

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-163992

(P2011-163992A)

(43) 公開日 平成23年8月25日(2011.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 A
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573	A

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2010-28388 (P2010-28388)	(71) 出願人	000003975
(22) 出願日	平成22年2月12日 (2010.2.12)		日東紡績株式会社
			福島県福島市郷野目字東1番地
		(74) 代理人	110000855
			特許業務法人浅村特許事務所
		(74) 代理人	100066692
			弁理士 浅村 皓
		(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100097870
			弁理士 梶原 斎子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F T C Dとその自己抗体との複合体の免疫測定方法、それに用いるキット及びそれを用いた癌判定方法

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、癌判定に応用することのできる、ホルミニノトランスフェラーゼ シクロデアミナーゼ (formininotransferase cyclodeaminase ; F T C D) とその自己抗体との複合体の測定方法を提供することである。

【解決手段】検体中の F T C D とその自己抗体との複合体に、 F T C D に対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を作用させ、得られる複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物を測定することによりその複合体を測定することができ、それによって、原発性肝細胞癌などの癌判定が可能である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中のホルミニノトランスフェラーゼ シクロデアミナーゼ (formininotransferase cyclodeaminase ; F T C D) とその自己抗体との複合体を免疫測定することを特徴とする、検体中の F T C D とその自己抗体との複合体の免疫測定方法。

【請求項 2】

検体中の F T C D とその自己抗体との複合体に、F T C D に対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を作用させ、得られる複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物を測定することによりその複合体を測定する、請求項 1 に記載の免疫測定方法。

10

【請求項 3】

試薬抗体および結合可能物質のいずれかが標識成分で標識されており、免疫複合物中の標識成分を測定して免疫複合物を測定することにより複合体を測定する、請求項 2 に記載の免疫測定方法。

【請求項 4】

検体中の F T C D とその自己抗体との複合体に、水不溶性担体に結合している F T C D に対する試薬抗体を作用させ、次いで、標識成分で標識されたその自己抗体に対する結合可能物質を作用させ、複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物を生成させ、その免疫複合物に結合している標識成分を測定することによりその複合体を測定する、請求項 3 に記載の免疫測定方法。

20

【請求項 5】

その自己抗体に対する結合可能物質が、抗 I g G 抗体である、請求項 2 から 4 のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 6】

標識成分が酵素または放射性物質である、請求項 3 から 5 のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 7】

癌判定用である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 8】

癌が原発性肝細胞癌である、請求項 7 に記載の免疫測定方法。

30

【請求項 9】

検体が血液由来検体である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 10】

F T C D に対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を含む、F T C D とその自己抗体との複合体の免疫測定用キット。

【請求項 11】

F T C D とその自己抗体との複合体を測定することにより、癌であることを判定する、癌判定方法。

【請求項 12】

血液由来検体中の複合体を測定する、請求項 11 に記載の癌判定方法。

40

【請求項 13】

癌が原発性肝細胞癌である、請求項 12 に記載の癌判定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホルミニノトランスフェラーゼ シクロデアミナーゼ (formininotransferase cyclodeaminase ; F T C D) とその自己抗体との複合体を測定するための免疫測定方法及び免疫測定用キットに関するものである。F T C D とその自己抗体との複合体は、特に担癌患者の血中に高値に出現するものであり、したがって、本発明は、F T C D とその自己抗体との複合体を単に測定する方法を提供するだけでなく、癌の判定にも利用するこ

50

とができる。

【背景技術】

【0002】

F T C D は、葉酸代謝及びグルタミン酸代謝の2種類の機能を持つ肝臓特異的に発現する酵素であることが知られている（非特許文献1）。

他方、アガロース2次元電気泳動に2D-DIGE法（two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis）を適用した改良アガロース2次元電気泳動法（非特許文献2）により、原発性肝細胞癌の癌部および周辺非癌部組織の蛋白発現量の比較をプロテオーム解析を行ない、F T C D が非癌部に多く発現されることが明らかになっている（非特許文献3）

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Anne-Marie Bashour et al., J Biol Chem. 1998; 31: 19612-19617

【非特許文献2】Takeshi Tomonaga et al., Clin. Cancer Res. 2004;10:2007-2014

【非特許文献3】Masanori Seimiya et al., Hepatology 2008;48:519-30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、癌が疑われる患者または癌患者由来の組織検体中に存在する、F T C D の発現レベルを測定して、組織中の癌部は非癌部に比べて弱く発現することにより、それらの組織の癌部と非癌部の判別することができることを見出し、これに対し特許出願した（特願2008年264794号）。本発明者らは、さらに血液検体中のF T C D の存在について研究を続けたところ、驚くべきことに、血液検体中にF T C D とその自己抗体との複合体が存在し、癌患者の場合、組織部とは逆に、その複合体の量が多いことを見出した。したがって、本発明の目的は、癌判定に応用することのできる、F T C D とその自己抗体との複合体の測定方法を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、検体中のF T C D とその自己抗体との複合体を免疫測定することにより、該複合体を測定することができ、それによって癌判定が可能になることを見出し、本発明を完成させた。

30

従って、本発明は、検体中のF T C D とその自己抗体との複合体を免疫測定することを特徴とする、検体中のF T C D とその自己抗体との複合体の免疫測定方法に関する。

更に、本発明は、F T C D に対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を含む、F T C D とその自己抗体との複合体の免疫測定用キットに関する。

更に、本発明は、F T C D とその自己抗体との複合体を測定することにより、癌であることを判定する、癌判定方法に関する。

【発明の効果】

【0006】

本発明においては、検体中、特に、血液由来検体中に存在するF T C D とその自己抗体との複合体を簡単に測定でき、原発性肝細胞癌などの癌患者の判定に有効である。

40

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】抗F T C D 抗体を感作したE L I S A プレートを用いて健常人血清検体、原発性肝細胞癌患者血清検体のF T C D とその自己抗体との複合体を測定した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明のF T C D とその自己抗体との複合体の免疫測定方法は、一般的な蛋白質とその抗体との免疫複合体の免疫測定方法で知られている公知の方法をそのまま、応用できる。

50

本発明の免疫測定方法においては、例えば、検体中のFTCDとその自己抗体との複合体に、FTCDに対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を作用させ、得られる複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物を測定することによりその複合体を測定することができる。

【0009】

本発明において、検体とは、生体由来の試料が好適で、特に、血液由来検体が好適であり、血液検体としては、全血、血漿、血清を例示できる。

【0010】

本発明の免疫測定方法の測定対象は、FTCDとその自己抗体との複合体である。本発明において、FTCDは、正式名がホルムイミノトランスフェラーゼシクロデアミナーゼ (formiminotransferase cyclodeaminase) であり、Swiss-Prot entry 095954でコードされる分子量59kDa、541アミノ酸で構成される蛋白質である。

10

【0011】

本発明において、FTCDとその自己抗体との複合体とは、FTCDとFTCDに対する自己抗体との免疫複合体を意味し、本明細書では単に複合体と記載することもある。

本発明において、自己抗体とは、自己の身体に存在する物質に対して自己の身体で産生される抗体であって、自己の身体に存在する物質がFTCDであり、そのFTCDに対する抗体をいう。

本発明において、FTCDに対する試薬抗体とは、試薬として用いるFTCDと特異的に結合する抗体をいい、本明細書では単に試薬抗体と記載することもある。その試薬抗体は、その産生動物種としてヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等があり、それぞれに所定範囲の免疫グロブリンがある。その試薬抗体は、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDのいずれでもよい。また、試薬抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、及びこれらの断片(抗原と結合能を有するもので例えば、H鎖、L鎖、Fab、F(ab')₂等)のいずれでもよい。このような試薬抗体は、FTCD全長蛋白質またはその断片ペプチドを抗原として、上記した産生動物種に免疫して、その免疫動物から抗血清として得ることができ、また、免疫動物からの脾細胞とミエローム細胞とを融合して、融合細胞から、FTCDに対する抗体を産生する融合細胞をスクリーニングして、得られるハイブリドーマからモノクローナル抗体として得ることもできる。また、FTCDに対する試薬抗体は、抗FTCD抗体として市販されており、それらの市販品を使用することもできる。

20

30

【0012】

本発明において、その自己抗体に対する結合可能物質とは、FTCDに対する自己抗体と結合可能な物質であれば特に限定しないが、本明細書では単に結合可能物質と記載することができる。この様な結合可能物質としては、抗IgG抗体、プロテインA、プロテインG、試薬としてのFTCD抗原を用いることができ、そのうち、抗IgG抗体が好ましい。

試薬としてのFTCD抗原を用いる場合、FTCDに対する自己抗体と抗原抗体反応しうる抗原であれば特に限定しないが、FTCD全長蛋白質、FTCD全長蛋白質の変異体であって該蛋白質と同様のFTCDに対する自己抗体と抗原抗体反応しうる機能を有し且つ該アミノ酸配列と90%以上の相同性を有する蛋白質もしくはFTCD全長蛋白質のアミノ酸配列において1個から数个のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有する蛋白質である変異体、FTCDの断片ペプチドであってFTCDの自己抗体と抗原抗体反応しうるペプチドを例示できる。FTCD全長蛋白質は、Abnova社より入手可能であるが、全アミノ酸配列が既知であるので、FTCD全長蛋白質やその変異体は、遺伝子組換え技術によっても合成できる。本発明においてFTCDの断片ペプチドを用いるときは、FTCD全長蛋白質を酵素分解等によって各種のペプチド断片に切断して作成してもよいし、市販の自動ペプチド合成装置を用いても容易に作成することができる。また、標的のFTCDの断片ペプチドを遺伝子組み換え技術によっても作成することができる。

40

50

そのようにして得られたFTCD全長蛋白質の変異体や断片ペプチドを、FTCDに対する自己抗体と反応させ抗原抗体反応をするものを選択して試薬としてのFTCD抗原として用いることができる。本発明においては、上記した各ペプチド断片の全体のほか、その一部も使用できるし、それらの混合物も使用でき、これらも試薬としてのFTCD抗原に包含される。

【0013】

本発明においては、検体中のFTCDとその自己抗体との複合体に、FTCDに対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を作用させると、複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物が生成する。その免疫複合物を測定するには、FTCDに対する試薬抗体（試薬抗体）およびその自己抗体に対する結合可能物質（結合可能物質）のいずれかを標識成分で標識し、生成する免疫複合物中の標識成分を測定することによって、免疫複合物を測定するのが好ましい。

標識成分としては、酵素、放射性物質、蛍光物質、化学発光物質等常用される標識成分を使用することができるが、酵素や放射性物質が好ましい。

標識するための酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ等の酵素免疫分析法(EIA)に常用される酵素が適宜使用され、これらの酵素に適合しEIAで常用される発色基質が適宜使用される。発色基質としては、例えばHRPの場合は、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMBZ)、TMBZ \cdot HCl、TMBZ \cdot PS、ABTS、*o*-フェニレンジアミン、*p*-ヒドロキシフェニル酢酸等が使用され、アルカリフォスファターゼの場合は、*p*-ニトロフェニルフォスフェート、4-メチルウンベリフェリルフォスフェート等が使用され、 α -ガラクトシダーゼの場合は、*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド等が使用される。

標識するための放射性物質としては放射性ヨウ素原子等を、蛍光物質としてはFITCやローダミン等を、化学発光物質としてはルミノール等を例示することができる。

【0014】

本発明において標識成分を用いる場合、例えば、検体中のFTCDとその自己抗体との複合体に、水不溶性担体に結合しているFTCDに対する試薬抗体を作用させ、次いで、標識成分で標識されたその自己抗体に対する結合可能物質を作用させ、複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物を生成させ、その免疫複合物に結合している標識成分を測定することによりその複合体を測定することが好ましい。また、検体中のFTCDとその自己抗体との複合体に、その自己抗体に対する結合可能物質が結合した水不溶性担体を作用させ、次いで、標識成分で標識されたFTCDに対する試薬抗体を作用させ、複合体と結合可能物質と試薬抗体との免疫複合物を生成させ、その免疫複合物に結合している標識成分を測定することによりその複合体を測定することもできる。

【0015】

水不溶性担体の調製は、蛋白質を固相面に結合する既知の方法を用いて容易に行うことができる。例えば、固相化担体としては、通常、ビーズ、マイクロプレート、チューブ等が用いられる。これらの固相面にFTCDに対する試薬抗体を結合する方法としては、物理吸着、化学結合等既知の固定化技術が適宜利用できる。

このようにして固相化したFTCDに対する試薬抗体に、FTCDとその自己抗体との複合体とを含む検体とを接触させると、複合体中のFTCD部分と試薬抗体とが結合する。さらに、その結合物に対し、標識成分で標識されたその自己抗体に対する結合可能物質（例えば標識抗IgG抗体）を作用させると複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物が生成する。その結果、生成する免疫複合物中の標識成分を測定することにより、検体中のFTCDとその自己抗体との複合体を測定することができる。

上記と同様にして、固相化担体にFTCDの自己抗体に対する結合可能物質を結合させて、固相化した結合可能物質に、FTCDとその自己抗体との複合体とを含む検体とを接触させて、複合体中の自己抗体部分と結合可能物質とを結合させ、さらに、その結合物に

10

20

30

40

50

対し、標識成分で標識された F T C D に対する試薬抗体（例えば、抗 F T C D 抗体）を作用させて、複合体と結合可能物質と試薬抗体との免疫複合物を生成させて、同様に、検体中の F T C D とその自己抗体との複合体を測定することもできる。

【0016】

本発明の免疫測定方法の典型的な例を以下に示す。

プレートに抗 F T C D 抗体を加え、低温例えば 4 で静置して感作し、その後、P B S 等の洗浄液で洗浄する。ついで、そのプレートを B S A でコーティングし、抗 F T C D 抗体 E L I S A プレートを作成する。希釈した検体を抗 F T C D 抗体 E L I S A プレートに加え、加温例えば 37 で静置し、次いで P B S 等の洗浄液で洗浄をする。得られるプレートのウェルに H R P 標識された抗ヒト I g G 抗体を加え、加温例えば 37 で静置する。ついで、ウェルを P B S 等の洗浄液で洗浄した後、T M B Z を加え、例えば室温で静置した後、反応停止剤として 1 N 硫酸を加える。吸光度はマイクロプレートリーダー（B i o R a d 社製）を用いて、波長 4 5 0 n m にて吸光度を測定する。吸光度の値とあらかじめ作成しておいた検量線から、F T C D とその自己抗体との複合体の値を求める。

10

【0017】

本発明の測定方法は、F T C D に対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を含む、F T C D とその自己抗体との複合体の免疫測定用キットにより実施することができる。そのための F T C D に対する試薬抗体、その自己抗体に対する結合可能物質は、本発明の測定方法で説明したとおりである。すなわち、例えば、F T C D に対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質のいずれかを水不溶性担体に結合させた形態で、他のいずれかを標識成分で標識した形態で、キットの試薬成分とすることができる。その他の試薬成分として、界面活性剤、緩衝剤等の免疫測定法で常用されるものを適宜、加えてもよい。

20

【0018】

本発明においては、F T C D とその自己抗体との複合体を測定することにより、癌判定をすることができる。

また、一般に F T C D とその自己抗体との複合体の量が多いと、原発性肝細胞癌（原発性肝細胞癌、原発性胆管細胞癌など）、転移性肝癌等の肝癌、膀胱癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、甲状腺癌、皮膚癌などの癌が疑われ、本発明により F T C D に対する自己抗体を測定することは、患者の癌疾患の判別に有効である。本発明においては、原発性肝細胞癌の判別に有効であり、例えば、健常人と、初発原発性肝細胞癌患者や再発原発性肝細胞癌患者との判別に有効である。

30

【実施例】

【0019】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に何ら制限されるものではない。

実施例 1

F T C D とその自己抗体との複合体の測定

健常人、初発原発性肝細胞癌患者、及び再発原発性肝細胞癌患者から採取した血清検体について、F T C D とその自己抗体との複合体の測定を、以下に具体的に説明するように行なった。

40

【0020】

1. 方法

(1) 抗 F T C D 抗体 E L I S A プレートの作成

E L I S A プレート（N u n c 社製，M a x i s o r p ）に抗 F T C D 抗体（A b n o v a 社製，5 μ g / m L ，1 0 0 μ L / w e l l ）を 1 晩 4 静置して感作し、その後、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S （2 0 0 μ L / w e l l ）で 3 回洗浄を行った。ついで、1 . 5 % B S A 、1 0 % サッカロースを含む P B S （2 0 0 μ L / w e l l ）で 1 晩コーティングし、抗 F T C D 抗体 E L I S A プレートを作成した。

【0021】

50

(2) F T C Dとその自己抗体との複合体の測定

検出抗体としてHRP標識された抗ヒトIgG抗体（Zymed社製）を、0.05% Tween 20を含むPBSにて4000倍に希釈したものをを用いた。サンプル血清はPBSにて100倍に希釈した。その希釈したサンプルを抗FTCD抗体ELISAプレートに100 μ L/wellずつ加え、1時間37 $^{\circ}$ Cで静置し、その後、0.05% Tween 20を含むPBS（200 μ L/well）で3回洗浄を行った。得られるプレートのウェルに希釈したHRP標識された抗ヒトIgG抗体を100 μ L/wellずつ加え、30分間37 $^{\circ}$ Cで静置した。ついで、0.05% Tween 20を含むPBS（200 μ L/well）で3回洗浄した後、TMBZを100 μ L/wellずつ加え、10分間室温で静置の後、反応停止剤として100 μ L/wellの1N硫酸を加えた。吸光度はマイクロプレートリーダー（BioRad社製）を用いて、波長450nmにて測定を行った。

10

なお、検体は健常人16例、初発原発性肝細胞癌患者検体16症例、再発原発性肝細胞癌患者16例を用いた。

【0022】

2. 結果

FTCDとその自己抗体との複合体を測定した結果を用いた結果を、図1に示す。有意差検定はKaleidaGraph 4.0を用い、Wilcoxonの2標本検定にて統計処理した。

図1に示すように、健常人群と比較し、特に再発原発性肝細胞癌患者検体群のFTCDとその自己抗体との複合体は、大きな有意差を認めた。

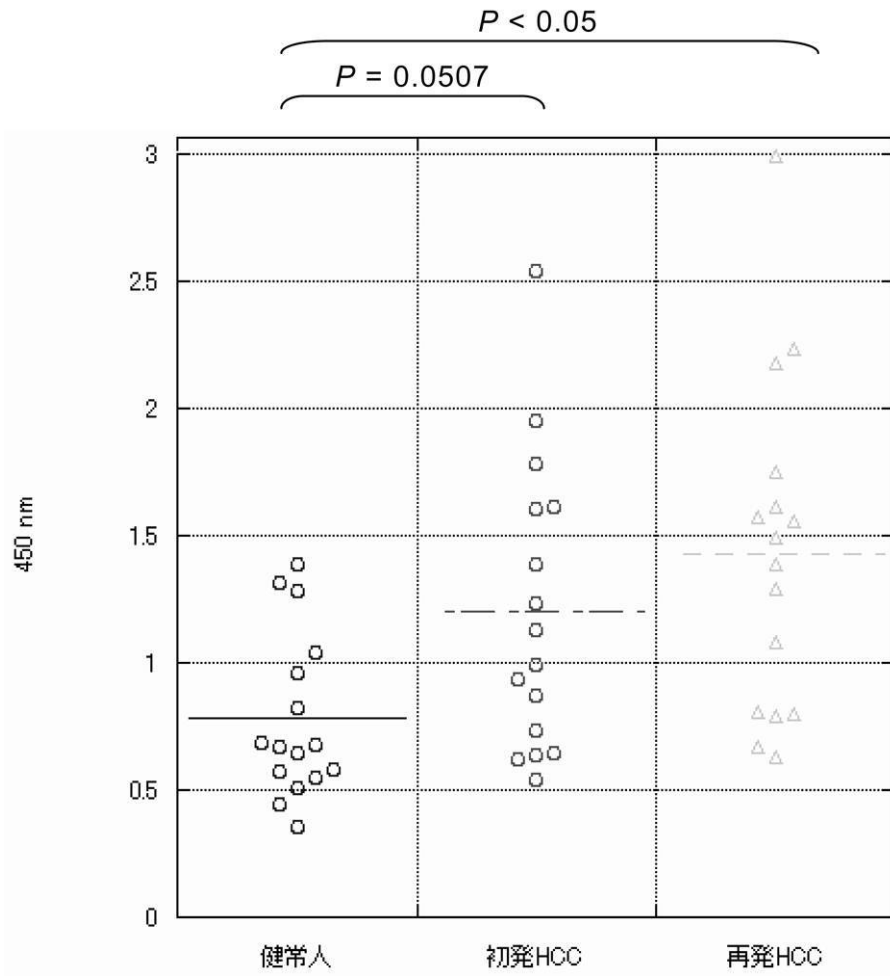
20

【産業上の利用可能性】

【0023】

以上に詳細に説明したように、血液由来検体などの検体中のFTCDとその自己抗体との複合体に、FTCDに対する試薬抗体およびその自己抗体に対する結合可能物質を作用させ、得られる複合体と試薬抗体と結合可能物質との免疫複合物を測定することによりその複合体を測定することができ、それによって、原発性肝細胞癌などの癌判定が可能である。

【 図 1 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100140556
弁理士 新村 守男
- (74)代理人 100114719
弁理士 金森 久司
- (74)代理人 100143258
弁理士 長瀬 裕子
- (74)代理人 100124969
弁理士 井上 洋一
- (74)代理人 100132492
弁理士 弓削 麻理
- (74)代理人 100163485
弁理士 渡邊 義敬
- (72)発明者 小島 良
福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 ニッターポームメディカル株式会社内
- (72)発明者 野田 健太
福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 ニッターポームメディカル株式会社内
- (72)発明者 清宮 正徳
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 千葉大学大学院医学研究院内
- (72)発明者 曾川 一幸
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 千葉大学大学院医学研究院内
- (72)発明者 野村 文夫
千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 千葉大学大学院医学研究院内

专利名称(译)	ftcd及其自身抗体的复合物的免疫测定方法，用于该试剂盒的试剂盒以及使用该试剂盒的癌症测定方法		
公开(公告)号	JP2011163992A	公开(公告)日	2011-08-25
申请号	JP2010028388	申请日	2010-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	小島良 野田健太 清宮正徳 曾川一幸 野村文夫		
发明人	小島良 野田健太 清宮正徳 曾川一幸 野村文夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/573		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.545.A G01N33/574.A G01N33/573.A G01N33/543.541.B G01N33/543.555.A G01N33/564.Z		
代理人(译)	池田幸 新村守男 井上洋一		
其他公开文献	JP5504945B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种复合的氨基转移酶环化脱氨酶 (FTCD) 及其自身抗体的测定方法，可用于癌症测定。解决方案：应用于FTCD的试剂抗体及其自身抗体的可组合物在样品中FTCD及其自身抗体的复合物，测量所得复合物，试剂抗体和可组合物质的免疫复合物。因此，可以测量复合物，因此可以确定诸如原发性肝细胞癌的癌症。

