

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/002345

発行日 平成25年8月22日(2013.8.22)

(43) 国際公開日 平成24年1月5日(2012.1.5)

(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 D	4 B O 6 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	4 H O 4 5
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2012-522624 (P2012-522624)	(71) 出願人	000175892
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/064724		エーディア株式会社
(22) 国際出願日	平成23年6月28日(2011.6.28)		東京都千代田区岩本町1-10-6
(31) 優先権主張番号	特願2010-147784 (P2010-147784)	(71) 出願人	390037327
(32) 優先日	平成22年6月29日(2010.6.29)		積水メディカル株式会社
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		東京都中央区日本橋3丁目13番5号
		(74) 代理人	100147935
			弁理士 石原 進介
		(74) 代理人	100080230
			弁理士 石原 詔二
		(72) 発明者	狩野 吉康
			北海道札幌市中央区北3条東8丁目5番地
			J A 北海道厚生連札幌厚生病院内
		最終頁に続く	

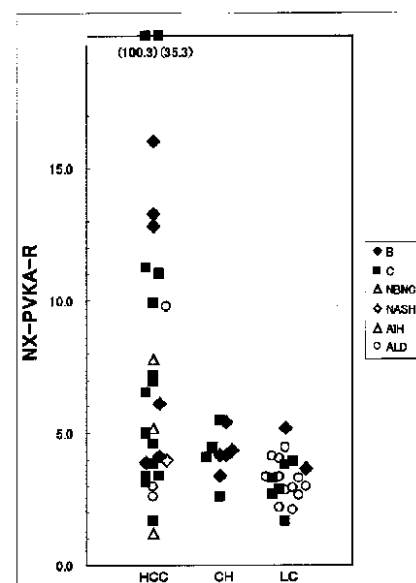
(54) 【発明の名称】 P I V K A - I I の測定方法、P I V K A - I I の測定試薬及び抗体

(57) 【要約】

従来の肝がんで上昇する P I V K A - I I を測定する測定試薬と異なり、ビタミン K 欠乏に起因して上昇する P I V K A - I I に特異的な抗体を用いて得られる測定値で肝がんにおける肝障害度の判定及び予後予測を可能とし、肝がんを感度良く検出することができる P I V K A - I I の測定方法、P I V K A - I I の測定試薬、肝障害度の判定方法及び肝がんの判定方法を提供する。

(a) 二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - I I を測定し、測定値 A を得る工程、を含む P I V K A - I I の測定方法であって、前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体として、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - I I に特異的な抗体を使用するようにした。

【図5】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIを測定し、測定値Aを得る工程、を含むPIVKA-IIの測定方法であって、

前記(a)工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体として、ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIに特異的な抗体を使用することを特徴とするPIVKA-IIの測定方法。

【請求項 2】

(b) 二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってPIVKA-IIを測定し、測定値Bを得る工程、及び

(c) 前記測定値A及び前記測定値Bを比較する工程、をさらに含み、

前記(b)工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる一方の抗体として人肝がん細胞培養細胞株より精製したPIVKA-IIと反応する抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を使用し、

前記(b)工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる他方の抗体としてヒトプロンビンと反応する抗体を含まない抗ヒトプロンビン抗体を使用することを特徴とする請求項1記載のPIVKA-IIの測定方法。

【請求項 3】

前記(a)工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1又は2記載のPIVKA-IIの測定方法。

【請求項 4】

前記(a)工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体がいずれも、 Ca^{2+} イオンの共存下における抗原固相ELISAにおいて、

i) プロンビンとは反応せず、且つ

ii) プロンビンの脱炭酸処理を6時間したもの比べ、脱炭酸処理を30分したものに対する反応性が高い、

ものの組み合わせであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載のPIVKA-IIの測定方法。

【請求項 5】

前記ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIに特異的な抗体が、受託番号FERM BP-11258で特定されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体及び受託番号FERM BP-11259で特定されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載のPIVKA-IIの測定方法。

【請求項 6】

二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIを測定するに当り、ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIに特異的な抗体を使用することを特徴とするPIVKA-IIの測定試薬。

【請求項 7】

前記二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体がいずれも、 Ca^{2+} イオンの共存下における抗原固相ELISAにおいて、

i) プロンビンとは反応せず、且つ

ii) プロンビンの脱炭酸処理を6時間したもの比べ、脱炭酸処理を30分したものに対する反応性が高い、

ものの組み合わせであることを特徴とする請求項6記載のPIVKA-IIの測定試薬。

【請求項 8】

前記ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIに特異的な抗体が、受託番号FERM BP-11258で特定されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体及び

受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 9 で特定されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 6 又は 7 記載の P I V K A - II の測定試薬。

【請求項 9】

受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 8 で特定されるハイブリドーマにより産生されることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 10】

受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 9 で特定されるハイブリドーマにより産生されることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 11】

受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 8 で特定されることを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項 12】

受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 9 で特定されることを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項 13】

請求項 1 記載の方法によって得られた値により、肝障害度を判定することを特徴とする肝障害度の判定方法。

【請求項 14】

請求項 2 記載の方法によって得られた値により、肝がんを判定することを特徴とする肝がんの判定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、P I V K A - II の測定方法、P I V K A - II の測定試薬及び抗体に関し、特に、検体中のビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を測定することによる肝がんにおける肝障害度の判定及び特異性を上げることが可能な P I V K A - II の測定方法、P I V K A - II の測定試薬及びモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

P I V K A - II (Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonist-II) は、A F P (α-フェトプロテイン) と並んで肝がんを診断するマーカーとして広く臨床検査室で測定されている。

P I V K A - II はビタミン K 依存性血漿タンパク質の一つであるプロトロンビンの前駆物質である。プロトロンビン (血液凝固第 II 因子) は、分子量 71,600 のタンパクで、フラグメント 1、2 及びトロンビンの 3 領域から構成されており、アミノ酸配列も明らかにされている (非特許文献 1)。フラグメント 1 は、N 末端から 41 個のアミノ酸によって構成される Gla ドメインを含む 156 個のアミノ酸からなる。この Gla ドメイン中の 10 個の γ-カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基が正常に合成されたものが正常プロトロンビン、正常に合成されず、その全てあるいは一部がグルタミン酸 (Glu) 残基のままのものが P I V K A - II である。従って、P I V K A - II とは正常プロトロンビンの γ-カルボキシグルタミン酸残基についての脱カルボキシル化体であるということもでき、異常プロトロンビンと呼ばれることもある。10 個のグルタミン酸残基中いくつかは γ-カルボキシル化を受けるかにより数種類の P I V K A - II が混在した状態で存在している (非特許文献 2)。

【0003】

肝がん細胞が産出する P I V K A - II は、ほとんどが Glu 残基のままであり、セルライン M U - 3 より得たモノクローナル抗体 (特許文献 1) を使用した従来の P I V K A - II 測定試薬は、正常プロトロンビンの 10 個の Gla 残基のうち、10~9 個が Glu 残基である P I V K A - II と強い反応性を示すことが知られている (非特許文献 2)。

【0004】

一般的には、P I V K A - II は次のようにして測定されている。まず、P I V K A - II に特異的なモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を吸着させた磁気ビーズやガラスビ

10

20

30

40

50

ーズ、プラスチックプレート、ラテックス等を血清や血漿と第一反応させたのち、BF洗浄を行い、続いて酵素、蛍光物質、放射性同位元素やRu錯体等で標識した、ヒトプロトンビンに特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を加えて第二反応をさせてBF洗浄した後、抗原抗体反応によって形成された免疫複合体に結合している酵素、蛍光物質、放射性同位元素、Ru錯体の吸光度又は発光量を測定する（特許文献2）。

また、プロトンビンとは反応せず且つPIVKA-IIとのみ反応するモノクローナル抗体と、プロトンビンと反応し且つPIVKA-IIとも反応するモノクローナル抗体を組み合わせた測定方法も知られている（特許文献3）。

また、Gla残基はカルシウム結合能を持っているため、カルシウム存在下で立体構造が変化することがわかっており、カルシウム存在下でのみPIVKA-IIに特異的に結合する抗体を用いた測定方法も知られている（非特許文献3）。

10

【0005】

肝がんは他臓器の悪性腫瘍と異なり、もともと慢性肝炎や肝硬変であったところに肝がんが合併するため、肝がん症例の治療にあたっては腫瘍側因子だけではなく、肝障害度を考量した上で治療方針を決定する必要がある。腫瘍マーカー検査としては、PIVKA-IIやAFPが用いられているが、治療方針の決定に必要な肝障害度や予後を必ずしも反映していない。こうした中、肝障害度や予後予測を反映する血液検査が望まれていた。

肝障害度とは、「原発性肝癌取扱い規約」に記載されている肝予備能を評価する指標である。腹水、血清ビリルビン値、血清アルブミン値、ICG R₁₅、プロトンビン活性値を3度に分類し、各項目別重症度を求め、2項目以上が該当した肝障害度を取る。またはChild-Pugh分類を用いて評価することもできる。Child-Pugh分類は、脳症、腹水、血清ビリルビン値、血清アルブミン値、プロトンビン活性値について、1～3点のポイントを付け、その合計点の低い方からA～Cまで分類する肝障害度を示す指標である。

20

【0006】

またPIVKA-IIは、肝がんでない場合でも、ビタミンK不足、ビタミンK拮抗剤投与症例においても上昇することがわかっている。試薬の高感度化に伴いアルコール性肝炎等における偽陽性が散見され、さらにPIVKA-IIが陽性にもかかわらず画像診断では肝がんが見つからない症例も報告されている。こうした中、より肝がんの特異性の高い測定方法の開発が望まれていた。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特公平5-43357

【特許文献2】特開平5-249108

【特許文献3】特開平9-43237

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Biochemistry. 1987 Sep 22;26(19):6165-77

【非特許文献2】Biochem Biophys Acta. 2002 Apr 24;1586(3):287-98 2002

【非特許文献3】J Immunoassay. 1995 May;16(2):213-29.

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

前述のごとくPIVKA-IIには、肝臓において肝がん細胞が産出するPIVKA-IIと、ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-II（以下、肝がん細胞が産出するPIVKA-II以外のPIVKA-IIを「ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-II」とする。）があるが、従来の測定試薬ではそれらの区別が難しく、偽陽性が散見されるため、より偽陽性の少ない測定方法の開発が望まれていた。

本発明は、肝がんにおける肝障害度の判定及び予後予測を可能とし、肝がんを感度良く

50

検出することができる P I V K A - II の測定方法、P I V K A - II の測定試薬、肝障害度の判定方法及び肝がんの判定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】

【0010】

本発明者らは、鋭意検討を行い、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II と反応する 2 種の抗体を用いた二抗体サンドイッチ法により P I V K A - II を測定することで、肝がんにおける肝障害度の判定及び予後予測が可能となることを見出した。また、この抗体を用いて得られる測定値と従来の方で行った P I V K A - II 測定値を比較することにより、アルコール性肝炎や肝硬変と肝がんを区別することが可能であり、肝がんの予後予測と、特異性の高い肝がんの検出が可能となることを見出し、本発明を完成した。

10

【0011】

すなわち、本発明の P I V K A - II の測定方法は、(a) 二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を測定し、測定値 A を得る工程、を含む P I V K A - II の測定方法であって、前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体として、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II に特異的な抗体を使用することを特徴とする。

【0012】

本発明の P I V K A - II の測定方法は、(b) 二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によって P I V K A - II を測定し、測定値 B を得る工程、及び (c) 前記測定値 A 及び前記測定値 B を比較する工程、をさらに含み、前記 (b) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる一方の抗体として人肝がん細胞培養細胞株より精製した P I V K A - II と反応する抗 P I V K A - II モノクローナル抗体を使用し、前記 (b) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる他方の抗体としてヒトトロニンと反応する抗体を含まない抗ヒトプロトロンビン抗体を使用することが好適である。

20

【0013】

前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体が、人肝がん細胞培養細胞株より精製した P I V K A - II と反応しないことが好ましい。

【0014】

前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体が、ヒトトロニンと反応しないことが好適である。

30

【0015】

前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体がモノクローナル抗体であることが好適である。

【0016】

前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体がいずれも、 Ca^{2+} イオンの共存下における抗原固相 ELISA において、i) プロトロンビンとは反応せず、且つ ii) プロトロンビンの脱炭酸処理を 6 時間したものに比べ、脱炭酸処理を 30 分したものに対する反応性が高い、ものの組み合わせであることが好適である。

【0017】

本発明の P I V K A - II の測定試薬は、二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を測定するに当り、抗体として、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II に特異的な抗体を使用することを特徴とする。

40

【0018】

本発明のビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II の測定試薬において、前記二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体がいずれも、 Ca^{2+} イオンの共存下における抗原固相 ELISA において、i) プロトロンビンとは反応せず、且つ ii) プロトロンビンの脱炭酸処理を 6 時間したものに比べ、脱炭酸処理を 30 分したものに対する反応性が高い、ものの組み合わせであることが好適である。

【0019】

本発明のモノクローナル抗体の第一の態様は、受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 8 で

50

特定されるハイブリドーマにより産生されることを特徴とする。

【0020】

本発明のモノクローナル抗体の第二の態様は、受託番号FERM BP-11259で特定されるハイブリドーマにより産生されることを特徴とする。

【0021】

本発明のハイブリドーマの第一の態様は、受託番号FERM BP-11258で特定されることを特徴とする。

【0022】

本発明のハイブリドーマの第二の態様は、受託番号FERM BP-11259で特定されることを特徴とする。

10

【0023】

本発明のPIVKA-IIの測定方法及び測定試薬において、前記ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIに特異的な抗体が、受託番号FERM BP-11258で特定されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体及び受託番号FERM BP-11259で特定されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であることが好適である。

【0024】

本発明の肝障害度の判定方法は、本発明のPIVKA-IIの測定方法によって得られた値により、肝障害度を判定することを特徴とする。

【0025】

本発明の肝がんの判定方法は、本発明のPIVKA-IIの測定方法によって得られた値により、肝がんを判定することを特徴とする。

20

【発明の効果】

【0026】

本発明により、血液検査では従来は困難であった、肝がんにおける肝障害度の判定及び予後予測を的確に判定することができ、肝がんを感度良く検出することができる。さらに、本発明により、肝がんを発症していないアルコール性肝炎や肝硬変と肝がんを区別することが可能であり、肝がんの予後予測と、特異性の高い肝がんの検出が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】抗体の反応性とプロトロンビンの脱炭酸処理時間の関係を示したグラフである。
【図2】実施例2及び比較例1～3の測定値のChild-Pugh分類別平均値を示したグラフであり、(a)は実施例2の結果、(b)は比較例1の結果、(c)は比較例2の結果、及び(d)は比較例3の結果をそれぞれ示す。
【図3】実施例2及び比較例1～3のROC分析の結果を示したグラフである。
【図4】実施例3のPIVKA-IIの測定結果を示すグラフである。
【図5】実施例3のレシオ値を示したグラフである。
【図6】実施例4(1)のGla残基含有ペプチドに対する抗体の反応性を示すグラフである。

30

【図7】実施例4(1)のペプチドの共通部位を示した図である。

40

【図8】実施例4(2)の変性プロトロンビン及び変性PIVKA-IIに対する反応性を示す図である。

【図9】実施例4(3)のフラグメント1及びフラグメント2に対する反応性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

以下に本発明の実施の形態を添付図面に基づいて説明するが、図示例は例示的に示されるもので、本発明の技術思想から逸脱しない限り種々の変形が可能なことはいうまでもない。

【0029】

50

本発明の P I V K A - II の測定方法は、(a) 二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を測定し、測定値 A を得る工程、を含む P I V K A - II の測定方法であって、前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体として、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II に特異的な抗体を使用するものである。本願明細書において、前記 (a) 工程で測定されたビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を N X - P V K A と称することがある。

【0030】

前記 (a) 工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる抗体は、それぞれ、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を抗原として作製されるビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II と反応する抗体であり、例えば、下記方法により製造される。

10

【0031】

非肝がん症例のクマジン血漿（ビタミン K 拮抗物質投与患者の血漿）より精製した P I V K A - II、すなわち、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を免疫原にして、公知の方法によりハイブリドーマを作製し、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II と反応するハイブリドーマ株を選択する。該ハイブリドーマ株選択時に、人肝がん細胞培養細胞株より精製した P I V K A - II やヒトプロトロンビンと反応しないハイブリドーマ株を選択することが好ましい。特に、プロトロンビンの 10 個のグルタミン酸残基についての γ -カルボキシ化の割合が高い P I V K A - II に反応性が高いハイブリドーマを選択することが好適であり、具体的には、正常プロトロンビンの脱炭酸処理時間が短い P I V K A - II に対して高い反応性を示すハイブリドーマを選択することが好適である。例えば、プロトロンビンより脱炭酸処理時間 30 分及び 6 時間で調製した P I V K A - II に対する反応性を比較する場合、30 分で調製した P I V K A - II に対する反応性を 6 時間で調製した P I V K A - II に対する反応性で割った場合に 1 より大きくなるハイブリドーマを選択することが好ましい。前記ハイブリドーマとしては、受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 8 で特定されるハイブリドーマ及び受託番号 F E R M B P - 1 1 2 5 9 で特定されるハイブリドーマが好ましい。

20

【0032】

前記選択したハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製し、該モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを用いて公知の方法によりビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II と反応するモノクローナル抗体を得ることが好ましい。

30

【0033】

前記 (a) 工程における二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法は、例えば、下記方法により実施される。

前記方法により、ビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を抗原として 2 種のモノクローナル抗体を調製し、一方を固相化して用い、他方を標識して用いる。該 2 種の抗体は、互いに交差反応しない抗体である。

抗体を固相化する方法は特に制限はないが、例えば、磁気ビーズやマイクロプレート等の固相に固相化することが好適である。

抗体を標識する方法は特に制限はないが、R u 等の標識物質により標識することが好ましい。

40

【0034】

前記固相化抗体及び標識抗体を用いて、検体中のビタミン K 欠乏に起因する P I V K A - II を測定する。測定は、二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法における通常の手順に従って行えばよい。なお、後述する実施例では、電気化学発光免疫測定法を用いた例を示したが、本発明はこれに限定されるものではなく、例えば、化学発光法や放射性同位元素法等の公知の測定法を広く使用可能である。

【0035】

本発明において、前記 (a) 工程で測定された N X - P V K A の測定値 A を得ることにより、肝がんにおける肝障害度を判定することができる。また、測定値 A を、従来の方法により測定される P I V K A - II の測定値と比較することにより、肝がんを発症していな

50

いアルコール性肝炎や肝硬変と肝がんを区別することができる。

従来の肝がん得上昇するPIVKA-IIの測定方法としては特に制限はないが、例えば、(b)二抗体サンドイッチ法を利用する免疫学的測定法によってPIVKA-IIを測定し、測定値Bを得る工程を含み、前記(b)工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる一方の抗体として人肝がん細胞培養細胞株より精製したPIVKA-IIと反応する抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を使用し、前記(b)工程の二抗体サンドイッチ法で用いられる他方の抗体としてヒトロンビンと反応する抗体を含まない抗ヒトプロトロンビン抗体を使用する方法が挙げられる。

【0036】

前記測定値Aと前記測定値Bを比較する手段は特に制限はなく、例えば、比や差を算出する方法が挙げられるが、測定値Bを測定値Aで除算してレシオ値を求めることが好適である。

【実施例】

【0037】

以下に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0038】

(実施例1)モノクローナル抗体の調製

(1)ハイブリドーマの調製

クマジン血漿(UNIGLOBE RESEARCH CORPORATION社製)より精製したPIVKA-II(1mg/mL)とフロイドの完全アジュバント(GIBCO社製)とを1対1で混和乳化し、50μg/100μmL(エマルジョン)で8週齢の雌BALB/Cマウス(日本チャールズリバー(株)製)の皮下に2週間間隔で4回投与後、最終免疫の3日後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓から得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞SP2/O-Ag14とを10対1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール1540(和光純薬工業(株)製)存在下にて細胞融合させた。融合細胞は脾臓細胞として 2.5×10^6 /mLになるようにHAT培地に懸濁し、96穴培養プレート(CORNING社製)に0.2mLずつ分注した。これを5%CO₂インキュベーター中で37℃にて培養し、おおよそ2週間後に、ハイブリドーマの生育してきたウェルの培養上清を、次に示すELISA法にしたがって評価し、PIVKA-IIに反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。

【0039】

具体的には、まず、マイクロプレート(NUNC社製)に前記のPIVKA-IIを0.1μg/mL固相化した。これに、各培養上清を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgGヤギ抗体を反応させ、次いでオルトフェニレンジアミン(東京化成工業(株)製)を含むペルオキシダーゼ基質溶液を加え発色させ、1.5N硫酸を加えて発色を停止させた後、マイクロプレートリーダー(Abs. 492nm)で測定し、PIVKA-IIと反応するハイブリドーマ株を選択した。このハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化を行った後、その培養上清から、プロテインAカラム(ファルマシア)を用いIgGを精製した。

【0040】

獲得したモノクローナル抗体の特異性を調べるため、プロトロンビン(Enzyme Research Laboratories社)からBajahらの方法(S. Paul Bajah, Paul A. Price, and William A. Russell, Decarboxylation of γ-Carboxyglutamic Acid Residues in Human Prothrombin, Journal of Biological Chemistry 257(7):3726,1982に記載の方法)に従い、脱炭酸時間の異なる各種PIVKA-IIを調製した。具体的には、4.6mg/mLのプロトロンビン溶液0.22mLに0.78mLの重炭酸アンモニウム溶液(0.1mol/L、pH8.0)を添加し、これを更に重炭酸アンモニウム溶液で4℃において一夜透析した。透析後の溶液に終濃度が10mmol/Lになるように0.1mol/L EDTA・2Naを添加し、室温で30分間静置した。この溶液を再び重炭酸アンモニウム溶液で4℃において2時間透析した。透析後の溶液をスクリーキャップ付きの耐熱性バイアル

6本に等量ずつ分注し、凍結乾燥した。次にバイアル内を窒素ガスで充填させ、110℃で各時間（0分、30分、1時間、2時間、6時間、23時間）加熱した。各バイアルに1mLの生理食塩水を加え、内容物を溶解させ、使用するまで-80℃で凍結保存した。

【0041】

前記の各種PIVKA-IIのうち、脱炭酸処理時間30分及び6時間のPIVKA-II、及びプロトンピンを0.1μg/mL固相化したマイクロプレートを用いて、塩化カルシウムを4mmol/Lの濃度で共存させた条件で、選択したハイブリドーマの精製IgGの反応性を測定した。この条件でプロトンピンに反応せず、且つ脱炭酸処理時間6時間のPIVKA-IIに比べて脱炭酸処理時間30分のPIVKA-IIに対して高い反応性を示すハイブリドーマを選択し、2種類のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ24211と24216（以下、それぞれ「ハイブリドーマ11」及び「ハイブリドーマ16」と表記することがある）を獲得した。前記得られたハイブリドーマ11及び16は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に寄託され（受領日：2010年5月28日）、ハイブリドーマ11の受託番号はFERM BP-11258であり、ハイブリドーマ16の受託番号はFERM BP-11259である。

【0042】

脱炭酸処理時間を表1及び図1に示した如く変更した以外は上記と同様の方法でプロトンピンの脱炭酸処理を行い、5種類のPIVKA-IIを調製した。ハイブリドーマ11から調製したP-11モノクローナル抗体、ハイブリドーマ16から調製したP-16モノクローナル抗体、及び従来試薬（ピコルミPIVKA-II（エーディア（株）製））の抗PIVKA-IIモノクローナル抗体の前記5種類のPIVKA-II及びプロトンピン（脱炭酸処理時間0分）に対する反応性を上記と同様の方法で測定した。結果を表1及び図1に示す。表1及び図1において、（1）はP-11モノクローナル抗体、（2）はP-16モノクローナル抗体、（3）は従来試薬の抗PIVKA-IIモノクローナル抗体（MU-3）である。なお、P-11モノクローナル抗体及びP-16モノクローナル抗体の調製は後述する方法により行った。

【0043】

【表1】

脱炭酸処理時間	(1)	(2)	(3)
0分	0.051	0.079	0.047
30分	0.174	0.379	0.114
1時間	0.239	0.482	0.201
2時間	0.184	0.371	0.491
6時間	0.079	0.227	1.222
23時間	0.057	0.096	0.614

【0044】

（2）モノクローナル抗体の調製

ハイブリドーマ11及びハイブリドーマ16からそれぞれ下記方法によりP-11モノクローナル抗体及びP-16モノクローナル抗体を調製した。

あらかじめ2週間前にプリスタン0.5mLを腹腔内に注射しておいた12週齢の雌BALB/Cマウスに、ハイブリドーマを細胞数0.5x10⁶個の量で腹腔内に投与した。約14日後に腹水を採取し、遠心処理して上清を得た。上清を等量の吸着用緩衝液（3mol/L NaCl-1.5mol/L Glycine-NaOH, pH8.5）と

混和後、濾過した。このろ液を吸着用緩衝液で平衡化したプロテインAカラム（ファルマシア社製）に通して抗体をカラムに吸着させた後、 0.1 mol/L クエン酸緩衝液（ $\text{pH} 3.0$ ）で溶出させてモノクローナル抗体を精製した。

【0045】

（実施例2）

実施例1で得たP-16モノクローナル抗体及びP-11モノクローナル抗体を用い、下記方法により、ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIの測定を行った。

（1）P-16モノクローナル抗体固相磁気ビーズの調製

磁気ビーズ（ $4.5\text{ }\mu\text{m}$ ） 30 mg/mL の 1 mL を試験管にとり、磁石でトラップし、上清液を捨てたあと、磁気ビーズにP-16モノクローナル抗体 0.5 mg/mL （ 150 mM リン酸緩衝液、 $\text{pH} 7.8$ ）を 1 mL 加え、室温で一昼夜攪拌しながら反応させた。磁気ビーズを洗浄したあと、 1% BSA・リン酸緩衝液を 2 mL 加え、室温で一昼夜攪拌しながらブロッキングし、P-16モノクローナル抗体固相磁気ビーズを調製した。使用時、ビーズ希釈液で磁気ビーズ量 1 mg/mL に希釈して用いた。ビーズ希釈液の組成を下記に示す。

ビーズ希釈液の組成： 0.05 mol/L トリス緩衝液（ $\text{pH} 7.5$ ）、 0.150 mol/L NaCl、 0.01% Tween 20、 0.1% NaN₃、 10% ウサギ血清（加熱）、 0.1% マウス血清（清澄化）

【0046】

（2）Ru標識P-11モノクローナル抗体の調製

P-11モノクローナル抗体 1 mg/mL に調製した 1 mL に、サクシニミド基修飾ルテニウム・トリ・ジピリジルのRu錯体化合物を $68\text{ }\mu\text{L}$ 加え、室温で30分攪拌しながら反応させたのち、 2 mol/L グリシンを $50\text{ }\mu\text{L}$ 加え、反応を停止し、さらに室温で10分間攪拌しながら反応させた。最後に試料をセファデックスG-25（ 10 mmol/L リン酸緩衝液で平衡化）に流し、Ru結合の蛋白分画を集め、Ru標識P-11モノクローナル抗体を調製した。得られたRu標識P-11モノクローナル抗体は、使用時、Ru希釈溶液で $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ に希釈して用いた。Ru希釈液の組成を下記に示す。

Ru希釈液の組成： 0.015 mol/L ヘプス緩衝液（ $\text{pH} 7.8$ ）、 0.150 mol/L NaCl、 0.013 mol/L CaCl₂、 0.1% 界面活性剤、 0.1% NaN₃、 0.1% ベンザミジン、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 5% ウサギ血清（加熱）、 0.01% マウスIgG

【0047】

（3）ビタミンK欠乏に起因するPIVKA-IIの測定

前記調製したP-16モノクローナル抗体固相磁気ビーズ及びRu標識P-11モノクローナル抗体を用い、電気化学発光免疫測定法により検体中のビタミンK欠乏に起因するPIVKA-II（NX-PVKA）の測定値Aを求めた。

検体として、手術を行っておらず、5年後の予後が判明している肝細胞癌患者63名の血清試料を用い、下記方法に従いNX-PVKA量を測定した。

【0048】

各検体 $50\text{ }\mu\text{L}$ にP-16モノクローナル抗体固相磁気ビーズを $25\text{ }\mu\text{L}$ と $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ のRu標識P-11モノクローナル抗体を含むRu標識抗体液 $150\text{ }\mu\text{L}$ を加え、 30°C で9分間反応させた。反応後、磁気ビーズを磁石でトラップしながらピコルミBF洗浄液（エーディア（株）製）で3回洗浄した。 0.1 mol/L トリプロピルアミンを含むピコルミ発光電解液（エーディア（株）製）を $300\text{ }\mu\text{L}$ 加えて、電極表面に送り、磁気ビーズに結合したRuの発光量を自動分析装置ピコルミIII（エーディア（株）製）で測定し、検体中のNX-PVKA量を求めた。

【0049】

10

20

30

40

【表 2】

	Child 分類	人数	平均値	標準偏差
NX- PVKA (mAU/mL)	A	35	480	1777
	B	26	1168	4047
	C	2	3371	4746
PIVKA-II (mAU/mL)	A	35	1627	5559
	B	26	3620	14676
	C	2	815	1116
AFP (ng/mL)	A	35	1158	4844
	B	26	22852	110222
	C	2	9746	13765
AFP-L3 (%)	A	35	12.4	23.1
	B	26	9.7	14.8
	C	2	11.5	0.7

10

20

【0050】

実施例 2 の測定値を Child-Pugh 分類別に平均値を算出した結果を表 2 及び図 2 (a) に示した。測定値について判別群を死亡例、対照群を生存例として ROC 分析を行った。得られた ROC 曲線を図 3 に示す。ROC 分析における曲線下面積は、0.710 であった。

【0051】

(比較例 1)

ピコルミ PIVKA-II 測定キット (エーディア (株) 製) を用いて、PIVKA-II の測定を行った。結果を表 2、図 2 (b) 及び図 3 に示した。ROC 分析における曲線下面積は、0.653 であった。

30

【0052】

(比較例 2)

レーザー誘起蛍光検出法 (LAB 法) による、ミュータスワコー AFP-L3 測定キット (和光純薬工業 (株) 製) を用いて、AFP の測定を行った。結果を表 2、図 2 (c) 及び図 3 に示した。ROC 分析における曲線下面積は、0.651 であった。

【0053】

(比較例 3)

比較例 2 と同様の方法により、AFP-L3 (AFP のレクチン反応性による分画比) の測定を行った。結果を表 2、図 2 (d) 及び図 3 に示した。ROC 分析における曲線下面積は、0.665 であった。

40

【0054】

表 2 及び図 2 に示した結果から明らかなように、実施例 2 の NX-PVKA のみが Child-Pugh 分類 (肝機能を評価するための分類) を反映していた。また、図 3 の結果から明らかなように、実施例 2 の NX-PVKA が最も予後予測を反映していた。

【0055】

(実施例 3)

検体として肝細胞癌患者 28 人、肝硬変患者 20 人、慢性肝炎患者 9 人の血清試料を用い、PIVKA-II と NX-PVKA 量を測定した。PIVKA-II 測定値を NX-PVKA 測定値で割ったレシオ値 (NX-PVKA-R) を算出した。NX-PVKA 量の測

50

定は実施例 2 と同様の方法で行った。PIVKA-II の測定は、ピコルミ PIVKA-II 測定キット（エーディア（株）製）を用いて行った。測定値を表 3 に示す。

【0056】

【表 3】

No.	疾患	PIVKA-II 量 (mAU/mL)	NX-PVKA 量 (mAU/mL)	レシオ値
1	HCC	15	4	3.4
2		22	6	3.9
3		23	6	4.1
4		23	7	3.4
5		36	9	4.0
6		55	7	7.8
7		1974	1669	1.2
8		182	35	5.2
9		225	87	2.6
10		716	241	3.0
11		73	7	9.8
12		2687	439	6.1
13		108	8	13.3
14		371	23	16.0
15		280	89	3.1
16		2886	579	5.0
17		69	11	6.5
18		48	7	6.9
19		205	21	9.9
20		245	22	11.0
21		373	33	11.3
22		9056	90	100.3
23		3943	2363	1.7
24		296	64	4.6
25		4224	120	35.3
26		284	73	3.9
27		2688	210	12.8
28		613	85	7.2

No.	疾患	PIVKA-II 量 (mAU/mL)	NX-PVKA 量 (mAU/mL)	レシオ値
1	LC	12	4	2.9
2		17	4	3.9
3		27	10	2.7
4		32	8	3.8
5		15	4	3.7
6		23	4	5.2
7		14	5	2.8
8		15	5	2.9
9		15	4	4.0
10		17	5	3.4
11		19	4	4.4
12		36	12	3.0
13		38	9	4.1
14		3634	1755	2.1
15		287	132	2.2
16		110	42	2.6
17		1410	432	3.3
18		181	54	3.3
19		74	44	1.7
20		86	26	3.3
1	CH	11	4	2.6
2		15	4	3.4
3		18	4	4.2
4		18	4	4.1
5		19	5	4.2
6		19	4	4.3
7		20	4	4.5
8		24	4	5.5
9		26	5	5.4

【0057】

PIVKA-II 測定値をグラフにしたものを図 4 に示した。PIVKA-II 測定値を NX-PVKA 測定値で割ったレシオ値の結果をグラフにしたものを図 5 に示した。表 3、図 4 及び図 5 において、HCC は肝細胞癌、CH は慢性肝炎、LC は肝硬変、B は B 型肝炎、C は C 型肝炎、NBNC は非 B 型非 C 型肝炎、NASH は非アルコール性肝障害、AIH は自己免疫性肝炎、ALD はアルコール性肝障害である。

表 3、図 4、図 5 に示した結果から明らかなように、従来の測定方法で得た PIVKA-II 測定値を NX-PVKA 測定値で割ったレシオ値（図 5 の NX-PVKA-R）により、従来の測定方法では偽陽性となっていた検体を区別することができ、肝がんの高い特異性を示した。

【0058】

（実施例 4）

実施例 1 で得た P-16 モノクローナル抗体及び P-11 モノクローナル抗体のエピトープを下記方法により調べた。

【0059】

（1）Gla 残基含有ペプチドに対する反応性

PIVKA-II の N 末端 16 残基に存在すると考えられる Gla 残基（γ と表示）を含む下記配列番号 1～3 で表わす 3 種のペプチド（PV002、PV003、PV004）

10

20

30

40

50

）を合成した。

PV002: ANTFL E γ VRKGNL γ R γ

PV003: ANTFL EE VRKGNL γ R γ

PV004: ANTFL EE VRKGNL E R γ

PV002のアミノ酸配列

Ala Asn Thr Phe Leu Glu Gla Val Arg Lys Gly Asn Leu Gla Arg Gla (配列番号1)

PV003のアミノ酸配列

Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Gla Arg Gla (配列番号2)

PV004のアミノ酸配列

Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Gla (配列番号3)

10

【0060】

この3種のペプチドに対する反応性を調べるため次の方法で競合ELISAを行った。

脱炭酸処理時間1時間のPIVKA-IIをPBSで0.1 μg/mLの濃度に希釈した後、ELISA用96穴プレートに50 μL/wellずつ分注し、4℃で一夜静置した。各wellを0.05% Tween 20含有PBS (以下、「PBST」という) で3回洗浄後(400 μL/well)、1% BSA含有PBST (以下、「BSA-PBST」という) を100 μL/wellずつ分注し、室温で1時間静置してブロッキングを行った。PBSTで3回洗浄後、各wellにBSA-PBSTで希釈した各濃度(20、4、0.8、0.16、0.032 μmol/L)のペプチド溶液を25 μL/wellずつ分注し、続いてBSA-PBSTで200 ng/mLの濃度に希釈した各モノクローナル抗体(P-16、P-11)溶液を25 μL/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、BSA-PBSTで3000倍希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体(DAKO社製)溶液を50 μL/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、オルトフェニレンジアミン(東京化成工業社製)を含む基質溶液を50 μL/wellずつ分注し、室温で10分間静置した。これに1.5 N硫酸を50 μL/wellずつ分注して反応を停止後、マイクロプレートリーダー492 nmにおける吸光度を測定した。その結果を図6に示す。

20

【0061】

まず、P-16モノクローナル抗体は3種のペプチド全てに同等の反応性を示した。このことから、P-16モノクローナル抗体のエピトープは3種のペプチドの共通部位であるPIVKA-IIのN末端の1～6残基(図7に示すaa1-6)、又はPIVKA-IIのアミノ酸配列のN末端から8～13残基(図7に示すaa8-13)であることが示唆された。一方、P-11モノクローナル抗体は何れのペプチドとも反応しないことが判明した。本願明細書において、PIVKA-IIのN末端からX～Y残基のものをaaX-Yと称する。

30

【0062】

(2) 変性PIVKA-II、変性プロトロンビン、及び変性トロンビンに対する反応性

変性状態のPIVKA-II、プロトロンビン、及びトロンビンに対する各モノクローナル抗体の反応性をウエスタンブロット法により調べた。具体的には、脱炭酸処理時間2時間のPIVKA-II、0分のプロトロンビン、及び市販精製トロンビン(ベネシス社製)に対する反応性を次の方法で調べた。0.1 mg/mL PIVKA-II、0.1 mg/mL プロトロンビン、及び10 U/mL トロンビンを、それぞれメルカプトエタノール含有のSDS処理液(コスモバイオ社製)と1対1で混和後、10分間煮沸処理した。各サンプルをコスモバイオ社製のポリアクリルアミドゲル(マルチゲルIIミニ4/20)に5 μL/wellずつ添加し、30 mAで1時間電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後のゲルをセミドライブロッター(コスモバイオ社製)を用いPVD F膜に転写を行った(100 mA、45分間)。該PVD F膜をレーン毎に切り分けた後、BSA-PBSTに浸し、4℃で一夜ブロッキングを行った。PBSTで1回洗浄後、5 μg/mLの濃度の各モノクローナル抗体液をPVD F膜と接触させ、室温で1時間静置した。PBSTで3回洗浄後、BSA-PBSTで2000倍希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体(

40

50

D A K O 社製) 溶液入りの容器に移し、室温で1時間緩やかに振とうさせた。各PVDF膜をP B S Tで3回、更にP B Sで1回洗浄後、ジアミノベンチジン(同仁化学研究所社製)を含む基質溶液に浸して3分間反応させた後、精製水に移し反応を停止した。得られた染色像の結果を図8に示す。

【0063】

まず、従来試薬の抗体はP I V K A - IIのみに反応しプロトロンビンには反応しなかったのに対し、P - 1 1及びP - 1 6モノクローナル抗体は何れもP I V K A - IIとプロトロンビンに対し同等に反応した。一方、トロンビンに対しては、何れの抗体も反応しなかった。このことから、P - 1 1及びP - 1 6モノクローナル抗体はP I V K A - IIとプロトロンビンの一次アミノ酸配列の共通部位即ちG l a残基を含まない部位を認識していることが示唆された。

10

【0064】

(3) フラグメント1及びフラグメント2に対する反応性

プロトロンビンのフラグメント1及び2に対する各モノクローナル抗体の反応性をウエスタンブロット法により調べた。フラグメント1及び2(Enzyme Research Laboratories社製)をP B Sでそれぞれ0.05mg/mLの濃度に調製し、メルカプトエタノール含有のS D S処理液(コスモバイオ社製)とそれぞれ1対1で混和後、10分間煮沸処理した。

調製したフラグメント1及び2を用い、上記(2)のウエスタンブロット法と同様の方法で各モノクローナル抗体のフラグメント1及び2に対する反応性を調べた。得られた染色像の結果を図9に示す。

20

【0065】

従来試薬の抗体(MU-3)はプロトロンビン由来のフラグメント1及び2のどちらにも反応しなかった。フラグメント1に対し、P - 1 6モノクローナル抗体は強い反応性が、P - 1 1モノクローナル抗体は弱いながらも反応性が認められた。一方、フラグメント2に対しては、P - 1 1及びP - 1 6モノクローナル抗体のどちらも反応性が認められなかった。このことから、P - 1 1及びP - 1 6モノクローナル抗体のエピトープは、フラグメント1即ちプロトロンビンのN末端から156残基(a a 1 - 1 5 6)の中に存在することが示唆された。

【0066】

30

(4) G l a残基非含有ペプチドに対する反応性

プロトロンビンのN末端から70番目まででG l a残基を含まない(10個のG l a残基全てがG u l残基のままのP I V K A - II)配列番号4~13で表わされる部分ペプチド10本を合成した。

a a 1 - 1 6のアミノ酸配列

Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu (配列番号4)

a a 7 - 2 2のアミノ酸配列

Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys (配列番号5)

a a 1 3 - 2 8のアミノ酸配列

Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe (配列番号6)

a a 1 9 - 3 4のアミノ酸配列

Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu Ser Ser (配列番号7)

a a 2 5 - 4 0のアミノ酸配列

Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val Phe (配列番号8)

a a 3 1 - 4 6のアミノ酸配列

Leu Glu Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala (配列番号9)

a a 3 7 - 5 2のアミノ酸配列

Thr Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala Cys Glu Thr Ala Arg Thr (配列番号10)

a a 4 3 - 5 8のアミノ酸配列

Lys Tyr Thr Ala Cys Glu Thr Ala Arg Thr Pro Arg Asp Lys Leu Ala (配列番号11)

40

50

aa 49-64 のアミノ酸配列

Thr Ala Arg Thr Pro Arg Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn (配列番号 12)

aa 55-70 のアミノ酸配列

Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gly Leu Gly (配列番号 13)
【0067】

上記(1)と同様の競合 ELISA で各モノクローナル抗体と各ペプチドの反応性を調べた。その結果を表4に示す。まず、P-16モノクローナル抗体はaa1-16のペプチドに反応性を示し、aa7-22及び他のペプチドに対しては反応性を示さなかった。一方、P-11モノクローナル抗体は何れのペプチドとも反応しないことが判明した。

【0068】

【表4】

MoAb	Peptide(μM)	Abs.492nm										Peptide free
		aa1-16	aa7-22	aa13-28	aa19-34	aa25-40	aa31-46	aa37-52	aa43-58	aa49-64	aa55-70	
P-11	100	0.355	0.336	0.336	0.340	0.415	0.372	0.356	0.341	0.361	0.396	0.337
	25	0.356	0.317	0.327	0.355	0.358	0.345	0.324	0.321	0.335	0.333	0.347
	6.25	0.346	0.348	0.347	0.346	0.350	0.369	0.322	0.330	0.413	0.317	0.341
	1.5625	0.356	0.326	0.362	0.359	0.348	0.343	0.333	0.334	0.332	0.340	0.709
P-16	100	0.089	1.329	1.242	1.310	1.324	1.414	1.320	1.315	1.394	1.441	0.780
	25	0.158	1.401	1.373	1.384	1.353	1.411	1.462	1.345	1.337	1.353	0.937
	6.25	0.482	1.392	1.403	1.419	1.353	1.363	1.419	1.240	1.339	1.555	1.060
	1.5625	0.727	1.393	1.333	1.357	1.384	1.367	1.285	1.312	1.405	1.285	1.832
MU3	100	1.846	1.817	0.042	1.043	1.618	1.758	1.791	1.675	1.913	1.922	1.864
	25	1.863	1.864	0.045	1.533	1.878	1.898	1.796	1.871	1.839	1.694	1.843
	6.25	1.879	1.807	0.059	1.853	1.895	1.826	1.671	1.779	1.788	1.723	1.795
	1.5625	1.765	1.824	0.114	1.719	1.735	1.750	1.620	1.751	1.748	1.795	0.954

【0069】

以上の結果をまとめると、次の通りである。

P-16モノクローナル抗体のエピトープは、該抗体の上記(1)と(4)に記載のペプチドに対する反応性、及び上記(2)に記載したPIVKA-IIとプロトロンビンに対する反応性から、プロトロンビンフラグメント1のN末端から5残基(配列番号14で表わすaa1-5)の範囲であることが判明した。

aa1-5のアミノ酸配列

Ala Asn Thr Phe Leu (配列番号14)

【0070】

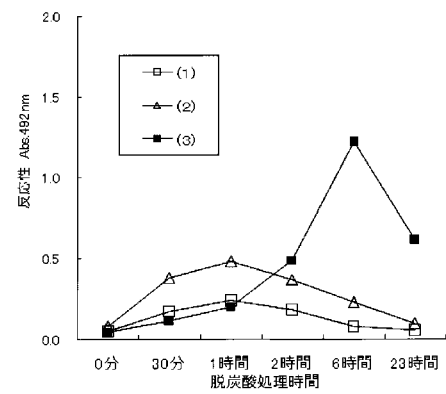
また、P-11モノクローナル抗体のエピトープは、上記(3)でフラグメント1(aa1-156)に反応すること、及び上記(4)でaa1-70に含まれる各ペプチドに反応しないことから、プロトロンビンフラグメント1のaa60-156の範囲に存在することが考えられた。

【産業上の利用可能性】

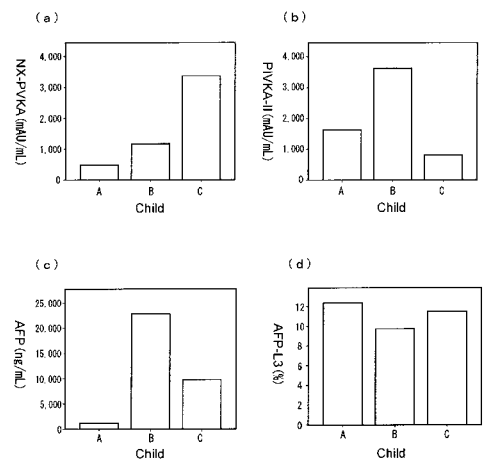
【0071】

本発明のPIVKA-II測定方法及び測定試薬は、肝障害度の判定及び予後予測、肝がんの予後予測と、特異性の高い肝がんの検出に利用できる。

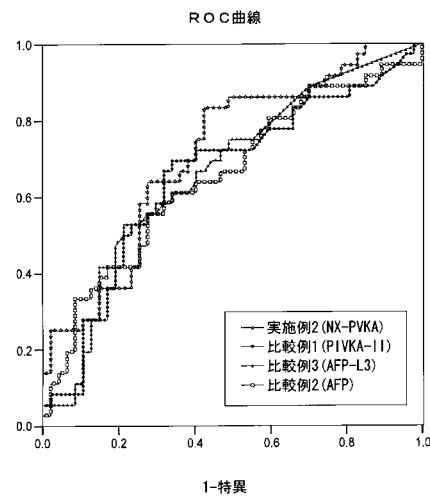
【 図 1 】



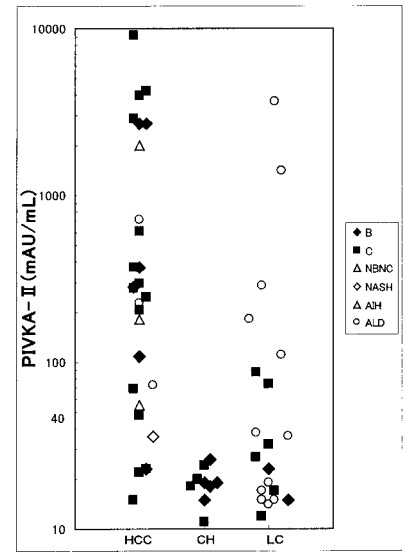
【 図 2 】



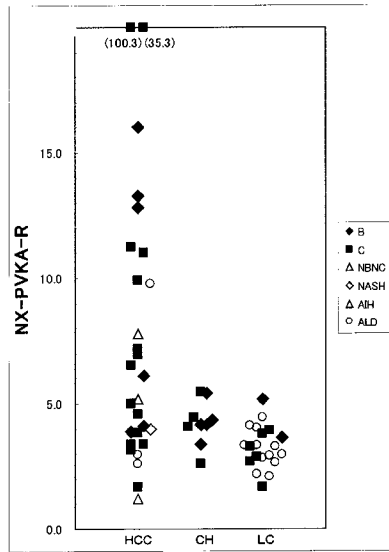
【 図 3 】



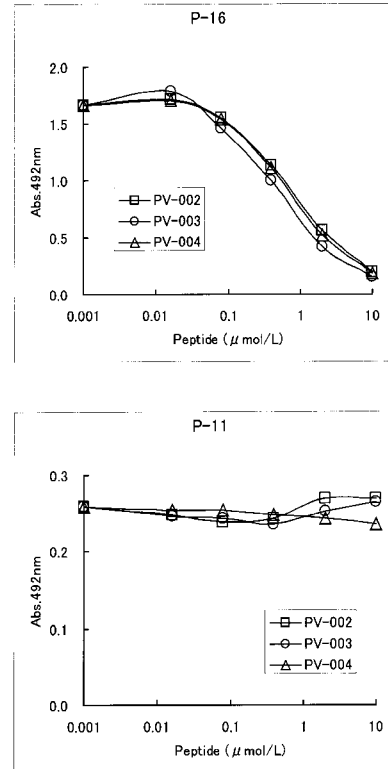
【 図 4 】



【図 5】



【図 6】

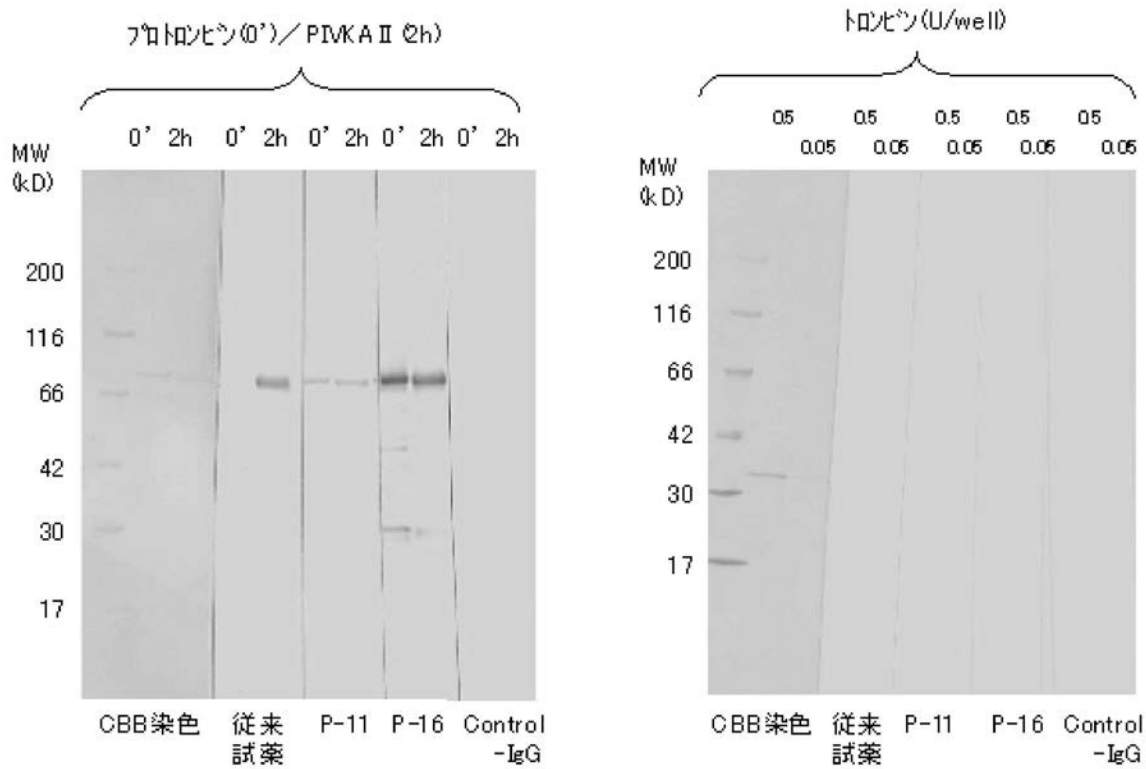


【図 7】

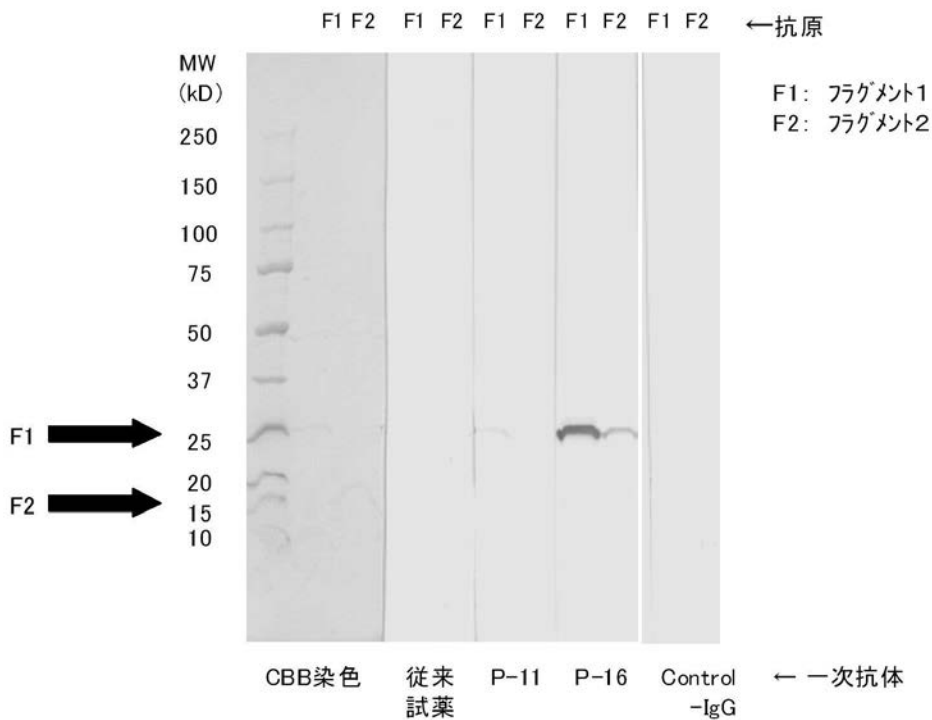
	1	5	7	10	14	15	16								
PV-002	A	N	T	F	L	E	V	R	K	G	N	L	R	R	R
PV-003	A	N	T	F	L	E	E	V	R	K	G	N	L	R	R
PV-004	A	N	T	F	L	E	E	V	R	K	G	N	L	R	R

aa1-6 aa8-13

【図 8】



【図 9】



【配列表】

[2012002345000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/064724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(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)

G01N33/53, C07K16/18, C12N5/10, G01N33/543, G01N33/577

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

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	Kunihiko MOTOHARA et al., "Vitamin K deficiency in infants. 2. Quantitative analysis of PIVKA-2 in blood by ELISA using anti-PIVKA-2 monoclonal antibody", The Journal of the Japan Pediatric Society, 1984, vol.88, no.7, pages 1508 to 1514, entire text	1,3-12
Y		13
A		2,14
X	Hiroshi SAKAI et al., "Clinical significance of PIVKA-IIIMU-3/19B7 ratio as prediction marker of hepatoma", Gekkan Rinsho to Kenkyu, 2002, vol.79, no.7, pages 1259 to 1264, page 1264, right column, lines 5 to 7	2,14

☒ 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
09 August, 2011 (09.08.11)Date of mailing of the international search report
23 August, 2011 (23.08.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/064724

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 2009-106191 A (The University of Tokyo), 21 May 2009 (21.05.2009), paragraph [0007] & EP 2210942 A1 & WO 2009/057294 A1 & CN 101855348 A	13
A	Takashi MORITA, "Biochemistry of PIVKA-II", Kan Tan Sui, 2007, vol.54, no.4, pages 459 to 463, 4.	1-14
A	JP 5-284994 A (Iatron Laboratories, Inc.), 02 November 1993 (02.11.1993), paragraph [0006] (Family: none)	1-14
A	Yuji YOSHIKAWA et al., "Vitamin K-dependent gamma-carboxylation deficiency in hepatocellular carcinoma: Analysis by monoclonal antibodies to discrete regions in protein C", Japan Society of Clinical Chemistry Nenkai Kiroku, 1987, vol.27, pages 22 to 25, Introduction	1-14
A	Kunihiko MOTOHARA et al., "Nyuji Vitamin K Ketsubosei Shukketsusho III Kanzo Roshiketsu ni yoru Screening-ho no Kento", The Journal of the Japan Pediatric Society, 1984, vol.88, no.9, pages 1972 to 1976, I. Hajimeni	1-14
P,A	JP 2010-243406 A (F. Hoffmann-LA Roche AG.), 28 October 2010 (28.10.2010), claims (Family: none)	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/064724	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(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. G01N33/53, C07K16/18, C12N5/10, G01N33/543, G01N33/577			
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 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011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） 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 A	本原邦彦等, 乳児ビタミンK欠乏性出血症 II 抗PIVKA-IIモノクローナル抗体を用いたELISA(2抗体サンドイッチ法)による血中PIVKA-IIの定量, 日本小児科学会雑誌, 1984, Vol.88, No.7, Page.1508-1514, 全文	1, 3-12 13 2, 14	
X	酒井寛等, 肝細胞癌の予測マーカーとしてのPIVKA-II MU-3/19B7比の臨床的意義, 月刊臨床と研究, 2002, Vol.79, No.7, Page.1259-1264, 1264ページ右欄5行~7行	2, 14	
☒ 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 09.08.2011		国際調査報告の発送日 23.08.2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 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） 三木 隆	2J 3312 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 4 7 2 4
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	JP 2009-106191 A (国立大学法人 東京大学) 2009. 05. 21, 【O O O 7】 & EP 2210942 A1 & WO 2009/057294 A1 & CN 101855348 A	1 3
A	森田隆司, PIVKA-II の新しい展開 PIVKA-II の基礎, 肝胆膵, 2007, Vol. 54, No. 4, Page. 459-463, 4.	1 - 1 4
A	JP 5-284994 A (株式会社ヤトロン) 1993. 11. 02, 【O O O 6】 (ファミリーなし)	1 - 1 4
A	吉川雄二等, プロテインCモノクローナル抗体を用いた肝疾患における血中プロテインCの評価 特に肝細胞癌におけるPIVKAの意義について, 日本臨床化学会年会記録, 1987, Vol. 27, Page. 22-25, 緒言	1 - 1 4
A	本原邦彦等, 乳児ビタミンK欠乏性出血症 III 乾燥ろ紙血によるスクリーニング法の検討, 日本小児科学会雑誌, 1984, Vol. 88, No. 9, Page. 1972-1976, I. はじめに	1 - 1 4
P A	JP 2010-243406 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 2010. 10. 28, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1 - 1 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 2

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, RO, RS, RU, 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

(72)発明者 大村 卓味
 北海道札幌市中央区北 3 条東 8 丁目 5 番地 J A 北海道厚生連札幌厚生病院内

(72)発明者 荒井 紀光
 東京都千代田区岩本町 1-10-6 エーディア株式会社内

(72)発明者 西村 順
 茨城県稲敷郡阿見町吉原 3 2 6 2-1 2 エーディア株式会社内

(72)発明者 宮崎 修
 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目 3 番地 1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

F ターム(参考) 4B065 AA90X AB02 BA08 CA25 CA46
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

(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)	PIVKA-II的测量方法，PIVKA-II和抗体的测量试剂		
公开(公告)号	JPWO2012002345A1	公开(公告)日	2013-08-22
申请号	JP2012522624	申请日	2011-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	イーディア株式会社 积水医疗有限公司		
[标]发明人	狩野吉康 大村卓味 荒井紀光 西村順 宮崎修		
发明人	狩野 吉康 大村 卓味 荒井 紀光 西村 順 宮崎 修		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/574 C07K16/18 C12N5/10		
CPC分类号	G01N33/57438 C07K16/40 C07K2317/34 G01N33/86 G01N2333/974 G01N2800/08		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.D G01N33/577.B G01N33/574.A C07K16/18.ZNA C12N5/00.102		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AB02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	石原伸介		
优先权	2010147784 2010-06-29 JP		
其他公开文献	JP5856956B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了PIVKA-II测量方法，PIVKA-II测量试剂，用于确定肝病严重程度的方法和用于确定肝癌的方法，它们均未利用测量PIVKA-II的常规测量试剂。在肝癌中升高的II可以根据使用对PIVKA-II特异的抗体获得的测量值来确定肝癌的严重程度或预测肝癌的预后，该抗体在维生素K缺乏时会升高，并且可以检测到肝脏 高灵敏度的癌症。具体公开了一种用于测量PIVKA-II的方法，该方法包括步骤(a)：通过利用双抗体夹心技术的免疫学测量方法来测量由于维生素K缺乏而引起的PIVKA-II，以获得测量值(A)。)，其中对由维生素K缺乏引起的PIVKA-II特异的抗体用作步骤(a)中的双抗体夹心技术中使用的抗体。

【図5】

