

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/137832

発行日 平成26年7月28日 (2014. 7. 28)

(43) 国際公開日 平成24年10月11日 (2012. 10. 11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 5
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 S	
	GO 1 N 33/48 E	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

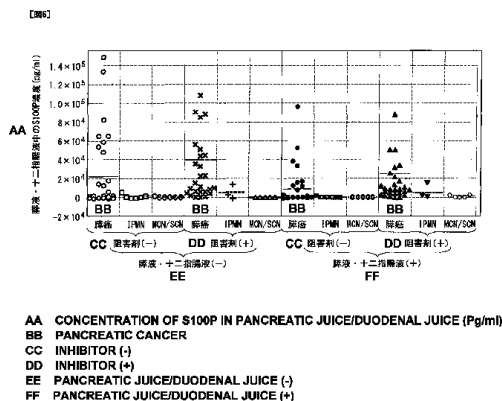
出願番号 特願2013-508905 (P2013-508905)	(71) 出願人 000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/059222	
(22) 国際出願日 平成24年4月4日 (2012. 4. 4)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-83910 (P2011-83910)	(74) 代理人 100118913 弁理士 上田 邦生
(32) 優先日 平成23年4月5日 (2011. 4. 5)	(74) 代理人 100112737 弁理士 藤田 考晴
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 佐貫 博美 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス株式会社内
	(72) 発明者 片岡 理恵 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓検査方法および膵臓検査キット

(57) 【要約】

簡略な設備と手順でありながら膵疾患を高感度で検査する。被検体から採取された膵液および/または膵液を含む体液に含まれるS100Pの濃度を免疫クロマトグラフィ法によって測定する膵臓検査方法を提供する。また、抗S100P抗体を保持する免疫クロマトグラフィ装置と、膵液に含まれる蛋白質分解酵素の活性を阻害する蛋白質分解酵素阻害剤が収容された採取容器とを備える膵臓検査キットを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検体から採取された膵液および/または膵液を含む体液に含まれる S 1 0 0 P の濃度を免疫クロマトグラフィ法によって測定する膵臓検査方法。

【請求項 2】

前記膵液が、膵管内から採取された膵液である請求項 1 に記載の膵臓検査方法。

【請求項 3】

前記膵液を含む体液が、十二指腸内から採取された体液である請求項 1 に記載の膵臓検査方法。

【請求項 4】

前記膵液を含む体液が、十二指腸液である請求項 3 に記載の膵臓検査方法。

【請求項 5】

前記膵液および/または膵液を含む体液が、生理的に分泌された膵液および/または該膵液を含む体液である請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の膵臓検査方法。

【請求項 6】

前記膵液および/または膵液を含む体液が、膵液分泌促進剤の投与により分泌させられた膵液および/または該膵液を含む体液である請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の膵臓検査方法。

【請求項 7】

前記膵液に含まれる蛋白質分解酵素の活性を阻害する蛋白質分解酵素阻害剤が収容された採取容器に採取された前記膵液および/または膵液を含む体液を使用する請求項 1 から請求項 6 のいずれかに記載の膵臓検査方法。

【請求項 8】

被検物質を標識物質によって標識する第 1 の抗体および該第 1 の抗体と複合体を形成した前記被検物質を吸着させる第 2 の抗体として、S 1 0 0 P の互いに異なるエピトープを認識する 2 つの抗 S 1 0 0 P 抗体を保持する免疫クロマトグラフィ装置を備える膵臓検査キット。

【請求項 9】

膵液に含まれる蛋白質分解酵素の活性を阻害する蛋白質分解酵素阻害剤が収容された採取容器をさらに備える請求項 8 に記載の膵臓検査キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膵臓検査方法および膵臓検査キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (I P M N) が膵癌の早期発見の手がかりとして注目されている。膵癌や I P M N の診断は、内視鏡検査や生検によって行われている。しかし、早期の膵癌や I P M N を内視鏡画像から発見することは難しく、生検においては膵臓から組織を採取するという作業そのものが難しい。したがって、これらの方法では十分な検査精度が得られない。

一方、膵癌や I P M N において、S 1 0 0 蛋白質ファミリーの 1 つである S 1 0 0 P が高い割合で過剰に発現することが知られている (例えば、非特許文献 1 , 2 参照。) 。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】Kenoki Ohuchida、外 9 名、“S100P Is an Early Developmental Marker of Pancreatic Carcinogenesis”、Clinical Cancer Research、2006年9月15日、第12巻、第18号、pp.5411-5416

【非特許文献 2】Mads Gronborg、外 8 名、“Comprehensive Proteomic Analysis of Hum

10

20

30

40

50

an Pancreatic Juice ”、Journal of Proteome Research、2004年9月17日、第3巻、第5号、pp.1042-1055

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

非特許文献1では、膵臓の組織や膵液中に含まれる膵細胞からRNAを抽出し、S100P遺伝子のmRNA発現レベルからS100Pの発現量を測定している。この方法では膵癌およびIPMNを高精度で検出できる。しかしながら、煩雑な多段階の工程が必要であり、検査には高額な費用と長い時間とが必要となる。非特許文献2では、膵液をTOF-MS（飛行時間型質量分析法）で解析することよりS100Pの発現量を測定しており、比較的大掛かりな設備が必要となる。すなわち、これらの方法で検査を実施できる施設は限られており、また、通常の臨床検査には不向きであるという不都合がある。

10

【0005】

本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、簡略な設備と手順でありながら膵疾患を高感度で検査することができる膵臓検査方法および膵臓検査キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記目的を達成するため、本発明は以下の手段を提供する。

本発明の第1の態様は、被検体から採取された膵液および/または膵液を含む体液に含まれるS100Pの濃度を免疫クロマトグラフィ法によって測定する膵臓検査方法である。

20

本発明の第1の態様によれば、被検体内から採取した膵液および/または膵液を含む体液に含まれるS100Pの濃度は、膵臓腫瘍、IPMN、慢性膵炎を含む膵疾患が存在する場合には高い確率で上昇するので、測定したS100Pの濃度の値から膵疾患の有無を高感度で検査することができる。この場合に、S100Pの濃度の測定に、操作が簡便で特別な設備を必要としない免疫クロマトグラフィ法を用いることにより、簡略な設備と手順でありながら膵疾患を高感度で検査することができる。

【0007】

上記第1の態においては、前記膵液が、膵管内から採取された膵液であってもよい。

30

このようにすることで、純度の高い膵液を用いることによって、被検体内において発現されたS100Pの濃度をより正確に測定することができる。

上記第1の態においては、前記膵液を含む体液が、十二指腸内から採取された体液であってもよく、該体液が十二指腸液であってもよい。

十二指腸内において、膵液を胆汁や十二指腸の分泌液と混合された状態で十二指腸液として採取することができる。このようにすることで、膵液を採取する際の被検体への侵襲を低減することができる。

【0008】

上記第1の態においては、前記膵液および/または膵液を含む体液が、膵液分泌促進剤の使用などの積極的な排出刺激をせずに、生理的に分泌された膵液および/または該膵液を含む体液であってもよい。

40

このようにすることで、検査に伴う被検体への負担を軽減することができる。

上記第1の態においては、前記膵液および/または膵液を含む体液が、膵液分泌促進剤の投与により分泌させられた膵液および/または該膵液を含む体液であってもよい。

このようにすることで、十分な量の膵液および/または膵液を含む体液を検査に用いることができる。

【0009】

上記第1の態においては、前記膵液に含まれる蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）の活性を阻害するプロテアーゼ阻害剤が収容された採取容器に採取された前記膵液および/または膵液を含む体液を使用してもよい。

50

このようにすることで、採取および検査の過程で腭液に含まれる蛋白質分解酵素によってS100Pが分解されてしまうことを防ぎ、検査精度を向上することができる。

【0010】

本発明の第2の態様は、被検物質を標識物質によって標識する第1の抗体および該第1の抗体と複合体を形成した前記被検物質を吸着させる第2の抗体として、S100Pの互いに異なるエピトープを認識する2つの抗S100P抗体を保持する免疫クロマトグラフィ装置を備える腭臓検査キットである。

上記第2の態様においては、腭液に含まれるプロテアーゼの活性を阻害するプロテアーゼ阻害剤が収容された採取容器をさらに備えていてもよい。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、簡略な設備と手順でありながら腭疾患を高感度で検査することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明の一実施形態に係る腭臓検査キットが備える採取容器の全体構成図である。

【図2A】本発明の一実施形態に係る腭臓検査キットが備える免疫クロマトグラフィ装置の内部構成を示す図である。

【図2B】図2Aの免疫クロマトグラフィ装置の外観を示す図である。

【図3】図1の採取容器の使用方法を説明する図である。

【図4】図1の採取容器の変形例を示す図である。

【図5】図1の採取容器のもう1つの変形例を示す図である。

【図6】実施例1において、腭液・十二指腸液中のS100P濃度を測定した結果を表すグラフである。

【図7】実施例1において、純粋腭液中のS100P濃度を測定した結果を表すグラフである。

【図8】実施例3において、5種類の腭疾患について腭液・十二指腸液中のS100P濃度を測定した結果を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下に、本発明の一実施形態に係る腭臓検査キットおよび該腭臓検査キットを使用した腭臓検査方法について図1から図5を参照して説明する。

本実施形態に係る腭臓検査キットは、図1に示されるように、シリンジの外筒2内にプロテアーゼ阻害剤Aが収容されてなる採取容器1と、図2Aおよび図2Bに示されるように、抗S100P抗体を保持する免疫クロマトグラフィ装置20とを備えている。

【0014】

採取容器1のシリンジは、外筒2と、該外筒2の内部空間を分画しつつ外筒2内において摺動可能に設けられたガスケット3と、該ガスケット3を押し引きするプランジャ4とを備えている。プロテアーゼ阻害剤Aは、ガスケット3により吸引口2a側に分画された空間内に配置されている。吸引口2aはキャップ5などによって密封されている。

【0015】

プロテアーゼ阻害剤Aは、水を主成分とする腭液および/または腭液を含む体液に容易に溶解する水溶性のものが用いられる。プロテアーゼ阻害剤Aとしては、例えば、スルホン系化合物であるフッ化フェニルメチルスルホン(PSF)、アミジノフェニルメチルスルフォニルフルオリド(APMSF)、4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルフォニルフルオリド(AESF)、トシル系化合物である1-クロロ-3-トシルアミド-7-アミノ-2-ヘプタノン塩酸塩(TLCK-HCL)、または、ペプチド系の阻害剤であるアプロチニン、ロイペプチン等が好適に用いられる。これらのプロテアーゼ阻害剤Aは、主にセリンプロテアーゼを不可逆的に阻害するものであり、腭液に多く含

10

20

30

40

50

まれるプロテアーゼであるアミラーゼ、トリプシン、エラスターゼなどを強力に阻害する。

【0016】

プロテアーゼ阻害剤 A は、1種類のみが外筒 2 内に收容されていてもよいし、2種類以上が外筒 2 内に收容されていてもよい。また、プロテアーゼ阻害剤 A は、リパーゼなどの他の消化酵素の活性を阻害する阻害剤とともに收容されていてもよい。

プロテアーゼ阻害剤 A は、凍結乾燥された粉体である。これにより、プロテアーゼ阻害剤 A は、さらに容易に腩液および / または腩液を含む体液に溶解させられる。

【0017】

採取容器 1 により採取される被検液の採取量は、採取容器 1 の内容量に応じて、または、検査に必要な被検液の量に応じて予め所定量に設定されている。外筒 2 内に收容されるプロテアーゼ阻害剤 A の重量は、採取すべき所定量の被検液に溶解させられたときにプロテアーゼ阻害剤 A の濃度が所望の数値になるように決定される。

10

【0018】

免疫クロマトグラフィ装置 20 は、図 2 A に示されるように、被検液が展開される担体 21 と、担体 21 の両端にそれぞれ配置されたサンプルパッド 22 および吸収パッド 23 とを備えている。

担体 21 は、被検液を展開可能なものであればよく、例えば、ニトロセルロース製のメンブレンフィルターなどが好適に用いられる。担体 21 には、第 1 の抗体が保持された帯状の標識領域 21 a と、該標識領域 21 a から間隔をあけた位置において第 2 の抗体が固相化された帯状の吸着領域 21 b とが設けられている。第 1 の抗体および第 2 の抗体は、S 100 P の互いに異なるエピトープを認識する抗 S 100 P 抗体である。

20

【0019】

第 1 の抗体は、所定の色を呈する物質、例えば、金コロイドや白金コロイド等の金属コロイド、または、彩色されたポリスチレンラテックス等の合成ラテックスや天然ゴムラテックスなどからなるラテックスコロイド（標識物質）によって標識されている。

第 1 の抗体を標識する標識物質は、酵素や放射性物質などであってもよい。

【0020】

サンプルパッド 22 は、吸水性に優れた材料、例えば、多孔質ポリエチレンや多孔質ポリプロピレン等の多孔質合成樹脂からなるシートまたはフィルム、もしくは、濾紙や綿布などのセルロース製の紙、織布または不織布等からなる。

30

吸収パッド 23 は、液体を迅速に吸収して保持できる材質、例えば、綿布、濾紙や、ポリエチレンやポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等からなる。

【0021】

これらの担体 21、サンプルパッド 22 および吸収パッド 23 は、図 2 B に示されるように、プラスチック製のケース 24 によって外装されている。ケース 24 は、サンプルパッド 22 に対応する位置において滴下窓 24 a が開口し、吸着領域 21 b に対応する位置において観察窓 24 b が開口している。

【0022】

このように構成された免疫クロマトグラフィ装置 20 を使用するには、操作者は、滴下窓 24 a からサンプルパッド 22 に被検液を滴下する。滴下された被検液はサンプルパッド 22 から吸収パッド 23 に向かって担体 21 を移動することにより展開される。展開の途中に、被検液に含まれる S 100 P は、標識領域 21 a において第 1 の抗体と結合して複合体を形成する。その後、該複合体は吸着領域 21 b において第 2 の抗体と結合することにより吸着領域 21 b に吸着される。そして、複合体が吸着領域 21 b に集積することにより吸着領域 21 b は所定の色を呈する。したがって、操作者は、観察窓 24 b 内に所定の色のパンドが出現したか否か、または、パンドの色の濃さから、S 100 P の有無または濃度を測定することができる。

40

【0023】

次に、このように構成された膵臓検査キットを使用した膵臓検査方法について説明する

50

。

本実施形態に係る膵臓検査方法は、被検体の十二指腸内から膵液を含む十二指腸液を採取容器内に採取し、採取した膵液を含む十二指腸液中のS100Pの濃度を免疫クロマトグラフィ装置20を使用して測定することにより行われる。十二指腸液の採取方法および採取容器は例示するカテーテルおよびシリンジに限定されず、膵液および/または膵液を含む体液が採取できればよい。

【0024】

具体的には、まず、十二指腸内に挿入した内視鏡のチャンネルを介してカテーテルを十二指腸内の乳頭部近傍に配置し、図3に示されるように、カテーテル6の基端を外筒2の吸引口2aに接続し、プランジャ4を引っ張る。これにより、乳頭部から十二指腸内に分泌された膵液を胆汁や十二指腸分泌液とともに十二指腸液として吸引して外筒2内に採取することができる。

10

【0025】

十二指腸液を吸引する前に、膵臓における膵液の分泌および乳頭部から十二指腸内への膵液の排出を促進する処置、例えば、セクレチンなどの膵液分泌促進剤の被検体への投与を行ってもよい。また、このような処置を行わずに、生理的な条件で十二指腸内に排出された膵液および/または該膵液を含む十二指腸液を採取してもよい。

【0026】

外筒2内に所定量まで膵液と胆汁、十二指腸分泌液との混合液(以下、膵液・十二指腸液という。)を採取した後、吸引口2aからカテーテル6を取り外し、外筒内2の膵液・十二指腸液を吸引口2aから免疫クロマトグラフィ装置20の滴下窓24aに滴下する。その後、膵液・十二指腸液が十分に担体21上に展開されるまで、例えば、5分から15分間待つ。以上の手順により、膵液・十二指腸液中のS100Pの有無、つまり、膵癌またはIPMNなどの膵疾患の有無を、観察窓24b内のバンドの出現の有無として検査することができる。なお、膵臓検査キットに緩衝液などからなる希釈液が付属され、該希釈液によって膵液・十二指腸液を希釈した後に滴下窓24aに滴下してもよい。

20

【0027】

観察窓24b内にバンドが観察された場合は、バンドの呈色の濃さを目視または免疫クロマトグラフィ用の読み取り機で測定することにより、S100Pの濃度を測定する。健康な人の膵液・十二指腸液から予め得られたバンドの呈色の濃さを基準値とし、この基準値と測定されたバンドの呈色の濃さとを比較することにより被検体の膵疾患の有無を判定してもよい。この場合、基準値の設定は、膵管内から採取した純粋膵液と膵液・十二指腸液とのいずれを用いるかによって異なり、また、採取量や採取に要する時間、膵液分泌促進剤を用いるか否かによっても異なる。したがって、様々な条件の下で被検液である膵液および/または膵液を含む体液を採取した場合の基準値が必要となる。

30

【0028】

この場合に、本実施形態によれば、膵液および/または膵液を含む体液中に含まれるS100Pの濃度と膵疾患の有無の間には高い相関があり、膵疾患が存在する場合には高い割合で膵液および/または膵液を含む体液中のS100Pの濃度が上昇する。したがって、膵疾患の有無を高い感度で検査することができる。

40

【0029】

さらに、膵液・十二指腸液は、カテーテル6から外筒2内に流入させられた後に外筒2内において迅速にプロテアーゼ阻害剤Aと混合させられる。これにより、膵液・十二指腸液中に含まれるS100Pの分解が迅速に抑制されるので、正確なS100Pの濃度を測定することができ、検査感度をさらに向上することができる。特に膵液は他の消化液に比べてプロテアーゼの活性が高いので、外筒2内に採取された膵液・十二指腸液中のプロテアーゼ阻害剤Aの濃度が十分に高くなるようプロテアーゼ阻害剤Aの収容量を設定することにより、検査精度を効果的に向上することができる。

【0030】

また、十二指腸に排出された膵液を十二指腸液として採取して検査に用いることにより

50

、膵管内にカテーテル6を挿入して膵管内の純粋膵液を採取する場合と比べて侵襲を低減しながら簡便に膵液を採取することができる。また、免疫クロマトグラフィ装置20の操作に特別な設備や長い時間を必要としないので、例えば、比較的規模の小さいかかりつけの病院等でも、安価にかつ短時間で高感度な検査を実施することができる。

【0031】

なお、本実施形態においては、乳頭部から十二指腸内に排出されて胆汁、十二指腸分泌液と混合された膵液を検査に使用することとしたが、これに代えて、膵管内から採取された純粋膵液を検査に使用してもよい。純粋膵液は、造影しながらカテーテルを乳頭部から膵管内に挿入して吸引したり、バルーンカテーテルやチューブを膵管内に一定時間留置したりすることにより採取することができる。

10

このようにすることで、膵管内から採取された純粋膵液は、十二指腸液によって希釈されることがないので、被検体内でのより正確なS100Pの濃度を測定することができる。

【0032】

また、本実施形態においては、プロテアーゼ阻害剤Aとして、凍結乾燥された粉体のものを用いることとしたが、これに代えて、緩衝液などに溶解された液体のものを用いてもよい。このようにすることで、膵液・十二指腸液の採取量が少量であっても、プロテアーゼ阻害剤Aを容易に均一に膵液・十二指腸液と混合させることができる。

【0033】

また、本実施形態においては、採取容器1としてシリンジを用いた構成のものを例示したが、採取容器1の構成はこれに限定されるものではなく、接続されたカテーテル内を介して膵液および/または膵液を含む体液を吸引可能であり、膵液および/または膵液を含む体液が接触させられ膵液に含まれるプロテアーゼの活性を阻害するプロテアーゼ阻害剤が収容されている構成であればよい。例えば、採取容器1として、図4に示されるように、トラップ型の容器を用いもよく、図5に示されるように、内部が真空状態の容器を用いてもよい。

20

【0034】

また、採取容器は、採取されてきた膵液および/または膵液を含む体液が、容器内に予め収容されたプロテアーゼ阻害剤Aと迅速に接触させられる構成であればよく図1、図4および図5に例示されている採取容器1以外の採取容器を採用することとしてもよい。また、例示したカテーテル以外の採取手段、例えば、吸引、吸収、回収などにより膵液および/または膵液を含む体液を採取する構成であってもよい。採取容器の構成は、採取手段に応じて選択することができる。

30

【0035】

図4に示される採取容器1は、カテーテル6に接続される吸引口2aと、排気ポンプ等に接続されたチューブ7に接続される排気口2bとを備え、排気口2bから排気することによって、吸引口2bから膵液・十二指腸液が流入して貯留するようになっている。

図5に示される採取容器1は、例えば、ゴムなどの弾性部材からなる栓8によって開口が塞がれ、カテーテル6に接続された中空針9を栓8に貫通させることにより、膵液・十二指腸液が内部に吸引されるようになっている。

40

このようにしても、膵液および/または膵液を含む体液に含まれるプロテアーゼの活性を、採取後迅速に阻害し、採取された膵液に含まれるS100Pの検査精度を向上することができる。

【0036】

ここで、従来の体液の採取容器の場合、カテーテルの基端に採取容器を接続して膵液および/または膵液を含む体液を貯留しながら吸引し、吸引が終了した後に膵液および/または膵液を含む体液を分注してプロテアーゼ阻害剤を添加するため、吸引の最中にも採取容器内において蛋白質の分解が進行してしまい、採取した膵液および/または膵液を含む体液から正確な検査結果を得ることが難しいという問題があった。

これに対して、本実施形態に係る採取容器1によれば、採取した膵液および/または膵

50

液を含む体液中に含まれるプロテアーゼの活性を迅速に抑制することにより、S100Pのみならず膵液および/または膵液を含む体液中に含まれる他の蛋白質についても検出精度を向上することができ、他の蛋白質をマーカーとした膵臓検査にも有効に用いることができる。

【0037】

また、本実施形態においては、S100Pの濃度を免疫クロマトグラフィ法によって測定することとしたが、固相化された抗体を用いて簡便に測定できる方法であれば他の測定方法を使用してもよい。例えば、小型の表面プラズモン共鳴装置(SPR)やマイクロフルイディスクスなどを使用して測定してもよい。

【実施例】

10

【0038】

次に、上述した実施形態に係る膵臓検査方法の実施例について説明する。

〔実施例1〕

本発明に係る膵臓検査方法の検査感度を以下の実験により評価した。

被検体として31人の膵癌患者群および7人のIPMN患者群からカテーテル吸引により被検液である膵液および膵液を含む体液を採取した。患者から採取した被検液を採取後迅速に凍結保存した後、各被検液中に含まれるS100Pの濃度をサイクレックス社製のELISAキットを使用して測定した。対照群として、6人の良性の膵のう胞患者(MCN、SCN)についても同様の方法で被検液の採取および測定を行った。各患者の疾患は病理診断によって診断した。

20

【0039】

被検液としては、膵管内から採取した純粋膵液および膵液・十二指腸液を用いた。膵液・十二指腸液については、生理的に分泌および排出された膵液(以下、膵液・十二指腸液(-)という。)を含む十二指腸液およびセクレチン投与による膵液の分泌促進後に採取した十二指腸液(以下、膵液・十二指腸液(+)という。)を用いた。さらに、膵液・十二指腸液(-)、(+)については、プロテアーゼ阻害剤が収容された採取容器(阻害剤(+))および空の採取容器(阻害剤(-))を使用して採取したものを測定した。その測定結果を図6および図7に示す。

【0040】

図6および図7において、横軸は患者の症例を示し、縦軸は純粋膵液中または十二指腸液中のS100Pの濃度を示している。各ドットは、各患者から上記条件で採取された膵液または十二指腸液中のS100Pの濃度を示している。

30

【0041】

次に、対照群から得られたS100Pの濃度の最も高い値をカットオフ値とし、膵癌患者およびIPMN患者から得られたS100Pの濃度がカットオフ値を超えた場合に、その患者が膵癌またはIPMNの検査に陽性であると判定した。そして、各検査条件において、31人の膵癌患者群および7人のIPMN患者群のうち正常に検査が済んだ患者の合計に対して陽性と判定された患者の割合を陽性率として算出した。その結果を表1に示す。上述の条件で正常に採取できなかった被検液のデータは、表1、図6および図7に示す統計から除外されている。

40

【0042】

【表 1】

被検液	プロテアーゼ 阻害剤	分泌促進	カットオフ値 (ng/ml)	陽性率 (%)	
				膵癌	IPMN
純粋膵液	無	有	3000	77 (23/30)	86 (23/30)
		無	1000	55 (17/31)	57 (4/7)
膵液・十二指腸液	有	有	500	39 (12/31)	17 (1/6)
		無	500	93 (25/27)	67 (2/3)
		有	500	81 (22/27)	33 (1/3)

10

20

30

40

【0043】

表1から分かるように、いずれの検査条件においても高い陽性率が得られた。すなわち、膵液・十二指腸液または純粋膵液に含まれるS100Pの濃度を測定することにより膵

50

癌またはIPMNの有無を高感度で検査することができ、本発明の膵臓検査方法は膵癌またはIPMNの検査に有用であることが確認された。

【0044】

また、膵液・十二指腸液を用いた検査においては、プロテアーゼ阻害剤入りの本発明に係る採取容器を使用することにより検査感度を大幅に高めることができることが確認された。すなわち、プロテアーゼ阻害剤入りの採取容器は、膵液とともに分泌された豊富なプロテアーゼによるS100Pの分解を阻害することにより、特に分泌促進を行う場合の検査に対して有効であることが確認された。

【0045】

〔実施例2〕

次に、実施例1で用いたELISAに使用されている2種類の抗S100P抗体(MBL社製)を第1の抗体および第2の抗体として用いて本実施例に係る免疫クロマトグラフィ装置を作成した。該免疫クロマトグラフィ装置によって実施例1に用いた被検液を検査することにより、ELISA法と免疫クロマトグラフィ法とからそれぞれ得られる検査結果の相関を確認した。

【0046】

担体をニトロセルロース膜で作成し、第1の抗体を金コロイドで標識し、本実施例に係る免疫クロマトグラフィ装置を作成した。そして、作成した免疫クロマトグラフィ装置を使用して実施例1の被検液を検査し、バンドの呈色の有無および呈色の濃さを測定した。

【0047】

測定された免疫クロマトグラフィ装置の呈色の濃さを3つの階級に区分したところ、ELISA法で定量した濃度との間に相関があることが確認された。本実施例の検査に要した時間は約15分であった。すなわち、免疫クロマトグラフィ法を用いることにより、短時間で十分に感度の高い検査結果を得られることが確認された。

【0048】

〔実施例3〕

実施例1の結果を元に、セレクチン投与による分泌促進を行わず、プロテアーゼ阻害剤を採取容器内に予め収容しておく方法にて、膵癌患者41例、IPMN患者17例、良性膵のう胞(SCN、MCN)患者6例、慢性膵炎患者4例、膵内分泌腫瘍患者3例について、膵液・十二指腸液を採取し、S100Pの濃度を測定した。膵液・十二指腸液の採取およびS100P濃度の測定は実施例1と同様の方法で行った。その測定結果を図8に示す。図8において、縦軸は対数表示となっている。

【0049】

良性膵のう胞患者6例から得られたS100Pの濃度の測定値のうち最も高い値をカットオフ値に設定し、各症例における陽性率を算出した。その結果、膵疾患の陽性率は、膵癌では90%、IPMNでは90%、慢性膵炎では100%、膵内分泌腫瘍では100%であった。

以上の実験結果から、膵液を含む十二指腸液中のS100P濃度を測定することにより上記の様々な膵疾患を高感度に検出できることが確認された。

【符号の説明】

【0050】

- 1 採取容器
- 2 外筒
- 2 a 吸引口
- 2 b 排気口
- 3 ガスケット
- 4 プランジャ
- 5 キャップ
- 6 カテーテル
- 7 チューブ

10

20

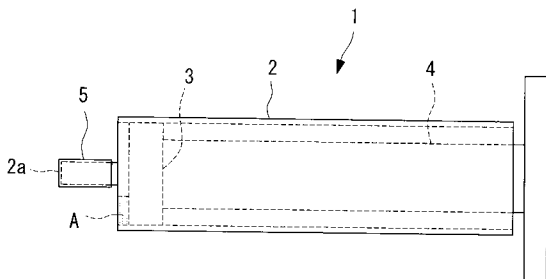
30

40

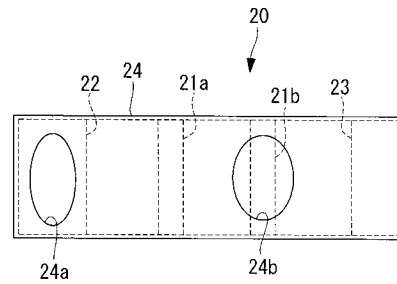
50

- 8 栓
- 9 中空針
- 20 免疫クロマトグラフィ装置
- 21 担体
- 21a 標識領域（第1の抗体、抗S100P抗体）
- 22b 吸着領域（第2の抗体、抗S100P抗体）
- 22 サンプルパッド
- 23 吸収パッド
- 24 ケース
- 24a 滴下窓
- 24b 観察窓
- A 蛋白質分解酵素阻害剤
- B 唾液

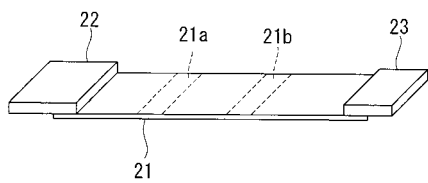
【図1】



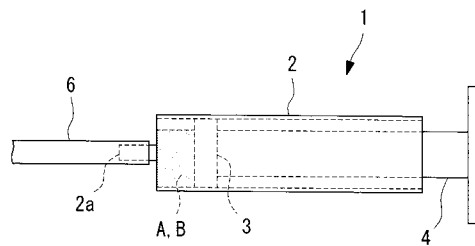
【図2B】



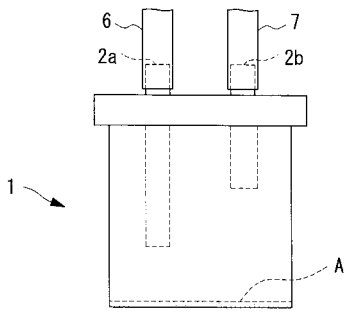
【図2A】



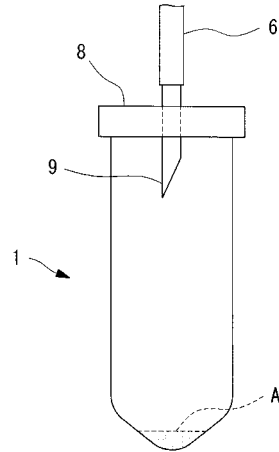
【図3】



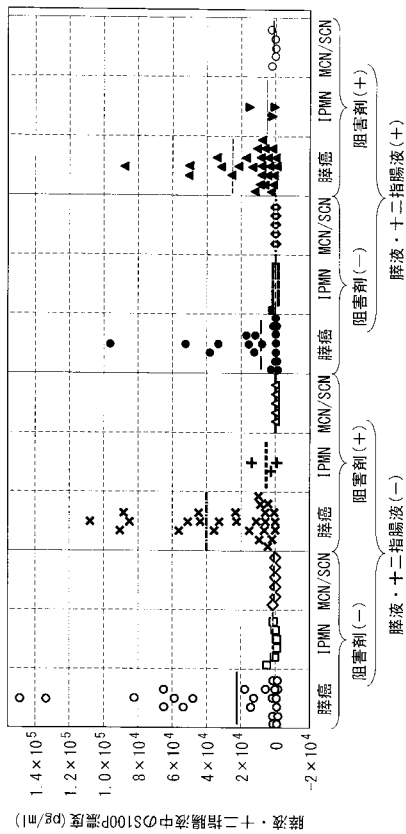
【 図 4 】



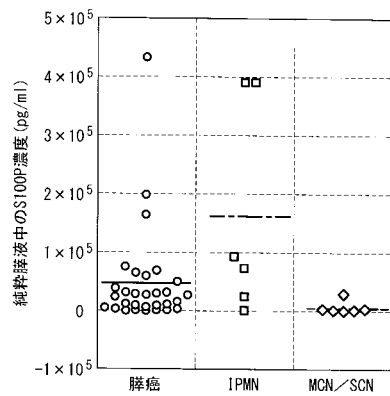
【 図 5 】



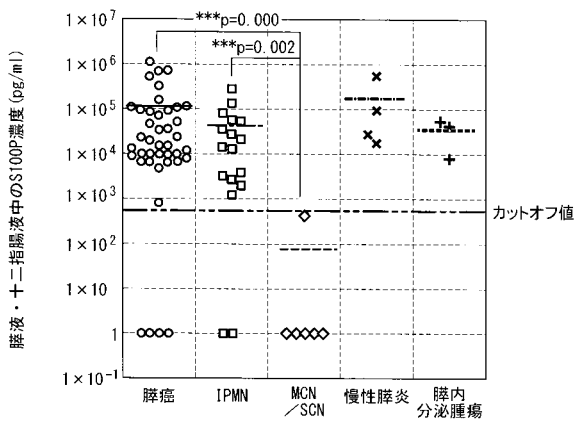
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年3月14日 (2014.3.14)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

被検体から採取された膵液および膵液を含む体液のうち少なくとも一方に含まれる S 1 0 0 P の濃度を、固相化された抗体を用いて測定する膵疾患の検出方法。

【 請求項 2 】

前記 S 1 0 0 P の濃度を、前記固相化された抗体を用いた免疫クロマトグラフィ法によって測定する請求項 1 に記載の膵疾患の検出方法。

【 請求項 3 】

前記膵液が、膵管内から採取された膵液である請求項 1 または請求項 2 に記載の膵疾患の検出方法。

【 請求項 4 】

前記膵液を含む体液が、十二指腸内から採取された体液である請求項 1 または請求項 2 に記載の膵疾患の検出方法。

【 請求項 5 】

前記膵液を含む体液が、十二指腸液である請求項 4 に記載の膵疾患の検出方法。

【 請求項 6 】

前記膵液および膵液を含む体液が、生理的に分泌された膵液および該膵液を含む体液である請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の膵疾患の検出方法。

【請求項 7】

前記膵液および膵液を含む体液が、膵液分泌促進剤の投与により分泌させられた膵液および該膵液を含む体液である請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の膵疾患の検出方法。

【請求項 8】

前記膵液に含まれる蛋白質分解酵素の活性を阻害する蛋白質分解酵素阻害剤が収容された採取容器に採取された前記膵液および膵液を含む体液のうち少なくとも一方を使用する請求項 1 から請求項 7 のいずれかに記載の膵疾患の検出方法。

【請求項 9】

被検物質を標識物質によって標識する第 1 の抗体および該第 1 の抗体と複合体を形成した前記被検物質を吸着させる第 2 の抗体として、S 1 0 0 P の互いに異なるエピトープを認識する 2 つの抗 S 1 0 0 P 抗体を保持する免疫クロマトグラフィ装置を備える膵臓検査キット。

【請求項 10】

膵液に含まれる蛋白質分解酵素の活性を阻害する蛋白質分解酵素阻害剤が収容された採取容器をさらに備える請求項 9 に記載の膵臓検査キット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

また、本実施形態においては、S 1 0 0 P の濃度を免疫クロマトグラフィ法によって測定することとしたが、固相化された抗体を用いて簡便に測定できる方法であれば他の測定方法を使用してもよい。例えば、小型の表面プラズモン共鳴装置 (SPR) やマイクロフルイディクスなどを使用して測定してもよい。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

〔実施例 3〕

実施例 1 の結果を元に、セクレチン 投与による分泌促進を行わず、プロテアーゼ阻害剤を採取容器内に予め収容しておく方法にて、膵癌患者 41 例、IPMN 患者 17 例、良性膵のう胞 (SCN、MCN) 患者 6 例、慢性膵炎患者 4 例、膵内分泌腫瘍患者 3 例について、膵液・十二指腸液を採取し、S 1 0 0 P の濃度を測定した。膵液・十二指腸液の採取および S 1 0 0 P 濃度の測定は実施例 1 と同様の方法で行った。その測定結果を図 8 に示す。図 8 において、縦軸は対数表示となっている。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/059222
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-529920 A (Wyeth), 27 August 2009 (27.08.2009), paragraph [0161] & US 2007/0253950 A1 & EP 2001907 A	8, 9
Y	WO 2010/047448 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY), 29 April 2010 (29.04.2010), [198] to [214]; fig. 12 & KR 10-2010-0044307 A	8, 9
Y	Joao A. Paulo, Optimized sample preparation of endoscopic collected pancreatic fluid for SDS- PAGE analysis, Electrophoresis, 2010.07, Vol.31/ No.14, 2377-2387	9
<input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 April, 2012 (25.04.12)		Date of mailing of the international search report 15 May, 2012 (15.05.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059222

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1-7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-7 pertain to diagnostic method for a human body comprising "method for inspection of pancreas", and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/059222									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N33/53(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. G01N33/543, G01N33/53											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012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) CA/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)											
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									
Y	JP 2009-529920 A (ワイス) 2009.08.27, 【0161】 & US 2007/0253950 A1 & EP 2001907 A	8,9									
Y	WO 2010/047448 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 2010.04.29, [198]-[214], [Fig.12] & KR 10-2010-0044307 A	8,9									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が挙示されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 25.04.2012		国際調査報告の発送日 15.05.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 吉田 将志	2J 4636								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/059222

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
Y	Joao A. Paulo, Optimized sample preparation of endoscopic collected pancreatic fluid for SDS-PAGE analysis, Electrophoresis, 2010.07, Vol.31/No.14, 2377-2387	9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 9 2 2 2

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1-7 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項1-7は「膵臓検査方法」という人の身体の診断方法であり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 守屋 奈緒

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリパス株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BB32 CB30 DA36 FA18 FB03 GC12

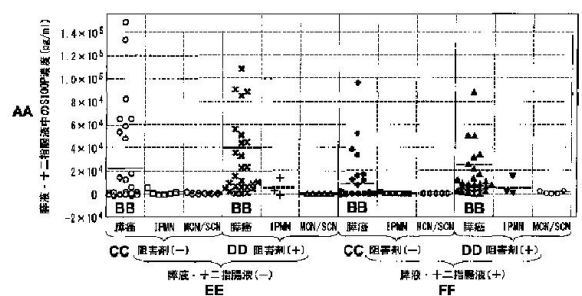
(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	胰腺试验方法和胰腺检测试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2012137832A1	公开(公告)日	2014-07-28
申请号	JP2013508905	申请日	2012-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	奥林巴斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	奥林巴斯公司		
[标]发明人	佐貫博美 片岡理惠 守屋奈緒		
发明人	佐貫 博美 片岡 理惠 守屋 奈緒		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/48		
CPC分类号	A61B10/0045 G01N33/57438 G01N33/6893 G01N2800/067 A61B5/4216 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/487		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.521 G01N33/48.S G01N33/48.E		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BB32 2G045/CB30 2G045/DA36 2G045/FA18 2G045/FB03 2G045/GC12		
代理人(译)	上田邦夫 藤田 考晴		
优先权	2011083910 2011-04-05 JP		
其他公开文献	JP5984795B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

即使使用简单的设备和简单的程序，也可以高灵敏度测试胰腺疾病。本发明提供一种胰腺检查方法，其中，通过免疫色谱法对从被检查者收集的胰液和/或含有胰液的体液中所含的S100P的浓度进行测定。另外提供了一种胰腺测试试剂盒，其包括容纳抗S100P抗体的免疫层析装置和保留有抑制胰液中所含蛋白酶活性的蛋白酶抑制剂的收集容器。

【006】



AA CONCENTRATION OF S100P IN PANCREATIC JUICE/DUODENAL JUICE (Pg/ml)
 BB PANCREATIC CANCER
 CC INHIBITOR (-)
 DD INHIBITOR (+)
 EE PANCREATIC JUICE/DUODENAL JUICE (-)
 FF PANCREATIC JUICE/DUODENAL JUICE (+)