

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-542774

(P2008-542774A)

(43) 公表日 平成20年11月27日(2008.11.27)

(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 3
C 1 2 Q 1/06	(2006.01)	C 1 2 Q 1/06	Z N A	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2008-515144 (P2008-515144)	(71) 出願人	508020155
(86) (22) 出願日	平成18年6月8日 (2006.6.8)		ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロピア
(85) 翻訳文提出日	平成20年1月9日 (2008.1.9)		ア
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/005508		B A S F S E
(87) 国際公開番号	W02006/131379		ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフェン (番地なし)
(87) 国際公開日	平成18年12月14日 (2006.12.14)		D-67056 Ludwigshafen, Germany
(31) 優先権主張番号	102005026710.6	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成17年6月9日 (2005.6.9)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 物質または物質の混合物の試験方法、該方法の使用と対応する試験キット

(57) 【要約】

本発明は、物質および物質の混合物を毒性について試験する方法、該方法の使用、および対応する試験キットに関する。本方法は、基本的に肝臓からの脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP) の測定に基づく。該方法の使用は、試験物質または物質の混合物の発癌性および腫瘍促進性の早期指標を与える。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

物質または物質混合物を試験する方法であって、

- a) 生物またはその一部が物質または物質混合物に接触される；および
- b) 少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）の発現が、その生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプルで測定され、接触時間が48時間より大きい方法。

【請求項 2】

接触時間が60時間またはそれ以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

接触時間が最大10日間である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

接触時間が最大5日間である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 5】

接触時間は最大72時間である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 6】

測定が物質または物質混合物への接触の前と後に行われる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

物質または物質混合物への接触の前と後に測定されるL-FABP発現が互いに比較される、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

物質または物質混合物への接触によりもたらされるL-FABP発現の変化が物質または物質混合物の毒性を表す、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

変化がL-FABP発現の低下である、請求項8の方法。

【請求項 10】

測定が少なくとも2つの異なる接触時間について行われる、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

- a1) 第1の生物またはその一部を物質または物質混合物に接触させ；
- b1) 第1の生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプル中の少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）の発現を測定し；
- a2) 第2の生物またはその一部を物質または物質混合物に接触し；そして
- b2) 第2の生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプル中の肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）の発現を測定する、請求項10記載の方法であって、第1の生物またはその一部の接触時間は第2の生物またはその一部の接触時間とは異なることを特徴とする方法。

【請求項 12】

- a) 生物またはその一部を物質または物質混合物に接触させ；そして
- b) 生物またはその一部から得られる少なくとも第1のサンプルおよび少なくとも第2のサンプルで、少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）の発現を測定する、ことを含んでなり、ここで第1のサンプルは生物またはその一部から第1の接触時間後に採取され、第2のサンプルは生物またはその一部から第2の接触時間後に採取され、かつ第1の接触時間は第2の接触時間とは異なる 請求項10記載の方法。

【請求項 13】

測定がタンパク質の分析により行われる、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

タンパク質の分析による測定が免疫学的方法である、請求項13に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

タンパク質の分析による測定が分光分析的方法である、請求項13に記載の方法。

【請求項 16】

生物がラットである、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

生物の一部は肝臓またはその一部である、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

物質または物質混合物の毒性を同定するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法の使用。

【請求項 19】

毒性が腫瘍促進性である、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

腫瘍促進性は、受容体仲介性、酵素誘導性、細胞毒性有糸分裂誘発性、酸化ストレス促進性、および/またはミトコンドリア毒性である、請求項19に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、物質および物質の混合物を毒性について試験する方法、その使用、および対応する分析キットに関する。本方法は、基本的に肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABPと省略する）の測定に基づく。この方法の応用は、特に試験された物質または試験された物質混合物の発癌性、特に腫瘍促進性の早期指標を与える。

【背景技術】

【0002】

発癌能力は、活性成分の開発のためのノックアウト基準となる。このような作用は適用部位によっては活性薬剤成分となるが、作物防御活性成分の開発にとっては大きな障害である。このような場合に適用される原理は、遺伝毒性に帰因する発癌性と非遺伝毒性の腫瘍促進機構に基づく発癌性とを区別することである。後者の場合、作用閾値を仮定しまたしばしば実験的に証明することができ、そして物質が認可される。一般的には、遺伝毒性発癌性と非遺伝毒性発癌性は大きな点で異なり、不完全な発癌性と完全な発癌性の差になると言える。すなわち作用は早期の促進相ではしばしば可逆性であり、腫瘍マーカー（遺伝毒性作用）自体は腫瘍促進のマーカーではない（非遺伝毒性作用）。さらに発癌性の2段階モデルでは、腫瘍促進作用の前に細胞への影響が開始されることが通常必要である。

【0003】

癌誘導研究における従来の検査は時間と費用がかかるため、腫瘍促進性についてできるだけ早い情報が重要である。遺伝毒性が存在しないかまたは非常に弱い場合、突然変異誘発/遺伝毒性について行われる研究は明確な警告にはつながらない。腫瘍は研究の後期にのみ高用量で腫瘍促進性の結果として現れ、従ってその出現は、ヒトへの関連で分類することが困難である。

【0004】

腫瘍促進物質は特にげっ歯動物の肝臓（特にラット）について詳しく説明されている。解毒の主要な臓器としての肝臓の第1の役割に一致して多くの発癌性物質はげっ歯動物の肝腫瘍を引き起こすため、標的臓器としての肝臓は良好なモデルシステムである。肝臓の発癌性については広範な機構論的データベースがある。肝臓を標的臓器とする非遺伝毒性腫瘍促進物質の中でいくつかの群の物質が記載されており、これらには特に、受容体仲介性活性機構を有するもの（例えば、脂質低下剤やペルオキシソーム増殖物質、TCDDと類似体、およびエストロゲン様物質）、酵素インデューサー（例えば、DDT、アルファヘキサクロクロクロヘキサン、フェノバルビタール、種々の作物防御物質や薬剤）、AH受容体アゴニストや細胞毒性分裂促進物質（例えばテトラクロロメタンやテトラヒドロフラン）、酸化ストレスを促進する物質（例えばFeNTA）、およびミトコンドリア毒性を有する物質（例えばいくつかの芳香族化合物、アミンおよびフラン）がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

ペルオキシソーム増殖物質はおそらくげっ歯動物システムにとってのみ重要である。抗ホルモン物質やオスおよびメスの生殖系にホルモン様作用を有する物質について、すでに機能試験系が開発されている。げっ歯動物における症状発現は、肝臓の顕著な肥大、後に肝腫瘍に進展する可能性のある新生物発生前の免疫細胞化学的に検出可能な病変の形成である。動物実験で新生物発生前病変を検出するための種々の中期アッセイが利用できる（例えば、Ito (Ito, N.; Imaida, K.; Hasegawa, R.; Tsuda, H. Crit. Rev. Toxicol. (1989) 19, 385-415) またはSchulte-Hermann (Schulte-Hermann, R.; Bursch, W.; Low-Baselli, A.; Wagner, A.; Grasl-Kraupp, B. Cell Biol. Toxicol. (1997) 13, 339-348のイニシエーション - プロモーションモデル)。しかしこれらはスクリーニング目的には複雑過ぎる。トランスクリプトームやプロテオーム分析に基づくスクリーニング系は、通常多くのマーカーが変化し、適応性ホメオスタシスと大きく（不可逆的に）変化したマーカーの区別でさえ困難なため、これらも問題がある。

10

【 0 0 0 6 】

L-FABPはラット肝臓中に一般的に存在するタンパク質であり、総サイトゾルタンパク質の2~6%の比率である (S. Sorof, Cancer and Metastasis Reviews (1994) 13, 317-336)。全部で7つの脂肪酸結合タンパク質が知られており、元々これらが得られた組織から命名されている (R. Das, R. Hammamieh, R. Neill, M. Melhem, M. Jett, Clin. Cancer Res. (2001) 7, 1706-1715) : a) 脂肪細胞 (A-FABP)、b) 心臓または筋肉 (H-FABP)、c) 脳 (B-FABP)、d) 表皮または乾癬関連 (E-FABP)、e) 肝臓 (L-FABP)、f) 小腸 (I-FABP)、およびg) ミエリンまたはP2 (P2-FABP)。FABPの主要な仕事は、長鎖脂肪酸や他の疎水性リガンド（そのいくつかはシグナル伝達鎖に関与している）を輸送することである。いくつかの脂肪酸結合タンパク質の欠如またはその機能障害は、例えば糖尿病、高脂質血症、肥満、アテローム性動脈硬化症、および心筋肥大のような疾患を引き起こすことが文献で示唆されている (J.F. Glatz, J. Storch, Curr. Opinion in Lipidology (2001) 12, 267-274)。

20

【 0 0 0 7 】

脂肪酸結合タンパク質は細胞分裂や分化で機能を有することが指摘されている。Schroederらは、L-FABPが胚幹細胞の増殖と分化に影響を与えることを証明することができた (F. Schroeder, BP. Atshaves, O. Starodub, A.L. Boedeker, R.R. Smith III, J.B. Roths, W.B. Foxworth, A.B. Kier, Molecular and Cellular Biochemistry (2001) 219, 127-138)。SorofはL-FABPによる有糸分裂誘発の調節を記載している (Sorofら、1994、前述)。細胞増殖の促進におけるL-FABPと不飽和脂肪酸との間に相乗作用があると言われている。L-FABPはさらに、有糸分裂誘発（種々のクラスの非遺伝毒性の肝癌誘発性ペルオキシソーム増殖物質により誘導される）を誘導するのに必要であると言われている。他の兆候と同様にこれは、L-FABPが肝細胞における細胞分裂を制御するのに関与していることを示唆すると言われている。Sorofらはさらに、遺伝毒性発癌物質（2-アセチルアミノフルオレン）のポリペプチド標的としてL-FABPを記載した (J.A. Bassuk, P.N. Tschlis, S. Sorof, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 84, 7547-7551)。しかし発癌物質で誘発した後の増殖中のラット肝細胞中のこのタンパク質の大幅な増加もまた記載されている。これは、正常なヒト前立腺細胞を対応する癌細胞と比較した時、L-FABPおよびI-FABPの著しいアップレギュレーション（5~9倍）を見いだしたDasらと一致する。これに対してA-FABPおよびE-FABPは、癌細胞中で顕著に（3~20倍）ダウンレギュレーションされていた。これらの著者は、FABPが乳癌や前立腺癌のマーカー候補および治療標的候補であると提唱しているが (US-A2002/0127619)、樹立された細胞株中または形質転換後の変化はしばしば顕著ではない。従ってこの方法では、腫瘍促進の早期マーカーを定義する目的を達成することはできない。

30

40

【 0 0 0 8 】

Celisと共同研究者 (J.E. Celis, M. Ostergaard, B. Basse, A. Celis, J.B. Lauridsen, G.P. Ratz, I. Andersen, B. Hein, H. Wolf, T.F. Orntoft, H.H. Rasmussen, Canc

50

er Research (1998) 56, 4782-4790) は、脂肪細胞FABP (A-FABP) が膀胱の扁平上皮細胞癌の進行状態を劇的に低下させることを2Dゲル電気泳動により証明することができた。膀胱癌発生の進行状態は統計的にA-FABPに有無に相関している。著者らは、A-FABPが扁平上皮細胞癌の進行の重要な成分であり、従って予知的価値を有すると結論している。

【0009】

脂肪酸結合タンパク質はまた、ペルオキシソーム増殖物質誘導性のプロテオームの変化の分析で注目された(これらの変化と受容体機構との協力がPPAR- (アルファ型のペルオキシソーム増殖物質活性化受容体) ノックアウトマウスでの比較研究により証明された) (Macdonald N., Chevalier S., Tonge R., Davison M. Rowlinson R., Young J., Rayner S. Roberts R., Arch. Toxicol (2001) 75, 415-424)。このタンパク質の増加はまたこの論文でも報告された。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的はまず、発癌性、特に腫瘍促進性を見つけることを可能にする物質または物質混合物を試験するための実行可能な方法を提供することである。

【0011】

この目的は本発明により、試験すべき物質または試験すべき物質混合物への生物またはその一部の接触が、少なくとも1つのL-FABPの発現を変化させるかどうかを測定することにより達成される。これは、エンドポイントについて明確に定義された作用を有する試験物質(例えば腫瘍促進物質)および長期試験でのその性状解析の助けを借りて、L-FABPが健常細胞中で十分な高濃度で存在する関連マーカーであり、物質による処理で変化するという発見に基づく。腫瘍促進物質への接触について発見されたL-FABPの挙動に基づいて、本発明の方法は、特に十分に高い統計的有意性を有し、従ってこのような作用をバックグラウンドノイズより上で検出することを可能にするという利点を有する。「バックグラウンドノイズ」とはこの関連で、その変化に対して因果関係が割り当てられない他のタンパク質の隣接する強度のシフトとして定義される。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、物質または物質混合物を試験する方法であって、

30

- a) 生物またはその一部が物質または物質混合物に接触される; および
 - b) 少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質(L-FABP)の発現が、その生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプルで測定される、
- ことを特徴とする方法に関する。

【0013】

該方法の工程a)では、生物またはその一部は、試験すべき物質または試験すべき物質混合物に接触される。この目的は、この方法の工程b)において、接触に関連するL-FABP発現の変化を検出、特に定量することである。

【0014】

本発明において、発現分析を少なくとも2回行うことが有利である。異なる時点での発現分析の繰り返しは、L-FABP発現の相対的变化を時間の関数として測定することを可能にする。このような時間依存性測定は、適当な統計的方法を使用して経時的に大きな変化を傾向として検出することを可能にし、従って一過性の減少(例えばL-FABP発現の初期の矛盾する変化)を認識することと適切に評価することを可能にする。

40

【0015】

従って好適な実施形態において本発明の方法は、

- a) 生物またはその一部を物質または物質混合物に接触させ; そして
 - b) 生物またはその一部から得られる少なくとも第1のサンプルおよび少なくとも第2のサンプルにおいて、少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質(L-FABP)の発現を測定する、
- ことを含んでなり、

50

ここで第1のサンプルは生物またはその一部から第1の接触時間後に採取され、第2のサンプルはその生物または部分から第2の接触時間後に採取され、かつ第1の接触時間は第2の接触時間とは異なることを特徴とする。

【0016】

本発明の方法の実施形態は、物質または物質混合物への接触時間中にサンプルを採取できる時、すなわちサンプルの採取が物質または物質混合物への接触を終了させることが無い場合に特に便利である。従ってこの実施形態はin vitro系に特に適している。

【0017】

さらに有利な実施形態において本発明の方法は、

- a1) 第1の生物またはその一部を物質または物質混合物に接触させ；
- b1) 第1の生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプル中の少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質(L-FABP)の発現を測定し；
- a2) 第2の生物またはその一部を物質または物質混合物に接触し；そして
- b2) 第2の生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプル中の肝脂肪酸結合タンパク質(L-FABP)の発現を測定する、ことを含んでなり、

ここで第1の生物またはその一部の接触時間は第2の生物またはその一部の接触時間とは異なることを特徴とする。

【0018】

本発明の方法の実施形態は、物質または物質混合物への接触がサンプルの採取により終了する時、特に便利である。これは特にin vivo系に適用され、すなわち例えば、物質または物質混合物への特定の接触時間後に動物が屠殺され、かつ発現を測定することを目的とする動物またはその一部を、肝脂肪酸結合タンパク質の発現のさらなる変化を可能にしない条件下に置く動物実験に適用される。

【0019】

a) 試験物質または試験物質混合物への接触

in vivoの接触が好適である。生物がこの目的で使用される場合、これは好ましくは動物、特に脊椎動物、好ましくは哺乳動物、特にげっ歯動物、例えばラットまたはマウスである。好適な実施形態において毒性試験で使用されるラットまたはマウス株は、例えばウイスターラットまたは好ましくはフィッシャー(Fischer) 344ラットである。後者は、動物から動物への細胞タンパク質パターンの変化が少ないと予測される近交系である。試験される物質または試験される物質混合物は、通常は標的化された方法で、特に経口的、例えば飼料とともにまたは胃管栄養法でまたは注射(例えば、腹腔内、静脈内、皮下、または皮内)により投与される。

【0020】

接触時間は実際変化してもよい。しかし第1に、接触により引き起こされる作用が測定できるように、最小の接触時間が本発明の方法には重要である。第2に、この方法を迅速に実施できるように、比較的短い接触時間が便利である。すなわちこの時間は数時間~数日間または数週間の範囲で変動する。しかし本発明ではまず24時間以上の最小の接触時間、特に少なくとも36時間、好適には少なくとも48時間であり、第2に、10、9、8、7、6、5または4日間、特に72、68、64、60、56、52、または48時間までの比較的短い接触時間が好適である。

【0021】

in vivo接触と比較的短い接触時間の本発明の好適な組合せは、特に以下の利点を有する：

- 比較的少量の物質を使用できる可能性；
- 方法を実施するための短い時間；
- 比較的少数の動物の使用。

【0022】

本発明の方法は通常、この方法でL-FABP発現の接触時間依存性変化を認識できるように、複数のアプローチで異なる接触時間を選択することからなる。試験される物質または試

10

20

30

40

50

験される物質混合物の用量についても同じことが言える。

【0023】

生物の一部が使用される場合、その可能な例は臓器、組織調製物もしくはその単離物、特に細胞含有画分である。これらはex vivoおよびin vitroアッセイで便利に調製することができる。従って物質または物質混合物への接触はインキュベーションに対応する。

【0024】

本発明の具体的な実施形態において、肝臓もしくは肝臓成分、例えば肝臓抽出物もしくは肝細胞および肝細胞培養物が使用される。

【0025】

接触またはインキュベーションの後に、処理される生物のいくつかの部分またはインキュベーション混合物もしくはインキュベート混合物の部分がサンプルとして、必要であれば適当な処理をして、分析的タンパク質測定用に提供される。

【0026】

b) 分析的タンパク質測定

本発明の発現分析は、タンパク質発現の測定、従って試験の時に細胞中に存在するタンパク質およびタンパク質成分の量についての情報を含む。これは本発明において重要である。翻訳制御、mRNA安定性、タンパク質安定性、およびタンパク質分解のために、mRNAの量と関連するタンパク質の量との間に厳密な相関は無いため、mRNA分析は直接この情報を提供しない。

【0027】

用語「肝脂肪酸結合タンパク質」（略してL-FABP）は、脂肪酸および他の疎水性リガンドの輸送に関与するタンパク質を意味する。その名前にふさわしく、これらのタンパク質は脊椎動物の肝臓中に存在する。

【0028】

系統発生的進化の差のために、この群のタンパク質にはいくつかの種依存性の不均一性がある。測定は生物に依存し、関連する生物で予測される具体的なL-FABPに向けられる。測定は特にラット、特にドブネズミ（*Rattus norvegicus*）のL-FABPに向けられる。

【0029】

種依存性変化以外に、各種について通常対立遺伝子の変化による異なるアミノ酸配列を有する多型性変種がある。さらにL-FABPの群はまた、同じ配列を有するが異なる翻訳後修飾（例えば特定のグリコシル化パターン）を有するタンパク質がある。

【0030】

本発明の好適な実施形態において発現分析は、配列番号1のアミノ酸配列を有するL-FABPに向けられる。

【0031】

本発明のL-FABP測定のためのさらに有用な使用法は、熟練研究者が見いだすことができるか、または上記刊行物に示されたアミノ酸配列および核酸配列から見つかる。さらに、L-FABPをコードする核酸配列について関連する遺伝子データベースに無数の記載があり、これに基づいて熟練者は対応するタンパク質を検出するための適切な手段を提供することができる。

【0032】

本発明の分析は、本方法の実質的に3つの工程に分類される：

- b1) 測定すべき発現産物の適切な提供；
- b2) 発現産物の定量；および該当する場合
- b3) 評価。

【0033】

本方法の工程b1)、b2)、およびb3)は記載された順序で行うことが有利である。L-FABP測定と一緒に別の試験、例えば別のタンパク質の測定を行う場合、これらの試験は別の方法、または本発明の好適な実施形態で、適切に設計された方法で少なくとも部分的には平行して、特に本方法の少なくとも工程b1)とb2)を平行して行うことができる。

10

20

30

40

50

【0034】

b1) 測定すべき発現産物（サンプル）の提供

原則的に生物またはその一部の任意のサンプルを分析することができる。臓器と組織（未変性、凍結、固定、解剖有り又は無し）および特にこれらの細胞含有画分、および上記のインキュベーション混合物またはその一部のような体のサンプルは、本発明のL-FABP測定に有利に使用することができる。従って本発明のこの部分はin vitro法である。

【0035】

本発明の好適な実施形態において肝臓および肝臓成分または単離物、特にその細胞含有画分はサンプルとして使用される。

【0036】

本発明に従って行われる発現分析について、必要であればサンプル中に存在する測定される細胞成分および特に発現産物は調製的前処理を受け、こうして本発明の方法に対してサンプルを便利な形で提供する。このような前処理は通常従来法に対応し、特に分析的タンパク質発現測定および特にプロテオミクス解析の要件に基づく。

【0037】

適当なサンプル調製の要件は通常厳密である。例えばタンパク質分解または他の修飾（例えば酸化）によるタンパク質組成のアーティファクトの変化は避けるべきである。

【0038】

サンプルが組織である場合、これは通常まずホモジナイズされる。次に普通細胞破砕が行われる。この目的に、サンプルは例えば剪断応力に接触されるか、または低張環境に入れられ、細胞は次に浸透圧により分解される。後者は、通常適当なプロテアーゼインヒビターを含有する従来法の溶解バッファーを用いて実現される。得られる溶解物は実際のタンパク質測定用に提供されるか、またはまず低温（例えば - 80 ）で保存される。

【0039】

複数の溶解物の互いの分析を比較できるように、各溶解物の総タンパク質含量を従来法により測定することができる。通常定量測定に適しているのは、比色アッセイ、例えばビュレットアッセイ、ローリー（Lowry）アッセイ、ピシンコニン酸アッセイ、ブラッドフォードアッセイ、およびさらに分光分析法または放射能標識によるタンパク質の測定である。

【0040】

総タンパク質のほぼ等量を以後の分析に供給するように、総タンパク質含量に基づいて適当なアリコート溶解物を選択することができる。

【0041】

b2) 発現産物の定量

原理的に、タンパク質分析特にプロテオミクス解析の領域から、タンパク質を定量するのに適していることが公知のすべての方法を使用することが可能である。例えば、必要であればクロマトグラフィー法または電気泳動分離法と組合せた免疫学的方法およびいくつかの分光分析法がある。発現されたタンパク質の特異的検出を確実にするために、免疫学的方法を使用することが有利である。通常このために必要とされるのは、測定すべきタンパク質を最大の特異性で認識する抗体である。

【0042】

適当なL-FABP認識抗体が開示されており、市販されている場合もある。例えばヒトL-FABPに対する抗体およびラットL-FABPに対する抗体がハイカルトバイオテクノロジー社（Hy Cult Biotechnology b.v.）から入手できる。これらはモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含み、これらのいくつかは他の種からのL-FABPと交差反応する。例えばビオチン化形態（カタログ番号HM2052）でも入手できるヒトL-FABPに対するモノクローナル抗体（クローンK5A6、カタログ番号HM2051）、ヒトL-FABPに対するポリクローナル抗体（カタログ番号HP9021）、およびヒト、ブタおよびマウスL-FABPと交差反応するラットL-FABPに対するポリクローナル抗体（カタログ番号HP8010）がある。ノボカストララボラトリーズ社（Novocastra Laboratories Ltd.）は、ヒトL-FABPに対するモノクローナル抗体（

10

20

30

40

50

これはまた、腎および小腸脂肪酸結合タンパク質とも反応する)を提供する。

【0043】

熟練した研究者は、L-FABPアミノ酸配列から出発して、このタンパク質に対する適当な抗体を産生することができる。この目的のために、免疫原として完全なタンパク質または誘導体、例えばその断片(ポリペプチド)を使用し、それ自体公知の方法を使用してポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生し、これに基づき、組換え法によりヒト化抗体およびその断片を産生することができる。

【0044】

例えば、本発明の少なくとも1つのL-FABPまたはその誘導体を用いて宿主を免疫し、免疫に应答して産生された宿主の抗体含有血清を単離することにより、適当な抗体を産生することができる。

10

【0045】

使用されるL-FABPがほとんどまたは全く免疫原性が無い場合、これを担体(好ましくはKLHのような担体タンパク質)に結合させることにより免疫原性を上昇させることができる。この目的の結合のための多くの可能性を熟練者は利用できる。例えばタンパク質もしくはタンパク質混合物を担体タンパク質もしくは種々の担体タンパク質の混合物と、水もしくは水性溶媒中でインキュベートすることにより、グルタルアルデヒドと反応させることが可能かつ便利である。反応は通常数時間以内で所望の結果を与える。反応パラメータの最適化は、熟練者の能力内である。

【0046】

抗原以外に免疫カクテルは通常補助物質、特に通常免疫に使用されるアジュバント、例えばフロイントアジュバントを含む。

20

【0047】

げっ歯動物またはウサギは特に適した宿主である。これらまたは他の適当な宿主は、注射(好ましくは皮下)により免疫カクテルを投与される。抗体力価は、例えば宿主IgGに対するヒツジ抗血清と標識オリゴマーとの競合によるイムノアッセイにより測定することができる。すなわち免疫の終わり頃、ある特定の宿主が抗体を得るのに適しているかどうかは、例えば4回の免疫を行うなら、3回目の免疫後に抗体力価を測定し、次に十分な抗体力価を有する動物から抗体を得ることができる。

【0048】

産生された抗体を得るためには、数週間または数ヶ月にわたって宿主から血液を採取することが好ましい。最後に宿主を放血させることができる。所望の抗体を含む血清は、得られた血液から公知の方法により得ることができる。こうして得られた完全な血清は、そこに存在する抗体画分、特にL-FABP認識抗体を濃縮するために、必要であればさらに熟練した方法で精製される。

30

【0049】

本発明の好適な実施形態において、血清中に免疫原として使用されるL-FABPを特異的に認識する少なくとも1つの抗体、その誘導体、または成分中に免疫原として使用される組成物中に存在する少なくとも1つのL-FABPもしくはその誘導体の選択がある。この関連で特異性は、特に関連する他の免疫原、特に最初に言及した別のFABPよりその免疫原に対する抗体のより高い結合親和性を意味する。モノクローナルL-FABP特異抗体もこうして得ることができる。しかしこの目的のためには、宿主から脾臓組織を取り、こうして得られた脾臓リンパ球から出発して、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを通常の方法で樹立することが好ましい。

40

【0050】

本発明で得られる抗体は、上記方法で得られる具体的な抗血清を含む。これらは完全な抗血清、すなわち細胞成分や凝固性成分を除去後宿主から得られる血液、または特に免疫グロブリン画分と好ましくはL-FABP認識免疫グロブリン画分が濃縮されたこの血清の画分でもよい。このタイプの画分は、抗体精製に関連して上記した方法により得ることができる。

50

【0051】

ポリクローナル抗血清は、特異性の異なる抗体、通常は異なるクラスおよびサブクラスの抗体を含み、通常すべてのL鎖イソタイプが存在し、多数のタンパク質エピトープが認識される。

【0052】

得られる抗体はまた、モノクローナル抗体、特にキメラおよびヒト化抗体、そしてこれらのL-FABP結合断片を含むことができる。

【0053】

次にこれらの抗体は定量的イムノアッセイおよび免疫プロットング法（例えばウェスタンプロットング法）で使用することができる。直接アッセイおよび間接アッセイの両方が適している。検出すべきタンパク質もしくはポリペプチドが抗原として抗体結合について標識抗原と競合する競合的イムノアッセイが特に言及される。抗原への特異抗体の結合が第2の（通常標識された）抗体を使用して検出されるサンドイッチイムノアッセイが好適である。これらのアッセイは、均一（すなわち固相や液相への分離が無い）かまたは不均一（すなわち、例えば結合標識物が非結合標識物から固相結合抗体により分離される）であるように設計することができる。標識および測定法 [例えばRIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）、FIA（蛍光イムノアッセイ）、LIA（発光イムノアッセイ）、TRFIA（時間分解FIA）、IMAC（免疫活性化アッセイ）、EMIT（酵素多重免疫試験）、TIA（濁度測定イムノアッセイ）] により、種々の不均一イムノアッセイおよび均一イムノアッセイフォーマットが特定のクラスに割り当てられる。

10

20

【0054】

さらにL-FABPを商業的に測定するための免疫学的測定法を得ることができる。例えばハイカルトバイオテクノロジー社（HyCult Biotechnology b.v.）は、サンドイッチ原理で作用する適切なELISAアッセイキットを供給する。簡単に説明するとサンプルと標準物質が、L-FABP認識抗体を被覆したマイクロタイタープレート中でインキュベートされる。インキュベート中L-FABPは、固相に結合した抗体により捕捉される。サンプル中に存在する非結合物質は洗浄により除去される。次にL-FABPに対する第2のビオチン化抗体が加えられる。トレーサー抗体が捕捉されたL-FABP（存在する場合）に結合する。過剰のトレーサーは洗浄により除去される。次にストレプトアビジン - ペルオキシダーゼコンジュゲートが加えられ、L-FABPに結合したビオチン化トレーサー抗体に特異的に反応する。過剰のストレプトアビジン - ペルオキシダーゼコンジュゲートは洗浄により除去される。次に基質（特にテトラメチルベンジジン（TMB））が加えられる。発色はサンプル中に存在するL-FABPの量に比例する。クエン酸を加えて酵素反応が停止され、分光光度計を使用して450nmの吸光度が測定される。吸光度を既知標準物質の対応する濃度にプロットして標準曲線が得られる。標準物質と平行して測定される未知濃度のサンプル中のL-FABP濃度を標準曲線から読みとることができる。

30

【0055】

免疫学的法以外に、L-FABPの定量的測定のために非免疫学的法、通常分光分析法を使用することもできる。

【0056】

しかしほとんどの分光分析法はL-FABPを確実に検出するものではないため、分光分析法によりL-FABPの特異的検出が可能になるように、通常は関連する分離法により溶解物中に存在する総タンパク質を分画する必要がある。

40

【0057】

クロマトグラフィー法および電気泳動法は分画に適している。適当なクロマトグラフィー法には、例えばアフィニティークロマトグラフィーがある。電気泳動法には、例えばゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動（変性および未変性条件下の両方）、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動などがある。

【0058】

本発明の方法の好適な実施形態においてタンパク質は2次元ゲル電気泳動により分離さ

50

れる。これは、高い分解能を与えかつ比較的迅速に実施できるため、プロテオミクス解析に特に適している。

【0059】

2次元電気泳動で行われる第1の工程は等電点電気泳動(1次元)であり、第2の工程はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(2次元)である。ある場合には一般的タンパク質やまれなタンパク質を互いにできるだけ分離するために、噴霧(sprayed)pH勾配または前分画が使用される。

【0060】

タンパク質はゲルマトリックス中での定量のために標識しなければならない。クマシーブルー染色およびより高感度の銀染色が一般的である。放射能標識タンパク質および免疫学的標識物の検出はより高感度であり、これらについては免疫学的方法についての上記説明を参照されたい。

10

【0061】

標識物により、染色タンパク質を定量するのに熟練者は種々の検出系を利用できる。2次元ゲルの場合は、これは例えばレーザーデンシトメータまたはスキャナーを用いて行われる。こうして絶対的にかつサンプル中に存在する別のタンパク質と比較して、サンプル中に存在するL-FABPの量を定量することが可能である。

【0062】

必要であればL-FABPに対応するスポットを同定することができる。例えば1つのスポットに対応する完全なタンパク質がゲルマトリックスから化学的に不活性な膜に移され、そこでさらにタンパク質の化学分析が行われる。あるいはゲルマトリックス中のタンパク質は、例えば酵素的に小さい断片に分解され、溶出され、次に断片を分析することができる。完全なタンパク質は、例えばアミノ酸配列分析を行うことにより、例えば質量スペクトル法(特にIR-MALDI質量スペクトル法)を使用して分析することができ、タンパク質の分子量が決定され、これを使用して同定される。タンパク質がまず小さい断片に分解される場合、これは通常酵素(例えばトリプシン、LysCエンドプロテアーゼ、およびAspNエンドプロテアーゼ)を用いて行われる。得られるペプチド断片のゲルマトリックスからの溶出は通常有機溶媒や酸を用いて可能である。質量スペクトル法(例えばMALDI質量スペクトルまたはESI(ナノスプレイ)質量スペクトル法)も同様に、適宜先行するペプチドのHPLC分離と組合せて、ペプチドを分析するのに適している。

20

30

【0063】

質量スペクトル法についてはSELDI法と呼ぶ方法がさらに言及される。これは、まず、必要であれば例えば適当な液体で洗浄することにより不要な物質を表面から除去し、適当な表面(例えばタンパク質に対する親和性を有する固相表面)に捕捉されたタンパク質混合物を調べ、次にMALDI-TOF(マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間)質量スペクトルにより測定することを含む。

【0064】

b3) 評価

上記測定法では、各試験サンプルにL-FABPの発現を特徴付ける値を割り当てることが可能であり、特に絶対的にまたは標準物質(内部または外から加えたもの)と比較してサンプル中のL-FABPの量を示す。

40

【0065】

本発明では、試験物質または試験物質混合物への接触によりL-FABP発現が変化するかどうかを確立することが特に重要である。これは、最初の投与および/または最初の接触について測定された発現を、試験物質または試験物質混合物で処理していないか、および/または1回目の投与とは異なる第2の投与中に試験物質または試験物質混合物に、または1回目とは異なる時間接触された対応する生物またはその一部からのサンプル中のL-FABPの発現と比較することが必要である。

【0066】

物質または物質混合物への接触の前と後に、または種々の接触時間および/または投与

50

後に本発明のL-FABP測定を行い、L-FABPの量を互いに比較することによりかかる比較が原理的に可能である。ある場合には、確立された試験系で、方法を実施することなくまたは実験をする必要無く、例えばデータベース中に蓄積された比較値を使用することも可能である。

【0067】

特定の試験系の評価のために、その値以上では発現の有意な変化がある具体的な値（限界値）を確立することが便利である。

【0068】

このような限界値は、試験されるサンプルの性質およびその獲得に依存する。すなわちあらかじめ試験物質または試験物質混合物に接触することなく本発明の方法をまず数回実施するための具体的なモデル系を実施し、L-FABP発現のための適切な平均を見つけることが便利である。次に、本発明の方法を使用して測定される性質を有することが知られている物質を使用して、および本発明の方法を使用してこれらの物質について見いだされたL-FABP値を用いて、試験物質または試験物質混合物を評価するための便利な限界を設定することができる。

10

【0069】

本発明の方法は特に、試験物質の毒性、特に発癌性または特に腫瘍促進性を評価することを目的とする。特に評価される性質には、受容体仲介性、酵素誘導性、細胞毒性/有糸分裂誘発性、酸化ストレス促進性および/またはミトコンドリアに毒性を含む。

【0070】

この関連で、特に上記の好適な条件（*in vivo*接触；比較的短い接触時間）下での試験物質または試験物質混合物への接触は、試験物質または試験物質混合物が毒性、すなわち発癌性であり特に腫瘍促進性である時、L-FABP発現を大きく低下させるため、およびそのような低下は、従来の直接的方法（例えば免疫学的方法）で有意な低下が検出できるため、本発明の方法は有利である。

20

【0071】

従って本発明はさらに、上記目的のための本発明の方法の使用に関する。これは特に、物質または物質混合物への接触が変化を引き起こし、特にL-FABP発現の低下を引き起こすかどうかの分析的知見に関連する。これが事実なら、物質または物質混合物は毒性、すなわち発癌性および特に腫瘍促進性を有する。

30

【0072】

本発明はまた、本発明の方法を実施するための分析キットに関する。これらには通常
i) L-FABP発現を測定するための少なくとも1つの手段、特に特異抗体；および適宜
ii) 本発明の方法を実施するためのさらなる通常的手段、とを含む。

【0073】

本発明のキットのさらなる実施形態は、方法自体についての説明から明らかである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0074】

実施例

1. 試験物質への動物の接触

40

フィッシャー（Fischer）344ラットを用いて動物実験を行う。このラット系統は、毒理学で使用される他の系統（例えばウイスター）と比較して動物から動物への細胞タンパク質パターンの変化が少ないと予測される近交系である。各用量レベルの各実験で1つの時点について5匹の動物（メス；フェノバルビタール群中にさらに同じ数のオス）が使用される。接触は4または17時間および3または10日間行われる。5匹の動物の対照群が各時点で含まれ、試験物質溶液のためのビヒクル（コーン油または2回蒸留水）または物質を含まない飼料のいずれかを投与される。各時点で低用量、中用量、および高用量が使用される。すなわち各実験で80匹の動物が使用される。物質を胃管栄養法により2回の短期間（1回の投与は期間ウィンドウの開始時）投与する。3日間と10日間の接触中、動物は飼料中の試験物質を投与される。高度に生体蓄積性のアルファヘキサクロロシクロヘキサンへの

50

接触は例外である。この場合3日間および10日間接触される動物は胃管栄養法により最初の用量を投与され、次に飼料中で初期用量の10%の維持用量が投与される。接触時間の最後に動物を気体二酸化炭素で麻酔し、断頭して放血させる。できるだけ早く肝臓を取り出し、セグメントに分割し、分析するまで液体窒素中でショック凍結する。同じ方法でさらに分割することなく腎臓を対照臓器として保存するが、この実施例ではさらに試験されない。

【0075】

2. ラットサンプル破碎

細胞破碎のために冷凍保存した肝臓セグメントをまず液体窒素でさらに冷却する。次にこれを金属乳棒で粉碎する。各約47~52mgのアリコートに2mlのエッペンドルフチューブに分注し、-80℃で保存する。これは、各サンプル破碎物のアリコートを生成する時の肝臓断片の部分的融解を避ける。

【0076】

実際のサンプル破碎のために、同じサンプルの2つのアリコートを取り、溶解バッファ（42.04gの尿素、15.22gのチオ尿素、4.0gのCHAPS、1.0gのDTT、2mlのアンホライン（pH3.5~10）、48mgのペファブロックSC、48mgのEDTA、50μgのロイペクチン、70μgのペプスタチン、100μgのアプロチニン；WFIで100mlに）と混合する。両方のサンプルについて、50mgの肝臓細胞を1000μlのバッファと混合する。直ちに同量のガラスビーズ（ガラスビーズNo.2；ブッデバーグ（Buddeberg）から、注文番号22.222.0002）（これは各初期重量のラット肝臓+溶解バッファの重量に対応する）をこの混合物に加える。次にサンプルを振動ミル（30分、全力）で冷室で+4℃でホモジナイズする。振動ミルのサンプルカップを-20℃に冷却後、サンプルを入れる。

【0077】

振動ミル中でホモジナイズ後プロテオミクス解析測定のために60分のインキュベーション期間と免疫学的測定のための30分のインキュベーション期間がある。インキュベーション中に時々エッペンドルフチューブを転倒させて混合を繰り返す。

【0078】

この時間が経過後、サンプルをヘラエウスバイオフィュージ（Heraeus Biofuge）28RS遠心分離機のHFA22.2ローター中で22000rpmで20℃で90分遠心分離する。次に2つの上清を注意深く取り、1.5mlのエッペンドルフチューブ中で混合する。残渣を捨てる。次に上清を再度HFA28.1ローター中で28000rpm（45000×g）かつ20℃で60分遠心分離する。次に上清を注意深く新しい1.5mlのエッペンドルフチューブに移し、最後に80μlアリコートで-80℃で最後に保存する。

【0079】

3. タンパク質測定

3.1. ローリー（Lowry）法

電気泳動の前に、個々のサンプルについてローリー法によるタンパク質測定を行い、後に各2Dゲルに同量のタンパク質がのせられるようにする。このタンパク質アッセイキット（シグマ（Sigma）タンパク質アッセイキット、注文番号：P5656）はラット肝臓抽出物についてのタンパク質測定のために使用される。これは、タンパク質含量の実際の測定の前に、すべてのタンパク質をTCA沈殿により沈殿させることを含む。例えば尿素、DTTまたはCHAPSは沈殿で上清とともに除去されるため、これらによる測定法への妨害の可能性がこうして避けられる。

【0080】

適当な名前（サンプル、5つの標準物質、およびブランク）を書いて1.5mlのエッペンドルフチューブを調製する。肝臓抽出物から20μlを取り、980μlの脱イオン水と混合し、ボルテクサー（vortexer）でホモジナイズする。標準物質シリーズについては、まずタンパク質キットの標準物質ビン（BSA）の内容物を必要量の脱イオン水で溶解する。すべてのさらなる溶液を、シグマ（Sigma）タンパク質アッセイキットについての添付文書に記載されたように調製する。次にBSA標準物質シリーズを表1と同様に調製する：

10

20

30

40

50

【表1】

表1:BSA 標準物質シリーズの混合物

タンパク質標準溶液 (μl)	脱イオン水(μl)	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
125	875	50
250	750	100
500	500	200
750	250	300
1000	0	400

10

【0081】

適当なBSAストック溶液を水に加える。水をボルテクサーを使用して完全に混合する。1000 μl の脱イオン水を1.5mlのエッペンドルフチューブにブランクとしてピペットで入れる。

【0082】

100 μl のDOC(デオキシコール酸)をそれぞれ異なるエッペンドルフチューブ(サンプル、標準物質、およびブランク)に加え、ホモジナイズし、室温で10分間インキュベートする。次に100 μl のTCA(トリクロロ酢酸)を加え、完全に混合する。サンプル容器を45000 $\times\text{g}$ で10分間遠心分離する。遠心分離からの上清を注意深くデカントして捨てる。残渣をそれぞれ1mlのローリー試薬溶液に溶解する。次にこれらの溶液を、分光分析測定のためにすでに調製されたマクロキュベット(グレイナー(Greiner)のマクロキュベット、注文番号614101)に移す。次にエッペンドルフチューブを1mlの脱イオン水でリンスする。攪拌棒を使用して攪拌しながらリンス溶液をキュベット中のローリー溶液に加える。サンプル溶液を室温で20分間インキュベートする。500 μl のフォリン・チオカルトール(PFolin & Ciocalteu)フェノール試薬作業溶液を各キュベットに入れる。攪拌棒を使用して完全に混合する。さらに30分間放置後、サンプルをUV/VIS分光光度計で750nmでブランクサンプルに対して測定する。標準物質サンプルの吸光度を標準プロット中の各BSA濃度に対してプロットする。ラット肝臓サンプル中のタンパク質濃度は、標準プロットからわかる。

20

30

【0083】

3.2. ポポフ(Popov)法

免疫学的測定のために個々の抽出物のタンパク質含量をポポフ(Popov)法により測定した(N. Popov, M. Schmitt, S. Schulzeck, H. Matthies, Acta biol. med. germ. 34, pp. 1441-1446 (1975))。

【0084】

4. プロテオミクス解析

4.1. 等電点電気泳動(IEF) - 1次元

4.1.1. 再水和

IEFストリップ(イモビリンドライストリップ(Immobiline DryStrip)、pH4~7、24cm、アマシャムファルマシア(Amersham Pharmacia)から、注文番号17-6002-46)の再水和のために、新鮮な再水和バッファー[8M(14.41g)尿素、2M(4.57g)チオ尿素、20mM(92.52mg)ジチオスレート(DTT)、1%(300mg)CHAPS、156 μl のIPGバッファー、pH3~10(アマシャムファルマシア(Amersham Pharmacia)から、注文番号17-6000-87)、WF1で30ml]を作成する。次に100 μg に対応するラット肝臓溶解物の容量を取り、1.5mlのエッペンドルフチューブに入れ、再水和バッファーを加えて総量を600 μl に希釈する。ボルテクサーを用いて溶液を完全に混合する。次に溶液をイモビリンドライストリップ再膨潤トレイ(Immobiline DryStrip Reswelling Tray)の細長いスロットの1つに入れる。使用前に、刻み付ローラーでトレイを水平にする。次にIEFストリップから保護フィルムをはずし、ストリップをゲル側を下に向けて、再水和バッファー/サンプル混合物を有する

40

50

スロットに入れる。ゲルストリップを入れた後、チャンバーを閉じてさらに密封するため接着テープで密封する。再水和は室温で24時間で起きる。

【0085】

4.1.2. 等電点電気泳動

24時間後、チャンバーを開き、最初のゲルストリップを取り出し、WFIで湿らせたろ紙（ワットマン（Whatman）ろ紙No.3、注文番号1003-917）上に押し当てる。この操作をすべてのストリップについて同様に行う。IEFストリップをゲル側を上に向けて、ファルマシアマルチフォア（Pharmacia Multiphor）チャンバー上のイモビリンドライストリップアライナー（Immobiline DryStrip Aligner）に入れる。電極ストリップをWFIで湿らせる。紙ワイプに押し当てて過剰の水を除去する。電極ストリップをすべてのゲルストリップの陽極側と陰極側の両方の上に置く。通電する前に電極ストリップを正しい長さにする。次に電極を正しく置き、80mlのカバー液（ドライストリップカバー液（DryStrip Cover Fluid）、アマシャムファルマシア（Amersham Pharmacia）から、注文番号17-1335-01）の層でカバーし、接続し、チャンバーを閉じる。表2に記載したパラメータを用いて等電点電気泳動を行う。

10

【表2】

表2: マルチフォアチャンバー中の等電点電気泳動のパラメータ

電圧 (V)	電流強度 (mA)	電力 (W)	モード	電圧-時間 (Vh)
500	1	5	勾配	500
500	1	5	勾配	2500
3500	1	5	勾配	10.000
3500	1	5	勾配	45.000

20

【0086】

翌朝、約25~30kVh後、電極ストリップを交換する。このために電圧部分は休止モードにし、チャンバーを開く。電極ブリッジを取り出し、古い電極ストリップを注意深く取り出す。次にWFIで湿らせた新しい電極ストリップを挿入する。電極ブリッジを戻し、チャンバーを閉じ、電圧部分を再度ラン（RUN）モードに設定する。実験が完了後、電圧部分のスイッチを切り、チャンバーを平き、電極ブリッジと電極ストリップを注意深く取り出す。次にゲルストリップをWFIで湿らせたろ紙上に押し当てて、付着しているカバー液を除去する。次に、ゲルストリップを2次元のためにすぐ使用しない場合は、DIN-A-4プラスチックジャケットにホッチキスで留めて、-80℃で保存する。

30

【0087】

4.2. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）- 2次元

4.2.1. エタン（Ettan）DALT-IIチャンバーの調製

最初にランニングチャンバーに7.5リットルのWFIを充填し、チャンバーの制御装置のスイッチを入れる。循環ポンプを作動させ、陰極バッファー濃縮液（75ml）を入れる。SDSゲル（エタンダルト（Ettan DALT）IIゲル（12.5%）：アマシャムファルマシア（Amersham Pharmacia）から、注文番号17-6002-36、エタンダルト（Ettan DALT）IIバッファーキット、アマシャムファルマシア（Amersham Pharmacia）から、注文番号17-6002-50）を2mlのゲルバッファーとともにゲルフレーム（ゲル側をガラスプレートに向ける）に入れ、過剰のゲルバッファーを市販のウォールペーパーローラーで除去する。フレームを閉じた後、過剰のバッファーの残りをフレームを傾けて除去する。次にゲルの左端と右端のチャンネルを85℃に溶融したアガロースで閉じる。次にフレームの下端をWFIで湿潤させ、エタンダルト（Ettan DALT）チャンバーに入れる。次にゲルに、1:10希釈した陽極バッファー濃縮液でマークまでカバーをする。

40

【0088】

4.2.2. ゲルストリップの平衡化

50

ストリップをゲル側を上にして平衡化トレイに入れ、第1工程で、4mlのDTT平衡化バッファ [4mlの平衡化ストックバッファ (6M (36g) 尿素、30% (30g) グリセロール、2% (2g) SDS、pH8.8の3.3mlトリス - 塩酸バッファ (1.5M (18.2g) トリス塩酸、0.4% (0.4g) SDS、pH8.8およびWFIで100ml)、WFIで100ml) + 20 μ lのプロモフェノールブルー溶液 (10mlのトリス塩酸バッファ、pH8.8中30mgのプロモフェノールブルー) + 200 μ l DTT + 1mlのWFI)] をそれぞれに加える。次にトレイを実験室シェーカーで15分間水平に攪拌する。次にバッファを注意深くデカントして捨てる。4mlのヨードアセトアミド平衡化バッファ (4mlの平衡化ストックバッファ + 20 μ lのプロモフェノールブルー溶液 (平衡化バッファを参照) + 260mM (192mgヨードアセトアミド)) で水平振盪を15分間繰り返す。バッファを注意深く流し出す。これで平衡化されたゲルストリップから、WFIで湿らせたろ紙上で過剰の平衡化バッファを除去する。

10

【 0 0 8 9 】

4.2.3. 電気泳動実験

次に支持体シート側をガラスプレートに向けて、ゲルフレームのガラスプレートとダルト (DALT) ゲルの支持体シートとの間の空間に平衡化ゲルストリップを注意深く入れて、バッファ中に下げる。ゲルストリップを薄い蛍光ルーラーを用いて配置させ、静かにダルト (DALT) ゲルに押しつける。こうして気泡が除去される。次にチャンバーを閉じ、表3のパラメータを用いて実験を開始する。

【表3】

表3

20

ステージ	ポンプ	ゲル当たりの電力(W)	温度(°C)	時間(分)	備考
1	オート	4	25	75	一定電力
2	オート	14	25	360	一定電力

【 0 0 9 0 】

実験が完了後、すなわちプロモフェノールブルー前線がゲルの下端に到達後、電圧のスイッチを切り、チャンバーを開く。ゲルフレームからゲルを取り出し、固定液 (50% 脱イオン水、40% メタノール、および10% 氷酢酸) とともに少なくとも2時間 (通常一晩) 振盪する。

30

【 0 0 9 1 】

4.3. ゲルの銀染色

ゲルの銀染色は表4に記載の個々の工程に基づいて行う。

【 0 0 9 2 】

4.3.1. 自動染色機

染色を迅速に行い再現性を上げるために、表4に記載したプロトコールを自動染色機で行う。

【表 4】

表 4：2D PAGE 後のタンパク質の銀染色

工程	溶液	インキュベーション時間
固定	40%メタノール 10%酢酸 50%脱イオン水	> 1時間
洗浄	70%脱イオン水 30%エタノール	20分
洗浄	70%脱イオン水 30%エタノール	20分
洗浄	70%脱イオン水 30%エタノール	20分
インキュベーション	70%脱イオン水 30%エタノール	1分
洗浄	チオ硫酸：0.02%	1分
染色	AgNO ₃ ：0.2%	20分
洗浄	脱イオン水	20秒
洗浄	脱イオン水	20秒
発色	Na ₂ CO ₃ ：3% ホルムアルデヒド：0.05% チオ硫酸：0.0004%	3～5分
洗浄	脱イオン水	1分
停止	EDTA：2%	5分
洗浄	脱イオン水	10分
保存	グリセロール：2%	>30分

10

20

30

40

50

【0093】

図1は、分析したpH範囲4～7のラット肝臓の典型的な銀染色2Dゲルを示す。

【0094】

4.4. 2Dゲルの評価：スポット検出、定量、マッチング、マスターゲル

12ピットのグレイスケールスキャナー（アグファアーカス（Agfa Arcus）II、1インチ当たり300ライン）を用いてゲルをデジタル化した後、これらを画像解析する。このためにゲネバイオ（Genebio）のメラニー（Melanie）3ソフトウェアパッケージを使用した。まずすべてのスポットを自動的に検出した。ゲル当たり平均3000を超えるタンパク質があるため、高タンパク質濃度の領域では複雑な手動的再編集が必要である。スポットは検出後自動的に定量される。

【0095】

次にゲルのマッチングを行う。これは、実験で検出されたすべてのタンパク質を含む合成マスターゲルを作成し、各タンパク質について共通の識別番号（マスターID）を作成することを含む。この関連でまた、すべての市販のソフトウェアパッケージは不完全にしか作動しない。ゲル中に発生するひずみのため、マッチングは用手法でチェックし、必要であれば改善する。

【0096】

この第1の実験（フェノバルビタール、メス）では、メラニー（Melanie）3は各時間 - 用量範囲でサブマスターゲルを生成する。次にすべてのサブマスターゲルからマスターゲルを作成する。しかしここからあまりにも多いミスマッチ数が出現する。ミスマッチの数はユニークなレスポンダーの数に対応するため、1つの処理群にのみ見つかるタンパク質を意味する。統計的観点から、かかる処理の対比は実験誤差を小さく見積もるためあまり好ましくない。このため、最初この実験は評価に含まれなかった。

【0097】

次の群（フェノバルビタール、オス；アルファヘキサクロロシクロヘキサン、メス；エチニルエストラジオール、メス）の評価では、異なる操作が選択される：各場合に中間の時間/用量範囲から2つのゲルから各物質についてマスターゲルが生成される。さらに出現するスポットが追加される。

【0098】

「スーパーマスターゲル」を作成するために、すべてのマスターゲルをエチニルエストラジオールのマスターゲル上で一致させる。最後の表は、個々のマスターIDに対応するスーパーマスターIDと一致させる。

【0099】

4.5. 統計

データの統計解析の目的は、処理の対比の矛盾の無い評価である。このためにまず、基礎データ計画を詳細に吟味する必要がある。3つのアッセイPHEN_M、ETHI_F、HEXA_F（それぞれフェノバルビタール/オス、エチニルエストラジオール/メス、およびアルファヘキサクロロシクロヘキサン/メスアッセイの略）のそれぞれは、用量（D）と時間（T）の因子の2つの4*2完全要因実験計画に基づく。i*j要因計画はこの場合、最初の因子がiレベルで変化し、第2の因子がjレベルで変化する実験計画を意味する。あるいはi*j要因実験計画は、iレベルの第1の次元とjレベルの第2の次元との2次元データマトリックスと見なすことができる（例えば表5を比較されたい）。2つの因子である用量と時間のそれぞれは4レベルD = {D₁, D₂, D₃, D₄}または2レベルT = {T₁, T₂}で変化し、すべての3つのアッセイの時間レベルは「4h」、「17h」、「3d」、および「10d」であり、用量は3つのアッセイ間で異なる。3つのアッセイの処理法を表5に要約する。

【表5】

表5:3つのアッセイPHEN_M、ETHI_F、HEXA_Fの処理法の要約

	PHEN_F	ETHI_F	HEXA_F	単位
4時間	0 10 50 100	0 0.1 1 10	0 10 50 200	mg/kg
17時間	0 10 50 100	0 0.1 1 10	0 10 50 200	mg/kg
3日	0 100 500 1000	0 1 10 100	0 10 50 200	ppm*
10日	0 100 500 1000	0 1 10 100	0 10 50 200	ppm*

*ppm：飼料中の百万分率：変換：0.1*ppm = mg/kg体重

【0100】

両方の計画とも4x2高用量/短時間計画と4x2低用量/長時間計画と見なすことができ、これはこれらの2つのサブ計画（以後ラン1（RUN1）とラン2（RUN2）と呼ぶ）を別々に評価するのに統計的かつ生物学的に実際的である。

【0101】

従って全体に各アッセイで16の処理群があり、各処理群で5つの独立の繰り返しがあり、すなわち各アッセイは80ゲルで示される。しかし失われる値のために、すべての3つのアッセイで80ゲルより少なくなる。これらのゲルのそれぞれはk個の異なるタンパク質を含み、これらは1回目の繰り返しでi個の異なる時間にj個の異なる用量で測定され、すなわちデータは記載の積分スポット強度 Y_{kij} からなる。

【0102】

スポット強度 Y_{kij} の予備試験的検査は、D=0の対照群の平均スポット強度が不均一で

10

20

30

40

50

あり、このためアッセイのすべての80ゲルがさらなる処理前は、

$$Y'_{kijl} = Y_{kijl} - Y_{.ijl}$$

(式中、 $Y_{.ijl}$ は80の個々のゲルの平均スポット強度を示す)の共通の平均を中心としていることを証明した。この中心化は、作用構造に実質的に影響を与えることなくゲル間の過剰染色および過小染色の作用を自然に排除する。

【0103】

こうして処理されるデータは、処理の対比を有意タンパク質について評価するために、分散分析(ANalysis OF VArianceのANOVA)法を使用してさらに試験される。

【0104】

この目的のために、応答 Y'_{kijl} は

$$Y'_{kijl} = \mu_k + \alpha_{ki} + \beta_{kj} + \gamma_{kij} + \epsilon_{kijl} \quad (1.0)$$

に従ってANOVAにより分解される。ここで μ_k はすべての処理にわたるk番目のタンパク質の全体の平均であり、 α_{ki} と β_{kj} はi番目の用量レベルの寄与であり、 γ_{kij} は応答 Y'_{kijl} への相乗作用的寄与である。 ϵ_{kijl} 項は誤差であり、これは一定の分散 σ_k^2 を有する正規分布を有すると仮定され、すなわち $\epsilon_{kijl} \sim N(0, \sigma_k^2)$ 。

【0105】

しかし分散分析によるデータの初期予備試験は、単純なANOVA法は入手できるデータにあまり適していないことを示す。これらの困難さを例示するために、図2において2つのタンパク質の強度の対比は代表的としてプロットされる。タンパク質の対数積分スポット強度IDNR = 1168とIDNR = 1624は、16の処理群にわたって平均の標準的誤差と実験的分散の尺度とともにプロットされる。

【0106】

多くのゼロレスポンダーは図2で明らかであり、ANOVAにおいて誤差分散の極端な膨張に至り、従って処理の効果を隠してしまう。これらのゼロレスポンダーは一致するプロセスのアーティファクトと見なされ、すなわちこれらの場合のタンパク質スポットは個々のゲルにおいて mismatch であり、これはおそらくひずみ作用のためであろう。

【0107】

極端な「異常値(outlier)」の存在下でデータを適切に評価することを可能にするために、正規分布の仮定を棄却し、分布によらない方法または非パラメトリック法の群を使用することが必要である。このために、近年分布によらない要因分析計画において大きな進歩があり有用である。k個の因子とnk個のレベルを有する完全要因実験計画において、すべての組合せ可能な要因レベル組合せ、すなわち $(n_k)^k$ 組合せが行われる。これらの計画は、多項作用が $(n_k - 1)$ のオーダーまで確定され、特に交互作用(相乗作用)を確定することを可能にする(例えば、Brunner, E.; Puri, M.L. 実験の計画と解析におけるノンパラメトリック法、Handbook of Statistics 13(1996) 631-703を参照)。この方法の核心は、処理と繰り返しにわたる元々のスケール Y'_{kijl} のタンパク質(k)による順位変換であり、すなわち

$$Y'_{kijl} \rightarrow R'_{kijl} \\ R(ijl)$$

ここで、 $R(ijl)$ はクラス i, j, l にわたる順位生成を示す。

【0108】

従ってノンパラメトリックANOVAの問題は同様に

$$R'_{kijl} = \mu_k + \alpha_{ki} + \beta_{kj} + \gamma_{kij} + \epsilon_{kijl} \quad (2.0)$$

と記載され、ここで分散はクラス k, i, j にわたって非均一であり、すなわち

$$\epsilon_{kijl} \sim N(0, \sigma_{kij}^2)$$

【0109】

混合モデル(式2.0)のフリーパラメータは最大確率法により決定することができ、帰無仮説 $H_0: (\alpha_{ki} = 0, \beta_{kj} = 0, \gamma_{kij} = 0)$ が対立仮説 $H_1: (\alpha_{ki} \neq 0 \text{ または } \beta_{kj} \neq 0 \text{ または } \gamma_{kij} \neq 0)$ に対して検定される。

【0110】

10

20

30

40

50

タンパク質スポットの具体的な数に依存して、記載の方法は非常に大きな数の個々の検定になり、その検定の各々は1%有意水準 α で評価されている。全体のアッセイの第1種の誤差をチェックするために、これらの個々の有意水準を調整することが必要である。

【0111】

この目的に、ホッホバーク - ベンジャミニ (Hochberg-Benjamini) 偽発見率法 (Benjamini, Y. と Hochberg, Y. 偽発見率を制御: 多重検定の実際的かつ強力なアプローチ, *Journal of the Royal Statistical Society B*, 57 (1995) 289-300) が使用され、調整された検定レベル1%が3つのアッセイの基礎として使用される。

【0112】

4.6. タンパク質同定

目的のタンパク質は、それぞれ独立のクマシー染色調製2Dゲルから3回同定される。2匹のメスと1匹のオスラットの肝臓をこの目的に使用した。対応するタンパク質スポットを切り出し、ゲル中でトリプシンを用いて酵素切断する。生じるペプチドを次にナノ-LC-MS/MSにより分析する。

【0113】

5. ウェスタンブロットングによる免疫学的測定

ピペット操作性を改善するために、ラット肝臓抽出物をまずSDSサンプルバッファーと1:10で混合し、ボルテクサーでホモジナイズし、95℃で10分間煮沸した。次に再度SDSサンプルバッファーで最終タンパク質濃度を0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈した。4~12%のノベックス (Novex) ビス/トリスゲルを各場合にレーン当たり20 μl (サンプル、対照、マーカーまたはバッファー) とともに流し (ゲルランニング条件: MOPSバッファー; $I = 100\text{mA}$, $P = 50\text{W}$, t は約90分)、プロットした (プロットング条件: 0.2 μm のPVDF膜、インビトロゲン (Invitrogen) より; $U = 200\text{V}$, $I = 102\text{mA}$, $t = 75\text{分}$)。

【0114】

検出はロシュディアグノスティクス (Roche Diagnostics) のBM化学発光ウェスタンブロットングキット (マウス/ウサギ) の方法と同様に行う。抗FABP抗体 (アブカム社 (abcam Ltd.)、注文番号ab7847-500、ウサギからのラット肝臓、ポリクローナル) を1:500希釈し、抗ラットウサギ抗体を40mU/mlに希釈した。

【0115】

シグナルを増幅するために、アマシャムバイオサイエンス (Amersham Biosciences) からのECLプラスウェスタンブロットング検出システムも使用した。光子計測カメラを使用して化学発光を測定した。積分時間は2.5~5分であった。

【0116】

6. 結果

6.1. プロテオミクス解析

全部で12の非遺伝毒性腫瘍促進物質に接触したメスラット (12) とオスラット (1) の群のうち4群 (すなわちエチニルエストラジオール、アルファヘキサクロロシクロヘキサン、およびフェノバルビタールで処理したメスとフェノバルビタールで同様に処理したオス) をプロテオミクス解析で調べた。

【0117】

2D電気泳動の再現性をスクアタープロットを使用してチェックした。これは、互いにプロットした各一致したタンパク質についての2つのゲルからのメラニー (Melanie) 3を使用して確認したタンパク質の量を含む。図3は、そのようなスクアタープロットを例として示す。時間/用量群からの各2つのゲル (2つの異なる動物に対応する) について、タンパク質の積分量の相関は通常96%より大きい。残りの差は、ゲル対ゲル変動と個体差の合計である。この高い再現性は、各肝臓について1つのゲルのみで試験することを可能にする。こうして対象間の変動についての重要な統計的情報は失われたため、時間/用量群から数個の肝臓をプールする必要が無い。しかしプールすることは、2Dゲルの数を実質的に少なくする利点を有する。

【0118】

10

20

30

40

50

スポット検出を用いる画像解析、積分、およびマッチングの後に、メラニー (Melanie) 3を使用して各物質群について合成マスターゲルを作成する。最初に使用したマッチング法 (フェノバルビタール、メス) は、生じる誤差が大きすぎるため、条件付きでのみ使用することができる。すべてのミスマッチはゲル中に追加のスポットを生成する。各単一のゲル上に存在する約3000個のスポットの代わりに、マスターゲルは9317スポットを示す。

【 0 1 1 9 】

より簡単で複雑ではない第2のマッチング変法は、3つの残りの群についてフェノバルビタール (オス) で3306個のタンパク質、およびメスについてアルファヘキサクロロシクロヘキサンで4277個のタンパク質、そしてエチニルエストラジオールで4161個のタンパク質を示すマスターゲルを生成する (表6を参照)。図7に示す合成エチニルエストラジオールマスターゲルを、スーパーマスターゲルの基礎として使用する。

10

【 0 1 2 0 】

次に3つのマスターゲルからテクスタイル (textile) を作成し、最初のカラムにマスタータンパク質IDを、群からの各ゲルのタンパク質の個体量の数値積分値を残りの80カラムに含む。追加の表は、個体マスターIDを対応するスーパーマスターIDと一致させる。

【 0 1 2 1 】

3つのデータセットをセクション8に記載した方法を使用してあらかじめ処理し、処理の対比を統計的有意性について評価した。表6は、3つのアッセイが基礎としているタンパク質の数と統計的検定で見つかる有意な対比の数の調査を与える。この関連で、短時間/高用量 (ラン1) と長時間/低用量 (ラン2) 処理法についてデータを別々に使用した。

20

【 0 1 2 2 】

表6のラン1とラン2の比較から、処理法2 (低用量を長時間) がより高い効果/ノイズ比を有し、従って生物学的にはより有効であることが直接明らかである。これらの条件下ではレベルの上昇の種々の効果 (特に初期の高い「大量」投与により引き起こされる) がより広い摂取分布に取って代わられるため、これは予想外ではなく、従って急性の毒性範囲に進むピーク作用が避けられる。

【 表 6 】

表 6: 総数とホッホバーガーベンジャミニ (Hochberg-Benjamini) 調整した 1% 有意水準で有意と評価された処理の対比の数

30

アッセイ	タンパク質の数 数	N _{有意}	
		ラン 1	ラン 2
PHEN_M	3306	9	407
ETHI_F	4161	92	112
HEXA_F	4277	22	38

【 0 1 2 3 】

図4は、3つのアッセイの共通部分頻度の模式図である。これは、ラン1のすべての共通部分が空であること、すなわちあるアッセイで有意として評価されたタンパク質はいずれも補足的アッセイでは見つからず、逆も真であることを示す。

40

【 0 1 2 4 】

これに対してラン2の共通部分頻度は、2つの共通部分または3つの共通部分でも空ではなく、3つの共通部分は特に注目値する。これはさらに調べると、この共通部分で同定されるタンパク質 [すなわちL-FABP (PHEN_M_ID = 3368、ETHI_F_ID = 4302、HEXA_F_ID = 4425)] が10d後に処理の影響で消滅され、この作用は一貫してすべての3つのアッセイで観察されることが証明されるためである。図5は、すべての16の処理にわたって3つのアッセイの平均処理の対比のプロットであり、10の数乗のタンパク質の抑制を強く証明する。

【 0 1 2 5 】

タンパク質L-FABP (ETHI_F = 4302) は、アッセイの対になった相関係数により証明され

50

るように処理の影響の最も大きな一致を示す。このタンパク質では、処理の平均影響は実質的にPHEN_MとHEXA_Fアッセイと一致し、一方PHEN_M、ETHI_F、HEXA_F対の低い有意な正の相関がある。

【0126】

L-FABPタンパク質ETHI_F_ID 4302とETHI_F_ID 4316は、3つの異なる調製2Dゲルで同定される。このために2匹のメスラットと1匹のオスラットの肝臓が使用される。タンパク質スポットを切り出し、ゲル中でトリプシンを用いて酵素切断し、ナノ-LC-MS/MSにより分析する。

【0127】

すべての6つのタンパク質が、これらのペプチド質量と内部配列タグに基づき肝脂肪酸結合タンパク質として同定された(L-FABP、スイスプロット(SWISS-Prot)-ID P02692)。

10

【0128】

6.2. ウェスタンブロッティング

物質フェノバルビタール、エチニルエストラジオールおよびアルファヘキサクロロシクロヘキサンについてプロテオミクス解析の結果をウェスタンブロッティングにより確認することができた(図7と8)。

【0129】

L-FABPの低下を同様に、以下の化合物を使用してウェスタンブロッティングにより検出した: テトラクロロメタン、フラン、2,6-ジニトロトルエンおよび酢酸シプロテロン(図9、10および12)。

20

【0130】

これに対して、2,4-ジニトロトルエン、2,6-ジアミノトルエン、2,4-ジアミノトルエンについて選択された最も高用量ではL-FABPレベルに変化は無く、2つのペルオキシソーム増殖物質(WY14,643とナフェノピン)ではわずかに低下する傾向があった(図10、11、12および13)。

【0131】

7. 考察

統計解析は、対照より長い接触時間と高用量で、合成エストロゲンであるエチニルエストラジオールと2つの酵素インデューサーであるフェノバルビタールとアルファヘキサクロロシクロヘキサンで処理したすべての試験ラットでは、L-FABP(ETHI_F_ID 4302)の肝臓では有意に低く発現されることを示す。タンパク質スポットETHI_F_ID 4316はETHI_F_ID 4302のすぐ近くに位置し、グラフ検査ではETHI_F_ID 4392の処理作用の類似のプロフィールを示し、すなわち10d後に処理の影響で消滅する。タンパク質ETHI_F_ID 4302はETHI_F_ID 4316とは配列は異ならず、2Dゲルでは同じ等電点でより高質量で出現する。これは、pHに影響を与えない翻訳後修飾の可能性を示唆する。2つのタンパク質の差はヘキサペプチドMEGDNK中のアスパラギン(N)上の異なるN-グリコシル化である可能性があり、このために、タンパク質のトリプシン切断後の質量スペクトルペプチド地図中の一回も検出できないのかも知れない。

30

【0132】

ETHI_F_ID 4302はすべての3つの物質に接触すると、対照と比較して用量依存性にその発現が非常に有意に数オーダーの大きさで低下したことは注目される。この点で重要な観察結果は、使用した試験物質が作用機構の異なるクラスに属する(すなわち酵素インデューサーのファミリーとエストロゲン作用を有する物質)ことである。すなわちL-FABPは、腫瘍促進に有意に関連するマーカーのいくつかの基本的特徴に一致する:

40

- 拡張した物質クラスの相関(酵素誘導とエストロゲン作用)
- 性非依存性: オス(フェノバルビタール)とメス(エチニルエストラジオールとアルファヘキサクロロシクロヘキサン(ウェスタンプロットでのメスについての追加の物質))での検出。

【0133】

50

- さらに、これは早期マーカーであり、フェノバルビタールで処理したオスとアルファヘキサクロロシクロヘキサンで処理したメスでは接触のわずか数時間後に、肝臓中でその量が増加することが観察される。

【図面の簡単な説明】

【0134】

【図1】ラット肝臓タンパク質の2Dゲルの典型的な外観（100 μg の総タンパク質、pH = 4 ~ 7、12.5% のアクリルアミド、タンパク質は銀で染色された）。

【図2】フェノバルビタールで処理した16群のオスラットについて、2つのタンパク質のコントラストプロフィール、IDNR = 1168とIDNR = 1624。

【図3】時間/用量群からの2つの異なるラット肝臓中のタンパク質の量の(A)線形および(B)対数分散プロット（2919スポットが「一致」し、相関係数は0.965である）。 10

【図4】(A)ラン1と(B)ラン2に分離された3つのアッセイPHEN_M、ETHI_FおよびHEXA_Fの共通部分頻度、試験基準は1%レベルに調整されたホッホバーク-ベンジャミニ（Hochberg-Benjamini）。

【図5】16個の処理の対比にわたるタンパク質の平均対数スポット強度のプロット、PHEN_M ID = 3368、ETHI_F_ID = 4302、HEXA_F_ID = 4425、誤差棒は平均標準誤差を示す。

【図6】関連スポット_IDs ETHI_F_ID 4302とETHI_F_ID 4316（いずれもL-FABPである）を有する合成スーパーマスターゲル。

【図7】抗L-FABPラット抗体と化学発光標識抗ラット抗体でL-FABPを視覚化したウェスタンブロット（レーン1：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー；レーン2、3：3日後の対照；レーン4、5：フェノバルビタール（高用量）で10日間処理したラット；レーン6、7：10日後の対照；レーン8、9：エチニルエストラジオール（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン10：SDSサンプルバッファー）。 20

【図8】抗L-FABPラット抗体と化学発光標識抗ラット抗体でL-FABPを視覚化したウェスタンブロット（レーン1：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー；レーン2、3、6、7：10日後の対照；レーン4、5、8、9：アルファ-ヘキサクロロシクロヘキサン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン10：SDSサンプルバッファー）。

【図9】抗L-FABPラット抗体と化学発光標識抗ラット抗体でL-FABPを視覚化したウェスタンブロット（レーン1：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー；レーン2、3、6、8：10日後の対照；レーン3、5：テトラクロロメタン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン7、9：フラン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン10：SDSサンプルバッファー）。 30

【図10】抗L-FABPラット抗体と化学発光標識抗ラット抗体でL-FABPを視覚化したウェスタンブロット（レーン1：SDSサンプルバッファー；レーン2、4、6、8：10日後の対照；レーン3、5：2,6-ジニトロトルエン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン7、9：2,4-ジニトロトルエン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン10：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー）。

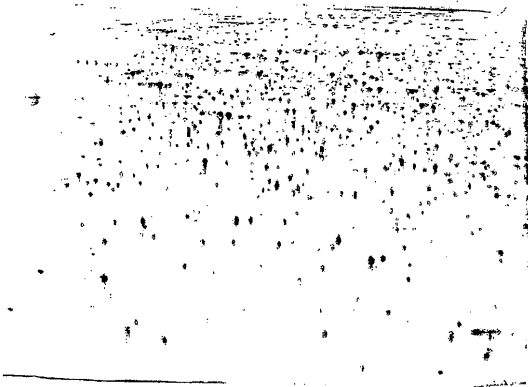
【図11】抗L-FABPラット抗体と化学発光標識抗ラット抗体でL-FABPを視覚化したウェスタンブロット（レーン1：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー；レーン2、4、6、8：10日後の対照；レーン3、5：2,6-ジアミノトルエン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン7、9：2,4-ジアミノトルエン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン10：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー）。 40

【図12】抗L-FABPラット抗体と化学発光標識抗ラット抗体でL-FABPを視覚化したウェスタンブロット（レーン1：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー；レーン2、4、6、8：10日後の対照；レーン3、5：WY14,643（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン7、9：酢酸シプロテロン（高用量）で10日間処理したメスラット；レーン10：SDSサンプルバッファー）。

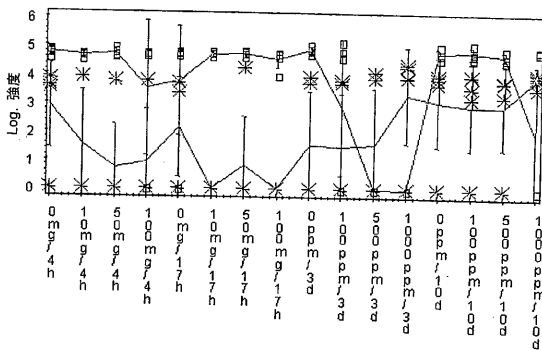
【図13】抗L-FABPラット抗体と化学発光標識抗ラット抗体でL-FABPを視覚化したウェスタンブロット（レーン1、7、8、9、10：SDSサンプルバッファー；レーン2：SDSサンプルバッファーと1:1のレインボーマーカー；レーン3、5：10日後の対照；レーン4、6：ナフ 50

エノピン（高用量）で10日間処理したメスラット）。

【 図 1 】

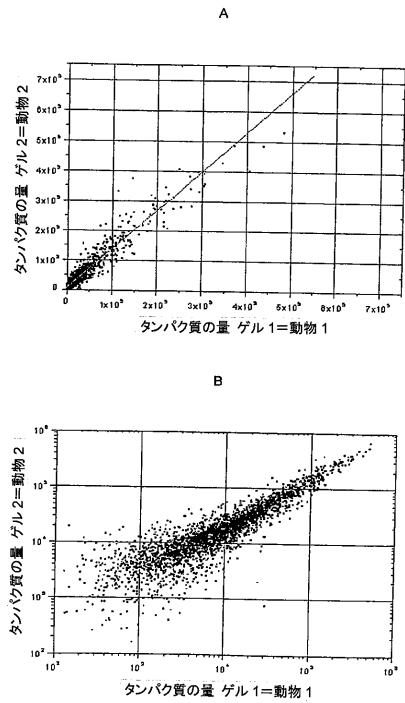


【 図 2 】

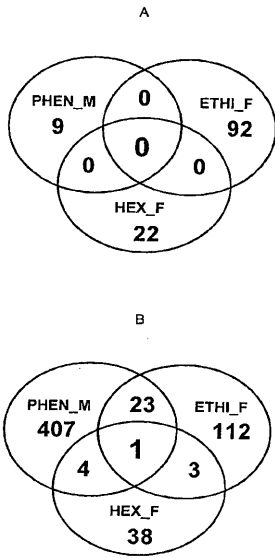


処理(フェノバルビタール 容量/時間)
 IDNR *** 1168 000 1624

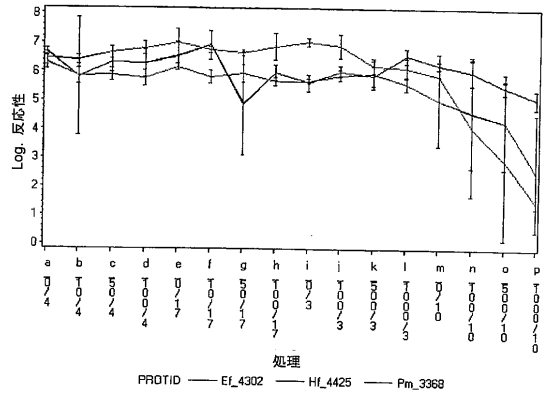
【 図 3 】



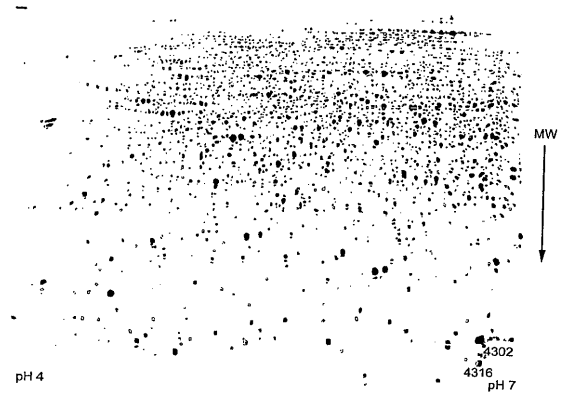
【 図 4 】



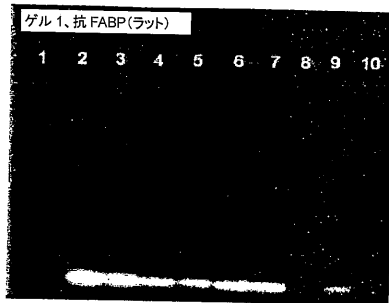
【 図 5 】



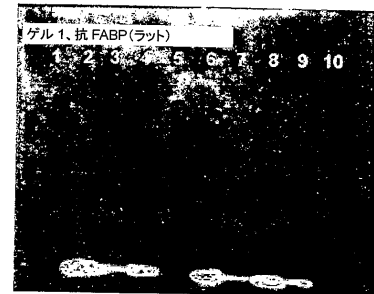
【 図 6 】



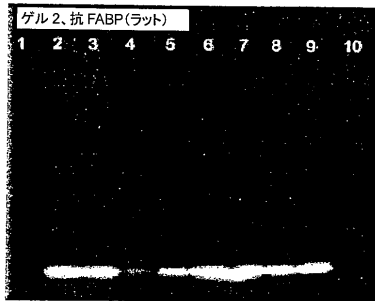
【 図 7 】



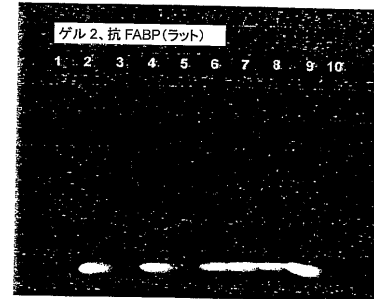
【 図 9 】



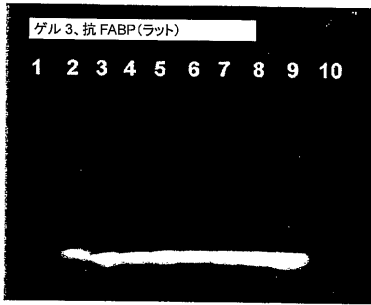
【 図 8 】



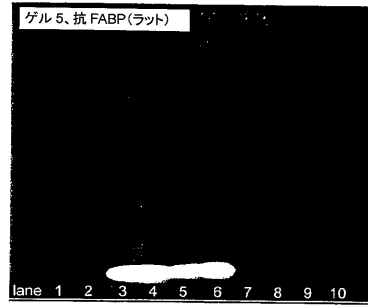
【 図 10 】



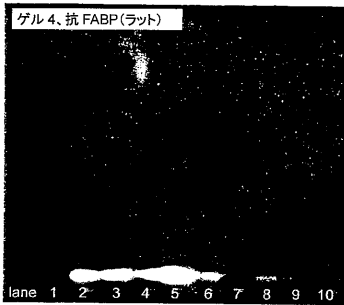
【図 1 1】



【図 1 3】



【図 1 2】



【配列表】

[2008542774000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成19年3月27日(2007.3.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

物質または物質混合物を試験する方法であって、

- a) 生物またはその一部が物質または物質混合物に接触される；および
- b) 少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質(L-FABP)の発現が、その生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプルで測定され、接触時間が48時間より大きく、前記物質または物質混合物への接触によりもたらされるL-FABPの発現の減少が前記物質または物質混合物の毒性を表す、方法。

【請求項2】

接触時間が60時間またはそれ以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

接触時間が最大10日間である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

接触時間が最大5日間である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】

接触時間は最大72時間である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 6】

測定が物質または物質混合物への接触の前と後に行われる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

物質または物質混合物への接触の前と後に測定されるL-FABP発現が互いに比較される、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

測定が少なくとも2つの異なる接触時間について行われる、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

a1) 第1の生物またはその一部を物質または物質混合物に接触させ；

b1) 第1の生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプル中の少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）の発現を測定し；

a2) 第2の生物またはその一部を物質または物質混合物に接触し；そして

b2) 第2の生物またはその一部から得られる少なくとも1つのサンプル中の肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）の発現を測定する、請求項10記載の方法であって、

第1の生物またはその一部の接触時間は第2の生物またはその一部の接触時間とは異なることを特徴とする方法。

【請求項 10】

a) 生物またはその一部を物質または物質混合物に接触させ；そして

b) 生物またはその一部から得られる少なくとも第1のサンプルおよび少なくとも第2のサンプルで、少なくとも1つの肝脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）の発現を測定する、ことを含んでなり、

ここで第1のサンプルは生物またはその一部から第1の接触時間後に採取され、第2のサンプルは生物またはその一部から第2の接触時間後に採取され、かつ第1の接触時間は第2の接触時間とは異なる 請求項10記載の方法。

【請求項 11】

測定がタンパク質の分析により行われる、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

タンパク質の分析による測定が免疫学的方法である、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質の分析による測定が分光分析的方法である、請求項11に記載の方法。

【請求項 14】

生物がラットである、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】

生物の一部は肝臓またはその一部である、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

物質または物質混合物の毒性を同定するための、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法の使用。

【請求項 17】

毒性が腫瘍促進性である、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

腫瘍促進性は、受容体仲介性、酵素誘導性、細胞毒性有糸分裂誘発性、酸化ストレス促進性、および/またはミトコンドリア毒性である、請求項17に記載の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/005508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/185503 A1 (YAMANOUCI MASAYA [JP] ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23) das ganze Dokument, siehe insbesondere die Ansprüche und die Paragraphen 22, 94 und 127	1-7, 10-16
X	WO 02/42328 A2 (UNIV WASHINGTON [US]; ASTRAZENECA AB [SE]; GORDON JEFFREY IVAN [US]; H) 30 May 2002 (2002-05-30) Ansprüche 1,7,16	1-7, 10-16
X	WO 01/68851 A2 (CURAGEN CORP [US]; PADIGARU MURALIDHARA [US]; VERNET CORINE A M [US];) 20 September 2001 (2001-09-20) Anspruch 38	1-7, 10-16
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
6 November 2006	12/12/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer STEINHEIMER, K	

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/005508

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 180 686 A1 (TANABE SEIYAKU CO [JP]) 20 February 2002 (2002-02-20) Ansprüche	1-7, 10-16
X	----- SAWADA HIROSHI ET AL: "A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: Analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system" TOXICOLOGICAL SCIENCES, vol. 83, no. 2, February 2005 (2005-02), pages 282-292, XP002403915 ISSN: 1096-6080 Tabelle 1, Seiten 289-291	1-12, 16-20
P,X	WO 2005/100989 A (GENE LOGIC INC [US]; PORTER MARK [US]; HIGGS BRANDON [US]; MENDRICK DO) 27 October 2005 (2005-10-27) Tabelle 5, Seite 188, Ansprüche	1-20
P,X	WO 2005/052154 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY [JP]; TAKAMI KENJI [JP]; SAWADA HIROSHI) 9 June 2005 (2005-06-09) the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/005508

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004185503	A1	23-09-2004	NONE
WO 0242328	A2	30-05-2002	AU 2698402 A EP 1414853 A2 JP 2004536557 T
WO 0168851	A2	20-09-2001	AU 4356901 A CA 2402248 A1 EP 1263955 A2 JP 2003526369 T
EP 1180686	A1	20-02-2002	AU 3195700 A WO 0073791 A1 US 6794154 B1
WO 2005100989	A	27-10-2005	NONE
WO 2005052154	A	09-06-2005	EP 1693452 A1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/005508

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/50		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2004/185503 A1 (YAMANOUCI MASAYA [JP] ET AL) 23. September 2004 (2004-09-23) das ganze Dokument, siehe insbesondere die Ansprüche und die Paragraphen 22, 94 und 127	1-7, 10-16
X	WO 02/42328 A2 (UNIV WASHINGTON [US]; ASTRAZENECA AB [SE]; GORDON JEFFREY IVAN [US]; H) 30. Mai 2002 (2002-05-30) Ansprüche 1,7,16	1-7, 10-16
X	WO 01/68851 A2 (CURAGEN CORP [US]; PADIGARU MURALIDHARA [US]; VERNET CORINE A M [US];) 20. September 2001 (2001-09-20) Anspruch 38	1-7, 10-16
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
6. November 2006		12/12/2006
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter STEINHEIMER, K

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2006/005508

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	EP 1 180 686 A1 (TANABE SEIYAKU CO [JP]) 20. Februar 2002 (2002-02-20) Ansprüche	1-7, 10-16
X	SAWADA HIROSHI ET AL: "A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: Analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system" TOXICOLOGICAL SCIENCES, Bd. 83, Nr. 2, Februar 2005 (2005-02), Seiten 282-292, XP002403915 ISSN: 1096-6080 Tabelle 1, Seiten 289-291	1-12, 16-20
P,X	WO 2005/100989 A (GENE LOGIC INC [US]; PORTER MARK [US]; HIGGS BRANDON [US]; MENDRICK DO) 27. Oktober 2005 (2005-10-27) Tabelle 5, Seite 188, Ansprüche	1-20
P,X	WO 2005/052154 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY [JP]; TAKAMI KENJI [JP]; SAWADA HIROSHI) 9. Juni 2005 (2005-06-09) das ganze Dokument	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/005508

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2004185503	A1	23-09-2004	KEINE	
WO 0242328	A2	30-05-2002	AU 2698402 A EP 1414853 A2 JP 2004536557 T	03-06-2002 06-05-2004 09-12-2004
WO 0168851	A2	20-09-2001	AU 4356901 A CA 2402248 A1 EP 1263955 A2 JP 2003526369 T	24-09-2001 20-09-2001 11-12-2002 09-09-2003
EP 1180686	A1	20-02-2002	AU 3195700 A WO 0073791 A1 US 6794154 B1	18-12-2000 07-12-2000 21-09-2004
WO 2005100989	A	27-10-2005	KEINE	
WO 2005052154	A	09-06-2005	EP 1693452 A1	23-08-2006

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 ヤコブ, エラルド

ドイツ連邦共和国 6 7 3 0 4 アイゼンベルク, ヘンデルシュトラッセ 1

(72)発明者 プラッチ, ヘルベルト

ドイツ連邦共和国 6 8 2 5 9 マンハイム, モスバッカーシュトラッセ 9 2

(72)発明者 クレンリッヒ, ゲルハルト

ドイツ連邦共和国 6 7 2 2 7 フランケンタール, ゴットヒルフ - ザルツマン - シュトラッセ
6 2

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ79 QQ91 QR48 QR66 QR72 QR77
QS03 QS16 QS28 QS33 QS36 QX01

专利名称(译)	测试物质或物质混合物的方法，所述方法的使用和相应的测试试剂盒		
公开(公告)号	JP2008542774A	公开(公告)日	2008-11-27
申请号	JP2008515144	申请日	2006-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯夫欧洲公司		
申请(专利权)人(译)	巴斯夫Soshietasu-Yoropia		
[标]发明人	ヤコブエラルド プラッチヘルベルト クレンリッヒゲルハルト		
发明人	ヤコブ,エラルド プラッチ,ヘルベルト クレンリッヒ,ゲルハルト		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/06		
CPC分类号	G01N33/5014 G01N33/5088 G01N2333/70567		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/06.ZNA		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS16 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01		
优先权	102005026710 2005-06-09 DE		
其他公开文献	JP4907650B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及测试物质和毒性物质混合物的方法，所述方法的用途，以及相应的测试试剂盒。该方法基本上基于来自肝脏的脂肪酸结合蛋白（L-FABP）的测量。该方法的使用提供了测试物质或物质混合物的致癌性和肿瘤促进的早期指标。

表 1: BSA 標準物質シリーズの混合物

タンパク質標準溶液 (μ l)	脱イオン水(μ l)	タンパク質濃度 (μ g/ml)
125	875	50
250	750	100
500	500	200
750	250	300
1000	0	400