

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6323463号  
(P6323463)

(45) 発行日 平成30年5月16日(2018.5.16)

(24) 登録日 平成30年4月20日(2018.4.20)

|               |           |               |   |
|---------------|-----------|---------------|---|
| (51) Int.Cl.  |           | F I           |   |
| GO 1 N 33/68  | (2006.01) | GO 1 N 33/68  |   |
| GO 1 N 33/574 | (2006.01) | GO 1 N 33/574 | A |
| GO 1 N 33/53  | (2006.01) | GO 1 N 33/53  | V |
| C 1 2 Q 1/02  | (2006.01) | C 1 2 Q 1/02  |   |

請求項の数 9 (全 19 頁)

|               |                              |           |   |
|---------------|------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2015-554445 (P2015-554445) | (73) 特許権者 | 000001270<br>コニカミノルタ株式会社<br>東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年12月27日(2013.12.27)      | (74) 代理人  | 110001070<br>特許業務法人 S S I N P A T             |
| (86) 国際出願番号   | PCT/JP2013/085116            | (72) 発明者  | 山下 克子<br>神奈川県横浜市戸塚区上矢部町3043-4                 |
| (87) 国際公開番号   | W02015/097863                | (72) 発明者  | 彼谷 高敏<br>東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内       |
| (87) 国際公開日    | 平成27年7月2日(2015.7.2)          | (72) 発明者  | 井出 陽一<br>東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内       |
| 審査請求日         | 平成28年9月26日(2016.9.26)        |           |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断用情報の分析方法およびそのためのキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

診断対象に由来する血液検体中の、抗ムチン - 1 抗体との反応性を有する全てのムチン - 1 (トータルMUC1) の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルMUC1 の濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺癌ではなく前立腺良性疾患であるとの推定を補助するための、診断用情報の分析方法。

【請求項2】

診断対象に由来する血液検体中の、抗ムチン - 1 抗体との反応性を有する全てのムチン - 1 (トータルMUC1) の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルMUC1 の濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺癌ではなく前立腺良性疾患であるとの推定を補助するための、診断用情報の分析方法と、

診断対象が前立腺疾患に罹患していることを示す前立腺特異抗原に関する診断用情報とを組み合わせ、診断対象が前立腺良性疾患と前立腺癌のどちらに罹患しているかの推定を補助するための、診断用情報の分析方法。

【請求項3】

診断対象に由来する血液検体中の、抗ムチン - 1 抗体との反応性を有する全てのムチン - 1 (トータルMUC1) の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルMUC1 の濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は

前立腺癌ではなく前立腺良性疾患であるとの推定を補助するための、診断用情報の分析方法と、

診断対象に由来する血液検体中の、N - アセチルガラクトサミン残基を認識して結合するレクチンとの反応性を有する前立腺特異抗原 ( L a c d i N A c - P S A ) の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、L a c d i N A c - P S A の濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺良性疾患ではなく前立腺癌であるとの推定を補助するための、診断用情報の分析方法と

を組み合わせ、診断対象が前立腺良性疾患と前立腺癌のどちらに罹患しているかの推定を補助するための、診断用情報の分析方法。

【請求項 4】

前記前立腺良性疾患が前立腺肥大症である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の診断用情報の分析方法。

【請求項 5】

前記抗ムチン - 1 抗体が前記抗 K L - 6 モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の診断用情報の分析方法。

【請求項 6】

前記トータル M U C 1 が、抗 K L - 6 モノクローナル抗体との反応性を有するものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の診断用情報の分析方法。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の診断用情報の分析方法を実施するためのキットであって、  
トータル M U C 1 を定量するための抗ムチン - 1 抗体と、L a c d i N A c - P S A を定量するための抗前立腺特異抗原抗体および N - アセチルガラクトサミン残基 を認識して結合するレクチンを含む診断用キット。

【請求項 8】

前記抗ムチン - 1 抗体が抗 K L - 6 モノクローナル抗体である、請求項 7 に記載の診断用キット。

【請求項 9】

さらに、診断用情報の分析方法を実施するために必要な情報を記載した使用説明書を含む、請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に記載の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺良性疾患および前立腺癌に関する診断用情報の分析方法に関する。また、本発明は、血液中のムチン - 1 の濃度に基づく診断用情報の分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体の生命機能を担う主役であるタンパク質が、生体内で秩序正しくその機能を発揮するためには、糖鎖修飾をはじめとする翻訳後修飾が極めて重要な役割を担っている。翻訳後修飾に関して、近年、以下のようなことが次々と明らかにされた。生体内の大部分のタンパク質は糖鎖による修飾を受けており、タンパク質に付加した糖鎖がタンパク質の安定性、ホルモンとの結合、毒素との結合、ウイルスの感染、マイコプラズマの感染、細菌の感染、原虫の寄生、受精、発生分化、がん細胞転移、アポトーシスなど、生命現象の様々な場で重要な役割を果たしている。同じアミノ酸配列の、同一名称のタンパク質であっても、修飾されている糖鎖は多種多様であり、タンパク質を産生する細胞の状態によってその糖鎖構造は異なり、生体内での役割が異なるのである。

【0003】

このような糖鎖の変化と疾病との関係性についても明らかになってきている。例えば、特許文献 1 には、前立腺疾患に罹患していることを示す前立腺特異抗原(以下 P S A と称する)に関して次の様に記載されている。即ち、前立腺癌の患者に由来する血液試料中には、糖鎖に特定の糖残基、N - アセチル - D - ガラクトサミン 1 - 4 N アセチルグルコ

10

20

30

40

50

サミン（以下L a c d i N A cと称する）残基を有する前立腺特異抗原（以下L a c d i N A c - P S Aと称する）および/またはフコース 1 - 2 ガラクトース 1 4 N - アセチルグルコサミン残基を有する前立腺特異抗原が、前立腺肥大症の患者に由来する血液試料中と比較して、多く含まれていることが記載されている。つまり、前立腺癌の発症によりP S Aの糖鎖が変化して前記特定の糖残基を有するP S Aが増加し、前立腺癌患者の血液試料中では前記特定の糖残基を有するP S Aは高い濃度であることが観察される。これに対して、前立腺肥大症が発症してもそのような糖鎖の変化は起きないため、前立腺肥大症患者では前記特定の糖残基を有するP S Aの濃度には、変化が観察されない。このことにより、当該特許文献1には、血液試料中の前記特定の糖残基を有するP S Aの濃度を測定することにより、前立腺癌の患者と前立腺肥大症の患者とを判別することができるという、糖鎖分画測定による前立腺癌の鑑別方法が開示されている。その他にも、フェト

10

【0004】

また、高分子量糖タンパク質であるムチンの一種であるムチン - 1（以下M U C 1と称する）も腫瘍関連抗原として知られている。M U C 1は正常腺上皮細胞に広く発現しているが、細胞が悪性になったときに、たとえば乳癌、卵巣癌、肺癌、膵臓癌、膀胱癌において、劇的に発現が増加し、さらに乳癌等においてはグリコシル化のパターンが変化することも知られている。特許文献2および特許文献3にはそれぞれ、そのようなM U C 1の定量に用いることのできるアプタマーリガンドおよび抗M U C 1抗体が記載されている。また、特許文献4には、前立腺癌および結腸直腸癌のバイオマーカーとしてM U C 1等を用いることができることが記載されている。

20

【0005】

糖鎖中に特定の糖残基が含まれている糖タンパク質を特異的に検出するためには、その糖残基を特異的に認識して結合する能力を持つレクチンと呼ばれるタンパク質が広く利用されている。それは、糖鎖をエピトープとする抗体、特に特定の糖残基をエピトープとする抗体が非常に作製しにくく、入手が困難であるためである。レクチンは安価で大量に入手が可能であり、またタンパク質の安定性にも優れており長期間保存も可能である。

【0006】

例えば、ノダフジレクチン（Wisteria floribunda Agglutinin：以下W F Aと称する）はN - アセチルガラクトサミンを主要な結合糖残基とすることが知られている。特許文献1には、このような特徴を持つW F Aを担体に結合させてカラムに充填し、アスパラギン結合型糖鎖の側鎖にL a c d i N A c残基を有するP S Aを分画した後、E L I S A等により当該画分を定量する方法が記載されている。また、特許文献5には、固相化された抗P S A抗体および蛍光標識されたW F Aを用いて、糖鎖の側鎖にL a c d i N A c残基を有するP S Aとサンドイッチ型の複合体を形成させ、S P F S（Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy：表面プラズモン励起増強蛍光分光法）によりこの特定の糖残基を有するP S Aを定量する方法が記載されている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0007】

【特許文献1】国際公開W O 2 0 1 0 / 0 9 0 2 6 4号公報

【特許文献2】特表2 0 0 9 - 5 3 5 0 5 1号公報

【特許文献3】国際公開W O 2 0 1 1 / 1 3 5 8 6 9号公報

【特許文献4】特表2 0 1 3 - 5 2 6 8 5 2号公報

【特許文献5】特開2 0 1 3 - 0 7 6 6 6 6号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

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

50

ぐ死亡原因となっており、その早期発見が望まれている。前立腺癌の診断方法として、従来広く使用されているものは、血液検体等に含まれる全てのPSAを定量し、トータルPSA値とし、その値を判断指標とする方法である。さらには、血液検体等に含まれる1-アンチキモトリプシンと結合しない遊離型PSAをフリーPSAとして定量し、PSA総量に対する遊離型PSAの量の比率(フリーPSA/トータルPSA比)を判断指標とする方法である。

【0009】

たとえば、(1)トータルPSA値が10ng/mL以上であることをもって前立腺癌である可能性が高いと判定したり、(2)トータルPSA値が4~10ng/mL(グレーゾーン)で、かつフリーPSA/トータルPSA比が25%以下であることをもって前立腺癌である可能性が高いと判定したりする手法が採用されている。前立腺癌である可能性が高いと判定された患者に対しては、確定診断のため、前立腺の生検が行われる。しかしながら、上記の診断方法においては、前立腺癌ではなく、前立腺肥大症等の良性疾患の患者についても前立腺癌である可能性が高いと判定される場合が比較的多い。そのような良性疾患の患者に対しても前立腺の生検がなされ、過度の負担を強いていることから、簡便かつ高精度で前立腺癌と良性疾患とを判別できる診断方法が求められていた。

10

【0010】

これに対して、特許文献1および特許文献5には前述したように、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、例えばWFAなどと、PSAを含む可能性のある試料とを接触させ、前記レクチンと親和性のあるPSA、つまり糖鎖中にN-アセチルガラクトサミン残基を有するPSAの量を定量し、その特定のPSAの絶対量、すなわち血液試料中の濃度をもって、あるいはトータルPSAまたはフリーPSAの量に対する特定のPSAの量の比率をもって、前立腺癌と前立腺肥大症とを判別する方法が記載されている。この方法は、トータルPSAまたはフリーPSAの量だけに基づいた場合には、前立腺癌と判定される可能性のある前立腺肥大症患者が、前立腺癌ではなく前立腺肥大症であると正しく診断されることにつながる。

20

【0011】

このように、前立腺癌と前立腺良性疾患との判別精度が改善された診断方法は提案されてはいるが、さらにその判別精度を一層向上させることができる、新たな診断用情報を得ることが出来る分析方法が引き続き求められている。

30

【0012】

本発明は、前立腺癌と前立腺良性疾患とを精度よく判別することのできる、新たな診断用情報を得ることが出来る分析方法を提供することを課題の一つとする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、前立腺良性疾患患者に由来する血液試料中には、MUC1が前立腺癌患者または健常人に由来する血液試料中に比べて多く含まれることを見出した。このことにより、血液試料中の抗MUC1抗体、好ましくはその一種である抗KL-6モノクローナル抗体との反応性を有する全てのMUC1を定量し、その情報を利用して、前立腺良性疾患と前立腺癌とを精度よく判別して診断することが可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は前立腺良性疾患患者が前立腺癌患者として誤って診断され、必要としない医療行為を受けることを避けることを可能とする。

40

【0014】

本発明は一つの側面において、下記[1]~[6]に係る診断用情報の分析方法を提供する。

[1] 診断対象に由来する血液検体中の全てのムチン-1(トータルMUC1)の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルMUC1の濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺癌ではなく前立腺良性疾患であると推定する診断用情報の分析方法。

[2] 診断対象に由来する血液検体中の全てのムチン-1(トータルMUC1)の濃度

50

を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルMUC1の濃度が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺癌ではなく前立腺良性疾患であると推定する診断用情報の分析方法と、診断対象が前立腺疾患に罹患していることを示す前立腺特異抗原に関する診断用情報とを組み合わせ、診断対象が前立腺良性疾患と前立腺癌のどちらに罹患しているかを推定する診断用情報の分析方法。

[ 3 ] 診断対象に由来する血液検体中の全てのムチン - 1 (トータルMUC1) の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルMUC1の濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺癌ではなく前立腺良性疾患であると推定する診断用情報の分析方法と、診断対象に由来する血液検体中の、N - アセチル - D - ガラクトサミン 1 - 4 Nアセチルグルコサミン残基を認識して結合するレクチンとの反応性を有する前立腺特異抗原 (Lac di NAc - PSA) の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、Lac di NAc - PSAの濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺良性疾患ではなく前立腺癌であると推定する診断用情報の分析方法とを組み合わせ、診断対象が前立腺良性疾患と前立腺癌のどちらに罹患しているかを推定する診断用情報の取得方法。

10

[ 4 ] [ 3 ] の診断用情報の分析方法において、診断対象が前立腺癌に罹患していると推定される場合に、さらに、トータルMUC1の濃度の測定値が [ 3 ] に記載の閾値より大きなもう一つの閾値よりも大きく、かつLac di NAc - PSAの濃度の測定値が [ 3 ] に記載の閾値より大きなもう一つの閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している前立腺癌が、転移性の高い前立腺癌、前立腺良性疾患を伴う前立腺癌またはホルモン抵抗性の前立腺癌であると推定する診断用情報の分析方法。

20

[ 5 ] 前記前立腺良性疾患が前立腺肥大症である、[ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれか一項に記載の診断用情報の分析方法。

[ 6 ] 前記トータルMUC1が、抗KL - 6モノクローナル抗体との反応性を有するものである、[ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか一項に記載の診断用情報の分析方法。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明はもう一つの側面において、下記 [ 7 ] ~ [ 1 0 ] に係る診断用キットを提供する。

[ 7 ] [ 1 ] に記載の診断用情報の分析方法を実施するためのキットであって、トータルMUC1を定量するための抗ムチン - 1抗体を含む診断用キット。

30

[ 8 ] [ 2 ] に記載の診断用情報の分析方法を実施するためのキットであって、トータルMUC1を定量するための抗ムチン - 1抗体と、抗前立腺特異抗原を定量するための抗前立腺特異抗原抗体とを含む診断用キット。

[ 9 ] [ 3 ] または [ 4 ] に記載の診断用情報の分析方法を実施するためのキットであって、トータルMUC1を定量するための抗ムチン - 1抗体と、抗前立腺特異抗原を定量するための抗前立腺特異抗原抗体およびN - アセチル - D - ガラクトサミン 1 - 4 Nアセチルグルコサミン残基を認識して結合するレクチンを含む診断用キット。

[ 1 0 ] 前記抗ムチン - 1抗体が抗KL - 6モノクローナル抗体である、[ 7 ] ~ [ 9 ] のいずれか一項に記載の診断用キット。

[ 1 1 ] さらに、診断用情報の分析方法を実施するために必要な情報を記載した使用説明書を含む、[ 7 ] ~ [ 1 0 ] のいずれか一項に記載の診断用キット。

40

#### 【 発明の効果 】

#### 【 0 0 1 6 】

本発明の分析方法によって得られる診断用情報は、単独で用いても前立腺良性疾患を高精度で判定することを可能とするが、前立腺良性疾患患者を前立腺癌患者と誤って推定してしまう従来の前立腺癌に関する診断用情報とを組み合わせることによって、従来診断法の誤診断の可能性を著しく低減することを可能とする。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 1 7 】

【 図 1 】 図 1 は、実施例の定量工程 ( 1 ) : トータルMUC1 ( KL 6 ) の定量の結果を

50

示す散布図である。P Cは前立腺癌患者のサンプル、B P Hは前立腺肥大症患者のサンプルを表す。

【図2】図2は、実施例の定量工程(1):トータルMUC1(KL6)の定量の結果(横軸)および定量工程(2):トータルPSAの定量の結果(縦軸)を複合的に示す散布図である。P Cは前立腺癌患者のサンプル、B P Hは前立腺肥大症患者のサンプルを表す。

【図3】図3は、実施例の定量工程(1):トータルMUC1(KL6)の定量の結果(横軸)および定量工程(3):LacdiNAc-PSAの定量の結果(縦軸)を複合的に示す散布図である。P Cは前立腺癌患者のサンプル、B P Hは前立腺肥大症患者のサンプルを表し、点線の丸印で囲まれたサンプルは、前立腺癌が他の部位に転移している患者に由来するものである。

10

【発明を実施するための形態】

【0018】

本明細書において、N-アセチル-D-ガラクトサミン 1-4NアセチルグルコサミンはLacdiNAc、ムチン-1はMUC1、ノダフジレクチンはWFAと略記する。

【0019】

また、本発明において用いる、WFAに代表されるLacdiNAc残基を認識するレクチンとの反応性を有するPSAをLacdiNAc-PSAと称し、LacdiNAc-PSAとそれ以外のPSAを包含するPSA全体をトータルPSAと称する。

【0020】

20

- 分析方法 -

本発明の診断用情報の分析方法の第1実施形態は、診断対象に由来する血液検体中の全てのMUC1、すなわちトータルMUC1の濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルMUC1の濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺癌ではなく前立腺良性疾患であると推定する診断用情報の分析方法である。

【0021】

上述した本発明による分析方法の第1実施形態によって取得された血液検体中のトータルMUC1の濃度に基づく診断用情報は、前立腺良性疾患と前立腺癌とを明確に識別することが出来ない先行技術の前立腺癌に関する診断用情報と組み合わせ、前記診断対象が前立腺良性疾患と前立腺癌のどちらに罹患しているかをより明確に判別するために利用することができる。

30

【0022】

先行技術はいずれも、前立腺良性疾患を前立腺癌と誤って推定する可能性があり、先行技術の前立腺癌に関する診断用情報は特に限定されるものではなく、公知のいずれかの診断用情報の分析方法によって取得することができる。たとえば、従来一般的であった、血液検体中の全てのPSAの濃度に基づく診断用情報や、国際公開WO2010/090264号公報(特許文献1)および特開2013-76666号公報(特許文献5)に記載されている、血液検体中の特定の糖残基を有するPSAの濃度に基づく診断用情報を利用することができる。

40

【0023】

したがって、本発明の診断用情報の分析方法の第2実施形態は、たとえば、第1実施形態で得られた診断用情報の分析方法と、診断対象に由来する血液検体中の全てのPSAの濃度、すなわちトータルPSAの濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、トータルPSAの濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺良性疾患ではなく前立腺癌であると推定する診断用情報の分析方法とを組み合わせ、診断対象が前立腺良性疾患と前立腺癌のどちらに罹患しているかを推定する診断用情報の分析方法とすることができる。

【0024】

上記第2実施形態では、第1実施形態で得られた診断用情報の分析方法と組み合わせ

50

用いる診断用情報の分析方法としてトータルPSAを用いる方法を例示したが、PSA総量に対する遊離型PSAの量の比率(フリーPSA/トータルPSA比)を用いる診断用情報の分析方法およびその他の既知の診断用情報の分析方法を用いることが出来ることは上述の通りである。

【0025】

本発明の診断用情報の分析方法の第3実施形態は、第1実施形態で得られた診断用情報の分析方法と、診断対象に由来する血液検体中の、LacdiNAc残基を認識して結合するレクチンとの反応性を有するPSA、すなわちLacdiNAc-PSAの濃度を測定し、得られた測定値を閾値と比較し、LacdiNAc-PSAの濃度の測定値が閾値よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している疾患は前立腺良性疾患ではなく前立腺癌であると推定する診断用情報の分析方法とを組み合わせ、診断対象が前立腺良性疾患と前立腺癌のどちらに罹患しているかを推定する診断用情報の分析方法である。

10

【0026】

さらに、本発明の診断用情報の分析方法の第4実施形態は、第3実施形態の診断用情報の分析方法において、診断対象が前立腺癌に罹患していると推定される場合に、さらに、トータルMUC1の濃度の測定値が第3実施形態に記載の閾値(トータルMUC1に関する第1の閾値)より大きなもう一つの閾値(トータルMUC1に関する第2の閾値)よりも大きく、かつLacdiNAc-PSAの濃度の測定値が第3実施形態に記載の閾値(LacdiNAc-PSAに関する第1の閾値)より大きなもう一つの閾値(LacdiNAc-PSAに関する第2の閾値)よりも大きいことをもって、診断対象が罹患している前立腺癌が、転移性の高い前立腺癌、前立腺良性疾患を伴う前立腺癌またはホルモン抵抗性の前立腺癌であると推定する診断用情報の分析方法である。

20

【0027】

ここで、本発明における「トータルMUC1」は、「抗KL-6モノクローナル抗体」との反応性を有するものが好ましい。つまり、トータルMUC1の濃度を測定する際には、通常は固相化用または標識用の抗体として抗MUC1抗体を用いるが、その抗MUC1抗体として抗KL-6モノクローナル抗体を用いることが好ましい。

【0028】

MUC1にはいくつかのパリアントがあるが、抗MUC1抗体の中には、全ての、または多数のパリアントに共通する部位をエピトープとして認識して結合するモノクローナル抗体も含まれているし、例えば、シアル化糖鎖抗原KL-6(アミノ酸配列PDTRPAP及びそのスレオニン(T)に結合しているシアル化糖鎖であるNeu5Ac<sub>2</sub>,3Gal<sub>1</sub>,3GalNAc糖鎖からなる抗原)をエピトープとして認識する抗KL-6モノクローナル抗体や、抗CA15-3モノクローナル抗体のように、一部のパリアントに結合するモノクローナル抗体も含まれる。本発明では、様々な抗MUC1抗体を用いて診断用情報を分析できる可能性があるが、一つの実施形態として、抗KL-6モノクローナル抗体を用いると、信頼性の高い分析を行うことができる。以下の明細書の記載においても、好ましい実施形態として、抗MUC1抗体は抗KL-6モノクローナル抗体に読み替えることができる。

30

【0029】

具体的には、前述した第1~第4実施形態において、SPFS、ELISA等のサンドイッチ型アッセイの形態で「トータルMUC1」の濃度を測定する際に、「抗MUC1抗体」として「抗KL-6モノクローナル抗体」を用いた場合、それによって濃度を測定される「トータルMUC1」は、抗KL-6モノクローナル抗体との反応性を有する全てのMUC1(トータルMUC1(KL6))と称する)、ということになる。

40

【0030】

以下、第1~第4の各実施形態に係る事項について順次説明する。

【0031】

・血液検体

本発明の分析方法では、特定の糖タンパク質の濃度を測定するための試料として、診断

50

対象に由来する血液検体を用いる。

【0032】

診断対象は、典型的にはヒトであるが、ヒトの疾患のモデル動物（マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ネコ、イヌ、ブタ、サルなど）のようなヒト以外の哺乳動物であつてもよい。

【0033】

好ましいヒトの診断対象者の例として、他の診断方法により前立腺癌に罹患していることを強く示唆されるが、罹患疾患が前立腺良性疾患である可能性も排除できないため、診断精度を高め、前立腺癌に罹患しているか否かを明確にする必要のある患者が挙げられる。

10

【0034】

前立腺良性疾患は、典型的には前立腺肥大症（良性前立腺過形成：BPH）であるが、前立腺炎など、前立腺に関係するその他の良性疾患も包含される。

【0035】

血液検体は、全血であつてもよいし、全血から調製された血清または血漿であつてもよい。また、血液検体は、血液の採取時に添加される抗凝固剤や、採取後に必要に応じて添加される希釈液、試薬等を含んでいてもよい。血液検体は、公知の手法に従って採取、調製すればよい。

【0036】

・レクチン

20

本発明の分析方法の第3実施形態および第4実施形態では、LacdiNAc-PSAを定量するためにLacdiNAc残基を認識して結合するレクチンを用いる。そのようなレクチンの代表例としてはWFAが挙げられるが、本発明で用いることのできるレクチンはこれに限定されるものではない。すなわち、LacdiNAc-PSAの糖鎖中に含まれるLacdiNAc残基を認識して結合する能力を有し、血液検体中のLacdiNAc-PSAの濃度を測定するために利用することのできるレクチンであれば、WFAと同様に本発明で用いることができる。

【0037】

さらに、本発明の分析方法の第3実施形態に用いるレクチンとしては、GalNAc残基およびフコース（1,2）ガラクトース残基の両方を認識して結合する、キカラスウリレクチン-II（TJA-II）も挙げられる。

30

【0038】

WFAは、Tn残基およびLacdiNAc残基以外にも、ガラクトースを認識し、結合するが、その結合力は極めて弱く、WFAと比べ結合定数が数オーダー低いため、本発明を実施する上で障害とはならない。

【0039】

WFA以外のレクチンは、そのレクチンが糖残基のうちTn残基およびLacdiNAc残基のみを認識して結合する能力を有することが好ましいが、Tn残基およびLacdiNAc残基以外の糖残基を認識して結合する能力が本発明を実施する上で実質的な障害とならない十分に弱い範囲のものであれば本発明に用いることが出来る。

40

【0040】

・定量方法

本発明の分析方法を実施する際には、トータルMUC1、LacdiNAc-PSAおよびトータルPSAの3項目の測定対象物から、実施形態に応じて必要な、選ばれた項目または全3項目の対象物を測定、定量する必要がある。これらの測定対象物の定量方法は、各実施形態における分析を実施するために十分な精度を有する測定値が得られるものであれば特に限定されるものではなく、公知の定量方法の中から適宜選択することができる。

【0041】

測定対象物の好適な定量方法として、高感度・高精度で測定対象物を定量することので

50

きるSPFS (Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy : 表面プラズモン励起増強蛍光分光法) が挙げられる。SPFSは、誘電体部材上に形成された金属薄膜に全反射減衰(ATR)が生じる角度で励起光を照射したときに、金属薄膜を透過したエバネッセント波が表面プラズモンとの共鳴により数十倍～数百倍に増強されることを利用して、金属薄膜近傍に捕捉された測定対象物を標識した蛍光物質を効率的に励起させる方法である。その蛍光物質から発せられる蛍光の強度を測定し、濃度が既知の標準試料を用いて測定したときの蛍光の強度と対比することにより、血液検体中の測定対象物の濃度を決定することができる。このようなSPFSは、一般的な蛍光標識法などに比べて極めて感度が高いため、検体中の測定対象物の濃度が極めて低い場合であっても、その濃度を測定することが可能である。

10

#### 【0042】

なお、トータルMUC1濃度、LacdiNAc-PSA濃度およびトータルPSA濃度の3項目のうち、実施形態に応じて必要とされる複数の測定項目について、単独項目または最終分析の必要を満たさない複数項目のみを定量することを繰り返して最終分析に必要なデータを得てもよいが、実施形態に応じて必要とされる複数の測定項目を一度にまとめて定量することが、測定工程の効率化や測定結果の信頼性などの面から好適である。

#### 【0043】

たとえば、一つのSPFS用測定部材(以下センサーチップと称する)上に、各測定項目に対応した複数の測定領域を形成することにより、複数の測定項目の定量を並行して行うことができる。このような実施形態は、複数のセンサーチップを用いて各測定対象物を定量する実施形態に比べて、必要な部材、試薬、工程数を削減し、定量に要するコストおよび時間を節約することができるとともに、同一のセンサーチップを用いることで、センサーチップの差異に基づく測定値のばらつきを抑えることができるなどの点で好ましい。

20

#### 【0044】

また、本発明では、トータルMUC1、LacdiNAc-PSAおよびトータルPSAの血液検体中の濃度に基づいて診断用情報の分析を行うが、SPFS等の定量方法によって、所定の測定プロトコールに従って得られた「測定値」を、ng/mL等の所定の単位で表される「濃度」に換算しないまま、分析に用いることも可能である。たとえば、SPFSでは通常、蛍光強度の測定値を任意単位(arbitrary unit: a.u.)で表すが、測定対象物の血液検体中の濃度を反映しているその測定値を用いて、閾値を設定し、診断用情報の分析を行ってもよい。

30

#### 【0045】

##### ・SPFSに基づく実施形態

SPFSを実施するための基本的な構成、すなわち、センサーチップ、測定装置およびシステム、測定手順等の実施形態は公知であり、これらを応用して本発明を適切に実施することができる。SPFSでは、固相化用プローブ(抗体)-測定対象物-蛍光標識用プローブ(レクチンまたは抗体)の三者からなる複合体を形成させる、サンドイッチ型アッセイの形態で測定対象物を定量することが一般的である。

#### 【0046】

ここで、トータルMUC1、LacdiNAc-PSAおよびトータルPSAのうち、特定の糖残基を有する糖タンパク質であるLacdiNAc-PSAを定量する場合、代表的には2つの定量方法がある。

40

#### 【0047】

第1の定量方法は、特定の糖残基を認識して結合するレクチンを用いた糖タンパク質の分画は行わず、血液検体(糖タンパク質)全体をSPFSに供し、固相化用プローブ(抗体)に捕捉された糖タンパク質のうち特定の糖残基を有するものを、その特定の糖残基に結合する蛍光標識用プローブ(レクチン)を用いて蛍光標識することによって定量する方法である。固相化用プローブには、特定の糖残基を有さない糖タンパク質も結合するが、それには特定の糖残基を認識する蛍光標識用プローブ(レクチン)は結合しないので、定量の対象とはならない。たとえば、特開2013-76666号公報(特許文献5)には

50

、この第1の定量方法と同様の、SPFSおよび特定のレクチン(WFA等)を利用して特定の糖タンパク質(PSA)を定量する方法などが開示されており、これを参考にすることができる。

【0048】

第2の定量方法は、特定の糖残基を認識して結合するレクチンを用いてあらかじめ特定の糖鎖を有する糖タンパク質を分画して、その画分のみをSPFSに供し、固相化用プローブ(抗体)に捕捉された特定の糖残基を有する糖タンパク質を、それに結合する蛍光標識用プローブ(抗体)を用いて蛍光標識することによって定量する方法である。どちらの方法であっても、特定の糖残基を認識するレクチンと抗PSA抗体との反応性を有する、LacdiNAc-PSAを定量することができる。たとえば、国際公開WO2010/090264号公報(特許文献1)には、特定のレクチン(WFA等)が結合した担体を充填したカラム(レクチンアフィニティークラム)を利用して特定の糖タンパク質(PSA)を含む画分を精製し、それをELISAによって定量する方法などが開示されており、これを参考にすることができる。

【0049】

レクチンアフィニティークラムを用いた分画法の概要は次の通りである。まず、常法に従って、カラム用の担体と、測定対象物に応じた特定の糖残基を認識して結合するレクチンとを反応させて、レクチンアフィニティークラムを作製する。次に、常法に従って、前記レクチンアフィニティークラムに血液検体をアプライし、血液検体中の特定の糖残基を有する測定対象物を前記レクチンに結合させる。レクチンに結合しない物質を含有する画分(非結合画分)を、洗浄用緩衝液をカラムに添加したときの流出液として回収する。その後、レクチンに結合している測定対象物を含有する画分(結合画分)を、溶出用緩衝液をカラムに添加したときの溶出液として回収する。溶出用緩衝液は、前記レクチンに結合している測定対象物を解離させることのできるハプテン糖を溶解したものである。ハプテン糖は、前記レクチンに応じて選択すればよく、たとえば前記レクチンとしてWFAを用いた場合は、そのハプテン糖としてGalNAcを用いることができる。

【0050】

(1) トータルMUC1の定量

トータルMUC1の定量方法としては、センサーチップの表面に固相化された抗MUC1抗体(固相化抗MUC1抗体)、MUC1、および蛍光物質が結合した抗MUC1抗体(蛍光標識抗MUC1抗体)の三者からなるサンドイッチ型免疫複合体を形成させる方法が挙げられる。

【0051】

抗MUC1抗体は、公知の手法により作製することも可能であり、市販されているものを購入することも可能である。測定の安定性からポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体を用いることが好ましい。市販されている抗MUC1モノクローナル抗体としては、例えば、VU-3D1、VU-12E1、VU-11E2、VU-12E1、VU-3C6、VU-13F11、VU-5F12、VU-4C2、VU-2G7、VU-4H5、VU-11D1、M4021209、M3A106、M9E7、Ma552、VU-3C6、SM3、DF3、No.1、No.3、M2C5、3H2740、175C5、126E7、C595、139H2、9A102、8L820、M2F1、M4H2、1B7、M10G4、EPR1023、EP1024Y、X325、115D8、OC125、X75、が挙げられる。これらの抗MUC1モノクローナル抗体はいずれも抗KL-6モノクローナル抗体に該当する。

【0052】

蛍光標識抗MUC1抗体は、抗MUC1抗体に、公知の手法を用いて目的とする蛍光物質を結合させて作製することができるが、その際には市販の蛍光物質ラベリングキットなどを用いることもできる。蛍光物質は特に限定されるものではなく、SPFSによって適切な蛍光を発することのできる公知の蛍光色素などを用いることができる。

【0053】

10

20

30

40

50

トータルMUC1の定量における、固相化抗MUC1抗体の抗MUC1抗体の種類と、蛍光標識抗MUC1抗体の抗MUC1抗体の種類は、同一であっても異なってもよい。MUC1は非常に大きな分子で共通した繰り返し構造が存在するため、同じ種類の抗MUC1抗体でも固相化および蛍光標識化ができる。

【0054】

(2) Lac di NA c - PSAの定量

Lac di NA c - PSAの定量における第1の方法としては、Lac di NA c - PSAを分画していない血液検体(PSA)全体をSPFSに供し、センサーチップの表面に固相化された抗PSA抗体(固相化抗PSA抗体)、Lac di NA c - PSA、および蛍光体が結合したLac di NA c - PSA用レクチン(蛍光標識Lac di NA c - PSA用レクチン)の三者からなるサンドイッチ型免疫複合体を形成させる方法が挙げられる。

10

【0055】

抗PSA抗体は、公知の一般的な手法により作製することも可能であり、市販されているものを購入することも可能である。測定の実験性からポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体を用いることが好ましい。市販されている抗PSAモノクローナル抗体としては、例えば、PS2、PS3、PS4、PS5、PS6、PS15、2H9、3B4、5A6、5G6、8G4、9A8、9G2、PS1、8A6、2H9、1H12、No. 79が挙げられる。また、糖鎖中の特定の糖残基を蛍光標識Lac di NA c - PSA用レクチンが認識して結合することを妨げないよう、PSAの糖鎖ではなくタンパク質の部分をエピトープとする抗体を用いることが好ましい。

20

【0056】

蛍光標識Lac di NA c - PSA用レクチンは、WFAに代表されるLac di NA c残基を認識するレクチンに、公知の一般的な手法を用いて目的とする蛍光物質を結合させることにより作製することができ、その際には市販されている蛍光物質ラベリングキットなどを用いることもできる。蛍光物質は特に限定されるものではなく、SPFSによって適切な蛍光を発することのできる公知の蛍光色素などを用いることができる。

【0057】

しかしながら、本発明の実施形態によっては、前立腺癌に関する診断用情報を取得するために、Lac di NA c残基を有するPSAだけではなく、Lac di NA c残基を有するPSAとフコース(1,2)ガラクトース残基を有するPSAの両方を、定量の対象とすることも可能である(特許文献1および特許文献5参照)。その場合は、蛍光標識Lac di NA c - PSA用レクチンを、Lac di NA c残基とフコース(1,2)ガラクトース残基の両方を認識するレクチン、たとえばキカラスウリレクチン-II(TJA-II)を用いて作製したりすることも可能である。

30

【0058】

Lac di NA c - PSAの定量における第2の方法として、あらかじめLac di NA c - PSA用レクチンを用いて血液検体からLac di NA c - PSA画分を調製し、そのLac di NA c - PSA画分をSPFSに供し、固相化抗PSA抗体、Lac di NA c - PSA、および蛍光物質が結合した抗PSA抗体(蛍光標識抗PSA抗体)の三者からなるサンドイッチ型免疫複合体を形成させる方法が挙げられる。

40

【0059】

Lac di NA c - PSAの第2の定量方法に用いる固相化抗PSA抗体は、上述したLac di NA c - PSAの第1の定量方法に用いる固相化抗PSA抗体と同じ種類のものとして用いることができる。

【0060】

蛍光標識抗PSA抗体は、抗PSA抗体に公知の手法を用いて目的とする蛍光物質を結合させて作製することができるが、その際には市販の蛍光物質ラベリングキットなどを用いることもできる。蛍光物質は特に限定されるものではなく、SPFSによって適切な蛍光を発することのできる公知の蛍光色素などを用いることができる。

50

## 【 0 0 6 1 】

## ( 3 ) トータル P S A の定量

トータル P S A の定量方法としては、センサーチップの表面に固相化された抗 P S A 抗体（固相化抗 P S A 抗体）、P S A、および蛍光体が結合した抗 P S A 抗体（蛍光標識抗 P S A 抗体）の三者からなるサンドイッチ型免疫複合体を形成させる方法が挙げられる。

## 【 0 0 6 2 】

トータル P S A の定量に用いる固相化抗 P S A 抗体は、L a c d i N A c - P S A の定量に用いる固相化抗 P S A 抗体と同じ種類のものですることができる。また、トータル P S A の定量に用いる蛍光標識抗 P S A 抗体（蛍光物質および / または抗 P S A 抗体）の種類は、L a c d i N A c - P S A の定量の第 2 の方法に用いる蛍光標識抗 P S A 抗体（蛍光物質および / または抗 M U C 1 抗体）の種類と同じものですることができる。

10

## 【 0 0 6 3 】

## ・その他の定量方法に基づく実施形態

S P F S 以外の測定対象物の定量方法としては、たとえば、生体関連物質の定量方法として汎用されている E L I S A が挙げられる。E L I S A では、固相化用プローブ（抗体） - 測定対象物 - 酵素標識用プローブ（抗体またはレクチン）の三者からなる複合体を形成させる、サンドイッチ型アッセイの形態で測定対象物を定量することが一般的であり、酵素標識用プローブの酵素と所定の基質との反応により生成する色素量（シグナル強度）に基づいて測定対象物を定量する。

## 【 0 0 6 4 】

E L I S A を用いて L a c d i N A c - P S A を定量する場合には、上述した L a c d i N A c - P S A の第 2 の定量方法と同様、特定の糖残基を認識して結合するレクチンを利用して、たとえば W F A を担持させたレクチンアフィニティーカラムを利用して、L a c d i N A c - P S A を含む画分を、血液検体中の全ての P S A の中からあらかじめ分離しておく必要がある。

20

## 【 0 0 6 5 】

E L I S A および分画法を実施するための基本的な手法は公知であり、これらを応用して本発明を適切に実施することができる。たとえば、E L I S A および特定のレクチンを担持させたレクチンアフィニティーカラムを利用して特定の糖タンパク質である P S A を定量する方法などが記載されている、国際公開 W O 2 0 1 0 / 0 9 0 2 6 4 号公報（特許文献 1）を参照することができる。

30

## 【 0 0 6 6 】

## ・閾値

第 1 実施形態およびこれを利用する第 2、第 3 および第 4 実施形態で用いられる、測定した血液検体中のトータル M U C 1 の濃度値を、ある疾患であるか否かを判別するための閾値（トータル M U C 1 に関する第 1 の閾値）のは、一般的な手法によって設定することができる。たとえば、前立腺癌と確定診断された複数の患者に由来する血液検体、および前立腺肥大症等の前立腺良性疾患と確定診断された複数の患者に由来する血液検体について、トータル M U C 1 の濃度を測定し、後者の測定データが基準とする比率以上で含まれる濃度を求めることにより、この濃度を前立腺良性疾患と推定するための閾値とすることができる。前記測定データの基準とする比率が、前立腺良性疾患の推定に関する信頼性、即ち、推定が正しい確率に相当する。測定データの母集団であるサンプル数を多くするほど、信頼性の高い閾値を設定することが可能となる。ある血液検体のトータル M U C 1 の濃度の測定値をそのようにして設定された閾値と比較し、トータル M U C 1 の濃度の測定値が閾値よりも大きければ、この血液検体は前立腺良性疾患に罹患している診断対象に由来するものであると、ある確率でもって推定することができる。前記測定データから、前立腺良性疾患に罹患している診断対象由来の血液検体について分析した場合に 1 0 0 % 陽性と判定し、前立腺癌に罹患している診断対象由来の血液検体について分析した場合に 1 0 0 % 陰性と判定できる閾値を設定できれば理想的であるが、現実的にそのようなことは困難である。目的とする分析の精度を考慮して、前立腺良性疾患に罹患している診断対象

40

50

由来の血液検体について分析した場合に望ましい高い確率で陽性と判定できる閾値、逆に言えば前立腺癌に罹患している診断対象由来の血液検体について分析した場合に擬陽性と判定されてしまう確率をなるべく低くできる閾値を設定すればよい。

【0067】

第2実施形態で用いられる、血液検体中のトータルPSAの濃度の測定値と比較するための閾値、第3実施形態で用いられる、血液検体中のLacdiNac-PSAの濃度の測定値と比較するための閾値(LacdiNac-PSAに関する第1の閾値)についても、上記と同様の手法によって設定することができる。

【0068】

さらに、第4実施形態で用いられる、転移性の高い前立腺癌、前立腺良性疾患を伴う前立腺癌またはホルモン抵抗性の前立腺癌を検出するための、血液検体中のLacdiNac-PSAの濃度、トータルMUC1の濃度それぞれと比較するための閾値(それぞれ、トータルMUC1およびLacdiNac-PSAに関する第2の閾値)も、上記と同様の手法によって設定することができる。これらの第4実施形態で用いられる閾値は、第3実施形態で用いられる閾値とは異なる値であり、通常、LacdiNac-PSA、トータルMUC1どちらについても第3実施形態より高くなる。第3実施形態における分析および第4実施形態における分析は、どちらも血液検体中のLacdiNac-PSAの濃度およびトータルMUC1の濃度を所定の閾値と比較する点で共通しているため、同時にを行うことが可能である。

【0069】

-キット-

本発明の診断用情報の分析方法を効率的に実施するために、必要な試薬類をまとめてキットを構成することができる。診断用情報の分析方法は、典型的にはSPFSやELISAのようなサンドイッチ型アッセイに基づく定量方法を用いて、また必要に応じてレクチンアフィニティーカラムによる分画法を併用して実施する。したがってキットも、典型的にはそれらの方法に適したサンドイッチ型免疫複合体を形成するための試薬類、すなわち、固相化用生体関連物質である抗体および検出用生体関連物質であるレクチンまたは抗体を主要な構成物とし、また必要に応じてレクチンアフィニティーカラムを作製するためのレクチンも構成物とすることができる。

【0070】

診断用情報の分析方法の第1実施形態を実施するためのキット(キットの第1実施形態)は、少なくとも、トータルMUC1を定量するための試薬として、抗MUC1抗体を含むものとして構成することができる。この抗MUC1抗体は、SPFS用のセンサーチップやELISA用の基板の表面に結合させる固相化用、および定量方法がSPFSであれば蛍光物質と結合させて蛍光標識抗MUC1抗体を作製するため、定量方法がELISAであれば所定の基質と反応する酵素と結合させて酵素標識抗MUC1抗体を作製する検出用として用いられる。したがって、この場合の抗MUC1抗体は固相化用の抗MUC1抗体と検出用の抗MUC1抗体を含むが、それらは同じ種類であってもよい。

【0071】

診断用情報の分析方法の第2実施形態を実施するためのキット(キットの第2実施形態)は、少なくとも以下の試薬を含むものとして構成することができる:トータルMUC1を定量するための試薬として、抗MUC1抗体;PSAを定量するための試薬として、抗PSA抗体。

【0072】

トータルMUC1を定量するための試薬については、前述したキットの第1実施形態についてと同様である。

【0073】

PSAを定量するための試薬としての抗PSA抗体は、たとえばトータルPSAを定量する場合は、SPFS用のセンサーチップやELISA用の基板の表面に結合させる固相化用、および定量方法がSPFSであれば蛍光物質と結合させて蛍光標識抗PSA抗体を

10

20

30

40

50

作製するため、定量方法がE L I S Aであれば所定の基質と反応する酵素と結合させて酵素標識抗P S A抗体を作製する検出用として用いられる。したがって、この場合の抗P S A抗体は固相化用の抗P S A抗体と検出用の抗P S A抗体を含む。

**【0074】**

診断用情報の分析方法の第3実施形態を実施するためのキット(キットの第4実施形態)は、少なくとも以下の試薬を含むものとして構成することができる: トータルM U C 1を定量するための試薬として、抗M U C 1抗体; L a c d i N A c - P S Aを定量するための試薬として、抗P S A抗体およびL a c d i N A c 残基を認識して結合するレクチン。

**【0075】**

トータルM U C 1を定量するための試薬については、前述したキットの第1実施形態についてと同様である。

**【0076】**

L a c d i N A c - P S Aを前述した第1の方法に従って定量する場合、キットに含まれる抗P S A抗体は、S P F S用のセンサーチップやE L I S A用の基板の表面に結合させる固相化用として用いられる。一方、L a c d i N A c 残基を認識して結合するレクチンは、定量方法がS P F Sであれば蛍光物質と結合させて蛍光標識L a c d i N A c - P S A用レクチンを作製するために用いられ、定量方法がE L I S Aであれば所定の基質と反応する酵素と結合させて酵素標識L a c d i N A c - P S A用レクチンを作製する検出用として用いられる。

**【0077】**

L a c d i N A c - P S Aを前述した第2の方法に従って定量する場合、キットに含まれる抗P S A抗体は、S P F S用のセンサーチップやE L I S A用の基板の表面に結合させる固相化用、および定量方法がS P F Sであれば蛍光物質と結合させて蛍光標識抗P S A抗体を作製するため、定量方法がE L I S Aであれば所定の基質と反応する酵素と結合させて酵素標識抗P S A抗体を作製する検出用として用いられる。したがって、この場合の抗P S A抗体は固相化用の抗P S A抗体と検出用の抗P S A抗体を含む。一方、L a c d i N A c 残基を認識して結合するレクチンは、L a c d i N A c - P S A画分を調製するためのレクチンアフィニティーカラムを作製するために用いられる。

**【0078】**

キットの第1~第4実施形態に含まれる抗M U C 1抗体としては抗K L - 6モノクローナル抗体が好ましく、特に固相化用の抗M U C 1抗体と検出用の抗M U C 1抗体の両方が含まれる実施形態においては、その両方が抗K L - 6モノクローナル抗体であることが好ましい。

**【0079】**

各実施形態の診断用情報の分析方法を実施するためのキットは、必要に応じて、上記の試薬以外の試薬、器具、使用説明書等を含んでもよい。そのような試薬および器具としては、たとえば、所定の抗体をS P F S用のセンサーチップやE L I S A用の基板の表面に固相化するための試薬、所定のレクチンまたは抗体に蛍光物質と結合させるための試薬、S P F S用のセンサーチップやE L I S A用の基板の表面の非特異的吸着を抑制するためのブロッキング液、S P F Sの各工程で血液検体や試薬を送液した後に送液するための洗浄液、レクチンアフィニティーカラムの担体に所定のレクチンを結合させるための試薬、レクチンアフィニティーカラム用の洗浄用もしくは溶出用緩衝液を調製するための試薬、血液検体用の処理液、これらの試薬を反応させるための器具、さらにS P F S用のセンサーチップやE L I S A用の基板、レクチンアフィニティーカラムの担体などが挙げられる。また、使用説明書には、本発明の各実施形態の診断用情報の分析方法を実施するために必要な情報、例えば、上記の試薬および器具の使用方法(プロトコール)や、診断用情報の分析に関する閾値などを記載しておくことができる。

**【実施例】****【0080】**

## [ 作製・調製工程 ]

## ( 1 ) プラズモン励起センサーの作製

厚さ 1 mm のガラス製の透明平面基板 ( (株)オハラ「S-LAL 10」、屈折率 1.72 ) をプラズマ洗浄した後、この基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法によって形成し、このクロム薄膜の表面にさらに金薄膜をスパッタリング法によって形成した。クロム薄膜の厚さは 1 ~ 3 nm、金薄膜の厚さは 44 ~ 52 nm であった。このようにして金薄膜が形成された基板を、10 - カルボキシ - 1 - デカンチオールのエタノール溶液 (濃度 25 mg / mL ) に 24 時間以上浸漬し、金薄膜の表面に SAM 膜を形成した。この基板をエタノール溶液から取り出し、エタノールおよびイソプロパノールで洗浄した後、エアガンを用いて乾燥させた。

10

## 【 0081 】

## ( 2 ) S P F S 用流路型測定部材の作製

前記工程で作製したプラズモン励起センサー (金薄膜) の表面に、幅 2 mm、長さ 14 mm の流路となる穴を有する、厚さ 0.5 mm のシート状のシリコンゴムスペーサーを積載した。さらにその上に、両端に貫通孔を有する厚さ 2 mm のポリメチルメタクリレート板を積載して圧着し、ビスでプラズモン励起センサーに固定して、貫通穴を通じて試料、試薬等を送液することのできる流路を備えた、S P F S 用流路型測定部材を作製した。

## 【 0082 】

## ( 3 ) 蛍光標識 W F A の作製

W F A ( L - 1350、Vector 社 ) を、Alexa Fluor (商標名) 647 タンパク質ラベリングキット (インビトロゲン社) を用いて蛍光標識化した。手順はそのキットに添付されたプロトコールに従った。未反応のレクチンおよび蛍光色素を除去するため、限外濾過膜 (日本ミリポア (株) 製) を用いて反応物を精製し、Alexa Fluor 647 標識 W F A 溶液を得た。吸光度を測定してその溶液の Alexa Fluor 647 標識 W F A の濃度を求めた後、4℃ で保存した。

20

## 【 0083 】

## ( 4 ) 蛍光標識抗 M U C 1 抗体の作製

前記工程 ( 3 ) において、W F A の代わりに市販の抗 M U C 1 モノクローナル抗体 (抗 K L - 6 モノクローナル抗体) を用い、それ以外は同様にして、Alexa Fluor 647 標識抗 M U C 1 抗体を作製した。なお、この抗 M U C 1 モノクローナル抗体は、後述する抗 M U C 1 抗体固相化領域の形成にも用いた。

30

## 【 0084 】

## ( 5 ) 蛍光標識抗 P S A 抗体の作製

前記工程 ( 3 ) において、W F A の代わりに市販の抗 P S A モノクローナル抗体 (ミクリ免疫研究所 (株)、クローン No. 79、2.5 mg / mL ) を用い、それ以外は同様にして、Alexa Fluor 647 標識抗 P S A 抗体を作製した。

## 【 0085 】

## ( 6 ) 血液検体の調製

前立腺癌の確定診断を受けた患者に由来する血清サンプルおよび前立腺肥大症の確定診断を受けた患者に由来する血清サンプルそれぞれについて、リン酸緩衝溶液にて 2 ~ 10 倍に希釈し、血液検体を調製した。

40

## 【 0086 】

## [ 定量工程 ]

前記作製・調製工程 ( 6 ) で調製した血液検体のそれぞれについて、下記の手順により、トータル M U C 1、L a c d i N A c - P S A およびトータル P S A それぞれの濃度を測定した。

## 【 0087 】

## ( 1 ) トータル M U C 1 の定量

## ( 1 - 1 ) 抗 M U C 1 抗体固相化領域の形成

前記作製・調製工程 ( 2 ) で作製した S P F S 用流路型測定部材の流路に、超純水を 1

50

0 分間、その後、リン酸緩衝生理食塩水を 20 分間、ペリスタポンプによって、室温 (25)、流速 500  $\mu$ L / 分の条件で循環送液し、プラズモン励起センサーの表面を平衡化した。続いて、N - ヒドロキシコハク酸イミドを 50 mM と、エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを 100 mM とを含むリン酸緩衝生理食塩水を 5 mL 送液し、20 分間循環させた。その後、市販の抗 MUC 1 モノクローナル抗体 (抗 KL - 6 モノクローナル抗体) 溶液 2.5 mL を 30 分間循環送液することで、SAM 膜上に当該抗体を固相化し、抗 MUC 1 抗体固相化領域を形成した。さらに、1 重量% 牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を 30 分間循環送液することによって、流路内の非特異吸着防止処理を行った。

【0088】

(1 - 2) SPFS による測定

試料送液工程：前記抗 MUC 1 抗体固相化領域が形成された流路に、前記作製・調製工程 (6) で調製した血液検体を 25 分間、循環送液した。

【0089】

第 1 洗浄工程：Tween (登録商標) 20 を 0.05 重量% 含むトリス緩衝生理食塩水を 10 分間、循環送液した。

【0090】

ブランク測定工程：前記トリス緩衝生理食塩水で流路を満たした状態で、波長 635 nm のレーザー光を、光学フィルタにより光子量を調節し、プリズムを通じて、プラズモン励起センサーの裏面から金属薄膜に照射した。測定領域の上部に設置された、倍率 20 倍の対物レンズを付けた CCD イメージセンサー (テキサスインスツルメント (株)) で、蛍光成分以外の波長をカットするフィルタを通過した光の強度を測定した。この測定値は、MUC 1 を標識した蛍光体が発する蛍光を含まないノイズ値であるので、ブランク値とする。

【0091】

標識工程：前記作製・調製工程 (4) で作製した Alexa Fluor 647 標識抗 MUC 1 抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水 (1 ng / mL) 5 mL を 20 分間、循環送液した。

【0092】

第 2 洗浄工程：Tween (登録商標) 20 を 0.05 重量% 含むトリス緩衝生理食塩水を 20 分間、循環送液した。

【0093】

シグナル測定工程：前記トリス緩衝生理食塩水で流路を満たした状態で、前記ブランク測定工程のときと同様にして、光の強度を測定した。この測定値は、MUC 1 を標識した蛍光体が発する蛍光を含む、シグナルに相当する。

【0094】

(2) トータル PSA の定量

(2 - 1) 抗 PSA 抗体固相化領域の形成

トータル MUC 1 の定量における前記工程 (1 - 1) において、前記抗 MUC 1 モノクローナル抗体の代わりに市販の抗 PSA モノクローナル抗体を用い、それ以外は同様にして、抗 PSA 抗体固相化領域を形成した。

【0095】

(2 - 2) SPFS による測定

トータル MUC 1 の定量における前記工程 (1 - 2) において、前記作製・調製工程 (4) で作製した Alexa Fluor 647 標識抗 MUC 1 抗体の代わりに、前記作製・調製工程 (5) で作製した Alexa Fluor 647 標識抗 PSA 抗体を用い、それ以外は同様にして、トータル PSA を定量した。

【0096】

(3) Lac di NA c - PSA の定量

(3 - 1) 抗 PSA 抗体固相化領域の形成

10

20

30

40

50

トータルMUC1の定量における前記工程(1-1)において、前記抗MUC1モノクローナル抗体の代わりに市販の抗PSAモノクローナル抗体を用い、それ以外は同様にして、抗PSA抗体固相化領域を形成した。

【0097】

(3-2)SPFSによる測定

トータルMUC1の定量における前記工程(1-2)において、前記作製・調製工程(4)で作製したAlexa Fluor 647標識抗MUC1抗体の代わりに、前記作製・調製工程(3)で作製したAlexa Fluor 647標識WFAを用い、それ以外は同様にして、LacdiNAc-PSAを定量した。

【0098】

[分析工程]

図1に、前記定量工程(1)：トータルMUC1(KL6)の定量の結果を示す。血液検体中のトータルMUC1(KL6)の濃度は、前立腺癌患者よりも前立腺肥大症患者の方が高いことが示されている。したがって、この結果に基づいた場合は、たとえば4.5~5unitのある値に相当する濃度を、本発明の分析方法の第1実施形態における閾値として設定することが可能であることが分かる。

【0099】

図2に、前記定量工程(1)：トータルMUC1(KL6)の定量の結果(横軸)および前記定量工程(2)：トータルPSAの定量の結果(縦軸)を複合的に示す。血液検体中のトータルMUC1(KL6)の濃度は、前立腺癌患者よりも前立腺肥大症患者の方が高いことが示されている。すなわち、この結果に基づいた場合は、たとえば4.5~5unitの範囲を、本発明の分析方法の閾値として設定することが可能であることが分かる。したがって、本発明の分析方法の第2実施形態において、従来診断に用いられてきたトータルPSAに関する閾値がグレーゾーンを含み、前立腺肥大症患者の一定数を前立腺癌であるとする偽陽性の結果を与える場合であっても、トータルMUC1(KL6)に関する閾値を併用することで、偽陽性患者を正しく前立腺肥大症であると判定することが可能であることが分かる。

【0100】

図3に、前記定量工程(1)：トータルMUC1(KL6)の定量の結果(横軸)および前記定量工程(3)：LacdiNAc-PSAの定量の結果(縦軸)を複合的に示す。血液検体中のトータルMUC1(KL6)の濃度は、前立腺癌患者よりも前立腺肥大症患者の方が高いことが示されている。すなわち、この結果に基づいた場合は、たとえば4.5~5unitの範囲を、本発明の分析方法の閾値として設定することが可能であることが分かる。したがって、本発明の分析方法の第3実施形態において、特許文献1に開示されたLacdiNAc-PSAに関する閾値がグレーゾーンを含み、前立腺肥大症患者の一定数を前立腺癌であるとする偽陽性の結果を与える場合であっても、トータルMUC1(KL6)に関する閾値を併用することで、偽陽性患者を正しく前立腺肥大症であると判定することが可能であることが分かる。

【0101】

なお、図3には、トータルMUC1(KL6)の濃度が高く、かつLacdiNAc-PSAの濃度も比較的高いサンプルが1つ見られるが(点線の丸印で囲まれたサンプル)、これは前立腺癌が他の部位に転移している患者に由来するサンプルである。また、他の結果を考慮すれば、前立腺肥大症等の前立腺良性疾患を併発している前立腺癌患者に由来するサンプルの場合も同様になると考えられる。さらに、ホルモン抵抗性の前立腺癌患者に由来するサンプルの場合も同様になると考えられる。したがって、本発明の第4実施形態において、トータルMUC1(KL6)およびLacdiNAc-PSAに関する第2の閾値を設定することで、転移性の高い前立腺癌、前立腺良性疾患を伴う前立腺癌またはホルモン抵抗性の前立腺癌を検出することが可能であることが分かる。

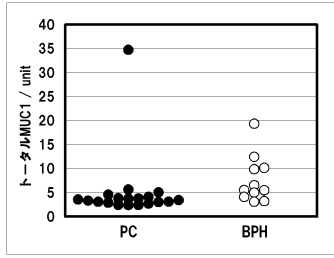
10

20

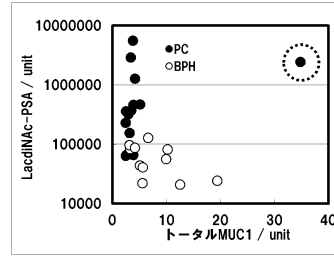
30

40

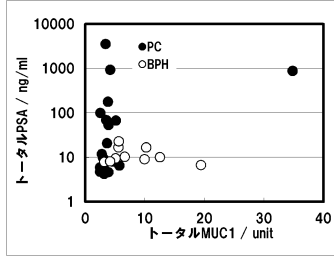
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 金子 智典

東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開2011-137754(JP,A)

特表2008-529967(JP,A)

米国特許第06677157(US,B1)

国際公開第2010/090264(WO,A1)

特表2004-515472(JP,A)

Devine P L et al , Prostate-specific antigen (PSA) and cancer-associated serum antigen (CASA) in distinguishing benign , The International journal of biological markers , 1995年 , Vol.10, No.4, Page.221-225

Xiang Song-Tao et al , Tumor infiltrating dendritic cells and Mucin1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and pr , Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology , 2003年 , Vol.9, No.7, Page.497-500

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/68

C12Q 1/02

G01N 33/53

G01N 33/574

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于分析诊断信息的方法及其套件   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP6323463B2</a>   | 公开(公告)日 | 2018-05-16 |
| 申请号            | JP2015554445  | 申请日     | 2013-12-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 柯尼卡株式会社   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 柯尼卡美能达有限公司  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 柯尼卡美能达有限公司  |         |            |
| [标]发明人         | 山下克子<br>彼谷高敏<br>井出陽一<br>金子智典  |         |            |
| 发明人            | 山下 克子<br>彼谷 高敏<br>井出 陽一<br>金子 智典  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/02   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/6893 G01N33/573 G01N33/57434 G01N2333/4725 G01N2333/705 G01N2333/96455<br>G01N2800/342 |         |            |
| FI分类号          | G01N33/68 G01N33/574.A G01N33/53.V C12Q1/02   |         |            |
| 审查员(译)         | 三木隆   |         |            |
| 其他公开文献         | JPWO2015097863A1  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本发明的一个目的是提供：一种分析诊断信息的新方法，通过该方法可以高精度地区分前列腺癌和良性前列腺疾病；以及用于获得诊断信息的诊断工具。根据本发明的分析诊断信息的方法的一个实施例是一种分析诊断信息的方法，其包括：测量源自待诊断对象的血液样品中的全部粘蛋白-1（总MUC1）的浓度；将如此测量的值与阈值进行比较；并且当总MUC1浓度的测量值大于阈值时，估计影响待诊断对象的疾病不是前列腺癌而是良性前列腺疾病，并且根据本发明的诊断试剂盒的一个实施方案是包括用于定量总MUC1的抗粘蛋白-1抗体的诊断试剂盒。

|  |                                   |  |
|--|-----------------------------------|--|
| (19) 日本国特許庁 (JP)                       | (12) 特 許 公 報 (B2)                 | (11) 特許番号<br>特許第6323463号<br>(P6323463) |
| (45) 発行日 平成30年5月16日 (2018. 5. 16)      | (24) 登録日 平成30年4月20日 (2018. 4. 20) |  |
| (5) Int. Cl.                           |                                   |  |
| GO1N 33/68 (2006.01)                   | GO1N 33/68                        | F I                                    |
| GO1N 33/574 (2006.01)                  | GO1N 33/574                       | A                                      |
| GO1N 33/53 (2006.01)                   | GO1N 33/53                        | V                                      |
| C12Q 1/02 (2006.01)                    | C12Q 1/02                         |  |
| 請求項の数 9 (全 19 頁)                       |                                   |  |
| (21) 出願番号 特願2015-554445 (P2015-554445) | (73) 特許権者 000001270               |  |
| (86) (22) 出願日 平成25年12月27日 (2013.12.27) | コニカミノルタ株式会社                       |  |
| (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/085116          | 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号                 |  |
| (87) 国際公開番号 W02015/097863              | 110001070                         |  |
| (87) 国際公開日 平成27年7月2日 (2015. 7. 2)      | 特許業務法人 S S I N P A T              |  |
| 審査請求日 平成28年9月26日 (2016. 9. 26)         | (74) 代理人 山下 克子                    |  |
|  | 神奈川県横浜市戸塚区上矢部町3-043-4             |  |
|  | (72) 発明者 坂谷 高敏                    |  |
|  | 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ               |  |
|  | ニカミノルタ株式会社内                       |  |
|  | (72) 発明者 井出 陽一                    |  |
|  | 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ               |  |
|  | ニカミノルタ株式会社内                       |  |
| 最終頁に続く                                 |                                   |  |

(54) 【発明の名称】 診断用情報分析方法及びそのためのキット