

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年8月12日(12.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/090264 A1

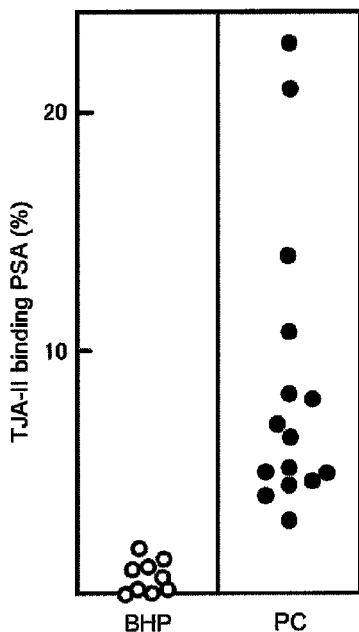
- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/051622
- (22) 国際出願日: 2010年2月4日(04.02.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-023597 2009年2月4日(04.02.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京工業大学(TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 (日本についてのみ): 三菱化学株式会社 (Mitsubishi Chemical Corporation) [JP/JP]; 〒1080014 東京都港区芝4丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 G P バイオサイエンス (GP Biosciences Ltd.) [JP/JP]; 〒0630870 北海道札幌市西区八軒10条東3-1-28 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山下 克子 (YAMASHITA Katsuko) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4-2-59 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 福島 慶子 (FUKUSHIMA Keiko) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4-2-59 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 馬場 志郎 (BABA Shiro) [JP/JP]; 〒2288555 神奈川県相模原市北里1-15-1 北里大学内 Kanagawa (JP). 佐藤 威文 (SATO Takefumi) [JP/JP]; 〒2288555 神奈川県相模原市北里1-15-1 北里大学内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 森田 憲一, 外(MORITA Kenichi et al.); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目6-7番8号 板橋中央ビル5階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING PSA, AND METHOD FOR DISTINGUISHING BETWEEN PROSTATE CANCER AND PROSTATOMEGALY EMPLOYING THE ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: P S Aの分析方法、及び前記分析方法を用いた前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法

[図3]



(57) Abstract: Disclosed is a PSA analysis method which can distinguish between prostate cancer and prostatomegaly reliably. Also disclosed is a PSA analysis kit. The PSA analysis method comprises: bringing a lectin having an affinity for a β -N-acetylgalactosamine residue and/or a lectin having an affinity for a fucose α (1,2)galactose residue into contact with a sample that is suspected of containing a PSA; and determining the quantity of a PSA having an affinity for the lectin. The method can provide a method for distinguishing between prostate cancer and prostatomegaly.

(57) 要約: 前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができる P S Aの分析方法、及び P S Aの分析キットを提供する。本発明の課題は、 β -N-アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチン及び/又はフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S Aを含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S Aの量を判定することによって解決することができる。この方法により、前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法を提供することが可能である。

WO 2010/090264 A1



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.

NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

PSAの分析方法、及び前記分析方法を用いた前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法

技術分野

[0001] 本発明は、PSAの分析方法及びそれを用いた前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法、並びにPSAの分析キットに関する。本発明によれば、前立腺癌の癌細胞から分泌されるPSAに特異的に発現する糖鎖に結合するレクチンを用いることにより、前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができる。

背景技術

[0002] 前立腺癌は、主に60歳以上の男性に発病し、欧米諸国では、男性の癌において肺癌に次ぐ死亡原因となっている。前立腺癌の発生率は、1975年以降増加しているが、その理由の1つは、前立腺特異抗原(Prostate Specific Antigen: 以下、PSAと称する)による診断方法の普及によるものである。このPSAの測定により、従来の直腸指診では困難であった早期の癌が発見されるようになった。

[0003] PSAは、前立腺の腺細胞から前立腺の腺腔内に分泌されるタンパク質であり、前立腺に特異的に発現するタンパク質であるが、前立腺癌に特異的に発現するタンパク質ではない。従って、前立腺癌以外の前立腺肥大症及び前立腺炎などの疾患でも上昇することが知られている。

現在、広く使用されているPSA測定法は、 α 1-アンチキモトリプシンと結合した結合型PSA(以下、PSA-ACTと称することがある)及び遊離型PSA(以下、フリーPSAと称することがある)を測定するトータルPSAの測定法であり、トータルPSAの測定値が10ng/mL以上の場合、50%以上のヒトに前立腺癌が発見されるが、4~10ng/mLのヒトで25%、2~4ng/mLでも15%のヒトに前立腺癌の発生が見ら

れる。特に、トータルPSA値が4～10 ng/mLの領域をグレーゾーンと呼んでいるが、前立腺肥大症の患者でも、このグレーゾーンのトータルPSA値を示す患者が多く、前立腺癌と前立腺肥大症の患者を鑑別することのできるPSAの分析方法の開発が期待されている。

[0004] 前記のグレーゾーンのトータルPSA値を示す患者において、前立腺肥大症と前立腺癌を鑑別するために、トータルPSAに対するフリーPSAの割合を測定することが行われている。前立腺癌患者では、トータルPSAに対するフリーPSAの割合が減少していることが報告されており、遊離型PSAのみを測定するフリーPSAの測定法によりフリーPSA値を測定し、トータルPSA値に対するフリーPSA値（以下、「フリーPSA/トータルPSA比」と称することがある）を求めると、この値が25%以下を示す場合、前立腺癌の可能性が高いといわれている。しかしながら、グレーゾーンの検体において、前記フリーPSA/トータルPSA比が0～10%の範囲の場合、前立腺癌の可能性は56%であるが、10～15%では28%、15～20%では20%、20～25%では16%であり、フリーPSA/トータルPSA比を用いても、前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別することは容易ではない。

[0005] トータルPSAが10 ng/mL以上の患者、及びトータルPSAが4～10 ng/mLのグレーゾーンで、且つフリーPSA/トータルPSA比が25%以下を示す患者の場合、前立腺癌の確定診断のため、前立腺の生検を行う。しかしながら、特に後者においては、前立腺癌が発見される割合は、30%程度であり、患者に過度の負担を強いており、この点からも、簡便に前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別する方法が開発されることが求められている。

[0006] PSAは1本のアスパラギン結合型糖鎖（以下、N-グリカン鎖と称することがある）を持つ糖タンパク質であるが、前立腺癌患者のPSAは、高分岐化複合型糖鎖を持つことが知られており、また前立腺癌の患者に特異的な糖鎖を有しているのではないかと考えられていた。例えば、前立腺癌由来の

LNCaP細胞から分泌されるPSAのN-グリカン鎖を、質量分析機で分析したところ、正常精漿中のPSAと比べてN-アセチルヘキソサミン（HexNAc）及びフコースの含量が多く、シアル酸を欠如していることが報告されている（非特許文献1）。しかしながら、このLNCaP細胞のPSAの糖鎖は、シアル酸を欠如していることなどから、生体内の前立腺癌患者の血清中のPSAの糖鎖と異なっており、特殊なPSAであると考えられた。

[0007] また、大山らは精漿中のPSAのN-グリカン鎖にシアル酸 α （2, 3）ガラクトース残基（Sialic acid alpha 2,3 Gal-R）を見出し、前立腺肥大症の患者と比較して、前立腺癌の患者のPSAで、このシアル酸 α （2, 3）ガラクトース残基が多いことを報告した（特許文献1及び非特許文献2）。そして、前記シアル酸 α （2, 3）ガラクトース残基に特異的に結合するイヌエンジュレクチン（*M. amurensis* agglutinin; 以下、MAAと称する）と前立腺癌患者のPSAを結合させ、MAAと結合したフリーPSAの比率を測定することにより、前立腺癌と前立腺肥大症を鑑別することができることを見出した（特許文献1及び非特許文献2）。しかしながら、前記シアル酸 α （2, 3）ガラクトース残基は、PSA以外に α 1-アンチキモトリプシンにも発現しており、従ってMAAは、 α 1-アンチキモトリプシンにも親和性があるため、 α 1-アンチキモトリプシンとPSAが結合している場合、すなわち、PSA-ACTではシアル酸 α （2, 3）ガラクトース残基を有するPSAとシアル酸 α （2, 3）ガラクトース残基を持たないPSAとを分離することができない。従って、トータルPSAの測定法では、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者を鑑別することはできず、フリーPSAを測定する必要があった。

[0008] 更に、タジリらは、2人の前立腺癌患者の血清中のPSAのN-グリカン鎖を、正常の精漿中PSAのN-グリカン鎖と質量分析により比較検討し、前立腺癌の患者のPSAがシアル化及びフコース化されていることを報告している（非特許文献3）。しかしながら、前記シアル酸 α （2, 3）ガラク

トース残基以外に、実際に前立腺癌患者のPSAと前立腺肥大症のPSAを鑑別することのできる糖鎖は、報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2002-55108号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：「グライコバイオロジー (Glycobiology)」2003年 (米国) 第13巻、p. 457~470

非特許文献2：「グライコバイオロジー (Glycobiology)」2004年 (米国) 第14巻、p. 671~679

非特許文献3：「グライコバイオロジー (Glycobiology)」2008年 (米国) 第18巻、p. 2~8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明者らは、前記特許文献1に記載のレクチンであるMAAのカラムを用いて健常人のPSA及び前立腺癌患者のPSAとを分別し、MAAに親和性のあるPSAの測定を試みた。しかしながら、MAAカラムを用いてPSA分別した場合、シアル酸 α (2, 3) ガラクトース残基を有しない正常なPSAの回収率は70%であり、PSAが非特異的に結合しているものと考えられた。また、前立腺癌患者のPSAの回収率は40%であり、MAAに対する非特異的な結合に加えて、シアル酸 α (2, 3) ガラクトース残基を有するPSAが、MAAから溶出されないことも考えられた。従って、MAAカラムを用いた場合、シアル酸 α (2, 3) ガラクトース残基を有するPSAの量を正確に測定できないことがわかった。

レクチンは、現在市販されているものだけでも100種類以上あるが、本発明者らは、糖結合特異性の異なる複数の植物レクチンを組み合わせて、前立腺癌患者のPSAに発現している糖鎖の同定を進め、前立腺癌患者のPS

Aと前立腺肥大症のPSAとを鑑別することについて鋭意研究したところ、キカラスウリレクチン-I I (Trichosanthes japonica Agglutinin-II ; 以下、TJA-I Iと称することがある)、ノダフジレクチン (Wisteria floribunda ; 以下、WFAと称することがある) 又はハリエニシダレクチン-I (Ulex europaeus agglutinin-I ; 以下、UEA-Iと称することがある) に親和性のあるPSAが、前立腺癌患者の血液中に存在していることを見出し、そして前記TJA-I I、WFA、又はUEA-Iを用いることにより、前立腺癌患者のPSAと前立腺肥大症のPSAとを鑑別することができることを見出した。すなわち、前立腺癌患者のPSAの多くが、 β -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc β 1 \rightarrow R) 及び/又はフコース α (1, 2) ガラクトース残基 (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow R) を有していることを見出した。

本発明は、このような知見に基づくものである。

課題を解決するための手段

[0012] 従って、本発明は、 β -N-アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチンと、PSAを含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のあるPSAの量を判定することを特徴とする、PSAの分析方法に関する。

本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、(a) 前記レクチンとPSAを含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のあるPSAと前記レクチンに親和性のないPSAとを分別する段階、及び(b) 前記試料中のレクチンに親和性のあるPSAの量を判定する段階を含む。

また、本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、前記レクチンに親和性のあるPSA量の判定が、分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、又は分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないPSA量の

測定による判定である。

また、本発明によるP S Aの分析方法の好ましい態様においては、前記P S A量の測定が、トータルP S A又はフリーP S Aの測定である。

また、本発明によるP S Aの分析方法の好ましい態様においては、前記レクチンが、キカラスウリレクチン- I I又はノダフジレクチンである。

また、本発明によるP S Aの分析方法の別の好ましい態様においては、前記レクチンが、更にフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである。

更に、本発明によるP S Aの分析方法の好ましい態様においては、前記試料が、前立腺癌の疑いのある患者から得られた試料である。

更に、本発明によるP S Aの分析方法の好ましい態様においては、前立腺癌の診断用である。

[0013] 本発明は、フコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S Aを含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のあるP S Aの量を判定することを特徴とする、P S Aの分析方法に関する。

本発明によるP S Aの分析方法の好ましい態様においては、(a) 前記フコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンとP S Aを含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のあるP S Aと前記レクチンに親和性のないP S Aとを分別する段階、及び(b) 前記レクチンに親和性のあるP S Aの量を判定する段階、を含む。

また、本発明によるP S Aの分析方法の好ましい態様においては、前記レクチンに親和性のあるP S A量の判定が、分別されたレクチンに親和性のあるP S A量の測定による判定、分別前の試料中のP S A量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるP S A量の測定による判定、又は分別前の試料中のP S A量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないP S A量の測定による判定である。

また、本発明によるP S Aの分析方法の好ましい態様においては、前記P

PSA量の測定が、トータルPSA又はフリーPSAの測定である。

また、本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、前記レクチンが、キカラスウリレクチン-11又はハリエニシダレクチンである。

更に、本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、前記試料が、前立腺癌の疑いのある患者から得られた試料である。

更に、本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、前立腺癌の診断用である。

[0014] 更に、本発明は、 β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、PSAを含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のあるPSAの量を判定することを特徴とする、PSAの分析方法に関する。

本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、(a)前記 β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、PSAを含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のあるPSAと前記レクチンに親和性のないPSAとを分別する段階、及び(b)前記レクチンに親和性のあるPSAの量を判定する段階、を含む。

また、本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、前記レクチンに親和性のあるPSA量の判定が、分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、又は分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないPSA量の測定による判定である。

また、本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、前記PSA量の測定が、トータルPSA又はフリーPSAの測定である。

また、本発明によるPSAの分析方法の好ましい態様においては、前記 β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンがキカラスウリ

レクチン- I I 又はノダフジレクチンであり、フコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンがキカラスウリレクチン- I I 又はハリエニシダレクチンである。

更に、本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、前記試料が、前立腺癌の疑いのある患者から得られた試料である。

更に、本発明による P S A の分析方法の好ましい態様においては、前立腺癌の診断用である。

[0015] また、本発明は、前記 P S A の分析方法により、試料中のレクチンに親和性のある P S A の量を分析することを特徴とする、前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法にも関する。

また、本発明は、 β -N-アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチンを含む、P S A の分析キットにも関する。

本発明による P S A の分析キットの好ましい態様においては、抗 P S A 抗体を更に含む。

また、本発明による P S A の分析キットの好ましい態様においては、前記レクチンが、キカラスウリレクチン- I I 又はノダフジレクチンである。

更に、本発明による P S A の分析キットの別の好ましい態様においては、前記レクチンが、更にフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである。

[0016] 本発明は、フコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含む、P S A の分析キットに関する。

本発明による P S A の分析キットの好ましい態様においては、 β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含む。

発明の効果

[0017] 本発明の P S A の分析方法、及び前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法、並びに P S A の分析キットによれば、前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができる。また、本発明に用いることのできるレクチンである T

J A - I I 及び W F A、並びに U E A - I と結合した P S A は、ほぼ 1 0 0 % の回収率で回収することが可能であり、前立腺癌が分泌する前立腺癌由来の β - N - アセチルガラクトサミン残基を有する P S A の量を正確に測定することが可能である。更に、T J A - I I 及び W F A カラム並びに U E A - I カラムは再生することが可能であり、再利用することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1] 精製した T J A - I I を電気泳動した写真である。M は分子量マーカを示し、レーン 1 は、還元した T J A - I I を、レーン 2 は非還元の T J A - I I を示している。

[図2] 前立腺癌患者及び前立腺肥大症患者の、T J A - I I カラムによる分別前の血清試料の P S A 量 (A) と T J A - I I 結合画分中の P S A 量 (B) を示したグラフである。黒丸 (●) が前立腺癌患者を、白丸 (○) が前立腺肥大症患者を示している。

[図3] 前立腺癌患者 (P C : ●) 及び前立腺肥大症患者 (B H P : ○) の、T J A - I I 非結合画分中の P S A 量を示したグラフである。

[図4] 正常フリー P S A (A) 及び前立腺癌患者の血清 (B) を M A A カラムにより、分画し、トータル P S A の測定を行った結果を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0019] [1] P S A の分析方法

本発明の P S A の分析方法は、 β - N - アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチンと、P S A を含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする。

[0020] 本発明に用いることのできるレクチンは、非還元末端に結合した β - N - アセチルガラクトサミン残基 (G a l N A c β 1 \rightarrow R) と親和性のあるレクチンを挙げるができる。この場合、非還元末端の β - N - アセチルガラクトサミン残基は、 β - N - アセチルガラクトサミンが、シアル酸や硫酸基で置換されていないことが必須である。前記 β - N - アセチルガラクトサミ

ン残基と親和性のあるレクチンは、特に限定されるものではないが、TJA-I I又はWFAを挙げるができる。

[0021] また、本発明に用いることのできるレクチンとしては、フコース α (1, 2)ガラクトース残基 (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow R)と親和性のあるレクチンを挙げるができる。フコース α (1, 2)ガラクトース残基は、 α -フコースがガラクトースに1, 2結合した構造を有する末端糖鎖である。フコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性の或るレクチンとしては、特に限定されるものではないが、UEA-I又はTJA-I Iを挙げるができる。

更に、本発明に用いることのできるレクチンとしては、非還元末端に結合した β -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc β 1 \rightarrow R)及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを挙げるができる。前立腺癌患者のPSA中には、 β -N-アセチルガラクトサミン残基、又はフコース α (1, 2)ガラクトース残基を単独で発現したPSAが存在する可能性がある。また、前立腺癌患者によっては、そのPSAに β -N-アセチルガラクトサミン残基、又はフコース α (1, 2)ガラクトース残基のいずれかが、優位に発現している可能性も高い。従って、本発明のPSAの分析方法においては、非還元末端に結合した β -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc β 1 \rightarrow R)及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを用いることが好ましい。前記非還元末端に結合した β -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc β 1 \rightarrow R)及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンとしては、特に限定されるものではないが、TJA-I Iを挙げるができる。

[0022] TJA-I Iは、キカラスウリの塊根から抽出及び精製されるレクチンであり、非還元状態の電気泳動による分子量は64kDaであるが、S-S結合した2量体であり、還元状態の電気泳動による分子量は32kDa及び29kDaを示す。TJA-I Iは、 β -N-アセチルガラクトサミン残基 (

G a l N A c β 1 \rightarrow R)、及びフコース α (1, 2) ガラクトース残基 (F u c α 1 \rightarrow 2 G a l β 1 \rightarrow R) に強い親和性を示す。

[0023] W F A は、ノダフジの種子から抽出及び精製されるレクチンであり、 β -N-アセチルガラクトサミン残基 (G a l N A c β 1 \rightarrow R) そのものに強い親和性を示す。また、G a l N A c β 1 \rightarrow 4 G a l 残基、及び G a l N A c β 1 \rightarrow 4 G l c N A c 残基にも強い親和性を示す。

[0024] U E A - I (Ulex europaeus agglutinin-I) は、ハリエニシダ (Ulex europaeus) から調製されるレクチンで、分子量は約 26, 700 である。 α -L-F u c に糖特異性を持っており、フコース α (1, 2) ガラクトース残基 (F u c α 1 \rightarrow 2 G a l β 1 \rightarrow 4 G l c N A c \rightarrow R) に強い親和性を示す。

[0025] 本発明の P S A の分析方法において、前記 β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン、フコース α (1, 2) ガラクトース残基に親和性のあるレクチン、並びに β -N-アセチルガラクトサミン残基及びフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンは、1つ又は2つ以上組み合わせても使用することができる。

[0026] 本発明に用いるレクチンは、市販されているものを用いることもできるが、定法に従って精製することも可能である。植物体 (例えば、葉、茎、花、根、又は種子など) を、細切、又は破碎し、緩衝液に溶解させる。遠心分離によって上清を回収し、硫酸塩析、イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、透析、又は凍結乾燥等を用いて精製することができる。具体的には、T J A - I I の精製は、山下らの報告 (Y amashita et al., J. Biol. Chem., 267, 25441-25422, 1992) に従って精製することが可能である。また、W F A は、豊島らの報告 (Toyoshima et al., Biochemistry, 10, 4457-4463, 1971) に従って、精製することが可能である。また、U E A - I は、Hindsgaulらの報告 (Hindsgaul et al., Carbohydr. Res., 109, 109-142, 1982) に従って、精製することができる。

[0027] 本発明のP S Aの分析方法は、前記レクチンとP S Aを含む可能性のある試料とを接触させ、レクチンに親和性のあるP S Aの量を判定する限り、特に限定されるものではないが、(A)レクチンにより、レクチンに親和性のあるP S Aと前記レクチンに親和性のないP S Aとを分別し、レクチンに親和性のあるP S Aの量を判定する分析方法（以下、分析方法（A）と称することがある）、及び（B）レクチンと、レクチンに親和性のあるP S Aとが結合した状態でレクチンに親和性のあるP S Aの量を判定する分析方法（以下、分析方法（B）と称することがある）を挙げることができる。

[0028] 《分析方法（A）》

前記分析方法（A）は、

（a）本発明のレクチンとして例えば β -N-アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチンと、P S Aを含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のあるP S Aと前記レクチンに親和性のないP S Aとを分別する段階（以下、「分別段階（a）」と称することがある）、及び

（b）前記試料中のレクチンに親和性のあるP S Aの量を判定する段階（以下、「判定段階（b）」と称することがある）

を含む。

[0029] 前記分別段階（a）においてレクチンに親和性のあるP S Aとレクチンに親和性のないP S Aとを分別する方法は、レクチンとP S Aの親和性を利用する方法であれば、特に限定されるものではないが、例えば、担体にレクチンを結合させ、担体に結合したレクチン（以下、「レクチンアフィニティーカラム」と称することがある）にP S Aを含む可能性のある試料を接触させ、レクチンに結合したP S Aとレクチンに結合しないP S Aを分離することによって行うことができる。

[0030] 担体としては、レクチンを結合させることのできるものであれば、限定されるものではないが、例えば、セファロース、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリアクリレート、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリ

メタクリルアミド、スチレンとジビニルベンゼンのコポリマー、ポリアミド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリ塩化ビニル、ポリメチルアクリレート、ポリスチレン及びポリスチレン・コポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、コラーゲン、アルギン酸カルシウム、ラテックス、ポリスルホン、シリカ、ジルコニア、アルミナ、チタニア、セラミックスを挙げることができる。担体の形状も特に限定されるものではないが、粒子状のビーズ、プレート、及びゲルなどの形状の担体を用いることができる。例えば、レクチンに親和性のあるPSAと前記レクチンに親和性のないPSAとの分別に、レクチンアフィニティーカラムを用いる場合は、担体はゲルの形状が好ましい。

[0031] レクチンアフィニティーカラムは、定法に従って作製することが可能である。例えば、CNBr-活性化セファロース4Bを用い、メーカーの推奨するプロトコールに従って、カップリングを行い、レクチンカラムを作製することが可能である。セファロースゲルへのレクチンの結合量は、2mg/mL~10mg/mLが好ましい。

[0032] レクチンアフィニティーカラムを用いて、前記レクチンに親和性のあるPSAと前記レクチンに親和性のないPSAとを分別する方法は、通常のレクチンアフィニティーカラムを用いた糖タンパク質の分離方法に従って行うことができる。

レクチンアフィニティーカラムは、PSAを含む可能性のある試料をアプライする前に、緩衝液で平衡化させる。平衡化緩衝液としては、例えば、0.1%牛血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝液、又は0.1%牛血清アルブミン(BSA)含有トリス塩酸緩衝液を用いることができる。

カラムを平衡化した後に、PSAを含む可能性のある試料を添加し、一定時間静置し、レクチンとPSAとを接触させる。接触時間は、特に限定されるものではなく、レクチンの種類とPSAの親和性によって、適宜決定することができるが、結合の速度と効率を考慮すると、通常15分~30分で行

うことが多い。

レクチンとPSAとを接触させる温度も、特に限定されるものではなく、レクチンの種類とPSAとの親和性によって、適宜決定することができるが、0℃～40℃で行うことが可能であり、好ましくは0℃～30℃である。0℃未満では、カラムが凍結してしまうことがあり、40℃を超えるとレクチンに親和性のないタンパク質の非特異結合が起こることがある。例えば、TJA-I IとPSAを接触させる温度も特に限定されるものではないが、通常、4℃～10℃で接触させるのが好ましい。また、WFAとPSAとを接触させる温度も特に限定されるものではないが、通常、4℃～10℃で接触させるのが好ましい。

[0033] 次に、レクチンに親和性のある結合画分（以下、「結合画分」と称することがある）と、レクチンに親和性のない非結合画分（以下、「非結合画分」と称することがある）を分別する。

レクチンへの非結合画分は、洗浄用緩衝液をカラムに添加し、素通り画分を回収することによって得ることができる。洗浄用緩衝液は、レクチンとPSAの結合を解離させずに、非結合成分を流出させることのできる緩衝液であれば、限定されるものではないが、例えば、前記平衡化に用いた緩衝液を使用することができる。洗浄用緩衝液の容量は、レクチンの種類とPSAとの親和性に応じて、適宜決定することができるが、好ましくはカラム容量の3～7倍であり、より好ましくは5倍程度である。

レクチンへの結合画分は、溶出用緩衝液をカラムに添加し、溶出画分を回収することによって得ることができる。溶出用緩衝液は、ハプテン糖を含んでおり、それによりレクチンに結合したPSAをレクチンから分離させることができる。ハプテン糖はレクチンの特異性によって適宜選択することが可能であるが、TJA-I Iの場合は、ラクトースなどをハプテン糖として用いることができ、例えば10mMラクトース、0.1%牛血清アルブミン（BSA）含有リン酸緩衝液を用いて、溶出画分を回収することができる。また、WFAの場合は、GalNAcなどをハプテン糖として用いることがで

き、例えば10mMGaINAc、0.1%牛血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝液を用いて、溶出画分を回収することができる。溶出用緩衝液の容量は、適宜選択することが可能であるが、好ましくはカラム容量の3~7倍であり、より好ましくは5倍程度である。溶出の温度も特に限定されるものではないが、0°C~40°C、好ましくは2~25°C、より好ましくは4~20°Cで行うことができる。0°C未満では、カラムが凍結してしまうことがあり、40°Cを超えるとレクチンに親和性のないタンパク質の非特異結合が起こることがある。例えば、TJA-IIからPSAを溶出させる温度は、特に限定されるものではないが、室温で溶出させるのが好ましい。また、WFAからPSAを溶出させる温度も、特に限定されるものではないが、室温で溶出させるのが好ましい。

[0034] 前記判定段階(b)における、レクチンに親和性のあるPSAの量の判定は、

- (1) 分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、
 - (2) 分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、又は
 - (3) 分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないPSA量の測定による判定
- を挙げることができる。

[0035] 前記分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定(1)は、前記レクチンへの結合画分中のPSA量を定量的又は半定量的に測定することによって行うことができる。すなわち、患者の血液中に含まれているレクチンに親和性のあるPSAの絶対量を測定することによって、判定を行うものである。

[0036] 前記分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定(2)は、分別前の試料中のPSA量(又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のPSA量の合計量)と前記レクチンへの結合画分中のPSA量とを比較することによって

行うことができる。具体的には、分別前の試料中のPSA量（又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のPSA量の合計量）に対する、前記レクチンへの結合画分中のPSA量の割合を計算することによって、レクチンに親和性のあるPSAの量を判定することが可能であり、例えば、以下のいずれかの式によって求めることができる。

$$\text{PSAの結合率} = (\text{結合画分中のPSA量} / \text{結合画分及び非結合画分のPSAの合計量}) \times 100\%$$

$$\text{PSAの結合率} = (\text{結合画分中のPSA量} / \text{分別前の試料中のPSA量}) \times 100\%$$

[0037] また、分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないPSA量の測定による判定（3）は、分別前の試料中のPSA量（又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のPSA量の合計量）と前記レクチンへの非結合画分中のPSA量とを比較することによって行うことができる。具体的には、分別前の試料中のPSA量（又は、前記レクチンへの結合画分及びレクチンへの非結合画分のPSA量の合計量）から、前記レクチンへの非結合画分中のPSA量を減算することによって、レクチンに親和性のあるPSAの量を判定することが可能である。例えば、以下のいずれかの式によって求めることができる。

$$\text{レクチン親和性PSA量} = \text{分別前の試料中のPSA量} - \text{非結合画分中のPSA量}$$

$$\text{レクチン親和性PSA量} = \text{結合画分及び非結合画分のPSAの合計量} - \text{非結合画分中のPSA量}$$

[0038] 前記（1）及び（2）の判定では、レクチンに結合したPSAをレクチンから分離してその量を測定するが、前記（3）の判定のうち、分別前の試料中のPSA量と非結合画分中のPSA量とからの判定では、レクチンに結合したPSA量を測定しないため、レクチンに結合したPSAを分離せずに判定することもできる。

また、分取した結合画分及び非結合画分のPSA量は、すべての画分につ

いてPSA量の測定を行うことが好ましいが、予めPSAが含まれる分取画分を調べておき、その画分について測定を行い、PSAの分析を行うことも可能である。

[0039] 前記判定段階（b）において、レクチンに親和性のあるPSA量を判定するためのPSAの測定方法としては、PSAを定量的又は半定量的に判定することのできる方法であれば、特に限定されるものではないが、トータルPSAの測定方法又はフリーPSAの測定方法を用いることができる。トータルPSAの測定方法又はフリーPSAの測定方法は、定法に従い、抗体又はその断片を用いる免疫学的手法（例えば、酵素免疫測定法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、免疫組織染色法、又はウエスタンブロット等）によって測定することができ、PSA測定キットとして市販されているものを使用することも可能である。

[0040] トータルPSAの測定方法に免疫学的分析方法を用いる場合には、PSA-ACT及びフリーPSAの両方のPSAに結合することのできるモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体を用いる。一方、フリーPSAの測定方法に免疫学的分析方法を用いる場合には、フリーPSAのみに結合することのできるモノクローナル抗体、又はポリクローナル抗体を用いる。モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、免疫抗原としてPSA-ACT又はフリーPSAを用いること以外は、公知の方法によって作製することが可能であり、例えば、モノクローナル抗体は、KoehlerとMilsteinの方法（Nature 256：495-497, 1975）に従って、作製することができる。また、ポリクローナル抗体は、例えば、ウサギの皮内に、PSA-ACT又はフリーPSAを単独もしくはBSA、KLHなどと結合させた抗原として、単純あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で採血し、そのまま抗血清として、又は抗体を公知の方法で精製して使用することができる。

[0041] 後述の実施例の解析により、本発明のPSAの分析方法に用いることので

きるT J A - I I又はW F Aを用いたレクチンアフィニティーカラムは、試料中のP S Aを約1 0 0 %（少なくとも、9 7 %以上）回収することが可能であることが分かった。これに対して、特許文献1に記載のM A Aの場合は、溶出液として乳糖含有リン酸緩衝液を用いた回収率は3 0 ~ 7 0 %であり、溶出液を、0. 1 M酢酸液に変更しても、回収率は改善されなかった。

[0042] 《分析方法（B）》

前記分析方法（B）は、レクチンにより直接レクチンに親和性のあるP S Aを検出する方法であるが、具体的には、電気泳動によるレクチンブロット、又はドットブロットによるレクチンブロットを挙げることができる。どちらのレクチンブロットも、定法に従って行うことができるが、電気泳動によるレクチンブロットの場合、P S Aを含む可能性のある試料を電気泳動し、ニトロセルロース膜、P V D F膜にP S Aを転写し、サンプルメンブレンとして用いる。ドットブロットによるレクチンブロットの場合、ドットブロット装置により、P S Aを含む可能性のある試料をニトロセルロース膜、又はP V D F膜などに吸着させ、サンプルメンブレンとして用いる。サンプルメンブレンは、ブロッキングバッファーでブロッキングを行い、ビオチン標識したレクチン、例えばビオチン標識W F A又はビオチン標識T J A - I Iを含む溶液中で接触させる。その後、発色酵素、又は発光酵素、例えばH R Pで標識されたアビジンと接触させ、発色液又は発光液を接触させ、得られたシグナルを検出する。

[0043] 更に、レクチンにより直接レクチンに親和性のあるP S Aを検出する方法（B）としては、イムノブロット及び酵素免疫法を一部変更して行うことができる。具体的には、前記P S Aに対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を、ニトロセルロース膜など、又はE L I S Aプレートなどに固相化し、ブロッキングバッファーでブロッキングを行う。P S Aを含む可能性のある試料をニトロセルロース膜、又はE L I S Aプレートなどに接触させ、次にビオチン標識したレクチン、例えばビオチン標識W F A又はビオチン標識T J A - I Iを接触させる。その後、発色酵素、又は発光酵素、例え

ばHRPで標識されたアビジンを結合させ、発色液又は発光液によりシグナルを検出することができる。

[0044] 本発明のPSAの分析方法に用いる被検試料としては、PSAを含む生体試料若しくは生体由来試料か、又はPSAを含む可能性のある生体試料若しくは生体由来試料を挙げることができ、例えば、尿、血液、血清、血漿、髄液、唾液、細胞、組織、若しくは器官、又はそれらの調整物（例えば、生検標本、特には、前立腺の生検標本）等を挙げることができ、血液、血清、血漿、又は前立腺の生検標本が好ましく、特には血液、血清、又は血漿が好ましい。健常人及び前立腺肥大症患者の血液、血清、又は血漿中には、 β -N-アセチルガラクトサミン残基及び/又はフコース α （1，2）ガラクトース残基を有するPSAは、ほとんど存在しておらず、前立腺癌患者においては、病期の初期から血液中に放出されるために、前立腺癌を検出するための被検試料として適当であるからである。

[0045] 前記尿、血液、血清、血漿、髄液、唾液などの液性の試料は、前記分析方法（A）又は分析方法（B）において、それぞれの分析方法に応じて適当な緩衝液により希釈して使用することができる。また、細胞、組織、又は器官などの固形の試料は、固形の試料の体積の2～10倍程度の適当な緩衝液でホモジェナイズして、懸濁液又はその上清を、前記分析方法（A）又は分析方法（B）において、そのまま、又は更に希釈して使用することができる。

例えば、前記分析方法（A）において、レクチンアフィニティーカラムを用いる場合、前記液体試料、又は固形の試料の懸濁液若しくはその上清は、適当な緩衝液により希釈して用いることができる。希釈倍率は、レクチンとPSAとの結合が阻害されなければ、特に限定されないが、好ましくは2～400倍であり、より好ましくは2～300倍であり、最も好ましくは4～200倍である。また、レクチンアフィニティーカラムにアプライする試料の容量は、カラムのベッドボリュームの40%以下が好ましく、30%以下がより好ましく、20%以下が、最も好ましい。例えば1mLのベッドボリュームのレクチンアフィニティーカラムを用いる場合、400 μ L以下が好

ましく、300 μ L以下がより好ましく、200 μ L以下が最も好ましい。

[0046] [2] 前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法

前記PSAの分析方法により、試料中のレクチンに親和性のあるPSAの量を分析することにより、前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別することができる。

前記PSAの分析方法により、レクチンに親和性のあるPSAの量を測定し、前立腺肥大症又は健常人から採取した血液等中のレクチンに親和性のあるPSAの量と比較することにより、前記患者が前立腺癌であるか否かを判定することができる。より具体的には、前立腺肥大症又は健常人の試料中に存在するレクチンに親和性のあるPSAと比べて、前記患者の試料中に存在するレクチンに親和性のあるPSAが有意に多い場合に前記患者は前立腺癌であると判定することができる。

前記分析方法(A)においては、 β -N-アセチルガラクトサミン残基及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基を認識するTJA-IIへの結合率と、 β -N-アセチルガラクトサミン残基のみを認識するWFAへの結合率が異なっている。従って、使用するレクチンの測定値によって、前立腺癌と前立腺肥大症とを鑑別することのできるカットオフ値を、それぞれ決定することが好ましい。カットオフ値は、前立腺癌患者の100%を陽性と判定でき、前立腺肥大症患者の100%を陰性と判定できる値が最も好ましい。もし、分析した前立腺癌と前立腺肥大症の母集団が増加することによって、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者との間の測定値が、オーバーラップした場合は、前立腺癌患者が100%陽性と判断される値をカットオフ値として選択することが好ましいが、オーバーラップした範囲の任意の値をカットオフ値とすることも可能である。具体的には、後述の実施例のTJA-II結合画分中のPSA量を測定した場合、前立腺癌患者の検出のためのカットオフ値は、前立腺癌患者のPSAを検出することのできる値であれば、限定されないが、例えば200 pg/mLを超え、240 pg/mL未満に設定することが可能であり、好ましくは、220 pg/mLである。

また、後述の実施例のレクチンへのPSAの結合率は、下記の式で得ることのできる百分率から決定することができる。

$$\text{PSAの結合率} = (\text{結合画分中のPSA量} / \text{分別前の試料中のPSA量}) \times 100\%$$

PSAの結合率のカットオフ値も、前立腺癌患者の100%を陽性と判定でき、前立腺肥大症患者の100%を陰性と判定できる値が最も好ましい。もし、分析した前立腺癌と前立腺肥大症の母集団の増加によって、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者との間で、レクチンへのPSAの結合率が、オーバーラップする場合は、前立腺癌患者が100%陽性と判断される値が好ましいが、オーバーラップした範囲の任意の値をカットオフ値とすることも可能である。具体的には、後述の実施例のPSAのTJA-II結合率のカットオフ値は前立腺癌を検出することのできる値であれば、限定されないが、例えば1.8%を超え、3%未満に設定することが可能であり、好ましくは2.4%である。

[0047] [3] 前立腺癌の診断キット

本発明の診断キットは、 β -N-アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチンを含む。また、本発明の診断キットは、フコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性のあるレクチンを含むこともできる。更に、本発明の診断キットは、 β -N-アセチルガラクトサミン残基(GalNAc β 1 \rightarrow R)及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含むこともできる。本発明の診断キットに含まれるレクチンは、上記担体に結合させた状態のものも含まれる。

[0048] 本発明の診断キットは、前記 β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン、フコース α (1, 2)ガラクトース残基に親和性のあるレクチン、並びに β -N-アセチルガラクトサミン残基及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを、1つ又は2つ以上組み合わせて含むことができる。

[0049] β -N-アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチンとしては、

特に限定されるものではないが、T J A - I I 及びW F A を挙げるができる。また、フコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性のあるレクチンとしては、特に限定されるものではないが、U E A - I 及びT J A - I I を挙げるができる。更に、 β - N - アセチルガラクトサミン残基 (G a I N A c β 1 \rightarrow R) 及びフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンとしては、T J A - I I を挙げるができる。

[0050] 本発明の診断キットは、更に抗P S A 抗体（例えば、P S A - A C T 又はフリーP S A に特異的に結合する抗体）又はその断片を含むことができる。前記抗体としては、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれを用いることもできる。前記抗体断片としては、P S A - A C T 又はフリーP S A への特異的結合能を保持する限り、特に限定されるものではなく、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、又はF v を用いることができる。

[0051] 前記レクチン及び抗P S A 抗体を含む、本発明の診断キットは、用いる免疫学的手法に応じて、所望の形態で前記抗P S A 抗体、又はその断片を含むことができる。

例えば、標識化抗体を用いる免疫学的手法、例えば、酵素免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、又は放射免疫測定法などの場合には、標識物質で標識した標識化抗体又は標識化抗体断片の形態で含むことができる。標識物質の具体例としては、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β - D - ガラクトシダーゼ、又はグルコースオキシダーゼ等を、蛍光物質としてフルオレセインイソチアネート又は希土類金属キレート等を、放射性同位体として³H、¹⁴C、又は¹²⁵I等を、その他、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質等を挙げるができる。酵素又は化学発光物質等の場合には、それ自体単独では測定可能なシグナルをもたらすことはできないことから、それぞれ対応する適当な基質等を選択して含むことが好ましい。

[0052] 《作用》

グレーゾーンのP S A 値（トータルP S A 値が4 ~ 1 0 n g / m L）を示

す患者においては、前記のように血清試料のフリーPSA／トータルPSA比（F／T値）の測定が行われている。表1に示すように、前立腺肥大症患者9例中7例において、F／T値が25%以下を示しており、これらの患者は、確定診断のための生検の対象となるが、実際には前立腺肥大症であり、患者にとって過度の負担となっている。

本発明に用いることのできるTJA-I Iは糖鎖の非還元末端に存在するフコース α （1，2）ガラクトース残基及び β -N-アセチルガラクトサミン残基を認識するレクチンである。WFAは糖鎖の非還元末端に存在する β -N-アセチルガラクトサミン残基を認識するレクチンである。また、UEA-Iは糖鎖の非還元末端に存在するフコース α （1，2）ガラクトース残基を認識するレクチンである。本明細書によって、前立腺癌患者の体内にTJA-I I及びWFAと結合するPSAが存在することが示され、すなわち、癌化に伴ってPSA糖鎖に、これらの糖鎖構造が出現することが、初めて示されたものである。前記のように前立腺癌由来のLNCaP細胞のPSAは、非還元末端側にHexNAc β 1-HexNAc残基持つことが報告されている。HexNAcには、 β -N-アセチルガラクトサミン（GalNAc β ）及び β -N-アセチルグルコサミン（GlcNAc β ）が含まれるが、質量分析では分子量が同一となり、区別することができない。また、このLNCaP細胞から分泌されるPSAの糖鎖は、シアル酸を欠如していることなどから、前立腺癌患者の生体のPSAを反映していないと考えられていた。従って、本明細書において、TJA-I Iカラム、WFAカラム及びUEA-Iカラムを用いることによって、前立腺癌患者の血清PSAにおける非還元末端 β -N-アセチルガラクトサミン、及びフコース α （1，2）ガラクトース残基を初めて同定できたものである。癌化に伴うPSA糖鎖構造の変化、すなわちフコース α （1，2）ガラクトース残基あるいは β -N-アセチルガラクトサミン残基の出現は、前立腺癌の発症によって、糖鎖の合成に関わる糖転移酵素活性量の変化が背景にあるものと考えられる。

[0053] また、特許文献1及び非特許文献2に記載のように、前立腺癌における糖

鎖の構造変化を $\text{NeuAc}\beta 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ を特異的に認識する MAA で検出しようとする場合に、一定の割合の血中 PSA は、血清 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシンと結合した PSA-ACT の状態で存在している。MAA は $\alpha 1$ -アンチキモトリプシンとも結合するため、PSA の糖鎖構造が異なっているにもかかわらず、 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシンと結合した PSA は分別することができない。従って、MAA で PSA を分別した場合は、フリー PSA を測定する必要がある。

一方、本発明で用いることのできる TJA-II は PSA 糖鎖の非還元末端に存在するフコース $\alpha (1, 2)$ ガラクトース残基又は β -N-アセチルガラクトサミン残基を認識し、WFA は PSA 糖鎖の非還元末端に存在する β -N-アセチルガラクトサミン残基を認識するが、これらの糖鎖構造は血清 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシン上には存在しないため、トータル PSA 測定キットを用いて定量することが可能である。一般的にフリー PSA 量はトータル PSA 量の 20% 以下であり、本発明の分析方法においてはトータル PSA 測定キットを用いることのできるため、非特許文献 2 及び特許文献 1 に記載の発明と比較して感度の上で有利である。

実施例

[0054] 以下に実施例及び比較例を示し本発明の具体的な説明を行うが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

[0055] 《TJA-II 精製例》

キカラスウリ (*Trichosanthes japonica*) の根塊 20 g より、既報 (Yamashita et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 25441-25422, 1992) に従って、TJA-II を精製した。具体的には、キカラスウリの塊根を細かく細断し、ワーリングブレンダーを用いて、0.15M NaCl を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 16 mL でホモジェナイズした。1000 x g で 30 分遠心し、得られた上清の 35~55% 飽和の硫酸分画沈殿物を水に溶解し、蒸留水で透析した。凍結乾燥後、435 mg の 35~55% 飽和の硫酸沈殿物を 6 mL の PBS に溶解し、PBS で平衡化した porcine stomach mucin セ

ファロース4B（10mg/mLゲル）カラム10mLにアプライした。カラムを洗浄した後、0.1Mラクトースを含むPBSで溶出し、TJA-IIを得た。

[0056] 《カラム作製例》

精製したTJA-IIを用いて、セファロースカラムにカップリングさせ、TJA-IIカラム及びWFAカラムを作製した。具体的には、CNBr-Sepharose（GE healthcare社製）を用い、メーカーの推奨する添付のプロトコールに従い、ゲル容積1mLあたり3mgの密度でTJA-II結合させ、TJA-IIカラムを作製した。

また、WFA（EYラボラトリー社製）及びCNBr-Sepharose（GE healthcare社製）を用いて、同様にWFAカラムを作製した。

[0057] 《実施例1：TJA-IIを用いたPSAの分析》

本実施例では、前記カラム作製例において作製したTJA-IIカラムを用いて、前立腺癌と診断された15人の患者及び前立腺肥大症と診断されたトータルPSAが4.0ng/mL以上の9人の患者について、本発明のPSAの分析方法によりPSAの量を測定した。

4°Cの条件下で、TJA-IIカラム（1mL容量）を0.1%牛血清アルブミン（BSA）含有リン酸緩衝液で平衡化した。血清試料1μL~50μLをリン酸緩衝液で希釈し、200μLとして、カラムにアプライし、30分保持した。その後、5倍容量の洗浄用緩衝液（0.1%BSA含有リン酸緩衝液）でカラムを洗浄し、各1mLずつ分画してTJA-II非結合画分を得た。カラムを室温に戻した後、5倍容量の溶出緩衝液（10mMラクトース、0.1%BSA含有リン酸緩衝液）で、1mLずつ分画して溶出し、TJA-II結合画分を得た。TJA-IIカラムによる分別前の血清試料、TJA-II非結合画分、及びTJA-II結合画分について、トータルPSA量を、アクセスハイブリテックトータルPSA（ベックマンコールター社製）を用いて測定した。TJA-IIカラムからのPSA回収率は常

に97%~100%であった。表1に分別前の血清試料のPSA量、TJA-I結合画分のPSA量、及びPSAのTJA-I結合率を示す。なお、TJA-I結合率は次の式により計算した。

$$\text{TJA-I結合率} = (\text{TJA-I結合画分中のPSA量} / \text{TJA-I非結合画分及びTJA-I結合画分中のPSA量}) \times 100\%$$

また、分別前の血清試料のフリーPSAを、アクセスハイブリテックフリーPSA（ベックマンコールター社製）を用いて測定した。前記トータルPSAの量及びフリーPSAの量から、フリーPSA/トータルPSA比を計算した。結果を表1、図2及び図3に示す。なお、癌患者の、年齢、病期（ステージ）、グリソンスコアは表2に示した。病期（ステージ）は、前立腺癌の進展度を示したものである。また、グリソンスコアは、前立腺癌の悪性度を、病理学上の分類によって5段階に分けたものである。「1」が最もおとなしい癌で、「5」が最も悪い癌を意味するが、前立腺癌の多くは、複数の、悪性度の異なる成分を有しているため、最も多い成分と次に多い成分を足し算してスコア化したものが、グリソンスコアである。例えば、最も多い成分が「3」で次に多い成分が「4」の場合、グリソンスコアは「3」+「4」=「7」となる。グリソンスコアが「6」以下は悪性度の低いもの、「7」は中程度の悪性度、「8」~「10」は悪性度の高い癌と考えられている。

[0058]

[表1]

検体	分別前の 血清試料のPSA量 (ng/mL)	TJA-II結合 画分中のPSA量 (ng/mL)	TJA-II非結合 画分中のPSA量 (ng/mL)	TJA-II結合率 (%)	フリーPSA/トータルPSA比
前立腺肥大症 1	17.00	0.20	16.3	1.2	19.0
前立腺肥大症 2	10.40	<0.005	10.1	<0.05	5.0
前立腺肥大症 3	10.20	0.02	9.87	0.2	79.0
前立腺肥大症 4	6.80	0.04	6.56	0.6	76.0
前立腺肥大症 5	8.30	0.12	7.93	1.5	22.0
前立腺肥大症 6	9.60	0.17	9.14	1.8	7.0
前立腺肥大症 7	8.00	<0.005	7.75	<0.05	6.0
前立腺肥大症 8	9.20	0.09	8.83	1.0	16.0
前立腺肥大症 9	8.20	<0.005	7.95	<0.05	12.0
前立腺癌 1	892.20	128.00	808.30	6.4	4.5
前立腺癌 2	101.00	6.60	92.92	5.0	11.9
前立腺癌 3	69.90	2.40	65.70	3.0	4.9
前立腺癌 4	944.80	9.50	873.95	4.5	16.8
前立腺癌 5	180.00	6.30	162.00	7.0	7.8
前立腺癌 6	3597.00	388.50	3100.60	10.8	3.9
前立腺癌 7	68.00	5.58	60.38	8.2	13.0
前立腺癌 8	4.30	0.90	3.27	21.0	NT
前立腺癌 9	6.00	0.84	4.98	14.0	NT
前立腺癌 10	10.00	0.46	9.24	4.6	NT
前立腺癌 11	4.50	1.04	3.32	23.0	NT
前立腺癌 12	53.80	4.30	47.88	8.0	17.0
前立腺癌 13	4.70	0.24	4.32	5.0	13.5
前立腺癌 14	21.20	0.85	19.71	4.0	10.0
前立腺癌 15	12.10	0.61	11.13	5.0	10.0

[0059]

[表2]

検体	年齢	病期 (ステージ)	グリソンスコア
前立腺肥大症 1	74	—	—
前立腺肥大症 2	75	—	—
前立腺肥大症 3	65	—	—
前立腺肥大症 4	70	—	—
前立腺肥大症 5	65	—	—
前立腺肥大症 6	52	—	—
前立腺肥大症 7	71	—	—
前立腺肥大症 8	71	—	—
前立腺肥大症 9	52	—	—
前立腺癌 1	83	3 c	7
前立腺癌 2	77	3 b	9
前立腺癌 3	66	3 b	9
前立腺癌 4	64	3 b	9
前立腺癌 5	81	4	9
前立腺癌 6	81	3 c	7
前立腺癌 7	83	3 b	9
前立腺癌 8	unknown	ND	ND
前立腺癌 9	unknown	ND	ND
前立腺癌 10	unknown	ND	ND
前立腺癌 11	unknown	ND	ND
前立腺癌 12	74	3 b	9
前立腺癌 13	59	1 c	7
前立腺癌 14	64	1 c	7
前立腺癌 15	64	2 a	9

[0060] 図2及び図3に示すように、TJA-II結合画分中のPSA量、及びTJA-II結合率は、いずれも前立腺癌患者と前立腺肥大症患者との間で重複することなく、前立腺癌患者と前立腺肥大症患者を鑑別することができることを示している。暫定的に、TJA-II結合画分中のPSA量のカットオフ値を250 pg/mL、TJA-II結合率のカットオフ値を2%とす

ると、100%の精度で前立腺肥大症患者と前立腺癌患者を区別することが可能である。異なる臨床ステージ、グリソンスコアにおいても、TJA-I I結合率とTJA-I I結合PSA量には有意な差が認められなかった。

[0061] 《実施例2》

本実施例では、前記カラム製造例で製造したWFAカラムを用いて、前立腺癌と診断された3人の患者について、本発明のPSAの分析方法によりPSAの量を測定した。

具体的には、TJA-I Iカラムと溶出液（10mMラクトース、0.1%BSA含有リン酸緩衝液）に代えて、WFAカラムと溶出緩衝液（10mM GalNAc、0.1%BSA含有リン酸緩衝液）を用いたことを除いては、前記実施例1の操作を繰り返し、前立腺癌患者の3人の血清試料を分析し、WFA結合画分中のPSA量及びWFA結合率を得た。WFA結合率の結果を表3に示す。

なお、WFA結合率は次の式により計算した。

$$\text{WFA結合率} = (\text{WFA結合画分中のPSA量} / \text{WFA非結合画分及びWFA結合画分中のPSA量}) \times 100\%$$

また、比較のためにTJA-I I結合率を表3に示す。

[0062] [表3]

検体	分別前の血清試料のPSA量 (ng/mL)	WFA結合画分中のPSA量 (ng/mL)	WFA非結合画分中のPSA量 (ng/mL)	WFA結合率 (%)	TJA-I I結合率 (%)
前立腺癌6	3597.00	327.98	3161.11	9.4	10.8
前立腺癌12	53.80	3.91	48.27	7.5	8.0
前立腺癌15	12.10	0.49	11.50	4.2	5.0

WFAカラムからのPSA回収率は、90%~98%であった。また、WFAの結合率は、TJA-I I結合率とほぼ相関しており、WFAはβ-N-アセチルガラクトサミン残基を有するPSAと結合して、前立腺癌患者のPSAを分別することが可能である。

但し、WFA結合率は、TJA-I I結合率よりやや低く、84.0%~

93. 8%である。このことは、前立腺癌患者の血液中には、TJA-IIのみに親和性のあるPSAが存在する可能性を示している。すなわち、β-N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAcβ1→R) を有さず、フコースα(1, 2)ガラクトース残基 (Fucα1→2Galβ1→R) のみを有しているPSAが存在する可能性を示唆している。

[0063] 《実施例4》

本実施例では、前立腺肥大症の患者血清中のPSA、前立腺癌の患者血清中のPSA、及び精漿中のPSAについて、TJA-IIカラム、UEA-Iカラム、又はWFAカラムへのそれぞれのPSAの結合率を調べた。

TJA-IIカラムへの結合率の測定は、実施例1に記載の方法に従った。WFAカラムへの結合率の測定は、実施例2に記載の操作に従った。

また、UEA-Iカラムへの結合率の測定は、以下のように行った。ハリエニシダアグルチニン-I (Ulex europaeus agglutinin-I : UEA-I) の結合したアガロース (UEA-Iアガロース : ジオイルミルズ) を用いて、UEA-Iに結合するPSAの量を測定した。具体的には、TJA-IIカラムと溶出液 (10mMラクトース、0.1%BSA含有リン酸緩衝液) に代えて、UEA-Iアガロースと溶出緩衝液 (50mM fucose、0.1%BSA含有リン酸緩衝液) を用いたことを除いては、前記実施例1の操作を繰り返し、UEA-I結合率を測定した。結果を表4に示す。

[0064] [表4]

レクチン	認識糖鎖	前立腺肥大症の患者血清のPSA	前立腺癌の患者血清のPSA	精漿中PSA
TJA-II	Fucα1→2Galβ1→4(3)GlcNAc 及び GalNAcβ1→	2.0%	16%	2%
UEA-I	Fucα1→2Galβ1→4GlcNAc	<1%	5%	<1%
WFA	GalNAcβ1→	<1%	11%	<1%

[0065] 前立腺肥大症の患者血清中のPSAは、TJA-IIカラム、UEA-Iカラム、又はWFAカラムにほとんど結合しない。一方、前立腺癌患者血清中のPSAは、TJA-IIカラムに16%のPSAが結合し、UEA-I

カラムに5%のPSAが結合し、WFAカラムに11%のPSAが結合する。これらのデータは、前立腺癌患者血清中のPSAは、非還元末端 β -N-アセチルガラクトサミン、及び/又はフコース α (1, 2)ガラクトース残基を有していることを示している。

[0066] 《比較例1》

本比較例では、特許文献1に記載のレクチンであるMAAを用いて、前立腺癌患者のPSAの分別及び測定を行った。

MAAの精製は、既報(Kawaguchi et al., J. Biol. Chem., 249, 2786-2792, 1974)の方法に従った。具体的には、イヌエンジュマメ (*Maackia amurensis*) の種子50gを数百mLのPBSでホモジナイザーにより細くなるまでホモジナイズし、更に一晩攪拌後、9000rpm30分遠心分離にて沈殿物を除いた。この抽出液(210mL)の50~80%の硫酸分画画分をPBSに透析し、遠心操作で沈殿を除いた後、一部(30mL)をチログロブリンセファロース(19mg/mL、15mL)に添加し、PBSで洗浄後、0.1Mラクトース、0.075M NaCl含有0.15Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.5)で溶出する。レクチン活性の高い部分をプールし濃縮後、50mMリン酸緩衝液(pH4.5)に透析にて置換する。遠心操作で沈殿を除去後、50mMリン酸緩衝液(pH4.5)で平衡化したSPセファデックスC-50(100mL)に添加し、非吸着画分を集め濃縮し、精製MAAを得た。

[0067] 精製したMAAを用いて、セファロースカラムを作製した。CNBr-Sepharose (GE healthcare社製)を用い、メーカーの推奨する添付のプロトコールに従い、ゲル容積1mLあたり3mgの密度でMAAを結合させ、MAAカラムを作製した。

[0068] まず、MAAカラムのシアル酸 α (2, 3)ガラクトース残基との結合特性を確認するため、シアル酸 α (2, 3)ガラクトースを3残基有するオリゴ糖を用いて結合を確認した。4°Cの条件下で、MAAカラム(1mL容量)を0.1%牛血清アルブミン(BSA)及び0.02%Tween含有リ

ン酸緩衝液で平衡化した。シアル酸 α (2, 3) ガラクトースを3残基有する複合型3本鎖オリゴ糖を含む試料をカラムにアプライし、30分保持した。その後、5倍容量の洗浄用緩衝液(0.1%BSA、0.02%Tween含有リン酸緩衝液)でカラムを洗浄し、各1mLずつ分画してMAA非結合分画を得た。カラムを室温に戻した後、5倍容量の溶出緩衝液(400mMラクトース、0.1%BSA、0.02%Tween含有リン酸緩衝液)で、1mLずつ分画して溶出し、MAA結合画分を得た。前記シアル酸 α (2, 3) ガラクトースを3残基有するオリゴ糖は、カラムに結合せず、95%以上がMAA非結合分画に回収された。

[0069] 次に、このMAAカラムを用いて、前立腺癌患者のPSAのMAAカラムへの結合を調べた。4°Cの条件下で、MAAカラム(1mL容量)を0.1%牛血清アルブミン(BSA)及び0.02%Tween含有リン酸緩衝液で平衡化した。血清試料10 μ Lをリン酸緩衝液で希釈し、200 μ Lとして、カラムにアプライし、30分保持した。その後、5倍容量の洗浄用緩衝液(0.1%BSA、0.02%Tween含有リン酸緩衝液)でカラムを洗浄し、各1mLずつ分画して5つのMAA非結合分画を得た。カラムを室温に戻した後、5倍容量の溶出緩衝液(400mMラクトース、0.1%BSA、0.02%Tween含有リン酸緩衝液)で、1mLずつ分画して溶出し、5つのMAA結合画分を得た。それぞれの画分について、トータルPSA量を、アクセスハイブリテックトータルPSA(ベックマンコールター社製)を用いて測定した。対照として、精製した正常フリーPSA5ngを用いて、同じ操作を繰り返し、トータルPSA量を測定した。前立腺癌患者のPSAの結果を図4(B)に、正常フリーPSAの結果を図4(A)に示す。

[0070] 正常フリーPSAは、ほとんどが2番目のMAA非結合分画に検出された。しかしながら、すべての画分のPSAの量を合計した正常フリーPSA量は、MAAカラムにアプライした、5ngの正常フリーPSAに対して、3.5ngであり、回収率は70%であり、30%がカラムに結合したままで

あると考えられた。

一方、前立腺癌患者のPSAは、2番目のMAA非結合分画に検出される未吸着のPSA、3番目のMAA非結合分画の肩の部分に検出されるわずかに吸着するPSA、及び400mMラクトースで溶出される吸着PSAに分かれた。すべての画分のPSA量を合計すると4ng/mLであり、分別前の血清試料のPSA量である10ng/mLに対して、40%程度しか回収されなかった。この回収率は、溶出溶液として、0.1M酢酸溶液を用いても改善されなかった。更に、用いた前立腺癌患者のPSAは、フリーPSA/トータルPSA比が3.6であり、96.4%のPSAが α -アンチキモトリプシンと結合したPSA-ACTの状態が存在している。 α -アンチキモトリプシンは、1分子あたりシアル酸 α (2,3)ガラクトース残基を1残基有しているため、PSA-ACTは、MAAカラムと結合するはずであるが、多くのPSAが2番目のMAA非結合分画に検出される未吸着のPSA、及び3番目のMAA非結合分画の肩の部分に検出されるわずかに吸着するPSAとして検出された。

[0071] すなわち、シアル酸 α (2,3)ガラクトースを3残基有するオリゴ糖が、MAAカラムに結合しないこと、及びPSA-ACTのうち結合しないものが存在することは、MAAレクチンカラムに対するPSAの結合が弱いことを示している。しかしながら、PSAのMAAへの結合が弱いにもかかわらず、PSAの回収率は悪く、ハプテン糖による溶出が困難であり、MAAで再現性よく正確に測定することは、困難であると考えられた。

産業上の利用可能性

[0072] 本発明のPSAの分析方法及びPSAの分析キットは、前立腺癌と前立腺肥大症の患者を確実に鑑別することが可能である。従って、健康診断において、前立腺癌を早期に発見することができる。また、前立腺癌と前立腺肥大症とを確実に鑑別することができるため、確定診断のために行う前立腺の生検の対象者を減少させることができ、患者の負担を軽減させることができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請求の範囲

- [請求項1] β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンと、PSAを含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のあるPSAの量を判定することを特徴とする、PSAの分析方法。
- [請求項2] (a) 前記 β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチンとPSAを含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のあるPSAと前記レクチンに親和性のないPSAとを分別する段階、及び
- (b) 前記試料中のレクチンに親和性のあるPSAの量を判定する段階を含む、請求項1に記載のPSAの分析方法。
- [請求項3] 前記レクチンに親和性のあるPSA量の判定が、分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のあるPSA量の測定による判定、又は分別前の試料中のPSA量の測定、及び分別されたレクチンに親和性のないPSA量の測定による判定である請求項2に記載のPSAの分析方法。
- [請求項4] 前記PSA量の測定が、トータルPSA又はフリーPSAの測定である、請求項3に記載のPSAの分析方法。
- [請求項5] 前記レクチンが、キカラスウリレクチン-I I又はノダフジレクチンである、請求項1～4のいずれか一項に記載のPSAの分析方法。
- [請求項6] 前記レクチンが、更にフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである、請求項1～4のいずれか一項に記載のPSAの分析方法。
- [請求項7] 前記試料が、前立腺癌の疑いのある患者から得られた試料である、請求項1～6のいずれか一項に記載のPSAの分析方法。
- [請求項8] 前立腺癌の診断用である、請求項1～7のいずれか一項に記載のP

S A の分析方法。

[請求項9] フコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、

P S A を含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする、P S A の分析方法。

[請求項10] (a) 前記フコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと P S A を含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある P S A と前記レクチンに親和性のない P S A とを分別する段階、及び

(b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階を含む、請求項 9 に記載の P S A の分析方法。

[請求項11] β - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S A を含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定することを特徴とする、P S A の分析方法。

[請求項12] (a) 前記 β - N - アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース α (1, 2) ガラクトース残基と親和性を有するレクチンと、P S A を含む可能性のある試料とを接触させることにより、前記レクチンに親和性のある P S A と前記レクチンに親和性のない P S A とを分別する段階、及び

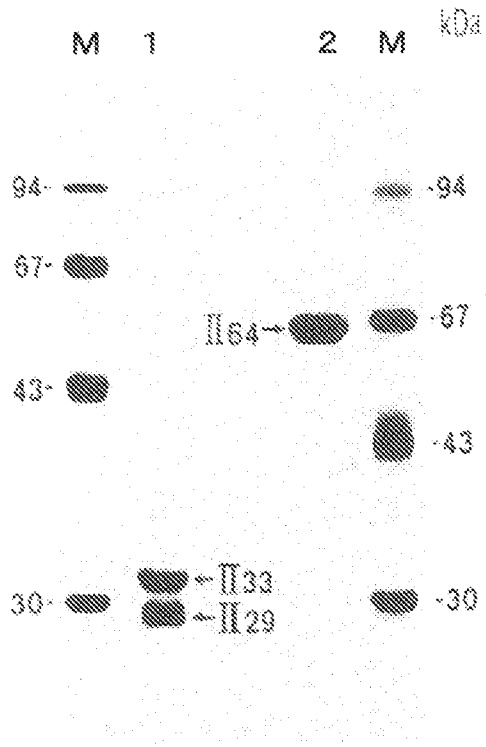
(b) 前記レクチンに親和性のある P S A の量を判定する段階を含む、請求項 1 1 に記載の P S A の分析方法。

[請求項13] 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の P S A の分析方法により、試料中のレクチンに親和性のある P S A の量を分析することを特徴とする、前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別方法。

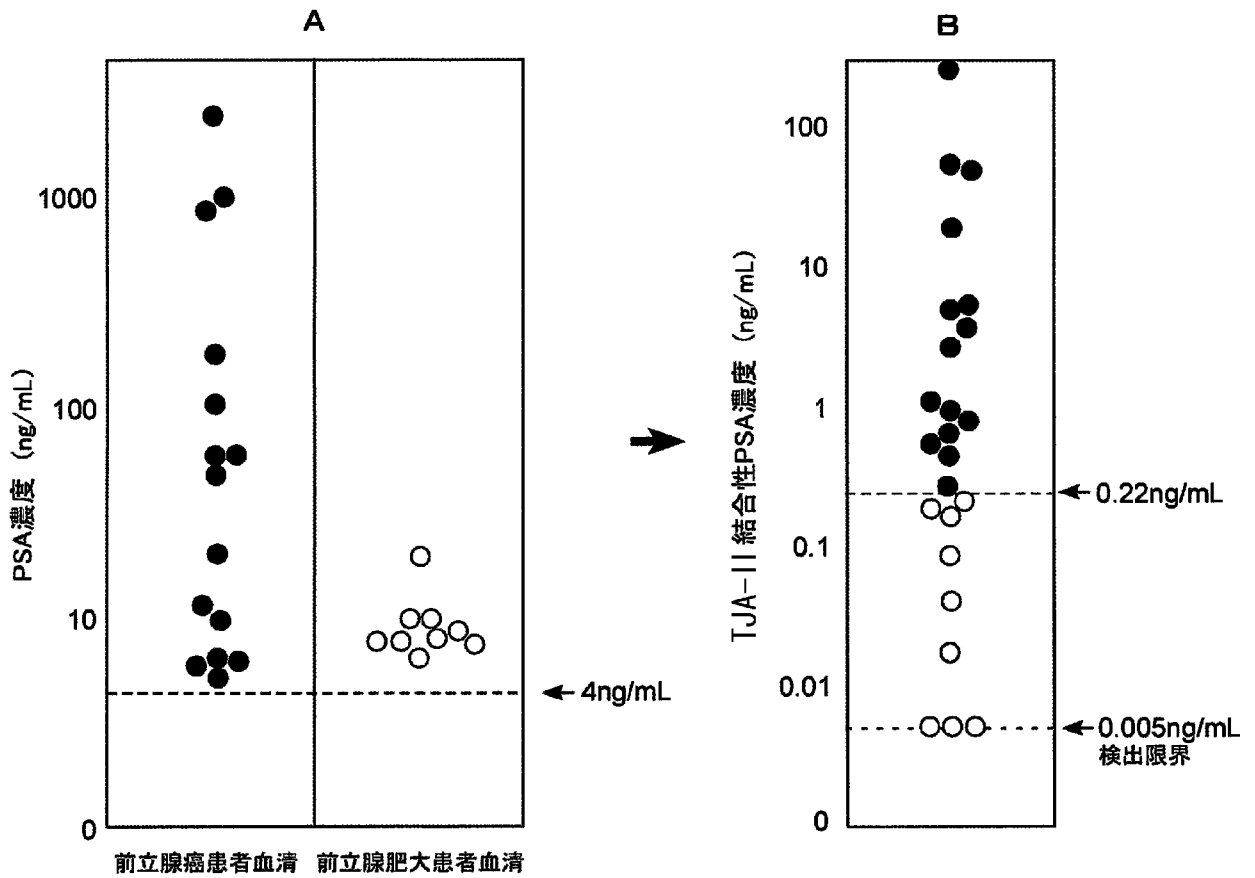
[請求項14] β - N - アセチルガラクトサミン残基と親和性のあるレクチンを含む、P S A の分析キット。

- [請求項15] 抗PSA抗体を更に含む、請求項14に記載のPSAの分析キット。
。
- [請求項16] 前記レクチンが、キカラスウリレクチン-11又はノダフジレクチンである、請求項14又は15に記載のPSAの分析キット。
- [請求項17] 前記レクチンが、更にフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンである、請求項14又は15に記載のPSAの分析キット。
- [請求項18] フコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含む、PSAの分析キット。
- [請求項19] β -N-アセチルガラクトサミン残基に親和性のあるレクチン及びフコース α (1, 2)ガラクトース残基と親和性を有するレクチンを含む、PSAの分析キット。

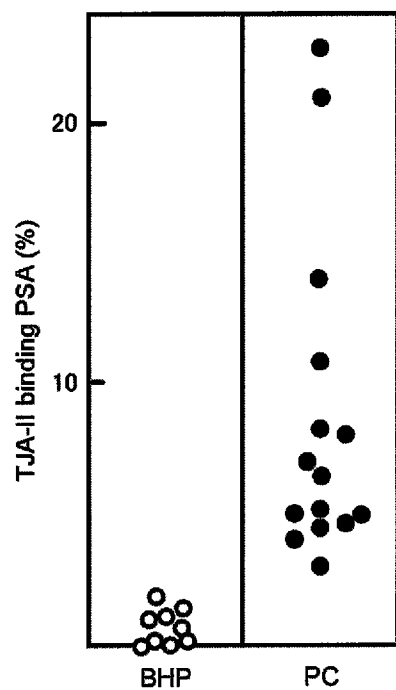
[図1]



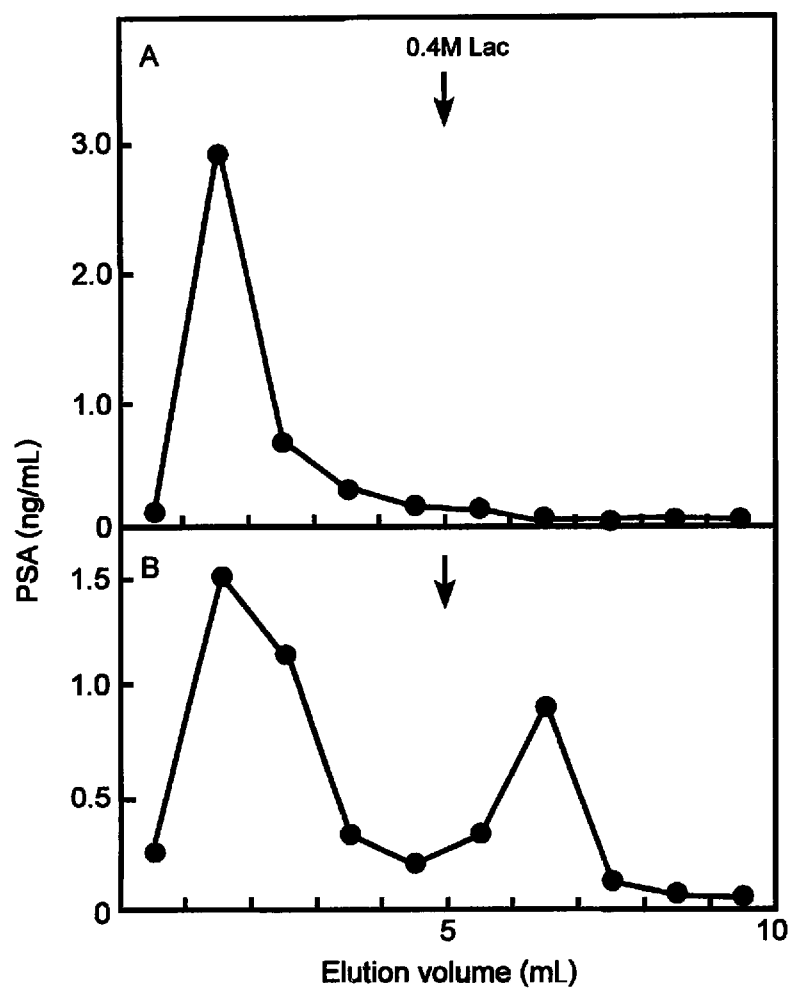
[図2]



[Fig 3]



[Fig 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574(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) G01N33/574		
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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-55108 A (Chikara OYAMA), 20 February 2002 (20.02.2002), claims (Family: none)	1-13
X/Y	YAMASHITA, K. et.al., Purification and characterization of a Fuc alpha 1-->2Gal beta 1 --> and GalNAc beta 1-->-specific lectin in root tubers of Trichosanthes japonica., J. Biol. Chem., 1992, Vol.267, No.35, Page.25414- 25422	14,16-19/15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "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 08 March, 2010 (08.03.10)		Date of mailing of the international search report 16 March, 2010 (16.03.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051622

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 2006-515927 A (Momenta Pharmaceuticals, Inc.), 08 June 2006 (08.06.2006), claims; paragraphs [0006], [0029] & US 2004/0147033 A1 & EP 1587408 A & WO 2004/066808 A2 & CA 2510250 A	15
A	TABARES, G. et al., Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA., Glycobiology., 2006.02, Vol.16, No.2, Page.132-145	1-19
A	Chikara OYAMA, "Zenritsusen Gan Screening no Atarashii Tenkai Gan Tokuiteki PSA wa Sonzai Suruka?: PSA no Tosa Kozo Kaiseki kara", Urology View, 01 August 2005 (01.08.2005), vol.3, no.4, pages 77 to 82	1-19
A	YAMASHITA, K. et al., Expression of Sia26Gals14GlcNAc Residues on Sugar Chains of Glycoproteins Including Carcinoembryonic Antigens in Human Colon Adenocarcinoma: Applications of Trichosanthes japonica Agglutinin I for Early Diagnosis, Cancer Res., 1995.04.15, Vol.55, Page.1675-1679	1-19
A	FUKUSHIMA, K. et al., Elevation of 26 Sialyltransferase and 12 Fucosyltransferase Activities in Human Choriocarcinoma, Cancer Res., 1998.10.01, Vol.58, Page.4301-4306	1-19
A	FUKUSHIMA, K. et al., Elevated serum levels of Trichosanthes japonica agglutinin-I binding alkaline phosphatase in relation to high-risk groups for hepatocellular carcinomas., Clin Cancer Res., 1998.11, Vol.4, Page.2771-2777	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(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. G01N33/574		
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 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010年		
国際調査で使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), CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)		
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
A	JP 2002-55108 A (大山力) 2002.02.20, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-13
X/Y	YAMASHITA, K. et. al., Purification and characterization of a Fuc alpha 1-->2Gal beta 1--> and GalNAc beta 1-->-specific lectin in root tubers of Trichosanthes japonica., J. Biol. Chem., 1992, Vol. 267, No. 35, Page. 25414-25422	14, 16-19 /15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 08.03.2010	国際調査報告の発送日 16.03.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 浅野 美奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 4 0 7 5

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 2006-515927 A (モメンタ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2006.06.08, 【特許請求の範囲】、段落【0006】、【0029】 & US 2004/0147033 A1 & EP 1587408 A & WO 2004/066808 A2 & CA 2510250 A	15
A	TABARES,G. et al., Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA., Glycobiology., 2006.02, Vol.16, No.2, Page.132-145	1-19
A	大山力, 前立腺癌スクリーニングの新しい展開 癌特異的P S Aは存在するか? : P S Aの糖鎖構造解析から, Urology View, 2005.08.01, Vol.3, No.4, Page.77-82	1-19
A	YAMASHITA,K. et al., Expression of Sia26Gals14GlcNAc Residues on Sugar Chains of Glycoproteins Including Carcinoembryonic Antigens in Human Colon Adenocarcinoma: Applications of Trichosanthes japonica Agglutinin I for Early Diagnosis, Cancer Res., 1995.04.15, Vol.55, Page.1675-1679	1-19
A	FUKUSHIMA,K. et al., Elevation of 26 Sialyltransferase and 12 Fucosyltransferase Activities in Human Choriocarcinoma, Cancer Res., 1998.10.01, Vol.58, Page.4301-4306	1-19
A	FUKUSHIMA,K. et al., Elevated serum levels of Trichosanthes japonica agglutinin-I binding alkaline phosphatase in relation to high-risk groups for hepatocellular carcinomas., Clin Cancer Res., 1998.11, Vol.4, Page.2771-2777	1-19