



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106796237 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201480078553.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2014.07.22

G01N 33/574(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.28

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/003855 2014.07.22

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/013041 JA 2016.01.28

(71)申请人 株式会社癌症免疫研究所
地址 日本熊本县熊本市东区下南部3丁目
2-100

(72)发明人 仓持恒雄

(74)专利代理机构 中国商标专利事务所有限公
司 11234

代理人 桑丽茹

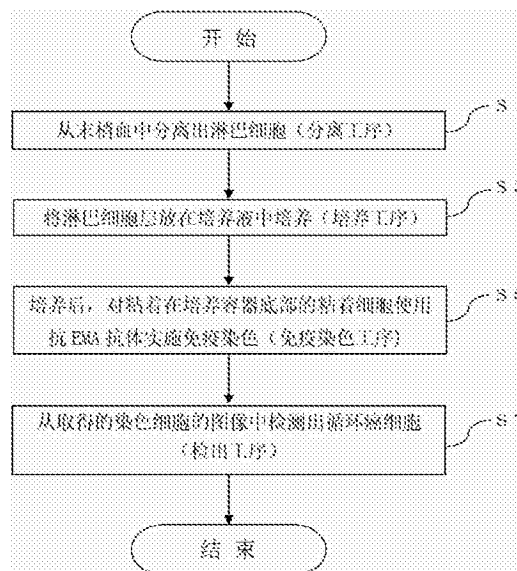
权利要求书1页 说明书18页 附图6页

(54)发明名称

末梢循环癌细胞的检测方法及检测装置

(57)摘要

提供一种可以简单而且高精度的检测出末梢循环癌细胞的检测方法。末梢循环癌细胞的检测方法,是一种从生物试样中检测出循环癌细胞的检测方法,包括以下(a)~(d)工序。(a)从未梢血中分离出淋巴细胞的分离工序、(b)将分离的末梢血淋巴细胞层放在培养液中培养的培养工序、(c)培养后,将粘着于培养容器底部的细胞实施免疫染色的免疫染色工序、(d)根据从免疫染色工序中取得的染色细胞的观察图像,从生物试样中检测出循环癌细胞的检出工序。



1. 一种末梢循环癌细胞的检测方法,其特征在于:
是一种从生物试样中检测出循环癌细胞的检测方法,包括
(a) 从末梢血中分离出淋巴细胞的分离工序、和
(b) 将分离的末梢血淋巴细胞层放在培养液中培养的培养工序、和
(c) 培养后,对粘着于培养容器底部的细胞实施免疫染色的免疫染色工序、和
(d) 根据从上述免疫染色工序中取得的染色细胞的观察图像,从上述生物试样中检测出循环癌细胞的检出工序。
2. 如权利要求1所述的末梢循环癌细胞的检测方法,其特征在于:
上述免疫染色工序中使用的是抗EMA(上皮膜抗原)抗体实施染色。
3. 如权利要求1或2所述的末梢循环癌细胞的检测方法,其特征在于:
上述培养工序中使用的培养容器、和上述免疫染色工序中使用的染色容器是同一个容器,培养后,从上述培养容器排出上清液仅留下粘着于底部的细胞,往上述培养容器注入免疫染色的抗体。
4. 如权利要求1~3中任意的权利要求项所述的末梢循环癌细胞的检测方法,其特征在于:上述培养液至少含有1000U/ml的白细胞介素-2(IL-2)。
5. 如权利要求1~4中任意的权利要求项所述的末梢循环癌细胞的检测方法,其特征在于:上述培养工序需要进行48~72小时的培养。
6. 如权利要求1~5中任意的权利要求项所述的末梢循环癌细胞的检测方法,其特征在于:上述分离工序之后,将分离的末梢血淋巴细胞层至少使用抗CD3抗体和抗CD161抗体中的任意一种实施固相化。
7. 权利要求1~6中任意的权利要求项所述的末梢循环癌细胞的检测方法中的上述检出工序中,按照上述观察图像中的上述染色细胞的个数,来筛查癌症患者和健康人的筛查方法。
8. 一种末梢循环癌细胞的检测装置,其特征在于:具备
从末梢血中分离出淋巴细胞的分离功能模块、和
将分离的末梢血淋巴细胞层放在培养液中培养的培养功能模块、和
将粘着于培养容器底部的细胞实施免疫染色的免疫染色功能模块、和
根据取得的染色细胞的观察图像,从上述生物试样中检测出循环癌细胞的检出功能模块。
9. 如权利要求8所述的末梢循环癌细胞的检测装置,其特征在于:
上述免疫染色功能模块使用的是抗EMA(上皮膜抗原)抗体实施染色。
10. 如权利要求8或9所述的末梢循环癌细胞的检测装置,其特征在于:
上述培养功能模块中使用的培养容器、和上述免疫染色功能模块中使用的染色容器是同一个容器。
11. 如权利要求8~10中任意的权利要求项所述的末梢循环癌细胞的检测装置,其特征在于:上述培养液至少含有1000U/ml的白细胞介素-2(IL-2)。
12. 如权利要求8~11中任意的权利要求项所述的末梢循环癌细胞的检测装置,其特征在于:将分离的末梢血淋巴细胞层至少使用抗CD3抗体和抗CD161抗体中的任意一种实施固相化。

末梢循环癌细胞的检测方法及其检测装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可以简单的检测出末梢循环癌细胞(CTC;Circulating Tumor Cell)的检测方法及检测装置。

背景技术

[0002] 向来,已知的末梢循环癌细胞(CTC)以106~107个的末梢血单核细胞中1个的超低浓度,从上皮衍生的癌症患者的末梢血中观察到。恶化的癌细胞在血液或淋巴液中循环流动,导致向远隔器官转移,因此CTC被认为是主要原因。

[0003] 在乳癌或大肠癌等转移性癌症的案例中,血液中的CTC已被认可对治疗效果的判定或作为预后因素是有用的,比如,已知的有美国Veridex公司开发的关于乳癌、大肠癌等领域的检测系列的CellSearch(注册商标)系统。CellSearch(注册商标)系统,利用抗EpCAM抗体固定化磁珠,将CTC浓缩分离后,通过免疫染色法来标记CTC,计数出试样中的CTC(例如,请参照非专利文件1)。

[0004] 此外,鉴于癌细胞对尿激酶(尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂(uPA))及其受体(尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂受体(uPAR))的表达,还公开了以尿激酶的活性为指标,从而将CTC即简便且高精度的检测回收的循环癌细胞的检测方法(请参照专利文件1)。

[0005] 【专利文献1】特开2014-39480号公报

[0006] 【非专利文献1】Riethdorf S et al.,Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer:a validation study of the CellSearch system.Clin Cancer Res.2007Feb 1;13(3):920-8.

发明内容

[0007] 发明所要解决的技术问题

[0008] 如上所述的CellSearch(注册商标)系统,对癌细胞表面的EpCAM(上皮细胞粘附分子)表达,利用抗EpCAM抗体的固定化磁珠,来浓缩CTC。具体讲就是,通过纳米铁粒子与抗EpCAM的抗体结合的磁性粒子,从血液众多的细胞中将异常的上皮细胞分离出。将分离出的上皮细胞与荧光标记后的细胞角蛋白单克隆抗体进行反应,然后一起被荧光性的DNA染色物质将细胞核染色。此外,为了将白血球识别为CTC,使荧光标记的CD45抗体发生反应。然后,将CTC的反应溶液转移到固定有磁铁的盒子中。由磁铁产生的磁力使CTC移动到盒子上面。对显示在盒子上面荧光的发色状况的荧光图像数据进行分析。

[0009] 如上所述,在CellSearch(注册商标)系统中,浓缩CTC、将上皮细胞特别分离出,将附在血液中的CTC利用磁铁来诱导,然后利用荧光发色,这样的检测方法或检测装置变得很复杂。

[0010] 鉴于以上情况,本发明以提供一种可以更简便且高精度的检测出末梢循环癌细胞的检测方法以及检测装置。

[0011] 解决问题的方法

[0012] 本申请的发明人,将从末梢血中分离出的淋巴细胞层进行培养,对粘着在培养容器底部的粘着细胞进行深入研究的结果,发现利用细胞培养后的粘着细胞可以更简单更精确的检测出末梢循环癌细胞。

[0013] 也就是说,本发明的末梢循环癌细胞的检测方法,是检测生物试样中的循环癌细胞的检测方法,包括以下(a)~(d)工序。

[0014] (a) 从末梢血中分离出淋巴细胞的分离工序、和

[0015] (b) 将分离的末梢血淋巴细胞层放在培养液中培养的培养工序、和

[0016] (c) 培养后,将附着于培养容器底部的细胞进行免疫染色的免疫染色工序、和

[0017] (d) 根据从免疫染色工序中取得的染色细胞的观察图像,从生物试样中检测出循环癌细胞的检出工序。

[0018] 在此,上述(c)的免疫染色工序,作为优选,最好使用抗EMA(上皮膜抗原)抗体染色。使用抗EMA抗体进行免疫染色得到的是分析数据的特异性低、灵敏度高的结果,结果是检测的cut-off(临界值)值等同与下降,是可以作为筛选检测使用的。

[0019] 作为优选,上述(b)的培养工序中使用的培养容器,最好是和上述(c)的免疫染色工序中使用的免疫染色容器为同一个容器,培养后,从培养容器排出上清液仅留下粘着于底部的细胞,往培养容器注入免疫染色的抗体,可以更简便的进行检测。

[0020] 此外,培养液为至少含有1000U/ml的白细胞介素-2(IL-2)也是可以的。用来培养末梢血淋巴细胞层的培养液,从临床经验上来讲最好是至少含有1000U/ml的白细胞介素-2(IL-2)。

[0021] 上述(b)的培养工序,最好是进行48~72小时的培养。培养不满48小时的话,从临床经验上来讲要检出循环癌细胞是比较困难的。此外,培养超过72小时的话,循环癌细胞会出现自然灭亡(细胞凋亡)。

[0022] 上述(a)的分离工序以后,最好将分离的末梢血淋巴细胞层至少使用抗CD3抗体和抗CD161抗体中的任意一种进行固相化。这是因为通常细胞培养用的培养瓶是使用经过抗CD3抗体或抗CD161抗体等固相化过的。经过抗CD3抗体或抗CD161抗体中任意一种的固相化,可使包含在末梢血淋巴层的细胞增殖和活化。固相化的处理工序,并不是特别限定的,可适宜进行选择。

[0023] 此外,本发明涉及的癌症患者与健康人群的筛查方法,如上所述的关于本发明的末梢循环癌细胞的检测方法中的上述(d)的检测工序中,根据观察图像内的染色细胞的个数来进行判断。根据观察图像内的染色细胞的个数,进行分级判断。

[0024] 接下来,就本发明的末梢循环细胞的检测装置进行说明。

[0025] 本发明涉及的末梢循环细胞的检测装置,具备从末梢血中分离出淋巴细胞的分离功能模块、和将分离的末梢血淋巴细胞层放在培养液中培养的培养功能模块、将粘着于培养容器底部的细胞实施免疫染色的免疫染色功能模块、和根据取得的染色细胞的观察图像从生物试样中检测出循环癌细胞的检出功能模块。

[0026] 免疫染色功能模块,最好使用抗EMA(上皮膜抗原)抗体进行染色。此外,培养功能模块中使用的培养容器最好是与免疫染色功能模块中使用的免疫染色容器是同一个容器。经过培养后,从培养容器排出上清液仅留下粘着于底部的细胞,可以往培养容器注入免疫染色的抗体,构成更简便的检测装置。

[0027] 培养液是至少含有1000U/ml的白细胞介素-2(IL-2)也是可以的。此外,将分离的末梢血淋巴层至少使用抗CD3抗体和抗CD161抗体中的任意一种进行固定化也是可以的。

[0028] 发明效果

[0029] 本发明的末梢循环癌细胞检测方法及检测装置,具有可以更简便且高精度的检测出末梢循环癌细胞的效果。

附图说明

[0030] 【图1】是本发明的末梢循环癌细胞的检测流程图

[0031] 【图2】是本发明的末梢循环癌细胞的检测流程图(包含固相化工序)

[0032] 【图3】是卵巢癌患者的EMA阳性细胞电子显微照片1

[0033] 【图4】是卵巢癌患者的EMA阳性细胞电子显微照片2

[0034] 【图5】是健康人的EMA阳性细胞电子显微照片1

[0035] 【图6】是健康人的EMA阳性细胞电子显微照片2

具体实施方式

[0036] 以下,就本发明的实施形态中的一例,一边参照图面一边进行详细说明。此外,关于本发明的范围,不限于以下的实施例或图示例,可以有其他的变更或变形。

[0037] 本发明的末梢循环癌细胞的检测方法,如图1的流程图所示,包括从末梢血中分离出淋巴细胞的分离工序(步骤S1)、和将分离的末梢血淋巴层放在培养液中培养的培养工序(步骤S3)、和培养后,将粘着于培养容器底部的细胞实施免疫染色的免疫染色工序(步骤S5)、和根据免疫染色工序取得的染色细胞的观察图像,从生物试样中检测出循环癌细胞的检测工序(步骤S7)构成。

[0038] 具体讲就是,在分离工序(步骤S1)中,从生物试样30ml的末梢血中,使用淋巴细胞分离液(比重 1.077 ± 0.001)将淋巴层分离。

[0039] 在培养工序(步骤S3)中,在75cm²的塑料培养瓶中,往以RPMI 1640、1MDM为基础的培养液、混合1000U/ml的IL-2调制成的淋巴细胞培养液,在5%CO₂、37℃的恒温箱里培养48~72小时。此外,比起使用低浓度的IL-2,混合1000U/ml的IL-2可提高细胞的生长速度和活性。已知的IL-2是会给细胞增殖及活性化带来影响的细胞因子(从细胞释放出的免疫物质),也可人工合成。

[0040] 在免疫染色工序(步骤S5)中,经过培养后,弃去上清液,将粘着在培养瓶底部的细胞用细胞刮刀剥离后,用95%的乙醇进行固定,在常温下实施免疫染色。

[0041] 在检测工序(步骤S7)中,先对从免疫染色工序中取得的标本进行前处理,用内源性过氧化物酶5分钟阻断后,然后滴加接下来要介绍的6种抗体20分钟,使用DAB显色剂4分钟,苏木素染色1分钟后,在显微镜下进行观察。

[0042] 在此,如图2的流程图所示,在分离工序(步骤S1)之后,附加将分离的末梢血淋巴层至少使用抗CD3抗体和抗CD161抗体中的任意一种进行固定化的固相化工序(步骤S2)也是可以得。

[0043] 在固相化工序(步骤S2)中,使用的是抗CD3抗体或是抗CD161抗体,或者是抗CD3抗体和抗CD161抗体一起使用。

[0044] 另外,在末梢循环癌细胞的检测方法中,用于反应的试剂、阻断剂、聚合物试剂、DAB显色剂、清洗液(Envision Flex Kit显色试剂盒)使用的是Dako公司的产品。此外,苏木素染液是将梅耶氏苏木精液自己调整配置的。

[0045] 然后,在免疫染色工序(步骤S5)中使用的抗体是Dako公司生产的稀释过的抗EMA抗体、抗CEA抗体、抗CK(AE1/AE3)抗体、抗Ki-67抗体、抗CD20(L-26)抗体,或者是抗CD45RO抗体中的任意一种,染色使用的是自动免疫染色装置。在以下的表1中,关于用于免疫染色的6种抗体,示意的是癌细胞的谱系及临床意义。

[0046] 【表1】

[0047]

使用的抗体	细胞的谱系及临床意义
EMA	在上皮性肿瘤、骨髓瘤细胞表达
CEA	在结肠癌、胃癌、食道癌、胰腺癌、肺癌等腺癌表达
CK(AE1/AE3;细胞角蛋白)	在皮性肿瘤、细胞增殖活性细胞表达
Ki-67	在细胞增殖活性细胞表达
CD20(L-26)	在B细胞淋巴瘤、成熟B细胞表达
CD45RO	在T细胞淋巴瘤、成熟T细胞表达

[0048] 为了证实本发明的末梢循环癌细胞的检测方法的有效性,在以下的实施例中对实施的试验结果进行说明。在以下的实施例中,如图2的流程图所示,将从30ml的末梢血中使用淋巴细胞分离液分离出的淋巴细胞层放在经过抗CD3抗体和抗CD161抗体固相化处理过的培养瓶中培养。

[0049] 抗CD3抗体是UCTH-1(bd biosciences公司生产)、抗CD161抗体使是191.B8

[0050] (Immuno-Tech公司生产)。固相培养容器的制作,是往底部的内表面积为75cm²的培养瓶滴加抗CD3抗体和抗CD161抗体实施固相化处理,即制成了固相培养瓶。固相化处理是将调制的1μg/ml抗CD3抗体注入培养瓶,在室温下静置24小时后,将多余的抗体用磷酸盐缓冲液清洗。然后,将调制的1μg/ml的抗CD161抗体注入培养瓶,再放在室温下静置24小时后,放入5℃的冷藏库保存,使用时将多余的抗体用磷酸盐缓冲液清洗后使用。

[0051] 另外,如图1的流程图所示,不包括将分离的淋巴细胞层使用抗CD3抗体和抗CD161抗体固定化的固定化工序也是可以的。

[0052] 【实施例1】

[0053] 关于实施例1,就免疫染色工序(步骤5)中使用抗EMA抗体进行免疫染色的结果进行说明。

[0054] (受试者的选择方法)

[0055] 关于受试者的选择方法,受试对象并非事先就决定的,先检查正解,分别选出癌症患者37名(其中、男性22名、女性15名)和健康人33名(其中、男性15名、女性18名),合计70名(其中、男性37名、女性33名)。

[0056] 表2示意的是37名癌症患者检体(检体名P1~P37),分别按照年龄、性别、癌症种类、分期(Stage)、免疫染色的结果(Positive:阳性,或是Negative:阴性),根据免疫染色的分析结果得出的判定等级(0~3)。

[0057] 如表2所示,所涉及的癌症种类范围广泛,如肝癌、乳腺癌、胃癌、胰脏癌、食道癌、

肺癌、大肠癌、肝细胞癌、结肠癌、恶性淋巴瘤等。

[0058] 此外,表3示意的是33名健康人(检体名N1~N33),分别按照年龄、性别、免疫染色的结果(Positive:阳性,或是Negative:阴性),根据免疫染色的分析结果得出的判定等级(0~3)。

[0059] 【表2】

[0060]

检体序号	年龄	性别	癌症种类	分期	结果	判定
P1	62	男	肝癌	Stage 111c	阳性	Grade2
P2	57	女	乳腺癌	Stage 1V	阳性	Grade1
P3	65	男	胃癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P4	70	男	胰腺癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P5	76	女	食道癌	Stage 1V	阳性	Grade1
P6	66	男	食道癌	Stage 1a	阴性	Grade0
P7	65	男	胰腺癌	Stage 111b	阳性	Grade1
P8	71	男	胰腺癌	Stage 1V	阳性	Grade3
P9	63	男	肺癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P10	70	女	乳腺癌	Stage 111c	阳性	Grade2
P11	60	男	进展期直肠癌	Stage 111b	阳性	Grade2
P12	73	女	肝细胞癌	Stage 111	阳性	Grade2
P13	44	女	乳腺癌	Stage 11c	阳性	Grade2
P14	58	女	胃癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P15	67	男	大肠癌	Stage 1V	阳性	Grade1
P16	70	男	肺癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P17	74	男	恶性淋巴瘤	Stage 111b	阳性	Grade2
P18	71	女	肺腺癌	Stage 1V	阴性	Grade0
P19	42	女	胰腺癌	Stage 1V	阴性	Grade0
P20	51	男	直肠癌	Stage 1V	阴性	Grade0
P21	71	男	输尿管癌	Stage 1V	阳性	Grade1
P22	73	男	肺腺癌	Stage 111a	阴性	Grade0
P23	78	女	胃癌	Stage 1V	阴性	Grade0
P24	47	女	卵巢癌	Stage 1V	阴性	Grade0
P25	75	女	直肠癌	Stage 1V	阳性	Grade1
P26	71	男	食道癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P27	56	男	脑肿瘤	Stage 111a	阳性	Grade3
P28	50	男	直肠癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P29	43	女	乳腺癌	Stage 1V	阳性	Grade2
P30	30	女	卵巢癌	Stage 1V	阳性	Grade1
P31	66	女	右肾癌	Stage 111c	阳性	Grade2
P32	70	男	胃癌	Stage 111b	阳性	Grade2

P33	71	男	胃癌	Stage IV	阳性	Grade2
P34	63	男	肺腺癌	Stage IIIb	阳性	Grade2
P35	55	女	胰腺癌	Stage IIIc	阴性	Grade0
P36	40	男	多发性骨髓瘤	Stage III	阴性	Grade0
P37	70	男	前列腺癌	Stage IIIb	阳性	Grade1

[0061] 【表3】

[0062]

检体序号	年龄	性别	结果	判定
N1	39	男	阴性	Grade0
N2	28	男	阳性	Grade2
N3	45	男	阳性	Grade2
N4	34	女	阳性	Grade2
N5	47	女	阳性	Grade3
N6	44	女	阳性	Grade2
N7	69	女	阴性	Grade0
N8	36	男	阳性	Grade2
N9	35	男	阳性	Grade2
N10	30	女	阴性	Grade0
N11	60	女	阴性	Grade0
N12	32	女	阴性	Grade0
N13	50	男	阴性	Grade0
N14	36	男	阴性	Grade0
N15	45	男	阴性	Grade0
N16	35	女	阴性	Grade0
N17	59	男	阳性	Grade2
N18	50几岁	女	阴性	Grade0
N19	60	女	阳性	Grade2
N20	57	女	阳性	Grade2
N21	54	女	阳性	Grade2
N22	54	女	阳性	Grade2
N23	43	男	阳性	Grade1
N24	50几岁	女	阴性	Grade0
N25	40几岁	女	阴性	Grade0
N26	51	男	阴性	Grade0
N27	57	男	阳性	Grade2
N28	42	女	阳性	Grade2
N29	52	男	阴性	Grade0
N30	26	女	阴性	Grade0
N31	72	男	阳性	Grade2

N32	75	女	阴性	Grade0
N33	60	男	阳性	Grade3

[0063] 使用抗EMA抗体实施免疫染色取得的结果,如下表4,表5所示。

[0064] 在表4中,真阳性、真阴性、假阳性及假阴性的术语的定义如下(本说明书中涉及的其他表中的记载以及在文中的记载也是一样)。

[0065] • 真阳性:经过检查被正确的检测为阳性的人(事实上是病人:癌症患者)

[0066] • 真阴性:经过检查被正确的检测为阴性的人(事实上是非病人:健康人)

[0067] • 假阳性:事实上是非病人被判定为检查阳性。

[0068] • 假阴性:事实上是病人被判定为检查阴性。

[0069] 此外,在表5中,敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确度的术语的定义如下(本说明书中涉及的其他表中的记载以及在文中的记载也是一样)。

[0070] • 敏感性:能正确检出被检者为阳性的比例

[0071] • 特异性:能正确检出非病患者为阴性的比例

[0072] • 阳性预测值:能正确检出阳性者有病的比例

[0073] • 阴性预测值:能正确说出阴性者没病的比例

[0074] • 准确度:总数中的准确比例

[0075] 在此,将敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确度的这5个作为通常诊断准确率的指标。虽然阳性率及患病率不是诊断准确率的指标,但确是解析数据的重要指标。在表5中,分别显示着各个指标的计算公式。

[0076] 敏感性越高,阳性者(患者)被漏检的就会减少,是诊断几率高的检查。此外,敏感性越高,漏检(假阳性者)少的检查。也就是说,当阳性预测值高的检查中出现阳性的话,那么患病率会很高,当阴性预测值高的检查中出现阴性的话,基本上可以否定该疾病。

[0077] 【表4】

[0078]

	癌症患者	健康人	合计
检查阳性	真阳性:28	假阳性:17	阳性数:45
检查阴性	假阴性:9	真阴性:16	阴性数:25
合计(人数)	患者数:37	非患者数:33	总数:70

[0079] 【表5】

[0080]

指标	计算公式	值(%)
敏感性	真阳性数/患者数	76
特异性	真阴性数/非患者数	48
阳性预测值	真阳性数/阳性数	62
阴性预测值	真阴性数/阴性数	64
患病率	患者数/总数	53
阳性率	阳性数/总数	64
准确度	(真阳性数+真阴性数)/总数	63

[0081] 如上表4所示,结果是癌症患者中阳性(真阳性)28人、阴性(假阴性)9人,健康人中

阳性(假阳性)17人,阴性(真阴性)16人。

[0082] 此外如上表5所示,虽然特异性为48%很低,敏感性却高达76%,阳性预测值为62%的结果。使用抗EMA抗体实施免疫染色取得的结果是,解析数据的特异性低,敏感性高,结果是相当于降低了筛查阳性界(Cut off)值,可用于筛选试验。另外,相反的,解析数据的特异性高,敏感性低时,结果是相当于升高了数据的筛查阳性界(Cut off)值,可用于以启动治疗为目的的检查。

[0083] 在此,对使用抗EMA抗体染色的细胞的谱系进行说明。抗EMA抗体,除了上皮肿瘤细胞以外,也会对骨髓中的浆细胞进行染色。由于健康人的骨髓浆细胞是不会出现在末梢血液中,在检查过程中发现的健康人的EMA阳性细胞是浆细胞的可能性可以排除。在癌症患者的末梢血中发现的EMA阳性细胞的疾患有霍奇金病(H&L细胞)和间变性大细胞淋巴瘤(T细胞系细胞),此次没有对这些患者进行检查。从以上理由可以得出,用抗EMA抗体染色的细胞,可判定是上皮肿瘤细胞或上皮起源的异常细胞。

[0084] 接下来,在培养细胞的培养工序(步骤3)中,关于不同组成成分的培养液,是否会影响到EMA阳性细胞的表达,用4名健康人的细胞进行检查的结果进行说明。

[0085] 选择1名为EMA阳性细胞表达呈阴性,其他3名有EMA阳性细胞表达的被验者,使用RPMI1640、1MDM为基础的培养液,对EMA阳性细胞的表达进行了比较。使用的是用抗CD3抗体和抗CD161抗体固相处理后的培养瓶进行的培养。比较结果如下表6所示。从表6可以知道,不同组成成分的培养液,对EMA阳性细胞的表达是没有影响的。

[0086] 【表6】

	培养液	
	RPMI1640	IMDM
	检查结果(Grade)	检查结果(Grade)
检体序号	EMA	EMA
N1	0	0
N2	2	2
N3	2	2
N4	2	2

[0088] 如上所述,在本实施例中,如图2的流程图所示,从30ml的末梢血中使用淋巴细胞分离液分离出的淋巴细胞层放在经过抗CD3抗体和抗CD161抗体固相化处理过的培养瓶中培养。这是因为通常的细胞培养是使用抗CD3抗体及抗CD161抗体固相化处理过的培养瓶中培养的。关于固相化工序(步骤S2)的有无,是否会影响到EMA阳性细胞的表达进行了检查。

[0089] 在实验中,分别使用经过抗CD3抗体和抗CD161抗体的抗体处理过的培养瓶,和没有实施抗体处理的培养瓶,同时进行细胞培养后,实施EMA的免疫染色。如下表7所示,即使没有使用抗体进行固相化处理的培养瓶,也有EMA阳性细胞的表达,因此,抗体的固相化处理是没有关系的。也就是说,即使是使用没有用抗体进行固相化处理的培养瓶,对EMA阳性细胞的表达是没有影响的,固相化工序(步骤S2)的有无,是不会影响到EMA阳性细胞的表达。

[0090] 【表7】

检体序号	EMA染色结果(Grade)	
	抗体处理	抗体未处理
N1	0	0
N2	2	2
N6	2	2
N7	0	0
N8	2	2
N9	2	2

[0091]

[0092] 接下来,就本实施例涉及的末梢循环癌细胞的检测方法的再现性进行了调查。如下表8所示,选出健康人5名、癌症患者7合计12名对EMA免疫染色的再现性进行了调查。第2次,第3次的检查是在第1次检查完的1~2个月后实施的。如表8所示,除了1例(P2),剩下的11例认可了再现性。表8的结果示意了本实施例的末梢循环癌细胞的检测方法的再现率为92%(11/12)。

[0093] 【表8】

检体序号	检查结果(Grade)			结果	分期
	第1次	第2次	第3次		
N1	0	0	0	健康人	
N2	2	2	2	健康人	
N3	2	2	ND	健康人	
N4	2	2	ND	健康人	
N5	3	2	ND	健康人	
P1	2	2	ND	肝癌	IV
P2	0	1	ND	乳腺癌	IV
P3	2	2	ND	胃癌	IV
P4	2	3	ND	胰腺癌	IV
P5	1	1	ND	食管癌	IV
P6	0	0	0	食管癌	I a
P7	1	1	ND	胰腺癌	IIIb

[0094]

[0095] (ND:无数据)

[0096] 将本实施例中的末梢循环癌细胞的检测方法与用其他方法取得的结果进行了比较。将EMA阳性细胞的被验者的检体使用CellSearch(注册商标)系统(美国Veridex公司开发的关于乳腺癌,直肠癌等领域的检测系统)进行了检测。如下表9所示的,通过EMA染色取得的结果与通过CellSearch(注册商标)系统取得的结果是一致的。由此,可以表明本实施例中的末梢循环癌细胞的检测方法,不逊色于CellSearch(注册商标)系统的检测敏

感度。

[0097] 【表9】

[0098]

检体序号	病名	分期	本实施例中的末梢循环癌细胞的检测方法	CellSearch系统
P2	乳腺癌	IV	1个	1个
P6	食管癌	Ia	0个	0个
P10	乳腺癌	IIIc	0个	0个

[0099] 接下来,就EMA阳性细胞的电子显微镜照片进行说明。图3和图4是卵巢癌患者的EMA阳性细胞的电子显微镜照片。从图3和图4中观察到的细胞,整体的N/C比高,虽然观察到线粒体的形成,但高尔基体等其他的细胞质内小器官的形成较差。此外,核小体的形成比较显著。虽然几乎没有发现细胞间连接装置的形成,但有暗示细胞质突起形成的粘附。虽然要特定细胞谱系是困难的,但可以推测是某些肿瘤细胞。

[0100] 另外,图5和图6是健康人的EMA阳性细胞的电子显微镜照片。在图5和图6中,虽然有少数,N/C比还是高的,观察到核小体显著的异形细胞。有一部分有出现细胞间相互粘附的影像,细胞间连接装置的发育较差。高尔基体等细胞质内小器官的发育也比较差。

[0101] 从以上的观察结果来看,虽然要特定在癌症患者、健康人身上表达的EMA阳性细胞的细胞谱系是比较困难,但也可以推测出是某些肿瘤细胞或异形细胞的。下表10是总结了卵巢癌患者和健康人的EMA阳性细胞的电子显微镜照片的观察比较结果。

[0102] 【表10】

[0103]

细胞的特征	癌症患者 (StageIV)	健康人
N/C比	大	大
线粒体的发育	差	差
高尔基体	差	差
核小体的形成	显著	显著
细胞间连接装置	差	差

[0104] 在此,就关于EMA阳性细胞为非肿瘤基质细胞的可能性的研究结果进行说明。基质细胞里有免疫细胞、炎症细胞、内皮细胞、成纤维细胞,周细胞。其中,需要确认的是EMA阳性细胞是否为基质细胞的问题。特别是,血液中的是否为免疫细胞、炎症细胞、内皮细胞。首先,炎症细胞有嗜中性粒细胞和浆细胞,嗜中性粒细胞通过免疫染色会表达为非特异性的CEA阳性,但不会表达为EMA阳性。此外,浆细胞会在霍奇金病或间变性大细胞型淋巴瘤患者的末梢血中出现,不会在健康人的末梢血中出现。关于患有霍奇金病或间变性大细胞型淋巴瘤患者,已从此次的被验者中排除,因此可以排除浆细胞的可能性。此外,骨髓中的浆细胞是很罕有会呈EMA阳性的,浆细胞通常是不会出现在健康人的末梢血中,因此可以排除这个可能性。

[0105] 接下来是免疫细胞。在末梢血中有时会出现从胸腺上皮细胞产生的非肿瘤性的未成熟的T细胞。但是,非肿瘤性的未成熟的T细胞没有在从健康人身上发现的见解,而在胸腺

瘤患者的末梢血中出现。关于胸腺瘤患者,也已从此次的被验者中排除,因此,因此可以排除是免疫细胞的可能性。

[0106] 在此,还存在内皮细胞、成纤维细胞或者周细胞是否以末梢血的EMA阳性细胞表达的问题。还有一个问题,有可能在血液采集时从针孔混入的血管内皮细胞,存在于皮下的成纤维细胞、周细胞。为了验证这些可能性,将在血液采集时有废弃最初的2ml的末梢血,和没有废弃的末梢血进行了培养比较。

[0107] 如下表11所示,采血时有废弃2ml的末梢血,和没有废弃2ml的末梢血同样都有EMA阳性细胞表达。由此,检测出的EMA阳性细胞是采血时从针孔混入的血管内皮细胞、成纤维细胞、周细胞的可能性可以排除。

[0108] 从上可知,存在于末梢血中的EMA阳性细胞可以认为是上皮细胞。

[0109] 【表11】

检体序号	EMA阳性细胞(Grade)	
	采血时没有废弃	采血时废弃2ml
N2	2	2
P5	1	2
P8	3	2
P33	2	2

[0110] 接下来,就本实施例的末梢循环癌细胞的检测方法中通过观察图像内的染色细胞个数,对癌症患者和健康人进行筛选判断的方法进行说明。

[0112] 判断以Grade (等级) 进行,例如,Grade如下表12所定。也就是说,Grade0,就是EMA阳性细胞为0个,像这种情况,癌症或癌细胞转移的担心较少,建议定期接受癌症检查。此外,Grade1是发现1个EMA阳性细胞,癌症的可能性很低,但建议接受癌症检查。像这种情况,今后需要注意癌症。此外,Grade2是出现数个EMA阳性细胞,有可能存在肉眼看不见的小癌细胞。像这种情况,建议接受详细的癌症检查。然后,Grade3是EMA阳性细胞多于5%,像这种情况,身体的某个位置存在癌细胞的可能性较高,建议尽早接受详细的癌症检查。此外,不管EMA阳性细胞数是多于5%、EMA阳性细胞数为10%、30%,不去考虑数量要素是可以的。

[0113] 【表12】

[0114]

等级	EMA阳性细胞个数	筛选判断
0	0 个	癌症或癌细胞转移的担心较少, 建议定期接受癌症检查。
1	1 个	癌症的可能性很低, 但建议接受癌症检查。 今后需要注意癌症。
2	数个	有可能存在肉眼看不见的小癌细胞。 建议接受详细的癌症检查。
3	> 5 %	身体的某个位置存在癌细胞的可能性较高。 建议尽早接受详细的癌症检查。

[0115] 就本实施例的末梢循环癌细胞的检测方法的检测结果的解释,关于癌症患者的EMA阳性细胞,健康人的EMA阳性细胞肯定不是癌细胞是有可能的。其中的一个理由是,有EMA阳性细胞表达的健康人,目前没有发展成癌症的例子。此外,为了证明这一点,对一部分EMA表达阳性细胞的健康人实施了PET-CT检查、肿瘤标志物的检测的检测结果是,目前没有发现有癌细胞等异常的人。相反,从癌症患者身上观察到EMA阳性细胞,对癌细胞的转移或复发的判定是有意义的(76%、真阳性28/患者数37),癌症患者的EMA阳性细胞,可以说捕获的是该癌细胞本身的可能性很高。

[0116] 在有EMA阳性细胞表达的患者中,在上述CellSearch(注册商标)系统的测定结果中也认定有癌细胞存在的2个病例(检体No=P2,P10),可以推测出EMA阳性细胞的表达与癌症复发或转移的关联性。这表明具有转移潜能的EMA阳性细胞的存在,关系到预后(复发,转移)的可能性。癌症患者的EMA阳性细胞,转移潜能高,与复发有关,可认为是健康人的EMA阳性细胞的成瘤能力低的可能性。也就是说,从癌症患者身上发现的EMA阳性细胞是具有转移潜能的癌细胞,健康人身上发现的EMA阳性细胞,将来有可能发展成癌的、分裂慢的癌症干细胞的可能性。此外,如上所述,这些有也可从卵巢癌患者和健康人身上表达的EMA阳性细胞放在电子显微镜下面观察的结果推测出来。(参照图3~6)。

[0117] 此外,即使是在检查时没有发现转移或复发的癌症患者,在检查以后确认有EMA阳性细胞,可认为是有癌细胞的转移或复发的几率变高的可能性。今后,有必要就癌症患者或健康人的EMA阳性细胞是否确定是癌细胞,或癌症干细胞进行详细查明。

[0118] 在细胞培养过程中,有1个或2个EMA阳性细胞发现时,确定是否真是转移或复发的癌症发病症状是非常重要的。比如,在末梢血中即使有100个这样的细胞出现,在培养过程中99个死掉的可能性也是有的。末梢血中的癌细胞有1万个、10万个或100万个,存在着其中的1个或2个是否为癌的转移细胞的几率问题。也有末梢血中发现的癌细胞在1小时到2小时40分钟左右自然死亡(细胞凋亡)的报告。

[0119] 有人体中1天内产生3000~4000个癌细胞或异常细胞的说法。可是,这些细胞或被免疫细胞排除、或自然死亡(细胞凋亡),从而抑制癌症发病。体内若留下1个或2个这样的细胞,这与培养条件不同,无法否认100%不会在生物体内发展为癌症。

[0120] 另外,在健康人的末梢血中有类似EMA阳性细胞的上皮细胞的存在是无法想象的。EMA阳性细胞也就在52%(如上表4中的假阴性17/非患者数33)的健康人身上出现的现象,这也许就是证实了无论男女、日本人2个人中有1个人在一生中会被诊断为癌症的说法。厚生劳动省在2010年的试算中提到,一生中患癌的几率,男性为60%、女性为45%。即使是本实施例的末梢循环癌细胞的检测方法,在33名的健康人(男性15名、女性18名)中,有EMA阳性细胞表达的人为男性9名(60%;9/15)、女性8名(44%;8/18),这与厚生劳动省的试算一致是令人深思。

[0121] 【实施例2】

[0122] 在实施例2的末梢循环癌细胞的检测方法中,在免疫染色工序(步骤S5)中使用抗CEA抗体取代抗EMA抗体进行免疫染色后的结果进行说明。由于抗CEA抗体会对大肠、肺、乳房、肝脏、胰脏等的腺癌细胞显示特殊染色,如上表2所示根据检体的癌症种类和癌细胞的谱系,选出肺癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌等腺癌患者,从实施例1中70例的病例(癌症患者和健康人分别为37名、33名),减少至52例(癌症患者和健康人分别为30名、22名)。

[0123] 使用抗CEA抗体免疫染色取得的结果示意在下表13,表14中。此外,表中的用词或指标,与实施例1中说明的内容相同。

[0124] 【表13】

[0125]

	癌症患者	健康人	合计
检查阳性	真阳性:10	假阳性:3	阳性数:13
检查阴性	假阴性:20	真阴性:19	阴性数:39
合计(人数)	患者数:30	非患者数:22	总数:52

[0126] 【表14】

[0127]

指标	计算公式	值(%)
敏感性	真阳性数/患者数	33
特异性	真阴性数/非患者数	86
阳性预测值	真阳性数/阳性数	77
阴性预测值	真阴性数/阴性数	49
患病率	患者数/总数	58
阳性率	阳性数/总数	25
准确度	(真阳性数+真阴性数)/总数	56

[0128] 如上表13所示,结果是癌症患者的阳性(真阳性)是10人、阴性(假阴性)是20人,健康人的阳性(真阳性)是3人、阴性(假阴性)是19人。

[0129] 此外,如上表14所示,结果是特异性高达86%,敏感性低仅为33%,此外,阳性预测值为77%。使用抗CEA抗体免疫染色取得的结果的分析数据是特异性高、敏感性低,结果是使检查的临界(Cut off)值变高,这与实施例1中记载的使用抗EMA抗体免疫染色的情况不同,可以用在判断是否可以开始进行癌症治疗的检查上。

[0130] 根据以上结果,虽然有可以用于判断是否可以开始进行癌症治疗的检查的可能性,但是抗CEA抗体虽会对大肠、肺、乳房、肝脏、胰脏等的腺癌细胞显示特殊染色,但也时常会将炎症时出现的嗜中性粒细胞显示特殊染色。因此,实施例2的末梢循环癌细胞的检测方法,也就是使用抗CEA抗体的免疫染色,从检查时抗体的特异性观点来看会比实施例1的末梢循环癌细胞的检测方法差一点。

[0131] 【实施例3】

[0132] 在实施例3的末梢循环癌细胞的检测方法中,在免疫染色工序(步骤S5)中将抗EMA抗体的EMA免疫染色的结果,和抗CEA抗体的EMA免疫染色的结果同时使用,对是否可以提高指标的准确度的调查结果进行说明。

[0133] 将实施例1中70例的病例(癌症患者和健康人分别为37名、33名),减少至57例(癌症患者和健康人分别为35名、22名)。

[0134] 将抗EMA抗体的EMA免疫染色的结果、和抗CEA抗体的EMA免疫染色的结果同时使用,所取得的判断结果如下表15,表16所示。此外,表中的术语或指标与实施例1中说明的内容相同。

[0135] 【表15】

[0136]

	癌症患者	健康人	合计
检查阳性	真阳性:6	假阳性:2	阳性数:8
检查阴性	假阴性:29	真阴性:20	阴性数:49
合计(人数)	患者数:35	非患者数:22	总数:57

[0137] 【表16】

[0138]

指标	计算公式	值(%)
敏感性	真阳性数/患者数	17
特异性	真阴性数/非患者数	91
阳性预测值	真阳性数/阳性数	75
阴性预测值	真阴性数/阴性数	41
患病率	患者数/总数	61
阳性率	阳性数/总数	14
准确度	(真阳性数+真阴性数)/总数	46

[0139] 如上表15所示,结果是癌症患者的阳性(真阳性)是6人、阴性(假阴性)是29人,健康人的阳性(假阳性)是2人、阴性(真阴性)是20人。

[0140] 此外,如上表16所示,结果是特异性高达91%,敏感性低至17%,准确度为46%低至一半以下。由此可见,同时使用抗EMA抗体的EMA免疫染色的结果、和抗CEA抗体的EMA免疫染色的结果进行判断的方法不合适,需通过进一步的数据积累,从而发现实用的可能性。

[0141] 【实施例4】

[0142] 在实施例4的末梢循环癌细胞的检测方法中,对免疫染色工序(步骤S5)中使用抗CK(AE1/AE3)抗体取代抗EMA抗体实施免疫染色后的结果进行说明。由于抗CK(AE1/AE3)抗体会对上皮性肿瘤及细胞增殖活性细胞显示特殊染色。病例数为30例(癌症患者和健康人分别为19名、11名)。此外,癌症患者是通过随机抽取的,与癌症种类无关。

[0143] 使用抗CK(AE1/AE3)抗体取得的免疫染色的结果如下表17,表18所示。此外,表中的术语或指标,与实施例1中说明的内容相同。

[0144] 【表17】

[0145]

	癌症患者	健康人	合计
检查阳性	真阳性:16	假阳性:9	阳性数:25
检查阴性	假阴性:3	真阴性:2	阴性数:5
合计(人数)	患者数:19	非患者数:11	总数:30

[0146] 【表18】

[0147]

指标	计算公式	值(%)
敏感性	真阳性数/患者数	84
特异性	真阴性数/非患者数	18
阳性预测值	真阳性数/阳性数	64

阴性预测值	真阴性数/阴性数	40
患病率	患者数/总数	63
阳性率	阳性数/总数	83
准确度	(真阳性数+真阴性数)/总数	60

[0148] 如上表17所示,结果是癌症患者的阳性(真阳性)是16人、阴性(假阴性)是3人,健康人的阳性(假阳性)是9人、阴性(真阴性)是2人。

[0149] 此外,如上表18所示,结果是敏感性高达84%,特异性低至18%,也没有观察到与敏感性的关联。因此,以现在的结果来看,本实施例的末梢循环癌细胞的检测方法,可以知道用抗CK(AE1/AE3)抗体的免疫染色是不适合用于判断的,需通过进一步的数据积累,从而发现实用的可能性。

[0150] 【实施例5】

[0151] 在实施例5的末梢循环癌细胞的检测方法中,对免疫染色工序(步骤S5)中使用抗Ki-67抗体取代抗EMA抗体实施免疫染色后的结果进行说明。由于抗Ki-67抗体会对细胞增殖活性细胞显示特殊染色。病例数为15例(癌症患者和健康人分别为8名、7名)。此外,癌症患者是通过随机抽取的,与癌症种类无关。

[0152] 使用抗Ki-67抗体取得的免疫染色的结果如下表19,表20所示。此外,表中的术语或指标,与实施例1中说明的内容相同。

[0153] 【表19】

[0154]

	癌症患者	健康人	合计
检查阳性	真阳性:6	假阳性:5	阳性数:11
检查阴性	假阴性:2	真阴性:2	阴性数:4
合计(人数)	患者数:8	非患者数:7	总数:15

[0155] 【表20】

[0156]

指标	计算公式	值(%)
敏感性	真阳性数/患者数	75
特异性	真阴性数/非患者数	29
阳性预测值	真阳性数/阳性数	55
阴性预测值	真阴性数/阴性数	50
患病率	患者数/总数	53
阳性率	阳性数/总数	73
准确度	(真阳性数+真阴性数)/总数	53

[0157] 如上表19所示,结果是癌症患者的阳性(真阳性)是6人、阴性(假阴性)是2人,健康人的阳性(假阳性)是5人、阴性(真阴性)是2人。

[0158] 此外,如上表20所示,结果是敏感性为75%较高,特异性为29%较低,也没有观察到与敏感性的关联。因此,以现在的结果来看,本实施例子的末梢循环癌细胞的检测方法,可以知道用抗Ki-67抗体的免疫染色是不适合用于判断的,需通过进一步的数据积累,从而发现实用的可能性。

[0159] 【实施例6】

[0160] 在实施例6的末梢循环癌细胞的检测方法中,对免疫染色工序(步骤S5)中使用抗CD20(L-26)抗体取代抗EMA抗体实施免疫染色后的结果进行说明。由于抗CD20(L-26)会对细胞增殖活性细胞显示特殊染色。病例数为3例(癌症患者和健康人分别为1名、2名)。此外,癌症患者是从多发性骨髓瘤患者中选出的。

[0161] 使用抗CD20(L-26)抗体取得的免疫染色的结果如下表21,表22所示。此外,表中的术语或指标,与实施例1中说明的内容相同。

[0162] 【表21】

	癌症患者	健康人	合计
[0163] 检查阳性	真阳性: 1 (多发性骨髓瘤)	假阳性: 2	阳性数: 3
检查阴性	假阴性: 0	真阴性: 0	阴性数: 0
合计(人数)	患者数: 1	非患者数: 2	总数: 3

[0164] 【表22】

[0165]

指标	计算公式	值(%)
敏感性	真阳性数/患者数	100
特异性	真阴性数/非患者数	0
阳性预测值	真阳性数/阳性数	33
阴性预测值	真阴性数/阴性数	0
患病率	患者数/总数	33
阳性率	阳性数/总数	100
准确度	(真阳性数+真阴性数)/总数	33

[0166] 如上表21所示,结果是癌症患者的阳性(真阳性)是1人、阴性(假阴性)是0人,健康人的阳性(假阳性)是2人、阴性(真阴性)是0人。

[0167] 由于病例数不足,如上表22所示,得出的结果是敏感性100%,特异性0%。因此,就现在的结果来看,本实施例子的末梢循环癌细胞的检测方法,也就是抗CD20(L-26)抗体的免疫染色是不适合用于判断的,需通过进一步的数据积累,从而发现实用的可能性。

[0168] 【实施例7】

[0169] 在实施例7的末梢循环癌细胞的检测方法中,对免疫染色工序(步骤S5)中使用抗CD45RO抗体取代抗EMA抗体实施免疫染色后的结果进行说明。由于抗CD45RO抗体会对T细胞淋巴瘤或成熟T细胞显示特殊染色。病例数为13例(癌症患者和健康人分别为10名、3名)。此外,癌症患者是通过随机抽取的,与癌症种类无关。

[0170] 使用抗CD45RO抗体取得的免疫染色的结果如下表23,表24所示。此外,表中的术语或指标,与实施例1中说明的内容相同。

[0171] 【表23】

[0172]

	癌症患者	健康人	合计
检查阳性	真阳性: 10	假阳性: 3	阳性数: 13
检查阴性	假阴性: 0	真阴性: 0	阴性数: 0

合计(人数)	患者数:10	非患者数:3	总数:13
--------	--------	--------	-------

[0173] 【表24】

[0174]

指标	计算公式	值(%)
敏感性	真阳性数/患者数	100
特异性	真阴性数/非患者数	0
阳性预测值	真阳性数/阳性数	77
阴性预测值	真阴性数/阴性数	0
患病率	患者数/总数	77
阳性率	阳性数/总数	100
准确度	(真阳性数+真阴性数)/总数	77

[0175] 如上表23所示,结果是癌症患者的阳性(真阳性)是10人、阴性(假阴性)是0人,健康人的阳性(假阳性)是3人、阴性(真阴性)是0人。

[0176] 如上表24所示,本实施例也得出了敏感性100%,特异性0%的结果。因此,就现在的结果来看,本实施例的末梢循环癌细胞的检测方法,也就是使用抗CD45RO抗体的免疫染色是不适合用于判断的,需通过进一步的数据积累,从而发现实用的可能性。

[0177] 【实施例8】

[0178] (使用贝叶斯定理进行的数据分析)

[0179] 关于本实施例的末梢循环癌细胞的检出准确度,数据是根据贝叶斯定理进行的分析。在使用贝叶斯定理时,患病率作为先验概率,阳性预测值作为后验概率。这本来是检查前患病的几率(患病率),当检查知道是阳性后,显示的是上升到是某种疾病几率(阳性预测率)。

[0180] 在此,数据的计算是根据如下表25所示的计算公式进行的。在表25中,似然比是将敏感性及特异性结合起来的指标,作为检出准确度的指标,选择不受患病率影响的敏感性、特异性、似然比、ROC(受试者工作特征曲线)曲线。

[0181] 通过计算取得的EMA免疫染色的判断、CEA免疫染色的判断、同时使用EMA免疫染色和CEA免疫染色(EMA+CEA)的判断时的检出准确度如下表26所示。

[0182] 根据表26的结果可以知道,从敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、准确度及似然比,EMA免疫染色是最适合筛选试验的。

[0183] 【表25】

[0184]

No	项目	使用的计算公式
1	验前几率 (患病的几率)	患病率 / (1 - 患病率)
2	检测为阳性后的几率	阳性预测值 / (1 - 阳性预测值)
3	检测为阳性后的几率	验前几率 × 阳性似然比
4	阳性似然比	敏感性 / (1 - 特异性) = (真阳性数 / 患者数) / (假阳性数 / 非患者数)
5	阳性的验前几率	验前几率 × 阴性似然比
6	阴性似然比	(1 - 敏感性) / 特异性 = (假阴性数 / 患者数) / (真阴性数 / 非患者数)
7	患病率	患者数 / 检查对象总数
8	阳性预测值	患病率 × 敏感性 / 阳性率
9	阳性率	患病率 × 敏感性 + (1 - 患病率) × (1 - 特异性)
10	几率比	阳性似然比 / 阴性似然比 = (真阳性数 / 假阴性数) / (假阳性数 / 真阴性数)
11	阳性表达的风险比 (相对风险)	阳性预测值 / (1 - 阴性预测值)

[0185] 【表26】

[0186]

检出准确度	EMA免疫染色	CEA免疫染色	EMA+CEA 的判断
敏感性 (%)	76	33	17
特异性 (%)	48	86	91
患病率 (%)	53	58	61
阳性预测值 (%)	62	77	71
阴性预测值 (%)	64	49	41
准确率 (%)	63	56	46
验前几率	0.57	1.08	1.42
验后几率	1.65	3.26	2.95
几率比	2.89	3.02	2.08
阳性表达的风险比 (相对风险)	1.72	1.51	1.27
阴性似然比	0.5	0.78	0.91
阳性似然比	1.46	2.36	1.89

[0187] 工业应用性

[0188] 本发明可作为健康人的早期发现癌症用筛选测试检查用的检测装置,癌症患者手术后的复发检查用装置,此外,还可作为判断抗癌药物、放射治疗或者癌症免疫疗法的治疗效果的判断装置使用。

[0189] 图中符号说明

[0190] 1 EMA阳性细胞

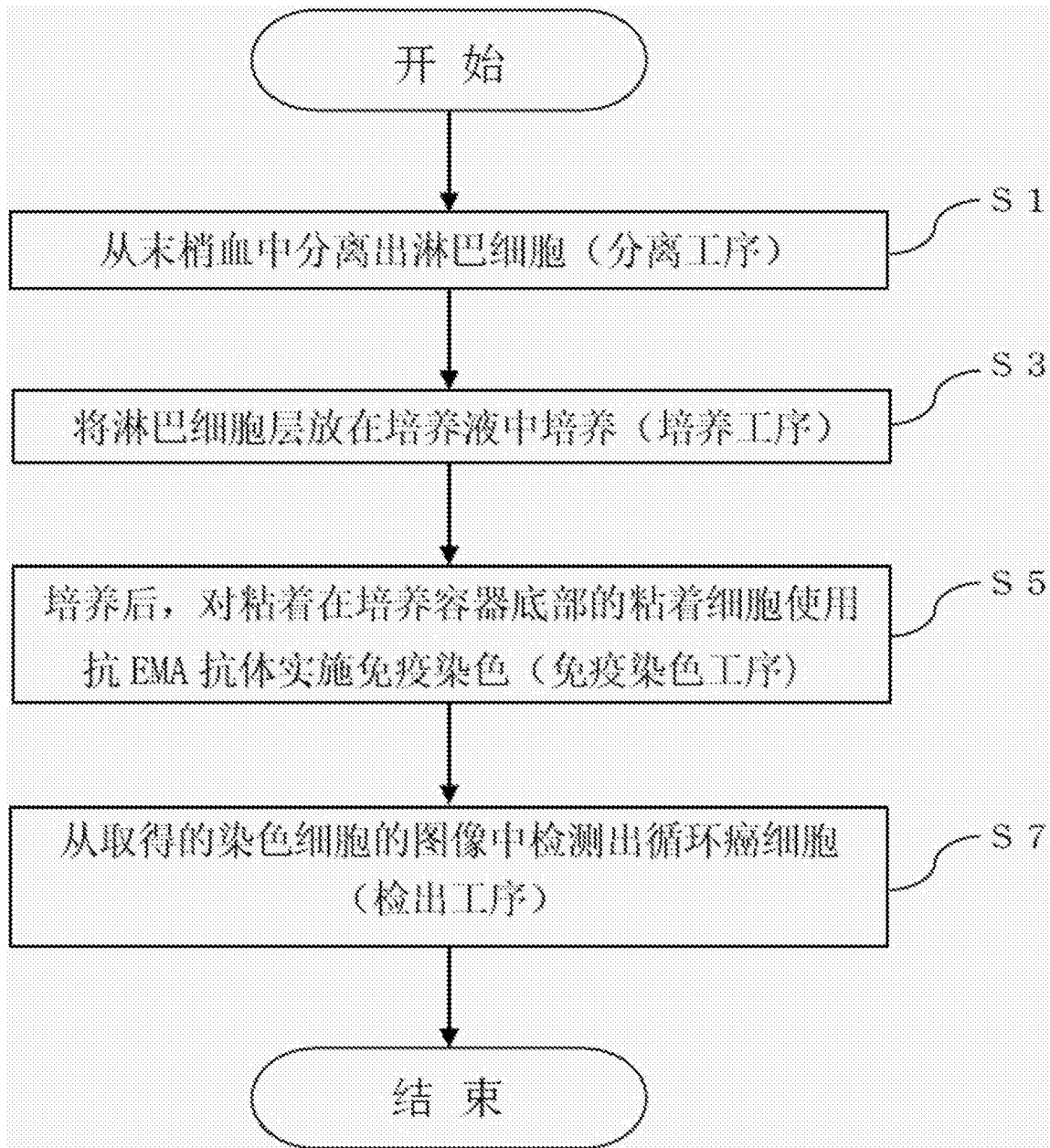


图1

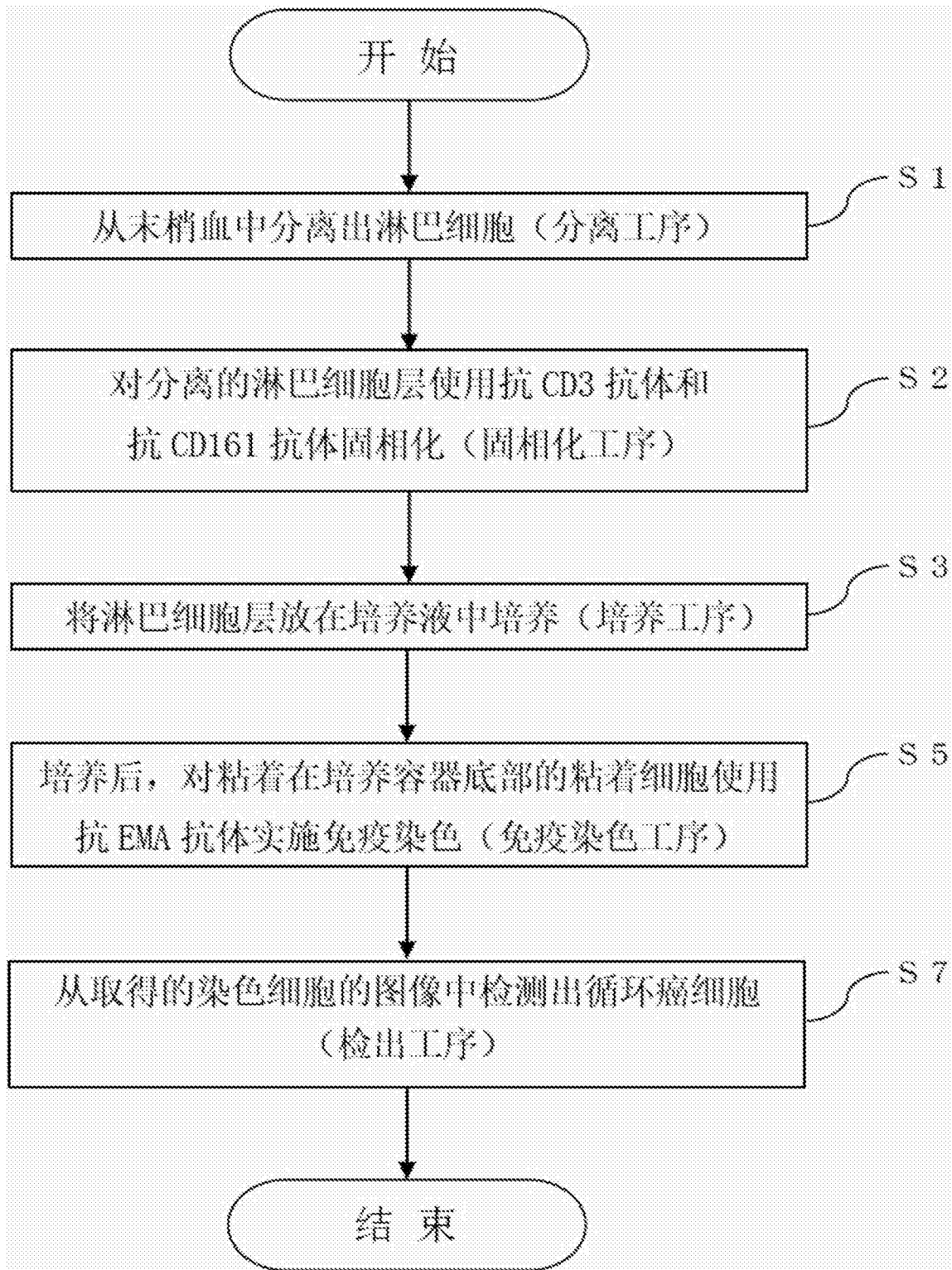


图2

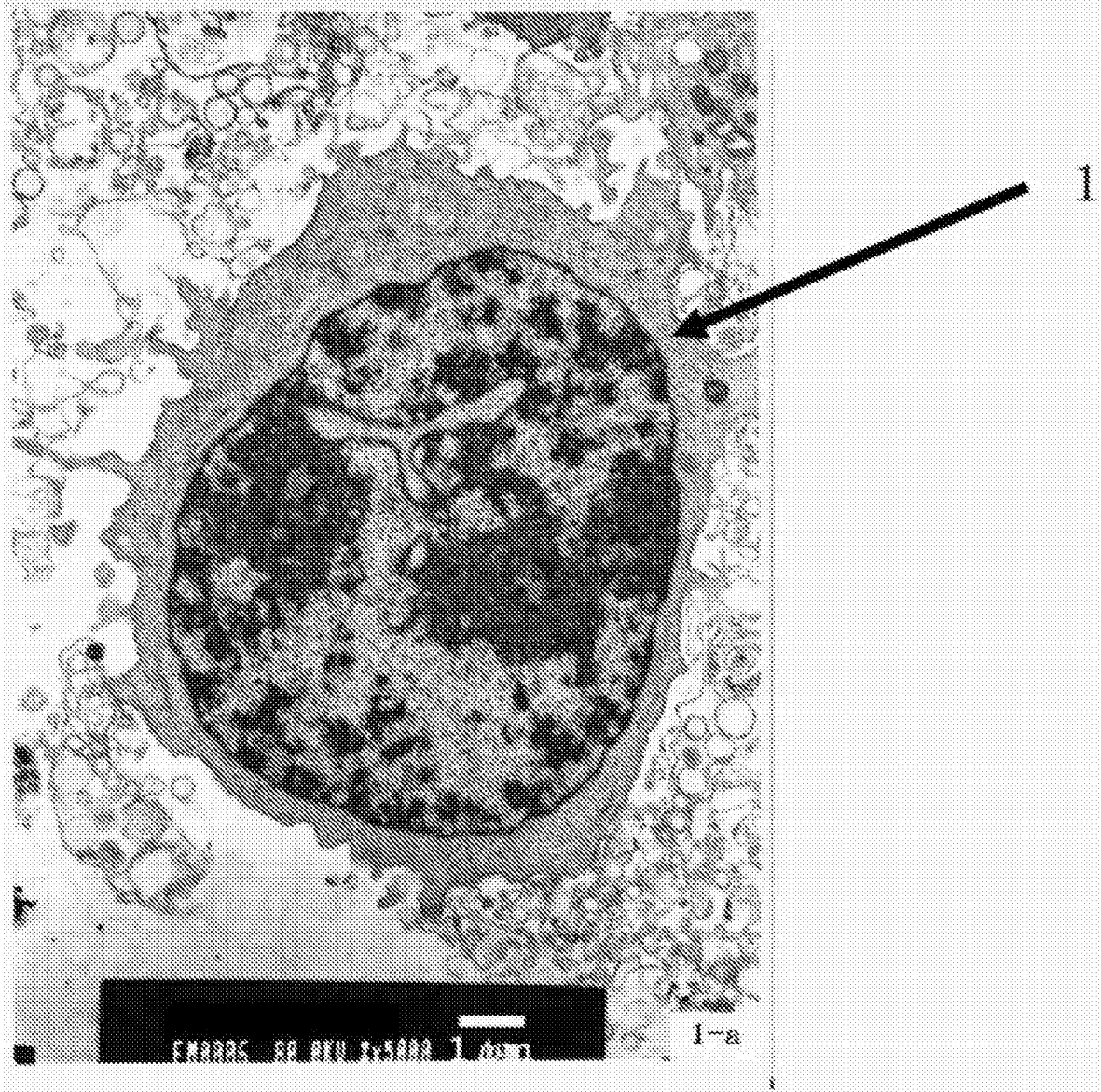


图3

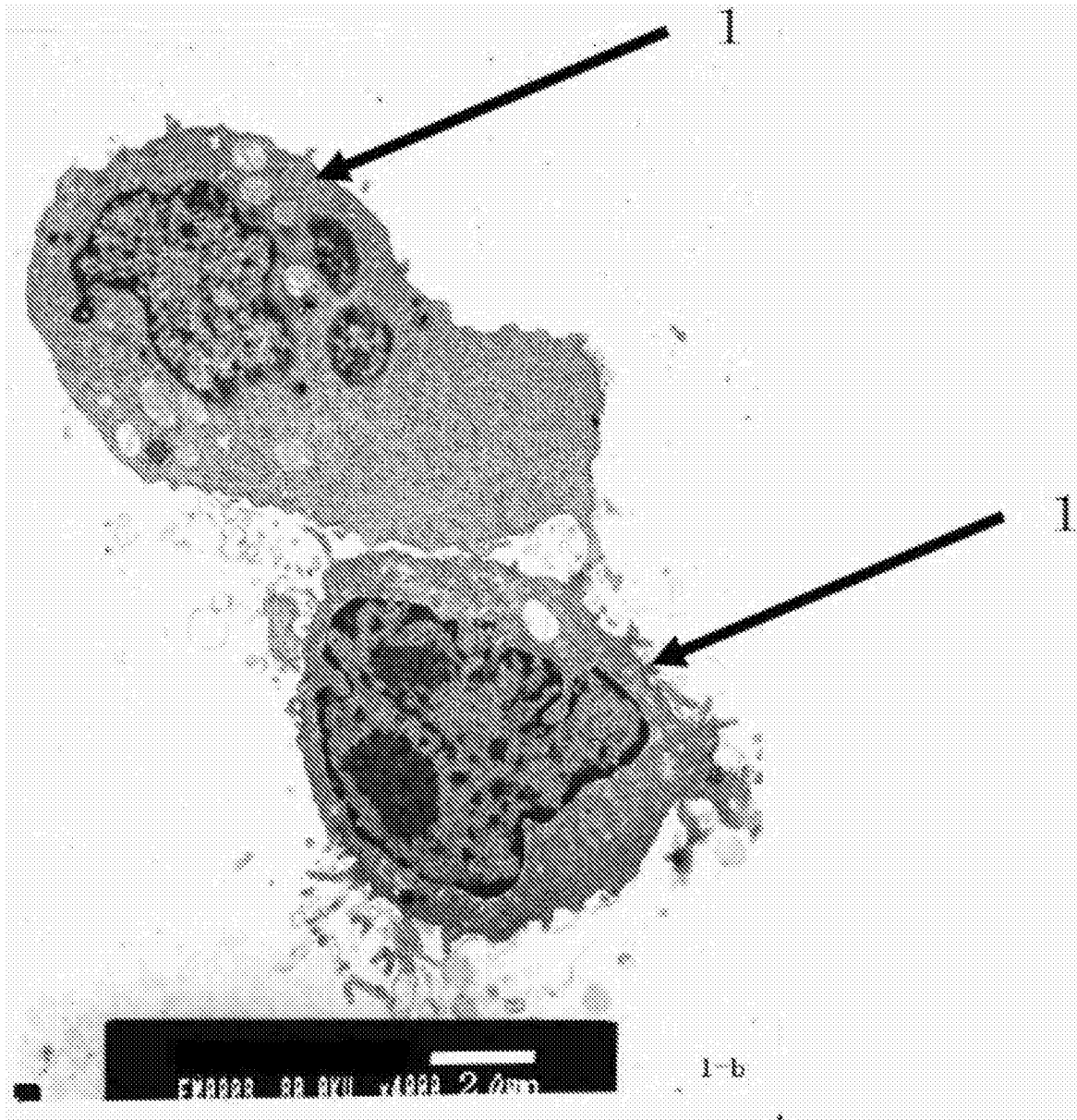


图4

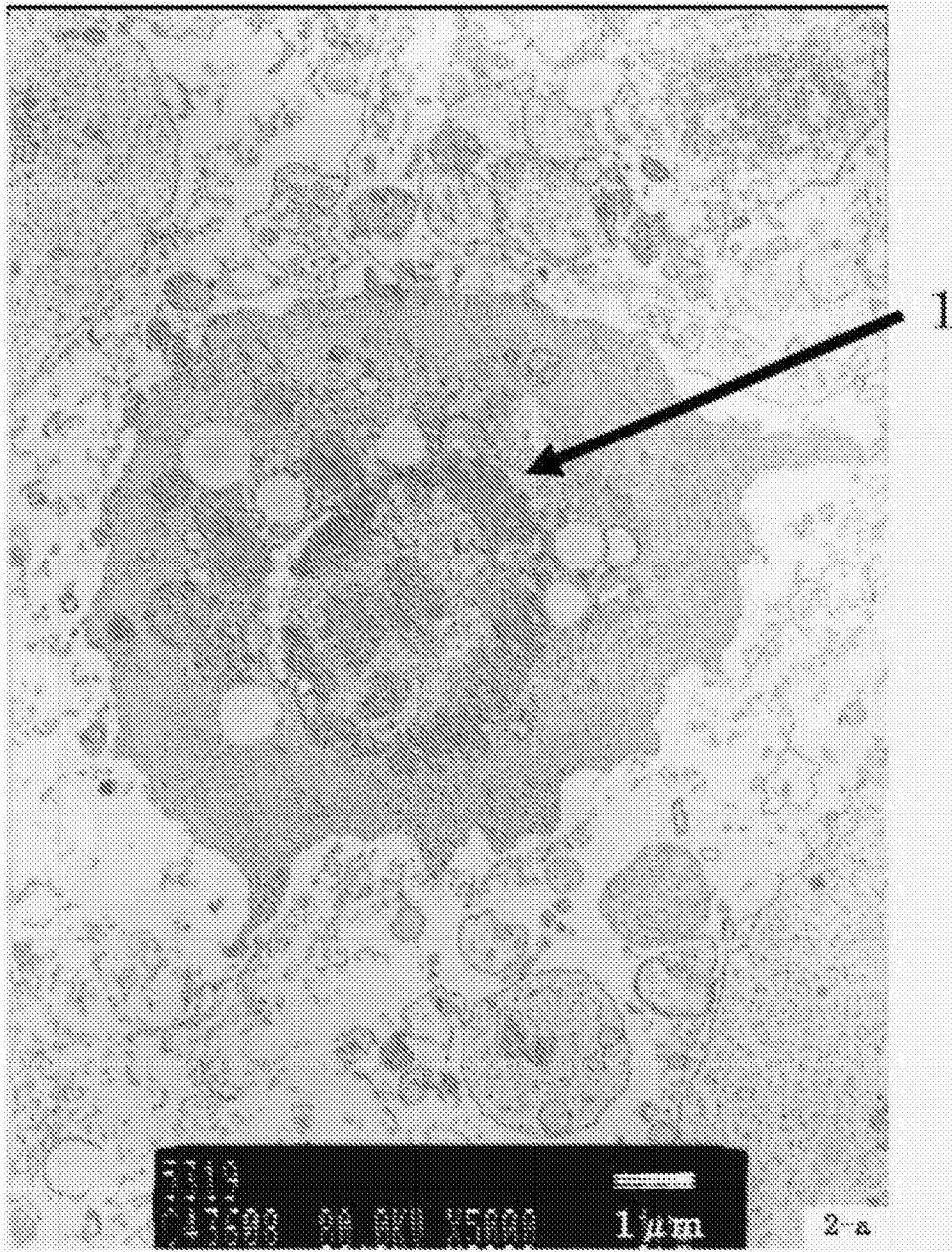


图5

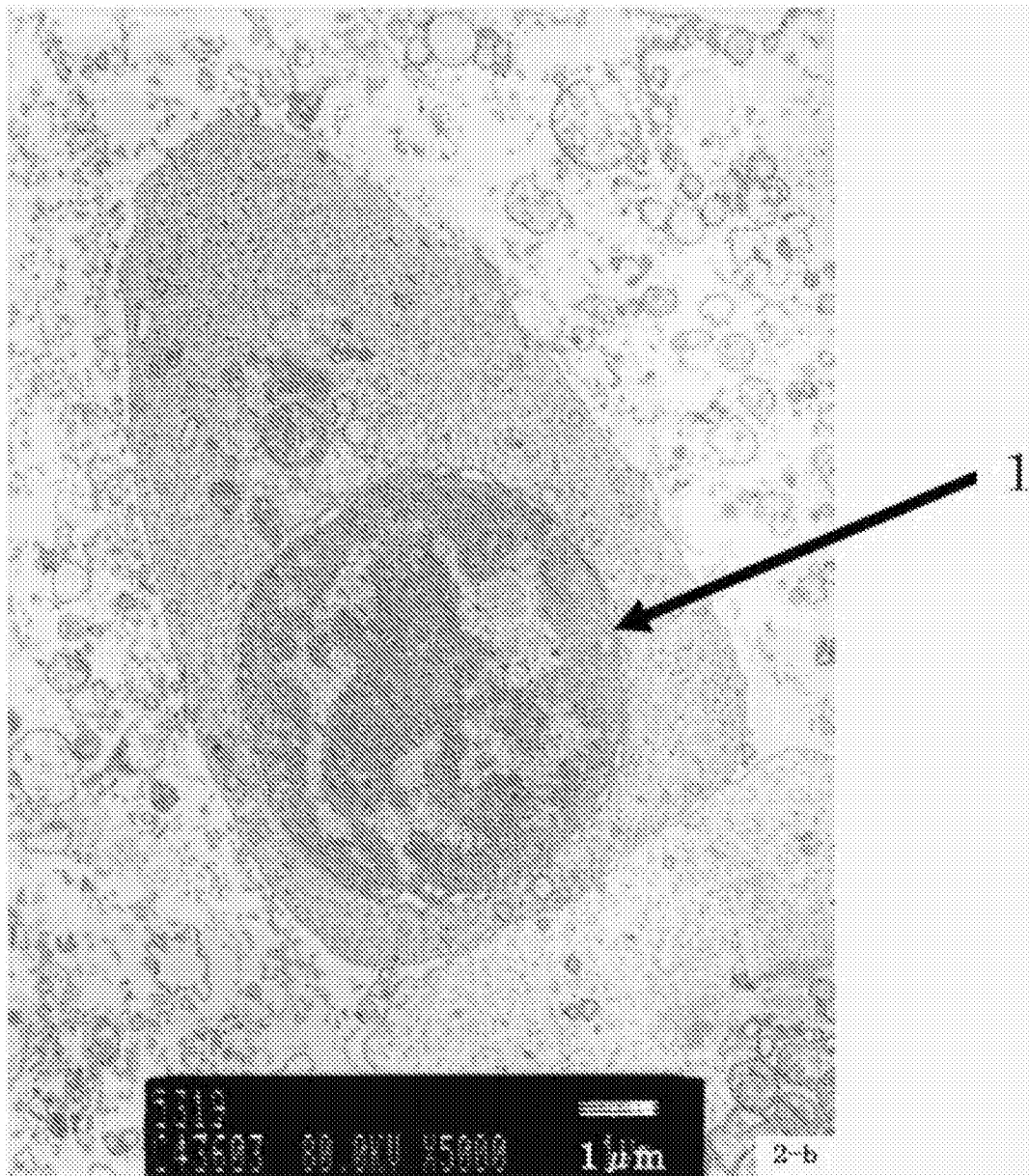


图6

专利名称(译)	末梢循环癌细胞的检测方法及检测装置		
公开(公告)号	CN106796237A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201480078553.7	申请日	2014-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社癌症免疫研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社癌症免疫研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社癌症免疫研究所		
[标]发明人	仓持恒雄		
发明人	仓持恒雄		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574		
其他公开文献	CN106796237B		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

提供一种可以简单而且高精度的检测出末梢循环癌细胞的检测方法。末梢循环癌细胞的检测方法，是一种从生物试样中检测出循环癌细胞的检测方法，包括以下(a)~(d)工序。(a)从末梢血中分离出淋巴细胞的分离工序、(b)将分离的末梢血淋巴细胞层放在培养液中培养的培养工序、(c)培养后，将粘着于培养容器底部的细胞实施免疫染色的免疫染色工序、(d)根据从免疫染色工序中取得的染色细胞的观察图像，从生物试样中检测出循环癌细胞的检出工序。

