

(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  
2011年8月4日(04.08.2011)

(10) 国際公開番号  
WO 2011/092796 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/007546
- (22) 国際出願日: 2010年12月27日(27.12.2010)
- (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 2010-016559 2010年1月28日(28.01.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): パナソニック株式会社 (PANASONIC CORPORATION) [JP/JP]; 〒5718501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 南條 俊文 (NANJOH, Toshifumi). 福原 崇臣 (FUKUHARA, Takaomi).
- (74) 代理人: 特許業務法人 有古特許事務所 (PATENT CORPORATE BODY ARCO PATENT OFFICE); 〒6500031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 Hyogo (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, 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, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

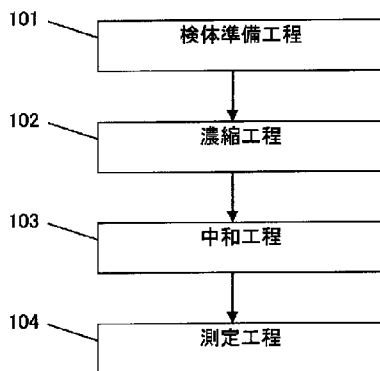
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: AMYLOID B MEASUREMENT METHOD

(54) 発明の名称: アミロイドβ測定方法

[図11]



- 101 sample preparation step
- 102 concentration step
- 103 neutralization step
- 104 measurement step

(57) Abstract: Provided is an amyloid β (Aβ) measurement method with which it is possible to accurately measure Aβ concentration even in a sample containing Aβ at an extremely low concentration (at the level of several pM). The Aβ measurement method comprises: a sample preparation step (101) for introducing a sample that possibly contains Aβ into a sample treatment vessel; a concentration step (102) for adding a solubilizer, which solubilizes Aβ, to the sample in the sample treatment vessel and reducing the amount of solvent contained in the sample; a neutralization step (103) for neutralizing the solubilizer in the sample treatment solution obtained by the concentration step; and a measurement step (104) for assaying the Aβ possibly contained in the neutralized sample treatment solution on the basis of antigen-antibody reaction.

(57) 要約: Aβを極低濃度(数pM程度)で含有する検体においても、Aβ濃度を正確に測定できるAβ測定方法を提供する。本発明のアミロイドβ測定方法は、アミロイドβを含む可能性がある検体を検体処理容器に入れる検体準備工程101と、前記検体処理容器中の前記検体に、アミロイドβを可溶化する可溶化剤を添加して、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する濃縮工程102と、前記濃縮工程で得られた検体処理液中の前記可溶化剤を中和する中和工程

103と、前記中和された検体処理液に含まれる可能性があるアミロイドβを抗原抗体反応に基づいて定量する測定工程104と、を含む。



WO 2011/092796 A1

## 明 細 書

**発明の名称**：アミロイド $\beta$ 測定方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、アミロイド $\beta$ （以降 $A\beta$ として説明する）の高感度測定方法に関する。

### 背景技術

[0002] アルツハイマー病は、初老期から老年期に起こる進行性の痴呆（認知症）を特徴とする疾患である。現在、国内の患者数は100万人以上と言われている。今後、人口の高齢化に伴い、その数は確実に増加すると予想される。アルツハイマー病の臨床症状は、記憶障害、高次脳機能障害（失語、失行、失認、構成失行）等である。それらの症状は他の痴呆疾患でも共通して見られることが多く、臨床症状だけでアルツハイマー病と確定診断することは極めて困難である。

[0003] アルツハイマー病はこれまで根本治療法がなかったが、1999年にワクチン療法がモデルマウスで成功して以来、根本治療法開発への期待が高まっている（非特許文献1を参照）。これら根本治療法を有効に活用するためには、早期にアルツハイマー病を診断する必要がある。

[0004] アルツハイマー病の特徴的な病理組織所見としては、脳組織における老人斑と神経原線維変化がある。前者の主構成成分は $\beta$ シート構造をとった $A\beta$ の凝集体であり、後者のそれは過剰にリン酸化されたタウ蛋白である。現在、アルツハイマー病の発症に関しては、 $A\beta$ が蓄積することが最初におこる病理変化である、というアミロイド仮説が有力である（非特許文献2を参照）。すなわち、アルツハイマー病においては、臨床症状が発症する前から、脳内では $A\beta$ が蓄積する等の上記病理的組織変化が進行することが知られている。したがって、脳内の $A\beta$ ペプチドをマーカーとして検出することが、 $A\beta$ が蓄積する疾患、特にアルツハイマー病の早期診断方法の1つとなる。

[0005] アルツハイマー病の体外診断薬としては、 $A\beta$ に対する特異抗体を用いた

ELISA法を原理としたものが広く用いられている。ELISA法によれば、脳脊髄液では、アルツハイマー病の進行に伴い、42個のアミノ酸からなるA $\beta$  (A $\beta$  42) が減少することがほぼ確立されている（非特許文献3を参照）。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1: Schenk D, Seubert P et al., Nature 400: 173-177, 1999.

非特許文献2: Hardy JA, Selkose DF, Science 297: 353-356, 2002.

非特許文献3: Hansson O, Mithon L et al., Lancet Neurol 5: 228-234, 2006.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、例えば生体組織を洗浄して得られる洗浄液のような、A $\beta$ を極低濃度（例えば数pM程度）で含有する物質を検体として、前述のELISA法等の抗原抗体反応に基づいた定量測定を実施すると、極低濃度であるが故に正確な測定ができないという課題があった。

[0008] 本発明は、前記課題を解決するもので、たとえA $\beta$ を数pM程度という極低濃度で含有する検体においても、A $\beta$ 濃度を正確に測定できるA $\beta$ 測定方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 前記課題を解決するために、本発明は、アミロイド $\beta$ を含む可能性がある検体を検体処理容器に入れる検体準備工程と、前記検体処理容器中の前記検体に、アミロイド $\beta$ を可溶化する可溶化剤を添加して、濃縮操作により、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する濃縮工程と、前記濃縮工程で得られた検体処理液中の前記可溶化剤を中和する中和工程と、前記中和された検体処

理液に含まれる可能性があるアミロイド $\beta$ を抗原抗体反応に基づいて定量する測定工程と、を含む、アミロイド $\beta$ 測定方法に関する。

- [0010] また、本発明は、アミロイド $\beta$ に付着させるための添加剤を検体処理容器に入れる検体処理容器準備工程と、アミロイド $\beta$ を含む可能性がある検体を前記検体処理容器に入れる検体準備工程と、前記検体処理容器内の前記検体を濃縮する第一濃縮工程と、前記第一濃縮工程により濃縮された検体に、アミロイド $\beta$ を可溶化する可溶化剤を添加して、濃縮操作により、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する第二濃縮工程と、前記第二濃縮工程で得られた検体処理液中の前記可溶化剤を中和する中和工程と、前記中和された検体処理液に含まれる可能性があるアミロイド $\beta$ を抗原抗体反応に基づいて定量する測定工程と、を含む、アミロイド $\beta$ 測定方法に関する。

### 発明の効果

- [0011] 本発明のアミロイド $\beta$ 測定方法によれば、たとえA $\beta$ を極低濃度（例えば数pM程度）で含有する検体においても、A $\beta$ 濃度を正確に測定することができる。

### 図面の簡単な説明

- [0012] [図1]実施例1の各手順を示すフローチャート  
[図2]実施例1で測定されたA $\beta$ 濃度の結果を示すグラフ  
[図3]実施例2の各手順を示すフローチャート  
[図4]実施例2で測定されたA $\beta$ 濃度の結果を示すグラフ  
[図5]実施例3の各手順を示すフローチャート  
[図6]実施例3によって得られたA $\beta$ 回収率の結果を示すグラフ  
[図7]実施例4の各手順を示すフローチャート  
[図8]実施例4によって得られたA $\beta$ 回収率の結果を示すグラフ  
[図9]参考例の各手順を示すフローチャート  
[図10]参考例によって得られたA $\beta$ 回収率の結果を示すグラフ  
[図11]本発明の第一実施形態によるA $\beta$ 測定方法の各手順を示すフローチャート

[図12]本発明の第二実施形態によるA $\beta$ 測定方法の各手順を示すフローチャート

[図13]可溶化剤の有無の差によるA $\beta$ 回収率の差を示すグラフ

### 発明を実施するための形態

[0013] 本発明のA $\beta$ 測定方法におけるA $\beta$ は凝集性及び吸着性の高い物質である。これは、A $\beta$ を構成するアミノ酸の多くが疎水性の高いアミノ酸からなることによる。

[0014] 「凝集性が高い」とは、A $\beta$ 自身が会合して凝集しやすい性質を意味する。ここで、凝集しておらず1分子で遊離しているA $\beta$ を、A $\beta$ モノマーという。また、2分子以上のA $\beta$ が凝集しているが、生理食塩水中等の水溶液に溶解可能なA $\beta$ を、可溶性A $\beta$ 多量体もしくは可溶性A $\beta$ オリゴマー（以下、可溶性A $\beta$ オリゴマーと総称する）という。さらに、前記可溶性A $\beta$ オリゴマーの状態から凝集が進み、前記水溶液に不溶性のA $\beta$ を、不溶性A $\beta$ 多量体もしくは不溶性A $\beta$ ポリマー（以下、不溶性A $\beta$ ポリマーと総称する）という。一般的に、疎水性の強いA $\beta$ は水溶液中で凝集物として存在するほうが安定であることが、凝集性が高い理由である。

[0015] 「吸着性が高い」とは、A $\beta$ がA $\beta$ 以外の物質に吸着されやすい性質を意味する。A $\beta$ 以外の物質とは、例えば、容器表面である。あるいは、生体組織である。いずれの場合も、A $\beta$ 以外の物質の疎水性領域とA $\beta$ の疎水性領域との疎水相互作用が一つの原因であると考えられる。

[0016] A $\beta$ モノマーにおいて、とくに重要なのが、42個のアミノ酸からなるA $\beta$ モノマー（これをA $\beta$ 42という）と、40個のアミノ酸からなるA $\beta$ モノマー（これをA $\beta$ 40という）である。脳組織におけるアルツハイマー病の特徴的な現象として知られる老人斑の形成には、前記A $\beta$ 42とA $\beta$ 40の凝集性および吸着性が起因していると考えられている。現在、実際の臨床現場では、髄液中のA $\beta$ 42とA $\beta$ 40が測定指標とされている。A $\beta$ 42とA $\beta$ 40とを比較すると、相対的にA $\beta$ 42の方が凝集性及び吸着性ともに強い。本発明では、特に断りのない限り、「A $\beta$ 」は、A $\beta$ モノマー、可

溶性A $\beta$ オリゴマー、及び不溶性A $\beta$ ポリマーを総称して示す。また、特に断りのない限り「A $\beta$ モノマー」は、A $\beta$ 42とA $\beta$ 40を示す。

[0017] 本発明のA $\beta$ 測定方法における検体とは、アルツハイマー病患者又はアルツハイマー病が疑われる被験者から採取した体液（例えば、脳脊髄液、血清、涙、鼻汁、唾液など）である。または、綿棒やスワブ等の採取具で前記被験者の鼻粘膜から鼻粘液を採取することで得られる鼻汁や鼻腔内粘膜擦過物である。あるいは、前記検体とは、前記A $\beta$ が凝集又は吸着している可能性がある生体組織（例えば脳組織や粘膜等）を生理食塩水等で洗浄して得られる洗浄液である。

[0018] 本発明では、綿棒やスワブ等の採取具で前記被験者の鼻粘膜から鼻粘液を採取することで得られる鼻汁や鼻腔内粘膜擦過物を検体とすることができる。これは、鼻粘膜周辺の組織に脳内のA $\beta$ が蓄積される傾向が見られるためである。具体的には、スワブや、綿棒（例えば、栄研化学社製の $\gamma$ 滅菌アルミ）を使用して採取することができる。スワブや綿棒等を鼻粘膜に擦りつけることにより鼻粘液を採取し、その採取された鼻粘液そのもの、又は、その綿棒から鼻粘液を所定の抽出液で抽出したものを検体とすることができる。ここで、所定の抽出液としては、生理食塩水、界面活性剤等を含む溶液、有機溶媒等が挙げられる。

[0019] 本発明では、特に、鼻粘膜を生理食塩水等で洗浄して得られた洗浄液を検体とすることができる。これは、鼻粘膜周辺の組織に脳内のA $\beta$ が蓄積される傾向が見られるためである。具体的には、一般的に販売される鼻洗浄機器を使用して前記洗浄液を採取することができる。例えば、泉精器製作所で生産販売されている鼻洗浄器（商品名：INC-7000、INC-7200、INC-7001）を用いて、一方の鼻穴から生理食塩水を注入し、他方の鼻穴から洗浄後の生理食塩水を受ける。このようにして、鼻洗浄後に得られた液体を全て採取し、これを本発明における検体とすることができる。尚、鼻腔内に投入して使用する洗浄用液体は、生体適合性のある液体であればよく、生理食塩水に限定されない。

- [0020] 本発明のA $\beta$ 測定方法が対象とする検体中のA $\beta$ の量は、極めて微量であってよい。A $\beta$ は粘膜等の生体組織に対して強く凝集又は吸着されているので、先に説明したスワブや綿棒で鼻粘液を採取する場合、当該採取具を鼻粘膜に強く複数回擦りつけることが必要になる。しかし、こうして得られる鼻粘液中のA $\beta$ は微量であるため、抽出液で抽出すると、検体中のA $\beta$ 濃度はさらに低くなる。また、先に説明した鼻洗浄を行う場合には、少量の生理食塩水ではA $\beta$ を取り出し難いので、大容量の生理食塩水を用いて鼻洗浄を行なうことが必要になる。そのため、得られた検体中のA $\beta$ 濃度は、極めて低い。
- [0021] 粘膜等の生体組織に含まれるA $\beta$ は、大部分が可溶性A $\beta$ オリゴマー、または不溶性A $\beta$ ポリマーであり、A $\beta$ モノマーは極めて微量である。このため、例えば和光純薬社より製造販売されているA $\beta$ モノマー定量用キットを用いて鼻粘液及び鼻洗浄液について直接ELISA測定を行うと、A $\beta$ の存在を確認することができなかった。そこで、測定時の濃度が所定の濃度（A $\beta$ 40は50 pM、A $\beta$ 42は10 pM）となるよう調製した検体を作製して、減圧濃縮した後に、この検体についてELISAで測定を行なった。すると、非常にわずかであるが、A $\beta$ の存在を確認することができた。従って、鼻粘液及び鼻洗浄液に含まれるA $\beta$ 40モノマー濃度は50 pM未満、A $\beta$ 42モノマー濃度は10 pM未満と、極めて低いと思われる。
- [0022] A $\beta$ は主に脳組織に蓄積されるが、その他の体細胞、あるいは、例えば血液、髄液、鼻水等の体液にも、極微量のA $\beta$ が分泌される。しかし、例えば、鼻粘膜から検体を採取するには、スワブや綿棒を鼻粘膜に擦りつける、または、鼻粘膜を洗浄用液体で洗浄する。スワブや綿棒で採取する場合、採取された鼻粘液を抽出液に抽出することが好ましい。また、鼻洗浄で採取する場合、大量の洗浄用液体を用いて洗浄することが好ましい。そのため、検体中のA $\beta$ 濃度が低下することになる。したがって測定を行なう前に、検体を濃縮操作に付して検体中のA $\beta$ 濃度を高めることが必要になる。
- [0023] 濃縮操作は、一般に減圧濃縮を用いることができる。本発明者らは、濃縮

工程に着目し、その条件や方法を様々に変えて実験を繰り返した。鋭意研究を重ねた結果、濃縮工程では、検体に含まれる溶媒が蒸発して検体中の溶媒量が減少するが、その過程で、検体中に含まれているA $\beta$ 40あるいはA $\beta$ 42のモノマー同士が凝集して、その凝集物が多量に生成することを解明した。すなわち、検体を直接濃縮工程に付すると、検体中のA $\beta$ 40又はA $\beta$ 42のモノマー同士が凝集し強固な凝集物を作るため、検体中のA $\beta$ 40又はA $\beta$ 42のモノマー量が激減し、その結果、ELISA法におけるA $\beta$ の測定値が低下することが判明した。

[0024] そこで、本発明者らは、濃縮工程でのモノマー同士の凝集を防ぐため、検体中にギ酸等の可溶化剤を添加してから濃縮工程を実施したところ、飛躍的にA $\beta$ の測定感度が向上することを見出した。その結果を、図13に示す。先に示した標準物質を所定の濃度に調整し、さらにギ酸を入れてから濃縮を行なった検体では、ギ酸を入れずに濃縮を行なった検体と比較して、約26倍から28倍のA $\beta$ の測定値が得られた。これにより、ギ酸等の可溶化剤を添加して濃縮工程を実施することにより、添加せずに直接濃縮工程を実施する場合と比較して、極めて高感度にA $\beta$ の測定を行うことができることが判明した。

[0025] 本発明のA $\beta$ 測定方法は、アミロイド $\beta$ を含む可能性がある検体を検体処理容器に入れる検体準備工程と、前記検体処理容器中の前記検体に、アミロイド $\beta$ を可溶化する可溶化剤を添加して、濃縮操作により、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する濃縮工程と、前記濃縮工程で得られた検体処理液中の前記可溶化剤を中和する中和工程と、前記中和された検体処理液に含まれる可能性があるアミロイド $\beta$ を抗原抗体反応に基づいて定量する測定工程とを含む。以上の工程を含むことにより、検体中に含まれるA $\beta$ を測定前に可溶化するとともに、可溶化により形成されたA $\beta$ モノマーが濃縮工程を経ても保持されるため、A $\beta$ 定量測定をより正確に行うことが可能になる。

[0026] 本発明のA $\beta$ 測定方法において、検体を検体処理容器に入れる前に、A $\beta$ に付着させるための添加剤を検体処理容器に入れることが好ましい。これに

より、添加剤がA $\beta$ に付着して、A $\beta$ 同士の凝集を抑制することができる。

[0027] また、本発明において、鼻洗浄液のように大容量の検体を測定対象とする場合には、前記濃縮工程の前に事前濃縮工程を実施することが有効である。すなわち、本発明は、前記濃縮工程（第二濃縮工程）の前に、前記検体処理容器内の前記検体を濃縮する事前濃縮工程（第一濃縮工程）を含むことが好ましい。これにより、次の濃縮工程（第二濃縮工程）を効率よく実施することが可能となる。

[0028] さらに、本発明は、前記検体準備工程で使用する検体処理容器に、予め、A $\beta$ に付着させるための添加剤を入れる検体処理容器準備工程を含むことが好ましい。これにより、A $\beta$ の回収率を向上させることができ、A $\beta$ 定量測定をさらに正確に行うことが可能になる。特に、前述した事前濃縮工程を実施する場合には、A $\beta$ に付着させるための添加剤を検体処理容器に予め入れておくことで、事前濃縮工程でA $\beta$ の不溶化が進行するのを防止することが可能になるので、A $\beta$ 定量測定をさらに正確に行うことが可能になる。

[0029] 本発明のA $\beta$ 測定方法は、アミロイド $\beta$ に付着させるための添加剤を検体処理容器に入れる検体処理容器準備工程と、アミロイド $\beta$ を含む可能性がある検体を前記検体処理容器に入れる検体準備工程と、前記検体処理容器内の前記検体を濃縮する第一濃縮工程と、前記第一濃縮工程により濃縮された検体にアミロイド $\beta$ を可溶化する可溶化剤を添加して、濃縮操作により、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する第二濃縮工程と、前記第二濃縮工程で得られた検体処理液中の前記可溶化剤を中和する中和工程と、前記中和された検体処理液に含まれる可能性があるアミロイド $\beta$ を抗原抗体反応に基づいて定量する測定工程と、を含む。

[0030] （第一実施形態）

以下では、本発明の第一実施形態における各工程の詳細を図11に沿って説明する。

[0031] 本発明のA $\beta$ 測定における検体準備工程101では、A $\beta$ を含む可能性のある検体を検体処理容器へ入れる。

- [0032] 本発明のA $\beta$ 測定方法において使用する検体処理容器は、容器の内壁表面に対するA $\beta$ の吸着を抑制してA $\beta$ の回収率を向上させるため、A $\beta$ の吸着を抑制する物性を有する内壁表面を有するものが好ましい。具体的には、内壁表面が、疎水性でない容器が好ましい。例えば、一般的にガラス製の容器が良い。あるいは、内壁表面にシリコン等で親水処理が施された容器であってもよい。前記容器を用いることにより、疎水性が高いA $\beta$ モノマーと容器内壁との疎水相互作用を低減し、その結果、容器の内壁表面へのA $\beta$ モノマーの吸着を抑制することができる。このため、A $\beta$ の回収率を向上させることができる。
- [0033] また、ブロッキング剤を用いることにより、さらに容器内壁に対するA $\beta$ モノマーの吸着を抑制することができる。ブロッキング剤とは、A $\beta$ モノマーと反応又は結合しないタンパク質や化合物を含む試薬の総称である。具体的には、牛血清アルブミン（BSA）やスキムミルク、カゼイン、界面活性剤等が挙げられる。これらが容器の内壁表面と相互作用することにより、検体中に低濃度に存在するA $\beta$ が内壁表面に吸着するのを相対的に阻止することができる。ブロッキング剤は、通常、0.01%w/v~5%w/vの濃度で使用され、粘性等が問題になる場合は、0.01%w/v~0.5%w/vの濃度で使用される。
- [0034] ブロッキング剤を使用する場合、検体を容器に入れた際に、ブロッキング剤が容器内に存在していればよい。具体的には、ブロッキング剤を含む溶液が漏れない状態で容器に封入されており、この容器に、検体を投入する。あるいは、再溶解可能な乾燥状態でブロッキング剤が容器に保持されており、この容器に、液状の検体を投入する。別の形態としては、予め、ブロッキング剤を含む溶液を容器の内壁表面に接触させておくことで、内壁表面にブロッキング剤を吸着固定させておいてもよい。また、別の形態としては、検体を容器に添加した後に、ブロッキング剤又はブロッキング剤を含む溶液を添加してもよい。尚、ブロッキング剤を溶解する溶液は、通常、緩衝液である。例えば、リン酸緩衝液やトリス緩衝液等である。ブロッキング剤を使用す

ると、 $A\beta$ の回収率がさらに向上するため好ましいが、使用を省略することは可能である。

[0035] 本発明で使用する検体処理容器の容量やその形状は特に限定されない。検体を保持できる容量であればよく、任意に設定すればよい。例えば、1 mLから2 mLまでの容量の容器としてはエッペンドルフのチューブ、50 mL以下の容器としてはコーニングのチューブ、1000 mL以下の容器としてはビーカーやフラスコを使用できる。また、形状についても、後に続く処理方法に合わせて、任意に選択すればよい。ここで処理方法とは通常の生化学の実験又は検査で使用されるもので、遠心分離等の方法である。尚、前記エッペンドルフのチューブやコーニングのチューブは、よく使用される遠心分離機のローターに合わせた形状になっている場合が多い。

[0036] 次いで、検体処理容器中の検体に対し、 $A\beta$ を可溶化する可溶化剤を添加して、得られた混合物を濃縮操作に付すことにより、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する濃縮工程102を行う。濃縮工程102では、検体中に含まれる可能性のある $A\beta$ オリゴマーを可溶化剤により処理することで、 $A\beta$ モノマーに変換する。抗体抗原反応に基づいた $A\beta$ 測定は $A\beta$ モノマーに対する感度が高いため、可溶化剤を用いた処理により予め検体中の $A\beta$ を $A\beta$ モノマーに変換し、これを測定対象とすることで、より正確な定量測定が可能になる。更に、検体に含まれる溶媒量を低減することで、検体中の $A\beta$ 濃度が高くなり、より高感度な測定が可能になる。

[0037] 可溶化剤としては、ギ酸を用いることができる。ギ酸は、一般的に、動物やヒトの組織に凝集又は吸着されているタンパク質を可溶化させ、組織から分離するために用いられている。しかし、本発明者らは、生体組織を含まない液体中に分散している可溶性 $A\beta$ オリゴマーに対してギ酸を作用させると、可溶性 $A\beta$ オリゴマーが解きほぐされ、 $A\beta$ モノマーとなることを見出した。ギ酸は検体に添加した際に、ギ酸濃度が70%以上となるものを使用することが好ましい。可溶性 $A\beta$ オリゴマーが $A\beta$ モノマーとなるメカニズムについては不明であるが、おそらく、液体中では、可溶性オリゴマーの一部

は、可逆的にA $\beta$ モノマーに極一部乖離しており、その中で、ギ酸がA $\beta$ モノマーの安定化に寄与しているものと推測される。

[0038] 本発明では、可溶化剤はギ酸に限定されない。可溶化剤としては、可溶性A $\beta$ オリゴマーをA $\beta$ モノマーに変換する能力を有する有機酸を用いることができる。そのような有機酸としては、カルボキシル基又はスルホ基を有する有機酸が挙げられる。具体的には、ギ酸の他、酢酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。可溶化剤は1種類のみを使用してもよいし、2種類以上を併用してもよい。

[0039] 濃縮工程102で使用する可溶化剤は、ギ酸と共に、二重結合、三重結合又は共役結合を持つ化合物（例えば、s-アリル- $\gamma$ -システイン（以降、SACと略す））を含むことが好ましい。これにより、A $\beta$ の回収率をさらに向上させることができる。

[0040] 濃縮工程102で濃縮する方法としては、減圧濃縮法が適用できる。本発明のA $\beta$ 測定方法における濃縮工程102では、A $\beta$ を不溶化させることなく検体を濃縮することが好ましい。検体中にはA $\beta$ モノマーや可溶性オリゴマーが含まれている。濃縮に伴って、前記A $\beta$ モノマーや可溶性オリゴマーの凝集が進行して、不溶性A $\beta$ ポリマーが形成されることで、A $\beta$ からなる固相が析出することを、A $\beta$ が不溶化するという。本発明においてA $\beta$ を不溶化させずに検体を濃縮するとは、検体を乾固させることなく濃縮すること、又は、可溶化剤として添加されたギ酸を中和せずに濃縮することで検体中の不溶性A $\beta$ ポリマー量（すなわちA $\beta$ からなる固相量）が濃縮に伴って実質上増加することがないようにすることである。濃縮工程102は検体中のA $\beta$ 濃度を向上させることを目的に行うが、不溶性A $\beta$ ポリマーが増加しないように濃縮するため、可溶化剤添加により得られたA $\beta$ モノマーがそのまま保持されることになり、正確なA $\beta$ の定量測定が可能になる。

[0041] 上述したような検体を乾固させずに濃縮するには、濃縮工程における溶媒

の低減量を調整すればよい。溶媒の低減量が多すぎると検体が乾固するので、低減量を抑制する。ここで、検体が乾固するとは、検体に含まれる溶媒量が相対的に少なくなり、検体全体として流動性がなくなり、固化することを意味する。従って、検体を乾固させずに濃縮するには、液状の検体はその流動性を維持している状態で、濃縮工程を終了すればよい。濃縮工程で検体が乾固すると、 $A\beta$ モノマーや可溶性オリゴマーが凝集するため、後の実施例3で示すように、 $A\beta$ の測定感度が低下する。そのため、第一実施形態の濃縮工程では、検体が乾固しない程度に、検体に含まれる溶媒の量を低減することが好ましく、これにより、 $A\beta$ の測定感度を著しく向上させることができる。

[0042] 次に、濃縮工程102で得られた検体処理液に対し中和剤を添加して、検体処理液に含まれている可溶化剤を中和する中和工程103を行う。濃縮工程102において、可溶化剤としてギ酸等の有機酸を用いた場合、検体処理液の酸性が強いため、その後続く測定工程104のために、中和を行う必要がある。

[0043] 中和剤としては、例えば1Mのトリスを所定量添加することでギ酸を中和することができる。

[0044] 次に、中和工程103により中和された検体処理液を、抗原抗体反応に基づいて $A\beta$ を定量する測定工程104に付する。本発明の $A\beta$ 測定方法における測定工程103では、抗原抗体反応に基づく免疫測定法を利用する。鼻洗浄液等の検体には、測定対象とする $A\beta$ 以外にも、多くのタンパク質や夾雑物が含まれる。その検体から測定対象の $A\beta$ のみを測定するには、 $A\beta$ と特異的に反応する物質を用いるのが好ましい。したがって、免疫測定法を利用する。免疫測定法とは、免疫反応である抗原抗体反応を利用する測定法で、測定すべき物質の抗体を人為的に作製することができるので、測定原理として幅広く適用されている。実際に、和光純薬から $A\beta$ 測定キットが販売されている。しかし、このような市販の $A\beta$ 測定キットを用いただけでは、検体に $A\beta$ が低濃度で含まれている場合、正確な $A\beta$ 定量ができない。本発

明によれば、上述した可溶化剤存在下での濃縮工程を行うことにより、極低濃度で $A\beta$ を含む検体であっても、正確な $A\beta$ 定量が可能になる。

[0045] 測定工程104では定量測定を目的とするので、濃縮工程102では、その濃縮量（濃縮後の液量）を一定に制御することが好ましい。濃縮量の制御は、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の、水系媒体と共沸しない沸点の高い媒体を検体処理液に入れることで容易に実施できる。この場合、当該高沸点媒体の添加量を一定量に調整しておくこと、水分蒸発を利用した濃縮により水系媒体のみが蒸発していき、DMSO等の高沸点媒体が残留するため、安定して一定の濃縮量が得られる。

[0046] あるいは、光計測により濃縮量を制御することができる。即ち、容器の所定の位置に光を照射しておき、濃縮の過程において検体処理液のメニスカスが所定の位置に移動したときの光の散乱信号を検出した時点で濃縮を停止する。

[0047] あるいは、電気化学的に残量を検知することにより濃縮量を制御することができる。即ち、容器の所定の位置に電極対を設けておき、濃縮の過程において所定の位置にある電極対を検体液のメニスカスが超えることで電流が流れなくなった時点で濃縮を停止する。

[0048] あるいは、揮発した溶液の容量を計測し残量計算する手段を設けることにより濃縮量を制御することができる。あるいは、濃縮液の重さを利用して一定量の濃縮量を達成する手段を設けることによる制御も可能である。例えば圧電素子を容器に付随させておき、それにより質量変化量を計測する。

[0049] 以上説明した工程101-104をすべて含む第一実施形態の測定方法は、特に綿棒やスワブ等の採取具で鼻粘膜から鼻粘液を採取して得られた検体を用いる場合に有効である。なぜなら、鼻粘液が検体である場合は、検体の容量が少ないため、検体に直接可溶化剤を添加して濃縮することができるからである。

[0050] （第二実施形態）

以下では、本発明の第二実施形態における各工程の詳細を図12に沿って

説明する。

- [0051] 本発明のA $\beta$ 測定における検体処理容器準備工程111では、A $\beta$ に付着させるための添加剤を検体処理容器に入れる。本発明者らは、A $\beta$ モノマーおよび可溶性A $\beta$ オリゴマーに対して前記添加剤を作用させると、A $\beta$ モノマーおよび可溶性オリゴマー同士の凝集が抑制されることを見出した。添加剤とは、例えば、ギ酸である。使用するギ酸は、可溶性A $\beta$ オリゴマーをA $\beta$ モノマーに変換する能力を有する必要はないため、ギ酸の濃度は70%未満でよい。
- [0052] 本発明では、添加剤はギ酸に限定されない。添加剤としては、A $\beta$ モノマーおよび可溶性オリゴマー同士の凝集を抑制する能力を有する有機酸を用いることができる。そのような有機酸としては、カルボキシル基又はスルホ基を有する有機酸が挙げられる。具体的には、ギ酸の他、酢酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。添加剤は1種類のみを使用してもよいし、2種類以上を併用してもよい。
- [0053] 検体処理容器準備工程111で使用する添加剤は、ギ酸と共に、二重結合、三重結合又は共役結合を持つ化合物（例えば、s-アリル- $\alpha$ -システイン（以降、SACと略す））を含むことが好ましい。これにより、A $\beta$ の回収率をさらに向上させることができる。
- [0054] 検体処理容器準備工程111は、添加剤を検体処理容器に入れるものであり、これによりA $\beta$ の回収率を向上させることができるため、A $\beta$ 定量測定をさらに正確に行うことが可能になる。しかし、添加剤を検体処理容器に予め入れておくことは本発明で必須ではなく、添加剤が入っていない検体処理容器を使用して検体準備工程112を実施し、その後、添加剤を添加してもよい。
- [0055] 本発明のA $\beta$ 測定方法において使用する検体処理容器は、容器の内壁表面に対するA $\beta$ の吸着を抑制してA $\beta$ の回収率を向上させるため、A $\beta$ の吸着

を抑制する物性を有する内壁表面を有するものが好ましい。具体的には、内壁表面が、疎水性でない容器が好ましい。例えば、一般的にガラス製の容器が良い。あるいは、内壁表面にシリコン等で親水処理が施された容器であってもよい。前記容器を用いることにより、疎水性が高いA $\beta$ モノマーと容器内壁との疎水相互作用を低減し、その結果、容器の内壁表面へのA $\beta$ モノマーの吸着を抑制することができる。このため、A $\beta$ の回収率を向上させることができる。

[0056] また、ブロッキング剤を用いることにより、さらに容器内壁に対するA $\beta$ モノマーの吸着を抑制することができる。ブロッキング剤とは、A $\beta$ モノマーと反応又は結合しないタンパク質や化合物を含む試薬の総称である。具体的には、牛血清アルブミン(BSA)やスキムミルク、カゼイン、界面活性剤等が挙げられる。これらが容器の内壁表面と相互作用することにより、検体中に低濃度に存在するA $\beta$ が内壁表面に吸着するのを相対的に阻止することができる。ブロッキング剤は、通常、0.01%w/v~5%w/vの濃度で使用され、粘性等が問題になる場合は、0.01%w/v~0.5%w/vの濃度で使用される。

[0057] ブロッキング剤を使用する場合、検体を容器に入れた際に、ブロッキング剤が容器内に存在していればよい。具体的には、ブロッキング剤を含む溶液が漏れない状態で容器に封入されており、この容器に、検体を投入する。あるいは、再溶解可能な乾燥状態でブロッキング剤が容器に保持されており、この容器に、液状の検体を投入する。別の形態としては、予め、ブロッキング剤を含む溶液を容器の内壁表面に接触させておくことで、内壁表面にブロッキング剤を吸着固定させておいてもよい。また、別の形態としては、検体を容器に添加した後に、ブロッキング剤又はブロッキング剤を含む溶液を添加してもよい。尚、ブロッキング剤を溶解する溶液は、通常、緩衝液である。例えば、リン酸緩衝液やトリス緩衝液等である。ブロッキング剤を使用すると、A $\beta$ の回収率がさらに向上するため好ましいが、使用を省略することは可能である。

- [0058] 本発明で使用する検体処理容器の容量やその形状は特に限定されない。検体を保持できる容量であればよく、任意に設定すればよい。例えば、1 mL から 2 mL までの容量の容器としてはエッペンドルフのチューブ、50 mL 以下の容器としてはコーニングのチューブ、1000 mL 以下の容器としてはビーカーやフラスコを使用できる。また、形状についても、後に続く処理方法に合わせて、任意に選択すればよい。ここで処理方法とは通常の生化学の実験又は検査で使用されるもので、遠心分離等の方法である。尚、前記エッペンドルフのチューブやコーニングのチューブは、よく使用される遠心分離機のローターに合わせた形状になっている場合が多い。
- [0059] 次に、準備した検体処理容器に対し、検体を入れる検体準備工程 112 を行う。
- [0060] 次いで、検体処理容器中の検体を濃縮する第一濃縮工程 113 を行う。第一濃縮工程 113 は、検体中の A $\beta$  濃度を上昇させることで、後の A $\beta$  測定を容易にするとともに、次の可溶化を効率よく実施することを可能とする。第一濃縮工程 113 を行う場合には、A $\beta$  を可溶化させるための添加剤を検体処理容器に予め入れておく検体処理容器準備工程 111 を行うことが好ましい。これにより、第一濃縮工程 113 で A $\beta$  の不溶化が進行するのを防止することができる。この第一濃縮工程 113 においては、後の参考例で示すように、試料を乾固させることなく濃縮を行う。
- [0061] 次いで、第一濃縮工程により濃縮された検体処理容器中の検体に対し、A $\beta$  を可溶化する可溶化剤を添加して、得られた混合物を 2 回目の濃縮操作に付すことにより、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する第二濃縮工程 114 を行う。第二濃縮工程 114 では、検体中に含まれる可能性のある A $\beta$  オリゴマーを可溶化剤により処理することで、A $\beta$  モノマーに変換する。抗体抗原反応に基づいた A $\beta$  測定は A $\beta$  モノマーに対する感度が高いため、可溶化剤を用いた処理により検体中の A $\beta$  を A $\beta$  モノマーに変換することで、より正確な定量測定が可能になる。更に、検体に含まれる溶媒量を低減することで、検体中の A $\beta$  濃度が高くなり、より高感度な測定が可能になる。

[0062] 可溶化剤としては、ギ酸を用いることができる。ギ酸は、一般的に、動物やヒトの組織に凝集又は吸着されているタンパク質を可溶化させ、組織から分離するために用いられている。しかし、本発明者らは、生体組織を含まない液体中に分散している可溶性A $\beta$ オリゴマーに対してギ酸を作用させると、可溶性A $\beta$ オリゴマーが解きほぐされ、A $\beta$ モノマーとなることを見出した。ギ酸は検体に添加した際に、ギ酸濃度が70%以上となるものを使用することが好ましい。可溶性A $\beta$ オリゴマーがA $\beta$ モノマーとなるメカニズムについては不明であるが、おそらく、液体中では、可溶性オリゴマーの一部は、可逆的にA $\beta$ モノマーに極一部乖離しており、その中で、ギ酸がA $\beta$ モノマーの安定化に寄与しているものと推測される。

[0063] 本発明では、可溶化剤はギ酸に限定されない。可溶化剤としては、可溶性A $\beta$ オリゴマーをA $\beta$ モノマーに変換する能力を有する有機酸を用いることができる。そのような有機酸としては、カルボキシル基又はスルホ基を有する有機酸が挙げられる。具体的には、ギ酸の他、酢酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。可溶化剤は1種類のみを使用してもよいし、2種類以上を併用してもよい。

[0064] 第二濃縮工程114で使用する可溶化剤は、ギ酸と共に、二重結合、三重結合又は共役結合を持つ化合物（例えば、s-アリル-L-システイン（以降、SACと略す））を含むことが好ましい。これにより、A $\beta$ の回収率をさらに向上させることができる。

[0065] 第二濃縮工程114で濃縮する方法としては、減圧濃縮法が適用できる。本発明のA $\beta$ 測定方法における第二濃縮工程114では、A $\beta$ を不溶化させることなく検体を濃縮することが好ましい。検体中にはA $\beta$ モノマーや可溶性オリゴマーが含まれている。濃縮に伴って、前記A $\beta$ モノマーや可溶性オリゴマーの凝集が進行して、不溶性A $\beta$ ポリマーが形成されることで、A $\beta$ からなる固相が析出することを、A $\beta$ が不溶化するという。本発明において

A $\beta$ を不溶化させずに検体を濃縮するとは、検体を乾固させることなく濃縮すること、又は、可溶化剤として添加されたギ酸を中和せずに濃縮することで検体中の不溶性A $\beta$ ポリマー量（すなわちA $\beta$ からなる固相量）が濃縮に伴って実質上増加することがないようにすることである。第二濃縮工程114は検体中のA $\beta$ 濃度を向上させることを目的に行うが、不溶性A $\beta$ ポリマーが増加しないように濃縮するため、可溶化剤添加により得られたA $\beta$ モノマーがそのまま保持されることになり、正確なA $\beta$ の定量測定が可能になる。

- [0066] 第二濃縮工程114の後に続く測定工程116では定量測定を目的とするので、第二濃縮工程114では、その濃縮量（濃縮後の液量）を一定に制御することが好ましい。濃縮量の制御は、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の、水系媒体と共沸しない沸点の高い媒体を検体処理液に入れることで容易に実施できる。この場合、当該高沸点媒体の添加量を一定量に調整しておくこと、水分蒸発を利用した濃縮により水系媒体のみが蒸発していき、DMSO等の高沸点媒体が残留するため、安定して一定の濃縮量が得られる。
- [0067] あるいは、光計測により濃縮量を制御することができる。即ち、容器の所定の位置に光を照射しておき、濃縮の過程において検体処理液のメニスカスが所定の位置に移動したときの光の散乱信号を検出した時点で濃縮を停止する。
- [0068] あるいは、電気化学的に残量を検知することにより濃縮量を制御することができる。即ち、容器の所定の位置に電極対を設けておき、濃縮の過程において所定の位置にある電極対を検体液のメニスカスが超えることで電流が流れなくなった時点で濃縮を停止する。
- [0069] あるいは、揮発した溶液の容量を計測し残量計算する手段を設けることにより濃縮量を制御することができる。あるいは、濃縮液の重さを利用して一定量の濃縮量を達成する手段を設けることによる制御も可能である。例えば圧電素子を容器に付随させておき、それにより質量変化量を計測する。

- [0070] 本発明のA $\beta$ 測定方法における濃縮工程において、検体が鼻洗浄液のような塩を含む溶液である場合、濃縮することで検体中の塩濃度が高くなり、次に例えば酵素免疫測定法により測定する際に、悪影響を及ぼすことがある。この場合、カラムや限外ろ過などを使用して検体の脱塩操作を行ったり、あらかじめ検体の液量を減らしたりしてから本発明を実施してもよい。
- [0071] 次に、第二濃縮工程114で得られた検体処理液に対し中和剤を添加して、検体処理液に含まれている可溶化剤を中和する中和工程115を行う。第二濃縮工程114において、可溶化剤としてギ酸等の有機酸を用いた場合、検体処理液の酸性が強いため、その後続く測定工程116のために、中和を行う必要がある。
- [0072] 中和剤としては、例えば1Mのトリスを所定量添加することでギ酸を中和することができる。
- [0073] 次に、中和工程115により中和された検体処理液を、抗原抗体反応に基づいてA $\beta$ を定量する測定工程116に付する。本発明のA $\beta$ 測定方法における測定工程116では、抗原抗体反応に基づく免疫測定法を利用する。鼻洗浄液等の検体には、測定対象とするA $\beta$ 以外にも、多くのタンパク質や夾雑物が含まれる。その検体から測定対象のA $\beta$ のみを測定するには、A $\beta$ と特異的に反応する物質を用いるのが好ましい。したがって、免疫測定法を利用する。免疫測定法とは、免疫反応である抗原抗体反応を利用する測定法で、測定すべき物質の抗体を人為的に作製することができるので、測定原理として幅広く適用されている。実際に、和光純薬からA $\beta$ 測定キットが販売されている。しかし、このような市販のA $\beta$ 測定キットを用いただけでは、検体にA $\beta$ が低濃度で含まれている場合、正確なA $\beta$ 定量ができない。本発明によれば、上述した可溶化剤存在下での濃縮工程を行うことにより、極低濃度でA $\beta$ を含む検体であっても、正確なA $\beta$ 定量が可能になる。
- [0074] 以上説明した工程111-116をすべて含む第二実施形態の測定方法は、特に鼻洗浄液など検体が大容量でA $\beta$ を極低濃度で含む場合に有効である。なぜなら、鼻洗浄液が検体である場合は、検体容量が多いため、検体に直

接可溶化剤を添加すると、液量が大量になってしまうからである。そのため、第一濃縮工程を実施して検体の液量を低減してから、可溶化剤を添加することが好ましい。

[0075] 本発明の対象とするA $\beta$ を測定するための免疫測定法としては、例えば、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法がある。これらの方法によると、酵素、蛍光性物質、化学発光反応性物質、又は電気化学発光性物質を標識した、測定対象物に特異結合する抗体と、測定対象物である抗原とを反応及び結合させ、未結合の前記標識抗体を分離除去する。その後、前記抗原と結合した前記標識抗体に標識されている酵素、蛍光性物質、化学発光反応性物質、又は電気化学発光性物質から生成される光学的もしくは電気化学的なシグナルを検出する。これらの免疫測定技術は、測定対象物である抗原と測定対象物に特異結合する抗体との抗原抗体結合体を、未結合の標識抗体から分離するプロセスが必要となってくる測定技術である。そこで総称して、BF分離方式免疫測定と呼ばれる（Bind-Free分離方式の略である）。

[0076] 具体的には、前記和光純薬製の測定キットは、酵素免疫測定法を基本原理としたものである。この測定キットの構成は、A $\beta$ モノマー（A $\beta$ 40、A $\beta$ 42）の第一の抗体が固定化されているマイクロタイタープレートと、HRP標識された第二のA $\beta$ 抗体と酵素発色基質とからなる。性能としては、A $\beta$ 40/42ELISA測定キットはA $\beta$ 40で1pMから100pM、A $\beta$ 42で0.1pMから20pMが検出可能である。測定時間は17時間である。非常に感度が高いものである。測定方法は、まず、マイクロタイタープレートに検体液を分注し、マイクロタイタープレートを緩衝液で洗浄した後に、第二の抗体を加える。その後、さらに、マイクロタイタープレートを緩衝液で洗浄した後に、発色基質を加え、発色させて、吸光度を計測する。

[0077] 本発明の対象とするA $\beta$ を測定するための免疫測定法としては、非BF分離方式の免疫測定法も利用できる。例えば、免疫比濁法、免疫比濁法、及び

ラテックス免疫比濁法が、非BF分離方式の免疫測定である。これらは、測定対象物である抗原と測定対象物に特異的に結合する抗体との結合反応により生成する抗原抗体凝集体を光学的に測定するものである。これらは、抗原抗体結合反応に伴う大きさの変化を光学的な変化として検出するものである。免疫比濁法やラテックス免疫比濁法は、抗原抗体反応により生成する濁りを透過光強度変化量として検出することによって、測定対象物を定量する。また、免疫比濁法は、抗原抗体反応により生成する凝集体の大きさの変化を散乱光強度変化量として検出することによって、測定対象物を定量する。

[0078] 本発明の対象とするA $\beta$ を測定するための免疫測定法で使用する抗体は、A $\beta$ と特異的に反応及び結合する抗体である。抗体は、その作製法が数種類確立されており、既に公知である。代表的なものとしては、マウスに測定対象物を抗原として免疫し、その後マウスの脾臓を取り出し、マウスの脾臓と癌細胞であるミエローマとの融合により、ハイブリドーマ（抗体産生細胞）を作製する方法がある。ここで重要なのは、抗原である。本発明の場合は、A $\beta$ を抗原とする。具体的には、A $\beta$ 42およびA $\beta$ 40である。さらに、抗原と結合する抗体は、A $\beta$ のどの領域を認識して結合するかが重要である。例えば、A $\beta$ 42とA $\beta$ 40を抗体により区別するには、A $\beta$ 42とA $\beta$ 40とで異なる領域のアミノ酸配列を認識する必要がある。即ち、A $\beta$ 42とA $\beta$ 40とではC末端側のアミノ酸配列が異なるため、アミノ酸配列のC末端側の2つを含むアミノ酸配列を認識できる抗体がA $\beta$ 42に特異的な抗体であり、そうでないものがA $\beta$ 40に特異的な抗体である。また、N末端側は、A $\beta$ 42もA $\beta$ 40のいずれも同じアミノ酸配列であるため、A $\beta$ 42とA $\beta$ 40のいずれとも結合する抗体である。前述の和光純薬の測定キットに用いられる抗体は、これらの抗体が適切に組み合わせられている測定キットである。

[0079] 前述したように、本発明のA $\beta$ 測定方法によると、加齢に応じて脳内のA $\beta$ が鼻粘膜やその周辺の組織に蓄積することを利用し、鼻粘膜等をスワブおよび綿棒を擦りつけることで得られる鼻粘液、または、鼻粘膜等を洗浄して

得られる洗浄液を検体とすることができる。この場合、本発明は、鼻骨を取り出さずに、即ち、臨床研究や診断に役立てることができるように、鼻骨や鼻粘膜を含む鼻腔内のA $\beta$ 量を測定することができるという利点がある。また、A $\beta$ を凝集させることなく検体を濃縮することにより、高感度にA $\beta$ を測定できるため、通常の濃縮方法では測定不可能な、鼻等から採取した検体中のA $\beta$ 量を測定できるという利点がある。

## 実施例

[0080] 以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0081] (実施例1) 綿棒で採取した鼻粘液の測定  
本実施例については、図1を用いて説明する。

[0082] (検体準備工程の実施)

栄研化学が生産販売している綿棒(11)( $\gamma$ 滅菌アルミ軸綿棒)を用い、インフルエンザ簡易キットの方法を転用して、被験者a~eの5名の健全な被験者から鼻粘液を採取した。鼻粘液を採取した綿棒(11)を試験管(12)に入れ、採取した鼻粘液を検体(13)とした。

[0083] (濃縮工程の実施)

次いで、検体(13)を採取した綿棒(11)を入れた試験管(12)に80%ギ酸(14)を500 $\mu$ L添加するとともに、10 $\mu$ M SAC(15)を50 $\mu$ L添加して、綿棒に付いた検体(13)を抽出するとともに可溶化を行い、試料(16)を得た。さらに、綿棒(11)の採取部を試験管(12)内の溶液から引き上げた状態で綿棒(11)を試験管(12)に固定し、試験管(12)を遠心機に入れて、回転数2000rpmで1分間遠心を行い、綿棒(11)を脱水し(17)、その後、綿棒(11)を試験管(12)から取り出して試料(18)を得た。その後、減圧濃縮(19)により試料(18)を濃縮して容量が40 $\mu$ Lの試料(20)を得た。

[0084] (中和工程の実施)

その後、試料(20)に1Mトリス緩衝溶液(pH未調整)(21)を9

60  $\mu$ L 加えてギ酸を中和し、容量が 1 mL の測定用試料 (22) を得た。

[0085] (測定工程の実施)

測定は、アミロイド $\beta$ を測定するELISAの測定キットを用いて実施した(和光純薬社製、Human/Rat  $\beta$  Amyloid 42 ELISA Kit wako、High-Sensitive; 商品番号292-64501およびHuman/Rat  $\beta$  Amyloid 40 ELISA Kit wako II; 商品番号; 294-64701)。測定に先立って、検量線を作製するための溶液を、A $\beta$  42およびA $\beta$  40のスタンダード溶液、あるいは、実施例4で調製した原液を用いて、A $\beta$  42を0.05、0.1、0.2、0.25、1、2、2.5、5、10、又は20 pM、A $\beta$  40を0.25、0.5、1、1.25、2.5、5、10、12.5、25、50、又は100 pM、に調製した。調製後は、検量線を作製するための溶液と各測定用試料をそれぞれ、前記測定キットのマイクロタイタープレートに100  $\mu$ L 添加した。

[0086] その後、測定キットの使用説明に従い、測定を実施した。測定後は、検量線を用いて、各測定用試料に含まれるA $\beta$  42とA $\beta$  40の濃度を算出した。

[0087] (測定結果)

以上の測定結果を、図2に示す。これによると、本実施例の方法で処理した鼻粘液検体において、A $\beta$  40が0.75~3.26 pM、A $\beta$  42が0.12~0.27 pMの値を示した。以上のように、鼻粘液検体にギ酸を添加して減圧濃縮することで、通常では測定出来なかった鼻液中に含まれるA $\beta$ 量を測定することに成功した。

[0088] (実施例2) マウス脳ホモジネートの測定

本実施例については、図3を用いて説明する。

[0089] (検体準備工程の実施)

A $\beta$ が大量発現されるように遺伝子改変されたマウス(以下APPマウスという)の脳切片を10 mMリン酸緩衝液(PB)中でホモジナイズして得

られた脳ホモジネート溶液の上清を用いた。本実施例では、これを検体（31）とし、試験管（32）に10 $\mu$ L添加した。

[0090] （濃縮工程の実施）

次いで、試験管（32）に添加された検体（31）に、80%ギ酸（33）を500 $\mu$ L添加し、10 $\mu$ M SAC（34）を50 $\mu$ L添加して可溶化を行い、容量が560 $\mu$ Lの試料（35）を得た。その後、減圧濃縮（36）により試料（35）を濃縮して、容量が40 $\mu$ Lの試料（37）を得た。

[0091] （中和工程の実施）

その後、試料（37）に1Mトリス緩衝溶液（pH未調整）（38）を960 $\mu$ L加えてギ酸の中和を行い、容量が1mLの測定用試料（39）を得た。

[0092] （未処理検体の調製）

検体準備工程で調製した脳検体を10 $\mu$ L試験管に添加し、さらに10mMリン酸緩衝液（PB）を990 $\mu$ L添加して100倍希釈した。これは、中和工程まで実施した脳検体と同等の希釈倍率となる。これを、本実施例の処理検体と比較するための未処理検体とした。

[0093] （測定工程の実施）

測定は、アミロイド $\beta$ を測定するELISAの測定キットを用いて実施した（和光純薬社製、Human/Rat  $\beta$  Amyloid 42 ELISA Kit wako、High-Sensitive；商品番号292-64501およびHuman/Rat  $\beta$  Amyloid 40 ELISA Kit wako II；商品番号；294-64701）。測定に先立って、検量線を作製するための溶液を、A $\beta$  42およびA $\beta$  40のスタンダード溶液、あるいは、実施例4で調製した原液を用いて、A $\beta$  42を0.1、0.2、0.25、1、2、2.5、5、10、又は20 pM、A $\beta$  40を1、1.25、2.5、5、10、12.5、25、50、又は100 pM、に調製した。調製後は、検量線を作製するための溶液と各測定用試料をそ

れぞれ、前記測定キットのマイクロタイタープレートに100 $\mu$ L添加した。

[0094] その後、測定キットの使用説明に従い、測定を実施した。測定後は、検量線を用いて、各測定用試料に含まれるA $\beta$ 42とA $\beta$ 40の濃度を算出した。

[0095] (測定結果)

以上の測定結果を、図4に示す。これによると、本実施例の方法で処理した脳検体において、A $\beta$ 40とA $\beta$ 42はともに未処理検体と比較して高い値を示した。中でも、A $\beta$ 42は約18倍となり、脳検体中に多量の凝集A $\beta$ 42が含まれていたことがわかった。これにより、検体にギ酸を添加して減圧濃縮することで、通常では測定出来なかった検体中に含まれる凝集A $\beta$ をA $\beta$ モノマーに変換して測定することができ、非常に高感度にA $\beta$ を測定できることがわかった。

[0096] (実施例3) 可溶化工程後の濃縮工程の有無

本実施例については、図5を用いて説明する。

[0097] 尚、実施例3では、鼻洗浄液を想定したモデルとしてA $\beta$ をリン酸緩衝液に希釈した溶液を調製し、これを検体として用いた。この検体中のA $\beta$ 濃度はA $\beta$ 40で50 pM、A $\beta$ 42で10 pMとした。以上の濃度は、APPマウスに対し鼻洗浄を行い、得られた洗浄液について測定したA $\beta$ 濃度に基づき、体重比でヒトへ反映させたときに得られると予想される濃度に設定したものである。

[0098] (検体準備工程の実施)

市販の固体A $\beta$ 42 (ペプチド研究所製; 商品番号4349-V)、市販の固体A $\beta$ 40 (ペプチド研究所製; 商品番号4307-V)、及び、ジメチルスルフォキシド (DMSO) を用いて、A $\beta$ 42のDMSO溶液 (濃度20 $\mu$ M)、及び、A $\beta$ 40のDMSO溶液 (濃度100 $\mu$ M) を調製した。これら溶液を等量混ぜA $\beta$ 42とA $\beta$ 40の混合液とした。

[0099] (濃縮工程の実施)

次に、この混合液を70%ギ酸により希釈することで可溶化を行い、最終濃度を、A $\beta$ 42は70%ギ酸溶液の10 pM、A $\beta$ 40は70%ギ酸溶液の50 pMとした。これを検体(41)とした。検体(41)を試験管(42)に1 mL添加し、減圧濃縮(43)により検体(41)の濃縮を行い、完全乾固した試料(44)と、完全乾固させずに50  $\mu$ Lの液体を残留させた試料(45)を作製した。その後、完全乾固した試料(44)に、40  $\mu$ Lのギ酸(46)を入れて、試料(47)を得た。

[0100] (中和工程の実施)

次いで当該試料(47)に1 Mトリス緩衝液(48)を960  $\mu$ L加えて中和を行い、1000  $\mu$ Lの測定用試料(49)を得た。完全乾固させなかった試料(45)には、直接1 Mトリス緩衝液(50)を950  $\mu$ L加えて中和を行い、1000  $\mu$ Lの測定用試料(51)を得た。

[0101] (測定工程の実施)

測定は、アミロイド $\beta$ を測定するELISAの測定キットを用いて実施した(和光純薬社製、Human/Rat  $\beta$  Amyloid 42 ELISA Kit wako、High-Sensitive; 商品番号292-64501およびHuman/Rat  $\beta$  Amyloid 40 ELISA Kit wako II; 商品番号; 294-64701)。測定に先立って、検量線を作製するための溶液を、A $\beta$ 42およびA $\beta$ 40のスタンダード溶液、あるいは、実施例4で調製した原液を用いて、A $\beta$ 42を0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、又は20 pM、A $\beta$ 40を1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、又は100 pM、に調製した。調製後は、検量線を作製するための溶液と各測定用試料1 mLをそれぞれ、前記測定キットのマイクロタイタープレートに添加した。

[0102] その後、測定キットの使用説明に従い、測定を実施した。測定後は、検量線を用いて、各測定用試料に含まれるA $\beta$ 42とA $\beta$ 40の濃度を算出し、容量補正を行なった後、各試料に含まれていたA $\beta$ 42量およびA $\beta$ 40量

に対する回収率を評価した。

[0103] (測定結果)

以上の測定結果を、図6に示す。これによると、 $A\beta 42$ 及び $A\beta 40$ の回収率は、可溶化剤添加後の濃縮工程により乾固させなかった試料では、それぞれ80%及び100%と、非常に高い値を示した。一方、可溶化剤添加後の濃縮工程により乾固させた試料では、回収率が10%未満及び20%未満と極めて低い値に留まった。これにより、可溶化剤添加後の濃縮工程で試料を乾固させないことにより、 $A\beta$ の回収率、すなわち測定感度が著しく向上することが分かった。

[0104] (実施例4) 検体処理容器準備工程における添加剤の検討

本実施例については、図7を用いて説明する。

[0105] (検体(61)の調製)

$A\beta 42$ 、 $A\beta 40$ 等の $A\beta$ モノマーのリン酸緩衝溶液の調製には $A\beta$ モノマーの凝集性および吸着性による損失が伴う。したがって、調製は、段階希釈に基づき、慎重に行った。具体的には、市販の固体 $A\beta 42$ (ペプチド研究所製;商品番号4349-V)、市販の固体 $A\beta 40$ (ペプチド研究所製;商品番号4307-V)、及び、ジメチルスルフォキシド(DMSO)を用いて、 $A\beta 42$ のDMSO溶液(濃度20 $\mu$ M)、及び、 $A\beta 40$ のDMSO溶液(濃度100 $\mu$ M)を調製した。これら溶液を等量混ぜ $A\beta 42$ と $A\beta 40$ の混合液とした。その後、0.5%牛血清アルブミン(BSA)及び0.1%Tween 20のリン酸生理食塩緩衝液(pH7.4、PBS)を用いて、 $A\beta 42$ の濃度が5nM、 $A\beta 40$ の濃度が25nMになるまで前記混合液を希釈した。この希釈された混合液では、 $A\beta 42$ および $A\beta 40$ いずれも、 $A\beta$ モノマーとして安定に存在させることができるので、本実施例における原液とした。

[0106] その後、前記原液を、リン酸緩衝液(PB)により段階希釈を行い、目的の濃度へ調整した。本実施例では、最終濃度を、 $A\beta 42$ はリン酸緩衝溶液中5pM、 $A\beta 40$ はリン酸緩衝液中25pMとした。また、前記段階希釈

の過程において、ブロッキング剤として、最終濃度で0.9%牛血清アルブミン(BSA)が含有されるように調整した。その後、調製した溶液を24時間以上放置することで、可溶性A $\beta$ オリゴマー、不溶性A $\beta$ ポリマーおよびA $\beta$ モノマーの混合物溶液とし、これを検体(61)とした。

[0107] 以上により調製した検体は、5 pM A $\beta$ 42・25 pM A $\beta$ 40・0.9%BSAのリン酸緩衝溶液(微量のDMSOを含む)である。

[0108] (検体処理容器準備工程の実施)

試験管(62)を13本準備し、各試験管に、添加剤(63)250 $\mu$ Lを加えた。添加剤としては、次の(A)から(M)で示す13種類の添加剤(63)を準備し、試験管1本あたり1種類の添加剤を添加した。

(A) 0.9%BSA・80%ギ酸

(B) 10 nMクルクミン・0.9%BSA・80%ギ酸

(C) 9%Triton X100・0.9%BSA・80%ギ酸

(D) 10 $\mu$ M SAC・0.9%BSA・80%ギ酸

(E) 20%DMSO・0.9%BSA・80%ギ酸

(F) 0.9%BSA・0.1%Tween 20・PBS

(G) 10 nMクルクミン・0.9%BSA・0.1%Tween 20・PBS

(H) 9%Triton X100・0.9%BSA・0.1%Tween 20・PBS (I) 10 $\mu$ M SAC・0.9%BSA・0.1%Tween 20・PBS

(J) 50%DMSO・0.9%BSA・0.1%Tween 20・PBS

(K) PB

(L) 28%NH<sub>3</sub>

(M) 5.6%NH<sub>3</sub>・0.9%BSA・0.1%Tween 20・PBS

(検体準備工程の実施)

次に、各試験管に、検体(61)を2 mL添加して2250 $\mu$ Lの試料(

64)を得た。

[0109] (第一濃縮工程の実施)

試料(64)に対し、減圧濃縮により濃縮(65)を実施し、容量を50  $\mu$ Lまで濃縮した試料(66)を得た。

[0110] (第二濃縮工程の実施)

試料(66)に80%ギ酸(67)を300  $\mu$ L添加することで可溶化を行い、容量が350  $\mu$ Lの試料(68)を得た。その後、減圧濃縮(69)により試料(67)の濃縮を実施し、容量が40  $\mu$ Lの試料(70)を得た。

[0111] (中和工程の実施)

その後、試料(70)に1Mトリス緩衝溶液(pH未調整)(71)を960  $\mu$ L加えてギ酸の中和を行い、容量が1mLの測定用試料(72)を得た。

[0112] (測定工程の実施)

測定は、アミロイド $\beta$ を測定するELISAの測定キットを用いて実施した(和光純薬社製、Human/Rat  $\beta$  Amyloid 42 ELISA Kit wako、High-Sensitive;商品番号292-64501およびHuman/Rat  $\beta$  Amyloid 40 ELISA Kit wako II;商品番号;294-64701)。測定に先立って、検量線を作製するための溶液を、A $\beta$ 42およびA $\beta$ 40のスタンダード溶液、あるいは、前記調製した原液を用いて、A $\beta$ 42を0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、又は20 pM、A $\beta$ 40を1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、又は100 pM、に調製した。調製後は、検量線を作製するための溶液と測定用試料(72)をそれぞれ、前記測定キットのマイクロタイタープレートに添加した。

[0113] その後、測定キットの使用説明に従い、測定を実施した。測定後は、検量線を用いて、測定用試料(72)に含まれるA $\beta$ 42とA $\beta$ 40の濃度を算出し、容量補正を行なった後、試料に含まれていたA $\beta$ 42量およびA $\beta$ 4

0量に対する回収率を評価した。

[0114] (測定結果)

以上の測定結果を、図8に示す。これによると、検体処理容器に予めギ酸を添加していた試料(A) - (E)では、ギ酸を添加していない試料(F) - (M)と比較して、Aβ42及びAβ40双方の回収率が非常に高い値を示した。中でも、ギ酸とSACを併用した試料(D)は、最も高い回収率を示した。これにより、検体処理容器に予めギ酸に代表される添加剤を添加しておくことにより、濃縮工程(第二濃縮工程)の前に事前濃縮工程(第一濃縮工程)を行う場合であっても、Aβの回収率、すなわち測定感度が著しく向上することが分かった。

[0115] (参考例)

実施例4における添加剤を使用しない状態で第一濃縮工程を実施し、第一濃縮工程を実施する場合における添加剤の必要性を検討した。本参考例については、図9を用いて説明する。

[0116] (検体(81)の調製)

市販の固体Aβ42(ペプチド研究所製;商品番号4349-V)、市販の固体Aβ40(ペプチド研究所製;商品番号4307-V)、及び、ジメチルスルフォキシド(DMSO)を用いて、Aβ42のDMSO溶液(濃度20μM)、及び、Aβ40のDMSO溶液(濃度100μM)を調製した。これら溶液を等量混ぜAβ42とAβ40の混合液とした。その後、0.5%牛血清アルブミン(BSA)及び0.1%Tween20のリン酸生理食塩緩衝液(pH7.4、PBS)を用いて、Aβ42の濃度は5nM、Aβ40の濃度は25nMになるまで前記混合液を希釈した。この希釈された混合液では、Aβ42およびAβ40いずれも、Aβモノマーとして安定に存在させることができるので、本参考例における原液とした。

[0117] その後、前記原液を、リン酸緩衝液(PB)により段階希釈を行い、目的の濃度へ調整した。本参考例では、最終濃度を、Aβ42はリン酸緩衝液中20pM、Aβ40はリン酸緩衝液中100pMとした。また、前記段階

希釈の過程において、ブロッキング剤として、最終濃度で0.9%牛血清アルブミン(BSA)が含有されるように調整した。その後、調製した溶液を24時間以上放置することで、可溶性A $\beta$ オリゴマー、不溶性A $\beta$ ポリマーおよびA $\beta$ モノマーの混合物溶液とし、これを検体(81)とした。

[0118] 以上により調製した検体は、20 pM A $\beta$ 42・100 pM A $\beta$ 40・0.9%BSAのリン酸緩衝溶液(微量のDMSOを含む)である。

[0119] (第一濃縮工程の実施)

検体(81)を試験管(82)に500  $\mu$ L添加した後、減圧濃縮により検体(81)の濃縮(83)を実施した。ここで、濃縮(83)では、凍結乾燥又は減圧濃縮を利用し、減圧濃縮により完全乾固させた試料(84)と、凍結乾燥により得た試料(85)と、減圧濃縮により容量を50  $\mu$ Lまで濃縮したが乾固していない試料(86)を作製した。

[0120] (第二濃縮工程の実施)

各試料に70%ギ酸(87)を添加することで可溶化を行い、容量が500  $\mu$ Lの試料(88)、(89)及び(90)を得た。

[0121] 引き続き、各試料(88)、(89)及び(90)を完全乾固させないように減圧濃縮により濃縮(91)を実施し、容量が40  $\mu$ Lの試料(92)、(93)及び(94)を得た。

[0122] (中和工程の実施)

その後、各試料(92)、(93)及び(94)に1Mトリス緩衝溶液(pH未調整)(95)を960  $\mu$ L加えてギ酸を中和し、容量が1mLの測定用試料(96)、(97)及び(98)を得た。

[0123] (測定工程の実施)

測定は、アミロイド $\beta$ を測定するELISAの測定キットを用いて実施した(和光純薬社製、Human/Rat  $\beta$  Amyloid 42 ELISA Kit wako、High-Sensitive;商品番号292-64501およびHuman/Rat  $\beta$  Amyloid 40 ELISA Kit wako II;商品番号;294-64701。測定に先立つ

て、検量線を作製するための溶液を、 $A\beta 42$ および $A\beta 40$ のスタンダード溶液、あるいは、前記調製した原液を用いて、 $A\beta 42$ を0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20 pM、 $A\beta 40$ を1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100 pM、に調製した。調製後は、検量線を作製するための溶液と各測定用試料1 mLをそれぞれ、前記測定キットのマイクロタイタープレートに添加した。

[0124] その後、測定キットの使用説明に従い、測定を実施した。測定後は、検量線を用いて、各測定用試料に含まれる $A\beta 42$ と $A\beta 40$ の濃度を算出し、容量補正を行なった後、各試料に含まれていた $A\beta 42$ 量および $A\beta 40$ 量に対する回収率を評価した。

[0125] (測定結果)

以上の測定結果を、図10に示す。これによると、いずれの試料でも、24%程度の回収率に留まった。可溶化剤添加の前に検体(81)を濃縮する第一濃縮工程においては、試料を完全乾固させても、完全乾固させなくても、回収率に有意差はなく、回収率は低かった。実施例4で示したように、可溶化剤添加の前に第一濃縮工程を実施する場合には、第一濃縮工程で試料の完全乾固を回避することよりも、検体処理容器に予めギ酸等の添加剤を添加しておくことの方が、 $A\beta$ の回収率、すなわち測定感度を向上させるために重要であることが判明した。

### 産業上の利用可能性

[0126] 本発明に係る $A\beta$ 測定方法によると、検体を濃縮しても $A\beta$ を可溶化状態に維持できるため、低濃度で $A\beta$ を含む溶液中の $A\beta$ を正確に定量することができる。そのため、例えば鼻洗浄液中に存在する極めて微量の $A\beta$ を測定することができ、アルツハイマー病の早期体外診断に利用できる。

### 符号の説明

- [0127] 11 綿棒  
12 試験管  
13 検体

- 1 4 ギ酸添加
- 1 5 S A C 添加
- 1 6 ギ酸及びS A C を添加した試料
- 1 7 綿棒の脱水
- 1 8 ギ酸及びS A C 添加後綿棒除去後の試料
- 1 9 濃縮
- 2 0 容量 4 0  $\mu$  L に濃縮した試料
- 2 1 1 M トリス緩衝液添加
- 2 2 測定用試料
- 3 1 検体
- 3 2 試験管
- 3 3 ギ酸添加
- 3 4 S A C 添加
- 3 5 ギ酸及びS A C を添加した試料
- 3 6 濃縮
- 3 7 容量 4 0  $\mu$  L に濃縮した試料
- 3 8 1 M トリス緩衝液添加
- 3 9 測定用検体
- 4 1 検体
- 4 2 試験管
- 4 3 濃縮
- 4 4 完全乾固した試料
- 4 5 完全乾固していない試料
- 4 6 ギ酸添加
- 4 7 ギ酸を添加した試料
- 4 8、5 0 1 M トリス緩衝液添加
- 4 9 測定用試料
- 5 1 測定用試料

- 6 1 検体
- 6 2 試験管
- 6 3 添加剤
- 6 4 添加剤を添加した試料
- 6 5、6 9 濃縮
- 6 6 濃縮後の、完全乾固していない試料
- 6 7 ギ酸添加
- 6 8 ギ酸を添加した試料
- 7 0 第二濃縮後の、完全乾固していない試料
- 7 1 1 M トリス緩衝液添加
- 7 2 測定用試料
- 8 1 検体
- 8 2 試験管
- 8 3、9 1 濃縮
- 8 4 第一濃縮後の、完全乾固した試料
- 8 5 凍結乾燥した試料
- 8 6 第一濃縮後の、完全乾固していない試料
- 8 7 ギ酸添加
- 8 8、8 8、8 9 ギ酸添加後の試料
- 9 2、9 3、9 4 第二濃縮後の、完全乾固していない試料
- 9 5 1 M トリス緩衝液添加
- 9 6、9 7、9 8 測定用試料
- 1 0 1 検体準備工程
- 1 0 2 濃縮工程
- 1 0 3 中和工程
- 1 0 4 測定工程
- 1 1 1 検体処理容器準備工程
- 1 1 2 検体準備工程

- 1 1 3 第一濃縮工程
- 1 1 4 第二濃縮工程
- 1 1 5 中和工程
- 1 1 6 測定工程

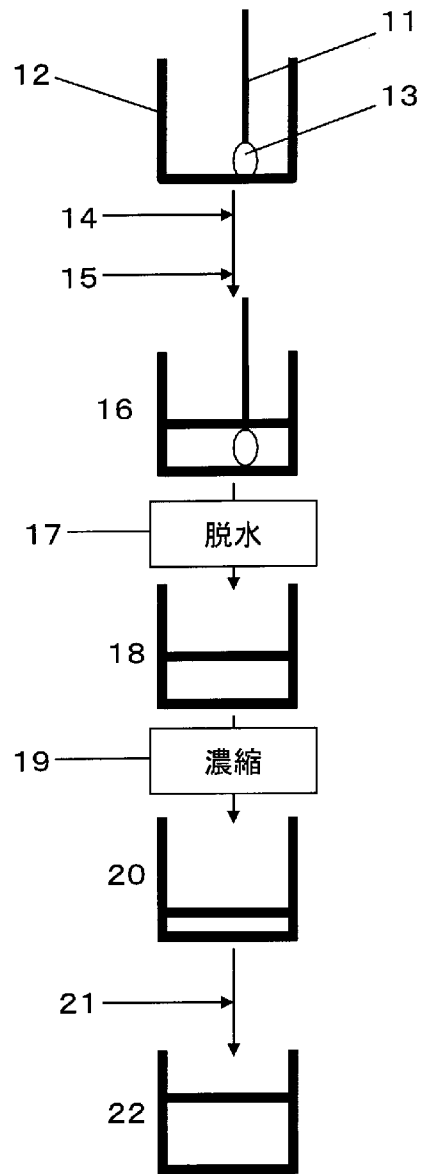
## 請求の範囲

- [請求項1] アミロイド $\beta$ を含む可能性がある検体を検体処理容器に入れる検体準備工程と、
- 前記検体処理容器中の前記検体に、アミロイド $\beta$ を可溶化する可溶化剤を添加して、濃縮操作により、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する濃縮工程と、
- 前記濃縮工程で得られた検体処理液中の前記可溶化剤を中和する中和工程と、
- 前記中和された検体処理液に含まれる可能性があるアミロイド $\beta$ を抗原抗体反応に基づいて定量する測定工程と、
- を含む、アミロイド $\beta$ 測定方法。
- [請求項2] 前記検体準備工程の前に、アミロイド $\beta$ に付着させるための添加剤を検体処理容器に入れる検体処理容器準備工程をさらに含む、請求項1に記載のアミロイド $\beta$ 測定方法。
- [請求項3] アミロイド $\beta$ に付着させるための添加剤を検体処理容器に入れる検体処理容器準備工程と、
- アミロイド $\beta$ を含む可能性がある検体を前記検体処理容器に入れる検体準備工程と、
- 前記検体処理容器内の前記検体を濃縮する第一濃縮工程と、
- 前記第一濃縮工程により濃縮された検体に、アミロイド $\beta$ を可溶化する可溶化剤を添加して、濃縮操作により、前記検体に含まれる溶媒の量を低減する第二濃縮工程と、
- 前記第二濃縮工程で得られた検体処理液中の前記可溶化剤を中和する中和工程と、
- 前記中和された検体処理液に含まれる可能性があるアミロイド $\beta$ を抗原抗体反応に基づいて定量する測定工程と、
- を含む、アミロイド $\beta$ 測定方法。
- [請求項4] 前記可溶化剤が、ギ酸である請求項1又は3に記載のアミロイド $\beta$

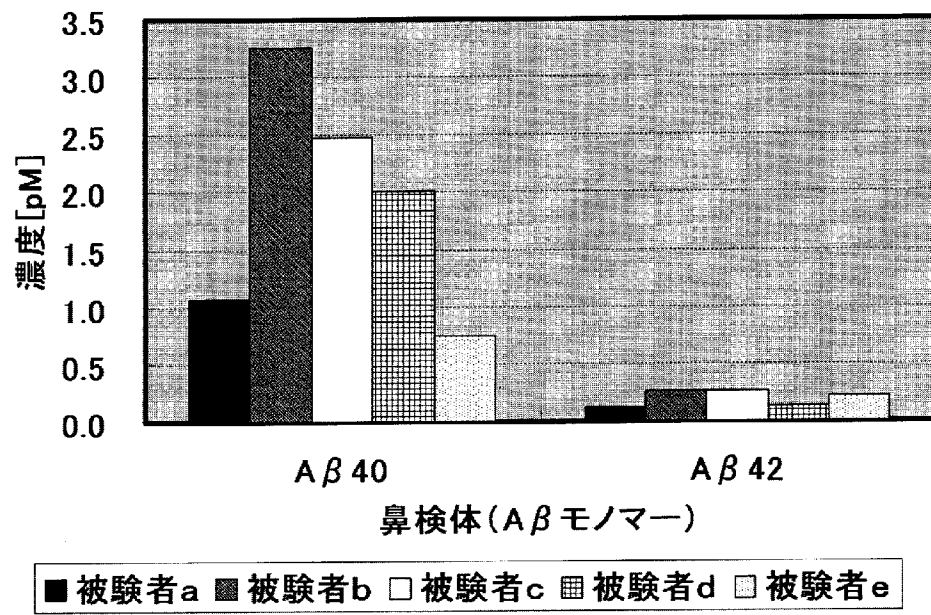
測定方法。

- [請求項5] 前記添加剤が、ギ酸と  $\alpha$ -アリル- $\gamma$ -システインを含む請求項 2 又は 3 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。
- [請求項6] 前記検体処理容器は、ブロッキング剤を含む請求項 1 又は 3 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。
- [請求項7] 前記ブロッキング剤が、牛血清アルブミンを含む請求項 6 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。
- [請求項8] 前記検体処理容器が、アミロイド  $\beta$  の吸着を抑制する内壁表面を有する請求項 1 又は 3 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。
- [請求項9] 前記第一濃縮工程において、アミロイド  $\beta$  を不溶化させずに濃縮を行う請求項 3 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。
- [請求項10] 前記検体が、体液である請求項 1 又は 3 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。
- [請求項11] 前記検体が、生体組織を洗浄して得られる洗浄液である請求項 1 又は 3 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。
- [請求項12] 前記生体組織が、鼻粘膜である請求項 11 に記載のアミロイド  $\beta$  測定方法。

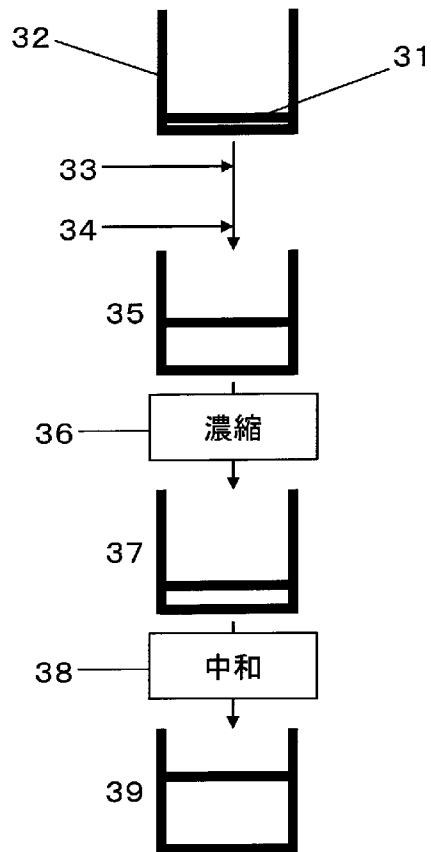
[図1]



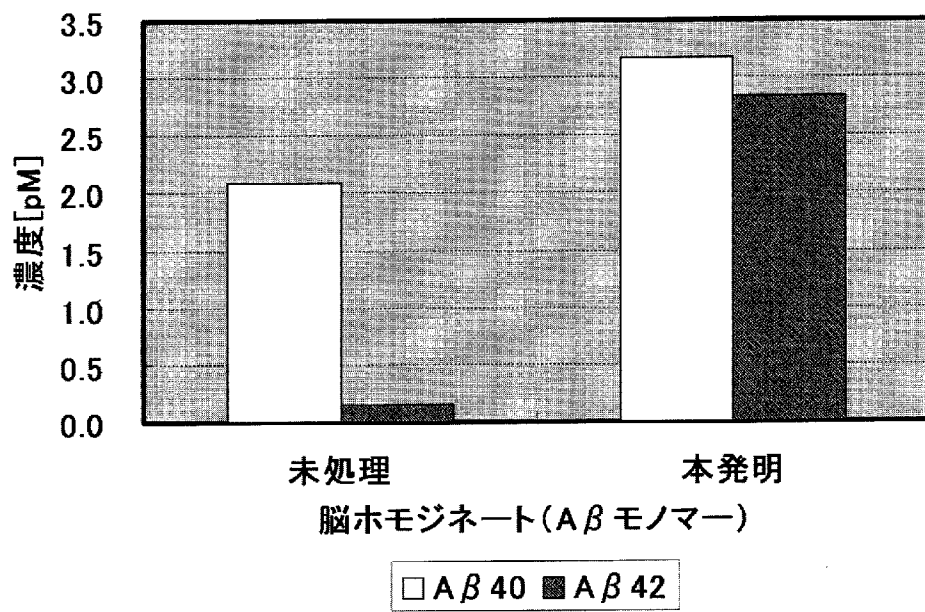
[図2]



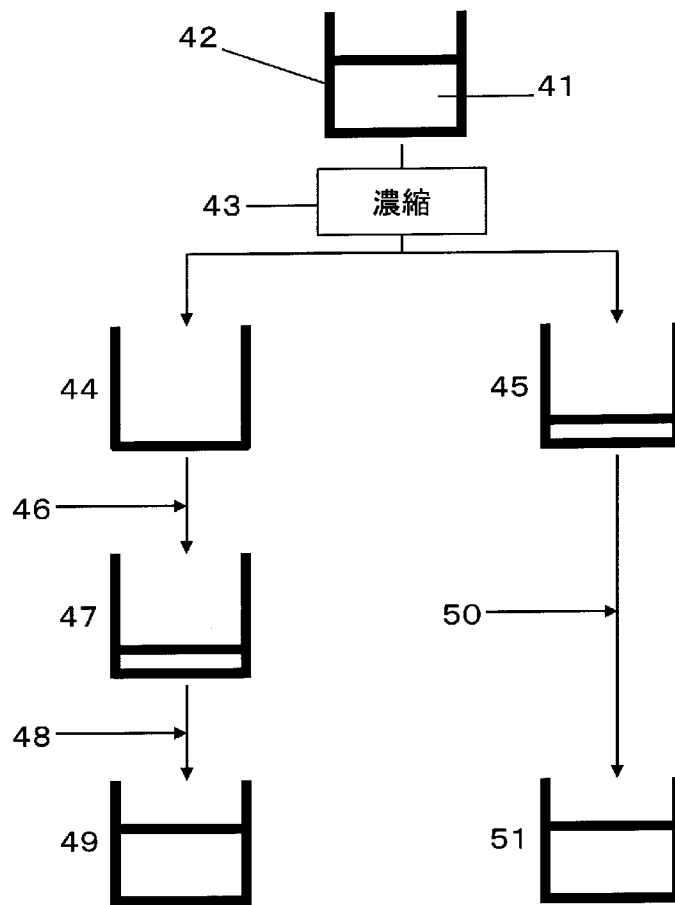
[図3]



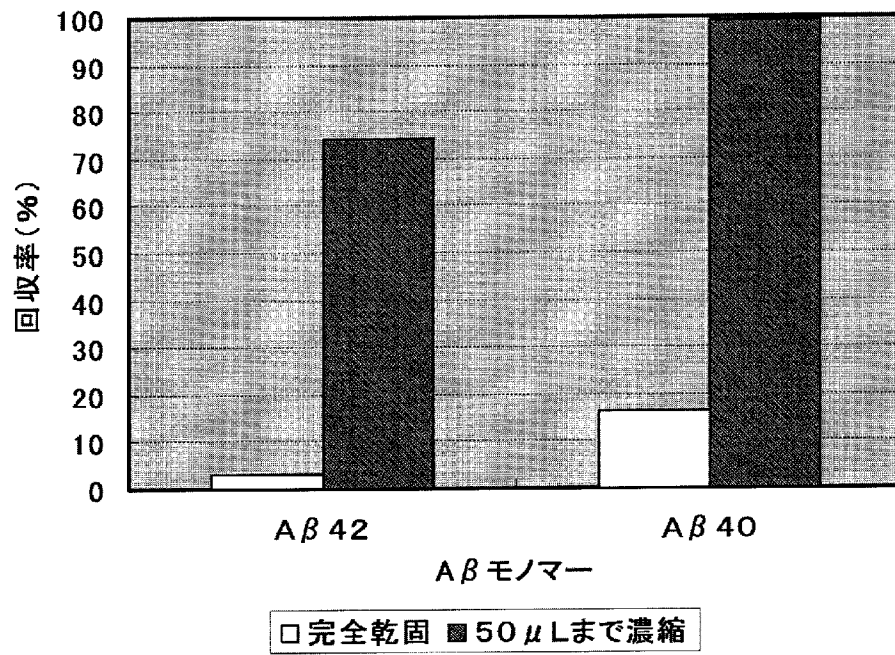
[図4]



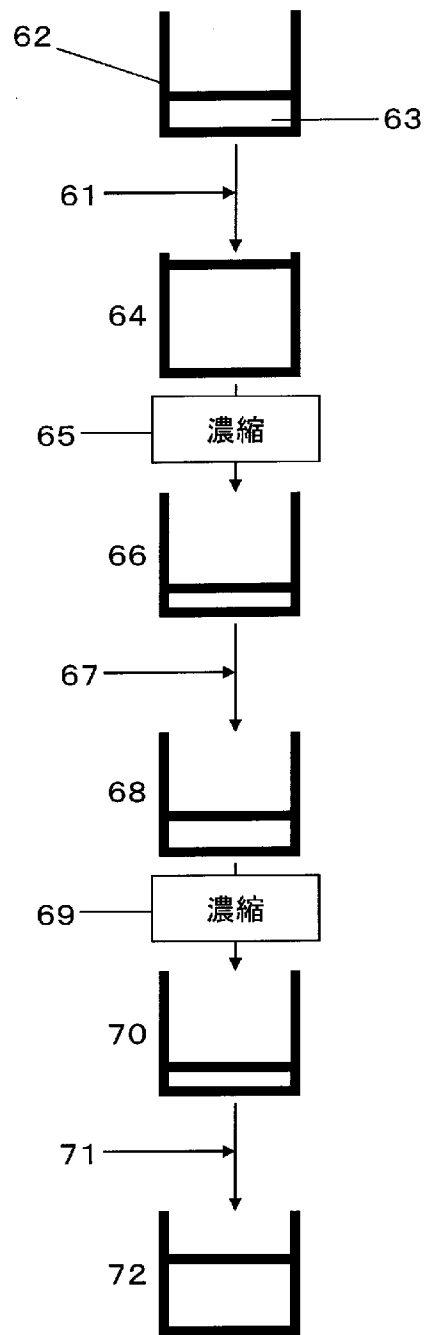
[図5]



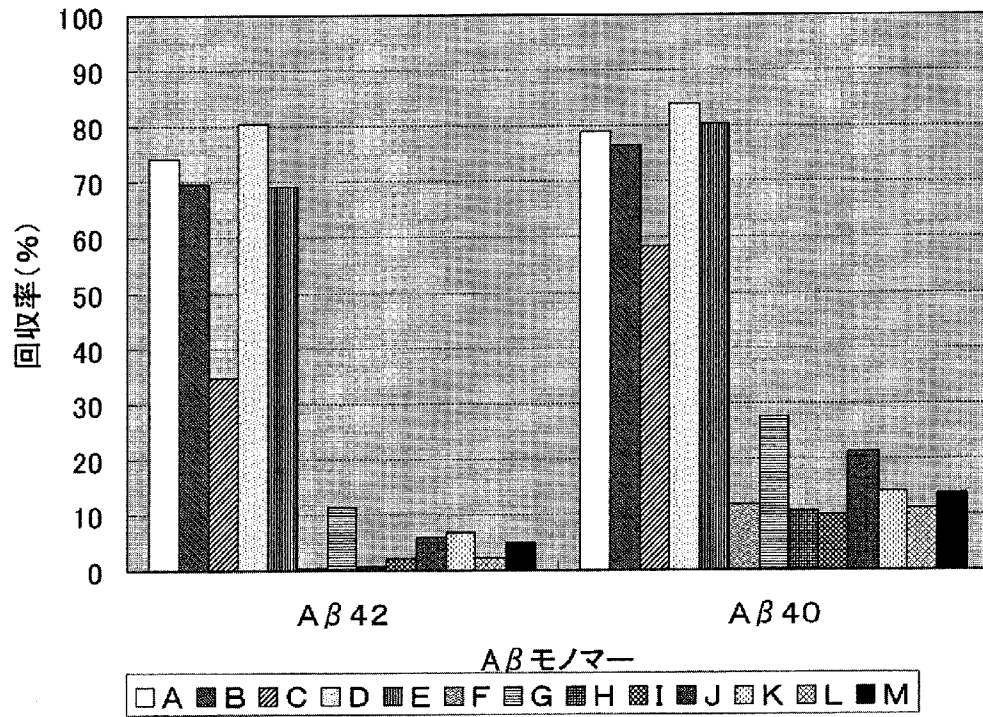
[図6]



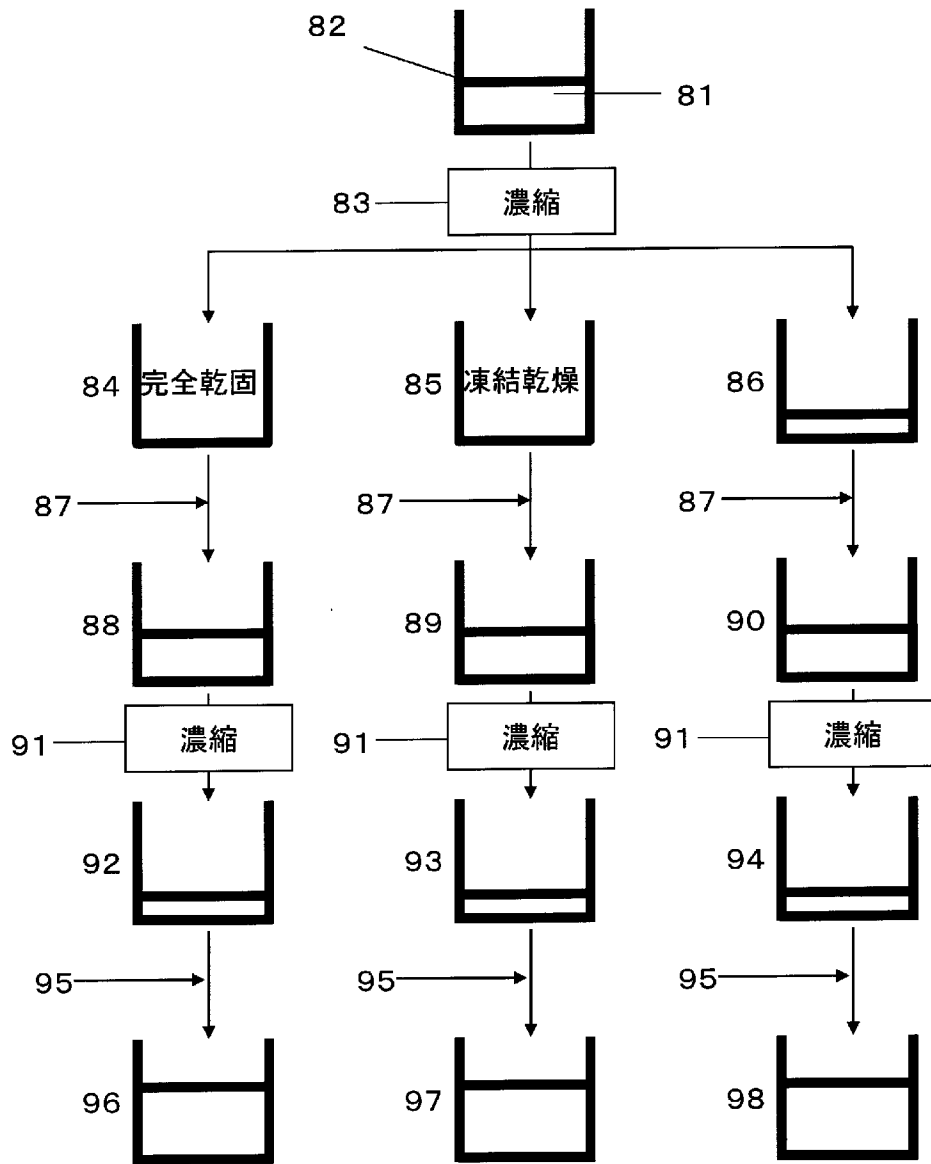
[図7]



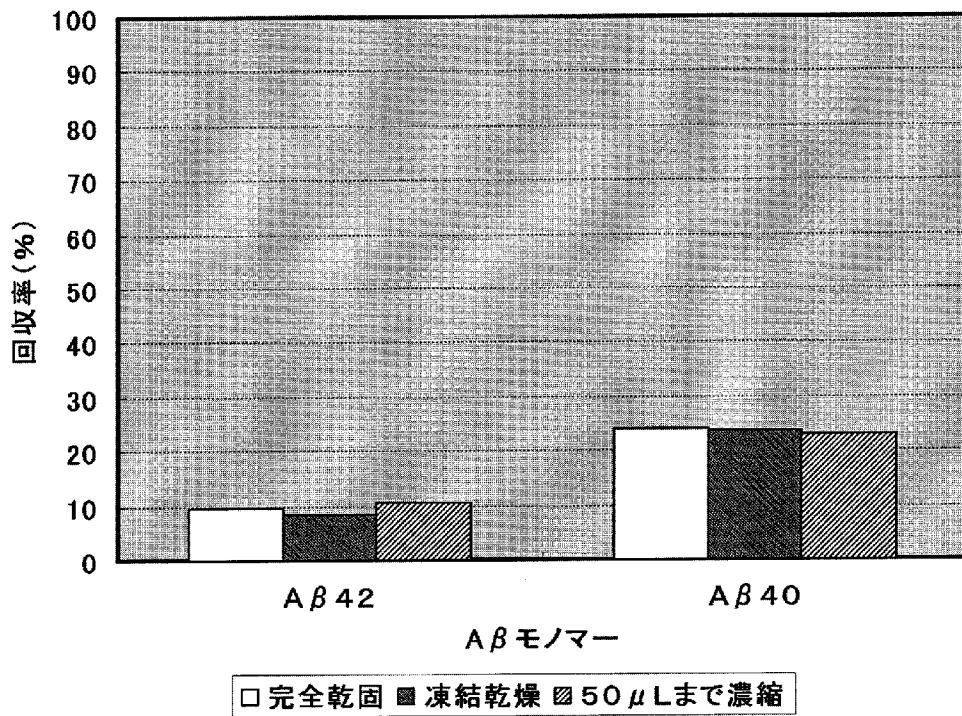
[図8]



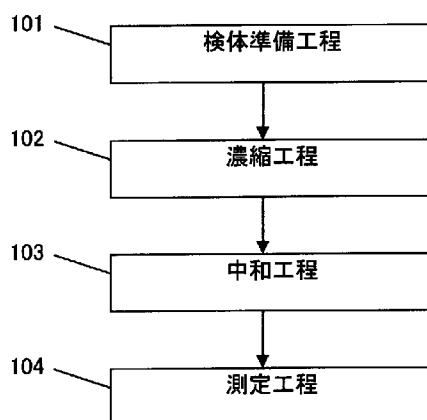
[図9]



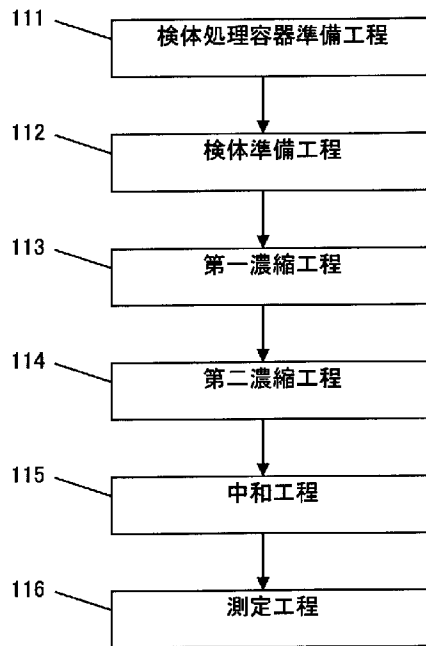
[図10]



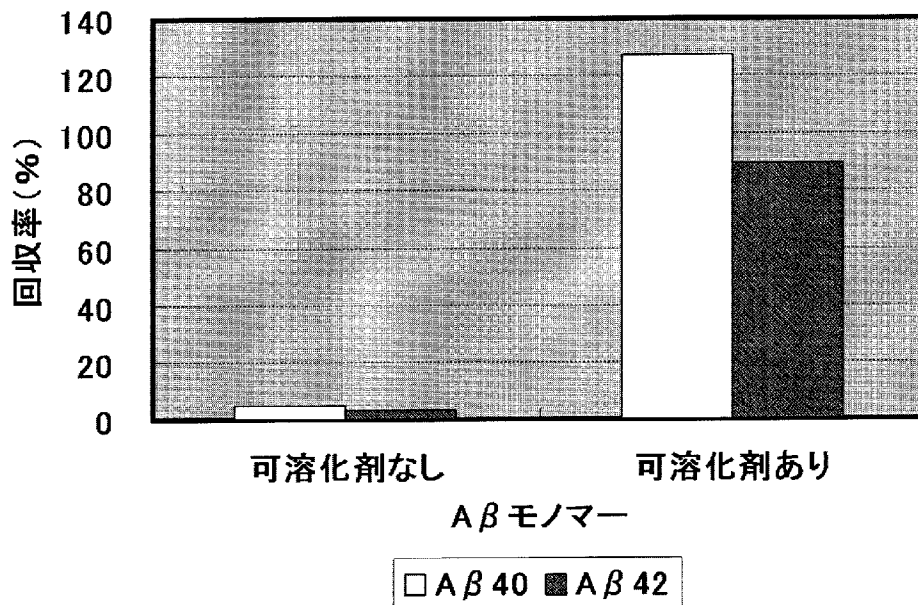
[図11]



[図12]



[図13]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/007546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01) i, G01N33/48(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) G01N33/48-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 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 2004-157124 A (F. Hoffmann-LA Roche AG.), 03 June 2004 (03.06.2004), paragraphs [0050], [0051], [0095] to [0096], [0110] to [0112] & US 2004/0096907 A1 & EP 1420254 A2	1, 4/6-10/2, 3, 5, 11, 12
Y	WO 2006/046644 A1 (Sanko Junyaku Co., Ltd.), 04 May 2006 (04.05.2006), paragraphs [0036], [0082] to [0088] & US 2008/0199879 A1 & EP 1813947 A1 & CA 2585148 A & NO 20072206 A & KR 10-2007-0073778 A & CN 101048662 A & BRA PI0516674 & IL 182540 D	6-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 February, 2011 (10.02.11)		Date of mailing of the international search report 22 February, 2011 (22.02.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/007546

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-544954 A (Vista Ventures GmbH), 17 December 2009 (17.12.2009), & US 2010/0129847 A & EP 1882944 A1 & WO 2008/012101 A1 & DE 602006005806 D & AT 426174 T & ES 2323725 T & CA 2693212 A	1-12
A	WO 2009/034158 A2 (PROBIODRUG AG.), 19 March 2009 (19.03.2009), page 80, line 26 to page 81, line 4 & US 2009/0098052 A1 & EP 2195336 A & AU 2008297070 A & CA 2696934 A & CN 101802000 A	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/48(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 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48-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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011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) CA/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JDreamI)		
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
X/Y/A	JP 2004-157124 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 2004.06.03, 【0050】、【0051】、【0095】-【0096】、 【0110】-【0112】 & US 2004/0096907 A1 & EP 1420254 A2	1,4/ 6-10/ 2,3,5,11,12
Y	WO 2006/046644 A1 (三光純薬株式会社) 2006.05.04, 【0036】、 【0082】-【0088】 & US 2008/0199879 A1 & EP 1813947 A1 & CA 2585148 A & NO 20072206 A & KR 10-2007-0073778 A & CN 101048662 A & BRA PI0516674 & IL 182540 D	6-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 10.02.2011	国際調査報告の発送日 22.02.2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/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) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J   9 2 1 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-544954 A (ヴィスタ ベンチャーズ ゲーエムベーハー) 2009. 12. 17, & US 2010/0129847 A & EP 1882944 A1 & WO 2008/012101 A1 & DE 602006005806 D & AT 426174 T & ES 2323725 T & CA 2693212 A	1-12
A	WO 2009/034158 A2 (PROBIODRUG AG) 2009. 03. 19, 80 ページ 26 行 - 81 ページ 4 行 & US 2009/0098052 A1 & EP 2195336 A & AU 2008297070 A & CA 2696934 A & CN 101802000 A	1-12