

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2018/190379

発行日 令和2年2月20日 (2020.2.20)

(43) 国際公開日 平成30年10月18日 (2018.10.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

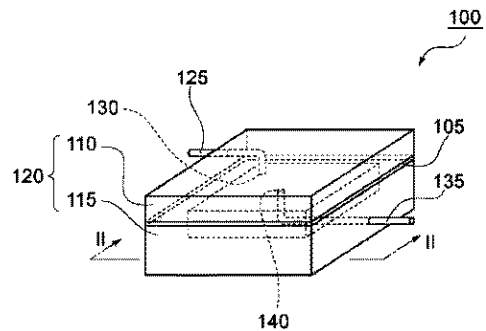
出願番号 特願2019-512556 (P2019-512556)	(71) 出願人 000004455
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/015264	日立化成株式会社
(22) 国際出願日 平成30年4月11日 (2018.4.11)	東京都千代田区丸の内一丁目9番2号
(31) 優先権主張番号 特願2017-79973 (P2017-79973)	(71) 出願人 308038613
(32) 優先日 平成29年4月13日 (2017.4.13)	公立大学法人和歌山県立医科大学
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	和歌山県和歌山市紀三井寺8 1 1 番地 1
	(74) 代理人 100088155
	弁理士 長谷川 芳樹
	(74) 代理人 100128381
	弁理士 清水 義憲
	(74) 代理人 100169454
	弁理士 平野 裕之
	(74) 代理人 100126653
	弁理士 木元 克輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法

(57) 【要約】

本発明に係る被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法は、( a ) 被験者の血液試料から細胞を採取する工程と、( b 1 ) 細胞に、PD - L 1 を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、PD - L 1 を認識する抗体であって蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、( c ) 細胞に蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる蛍光を検出する工程と、を備え、細胞がPD - L 1 陽性癌細胞である場合に、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性が高いと予測する。かかる方法によれば、被験者に大きな負担をかけることなく、免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法であって、

(a) 被験者の血液試料から細胞を採取する工程と、

(b1) 細胞に、PD-L1を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、PD-L1を認識する抗体であって蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、

(c) 細胞に蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる蛍光を検出する工程と、を備え、

蛍光色素の蛍光が検出されることが、細胞がPD-L1陽性癌細胞であることを示し、細胞がPD-L1陽性癌細胞である場合に、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性が高いと予測する、方法。

10

## 【請求項 2】

被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法であって、

(a) 被験者の血液試料から細胞を採取する工程と、

(b1) 細胞に、PD-L1を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第一の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、PD-L1を認識する抗体であって第一の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、

(b2) 細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第二の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する抗体であって第二の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、

(c) 細胞に、第一及び第二の蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる第一及び第二の蛍光を検出する工程と、

(d) 検出された蛍光の組み合わせから、細胞における、癌細胞の数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合を算出する工程であって、

癌細胞の数は、第二の蛍光色素の蛍光が検出された細胞の数であり、

PD-L1陽性癌細胞の数は、第一及び第二の蛍光色素の蛍光の組み合わせが検出された細胞の数である、工程と、を備え、

工程(b1)及び工程(b2)を任意の順で行い、

癌細胞の数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合が、30%以上の基準値以上である場合に、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性が高いと予測する、方法。

30

## 【請求項 3】

工程(a)が、血液試料をフィルターでろ過してフィルター上に細胞を捕捉する工程である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 4】

工程(a)の後かつ工程(c)の前の任意の段階で、

(x1) 細胞に、白血球のマーカータンパク質を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第三の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、白血球を認識する抗体であって第三の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、

(x2) 細胞の核を第四の蛍光色素で標識する工程と、を任意の順でさらにを行い、

工程(c)において、細胞に、第一、第二、第三及び第四の蛍光色素の励起光をそれぞれ照射して、細胞から発せられる第一、第二、第三、及び第四の蛍光色素の蛍光をそれぞれ検出し、

40

50

工程 ( d ) において、

癌細胞の数は、第三の蛍光色素の蛍光が観察されず、かつ、第二及び第四の蛍光色素の蛍光の組み合わせが検出され細胞の数であり、

P D - L 1 陽性癌細胞の数は、第三の蛍光色素の蛍光が観察されず、かつ、第一、第二及び第四の蛍光色素の蛍光の組み合わせが検出された細胞の数である、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 ( x 1 )、工程 ( b 1 ) 及び工程 ( b 2 ) をこの順で行い、

工程 ( x 2 ) を工程 ( b 2 ) と同時に行う、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

免疫チェックポイント阻害剤が、抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体である、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

白血球のマーカータンパク質が C D 4 5 である、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

上皮細胞のマーカータンパク質がサイトケラチンである、請求項 4 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

第一、第二、及び第三の蛍光色素が、フルオレセイン、A l e x a F l u o r ( 登録商標 ) 5 9 4、及び A l e x a F l u o r ( 登録商標 ) 6 4 7 からなる群より選ばれ、第四の蛍光色素が 4 , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドールである、請求項 4 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

癌の治療方法の一つとして「免疫チェックポイント阻害療法」が知られている。免疫チェックポイント阻害療法は、免疫反応を抑制する反応経路（免疫チェックポイント）を免疫チェックポイント阻害剤で阻害することにより、免疫細胞を活性化させる。患者の癌細胞が標的の免疫チェックポイントを有さない場合、免疫チェックポイント阻害剤の奏効性は低い。そのため、免疫チェックポイント阻害療法を実際実施する前に、免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測することが重要である。

【0003】

免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法として、非特許文献 1 に記載される方法がある。この文献では、免疫チェックポイント阻害剤「ペムブロリズマブ」の奏効性を、患者から組織検体を採取して、検体中の P D - L 1 を発現している癌細胞（P D - L 1 陽性癌細胞）を検出することにより予測している。ペムブロリズマブは、免疫反応を抑制する P D - 1 / P D - L 1 経路を阻害する薬剤であり、同じく P D - 1 / P D - L 1 経路を阻害するニボルマブと並んで、開発が最も進んでいる免疫チェックポイント阻害剤の一つである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】" The New England Journal of Medicine ", 2 0 1 5、V o l . 3 7 2、N o . 2 1、p . 2 0 1 8 - 2 0 2 8

【発明の概要】

10

20

30

40

50

**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

非特許文献1の方法は、患者から腫瘍組織を採取することを要するため、患者への負担が大きかった。本発明は、被験者に大きな負担をかけることなく、免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測することを目的とする。

**【課題を解決するための手段】****【0006】**

本発明は、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法であって、(a)被験者の血液試料から細胞を採取する工程と、(b1)細胞に、PD-L1を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、PD-L1を認識する抗体であって蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、(c)細胞に蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる蛍光を検出する工程と、を備え、蛍光色素の蛍光が検出されることが、細胞がPD-L1陽性癌細胞であることを示し、細胞がPD-L1陽性癌細胞である場合に、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性が高いと予測する方法を提供する。

**【0007】**

また、本発明は、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法であって、(a)被験者の血液試料から細胞を採取する工程と、(b1)細胞に、PD-L1を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第一の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、PD-L1を認識する抗体であって第一の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、(b2)細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第二の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する抗体であって第二の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、(c)細胞に、第一及び第二の蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる第一及び第二の蛍光を検出する工程と、(d)検出された蛍光の組み合わせから、細胞における、癌細胞の数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合を算出する工程であって、癌細胞の数は、第二の蛍光色素の蛍光が検出された細胞の数であり、PD-L1陽性癌細胞の数は、第一及び第二の蛍光色素の蛍光の組み合わせが検出された細胞の数である、工程と、を備え、工程(b1)及び工程(b2)を任意の順で行い、癌細胞の数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合が、30%以上の基準値以上である場合に、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性が高いと予測する方法も提供する。

**【0008】**

工程(a)は、血液試料をフィルターでろ過してフィルター上に細胞を捕捉する工程であってよい。

**【0009】**

工程(a)の後かつ工程(c)の前の任意の段階で、(x1)細胞に、白血球のマーカータンパク質を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第三の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、白血球を認識する抗体であって第三の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、(x2)細胞の核を第四の蛍光色素で標識する工程と、を任意の順でさらに行ってもよく、工程(c)において、細胞に、第一、第二、第三及び第四の蛍光色素の励起光をそれぞれ照射して、細胞から発せられる第一、第二、第三、及び第四の蛍光色素の蛍光をそれぞれ検出してもよく、工程(d)において、癌細胞の数は、第三の蛍光色素の蛍光が観察されず、かつ、第二及び第四の蛍光色素の蛍光の組み合わせが検出された細胞の数であってよく、PD-L1陽性癌細胞の数は、第三の蛍光色素の蛍光が観察されず、かつ、第一、第二及び第四の蛍光色素の蛍光の組み合わせが検出された細胞の数であってよい。

**【0010】**

工程 ( x 1 )、工程 ( b 1 ) 及び工程 ( b 2 ) をこの順で行ってもよく、工程 ( x 2 ) を工程 ( b 2 ) と同時に行ってもよい。免疫チェックポイント阻害剤は、抗 P D - 1 抗体又は抗 P D - L 1 抗体であってよい。白血球のマーカータンパク質は C D 4 5 であってよい。上皮細胞のマーカータンパク質はサイトケラチンであってよい。第一、第二、及び第三の蛍光色素は、フルオレセイン、A l e x a F l u o r ( 登録商標 ) 5 9 4、及び A l e x a F l u o r ( 登録商標 ) 6 4 7 からなる群より選ばれてもよく、第 4 の蛍光色素は 4 , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドールであってよい。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明の方法によれば、血液試料を使用することにより、被験者に大きな負担をかけることなく、簡単かつ短時間で、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】細胞捕捉カートリッジの一実施形態を示す斜視図である。

【図 2】図 1 における I I - I I 線断面図である。

【図 3】実施参考例 1 において蛍光標識された細胞の画像である。

【図 4】実施参考例 2 において蛍光標識された細胞の画像である。

【図 5】実施参考例 2 において蛍光標識された細胞の画像である。

【図 6】実施参考例 3 において蛍光標識された細胞の画像である。

【図 7】実施参考例 3 において蛍光標識された細胞の画像である。

【図 8】実施参考例 4 において蛍光標識された細胞の画像である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

本発明の、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法は、( a ) 被験者の血液試料から細胞を採取する工程と、( b 1 ) 細胞に、P D - L 1 を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、P D - L 1 を認識する抗体であって蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、( c ) 細胞に蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる蛍光を検出する工程と、を備える。癌患者の血液中には、血中循環癌細胞 ( C i r c u l a t i n g T u m o r C e l l、以下、「C T C」ともいう。) と呼ばれ、血管及びリンパ管を通じて体内を循環する癌細胞が存在する場合がある。C T C は、例えば、肺、肝臓、胃、頭頸、膀胱、尿路上皮、食道、胆道、乳腺、卵巣、子宮、肝臓、前立腺、又は脾臓における癌の細胞が血管及びリンパ管に侵入したものである。したがって、これらの器官における癌組織を採取せずとも、被験者の血液試料を使用することで、P D - L 1 陽性癌細胞 ( P D - L 1 陽性の C T C ) を検出することができる。本明細書において、「C T C」と「血液試料中の癌細胞」は同義として扱う。

【 0 0 1 4 】

被験者は、癌患者又は癌を患っている可能性のある対象であってよい。

【 0 0 1 5 】

免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントを阻害する薬剤であれば特に制限されず、P D - L 1 及び P D - 1 等、免疫チェックポイントに関与するタンパク質の発現又は活性を阻害する薬剤であってよい。免疫チェックポイント阻害剤は、例えば、低分子化合物、抗体、核酸、又はこれらの組み合わせである。免疫チェックポイント阻害剤の具体例は、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、及び抗 C T L A - 4 抗体である。抗 P D - 1 抗体の具体例は、ニボルマム及びベムプロリズマブである。抗 P D - L 1 抗体の具体例は、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びアベルマブである。抗 C T L A - 4 抗体の具体例は、トレメリムマブ及びイピリムマブである。

【 0 0 1 6 】

血液試料としては、被験者から採取した血液をそのまま使用してもよいし、リン酸緩衝

10

20

30

40

50

生理食塩水（PBS）等の緩衝液又はその他適当な媒体で希釈された血液を使用してもよい。血液試料には、抗凝固剤及び固定剤等、通常血液試料に添加される添加剤が添加されていてもよい。

【0017】

工程（a）において、細胞は、例えば、血液試料をフィルターでろ過して、フィルター上に血液試料中の細胞を捕捉することで、血液試料から採取することができる。血液に含まれる細胞のうち、白血球はCTCと同程度の直径を有するため、フィルター上にはCTCとともに一部の白血球が捕捉される。フィルターにより血液試料中の細胞を採取する場合、PD-L1陽性癌細胞の検出は、そのままフィルター上で行うことができる。すなわち、本発明における全ての工程は、フィルター上に捕捉された細胞に対して行うことができる。「捕捉」とは、細胞を含有する液体をフィルターでろ過して、細胞をフィルター上に残留させることを意味する。

10

【0018】

フィルターは、血液試料中に存在するCTCを捕捉できるフィルターであれば特に限定されず、従来公知のフィルターを使用できる。フィルターは、例えば、金属又は樹脂製のフィルターであってよく、基板と、基板上に設けられた、好ましくは $5\mu\text{m} \sim 15\mu\text{m}$ 、より好ましくは $6\mu\text{m} \sim 12\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $7\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ の孔径の貫通孔と、を有してもよい。貫通孔の孔径は、貫通孔を通過できる球の直径の最大値をいう。

【0019】

本明細書において、細胞に物質を「接触させる」ことは、例えば、細胞をその物質若しくはその物質の溶液に浸すことにより行うことができる。細胞の採取にフィルターを使用する場合、細胞に反応液又は洗浄液を接触させることは、これらの溶液をフィルターでろ過することにより行うことができる。ろ過の際、細胞へのダメージを最小限に抑える観点から、溶液の流速は、 $50\mu\text{L}/\text{分} \sim 3000\mu\text{L}/\text{分}$ が好ましく、 $100\mu\text{L}/\text{分} \sim 1000\mu\text{L}/\text{分}$ がより好ましく、 $200\mu\text{L}/\text{分} \sim 600\mu\text{L}/\text{分}$ がさらに好ましい。

20

【0020】

工程（a）の後、細胞を洗浄してもよい。洗浄工程は、例えば、PBS等の既知の緩衝液を含む洗浄液を、細胞に接触させることで行う。洗浄液には、牛血清アルブミン（BSA）又はエチレンジアミン四酢酸（EDTA）等の添加物が含まれていてもよい。洗浄は、工程（a）の後に限らず、各工程の後に適宜行うことができる。

30

【0021】

さらに、工程（a）の後、細胞を固定化してもよい。ホルムアルデヒド等の公知の固定剤を細胞に接触させることで、細胞を固定化できる。細胞を固定化することにより、細胞の腐敗又は凝集をより軽減することができる。

【0022】

固定化した細胞を、次いで透過処理してもよい。公知の透過処理剤を細胞に接触させることで、細胞を透過処理することができる。透過処理剤としては、例えば、ポリ（オキシエチレン）オクチルフェニルエーテルを使用することができる。

【0023】

工程（b1）では、細胞に、PD-L1を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって蛍光色素（第一の蛍光色素）で標識されている二次抗体を接触させる（二段階の蛍光標識）。あるいは、細胞に、PD-L1を認識する抗体であって蛍光色素（第一の蛍光色素）で標識されている抗体を接触させる（一段階の蛍光標識）。この工程によりPD-L1が蛍光標識される。PD-L1の蛍光標識は、上記のように、二段階又は一段階のいずれで行ってもよい。

40

【0024】

PD-L1を認識する一次抗体又はPD-L1を認識する抗体であって蛍光色素（第一の蛍光色素）で標識されている抗体は、例えば、28-8、SP142、E1L3N（登録商標）、EPR1161（2）、及び22C3からなる群より選ばれるクローンに由来してもよく、ポリクローナル抗体（例えば、Prosci社のカタログ番号：4059）

50

であってもよい。より高い感度でPD-L1陽性癌細胞を検出する観点から、PD-L1を認識する一次抗体又はPD-L1を認識する抗体は、28-8又はSP142に由来することが好ましい。また、28-8に由来する抗体又はSP142に由来する抗体を使用することで、抗体の非特異的な結合を低減することができ、したがって、偽陽性を減らすことができる。これらのクローンに由来する抗体は、いずれも抗PD-L1ウサギモノクローナル抗体である。

**【0025】**

蛍光色素（第一の蛍光色素）は、抗体の蛍光標識に通常使用される蛍光色素であれば特に限定されない。第一の蛍光色素は、例えば、Alexa Fluor（登録商標）647又はCy（登録商標）5である。

**【0026】**

最後に、工程（c）において、細胞に蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる蛍光を検出する。蛍光色素（第一の蛍光色素）の蛍光が検出される（陽性）ことは、細胞がPD-L1陽性癌細胞であることを示す。細胞がPD-L1陽性癌細胞である場合、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性が高いと予測する。その後、被験者に対する奏効性が高いと予測された免疫チェックポイント阻害剤を、その被験者に投与してもよい。すなわち、本発明の一側面は、癌患者を治療する方法であるともいえる。

**【0027】**

PD-L1の発現量は被験者によって異なる。癌組織におけるPD-L1の発現の程度が高いほど、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性は高い傾向にある。逆に、癌組織におけるPD-L1の発現の程度が低いほど、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性は低いか、奏効性が全くない可能性が高い傾向にある。免疫チェックポイント阻害剤の奏効性をより適格に予測する観点から、本発明の一形態に係る方法は、（a）被験者の血液試料から細胞を採取する工程と、（b1）細胞に、PD-L1を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第一の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、PD-L1を認識する抗体であって第一の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、（b2）細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第二の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる工程、又は、細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する抗体であって第二の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる工程と、（c）細胞に、第一及び第二の蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる第一及び第二の蛍光を検出する工程と、（d）検出された蛍光の組み合わせから、細胞における、CTC（癌細胞）の数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合を算出する工程と、を備えてもよい。

**【0028】**

工程（a）及び工程（b1）は既に説明したとおりである。洗浄工程並びに細胞の固定化及び透過処理も、上記実施形態において説明したとおり、適宜行うことができる。工程（b1）と工程（b2）は、任意の順で行うことができる。

**【0029】**

工程（b2）では、細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第二の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる（二段階の蛍光標識）。あるいは、細胞に、上皮細胞のマーカータンパク質を認識する抗体であって第二の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる（一段階の蛍光標識）。この工程により、CTCが蛍光標識される。CTCの蛍光標識は、上記のように二段階又は一段階のいずれで行ってもよい。

**【0030】**

上皮細胞のマーカータンパク質としては、例えば、サイトケラチン、上皮細胞接着分子（EPCAM）、CD146、及びCD176が挙げられ、サイトケラチンが好ましい。CTCは上皮細胞に由来するため、これら上皮細胞のマーカータンパク質を有する。

**【0031】**

10

20

30

40

50

第二の蛍光色素は、抗体の蛍光標識に通常使用される蛍光色素であって、第一の蛍光色素とは別の蛍光色素であれば特に限定されない。第二の蛍光色素は、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）等のフルオレセイン又はAlexa Fluor（登録商標）488である。

【0032】

上皮細胞のマーカータンパク質を認識する一次抗体、第二の蛍光色素で標識されている二次抗体、及び上皮細胞のマーカータンパク質を認識する抗体であって第二の蛍光色素で標識されている抗体は、特に限定されず、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であってよい。抗体が由来する動物は、一次抗体が由来する動物と二次抗体が由来する動物とが異なる動物である限り、特に限定されない。

【0033】

本実施形態において、工程（c）では、細胞に、第一及び第二の蛍光色素の励起光を照射して、細胞から発せられる第一及び第二の蛍光を検出する。PD-L1陽性癌細胞は第一及び第二の蛍光色素で標識されているため、第一及び第二の蛍光色素の蛍光が検出される細胞をPD-L1陽性癌細胞と同定することができる。CTCは第二の蛍光色素で標識されているため、第二の蛍光色素の蛍光が検出される細胞を、CTCと同定することができる。

【0034】

最後に、工程（d）において、検出された蛍光の組み合わせから、細胞における、CTCの数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合を算出する。割合は百分率であってもよい。PD-L1陽性癌細胞の数は、第一及び第二の蛍光色素の蛍光が検出された細胞の数である。CTCの数は、第二の蛍光色素の蛍光が検出された細胞の数である。

【0035】

CTCの数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合が基準値以上である場合に、被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性が高いと予測する。免疫チェックポイント阻害剤の奏効性をより適格に予測する観点から、基準値は30%以上であってよく、40%以上であることが好ましく、50%以上であることがより好ましい。その後、被験者に対する奏効性が高いと予測された免疫チェックポイント阻害剤を、その被験者に投与してもよい。

【0036】

血液試料中には、PD-L1陽性癌細胞の他に、PD-L1陰性癌細胞、白血球等のその他の細胞が多数存在する。このため、工程（b1）において、PD-L1を認識する抗体がPD-L1陰性の細胞に結合し、PD-L1陰性の細胞からPD-L1を示す蛍光が観察される場合がある（PD-L1偽陽性ともいう）。同様に、サイトケラチンを認識する抗体がサイトケラチン陰性の細胞に結合し、サイトケラチン陰性の細胞からサイトケラチンを示す蛍光が観察される場合もある（サイトケラチン偽陽性ともいう）。これら偽陽性の存在は、免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を適格に予測することを、妨げる傾向にある。偽陽性を減らし、免疫チェックポイント阻害剤の奏効性をより適格に予測する観点から、工程（a）の後かつ工程（c）の前の任意の段階で、以下の工程（x1）及び（x2）をさらに行うことが好ましい。

【0037】

工程（x1）では、細胞に、白血球のマーカータンパク質を認識する一次抗体を接触させ、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって第三の蛍光色素で標識されている二次抗体を接触させる（二段階の蛍光標識）。あるいは、細胞に、白血球を認識する抗体であって第三の蛍光色素で標識されている抗体を接触させる（一段階の蛍光標識）。この工程により、白血球が蛍光標識される。白血球の蛍光標識は、上記のように二段階又は一段階のいずれで行ってもよい。

【0038】

白血球のマーカータンパク質は、例えば、全造血幹細胞に発現するCD45である。

【0039】

10

20

30

40

50

白血球のマーカータンパク質を認識する一次抗体、第三の蛍光色素で標識されている二次抗体、及び白血球のマーカータンパク質を認識する抗体であって第三の蛍光色素で標識されている抗体は、特に限定されず、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であってよい。抗体が由来する動物は、一次抗体が由来する動物と二次抗体が由来する動物とが異なる動物である限り、特に限定されない。

#### 【0040】

第三の蛍光色素は、抗体の蛍光標識に通常使用される蛍光色素であれば特に限定されない。第三の蛍光色素は、例えば、Alexa Fluor（登録商標）594又はTexas Red（登録商標）である。第三の蛍光色素は、第一、第二及び第四の蛍光色素とは別の蛍光色素である。各蛍光色素は異なる蛍光波長を有するため、識別可能である。好ましくは、第一、第二、及び第三の蛍光色素は、フルオレセイン、Alexa Fluor 594、及びAlexa Fluor 647からなる群より選ばれ、第四の蛍光色素は4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）である。

10

#### 【0041】

工程(x2)では、細胞の核を第四の蛍光色素で標識する。核を標識する第四の蛍光色素は、核酸に結合することができる蛍光色素であれば特に限定されず、核を蛍光標識するのに通常用いられる蛍光色素を使用することができる。第四の蛍光色素としては、例えば、DAPI及び2-(4-エトキシフェニル)-5-(4-メチル-1-ピペラジニル)-2,5-ビ-1H-ベンゾイミダゾール三塩酸塩（Hoechst 33342）が挙げられる。

20

#### 【0042】

工程(x1)、工程(x2)、工程(b1)、及び工程(b2)の順番は特に限定されず、例えば、工程(x1)、工程(b1)及び工程(b2)をこの順で行い、工程(x2)を工程(b2)と同時に進めてもよい。工程(x1)と工程(b1)との間に、細胞の固定化及び透過処理を行ってもよい。

#### 【0043】

任意である工程(x1)及び(x2)を行う場合、工程(c)では、細胞に、第一、第二、第三及び第四の蛍光色素の励起光をそれぞれ照射して、細胞から発せられる第一、第二、第三及び第四の蛍光色素の蛍光をそれぞれ検出する。PD-L1陽性癌細胞は、第一、第二、及び第四の蛍光色素で標識されているが、第三の蛍光色素では標識されていない。したがって、第三の蛍光色素の蛍光が検出されず（陰性）、第一、第二、及び第四の蛍光色素の蛍光が検出される（陽性）細胞を、PD-L1陽性癌細胞と同定することができる。工程(d)におけるPD-L1陽性癌細胞の数は、このような細胞の数である。CTCは、第二及び第四の蛍光色素で標識されているが、第三の蛍光色素では標識されていない。したがって、第三の蛍光色素の蛍光が検出されず（陰性）、第二、及び第四の蛍光色素の蛍光が検出される（陽性）細胞を、CTCと同定することができる。工程(d)におけるCTCの数は、このような細胞の数である。

30

#### 【0044】

上記のいずれかの方法により血液試料中のPD-L1陽性癌細胞を検出するときは、例えば、図1及び図2に示すカートリッジを用いることができる。以下、本発明の一実施形態であって、カートリッジを使用して被験者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効性を予測する方法について述べる。別段の記載がない限り、各工程についての詳細及び工程の順番は、上記実施形態で述べたとおりである。

40

#### 【0045】

図1及び図2に示すCTC捕捉カートリッジ（カートリッジ）100は、液体が流入する流入管125が接続された流入口130と、液体が流出する流出管135が接続された流出口140とを有する筐体120と、フィルター105とを備える。フィルター105は、上部部材110及び下部部材115から構成される筐体120により固定されている。血液試料、洗浄液及びその他の反応液は、流入管125を通過して筐体120の内部に導入され、フィルター105を通過して、流出管135から外部に排出される。このような液

50

体の流れは、例えば、流入管 1 2 5 の上流又は流出管 1 3 5 の下流にポンプを接続することにより作り出すことができる。また、流入管 1 2 5 の上流及び / 又は流出管 1 3 5 の下流にコックを設け、液体の流れを制御してもよい。

【 0 0 4 6 】

はじめに、血液試料を流入管 1 2 5 からカートリッジ 1 0 0 内に導入して、血液試料をフィルター 1 0 5 でろ過する（工程（ a ））。血液試料中の C T C 及び一部の白血球は、フィルター 1 0 5 の貫通孔 1 0 6 を通過できず、フィルター 1 0 5 の表面に残留する。血液試料中のその他の成分は、貫通孔 1 0 6 を通過し、カートリッジ 1 0 0 の外へと排出される。次いで、洗浄液をフィルター 1 0 5 に通液してフィルター 1 0 5 を洗浄してもよい。フィルター 1 0 5 の洗浄は、以下の各工程の後にも、適宜行うことができる。

10

【 0 0 4 7 】

さらに、フィルター 1 0 5 上に細胞が捕捉された後、固定剤、次いで透過処理剤を含む反応液を、それぞれカートリッジ 1 0 0 内に任意で導入して、カートリッジ 1 0 0 内に所定時間保持することで、細胞と固定剤及び透過処理剤とをそれぞれ反応させてもよい。

【 0 0 4 8 】

同様に、細胞に、 P D - L 1 を認識する一次抗体を含む反応液、次いで一次抗体を認識する二次抗体であって蛍光色素（第一の蛍光色素）で標識されている二次抗体を含む反応液を、それぞれフィルター 1 0 5 上に捕捉された細胞と反応させる。あるいは、細胞に、 P D - L 1 を認識する抗体であって蛍光色素（第一の蛍光色素）で標識されている抗体を含む反応液を、フィルター 1 0 5 上に捕捉された細胞と反応させる（工程（ b 1 ））。

20

【 0 0 4 9 】

最後に、蛍光顕微鏡を使用してカートリッジ 1 0 0 に蛍光色素の励起光を照射して、フィルター 1 0 5 上に捕捉された細胞から発せられる蛍光を検出する（工程（ c ））。蛍光の検出は、例えば、カートリッジ 1 0 0 の垂直方向上面からカートリッジ 1 0 0 を観察し、蛍光観察像を処理することにより行う。

【 0 0 5 0 】

カートリッジは、工程（ b 2 ）及び工程（ d ）をさらに備える実施形態においても使用可能である。また、任意の工程（ x 1 ）及び（ x 2 ）をさらに行うこともできる。

【実施例】

30

【 0 0 5 1 】

（実施参考例 1 ）

培養フラスコに入った非小細胞肺癌細胞株を、二酸化炭素インキュベーター内で、 3 7 で培養した。培養フラスコに、濃度 0 . 2 5 % のトリプシン - E D T A を添加し、フラスコに張り付いた培養細胞をフラスコから剥離した。剥離させた細胞を血球計算盤及び位相差顕微鏡を用いて計数した。採血管に採血した健常人の血液に、 1 0 0 個の細胞を添加することで、肺癌患者の血液を摸した血液試料を調製した。細胞株としては、それぞれ P D - L 1 の発現程度の異なる、 N C I - H 8 2 0 （ P D - L 1 高発現）、 N C I - H 4 4 1 （ P D - L 1 中発現）、 A 5 4 9 （ P D - L 1 低発現）、及び N C I - H 2 3 （ P D - L 1 陰性）の 4 種類を用いて、 4 種類の血液試料を準備した。採血管としては、ベクトン・ディッキンソンアンドカンパニー社製の E D T A - 2 K （エチレンジアミン四酢酸二カリウム塩）入り採血管を使用した。

40

【 0 0 5 2 】

採血から 1 時間以内に、 C T C 捕捉装置を用いて上記 4 種類の血液試料中の P D - L 1 陽性癌細胞を以下のように検出した。 C T C 捕捉装置は、血液試料及びその他の反応液を導入するリザーバーと、 C T C 捕捉カートリッジとを備える。 C T C 捕捉カートリッジ（以下、カートリッジともいう）は、長径 1 0 0  $\mu$  m、短径 8  $\mu$  m の貫通孔を多数有する薄膜の金属フィルター（膜面積 6 m m  $\times$  6 m m、膜厚 1 8  $\mu$  m）を内部に備え、上記実施形態で説明したカートリッジ 1 0 0 に相当する。

【 0 0 5 3 】

50

まず、カートリッジを、0.5% BSA及び2mM EDTAを含有したPBS溶液（以下、「洗浄液」という。）で満たした。リザーバーに、洗浄液を7mL入れ、洗浄液の下に、上記血液試料を3mL、血液試料と洗浄液が層をなすように加えた。CTC捕捉装置を作動させ、流速200 $\mu$ L/分でリザーバー中の血液試料及び洗浄液をカートリッジに導入し、血液試料中の細胞をフィルター上に捕捉した。カートリッジに洗浄液を導入し、フィルターに残留した血液成分を洗い流した。

【0054】

1.25mLの抗ヒトCD45マウスモノクローナル抗体（クローン：2D1）を含む反応液を流速200 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、室温にて30分反応させた。1.40mLの洗浄液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、カートリッジ内の上記反応液を排出した。1.25mLのAlexa Fluor 594標識抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体を含む反応液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、室温にて30分反応させた。1.40mLの洗浄液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、カートリッジ内の上記反応液を排出した。

10

【0055】

ホルムアルデヒドを0.5質量%～4質量%含有するPBS溶液1.25mLを、流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、室温にて10分反応させることにより、細胞を固定化した。1.40mLの洗浄液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、カートリッジ内の上記反応液を排出した。

【0056】

Triton X-100（シグマアルドリッチ社製）を0.05質量%～0.1質量%含有するPBS溶液1.25mLを、流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、室温にて10分反応させることにより、細胞を透過処理した。1.40mLの洗浄液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、カートリッジ内の上記反応液を排出した。

20

【0057】

1.25mLの抗ヒトPD-L1ウサギモノクローナル抗体（クローン：28-8）を含む反応液を流速200 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、室温にて60分反応させた。1.40mLの洗浄液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、カートリッジ内の上記反応液を排出した。1.25mLのAlexa Fluor 647標識抗ウサギIgGヤギポリクローナル抗体を含む反応液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、室温にて30分反応させた。1.40mLの洗浄液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、カートリッジ内の上記反応液を排出した。

30

【0058】

FITC標識抗ヒトサイトケラチンマウスモノクローナル抗体（クローン：CK3、6H5、AE1、及びAE3の混合物）、及びDAPIを含む反応液1.25mLを、400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、室温にて30分反応させた。3.00mLの洗浄液を流速400 $\mu$ L/分でカートリッジに導入し、カートリッジ内の上記反応液を排出した。次いで、カートリッジをCTC捕捉装置から外した。

【0059】

カートリッジを蛍光顕微鏡に設置した。蛍光ミラーユニットを使用して、細胞上の蛍光色素（FITC、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、及びDAPI）をそれぞれ励起させた。それぞれの蛍光色素から発せられた蛍光を撮影し、得られた画像を合成した。

40

【0060】

結果を図3に示す。図中、H820はNCI-H820、H441はNCI-H441、H23はNCI-H23を、それぞれ意味する（以下、同じ）。PD-L1陽性の癌細胞株であるNCI-H820及びNCI-H441を用いた実験においては、細胞核（DAPI）、サイトケラチン（FITC）、及びPD-L1（Alexa Fluor 647）が陽性であり、かつ、CD45（Alexa Fluor 594）が陰性である細胞の蛍光画像が得られた。PD-L1陰性の癌細胞株であるNCI-H23を用いた実

50

験においては、細胞核及びサイトケラチンが陽性であり、かつ、CD45及びPD-L1が陰性である細胞の蛍光画像が得られた。一方、いずれの実験においても、細胞核及びCD45が陽性であり、かつ、サイトケラチン及びPD-L1が陰性である、白血球の蛍光画像も得られた(図には示していない)。抗体の非特異的な結合によるPD-L1偽陽性はみられなかった。なお、「陽性」とは蛍光が検出されたことを意味し、「陰性」とは蛍光が検出されなかったことを意味する。

**【0061】**

(実施参考例2)

細胞株としてNCI-H820を用いた。抗ヒトPD-L1ウサギモノクローナル抗体のクローンをSP142に変更した以外は実施参考例1と同様の方法により、細胞の蛍光を観察した。

10

**【0062】**

結果を図4及び図5に示す。これらの図に示すように、細胞核、サイトケラチン、及びPD-L1が陽性であり、かつ、CD45が陰性である細胞の蛍光画像が得られた。また、図5の右下には、細胞核及びCD45が陽性であり、かつ、サイトケラチン及びPD-L1が陰性である、白血球がみられる。抗体の非特異的な結合によるPD-L1偽陽性はみられなかった。

**【0063】**

(実施参考例3)

細胞株としてNCI-H820を用いた。抗ヒトPD-L1ウサギモノクローナル抗体を、E1L3N(登録商標)由来の抗体、EPR1161(2)由来の抗体、及びポリクローナル抗体(Proscia社製、カタログ番号:4059)に変更した以外は実施参考例1と同様の方法により、細胞の蛍光を観察した。結果を図6及び図7に示す。

20

**【0064】**

図6及び図7に示すように、いずれの抗体を用いた実験においても、細胞核、サイトケラチン、及びPD-L1が陽性であり、かつ、CD45が陰性である細胞の蛍光画像が得られた。PD-L1の蛍光強度は、E1L3N由来の抗体を用いた実験において高く、ポリクローナル抗体を用いた実験において低かった。EPR1161(2)由来の抗体を用いた実験においては、PD-L1の蛍光は僅かに確認できる程度であった。

**【0065】**

図7に示すように、いずれの抗体を用いた実験においても、細胞核及びCD45が陽性であり、かつ、サイトケラチン及びPD-L1が陰性である、白血球がみられる。一方、図7は、いずれの抗体を用いた実験においても、抗体の非特異的な結合が観察されたことを示す。

30

**【0066】**

(実施参考例4)

PD-L1に対する二次抗体(抗ウサギIgGヤギポリクローナル抗体)の標識色素をAlexa Fluor 680及びAlexa Fluor(登録商標) 700に変更した以外は実施参考例1と同様の方法により、細胞の蛍光を観察した。

**【0067】**

結果を図8に示す。Alexa Fluor 680及びAlexa Fluor 700を用いた場合、PD-L1の蛍光強度が低かった。

40

**【0068】**

(実施例1)

<PD-L1陽性癌細胞の検出>

非小細胞肺癌と診断された癌患者30名から採血した。癌患者の詳細を表1に示す。採血管としては、ベクトン・ディッキンソンアンドカンパニー社製のEDTA-2K(エチレンジアミン四酢酸二カリウム塩)入り採血管を使用した。

**【0069】**

50

【表 1】

総患者数	30	
年齢の中央値, (年齢幅)	70 才 (49-86 才)	
性別 n, (%)	男	22 (73)
	女	8 (27)
喫煙歴 n, (%)	Pack-year $\geq$ 30	17 (57)
	Pack-year < 30	3 (10)
	Never-smoker	10 (33)
組織型 n, (%)	腺癌	20 (67)
	-EGFR 変異	4 (13)
	-ALK 転座	1 (3)
	扁平上皮癌	8 (27)
	その他	2 (7)
過去の治療回数 n, (%)	0	1 (3)
	1	12 (40)
	$\geq$ 2	17 (57)
パフォーマンスステータス(PS) n, (%)	0	6(21)
	1	19 (66)
	$\geq$ 2	5 (14)
ステージ n, (%)	II	1 (3)
	III	8 (27)
	IV	21(70)

表中、「EGFR 変異」は上皮成長因子受容体遺伝子の変異を、「ALK 転座」は未分化リンパ腫キナーゼ遺伝子の転座を、それぞれ意味する。

## 【0070】

採血から1時間以内に、血液試料中のPD-L1陽性癌細胞を検出した。検出は、上記血液試料を用いたこと以外は、実施参考例1と同様の方法により行った。

## 【0071】

検出された蛍光の合成画像から、細胞核(DAPI)及びサイトケラチン(FITC)が陽性であり、かつ、CD45(Alexa Fluor 594)が陰性である細胞の数(すなわち、CTCの数)を求めた。同様に、蛍光の合成画像から、細胞核、サイトケラチン、及びPD-L1が陽性であり、かつ、CD45が陰性である細胞の数(すなわち、PD-L1陽性癌細胞の数)を求めた。これらの値から、CTCの数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合(%)を算出した。

## 【0072】

<ニボルマムの奏効性の評価>

30名の患者のうち、CTCの数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合を算出することができた患者28名に、ニボルマム3mg/kgを2週間間隔で投与した。投与は、臨床的に無効又は副作用により投与不可と判断されるまで続け、投与期間は約6週間から8週間にわたった。投与から約42日経過後、患者の腫瘍(標的病変)の大きさをコンピュータ断層撮影(CT)の横断面像から計測し、投与前の腫瘍の大きさと比べることによ

リニボルマムの奏効性を評価した。具体的には、奏効性は、「固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン（RECISTガイドライン）改訂版 version 1.1」に従って評価した。以下が、ガイドラインに示される、腫瘍縮小効果の判定に使用する規準である。

CR（完全奏効、Complete Response）：すべての標的病変の消失。標的病変として選択したすべてのリンパ節病変は、短径で10mm未満に縮小しなくてはならない。

PR（部分奏効、Partial Response）：ベースライン径和に比して、標的病変の径和が30%以上減少。

PD（進行、Progressive Disease）：経過中の最小の径和（ベースライン径和が経過中の最小値である場合、これを最小の径和とする）に比して、標的病変の径和が20%以上増加、かつ、径和が絶対値でも5mm以上増加。

SD（安定、Stable Disease）：経過中の最小の径和に比して、PRに相当する縮小がなくPDに相当する増大がない。

【0073】

結果を表2～表4に示す。表2、表3、表4は、それぞれCTCの数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合（%）が、50%以上、40%以上、30%以上であった患者群におけるニボルマムの奏効性をまとめたものである。これらの結果は、CTCの数に対するPD-L1陽性癌細胞の数の割合（%）が30%以上であった患者の多くに対して、ニボルマムの投与が有効であったことを示す。これは、免疫チェックポイント阻害剤が、PD-L1陽性癌細胞の割合が30%以上である被験者に対して高い奏効性を示すと予測することの妥当性を示している。

【0074】

【表2】

≥50%	例数	割合(%)	
PR	3	33.3	88.9
SD	5	55.6	
PD	1	11.1	
総例数	9		

【表3】

≥40%	例数	割合(%)	
PR	3	27.3	81.8
SD	6	54.5	
PD	2	18.2	
総例数	11		

【表4】

≥30%	例数	割合(%)	
PR	5	31.3	68.8
SD	6	37.5	
PD	5	31.3	
総例数	16		

【符号の説明】

【0075】

100 CTC捕捉カートリッジ、105 フィルター、106 貫通孔、110 上

10

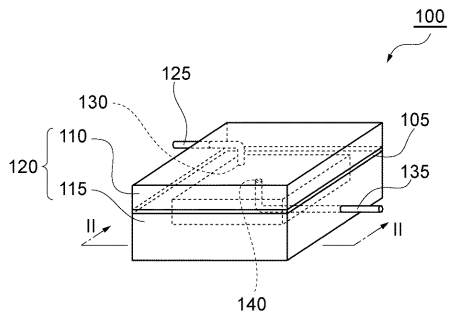
20

40

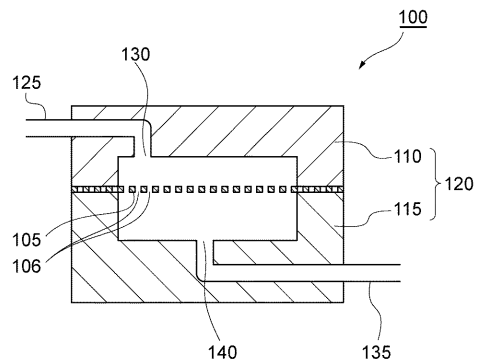
50

部部材、 1 1 5 下部部材、 1 2 0 筐体、 1 2 5 流入管、 1 3 0 流入口、 1 3 5  
流出管、 1 4 0 流出口。

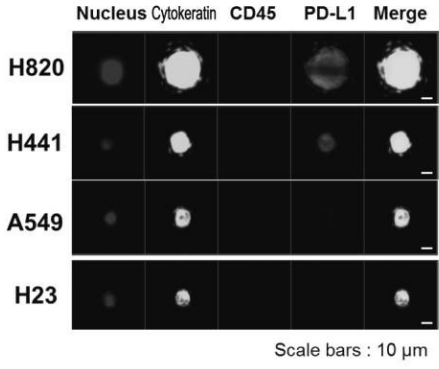
【 図 1 】



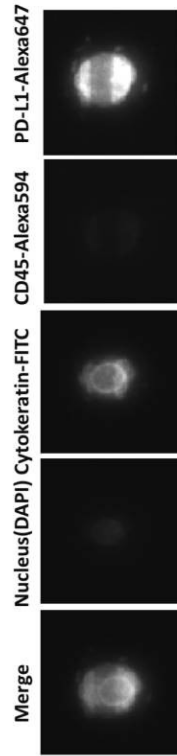
【 図 2 】



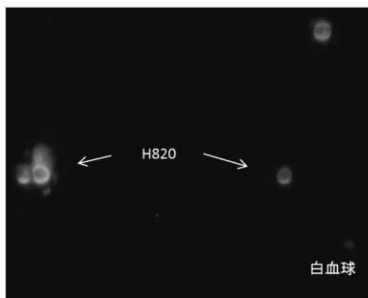
【 図 3 】



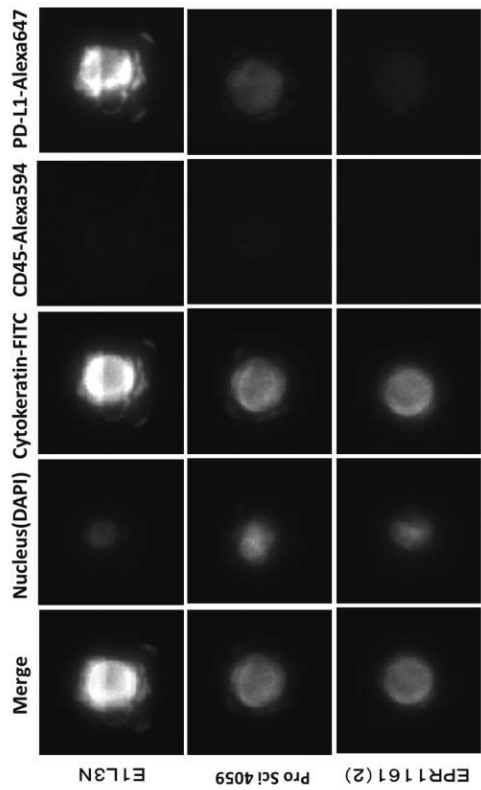
【 図 4 】



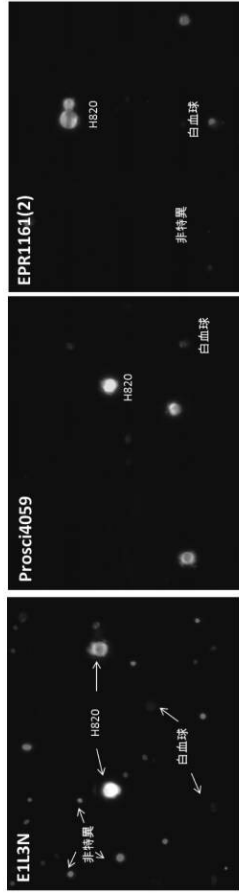
【 図 5 】



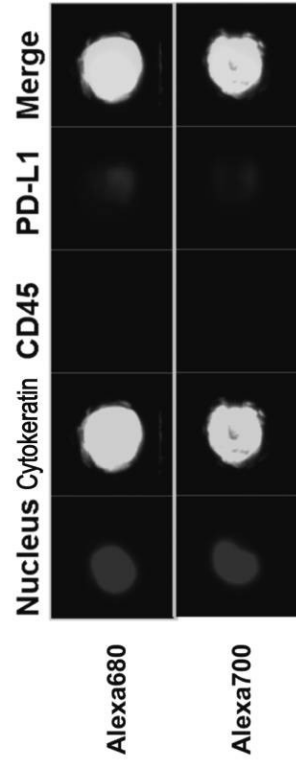
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/015264
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. G01N33/53, G01N33/48, G01N33/543, G01N33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan		1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan		1971-2018
Registered utility model specifications of Japan		1996-2018
Published registered utility model applications of Japan		1994-2018
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPus/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	洪泰浩, 進行肺癌における循環腫瘍細胞での PD-L1 発現の測定, 日本臨床腫瘍学会学術集会プログラム・抄録集, 2016, vol. 14th, page. ROMEUNNO. P2-145, Background, Methods, Conclusion, non-official translation (KO, Yasuhiro, "Measurement of PD-L1 expression in circulating-tumour cell with respect to ongoing lung cancer", Abstracts of academic conference program of Japanese Society of Medical Oncology)	1-2, 4-9 3
Y	JP 2011-163830 A (TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY) 25 August 2011, paragraphs [0032], [0035], [0036], [0040] (Family: none)	3
Y	WO 2016/035772 A1 (HITACHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) 10 March 2016, paragraphs [0179]-[0185] (Family: none)	3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 June 2018 (18.06.2018)		Date of mailing of the international search report 03 July 2018 (03.07.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/015264

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/174539 A1 (JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION) 19 November 2015, [2] Reagent for detecting epithelium-derived cell (Family: none)	1-9
A	洪泰浩, CTC と PD-L1 発現, がん分子標的治療, 08 July 2016, vol. 14, no. 2, pp. 228-232, 168, 231, (KO, Yasuhiro, "Circulating tumor cells and their PD-L1 expression", Journal of molecular targeted therapy for cancer)	1-9
P, A	寺岡俊輔, ニボルマブ治療を受けた非小細胞肺癌患者における PD-L1 陽性血中循環腫瘍細胞の経時的解析, 肺癌, 05 September 2017, vol. 57, no. 5, p. 607, P57-5 (Proceedings of the Japanese Lung Cancer Society), non-official translation (TERAOKA, Shunsuke, "Diachronic analysis on PD-L1 positive circulating-tumor cells in blood with respect to non-small cell lung cancer patient who received nivolumab therapy")	1-9
A	TANAKA, Ayaka, "Evaluation of a novel automated device for size-based enrichment and isolation of CTCs in patients with advanced lung cancer", 日本呼吸器学会誌, 2016, vol. 5 extra issue, p. 373 EPD-15-2, (Annals of the Japanese Respiratory Society)	1-9
A	KIM, Woong, "Differential expression of PD-L1 on circulating tumor cells among patients with advanced lung cancer, Cancer Research", July 2016, vol. 76, no. suppl. 14, p. 2257	1-9
P, A	PANIEL, Klaus, "Circulating tumor cells: Detection, Biology and Clinical Implications", 日本がん転移学会学術集会・総会プログラム抄録集, 2017, vol. 26th, p. 62, non-official translation (Program abstracts of meeting of the Japanese Association for Metastasis Research)	1-9
A	上林聡之, 肺がんにおける循環腫瘍細胞での PD- L1 発現の検討, 肺癌, 05 November 2016, vol. 56, no. 6, p. 802, P-3-146, (Proceedings of the Japanese Lung Cancer Society), non-official translation (KANBAYASHI, Satoshi, "Review on PD-L1 expression in circulating-tumour cell with respect to lung cancer")	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/015264

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	洪泰浩, ニボルマブ治療を受けた非小細胞肺癌患者における PD-L1 陽性血中循環腫瘍細胞の経時的解析, 和歌山医学, 31 March 2018, vol. 69, no. 1, pp. 74-75, 10, conclusion, (The journal of the Wakayama Medical Society), non-official translation (KO, Yasuhiro, "Diachronic analysis on PD-L1 positive circulating-tumor cells in blood with respect to non-small cell lung cancer patient who received nivolumab therapy")	1-9
A	JP 2016-86736 A (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 23 May 2016, paragraphs [0068], [0069] (Family: none)	1-9
P, A	WO 2018/029858 A1 (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 15 February 2018 & WO 2018/030546 A1 & WO 2018/030547 A1 & WO 2018/030548 A1	1-9
E, A	KR 2018-0048215 A (CYTOGEN CO., LTD.) 10 May 2018 (Family: none)	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 5 2 6 4	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. G01N33/53, G01N33/48, G01N33/543, G01N33/574			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018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), CPlus/MEDLINE/BIOSIS (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	
X Y	洪泰浩, 進行肺癌における循環腫瘍細胞でのPD-L1発現の測定, 日本臨床腫瘍学会学術集会プログラム・抄録集, 2016, Vol.14th, Page.ROMBUNNO.P2-145, Background, Methods, Conclusion	1-2,4-9 3	
Y	JP 2011-163830 A (国立大学法人東京農工大学) 2011.08.25, [0032][0035][0036][0040] (ファミリーなし)	3	
Y	WO 2016/035772 A1 (日立化成株式会社) 2016.03.10, [0179] - [0185] (ファミリーなし)	3	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>			
* 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「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	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 18.06.2018		国際調査報告の発送日 03.07.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 隆 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 5 2 6 4
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	WO 2015/174539 A1 (学校法人順天堂) 2015. 11. 19, [ 2 ] 上皮由来細胞の検出用試薬 (ファミリーなし)	1-9
A	洪泰浩, CTCとPD-L1発現, がん分子標的治療, 2016. 07. 08, Vol. 14 No. 2, Page. 228-232, 168, 231 ページ	1-9
PA	寺岡俊輔, ニボルマブ治療を受けた非小細胞肺癌患者におけるPD-L1陽性血中循環腫瘍細胞の経時的解析, 肺癌, 2017. 09. 05, Vol. 57 No. 5, Page. 607 P57-5	1-9
A	TANAKA Ayaka, Evaluation of a novel automated device for size-based enrichment and isolation of CTCs in patients with advanced lung cancer, 日本呼吸器学会誌, 2016, Vol. 5 増刊号, Page. 373 EPD-15-2	1-9
A	KIM Woong, Differential expression of PD-L1 on circulating tumor cells among patients with advanced lung cancer, Cancer Research, 2016. 07, Vol. 76, No. Suppl. 14, Page. 2257	1-9
PA	PANTEL Klaus, Circulating tumor cells: Detection, Biology and Clinical Implications, 日本がん転移学会学術集会・総会プログラム抄録集, 2017, Vol. 26th, Page. 62	1-9
A	上林聡之, 肺がんにおける循環腫瘍細胞でのPD-L1発現の検討, 肺癌, 2016. 11. 05, Vol. 56 No. 6, Page. 802 P-3-146	1-9
PA	洪泰浩, ニボルマブ治療を受けた非小細胞肺癌患者におけるPD-L1陽性血中循環腫瘍細胞の経時的解析, 和歌山医学, 2018. 03. 31, Vol. 69 No. 1, Page. 74-75 10, 結語	1-9
A	JP 2016-86736 A (日立化成株式会社) 2016. 05. 23, [ 0 0 6 8 ] [ 0 0 6 9 ] (ファミリーなし)	1-9
PA	WO 2018/029858 A1 (日立化成株式会社) 2018. 02. 15, & WO 2018/030546 A1 & WO 2018/030547 A1 & WO 2018/030548 A1	1-9
EA	KR 2018-0048215 A (CYTOGEN CO., LTD.) 2018. 05. 10, (ファミリーなし)	1-9

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構「次世代がん医療創生研究事業(2次公募)」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

- (72)発明者 八木 理美  
東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内
- (72)発明者 遠藤 勝也  
東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内
- (72)発明者 樋口 雅之  
東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内
- (72)発明者 上原 寿茂  
東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内
- (72)発明者 洪 泰浩  
和歌山県和歌山市紀三井寺8 1 1 - 1 公立大学法人和歌山県立医科大学内
- (72)発明者 山本 信之  
和歌山県和歌山市紀三井寺8 1 1 - 1 公立大学法人和歌山県立医科大学内
- (72)発明者 赤松 弘朗  
和歌山県和歌山市紀三井寺8 1 1 - 1 公立大学法人和歌山県立医科大学内

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	预测免疫检查点抑制剂对受试者反应的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2018190379A1</a>	公开(公告)日	2020-02-20
申请号	JP2019512556	申请日	2018-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社 公立大学法人和歌山県立医科大学		
申请(专利权)人(译)	日立化成株式会社 公立大学法人和歌山県立医科大学		
[标]发明人	八木理美 遠藤勝也 樋口雅之 上原寿茂 洪泰浩 山本信之		
发明人	八木 理美 遠藤 勝也 樋口 雅之 上原 寿茂 洪 泰浩 山本 信之 赤松 弘朗		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/574.D		
代理人(译)	长谷川良树 清水义 平野博之		
优先权	2017079973 2017-04-13 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

根据本发明的预测免疫检查点抑制剂对受试者的反应的方法，(a)从受试者的血液样品中收集细胞的步骤，(b1)细胞，其识别PD-L1。接触，然后接触第二抗体，该第二抗体是识别第一抗体并被荧光染料标记的第二抗体，或者细胞是识别PD-L1并被荧光染料标记的抗体。其包括以下步骤：接触抗体，(c)用荧光染料的激发光照射细胞，并检测从细胞发出的荧光，其中所述细胞是PD-L1阳性癌细胞。预计免疫检查点抑制剂将在受试者中具有高功效。根据这种方法，可以在不给受试者带来沉重负担的情况下预测免疫检查点抑制剂的功效。

