

(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2010-91308

(P2010-91308A)

(43) 公開日 平成22年4月22日(2010.4.22)

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

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2008-259144 (P2008-259144)	(71) 出願人	307014555 北海道公立大学法人 札幌医科大学 北海道札幌市中央区南1条西17丁目29 1
(22) 出願日	平成20年10月4日 (2008.10.4)	(71) 出願人	504000292 グライコリサーチ株式会社 愛知県名古屋市千種区千種2-22-8
		(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
		(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100123168 弁理士 大▲高▼ とし子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レクチン吸収法による前立腺がんの診断方法及び判定キット

(57) 【要約】

【課題】高い特異性、高い感度及び簡便性を兼ね備えた、前立腺がんの早期発見・早期治療に貢献しうる前立腺がんの判定方法や判定キットを提供すること。

【解決手段】(a) 血清試料に糖非還元末端に 2, 3 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズを接触させ、インキュベーションする工程；(b) 工程(a)におけるインキュベーション後のレクチン固相化ビーズを分離した残存試料中の P S A 値 [2,3-Non-bound P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；(c) 血清試料中の P S A 値 [Total P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；(d) [Total P S A] - [2,3-Non-bound P S A] により [2,3-Bound P S A] を求め、[2,3-Bound P S A] / [Total P S A] で求められる吸収率(%)を算出する工程；(f) 吸収率が対象となる良性と比べて高いとき、前立腺がんと判定する工程；の各工程からなる前立腺特異抗原(P S A)を標的とした前立腺がんの判定方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を備えた前立腺特異抗原 (P S A) を標的とした前立腺がんの判定方法。

(a 1) 血清試料に、糖非還元末端に 2 , 3 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズを接触させ、インキュベーションする工程 ;

(b 1) 工程 (a 1) におけるインキュベーション後のレクチン固相化ビーズを分離した残存試料中の P S A 値 [2,3-Non-bound P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程 ;

(c) 血清試料中の P S A 値 [Total P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程 ;

10

【請求項 2】

さらに、以下の工程を備えたことを特徴とする請求項 1 記載の判定方法。

(d 1) [Total P S A] - [2,3-Non-bound P S A] により [2,3-Bound P S A] を求め、 [2,3-Bound P S A] / [Total P S A] で求められる吸収率 (%) を算出する工程 ;

(f) 吸収率が対象となる良性と比べて高いとき、前立腺がんと判定する工程 ;

【請求項 3】

以下の工程を備えた前立腺特異抗原 (P S A) を標的とした前立腺がんの判定方法。

(a 2) 血清試料に糖非還元末端に 2 , 6 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズを接触させ、インキュベーションする工程 ;

(b 2) 工程 (a 2) におけるインキュベーション後のレクチン固相化ビーズを分離した残存試料中の P S A 値 [2,6-Non-bound P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程 ;

(c) 血清試料中の P S A 値 [Total P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程 ;

20

【請求項 4】

さらに、以下の工程を備えたことを特徴とする請求項 3 記載の判定方法。

(d 2) [2,6-Non-bound P S A] を [2,3-Bound P S A] とし、 [2,3-Bound P S A] / [Total P S A] で求められる吸収率 (%) を算出する工程 ;

(f) 吸収率が対象となる良性と比べて高いとき、前立腺がんと判定する工程 ;

30

【請求項 5】

吸収率が 10 % 以上の場合、前立腺がんを判定することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の判定方法。

【請求項 6】

工程 (c) が、以下の工程を備えたことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の判定方法。

(c i) 血清試料に非特異的吸着補正用対照タンパク質固相化ビーズを接触させ、インキュベーションする工程 ;

(c i i) 工程 (c i) におけるインキュベーション後の対照タンパク質固相化ビーズを分離した残存試料中の P S A 値 [Total P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程 ;

40

【請求項 7】

非特異的吸着補正用対照タンパク質固相化ビーズが、 B S A 固相化ビーズであることを特徴とする請求項 6 記載の判定方法。

【請求項 8】

固相化ビーズが固相化磁性ビーズであることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の判定方法。

【請求項 9】

免疫学的方法が、サンドイッチエライザであることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の判定方法。

50

【請求項 10】

糖非還元末端に 2, 3 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズ、抗 P S A 抗体を含む P S A 測定試薬、緩衝液、及び反応終了液を備えた前立腺がんの判定キット。

【請求項 11】

糖非還元末端に 2, 6 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズ、抗 P S A 抗体を含む P S A 測定試薬、緩衝液、及び反応終了液を備えた前立腺がんの判定キット。

【請求項 12】

さらに、非特異的吸着補正用対照タンパク質固相化ビーズを含むことを特徴とする請求項 10 又は 11 記載の判定キット。

10

【請求項 13】

非特異的吸着補正用対照タンパク質固相化ビーズが、B S A 固相化ビーズであることを特徴とする請求項 12 記載の判定キット。

【請求項 14】

固相化ビーズが固相化磁性ビーズであることを特徴とする請求項 10 ~ 13 のいずれか記載の判定キット。

【請求項 15】

抗 P S A 抗体を含む P S A 測定試薬が、抗 P S A 抗体固相化エライザ用アッセイプレート、標識化抗 P S A 抗体、検出基質を含むことを特徴とする請求項 10 ~ 14 のいずれか記載の判定キット。

20

【請求項 16】

標識化抗 P S A 抗体が、ビオチン標識抗 P S A モノクローナル抗体と H R P 標識ストレプトアビジンとの組合せであることを特徴とする請求項 15 記載の判定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺特異抗原 (prostate specific antigen: 以下「P S A」と略す) を標的としたレクチン吸収法による前立腺がんの判定方法や判定キットに関する。

【背景技術】

30

【0002】

前立腺がん (prostate carcinoma) は男性の主要な死亡原因である。前立腺上皮細胞から分泌され前立腺がん細胞によっても産生される P S A は、セリンプロテアーゼの一種で、前立腺がんに対する最も重要な腫瘍マーカーとして認識されている (例えば、非特許文献 1 参照)。P S A は分子量約 34 k D a の糖タンパク質であり、45 番目のアスパラギン残基に 1 本の糖鎖を有し、糖鎖の中で主たるものは、非還元末端にシアル酸が 2, 6 結合したものである。P S A は、血中では、プロテアーゼインヒビターとの結合型と、非結合の遊離型前立腺特異抗原として存在する。P S A は、健康なときも血液中に存在するが、前立腺がんが発症すると大量の P S A が血液中に放出されることから、前立腺がんの腫瘍マーカーとして広く用いられており、前立腺がんの初期診断に対する血清 P S A 試験の簡便性・有用性は既に多く報告されている。

40

【0003】

図 1 のグラフ (財団法人 前立腺研究財団: 前立腺がん検診テキスト) は、P S A 値と前立腺がんの発見率を示したもので、P S A 値が高くなるにつれて、前立腺がんの確率も高くなることが示されているものの、P S A 値が低いと前立腺がんの発見率が 30% 以下となることが示されている。日本人男性の P S A 基準値としては、64 歳以下の男性では 3.0 n g / m L、65 ~ 69 歳の男性では 3.5 n g / m L、70 歳以上の男性では 4.0 n g / m L が目安といわれ、この基準値以上であれば、前立腺がんである可能性があり、医療機関でさらに詳しい検査を受けることが推奨されている (例えば、非特許文献 2 及び 3 参照)。

50

【 0 0 0 4 】

図 2 (栗山 学他 : 泌尿器科紀要, 41(1) : 39, 1995より改変) には、前立腺がん、前立腺肥大症、及び、健常男子における血清 P S A 値が示されている。健常男子に比べて、前立腺肥大症、前立腺がんでは数値が高く、病期が進行しているほど数値も高くなり、P S A 検査は、がんの進行を示す病期の予測にも有用であるといわれている。しかし、病期がかなり進行していても、P S A 値が正常範囲の例もあることや、前立腺肥大や前立腺炎でも P S A 値が高値となることに起因するグレイゾーンの取り扱いの問題などから、P S A 値だけで診断することはできず、疑わしい場合は、さらに他の検査を併用して、診断精度を高める必要がある。

【 0 0 0 5 】

最近、前立腺がんにおける P S A の糖鎖変化、すなわち、前立腺がん患者では、血清 P S A の糖鎖の非還元末端が 2, 6 結合型シアル酸から 2, 3 結合型シアル酸を有するものに有意に変化しており、前立腺がん特異的な P S A の糖鎖構造を糖鎖に結合活性を示すタンパク質であるレクチンが識別するという報告がなされ (例えば、非特許文献 4 ~ 6 参照)、P S A を含む試料を P S A 糖鎖構造の末端シアル酸残基の 2, 3 結合型を特異的に認識するイヌエンジュレクチン (M A A) や、末端シアル酸残基の 2, 6 結合型を特異的に認識するニフトコレクチン (S N A) に接触させ、該レクチンと P S A の糖鎖構造の親和性により分別された P S A を測定することにより、前立腺がんと前立腺肥大を識別する方法も提案され (例えば、特許文献 1 参照)、レクチンを検出プローブとして用いることで、より特異的かつ高感度に前立腺がんを鑑別することが可能になると考えられてきた。

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 2 - 5 5 1 0 8 号公報

【非特許文献 1】N Engl J Med 1987;317:909-916

【非特許文献 2】財団法人 前立腺研究財団 : 前立腺がん検診テキスト

【非特許文献 3】Ito K, et al : Urology, 56, 278, 2000

【非特許文献 4】Ohyama et al., Glycobiology, 14, 671-679, 2004

【非特許文献 5】Clin Biochem. 2005 Jan;38(1):58-65

【非特許文献 6】Glycobiology. 2006 Feb;16(2):132-145

【 発明の開示 】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

本発明の課題は、高い特異性 (前立腺がん患者だけを的確に識別)、高い感度 (早期がんを発見できる) 及び簡便性 (一般の検査施設で簡便に検査できる) を兼ね備えた、前立腺がんの早期発見・早期治療に貢献しうる前立腺がんの判定方法や判定キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

血清 P S A 濃度は前立腺がんのスクリーニングに用いられているが、P S A 濃度が 1 0 n g / m L 未満 (グレーゾーン) の場合、P S A 濃度により前立腺がん患者を前立腺肥大等の良性患者と区別することはできない。レクチンの中には、P S A の糖鎖の非還元末端が 2, 6 結合型シアル酸から 2, 3 結合型シアル酸に変化した前立腺がん特異的糖鎖を有する P S A に選択的・優先的に結合するものがあるとの知見をもとに、本発明者らは低 P S A 濃度での前立腺がんの血清診断方法を新たに確立するべく鋭意研究し、糖鎖の非還元末端が 2, 3 結合型シアル酸を有する P S A に結合することができる数種のレクチンをレクチンプロッティング解析によりスクリーニングした。次いで、前立腺がん患者と良性患者の血清試料を用い、レクチン抗体サンドウィッチ法とレクチン吸収アッセイ法が前立腺がんの血清診断に有効かどうかを検討した。

【 0 0 0 9 】

本発明者らがスクリーニングしたレクチンの中で、M A L レクチン (Maackia amurensi

10

20

30

40

50

s lectin) が、 2, 3 結合型シアル酸を糖鎖の非還元末端に有する前立腺がん特異的 P S A により選択的・優先的に結合することを確認した(図 3 参照)。30 の血清試料を用いて、図 4 に示すレクチン抗体サンドイッチエライザ法と図 5 に示すレクチン吸収アッセイ法により試験した。M A L レクチン結合(吸収)分画の P S A を直接測定するレクチン抗体サンドイッチエライザ法による試験ではレクチンの親和性が低く、前立腺がん患者を区別することはできなかったが、M A L レクチン非結合(非吸収)分画の P S A を測定するレクチン吸収アッセイ法による試験では 88% の特異性と 81% の感受性で、20 ng / mL 以下の P S A 低濃度の前立腺がん患者が良性の患者と区別しうることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち本発明は、(1) 以下の工程を備えた前立腺特異抗原(P S A)を標的とした前立腺がんの判定方法；(a1) 血清試料に、糖非還元末端に 2, 3 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズを接触させ、インキュベーションする工程；(b1) 工程(a1)におけるインキュベーション後のレクチン固相化ビーズを分離した残存試料中の P S A 値 [2,3-Non-bound P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；(c) 血清試料中の P S A 値 [Total P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；や、(2) さらに、以下の工程を備えたことを特徴とする前記(1)記載の判定方法；(d1) [Total P S A] - [2,3-Non-bound P S A] により [2,3-Bound P S A] を求め、[2,3-Bound P S A] / [Total P S A] で求められる吸収率(%)を算出する工程；(f) 吸収率が対象となる良性と比べて高いとき、前立腺がんと判定する工程；や、(3) 以下の工程を備えた前立腺特異抗原(P S A)を標的とした前立腺がんの判定方法；(a2) 血清試料に糖非還元末端に 2, 6 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズを接触させ、インキュベーションする工程；(b2) 工程(a2)におけるインキュベーション後のレクチン固相化ビーズを分離した残存試料中の P S A 値 [2,6-Non-bound P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；(c) 血清試料中の P S A 値 [Total P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；や、(4) さらに、以下の工程を備えたことを特徴とする前記(3)記載の判定方法；(d2) [2,6-Non-bound P S A] を [2,3-Bound P S A] とし、[2,3-Bound P S A] / [Total P S A] で求められる吸収率(%)を算出する工程；(f) 吸収率が対象となる良性と比べて高いとき、前立腺がんと判定する工程；や、(5) 吸収率が 10% 以上の場合、前立腺がんと判定することを特徴とする前記(1)~(4)のいずれか記載の判定方法や、(6) 工程(c)が、以下の工程を備えたことを特徴とする前記(1)~(5)のいずれか記載の判定方法；(c i) 血清試料に非特異的吸着補正用対照タンパク質固相化ビーズを接触させ、インキュベーションする工程；(c i i) 工程(c i)におけるインキュベーション後の対照タンパク質固相化ビーズを分離した残存試料中の P S A 値 [Total P S A] を、抗 P S A 抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；や、(7) 非特異的吸着補正用対照タンパク質固相化ビーズが、B S A 固相化ビーズであることを特徴とする前記(6)記載の判定方法や、(8) 固相化ビーズが固相化磁性ビーズであることを特徴とする前記(1)~(7)のいずれか記載の判定方法や、(9) 免疫学的方法が、サンドイッチエライザであることを特徴とする前記(1)~(8)のいずれか記載の判定方法に関する。

【0011】

また本発明は、(10) 糖非還元末端に 2, 3 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズ、抗 P S A 抗体を含む P S A 測定試薬、緩衝液、及び反応終了液を備えた前立腺がんの判定キットや、(11) 糖非還元末端に 2, 6 結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズ、抗 P S A 抗体を含む P S A 測定試薬、緩衝液、及び反応終了液を備えた前立腺がんの判定キットや、(12) さらに、非特異的吸着補正用対照タンパク質固相化ビーズを含むことを特徴とする前記(10)又は(11)記載の判定キットや、(13) 非特異的吸着補正用対照タン

10

20

30

40

50

パク質固相化ビーズが、BSA固相化ビーズであることを特徴とする前記(12)記載の判定キットや、(14)固相化ビーズが固相化磁性ビーズであることを特徴とする前記(10)~(13)のいずれか記載の判定キットや、(15)抗PSA抗体を含むPSA測定試薬が、抗PSA抗体固相化エライザ用アッセイプレート、標識化抗PSA抗体、検出基質を含むことを特徴とする前記(10)~(14)のいずれか記載の判定キットや、(16)標識化抗PSA抗体が、ビオチン標識抗PSAモノクローナル抗体とHRP標識ストレプトアビジンとの組合せであることを特徴とする前記(15)記載の判定キットに関する。

【発明の効果】

【0012】

レクチン吸収アッセイ法を利用する本発明によると、従来の血清PSA濃度測定法では、良性疾患と前立腺がんとの鑑別は不可能であった低濃度PSA値の場合であっても、良悪の鑑別が可能となり、前立腺がんであるか否かを一般の検査施設で簡単に検査することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明のPSAを標的とした前立腺がんの判定方法としては、(a1)血清試料に、糖非還元末端に2,3結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズを接触させ、インキュベーションする工程、すなわち、糖非還元末端に2,3結合型シアル酸を有するPSAと前記レクチン固相化ビーズとの複合体を形成させる工程；(b1)工程(a1)におけるインキュベーション後のビーズを分離した残存試料中のPSA値[2,3-Non-bound PSA]を、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程、すなわち、工程(a1)で形成された複合体を分離した残存試料中のPSA値を、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；(c)血清試料中のPSA値[Total PSA]を、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；の(a1)、(b1)、(c)の各工程を備える方法[以下、「判定方法I」ということがある]や、(a2)血清試料に糖非還元末端に2,6結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズを接触させ、インキュベーションする工程、すなわち、糖非還元末端に2,6結合型シアル酸を有するPSAと前記レクチン固相化ビーズとの複合体を形成させる工程；(b2)工程(a2)におけるインキュベーション後のレクチン固相化ビーズを分離した残存試料中のPSA値[2,6-Non-bound PSA]を、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程、すなわち、工程(a2)で形成された複合体を分離した残存試料中のPSA値を、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；(c)血清試料中のPSA値[Total PSA]を、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程；の(a2)、(b2)、(c)の各工程を備える方法[以下、「判定方法II」ということがある]であれば特に制限されず、本発明の判定方法においては、特定のレクチンと、レクチン吸収アッセイ法(レクチン結合(吸収)分画のPSAを直接測定することなく、レクチン非結合(非吸収)分画のPSAを測定する方法)とを用いることを特徴としている。

【0014】

上記判定方法Iにおいては、さらに、(d1)[Total PSA]-[2,3-Non-bound PSA]により[2,3-Bound PSA]を求め、[2,3-Bound PSA]/[Total PSA]で求められる吸収率(%)を算出する工程；(f)吸収率が対象となる良性と比べて高いとき、例えば吸収率が10%以上のとき、前立腺がんと判定する工程；の両工程を備えることが好ましく、上記判定方法IIにおいては、さらに、(d2)[2,6-Non-bound PSA]を実質的に[2,3-Bound PSA]と考え、[2,3-Bound PSA]/[Total PSA]で求められる吸収率(%)を算出する工程；(f)吸収率が対象となる良性と比べて高いとき、例えば吸収率が10%以上のとき、前立腺がんと判定する工程；の両工程を備えることが好ましい。

【0015】

10

20

30

40

50

上記(a1)工程で用いられる、糖非還元末端に2,3結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンとしては、糖非還元末端に2,6結合型シアル酸を有する糖鎖を認識することなく、糖非還元末端に2,3結合型シアル酸を有する糖鎖を認識するレクチンであれば特に制限されないが、MALレクチン(Maackia amurensis leucoagglutinin lectin、Maackia amurensis Lectin I、MAMレクチンともよばれる)や、MAAレクチン(Maackia amurensis agglutinin lectin、Maackia amurensis Lectin IIともよばれる)やACGレクチン(Agrocybe cylindracea galectin lectin)等を好適に例示することができる。この(a1)工程で用いられるMAL固相化ビーズ、ACG固相化ビーズ等は、常法により作製することもできるが、市販品を利用することもできる。

【0016】

上記(a2)工程で用いられる、糖非還元末端に2,6結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンとしては、糖非還元末端に2,3結合型シアル酸を有する糖鎖を認識することなく、糖非還元末端に2,6結合型シアル酸を有する糖鎖を認識するレクチンであれば特に制限されないが、SNAレクチン(Elderberry bark lectin)やSSAレクチン(Sambucus sieboldiana lectin)等を好適に例示することができる。この(a2)工程で用いられるSNA固相化ビーズ、SSA固相化ビーズ等は、常法により作製することもできるが、市販品を利用することもできる。

【0017】

上記(c)工程は、血清試料中の全PSAを、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程であるが、血清試料にBSA固相化ビーズ等の非特異的吸着補正用の対照タンパク質吸着用ビーズを接触させ、インキュベーションする工程(c i)と、該工程(c i)におけるインキュベーション後の対照タンパク質固相化ビーズを分離した残存試料中の全PSAを、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により測定する工程(c ii)とを備えた工程とすることが、抗PSA抗体を用いた免疫学的方法により血清試料中の全PSAを正確に測定する上で好ましい。上記BSA固相化ビーズ等は、常法により作製することもできるが、市販品を利用することもできる。

【0018】

上記工程(a1, a2)工程や(b1, b2)工程や(c i)工程におけるインキュベーションとしては、例えば、20~30で30~150分間攪拌するインキュベーションを好適に例示することができる。また、固相化ビーズとしては、磁性ビーズ、ポリスチレンビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、ガラスビーズ等を例示ことができ、上記工程(b1, b2)や(c ii)工程におけるビーズを分離した残存試料には、反応液中からビーズを遠心分離又は濾過除去した残存液や、反応液中の磁性ビーズを磁石により固定し、マイクロピペット等で回収した上清が含まれる。

【0019】

上記(b1, b2)工程や(c)工程における抗PSA抗体を用いた免疫学的方法としては、PSAを定量できる免疫学的方法であれば特に制限されず、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング、免疫染色、免疫拡散法などを挙げることができるが、エンザイムイムノアッセイが好ましく、特にエライザが好ましく、中でもサンドイッチエライザが好ましい。エライザなどの免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことができる。上記抗PSA抗体としては抗PSAモノクローナル抗体が好ましく、また、かかるモノクローナル抗体に代えて、F(ab')₂、Fabなどのモノクローナル抗体の変領域からなる抗体結合部位を含む抗体フラグメントも使用することができる。これら抗体フラグメントは、抗PSAモノクローナル抗体に便宜上含まれる。また、これらモノクローナル抗体や抗体フラグメントを標識化抗体として用いる場合、標識物質としては、 α -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ等の酵素を例示ことができ、これら酵素は「酵素標識法(生物化学実験法27)」(第1版、石川栄治著、学会出版センター、1991年)などに記載されている方法で標識することができる。またこれら酵素に代えて、例えば、¹²⁵I

10

20

30

40

50

I、³²P、³⁵S、³H等のラジオアイソトープや、FITC（フルオレセインイソシアネート）、テトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、GFP（グリーン蛍光タンパク質）等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることもできる。

【0020】

上記の抗PSA抗体を用いたサンドイッチエライザによる残存試料中のPSA値の測定は、当業者に公知の方法により行うことができる。例えば、第1抗PSA抗体と標識化第2抗PSA抗体を用い、シリコン、ナイロン、プラスチック、ガラスからなるビーズ、マイクロプレート、試験管、フィルター、メンブレン等の固相、好ましくは抗体固相化エライザ用アッセイプレートのウェルに第1抗PSA抗体を固定化し、前記ウェル内に試料を加え、試料中のPSAと第1抗PSA抗体との間で抗原抗体反応を行わせ、PSAを捕捉する。その後、試料を除いて洗浄した後、ウェル内に標識化第2抗PSA抗体を加え、この標識化第2抗PSA抗体と前記ウェルに捕捉されたPSAとの間で抗原抗体反応を行わせ、第1抗PSA抗体とPSAとを介して標識化第2抗PSA抗体をウェルに結合させ、ウェルに結合した標識化第2抗PSA抗体の標識を利用してPSAを定量する。上記第1抗PSA抗体としては抗PSAモノクローナル抗体が好ましく、第2抗PSA抗体としては、第1抗PSA抗体と認識部位を異にし、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、ビオチン等で標識化された抗PSAモノクローナル抗体が好ましい。また、標識化第2抗PSA抗体に代えて、第2抗PSA抗体と標識化抗IgG抗体を用いることもできる。

10

20

【0021】

本発明の前立腺がんの判定キットとしては、糖非還元末端に2,3結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズ、抗PSA抗体を含むPSA測定試薬、緩衝液、及び反応終了液を備えた、前記判定方法Iに用いることができるキットや、糖非還元末端に2,6結合型シアル酸を有する糖鎖を特異的に認識するレクチンを固相化したビーズ、抗PSA抗体を含むPSA測定試薬、緩衝液、及び反応終了液を備えた、前記判定方法IIに用いることができるキットであれば特に制限されず、これらキットには、BSA固相化ビーズ等の非特異的吸着補正用の対照タンパク質固相化ビーズを含むことが好ましく、上記固相化ビーズとしては、磁性ビーズ、ポリスチレンビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、ガラスビーズ等を例示することができるが、磁性ビーズが好ましい。また、上記抗PSA抗体を含むPSA測定試薬としては、PSAを定量しうる試薬であれば特に制限されないが、抗PSA抗体固相化エライザ用アッセイプレート、標識化抗PSA抗体、検出基質を含むサンドイッチエライザ用試薬が好ましく、上記標識化抗PSA抗体としては、酵素標識抗PSAモノクローナル抗体の他、ビオチン標識抗PSAモノクローナル抗体とHRP標識ストレプトアビジンとの組合せを特に好適に例示することができる。

30

【0022】

以下、実施例により本発明のレクチン吸収アッセイ法をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

40

【0023】

[測定試薬]

1. 天然レクチン固相化磁性ビーズ

1) BSA固相化磁性ビーズ (total PSA濃度測定用、Polyscience社製Streptavidin Particles, BioMag PlusにBSAを固相化した磁性ビーズ) 5 mL

2) MAL固相化磁性ビーズ (2,3-Non-bound PSA濃度測定用、Polyscience社製Streptavidin Particles, BioMag PlusにMALを固相化した磁性ビーズ) 5 mL

【0024】

2. 抗体固相化エライザ用アッセイプレート

(日本医学臨床検査研究所社製エライザキャプチャー用マウスモノクローナル抗PSA抗

50

体clone 2E2を固相化) 2枚

3. 検出用抗体試薬(100倍検出用抗体試薬(日本医学臨床検査研究所社製エライザ検出用ビオチン標識抗PSA抗体clone 79)) 0.3 mL

4. 検出試薬(100倍HRP標識検出試薬(Zymed社製HRP標識ストレプトアビジン)) 0.3 mL

5. 緩衝液

1) 検出用抗体試薬用緩衝液(TBS - 0.05% Tween 20, 1% BSA) 2.3 mL

2) HRP標識検出試薬用緩衝液(TBS - 0.05% Tween 20, 1% BSA) 2.3 mL

6. 検出基質/反応終了液

1) 検出基質(TMB) 2.3 mL

2) 反応終了液(0.5M H₂SO₄) 2.3 mL

【0025】

7. 標準物質(CHO細胞発現リコンビナントPSA)

標準溶液1 0 pg/mL

標準溶液2 5 pg/mL

標準溶液3 20 pg/mL

標準溶液4 50 pg/mL

標準溶液5 150 pg/mL

8. 磁性ビーズ反応プレート 2枚

9. 血清希釈液(TBS - 0.05% Tween20, 1mM MnCl₂, 1mM CaCl₂) 50 mL

【0026】

[操作法]

1. 試薬の調製

1) エライザ洗浄液

0.1% Tween20を含むPBS溶液を調製する。

2) 検出用抗体試薬

100倍検出用抗体試薬0.23 mLを検出用抗体用緩衝液2.3 mLと混合させる。混合後は4℃保存し、なるべく早く使用する。

3) HRP標識検出試薬

100倍HRP標識検出試薬0.23 mLをHRP標識検出試薬用緩衝液2.3 mLと混合させる。混合後は4℃保存し、なるべく早く使用する。

【0027】

2. 必要な器具・器材

1) マイクロピペット

2) 攪拌機能付き恒温槽(25℃で使用可能な装置)

エッペンドルフ社製サーモミキサーコンフォート

3) マイクロプレート用磁石スタンド

4) ボルテックスミキサー

5) マイクロプレート用分光光度計(主波長450 nmおよび副波長630 nm)

【0028】

3. 測定操作

1) 磁性ビーズ反応プレートの各ウェルに、各血清検体を血清希釈液で20倍希釈した溶液を100 μL加える。

2) BSA固相化磁性ビーズまたはMAL固相化磁性ビーズを攪拌し、それぞれ各ウェルに50 μL加える。

3) 攪拌機能付き恒温槽で800 rpmで攪拌しながら、25℃、1時間インキュベーションする。

4) 磁石スタンド上に磁性ビーズ反応プレートを載せ、室温で10分間静置する。

10

20

30

40

50

- 5) 集積させた磁性ビーズを吸わないように注意しながらマイクロピペットで上清 100 μL を回収し、抗体固相化エライザ用アッセイプレートに加える。
- 6) 各標準溶液 100 μL を抗体固相化エライザ用アッセイプレートの各ウェルに加える。
- 7) 攪拌しながら 25 で 1 時間インキュベーションする。
- 8) 試料を除き、エライザ用洗浄液を各ウェルに 200 μL 加える。
- 9) エライザ用洗浄液を除く。
- 10) 8) と 9) を計 5 回行い、ウェルを洗浄する。
- 11) ペーパータオルでタッピングして余分な水分を除去する。
- 12) 各ウェルに調製した検出用抗体試薬を 100 μL 加える。
- 13) 攪拌しながら 25 で 1 時間インキュベーションする。
- 14) 8) と 9) を計 5 回行い、ウェルを洗浄する。
- 15) ペーパータオルでタッピングして余分な水分を除去する。
- 16) 各ウェルに調製した HRP 標識検出試薬を 100 μL 加える。
- 17) 攪拌しながら 25 で 1 時間インキュベーションする。
- 18) 8) と 9) を計 5 同行い、ウェルを洗浄する。
- 19) ペーパータオルでタッピングして余分な水分を除去する。
- 20) 各ウェルに検出基質を 100 μL 加える。
- 21) 25 で 20 分間、静置してインキュベーションする。
- 22) 各ウェルに反応終了液 100 μL を加える。
- 23) マイクロプレート用分光光度計にて主波長 450 nm、副波長 630 nm の吸光度を測定する。

10

20

30

40

50

【0029】

4. PSA 濃度測定

PSA 濃度 0 ~ 150 pg/mL の標準溶液により作成した検量線から、使用試料の PSA 濃度を算出する。図 6 に PSA 濃度測定用検量線の代表例を示す。

【0030】

5. MAL との Bound 率の測定

血清検体希釈液と BSA 固相化磁性ビーズを反応させた溶液の上清の PSA 濃度を Total PSA とし、MAL 固相化磁性ビーズと反応させた溶液の上清の PSA 濃度を 2,3-Non-bound PSA とする。

以下の式より、MAL 固相化磁性ビーズに吸着した PSA 濃度 [Bound PSA] を求め、最終的に吸収 (Bound) 率を求める。

$$[\text{Total PSA}] - [2,3\text{-Non-bound PSA}] = [\text{Bound PSA}]$$

$$100 \times [\text{Bound PSA}] / [\text{Total PSA}] = \text{MAL Bound} (\%)$$

(算出例)

[Total PSA] = 50 pg/mL 、[2,3-Non-bound PSA] = 30 pg/mL の場合、

$$[\text{Bound PSA}] = 50 - 30 = 20$$

$$\text{MAL Bound} (\%) = 100 \times 20 / 50 = 40 (\%)$$

【0031】

[本エライザの性能]

1. 感度

0 pg/mL の標準溶液 1 を試料とした場合の吸光度は、0.1 以下であり、150 pg/mL の標準溶液 5 を試料とした場合の吸光度は、1.5 ~ 2.8 の範囲内である。

2. 再現性

標準溶液 2 ~ 5 を 8 回同時に測定するとき、変動係数 (CV) は 10% 以下である。

3. 測定範囲

本エライザによる PSA 濃度測定範囲は 0.5 pg/mL ~ 150 pg/mL である。

【0032】

[M A L 固相化磁性ビーズとの反応時の留意点]

1 . B S A または M A L 固相化磁性ビーズ 5 0 μ L と混合させることにより、血清検体希釈液 1 0 0 μ L 中の P S A 濃度は約 2 / 3 倍となる。

また、M A L 固相化磁性ビーズに P S A が吸着することにより、その上清の P S A 濃度 [F r e e P S A] はさらに低濃度となる。

各固相化磁性ビーズと反応させる検体希釈液中の P S A 濃度は 2 0 p g / m L 以上が望ましい。

2 . 血清中の成分が P S A と M A L 固相化磁性ビーズとの吸着に影響を与える可能性がある。

【 0 0 3 3 】

10

[測定結果]

上記の [操作法] に従い、良性患者と前立腺がん患者における P S A 濃度 (n g / m L) をレクチン吸収アッセイ法により測定し、吸収率 (%) を算出した。結果を図 7 に示す。これらのレクチン吸収アッセイ法による試験結果から、8 8 % の特異性と 8 1 % の感受性で、より吸収率が低いことから、前立腺がん患者が良性の患者と区別しうることがわかった。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 4 】

【 図 1 】 P S A 値と前立腺がんの発見率を示すグラフである。

【 図 2 】 前立腺がん、前立腺肥大症、及び、健常男子における血清 P S A 値を示す図である。

20

【 図 3 】 レクチン抗体サンドウィッチエライザ法による P S A の糖鎖解析の結果を示す図である。

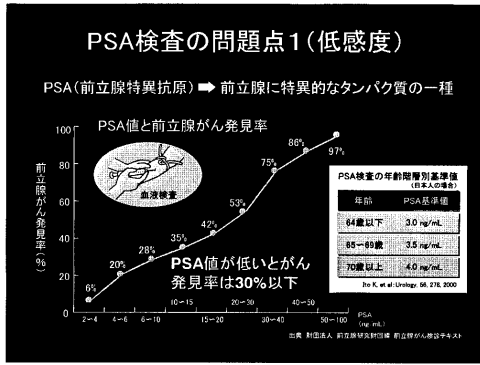
【 図 4 】 レクチン抗体サンドウィッチエライザ法の概略を示す図である。

【 図 5 】 本発明におけるレクチン吸収アッセイ法の概略を示す図である。

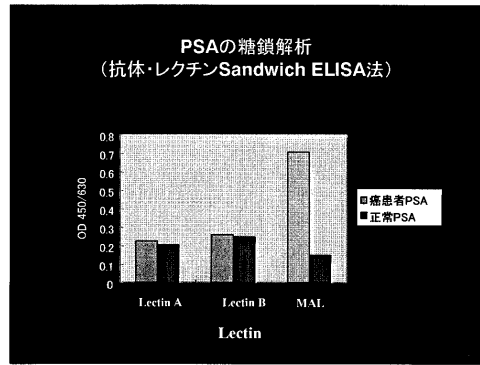
【 図 6 】 本発明における P S A 濃度測定用検量線の代表例を示す図である。

【 図 7 】 本発明における良性患者と前立腺がん患者における P S A 濃度 (n g / m L) と吸収率 (%) の測定結果を示す図である。

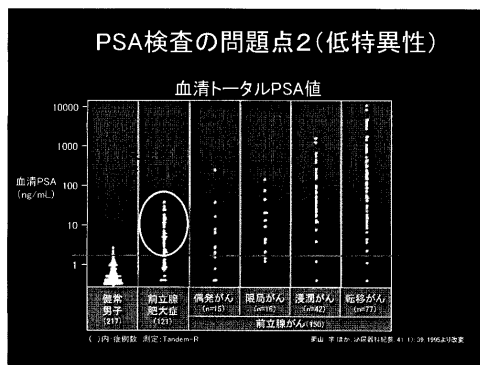
【 図 1 】



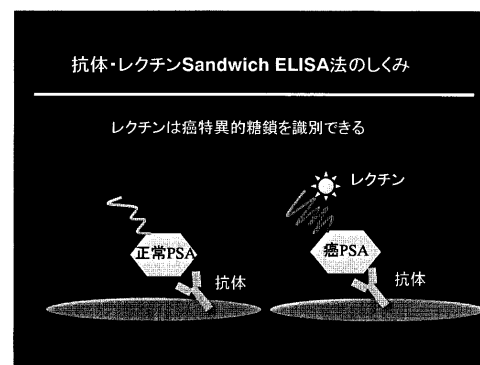
【 図 3 】



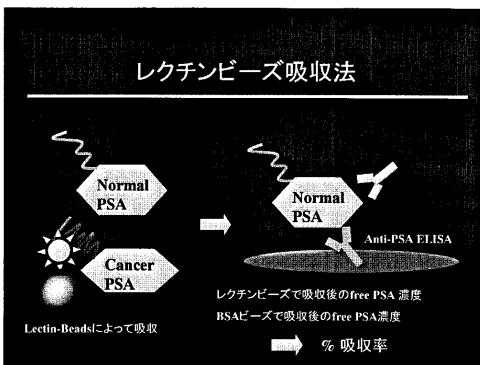
【 図 2 】



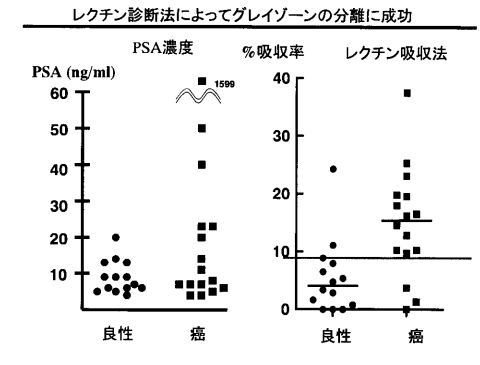
【 図 4 】



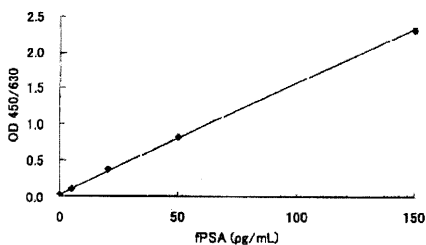
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100120086
弁理士 高 津 一也
- (74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
- (71)出願人 504229284
国立大学法人弘前大学
青森県弘前市文京町1番地
- (74)代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀
- (72)発明者 鳥越 俊彦
北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内
- (72)発明者 岡本 英治
東京都中央区晴海1丁目8番11号 サミットグライコリサーチ株式会社内
- (72)発明者 塚本 泰司
北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内
- (72)発明者 大山 力
青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内

专利名称(译)	凝集素吸收法诊断前列腺癌的方法和测定试剂盒		
公开(公告)号	JP2010091308A	公开(公告)日	2010-04-22
申请号	JP2008259144	申请日	2008-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人弘前大学		
申请(专利权)人(译)	北海道公立大学法人 札幌医科大学 图形均衡器研究公司 国立大学法人弘前大学		
[标]发明人	鳥越俊彦 岡本英治 塚本泰司 大山力		
发明人	鳥越 俊彦 岡本 英治 塚本 泰司 大山 力		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/543.501.H G01N33/53.U G01N33/543.541.A		
代理人(译)	▲▼高津哉 堀内申		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种确定前列腺癌的方法和试剂盒，它们具有高特异性，高灵敏度和简单性，能够有助于前列腺癌的早期检测和早期治疗。解决方案：使用前列腺特异性抗原（PSA）作为靶标来确定前列腺癌的方法由步骤（a）组成，该步骤用于使具有凝集素的珠子具有特异性识别具有 α 2,3-结合型唾液酸的糖链。其糖非还原末端，在固相状态下固化成与血清样品接触以进行培养，用于测量剩余样品中PSA值[α 2,3-非结合PSA]的步骤（b）通过使用抗PSA抗体的免疫测定在步骤（a）中孵育后分离凝集素固化的珠子，使用抗PSA通过免疫测定测量血清样品中的PSA值[总PSA]的步骤（c）抗体，[总PSA] - [α 2,3-非结合PSA]计算[α 2,3-结合PSA]的步骤（d）和计算[α 2,3-结合PSA]计算的吸收系数（%）] / [总PSA]，以及当吸收因子与ben相比时确定前列腺癌的步骤（f）点燃成为目标。Ž

