(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
2017 年 3 月 16 日(16.03.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/043617 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/076562

(22) 国際出願日: 2016 年 9 月 9 日(09.09.2016)

(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 2015-178402 2015 年 9 月 10 日(10.09.2015) JP

(71) 出願人: エーディア株式会社 (EIDIA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1010032 東京都千代田区岩本町１－１０－６ Tokyo (JP). 社会福祉法人恩賜財団大阪府済生会(SOCIAL WELFARE ORGANIZATION "SAI-SEIKAI" IMPERIAL GIFT FOUNDATION INC.) [JP/JP]; 〒5640013 大阪府吹田市川園町１７８６番１ Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(71) 出願人: 宮崎 徹 (MIYAZAKI, Toru) [JP/JP]; 〒1120003 東京都文京区春日２－１２－１２－１００４ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 岡上 武 (OKANOUE, Takeshi); 〒5640013 大阪府吹田市川園町１番２号 社会福祉法人恩賜財団大阪府済生会吹田病院内 Osaka (JP). 小山則行 (KOYAMA, Noriyuki); 〒1620812 東京都新宿区西五軒町１３－１ エーザイ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 南条 雅裕, 外 (NANJO, Masahiro et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂９－７－２－１４１６ 東京ＡＣＴｉ国際特許事務所 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, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

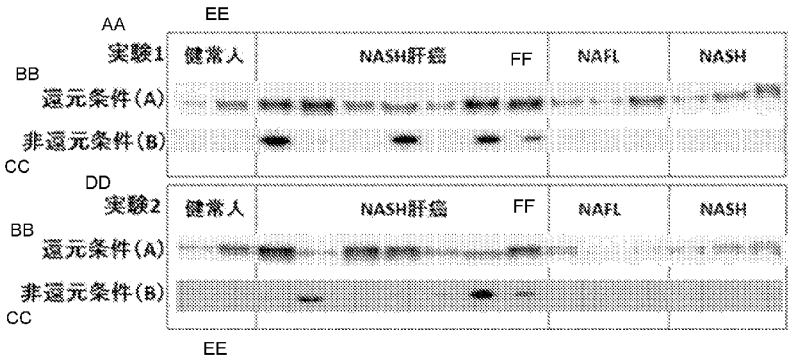
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー

[続葉有]

(54) **Title**: LIVER CANCER TEST METHOD

(54) 発明の名称 : 肝癌の検査方法

[図1]



AA Experiment 1
BB Reductive condition (A)
CC Non-reductive condition (B)
DD Experiment 2
EE Normal person
FF NASH liver cancer

(57) **Abstract**: [Problem] To provide: a method for testing for liver cancer or a method for assisting the diagnosis of liver cancer, which has excellent sensitivity and specificity; and a kit which can be used in each of the methods. [Solution] Provided are: a method for testing for liver cancer or a method for assisting the diagnosis of liver cancer, which comprises a step of detecting or quantifying a free AIM in a biological sample collected from a subject; and a kit for testing for liver cancer or for assisting the diagnosis of liver cancer, which includes an antibody capable of binding to a free AIM.

(57) 要約: 【課題】感度および特異性に優れた肝癌の検査方法または肝癌の診断の補助方法、およびこれらの方法に使用可能なキットを提供する。 【解決手段】被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量する工程を含む、肝癌の検出方法または肝癌の診断の補助方法、およびｆｒｅｅ ＡＩＭに結合する抗体を含む、肝癌の検査または診断補助用キットを提供する。

WO 2017/043617 A1

ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 肝癌の検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、典型的には、肝癌の検査方法または診断の補助方法に関する。具体的に、本発明は、被験体の生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭを検出することを含む、肝癌の検査方法または診断の補助方法に関する。本発明はさらに、肝癌の検査または診断補助用キットに関する。

背景技術

[0002] ＡＩＭ（ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　ｏｆ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ；ＣＤ５Ｌ、ａｐｉ６、Ｓｐαとも称する）は、組織マクロファージが特異的に産生する分子量約５０ｋＤａの分泌型タンパク質である（非特許文献１）。ＡＩＭは、システイン残基を多く含む特異的な配列であるｓｃａｖｅｎｇｅｒ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｃｙｓｔｅｉｎｅ－ｒｉｃｈ（ＳＲＣＲ）ドメインをタンデムに３つつなげた構造をしており、それぞれのシステイン残基は各ドメイン内で互いにジスルフィド結合することで、コンパクトな球状の立体構造をしていると考えられている。

[0003] ＡＩＭは、接着性のあるタンパク質であり、その結合パートナーとして様々な分子が報告されている。例えば、ｌｉｐｏｔｅｉｃｈｏｉｃ　ａｃｉｄ（ＬＴＡ）やｌｉｐｏｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ（ＬＰＳ）などの細菌・菌類の病原体関連分子パターン（ｐａｔｈｏｇｅｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｐａｔｔｅｒｎｓ：ＰＡＭＰｓ）を認識し、細菌を凝集させる能力を持つことが知られている（非特許文献２）。また、体内にはＡＩＭをその表面に結合する、あるいは細胞内に取り込む細胞も多く存在し、産生細胞であるマクロファージ自身への取り込みのほか、脂肪細胞ではスカベンジャー受容体ＣＤ３６を介してエンドサイトーシスにより取り込まれ、脂肪分解を誘導することが報告されている（非特許文献３）。

[0004] また、古くから、血液では、ＡＩＭがＩｇＭに結合することが知られてい

る（非特許文献４）。近年では、ＡＩＭは、尿中へ排出されずに血液中で安定的に存在するために、ＩｇＭとの結合が深く関与していること、ほとんどすべてのＡＩＭは血液中ではＩｇＭと複合体を形成し、非結合体で存在することがほとんどないことが報告されている（非特許文献５、６）。

[0005] 肝癌（ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ ｃａｒｃｉｎｏｍａ；ＨＣＣ）は、有効な治療法が乏しく、癌種では死亡原因の上位に位置している疾患である。また現在、生活習慣病と共に非アルコール性脂肪性肝疾患（ｎｏｎ－ａｌｃｏｈｏｌｉｃ ｆａｔｔｙ ｌｉｖｅｒ ｄｉｓｅａｓｅｓ；ＮＡＦＬＤ）が増加しつつある。このうち、脂肪肝のみを示す状態（ｎｏｎ－ａｌｃｏｈｏｌｉｃ ｆａｔｔｙ ｌｉｖｅｒ；ＮＡＦＬ）から、炎症・線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（ｎｏｎ－ａｌｃｏｈｏｌｉｃ ｓｔｅａｔｏｈｅｐａｔｉｔｉｓ；ＮＡＳＨ）へ進行する患者数が顕著に増加しているため、今後ＮＡＳＨ由来のＨＣＣ発症患者数の増加が確実視されている（非特許文献７）。こうした背景を踏まえ、ＨＣＣの診断マーカー、およびこれを利用した有効な治療法の開発に関する重大なニーズが存在する。

[0006] 現在までに、ＡＩＭと肝癌との関連についていくつかの報告が存在する。例えば、肝臓癌を含むＡＩＭ関連疾患の診断または検査方法として、被検者から採取した試料中のＡＩＭ濃度を測定する方法が報告されている（特許文献１）。

[0007] また肝臓癌を含む肝疾患の診断方法において、被検者の試料中のＡＩＭ濃度が健常者の試料中のＡＩＭ濃度に比べて低値である場合に、前記被検者が肝疾患または肝疾患になる可能性が高いと判断することを含む、肝疾患の診断方法が報告されている（特許文献２）。

[0008] さらに、健康成人に比して、ＨＣＣ患者の血中ＡＩＭ値が有意に高いこと（非特許文献８）、循環するＡＩＭレベルがＨＣＣの診断および／または予後マーカーとして使用し得ること（非特許文献９）、ＨＣＣを患う多くの肝硬変の個体で、ＣＤ５Ｌが顕著に上昇したこと（非特許文献１０）、ならびにＨＣＶに感染した患者において、肝硬変に比較して、ＨＣＣステージでの

ＣＤ５Ｌ発現の増加が見出されたこと（非特許文献１１）等が報告されている。

[0009] しかし、現在までに、他の結合パートナー、特にＩｇＭ、と複合体を形成していない、非結合体のＡＩＭと肝癌との関係については、報告されていない。また、ＨＣＣと、ＮＡＦＬやＮＡＳＨを含む他の肝疾患とを、高い精度で区別できる方法も報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開公報ＷＯ２０１１／１４５７２５　Ａ１

特許文献2：国際公開公報ＷＯ２０１３／１６２０２１　Ａ１

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Ｍｉｙａｚａｋｉ Ｔ ｅｔ ａｌ． Ｉｎｃｒｅａｓｅｄ Ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ ｏｆ Ｔｈｙｍｏｃｙｔｅｓ ｔｏ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｉｎ Ｍｉｃｅ Ｌａｃｋｉｎｇ ＡＩＭ, ａ Ｎｏｖｅｌ Ｍｕｒｉｎｅ Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ Ｓｏｌｕｂｌｅ Ｆａｃｔｏｒ Ｂｅｌｏｎｇｉｎｇ ｔｏ ｔｈｅ Ｓｃａｖｅｎｇｅｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｃｙｓｔｅｉｎｅ－ｒｉｃｈ Ｄｏｍａｉｎ Ｓｕｐｅｒｆａｍｉｌｙ． Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １８９：４１３－４２２，１９９９

非特許文献2：Ｓａｒｒｉａｓ ＭＲ ｅｔ ａｌ． Ａ ｒｏｌｅ ｆｏｒ ｈｕｍａｎ Ｓｐ ａｌｐｈａ ａｓ ａ ｐａｔｔｅｒｎ ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ． Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２８０：３５３９１－３５３９８，２００５

非特許文献3：Ｋｕｒｏｋａｗａ Ｊ ｅｔ ａｌ． Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ＡＩＭ ｉｓ ｅｎｄｏｃｙｔｏｓｅｄ ｉｎｔｏ ａｄｉｐｏｃｙｔｅｓ ａｎｄ ｄｅｃｒｅａｓｅｓ ｌｉｐｉｄ Ｄｄｒｏｐｌｅｔｓ ｖｉａ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｆａｔｔｙ ａｃｉｄ ｓｙｎｔｈａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ． Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂ １１：

４７９－４９２，２０１０

非特許文献4：Ｔｉｓｓｏｔ ＪＤ ｅｔ ａｌ． ＩｇＭ ａｒｅ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｔｏ Ｓｐ ａｌｐｈａ（ＣＤ５ ａｎｔｉｇｅｎ－ｌｉｋｅ）．Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ ２３：１２０３－１２０６，２００２．

非特許文献5：宮崎徹ら，「マクロファージ由来タンパク質ＡＩＭの最新知見－その多様な機能と生活習慣病との関連性－」 日本臨牀７１巻９号（２０１３－９）、１６８１頁－１６８９頁

非特許文献6：Ｍｉｙａｚａｋｉ Ｔ ｅｔ ａｌ． Ｏｂｅｓｉｔｙ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ａｕｔｏａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｒｅｑｕｉｒｅｓ ＡＩＭ ｔｏ Ｒｅｔａｉｎ ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｍ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｏｍｐｌｅｘ ｏｎ Ｆｏｌｌｉｃｕｌａｒ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ，Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ３，１１８７－１１９８，Ａｐｒｉｌ ２５，２０１３

非特許文献7：Ａｓｃｈａ ＭＳ ｅｔ ａｌ． Ｔｈｅ ｉｎｃｉｄｅｎｃｅ ａｎｄ ｒｉｓｋ ｆａｃｔｏｒｓ ｏｆ ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｎｏｎａｌｃｏｈｏｌｉｃ ｓｔｅａｔｏｈｅｐａｔｉｔｉｓ．Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ ５１：１９７２－１９７８，２０１０

非特許文献8：宮崎徹，脂肪融解タンパク質ＡＩＭによる脂肪肝性肝細胞癌の抑制，酸化ストレスと肝疾患＜第１０巻＞９９－１０６，２０１５年３月２７日発行

非特許文献9：Ｙａｍａｚａｋｉ Ｔ ｅｔ ａｌ．“Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ ＡＩＭ ａｓ ａｎ Ｉｎｄｉｃａｔｏｒ ｏｆ Ｌｉｖｅｒ Ｄａｍａｇｅ ａｎｄ Ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ Ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｉｎ Ｈｕｍａｎｓ” ＰＬＯＳ ＯＮＥ，９（１０）；ｅ１０９１２３，２０１４

非特許文献10：Ｇｒａｙ Ｊ ｅｔ ａｌ． “Ａ ｐｒｏｔｅｏｍｉｃ

strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease" BMC Cancer 2009, 9: 271

非特許文献11：Sarvari J et al. "Differentially Expressed Proteins in Chronic Active Hepatitis, Cirrhosis, and HCC Related to HCV Infection in Comparison With HBV Infection: A proteomics study" Hepatitis Monthly. 2013 Jul; 13(7): e8351

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の課題は、感度および特異性に優れた肝癌の検査方法または肝癌の診断の補助方法、およびこれらの方法に使用可能なキットを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねたところ、肝癌の被験体の生体試料において、ｆｒｅｅ ＡＩＭが顕著に増加していることを見出した。血液では、従来ｆｒｅｅ ＡＩＭはほとんど確認することができないと考えられていたため、とりわけ、肝癌の被験体の血清でｆｒｅｅ ＡＩＭの顕著な増加が確認されたことは驚きである。

[0014] 本発明は上記知見に基づくものであり、以下、本発明の実施の態様を説明するが、これらの態様は本発明の範囲を限定するものではない。

[0015] すなわち、本発明は、一実施態様において、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量する工程を含む、肝癌の検査方法に関する。本発明は、別の態様において、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅ

ｅ　ＡｌＭを検出または定量する工程を含む、肝癌の診断を補助する方法であることができる。本発明は、さらに別の態様において、肝癌を検査するために、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ　ＡｌＭを検出または定量する方法であることができる。

[0016] 本発明の方法において、前記生体試料は、体液とすることができる。また、本発明の方法の一実施態様において、前記体液は、血清、血漿、全血および尿からなる群から選択されるものとすることができる。

[0017] 本発明の方法は、一実施態様において、前記検出または定量が、イムノアッセイによるものであることを特徴とする。例えば、本発明の方法において、前記検出または定量は、生体試料とｆｒｅｅ　ＡｌＭに結合する抗体とを接触させることにより行うものとすることができる。本発明の方法の一実施態様において、前記ｆｒｅｅ　ＡｌＭに結合する抗体は、ｆｒｅｅ　ＡｌＭに特異的に結合する抗体である。また、本発明の一実施態様において、前記検出または定量は、ＥＬＩＳＡによる測定であることができる。

[0018] 本発明の方法は、一実施態様において、前記検出または定量は、血清、血漿または全血から選択される血液試料をタンパク質変性条件に曝露することなく、かつ、還元条件に曝露することなく行うことを特徴とする。

[0019] 本発明の方法は、一実施態様において、被験体に由来する生体試料中のｔｏｔａｌ　ＡｌＭを定量する工程をさらに含むものとすることができる。本発明の方法において、ｆｒｅｅ　ＡｌＭを定量する工程をさらに含む場合、ｆｒｅｅ　ＡｌＭの量は、ｔｏｔａｌ　ＡｌＭに対する比率として算出することができる。

[0020] 本発明はまた、ｆｒｅｅ　ＡｌＭに結合する抗体を含む、肝癌の検査または診断補助用キットに関する。本発明のキットの一実施態様において、前記ｆｒｅｅ　ＡｌＭに結合する抗体は、ｆｒｅｅ　ＡｌＭに特異的に結合する抗体である。

[0021] 本発明において、前記肝癌は、非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に起因する肝癌である。

[0022] 本発明は、非限定的に、以下の特徴を包含する。

（１）肝癌の検査方法であって、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量する工程を含む、方法。

[0023] （２）肝癌の診断を補助する方法であって、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量する工程を含む、方法。

[0024] （３）肝癌を検査するために、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量する方法。

[0025] （４）（１）～（３）のいずれかに記載の方法であって、前記生体試料が、体液である、方法。

[0026] （５）（４）に記載の方法であって、前記体液が、血清、血漿、全血および尿からなる群から選択される、方法。

[0027] （６）（１）～（５）のいずれかに記載の方法であって、前記肝癌が、非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に起因する肝癌である、方法。

[0028] （７）（１）～（６）のいずれかに記載の方法であって、前記検出または定量は、イムノアッセイによるものである、方法。

[0029] （８）（７）に記載の方法であって、前記検出または定量は、生体試料とｆｒｅｅ ＡＩＭに結合する抗体とを接触させることにより行う、方法。

[0030] （９）（８）に記載の方法であって、前記検出または定量は、ｆｒｅｅ ＡＩＭに特異的に結合する抗体により行う、方法。

[0031] （１０）（８）または（９）に記載の方法であって、前記検出または定量は、ＥＬＩＳＡによる測定である、方法。

[0032] （１１）（６）～（１０）のいずれかに記載の方法であって、前記検出または定量は、血清、血漿または全血から選択される血液試料をタンパク質変性条件に曝露することなく、かつ、還元条件に曝露することなく行うことを特徴とする、

方法。

[0033] （１２）（１）または（２）に記載の方法であって、被験体に由来する生体試料中のｔｏｔａｌ ＡＩＭを定量する工程をさらに含む、方法。

[0034] （１３）（１２）に記載の方法であって、ｆｒｅｅ　ＡＩＭとｔｏｔａｌＡＩＭの比率を算出する工程をさらに含む、方法。

[0035] （１４）ｆｒｅｅ　ＡＩＭに結合する抗体を含む、肝癌の検査または診断補助用キット。

[0036] （１５）（１４）に記載のキットであって、前記抗体が、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに特異的に結合する抗体である、キット。

[0037] （１６）（１４）または（１５）に記載のキットであって、前記肝癌が、非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に起因する肝癌である、キット。

発明の効果

[0038] 本発明によれば、感度および特異性に優れた肝癌の検出方法または肝癌の診断の補助方法、およびこれらの方法に使用可能なキットを提供される。

図面の簡単な説明

[0039] [図1]図１は、健常人、ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者およびＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）の血清において、抗ＡＩＭ抗体を用いた、ウエスタンブロット分析の結果を示す。図中、（Ａ）は血清を還元条件に曝露した場合の結果を示し、（Ｂ）は非還元条件での結果を示す。

[図2]図２は、健常人、ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者およびＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）の血清において、Ｈｕｍａｎ　ＡＩＭ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＣＹ－８０８０；ＣｉｒｃｕＬｅｘ社）を用いて、ｆｒｅｅ　ＡＩＭを検出した結果を示す。

[図3]図３は、ＮＡＳＨ患者（ＮＡＳＨ）とＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）の血清における繊維化ステージごとのｆｒｅｅ　ＡＩＭの定量結果を示す。

[図4]図４は、ＮＡＳＨ患者（ＮＡＳＨ）とＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）の血清における繊維化ステージごとのＴｏｔａｌ　ＡＩＭの定量結果を示す。

[図5]図５は、ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者（あわせてｎｏｎ－ＨＣＣ）およびＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）の血清で定量したｆｒｅｅ　ＡＩＭおよびＴｏｔａｌ　ＡＩＭの量に基づいて作成した散布図である。

[図6]図６は、ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者（あわせてｎｏｎ－ＨＣＣ）と、

ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）にて実施した、ＲＯＣ解析の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0040] 以下、本発明の実施の形態を具体的に説明する。

本発明に係る肝癌の検査方法は、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量する工程を含むものである。ＡＩＭは、上記のとおり、組織マクロファージが特異的に産生する分子量約５０ｋＤａの分泌型タンパク質であり、ヒトおよびヒト以外の多くの哺乳類や鳥類において発現していることが知られている。また、ＡＩＭは、血液においては、尿中へ排出されずに安定的に存在するために、その大部分がＩｇＭと複合体を形成し、非結合体で存在することがほとんどないことが知られている（非特許文献５、６）。また、被検者の試料中のＡＩＭ濃度がより低値である場合に、肝疾患または肝疾患になる可能性が高いとの示唆も存在している（特許文献２）。これらの知見にも関わらず、今回、肝癌の被験体において、生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭが顕著に増加することが見出された。したがって、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量することによって、当該被験体における肝癌を良好な検出感度および特異性で検出することができる。本明細書中、「ｆｒｅｅ ＡＩＭ」とは、生体試料において、ＡＩＭの他の結合パートナー、特にＩｇＭ、と複合体を形成していない、非結合体のＡＩＭをいう。これに対し、「ｔｏｔａｌ ＡＩＭ」とは、「ｆｒｅｅ ＡＩＭ」と、他の結合パートナー（例えばＩｇＭ等）と複合体を形成したＡＩＭ（以下、複合体ＡＩＭとも称する）の総称であり、「ｔｏｔａｌ ＡＩＭを検出または測定する」とは、生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭと複合体ＡＩＭの両方を検出または測定することをいう。

[0041] 別の態様では、本発明は、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ ＡＩＭを検出または定量する工程を含む、肝癌の診断を補助する方法に関する。

[0042] 本明細書において、「肝癌の検査」または「肝癌の診断の補助」とは、診断に必要な情報を得るために、被験体から採取した試料を調べることを意味する。したがって、本発明の方法は、医療機関でなくとも、例えば検査会社

等で実施され得る。

[0043] さらに別の態様では、本発明は、肝癌を検査するために、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ　ＡｌＭを検出または定量する方法に関する。

[0044] 本発明において、被験体は、特に制限されないが、例えば、肝癌を発症するおそれがあるか、または発症していることが疑われる被験体が挙げられる。被験体には、また、肝癌を既に発症している被験体も含まれ、その場合には、かかる被験体の予後を判定する目的で、または特定の肝癌治療の効果を判定する目的で、本発明を実施することができる。被験体は、典型的にはヒトを指すが、例えば他の霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどを含む他の動物も含み得る。

[0045] 本発明において、肝癌は、肝内に発生する悪性腫瘍をいい、肝臓で原発性に発生する肝細胞癌を意味する。一実施形態において、肝癌は、非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に起因する肝癌である。

[0046] さらに別の態様では、本発明は、本発明の検査方法または肝癌の診断の補助方法により肝癌を発症するおそれがあるか、または発症していることが疑われると判定された被験者に対し、肝癌の治療または処置を施す工程をさらに含むことができる。

[0047] 本発明において、被験体に由来する生体試料は、被験体から採取可能なものである限り特に限定されず、例えば組織または体液とすることができる。組織としては、非限定的に、卵巣、子宮、乳房、甲状腺、脳、食道、舌、肺、膵臓、胃、小腸、十二指腸、大腸、膀胱、腎臓、肝臓、前立腺、胆嚢、咽頭、筋肉、骨および皮膚などが挙げられるがこれらに限定されない。体液としては、非限定的に、血清、血漿または全血などの血液、リンパ液、組織液、髄液、体腔液、消化液、鼻水、涙液、汗および尿などが挙げられるがこれらに限定されない。取得および処理の簡便さから、前記生体試料として血液または尿を用いることが好ましく、血液を用いることがさらに好ましく、血液の中でも血清を用いることが特に好ましい。また、前記体液は、被験体から採取した体液そのものであっても、採取した体液に通常行われる希釈、濃

縮等の処理を行ったものであってもよい。なお、本発明に用いる被験体に由来する生体試料の採取や調製を行なう者は、本発明の工程を行う者と同一人物でもよく、別人物であってもよい。また、本発明に用いる被験体に由来する生体試料は、本発明の実施時に採取または調製されたものでもよく、予め採取または調製され保存されたものであってよい。

[0048] ｆｒｅｅ ＡｌＭの検出または定量方法は、ｆｒｅｅ ＡｌＭと、複合体ＡｌＭとを区別して検出できる方法であれば特に制限はなく、通常用いられるタンパク質検出方法を適用することができる。また、そのようなタンパク質検出方法は、ｆｒｅｅ ＡｌＭを定量または半定量的に測定できる方法であることが好ましい。そのような方法として、これに限定されるものではないが、ｆｒｅｅ ＡｌＭに結合する抗体を用いる方法、分子ふるいクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、質量分析等を挙げることができる。

[0049] 本発明において、ｆｒｅｅ ＡｌＭの検出に用いる装置には特に制限はなく、ｆｒｅｅ ＡｌＭの検出または測定の方法に応じて適宜選択することができる。具体的には例えば、ＨＰＬＣ機器、質量分析機器（マススペクトロメトリー）、電気泳動機器（キャピラリー電気泳動装置等）、全自動あるいは半自動酵素免疫測定機器、セルウォッシャー、全自動あるいは半自動化学発光免疫測定機器、発光測定装置、全自動あるいは半自動電気化学発光免疫測定機器、光学測定装置、プレートリーダー、ＣＣＤカメラ、全自動あるいは半自動蛍光免疫測定機器、蛍光測定装置、全自動あるいは半自動放射免疫測定機器、液体シンチレーションカウンター、クールターカウンター、表面プラズモン測定装置、ブロッティング装置、デンシトメーター等を挙げることができる。

[0050] 本発明においては、検出感度、特異性および簡便性の観点から、ｆｒｅｅ ＡｌＭに結合する抗体（本明細書中、「抗ｆｒｅｅ ＡｌＭ抗体」とも称する）を用いる方法、例えば抗ｆｒｅｅ ＡｌＭ抗体を用いるイムノアッセイを使用することが好ましい。抗ｆｒｅｅ ＡｌＭ抗体は、ＡｌＭを認識し

て結合可能な抗体であれば特に制限されない。

[0051] 抗ｆｒｅｅ ＡｌＭ抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のいずれも公知の方法に従って作製することができる。モノクローナル抗体は、例えば、ｆｒｅｅ ＡｌＭまたはｆｒｅｅ ＡｌＭフラグメントで免疫した非ヒト哺乳動物から抗体産生細胞を単離し、これを骨髄腫細胞等と融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマが産生した抗体を精製することによって得ることができる。また、ポリクローナル抗体は、ｆｒｅｅ ＡｌＭまたはｆｒｅｅ ＡｌＭフラグメントで免疫した動物の血清から得ることができる。ｆｒｅｅ ＡｌＭフラグメントはｆｒｅｅ ＡｌＭの部分ペプチドであり、抗ｆｒｅｅ ＡｌＭフラグメント抗体は、ｆｒｅｅ ＡｌＭを認識する。また、免疫原としては、例えば、ヒトやサルなどの霊長類、ラットやマウスなどのげっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどのｆｒｅｅ ＡｌＭまたはｆｒｅｅ ＡｌＭフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

[0052] なお、本明細書において「抗体」とは、天然に存在するか、遺伝子組換え技術によって産生される、全長の免疫グロブリン分子、または抗体フラグメントのような免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片をいう。特に断りがない限り、本発明の抗体はいずれのタイプ、クラス、サブクラスも含み、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、ＩｇＹ、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1およびIgA_2などが含まれる。これらの抗体は、慣用技術を用いて作製することができ、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。抗体フラグメントとしては、$F(ab')_2$、$F(ab)_2$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖなどが挙げられる。抗体フラグメントは、例えば、これをコードする核酸を用いて遺伝子組み換え技術によって作製することもできるし、全長の抗体を酵素で切断して作製することもできる。本発明において、抗ｆｒｅｅ ＡｌＭ抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。

[0053] 本発明において、抗ｆｒｅｅ ＡｌＭ抗体の例として、例えば、独立行政

法人　製品評価技術基盤機構　特許微生物寄託センターに寄託されたＡＩＭ－ＣＬ－６（受託番号：ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０９２）およびＡＩＭ－ＣＬ－７（受託番号：ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０９３）を挙げることができる。

[0054] 本発明において使用する抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体は、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに特異的に結合する抗体であることが好ましい。「特異的な結合」とは、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を指し、本発明においてはさらに、ＩｇＭと複合体を形成したＡＩＭよりも、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに対して高い結合親和性を有する抗体を指す。本発明の一態様において、「特異的な結合」は、例えばｆｒｅｅ　ＡＩＭに対して少なくとも約10^{-4}M、または少なくとも約10^{-5}M、または少なくとも約10^{-6}M、または少なくとも約10^{-7}M、または少なくとも約10^{-8}M、または少なくとも約10^{-9}M、または少なくとも約10^{-10}M、または少なくとも約10^{-11}M、または少なくとも約10^{-12}M、またはそれ以上のＫｄを持つ抗体によって示されうる。別の態様では、「特異的な結合」は、ＩｇＭと複合体を形成したＡＩＭを含む、ｆｒｅｅ　ＡＩＭとは異なる他のポリペプチドに実質的に結合することなく、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに結合することを意味する。

[0055] 本発明におけるイムノアッセイとしては、当業者に一般的に使用される方法を用いることができるが、ｆｒｅｅ　ＡＩＭと、複合体ＡＩＭとが、区別して検出または定量される方法または条件を選択するべきである。例えば、本発明の方法において、尿以外の生体試料、例えば血清、血漿または全血から選択される血液試料を用いる場合には、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体を用いた検出または定量に際して、ｆｒｅｅ　ＡＩＭと、複合体ＡＩＭとが区別して検出されるように、必要に応じて、分子量に基づく生体試料の分画を行うことが好ましい。また、複合体ＡＩＭからｆｒｅｅ　ＡＩＭを分離した後に、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体を用いて検出または定量を行うことも好ましい。また、本発明の方法において、ＩｇＭと結合して複合体を形成したＡＩＭの結合状態が解消されるようなタンパク質変性条件または還元条件に前記生体試料を曝露しないことに留意すべきである。そのようなタンパク質変性条件ま

たは還元条件は、タンパク質の立体構造やタンパク質間の結合が破壊または阻害される方法または条件として当業者に周知である。

[0056] イムノアッセイは、検出可能に標識した抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体、または、検出可能に標識した抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体に対する抗体（二次抗体）を用いる。抗体の標識法により、エンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡまたはＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、蛍光イムノアッセイ（ＦＩＡ）、蛍光偏光イムノアッセイ（ＦＰＩＡ）、化学発光イムノアッセイ（ＣＬＩＡ）、電気化学発光イムノアッセイ（ＥＣＬＩＡ）等に分類され、これらのいずれも本発明の方法に用いることができる。

[0057] ＥＬＩＳＡ法では、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、ＲＩＡ法では、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ等の放射性物質、ＦＰＩＡ法では、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリスリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、ＣＬＩＡ法では、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質で標識した抗体が用いられる。その他、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子で標識した抗体を検出することもできる。

[0058] また、イムノアッセイでは、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体をビオチンで標識し、酵素等で標識したアビジンまたはストレプトアビジンを結合させて、ｆｒｅｅ　ＡＩＭを検出、測定することもできる。

[0059] イムノアッセイの中でも、酵素標識を用いるＥＬＩＳＡ法は、簡便且つ迅速に標的を測定することができて好ましい。

[0060] ＥＬＩＳＡ法では、例えばサンドイッチ法を用いることができる。固相担体に抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体を固定し、適宜処理した生体試料を添加して反応させた後、さらに酵素で標識した別のエピトープを認識する抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体を添加して反応させる。洗浄後、酵素基質と反応、発色させ、吸光度を測定することにより、ｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を求めることができる。また、固相担体に固定した抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体と生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭを反応させた後、非標識ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体（一次抗体）を添加

し、この非標識抗体に対する抗体（二次抗体）を酵素標識してさらに添加してもよい。

[0061] 酵素基質は、酵素がペルオキシダーゼの場合、３，３’－ｄｉａｍｉｎｏｂｅｎｚｉｄｉｎｅ（ＤＡＢ）、３，３’５，５’－ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｂｅｎｚｉｄｉｎｅ（ＴＭＢ）、ｏ－ｐｈｅｎｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅ（ＯＰＤ）等を用いることができ、アルカリホスファターゼの場合、ｐ－ｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ（ＮＰＰ）等を用いることができる。

[0062] また、上記イムノアッセイの中で、高感度にタンパク質を測定する方法として、ＥＣＬＩＡ法も好ましい。ＥＣＬＩＡ法では、マイクロビーズに抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体を固定し、適宜処理した生体試料を添加して反応させた後、電気化学発光物質を標識した別のエピトープを認識する抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体を添加して反応させる。マイクロビーズを洗浄後、電極上にマイクロビーズを捕捉し、電気エネルギーを加えて発光させ、発光量を測定することにより、ｆｒｅｅ ＡＩＭ濃度を求めることができる。

[0063] また、上記イムノアッセイの中で、微量のタンパク質を簡便に検出できる方法として凝集法も好ましい。凝集法としては、例えば、抗体にラテックス粒子を結合させたラテックス凝集法が挙げられる。

[0064] ラテックス粒子に抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体を結合させて生体試料に混合すると、ｆｒｅｅ ＡＩＭが存在すれば、抗体結合ラテックス粒子が凝集する。そこで、試料に近赤外光を照射して、吸光度の測定（比濁法）または散乱光の測定（比朧法）により凝集塊を定量し、抗原の濃度を求めることができる。

[0065] 本発明において、ｆｒｅｅ ＡＩＭの検出または定量は、ｆｒｅｅ ＡＩＭを特異的に検出可能なキットを用いることができる。当該キットとしては、例えば、市販のキットを挙げることができ、当該キットの製品説明書に従ってｆｒｅｅ ＡＩＭの検出または定量に用いることができる。そのようなキットとして、これに限定されるものではないが、Ｈｕｍａｎ ＡＩＭ Ｅ

ＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＣＹ－８０８０；Ｃｉｒｃｕｌｅｘ社）等を挙げることができる。

[0066] 本発明の方法は、ｆｒｅｅ　ＡＩＭの検出または定量に加えて、被験体に由来する生体試料中のｔｏｔａｌ　ＡＩＭを定量する工程をさらに含んでもよい。例えばＮＡＳＨ肝癌の患者においては、肝臓の線維化のステージに応じて、生体試料中のｔｏｔａｌ　ＡＩＭには有意な増加が認められない一方、ｆｒｅｅ　ＡＩＭには有意な増加が認められる。したがって、例えば、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの量をさらに評価することで、より高い精度および特異性で肝癌を検査することができる。本発明の一実施形態では、ｆｒｅｅ　ＡＩＭの量は、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭに対する比率として算出される。

[0067] ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出または定量は、当業者に慣用的な任意のタンパク質検出方法によって行うことができ、そのような方法として、これに限定されるものではないが、ＡＩＭに結合する抗体を用いる方法、分子ふるいクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、質量分析等を挙げることができる。本発明の一実施形態では、特異性と簡便性の観点から、ＡＩＭに結合する任意の抗体を用いたイムノアッセイ、例えばＥＬＩＳＡによって測定することが好ましい。また、本発明において、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出に用いる装置には特に制限はなく、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出または測定の方法に応じて適宜選択することができる。

[0068] 本発明において、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出または定量は、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭを特異的に検出可能なキットを用いることができる。当該キットとしては、例えば、市販のキットを挙げることができ、当該キットの製品説明書に従ってｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出または定量に用いることができる。そのようなキットとして、これに限定されるものではないが、Ｈｕｍａｎ　ＡＩＭ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＫＫ９０１；トランスジェニック社）等を挙げることができる。

[0069] 本発明の一実施形態において、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出または定量は、ｆｒｅｅ　ＡＩＭを検出または定量した被験体に由来する生体試料を、タン

パク質変性条件または還元条件に曝露することによって、生体試料中の複合体ＡＩＭをｆｒｅｅ　ＡＩＭに変換した後、ｆｒｅｅ　ＡＩＭの総量を定量することによって行うことができる。

[0070] また、本発明の一実施形態において、ｆｒｅｅ　ＡＩＭの検出または定量とｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出または定量を、一の測定において同時に行うこともできる。そのような実施態様としては、上記ＡＩＭに結合する抗体を用いる方法と分子ふるいクロマトグラフィーとを組み合わせた方法を挙げることができる。ＡＩＭに結合する抗体は、ｆｒｅｅ　ＡＩＭおよび他の結合パートナーと複合体を形成したＡＩＭの両方を認識することができる抗体であり、本明細書中、「抗ＡＩＭ抗体」とも記載される。したがって、抗ＡＩＭ抗体は、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体、および／または、他の結合パートナーと複合体を形成したＡＩＭを認識できる抗体であり得る。一実施形態では、抗ＡＩＭ抗体は、他の結合パートナーとの複合体形成領域とは異なるｆｒｅｅ　ＡＩＭ上の領域を認識する抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体である。抗ＡＩＭ抗体と生体試料を混合すると、前記試料中に複合体ＡＩＭまたはｆｒｅｅ　ＡＩＭが存在すれば、抗ＡＩＭ抗体は、複合体ＡＭＩ又はｆｒｅｅ　ＡＩＭのそれぞれに結合する。前記混合試料を分子ふるいクロマトグラフィーに適用すると、抗ＡＩＭ抗体が結合したｆｒｅｅ　ＡＩＭと抗ＡＩＭ抗体が結合した複合体ＡＩＭは、それぞれの分子量に応じた保持時間で分離、溶出されるので、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに由来するピークおよび複合体ＡＩＭに由来するピークを測定すれば、ｆｒｅｅ　ＡＩＭ、複合体ＡＩＭ、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭ、およびｆｒｅｅ　ＡＩＭのｔｏｔａｌ　ＡＩＭに対する比率を一の測定により同時に測定することができる。上記のような抗体と抗原の結合物をクロマトグラフィーによって分離、測定する方法は、例えば、特開平２－０２８５５７などにより公知であり、抗ＡＩＭ抗体の標識や分子ふるい以外のクロマトグラフィーの適用にも制限がなく、ｆｒｅｅ　ＡＩＭの検出または定量とｔｏｔａｌ　ＡＩＭの検出または定量に関する本明細書の記載を参考にして、適宜に選択および組み合わせて使用することができる。

[0071] 本発明の方法は、前記被験体由来の生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭの量に基づいて、肝癌であると判定する工程をさらに含むことができる。本発明におけるｆｒｅｅ　ＡＩＭの量としては、前記被験体由来の生体試料中に含まれる前記ｆｒｅｅ　ＡＩＭの濃度またはそれに対応する定量値もしくは半定量値であれば特に制限されない。例えば、本発明におけるｆｒｅｅ　ＡＩＭの量としては、前記ｆｒｅｅ　ＡＩＭの検出量を直接的に測定した測定値、前記ｆｒｅｅ　ＡＩＭの検出量を標識の検出を介して間接的に測定した測定値等を挙げることができる。

[0072] 本発明の方法における判定工程では、被験体由来の生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭの量を、例えば対照となる健常者の生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭの量を基準値（カットオフ値）として比較して、前記被験体由来の生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭの量が大きい場合に、肝癌であると判定することができる。

[0073] 対照となる健常者は、肝癌を発症していないことが予め判明している個体を意味する。また、ｆｒｅｅ　ＡＩＭの量が大きいとは、健常者と肝癌患者とを区別するために設定された基準値（カットオフ値）よりも、被験体に由来するｆｒｅｅ　ＡＩＭの量のほうが大きいことをいう。

[0074] 前記基準値は、例えば、肝癌患者の生体試料におけるｆｒｅｅ　ＡＩＭの量と、対照となる健常者群の生体試料におけるｆｒｅｅ　ＡＩＭの量とをＲＯＣ解析（Ｒｅｃｅｉｖｅｒ　Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ　ａｎａｌｙｓｉｓ）等に付することよって設定することができる。ＲＯＣ解析は、例えば、疾病の検査方法の検出能、診断能を評価可能な解析方法であって、日本臨床検査自動化学会会誌「臨床検査の診断的有用性評価マニュアル」Ｖｅｒ．１．３（２００４．９．１）、Ｖｏｌ．２９　Ｓｕｐｐｌ．１（通巻第１５４号）（２００４年９月１日発行）に記載された解析方法である。

[0075] また、基準値は、例えば、健常者の検出レベルの平均値に、標準偏差を２倍あるいは３倍した値を加算した値として定めることもでき、更に、感度（

検出率）および特異性（偽陽性率の低さ）をバランスよく満たす値に適宜定めることができる。

[0076] 例えば、下記実施例３に記載した健常者の血清ｆｒｅｅ　ＡＩＭ測定値（１．１２±０．１８７μｇ／ｍＬ）およびＮＡＳＨ肝癌患者の血清ｆｒｅｅ　ＡＩＭ測定値（２．９０±１．３７５μｇ／ｍＬ）に、上記の手順を適用し、健常者の平均値に３倍標準偏差を加算した値として１．６８１（１．１２＋０．１８７＊３）μｇ／ｍＬ、あるいは健常者の平均値に２倍標準偏差を加算した値として１．４９４（１．１２＋０．１８７＊２）μｇ／ｍＬ（Ｈｕｍａｎ　ＡＩＭ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＣＹ－８０８０、ＣｉｒｃｕＬｅｘ社）による測定値に基づく）を定め、更に、感度および特異性をバランスよく満たす値とすることが挙げられる。

[0077] 上記、判定工程の別の態様としては、例えば、患者を病態等により群分けし、患者群同士のｆｒｅｅＡＩＭの測定結果を対比させることもできる。そのような例としては、下記実施例に記載したＮＡＦＬ患者およびＮＡＳＨ患者の群（ｎｏｎ－ＨＣＣ患者群）とＮＡＳＨ肝癌（ＨＣＣ患者群）の比較を挙げることができる。また、このような場合のカットオフ値として、下記実施例に記載の１．６μｇ／ｍＬ以上（Ｈｕｍａｎ　ＡＩＭ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＣＹ－８０８０、ＣｉｒｃｕＬｅｘ社）による測定値に基づく）を挙げることができる。

[0078] 別の態様において、本発明は、肝癌の検査または診断補助用キットに関する。本発明に係るキットは、本発明の一態様において、上述した本発明に係る肝癌の検査方法を行うためのキットであり、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体を含む。本発明のキットの一実施形態において、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体は、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに特異的に結合する抗体である。

[0079] 当該検査または診断補助用キットは、ｆｒｅｅ　ＡＩＭと、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体との抗原抗体反応を利用するイムノアッセイによって、生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を測定するために必要な試薬および装置を含む。

[0080] 本発明のキットは、一態様において、サンドイッチＥＬＩＳＡ法によって

ｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を測定するためのものであり、マイクロタイタープレート；捕獲用の抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体；アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼで標識した抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体；および、アルカリホスファターゼ基質（ＮＰＰ等）またはペルオキシダーゼの基質（ＤＡＢ、ＴＭＢ、マイクロタイタープレートＯＰＤ等）、を含む。捕獲抗体と標識抗体は、異なるエピトープを認識する。このようなキットの場合、まず、マイクロタイタープレートに捕獲抗体を固定し、ここに適宜処理し希釈した生体試料を添加した後インキュベートし、試料を除去して洗浄する。次に、標識抗体を添加した後インキュベートし、基質を加えて発色させる。マイクロタイタープレートリーダー等を用いて発色を測定することにより、ｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を求めることができる。

[0081] 本発明のキットは、別の態様において、二次抗体を使用したサンドイッチＥＬＩＳＡ法によりｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を測定するためのものであり、マイクロタイタープレート；捕捉用の抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体；一次抗体として、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体；二次抗体として、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼで標識した、抗ｆｒｅｅ　ＡＩＭ抗体に対する抗体；および、アルカリホスファターゼの基質（ＮＰＰ等）またはペルオキシダーゼの基質（ＤＡＢ、ＴＭＢ、ＯＰＤ等）、を含む。捕獲抗体と一次抗体は、異なるエピトープを認識する。このようなキットでは、まず、マイクロタイタープレートに捕獲抗体を固定し、ここに適宜処理し希釈した生体試料を添加した後インキュベートし、試料を除去して洗浄する。続いて、一次抗体を添加してインキュベートおよび洗浄を行い、さらに酵素標識した二次抗体を添加してインキュベートを行った後、基質を加えて発色させる。マイクロタイタープレートリーダー等を用いて発色を測定することにより、ｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を求めることができる。二次抗体を用いることにより、反応が増幅され検出感度を高めることができる。

[0082] 本発明のキットは、さらに、必要な緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレートリーダー、製品説明書等を含むことも好ましい。

[0083] 標識抗体は、酵素標識した抗体に限定されず、放射性物質（^{25}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ等）、蛍光物質（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリスリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等）、発光物質（ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等）、ナノ粒子（金コロイド、量子ドット）等で標識した抗体であってもよい。また標識抗体としてビオチン化抗体を用い、キットに標識したアビジンまたはストレプトアビジンを加えることもできる。

[0084] 本発明の診断用キットの別の態様として、ＥＣＬＩＡ法によってｆｒｅｅ ＡＩＭ濃度を高感度に測定するためのものも挙げられる。このキットは、抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体固相化マイクロビーズ、電気化学発光物質（ルテニウム等）標識抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体等を含む。このようなキットでは、抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体を固相化したマイクロビーズに、適宜処理した生体試料を添加して反応させた後、試料を除去して洗浄する。続いて、電気化学発光物質を標識した別のエピトープを認識する抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体を添加して反応させる。マイクロビーズを洗浄後、電極上にマイクロビーズを捕捉し、電気エネルギーを加えて発光させ、発光量を測定することにより、ｆｒｅｅ ＡＩＭ濃度を求めることができる。

[0085] 本発明の診断用キットのさらに別の態様として、ラテックス凝集法によってｆｒｅｅ ＡＩＭ濃度を測定するためのものも挙げられる。このキットは、抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体感作ラテックスを含み、生体試料と抗ｆｒｅｅ ＡＩＭ抗体とを混合し、光学的方法で集塊を定量する。キットに凝集反応を可視化する凝集反応板が含まれていることも好ましい。

[0086] 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

[0087] 実施例１：マウス抗ヒトＡＩＭモノクローナル抗体の作製

＜動物感作＞

抗原として全長ヒトｒＡＩＭ（２ｍｇ／ｍｌ）を等量のＴｉｔｅｒＭａｘ

Ｇｏｌｄ（Ｇ－１フナコシ）と混合しエマルジョンを作製した。免疫動物にはＢａｌｂ／ｃマウス（チャールズリバー（株）８週齢のメス２匹を用い、後ろ足底部へ抗原溶液５０μＬを投与した。２週間後に同様の投与を行い、更に２週間以上をおいて抗原溶液５０μｇを後ろ足底部へ投与し３日後の細胞融合に備えた。

[0088] ＜ミエローマ細胞＞

ミエローマ細胞にはマウスＰ３Ｕ１を用い、増殖培養には、ＲＰＭＩ１６４０（１１８７５－１１９　ＧＩＢＣＯ）に、グルタミンとピルビン酸を加え、ＦＢＳ（Ｓ１５６０　ＢＷＴ社）を１０％になるように添加した培地を用いた。抗生物質としてはペニシリン、ストレプトマイシンを適量加えた。

[0089] ＜細胞融合＞

麻酔下にて心臓採血を行ったマウスから、無菌的に膝窩リンパ節を摘出し、＃２００メッシュ付ビーカーにのせ、シリコン棒で押しながら、細胞浮遊液を調製した。細胞はＲＰＭＩ１６４０にて２回の遠心洗浄を行った後、細胞数をカウントした。対数増殖期の状態のミエローマ細胞を遠心により集め、洗浄後、リンパ細胞とミエローマ細胞の比率が５対１となるように調製し、混合遠心を行った。細胞融合はＰＥＧ１５００（７８３６４１　ロシュ）を用いて行った。すなわち、細胞ペレットへ１ｍＬのＰＥＧ液を３分間かけて反応させ、その後段階的に希釈を行い、遠心にて洗浄した後、培地を加え９６ウェルプレート１５枚へ２００μＬずつ入れ、１週間の培養を行った。培地にはミエローマ細胞用培地にＨＡＴサプリメント（２１０６０－０１７　ＧＩＢＣＯ）を加え、ＦＢＳ濃度を１５％にしたものを用いた。

[0090] ＜マウス腹水採取＞

凍結保存された細胞を解凍し、増殖培養を行った後、１週間以上前に０．５ｍＩのプリスタン（４２－００２　コスモバイオ）を腹腔内投与したヌードマウス（ＢＡＬＢ／ｃＡＪｃＩ－ｎｕ／ｎｕ　日本クレア）の腹腔へ、１×１０^{7}個を投与し、およそ２週間後に４～１２ｍＩの腹水を得た。遠心処理にて固形物を除去した後、凍結保存を行った。

[0091] 実施例２：ＮＡＳＨ肝癌（ＨＣＣ）に特異的な血清中ｆｒｅｅ　ＡＩＭの検出

健常人４例、ＮＡＦＬ患者６例、ＮＡＳＨ患者６例、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）１４例の血清を、還元条件と非還元条件にてアガロースゲル電気泳動を行い、抗ＡＩＭ抗体にてウエスタンブロットを行った。

還元条件では、患者血清をＳＤＳとメルカプトエタノールを含むｓａｍｐｌｅ　ｂｕｆｆｅｒと混合し、９９℃にて５分間還元した後、ｅ－ＰＡＧＥＬ（アトー株式会社）ゲルに添加し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法にて分離した。非還元条件では、患者血清をＳＤＳとメルカプトエタノールを含まないｓａｍｐｌｅ　ｂｕｆｆｅｒと混合し、Ｎａｔｉｖｅ－ＰＡＧＥ法にて分離した。電気泳動後、蛋白質をＰＶＤＦ膜（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ，ミリポア社）に転写し、実施例１で作製したマウス抗ヒトＡＩＭモノクローナル抗体と４℃ｏｖｅｒｎｉｇｈｔにて一次抗体反応を行った。二次抗体にＨＲＰ結合抗マウスＩｇＧ抗体、検出試薬としてＬｕｍｉｎａｔａ　Ｆｏｒｔｅ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　ＨＲＰ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（ミリポア社）を用い、シグナルの検出はＩｍａｇｅ　Ｑｕａｎｔ　ＬＡＳ　４０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）にて行った。

[0092] 還元条件（Ａ）では、すべてのＡＩＭ分子がＩｇＭから外れるためｆｒｅｅ　ＡＩＭの単一のバンドとなった。非還元条件（Ｂ）では、ＡＩＭはＩｇＭから外れないため、健常人、ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者ではｆｒｅｅ　ＡＩＭのバンドは検出されなかったが、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）ではｆｒｅｅ　ＡＩＭのバンドが検出された。異なる患者血清を使用した実験１と実験２において、同様の結果が確認された（図１）。また、本実験によって、実施例１で作製したマウス抗ヒトＡＩＭモノクローナル抗体がＡＩＭと結合することが確認された。

[0093] 実施例３：血清中ｆｒｅｅ　ＡＩＭの定量

ｆｒｅｅ　ＡＩＭを定量するＨｕｍａｎ　ＡＩＭ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＣＹ－８０８０，ＣｉｒｃｕＬｅｘ社）を用い、健常人１０例、ＮＡＦＬ患

者４２例、ＮＡＳＨ患者１３５例、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）２６例の血清中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を測定した。測定はキットの取り扱い手順書に従って実施した。統計解析はＭａｎ－Ｗｈｉｔｔｎｅｙ　Ｕ　ｔｅｓｔを用い、ｐ＜０．０５を有意差ありとした。

その結果、ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度はそれぞれ１．０７±０．５６８μｇ／ｍＬ、１．１２±０．６３２μｇ／mLであり、健常人（１．１２±０．１８７μｇ／ｍＬ）と差はなかったが、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）では、２．９０±１．３７５μｇ／ｍＬとｆｒｅｅ　ＡＩＭが有意に高かった（図２）。

[0094] 実施例４： 肝臓の各線維化ステージにおけるｆｒｅｅ　ＡＩＭおよびｔｏｔａｌ　ＡＩＭの定量

前述のｆｒｅｅ　ＡＩＭを定量するＨｕｍａｎ　ＡＩＭ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ　（ＣＹ－８０８０，ＣｉｒｃｕＬｅｘ社）を用いて、ＮＡＳＨ患者１３５例、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）２６例の血清中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を測定した。

さらにｔｏｔａｌ　ＡＩＭを定量するＥＬＩＳＡを用いて、患者血清中のｔｏｔａｌ　ＡＩＭ濃度を測定した。測定にあたっては、ＢＣＡ法で濃度を値付けした標準物質を用いた。当該ＥＬＩＳＡでは、定法に従って、マウス抗ヒトＡＩＭモノクローナル抗体をプレートに固相化し、患者血清を添加した。洗浄後、ＨＲＰ標識マウス抗ヒトＡＩＭモノクローナル抗体にて反応させ、ＨＲＰ基質にて発色させた。用いた抗ＡＩＭ抗体は、いずれも実施例１に記載の方法に従って作製された抗体であり、ｆｒｅｅ　ＡＩＭと複合体ＡＩＭの双方を認識し、それぞれエピトープが異なる抗体である。

肝臓の線維化の進行に伴いｔｏｔａｌ　ＡＩＭの増加が報告されているため、Ｂｒｕｎｔの分類（Ａｍ　Ｊ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．　１９９９　Ｓｅｐ；９４（９）：２４６７－２６７４）に従って、線維化のステージ１と２（Ｆ１－Ｆ２）、ステージ３（Ｆ３）、ステージ４（Ｆ４）の３群に患者を分けて解析した。ＮＡＳＨ患者のうち、繊維化が見られなかった２

７例は除き、解析したＮＡＳＨ患者とＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）のそれぞれの症例数は、Ｆ１－Ｆ２で７１例と４例、Ｆ３で３０例と１０例、Ｆ４で７例と１２例であった。

ｆｒｅｅ　ＡＩＭはいずれのステージにおいても、ＮＡＳＨ患者に比べＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）で有意に増加した（図３）。ｔｏｔａｌ　ＡＩＭはいずれのステージでも、ＮＡＳＨ患者とＮＡＳＨ肝癌患者の間に有意な差は見られなかった（図４）。

[0095] 実施例５：癌化に伴うｆｒｅｅ　ＡＩＭの増加とｔｏｔａｌ　ＡＩＭの増加の比較

前述のｆｒｅｅ　ＡＩＭを定量するＨｕｍａｎ　ＡＩＭ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＣＹ－８０８０，ＣｉｒｃｕＬｅｘ社）と、実施例４で使用したものと同じｔｏｔａｌ　ＡＩＭを定量するＥＬＩＳＡを用い、ＮＡＦＬ患者４２例、ＮＡＳＨ患者１３５例とＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）２６例の血清中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩＭ濃度を測定した。ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの増加に伴いｆｒｅｅ　ＡＩＭは増加したが、ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者（あわせてｎｏｎ－ＨＣＣ）（白丸）に比べＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）（黒丸）のｆｒｅｅ　ＡＩＭの増加は顕著であった（図５）。

[0096] 実施例６：ＮＡＳＨ患者とＮＡＳＨ肝癌患者、繊維化進行症例、肝硬変症例におけるＲＯＣ解析

ＮＡＳＨ患者（１３５例）と、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）（２６例）において、血清中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩＭ濃度のＲＯＣ解析を行った（表１参照）。

ＡＵＣは、ｆｒｅｅ　ＡＩＭでは０．９２７、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭでは０．８０１であった（表１の（Ａ））。ｆｒｅｅ　ＡＩＭがより高い精度で肝癌の判別が可能であった。

肝癌の発症は、肝臓の線維化が進行するほど起こりやすいことが知られている。線維化ステージ３（Ｆ３）およびステージ４（Ｆ４）の線維化進行症例において、血清中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩＭ濃度のＲ

ＯＣ解析を行った。線維化進行症例では、ＡＵＣはｆｒｅｅ　ＡＩＭでは０．９１８、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭでは０．７０９であった（表１の（Ｂ））。線維化進行症例においても、ｆｒｅｅ　ＡＩＭは高い精度で肝癌の判別が可能であったが、　ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの精度は低かった。

[0097]　線維化が進んだ肝硬変症例では、最も肝癌の発症リスクが高い。ステージ４（Ｆ４）の肝硬変症例において、血清中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩＭ濃度のＲＯＣ解析を行った。肝硬変症例では、ＡＵＣはｆｒｅｅ　ＡＩＭでは０．８６９、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭでは０．５０６であった（、表１の（Ｃ））。肝硬変症例においても、ｆｒｅｅ　ＡＩＭは高い精度で肝癌の判別が可能であったが、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭの精度は低かった。

[表1]

		(A) 全症例	(B)線維化進行症例	(C)肝硬変症例
症例数	NASH	135	37	7
	NASH肝癌	26	22	12
ROC-AUC	Free AIM	0.927	0.918	0.869
	Total AIM	0.801	0.709	0.506

[0098] 実施例７：ｎｏｎ－ＨＣＣ患者とＨＣＣ患者におけるＲＯＣ解析

ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者（あわせてｎｏｎ－ＨＣＣ患者）（１７７例）と、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）（２６例）を対象に、血清中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩＭ濃度およびｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩＭ濃度の比率につきＲＯＣ解析を行った。ＡＵＣは、ｆｒｅｅ　ＡＩＭで０．９２９、ｔｏｔａｌ　ＡＩＭで０．８０６、ｆｒｅｅ　ＡＩＭ／ｔｏｔａｌ　ＡＩＭ比で０．８４２であり、ｆｒｅｅ　ＡＩＭがより高い診断効率で肝癌患者の判別が可能であった（図６参照）。

[0099] 実施例８：診断感度と特異度の解析

ＮＡＦＬ患者、ＮＡＳＨ患者（あわせてｎｏｎ－ＨＣＣ）（１７７例）と、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）（２６例）について血中のｆｒｅｅ　ＡＩＭ濃度を測定し、カットオフ値を１．６μｇ/ｍＬとして、ｆｒｅｅ　ＡＩＭによる肝癌の診断的価値を検討した。その結果、ＮＡＳＨ肝癌患者（ＨＣＣ）

で１．６μｇ/mL以上を示した患者は２３例であり、診断感度は０．８８５（２３／２６）であった。また、肝癌ではない患者で１．６μｇ/mL未満を示した患者は１５２例であり、診断特異度は０．８５９（１５２／１７７）であった（表２）。

[表2]

	Non-HCC	HCC	total
free AIM 1.6μg/mL未満	152	3	155
free AIM 1.6μg/mL以上	25	23	48
total	177	26	203

[0100] 実施例９：腫瘍マーカーとの関連性

ＮＡＳＨ肝癌患者２５例を対象として、血中のｆｒｅｅ　ＡＩM濃度、ｔｏｔａｌ　ＡＩM濃度、ｆｒｅｅ　ＡＩM濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩM濃度の比率につき、腫瘍マーカー（ＰＩＶＫＡ－ＩＩ，ＡＦＰ）との関連性を検討した。ＰＩＶＫＡ－ＩＩとＡＦＰのカットオフ値をそれぞれ４０ｍＡＵ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬとして患者を分別し、それぞれの患者についてｆｒｅｅ　ＡＩM濃度、ｔｏｔａｌ　ＡＩM濃度、ｆｒｅｅ　ＡＩM濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩM濃度の比率を解析した。その結果、各腫瘍マーカーのカットオフ値以上を示した患者群と、カットオフ値未満を示した患者群間におけるｆｒｅｅ　ＡＩM濃度、ｔｏｔａｌ　ＡＩM濃度、ｆｒｅｅ　ＡＩM濃度とｔｏｔａｌ　ＡＩM濃度の比率にいずれも有意差は認められなかった（表３）。

[0101] [表3]

	PIVKA-II			AFP		
	40mAU未満	40mAU以上		20ng未満	20ng以上	
	平均(SD)	平均(SD)	p	平均(SD)	平均(SD)	p
free AIM (mg/mL)	2.83 (1.60)	2.99 (1.20)	0.406	2.73 (1.44)	3.51 (1.05)	0.121
total AIM (mg/mL)	7.42 (3.19)	7.70 (2.50)	0.574	7.40 (2.90)	8.11 (2.60)	0.475
free/total比率	0.39 (0.13)	0.38 (0.10)	0.723	0.37 (0.12)	0.44 (0.08)	0.196

産業上の利用可能性

[0102] 本発明の方法および／または検査または診断補助キットを用いることにより、優れた感度および特異性で肝癌を検査することができる。

請求の範囲

[請求項1] 肝癌の検査方法であって、

被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭを検出または定量する工程を含む、

方法。

[請求項2] 肝癌の診断を補助する方法であって、

被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭを検出または定量する工程を含む、

方法。

[請求項3] 肝癌を検査するために、被験体に由来する生体試料中のｆｒｅｅ　ＡＩＭを検出または定量する方法。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか１項に記載の方法であって、

前記生体試料が、体液である、

方法。

[請求項5] 請求項４に記載の方法であって、

前記体液が、血清、血漿、全血および尿からなる群から選択される、

方法。

[請求項6] 請求項１～５のいずれか１項に記載の方法であって、

前記肝癌が、非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に起因する肝癌である、

方法。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか１項に記載の方法であって、

前記検出または定量は、イムノアッセイによるものである、

方法。

[請求項8] 請求項７に記載の方法であって、

前記検出または定量は、生体試料とｆｒｅｅ　ＡＩＭに結合する抗体とを接触させることにより行う、

方法。

[請求項9] 請求項８に記載の方法であって、

前記検出または定量は、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに特異的に結合する抗体により行う、

方法。

[請求項10] 請求項８または請求項９に記載の方法であって、

前記検出または定量は、ＥＬＩＳＡによる測定である、

方法。

[請求項11] 請求項６～１０のいずれか１項に記載の方法であって、

前記検出または定量は、血清、血漿または全血から選択される血液試料をタンパク質変性条件に曝露することなく、かつ、還元条件に曝露することなく行うことを特徴とする、

方法。

[請求項12] 請求項１または請求項２に記載の方法であって、

被験体に由来する生体試料中のｔｏｔａｌ　ＡＩＭを定量する工程をさらに含む、

方法。

[請求項13] 請求項１２に記載の方法であって、

ｆｒｅｅ　ＡＩＭとｔｏｔａｌ　ＡＩＭの比率を算出する工程をさらに含む、

方法。

[請求項14] ｆｒｅｅ　ＡＩＭに結合する抗体を含む、肝癌の検査または診断補助用キット。

[請求項15] 請求項１４に記載のキットであって、

前記抗体が、ｆｒｅｅ　ＡＩＭに特異的に結合する抗体である、

キット。

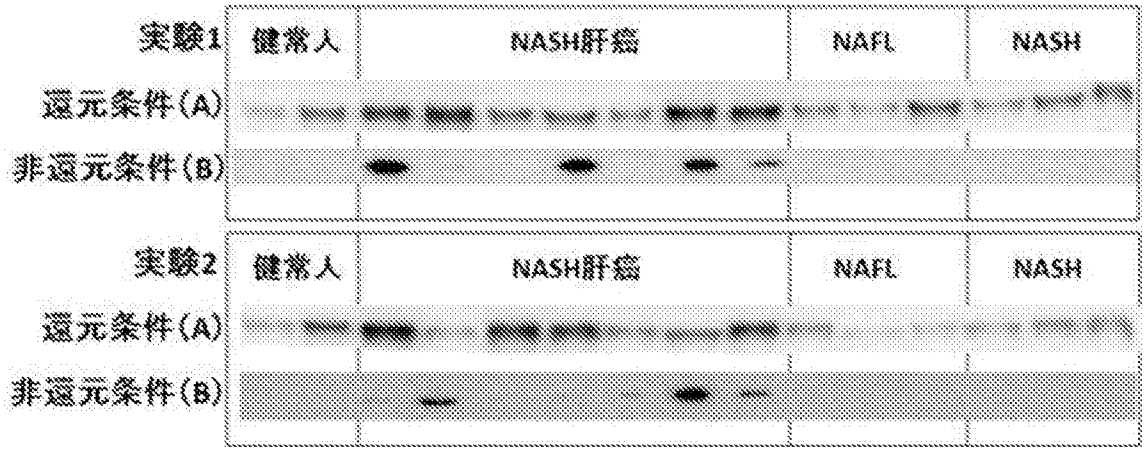
[請求項16] 請求項１４または請求項１５に記載のキットであって、

前記肝癌が、非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ）に起因する肝癌

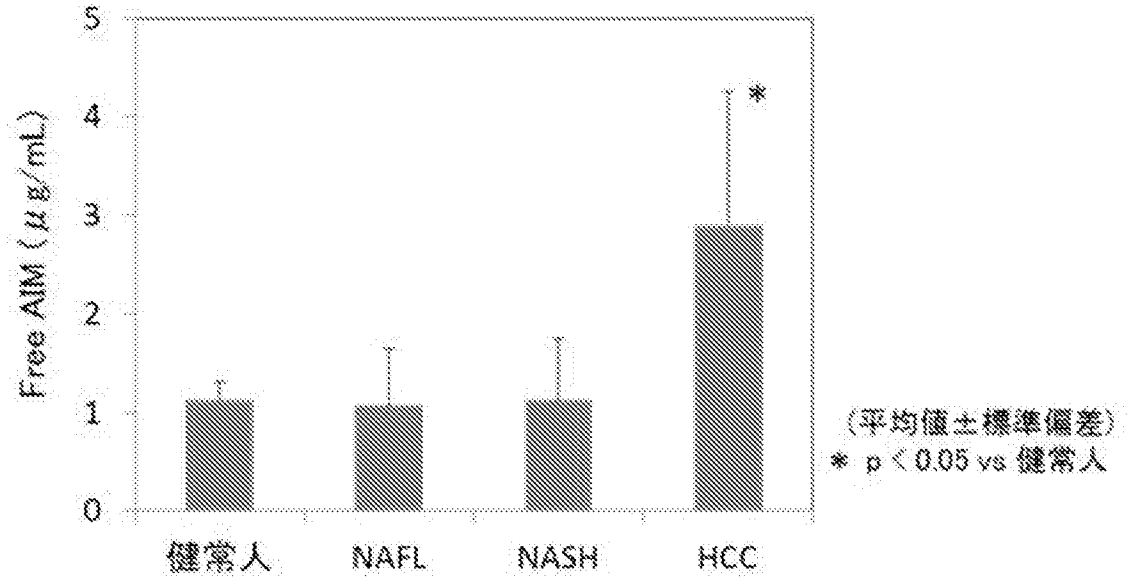
である、

キット。

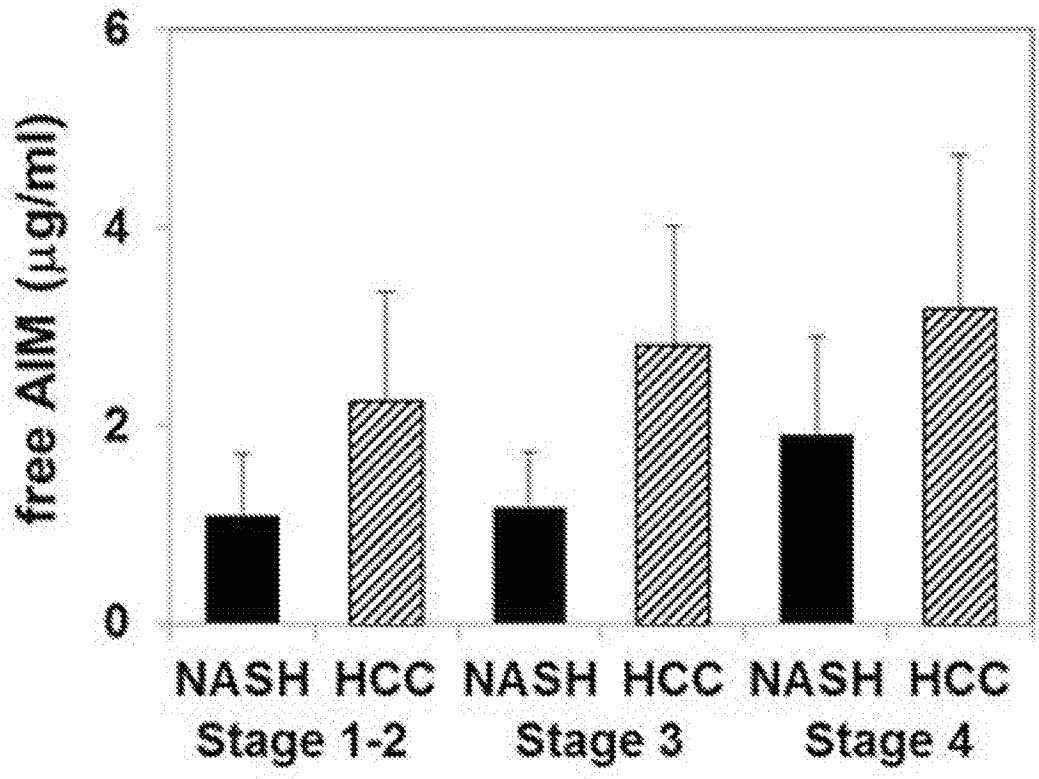
[図1]


実験1
健常人
NASH肝癌
NAFL
NASH
還元条件(A)
非還元条件(B)
実験2
健常人
NASH肝癌
NAFL
NASH
還元条件(A)
非還元条件(B)

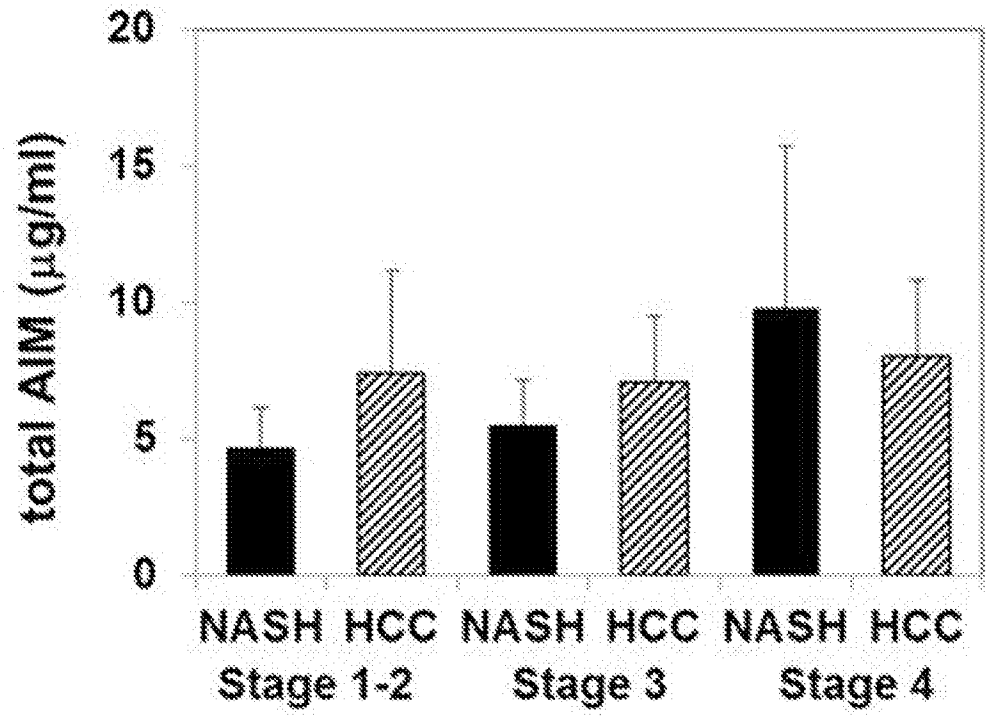
[図2]


Free AIM (μg/mL)
0
1
2
3
4
5
*
健常人
NAFL
NASH
HCC
(平均値±標準偏差)
* p < 0.05 vs 健常人

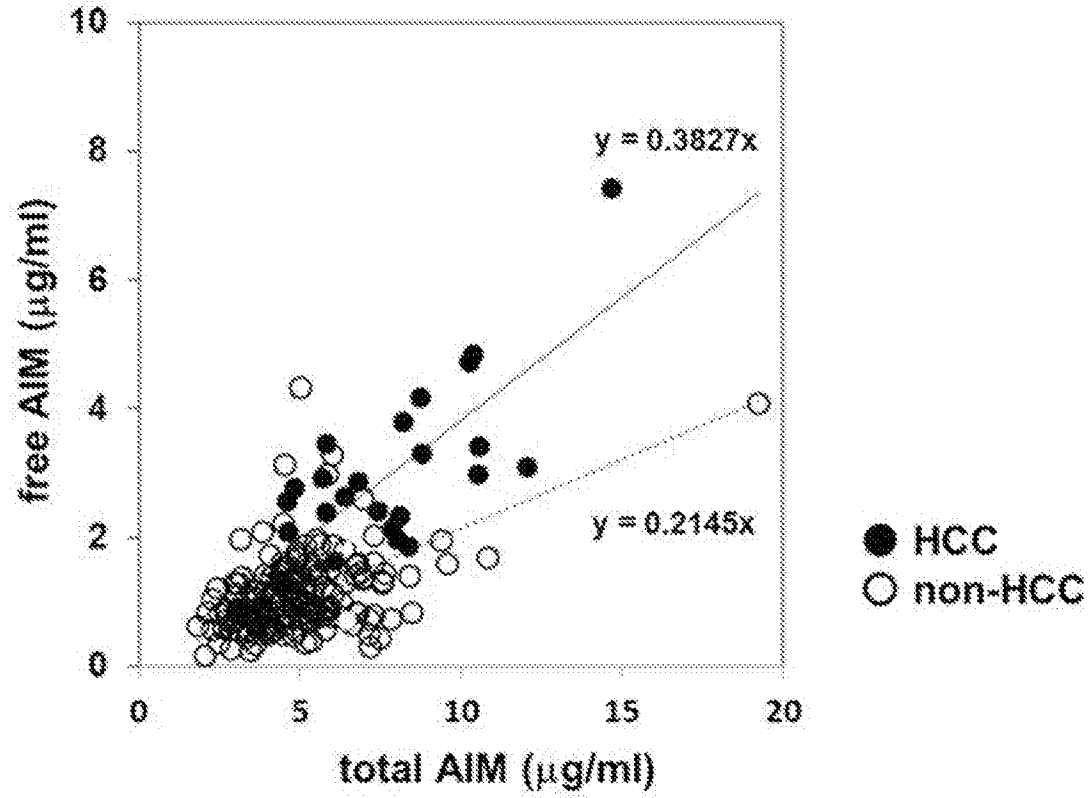
[図3]


free AIM (μg/ml)
6
4
2
0
NASH HCC NASH HCC NASH HCC
Stage 1-2
Stage 3
Stage 4

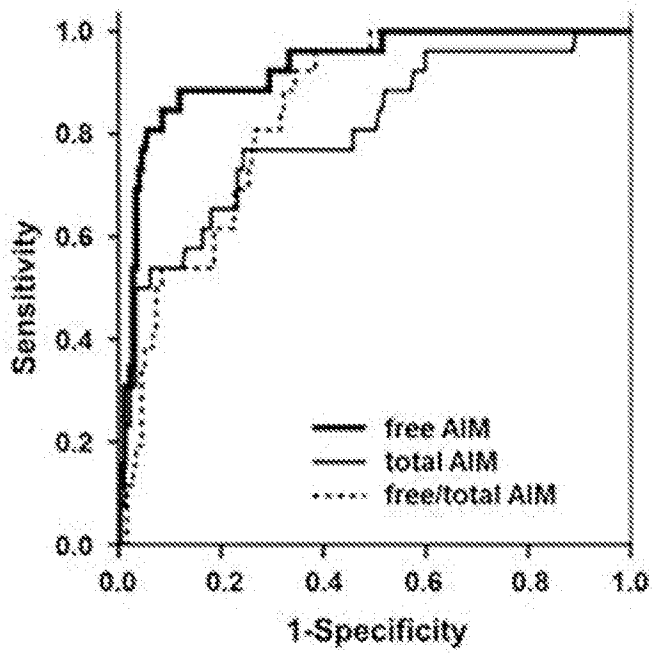
[図4]


total AIM (μg/ml)
20
15
10
5
0
NASH HCC NASH HCC NASH HCC
Stage 1-2
Stage 3
Stage 4

[図5]



[図6]



parameter	ROC-AUC
free AIM	0.929
total AIM	0.806
free/total AIM	0.842

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/076562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/574(2006.01)i, *C12Q1/02*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *G01N33/68*(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, C12Q1/02, G01N33/53, G01N33/68

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Scopus, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/145725 A1 (Toru MIYAZAKI), 24 November 2011 (24.11.2011), entire text; all drawings & EP 2573192 A1 entire text; all drawings	1-16
A	MERA, Kumiko et al., Serum levels of apoptosis inhibitor of macrophage are associated with hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C, BMC Gastroenterology, 2014, 14(27), 1-10	1-16
A	US 2015/0094268 A1 (MIYAZAKI, Toru), 02 April 2015 (02.04.2015), entire text; all drawings (Family: none)	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
07 November 2016 (07.11.16)	22 November 2016 (22.11.16)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/076562

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAZAKI, Tomoko et al., Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans, PLOS ONE, 2014, 9(10), 1-12	1-16
A	GRAY, Joe et al., A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease, BMC Cancer, 2009, 9(271), 1-11	1-16
A	ARAI, Satoko et al., Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells, Cell Reports, 2013, 3, 1187-1198	1-16
A	GANGADHARAN, Bevin et al., Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients, Clinical Chemistry, 2007, 53(10), 1792-1799	1-16
A	MIYAZAKI, Toru et al., Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily, Journal of Experimental medicine, 1999, 189(2), 413-422	1-16

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０７６５６２

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, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/68(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, C12Q1/02, G01N33/53, G01N33/68

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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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（JDreamIII）、Scopus、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	WO 2011/145725 A1（宮崎徹）2011.11.24, 全文、全図 & EP 2573192 A1（全文、全図）	1-16
A	MERA, Kumiko et al., Serum levels of apoptosis inhibitor of macrophage are associated with hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C, BMC Gastroenterology, 2014, 14(27), 1-10	1-16

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　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の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	国際調査報告の発送日
０７．１１．２０１６	２２．１１．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　２Ｊ　８３５６
赤坂　祐樹
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

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
A	US 2015/0094268 A1 (MIYAZAKI, Toru) 2015.04.02, 全文、全図（ファミリーなし）	1-16
A	YAMAZAKI, Tomoko et al., Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans, PLOS ONE, 2014, 9(10), 1-12	1-16
A	GRAY, Joe et al., A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease, BMC Cancer, 2009, 9(271), 1-11	1-16
A	ARAI, Satoko et al., Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells, Cell Reports, 2013, 3, 1187-1198	1-16
A	GANGADHARAN, Bevin et al., Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients, Clinical Chemistry, 2007, 53(10), 1792-1799	1-16
A	MIYAZAKI, Toru et al., Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily, Journal of Experimental medicine, 1999, 189(2), 413-422	1-16