

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6244644号  
(P6244644)

(45) 発行日 平成29年12月13日(2017.12.13)

(24) 登録日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/574 (2006.01)** GO 1 N 33/574 A  
**GO 1 N 33/573 (2006.01)** GO 1 N 33/573 A

請求項の数 2 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2013-84915 (P2013-84915)                  (22) 出願日 平成25年4月15日 (2013.4.15)                  (65) 公開番号 特開2014-206491 (P2014-206491A)                  (43) 公開日 平成26年10月30日 (2014.10.30)                  審査請求日 平成28年3月11日 (2016.3.11)</p>	<p>(73) 特許権者 000003300                  東ソー株式会社                  山口県周南市開成町4560番地                  (72) 発明者 仲田 大輔                  神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ                  ー株式会社 東京研究センター内                    審査官 海野 佳子                    (56) 参考文献 特開2010-180174 (JP, A                  )</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓癌の検出方法及び検出用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- ・膵臓特異的リボヌクレアーゼ1を認識する抗体(a)、
- ・抗体(a)とは異なる部位で膵臓特異的リボヌクレアーゼ1を認識する抗体(b)、及び

・試料、  
 を接触させ、ここで試料は血清であり、抗体(a)及び(b)と複合体を形成した膵臓特異的リボヌクレアーゼ1を測定し、その値が、予め病期が決定されている膵臓癌患者血清を用いて測定しその病期ステージIII以下と病期ステージIVとに分けた場合に最も検出精度が良くなるよう設定したカットオフ値よりも高い値を示した場合に病期ステージIVの膵臓癌とすることを特徴とする、病期ステージIVの膵臓癌の検出方法。

10

【請求項2】

- ・膵臓特異的リボヌクレアーゼ1を認識する抗体(a)、及び
  - ・抗体(a)とは異なる部位で膵臓特異的リボヌクレアーゼ1を認識する抗体(b)、
- を有することを特徴とする、病期ステージIVの膵臓癌検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膵臓癌の検出方法及び検出用キットに関する。より詳しくは、試料中の膵臓特異的リボヌクレアーゼ1(以下、リボヌクレアーゼ1を「RNase 1」と称する)

20

を免疫学的手法により測定することによる膵臓癌の検出方法及び検出用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

膵臓癌は、早期発見の難しい癌の1つである。非特許文献1によれば、血清中のリボヌクレアーゼ酵素活性を測定すると、膵臓癌患者から得られた血清中では酵素活性が増加していることを示しており、他の臓器癌患者から得られた血清中のリボヌクレアーゼ酵素活性に比べて高い値を示すことが、報告されている。一方で、非特許文献2によれば、血清中のリボヌクレアーゼ酵素活性を測定すると、非特許文献1と同様に膵臓癌患者から得られた血清中では酵素活性が増加していることが報告されているが、他の臓器癌患者から得られた血清中の酵素活性も増加しているため、膵臓癌を明確に区別できなかったと報告されている。以上の文献は、両者とも酵素活性を測定しており、酵素活性を持つ酵素自体を明確に特定していないが、基質特異性などの特徴から血清中のリボヌクレアーゼが、膵臓由来の酵素と同一であると結論づけている。両文献の酵素活性測定の結果において、癌の組織特異性に関して異なる結果が示されたことは、リボヌクレアーゼ酵素活性測定による癌の検出は、確実性に欠く手法であることを示唆している。

10

【0003】

特許文献1では、膵臓特異的RNase 1を認識する抗体による免疫学的測定法によって、各種癌由来培養細胞の培養上清に分泌された膵臓特異的RNase 1の量を測定する例が示されている。膵臓癌由来細胞から膵臓特異的RNase 1が検出され、胃癌および肺癌由来細胞株の培養上清中には膵臓特異的RNase 1が検出されなかったという結果をもって、膵臓癌の検出が可能であるとしている。また、膵臓癌由来細胞ではないヒト臍帯血管内皮細胞株HUVECからも膵臓特異的RNase 1が検出されることが示されている。非特許文献1および2の結果によれば、健常者の血清中にもリボヌクレアーゼ活性が検出されることから、膵臓由来正常細胞も膵臓特異的RNase 1を分泌している可能性があることは推定されるにも関わらず、特許文献1には膵臓由来正常細胞の測定例は示されていない。さらには、非特許文献3によると膵臓癌由来培養細胞であっても、膵臓特異的RNase 1を分泌しない細胞も存在していることが明らかである。よって特許文献1に提示された方法は、当時の公知事実から判断して、膵臓特異的RNase 1を分泌する培養細胞を検出する方法を提供しているに過ぎず、体外診断薬のような医学的な見地にのっとった膵臓癌の検出方法については何ら開示・示唆はない。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2010-180174号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2308-10 (1976)

【非特許文献2】J. Clin. Pathol. 33, 1212-3 (1980)

40

【非特許文献3】Eur. J. Biochem. 267, 1484-94 (2000)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明が解決しようとする課題は、膵臓癌を検出可能なより確実性の高い方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、膵臓癌患者から得られた試料

50

中の膵臓特異的 R N a s e 1 を免疫学的測定法によって測定した場合に、健常人から得られた試料中の膵臓特異的 R N a s e 1 を測定した場合よりも高い値を示すことを見だし、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 8 】

即ち本発明は、以下のとおりである。

( 1 ) ・膵臓特異的 R N a s e 1 を認識する抗体 ( a ) 、

・抗体 ( a ) とは異なる部位で膵臓特異的 R N a s e 1 を認識する抗体 ( b ) 、及び  
・試料、

を接触させ、抗体 ( a ) 及び ( b ) と複合体を形成した膵臓特異的 R N a s e 1 を測定し、その値が健常人から得られた試料を用いて測定した場合よりも高い値を示した場合に膵臓癌とすることを特徴とする、膵臓癌の検出方法。

( 2 ) 上述の ( 1 ) の検出方法において、膵臓癌が病期ステージ I V の膵臓癌である方法。

( 3 ) ・膵臓特異的 R N a s e 1 を認識する抗体 ( a ) 、及び

・抗体 ( a ) とは異なる部位で膵臓特異的 R N a s e 1 を認識する抗体 ( b ) 、  
を有することを特徴とする、膵臓癌検出用キット。

( 4 ) 上述の ( 3 ) のキットにおいて、膵臓癌が病期ステージ I V の膵臓癌であるキット。

【 0 0 0 9 】

以下に本発明を更に詳細に説明する。本発明は、試料中の膵臓特異的 R N a s e 1 を測定することにより、膵臓癌を検出するものである。試料中の膵臓特異的 R N a s e 1 は、認識部位の異なる 2 つの抗体 ( a ) 及び ( b ) を使用した免疫学的測定方法によって測定するものであって、リボヌクレアーゼ酵素活性を測定するものではない。本発明ではこのようにして得られた測定値が、健常人から得られた試料の測定値よりも高い値を示す場合に、膵臓癌であるとする検出方法である。測定に供される認識部位の異なる 2 つの抗体 ( a ) 及び ( b ) は、膵臓特異的 R N a s e 1 を認識するものであればよく特に限定されないが、膵臓特異的 R N a s e 1 の翻訳後修飾、特に糖鎖修飾に抗体の認識能が影響を受けないものが好ましい。また抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又はそれらの断片であってもよい。これらの抗体はキット化し、膵臓癌の検出に用いることもできる。

【 0 0 1 0 】

一方、本発明において測定対象となる試料は、特に限定されるものではないが、人から採取された体液であることが好ましく、特に血清試料であることがもっとも好ましい。

【 0 0 1 1 】

このような試料を前述の 2 つの抗体 ( a ) 及び ( b ) と接触させ、抗体 ( a ) 及び ( b ) と複合体を形成した膵臓特異的 R N a s e 1 を測定する。これはいわゆるサンドイッチ測定法といわれるものであり、抗体 ( a ) 及び ( b ) の一方は固相化し、他方は標識化することが好ましく、これにより測定を好都合に行うことができる。また試料と抗体 ( a ) 、 ( b ) との反応の順序には特に限定はなく、同時に反応させてもよく、また順次反応させてもよい。

【 0 0 1 2 】

このようにして抗体 ( a ) 及び ( b ) と複合体を形成した膵臓特異的 R N a s e 1 を測定し、その値が健常人から得られた試料を用いて測定した場合よりも高い値を示す場合に、膵臓癌として検出するものである。

【 0 0 1 3 】

特に本発明によれば、病期ステージ I V の膵臓癌を検出することができる。膵臓癌は、国際体がん連合 ( U I C C ) 膵癌病期分類によると、後述の表 1 に記載したようにステージ I V は「遠隔転移がある膵臓癌」と定義されている。「遠隔転移の有無」は、膵臓癌の治療、すなわち手術による切除可能か否かを決定する重要な因子であり、ステージ I V の膵臓癌を検出可能な本発明の方法は、膵臓癌の治療方針決定において重要な判断材料を提

10

20

30

40

50

供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、膵臓癌の検出を行うことができ、特に病期ステージIVの膵臓癌を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】健常人血清、膵臓癌患者血清中の膵臓特異的RNase 1をプロットしたグラフである。

【図2】膵臓癌患者血清を、国際体がん連合(UICC)膵癌病期分類に従ってステージ別に膵臓特異的RNase 1をプロットしたグラフである。

10

【実施例】

【0016】

実施例1 膵臓特異的RNase 1特異的抗体の作製

[免疫原の調製]

ヒト膵臓特異的RNase 1全長を含むポリペプチドを取得するために、昆虫細胞で発現可能なプラスミドベクターに成熟型ヒト膵臓特異的RNase 1(配列番号1)をコードする遺伝子配列を挿入した発現プラスミドを作製した。詳しく説明すると、昆虫細胞組換えタンパク質発現用プラスミドであるpIZ/V5His vector(ライフテクノロジー社)のマルチクロニングサイトに、5'上流側からヒトイムノグロブリン

20

【0017】

作製された発現プラスミドpIZ-KFH-hRNase1は、昆虫細胞株Sf9にCellfectin II(ライフテクノロジー社)を用いて遺伝子導入を実施したことにより、N末端側にヒトイムノグロブリンカップ鎖が付加した組換え体ヒト膵臓特異的RNase 1が培地中に分泌されることを確認した。培地中に分泌されたタンパク質は、培養上清から抗ヒトイムノグロブリンカップ鎖抗体を用いたアフィニティー精製

30

【0018】

[免疫動物への免疫]

上述の免疫原を用いてマウスおよびラットに免疫を実施した。詳しくは、マウスへの免疫の場合、100μgの免疫原をフロイント完全アジュバンドと共に、6週齢Balb/c雌マウス腹腔に投与し初回免疫とした。その後、7日後、14日後、21日後、28日後、35日後に免疫原100μgをフロイント不完全アジュバンドと共に腹腔投与し、追加免疫とした。さらに、42日後に免疫原100μgを生理食塩水と共に腹腔投与し、最終免疫とした。ラットへの免疫の場合は、100μgの免疫原をフロイント完全アジュバンドと共に、6週齢WHY雌ラット両後肢フットパッドへ投与し初回免疫とした。その後、28日後に免疫原100μgを生理食塩水と共に後肢フットパッドへ投与し、最終免疫とした。

40

【0019】

[抗体産生ハイブリドーマの作製]

最終免疫の3日後に、マウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を回収した。ラットからは、腸骨リンパ節と鼠蹊リンパ節を摘出し、リンパ節細胞を得た。マウス脾臓細胞およびラットリンパ節細胞は、それぞれマウスミエローマ細胞株と電気細胞融合法により融合させた後、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを添加したGIT培地(和光純薬工業株式会社)で細胞培養用96ウェルプレートに播種することにより、融合細胞を選択した。

50

## 【0020】

[マウス抗ヒト膵臓特異的RNase 1抗体産生融合細胞株の選定]

マウス抗ヒト膵臓特異的RNase 1抗体産生融合細胞株は、融合細胞が培地中に分泌する抗体の、組換え体ヒト膵臓特異的RNase 1に対する反応性を指標にしたELISA法によるスクリーニングにより選択した。スクリーニングに用いたELISAは以下の通りである。96穴マイクロタイタープレート(グライナー社製)の各ウェルに25ngのヤギ抗ヒトイムノグロブリンカップー鎖抗体(シグマアルドリッチ社製)を含むリン酸緩衝液(50mM リン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH7.4)を50μl加えて4、16時間固定した。これらのウェルを300μlの洗浄液(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.4)で3回洗浄した後、3%BSAを含むブロッキング溶液(3%BSA, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.4)を200μl加えて室温で2時間放置してブロッキングを行った(抗ヒトイムノグロブリンカップー鎖抗体固相化プレート)。

10

## 【0021】

各ウェルを300μlの洗浄液で3回洗浄した後、0.5μg/mlとなるように希釈液(1%BSA、20mM Tris-HCl, 150mM NaCl、0.05%Tween-20、pH7.4)で希釈した組換え体ヒト膵臓特異的RNase 1を加え、室温で1時間放置した。各ウェルを300μlの界面活性剤を含む洗浄液(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl、0.05% Tween-20、pH7.4)で3回洗浄した後、50μlの融合細胞培養上清を加えて室温で1時間放置した。次に、各ウェルを300μlの界面活性剤を含む洗浄液で3回洗浄した後、0.01μgのホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識された抗マウスIgG抗体(Rockland社製)を含む希釈液を50μl加えて、室温で1時間放置した。最後に、各ウェルを300μlの界面活性剤を含む洗浄液で3回洗浄した後、50μlのテトラメチルベンジジン(TMB)溶液(KPL社製)を添加して15分間発色させた後に、1Mのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、450nmにおける吸光度を測定した。スクリーニングの結果から、膵臓特異的RNase 1に強い親和性を示す抗体を産生する融合細胞を得た。得られた融合細胞は、限界希釈法によりモノクローン化され、モノクローナル抗体MrhRN0614を得た。

20

## 【0022】

[ラット抗ヒト膵臓特異的RNase 1抗体産生融合細胞株の選定]

ラット抗ヒト膵臓特異的RNase 1抗体産生融合細胞株は、融合細胞が培地中に分泌する抗体の、ヒト膵臓癌細胞(Capan1)由来の膵臓特異的RNase 1に対する反応性を指標にしたELISA法によるスクリーニングにより選択した。スクリーニングに用いたELISAは以下の通りである。96穴マイクロタイタープレート(グライナー社製)の各ウェルに25ngのマウス抗ヒト膵臓特異的RNase 1抗体(MrhRN0614)を含むリン酸緩衝液(50mM リン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH7.4)を50μl加えて4、16時間固定した。これらのウェルを300μlの洗浄液(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.4)で3回洗浄した後、3%BSAを含むブロッキング溶液(3%BSA, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.4)を200μl加えて室温で2時間放置してブロッキングを行った(抗ヒト膵臓特異的RNase 1抗体固相化プレート)。

30

40

## 【0023】

各ウェルを300μlの洗浄液(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.4)で3回洗浄した後、希釈液(1%BSA、20mM Tris-HCl, 150mM NaCl、0.05% Tween-20、pH7.4)で2倍に希釈したヒト膵臓癌細胞(Capan1)の培養上清を加え、室温で1時間放置した。各ウェルを300μlの界面活性剤を含む洗浄液(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl、0.05% Tween-20、pH7.4)で3回洗浄した後、50μlの融合細胞培養上清を加えて室温で1時間放置した。次に、各ウェルを300μlの界面活性剤

50

を含む洗浄液で3回洗浄した後、 $0.01 \mu\text{g}$ のHRP標識された抗ラットIgG抗体 (American Quallex Antibodies社製) を含む希釈液を $50 \mu\text{l}$ 加えて、室温で1時間放置した。最後に、各ウェルを $300 \mu\text{l}$ の界面活性剤を含む洗浄液で3回洗浄した後、 $50 \mu\text{l}$ のTMB溶液を添加して15分間発色させた後に、1Mのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、 $450 \text{nm}$ における吸光度を測定した。スクリーニングの結果から、膵臓特異的RNase 1に強い親和性を示す抗体を産生する融合細胞を得た。得られた融合細胞は、限界希釈法によりモノクローン化され、モノクローナル抗体RrhRN1111を得た。

#### 【0024】

実施例2 膵臓特異的RNase 1特異的抗体による膵臓特異的RNase 1の免疫学的測定方法の構築 10

実施例1で得た2つの抗体を用いて免疫測定系を構築した。その測定試薬の調製法、評価方法を示す。水不溶性担体 (内部にフェライトを練り込んだ粒子径約 $1.5 \mu\text{m}$ のEVA製) にMrhRN0614を $90 \text{ng}$ /担体となるよう物理的に吸着させ、吸着後BSAを用いてブロッキング処理を行った。この水不溶性担体は、1個当たり約 $100 \text{ng}$ の蛋白質を物理的に吸着可能である。磁力透過性の容器 (容量 $1.2 \text{mL}$ ) に12個の担体を入れた後、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアルカリ性フォスファターゼ標識を施した抗体RrhRN1111を含む緩衝液 (1% BSA、2.5% デキストラン、 $150 \text{mM}$  NaCl、0.05% Tween-20、 $20 \text{mM}$  トリス緩衝液、 $\text{pH} 7.4$ ) を加え、凍結乾燥した。 20

#### 【0025】

この試薬を市販の全自動免疫測定装置 (東ソー (株) 製、商品名AIA-600II) を用いて全自動での測定を行った。その測定原理は以下の通りである。即ち、測定サンプルを $150 \mu\text{L}$ 加え、水不溶性担体を37 で10分間磁石を用いて運動させ、混合液を攪拌した状態で免疫反応させた。反応後、B/F分離操作を行って遊離の標識抗体を分離除去し、アルカリ性フォスファターゼの基質である4-メチルウンベリフェリルリン酸を加え、該基質添加後20秒から295秒までの酵素反応分解物 (4メチルウンベリフェロン) の単位時間あたりの生成速度 ( $\text{nM}/\text{秒}$ ) を測定した。この測定試薬を使用して、精製したヒト膵臓特異的RNase 1を測定すると、精製したヒト膵臓特異的RNase 1の濃度に依存して測定値が増加していることがわかった。このデータは、以後の試料中膵臓特異的RNase 1の測定において、検量線を描くデータとして使用した。 30

#### 【0026】

実施例3 膵臓特異的RNase 1特異的抗体による膵臓特異的RNase 1の免疫学的測定方法による癌患者検体の検出

実施例2で作製した免疫学的測定試薬を使用して、健常人から得られた血清10検体と、膵臓癌患者から得られた血清26検体の、膵臓特異的RNase 1を測定した。なお膵臓癌患者から得られた血清は、医学的診断の結果病期が決定されているものであり、その内訳を表1に示した。この病期は、国際体がん連合 (UICC) 膵癌病期分類によるものである。 40

#### 【0027】

##### 【表1】

試料由来	病期分類	病期定義	検体数
健常人		非癌	10
膵臓癌患者	ステージI	リンパ節転移陰性、膵体内限局	4
膵臓癌患者	ステージII	重要血管への浸潤陰性	8
膵臓癌患者	ステージIII	重要血管への浸潤陽性、遠隔転移なし (局所進行型)	6
膵臓癌患者	ステージIV	遠隔転移あり	8

結果を図1, 2に示す。図1は、健常人血清、膵臓癌患者血清の膵臓特異的RNase 1をプロットしたグラフである。ここで測定検体を健常人と膵臓癌に分けた場合に、最 50

も検出精度が良くなるようにカットオフ値を設定したところ、 $776 \text{ ng/ml}$ となった。またその時の感度及び特異度を統計的に算出したところ、感度 $84.6\%$ 、特異度 $100\%$ となり、検出性能に優れていることがわかり、膵臓癌患者と健常人を有意に区別可能であることが明らかとなった。

【0028】

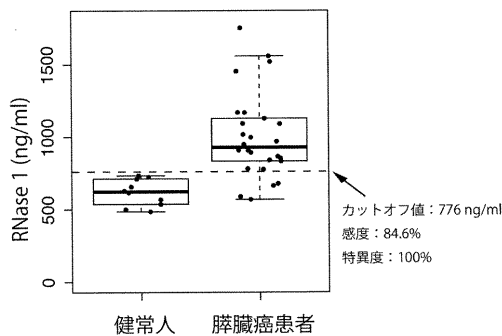
図2は、健常人血清と、膵臓癌患者血清を国際体がん連合（UICC）膵癌病期分類に従ってステージ別に膵臓特異的RNase 1をプロットしたグラフである。図2から明らかなように、病期がステージIVの試料では、他の病期ステージに比べて、試料中の膵臓特異的RNase 1が著しく増加していることがわかる。ここで測定検体をステージIII以下とステージIVに分けた場合に、最も検出精度が良くなるようにカットオフ値を設定したところ、 $1170 \text{ ng/ml}$ となった。またその時の感度及び特異度を統計的に算出したところ、感度 $62.5\%$ 、特異度 $96.4\%$ となった。このように試料中の膵臓特異的RNase 1を測定したときに高い値を示す場合には、ステージIVの膵臓癌である可能性が高いことを示している。

10

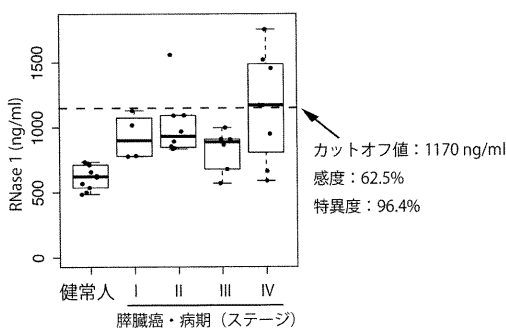
【0029】

以上の結果から、試料中の膵臓特異的RNase 1を測定することにより膵臓癌を検出することが可能であり、特に高い値を示す場合は、病期ステージIVである可能性が強く示された。

【図1】



【図2】



【配列表】

0006244644000001.app



---

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)