

(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2010-276484

(P2010-276484A)

(43) 公開日 平成22年12月9日(2010.12.9)

(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	S
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88	E
GO 1 N 30/74 (2006.01)	GO 1 N 30/74	F
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	Z

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2009-129695 (P2009-129695)	(71) 出願人	508123858
(22) 出願日	平成21年5月28日 (2009. 5. 28)		S B I アラプロモ株式会社
			東京都港区六本木一丁目6番1号
		(71) 出願人	504174180
			国立大学法人高知大学
			高知県高知市曙町二丁目5番1号
		(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】 尿路系腫瘍の判定システム

(57) 【要約】

【課題】がんや腫瘍について、薬剤を投与することなく、腫瘍が生じている組織により特異的に検出される化合物を異性体レベルで特異的に検出することで、容易に早期発見、治療効果のモニタリング、予後の診断等を行うことができる腫瘍判定システムを開発する。

【解決手段】被検尿試料中に存在する、コプロポルフィリンIの検出量が、陰性対照正常者尿試料中に存在する、コプロポルフィリンIの検出量よりも有意に高い場合は、被検尿試料を採取した被検者が尿路系腫瘍患者であると評価することにより、尿路系腫瘍の患者と健常者とを選別するために有効であり、尿路系腫瘍の早期発見や治療効果のモニタリングや、予後の再判定に用いることができることを確認した。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検尿試料中のコプロポルフィリン I の検出手段を有することを特徴とする尿路系腫瘍の判定システム。

【請求項 2】

尿路系腫瘍が、膀胱がん、前立腺がん、腎臓がん、又は尿路上皮がんであることを特徴とする請求項 1 記載の判定システム。

【請求項 3】

コプロポルフィリン I の検出手段が、HPLC 蛍光検出手段又は免疫学的測定手段であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の判定システム。

10

【請求項 4】

被検尿試料中のコプロポルフィリン I を検出することを特徴とする尿路系腫瘍の判定方法。

【請求項 5】

尿路系腫瘍が、膀胱がん、前立腺がん、腎臓がん、又は尿路上皮がんであることを特徴とする請求項 4 記載の判定方法。

【請求項 6】

HPLC 蛍光検出手段又は免疫学的測定手段を用いて、コプロポルフィリン I を測定することを特徴とする請求項 4 又は 5 記載の判定方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被検者の尿から、コプロポルフィリン I を有意に検出することにより、尿路系腫瘍を判定するシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

わが国においては、食生活の欧米化に伴いがんは増加傾向にある。がんは早期に発見されればほぼ 100% 完治するとされているが、初期段階では自覚症状がないため早期発見が必要であり、そのために主として血中の腫瘍マーカーと総称される物質を測定することによって検査することが一般的に行われている。腫瘍マーカーとは、「がん細胞をつくる物質、又はがん細胞と反応して体内の正常細胞がつくる物質のうちで、それらを血液や組織、排泄物(尿・便)などで検査することが、がんの診断または治療の目印として役立つもの」と定義される場合もある。

30

【0003】

例えば、がんの診断を支援する方法であって、患者のサンプル尿を用意するステップと、前記サンプル尿中の分子量約 7500 ~ 8500 の蛋白質のマーカーを検出するステップと、前記マーカー又は前記マーカーの量を可能性のあるがんと対応付けるステップと、を備えるがんの診断支援方法(特許文献 1 参照)や、膀胱がんを有していると疑われる被験者から採取したサンプル中の検出されたヒト HURP 遺伝子の発現の有無により膀胱がんの検出方法(特許文献 2 参照)が提案されている。

40

【0004】

一方、5-アミノレブリン酸(以下「 α -アミノレブリン酸」又は「ALA」ともいう)は、色素生合成経路におけるポルフィリン類の原料として知られており、動物や植物や菌類に広く存在し、5-アミノレブリン酸シンセターゼにより、スクシニル CoA とグリシンとから生合成されてポルフィリン類に通常誘導されるが、ALA、その誘導體又はそれらの塩を含有する腫瘍診断剤であって、該腫瘍診断剤を投与後、体内又は体外から採取した試料中のプロトポルフィリン IX、ウロポルフィリン I、ウロポルフィリン III、コプロポルフィリン I、コプロポルフィリン III、ヘプタカルボキシルポルフィリン I、ヘプタカルボキシルポルフィリン III、ヘキサカルボキシルポルフィリン I、ヘキサカルボキ

50

シルポルフィリンIII、ペンタカルボキシシルポルフィリンI、ペンタカルボキシシルポルフィリンIII、イソコプロポルフィリン、ハルデロポルフィリン、イソハルデロポルフィリン、メソポルフィリンIX、デューテロポルフィリンIX又はペンプトポルフィリン等のポルフィリン類を測定することにより診断する腫瘍の有無を判定することを目的とした腫瘍診断剤（特許文献3参照）が提案されている。

【0005】

上記ポルフィリン類は、4つのピロールからなる環状構造を有する有機化合物の誘導体の総称であって、生体組織内で、ヘム代謝系におけるヘム合成の中間体として重要な役割を有するが、ヘム代謝系の異常は、各型のポルフィリン症、鉛中毒、ある種の貧血等に見られ、赤血球・血漿・尿・糞便などにヘム代謝系の中間代謝物が異常に増加し、ポルフィリン類も尿中に排出されることが知られている。

10

【0006】

また、ALA等未投与の、自然糞便中のプロトポルフィリンまたはその関連化合物ないしは誘導体の存在を検出することを含む、大腸腫瘍の診断方法（特許文献4）や、糞便等の試料中のプロトポルフィリン類の免疫学的検出方法（特許文献5）が提案されている。

【0007】

さらに、尿中のポルフィリン類のうち、コプロポルフィリンについては、各異性体についての検出についての研究において、赤芽球性プロトポルフィリン症の肝障害においてコプロポルフィリンの一異性体であるコプロポルフィリンIが増加する報告はあるが、疾病が、腫瘍である場合等についての詳細な報告はなかった。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2003-279578号公報

【特許文献2】特開2004-248508号公報

【特許文献3】特開2006-124372号公報

【特許文献4】特開2006-284298号公報

【特許文献5】特開2008-89358号公報

【非特許文献】

【0009】

30

【非特許文献1】近藤雅雄，ポルフィリン，1，51（1992）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上記各種腫瘍検出方法では、投与する - アミノレブリン酸の誘導体の種類によっては、重篤な副作用が生じるおそれがあり、がん以外の疾病によっても試料中に各種のポルフィリン類が検出されるなど特異性の点で問題があり、早期に、確実に、がんが発生している組織を検出、確認することは困難な場合があった。

【0011】

本発明の課題は、がんや腫瘍について、薬剤を投与することなく、腫瘍が生じている組織により特異的に検出される化合物を異性体レベルで特異的に検出することで、容易に早期発見、治療効果のモニタリング、予後の診断等を行うことができる腫瘍判定システムを開発することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、ヘム合成の中間体としてのポルフィリン前駆体であるALA等の薬剤を未投与のがん患者の尿から検出されるポルフィリン類を詳細に検討した結果、ポルフィリン類の中でも特にコプロポルフィリンIが、尿路系腫瘍の患者に特異的に検出されることを見出し、さらに、被検尿試料中に存在する、コプロポルフィリンIの検出量が、陰性対照正常者尿試料中に存在する、コプロポルフィリンIの検出量よりも有意に高い場合は

50

、被検尿試料を採取した被検者が尿路系腫瘍患者であると評価することにより、尿路系腫瘍の患者と健常者とを選別するために有効であり、尿路系腫瘍の早期発見や治療効果のモニタリングや、予後の再判定に用いることができることを確認して、本発明を完成した。

【発明の効果】

【0013】

本発明の腫瘍の判定システムによれば、尿路系腫瘍についてコプロポルフィリンIを有意に検出することにより、容易に、腫瘍の早期発見、治療効果のモニタリング、予後の判定等を行うことができる。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の尿路系腫瘍の判定システムとしては、被検尿試料中のコプロポルフィリンIを検出する手段を有するものであれば特に制限されず、また、本発明の尿路系腫瘍の判定方法としては、本発明の尿路系腫瘍の判定システムを用いて、被検尿試料中のコプロポルフィリンIを検出する方法であれば特に制限されず、本発明の判定システムや判定方法を利用すると、被検尿試料中に、生体内でヘム合成に至る中間体であるポルフィリン類の一種であるコプロポルフィリンの一異性体であるコプロポルフィリンIが有意に高く検出される被検者は、尿路系腫瘍を有している危険性が高いと判定することができる。

【0015】

本発明のシステムにおける尿路系腫瘍としては、膀胱、尿道、尿管等の尿路系に属する組織に由来するがんであれば特に制限されず、具体的には、膀胱がん、前立腺がん、腎臓がん、尿路上皮がん等の浸潤性に増殖し転移性を示す悪性腫瘍や、非悪性腫瘍を挙げることができる。なお、本明細書中においては、「がん」と「腫瘍」は同じ意味に用いられる。

【0016】

本発明の判定システムで使用される被検尿試料としては、被検者から採取された尿であって、生体においてヘム生合成の原料や中間体である5-アミノレブリン酸等(ポルフィリン関連化合物)を投与されずに排泄された尿を採取した試料を好適に挙げることができ、採取直後に被検尿試料として本発明の判定システムのために使用されることが好ましいが、保管後に使用する場合には、ポルフィリン関連化合物は光と温度により影響を受けやすいので、遮光条件下で保存されることが好ましく、保存温度としては25~4℃が好ましく、10~4℃がより好ましく、中でも4℃が特に好ましい。

【0017】

本発明の判定システムで使用される被検尿試料中のコプロポルフィリンIの検出手段としては、コプロポルフィリンIのHPLC蛍光検出のための手段(機器や試薬)、コプロポルフィリンIの免疫学的測定のための手段(機器や試薬)等を例示することができる。

【0018】

上記HPLC蛍光検出において、コプロポルフィリンIは、励起波長が350~500nmで蛍光波長が550~750nm、好ましくは、励起波長が380~450nmで蛍光波長が590~700nm、より好ましくは、励起波長が400~420nmで蛍光波長が600~650nm、さらに好ましくは、励起波長が405~415nmで蛍光波長が605~615nmで検出することができる。具体的には、被検尿試料200μLに0.08%ヨウ素-酢酸混合溶液(1/1, V/V)を200μL添加し、ボルテックスで混合後、15000rpmで5分間遠心後、採取した上清40μLをHPLC機器(Shimadzu LC-10AVP)に注入し、流速1.0ml/min、温度40℃の条件下でHPLC分析を行い、コプロポルフィリンIの検出をShimadzu RF-10AXL蛍光検出器を用いて、励起波長406nm、蛍光波長609nmで行い、標準液のピーク面積から濃度を算出する方法を例示することができる。

【0019】

上記免疫学的測定には、コプロポルフィリンIに特異的に結合する分子を用いるRIA法、ELISA法、蛍光抗体法等の公知の免疫学的測定法を用いることができ、コプロポ

10

20

30

40

50

ルフィリン I に特異的に結合する分子としては、具体的には、コプロポルフィリン I に特異的に結合し、他のポルフィリン類やヘムと交差反応しない抗体を好ましく例示することができるが、ポルフィリン類はハプテンとして機能するので、これらの化合物と免疫原性物質とのコンジュゲートであってもよい。かかる抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、2つのエピトープを同時に認識することができる二機能性抗体等を例示することができ、また、これら抗体の Fab 断片や F (a b ')₂ 断片等も使用しうるが、モノクローナル抗体を用いることが好ましい。これら抗体は、慣用のプロトコールを用いて作製することができる。コプロポルフィリン I に特異的に結合する分子は、適当な標識剤により標識されていてもよい。

【0020】

本発明の判定システムや判定方法には、被検尿試料中に存在する、コプロポルフィリン I を検出した後に、検出結果を評価するシステムや工程を含んでいてもよい。検出結果の評価は、正常人や尿路系腫瘍患者の生体尿試料におけるコプロポルフィリン I の検出結果を基準として行うことができる。具体的には、(i) 被検尿試料中に存在する、コプロポルフィリン I の検出量が、陰性対照正常者尿試料中に存在する、コプロポルフィリン I の検出量 (基準量) よりも有意に高い場合、例えば、50.903 nmol / g CRE 以上の場合、被検尿試料を採取した被検者が尿路系腫瘍患者であると判定することができ、(ii) 被検尿試料中に存在する、コプロポルフィリン I の検出量が、陽性対照尿路系腫瘍患者尿試料中に存在する、コプロポルフィリン I の検出量 (基準量) よりも有意に低い場合、例えば、21.5 nmol / g CRE 以下の場合、被検尿試料を採取した被検者が正常者であると判定することができる。

【0021】

本発明の尿路系腫瘍判定キットとしては、コプロポルフィリン I に特異的に結合する分子、又はそれらの標識物を備えたキットであれば特に制限されず、コプロポルフィリン I に特異的に結合する分子が、少なくとも1つ以上固定化されているマイクロアレイ又はマイクロチップを備えたキット等を例示することができ、このキットを用いることにより、尿路系腫瘍の判定を行うことができる。上記分子としては、常法により作製された抗体等を好ましく例示することができる。また、上記尿路系腫瘍判定キットとしては、他の試薬等が含まれていてもよい。

【0022】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されない。

【実施例1】

【0023】

[ポルフィリン類の標準溶液]

ポルフィリン類の標準溶液としては以下の試薬を使用した。すなわち、ウロポルフィリン I (以下、Uro I と略) , 及びコプロポルフィリン I (以下、Copro I と略) は、Porphyrin Acid Chromatographic Marker kit (Porphyrin Products 社製) に備えられている試薬を使用した。ウロポルフィリン III (以下、Uro III と略) 及びコプロポルフィリン III (以下、Copro III と略) は、Frontier Scientific, Inc. より購入した。アセトニトリルは HPLC 用、その他はすべて試薬特級品を使用した。

【0024】

[蛍光 HPLC 分析]

ヒト健常人 12 人と膀胱がん患者 31 人の尿を各 0.2 mL 採取し、被検尿試料とした。被検尿試料 200 μL に 0.08% ヨウ素 - 酢酸混合溶液 (1 / 1 , V / V) を 200 μL 添加し、ボルテックスで混合後、15000 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上清を採取し、各 40 μL を HPLC 機器に注入した。システムは Shimadzu LC-10A VP (カラムは Shiseido CAPCELL PAK C18 AG120、検出器は RF-10AXL 蛍光検出器 (Ex . 406 nm、Em . 609 nm)) を用いた。移動相は A 液 : 12.5% アセトニトリル・1 M 酢酸アンモニウム混合液 (pH 5.15)、B 液 : 80% アセトニトリル・50 mM 酢酸アンモニ

10

20

30

40

50

ウム混合液 (pH 5.15) を用い、A 液で 5 分間 hold し、A/B (100/0) - A/B (65/35) 35 分 Linear グラジエント、A/B (65/35) - A/B (0/100) 1 分 Linear グラジエント、B 液で 9 分間 hold し、A/B (0/100) - A/B (100/0) 1 分 Linear グラジエント、A 液で 9 分間 hold した。測定は、流速 1.0 ml/min、温度 40 で行った。各被検尿試料を測定し、各ポルフィリン類の標準溶液のピーク面積から各試料の濃度を算出した。

【0025】

膀胱がん患者と健常人の被検尿試料の各ポルフィリン類の濃度の平均値の比較を、統計解析ソフト spss を用いて、等分散を仮定しない場合の t 検定で行った。その結果を表 1 に示す。

【0026】

【表 1】

	項目	検体数	平均値*	標準偏差	有意確率
がん患者	Uro I	31	25.968	39.062	0.813
健常人		12	28.583	29.100	
がん患者	UroIII	31	7.581	35.013	0.237
健常人		12	0.000	0.000	
がん患者	Copro I	31	50.903	42.741	0.004
健常人		12	21.500	19.398	
がん患者	CoproIII	31	82.000	76.167	0.076
健常人		12	48.500	42.397	

Uro I、UroIII、Copro I、CoproIII : nmol/gCRE

【0027】

[結果]

がん患者 (31 例) と健常人 (12 例) の Uro I、UroIII、Copro I、CoproIII を測定した結果、Copro I の量が、陰性対照正常者尿試料中に存在する Copro I の量よりも高く、有意確率 (両側) が 0.004 であって、0.05 以下であったので、有意差があることを確認することができた (表 1 参照)。すなわち、Copro I を測定することにより、尿路系腫瘍患者と健常人とを明確に分けることが可能となり、尿中の Copro I (コプロポルフィリン I) が 50.903 nmol/gCRE 以上である被検者は、腫瘍を有している危険性が高いと判定することができる。

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

(72)発明者 田中 徹

東京都港区六本木一丁目6番1号泉ガーデンタワー18F SBIアラプロモ株式会社内

(72)発明者 井上 啓史

高知県高知市曙町二丁目5番1号 国立大学法人高知大学内

(72)発明者 執印 太郎

高知県高知市曙町二丁目5番1号 国立大学法人高知大学内

专利名称(译)	泌尿道肿瘤测定系统		
公开(公告)号	JP2010276484A	公开(公告)日	2010-12-09
申请号	JP2009129695	申请日	2009-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	SBIアラプロモ 国立大学法人高知大学		
申请(专利权)人(译)	SBIアラプロモ株式会社 国立大学法人高知大学		
[标]发明人	田中 徹 井上 啓史 執印 太郎		
发明人	田中 徹 井上 啓史 執印 太郎		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/88 G01N30/74 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/53.S G01N30/88.E G01N30/74.F G01N33/574.Z		
代理人(译)	▲▼高津哉 堀内申		
其他公开文献	JP5224536B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过在异构体水平上特异性地检测由肿瘤发生的组织特异性检测的化合物，而不用给予癌症或肿瘤的药物，可以容易且快速地检测化合物，特别是治疗效果监测肿瘤，诊断预后等 当检测到的受试者中存在的粪卟啉I的检测量显著高于阴性对照正常尿液样品中存在的粪卟啉I的检测量时，收集受试者尿液样品通过评估泌尿系肿瘤患者是患者，尿路肿瘤的早期发现和治疗效果的监测，选择泌尿系肿瘤患者和健康受试者是有效的。 ，证实它可以用于重新确定预后。 【选择图】无

	項目	検体数	平均値*	標準偏差	有意確率
がん患者	Uro I	31	25.968	39.062	0.813
健常人		12	28.583	29.100	
がん患者	UroIII	31	7.581	35.013	0.237
健常人		12	0.000	0.000	
がん患者	Copro I	31	50.903	42.741	0.004
健常人		12	21.500	19.398	
がん患者	CoproIII	31	82.000	76.167	0.076
健常人		12	48.500	42.397	

Uro I、UroIII、Copro I、CoproIII : nmol/gCRE