

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5224536号  
(P5224536)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	S
<b>GO 1 N 30/88</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 30/88	E
<b>GO 1 N 30/74</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 30/74	F
<b>GO 1 N 33/574</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	Z

請求項の数 6 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2009-129695 (P2009-129695)	(73) 特許権者	508123858
(22) 出願日	平成21年5月28日 (2009.5.28)		S B I ファーマ株式会社
(65) 公開番号	特開2010-276484 (P2010-276484A)		東京都港区六本木一丁目6番1号
(43) 公開日	平成22年12月9日 (2010.12.9)	(73) 特許権者	504174180
審査請求日	平成24年5月24日 (2012.5.24)		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) 【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 の検出手段を有し、( 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判定し、( 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 の検出量よりも有意に低い場合は、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、H P L C 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。

【請求項 4】

被検尿試料中のコプロポルフィリン I を検出し、( 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判定し、( 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の検出量よりも有意に低い場合は、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。

【発明の詳細な説明】

10

【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。

20

【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。

30

【0004】

一方、5-アミノレブリン酸(以下「5-アミノレブリン酸」又は「ALA」ともいう)は、色素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、ヘキサカルボキシルポルフィリンⅢ、ペンタカルボキシルポルフィリンⅠ、ペンタカルボキシルポルフィリン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。

40

【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體の総称であって、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。

50

## 【 0 0 0 6 】

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。

## 【 0 0 0 7 】

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。

## 【 先行技術文献 】

10

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【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 】

## 【 0 0 0 9 】

【非特許文献1】近藤雅雄，ポルフィリン，1，51（1992）

20

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 1 0 】

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。

## 【 0 0 1 1 】

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。

30

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 2 】

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、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。

40

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 1 3 】

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 】

## 【 0 0 1 4 】

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

50

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。

10

**【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。

20

**【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。

30

**【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(ab')<sub>2</sub>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。

40

**【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

50

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、 $50.903 \text{ nmol/gCRE}$ 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、 $21.5 \text{ nmol/gCRE}$ 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。

10

#### 【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。

20

#### 【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、UroIと略)、及びコプロポルフィリンI(以下、CoproI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、UroIIIと略)及びコプロポルフィリンIII(以下、CoproIII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。

30

#### 【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0.2mL採取し、被検尿試料とした。被検尿試料200 $\mu$ Lに0.08%ヨウ素-酢酸混合溶液(1/1, V/V)を200 $\mu$ L添加し、ボルテックスで混合後、15000rpmで5分間遠心した。遠心後、上清を採取し、各40 $\mu$ L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. 406nm, Em. 609nm))を用いた。移動相はA液:12.5%アセトニトリル・1M酢酸アンモニウム混合液(pH5.15)、B液:80%アセトニトリル・50mM酢酸アンモニウム混合液(pH5.15)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1.0ml/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。

40

#### 【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】

50

【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

## 【 0 0 2 7 】

## [ 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（コプロボルフィリン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

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開2006-124372(JP,A)

特開2006-284298(JP,A)

特開平05-293107(JP,A)

Neoplasma, 1989年, Vol.36, No.2, Page.207-213

Zentralblatt fuer Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, 1968年, Vol.111, No.3, Page.185-191

Materia Medica Polona, 1987年, Vol.19, No.2, Page.72-77

ポルフィリン, 1997年, Vol.6, No.1, Page.15-20

J Chromatogr, 1986年, Vol.380, No.1, Page.232-234

Dokl Akad Nauk BSSR, 1983年, Vol.27, No.6, Page.565-567

Food Cosmet Toxicol, 1979年, Vol.17, No.3, Page.205-221

Sci Total Environ, 2007年, Vol.379, No.2-3, Page.235-243

BRIT JOUR CANCER, 1962年, Vol.16, No.2, Page.283-288

British Journal of Cancer, 1962年, Vol.16, Page.289-297

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

G01N 30/74

G01N 30/88

G01N 33/574

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

专利名称(译)	泌尿道肿瘤测定系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP5224536B2</a>	公开(公告)日	2013-07-03
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		
当前申请(专利权)人(译)	SBI制药有限公司 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		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2010276484A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：开发肿瘤测定系统，通过特异性检测异构体水平的化合物，特别是肿瘤组织检测，轻松进行癌症和肿瘤的早期检测，监测治疗效果，进行预后等在没有给予化学品的情况。SOLUTION：在待测尿样中存在的粪卟啉I的检出量显著高于正常受试者的阴性对照尿样中存在的粪卟啉I的检出量的情况下，通过评价来自如果将要测试的尿样作为患有泌尿道肿瘤的患者收集，则肿瘤测定系统对于区分患有尿道肿瘤的患者和健康受试者是有效的。肿瘤测定系统用于尿道肿瘤的早期检测，治疗效果的监测和预后重新确定。

	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