

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/018947

発行日 平成16年1月15日 (2004.1.15)

(43) 国際公開日 平成14年3月7日 (2002.3.7)

(51) Int.Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

K

GO 1 N 21/64

GO 1 N 21/64

F

GO 1 N 33/49

GO 1 N 33/49

H

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)

出願番号	特願2002-523616 (P2002-523616)	(71) 出願人	503074935
(21) 国際出願番号	PCT/JP2000/005896		有限会社ゴールドラッシュ
(22) 国際出願日	平成12年8月30日 (2000.8.30)		大阪府大阪市北区天神橋4-10-10
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, CN, JP, US	(74) 代理人	100101708
			弁理士 中井 信宏
		(72) 発明者	楊 裕治
			大阪市北区天神橋4-10-10

(54) 【発明の名称】 血液腫瘍の診断方法および診断薬

(57) 【要約】

血液腫瘍患者の病態を把握し、かつ抗癌剤の有効性等を適切に経過観察することのできる血液腫瘍の診断方法及びそれに用いる診断薬である。血液腫瘍の診断方法は、患者から採取した血液標本、細胞標本又は組織標本と抗H抗体とをインビトロで抗原抗体反応させたのち、抗原抗体反応の結果を定性的又は定量的に分析することによって、血液腫瘍患者の病態を診断する。抗原抗体反応の結果は、免疫組織染色法によって定性的に分析してもよく、フローサイトメトリー法によって定量的に分析してもよい。また、血液腫瘍の診断薬は、上記診断方法に使用され、抗H抗体を主成分として含有するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者から採取した血液標本、細胞標本又は組織標本と抗 H 抗体とをインビトロで抗原抗体反応させたのち、抗原抗体反応の結果を定性的又は定量的に分析することによって、血液腫瘍患者の病態を診断することを特徴とする血液腫瘍の診断方法。

【請求項 2】

抗原抗体反応の結果を、免疫組織染色法によって定性的に分析することを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の血液腫瘍の診断方法。

【請求項 3】

抗原抗体反応した抗 H 抗体量を、フローサイトメトリー法によって定量的に分析することを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の血液腫瘍の診断方法。 10

【請求項 4】

抗 H 抗体を主成分とすることを特徴とする血液腫瘍の診断薬。

【発明の詳細な説明】

技術分野

この発明は、急性骨髄性白血病（AML）、ホジキン病（HD）や非ホジキンリンパ腫（NHL）などの悪性リンパ腫、リンパ性白血病等の血液腫瘍患者の病態を、容易に把握することができる診断薬及び診断方法に関する。

背景技術

悪性リンパ腫や白血病等の血液腫瘍は、リンパ球や白血球などの血球細胞やリンパ節が腫瘍化しているため、他の臓器の腫瘍で一般的に行われる外科的手術をでは治療できず、もっぱら抗癌剤を利用した化学療法、X 線や他の高エネルギーの放射線を使用する放射線療法、他人の骨髄を移植する骨髄移植療法などによる治療が行われている。なかでも、骨髄提供者（ドナー）や特別な放射線施設を必要としない、化学療法による治療が最もよく行われている。 20

しかし、上記のような化学療法においては、抗癌剤が、ガン細胞のみならず、正常な血液細胞をも傷つけてしまうため、吐き気、嘔吐、口内炎、脱毛、高熱、下痢、感染症、貧血、呼吸困難、出血、薬物アレルギー等の副作用が生じたり、また、骨髄抑制による感染症、出血が生じることもある。

このような副作用を最小限にとどめながら、患者の病態を把握し有効な治療を行うには、治療の進み具合に応じて、抗癌剤の種類、投与量、投与時期等を抗癌剤の有効性を確認しながらコントロールする必要がある、治療の進み具合、すなわち、病気の治り具合を定期的に経過観察することが求められている。 30

そして、このような経過観察の方法としては、血液中の可溶性インターロイキン 2 受容体の量に基づく方法や、血中のリンパ球数や白血球数に基づく方法等が行われている。

しかし、可溶性インターロイキン 2 受容体の量に基づく方法は、非ホジキンリンパ腫（NHL）、成人細胞白血病（ATL）などにしか適用できず、適用範囲が狭いとの問題点があった。

また、血中のリンパ球数や白血球数に基づく方法は、必ずしも病態を把握するとは言えないとの問題点があった。 40

そこで、この発明は上記のような問題点を解決し、血液腫瘍患者の病態を把握し、かつ抗癌剤の有効性等を適切に経過観察することのできる血液腫瘍の診断方法及びそれに用いる診断薬を提供することを目的とする。

発明の開示

すなわち、この発明にかかる血液腫瘍の診断方法は、患者から採取した血液標本、細胞標本又は組織標本と抗 H 抗体とをインビトロで抗原抗体反応させたのち、抗原抗体反応の結果を定性的又は定量的に分析することによって、血液腫瘍患者の病態を診断することを特徴とする。また、抗原抗体反応の結果は、免疫組織染色法によって定性的に分析してもよく、フローサイトメトリー法によって定量的に分析してもよい。

このように、患者から採取した血液標本等と抗 H 抗体とを抗原抗体反応させ、反応の結果 50

を定性的又は定量的に分析することによって、病態の把握及び抗癌剤による治療の進み具合を容易に経過観察することができ、患者に投与する抗癌剤の種類、投与量、投与時期、有効性等の判断に役立てることができる。

発明を実施するための最良の形態

この発明の血液腫瘍の診断方法は、患者から採取した血液標本又は組織標本と抗H抗体とをインビトロで抗原抗体反応させたのち、抗原抗体反応の結果を定性的又は定量的に分析することによって、血液腫瘍患者の病態を診断する。

ここで、抗H抗体とは、赤血球表面及びその他の組織に存在し、ABO式の血液型を決定するH抗原(O型抗原)に対するヒト以外の動物由来の抗体であり、ポリクローナル抗体でもかまわないが、検出感度の点から、ハイブリドーマ法によって作られたモノクローナル抗体が好ましい。

抗原抗体反応の結果に基づいて、定性的に判断する方法としては、免疫組織染色法などの通常用いられる方法が、定量的に測定する方法としてはフローサイトメトリー法などの通常用いられる方法が挙げられる。

なお、免疫組織染色法とは、パラフィン固定された組織切片をスライドガラスに固定して、脱パラフィン化したのち、抗H抗体(1次抗体)を主要成分とする診断薬を降りかけて抗原抗体反応を行い、当該抗H抗体と特異的に抗原抗体反応する二次抗体を降りかけて抗原抗体反応させ、当該2次抗体につけられた蛍光色素による呈色やペルオキシダーゼなどの酵素による呈色反応によって、抗原抗体反応の結果を定性的に判断する方法である。また、フローサイトメトリー法とは、溶液中で血球細胞と蛍光色素によって標識された抗H抗体等とを抗原抗体反応させ、蛍光色素によって染色された細胞の数をフローサイトメーターによって測定する方法である。

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

実施例

組織標本として、成人の重篤な病態の急性骨髄性白血病(AML)、ホジキン病(HD)、T細胞又はB細胞由来の非ホジキンリンパ腫(T-NHL、B-NHL)患者から採取したリンパ節のパラフィン切片と、KM132(抗H抗体)、KM32(抗A抗体)、KM126(抗B抗体)、KM93(抗シアル酸含有糖鎖抗体)、KM174(抗Forssman及び抗A抗体)、KM380(抗Stage specific embryonic antigen-1抗体)の6種類の抗体を用いて、以下に示す手順によって免疫組織染色した。なお、各疾病ごとの標本数は、AMLは9例、HDは2例、T-NHLは7例、B-NHLは23例であり、抗原抗体反応の結果は、VECTASTAIN(登録商標)Elite ABCキット(フナコシ株式会社)に添付された説明書にしたがって呈色反応を行い、当該呈色反応の結果に基づいて判断した。

(1) 脱パラフィン化

組織標本のパラフィン切片が接着されたスライドガラスを、室温で、キシレンに10分間づつ3回、エタノールに2分間づつ3回通したのち、水道水で5分間洗浄した。なお、エタノールの濃度は一回ごとに段階的に下げた。

(2) 内因性ペルオキシダーゼ及び非特異的反応のブロッキング

脱パラフィン化された組織標本を、0.3%過酸化水素加メタノール溶液(100mlのメタノール液に対して30%の過酸化水素原液を1mlの割合で加える)に室温で30分間浸して、内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。

つぎに、組織標本を流水で10分間水洗し、蒸留水に浸した後、PBS(10mMリン酸ナトリウム(pH7.5), 0.9%NaCl緩衝液)に5分間浸した。

さらに、PBSに浸した組織標本を、2次抗体を作製した動物と同じ動物種由来の希釈正常血清(PBSに2%の濃度となるようにブロッキング用血清を溶かしたもの)に室温で20分浸し、2次抗体が非特異的に組織標本と反応するのを防いだ。

(3) 1次抗体との反応

PBSで希釈した1次抗体(6種)を滴下し、室温で30分間抗原抗体反応させ、PBSで5分間洗浄した。

10

20

30

40

50

(4) 2次抗体との反応

希釈ビオチン化2次抗体溶液 (PBS 10 ml、正常血清 150 μ l、ビオチン化2次抗体 50 μ l の割合で混合したもの) を滴下し、室温で30分反応させ、PBSで5分間洗浄した。

(5) 呈色反応

ABC試薬 (PBS 5 ml に試薬 A (アビジン DH 溶液) 100 μ l を加えたのち、試薬 B (ビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼアビジン H 溶液) 100 μ l を加えたもの) を滴下し、室温で30分反応させ、PBSで5分間洗浄した。

つぎに、0.02%過酸化水素溶液と0.1%3,3'-ジアミノベンチジン (DAB) 溶液 (0.1 M Tris 緩衝液、pH 7.2 で調整) とを等量混合してペルオキシダーゼ基質溶液を調製し、組織標本に滴下して室温で10分間呈色反応させ、流水 (水道水) で水洗して呈色反応を停止させた。

呈色反応終了後、組織標本をヘマトキシリンで核染色し、情報にしたがって脱水、透徹、封入した。

このようにして、免疫組織染色した結果を疾患別に、以下の表1から表4に示す。なお、表中の「+」は陽性をであったことを示し、「-」は陰性であったことを示しており、「++」及び「+++」は、それぞれ、強い陽性、かなり強い陽性をそれぞれ示している。

表1

No.	疾患	血液型	KM132	KM32	KM126	KM93	KM174	KM380
1	AML	A	-	+	-	++	+	++
2	AML	A	-	+++	-	++	++	+++
3	AML	O	-	-	-	+	-	+
4	AML	B	-	-	++	+	-	+
5	AML	A	-	++	-	+	++	+
6	AML	AB	-	+++	++	+	+	+++
7	AML	O	+	-	-	++	-	+
8	AML	O	-	-	-	+	-	+++
9	AML	B	-	-	++	++	-	+

表2

No.	疾患	血液型	KM132	KM32	KM126	KM93	KM174	KM380
10	HD	A	-	++	-	+	++	+++
11	HD	O	-	-	-	+	-	+++

表 3

No.	疾患	血液型	KM132	KM32	KM126	KM93	KM174	KM380
12	T-NHL	O	—	—	—	+	—	+
13	T-NHL	O	—	—	—	+	—	++
14	T-NHL	B	—	—	++	++	—	+
15	T-NHL	O	—	—	—	+	—	++
16	T-NHL	A	—	+++	—	++	+++	+
17	T-NHL	A	—	++	—	+	+	+
18	T-NHL	A	—	++	—	+	+	+

表 4

No.	疾患	血液型	KM132	KM32	KM126	KM93	KM174	KM380
19	B-NHL	B	—	—	++	++	—	++
20	B-NHL	B	—	—	+++	++	—	+++
21	B-NHL	A	—	+	—	+	+	+++
22	B-NHL	O	—	—	—	+	—	+
23	B-NHL	A	—	++	—	+	++	+
24	B-NHL	B	—	—	+	+	—	++
25	B-NHL	AB	—	+++	+	+	+	++
26	B-NHL	O	—	—	—	+	—	+++
27	B-NHL	O	—	—	—	+	—	+
28	B-NHL	A	—	++	—	+	++	+
29	B-NHL	A	—	++	—	+	++	++
30	B-NHL	A	—	+++	—	+	+++	++
31	B-NHL	O	—	—	—	+	—	++
32	B-NHL	B	—	—	+	+	—	++
33	B-NHL	AB	—	++	+	+	+	++
34	B-NHL	O	—	—	—	++	—	++
35	B-NHL	A	—	++	—	+	+	++
36	B-NHL	B	—	—	++	+	—	+
37	B-NHL	O	—	—	—	+	—	+++
38	B-NHL	O	—	—	—	+	—	+++
39	B-NHL	O	—	—	—	+	—	+++
40	B-NHL	A	—	++	—	+	++	+
41	B-NHL	AB	—	++	+	+	+	+

以上の結果からも明らかなように、AML患者からの組織標本1例を除き、すべての血液腫瘍患者の病理組織において、KM132（抗H抗体）との反応が陰性であり、これらの組織においては、H抗原が消費されていることがわかった。

すなわち、H抗原が潤沢であることは、患者の病態が寛解・治癒に向かっていることを示し、H抗原が消費されていることは、患者の病態が再発・重篤に向かっていることを示していることがわかった。

なお、この発明は上記実施例に限定されるものではなく、請求の範囲に記載された技術的範囲内において様々な変形を加えることができる。

10

20

30

40

50

例えば、上記実施例においては、2次抗体につけられたペルオキシダーゼによる呈色反応に基づいて患者の病態を判断したが、このほかにも2次抗体又は1次抗体に蛍光色素や放射性元素マーカをつけ、当該2次抗体又は1次抗体と組織標本との抗原抗体反応の結果に基づいて患者の病態を定性的に判断してもよい。

また、溶液中の血球細胞と蛍光色素によって標識された抗H抗体等とを抗原抗体反応させ、蛍光色素によって染色された細胞の数をフローサイトメーターで測定するフローサイトメトリー法によって、患者の病態を定量的に経過観察することもできる。

さらに、上記実施例で実験した症例以外にも、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、形質細胞種などの血液腫瘍患者の経過観察にも適用することができる。なお、血液腫瘍患者であっても、生れつきH抗原を持たないボンベイ・パラボンベイ型の患者には適応することができない。

10

加えて、上記実施例の結果から、H抗原の消費を抑制するよって、血液腫瘍を寛解・治癒できる可能性があり、例えば、抗H抗体によってH抗原をカバーすることにより、血液腫瘍の治療に役立つ可能性がある。

産業上の利用可能性

この発明は、血球細胞等と抗H抗体とを抗原抗体反応させ、反応結果を分析することによって、簡便・容易に血液腫瘍患者を経過観察し、フォローアップすることができ、また、抗癌剤治療においては、抗癌剤の種類、投与量、投与時期や有効性の判断に役立てることができる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP00/05896
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ G01N33/53		
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. ⁷ G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Kobo 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Kobo 1994-2000 Kokai Jitsuyo Shinan Kobo 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Kobo 1996-2000		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Takayoshi ASAI et al., "Keika-chu ni Ketsueki-gata A-Kougen, H-Kougen ga shoushitsu shita Kyuu-sei Kotsuzui Gakkyuu-sei Hakketsu-byou no Irei", Rinshou Ketsueki, 24(7), (1983), Pages 881 to 886	1-4
X	Masahiko SUZUKI et al., "Kassei Transferase Kassei Teika to Kekkyuu H-Kougen Kassei Teika wo tomonai AB-Benkei-gata wo shimeshita Kyuusei Kotsuzui-sei Hakketsu-byou no Irei", Niszeki Igaku, 41(4), (1989), pages 193 to 197	1-4
A	JP 4-252957 A (Becton Dickinson & Co.), 08 September, 1992 (08.09.92) & EP 470810 A & NO 9103063 A & AU 9181528 A & CA 2048604 A & FI 9103733 A & ZA 9105958 A & BR 9103400 A & US 5627037 A & DE 69118617 A & IE 76732 A & SG 49820 A	3
☐ 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 document 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 "1" 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 30 November, 2000 (30.11.00)		Date of mailing of the international search report 12 December, 2000 (12.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP00/05896
A. 発明の属する分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ G01N33/53		
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 ⁷ 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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2000年 日本国特許実用新案公報 1994-2000年 日本国実用新案登録公報 1996-2000年		
国際調査で利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) JICST		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 請求の範囲の番号
X	浅井隆善ら「経過中に血液型A抗原、H抗原が消失した急性骨髄芽球性白血病の1例」、臨床血液、24(7)、1983、p881-886	1-4
X	鈴木正彦ら「血清transferrase活性低下と血球H抗原活性低下を伴いAB変異型を示した急性骨髄性白血病の1例」日赤医学、41(4)、1989、p193-197	1-4
☒ 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 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「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」 従来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		
国際調査を完了した日 90.11.00		国際調査報告の発送日 12.12.00
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100-8916 東京都千代田区霞が関二丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中明典 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP00/05896
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 及び一部の数所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 4-252957, A (ベクトン・ディッキンソン・アンド ・カンパニー) 8, 9月, 1992 (08, 09, 92) 、 & EP, 470810, A & NO, 9103063, A & AU, 9181528, A & CA, 2048004, A & FI, 9103733, A & ZA, 9105958, A & BR, 9103400, A & US, 5627037, A & DE, 69118617, A & IE, 76732, A & SG, 48820, A	3

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	血肿瘤的诊断方法和诊断剂		
公开(公告)号	JPWO2002018947A1	公开(公告)日	2004-01-15
申请号	JP2002523616	申请日	2000-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	有限公司淘金热		
申请(专利权)人(译)	有限公司淘金热		
[标]发明人	楊裕治		
发明人	楊 裕治		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N33/49 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57407		
FI分类号	G01N33/53.K G01N21/64.F G01N33/49.H		
代理人(译)	中井信弘		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种能够掌握血液肿瘤患者的病理状况并适当观察抗癌剂等的功效的血液肿瘤的诊断方法及其诊断剂。 诊断血液肿瘤的方法是在从患者收集的血液样品，细胞样品或组织样品与抗-H抗体之间进行抗原-抗体反应，然后定性或定量地分析抗原-抗体反应的结果。 ，诊断血液肿瘤患者的病理状况。 抗原-抗体反应的结果可以通过免疫组织染色法进行定性分析，也可以通过流式细胞术进行定量分析。 在上述诊断方法中使用血液肿瘤的诊断剂，并以抗H抗体为主要成分。

No.	疾患	血液型	KM132	KM32	KM126	KM93	KM174	KM380
1	AML	A	-	+	-	++	+	++
2	AML	A	-	+++	-	++	++	+++
3	AML	O	-	-	-	+	-	+
4	AML	B	-	-	++	+	-	+
5	AML	A	-	++	-	+	++	+
6	AML	AB	-	+++	++	+	+	+++
7	AML	O	+	-	-	++	-	+
8	AML	O	-	-	-	+	-	+++
9	AML	B	-	-	++	++	-	+