

(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
2012年6月21日(21.06.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/081701 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 1/22 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/079218
- (22) 国際出願日: 2011年12月16日(16.12.2011)
- (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 2010-280753 2010年12月16日(16.12.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 公立大学法人福島県立医科大学(FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9601295 福島県福島市光が丘1番地 Fukushima (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 成松 久(NARIMATSU Hisashi) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人

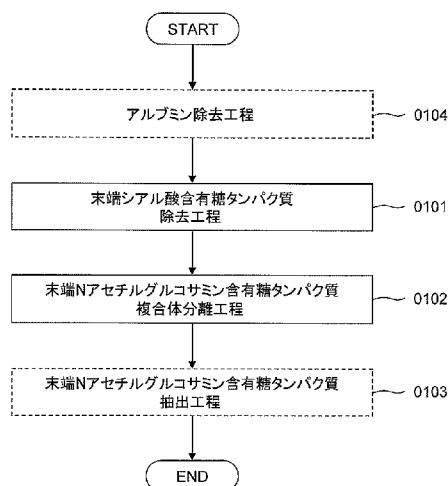
人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 平林 淳(HIRABAYASHI Jun) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 久野 敦(KUNO Atsushi) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 松崎 英樹(MATSUZAKI Hideki) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 池原 譲(IKEHARA Yuzuru) [JP/JP]; 〒3058568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 伊藤 浩美(ITO Hiromi) [JP/JP]; 〒9601295 福島県福島市光が丘1番地 公立大学法人福島県立医科大学内 Fukushima (JP). 橋本 康弘(HASHIMOTO Yasuhiro) [JP/JP]; 〒9601295 福島県福島市光が丘1番地 公立大学法人福島県立医科大学内 Fukushima (JP). 城谷 圭朗(SHIROTANI Keiro) [JP/JP]; 〒9601295 福島県福島市光が丘1番地 公立大学法人福島県立医科大学内 Fukushima (JP). 二川了次(FUTAKAWA Satoshi) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台3-16-1 3白金台ウスイビル2階・9階 株式会社リボミック内 Tokyo (JP). 新井 一(ARAI Hajime) [JP/JP]; 〒1138421 東京都

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR ENRICHMENT AND SEPARATION OF SPINAL FLUID GLYCOPROTEIN, METHOD FOR SEARCHING FOR MARKER FOR CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES WHICH UTILIZES THE AFOREMENTIONED METHOD, AND MARKER FOR CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES

(54) 発明の名称: 髄液型糖タンパク質の富化及び分離方法、並びにその方法を用いた中枢神経系疾患用マーカーの探索方法及び中枢神経系疾患用マーカー

[図1]



- 0104 STEP OF REMOVAL OF ALBUMIN
0101 STEP OF REMOVAL OF GLYCOPROTEIN CONTAINING TERMINAL SIALIC ACID
0102 STEP OF SEPARATION OF COMPLEX OF GLYCOPROTEIN CONTAINING TERMINAL N-ACETYLGLUCOSAMINE
0103 STEP OF EXTRACTION OF GLYCOPROTEIN CONTAINING TERMINAL N-ACETYLGLUCOSAMINE

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to develop: a method for selectively separating a glycoprotein derived from the central nervous system from a body fluid or a central nervous system cell; and a method for searching for an index marker for central nervous system diseases, which utilizes the aforementioned method. A protein derived from the central nervous system, which occurs in a trace amount in a body fluid or a central nervous system cell, can be selectively enriched by a two-stage separation procedure comprising removing a glycoprotein having sialic acid at a non-reducing terminal thereof from the body fluid or the central nervous system cell and then separating a glycoprotein having N-acetylglucosamine at a non-reducing terminal thereof.

(57) 要約: 体液又は中枢神経細胞から中枢神経系由来の糖タンパク質を選択的に分離する方法、及びその方法に基づいた中枢神経系疾患用指標マーカーの探索方法の開発を目的とする。体液又は中枢神経細胞から非還元末端にシアル酸を有する糖タンパク質を除去した後、非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖タンパク質を分離する二段階分離方式により体液又は中枢神経細胞中に存在する微量の中枢神経系由来タンパク質を選択的に富化する。



文京区本郷2丁目1番1号 順天堂大学医学
部脳神経外科学講座内 Tokyo (JP). 宮嶋 雅一
(MIYAJIMA Masakazu) [JP/JP]; 〒1138421 東京都
文京区本郷2丁目1番1号 順天堂大学医学
部脳神経外科学講座内 Tokyo (JP). 藤原 一男
(FUJIHARA Kazuo) [JP/JP]; 〒9808574 宮城県仙台
市青葉区星陵町1-1 国立大学法人東北大学
大学院医学系研究科 多発性硬化症治療学
寄附講座内 Miyagi (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.);
〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛
宕グリーンヒルズMORIタワー32階 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, 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, 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))

明 細 書

発明の名称：

髄液型糖タンパク質の富化及び分離方法、並びにその方法を用いた中枢神経系疾患用マーカーの探索方法及び中枢神経系疾患用マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、髄液型糖タンパク質の富化及び分離方法、並びにその方法を用いた中枢神経系疾患用マーカーの探索方法及びその方法によって得られた中枢神経系疾患用マーカーに関する。

背景技術

[0002] 脳脊髄液（髄液）は、中枢神経系（CNS：Central Nerve System）の細胞外液に相当し、血液脳関門によって血液成分とは隔てられている。この髄液中に主として存在する中枢神経系由来のタンパク質は、中枢神経系疾患に伴い、その発現が増減する可能性が高い。そのため、その発現量と特定の中枢神経系疾患との間に相関性のある中枢神経系由来のタンパク質は、その疾患の有力な診断マーカーとなり得る（非特許文献1）。

[0003] しかし、たとえ髄液であっても、その成分の8割以上は、脳液循環系に漏れ込んだ血清タンパク質であり、中枢神経系由来のタンパク質成分は、実際には極僅かにしか存在しない（非特許文献1）。しかも、中枢神経系由来のタンパク質を髄液から選択的に分離することは、公知の技術では困難であるため、前記診断マーカーの探索は容易ではない。

[0004] 一方、逆に中枢神経系由来のタンパク質も血液中に漏れ込むのであれば、血液中の中枢神経系由来のタンパク質を検出することにより、侵襲性の低い有力な中枢神経系疾患の検査方法となり得る。ところが、血液中の中枢神経系由来のタンパク質量は、髄液中の中枢神経系由来のタンパク質量よりも一層微量であるため、髄液から中枢神経系由来のタンパク質を検出するよりもさらに困難を極める。

[0005] 現在公知の中枢神経系疾患用の診断マーカーとして、例えば、アルツハイ

マー病 (AD: Alzheimer's Disease) の原因因子であるtauタンパク質若しくは $A\beta$ 42ペプチド、又は炎症性疾患におけるサイトカイン等の微量物質が知られている (非特許文献2)。tauタンパク質は、優れたAD診断マーカーではあるが、このタンパク質の出現は、神経細胞の死を意味しており、ADの治療 (神経細胞死の回避) を目指すための早期診断用としては不十分である。また、他の認知症の中にはtauタンパク質が増加するものがあり、ADに特異的なマーカーとは言い難い。一方、 $A\beta$ 42ペプチドについても病気が進行した後でなければ変化しないという問題がある。さらに、サイトカインは、感度よく測定できるものの、疾患特異性に乏しいという欠点がある。

[0006] 本発明者は、特許文献1で血清中の糖タンパク質の糖鎖に注目したADの診断薬を見出し、それを開示した。しかし、血清の糖タンパク質のほとんどは、肝臓に由来し、しかもその濃度はADとは無関係な各種疾患により大きく変動する。例えば、軽度の感染、火傷及び小さな傷等に伴う炎症によって、C反応性タンパク質 (CRP)、マンノース結合性タンパク質、フィブリノーゲン、ハプトグロビン、 α 1-アンチトリプシン等のいわゆる急性期タンパク質が大きく変動することが知られている。したがって、血清タンパク質中に混在する極微量の中枢神経系マーカーを検出又は富化することには、技術的困難性を伴うという問題があった。

[0007] 本発明者らは、特許文献2において、中枢神経系には固有の糖鎖構造を有する糖タンパク質が存在すると仮定し、髄液と血清間で糖鎖部分が異なるタンパク質を様々な抗体を用いてスクリーニングした。その結果、髄液中には、血清中にも多量に存在する公知の α 2, 6シアル酸 (本明細書では特に断りのない限り、以下「Sia- α 2, 6-Gal」とする) を非還元末端に有するトランスフェリン-2の他に、N-アセチルグルコサミン (本明細書では特に断りのない限り、以下「GlcNAc」とする) を非還元末端に有し、かつシアル酸残基を有さないトランスフェリン-1が存在することを見出した。このトランスフェリン-1は、髄液産生組織である脈絡叢から分泌されることを明らかにした。さらに、髄液代謝異常症である特発性正常圧水頭症 (iNPH) の指標マーカー

一になり得ることが明らかとなった（特許文献2）。この結果から、中枢神経系由来の髄液型糖タンパク質は、糖鎖の非還元末端にGlcNAcを有するが、Sia- α 2,6-Galは有さないことが示唆された。

[0008] GlcNAc非還元末端に強く結合するレクチンとして、PVLレクチンが知られている。PVLレクチンは、Sia- α 2,6-Gal非還元末端にはほとんど結合しないことが当該分野での技術常識となっている（非特許文献3）。したがって、当業者であれば、PVLレクチンを用いることによって髄液中に含まれる非還元末端にGlcNAcを有し、かつシアル酸残基を有さない糖タンパク質、すなわち中枢神経系由来の髄液型糖タンパク質を選択的に富化できると予想し得る。また同時に、PVLレクチンの使用により末端Sia- α 2,6-Gal含有糖タンパク質、すなわち血清型糖タンパク質を選択的に除去できると予想し得る。しかし、実際には、当該分野での技術常識とは異なり、PVL-レクチンは、部分的にはあるが、末端Sia- α 2,6-Galを持つトランスフェリン-2にも結合することが明らかとなった。例えば、図11に示すように、トランスフェリン-2（TF-2）はPVL-レクチンカラムの結合画分BF（レーン4）及び非結合画分NF（レーン5）のいずれにおいても回収される。この結果は、髄液サンプルのように、Sia- α 2,6-Gal非還元末端糖鎖を持つ糖タンパク質を大量に含む試料（髄液や血清等の体液）からPVL-レクチンビーズのみを用いて髄液型糖タンパク質を選択的に富化することが難しいことを示している。一方、トランスフェリン-2はSSA-レクチンに強い親和性を示し、SSA-レクチンカラムの結合画分BF（レーン2）において回収される。また、GlcNAcのみを非還元末端に有する中枢神経系由来の髄液型トランスフェリン-1（TF-1）はPVL-レクチンに特異的に結合するがSSA-レクチンには結合しない（レーン7～10）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特許4385149号

特許文献2：特開2010-121980号

非特許文献

[0010] 非特許文献1: Korolainen MA. et al., 2010, J. Neurochem., 112(6):1386-1414

非特許文献2: Mattsson N et al., JAMA. 2009 Jul 22;302(4):385-93

非特許文献3: Ueda H. et al., 2002, J. Biol. Chem. 277(28) :24916-24925

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、髄液等の体液から中枢神経系由来の糖タンパク質を選択的に分離する方法の開発、その方法に基づいた中枢神経系疾患用指標マーカーの探索方法の開発及びその方法を用いて得られた中枢神経系疾患用指標マーカーの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決するために、トランスフェリンー１以外の中枢神経系由来の糖タンパク質についても、PVLレクチンと各種抗体を組合せて探索した。その結果、GlcNAc非還元末端糖鎖は、他の多くの中枢神経系由来の髄液型糖タンパク質にも共通して存在することが明らかとなった。この糖鎖構造は、血清型糖タンパク質にも存在する。しかし、血清型糖タンパク質は、同時に非還元末端にシアル酸も有しており、GlcNAcのみを非還元末端に有する中枢神経系由来の髄液型糖タンパク質とは、構造的な差異が存在することも判明した。また、本発明者らは、従来 $\alpha 2,6$ シアル酸の非還元末端糖鎖には結合し難いとされてきたPVLレクチンが、実際には結合することを明らかにした。本発明は、上記新規知見に基づいて完成されたものであって、すなわち以下を提供する。

[0013] (1) 被験体由来の体液又は中枢神経細胞から末端GlcNAc含有糖タンパク質を富化又は分離する方法であって、(i) シアル酸結合性物質を用いて体液又は中枢神経細胞から末端シアル酸含有糖タンパク質を除去する除去工程、及び(i i) 前記除去工程で得られた試料中に存在する末端GlcNAc含有糖タンパク質をGlcNAc結合性物質に結合させて、形成された複合体を分離する分

離工程を含む前記方法。

- [0014] (2) 前記複合体を解離させ、末端GlcNAc含有糖タンパク質を溶出する工程をさらに含む、(1)に記載の方法。
- [0015] (3) 前記除去工程に先立ち、アルブミン結合性物質を用いて、体液又は中枢神経細胞からアルブミンを除去するアルブミン除去工程をさらに含む、(1)又は(2)に記載の方法。
- [0016] (4) 前記シアル酸結合性物質が抗シアル酸抗体若しくはその活性断片又はシアル酸結合性レクチンである、(1)～(3)のいずれかに記載の方法。
- [0017] (5) 前記シアル酸が $\alpha 2,6$ シアル酸である、(1)～(4)のいずれかに記載の方法。
- [0018] (6) $\alpha 2,6$ シアル酸結合性レクチンがSSAレクチン、SNAレクチン及びTJA-Iレクチンからなる群より選択される、(5)に記載の方法。
- [0019] (7) 前記GlcNAc結合性物質が抗GlcNAc抗体若しくはその活性断片又はGlcNAc結合性レクチンである、(1)～(6)のいずれかに記載の方法。
- [0020] (8) 前記GlcNAc結合性レクチンがPVLレクチン又はWGAレクチンである、(7)に記載の方法。
- [0021] (9) アルブミン結合性物質がブルーセファロース、又は抗アルブミン抗体若しくはその活性断片である、(1)～(8)のいずれかに記載の方法。
- [0022] (10) 体液が髄液、血液(血清、血漿及び間質液を含む)、リンパ液、神経根周囲液又は組織若しくは細胞の抽出液である、(1)～(9)のいずれかに記載の方法。
- [0023] (11) 中枢神経系疾患用指標マーカーを選択する方法であって、(1)～(10)のいずれかに記載の方法を用いて対照体由来及び特定の中枢神経系疾患に罹患した個体由来のそれぞれの体液又は中枢神経細胞から末端GlcNAc含有糖タンパク質を富化又は分離する富化・分離工程、前記富化・分離工程で得られた前記末端GlcNAc含有糖タンパク質の分量を測定する測定工程、及び対照体由来及び特定の中枢神経系疾患に罹患した個体由来の対応する前記測定した末端GlcNAc含有糖タンパク質の分量を比較して、統計学的に有意な

量的差異が見られる前記末端GlcNAc含有糖タンパク質をその特定の中枢神経系疾患用指標マーカーとして選択する選択工程を含む前記方法。

[0024] (12) 中枢神経系疾患用指標マーカーを選択する方法であって、対照体と特定の中枢神経系疾患に罹患した個体における表1で示される末端GlcNAc含有糖タンパク質の分量を測定する工程、及び対照体由来と特定の中枢神経系疾患に罹患した個体由来の対応する前記糖タンパク質の分量を比較して、統計学的に有意な量的差異が見られる前記糖タンパク質をその特定の中枢神経系疾患用指標マーカーとして選択する工程を含む前記方法。

[表1]

No.	糖タンパク質名	アクセッション#	分子量 (Da)
1	アセチル CoA カルボキシラーゼ 2	O00763	279696.3
2	多重 EGF-様-ドメインタンパク質 4	Q7Z7M0	254575.3
3	α 2-マクログロブリン	P01023	163279.4
4	プラズマプロテアーゼ C1 インヒビター	P05155	55154.7
5	トランスフェリン 1	P02787	77050.6
6	グルタミン酸カルボキシラーゼ様タンパク質	Q96KN2	56779.8
7	α 1-アンチキモトリプシン	P01011	47651.3
8	亜鉛- α 2-糖タンパク質	P25311	33872.5
9	インヒビン β A 鎖	P08476	47442.7
10	プロスタグランジン-H2 D-イソメラーゼ (プロスタグランジン-D2 合成酵素)	P41222	21029.0
11	トランスサイレチン	P02766	15887.2
12	カテプシン D	P07339	44553.0
13	プロコラーゲン C-エンドペプチダーゼ エンハンサー2	Q15113	47973.0

[0025] (13) シアル酸結合性物質及びGlcNAc結合性物質を含む、GlcNAc含有タンパク質を富化又は分離するキット。

[0026] (14) 前記シアル酸結合性物質が抗シアル酸抗体若しくはその活性断片又はシアル酸結合性レクチンである、(13)に記載のキット。

[0027] (15) 前記シアル酸が α 2,6シアル酸である、(14)に記載のキット。

[0028] (16) α 2,6シアル酸結合性レクチンがSSAレクチン、SNAレクチン及び／又

はTJA-Iレクチンである、(15)に記載のキット。

[0029] (17) 前記GlcNAc結合性物質が抗GlcNAc抗体若しくはその活性断片及び／又はGlcNAc結合性レクチンである、(14)～(16)のいずれかに記載のキット。

[0030] (18) 前記GlcNAc結合性レクチンがPVLレクチン及び／又はWGAレクチンである、(17)に記載のキット。

[0031] (19) 複合体解離用バッファをさらに含む、(13)～(18)のいずれかに記載のキット。

[0032] (20) 複合体解離用バッファがGlcNAcを含む、(19)に記載のキット。

[0033] (21) アルブミン結合性物質をさらに含む、(13)～(20)のいずれかに記載のキット。

[0034] (22) アルブミン結合性物質が抗アルブミン抗体又はその活性断片である、(21)に記載のキット。

[0035] (23) 非還元末端にN-アセチルグルコサミン残基を含み、かつ α 2,6シアル酸を含まない糖鎖を有する前記表1に記載の一以上の糖タンパク質（ただし、中枢神経系疾患が突発性正常圧水頭症の場合における表1に記載のトランスフェリン1を除く）又はその断片からなる中枢神経系疾患用指標マーカー。

[0036] (24) 中枢神経系疾患が視神経脊髄炎である、(23)に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。

[0037] (25) 中枢神経系疾患がギランバレー症候群である、(23)に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。

[0038] (26) 中枢神経系疾患が急性散在性脳脊髄炎である、(23)に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。

[0039] (27) 中枢神経系疾患が脳症である、(23)に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。

[0040] (28) 中枢神経系疾患用指標マーカーが表1に記載の α 2-マクログロブリンである、(24)～(27)のいずれかに記載の中枢神経系疾患用指標マ

ーカー。

[0041] (29) 被検体由来の体液又は中枢神経細胞から(23)に記載の一以上の中枢神経系疾患用指標マーカを検出して、その検出結果から該被検体における特定の中枢神経系疾患に関する罹患の有無を判別する方法。

[0042] (30) 前記特定の中枢神経系疾患が視神経脊髄炎である、(29)に記載の方法。

[0043] (31) 検出すべき中枢神経系疾患用指標マーカが表1に記載の $\alpha 2$ -マクログロブリンである(30)に記載の方法。

[0044] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願番号特願2010-280753号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0045] 本発明の富化・分離方法、及び当該方法を応用したキットによれば、体液及び／又は中枢神経細胞中に極微量に存在する中枢神経系由来の糖タンパク質を簡便かつ効率的に富化、分離及び選択することができる。

[0046] 本発明の中枢神経系疾患用指標マーカ選択方法によれば、中枢神経系疾患用の新規指標マーカとしての糖タンパク質を選択及び分離することができる。また、得られた特定の中枢神経系疾患の指標マーカを用いて、早期かつ容易に、また低侵襲的にその疾患の発症を診断することができる。

図面の簡単な説明

[0047] [図1]本発明の第1実施形態の方法を概念的に示すフローである。破線枠の工程は、任意の工程であることを示す。

[図2]本発明の第2実施形態の方法を概念的に示すフローである。

[図3]抗トランスフェリン抗体を用いて検出した、本発明の第1実施形態の方法における各工程で得られた画分中の血清型糖タンパク質であるトランスフェリン-2(TF-2)の有無を示すSSAレクチンブロットティングである。PVLカラムからの溶出画分であるD画分(富化画分)ではSSAレクチン反応性のTF-2は検出されない。

[図4]本発明の第1実施形態の方法における各工程で得られた画分中の髄液型

糖タンパク質の富化状況を示すウェスタンブロッティングである。PVLカラムからの溶出画分であるD画分（富化画分）ではトランスフェリン-1（TF-1）と同じ移動度のバンドのみが検出された。

[図5]レクチンマイクロアレイによるプロファイリングを示す図である。Aは、マイクロアレイ上の各種レクチンの配置を示す。Bは髄液の、またCはPVLカラムからの溶出画分であるD画分（富化画分）の、レクチンマイクロアレイによる結果である。

[図6]髄液及びPVLカラムからの溶出画分であるD画分（富化画分）の質量分析結果を示す図である。

[図7]視神経脊髄炎（NM0）罹患個体及び対照体（多発性硬化症（MS）罹患／NM0非罹患個体）のそれぞれの髄液から富化された $\alpha 2$ -マクログロブリンの発現量を抗 $\alpha 2$ -マクログロブリン抗体を用いて検出したウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

[図8]急性散在性脳脊髄炎（ADEM）罹患個体、ギランバレー症候群罹患個体及び対照体（ADEM非罹患／ギランバレー症候群非罹患個体）のそれぞれの髄液から $\alpha 2$ -マクログロブリンを抗 $\alpha 2$ -マクログロブリン抗体を用いて検出したウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

[図9]痙攣重積症罹患個体、脳症罹患個体（入院時と治療7日後）及びウイルス性髄膜炎罹患個体のそれぞれの髄液から $\alpha 2$ -マクログロブリンを抗 $\alpha 2$ -マクログロブリン抗体を用いて検出したウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

[図10]アルツハイマー病（AD）及びコントロール髄液（N）中のプロスタグランジン-H2 D-イソメラーゼ（プロスタグランジンD2合成酵素：PGD2S）を抗PGD2S抗体で検出し、定量した結果である。

[図11]各レクチンカラムの結合画分（BF：Binding Fraction）及び非結合画分（NF：Nonbinding Fraction）に含まれるTF-1又はTF-2を抗トランスフェリン抗体で検出したウェスタンブロッティングである。

発明を実施するための形態

[0048] <実施形態 1：末端GlcNAc含有糖タンパク質の富化・分離方法>

(概要)

本発明の第 1 の実施形態は、体液又は中枢神経細胞から末端GlcNAc (N-アセチルグルコサミン) 含有糖タンパク質を富化又は分離する方法である。

[0049] 「末端GlcNAc含有糖タンパク質」とは、糖鎖の非還元末端側にGlcNAc残基を有する糖タンパク質である。本明細書においては、「末端GlcNAc含有糖タンパク質」と記載した場合、特に、髄液型糖タンパク質を指すものとする。また、「糖鎖 (の) 非還元末端」とは、(タンパク質部分を除く) 糖鎖のみの構造を考えたとき、還元性を示す糖鎖末端 (還元末端) 以外の末端糖を指す。還元性を示す糖はヘミアセタール (又はケタール) 構造をとる。例えば、グルコースは 1 位のアルデヒド基と 5 位のヒドロキシル基が反応して環状構造を取る。糖鎖の中にあっても、環状構造の 1 位の炭素上のヒドロキシル基が保存されていれば、逆反応によってアルデヒド基を再生し、還元性を示すことが出来る。しかし、糖鎖の非還元末端糖のように、この 1 位ヒドロキシル基がグリコシド結合していると、アルデヒド基を生じる反応が起こらず、還元性を示さなくなる。すなわち、1 位の水酸基 (1-ヒドロキシル基) がフリーであるのが還元末端糖である。通常は還元末端糖がタンパク質に結合している。

[0050] 「髄液型糖タンパク質」とは、本明細書においては、脳及び／又は脊髄のような中枢神経系の細胞で発現し、主として髄液中に見られ、かつ糖鎖の非還元末端側にGlcNAc残基を有する糖タンパク質をいう。また、いわゆるバイセクトGlcNAc (N-グリカンの還元末端側 3 糖構造の $\text{Man} \beta 1-4\text{GlcNAc} \beta 1-4\text{GlcNAc}$ のManにGlcNAcが $\beta 1-4$ 結合したもの) 及びコア Fucose (上記 $\text{Man} \beta 1-4\text{GlcNAc} \beta 1-4\text{GlcNAc}$ の還元末端側のGlcNAcにFucose が $\alpha 1-6$ 結合したもの) を持つものも「髄液型糖タンパク質」に含む。ただし、たとえ糖鎖の非還元末端にGlcNAc残基を有する糖タンパク質であっても、シアル酸残基を糖鎖の他の非還元末端に有する糖タンパク質は、髄液型糖タンパク質には含まれない。このような非還元末端に一以上のシアル酸残基を有する糖タンパク質は、本

明細書においては、後述する血清型糖タンパク質に属するものとする。

[0051] GlcNAc末端残基の数は、特に制限しない。例えば、1つ、又は糖鎖が分岐する場合には複数であっても構わない。ここでいう複数とは、例えば、2以上、3以上、又は4以上をいう。

[0052] 本実施形態の方法は、図1で示すように末端シアル酸含有糖タンパク質除去工程(0101)及び末端GlcNAc含有糖タンパク質複合体分離工程(0102)を含む。また、本実施形態では、前記複合体分離工程(0102)後に末端GlcNAc含有糖タンパク質抽出工程(0103)を任意で含むこともできる。さらに、前記除去工程(0101)に先立ちアルブミン除去工程(0104)を任意で含んでもよい。以下、各工程について具体的に説明をする。

[0053] 1-1. 末端シアル酸含有糖タンパク質除去工程
(構成)

「末端シアル酸含有糖タンパク質除去工程」(0101)(以下、単に「除去工程」とする)とは、シアル酸結合性物質を用いて、被検体の体液又は中枢神経細胞から末端シアル酸含有糖タンパク質を除去する工程をいう。

[0054] 本明細書において「末端シアル酸含有糖タンパク質」とは、糖鎖の非還元末端に少なくとも一つのシアル酸残基を有する糖タンパク質をいう。このような構造の糖鎖を有する糖タンパク質は、通常血清中に多く見出されることから、本明細書では、「末端シアル酸含有糖タンパク質」を「血清型糖タンパク質」とも称する。ただし、前述のように、髄液中にも血清中の多数のタンパク質が漏れ込んでいることから、血清型糖タンパク質は、血清に特有のタンパク質ではなく、髄液中であっても主要なタンパク質成分として存在し得る。

[0055] 「シアル酸」とは、糖鎖末端に存在する酸性糖の一種であり、ノイラミン酸のアミノ基又はヒドロキシル基が他の官能基により置換された構造を有する物質をいう。例えば、N-アセチルノイラミン酸(NeuAc)等が挙げられる。

[0056] シアル酸が糖鎖に連結される結合様式は、特に制限はしないが、本明細書

においては、例えば、 $\alpha 2,6$ 結合された $\alpha 2,6$ シアル酸 (Sia- $\alpha 2,6$ -Gal) 糖鎖が挙げられる。前記末端シアル酸含有糖タンパク質における末端糖鎖としてのシアル酸残基数は、特に制限しない。例えば、1つ、又は糖鎖が分岐する場合には複数あっても構わない。ここでいう複数とは、2以上をいうが、3以上、又は4以上であってもよい。

[0057] 「シアル酸結合性物質」とは、前記シアル酸と親和的に、好ましくは特異的に結合する物質をいう。それゆえ、シアル酸結合性物質は、末端糖鎖にシアル酸をもたない本発明の末端GlcNAc含有糖タンパク質とは結合しない。前記結合は、可逆的結合又は不可逆的結合のいずれであってもよい。シアル酸結合性物質としては、例えば、抗シアル酸抗体若しくはその活性断片又はシアル酸結合性レクチンが挙げられる。

[0058] 「抗シアル酸抗体」とは、シアル酸を認識し、それに特異的に結合し得る糖鎖抗体をいう。本明細書において「抗体」とは、免疫グロブリン、キメラ抗体、ヒト化抗体又は合成抗体（ダイアボディ等）をいう。抗体が免疫グロブリンの場合、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれであってもよい。抗シアル酸抗体の具体例としては、 $\alpha 2,6$ シアル酸糖鎖を認識し、それに特異的に結合する抗 $\alpha 2,6$ シアル酸抗体が挙げられる。

[0059] 本明細書において「その活性断片」とは、上述した抗体の部分領域であって、該抗体が有する抗原特異的結合活性と実質的に同等の活性を有するポリペプチド鎖又はその複合体をいう。例えば、少なくとも1つの軽鎖可変領域 (V_L) と少なくとも一つの重鎖可変領域 (V_H) を有するポリペプチド鎖又はその複合体が該当する。具体例としては、免疫グロブリンを様々なペプチダーゼで切断することによって生じる抗体断片等が挙げられる。より具体的な例としては、Fab、F(ab')₂、Fab'等が該当する。

[0060] 本発明の抗シアル酸抗体は、鳥及び哺乳動物を含めたあらゆる動物由来とすることができる。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、ニワトリ又はヒト等が挙げられる。

[0061] これらの抗シアル酸抗体は、当該分野で公知の方法に準じて作製すればよ

い。例えば、特許文献3に記載の方法を参照されたい。あるいは、市販の抗体を利用してもよい。

[0062] 「シアル酸結合性レクチン」とは、末端シアル酸含有糖タンパク質、すなわち血清型糖タンパク質との結合活性を有する抗体以外のタンパク質をいう。該糖タンパク質における非還元末端のシアル酸を認識し、それに結合し得るレクチンであれば、その種類等は特に限定はしない。例えば、 $\alpha 2,6$ シアル酸を末端糖鎖とする糖タンパク質を認識し、それに結合できる $\alpha 2,6$ シアル酸結合性レクチンが挙げられる。 $\alpha 2,6$ シアル酸結合性レクチンの具体例としては、ニホンニワトコ (*Sambucus sieboldiana*) 由来の凝集素SSAレクチン、セイヨウニワトコ (*Sambucus nigra*) 由来の凝集素SNAレクチン及びキカラスウリ (*Trichosanthes japonica*) 由来のI型凝集素TJA-Iレクチンが挙げられる。これらは、市販のレクチンを利用してもよい。例えば、SSAレクチンであれば生化学バイオビジネス社の300177あるいはMBL社のJ1001014を、SNAレクチンであればシグマ社のL6890 Lectin from *Sambucus nigra* (elder)を、TJA-Iレクチンであれば生化学バイオビジネス社の300186を利用することができる。

[0063] 本明細書において「被検体」とは、検査に供される個体、すなわち体液又は中枢神経細胞を提供する脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。被検体は、何らかの疾患を有する個体又は健常体のいずれであってもよい。

[0064] 「体液」とは、被検体から採取された末端GlcNAc含有糖タンパク質を含み得る液体状の生体試料をいう。例えば、髄液、血液（血清、血漿及び間質液を含む）、リンパ液、神経根周囲液、各組織若しくは細胞の抽出液、涙液、鼻汁、唾液、尿、腔液、精液等が挙げられる。好ましくは、髄液、血液、リンパ液、又は神経根周囲液である。体液は、被検体から採取したものをそのまま使用してもよいし、必要に応じて希釈若しくは濃縮、又はヘパリンのような血液凝固阻止剤を添加したものを使用してもよい。体液の採取は、当該分野の公知の方法に基づいて行なえばよい。例えば、血液やリンパ液であれば

、公知の採血方法に従えばよい。具体的には、末梢血であれば、末梢部の静脈等に注射をして採取することができる。また、髄液であれば、公知の腰椎穿刺によって採取すればよく、また、臍帯血であれば分娩後胎盤の娩出前の臍帯に針を刺して採取すればよい。体液は、採取後直ちに利用してもよいし、冷凍又は冷蔵により一定期間保存した後、必要に応じて解凍等の処理を行ない利用することもできる。本実施形態において、髄液を用いる場合には、少なくとも0.1mL、好ましくは少なくとも1mL、より好ましくは少なくとも10mLの容量を用いれば、検出に十分な量の末端GlcNAc含有糖タンパク質を富化・分離することができる。また、血液を用いる場合には、少なくとも1mL、好ましくは少なくとも10mL、より好ましくは少なくとも30mLの容量を用いれば、検出に十分な量の末端GlcNAc含有糖タンパク質を富化・分離することができる。

[0065] 「中枢神経細胞」とは、被検体から採取された脳（大脳、中脳、間脳、橋、小脳及び延髄を含む）細胞又は脊髄細胞、それらの細胞の集合体である組織をいう。中枢神経細胞は、本方法での使用に際し、予めホモジナイズした細胞抽出液としておくことが好ましい。膜結合性の髄液型糖タンパク質の抽出にはホモジナイズの際に界面活性剤（NP-40, TritonX-100等）を加える。また、必要に応じて、生理食塩水やPBSバッファ等の媒体を加えてもよい。

[0066] （方法）

本工程は、被検体由来の体液又は中枢神経細胞（以下、これらをまとめて「体液等」とする）中に含まれる末端シアル酸含有糖タンパク質をシアル酸結合性物質と結合させて、形成された複合体を前記体液等から除去することによって達成することができる。

[0067] 前記複合体を形成させる方法は、体液等と前記シアル酸結合性物質とを接触させればよい。例えば、シアル酸結合性物質を含む流体物と体液等とを混合する方法が挙げられる。形成された複合体を体液等中から除去する方法は、当該分野で公知のいずれの方法も利用することができる。例えば、シアル酸結合性物質を担体表面に固定化又は化合物で標識化したものを、体液等と

接触させた後、その担体又は化合物の特性に基づいて除去する方法が挙げられる。

[0068] 前記「担体」には、高分子多糖支持体（例えば、セファロース若しくはセファデックス）、磁性ビーズ、シリカ、ガラス、金属（例えば、金、白金、銀）、プラスチック樹脂（例えば、ポリスチレンのようなプラスチック、ポリアクリルアミド等）、セラミックス、ラテックス等が含まれる。担体の形状は、特に限定はしないが、表面積の大きい形状が好ましい。これは、担体表面に固定化したシアル酸結合性物質と体液等中の末端シアル酸含有糖タンパク質との接触機会を増大させ、複合体をより効率的に形成させるためである。例えば、ビーズ状、多孔質粒子形状、繊維集合形状等が好ましい。さらに、カラム等に充填し易い形状は、より好ましい。

[0069] 前記「化合物」には、蛍光色素（例えば、Cy3、Cy5、FAM、HEX、VIC、TAMRA）、発光物質、又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジン等が含まれる。

[0070] 本発明におけるシアル酸結合性物質の担体への固定化又は化合物による標識化は、不可逆的な結合、すなわち、一旦形成された後に逆反応によって解離しない結合又はその解離が無視できる程度の結合が好ましい。このような不可逆的結合の例としては、官能基間の求核的付加反応、求核置換反応若しくは求電子置換反応といった化学反応による共有結合、又は高親和力による非共有結合が挙げられる。化学反応による共有結合は、例えば、直接的結合であれば、シアル酸結合性物質と担体又は化合物をそれぞれ適当な官能基で修飾しておき、両官能基間での化学反応による共有結合を形成させることによって達成できる。この場合、両官能基が共有結合を形成し得る組み合わせとなるようにする。このような組み合わせとしては、例えば、アミノ基とアルデヒド基、チオール基とマレイミド基、アジド基とアセチレン基、アジド基とアミノ基、ヒドラジン基とケトン基、ヒドラジン基とアルデヒド基等が挙げられる。このような化学反応により共有結合を形成させる方法は、当業者には周知の技術である。

[0071] 末端シアル酸含有糖タンパク質とシアル酸結合性物質の結合により形成された複合体の分離は、前記担体又は化合物の特性を利用した公知の方法を適宜用いればよい。ここでいう「特性」とは、前記担体又は化合物が有する特有の性質であって、例えば、磁力、比重、蛍光、発光、親和力等が挙げられる。具体例を挙げれば、シアル酸結合性物質を高分子多糖支持体やシリカ等に固定化した場合には、カラムクロマトグラフィー（HPLCを含む）法が利用できる。具体的には、シアル酸結合性物質を固定化した高分子多糖支持体をレジンとしてカラムに充填した後、体液等をカラムに積載（アプライ）し、カラムから流れ出た試料液体、すなわち、末端シアル酸含有糖タンパク質がレジんに捕捉された残りの画分を回収すればよい。また、シアル酸結合性物質をガラスビーズやセファデックスビーズ等の担体に固定化した場合であれば、シアル酸結合性物質を固定化したビーズを体液等に投入し、必要に応じて攪拌した後、担体の比重を利用して遠心により末端シアル酸含有糖タンパク質が結合したシアル酸結合性物質固定化ビーズを沈降させ、上層液を回収すればよい。さらに、シアル酸結合性物質を磁気ビーズに固定化した場合であれば、シアル酸結合性物質固定化磁気ビーズを体液等に投入し、必要に応じて攪拌する等した後、磁力を利用して末端シアル酸含有糖タンパク質が結合したシアル酸結合性物質固定化ビーズを分離し、液体部分を回収すればよい。あるいは、シアル酸結合性物質を蛍光色素や発光物質等の化合物で標識化した場合であれば、標識化シアル酸結合性物質を体液等に投入し、必要に応じて攪拌した後、セルソーターやフローサイトメトリーを用いて、標識化シアル酸結合性物質が末端シアル酸含有糖タンパク質と結合した複合体を分配除去することもできる。これらは、いずれも、それぞれ当該分野で公知の方法に従えばよい。

[0072] 本工程は、同一の除去方法を複数回、例えば、2回、3回、4回、5回若しくは6回又は異なる除去方法を二以上組み合わせて行なうことにより、体液等中の末端シアル酸含有糖タンパク質をより確実に除去することもできる。

[0073] 前述のように、従来は、PVLレクチンがGlcNAc非還元末端に強く結合し、か

つ血液型糖タンパク質の主要な糖鎖末端であるSia- α 2,6-Gal非還元末端にはほとんど結合しないことが当該分野の技術常識であったことから、当業者は、より簡易な方法の開発を目指して、PVLレクチンのみを用いて髄液型糖タンパク質を富化することを想定していた。しかし、実際には、PVLレクチンは、Sia- α 2,6-Gal非還元末端にも結合することが本発明者らによって判明し、髄液型糖タンパク質を富化するためには、本工程が必須であることが明らかとなった。

[0074] 本工程によって、体液又は中枢神経細胞中に包含される末端シアル酸含有糖タンパク質、すなわち血清型糖タンパク質を除去することができる。

[0075] 1-2. 末端GlcNAc含有糖タンパク質複合体分離工程
(構成)

「末端GlcNAc含有糖タンパク質複合体分離工程」(0102)(以下、単に「複合体分離工程」とする)とは、前記除去工程(0101)で得られた試料中に存在する末端GlcNAc含有糖タンパク質をGlcNAc結合性物質に結合させて、形成された複合体を分離・回収する工程をいう。

[0076] 前記除去工程(0101)後に得られた試料中には、末端シアル酸含有糖タンパク質は含まれないか、含まれていても極めて微量である。それ故、この試料中で糖鎖末端にGlcNAc残基を有する糖タンパク質は、原則としては本発明の目的とする髄液型糖タンパク質となる。したがって、本工程は、前記除去工程(0101)を経た試料から末端GlcNAc含有糖タンパク質をGlcNAc結合性物質と結合させた複合体の状態で分離することを特徴とする。

[0077] 本明細書において「GlcNAc結合性物質」とは、GlcNAc又はGlcNAc末端糖鎖と親和的に、好ましくは特異的に結合する物質をいう。GlcNAcとGlcNAc結合性物質間の結合は、本工程で得られた試料溶液を後述する末端GlcNAc含有糖タンパク質抽出工程に供するのであれば、可逆的結合であることが好ましい。GlcNAc結合性物質としては、例えば、抗GlcNAc抗体若しくはその活性断片又はGlcNAc結合性レクチンが挙げられる。

[0078] 「抗GlcNAc抗体」とは、GlcNAcを特異的に認識し、それに結合し得る糖鎖

抗体をいう。この抗GlcNAc酸抗体は、当該分野で公知の方法に準じて作製すればよい。例えば、特許文献3に記載の方法を参照されたい。例えば、OMB4 (Archives of Biochemistry and Biophysics 1997, vol.342(1), p48-57 Oza wa, H et al.)を利用することができる。

[0079] 「GlcNAc結合性レクチン」とは、GlcNAc、又はそれを糖鎖末端に有する糖タンパク質と結合する活性を有する抗体以外のタンパク質をいう。末端糖鎖のGlcNAcを認識し、それに結合し得るレクチンであれば、その種類等は特に限定はしない。例えば、ムジナタケ (*Psathyrella velutina*) 由来のPVLレクチン及びパンコムギ由来のWGAレクチンが挙げられる。これらは、市販のレクチンを利用してもよい。例えば、PVLレクチンであれば和光純薬工業の165-17591 *Psathyrella Velutina Lectin*あるいはMBL社のリコンビナントPVLを、又はWGAレクチンであれば生化学バイオビジネス社の300191あるいはMBL社の J1 001016を利用することができる。

[0080] (方法)

本工程は、前記除去工程後に得られた試料溶液中に含まれる末端GlcNAc含有糖タンパク質をGlcNAc結合性物質と結合させて、形成された複合体を回収することによって達成することができる。

[0081] 前記複合体を形成させる方法は、前記除去工程において説明した方法に準ずる。また、形成された末端GlcNAc含有糖タンパク質とGlcNAc結合性物質の複合体を回収する方法も原則的には前記除去工程において説明した方法に準ずる。ただし、本工程は、形成された末端GlcNAc含有糖タンパク質とGlcNAc結合性物質の複合体を回収し、それ以外の試料溶液を除去する点で前記工程とは異なる。

[0082] 本工程は、複合体を回収した後の試料溶液を、さらに同一の分離方法に、又は二以上の異なる分離方法に、複数回供することにより、前記試料溶液中の末端GlcNAc含有糖タンパク質をより確実に回収することもできる。

[0083] 回収後の末端GlcNAc含有糖タンパク質とGlcNAc結合性物質の複合体は、適当なバッファ（例えば、PBSバッファ等）で数回洗浄することによって、混在

する夾雑物を除去してもよい。

[0084] 本工程によって、体液又は中枢神経細胞中に包含される末端GlcNAc含有糖タンパク質、すなわち髄液型糖タンパク質を選択的に富化・分離することができる。

[0085] 1－3. 末端GlcNAc含有糖タンパク質抽出工程
(構成)

「末端GlcNAc含有糖タンパク質抽出工程」(0103)(以下、単に「抽出工程」とする)とは、前記末端GlcNAc含有糖タンパク質とGlcNAc結合性物質の複合体を解離させて、末端GlcNAc含有糖タンパク質を溶出する工程である。本工程は、本発明において選択可能な任意の工程である。

[0086] (方法)

前記複合体を構成する末端GlcNAc含有糖タンパク質とGlcNAc結合性物質とを解離させる方法は、GlcNAc結合性物質の性質に応じて、当該分野で公知の方法を用いればよい。

[0087] 例えば、GlcNAc結合性物質が抗GlcNAc抗体の場合であれば、同一ハプテンを有するGlcNAc等を加えて、末端GlcNAc含有糖タンパク質との間で抗GlcNAc抗体を競合させることにより解離させることができる。

[0088] また、複合体高塩濃度条件(例えば、 $Mg^{2+} > 2M$)下、強酸性条件(例えば、Gly-HCl pH3>)下で解離させてもよい。

[0089] GlcNAc結合性物質がGlcNAc結合性レクチンの場合であれば、ハプテン糖であるGlcNAcを添加することで解離させることができる。

[0090] 本工程によって、前記複合体から末端GlcNAc含有糖タンパク質のみを分離、取得することができる。

[0091] 1－4. アルブミン除去工程
(構成)

「アルブミン除去工程」(0104)とは、前記除去工程に先立ち、アルブミン結合性物質を用いて、体液等中に含まれるアルブミンを除去する工程である。本工程も、本発明においては選択可能な任意の工程である。

[0092] 本明細書における「アルブミン」は、体液等中に含まれるアルブミンであって、主として血清アルブミンを意味する。

[0093] (方法)

本工程の基本原理は、前記除去工程(0101)に準ずる。すなわち、本工程は、アルブミン結合性物質を体液等と接触させて、体液中のアルブミン結合性物質と前記アルブミン結合性物質との複合体を形成させた後、その複合体を除去することにより達成できる。

[0094] 「アルブミン結合性物質」とは、アルブミンと親和的に、好ましくは特異的に結合する物質をいう。この結合は可逆的結合又は不可逆的結合のいずれであってもよいが、一旦結合したアルブミンが解離して、再び体液等中に混入することを防ぐためには、不可逆的であることが望ましい。

[0095] アルブミン結合性物質としては、例えば、抗アルブミン抗体又はその活性断片が挙げられる。

[0096] 「抗アルブミン抗体」とは、アルブミン、主として血清アルブミンを認識し、それに結合し得る抗体をいう。この抗体は、市販の抗体を利用してもよい。例えば、Bethyl社のA80-129A Human Albumin Antibody Affinity Purified又はコスモ・バイオ株式会社のKR-002抗体等を利用することができる。

[0097] 体液等中のアルブミンとアルブミン結合性物質の複合体を形成させる方法、及び／又は形成されたアルブミンとアルブミン結合性物質の複合体を除去する方法は、前記除去工程(0101)において説明した方法に準ずる。

[0098] 本工程によって、夾雑物であるアルブミンが除去された体液等を前記末端シアル酸含有糖タンパク質除去工程に供することができる。

[0099] 1-5. 効果

本実施形態によれば、体液等中から、従来、その検出が極めて困難であった末端GlcNAc含有糖タンパク質、すなわち、髄液型糖タンパク質を効率的かつ選択的に富化・分離することができる。

[0100] <実施形態2：中枢神経系疾患用指標マーカー選択方法>

(概要及び構成)

本発明の第2の実施形態は、中枢神経系疾患用の指標マーカーを選択する方法である。

[0101] 本実施形態は、前記実施形態1の方法を利用して、体液等中に大量に存在する血液型糖タンパク質、すなわち、末端シアル酸含有糖タンパク質群を効率的に除去し、目的の髄液型糖タンパク質、すなわち、末端GlcNAc含有糖タンパク質群を富化・分離した後に、得られたその末端GlcNAc含有糖タンパク質群の中から特定の中枢神経系疾患用の指標マーカーとなる末端GlcNAc含有糖タンパク質を選択する方法である。

[0102] 「指標マーカー」とは、病理学的過程又は治療的介入に対する薬理学的応答の指標として、客観的に測定及び評価される特性を有する物質をいう。したがって、本明細書において「中枢神経系疾患用（の）指標マーカー」とは、特定の中枢神経系疾患等に対する罹患の有無やその重度に応答し、客観的に測定及び評価することのできる特性を有する糖タンパク質又はその断片を意味する。その具体的な例については、後述の実施形態4に記載する。

[0103] 本明細書において「中枢神経系疾患」とは、脳及び／又は脊髄の機能異常及び／又は形態異常（発生異常を含む）を原因として発症する疾患を言う。例えば、神経変性疾患としてはアルツハイマー病（AD: Alzheimer's Disease及びその前病変である軽度認知障害: Mild Cognitive Impairment）、前頭側頭葉型認知症、レビー小体型認知症、パーキンソン病、進行性核上性麻痺、若しくは大脳皮質基底核変性症等が挙げられる。また、代謝異常症としては特発性正常圧水頭症（iNPH）、閉塞性水頭症若しくは感染性あるいは代謝性の脳症等が、自己免疫関連疾患としては多発性硬化症（MS: multiple sclerosis）、視神経脊髄炎（NM0: neuromyelitis optica）、ギランバレー症候群（末梢の運動神経が冒されることが多いが、pharyngeal-cervical-brachial variantでは脳神経が傷害される）、急性散在性脳脊髄炎（ADEM: acute disseminated encephalomyelitis）等が、精神疾患としては統合失調症、双極性障害（bipolar disorder）若しくはうつ病（major depression）が、腫瘍性疾患としては、神経上皮組織性腫瘍（神経膠腫、神経細胞性腫瘍等）、神経鞘性

腫瘍（神経鞘腫、神経線維腫等）、髄膜性腫瘍（髄膜腫、その他の間葉性腫瘍）、トルコ鞍部腫瘍、転移性腫瘍等があげられる。感染症として、細菌性あるいはウィルス性の脳髄膜炎があげられる。

[0104] 本実施形態の方法は、図2で示すように末端GlcNAc含有糖タンパク質富化・分離工程（0201）及び比較選択工程（0202）を含む。以下、各工程の方法について具体的に説明をする。

[0105] （方法）

2-1. 末端GlcNAc含有糖タンパク質富化・分離工程

「末端GlcNAc含有糖タンパク質富化・分離工程」（0201）とは、前記実施形態1の方法を用いて、対照体由来の体液等（以下「対照体試料」とする）と特定の中樞神経系疾患に罹患した個体の体液等（以下「罹患個体試料」とする）のそれぞれから末端GlcNAc含有糖タンパク質群を分離する工程である。

[0106] 本明細書で「対照体」とは、対照体試料採取時において対象となる中樞神経系疾患（以下「対象疾患」とする）に罹患していない個体をいう。例えば、健常体のようにいずれの中樞神経系疾患にも罹患していない個体のみならず、その対象疾患には罹患していないが、他の中樞神経系疾患に罹患している個体も対象疾患罹患個体に対する対照体となり得る。対象疾患には罹患していないが、その特定の中樞神経系疾患と症状が非常に類似する他の中樞神経系疾患に罹患している個体は、本実施形態における対照体として、特に好ましい。異なる中樞神経系疾患であって、その症状が非常に類似するために鑑別が困難な疾患の組合せについて以下に述べる。

[0107] 上記疾患のうち、精神疾患は症候学によって診断されているが、特に鬱病と双極性障害（鬱状態と躁状態を繰り返す）の鑑別が難しい。従って、精神疾患全般にわたって新しい診断マーカーが求められている。また、腫瘍性疾患の場合は、発生部位により神経学的な症状が異なる上に、形態学的な検査により、そのサイズを測定することが容易である。しかし、腫瘍性疾患の予後を決定づけるのは腫瘍細胞の浸潤性であり、このような生物学的な性質を

反映するバイオマーカーはほとんどない。

[0108] 自己免疫性の脱髄疾患の代表として多発性硬化症（MS）が知られている。MSは白人女性に多い疾患で、その患者数は、米国では40万人（750人に1人）、全世界では250万人に達するといわれている。日本におけるMSの発症頻度は、1万人（1万人に1人）で、従来、発症頻度の低い疾患と考えられてきたが、生活の欧米化（特に食事）に伴い、近年、発症頻度が著しく増加してきている。

[0109] 視神経脊髄炎（デービック病）は、歴史的には、多発性硬化症の亜型と考えられていた。しかし、2005年に、視神経脊髄炎患者の持つ自己抗体が水チャンネルであるアクアポリン-4を認識することが示され、多発性硬化症とは独立した疾患であることが示された。これ以降は、本抗体の存在により確定診断が行われている。しかし、この抗体の測定は技術的に難しく、日本においては4研究室でのみ測定可能であり、その陽性率も60～80%と施設による差が著しい。NM0及びMSは、急性期にはステロイド治療等の強力な処方が必要である。また、慢性期には、再発予防のため、MSではインターフェロン β を用いるのに対し、NM0ではインターフェロン β が症状を増悪させることがあるため、少量のステロイド剤や免疫抑制剤が使用される。したがって、両疾患では治療法が異なることから、その鑑別診断は、極めて重要な課題である。それ故、両疾患を正確に診断可能な診断マーカーが求められている。

[0110] 中枢神経疾患として上記に列挙したものの中には、進行にともない（MRIやCT検査）形態学的に（MRIやCT検査にて）診断できるものもあるが、病初期には鑑別が難しい疾患が多い。例えば、パーキンソン病と進行性核上性麻痺、あるいは大脳皮質基底核変性症はよく似た歩行異常を示し、形態学的な変化がほとんど認められない。また、初期のアルツハイマー病とレビー小体型認知症や前頭葉側頭葉型認知症の初期病変の鑑別は容易ではない。特に前頭葉側頭葉型認知症ではアルツハイマー病と同様に髄液中リン酸化タウタンパク質の増加が見られ、従来最も有効とされる鑑別診断マーカーが利用できない。進行したアルツハイマー病においては、認知症と脳室拡大（脳萎縮）

という顕著な形態変化が見られるが、この2つの症状は特発性正常圧水頭症のものと同一である。事実、特発性正常圧水頭症患者数は31万人と推測されているが、後述する本疾患の根治手術を受けているのは年間1200人（予想患者数の0.4%）にすぎない。すなわち、多く特発性正常圧水頭症患者がアルツハイマー病と誤って診断され、治療の恩恵を受けられないまま放置されている可能性が高い。特発性正常圧水頭症は髄液の過剰が原因であることから、簡単な小手術（例えば脳室と腹腔をチューブでバイパスするシャント術）で過剰髄液を排液すれば完治可能である。すなわち“治る”認知症であることからその正確な診断が求められている。

[0111] 上記疾患のマーカーの発見について下記の実施例で詳述する。

[0112] 個体は、死後直後であって、中枢神経系に影響が及んでいないことが明らかである限り、必ずしも生体である必要はない。本発明において、個体は、好ましくは哺乳動物、より好ましくは霊長類、特に好ましくはヒトである。

[0113] 本工程の方法の詳細については、前記実施形態1で説明しているため、ここではその詳細を省略する。本工程によって得られる末端GlcNAc含有糖タンパク質群、すなわち髄液型糖タンパク質群の一例として、後述の実施例2において分離された表1で示す髄液型糖タンパク質群が挙げられる。これらは、いずれも本実施形態の中枢神経系疾患用指標マーカー候補となり得る。

[0114] 2-2. 比較選択工程

「比較選択工程」（0202）とは、前記工程で、対照体試料及び罹患個体試料のそれぞれから得られた末端GlcNAc含有糖タンパク質を定量化し、両者で対応する末端GlcNAc含有糖タンパク質の分量を比較した後、統計学的に有意な量的差異が見られる場合には、その末端GlcNAc含有糖タンパク質を前記罹患個体試料に基づく特定の中枢神経系疾患用指標マーカーとして選択する工程である。

[0115] 「分量」とは、前記工程で得られた末端GlcNAc含有糖タンパク質群中における特定の末端GlcNAc含有糖タンパク質の量であって、濃度のような相対量であってもよく、又は重量若しくは容量のような絶対量であってもよい。

- [0116] 本工程では、まず、前記工程で対照体試料と罹患個体試料のそれぞれから得られた末端GlcNAc含有糖タンパク質群中に含まれる末端GlcNAc含有糖タンパク質を定量する。本検出及び定量する方法は、特に限定はしない。例えば、質量分析法、抗原抗体反応法及び電気泳動法等を利用することができる。
- [0117] 「質量分析法」は、質量分析機を用いたあらゆる公知の定量方法を包含する。例えば、高速液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS）、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法（LC-MS/MS）、ガスクロマトグラフ質量分析法（GC-MS）、ガスクロマトグラフタンデム質量分析法（GC-MS/MS）、キャピラリー電気泳動質量分析法（CE-MS）及びICP質量分析法（ICP-MS）が挙げられる。
- [0118] 「抗原抗体反応方法」は、抗体を用いたあらゆる公知の定量方法を包含する。例えば、ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）法若しくはそれに類する方法、フローサイトメトリー法、表面プラズモン共鳴（SPR）法、又は水晶振動子マイクロバランス（QCM）法が挙げられる。
- [0119] 「電気泳動法」は、電気泳動を利用するあらゆる公知の定量方法を包含する。例えば、二次元電気泳動法が挙げられる。
- [0120] これらの検出・定量方法は、いずれも当該分野に公知の技術であるので、それぞれの公知の方法に準じて行えばよい。
- [0121] 次に、対照体と罹患個体のそれぞれの対応する、すなわち同じ種類の末端GlcNAc含有糖タンパク質の分量を定量結果に基づいて比較する。このとき、末端GlcNAc含有糖タンパク質群に含まれるタンパク質であって、対照体と罹患個体との間で発現に量的差異のないことが期待される公知のタンパク質を内部コントロールとして用いれば、対照体と罹患個体の定量結果を補正することができる。このような内部コントロール用のタンパク質として、例えば、アルブミンが挙げられる。比較の結果、統計学的に有意な量的差異が見られる末端GlcNAc含有糖タンパク質をその特定の中樞神経系疾患用指標マーカーとして選択する。選択される中樞神経系疾患用指標マーカーは、特定の中樞神経系疾患に特異的な指標マーカーであってもよいし、複数の中樞神経系疾

患用の指標マーカーであってもよい。

- [0122] 「統計学的に有意」とは、前記2つの対応する末端GlcNAc含有糖タンパク質の量的差異を統計学的に処理したときに、両者間に有意差があることをいう。具体的には、例えば、危険率（有意水準）が5%、1%又は0.1%より小さい場合が挙げられる。統計学的処理の検定方法は、有意性の有無を判断可能な公知の検定方法を適宜使用すればよく、特に限定しない。例えば、スチューデントt検定法、多重比較検定法を用いることができる。文献名（鈴木▼完▲之、統計学の基礎、永田靖ら、統計的多重比較法の基礎）

統計学的に有意な量的差異は、両者の差が1.3倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは1.7倍以上、一層好ましくは2倍以上である。統計学的に有意な量的差異は、罹患個体由来の特定の末端GlcNAc含有糖タンパク質が、対照体由来のその末端GlcNAc含有糖タンパク質の分量よりも多くても、又は少なくともよい。特定の中枢神経系疾患において、特異的に増加又は減少する末端GlcNAc含有糖タンパク質は、いずれも本発明の指標マーカーの候補となり得るからである。特に、検出・定量結果において、対照体又は罹患個体のいずれか一方の体液等中に存在し、他方には全く存在しない末端GlcNAc含有糖タンパク質は、その特定の中枢神経系疾患用の好ましい指標マーカーとなり得る。

- [0123] なお、対照体試料から得られた末端GlcNAc含有糖タンパク質群における各種糖タンパク質の分量をデータベース化しておけば、末端GlcNAc含有糖タンパク質富化・分離工程を同条件下で実行する限りにおいて、中枢神経系疾患に罹患した個体由来の体液等のみを分析すればよく、その都度対照体由来の体液等を分析する必要がないため便利である。

- [0124] 本実施形態によれば、従来探索が困難であった中枢神経系疾患に罹患した個体の体液、特に髄液又は中枢神経細胞から、その中枢神経系疾患用の指標マーカーとなり得る末端GlcNAc含有糖タンパク質を容易かつ効率的に選択することができる。

- [0125] 本実施形態で単一の中枢神経系疾患に対して、末端GlcNAc含有糖タンパク

質が複数選択された場合には、いずれもその特定の中枢神経系疾患用指標マーカーとなり得る。複数の指標マーカーがあれば、多面的に診断することが可能となるので、より正確な診断を行うことができる点で有利である。また、選択された一の指標マーカーが複数の中枢神経系疾患用の指標マーカーとなる場合であっても、その指標マーカーが特定の中枢神経系疾患とそれに類似の症状を呈する他の中枢神経系疾患とを鑑別可能であれば、指標マーカーとしては有効である。例えば、後述する実施例に記載のように、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、NM0患者の髄液において、その発現量が増大する。ここで、仮に $\alpha 2$ -マクログロブリンの髄液中の発現量が他の中枢神経系疾患患者においても同様に増大するとしても、NM0と極めて症状の類似するMS患者の髄液において、その発現量が増大していなければ、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、その患者がNM0とMSのいずれに罹患しているかを診断する上で、有効なNM0指標マーカーとなり得る。さらに、一の指標マーカーが複数の中枢神経系疾患用の指標マーカーとなる場合であって、かつその複数の中枢神経系疾患が類似の症状を呈する場合であっても、個々の中枢神経系疾患が複数の異なる指標マーカーを有しているのであれば、その疾患に特異的な指標マーカーの組合せパターンによって、それぞれの疾患の同定は可能であるので、やはり指標マーカーとして機能し得る。

[0126] 従来の技術では、体液等から特定の中枢神経系疾患用指標マーカーを新規に分離することすらも困難であった。まして、単一の中枢神経系疾患に対して複数の指標マーカーを網羅的に分離することは不可能に近かった。本実施形態の方法によれば、体液等から富化・分離された、例えば、表1で示す髄液型糖タンパク質から、特定の中枢神経系疾患用の指標マーカーを容易にかつ網羅的に分離することができる。

[0127] <実施形態3：末端GlcNAc含有糖タンパク質富化・分離キット>

本発明の第3の実施形態は、末端GlcNAc含有糖タンパク質、すなわち髄液型糖タンパク質を体液等から選択的に富化・分離することのできるキットである。

[0128] (構成)

本実施系他のキットは、必須の構成物としてシアル酸結合性物質及びGlcNAc結合性物質を含む。

[0129] シアル酸結合性物質としては、例えば、抗シアル酸抗体及び／又はシアル酸結合性レクチンが挙げられる。本キットで対象となる末端シアル酸含有糖タンパク質は、末端糖鎖が $\alpha 2,6$ シアル酸であることが好ましい。したがって、本キットに包含される抗シアル酸抗体は、抗 $\alpha 2,6$ シアル酸抗体、又はその活性断片であることが好ましい。また、シアル酸結合性レクチンは、 $\alpha 2,6$ シアル酸結合性レクチン、例えば、SSAレクチンであれば生化学バイオビジネス社の300177あるいはMBL社のJ1001014を、SNAレクチンであればシグマ社のL6890 Lectin from Sambucus nigra (elder)を、TJA-Iレクチンであれば生化学バイオビジネス社の300186を利用することができる。

[0130] GlcNAc結合性物質としては、例えば、抗GlcNAc抗体又はその活性断片であることが好ましい。抗GlcNAc抗体は、例えば、OMB4抗体 (Archives of Biochemistry and Biophysics 1997, vol.342(1), p48-57 Ozawa, H et. al.) が挙げられる。GlcNAc結合性レクチンは、和光純薬工業の165-17591 Psathyrella Velutina LectinあるいはMBL社のリコンビナントPVLを、又はWGAレクチンであれば生化学バイオビジネス社の300191あるいはMBL社のJ1001016を利用することができる。

[0131] 前記構成物に加えて、本実施形態のキットは、複合体解離用バッファを包含することもできる。「複合体解離用バッファ」とは、末端GlcNAc糖タンパク質とGlcNAc結合性物質との複合体を解離させることのできるカオトロピック効果を有するバッファをいう。例えば、高塩濃度（例えば、 $Mg^{2+} > 2M$ ）バッファ、強酸性バッファ（ $pH > 2.5$ ）、又はカオトロピック剤（例えば、GlcNAc）を包含するバッファが該当する。

[0132] 本実施形態のキットは、さらに、アルブミン結合性物質を含んでもよい。アルブミン結合性物質の具体例としては、例えば、ブルーセファロース又は抗アルブミン抗体若しくはその活性断片が挙げられる。

- [0133] 上記シアル酸結合性物質、GlcNAc結合性物質及び／又はアルブミン結合性物質は、必要に応じて担体に固定化されているか、あるいは蛍光色素又は発光物質等で標識化されていてもよい。
- [0134] 上記構成物の他、本実施形態のキットは、前記シアル酸結合性物質、GlcNAc結合性物質及又はアルブミン結合性物質を充填するためのカラム（スピンカラム等）、洗浄用バッファ（PBSバッファ、生理食塩水等）、及び／又はプロトコル等を記載した説明書等を包含することができる。
- [0135] さらに、本実施形態のキットは、特定中枢神経系疾患用指標マーカー結合物質を含んでもよい。「特定中枢神経系疾患用指標マーカー結合物質」とは、公知の特定の中枢神経系疾患用指標マーカーの他、前記実施形態2等の方法で得られる指標マーカー（末端GlcNAc糖タンパク質）を特異的に認識し、それに結合できる物質を言う。例えば、特定の末端GlcNAc糖タンパク質に対する抗体又はその活性断片が該当する。具体例として、突発性正常圧水頭症（iNPH）の指標マーカーであるトランスフェリンー1及びトランスフェリンー2（特許文献3）に対する抗体（抗トランスフェリンー1抗体及び抗トランスフェリンー2抗体）又はその活性断片が挙げられる。
- [0136] このような特定中枢神経系疾患用指標マーカー結合物質を包含する場合、本実施形態のキットは、その特定中枢神経系疾患診断用キットとなり得る。すなわち、被検者から採取した体液中の末端GlcNAc糖タンパク質群において、特定の疾患（前記例ではiNPH）に関連する指標マーカーを添付のその疾患用指標マーカー結合物質を用いて検出・定量することができる。定量結果が、対照体との間で統計学的に有意な量的差異がある場合には、その被検体は当該疾患用指標マーカー結合物質に対応する中枢神経系疾患に罹患している可能性が高いと診断することができる。
- [0137] （効果）
- 本実施形態のキットによれば、体液等中から髄液型糖タンパク質である末端GlcNAc糖タンパク質を簡便かつ効率的に分離・付加することができる。
- [0138] ＜実施形態4：中枢神経系疾患用指標マーカー＞

本発明の第4の実施形態は、中枢神経系疾患用指標マーカーである。

[0139] 本実施形態の「中枢神経系疾患用指標マーカー」は、後述する実施例2において、前記実施形態2の方法を用いて得られた表1に記載の糖タンパク質群より選択される一以上の糖タンパク質又はその断片に基づく。

[0140] 表1に記載の13種の糖タンパク質は、いずれも本発明に記載の髄液型糖タンパク質、すなわち非還元末端にN-アセチルグルコサミン残基を含み、かつ α 2,6シアル酸を含まない糖鎖を有する糖タンパク質である。また、「その断片」とは、表1に記載の各糖タンパク質において、GlcNAc残基を含み、かつ α 2,6シアル酸を含まない糖鎖を有する糖タンパク質断片をいう。

[0141] 本実施形態の「中枢神経系疾患用指標マーカー」の具体例としては、例えば、中枢神経系疾患が視神経脊髄炎(NMO)であれば、表1で示される α 2-マクログロブリン又はその断片が挙げられる。実施形態2で説明したように、GlcNAc残基を含み、かつ α 2,6シアル酸を含まない糖鎖を有する α 2-マクログロブリン又はその断片は、NMO患者では増加するがMS患者では増加しない(後述の実施例3を参照)。したがって、 α 2-マクログロブリン又はその断片は、被検体がNMO又は多発性硬化症(MS)のいずれに罹患しているかを判別する場合において、非常に有用なNMO又はMS用指標マーカーとなり得る。

[0142] <実施形態5：中枢神経系疾患罹患判別方法>

(概要及び構成)

本発明の第5の実施形態は、特定の中枢神経系疾患に関する罹患の有無を判別する方法である。本実施形態の方法は、中枢神経系疾患用指標マーカー検出工程と罹患判別工程を含む。

[0143] 5-1. 中枢神経系疾患用指標マーカー検出工程

「中枢神経系疾患用指標マーカー検出工程」とは、被検体由来の体液又は中枢神経細胞から前記実施形態4の中枢神経系疾患用指標マーカーを検出する工程をいう。

[0144] 被検体由来の体液又は中枢神経細胞から中枢神経系疾患用指標マーカーを検出する方法は、前記実施形態1に記載の末端GlcNAc含有糖タンパク質の富

化・分離方法を用いて、体液又は中枢神経細胞中に含まれる中枢神経系疾患用指標マーカー、すなわち髄液型糖タンパク質又はその断片を富化・分離することが好ましい。

[0145] 被検体由来の体液又は中枢神経細胞から実施形態4の中枢神経系疾患用指標マーカー、すなわち、表1に記載の糖タンパク質群又はその断片のいずれをいくつ検出するかについては、罹患の有無を判別すべき特定の中枢神経系疾患の種類、目的に応じて適宜定めればよい。ここでいう「目的」とは、例えば、健康診断のように被験者がいずれかの中枢神経系疾患に罹患しているか又は健常であるかを判別すること、すなわち中枢神経系疾患がまったく特定されていない状態において特定の中枢神経疾患の有無を判別すること、あるいは、被検者が既に何らかの中枢神経疾患に罹患しており、その症状からいくつかの候補疾患に絞り込めてはいるが、候補疾患間で非常に類似する症状のためにいずれの疾患であるかを判別しかねるケースにおいて最終判別することを含む。後者を目的とした場合の具体例として、被験者がNM0と多発性硬化症（MS）のいずれに罹患しているかを最終判別するケースが挙げられる。この場合、中枢神経系疾患用指標マーカーは、表1で示される $\alpha 2$ -マクログロブリン又はその断片のみを検出すれば足りる。

[0146] 中枢神経系疾患用指標マーカーの検出方法は、特に限定はしない。目的とする中枢神経系疾患用指標マーカーを検出できる方法であれば、当該分野で公知のいかなる方法も利用することができる。対象分子が特定されている場合は、抗原抗体反応方法、特にサンドイッチELISA法を好ましく利用することができる。

[0147] 特開2010-121980号（特許文献2）において、髄液型トランスフェリンの定量にはウェスタンブロッティングあるいはレクチンブロッティング法を利用した。より好ましくは、ブロッティング法より測定の感度や定量性にすぐれ、ハイスループットなサンドイッチELISA法を利用することができる。

[0148] 特開2010-121980号（特許文献2）においては、（抗体/レクチン）サンドイッチELISA法として、抗トランスフェリン抗体（捕捉抗体）をプレートに吸着

させ、捕捉された髄液型トランスフェリンの糖鎖部分をPVLレクチンで検出する方法を記載した。しかし、PVLレクチンの結合性の弱さのためと推測されるが、定量的な測定が難しいことが判明した一方、本発明では、PVLレクチンをプレートに吸着させ、髄液型糖鎖を持つ分子をすべて捕捉した後、目的とする分子に対する抗体で検出する方法を開発した(レクチン/抗体サンドイッチELISA法)。この方法によれば、髄液型トランスフェリンの添加回収率実験において80%~90%と良好な値を示した。さらに、本発明によるPVLレクチン・プレートを一枚準備すれば、髄液型糖タンパク質の任意の分子を、あるいは13種類の分子を一斉に定量することが可能である。レクチン/抗体サンドイッチELISA法は松田らの論文(Matsuda, et al., Hepatology, 2010 Jul;52(1):174-82)において、ムチン型糖鎖抗原の測定における有用性がすでに示されており、当該分野で公知の技術であるが、本発明では、髄液型糖鎖を持つ(中枢神経系由来と考えられる)マーカー分子を多種類同時に測定することが可能であり、この結果、診断の感度・特異性を高めるだけでなく、多種類の疾患との鑑別が可能となる。

[0149] 5-2. 判別工程

「罹患判別工程」とは、被検体が特定の中枢神経系疾患に罹患しているか否かを判別する工程である。

[0150] 当該工程は、前記中枢神経系疾患用指標マーカー検出工程の検出結果から、被検体が特定の中枢神経疾患に罹患しているか否かを最終判別する工程である。本実施形態で用いる中枢神経系疾患用指標マーカーは、実施形態2により特定の中枢神経系疾患での検出パターン(すなわち、含有量の増加あるいは減少)が予め判明している。例えば、前述の例を挙げれば、特定の中枢神経系疾患がNM0の場合、中枢神経系疾患用指標マーカーとしての $\alpha 2$ -マクログロブリンは、NM0患者で増加しているが、特定の中枢神経系疾患がMSの場合には、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、MS患者からは増加していない、というものである。したがって、被験者がその症状からNM0とMSのいずれかに罹患している場合、 $\alpha 2$ -マクログロブリンを中枢神経系疾患用指標マーカーとして用い

ることによって、そのマーカーが増加していれば、被験者はNM0に罹患しており、逆に検出されなければMSに罹患していると判別することができる。両疾患は治療法が異なるため、この鑑別は重要である。

[0151] 特定の中枢神経系疾患における表1に記載の各糖タンパク質又はその断片の検出パターンをデータベース化しておけば、各種中枢神経系疾患の罹患の有無を判別する場合、検出すべき必要最小限の中枢神経系疾患用指標マーカーを直ちに選択できるので便利である。

実施例 1

[0152] <髄液型糖鎖タンパク質の富化>

(1) 本発明の分離・付加方法を用いた髄液型糖鎖タンパク質の富化

前記実施形態1に記載の本発明の末端GlcNAc含有糖タンパク質富化・分離方法を用いて、髄液型糖タンパク質を分離した。

[0153] まず、被検体由来の髄液(11mL、0.47mg/mL)を脱塩のためクロマトグラフィ前にリン酸バッファ(20mM, pH7.0)に対して透析した。透析後、アルブミン除去のためにブルーセファロースカラム(HiTrap Blue HP; GE Healthcare)(5mL)にアプライし、流出した非結合画分(A画分)、すなわちアルブミンが除去された画分を回収した(アルブミン除去工程)。このA画分には α 2,6-シアル酸を持つ血清型糖タンパク質が多く含まれている。そこで、これを除去するために、続いてA画分20mLを α 2,6-シアル酸と特異的に結合するSSAレクチンカラム(生化学工業)(5mL)にアプライした(末端シアル酸含有糖タンパク質除去工程)。髄液型糖タンパク質は、糖鎖末端にGlcNAcを持つので、SSAレクチンカラムには吸着されず、非結合性画分(B画分)として流出する。このB画分を回収することで、髄液中に存在する血清型糖タンパク質を除去し、髄液型糖タンパク質を選択的に濃縮することができる。

[0154] 続いて、SSAレクチンカラムクロマト後に回収されたB画分30mLをGlcNAcと特異的に結合するPVLレクチンカラム(和光純薬工業)(5mL)にアプライした。これにより、B画分中の髄液型糖鎖タンパク質である末端GlcNAc含有糖タンパク質は、PVLレクチンカラムに結合する(末端GlcNAc含有糖タンパク質複

合体分離工程)。ここで流出した非結合性画分をC画分とした。カラムを洗浄した後、4mLのPBSで5回洗浄した後、結合した髄液型糖タンパク質を0.2MのGlcNAc (Sigma) で特異的に溶出し、末端GlcNAc含有糖タンパク質富化画分 (D画分: PVLカラム溶出画分) として回収した。

[0155] (2) 各画分中の血清型糖タンパク質の確認

前記(1)の各工程で得られた画分中の血清型糖鎖タンパク質の有無について検証した。

[0156] 20 μ gタンパク質相当のヒト髄液、及び前記B~D画分をそれぞれLaemmliサンプルバッファと混合して加熱した後、4~20%グラジエント・ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS/PAGEに供した。なお、血清型糖タンパク質及び髄液型糖タンパク質の指標として、それぞれトランスフェリン-2及びトランスフェリン-1を用いた。泳動は、40mAの定電流で55分間行った。

[0157] 続いて、SSAレクチンブロットのため、PVDFメンブレンに260mAの定電流で50分間電氣的に転写した。メンブレンを1% BSA-PBSバッファで1時間以上ブロッキングした後、1% BSA-PBSで希釈したビオチン化SSAレクチンと前記ブロッティング後のPVDFメンブレンを1時間反応させた。続いて、PVDFメンブレンを0.05% Tween 20含有PBS洗浄液で15分ずつ3回洗浄した。

[0158] 洗浄後、1% BSA-PBSで希釈したストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合HRP (Amersham、#RPN1231V) と1時間反応させた。その後、前記洗浄液でメンブレンを15分ずつ3回洗浄した。続いて、化学発光基質 (PierceSuperSignal West DuraExtended Duration Substrate) を用いて糖タンパク質のバンドをルミノイメージアナライザ (LAS -1000plus:富士フィルム) で検出した。本実験ではビオチン-SSA (生化学工業 #300442) を1 μ g/mLの濃度で使用した。ビオチン化PVLは市販されていないので、非標識PVLレクチン (和光純薬、Cat.No.165-17591) を購入し、10mM GlcNAc存在下でビオチン化を行った。ビオチン化剤は、Ez-Link NHS-Biotin (ピラス社、Cat.No.21336) を用いた。10mM GlcNAcは、糖の結合部位と相互作用して、この部位がビオチン化されて不活化されるのを防ぐために用いた。

[0159] (結果)

結果を図3に示す。ここで検出されたバンドは、血液型糖タンパク質に由来する。本明細書の背景技術にも記載したように、髄液には、多数の血清タンパク質、すなわち血液型糖タンパク質が存在することが確認された。SSAレクチンカラムを通過したB画分では、髄液中の血液型糖タンパク質の多くのバンドが消失し、末端シアル酸含有糖タンパク質除去工程で血液型糖タンパク質の大部分が除去されたことが確認された。B画分には、まだ血液型糖タンパク質に由来するバンドが若干数観察されるが、PVLレクチンカラムに吸着後、溶出されたD画分では完全に消失していた。一方、PVLレクチンカラムから流出したC画分では、B画分とほぼ同程度の量の血液型糖タンパク質に由来するバンドが観察された。この結果から、SSAレクチンカラムを用いた末端GlcNAc含有糖タンパク質複合体分離工程で、B画分中の残余血液型糖タンパク質をほぼ完全に除去できることが明らかとなった。以上の結果から、本発明の髄液型糖タンパク質の富化及び分離方法によれば、体液中の血液型糖タンパク質を選択的に除去できることが示された。

[0160] (3) 各画分中の髄液型糖タンパク質の確認

前記実験とは逆に、髄液型糖タンパク質が本発明の方法によって富化されているか否かについて検証した。

[0161] (方法)

0.04 μ gタンパク質相当のヒト髄液、前記B画分及びD画分にLaemmli サンプルバッファを加えて加熱した後、4~20%グラジエント・ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS/PAGEに供した。なお、血清型糖タンパク質及び髄液型糖タンパク質の指標には、(2)と同様にそれぞれトランスフェリン-2及びトランスフェリン-1を用いた。泳動は、40mAの定電流で55分電気泳動した。

[0162] 分離されたタンパク質を当該分野で公知のブロッティング方法により、PVD Fメンブレンに260mAの定電流で50分間電氣的に転写した。転写後、当該メンブレンを5%スキムミルク-0.1% Tween 20含有Tris buffered saline (TBS) で1時間以上ブロッキングした。

[0163] 次に、3%スキムミルク-TBSに1:1000希釈した抗体（1~2 μ g/mL）を加え、1時間反応させた。0.1% Tween 20含有TBS洗浄液で前記メンブレンを15分ずつ3回洗浄した。

[0164] 続いて、3%スキムミルク-TBSに1:1000で希釈し抗ウサギIgG, Horseradish Peroxidase (Amersham, #NA934V)（1 μ g/mL）とともに1時間反応させた。メンブレンを前記洗浄液で再度15分ずつ3回洗浄した。化学発光基質（Pierce SuperSignal West DuraExtended Duration Substrate）を用いて糖タンパク質のバンドをルミノイメーリアナライザ（LAS-1000plus:富士フィルム）で検出した。トランスフェリンのウェスタンブロットティングには、抗ヒトトランスフェリン抗体として、BETHYL Laboratories, inc. のCat.No. A80-128AのLot No. A80-128A-5を用いた。

[0165] （結果）

結果を図4に示す。未精製の髄液中に存在するトランスフェリンのうち髄液型糖タンパク質であるトランスフェリン-1のみが選択的にB、D画分に存在し、さらにD画分ではB画分よりもその量が濃縮されていることが示された。つまり、本発明の髄液型糖タンパク質の富化及び分離方法によれば、体液中の髄液型タンパク質を選択的に濃縮回収できることが示された。

[0166] 前記（2）及び当該（3）の結果を総合すると、本発明の髄液型糖タンパク質の富化及び分離方法によれば、体液中の血液型糖タンパク質を除去し、髄液型糖タンパク質を選択的に富化及び分離できることが立証された。

[0167] （4）レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリング

本発明の方法による髄液型糖タンパク質の富化をレクチンマイクロアレイにて確認した。

[0168] （方法）

以降の確認実験には前記（1）で分画後の各溶液を事前に脱塩濃縮する必要がある。そこで、2-D Clean-Up kit（GEヘルス株）を用いて各フラクション溶液の濃縮を行った。沈殿後に20 μ LのPBSバッファで再溶解した。

[0169] レクチンマイクロアレイによる未精製髄液及びエンリッチ画分中糖タンパ

ク質の糖鎖プロファイリングは、基本的にKuno, A. et al., Nature Methods . 2, 851-856 (2005)、Uchiyama N., Proteomics 8, 3042-3050 (2008) に記載の方法に従った。未精製髄液 (0.47 mg/l) 及びD画分の濃縮液 (1.42 mg /mL) をPBSバッファで10倍に希釈した。タンパク質量200ng相当 (それぞれ4.3 μ Lと1.4 μ L) を1%Triton X-100含有PBSバッファで10 μ Lに調製し、そこへ20 μ gの蛍光ラベル化試薬 (Cy3-SE、GEヘルスケア社) を加え、1時間室温にて蛍光ラベル反応した。反応産物中に90 μ Lのグリシン含有緩衝液を加え、2時間室温にて反応することで、余剰蛍光ラベル化試薬を不活化した。これを蛍光標識糖タンパク質溶液としてレクチンマイクロアレイに供した。レクチンマイクロアレイは、43種類の異なるレクチンが固定化されているものを使用した。獲得される結合シグナルが以降の比較解析に最適なものとするために各サンプルについて4点の希釈系列を作製し、レクチンマイクロアレイへアプライした。レクチンと分析対象糖タンパク質との結合反応は、20°Cで12時間行った。反応後、アレイ上のサンプル溶液を除去し、専用バッファで3回洗浄した後、GPバイオサイエンス社製のレクチンマイクロアレイ用スキャナーGlycoStation™ Reader1200でスキャンした。スキャンによって得られたデータをjpegファイル及びTIFFファイルとして保存した。イメージ図の作成は、jpegファイルを用いた。

[0170] (結果)

結果を図5に示す。未精製の髄液と血清では、いずれもレクチンSSA, SNA, TJA-Iにおいて強いシグナルが観察された。これらのレクチンは、血液型糖鎖の一つである α 2,6シアル酸に結合する。したがって、髄液に含まれる糖タンパク質の大部分は、血液型糖タンパク質に典型的な α 2,6シアル酸末端を有することが示された。一方、本発明の方法で富化されたD画分では、 α 2,6シアル酸結合性レクチンシグナルは、殆ど検出されず、WGA、ABAレクチンに強いシグナルを示した。これらのレクチンは、末端糖鎖のGlcNAcに結合する。また、PHAEとUDAのシグナルから、バイセクト型のbeta1,4-GlcNAcの存在が、さらにPSA、LCA、AALのシグナルからコアフコースの存在が、それぞれ示され

た。これらは、いずれも髄液型糖鎖の特徴を示すものであった。なお、Jacalin, ACA, MAHも富化後にシグナルが増加しており、その存在率が高くなっていることが示されたが、これはPVLレクチンによって富化された糖タンパク質の中に、N-結合型糖鎖だけでなく、O-結合型糖鎖を含んでいるものが存在していることを意味している。以上の結果から、 $\alpha 2,6$ シアル酸末端を持つ糖タンパク質は、本発明の富化・分離方法によって得られるD画分からは効率的に除去され、GlcNAc末端を有する髄液型糖タンパク質のみが濃縮されていることが示された。

[0171] (5) 質量分析による解析

本発明の方法による髄液型糖タンパク質の富化を質量分析により確認した。

[0172] (方法)

前記(4)に記載のように、前記(1)で分画後の各溶液を事前に脱塩濃縮した。未精製の髄液サンプル(150 μ L)、及びD画分(50 μ L)をそれぞれアセトン沈殿し、得られた沈殿物にミリQ水50 μ L、7M Guanidine-HCl / 0.5M Tri-HCl (pH8.6) / 10mM EDTA-Na溶液50 μ L、1M Tri-HCl (pH8.6) 溶液20 μ L、100mM 1,4-Dithio-DL-threitol (Wako) 溶液10 μ Lを加えて室温にて1時間還元後、200mM 2-Iodoacetamide (Wako) 溶液10 μ Lを加え、遮光下、室温にて1時間アルキル化を行った。外液として5Lの10mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いて、4℃にて透析(8kDa cut off)を行った後、凍結乾燥したサンプルにトリプシン溶液(50 μ Lの50mM 重炭酸アンモニウム溶液に2 μ g トリプシンを溶解したもの)を加えて37℃にて一晩インキュベーション後、100℃にて5分間加熱し、反応液を室温に戻した後、5 mUのPNGaseF (TaKaRa) 溶液10 μ Lを加えて37℃にて一晩インキュベーションした。この反応液に50%酢酸溶液5 μ Lを加えて37℃にて30分間インキュベーション後、簡易カラムOasis HL B (10mg/1mL, Waters)にて除タンパク後、減圧濃縮し、髄液サンプル及びD画分からそれぞれN-結合型糖鎖を精製した。

[0173] 次に、得られたN-結合型糖鎖に40 μ Lの還元溶液(500 mM 水素化ホウ素ナ

トリウム／50mM 水酸化ナトリウム溶液)を加えて45℃にて一晩インキュベーション後、氷上にて50%酢酸溶液5 μ Lを加えて過剰試薬を分解した。次に、カチオン樹脂 (AG50W-X8 (H⁺), Bio-Rad) にて脱塩、減圧濃縮後、1%酢酸を含むメタノール溶液にて共沸し、残存試薬を除去した。

[0174] 得られたサンプルをガラスバイアルに移し、乾燥させた。乳鉢にて約50mgの水酸化ナトリウム (Fluka) を250 μ Lのジメチルスルホキシド (Wako) を用いてすりつぶして得た水酸化ナトリウム懸濁液50 μ Lを前記乾燥サンプルに加えて軽く混合した後、50 μ Lのヨウ化メチル (Wako) を加えて、振盪機にて30分間反応させた。次に、氷上にて50%酢酸溶液150 μ Lを加えて中和後、さらに蒸留水850 μ Lを加えた溶液を、簡易カラムSepPakC18 (50mg/mL, Waters) にて供して精製し、アセトニトリル600 μ Lにて溶出後、減圧濃縮した。0.5 μ Lのマトリックス溶液 (10mgの2,5-ジヒドロキシ安息香酸を1 mLの30% ethanolに溶解したもの) をステンレス製MALDIプレートにアプライし、続いて、完全メチル化したサンプルをアセトニトリル25 μ Lに再溶解したものを0.5 μ Lアプライし、プレート上で混合、風乾させた後、MS測定に供した。すべてのMS測定はポジティブイオンモードにて行った。MSプロファイルについてはMALDI-TOF MS (Reflex IV, Bruker-Daltonics) を用いてそれぞれ3回測定し、得られたMSシグナルのモノイソトピックピーク相対強度 (total強度を100として) について3回の測定結果の平均値をグラフ化した。糖鎖構造についてはMALDI-QIT-TOF MS (AXIMA-QIT, Shimadzu) を用いて決定した。

[0175] (結果)

結果を図6に示す。髄液中に含まれる糖タンパク質から得られたメチル化糖を質量分析機で解析すると、主要ピークは $m/z=2097.2$ である。このピークは、二分岐型アシアローアガラクト複合体 (biantenary asialo-agalacto-complex) 型のN-グリカンで、バイセクト型の $\beta 1,4$ -GlcNAc及びコア $\alpha 1,6$ -フコース (fucose) を持つ構造 (髄液型糖鎖) に一致するが、そのほとんどは、血清糖タンパク質として最も含量の高いIgGに由来することが分かる。そのほかに血清中に見られる様々な糖鎖ピークも出現している。つまり、髄液中の糖

タンパク質の大部分は、血清に由来することが改めて立証された。

- [0176] 一方、PVLレクチンカラムからの溶出画分（D画分）から由来するメチル化糖では、髄液型糖鎖に一致する $m/z=2097.2$ のピークの比率が髄液の2.5倍程度増加し、全体の55%を占めている。この結果は $m/z=2097.2$ のピークに相当する糖鎖が効率よく富化されたことを意味している。したがって、質量分析結果においても、本発明の富化・分離方法により血清糖タンパク質が除去され、髄液型糖タンパク質が富化されたことが確認された。

実施例 2

- [0177] <質量分析計による髄液型糖タンパク質の同定>

本発明の富化・分離方法で得られた髄液型糖タンパク質群を質量分析計により同定した。

- [0178] (方法)

実施例 1 で得られた濃縮後の富化画分であるD画分を、電気泳動用サンプルバッファに溶解し、100℃で5分間反応させ、5～20%グラジエントゲルで分離展開した。展開したゲルは、下記に示した質量分析用のプロトコルで銀染色を行った。なお使用した溶液の組成は以下の通りである。

- [0179] ・固定液（50%メタノール（シグマ社）、5%酢酸（和光純薬社））
・洗浄液（50%メタノール）
・増感液（0.02%チオ硫酸ナトリウム（和光純薬社））
・硝酸銀液（0.1%硝酸銀（シグマ社））
・現像液（0.04%ホルムアルデヒド（和光純薬社）、2%炭酸ナトリウム（和光純薬社））
・停止液（5%酢酸）

ゲルを固定液中で20分間、続いて洗浄液で10分間、さらに純水中で10分間振盪した。次に増感液中で1分間反応させた後に純粋中で1分間振盪した。続いて硝酸銀液に交換し、20分間低温で振盪後、純水で1分間振盪し、現像液を入れた。発色を確認し、停止液に交換しゲルを保管した。解析対象としたバンドを切り出した後に、下記手順でゲル内消化を実施し、質量分析計で解析

しタンパク質同定を行った。解析対象としたタンパク質バンドを切り出した後に、下記手順で染色ゲルを脱色した。使用した溶液の組成は、以下の通りである。

- [0180] ・ 30mM フェリシアン化カリウム（和光純薬社）
 ・ 100mM チオ硫酸ナトリウム

上記のストック液を1:1で混合し、1バンドあたり50 μ Lを加え、5分間反応させ、続いて純水で5分間振盪した。

- [0181] 次いで、還元アルキル化～酵素消化反応及びペプチドの抽出を以下の手順で行った。ここで使用した溶液の組成は、以下の通りである。

- [0182] ・ 還元液（10mM DTT（和光純薬社）、25mM 重炭酸アンモニウム（和光純薬社）
 ・ 洗浄用バッファ（25mM 重炭酸アンモニウム）
 ・ アルキル化液（55mM ヨードアセトアミド（和光純薬社）、25mM 重炭酸アンモニウム）
 ・ 脱水液（50%アセトニトリル（和光純薬社）、50mM 重炭酸アンモニウム）
 ・ 酵素トリプシン溶液（10 μ g/mLトリプシン（プロメガ社）、50mM 重炭酸アンモニウム）
 ・ 抽出液（50%アセトニトリル、5%トリフルオロ酢酸（和光純薬社））

脱色したゲルを脱水液で5分間振盪した後に、還元液100 μ Lに交換し56℃で1時間振盪した。室温に戻し、洗浄用バッファで10分間振盪し、アルキル化液100 μ Lに交換して、遮光した室温で45分間振盪した。洗浄用バッファで10分間、脱水液で10分間振盪した後に、酵素トリプシン溶液を加え37℃で一晩反応させた。1サンプルあたり50 μ Lの抽出液を入れ、室温で30分間振盪した後、溶液を回収した。さらに25 μ Lの抽出液を加え、30分間振盪し、2回の抽出液を合わせて、真空減圧下で濃縮して、これを試料溶液として質量分析計による解析に用いた。

- [0183] 質量分析系MALDI-TOFによる分析は、試料溶液をZipTipu-C18（Millipore

社)で脱塩濃縮し、CHCA (alpha-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (BRUKER社))と混和し、MALDI-TOF質量分析計 (ultraflex III、Bruker社)を用いた解析により、ペプチド質量の測定を行った。UCSFで開発されたプログラムパッケージProteinProspectorの中のMS-Fitによりタンパク質の同定を行った。

[0184] (結果)

富化画分であるD画分に存在するタンパク質をSDS-PAGEで分析したところ、20種類以上の髄液型糖タンパク質の存在が示された。このうち13種を前記表1に示す。最も含有量が多いものは、本発明者らが特許文献3において同定したトランスフェリン1であった。また、髄液型糖タンパク質の一つとして知られるプロスタグランジンD2合成酵素も含まれていた。したがって、本発明の方法により、髄液型糖タンパク質が選択的に富化されることが示された。したがって、本発明の方法によれば、従来、検出すら困難であった髄液型糖タンパク質を容易に、かつ網羅的に富化・分離できることが立証された。分離条件 (例えば、レクチンの種類等) や定量条件を変えることで、さらに異なる多くの髄液型糖タンパク質が分離できると推測される。また、それらの髄液型糖タンパク質は、各種中枢神経系疾患用の指標マーカー候補となり得る。

実施例 3

[0185] <富化画分における中枢神経系疾患用指標マーカーの探索>

多発性硬化症 (MS) は、中枢神経の脱髄を起こす疾患で、自己免疫により発症すると考えられている。また、視神経脊髄炎 (NMO) は、従来、視神経炎を合併するMSの亜型と考えられていたが、2005年になって多くのNMO患者で血清中の抗アクアポリン4抗体が陽性を示すことが明らかとなり、NMOは、MSとは異なる独立した疾患と考えられるようになった。一方で、抗アクアポリン4抗体が陰性を示すNMO患者も存在する。後者のような抗アクアポリン4抗体陰性NMO患者の場合、患者がNMOとMSのいずれに罹患しているのかを判断することは、従来方法では極めて困難であった。そこで、抗アクアポリン4抗体陰性患者を含めたNMOの正確な診断が可能な中枢神経系疾患用指標マーカーの探索

を行なった。

[0186] (方法)

実施形態 1 の方法で富化され、実施例 2 で同定された表 1 に記載の中樞神経系疾患用指標マーカー候補である髄液型糖タンパク質のうち、抗体が利用可能なものについて NM0 患者と対照体である MS 患者との間で差が認められるもの、すなわち MS に対する NM0 指標マーカーとなり得るものをウェスタンブロッティングで探索した。

[0187] まず、NM0 患者と対照体の各髄液から、前記実施例 1 (1) の方法に準じて髄液型糖タンパク質をそれぞれ富化した。続いて、表 1 に示す各種髄液型糖タンパク質に対する抗体を用いて、実施例 1 (3) の方法に準じてウェスタンブロッティングを行なった。NM0 指標マーカー候補の髄液型糖タンパク質として、抗体入手が容易な $\alpha 2$ -マクログロブリンについて、まず検証を試みた。抗体は、抗ヒト $\alpha 2$ -マクログロブリン抗体 (ICN 社、Cat.No. 55113) (1 ~ 2 μ g/mL) を用いた。

[0188] (結果)

結果を図 7 に示す。図 7 は富化後の髄液試料中の $\alpha 2$ -マクログロブリンを示す。 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、NM0 患者と対照体、すなわち NM0 非罹患 MS 患者との間で発現レベルに明瞭な差が認められた。他社の抗ヒト $\alpha 2$ -マクログロブリン抗体 (例えば、abcam 社 cat.No. ab84176, SantaCruz 社 cat.No. sc-8514, 及び Dako 社 cat.No. Q0102) を用いても同様の結果が得られた。MS 患者では $\alpha 2$ -マクログロブリンは、ほとんど検出されなかったことから、髄液型糖鎖を持つ $\alpha 2$ -マクログロブリンが MS に対する NM0 指標マーカーとなることが示された。NM0 では治療薬としてステロイド剤のような副作用の強い薬剤を使用するので、本マーカーが薬剤効果判定の指標として利用すれば、副作用のない短期間治療の目安となる。なお、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) 阻害活性を有することから、NM0 の炎症巣の拡大を防止のために発現が増加するものと考えられる。

実施例 4

[0189] <未富化画分における中枢神経系疾患用指標マーカーの探索>

実施例3では、対照体又は患者の髄液から実施例1(1)の方法に準じて髄液型糖タンパク質を富化した試料を用いた。しかし、中枢神経系疾患によっては、体液中の髄液型糖タンパク質の量が対照体と比較して著しく高くなる可能性がある。このような場合、その髄液型糖タンパク質を中枢神経系疾患用指標マーカーとすることによって、採取した体液から富化処理を経ることなく、迅速かつ簡便に中枢神経系疾患を鑑別できる利点がある。

[0190] そこで、実施例2で同定された表1に記載の髄液型糖タンパク質から、NMOとMSのように互いの病状が類似し、鑑別の困難な2つの疾患を鑑別することのできる中枢神経系疾患用指標マーカーの探索を行った。

[0191] (方法)

(1) 急性散在性脳脊髄炎及びギランバレー症候群の鑑別をするための中枢神経系疾患用指標マーカーの探索

「急性散在性脳脊髄炎」(以下「ADEM」とする)は、ウイルス感染後やワクチン接種後に引き起こされる急性の炎症性脱髄性疾患で、多くは单相性の経過をとり、MSのような再発を繰り返すことはほとんどない。病変は、対称性で、MSに比べて発熱や髄膜刺激症状等の炎症徴候が強く、意識障害・痙攣が多いなどの特徴があるが、病変部位自体は、MSと非常に類似しており、MSの初発時の急性期症状との鑑別は、極めて困難である。それ故、ADEMとMSを明確に鑑別することのできる診断マーカーの開発が求められている。

[0192] ギランバレー症候群は、神経に対する自己抗体によって引き起こされる疾患である。その症状は、運動神経と共に知覚神経の障害を伴う他、Pharyngeal-Cervical-Brachialバリエーションでは、脳神経が傷害されることも知られている。このため、多発性神経炎との鑑別が重要となる。「多発性神経炎」とは、薬物中毒、代謝異常、遺伝性疾患などにより手や足の末梢神経に障害を生じる疾患である。多くは手足の末端の部分にしびれなどが現れ、その後、歩行困難等の運動障害が生じることがある。

[0193] 「ギランバレー症候群」は、自己免疫疾患の一種であるので、ステロイド

による治療が有効とされてきたが、近年の臨床試験では、経口投与及び静注療法ともにほとんど効果が認められず、むしろ症状を悪化する懸念が出てきたことから、ほとんど使用されなくなっている。現在は、血漿交換療法又はガンマ・グロブリンの大量注入（点滴）が行われる。約20%の患者で重篤な後遺症を示すが、早期治療により合併症の頻度や程度が軽減できることから、早期診断は重要である。

[0194] そこで、実施例2で同定された表1に記載の中樞神経系疾患用指標マーカー候補である髄液型糖タンパク質から、MSとADEM、及びギランバレー症候群と多発性神経炎を診断可能な中樞神経系疾患用指標マーカーを探索した。

[0195] 具体的には、まず、髄液を、定法に従って腰椎穿刺により、ADEM患者、ギランバレー症候群患者、及び対照体として中樞神経系疾患を持たない個体（ADEM非罹患かつギランバレー症候群非罹患の患者）から採取した。次に、髄液2 μ LにLaemmli サンプルバッファを加えて加熱した後、5~20%グラジエント・ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS/PAGEに供した。泳動は、40mAの定電流で55分電気泳動した。分離されたタンパク質を当該分野で公知のブロッキング方法により、PVDFメンブレンに260mAの定電流で50分間電氣的に転写した。転写後、当該メンブレンを1%BSA-PBSで1時間以上ブロッキングした。続いて、表1に記載の髄液型糖タンパク質のうち、抗体が利用可能なもの（例えば、goat anti-human α -2-macroglobulin antibody, cappel, Cat.No. 55113; abcam社 cat.No. ab84176; SantaCruz社 cat.No. sc-8514; 及びDako社 cat.No. Q0102）について1%BSA-PBSで希釈（最終濃度1~2 μ g/mL）して加え、1時間反応させた。0.1% Tween 20含有PBS洗浄液で前記メンブレンを15分ずつ3回洗浄した。そして、1%BSA-PBSに1:1000で希釈した2次抗体（donkey Anti-goat IgG Anti body-Horseradish Peroxidase, Santa Cruz Biotechnology, Cat.No. sc-2020）1 μ g/mLとともに1時間反応させた。メンブレンを前記洗浄液で再度15分ずつ3回洗浄した。化学発光基質（PierceSuperSignal West DuraExtended Duration Substrate）を用いてそれぞれの髄液型糖タンパク質のバンドをルミノイメージアナライザ（LAS-1000plus:富士フ

イルム)で検出した。

[0196] (結果)

結果を図8に示す。表1に記載の髄液型糖タンパク質のうち、抗体が利用可能なものについて調べた結果、 $\alpha 2$ -マクログロブリンが、ADEM、ギランバレー症候群及び対照体との間で発現レベルに明瞭な差があることが明らかとなった。図8は、髄液試料中の $\alpha 2$ -マクログロブリンの検出結果である。対照体に比べて、ADEMでは $\alpha 2$ -マクログロブリンの増加が認められた。一方、実施例3で示したようにMSでは、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、ほとんど検出されない。したがって、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、ADEMとMSとの鑑別に有効な中枢神経系疾患用指標マーカーであることが示された。

[0197] また、ギランバレー症候群においても、 $\alpha 2$ -マクログロブリンが増加しており、病変が末梢神経に局限している多発性神経炎との鑑別が可能であることを示している。また、他社の抗ヒト $\alpha 2$ -マクログロブリン抗体を用いても同様の結果が得られた。

[0198] したがって、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、ADEMとMSを、また、ギランバレー症候群と多発性神経炎を鑑別できる有用な診断マーカーとなり得ることが明らかとなった。

[0199] (2) 痙攣重積症、脳症、及びウイルス性髄膜炎の鑑別をするための中枢神経系疾患用指標マーカーの探索

小児でしばしば見られる「熱性痙攣」は、38～39℃以上の発熱に伴って起こる痙攣である。痙攣発作は、5分以内に収まり、神経学的な後遺症を残すことなく自然治癒する。一方、「痙攣重積症」は、30分以上発作が持続し、90分を超える発作では後遺症が残ることがあるため、通常、抗痙攣剤による治療を行う。発熱を伴う30分を超える痙攣発作は、痙攣重積症以外にも髄膜炎、脳炎、脳症等の中枢神経感染症が原因となることがあるので髄液検査が必要である。

[0200] 「髄膜炎」には細菌性およびウイルス性髄膜炎が含まれるが、両者は髄液検査によりに診断可能である。例えば、細菌性髄膜炎は、髄液中の好中球の

増加やグルコース濃度の低下などによって、またウイルス性髄膜炎は、単核球の増加によって診断が可能である。さらに、それぞれの髄膜炎に対する標準的な治療法も確立している。

[0201] 「脳症」は、細菌やウイルスの感染に続発して生じる疾患である。その病態は、未解明な点が多いが、脳のエネルギー、電解質代謝異常に基づくと考えられ、脳のむくみ、意識障害、痙攣、発熱を伴う重篤な疾患である。例えば、インフルエンザ脳症では死亡率が50～60%に達する。

[0202] 抗痙攣剤投与により治癒する比較的軽症の痙攣重積症と、脳症等との明確な鑑別方法は、これまで知られていない。それ故、脳症は、初診時（入院時）には診断できず、症状の経過や治療に対する反応性を観察して、後日に診断名が付けられるのが一般的である。

[0203] そこで、実施例2で同定された表1に記載の中樞神経系疾患用指標マーカー候補である髄液型糖タンパク質から、痙攣重積症と脳症とを鑑別可能な中樞神経系疾患用指標マーカーを探索した。

[0204] （方法）

基本的な方法は、上記（1）と同じである。髄液は、痙攣重積症患者、脳症患者、及びウイルス性髄膜炎患者から採取した。ここで、脳症患者は、入院後の経過観察により診断されたものであって、同一患者から入院初診時及び治療後（7日後）に採取されたものである。

[0205] （結果）

結果を図9に示す。表1に記載の髄液型糖タンパク質のうち、抗体が利用可能なものについて調べた結果、 $\alpha 2$ -マクログロブリンが、痙攣重積症患者と脳症患者との間で発現レベルに明瞭な差があることが明らかとなった。図9は、髄液試料中の $\alpha 2$ -マクログロブリンの検出結果である。痙攣重積症患者では、髄液中の $\alpha 2$ -マクログロブリン量の増加がわずかであるのに対して、入院時の脳症患者では著しい増加が認められ、 $\alpha 2$ -マクログロブリンにより両疾患が鑑別できることが示された。また、脳症の治療後7日目には、それに対応して髄液中の $\alpha 2$ -マクログロブリン量が減少し、正常化していること

も明らかとなった。一方、ウイルス性髄膜炎でも、脳症と同様に髄液中の $\alpha 2$ -マクログロブリンが増加する。脳症及びウイルス性髄膜炎は、いずれも類似の症状（痙攣）を示すものの、前述のように単核球増加により診断可能である。したがって、両疾患は、 $\alpha 2$ -マクログロブリン以外の方法で鑑別可能であるため、問題とはならない。

[0206] 脳症では、ステロイド剤の使用など強力な治療を行うが、 $\alpha 2$ -マクログロブリンを脳症の中樞神経系疾患用指標マーカーとすることでステロイド剤治療の打ち切り時期の決定が可能となり、薬剤の過剰投与に伴う副作用を軽減することができるようになる。

[0207] したがって、 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、痙攣重積症患者と脳症患者から脳症患者を鑑別可能な中樞神経系疾患用指標マーカーとなり得ることが明らかとなった。

実施例 5

[0208] <髄液型糖タンパク質におけるアルツハイマー病マーカーの探索>

アルツハイマー病（AD）患者は、いわゆる“物忘れ”外来で見いだされることが多い。認知症の程度により正常域、軽度認知障害、ADの3群に分類される。形態学的検査（MRIあるいはCT）によって脳の萎縮が確認されれば、その患者はAD群であると確定診断とされる。しかし、このような病終期に確定診断がなされても、すでに神経細胞の大部分が死滅しており回復は望めない。したがって、アルツハイマー病の治療薬が臨床治験に供されている現在、早期診断が可能なバイオマーカーが求められている。このようなマーカーの発見のためには、一次スクリーニング法としてアルツハイマー群と正常域群の両方で差を示すものを検索することになる。その後、正常域から軽度認知症を経てアルツハイマー病と進行した患者サンプルにおいてこのマーカーの経時的変化を調べ、早期診断マーカーとなるか否かを解析することになる。以下の実施例では、アルツハイマー病群と正常域群で差を示す髄液型糖タンパク質としてプロスタグランジンD2合成酵素（PGD2S）を同定した。

[0209] （方法）

PGD2Sは髄液中の含有量が比較的多いため、富化操作をせずに直接ウェスタンブロッティング法で分析した。抗体は、抗ヒトPGD2S抗体 (Thermo scientific, Cat.No. PA1-46023) ($1\mu\text{g/ml}$) を用い、それぞれ2個体について検証した。

[0210] (結果)

結果を図10に示す。アルツハイマー病患者では、正常域群に比べてPGD2Sの含有量が増加していることが示された。定量的な解析によりこの増加は有意であることが示された。

[0211] なお、本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 被検体由来の体液又は中枢神経細胞から末端N－アセチルグルコサミン含有糖タンパク質を富化又は分離する方法であって、
- (1) シアル酸結合性物質を用いて体液又は中枢神経細胞から末端シアル酸含有糖タンパク質を除去する工程、及び
- (2) 前記除去工程で得られた試料中に存在する末端N－アセチルグルコサミン含有糖タンパク質をN－アセチルグルコサミン結合性物質に結合させ、形成された複合体を分離する工程を含む前記方法。
- [請求項2] 前記複合体を解離させ、末端N－アセチルグルコサミン含有糖タンパク質を溶出する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記除去工程に先立ち、アルブミン結合性物質を用いて、体液又は中枢神経細胞からアルブミンを除去する工程をさらに含む、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記シアル酸結合性物質が抗シアル酸抗体若しくはその活性断片又はシアル酸結合性レクチンである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記シアル酸が $\alpha 2,6$ シアル酸である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] $\alpha 2,6$ シアル酸結合性レクチンがSSAレクチン、SNAレクチン及びTJA-Iレクチンからなる群より選択される、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 前記N－アセチルグルコサミン結合性物質が抗N－アセチルグルコサミン抗体若しくはその活性断片又はN－アセチルグルコサミン結合性レクチンである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 前記N－アセチルグルコサミン結合性レクチンがPVLレクチン又はWGAレクチンである、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] アルブミン結合性物質がブルーセファロース、又は抗アルブミン抗体若しくはその活性断片である、請求項1～8のいずれか一項に記載

の方法。

[請求項10] 体液が髄液、血液（血清、血漿及び間質液を含む）、リンパ液、神経根周囲液又は組織若しくは細胞の抽出液である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

[請求項11] 中枢神経系疾患用指標マーカーを選択する方法であって、
請求項1～10のいずれか一項に記載の方法を用いて対照体由来及び特定の中枢神経系疾患に罹患した個体由来のそれぞれの体液又は中枢神経細胞から末端N-アセチルグルコサミン含有糖タンパク質を富化又は分離する工程、

前記富化・分離工程で得られた前記糖タンパク質の分量を測定する工程、及び

対照体由来及び特定の中枢神経系疾患に罹患した個体由来の対応する前記測定した糖タンパク質の分量を比較して、統計学的に有意な量的差異が見られる前記糖タンパク質をその特定の中枢神経系疾患用指標マーカーとして選択する工程

を含む前記方法。

[請求項12] 中枢神経系疾患用指標マーカーを選択する方法であって、
対照体と特定の中枢神経系疾患に罹患した個体のそれぞれの体液又は中枢神経細胞における表1で示される前記糖タンパク質の分量を測定する工程、及び

対照体由来と特定の中枢神経系疾患に罹患した個体由来の対応する前記糖タンパク質の分量を比較して、統計学的に有意な量的差異が見られる前記糖タンパク質をその特定の中枢神経系疾患用指標マーカーとして選択する工程

を含む前記方法。

[表1]

No.	糖タンパク質名	アクセッション#	分子量 (Da)
1	アセチル CoA カルボキシラーゼ 2	O00763	279696.3
2	多重 EGF-様-ドメインタンパク質 4	Q7Z7M0	254575.3
3	α -2-マクログロブリン	P01023	163279.4
4	プラズマプロテアーゼ C1 インヒビター	P05155	55154.7
5	トランスフェリン 1	P02787	77050.6
6	グルタミン酸カルボキシラーゼ様タンパク質	Q96KN2	56779.8
7	α 1-アンチキモトリプシン	P01011	47651.3
8	亜鉛- α 2-糖タンパク質	P25311	33872.5
9	インヒビン β A 鎖	P08476	47442.7
10	プロスタグランジン-H2 D-イソメラーゼ (プロスタグランジン-D2 合成酵素)	P41222	21029.0
11	トランスサイレチン	P02766	15887.2
12	カテプシン D	P07339	44553.0
13	プロコラーゲン C-エンドペプチダーゼ エンハンサー2	Q15113	47973.0

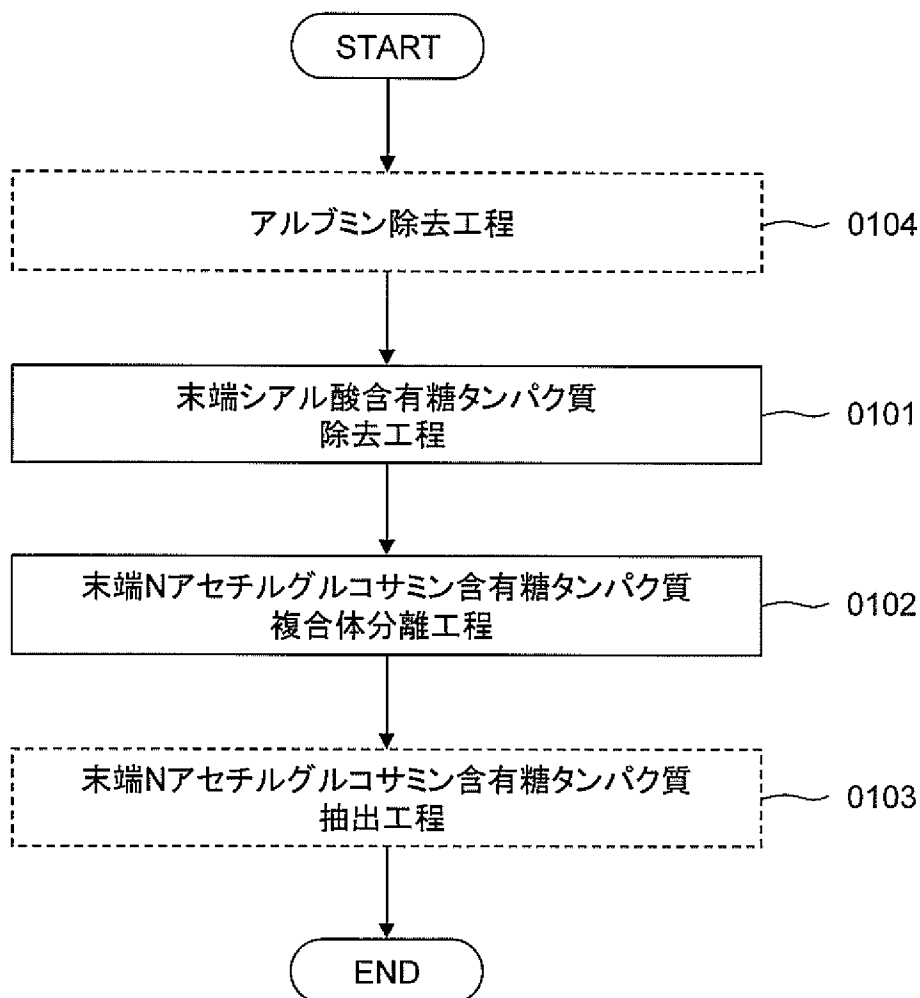
- [請求項13] シアル酸結合性物質及びN-アセチルグルコサミン結合性物質を含む、末端N-アセチルグルコサミン含有糖タンパク質を富化又は分離するキット。
- [請求項14] 前記シアル酸結合性物質が抗シアル酸抗体又はシアル酸結合性レクチンである、請求項 1 3 に記載のキット。
- [請求項15] 前記シアル酸が α 2,6シアル酸である、請求項 1 4 に記載のキット。
- [請求項16] 前記シアル酸結合性レクチンにおいて、 α 2,6シアル酸結合性レクチンがSSAレクチン、SNAレクチン及び／又はTJA-Iレクチンである、請求項 1 5 に記載のキット。
- [請求項17] 前記N-アセチルグルコサミン結合性物質が抗N-アセチルグルコサミン抗体及び／又はN-アセチルグルコサミン結合性レクチンである、請求項 1 3 ～ 1 6 のいずれか一項に記載のキット。
- [請求項18] 前記N-アセチルグルコサミン結合性レクチンがPVLレクチン及び／又はWGAレクチンである、請求項 1 7 に記載のキット。
- [請求項19] 複合体解離用バッファをさらに含む、請求項 1 3 ～ 1 8 のいずれか

一項に記載のキット。

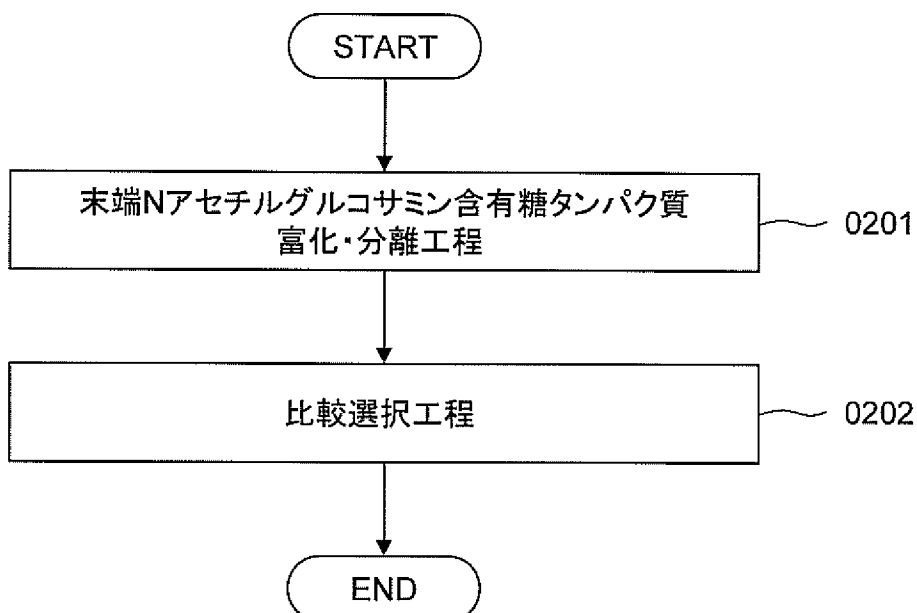
- [請求項20] 複合体解離用バッファがN-アセチルグルコサミンを含む、請求項19に記載のキット。
- [請求項21] アルブミン結合性物質をさらに含む、請求項13～20のいずれか一項に記載のキット。
- [請求項22] アルブミン結合性物質がブルーセファロース、又は抗アルブミン抗体若しくはその活性断片である、請求項21に記載のキット。
- [請求項23] 非還元末端にN-アセチルグルコサミン残基を含み、かつ $\alpha 2,6$ シアル酸を含まない糖鎖を有する前記表1に記載の一以上の糖タンパク質（ただし、中枢神経系疾患が突発性正常圧水頭症の場合の表1に記載のトランスフェリン1を除く）又はその断片からなる中枢神経系疾患用指標マーカー。
- [請求項24] 中枢神経系疾患が視神経脊髄炎である、請求項23に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。
- [請求項25] 中枢神経系疾患がギランバレー症候群である、請求項23に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。
- [請求項26] 中枢神経系疾患が急性散在性脳脊髄炎である、請求項23に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。
- [請求項27] 中枢神経系疾患が脳症である、請求項23に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。
- [請求項28] 中枢神経系疾患用指標マーカーが表1に記載の $\alpha 2$ -マクログロブリンである、請求項24～27のいずれか一項に記載の中枢神経系疾患用指標マーカー。
- [請求項29] 被検体由来の体液又は中枢神経細胞から請求項23に記載の一以上中枢神経系疾患用指標マーカーを検出して、その検出結果から該被検体における特定の中枢神経系疾患に関する罹患の有無を判別する方法。
- [請求項30] 前記特定の中枢神経系疾患が視神経脊髄炎である、請求項29に記載の方法。

[請求項31] 検出すべき中枢神経系疾患用指標マーカーが表 1 に記載の $\alpha 2$ -マクログロブリンである、請求項 30 に記載の方法。

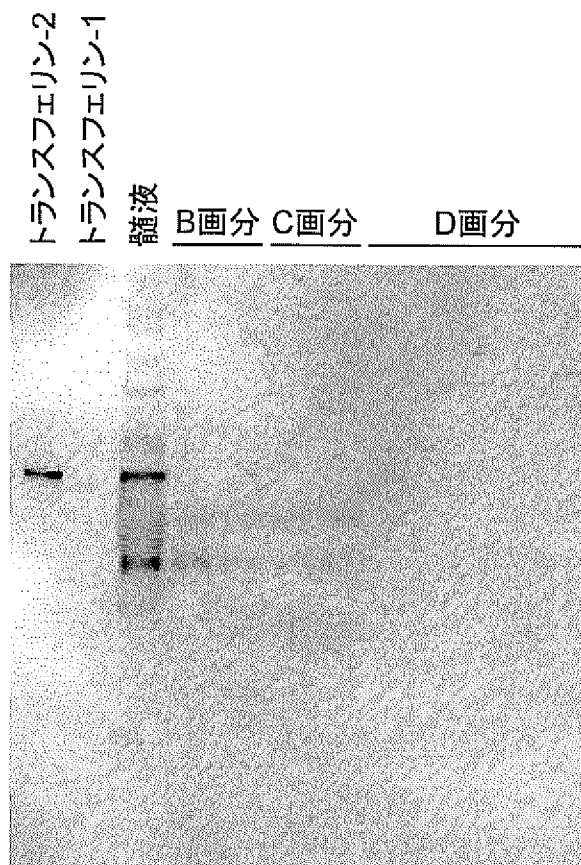
[図1]



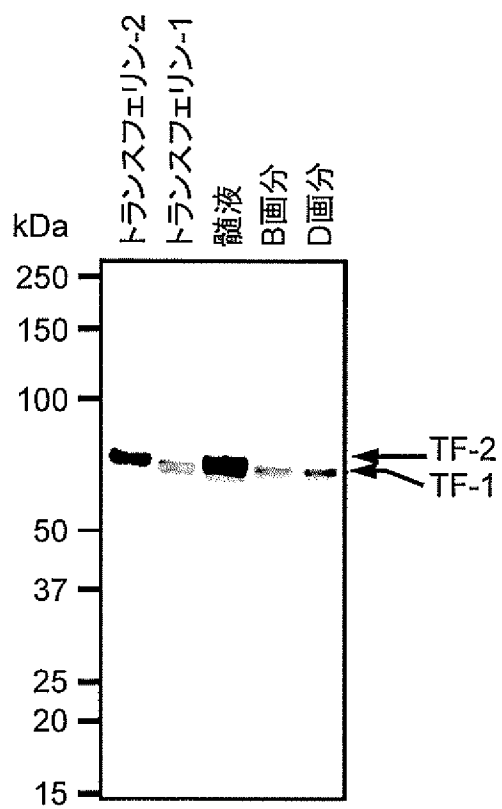
[図2]



[図3]



[図4]



[図5]

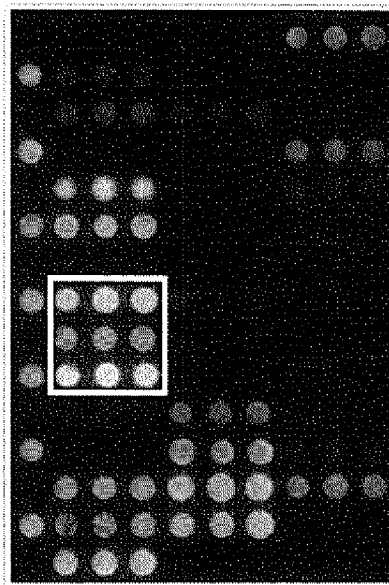
A

レクチンアレイフォーマット

		Jacalin
LCA		
PSA	ConA	
		ACA
AOL		MPA
AAL		
SNA		
SSA	TJA-II	
TJAI		
	ABA	
	LEL	MAH
RCA120	STL	WGA
PHAE	UDA	
DSA		

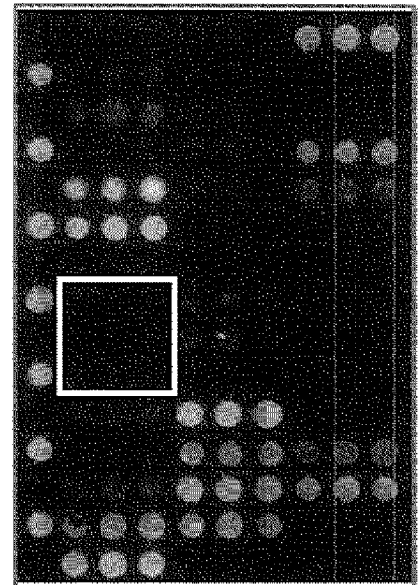
B

髄液

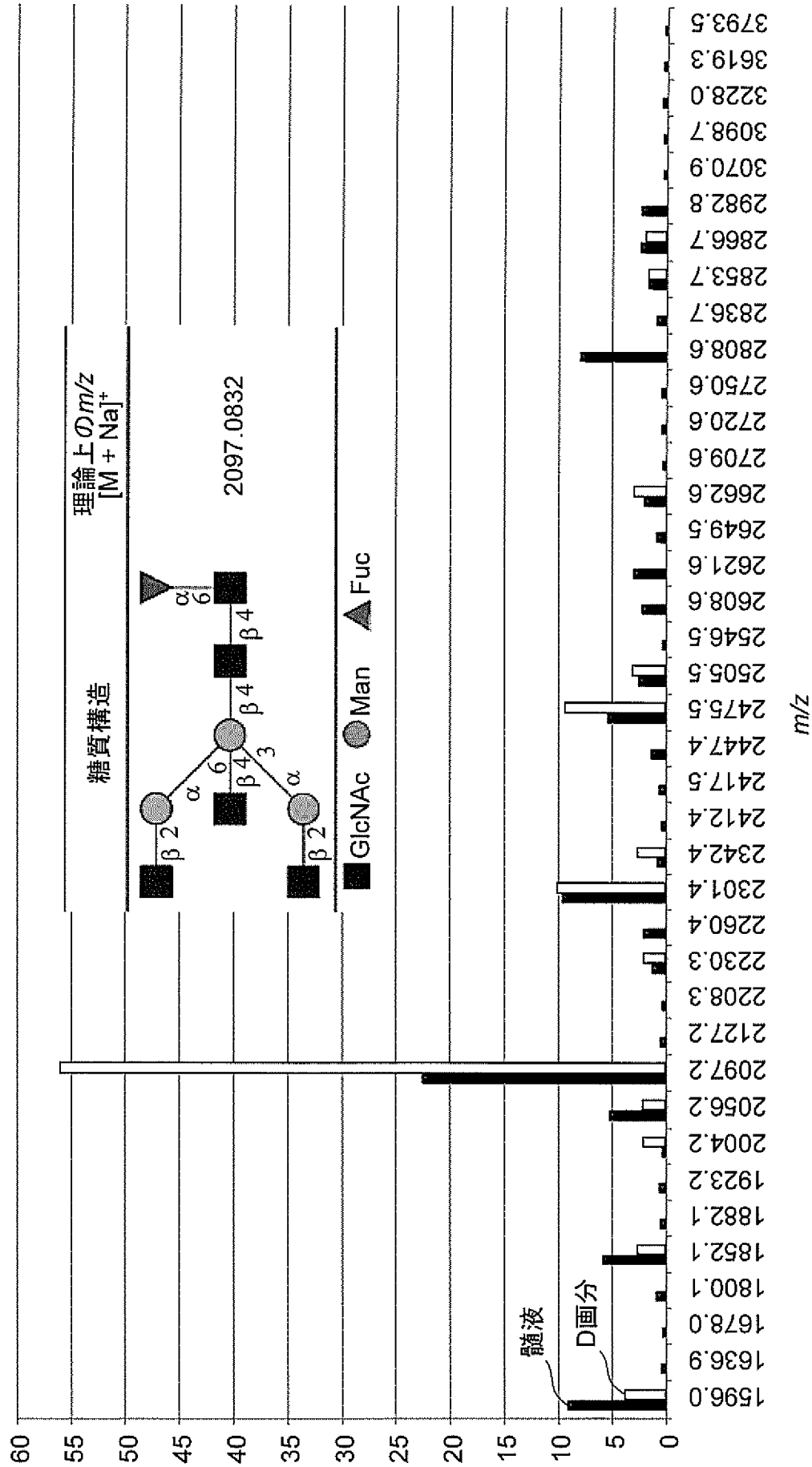


C

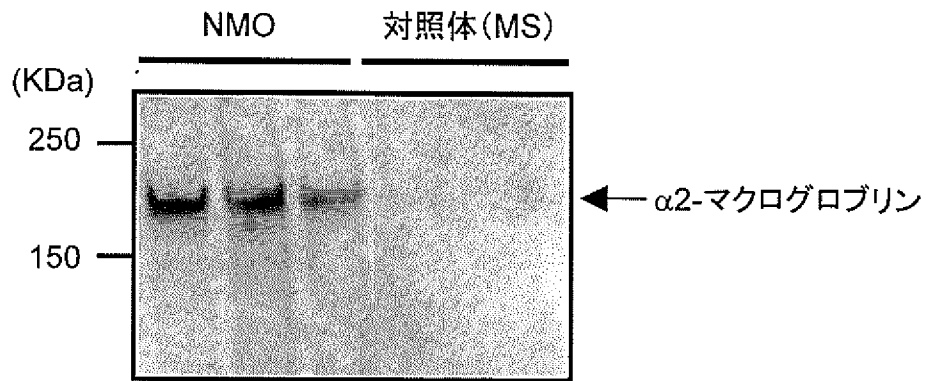
D画分



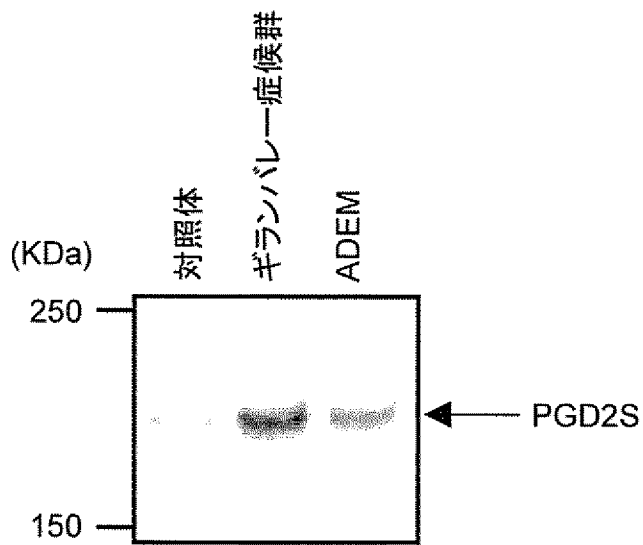
[図9]



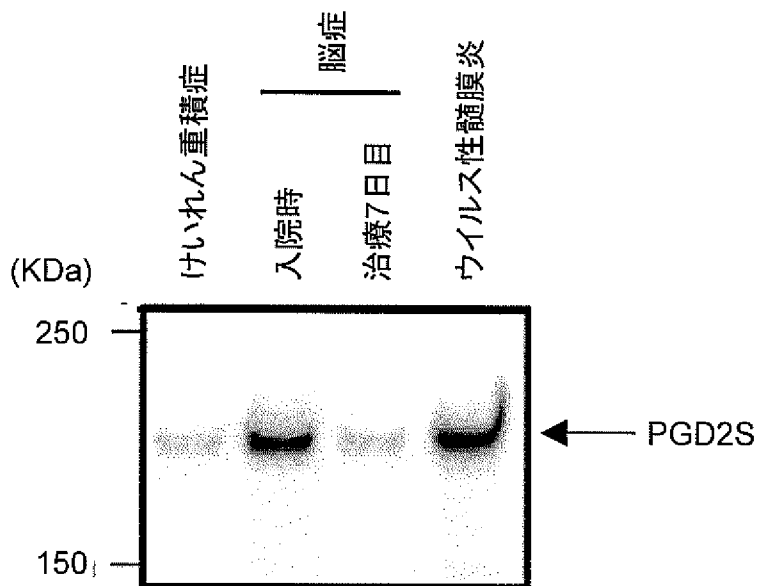
[図7]



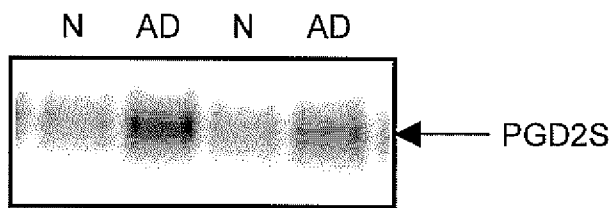
[図8]



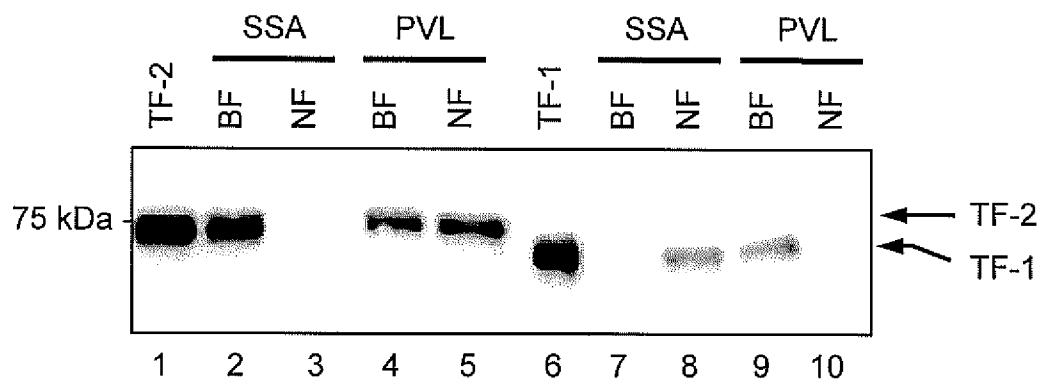
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079218

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K1/22(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(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)

C07K1/22, G01N33/50, G01N33/53

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

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (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	JP 2010-121980 A (Riken, Japan), 03 June 2010 (03.06.2010), (Family: none)	23, 27, 29/ 1-31
Y	Yasuhiro HASHIMOTO et al., "To Tanpakushitsu no Tosa o Marker to suru Seijoatsu Suitosho no Shindanho no Kaihatsu", Kosei Rodo Kagaku Kenkyuhi Hojokin Nanjisei Shikkan Kokufuku Kenkyu Jigyo Seijoatsu Suitosho no Ekigaku · Byotai to Chiryo ni Kansuru Kenkyu Heisei 21 Nendo Sokatsu · Buntan Kenkyu Hokokusho, March 2010, pages 23 to 24	1-31
Y	JP 2008-184404 A (Gekkeikan Sake, Co., Ltd.), 14 August 2008 (14.08.2008), (Family: none)	1-31

☒ 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

"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
21 February, 2012 (21.02.12)Date of mailing of the international search report
28 February, 2012 (28.02.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079218

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-513372 A (Connaught Laboratories Ltd.), 16 November 1999 (16.11.1999), & WO 1997/011093 A2 & EP 0851873 A2 & US 6165774 A	1-31
Y	UEDA H., et al., Psathyrella velutina Mushroom Lectin Exhibits High Affinity toward Sialoglycoproteins Possessing Terminal N-Acetylneuraminic Acid α 2,3-Linked to Penultimate Galactose Residues of Trisialyl N-Glycans. Comparison with other sialic acid- specific lectins, J. Biol. Chem., 2002, vol.277, no.28, p.24916-24925	1-31
Y	UEDA H., et al., Interaction of a lectin from Psathyrella velutina mushroom with N-acetylneuraminic acid, FEBS Lett., 1999, vol.448, no.1, p.75-80	1-31

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K1/22(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(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. C07K1/22, G01N33/50, G01N33/53

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

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/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	JP 2010-121980 A (独立行政法人理化学研究所) 2010.06.03 (ファミリーなし)	23, 27, 29 / 1-31

☒ 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

2 1 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 8 . 0 2 . 2 0 1 2

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 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

池上 文緒

4 B

3 7 6 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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	橋本康弘ほか, 糖タンパク質の糖鎖をマーカーとする正常圧水頭症の診断法の開発, 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 正常圧水頭症の疫学・病態と治療に関する研究 平成 21 年度総括・ 分担研究報告書, Mar-2010, p.23-24	1-31
Y	JP 2008-184404 A (月桂冠株式会社) 2008.08.14 (ファミリーなし)	1-31
Y	JP 11-513372 A (コノート ラボラトリーズ リミテッド) 1999.11.16 & WO 1997/011093 A2 & EP 0851873 A2 & US 6165774 A	1-31
Y	UEDA H., et al., Psathyrella velutina Mushroom Lectin Exhibits High Affinity toward Sialoglycoproteins Possessing Terminal N-Acetylneuraminic Acid α 2,3-Linked to Penultimate Galactose Residues of Trisialyl N-Glycans. Comparison with other sialic acid-specific lectins, J. Biol. Chem., 2002, vol.277, no.28, p.24916-24925	1-31
Y	UEDA H., et al., Interaction of a lectin from Psathyrella velutina mushroom with N-acetylneuraminic acid, FEBS Lett., 1999, vol.448, no.1, p.75-80	1-31