

(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
2019年3月14日(14.03.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/049705 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/34 (2006.01) C12Q 1/28 (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/031554

(22) 国際出願日: 2018年8月27日(27.08.2018)

(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 2017-173037 2017年9月8日(08.09.2017) JP

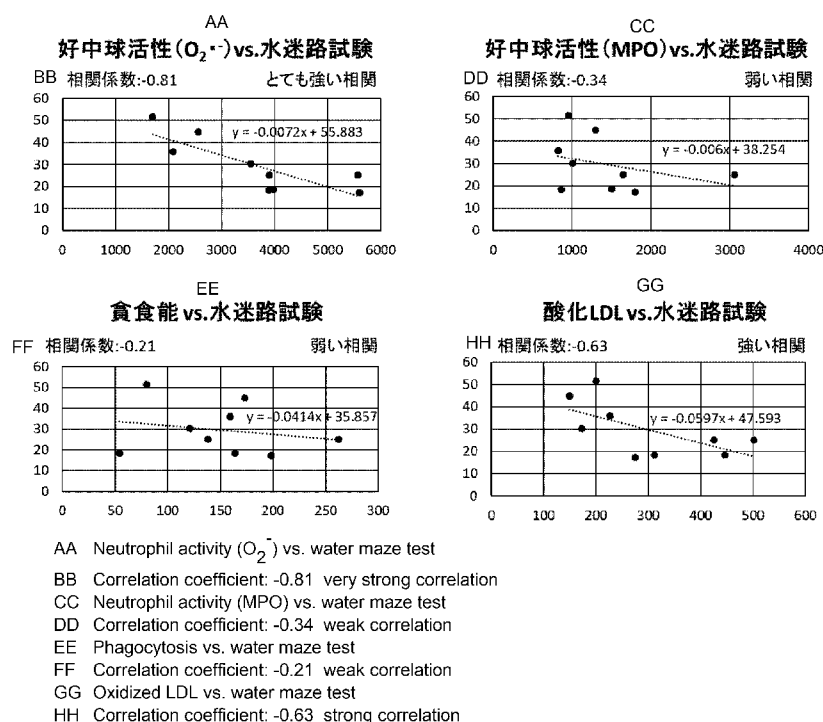
(71) 出願人: 自然免疫制御技術研究組合 (CONTROL OF INNATE IMMUNITY TECHNOLOGY RESEARCH ASSOCIATION)

[JP/JP]; 〒7618075 香川県高松市多肥下町 1 5 6 0 番地 1 4 Kagawa (JP). 浜松ホトニクス株式会社 (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) [JP/JP]; 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 Shizuoka (JP). 国立大学法人 香川大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KAGAWA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7608521 香川県高松市幸町 1 番 1 号 Kagawa (JP).

(72) 発明者: 杣 源一郎 (SOMA Gen-Ichiro); 〒1580084 東京都世田谷区東玉川 1 - 1 0 - 2 1 Tokyo (JP). 稲川 裕之 (INAGAWA Hiroyuki); 〒7618062 香川県高松市室新町 9 7 3 - 5 イーストテラス 1 2 1 1 号 Kagawa (JP).

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S SYMPTOMS

(54) 発明の名称: アルツハイマー症診断装置及び方法



(57) Abstract: In order to provide a simple and highly accurate pathological index for Alzheimer's disease, this Alzheimer's disease diagnosis device is provided with: a measurement means for measuring, in peripheral blood, one or more selected from the group consisting of superoxide production activity, myeloperoxidase activity, oxidized LDL level, phagocytosis, triglyceride, fasting blood glucose, total cholesterol, hemoglobin A1c, and insulin; and a displaying means for displaying an index determined by the measurement means as a pathological index for Alzheimer's disease.

数村 公子(KAZUMURA Kimiko); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP). 小林優多郎(KOBAYASHI Yutaro); 〒7610793 香川県木田郡三木町池戸 1 7 5 0 - 1 国立大学法人香川大学医学部内 Kagawa (JP).

(74) 代理人: 中 村 和 男 (NAKAMURA Kazuo); 〒1440051 東京都大田区西蒲田七丁目 5 0 番 1 0 号 中村ビル 2 階 中村国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 簡便、かつ、高精度にアルツハイマー病の病態指標を提供するため、アルツハイマー病診断装置は、末梢血中の、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、食細胞貪食能、トリグリセリド、空腹時血中グルコース、総コレステロール、ヘモグロビンA1c、及びインスリン、からなる群より選ばれる1つ以上を測定する測定手段と、該測定手段によって測定された指標をアルツハイマー病の病態指標として表示する表示手段とを備える。

明 細 書

発明の名称：アルツハイマー症診断装置及び方法

技術分野

[0001] 本発明は、好中球機能評価システム等を用いたアルツハイマー症診断装置及び方法に関する。

背景技術

[0002] 我が国では、近年、人口の高齢化とともに認知症の患者数が年々増加している。国内の患者数は現在460万人を超えており、2025年には、700万人、高齢者の5人に1人になると見込まれている。認知症患者の約60%はアルツハイマー症、約20%が血管性認知症であり、残りはレビー小体型認知症などの種々の認知症疾患が含まれている。アルツハイマー症は未だに原因、治療法、予防法が明らかでなく、早急な医学的解決が求められている。2011年にNIA/AA(The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association)から提案されたアルツハイマー症の診断基準では、アルツハイマー症を発症前段階、軽度認知障害(MCI)、アルツハイマー症による認知症の3つの段階に分類しており、主要臨床診断基準と研究用診断基準を提示している。前者は、認知機能障害(記憶障害、失語、失行など)や精神障害(抑うつ、不眠、幻覚など)等の臨床的所見である。後者は、アルツハイマー症に関するバイオマーカー評価(脳脊髄液中のアミロイド β やタウタンパク質の定量)、PET(陽電子放出断層撮影)による脳内アミロイド蓄積のイメージング、MRIによる脳萎縮の評価を含むが、このような診断マーカーの多くは病理変化との関係が十分に解明されておらず、高い侵襲性や高額な装置・検査費用等の課題が残されている。そこで、アルツハイマー症の早期診断・発症前診断を行うためには、簡便かつ低侵襲にアルツハイマー症の発症を検出できる生化学的診断マーカーが特に有効であると考えられる。これまでに、血液の生化学マーカーである、各種の炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカー(例えば、過酸化脂質、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)、最終糖化産物(AGEs))、

マイクロRNA等の測定がアルツハイマー症の診断マーカーとして提唱されている（例えば、非特許文献1）。近年、末梢血の酸化ストレスがアルツハイマー発症の初期段階に関与していることが指摘されている（非特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2015-084757号公報

特許文献2：特開2017-074008号公報

特許文献3：特開2017-040473号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：N. Sharma et al., Journal of Clinical and Diagnostic Research, 10, 1-6, 2016

非特許文献2：M. Schrag et al., Neurobiology of Disease, 59, 100-110, 2013

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 好中球は、生体防御に関わる免疫担当細胞であり、生体内異物を認識すると、酵素NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) オキシダーゼにより、活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンラジカル（通称スーパーオキシド、 $O_2^{\cdot-}$ ）を産生する。さらに、スーパーオキシド代謝産物である過酸化水素を基質として、酵素ミエロペルオキシダーゼ（MPO）は次亜塩素酸を生成する。このような活性酸素種は生理的な濃度において様々な生体内反応（例えば、細胞周期、食食反応）を制御しているが、過剰に産生されると、組織における炎症反応を惹起することから、脳内の特定の部位における好中球活性等はアルツハイマー症を始めとする酸化ストレス関連疾患の発症に関与していることが指摘されている。これに対して、血液脳関門によって隔てられている脳内とは独立の末梢血中の好中球活性等がアルツハイマー病と関連するとすれば、この末梢血中の好中球活性等を測定することによって

簡便にアルツハイマー症の病態指標を評価することができる。ところで、數村らは、蛍光及び化学発光のリアルタイム測定システムを用いて、簡便な操作で、血液のMP0活性及びスーパーオキシド産生活性を同時に評価する方法を開発しており（特許文献1、3）、また、好中球等の食細胞の貪食能を評価する方法も開示されている（特許文献2）。

[0006] そこで、本発明は、特許文献1～3に開示されている好中球活性評価システム（以下、単に「好中球活性評価システム」ともいう）等を用いて、アルツハイマー症の診断装置及び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

[0007] 本発明のアルツハイマー病診断装置は、末梢血中の、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、食細胞貪食能、トリグリセリド、空腹時血中グルコース、総コレステロール、ヘモグロビンA1c、及びインスリン、からなる群より選ばれる1つ以上を測定する測定手段と、該測定手段によって測定された指標をアルツハイマー病の病態指標として表示する表示手段とを備えることを特徴とする。

[0008] また、前記測定手段は、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、及び食細胞貪食能、からなる群よりスーパーオキシド産生活性が選ばれる2つ以上を測定することで、より高い精度でアルツハイマー病の病態指標を提供することができる。

[0009] また、前記測定手段は、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、及び酸化LDL量を測定することで、更により高い精度でアルツハイマー病の病態指標を提供することができる。

[0010] また、本発明のアルツハイマー病診断装置は、末梢血中の、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、及び食細胞貪食能、を測定する測定手段と、該測定手段によって測定された指標に対して、 $a \times A + b \times B + c \times C + d \times D$ 、をアルツハイマー病の病態指標として表示する表示手段とを備えることを特徴とする。

ただし、

A：正規化スーパーオキシド産生活性

B：正規化ミエロペルオキシダーゼ活性

C：正規化酸化LDL量

D：正規化食細胞貪食能

a、b、c、d：係数

[0011] また、本発明のアルツハイマー病診断方法は、採血された末梢血中の、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、食細胞貪食能、トリグリセリド、空腹時血中グルコース、総コレステロール、ヘモグロビンA1c、及びインスリン、からなる群より選ばれる1つ以上をアルツハイマー病の病態指標とする方法である。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、簡便、かつ、高精度にアルツハイマー病の病態指標を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]水迷路試験との相関を示す図。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、添付図面を参照しながら本発明を実施するための形態について詳細に説明する。

[0015] 本実施形態に掛かる好中球活性の評価は、特許文献1及び特許文献3に記載の方法に従う。すなわち、試料中のMP0活性はアミノフェニルフルオレセイン（APF: Aminophenyl fluorescein）を指示薬とした蛍光検出法に基づき、スーパーオキシド産生活性は2-メチル-6-（4-メトキシフェニル）-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン（MCLA）を指示薬とした化学発光法に基づいている。好中球刺激剤を試料に添加することで、好中球の炎症防御能力（抗酸化能又は酸化ストレス防止能ともいえる）を評価することができるため、本実施形態では、ホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸塩（PMA）を使用している。好中球刺激剤による試料中の正味のMP0活性又はスーパーオキシド産生活性は、刺激剤添加後の最大蛍光量又は発光量

から、刺激前の蛍光量又発光量を各々差し引いた値として、評価することができる。また、試料中の貪食能は、特許文献2に記載の方法に従う。すなわち、pH感受性蛍光色素を標識した貪食粒子（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社製）を指示薬とした蛍光検出法に基づいている。マウス末梢血中の酸化LDL量は市販のELISAキット（Kamiya Biomedical Company）を用いて評価できる。

[0016] 実験には、アルツハイマー症モデルマウスとして12-14週齢の雄SAMP8マウス（SAMP8/Ta Slc、日本SLC社）を使用し、1週間予備飼育後、2群に分け、一方の群に高脂肪食（35%脂肪を含む飼料（リサーチダイエツト））を与え、もう一方の群に低脂肪食を与えた（詳しくは後記のとおり。）。高脂肪食を与えることで、アルツハイマー症の発症を促進した。なお、水は自由飲水で与えた。マウスの飼育は、温度湿度管理された動物施設にて、自由摂食、自由飲水、12時間光照射/12時間暗黒下の環境条件にて行った。17週間飼育後、以下に示す水迷路試験を1週間行い、学習機能を評価した。水迷路試験終了の翌日、心臓より採血をした。本動物実験は香川大学動物実験委員会によって承認されている。

[0017] 生体内の炎症反応に関わる白血球のスーパーオキシド産生活性、MP0活性及び貪食能は、好中球活性評価システム（CFL-P2200、浜松ホトニクス社）（特許文献1～3）を用いて測定した。採血にはヘパリンを抗凝固剤として用いた。血液は遠心分離（1200g 20分）を行い血漿を得た。血漿の生化学分析は以下に示す市販のキットを用いて評価した。

インスリン（insulin）：マウスインスリンELISAキット（シバヤギ）

ヘモグロビンA1c（HbA1c）：HbA1c測定キット（積水メディカル）

トリグリセリド（TG）、総コレステロール（TC）：各測定キット（和光純薬）

空腹時血中グルコース（fasting BG）：血糖自己測定器（ロッシュ・ダイアグノスティック）

[0018] 本実施例では、マウスを以下の2群に分けた。

（1）NC群：4%脂肪を含む飼料（低脂肪飼料）及び水を自由摂取により与え

た。

(2) PC群：35%脂肪を含む飼料（高脂肪飼料）及び水を自由摂取により与えた。

[0019] [スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) 産生活性] と [ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性]

マウス末梢血の好中球活性 ($O_2^{\cdot-}$ 産生活性とMPO活性) は好中球活性能評価試作機 (特許文献 1、3) を用いて評価した。マウス末梢血30 μ Lに溶血試薬 (Tonbo Biosciences) 500 μ Lを添加し、室温で2分反応後、200 $\times$ g, 3分間遠心処理を行い、細胞懸濁液を回収した。なお、溶血試薬は市販されているものを使用してよいが、細胞固定化剤を含まないものが好ましい。血液30 μ Lから得られた好中球画分に化学発光試薬 (MCLA、終濃度0.5 μ M) 及び蛍光試薬 (APF、終濃度2 μ M) を添加し、緩衝液 (塩化ナトリウム154mM、塩化カリウム5.6mM、HEPES10mM、塩化カルシウム1mM) を用いて全量を500 μ Lとした。測定試料を好中球活性能評価試作機に設置し、PMA (終濃度1 μ M) 刺激前後における化学発光及び蛍光値をリアルタイム (0.5秒毎) に測定した。スーパーオキシド産生活性及びMPO活性の値は、PMA刺激前後の測定値蛍光強度差とした。各測定値を平均値0, 標準偏差1となるように変換 (正規化(Wikipedia: 数量を代表値で割るなどして無次元量化し、互いに比較できるようにすることを、正規化という。多変量解析には『平均が 0、分散が 1 になるよう、線形変換する』が使われる。)) した。

[0020] [酸化LDL (oxLDL)]

マウス末梢血中の酸化LDL量は市販のELISAキット (Kamiya Biomedical Company) を用いて測定した。測定方法はキット付属のプロトコルに従い、マウス血漿をキット付属の緩衝液で1000倍希釈したサンプルを測定に供した。各測定値を平均値0, 標準偏差1となるように変換 (正規化) した。

[0021] [貪食能 (貪食)]

マウス末梢血の食細胞貪食能は食細胞貪食能評価装置 (特許文献 2) を用いて評価した。測定については、マウス末梢血30 μ LにpH感受性蛍光粒子 (Gree

n E.Coli) を添加し、37℃で1時間反応させ、陰性対照には、低温（4℃）処理を加え、貪食反応を阻害させた。貪食能の値は、貪食反応後に食細胞貪食能評価装置を用いて10回（5秒間）蛍光を測定した平均値を得、陰性対照の測定値を引いた蛍光強度差の値とした。各測定値を平均値0, 標準偏差1となるように変換（正規化）した。

[0022] [水迷路試験]

（1）装置

市販の黒色インクを円筒形プール（直径100 cm、深さ40 cm）の水（23±1℃）に添加し、水泳中のマウスがプラットフォームを視認できないようにした。なお、透明なプラットフォーム（直径10 cm）は水面下1cmに位置するように設置した。プール水面の真上に設置した市販のデジタルカメラにより、マウスの水泳を動画で記録した。水泳軌跡の解析は、画像解析ソフトAminalTrackerを用いて、「Neuroinformatics, 14, 479-481, 2016」記載の方法に従って行った。

[0023] （2）手順

試験前日に、マウスをプールに馴れさせるために、各々1回泳がせた。手順は、水面上1cmに固定したプラットフォームにマウスを20秒間静置したのち、30秒間自由に泳がせた。その後、実験者の手でマウスをプラットフォーム上に誘導し、20秒間静置した。また、プールに入れる際はマウスをプールの壁向きに入水させ、実験者は速やかにマウスから見えない位置に移動した。1～5日目はマウスにプラットフォームの位置を記憶させるトレーニング（4回／日）を実施した。トレーニングの手順は、マウスを任意の位置からプールに入れ、60秒間泳がせ、水面下1cmに設置したプラットフォームを探索させた。プラットフォーム到達に要する時間を記録し、60秒で到達できない場合は60秒と記録した。また、時間内にプラットフォームに到達しないマウスは実験者の手でプラットフォームに誘導した。プラットフォームに到達後、20秒間静置し、マウスをプールから取り出した。なお、5日間のトレーニングにより、いずれの群においてもプラットフォーム到達に要する時間の短縮が認め

られたが、群間で差は認められなかった。6日目にプローブ試験を実施した。プローブ試験は、プールからプラットフォームを取り除き、マウスを60秒間泳がせ、プールのプラットフォームがあった4分円領域内での滞在時間を測定した。なお、プローブ試験は各マウスにつき1回行った。

[0024] [学習機能]

アルツハイマー病モデルマウス (SAMP8) のデータに基づいて、統計解析を検討した。好中球活性・酸化LDL・貪食能の各測定値と学習機能評価の従来法 (水迷路試験) との相関解析を行った結果、好中球活性 ($O_2^{\cdot-}$ 産生活性) との間にとっても強い相関 (相関係数:-0.81)、酸化LDLとの間に強い相関 (相関係数:-0.63) が認められた (図1)。好中球活性・貪食能・酸化LDLの各測定値を統合化し、学習機能の予測が可能となるか検討を行った。

[0025] 各測定値を平均値0, 標準偏差1となるように変換した。この変換値 (正規化した測定値) に重回帰分析法を適用し、次のとおりの結果を得た。

$$\begin{aligned} (\text{水迷路試験}) &= -0.78 \times (O_2^{\cdot-}\text{産生活性}) - 0.08 \times (\text{酸化LDL}) \\ \text{相関係数} &= 0.8228 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} (\text{水迷路試験}) &= -1.29 \times (O_2^{\cdot-}\text{産生活性}) + 0.62 \times (\text{MPO活性}) \\ \text{相関係数} &= 0.9131 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} (\text{水迷路試験}) &= -1.295 \times (O_2^{\cdot-}\text{産生活性}) + 0.620 \times (\text{MPO活性}) + 0.021 \times (\text{貪食能}) \\ \text{相関係数} &= 0.9133 \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} (\text{水迷路試験}) &= -1.264 \times (O_2^{\cdot-}\text{産生活性}) + 0.787 \times (\text{MPO活性}) - 0.316 \times (\text{酸化LDL}) \\ \text{相関係数} &= 0.9480 \end{aligned} \quad (4)$$

$$(\text{水迷路試験}) = -1.24 \times (O_2^{\cdot-}\text{産生活性}) + 0.79 \times (\text{MPO活性}) - 0.05 \times (\text{貪食能}) - 0.$$

33×(酸化LDL)

相関係数=0.9489

(5)

[0026] 統合化した測定値は、単独の測定値に比べて、水迷路試験とのより高い相関性（統合化:0.9489、単独:-0.21~-0.81）を示したことから、好中球活性、酸化LDL、貪食能を統合化することの意義を見出した。

[0027] また、これらの結果から、

4変数の場合には、($O_2^{\cdot-}$ 産生活性)、(MP0活性)、(酸化LDL)、(貪食能)

3変数の場合には、($O_2^{\cdot-}$ 産生活性)、(MP0活性)、(酸化LDL)

2変数の場合には、($O_2^{\cdot-}$ 産生活性)、(MP0活性)

1変数の場合には、($O_2^{\cdot-}$ 産生活性)

を用いた場合に、より高い相関係数が認められているために、より望ましいことが分かる。

[0028] 中でも、単独での場合は、酸化LDLとの間に強い相関（相関係数:-0.63）が認められているのに対して、2変数の場合は、($O_2^{\cdot-}$ 産生活性)と(酸化LDL)との組合せよりも（相関係数=0.8228）、($O_2^{\cdot-}$ 産生活性)と(MP0活性)との組合せのほうがより高い相関係数（相関係数=0.9131）が認められた点は注目に値する。

[0029] 各測定値を平均値0,標準偏差1となるように変換した。この変換値（正規化した測定値）に重回帰分析法を適用し、次のとおりの結果を得た。

[0030] 正規化測定値の重回帰分析

（重回帰式を作ることで、単独の相関式（単回帰式）よりも高い相関係数が得られる順）

[0031]

[表1]

重回帰式	相関係数	*
(水迷路試験) = $-1.24(O_2'^{-}) + 0.79(MPO) - 0.05(\text{食食}) + 0.33(oxLDL)$	R=0.949	0.129
(水迷路試験) = $-1.26(O_2'^{-}) + 0.78(MPO) + 0.32(oxLDL)$	R=0.948	0.128
(水迷路試験) = $-0.80(HbA1c) - 0.44(\text{食食})$	R=0.816	0.124
(水迷路試験) = $-0.52(TG) - 0.60(O_2'^{-})$	R=0.944	0.124
(水迷路試験) = $-0.14(MPO) - 0.38(oxLDL)$	R=0.469	0.111
(水迷路試験) = $-1.30(O_2'^{-}) + 0.62(MPO) - 0.02(\text{食食})$	R=0.913	0.093
(水迷路試験) = $-1.29(O_2'^{-}) + 0.62(MPO)$	R=0.913	0.093
(水迷路試験) = $-0.77(TG) - 0.37(MPO)$	R=0.854	0.089
(水迷路試験) = $-0.05(MPO) - 0.29(\text{食食}) - 0.451(oxLDL)$	R=0.545	0.085
(水迷路試験) = $-0.299(\text{食食}) - 0.479(oxLDL)$	R=0.540	0.084
(水迷路試験) = $-0.38(HbA1c) - 0.63(O_2'^{-})$	R=0.886	0.066
(水迷路試験) = $-0.33(MPO) - 0.21(\text{食食})$	R=0.414	0.056
(水迷路試験) = $-0.77(TG) - 0.27(\text{食食})$	R=0.815	0.050
(水迷路試験) = $-0.392(\text{fasting BG}) - 0.577(O_2'^{-})$	R=0.870	0.050
(水迷路試験) = $-0.77(\text{fasting BG}) - 0.27(\text{食食})$	R=0.811	0.046
(水迷路試験) = $-0.64(HbA1c) - 0.20(MPO)$	R=0.718	0.035
(水迷路試験) = $-0.64(TC) - 0.19(\text{食食})$	R=0.692	0.027
(水迷路試験) = $-0.575(TG) - 0.228(TC) - 0.042(HbA1c)$	R=0.789	0.024
(水迷路試験) = $-0.203(TC) - 0.682(O_2'^{-})$	R=0.833	0.013
(水迷路試験) = $-0.53(insulin) - 0.10(MPO)$	R=0.584	0.007
(水迷路試験) = $-0.53(insulin) - 0.10(\text{食食})$	R=0.584	0.007
(水迷路試験) = $-0.68(\text{fast BG}) - 0.13(insulin)$	R=0.772	0.007
(水迷路試験) = $-0.64(TC) - 0.055(MPO)$	R=0.670	0.005
(水迷路試験) = $-0.76(O_2'^{-}) - 0.05(\text{食食}) + 0.10(oxLDL)$	R=0.824	0.004
(水迷路試験) = $-0.78(O_2'^{-}) - 0.08(oxLDL)$	R=0.823	0.003
(水迷路試験) = $-0.392(\text{fasting BG}) - 0.577(MPO)$	R=0.765	0
(水迷路試験) = $-0.81(O_2'^{-}) - 0.02(\text{食食})$	R=0.820	0
(水迷路試験) = $-0.03(insulin) - 0.84(O_2'^{-})$	R=0.820	0

*重回帰式を構成する項目が単独で示す(水迷路試験)との相関係数のうち、最も高い値と重回帰式を作ることによって得られた相関係数との差。

[0032] 正規化測定値の単回帰分析

(単回帰式で高い相関係数を示した順)

[0033]

[表2]

単回帰式	相関係数
(水迷路試験)= -0.820(O_2 消費)	R=0.820
(水迷路試験)= -0.769(TG)	R=0.769
(水迷路試験)= -0.765(fasting BG)	R=0.765
(水迷路試験)= -0.765(TC)	R=0.765
(水迷路試験)= -0.692(HbA1c)	R=0.692
(水迷路試験)= -0.577(insulin)	R=0.577
(水迷路試験)= -0.455(oxLDL)	R=0.455
(水迷路試験)= -0.358(MPO)	R=0.358
(水迷路試験)= -0.261(食食)	R=0.261

[0034] 重回帰式により得られた相関係数が単回帰式の相関係数よりも高くなっていることは、重回帰したことにより水迷路試験（認知機能）をより正確に予測する式になっているといえる。したがって、選択した複数の項目を評価することは認知機能を改善評価に有用であることを示している。以上の点で、表1に示すように、単回帰よりも0.129も相関係数が高くなった4つの項目(O_2 消費、MPO、食食、oxLDL)を測定することが最も有用である。その他にも0.1以上高くなった組合せ(O_2 消費、MPO、oxLDL)、(HbA1c、食食)、(TG、 O_2 消費)、(MPO、oxLDL)が次いで有望である。また、0.05以上高くなった組合せ(O_2 消費、MPO、食食)、(O_2 消費、MPO)、(TG、MPO)、(MPO、食食、oxLDL)、(食食、oxLDL)、(HbA1c、 O_2 消費)、(MPO、食食)、(TG、食食)、(fasting BG、 O_2 消費)も有用である。

[0035] 本明細書で引用したすべての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として、ここにとり入れるものとする。

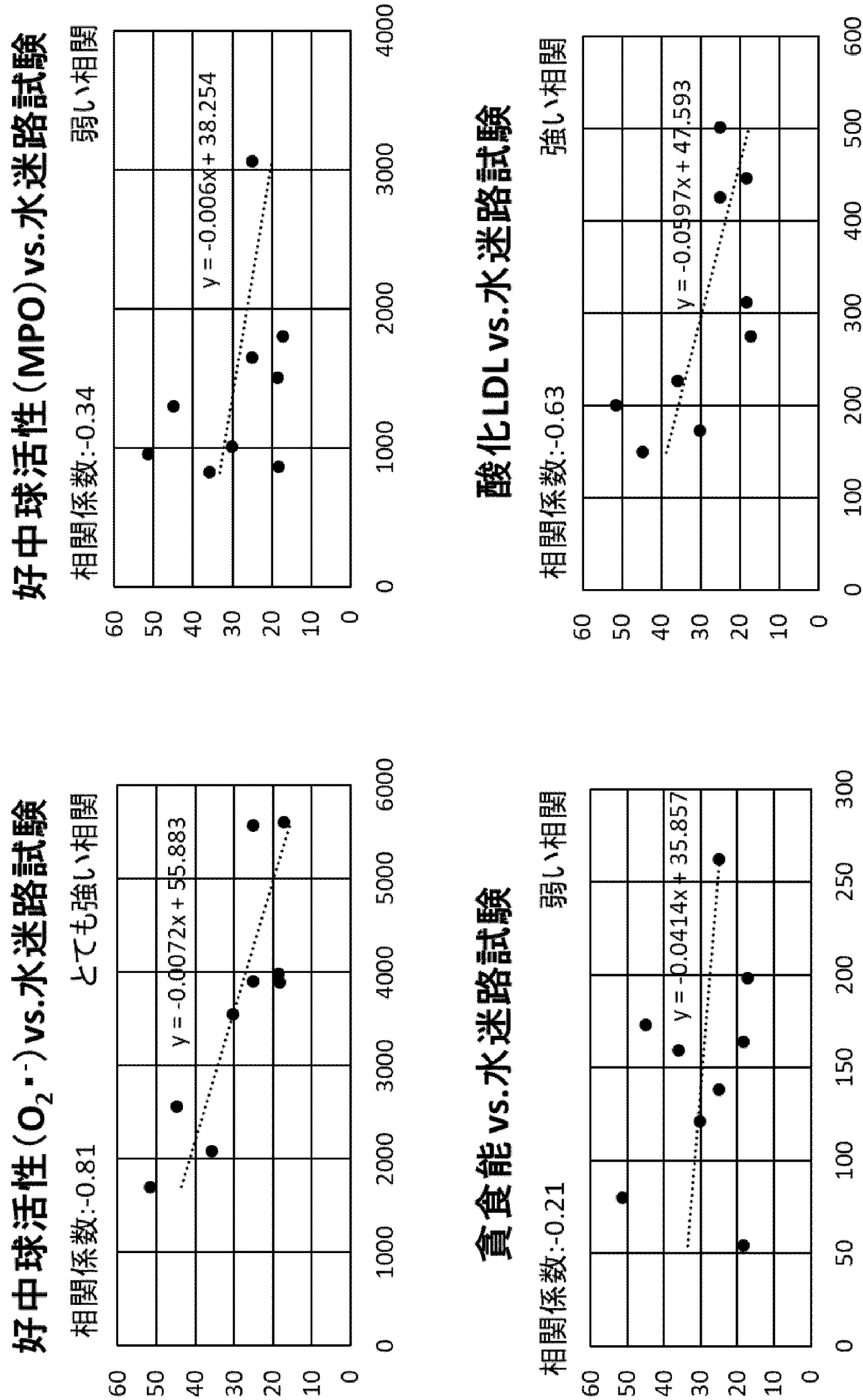
また、明細書、特許請求の範囲及び図面を含む2017年9月8日に出願の日本国特許出願2017-173037の開示は、そのまま参考として、ここにとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 末梢血中の、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、食細胞貪食能、トリグリセリド、空腹時血中グルコース、総コレステロール、ヘモグロビンA1c、及びインスリン、からなる群より選ばれる1つ以上を測定する測定手段と、
- 該測定手段によって測定された指標をアルツハイマー病の病態指標として表示する表示手段と
- を備えることを特徴とするアルツハイマー病診断装置。
- [請求項2] 前記測定手段は、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、及び食細胞貪食能、からなる群よりスーパーオキシド産生活性が選ばれる2つ以上を測定することを特徴とする請求項1記載のアルツハイマー病診断装置。
- [請求項3] 前記測定手段は、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、及び酸化LDL量を測定することを特徴とする請求項1記載のアルツハイマー病診断装置。
- [請求項4] 末梢血中の、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオキシダーゼ活性、酸化LDL量、及び食細胞貪食能、を測定する測定手段と、
- 該測定手段によって測定された指標に対して、 $a \times A + b \times B + c \times C + d \times D$ 、をアルツハイマー病の病態指標として表示する表示手段と
- を備えることを特徴とするアルツハイマー病診断装置。
- ただし、
- A：正規化スーパーオキシド産生活性
- B：正規化ミエロペルオキシダーゼ活性
- C：正規化酸化LDL量
- D：正規化食細胞貪食能
- a、b、c、d：係数
- [請求項5] 採血された末梢血中の、スーパーオキシド産生活性、ミエロペルオ

キシダーゼ活性、酸化LDL量、食細胞貪食能、トリグリセリド、空腹時血中グルコース、総コレステロール、ヘモグロビンA1c、及びインスリン、からなる群より選ばれる1つ以上をアルツハイマー病の病態指標とする方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/031554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/28(2006.01)i, G01N33/49(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)

Int.Cl. C12M1/34, C12Q1/06, C12Q1/26, C12Q1/28, G01N33/49

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-537133 A (EXONHIT THERAPEUTICS SA) 29 October 2009, whole document, particularly, claims, examples & US 2010/0055682 A1, claims, examples & WO 2007/132120 A2 & EP 2021509 A2 & CN 101490280 A & KR 10-2009-0098941 A	1-5
Y	JP 2004-527754 A (SYN.X PHARMA, INC.) 09 September 2004, whole document, particularly, claims, examples & US 2002/0160425 A1, claims, examples & WO 2002/088706 A2 & EP 1467212 A1 & KR 10-2004-0015168 A & CN 1543571 A	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 25.10.2018	Date of mailing of the international search report 06.11.2018
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/031554

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/143703 A1 (NIIGATA UNIV) 15 September 2016, whole document, particularly, claims, examples & US 2018/0024150 A1, claims, examples & EP 3267200 A1	1-5
Y	JP 2008-509668 A (GENERAL ATOMICS) 03 April 2008, claims, examples & US 2006/0035308 A1, claims, examples & WO 2006/020762 A1 & EP 1776466 A1 & CN 101044246 A	1-5
Y	JP 2003-227837 A (IKAGAKU KK) 15 August 2003, paragraph [0001] & US 2003/0077668 A1, paragraph [0005] & EP 1070962 A2	1-5
Y	JP 2010-47616 A (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 04 March 2010, paragraph [0007], examples & US 6080778 A, columns 1, 2, examples & WO 1999/048488 A2 & EP 1063980 A2	1-5
Y	WO 2016/011335 A1 (SCHNTAG, J.) 21 January 2016, claims, examples & JP 2017-528431 A & US 2017/0173060 A1 & EP 3169331 A1 & KR 10-2017-0026635 A & CN 106687119 A	1-5
Y	O' BRYANT, S. E. et al., A blood-based screening tool for Alzheimer's disease that spans serum and plasma: findings from TARC and ADNI, PLoS One, 2011, vol. 6, no. 12, e28092, pp. 1-8, particularly, pp. 5, 6	1-5
Y	LIU, Z. Y., Correlation between cognition and blood glucose/lipid of patients with Alzheimer's disease, Zhongguo Laonianxue Zazhi, 2014, vol. 34, no. 4, pp. 1046, 1047, particularly, p. 1046, table 1	1-5
Y	GU, B. J. et al., Innate phagocytosis by peripheral blood monocytes is altered in Alzheimer's disease, Acta Neuropathologica, 2016, vol. 132, no. 3, pp. 377-389, particularly, p. 382, fig. 2	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/28(2006.01)i, G01N33/49(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. C12M1/34, C12Q1/06, C12Q1/26, C12Q1/28, G01N33/49

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-537133 A (エグゾニ・テラピューティック・ソシエテ・アノニム) 2009.10.29, 全体。特に、特許請求の範囲、実施例 & US 2010/0055682 A1 特許請求の範囲、実施例 & WO 2007/132120 A2 & EP 2021509 A2 & CN 101490280 A & KR 10-2009-0098941 A	1-5
Y	JP 2004-527754 A (シンエックス・ファルマ・インコーポレーテッド) 2004.09.09, 全体。特に、特許請求の範囲、実施例 & US 2002/0160425 A1 特許請求の範囲、実施例 & WO 2002/088706 A2 & EP 1467212 A1 & KR 10-2004-0015168 A & CN 1543571 A	1-5

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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

25.10.2018

国際調査報告の発送日

06.11.2018

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)

上村 直子

4 B

4508

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	WO 2016/143703 A1 (国立大学法人 新潟大学) 2016.09.15, 全体。 特に、特許請求の範囲、実施例 & US 2018/0024150 A1 特許請求の 範囲、実施例 & EP 3267200 A1	1-5
Y	JP 2008-509668 A (ジェネラル アトミクス) 2008.04.03, 特許請 求の範囲、実施例 & US 2006/0035308 A1 特許請求の範囲、実施例 & WO 2006/020762 A1 & EP 1776466 A1 & CN 101044246 A	1-5
Y	JP 2003-227837 A (株式会社いかがく) 2003.08.15, [0001] 段落 & US 2003/0077668 A1 [0005]段落 & EP 1070962 A2	1-5
Y	JP 2010-47616 A (チルドレンズ メディカル センター コーポレ ーション) 2010.03.04, [0007] 段落、実施例 & US 6080778 A column 1-2、実施例 & WO 1999/048488 A2 & EP 1063980 A2	1-5
Y	WO 2016/011335 A1 (SCHNTAG, JEROME) 2016.01.21, 特許請求の範 囲、実施例 & JP 2017-528431 A & US 2017/0173060 A1 & EP 3169331 A1 & KR 10-2017-0026635 A & CN 106687119 A	1-5
Y	O' BRYANT, S. E. et al., A blood-based screening tool for Alzheimer' s disease that spans serum and plasma: findings from TARC and ADNI, PLoS ONE, 2011, Vol.6, No.12, e28092, p.1-8, 特 に、第5頁～第6頁	1-5
Y	LIU, Z.-Y., Correlation between cognition and blood glucose/lipid of patients with Alzheimer' s disease, ZHONGGUO LAONIANXUE ZAZHI, 2014, Vol.34, No.4, p.1046-1047, 特に、第1 046頁 表1	1-5
Y	GU, B. J. et al., Innate phagocytosis by peripheral blood monocytes is altered in Alzheimer' s disease, Acta Neuropathologica, 2016, Vol.132, No.3, p.377-389, 特に、第3 82頁 Fig. 2	1-5