプチド 1-42、; (溶液 1)

-罹患した患者からの脳脊髄液及び健常な被験者からのコントロール

操作：

以下のバッチが調製された。

2μl の溶液 1 (1:10)

18μl の患者からの脳脊髄液

10

【0067】

さらなる処理又は濃縮なしに、脳脊髄液は 0.02% の SDS において蛍光標識された A (1-42)-Cy2 (0.1ng/μl) とともに直接的にインキュベートされ、そして直ちに FCS によって 20 分間測定された (図 7)。精神病治療の診断基準により判断される通りに、アルツハイマー性痴呆 (AD) を罹患した患者からの脳脊髄液試料中で検出された凝集体及び健常なコントロール被験者からのものが比較された。アルツハイマー性痴呆を罹患したすべての患者は、類似の年齢構成を有する対応するコントロールグループと比べ、脳脊髄液中ではるかに高いシグナル強度を有することが見出された。CAA として示された患者は、診断を受けた全患者の中で最も高いシグナル強度を有する。この患者は、その移動が徐々に破壊されるアミロイド ペプチド類の沈着が、大脳管 (vessels) の毛細血管において起こるアルツハイマー症の特別な形態である、コンゴフィル (congophile) 脈管障害を罹患する。この疾患において、シグナル強度の増大を与える、A 凝集体の脳脊髄液への最も甚だしい逸脱 (transgression) が起こるように見える。コントロールグループの測定結果は、凝集体が、単離された場合と同様に、ここで検出されることを示す。この結果は、プローブのみ (A (1-42)-Cy2) によっても示される。それは、20 分の測定時間中に起こる自己凝集効果により、又は A 凝集体の存在による。前記プローブの測定結果は、0.01% 又は 0.2% の SDS 中で達成された。

20

【0068】

実施例 7

蛍光標識された 2 つの rPrP プローブの rPrP (90-231) への共同凝集 (coaggregation) ハムスター PrP のプロテアーゼ-耐性部位と相同的組換え体 プリオンタンパク質 (90-231) (以下、rPrP) は、励起波長が 488nm (オレゴングリーン (Oregon Green)、モレキュラープローブス (Molecular Probes)) 及び 633nm (Cy5、アマシャム (Amersham)) であるアミノ反応性蛍光染料により標識された。タンパク濃度及び標識比は 280nm、496nm、及び 650nm における吸収測定により決定された。標識効率は、アミノ反応性蛍光染料の等モル添加において 10% (rPrP-Cy5) 及び 4% (rPrP-OrG) であった。

30

【0069】

凝集実験：2 つの標識された等モル量の rPrP プローブは、25 倍過剰の標識されていない rPrP、0.2% SDS を含む緩衝液と混合された。凝集工程は SDS 濃度を 0.01% に、rPrP 総濃度を 50nM に希釈することにより開始した。

40

【0070】

凝集工程の後、続いて、二色相互相関 FCS 機器 (ConfoCor prototype, Zeiss) を用いて、自己相関及び相互相関曲線を繰り返し記録した。相関曲線は、拡散パラメーター τ_g が相互相関曲線に使用される 3 次元拡散モデルにより描かれた。適合は、球体分子モデルを用いて行われた。

【0071】

SDS 濃度の減少は、赤及び緑の標識 PrP が両方とも組み込まれている粒子濃度に比例した相互相関幅 (amplitude) の急激な増加を引き起こす。0.2% SDS 存在下では、相互相関生成物は検出されなかった。数分で、オリゴマー濃度はプラトーまで増加し、その後、さらに高次元の凝集体の形成が起こるにつれて減少する。

50

【 0 0 7 2 】

図9(左)は、PBS中 $c(\text{rPrP}) = 50 \text{ nM}$ 、 $c(\text{rPrP-Cy5})$ 、 $c(\text{rPrP-OrG}) = 2 \text{ nM}$ の濃度で、25、0.01% SDS存在下における蛍光標識されたrPrP(90-231)の相互相関を示す。曲線は、以下の意味を現す：a) 小さい点：インキュベーション時間 1分； b) 短いダッシュ： 6分； c) 大きい点：20分； d) 点線： 30分； e) 実線： 130分； f) 小さい点： 参照検体、0.2% SDS。

【 0 0 7 3 】

図9(右)は、凝集過程における相互相関幅(四角)のグラフを示している。赤及び緑のフルオロフォア(fluorophores)の両方が組み込まれている粒子の形成は、二次反応により説明することができる： $A_i + B_j \rightarrow Ab_{ij}$ ， $k = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ 。

10

【 0 0 7 4 】

実施例8

励起rPrP凝集体へのrPrPプローブの会合

濃度が0.2から20 ng/μlである予め凝集されたrPrPは、実施例7の凝集バッチに添加された。rPrP凝集体は、rPrPを0.01%SDS濃度で1時間、25 (c(rPrP) = 100 ng/ml)のインキュベーションにより生成された。会合工程の後、続けて自己相関及び相互相関曲線の連続した記録が行われた。

【 0 0 7 5 】

標識されたrPrPの凝集体への会合は、数分という時間範囲内で観察することができた。この工程は生のシグナルにおける大きな蛍光ピークの発生により特徴づけられた。相互相関曲線では、長い拡散時間(> 5 ms)を有する成分が優性であった。

20

【 0 0 7 6 】

実施例9

2つのプローブの相互相関によるrPrP凝集体の認識；モノクローナル抗体(mAB) + rPrPプリオンタンパク質の特異的認識のために、その特異性及び結合強度により識別することができる様々なモノクローナル抗体が入手可能である。CJD患者サンプル中の病原性PrPの認識に特に適当なのは、病原性形態プリオンタンパク質に特異的に結合するB. Oesch(Korthら, Nature, 1997.11.6, 390(6655): 74-7)に開発された抗体である。PrPプローブの共同凝集(coaggregation)に結合する特異的な抗体の組み合わせは、病原性凝集体の単一標識と比較して増加した特異性を提供する。

30

【 0 0 7 7 】

モノクローナル抗体IgM 15b3は、PrPプローブとの類似性により、アミノ基(function)において蛍光染料により標識された。標識された抗体は、最終濃度20nMで使用された。rPrPと抗体プローブを混合して用いるためには、結合条件は両方のプローブに適するように設定することが好ましい。SDS濃度0.01%では、rPrPプローブの凝集と抗体結合の両方を観察することができる。標識された凝集体が焦点へ入ると、蛍光ピークが発生する。適するサイズでは、ピークシグナルは相互相関曲線において優勢である。

【 0 0 7 8 】

図10は、rPrPプローブとmABのrPrP凝集体への会合を示す。上段：相互相関蛍光シグナルの掃引(sweep)。下段：二色相互相関曲線。曲線の軌跡において、掃引の最初から大きな凝集体が優性である。濃度は $c(\text{rPrP}) = 50 \text{ nM}$ 、 $c(\text{rPrP-Cy2}) = 2 \text{ nM}$ 、 $c(\text{mAB-Cy5}) = 20 \text{ nM}$ であった。

40

【 0 0 7 9 】

実施例10

蛍光の生データのピーク分析

ターゲットタンパク質への多くのプローブ分子の会合は、遊離プローブのバックグラウンドシグナルより2倍以上突出している高度に標識された凝集体(> 10組み込んだプローブ)を生成する。サンプル中に存在する凝集体の量は、ピークの数から決定することができる。従って、測定時間15分では、フェムトモルの濃度まで減少した凝集体が検出され得る。

【 0 0 8 0 】

50

1つの応用は、CJD患者の脳脊髄液中のPrP凝集体の検出である。3つのCJD陰性及びCJD陽性脳脊髄液サンプルが試験された。CJD陽性及びCJD陰性サンプルの差別化は、高い蛍光バースト(bursts)の発生した事象数により行うことができた。

【 0 0 8 1 】

実験的条件：Cy2-標識されたrPrPプローブは、0.02%のSDS存在下、プローブ濃度が10nMになるように脳脊髄液サンプルに添加された。測定は22 で15分間行われた。

【 0 0 8 2 】

データ取得：サンプルはConfoCor FCSデザインで測定された。励起は、仕事率密度 $5 \cdot 10^4$ W/cm²で、波長488 nm(Ar⁺レーザー)において行われた。放射される蛍光は、顕微鏡対物レンズ(40x /1.2 NA, Zeiss)により焦点を合わされ、アヴァランチ(avalanche)フォトダイオード上へ同焦点に像が描かれた。後者は、1光子に対して1シグナルを発する光子カウンターとしての役割を果たす。シグナルパルスはシグナルディバイダーを介して伝達され、並行してハードウェア相関カードで評価され、チャンネル幅250 μsの目盛りカードに記録された。総測定時間は、360万チャンネルの合計に相当する15分であった。

【 0 0 8 3 】

データ評価：評価は、蛍光ピークの数及び高さを基に行われた。チャンネル毎の光子数の分布はヒストグラムに示されている。

【 0 0 8 4 】

図11は、チャンネル幅250 μs及びプローブ濃度rPrP-Cy2 = 20 nMでの測定用チャンネル毎の蛍光光子頻度分布を示している；左：CJD陽性脳脊髄液サンプル、右：CJD陰性脳脊髄液サンプル。

【 0 0 8 5 】

ピークの高さは光子数を表し、チャンネル数は全てのピーク領域の積分の測定である。CJD陽性サンプルでは、高い比率で大きな蛍光ピークが観察される。始めの値をセットすることで、CJD陽性とCJD陰性サンプル間の明確な分類を行うことができる。

【 0 0 8 6 】

図12は、チャンネル幅250 μs、プローブrPrP-Cy2の濃度が20nMにおけるCJD陽性(CJD+) / CJD陰性(CJD-)脳脊髄液サンプル中の150カウント / チャンネルより上のチャンネルからの蛍光光子の頻度を示す。p315等は内部での患者の識別番号である。

【 0 0 8 7 】

二色デザインでは、一致の(coincidence)分析は、両方の色のプローブで標識された凝集体からのピークを認識するために、赤シグナルに緑シグナルを乗じることにより行うことができる。改良ピークバースト分析により、プローブシグナルからの大きいピークの分離を更に改善することができた。

【 0 0 8 8 】

実施例11

スクリーニング法用モデルとしてのコンゴレッド

コンゴレッドはその原線維発生における阻害効果で知られている。

【 0 0 8 9 】

アルツハイマー痴呆症を罹患する患者の脳脊髄液における始めの測定(測定時間1分につき各20コ測定)を図13に示す。

【 0 0 9 0 】

図13は、特異的プローブA⁺-42-Cy2の合成A⁺-1-42凝集体への会合におけるコンゴレッドの影響を示す。FCSにおいて、相同性凝集のシグナル強度が20%まで下がる減少は、1mMコンゴレッドの添加において観察され得る。

【 0 0 9 1 】

1mMコンゴレッドの添加(下段)では、参照パッチ(上段)と比較して検出可能なピークの減少が観察され得る。励起波長範囲でコンゴレッドは吸収するため、異なるスケールの測定がコンゴレッドあり及びなしのサンプルにおいて行われた。これは、FCSで原線維発生を阻害する物質を識別することができることを示す。

10

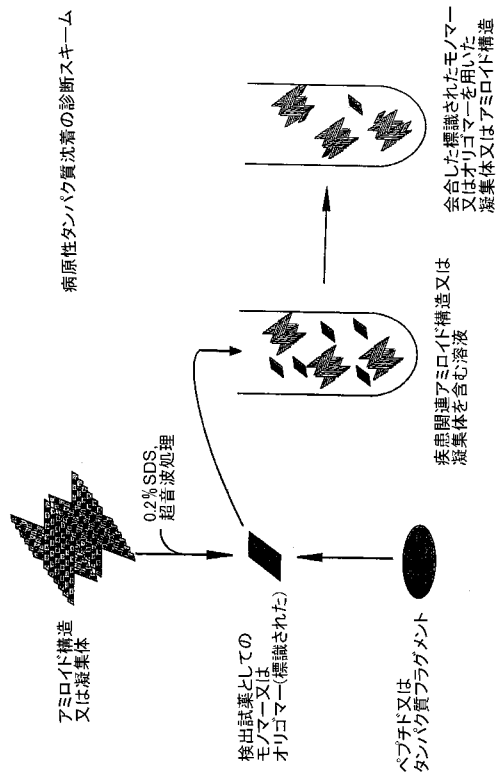
20

30

40

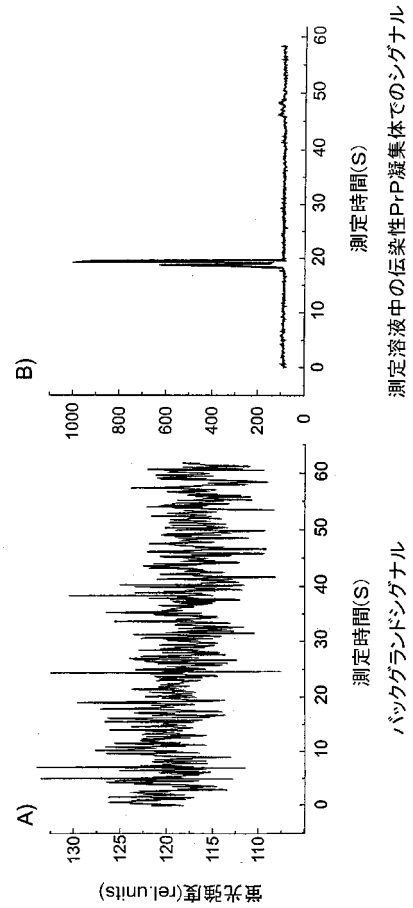
50

【図 1】



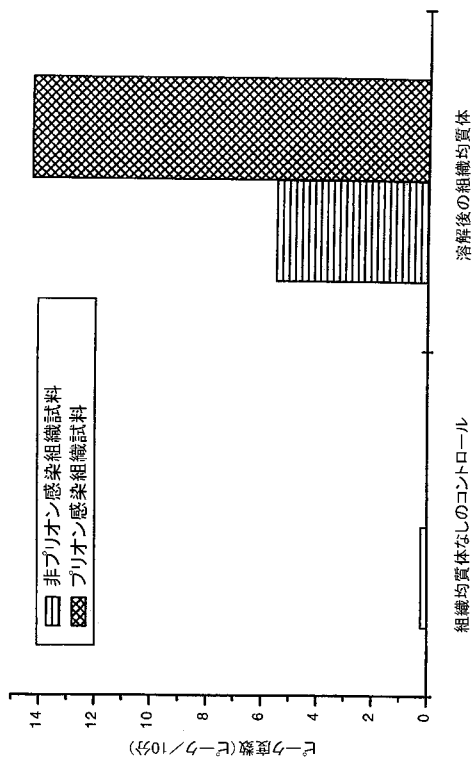
【図 2】

蛍光相関分光法によるPrP凝集体の検出



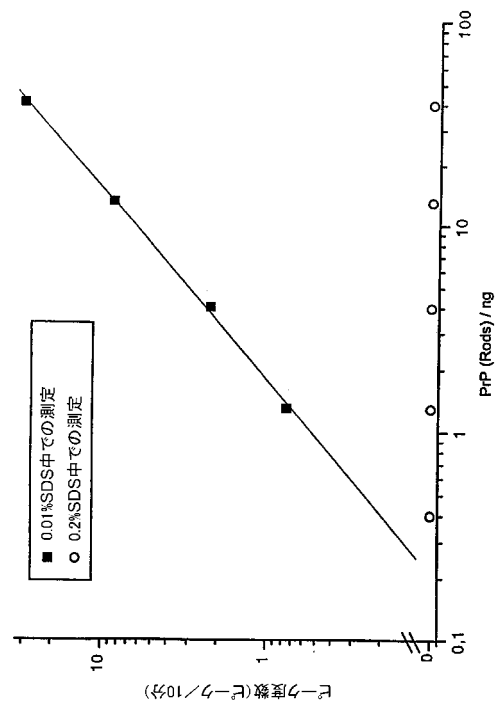
【図 3】

組織試料から単離したプリオン類の検出



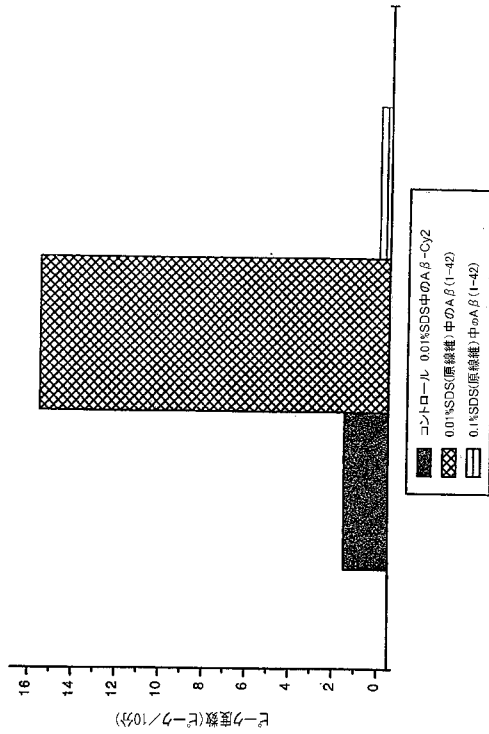
【図 4】

PrP-Cy2のプリオンタンパク質凝集体への相溶性会合



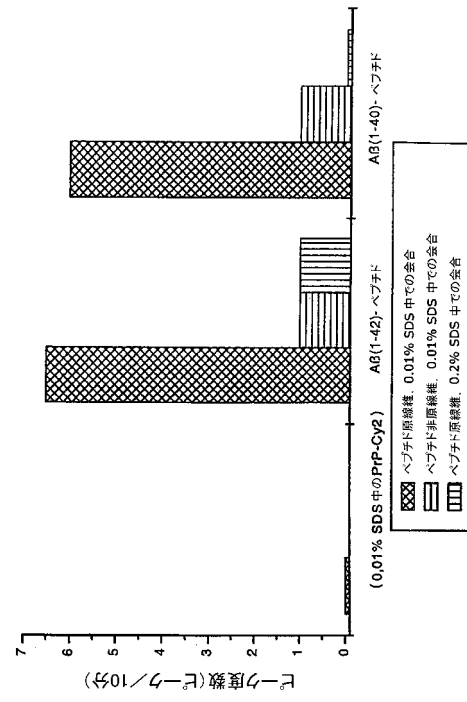
【図 5】

Aβ(1-42)-Cγ2の原線維への相溶性会合

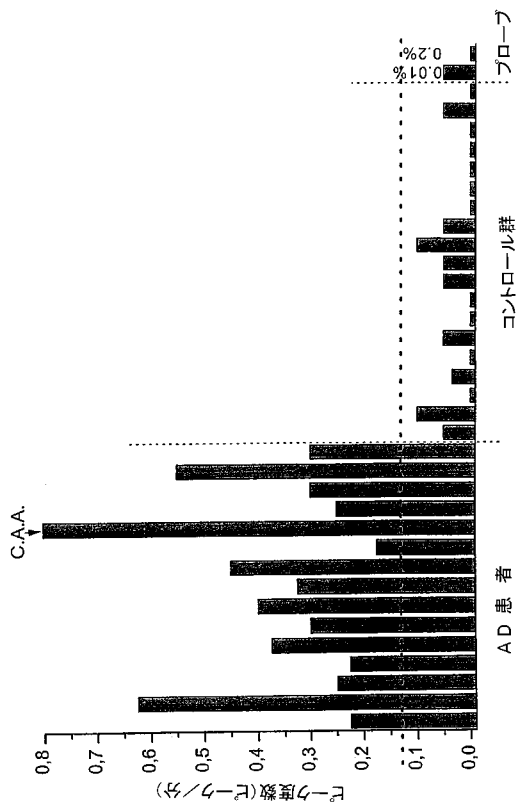


【図 6】

PIP-Cγ2のAβペプチドへの相溶性会合

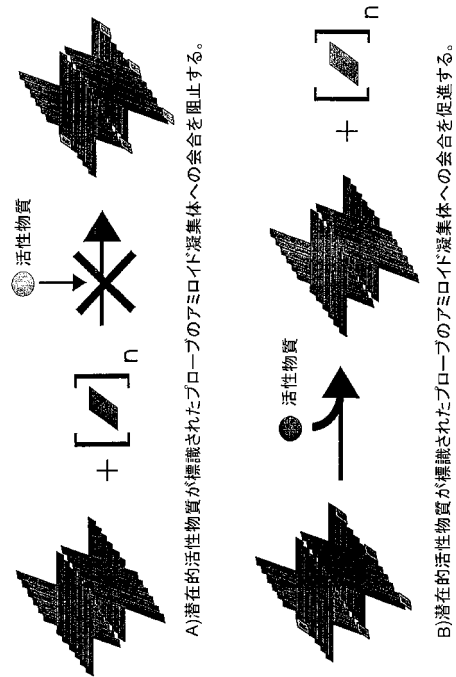


【図 7】

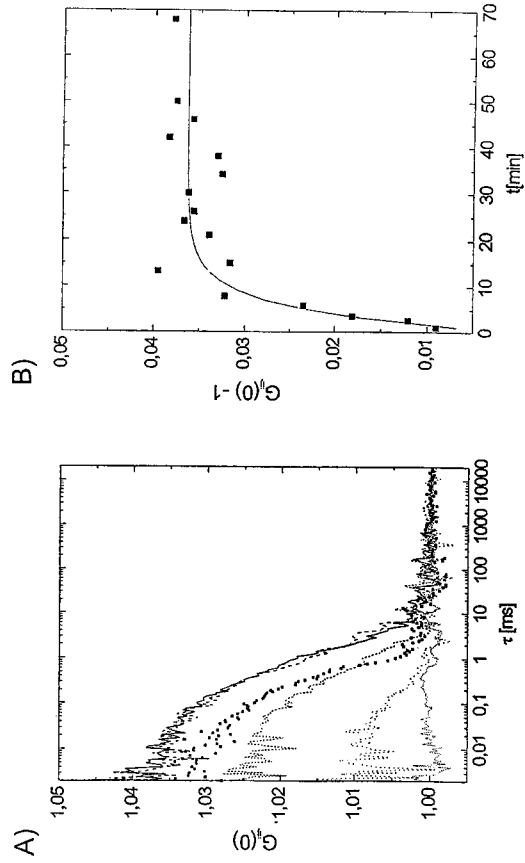


【図 8】

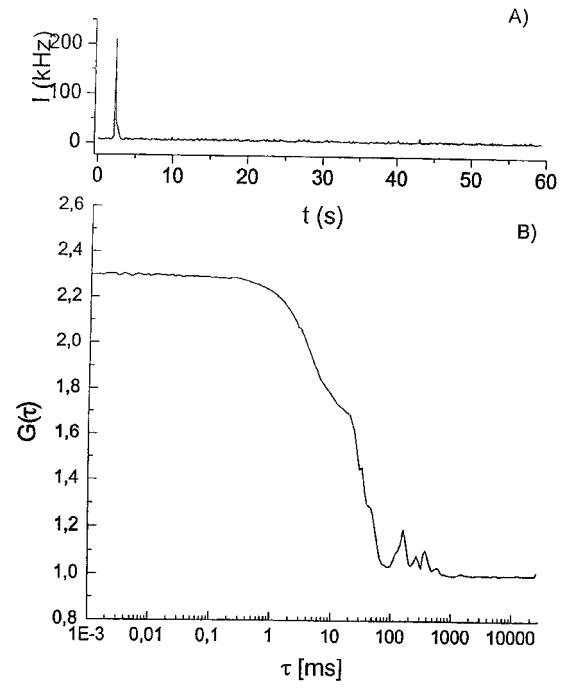
活性物質のスクリーニング



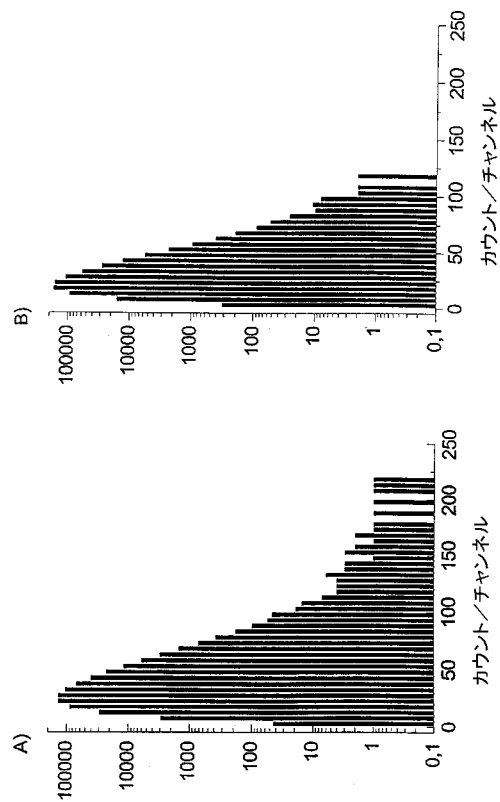
【図 9】



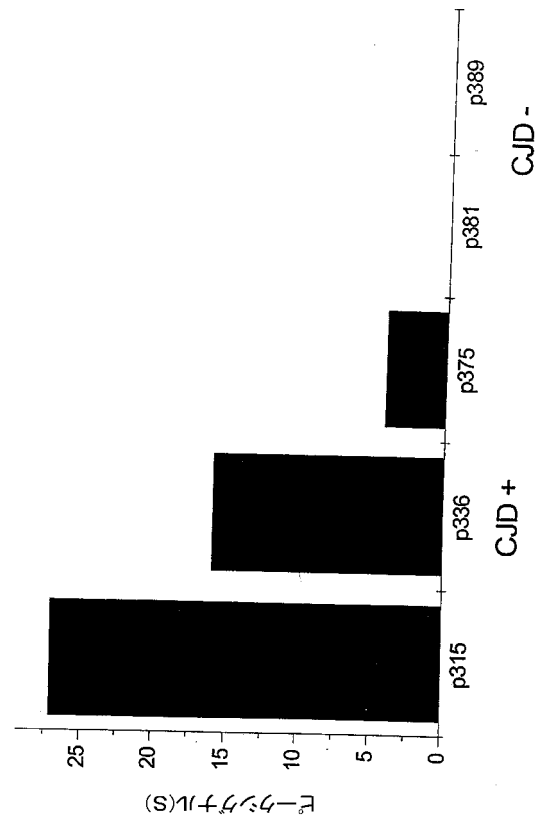
【図 10】



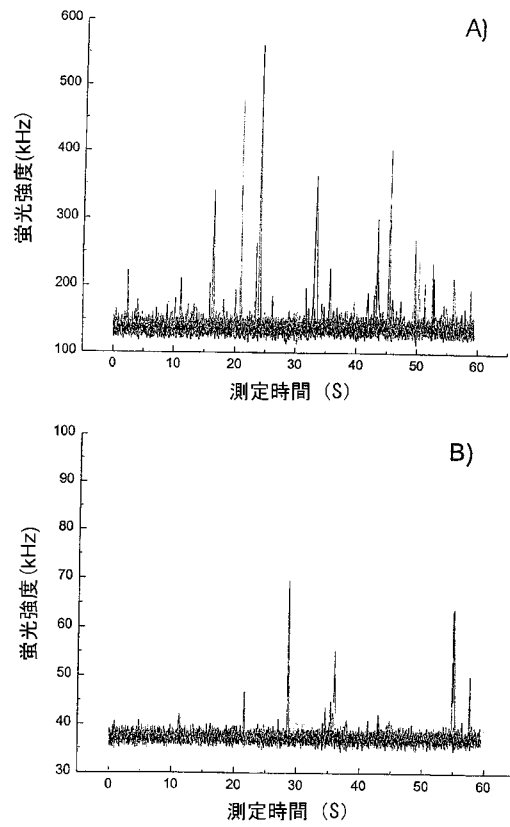
【図 11】



【図 12】



【図 13】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 198 18 917.6
(32)優先日 平成10年4月28日(1998.4.28)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

前置審査

- (72)発明者 シェーファー オリバー
ドイツ連邦国、エッセン D - 4 5 2 3 9、キンメスカンプヴェグ 3 0
(72)発明者 ピシュケ マルティン
ドイツ連邦国、ベルベルト D - 4 2 5 5 3、コンラード - アデナウアー - シュトラーセ 3 8
(72)発明者 アイゲン マンフレッド
ドイツ連邦国、ゲッチンゲン D - 3 7 0 7 5、ゲオルグ - デハイオ - ヴェグ 1 4
(72)発明者 ビーシュケ ヤン
ドイツ連邦国、ゲッチンゲン D - 3 7 0 8 1、ケーニヒサリー 3 4

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特表平06 - 510761 (JP, A)
国際公開第96 / 007096 (WO, A1)
国際公開第94 / 016313 (WO, A1)
国際公開第95 / 020979 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
PubMed