

(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2015-72195

(P2015-72195A)

(43) 公開日 平成27年4月16日(2015.4.16)

(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 V	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2013-208049 (P2013-208049)	(71) 出願人	000003300 東ソー株式会社 山口県周南市開成町4560番地
(22) 出願日	平成25年10月3日(2013.10.3)	(71) 出願人	504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
		(72) 発明者	青木 淳賢 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
		(72) 発明者	島本 怜史 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ 一株式会社 東京研究センター内
		(72) 発明者	五十嵐 浩二 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ 一株式会社 東京研究センター内 最終頁に続く

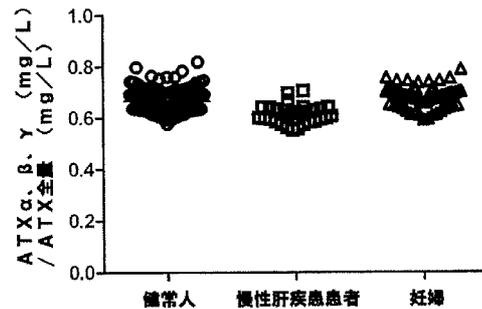
(54) 【発明の名称】 オートタキシンアイソフォーム $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の測定による疾患等の検出方法

(57) 【要約】

【課題】オートタキシンアイソフォーム $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の測定により、慢性肝疾患、妊娠をはじめとするオートタキシンアイソフォーム $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の測定により検出する疾患等の、検出方法、検出薬及び推定方法を提供すること。

【解決手段】血清等の検体中のオートタキシンアイソフォーム $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ を、抗体を用いた免疫化学的測定法により測定することにより、オートタキシンアイソフォーム $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の測定により検出する疾患等、例えば慢性肝疾患や妊娠等を検出する。またオートタキシンアイソフォーム $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の濃度を測定し、その値を換算することにより、オートタキシンアイソフォーム $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ の濃度を推定する。

【選択図】 図8



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

オートタキシンアイソフォーム、及び を測定することを特徴とする、オートタキシンアイソフォーム、及び 測定により検出する疾患等の検出方法。

## 【請求項 2】

前記疾患等が慢性肝疾患である請求項 1 に記載の検出方法。

## 【請求項 3】

前記疾患等が悪性リンパ腫である請求項 1 に記載の検出方法。

## 【請求項 4】

前記疾患等が隣疾患である請求項 1 に記載の検出方法。

10

## 【請求項 5】

前記疾患等がステロイド服用効果モニターである請求項 1 に記載の検出方法。

## 【請求項 6】

前記疾患等が妊娠又は妊娠高血圧症候群である請求項 1 に記載の検出方法。

## 【請求項 7】

前記オートタキシンアイソフォーム、及び が完全長のオートタキシンアイソフォーム、及び、部分的に切断を受けたオートタキシンアイソフォーム、及び、又は一部の遺伝子の変異を受けたオートタキシンアイソフォーム、及び である、請求項 1 から 6 いずれかに記載の検出方法。

## 【請求項 8】

検体が、血液成分又は細胞若しくは組織の抽出液である、請求項 1 から 7 いずれかに記載の検出方法。

20

## 【請求項 9】

前記方法が、抗体を用いた免疫化学的方法である、請求項 1 から 8 いずれかに記載の検出方法。

## 【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の検出方法を利用することを特徴とする、オートタキシンアイソフォーム、及び 測定により検出する疾患等の検出薬。

## 【請求項 11】

オートタキシンアイソフォーム、及び 濃度を測定し、その値を換算することを特徴とする、オートタキシンアイソフォーム、及び 濃度の推定方法。

30

## 【請求項 12】

オートタキシンアイソフォーム、及び 濃度を測定し、その値を換算することを特徴とする、オートタキシンアイソフォーム、及び 濃度の推定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、オートタキシンアイソフォーム、及び の測定による、慢性肝疾患、妊娠をはじめとするオートタキシン全量濃度の測定により検出する疾患等の、検出方法、検出薬及び推定方法に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

オートタキシンにはいくつかのアイソフォーム ( i s o f o r m、構造は異なるが同じ機能をもつタンパク質) があることが知られている。一例として、スプライシングバリエント、及び が遺伝子として同定されているオートタキシンアイソフォーム、及び (以下それぞれを A T X、及び と略す) がある (非特許文献 1、2)。

前記アイソフォームのアミノ酸配列の相同性を確認した結果、A T X、及び (以下、A T X、及び と定義する) は、L2リンカー領域で V a l - G l u - P r o - L y s (配列番号 1) を有し、A T X、及び は L2リンカー領域で配列番号 1 のアミノ酸配

50

列を欠損していることが明らかとなっている（非特許文献2）。

【0003】

オートタキシンの測定に関しては、特許文献1にて、ヒト血清等ヒト検体中のATX、及び（以下ATX全量と定義する）濃度を簡便、短時間、かつ信頼性高く定量可能な方法が開示されており、悪性リンパ腫、肝臓の線維化、脾疾患、ステロイド服用効果モニター、妊娠および妊娠高血圧症候群の検出が可能となっている（特許文献1、2、3、4、5）。また、特許文献6にて、ヒト血清等ヒト検体中のATX、のみを簡便、短時間、かつ信頼性高く定量可能な方法が開示されているが、各種疾患におけるATX、の濃度はこれまで不明であった。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第2008/016186号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2011/081214号パンフレット

【特許文献3】特開2012-52875号公報

【特許文献4】特開2012-2588号公報

【特許文献5】特開2009-162616号公報

【特許文献6】特開2013-14558号公報

【非特許文献】

【0005】

20

【非特許文献1】J. Biol. Chem.、283、7776、2008

【非特許文献2】J. Biochem.、151、89-97、2012

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで本発明は、ATX、の測定により、慢性肝疾患、妊娠をはじめとするATX全量測定により検出しうる疾患等の、検出方法、検出薬及び推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】

【0007】

30

上記課題に鑑みてなされた本発明は、以下の態様を包含する：

(1) ATX、を測定することを特徴とする、ATX全量測定により検出しうる疾患等の検出方法。

(2) 前記疾患等が慢性肝疾患である(1)に記載の検出方法。

(3) 前記疾患等が悪性リンパ腫である(1)に記載の検出方法。

(4) 前記疾患等が脾疾患である(1)に記載の検出方法。

(5) 前記疾患等がステロイド服用効果モニターである(1)に記載の検出方法。

(6) 前記疾患等が妊娠又は妊娠高血圧症候群である(1)に記載の検出方法。

(7) 前記ATX、が完全長のATX、、部分的に切断を受けたATX、、又は一部の遺伝子の変異を受けたATX、である、(1)から(6)いずれかに記載の検出方法。

40

(8) 検体が、血液成分又は細胞若しくは組織の抽出液である、(1)から(7)いずれかに記載の検出方法。

(9) 前記方法が、抗体を用いた免疫化学的方法である、(1)から(8)いずれかに記載の検出方法。

(10) (1)から(9)のいずれかに記載の検出方法を利用することを特徴とする、ATX全量測定により検出しうる疾患等の検出薬。

(11) ATX、濃度を測定し、その値を換算することを特徴とする、ATX全量濃度の推定方法。

(12) ATX全量濃度を測定し、その値を換算することを特徴とする、ATX、

50

濃度の推定方法。

【0008】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】

本発明者らはATXのアイソフォームに着目し、ヒト血中のATX、  
、  
を検出することを試みた。その結果、慢性肝疾患患者では、その値が健常人からなる正常値に対し有意差をもって高値を示した。妊婦では、その値が非妊娠健常人測定値からなる正常値に対し有意差をもって高値を示した。悪性リンパ腫では、その値が健常人からなる正常値に対し有意差をもって高値を示す。非癌膵疾患患者では、その値が健常人からなる正常値に対し低値を示し、非癌膵疾患患者では、その値が膵臓癌患者に対し低値を示す。ステロイド服用により、その値が低値を示す。妊娠高血圧症候群では、その値が正常妊娠群の測定値に対して有意差をもって低値を示す。

10

【0010】

測定されるATX、  
、  
は、完全長のATX、  
、  
だけでなく、部分的に切断を受けたATX、  
、  
、又は一部の遺伝子の変異を受けたATX、  
、  
も含まれる。検体は、血液成分又は細胞若しくは組織の抽出液があげられる。測定方法は、ATX、  
、  
を検出可能な方法であれば検出方法を選ばない。特異性、感度、汎用性などの点から、免疫化学的方法が優れている。本発明の検出方法を利用して、ATX全量測定により検出する疾患等の検出薬とすることもできる。特許文献6の方法に従い、免疫学的定量試薬を用い測定すれば、検体中に含まれる内在性の測定妨害因子や競合酵素の影響を受けることなく、かつ短時間でATX、  
、  
を定量可能であり、小規模医療施設においても簡便、低コストで診断可能な本発明の検出薬を提供することが可能である。

20

【0011】

また、ATX、  
、  
濃度はATX全量濃度と、疾患によらず有意な正の相関があり、ATX、  
、  
はATX全量に対し約67%の比率で存在した。したがって、ATX、  
、  
濃度を0.67で除すことにより、ATX全量濃度を推定することができ、ATX全量濃度に0.67を乗ずることにより、ATX、  
、  
濃度を推定することができる。

【発明の効果】

【0012】

特許文献6の方法を用いれば、検体中に含まれる内在性の測定妨害因子や競合酵素の影響を受けることなく、かつ短時間でATX、  
、  
を定量可能であり、小規模医療施設においても簡便、低コストで診断可能な本発明の検出薬を提供することが可能である。ATX、  
、  
の測定により、ATX全量測定と同様に、慢性肝疾患、妊娠を診断することが可能である。また、ATX、  
、  
濃度はATX全量濃度と良好な正の相関性を示すこと、ATX全量濃度に占めるATX、  
、  
濃度の比率は約67%と疾患によらずほぼ一定であることから、ATX、  
、  
の測定によりATX全量を推定することができ、またその逆も可能である。したがって、ATX、  
、  
の測定は、ATX全量の血中濃度の上昇又は下降を伴う疾患等、例えば、悪性リンパ腫、膵疾患、ステロイド服用効果モニター、および妊娠高血圧症候群の診断にも使用することが期待できる。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】健常人と慢性肝疾患患者のATX、  
、  
Indexを示す図である。

【図2】健常人と慢性肝疾患患者のATX全量Indexを示す図である。

【図3】健常人女性と妊婦のATX、  
、  
濃度を示す図である。

【図4】健常人女性と妊婦のATX全量濃度を示す図である。

【図5】健常人のATX全量濃度とATX、  
、  
濃度の相関性を示す図である。

【図6】慢性肝疾患患者のATX全量濃度とATX、  
、  
濃度の相関性を示す図である。

【図7】妊婦のATX全量濃度とATX、  
、  
濃度の相関性を示す図である。

50

【図 8】健常人、慢性肝疾患患者および妊婦の A T X 全量濃度に占める A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度の比率を示す図である。

【実施例】

【0014】

以下に実施例を示すが、本発明は実施例に記載された例に限られるものではない。なお、以下の実験例で使用したヒト検体は、インフォームドコンセントのもと採血された検体を用い実施した。また、A T X 全量濃度の測定は特許文献 1 の方法、A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度の測定は特許文献 6 の方法に基づき、自動免疫測定装置 A I A シリーズ（東ソー（株）製）を用い実施した。

【0015】

実施例 1：健常人検体の A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度の定量

患者検体測定に先立ち、コントロール群として健常人血清の A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度を測定した。男性 81 名（19～61 歳）、女性 52 名（19～50 歳）の健常人血清中の A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度を全自動免疫測定装置にて実施した。

【0016】

結果を表 1 に示す。女性血清中の A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度は男性に比べ明らかに高濃度であり、Mann-Whitney U test では  $P < 0.001$  の有意差を示した。患者検体測定時には男女の性差を考慮する必要があるため、患者検体測定値を男女それぞれの 95 パーセンタイル上限値である  $0.701 \text{ mg/L}$ 、 $0.925 \text{ mg/L}$  で除した値「オートタキシン  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  指数」（A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  index = A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  測定値 / 95 パーセンタイル上限値）にて男女性差を補正した値を用い以下の評価を実施した。

【0017】

【表 1】

	ATX $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 濃度 (mg/L, mean $\pm$ SD)	中央値 (mg/L)	95パーセンタイル参考基準範囲 (mg/L)	n数	有意差検定結果
健常人男性	0.460 $\pm$ 0.084	0.450	0.320 ~ 0.701	81	
健常人女性	0.663 $\pm$ 0.128	0.659	0.427 ~ 0.925	52	S vs 男性 $p < 0.001$
全健常人	0.539 $\pm$ 0.143	0.510	0.326 ~ 0.925	133	

実施例 2：健常人検体の A T X 全量濃度の定量

実施例 1 と同じ健常人検体中の A T X 全量濃度を全自動免疫測定装置にて実施した。

【0018】

結果を表 2 に示す。女性検体中の A T X 全量濃度は男性に比べ明らかに高濃度であり、Mann-Whitney U test では  $P < 0.001$  の有意差を示した。患者検体測定時には男女の性差を考慮する必要があるため、患者検体測定値を男女それぞれの 95 パーセンタイル上限値である  $1.013 \text{ mg/L}$ 、 $1.354 \text{ mg/L}$  で除した値「オートタキシン全量指数」（A T X 全量 index = A T X 全量測定値 / 95 パーセンタイル上限値）にて男女性差を補正した値を用い以下の評価を実施した。

【0019】

【表 2】

	ATX全量濃度 (mg/L, mean $\pm$ SD)	中央値 (mg/L)	95パーセンタイル参考基準範囲 (mg/L)	n数	有意差検定結果
健常人男性	0.704 $\pm$ 0.126	0.678	0.489 ~ 1.013	81	
健常人女性	0.971 $\pm$ 0.190	0.964	0.635 ~ 1.354	52	S vs 男性 $p < 0.001$
全健常人	0.808 $\pm$ 0.202	0.757	0.499 ~ 1.348	133	

実施例 3：慢性肝疾患患者検体の A T X  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度と A T X 全量濃度の定量

慢性肝疾患患者血清のATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 濃度を健常人と比較した。比較のために、ATX全量濃度の測定を行なった。結果を表3（男性及び女性のATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 濃度）、表4（性差を考慮したATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  Index）、表5（男性及び女性のATX全量濃度）、表6（性差を考慮したATX全量 Index）、図1（性差を考慮したATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  Index）および図2（性差を考慮したATX全量 Index）に示す。

【0020】

ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 濃度およびATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  Indexは、ATX全量濃度およびATX全量 Indexと同様に慢性肝疾患患者において有意に高いことが確認された。

【0021】

【表3】

	ATX $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 濃度 (mg/L、mean $\pm$ SD)	n数	有意差検定結果
健常人男性	0.460 $\pm$ 0.084	81	
慢性肝疾患患者男性	1.118 $\pm$ 0.683	14	S vs 健常人男性 p < 0.001
健常人女性	0.663 $\pm$ 0.128	52	
慢性肝疾患患者女性	0.988 $\pm$ 0.572	16	S vs 健常人女性 p = 0.131

10

20

【0022】

【表4】

	ATX $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ Index (-, mean $\pm$ SD)	n数	有意差検定結果
全健常人	0.680 $\pm$ 0.130	133	
全慢性肝疾患患者	1.314 $\pm$ 0.834	30	S vs 健常人 p < 0.001

30

【0023】

【表5】

	ATX全量濃度 (mg/L、mean $\pm$ SD)	n数	有意差検定結果
健常人男性	0.704 $\pm$ 0.126	81	
慢性肝疾患患者男性	1.860 $\pm$ 1.157	14	S vs 健常人男性 p < 0.001
健常人女性	0.971 $\pm$ 0.190	52	
慢性肝疾患患者女性	1.595 $\pm$ 0.927	16	S vs 健常人女性 p = 0.006

40

【0024】

【表 6】

	ATX全量 Index (-, mean±SD)	n数	有意差検定結果
全健常人	0.703 ± 0.131	133	
全慢性肝疾患患者	1.485 ± 0.969	30	S vs 健常人 p < 0.001

実施例 4：妊婦検体の ATX 全量濃度と ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度

妊婦血清の ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度を、健常人女性と比較した。また、比較のために、ATX 全量濃度の測定を行なった。結果を表 7 (ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度)、表 8 (ATX 全量濃度)、図 3 (ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度) および図 4 (ATX 全量濃度) に示す。

10

【0025】

ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度は、ATX 全量濃度と同様に妊婦において有意に高いことが確認された。

【0026】

【表 7】

	ATX $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 濃度 (mg/L, mean±SD)	n数	有意差検定結果
健常人女性	0.663 ± 0.128	52	
妊婦	3.276 ± 1.825	65	S vs 健常人女性 p < 0.001

20

【0027】

【表 8】

	ATX 全量濃度 (mg/L, mean±SD)	n数	有意差検定結果
健常人女性	0.971 ± 0.190	52	
妊婦	4.773 ± 2.579	65	S vs 健常人女性 p < 0.001

30

実施例 5：ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度と ATX 全量濃度の相関

健常人検体、慢性肝疾患患者検体、妊婦検体における ATX 全量濃度を横軸に、ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度を縦軸にしてプロットし、相関関係を確認した。結果を図 5 (健常人)、図 6 (慢性肝疾患患者)、図 7 (妊婦) に示す。

【0028】

図 5、6、7 に示されるとおり、健常人、慢性肝疾患患者、妊婦で ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度と ATX 全量濃度は良好な正の相関性を示した。

【0029】

また、健常人、慢性肝疾患患者、妊婦における、ATX 全量濃度に占める ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度の比率 (ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度 (mg/L) / ATX 全量濃度 (mg/L)) の結果を表 9、図 8 に示す。ATX 全量濃度に占める ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度の比率の平均は、健常人検体では 0.666、慢性肝疾患患者検体では 0.615、妊婦では 0.680 であった。これらのことから、ATX 全量濃度に占める ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度の比率は疾患によらずほぼ一定の 0.67 であることから、ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度を 0.67 で除すことにより、ATX 全量濃度を推定することができ、ATX 全量濃度に 0.67 を乗ずることにより、ATX  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  濃度を推定することができる。

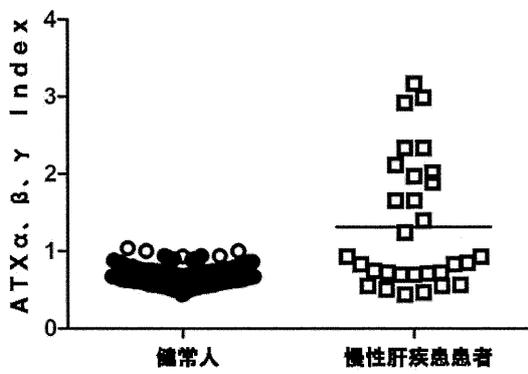
40

【0030】

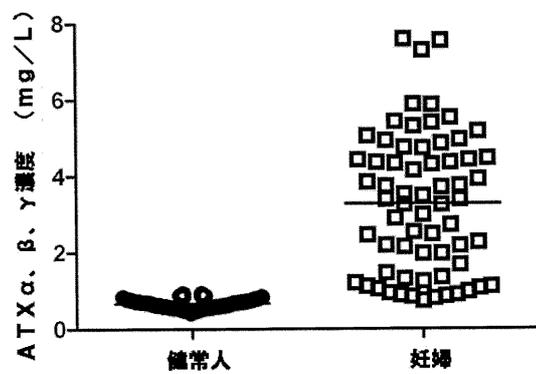
【表 9】

	ATX $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ 濃度/ATX全量濃度 (-, mean $\pm$ SD)	n数
健常人	0.666 $\pm$ 0.045	133
慢性肝疾患患者	0.615 $\pm$ 0.037	30
妊婦	0.680 $\pm$ 0.041	65

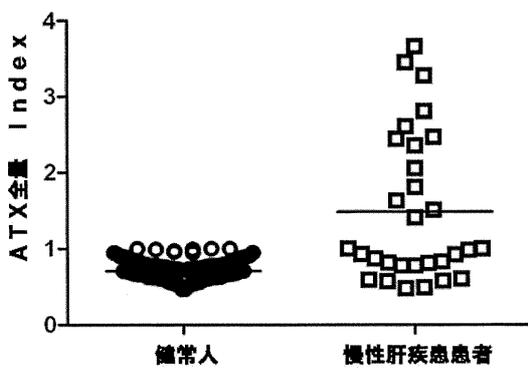
【図 1】



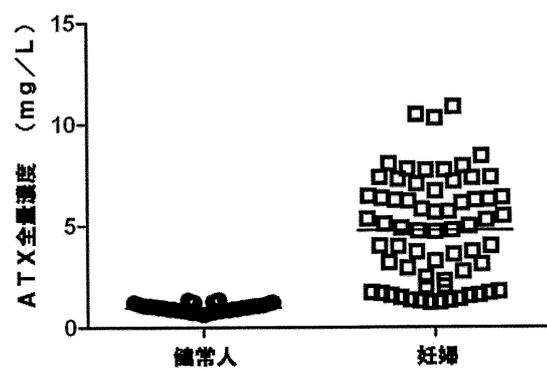
【図 3】



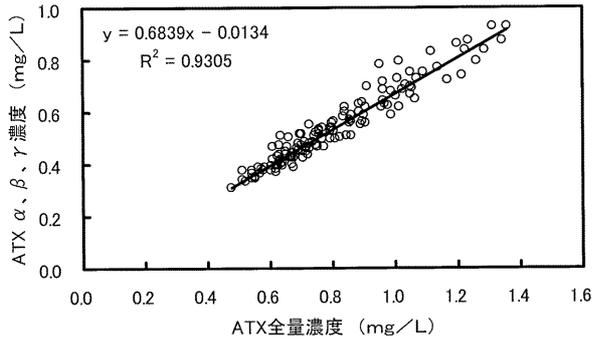
【図 2】



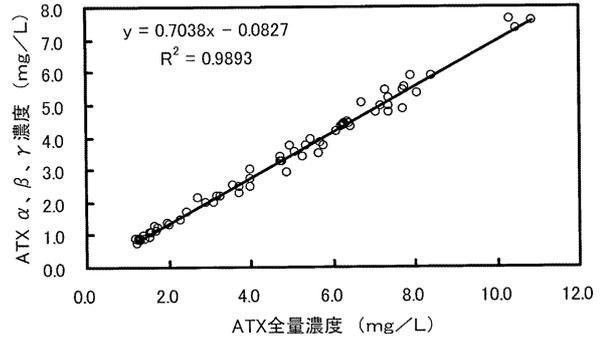
【図 4】



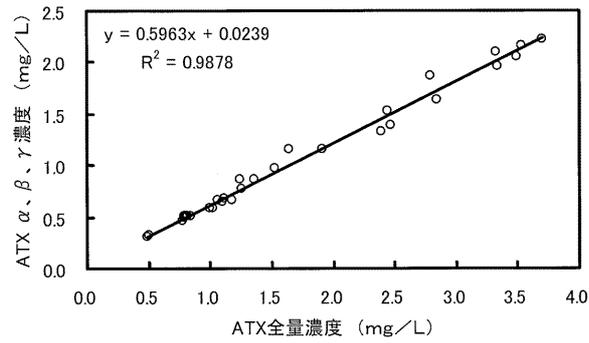
【 図 5 】



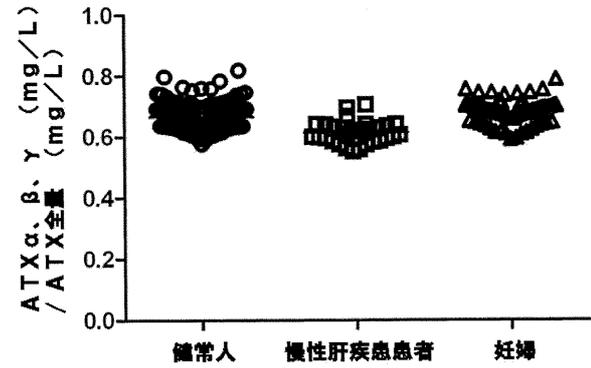
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【 配列表 】

[201507219500001.app](#)

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ79 QQ96 QR48 QS15 QS33 QX02

专利名称(译)	通过测量自分泌运动因子同种型 $\alpha$ ， $\beta$ 和 $\gamma$ 来检测疾病等的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015072195A</a>	公开(公告)日	2015-04-16
申请号	JP2013208049	申请日	2013-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司 国立大学法人东北大学		
[标]发明人	青木淳賢 島本怜史 五十嵐浩二		
发明人	青木 淳賢 島本 怜史 五十嵐 浩二		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/02		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/574.A C12Q1/02.ZNA		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QX02		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：要通过测量自分泌生物素同种型 $\alpha$ ， $\beta$ 和 $\gamma$ 来检测慢性肝病，可以通过测量自分泌生物素同种型 $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$ ， $\delta$ 和 $\epsilon$ 等来检测诸如怀孕的疾病，提供一种检测剂和估计方法。解决方案：自身免疫素同工型 $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$ ， $\delta$ 和 $\epsilon$ 是通过使用抗体的免疫化学分析方法通过测量样品（例如血清）中的自身分泌同工型 $\alpha$ ， $\beta$ 和 $\gamma$ 来测量的。可检测到诸如慢性肝病和妊娠之类的可检测疾病。此外，测量自分泌生物素同工型 $\alpha$ ， $\beta$ 和 $\gamma$ 的浓度，并将其值转换以估算自分泌生物素同工型 $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$ ， $\delta$ 和 $\epsilon$ 的浓度。[选择图]图8

