

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5805518号
(P5805518)

(45) 発行日 平成27年11月4日(2015.11.4)

(24) 登録日 平成27年9月11日(2015.9.11)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/68 (2006.01) GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/48 (2006.01) GO 1 N 33/48 Z

請求項の数 2 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2011-280149 (P2011-280149)	(73) 特許権者	000001993 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(22) 出願日	平成23年12月21日(2011.12.21)	(73) 特許権者	504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(65) 公開番号	特開2013-130477 (P2013-130477A)	(74) 代理人	100100561 弁理士 岡田 正広
(43) 公開日	平成25年7月4日(2013.7.4)	(72) 発明者	渡辺 真 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
審査請求日	平成26年5月30日(2014.5.30)	(72) 発明者	松尾 英一 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチプレックス大腸がんマーカーパネル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌胎児性抗原、糖鎖抗原19-9、ガレクチン4、APEXヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質2の5種の大腸がんマーカーの組み合わせで構成されるマルチプレックス大腸がんマーカーパネル。

【請求項2】

個体由来の生体試料中の、癌胎児性抗原、糖鎖抗原19-9、ガレクチン4、APEXヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質2の5種の大腸がんマーカーの測定値をそれぞれ取得することと、

前記5種の大腸がんマーカーの測定値を正規化して前記5種の大腸がんマーカーの確率スコアをそれぞれ導出し、前記確率スコアの平均値を導出することと、

前記5種の大腸がんマーカーの基準値に基づき、前記確率スコアの平均値の高低に関する評価を行うこととを含む、大腸がんマーカーの分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、大腸がんの臨床での診断及び検診の技術に関し、具体的には、マルチプレックス大腸がんマーカーパネルに関する。より具体的には、本発明は、大腸がんの判別能力が高い大腸がんマーカーの組み合わせに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

代表的な大腸がんマーカーとして、癌胎児性抗原（CEA；Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5）や糖鎖抗原 19 - 9（CA19-9；Carbohydrate Antigen 19-9）が知られている。これらの大腸がんマーカーは、実際に臨床現場で利用されているものの、早期診断には適していないことが実証されている。

特開 2 0 0 8 - 1 4 9 3 7 号公報（特許文献 1）及びOncology Reports 2011, 25:1217-26（非特許文献 1）においては、大腸がん組織のプロテオーム解析によって、新たに大腸がん関連タンパク質が同定されている。さらに、非特許文献 1 においては、ガレクチン 1、ガレクチン 3 及びガレクチン 4 が大腸がんの血漿マーカーとして有効であることが示されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 3 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 8 - 1 4 9 3 7 号公報

【非特許文献】

【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】オンコロジー・レポート（Oncology Reports）、2 0 1 1 年、第 2 5 巻、p . 1 2 1 7 - 1 2 2 6

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【 0 0 0 5 】

これまで報告されている大腸がんマーカーは、シングルマーカーとして用いられた場合、がん患者検出率（具体的にはSensitivity）は十分なものではない。

一方、診断の信頼性を上げる目的で、マーカーが単純に組み合わせられて使用されることがある。確かに、マーカーを組み合わせることによって、がん患者検出率は向上するものの、特異度（Specificity: 健常者を健常者として正しく診断する割合）が低下する。従って、特異度の低下を最小限にとどめることが必要である。

【 0 0 0 6 】

そこで、本発明の目的は、特異度を高く保ちながら、より早期段階に、より多くの大腸がん患者を検出することができる、統計学的知見に基づいた大腸がんマーカーの特定の組み合わせを提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、特定の組み合わせにおいて、高い特異度を保ちつつ、高いがん患者検出率が認められることを見出した。このような知見は本発明において初めて見出されたものである。

本発明は、以下の発明を含む。

【 0 0 0 8 】

(1)

癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4、A P E Xヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質 2 の 5 種の大腸がんマーカーの組み合わせで構成されるマルチプレックス大腸がんマーカーパネル。

40

(2)

癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4、A P E Xヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質 2 の 5 種の大腸がんマーカーから任意に選択される 4 種の大腸がんマーカーの組み合わせで構成されるマルチプレックス大腸がんマーカーパネル。

(3)

癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9 及び A P E Xヌクレアーゼ；

癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9 及びアクチン関連タンパク質 2 ；

癌胎児性抗原、ガレクチン 4 及び A P E Xヌクレアーゼ；

50

糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4 及び A P E Xヌクレアーゼ；
 糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4 及びアクチン関連タンパク質 2；又は
 糖鎖抗原 19 - 9、A P E Xヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質 2
 の 3 種の大腸がんマーカーの組み合わせで構成されるマルチプレックス大腸がんマーカー
 パネル。

(4)

糖鎖抗原 19 - 9 及び A P E Xヌクレアーゼの 2 種の大腸がんマーカーの組み合わせで
 構成されるマルチプレックス大腸がんマーカーパネル。

(5)

個体由来の生体試料中の、癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4、A P E X
 ヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質 2 の 5 種の大腸がんマーカーの測定値をそれぞ
 れ取得することと、

10

前記 5 種の大腸がんマーカーの測定値を正規化して前記 5 種の大腸がんマーカーの確率
 スコアをそれぞれ導出し、前記確率スコアの平均値を導出することと、

前記 5 種の大腸がんマーカーの基準値に基づき、前記確率スコアの平均値の高低に関す
 る評価を行うこととを含む、大腸がんマーカーの分析方法。

(6)

個体由来の生体試料中の、癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4、A P E X
 ヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質 2 の 5 種の大腸がんマーカーから任意に選択さ
 れる 4 種の大腸がんマーカーの測定値をそれぞれ取得することと、

20

前記 4 種の大腸がんマーカーの測定値を正規化して前記 4 種の大腸がんマーカーの確率
 スコアをそれぞれ導出し、前記確率スコアの平均値を導出することと、

前記 4 種の大腸がんマーカーの基準値に基づき、前記確率スコアの平均値の高低に関す
 る評価を行うこととを含む、大腸がんマーカーの分析方法。

(7)

個体由来の生体試料中の、

癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9 及び A P E Xヌクレアーゼ；

癌胎児性抗原、糖鎖抗原 19 - 9 及びアクチン関連タンパク質 2；

癌胎児性抗原、ガレクチン 4 及び A P E Xヌクレアーゼ；

糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4 及び A P E Xヌクレアーゼ；

30

糖鎖抗原 19 - 9、ガレクチン 4 及びアクチン関連タンパク質 2；又は

糖鎖抗原 19 - 9、A P E Xヌクレアーゼ及びアクチン関連タンパク質 2

の 3 種の大腸がんマーカーの測定値をそれぞれ取得することと、

前記 3 種の大腸がんマーカーの測定値を正規化して前記 3 種の大腸がんマーカーの確率
 スコアをそれぞれ導出し、前記確率スコアの平均値を導出することと、

前記 3 種の大腸がんマーカーの基準値に基づき、前記確率スコアの平均値の高低に関す
 る評価を行うこととを含む、大腸がんマーカーの分析方法。

(8)

個体由来の生体試料中の、糖鎖抗原 19 - 9 及び A P E Xヌクレアーゼの 2 種の大腸が
 んマーカーの測定値をそれぞれ取得することと、

40

前記 2 種の大腸がんマーカーの測定値を正規化して前記 2 種の大腸がんマーカーの確率
 スコアをそれぞれ導出し、前記確率スコアの平均値を導出することと、

前記 2 種の大腸がんマーカースコアの基準値に基づき、前記確率スコアの平均値の高低
 に関する評価を行うこととを含む、大腸がんマーカーの分析方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明により、特異度を高く保ちながら、より早期段階に、より多くの大腸がん患者を
 検出することができる、統計学的知見に基づいた大腸がんマーカーの特定の組み合わせを
 提供することができる。より具体的には、被験者からの採血試料（血漿試料）中の特定の
 複数の大腸がんマーカーの発現定量を行うことにより、大腸がん患者を高感度に検出する

50

ことができる。がん患者を高感度に検出することによって、早期判断及び適切ながん治療法の選択が可能となり、結果として患者のQOL向上に資する。また、本発明の大腸がんマーカーパネルは、大腸がん診断試薬や大腸がん診断装置へ応用することも期待される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】(a) 健常者(Control)及び大腸がん患者(CRC)におけるGalectin4のマーカー値分布を示したヒストグラムである。健常者についてのヒストグラムは灰色で、大腸がん患者についてのヒストグラムは黒色で示す。横軸にマーカー値、縦軸に試料数を示す。(b) 前記(a)における極値分布の累積分布関数に基づき変換されたマーカー値の確率スコアの曲線を示す。横軸にマーカー値(raw value)、縦軸に確率スコア(probability score)を示す。

10

【図2】マーカーの組み合わせ数の評価を示す。横軸にマーカーの組み合わせ数(Numbers of markers)、縦軸にAUC(ROC曲線下面積)値を示す。

【図3】参考例3における100回解析におけるマーカーの組み合わせ数を5とした場合の、各マーカーの選択頻度を示す円グラフである。

【図4】参考例3における100回解析におけるマーカーの組み合わせ数を4とした場合の、各マーカーの選択頻度を示す円グラフである。

【図5】参考例3における100回解析におけるマーカーの組み合わせ数を3とした場合の、各マーカーの選択頻度を示す円グラフである。

【図6】参考例3における100回解析におけるマーカーの組み合わせ数を2とした場合の、各マーカーの選択頻度を示す円グラフである。

20

【図7】本発明のがんマーカーパネルを構成する5種類のマーカーをそれぞれ単独で用いた場合にがんと判断された試料と、全てを組み合わせで用いた場合にがんと判断された試料とを示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

[1. 大腸がんマーカーパネル]

本発明は、特定の複数の大腸がんマーカーから構成される大腸がんマーカーパネルである。本発明の大腸がんマーカーパネルを構成する大腸がんマーカーは2~5種類であり、いずれも、大腸がんにおいて発現亢進を示すものである。

30

【0012】

5種類の大腸がんマーカーから構成される大腸がんマーカーは、癌胎児性抗原(Carcin oembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5; 以下「CEA」と記載する)、糖鎖抗原19-9(以下「CA19-9」と記載する)、ガレクチン4(以下「Galectin4」と記載する)、APEXヌクレアーゼ(DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase; 以下「APEX1」と記載する)及びアクチン関連タンパク質2(Actin-related protein 2; 以下「ACTR2」と記載する)である。

【0013】

4種類の大腸がんマーカーから構成される大腸がんマーカーは、上記の5種類の中から任意に選ばれるものである。従って、具体的には、CEA、CA19-9、Galectin4及びAPEX1と; CEA、CA19-9、Galectin4及びACTR2と; CEA、CA19-9、APEX1及びACTR2と; CEA、Galectin4、APEX1及びACTR2と; CA19-9、Galectin4、APEX1及びACTR2とが挙げられる。

40

【0014】

3種類の大腸がんマーカーから構成される大腸がんマーカーは、上記の5種類の中から選ばれる特定の大腸がんマーカーである。具体的には、CEA、CA19-9及びGalectin4と; CEA、CA19-9及びAPEX1と; CEA、CA19-9及びACTR2と; CEA、Galectin4及びAPEX1と; CA19-9、Galectin4及びAPEX1と; CA19-9、Galectin4及びACTR2と; CA19-9、APEX1及びACTR2とが挙げられる。

【0015】

2種類の大腸がんマーカーから構成される大腸がんマーカーは、上記の5種類の中から

50

選ばれる特定の大腸がんマーカーである。具体的にはCA19-9及びGalectin4と；CA19-9及びAPEX1とが挙げられる。

【0016】

[2 . 大腸がんマーカーの分析方法]

[2 - 1 . 解析対象試料]

本発明の方法においては、解析対象は個体（ヒト個体）に由来する生体試料であればよい。好ましくは、解析対象となる生体試料は採血試料である。しかしながら、採血試料以外の体液試料や組織試料を除外するものではない。

【0017】

採血試料としては、全血、血漿、血清などが含まれる。個体から採取された全血を、適宜処理することによって調製することができる。採取された全血から採血試料の調製を行う場合に行われる処理としては特に限定されず、臨床学的に許容されるいかなる処理が行われてよい。例えば、抗凝血処理及び遠心分離などが行われうる。また、マーカー値測定に直接的に供される採血試料は、その調製工程の中途段階又は調製工程後に、適宜冷凍など低温下での保存が行われたものであってよい。なお、本発明において採血試料は、由来元の個体に戻すことなく破棄される。

10

【0018】

[2 - 2 . 測定すべき大腸がんマーカー]

本発明の方法は、上述の大腸がんマーカーパネルを構成する大腸がんマーカーの測定を行う工程を必須とする。

20

さらに、上述の大腸がんマーカーパネルを構成する大腸がんマーカーを測定する工程に加え、複数の大腸がんマーカーを測定する工程を行っても、高い検出率が期待できる。その一方で、組み合わせずマーカーの数を増やして高い検出率を達成したとしても、特異度が低ければ臨床的に意味がなくなる。故に、各マーカー数において、100回繰り返し解析(後述)において得られたAUC(Area under the curve)値の中央値を指標として最適なマーカー数を決定することができる。

【0019】

[2 - 3 . 大腸がんマーカー値の分析]

本発明によるがんマーカー値の分析は、大腸がんマーカーパネルを構成する各大腸がんマーカーの測定値を取得し、測定値を極値分布に基づいてシグモイド正規化したものを用いて行われる。

30

極値分布におけるパラメータは健常者試料のマーカー値のみを用いて決定される。各マーカーの測定値は極値分布の累積分布関数により「確率スコア」へ変換される。確率スコア（以降、単にスコアと表記する場合がある）は、あるマーカー値における大腸がん患者の確率であり、0から1まで間の値に正規化されているものである。

各マーカー測定値から導出された各スコアからは、平均値が導出される。このようにして導出されたスコア平均値が、大腸がんの判断基準となる。スコア平均値が基準値より大きければ陽性とし、スコア平均値が基準値より小さければ陰性とする。スコアの平均値が陽性であれば、試料の由来元であるヒト個体が大腸がん罹患していると判定することができる。

40

【0020】

測定値と比較されるべき基準値の具体例としては、個々の大腸がんマーカースコアの平均値の閾値が挙げられる。本発明における閾値は、人種及び年齢等に応じて予め設定することができる。閾値は、健常者グループに属する個体及び大腸がん患者グループに属する個体に由来する試料中の各大腸がんマーカーの存在量を測定し、それらの測定値を前述の正規化でスコアに変換し、平均化したものを参照することによって設定することができる。

【0021】

閾値には、高い正診率を示すカットオフ値が選択される。好ましくは、特異度が80%以上、例えば95%を示すカットオフ値の中から当業者が適宜決定する事ができる。上記

50

特異度の範囲の上限は特に限定されないが、例えば98%とすることができる。

閾値を設定する手法は、当業者によって適宜選択されるものである。一例として、ROC Curve (受信者動作特性曲線; Receiver Operating Characteristic Curve) 分析が挙げられる。

【0022】

[2-4. 測定方法]

本発明の方法において、大腸がんマーカーの測定は、好ましくは、生体特異的親和性に基づく検査によって行われる。生体特異的親和性に基づく検査は当業者に良く知られた方法であり、特に限定されないが、免疫アッセイが好ましい。具体的には、ウエスタンブロット、ラジオ免疫アッセイ、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: サンドイッチ免疫法、競合法、直接吸着法を全て含む)、免疫沈降法、沈降反応、免疫拡散法、免疫凝集測定、補体結合反応分析、免疫放射定量法、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイなどの、競合及び非競合アッセイ系を含む免疫アッセイが含まれる。免疫アッセイにおいては、採血試料中の大腸がんマーカーに結合する抗体を検出する。この際、大腸がんマーカーパネルを構成する全てのタンパク質に対する抗体が1つの基板表面上に固定化された大腸がん検出チップを用いてもよい。

10

大腸がんマーカー測定においては、測定すべき大腸がんマーカータンパク質と、その大腸がんマーカータンパク質の抗体とが免疫複合体を形成しうる条件のもと、試料を抗体に接触させることによって行われる。

免疫アッセイのより具体的なプロトコルは、当業者であれば容易に選択することができるものである。

20

【0023】

上記の他、大腸がんマーカーの測定は、質量分析法に基づいて行われてもよい。質量分析法としては、定量的分析が可能な方法であれば特に限定されず、当業者によって適宜行われる。

【実施例】

【0024】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

【0025】

[参考例1]

以下の参考例2及び実施例1において、血漿試料を以下のように調製した。1人につき、約15mLの血液をBDバキュテナ (Vacutainer) 採血管CPTTMに採血した。採血後、直ちに遠心分離 (1700 x g、4分、20分) を行い、上清を血漿成分として得た (約5mL)。得られた血漿試料は、-80℃にて保存した。

30

この血漿試料は測定時に解凍し、5000~20000倍に希釈されることによって、本発明の大腸がんマーカー濃度が測定されるべき採血試料となる。

【0026】

[参考例2]

特開2008-14937号公報において、がん組織を用いたプロテオーム解析によって同定されたタンパク質のうち、ELISA測定系が構築された40種類のタンパク質を、大腸がんマーカー候補とした。40種類のタンパク質を、表1~表8に示す。表においては、40種類のタンパク質についての、タンパク質名 (Protein Name)、遺伝子名 (Gene Name)、既存のELISAキット (ELISA Kit)、標準タンパク質 (Standard protein)、捕捉用抗体 (Capture antibody)、検出用抗体 (Detection antibody)、複合酵素 (Conjugated enzyme)、二次抗体 (Secondary antibody) 及び基質 (Substrate) を示す。なお、表中のProtein Name及びGene Nameは、UniProtデータベースに登録されている名前で示されている。表中のCA19-9は、carbohydrate antigen 19-9を示す。表中の3) で表されるリコンビナントタンパク質は、Transdirect insect cell" ((株) 島津製作所製) によって合成されたものである。表中の4) で表される抗体は、合成ペプチドに対して免疫

40

50

して作製したものである。

【 0 0 2 7 】

【 表 1 】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	CEACAM5	Access CEA (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)						
2	CA19-9		SphereLight CA19-9 (Olympus, Tokyo, Japan)						
3	Galectin-1	LGALS1		Recombinant LGALS1 (Abnova, Taiwan)	Goat anti-human Galectin-1 pAb (R&D Systems, Minneapolis, MN) 5 µg/ml	Mouse anti-human Galectin-1 mAb (Abnova, Taiwan) 0.5 mg/ml	ALP		Colorimetric ALP substrate
4	Galectin-2	LGALS2		Recombinant LGALS2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 5 µg/ml	Goat anti-human Galectin-2 pAb (R&D)	Goat anti-human Galectin-2 pAb (R&D)	HRP		Chemiluminescent ALP substrate
5	Galectin-3	LGALS3		Recombinant LGALS3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 5 µg/ml	Goat anti-human Galectin-3 pAb (R&D)	Mouse anti-human Galectin-3 mAb (Abnova) 0.1 mg/ml	HRP		HRP chromogenic substrate

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 2】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
6	Galectin-4	LGALS4		Recombinant LGALS4 (R&D Systems)	Goat anti-human Galectin-4 pAb (R&D)	Goat anti-human Galectin-4 pAb (R&D)	HRP		HRP chromogene
7	Galectin-7	LGALS7		Recombinant LGALS7 (R&D Systems)	Goat anti-human Galectin-7 pAb (R&D)	Goat anti-human Galectin-7 pAb (R&D)	HRP		Chemiluminescent ALP substrate
8	Vitronectin	VTN	Vitronectin EIA Kit (TAKARA BIO, Shiga, Japan)						
9	Alpha-1-acid glycoprotein 2	ORM2		Recombinant ORM2 ³⁾	Rabbit anti-human ORM2 pAb ⁴⁾ 5 mg/ml	Rabbit anti-human Alpha 1 acid glycoprotein pAb (Abcam) 0.5 mg/ml	HRP		HRP chromogene
10	Zyxin	ZYX		Recombinant ZYX (Abnova)	Mouse anti-human Zyxin mAb (Invitrogen) 5 mg/ml	Rabbit anti-human ZYX pAb (Proteintech Group, Chicago, IL)	HRP	Anti-Rabbit IgG HRP (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1/50000	HRP chromogene

【 表 3 】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
11	Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3		Recombinant SF3B3 ³⁾	Goat anti-human SAP130 pAb (Abcam, Cambridge, UK) 5 mg/ml	Rabbit anti-human SF3B3 pAb ⁴⁾ 0.7 mg/ml	Anti-Rabbit IgG HRP (Invitrogen) 1/50000	HRP chromogene	
12	Glycyl-tRNA synthetase	GARS		Recombinant GARS ³⁾	Rabbit anti-human GARS pAb ⁴⁾ 5 mg/ml	Rabbit anti-human GARS pAb ⁴⁾ 0.4 mg/ml	ALP	Colorimetric ALP substrate	
13	Alpha-enolase	ENO1		Recombinant ENO1 (Abnova)	Mouse anti-human ENO1 mAb (Abnova) 2.5 mg/ml	Rabbit anti-human ENO1 pAb (Proteintech Group) 0.3 mg/ml	Anti-Rabbit IgG HRP (Invitrogen) 1/50000	HRP chromogene	
14	Reticulocalbin-I	RCN1		Recombinant RCN1 (Abnova)	Rabbit anti-human RCN1 pAb (Bethyl Laboratories) 2.5 µg/ml	Mouse anti-human RCN1 mAb (Abnova) 0.5 mg/ml	Anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen) 1/10000	HRP chromogene	
15	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	M30 Apoptosense® ELISA (PEVIVA, Stockholm, Sweden)						

【 0 0 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 4】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
16	Protein S100-A8/S100-S9	S100A8/A9	Calprotectin, Human, ELISA kit (Hycult biotechnology, Plymouth Meeting, PA)						
17	Heat shock protein beta-1	HSPB1	Hsp27 ELISA Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany)						
18	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	PTPRA		Recombinant PTPRA (SignalChem, British Columbia, Canada)	Rabbit anti-human PTPRA pAb (Proteintech Group) 3 mg/ml	Rabbit anti-human PTPRA pAb ⁴⁾ 1 mg/ml	ALP		Chemiluminescent ALP substrate
19	Endoplasmic	HSP90B1		Recombinant TRA1 (Abnova)	Mouse anti-human TRA1 mAb (Proteintech Group) 5 mg/ml	Rabbit anti-human TRA1 pAb (Proteintech Group) 0.5 mg/ml		Anti-Rabbit IgG ALP (Invitrogen) 1/20000	Chemiluminescent ALP substrate
20	Complement factor H CFH			Native Factor H (AbD serotec, Kidlington, UK)	Sheep anti-human Factor H pAb (Gene Tex, Irvine, CA) 5 µg/ml	Sheep anti-human Factor H pAb (Gene Tex) 0.5 µg/ml	ALP		Colorimetric ALP substrate

【 表 5 】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
21	Vimentin	VIM		Recombinant Vimentin (assay designs, Ann Arbor, MI)	Mouse anti-human Vimentin mAb (Abcam) 3 mg/ml	Rabbit anti-human Vimentin pAb (Abcam) 1 mg/ml		Anti-Rabbit IgG HRP (Invitrogen) 1/50000	HRP chromogene
22	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1		Recombinant Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (ALEXIS BIOCHEMICALS, San Diego, CA)	Mouse anti-human APE1 mAb (Abcam) 3 mg/ml	Mouse anti-human APE1 mAb (Abcam) 0.2 mg/ml	HRP		HRP chromogene
23	Serine/arginine-rich splicing factor 3	SFRS3		Recombinant SFRS3 (Abnova)	Rabbit anti-human SFRS3 pAb (Abcam) 1 mg/ml	Mouse anti-human SFRS3 mAb (Abnova) 1 mg/ml		Anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen) 1/10000	HRP chromogene
24	F-box only protein 40	FBXO40		Recombinant FBXO40 (Abnova)	Rabbit anti-human FBXO40 pAb (Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden) 2 µg/ml	Mouse anti-human FBXO40 mAb (Abnova) 0.5 mg/ml		Anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen) 1/10000	HRP chromogene
25	Fermitin family homolog 2	FERMT2		Recombinant PLEKHC1 (Abnova)	Rabbit anti-human FERMT2 pAb (Proteintech Group) 5 mg/ml	Goat anti-human Mig-2 pAb (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) 2.5 mg/ml		Anti-Goat IgG HRP (Invitrogen) 1/50000	HRP chromogene

【表 6】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
26	Ras-related protein Rab-18	RAB18		Recombinant RAB18 (Abnova)	Mouse anti-human RAB18 mAb (Proteintech Group) 5 mg/ml	Rabbit anti-human RAB18 pAb (Proteintech Group) 1 mg/ml	HRP	Anti-Rabbit IgG HRP (Invitrogen) 1/50000	HRP chromogene
27	Thiosulfate sulfurtransferase	TST		Recombinant TST (Abnova)	Rabbit anti-human TST pAb (Proteintech Group) 2 mg/ml	Rabbit anti-human TST pAb (Abcam) 1 mg/ml	HRP		HRP chromogene
28	Inorganic pyrophosphatase	PPA1		Recombinant PP (Abnova)	Rabbit anti-human PPA1 pAb (Atlas Antibodies) 5 µg/ml	Mouse anti-human PPA1 mAb (Abnova) 0.5 mg/ml	HRP	Anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen) 1/10000	HRP chromogene
29	6-phosphogluconolactonase	PGLS		Recombinant PGLS (Abnova)	Rabbit anti-human PGLS pAb (Abcam) 5 mg/ml	Mouse anti-human PGLS mAb (Abnova) 0.5 mg/ml	HRP	Anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen) 1/10000	HRP chromogene
30	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3		Recombinant PSMD3 (Abnova)	Rabbit anti-human PSMD3 pAb (Proteintech Group) 3 mg/ml	Rabbit anti-human Proteasome 19S S3 pAb (NOVUS Biologicals, Littleton, CO) 0.5 mg/ml	HRP		HRP chromogene

【表 7】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
31	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13	USP13		Recombinant USP13 (Abnova)	Rabbit anti-human USP13 pAb (Proteintech Group) 1 mg/ml	Rabbit anti-human USP13 pAb (Abcam) 0.5 mg/ml	HRP		HRP chromogene
32	Signal recognition particle 9 kDa protein	SRP9		Recombinant SRP9 (ORIGENE, Rockville, MD)	Rabbit anti-human SRP9 pAb (Proteintech Group) 2 mg/ml	Goat anti-human SRP9 pAb (Santa cruz) 0.5 mg/ml		Anti-Goat IgG HRP (Invitrogen) 1/50000	HRP chromogene
33	GTP-AMP phosphotransferase mitochondrial	AK3		Recombinant AK3 (Abnova)	Rabbit anti-human AK3 pAb (Proteintech Group) 1 mg/ml	Rabbit anti-human AK3 pAb (Abcam) 1 mg/ml	HRP		HRP chromogene
34	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13		Recombinant PSMD13 (Abnova)	Rabbit anti-human PSMD13 pAb (Proteintech Group) 2 mg/ml	Rabbit anti-human PSMD13 pAb (Abcam) 1 mg/ml	HRP		HRP chromogene
35	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	CYC1		Recombinant CYC1 (Abnova)	Rabbit anti-human CYC1 pAb (Proteintech Group) 2 mg/ml	Rabbit anti-human CYC1 pAb (GeneTex) 0.4 µg/ml	HRP		HRP chromogene

【 表 8 】

No.	Protein Name	Gene Name	ELISA Kit	Standard protein	Capture antibody	Detection antibody	Conjugated enzyme	Secondary antibody	Substrate
36	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4		Recombinant PDIA4 (Abnova)	Rabbit anti-human PDIA4 pAb (Atlas Antibodies) 1 µg/ml	Rabbit anti-human ERp72 pAb (Abcam) 1 mg/ml	HRP		HRP chromogene
37	Proteasome subunit alpha type-7	PSMA7		Recombinant PSMA7 (Abnova)	Rabbit anti-human PSMA7 pAb (Proteintech Group) 2 mg/ml	Mouse anti-human PSMA7 mAb (Abnova) 0.5 mg/ml		Anti-Mouse IgG (Invitrogen) 1/10000	HRP chromogene
38	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1		Recombinant VDAC1 (Abnova)	Rabbit anti-human VDAC1 pAb (Proteintech Group) 3 mg/ml	Rabbit anti-human VDAC1 pAb (Abcam) 1 mg/ml	HRP		HRP chromogene
39	Actin-related protein 2	ACTR2		Recombinant ACTR2 (Abnova)	Rabbit anti-human ACTR2 pAb (Proteintech Group) 2 mg/ml	Mouse anti-human ACTR2 mAb (Abnova) 0.5 mg/ml	HRP		HRP chromogene
40	Paraneoplastic antigen Ma2	PNMA2		Recombinant PNMA2 (ORIGENE)	Rabbit anti-human PNMA2 pAb (Atlas Antibodies) 1 µg/ml	Mouse anti-human PNMA2 mAb (Abnova) 0.2 mg/ml	HRP		HRP chromogene

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

50

大阪大学医学部の倫理規定に沿って患者の同意が得られた血漿試料について、以下の解析を行った。以下の解析において、検出感度(Sensitivity)は、大腸がん患者を大腸がん患者と判定する割合を表し、特異度(Specificity)は、健常者を健常者と判定する割合を表し、偽陽性度は、健常者を大腸がんとして判定する割合を表す。

血漿試料は、大腸がん患者105名及び健常者100名から採取した血液から参考例1に従って調製した。表1～表8のELISA系を用い、タンパク質40種について、大腸がん患者と健常者における血漿試料中の濃度測定を行った。

【0036】

40種のマーカーのうち13種類のタンパク質が、大腸がん患者と健常者との間で統計的有意差 ($p < 0.05$) を示した。統計的有意差を示した13種類のタンパク質の具体的な解析結果について、表9に示す。表9においては、健常者対大腸がん患者 (Control vs CRC) における、それぞれのマーカーについてのROC曲線下の面積 (AUC: Area Under the Curve) 及びP値 (P value) ; 濃度 (Concentration) 及び確率スコア (Probability Score) で表したカットオフ値 (Cutoff Value) ; 及びそのカットオフ値を用いた場合の大腸がんの各ステージ (Stage 0, Stage I, Stage II, Stage III, Stage IV) 及び全てのステージ (All Stages) における感度 (Sensitivity) を示している。なお、カットオフ値及び感度は、特異度 (Specificity) が95%の場合 (すなわち5%の偽陽性度を許容した場合) の値を示している。また、濃度値の有意差は、Mann-Whitney testを用いた検証に基づく。大腸がんの各ステージは、TMN分類に基づくものであり、原発性がんをStage 0 (上皮内がん)、Stage I及びStage IIと表記し、リンパ節転移がんをStage IIIと表記し、Stage IVと表記する (以下においても同じ)。

表9が示すように、これら13種類のタンパク質をそれぞれ単独で用いた場合、全がん患者 (All Stages) における検出感度 (Sensitivity) は最高でも40%程度であった。すなわち、シングルマーカーとして用いた場合、検出感度が不十分であるといえる。

【0037】

10

20

【 表 9 】

Protein Name	Gene Name	Control vs CRC		Cutoff Value		Sensitivity					
		AUC	P value	Concentration	Probability Score	Stage 0	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV	All Stages
						(N = 6)	(N = 28)	(N = 25)	(N = 27)	(N = 19)	(N = 105)
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	CEACAM5	0.744	<0.001	5 (ng/mL)	0.957	0.167	0.071	0.360	0.370	0.684	0.333
	(CA19-9)	0.834	<0.001	37 (U/mL)	0.995	0.000	0.036	0.160	0.111	0.526	0.171
Galectin-4	LGALS4	0.786	<0.001	0.6075 (ng/mL)	0.930	0.167	0.250	0.400	0.481	0.632	0.410
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	0.731	<0.001	1026 (ng/mL)	0.967	0.167	0.036	0.240	0.185	0.211	0.162
Actin-related protein 2	ACTR2	0.696	<0.0001	709.3 (ng/mL)	0.910	0.167	0.036	0.160	0.148	0.105	0.114
Vitronectin	VTN	0.657	<0.001	10.89 (mg/mL)	0.992	0.167	0.286	0.280	0.370	0.211	0.286
Galectin-1	LGALS1	0.654	0.0001	364.2 (ng/mL)	0.937	0.500	0.214	0.480	0.296	0.263	0.324
Galectin-3	LGALS3	0.647	0.0003	10.93 (ng/mL)	0.933	0.000	0.179	0.320	0.296	0.263	0.248
Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	0.638	0.0007	160.8 (U/L)	0.964	0.167	0.107	0.200	0.074	0.368	0.171
Proteasome subunit alpha type-7	PSMA7	0.599	0.0128	520.8 (ng/mL)	0.986	0.167	0.143	0.120	0.037	0.105	0.105
Inorganic pyrophosphatase	PPA1	0.590	0.0253	536.1 (ng/mL)	0.979	0.167	0.000	0.040	0.111	0.105	0.067
Reticulocalbin-1	RCN1	0.581	0.0195	36.77 (ng/mL)	0.902	0.167	0.000	0.040	0.074	0.105	0.057
Fermitin family homolog 2	FERMT2	0.581	0.0446	600.0 (ng/mL)	0.661	0.167	0.000	0.160	0.111	0.053	0.086

【 0 0 3 8 】

【 参 考 例 3 】

10

20

30

40

50

大腸がん患者の検出率を向上させるための、組み合わせられた大腸がんマーカ－の有効性について検証した。

参考例2で得られた13種類のマーカ－のほとんど全てについて、健常者におけるマーカ－値は比較的低い値を示していた。一方、がん患者におけるマーカ－値は比較的高い値を示したが、一部の血漿試料において極めて高い値(すなわち外れ値)を示したのも確認された。例として、図1(a)に、健常者及びがん患者におけるガレクチン4の濃度(マーカ－値)についてのヒストグラムを示す。図1(a)において、横軸はガレクチンのマーカ－値、縦軸は試料数を示す。図1(a)に示されるように、健常者群のマーカ－値は極値分布関数(図1(a)中に曲線として示す)に良く適合している。一方、がん患者群では、一部の血漿試料において極めて高いマーカ－値が確認された。このため、線形分類などを用いた単純な判別は難しいと考えられる。

10

【0039】

そこで、マーカ－値について極値分布に基づくシグモイド正規化を行った。極値分布におけるパラメータは、健常者試料のマーカ－値のみを用いて決定し、各試料のマーカ－値を極値分布の累積分布関数により、「確率スコア」(以降、単にスコアと表記する場合がある)へ変換した。得られた確率スコアの曲線を図1(b)に示す。図1(b)において、横軸はガレクチンのマーカ－値(raw value)、縦軸は確率スコア(probability score)を示す。確率スコアは、あるマーカ－値における大腸がん患者の確率であり、0から1まで間の値に正規化されている。従って、健常者群では観測されにくいような高いマーカ－値であるほど確率スコアは1に近づく。

20

【0040】

各マーカ－値について同様に正規化した後、正規化された複数のスコアの平均値を大腸がん患者と健常者とを区別する指標として用いた。大腸がん患者と健常者との識別に効果的なマーカ－の組み合わせを、以下のようにモンテカルロ法を用いて決定した。

例えば、マーカ－を2個組み合わせた場合の解析においては、健常者試料100のうち50試料を選択して正規化のためのパラメータ推定を行い、残りの健常者試料50とがん患者試料105のうち53試料とを選んで判定を行う工程を100回繰り返した(100回解析)。このようにして、表1～表8の40種類のマーカ－からランダムに選択された2個のマーカ－を組み合わせた場合のスコアの平均値を算出した。

また、マーカ－を3個組み合わせた場合の解析においては、健常者試料100のうち50試料を選択して正規化のためのパラメータ推定を行い、残りの健常者試料50とがん患者105試料のうち53試料とを選んで判定を行う工程を100回繰り返した(100回解析)。このようにして、表1～表8の40種類のマーカ－からランダムに選択された3個のマーカ－を組み合わせた場合のスコアの平均値を算出した。

30

上述の100回解析を、マーカ－を4個、5個、6個、・・・及び40個組み合わせた場合についても同様に行い、スコアの平均値を算出した。

【0041】

得られた結果は、受信者動作特性曲線(Receiver Operating Characteristic Curve (ROC))を元に再評価した。マーカ－の組み合わせ数(Number of markers)とROC曲線下面積(Area Under the ROC Curve (AUC))平均値との関係を、図2に箱ひげ図で示す。図2においては、1個のマーカ－を選択した場合も示している。箱ひげ図において、箱で示した範囲は選択された100試料のうちAUC平均値のばらつきが75%以内に収まる検体を示す。

40

図2より、5種類のマーカ－を組み合わせた場合が最も効率的にがんを判別することが予想される結果となった。

【0042】

上記の5種類のマーカ－についての100回解析における各マーカ－の選択頻度を示したグラフを図3に示す。同様に、4種類のマーカ－については図4に、3種類のマーカ－については図5に、2種類のマーカ－については図6に示す。いずれにおいても、上位5位以内に挙がったマーカ－は、糖鎖抗原19-9(CA19-9)、ガレクチン4(Galectin4

50

)、APEXヌクレアーゼ (APEX1)、癌胎児性抗原 (CEA) 及びアクチン関連タンパク質 2 (ACTR2) であった。

【 0 0 4 3 】

[実施例 1]

参考例 3 において上記 5 位以内の高頻度で選択された 5 種のマーカー (CA19-9、Galectin4、APEX1、CEA 及び ACTR2) から 2 ~ 5 種類を組み合わせたがんマーカーパネルを用い、それぞれの場合におけるがんマーカーパネルの判定能を調べた。その結果を表 10 に示す。表 10 においては、健常者対大腸がん患者 (Control vs CRC) におけるそれぞれの組み合わせにおける ROC 曲線下の面積 (AUC: Area Under the Curve) ; 確率スコアで表したカットオフ値 (Cutoff Value) ; 及びそのカットオフ値を用いた場合の大腸がんの各ステージ (Stage 0, Stage I, Stage II, Stage III, Stage IV) 及び全てのステージ (All Stages) における感度 (Sensitivity) を示している。なお、カットオフ値及び感度は、特異度が 95% の場合 (すなわち 5% の偽陽性度を許容した場合) の値を示している。また、本発明のがんマーカーパネルは、アスタリスクを付して示している。

【 0 0 4 4 】

【 表 1 0 】

	Combination	Control vs CRC		Cutoff Value	Sensitivity					
		AUC (Area under the ROC Curve)			Stage 0	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV	All
					(N = 6)	(N=28)	(N=25)	(N=27)	(N = 19)	Stages
2 marker	CEA CA19-9	0.836		0.884	0.333	0.179	0.520	0.481	0.579	0.419
	CEA Galectin4	0.795		0.830	0.167	0.286	0.560	0.481	0.842	0.495
	CEA APEX1	0.784		0.839	0.167	0.036	0.480	0.296	0.632	0.324
	CEA ACTR2	0.768		0.690	0.167	0.107	0.360	0.296	0.421	0.276
	*CA19-9_Galectin4	0.887		0.874	0.500	0.321	0.400	0.519	0.526	0.438
	*CA19-9_APEX1	0.850		0.914	0.167	0.107	0.400	0.407	0.368	0.305
	CA19-9_ACTR2	0.826		0.786	0.167	0.107	0.360	0.333	0.211	0.248
	Galectin4_APEX1	0.813		0.862	0.333	0.179	0.440	0.296	0.526	0.343
	Galectin4_ACTR2	0.800		0.802	0.167	0.000	0.240	0.185	0.211	0.152
	APEX1_ACTR2	0.772		0.768	0.167	0.036	0.240	0.111	0.158	0.133
3 marker	*CEA CA19-9_Galectin4	0.876		0.800	0.333	0.393	0.760	0.556	0.789	0.590
	*CEA CA19-9_APEX1	0.862		0.794	0.333	0.286	0.600	0.593	0.579	0.495
	*CEA CA19-9_ACTR2	0.855		0.637	0.333	0.250	0.640	0.630	0.684	0.524
	*CEA Galectin4_APEX1	0.839		0.790	0.333	0.143	0.640	0.481	0.684	0.457
	CEA Galectin4_ACTR2	0.827		0.714	0.167	0.000	0.480	0.333	0.474	0.295
	CEA APEX1_ACTR2	0.812		0.670	0.167	0.071	0.440	0.407	0.421	0.314
	*CA19-9_Galectin4_APEX1	0.892		0.783	0.500	0.321	0.760	0.630	0.632	0.571
	*CA19-9_Galectin4_ACTR2	0.883		0.679	0.333	0.250	0.640	0.593	0.526	0.486
	*CA19-9_APEX1_ACTR2	0.860		0.652	0.500	0.179	0.640	0.519	0.526	0.457
	Galectin4_APEX1_ACTR2	0.829		0.743	0.333	0.000	0.400	0.185	0.368	0.229
4 marker	*CEA CA19-9_Galectin4_APEX1	0.895		0.753	0.333	0.321	0.720	0.593	0.737	0.562
	*CEA CA19-9_Galectin4_ACTR2	0.892		0.655	0.500	0.357	0.720	0.704	0.737	0.610
	*CEA CA19-9_APEX1_ACTR2	0.880		0.636	0.667	0.286	0.680	0.667	0.526	0.543
	*CEA Galectin4_APEX1_ACTR2	0.856		0.686	0.167	0.071	0.600	0.519	0.632	0.419
	*CA19-9_Galectin4_APEX1_ACTR2	0.894		0.696	0.333	0.179	0.640	0.704	0.526	0.495
5 marker	*CEA CA19-9_Galectin4_APEX1_ACTR2	0.907		0.630	0.500	0.357	0.800	0.778	0.737	0.648

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

表10における判定においては、“各マーカーでの確率スコア(Probability score)の平均値”がCut off値を上回った検体を陽性とみなしている。

AUC値は、5種類のマーカー(CA19-9、CEA、Galectin4、APEX1及びACTR2)を組み合わせた場合が最も大きく、がんと健常者の判別能力が最も高いことを確認した。その他にも、アスタリスクを付した本発明のマーカーの組み合わせ全てにおいて、従来のマーカーCEA及びCA19-9を組み合わせた場合よりも高いAUC値が確認された。

また、感度(Sensitivity)を比較すると、特に、上記の5種のマーカーを組み合わせた時に最も感度が向上した。

【0046】

さらに、上記5種類のマーカーをそれぞれ単独で用いた場合と、組み合わせて用いた場合とで、陽性を示した血漿試料の比較を行った。その結果を図7に示す。図7中、エントリ1~5はそれぞれマーカーを単独で用いた場合に陽性を示した試料(比較用)、エントリ6はCEA及びCA19-9の少なくともいずれかによって陽性を示した試料(CEA>5 ng/mL 及び/又はCA19-9>37 U/mL; 比較用)、エントリ7は5種類のマーカーを全て組み合わせた(all combined)場合に陽性を示した試料を、塗りつぶしたバーによって示している。星印を付した試料は、CEA及びCA19-9によって検出できなかった大腸がん試料(CRC samples could not be detected by CEA and CA19-9)を示す。なお、エントリ7においては、各マーカーの確率スコアの平均値がカットオフ値を上回る検体を陽性とみなしている。

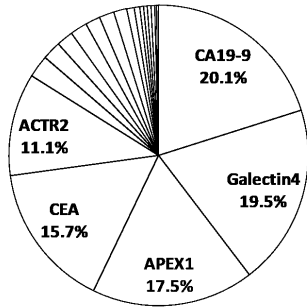
【0047】

図7が示すように、5種類のマーカーを全て組み合わせた場合においては、CEA及びCA19-9の少なくともいずれかを用了場合に比べ、特に早期ステージ(Stage 0及びStage I)のがん患者において感度が著しく向上することが分かった。従って、Galectin4、APEX1及びACTR2を用いることによって、確立された大腸がんマーカーであるCEAやCA19-9では検出できない比較的早期ステージの検体を相補的に検出できていることがわかった。

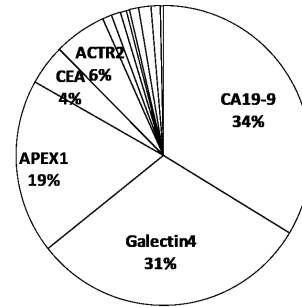
10

20

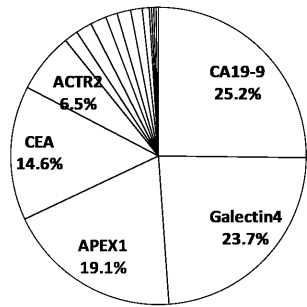
【 3 】



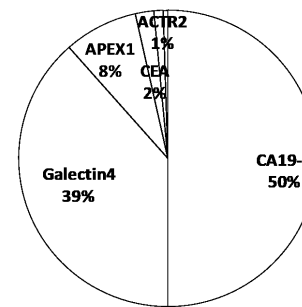
【 5 】



【 4 】

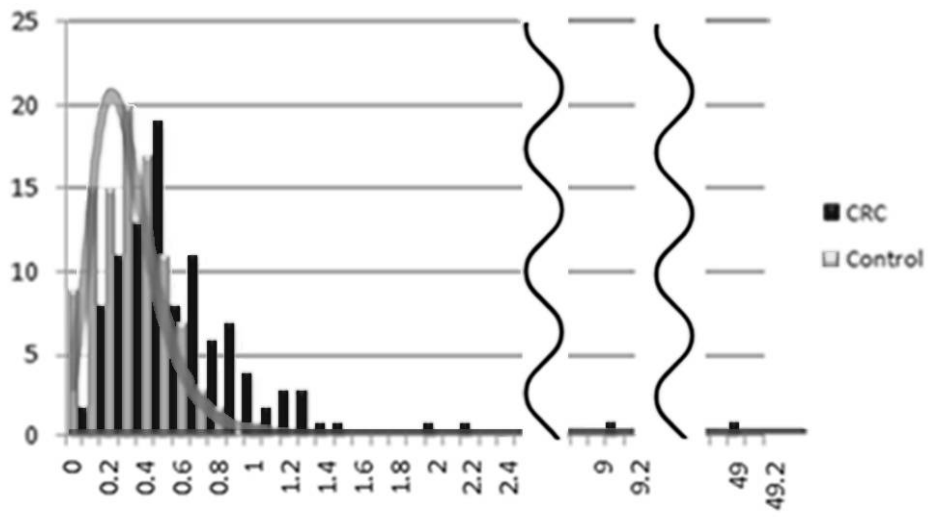


【 6 】

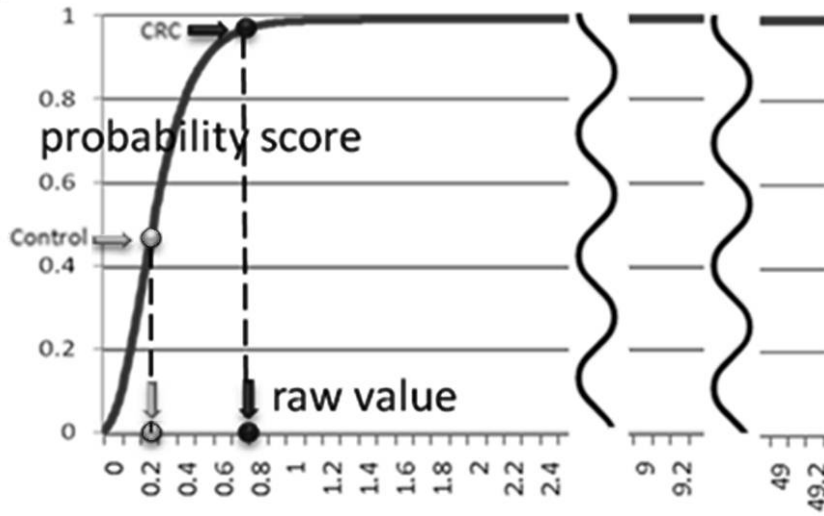


【 図 1 】

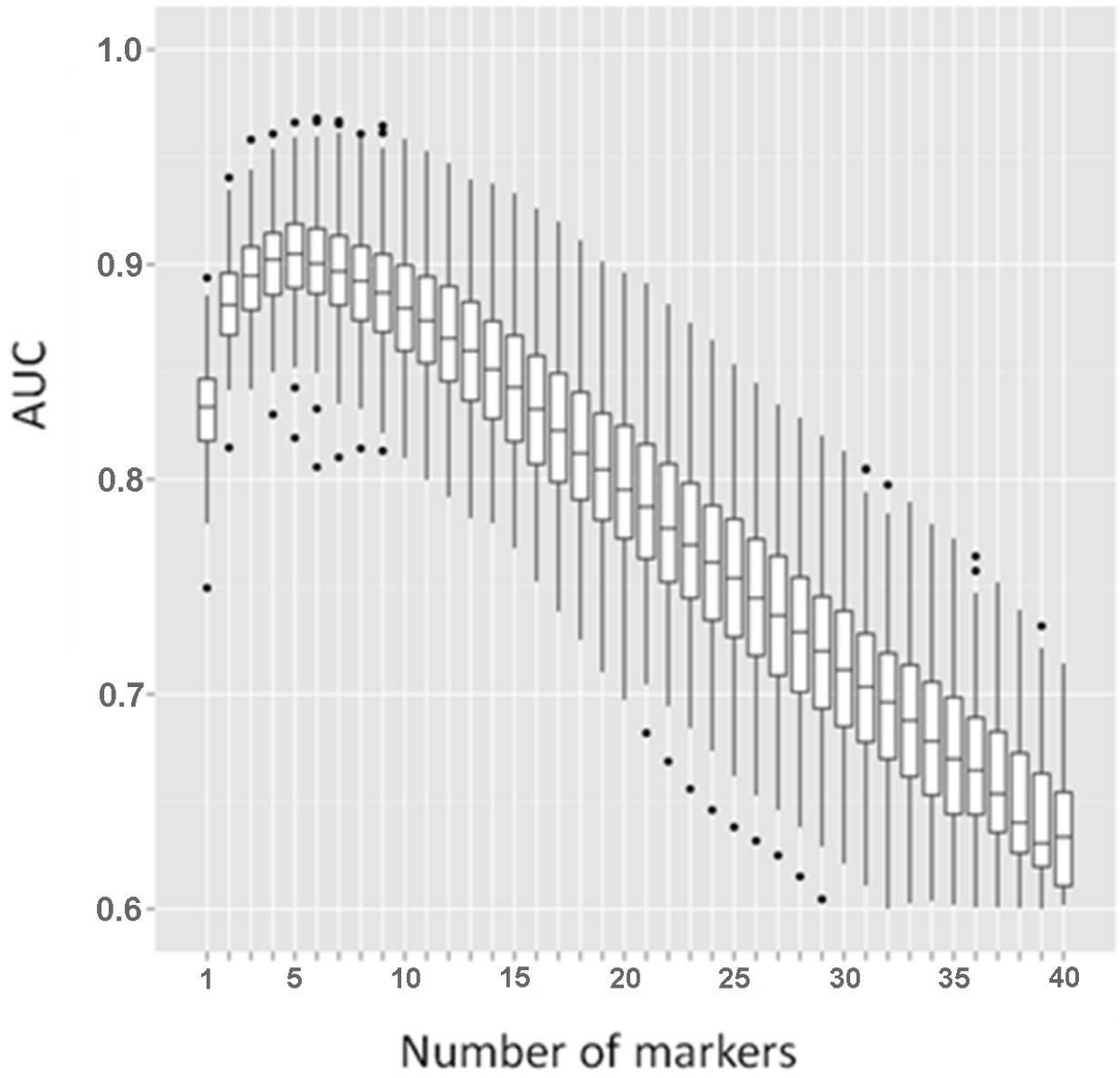
a



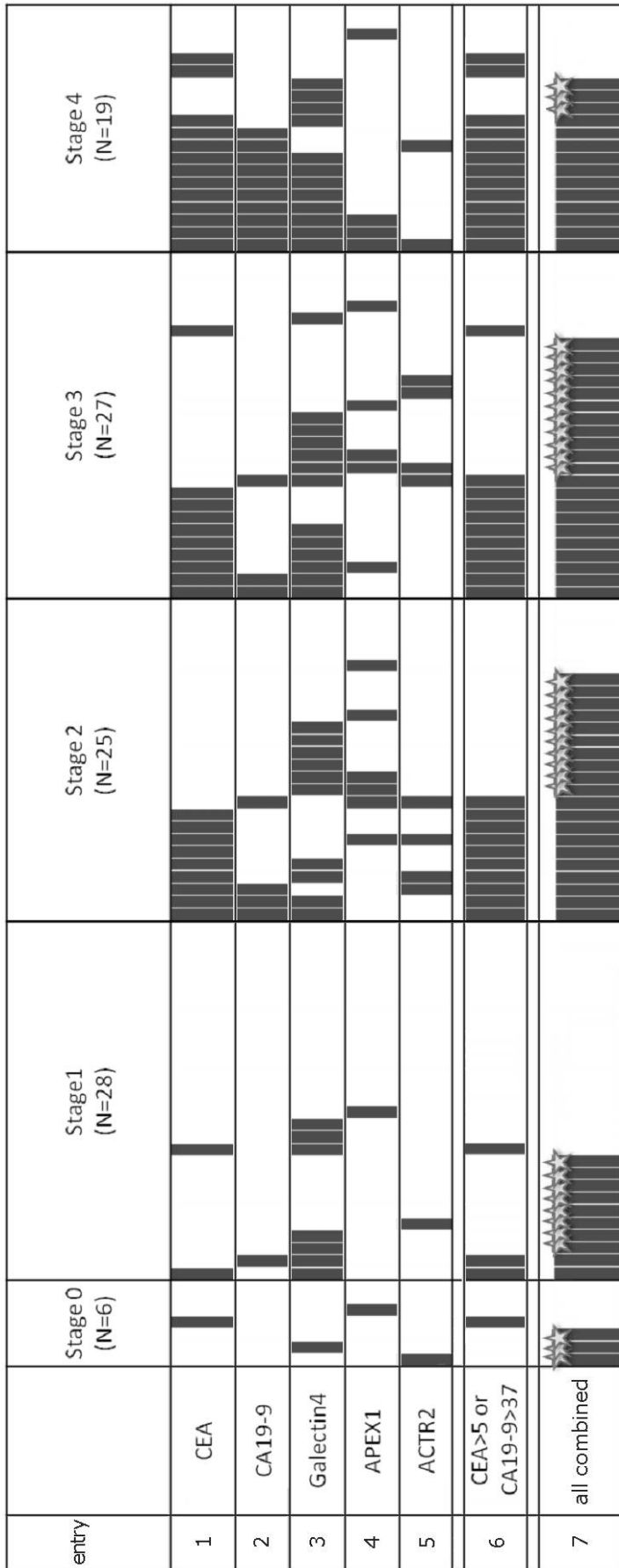
b



【 図 2 】



【 7 】



☆ CRC samples could not be detected by CEA and CA19-9

フロントページの続き

- (72)発明者 金子 直樹
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 森 正樹
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 西村 紀
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 竹政 伊知朗
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 松田 秀雄
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 瀬尾 茂人
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 松原 稔哉
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特開2008-014937(JP,A)
特開2002-323499(JP,A)
特表2011-517765(JP,A)
国際公開第2011/148668(WO,A1)
国際公開第2011/063274(WO,A2)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/68
PubMed