

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6583785号
(P6583785)

(45) 発行日 令和1年10月2日 (2019. 10. 2)

(24) 登録日 令和1年9月13日 (2019. 9. 13)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/574 (2006. 01)

GO 1 N 33/574 D

GO 1 N 33/48 (2006. 01)

GO 1 N 33/574 A

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 P

GO 1 N 33/53 Y

請求項の数 10 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2015-557918 (P2015-557918)
 (86) (22) 出願日 平成27年1月20日 (2015. 1. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/051290
 (87) 国際公開番号 W02015/108195
 (87) 国際公開日 平成27年7月23日 (2015. 7. 23)
 審査請求日 平成30年1月17日 (2018. 1. 17)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-7607 (P2014-7607)
 (32) 優先日 平成26年1月20日 (2014. 1. 20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 518018333
 川原井 晋平
 神奈川県相模原市中央区淵野辺1丁目17
 - 7 1 麻布大学内
 (74) 代理人 110001807
 特許業務法人磯野国際特許商標事務所
 (72) 発明者 川原井 晋平
 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-
 7 1 麻布大学内
 (72) 発明者 斑目 広郎
 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-
 7 1 麻布大学内
 (72) 発明者 圓尾 拓也
 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-
 7 1 麻布大学内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非ヒト動物の悪性腫瘍の悪性度の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非ヒト動物の腫瘍の悪性度を評価する方法であって、腫瘍細胞を含む対象動物由来の試料中の細胞に発現しているCD34を検出し、試料中に存在する細胞に対する該CD34を発現する細胞の割合を算出し、その割合に基づいて該腫瘍の悪性度を評価する方法。

【請求項 2】

前記CD34を発現している細胞の割合が、試料中に存在する細胞の20%以上である場合に、該腫瘍の悪性度が高いと判断することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記CD34の発現を検出することが、免疫組織化学的染色法であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記「CD34を発現する細胞」を、抗CD34抗体による細胞の染色性に基づいて評価することを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記染色性が2+である場合に、「CD34を発現する細胞」と評価するものであり、

前記評価は、

前記抗CD34抗体を使用した免疫組織化学的手法により前記細胞を染色し、

次いで、前記染色した細胞を低倍率で顕微鏡観察して最も染色強度が高い領域を選択し

次いで、前記領域を高倍率視野下で観察を行い、観察対象の細胞を100個選び、
 次いで、選んだ100個の前記細胞の各々の染色強度を、
 0：染色性が認められない、あるいは、バックグラウンドと同程度にわずかに染色され
 ている細胞、

1+：低倍率では0と区別がつかないが、高倍率で淡く染色性が確認される細胞、

2+：低倍率で染色性が確認可能で、高倍率で完全に染色性が確認される細胞、

3+：低倍率で完全に染色性が確認される細胞、

の4つに分類して行うことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記非ヒト動物が、イヌ又はネコであり、前記腫瘍が皮膚肥満細胞腫であることを特徴
 とする請求項1乃至5のいずれかに記載の方法。

10

【請求項7】

非ヒト動物の腫瘍の補助療法又は内科的療法の要否を決定するために使用することを特
 徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

非ヒト動物の腫瘍の外科手術を行う場合の切除範囲を決定するために使用することを特
 徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

非ヒト動物の腫瘍の予後の予測を行うために使用することを特徴とする請求項1乃至6
 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項10】

抗CD34抗体を含んでなる、非ヒト動物の腫瘍の悪性度を評価するための診断用キットで
 あって、

前記非ヒト動物がイヌ又はネコであり、前記腫瘍が皮膚肥満細胞腫であることを特徴と
 する診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非ヒト動物の悪性腫瘍の悪性度の評価方法に関する。より具体的には、発明
 の非ヒト動物の悪性腫瘍の悪性度の評価方法には、該腫瘍の予後の予測方法も含まれる。

30

【背景技術】

【0002】

肥満細胞腫（Mast cell tumors ; MCT）は、イヌやネコに多い腫瘍で、皮膚に発生する
 ことが多く、イヌの場合皮膚腫瘍の中で1番多く、ネコでは2番目に多いとされている。

イヌの皮膚肥満細胞腫は、全皮膚腫瘍の7～21%の割合を占める一般的な皮膚腫瘍の1つ
 であり、その生物学的挙動は非常に多様である。臨床的に外科切除で完治する可能性のある
 良性のものが存在する一方で、領域リンパ節に浸潤するものや外科切除後に再発するもの、
 致命的な転移を起こすものなど様々なタイプの症例が知られている。そのため、イヌの
 皮膚肥満細胞腫の悪性度の指標、あるいは、予後を予測するための指標が必要とされて
 きた。

40

【0003】

皮膚肥満細胞腫の挙動を予測するために臨床ステージ、成長率、腫瘍の存在位置、増殖
 活性、腫瘍内血管新生などがこれまで指標として研究されてきたが、現在、イヌの皮膚肥
 満細胞腫の予後及び治療法の決定は主に病理組織学的グレード分類に基づいて行われて
 いる。これまで2種類の病理組織学的グレード分類法が提唱されてきたが、イヌの皮膚肥満
 細胞腫については、1984年にPatnaikらにより提唱されたPatnaikの分類法（非特許文献1）
 が最も一般的に用いられている。Patnaikの分類法は、病変部の範囲、細胞密度、細胞
 形態、核分裂指数、間質反応などに基づいて、高分化型（グレードI）、中等度分化型（
 グレードII）、低分化型（グレードIII）と分類する。しかしながら、イヌの皮膚肥満細
 胞腫の大部分はグレードIIに分類されるところ、その予後は様々であり、病理医間の一致

50

率が低いなど、Patnaikの分類法については議論の余地が残っている（非特許文献2）。従って、イヌの皮膚肥満細胞腫の予後因子を含めた腫瘍の悪性度を評価する因子について病理組織学的分類の他に、近年様々な因子が検討されている。

【0004】

例えば、予後因子としては、有糸分裂指数（Mitotic Index；MI）が最も重要な指標の一つとされているが（非特許文献3）、その他に、皮膚肥満細胞腫の腫瘍細胞の増殖度に関与するKi67（MIB-1）核抗原標識指数、核小体形成領域関連蛋白（AgNOR）、増殖性細胞核抗原（PCNA）（非特許文献4～6）や、一部の肥満細胞腫の進行に関与するとされている突然変異したc-kit癌原遺伝子産物であるKITの免疫発現パターン（非特許文献4及び7）、肥満細胞内に存在する中性プロテアーゼの1つであるトリプターゼ（非特許文献7）

10

などが報告されている。

【0005】

腫瘍の予後を正確に見極めることは、該腫瘍の悪性度を把握する上でも、また、治療方針を決定する上で重要なことであり、とりわけ、外科的手術を行う場合には、切除する範囲を決定する上で必要なことである。イヌの皮膚肥満細胞腫は悪性である場合が少なくなく、外科的手術が必要となる場合が多い中、上記のように、現在のところ、肥満細胞腫の悪性度の評価方法、及び、予後判断の方法は、必ずしも十分な情報を提供しているとは言えない状況にある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0006】

【非特許文献1】Patnaikら、Vet Pathol, 21:469-474, 1984

【非特許文献2】Kiupelら、Vet Pathol, 48:147-155, 2011

【非特許文献3】Elstonら、Vet Pathol, 46:362-365, 2009

【非特許文献4】Gil da Costaら、BMC Veterinary Research, 3:19, doi10.1186/1746-6148-3-19, 2007

【非特許文献5】Simoesら、Vet Pathol. 31:637-647, 1994

【非特許文献6】Abadieら、J Am Vet Med Assoc. 215:1629-1634, 1999.

【非特許文献7】Kiupelら、Vet Pathol, 41:371-377, 2004

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記事情に鑑み、本発明者らは、非ヒト動物の悪性腫瘍の悪性度の評価、及び、予後の予測をより正確に行うための方法を検討した。

すなわち、本発明は、非ヒト動物の悪性腫瘍の悪性度の評価、及び、予後を予測する方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明者らは、イヌの肥満細胞腫の予後あるいは転移の可能性を表す指標として、肥満細胞腫由来の腫瘍細胞におけるCD34の発現状況を手がかりにすることができないか検討を行った。CD34は膜貫通タンパクで、通常、骨格筋の衛星細胞、消化管のカハール介在細胞、血管内皮、脳の神経細胞体、真皮の樹状細胞に発現する。また、CD34は造血幹細胞に発現を認め、CD34陽性細胞は肥満細胞の前駆細胞として知られているため（Kawarai et al., J Vet Med Sci. 2010 Feb;72(2):131-40）、過去に報告されているKITと同様にCD34は皮膚肥満細胞腫の腫瘍細胞の分化度により、その発現に違いが生じる可能性があった。また、CD34を欠損させたマウスより得られた骨髓由来培養肥満細胞は、野生型のマウスから得られた肥満細胞と比べて細胞同士が凝集することも報告されていた（Drew E, et al., Immunity. 2005 Jan;22(1):43-57.）。そこで、発明者らは、新たな予後あるいは転移の因子としての可能性について検討した結果、イヌの皮膚肥満細胞腫由来の試料において、抗CD34抗体による免疫染色のレベルが染色性+2（後述）以上である細胞の割合が、およ

40

50

そ20%以上である場合に、予後が不良となることを初めて見出した。

【0009】

すなわち、本発明は以下の(1)～(11)である。

(1) 非ヒト動物の腫瘍の悪性度を評価する方法であって、腫瘍細胞を含む対象動物由来の試料中の細胞に発現しているCD34を検出し、試料中に存在する細胞に対する該CD34を発現する細胞の割合を算出し、その割合に基づいて該腫瘍の悪性度を評価する方法。

(2) 前記CD34を発現している細胞の割合が、試料中に存在する細胞の20%以上である場合に、該腫瘍の悪性度が高いと判断することを特徴とする上記(1)に記載の方法。

(3) 前記CD34の発現を検出することが、免疫組織化学的染色法であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 前記「CD34を発現する細胞」を、抗CD34抗体による細胞の染色性に基づいて評価することを特徴とする上記(3)に記載の方法。

(5) 前記染色性が2+である場合に、「CD34を発現する細胞」と評価するものであり、前記評価は、前記抗CD34抗体を使用した免疫組織化学的手法により前記細胞を染色し、次いで、前記染色した細胞を低倍率で顕微鏡観察して最も染色強度が高い領域を選択し、次いで、前記領域を高倍率視野下で観察を行い、観察対象の細胞を100個選び、次いで、選んだ100個の前記細胞の各々の染色強度を、0：染色性が認められない、あるいは、バックグラウンドと同程度にわずかに染色されている細胞、1+：低倍率では0と区別がつかないが、高倍率で淡く染色性が確認される細胞、2+：低倍率で染色性が確認可能で、高倍率で完全に染色性が確認される細胞、3+：低倍率で完全に染色性が確認される細胞、の4つに分類して行うことを特徴とする上記(4)に記載の方法。

(6) 前記非ヒト動物が、イヌ又はネコであり、前記腫瘍が皮膚肥満細胞腫であることを特徴とする上記(1)乃至(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 非ヒト動物の腫瘍の補助療法又は内科的療法の要否を決定するために使用することを特徴とする上記(1)乃至(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 非ヒト動物の腫瘍の外科手術を行う場合の切除範囲を決定するために使用することを特徴とする上記(1)乃至(6)のいずれかに記載の方法。

(9) 非ヒト動物の腫瘍の予後の予測を行うために使用することを特徴とする上記(1)乃至(6)のいずれかに記載の方法。

(10) 抗CD34抗体を含んでなる、非ヒト動物の腫瘍の悪性度を評価するための診断用キットであって、前記非ヒト動物がイヌ又はネコであり、前記腫瘍が皮膚肥満細胞腫であることを特徴とする診断用キット。

【発明の効果】

【0010】

本発明の悪性度の評価方法及び予後の予測方法によれば、非ヒト動物の腫瘍細胞、特に肥満細胞腫の悪性度及び予後を的確に診断することが可能である。

【0011】

また、本発明の悪性度の評価方法及び予後の予測方法は、腫瘍の切除範囲を決定するための手がかりを提供することができる。

【0012】

これまで、外科手術を行わない限り、悪性度の判定、あるいは、予後判定をすることができず、全ての症例において、化学療法の適応を考える必要性があった。

本発明により、転移の可能性について、画像診断を行わなくとも予測が可能となり、化学療法の開始を本発明の結果に沿って行うことができる。すなわち、必要な症例に適切な化学療法を行うことができる。この点、本発明は、陰性である症例には、不必要な化学療法をしなくてよいという効果も発揮する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、イヌの肥満細胞腫に関するROC曲線である。

【図2】図2は、Patnaikグレードと本発明によるCD34の染色性との関係を示した図であ

10

20

30

40

50

る。

【図3】図3は、イヌの肥満細胞腫由来の細胞を抗CD34抗体で免疫染色した結果を示す。染色性1+、2+、染色性3+については明細書本文を参照のこと。

【図4】図4は、イヌの肥満細胞腫の転移の有無と生存日数に関するログランク検定結果を示す。

【図5】図5は、イヌの肥満細胞腫由来の細胞のCD34抗体による染色性と生存日数に関するログランク検定結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、腫瘍細胞に発現するCD34の発現量を指標にして、該腫瘍細胞の悪性度の評価、予後若しくは転移の有無を予測する方法である。

すなわち、本発明の実施形態の1つは、非ヒト動物の腫瘍の悪性度の評価、あるいは、予後の予測方法であって、腫瘍細胞を含む対象動物由来の試料中の細胞に発現しているCD34の発現を検出し、該CD34を発現する細胞数が、試料中に存在する全細胞数の一定割合以上の場合に、該腫瘍の悪性度が高い、又は、予後が不良であると判断する方法である。

ここで、「悪性度が高い」とは、その後の予後が悪いことを意味し、本発明の腫瘍の悪性度の評価方法を使用して、得られた悪性度は、該腫瘍の外科的手術による切除範囲の決定、術前又は術後の補助療法若しくは内科的療法（化学療法剤や、分子標的薬を使用した療法など）の要否などの治療方法の選択を行う上で有効である。従って、該腫瘍の治療範囲や治療方法を決定するために、本発明を使用することは、当然に、本発明の権利範囲内における本発明の実施に該当する。

また、「予後」とは、医学分野で用いられる場合の意味と同じであって、特に限定はしないが、例えば、予想される医学的な状態（健康状態）に関する見解、病気・創傷の将来的な状態のことである。また、疾患が癌等である場合に、予後の評価又は予後の診断としては、例えば、癌等のグレード診断、悪性度診断、将来における転移の有無の予測、手術後の症状の悪化の有無の予測等を挙げることができる。そして、予後が不良であるとは、例えば、生存率の短縮、再発リスクの増大及び/又は腫瘍が他の部位に転移している可能性がある場合を指す。また、本発明における腫瘍細胞は、CD34を発現する細胞を起源とする細胞、例えば、毛包幹細胞、肥満細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、ランゲルハンス細胞を起源とする細胞が腫瘍化したものであり、特に好ましくは、肥満細胞腫細胞である。本発明の予後評価方法の対象となる非ヒト動物は、特に限定はしないが、例えば、イヌ、ネコ、フェレットなどである。

【0015】

CD34は、110kDaの単鎖膜貫通型リン酸化糖タンパク質のことであるが、本明細書において「CD34」と記載する場合は、タンパク質のことを指し、これをコードする核酸等については、「CD34核酸」と記載する。CD34のアミノ酸配列及び核酸配列等の情報はすでに公開のデータベース等に掲載されているため、当業者であれば、容易に取得することが可能である。参考まで挙げるとすれば、イヌのCD34アミノ酸配列及び核酸配列は、各々、配列番号1及び2であり、ネコのCD34アミノ酸配列及び核酸配列は、各々配列番号3及び4である。

【0016】

本発明の好ましい実施形態には、CD34を検出する工程が含まれる。この場合、診断対象動物からの腫瘍細胞の試料を採取する手段は、当業者において、容易に選択されるいかなる方法、例えば、穿刺針を用いて細胞試料を得る針生検、外科的に切開して患部組織片を得る切開生検などの方法により実施することができる。

【0017】

腫瘍細胞を含む診断試料中におけるCD34の発現状況については、当業者において容易に選択し得る方法により実施することができる。

例えば、免疫組織化学的手法により、試料中の腫瘍細胞に発現するCD34を検出し、その発現レベルを調べる場合、適当な組織標本あるいは細胞診標本を作製し、検討を行うこと

10

20

30

40

50

ができる。組織標本あるいは細胞標本の作製方法は、既知のいかなる方法を使用して作製してもよい。例えば、採取した組織等をホルマリン等で固定し、パラフィン包埋処理後、切片を作製し、免疫組織化学染色を行いCD34の発現レベルの検討を行うことができる。あるいは、細胞診の1つの方法である、Liquid Based Cytology (LBC: 液状化細胞診) により実施することもできる。LBC法は、採取した細胞診検体(腫瘍細胞試料)を分散液(保存液)中で攪拌・分散した後、細胞を回収しスライドガラス上へ薄く転写・塗抹し、固定した後、抗体染色等を行い染色されるCD34の量を調べる方法である。また、スライドガラス標本ではなくとも、細胞を分散した状態で試料中のCD34を発現する細胞を検出するフローサイトメトリー法を用いてもよい。

【0018】

10

採取した組織又は細胞中に発現しているCD34を免疫組織化学的手法によって検出するため、CD34に対する抗体(抗CD34抗体)を使用することができる。抗CD34抗体は、本発明を実施する者がみずから作製した抗体、市販されている抗体(例えば、SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY社、#sc-7045)のいずれであっても使用可能であり、また、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。さらに、完全体の抗体である必要はなく、CDR領域等を含む断片であっても良く、遺伝子工学的に調製されたものであっても良い。抗体の断片としては、細胞上に発現しているCD34と結合し、免疫組織化学的染色に用いることができるものであれば如何なるものであってもよく、例えば、抗CD34抗体の一部分の領域を含むペプチド断片である、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(variable fragment of antibody)、一本鎖抗体(重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域等)、scFv、diabody(scFv二量体)、dsFv(ジスルフィド安定化可変領域)、並びに、CDRを少なくとも一部に含むペプチド等が挙げられる。

20

【0019】

診断対象動物から取得した組織又は細胞試料を、抗CD34抗体を用いて免疫染色する場合、抗CD34抗体、あるいは、抗CD34抗体を1次抗体として使用する場合には該抗CD34抗体と結合する2次抗体に適当な標識を結合させて、その標識を視覚化することで実施することができる。例えば、ペルオキシダーゼで標識した場合には、ジアミノベンチジン(DAB)又はアミノメチルカルバゾール(ACE)などを発色基質とし、アルカリフォスファターゼで標識した場合には、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルフォスフェート/ニトロブルーテトラゾリウムクロライド(BCIP/NBT)などを発色基質として使用し、染色することができる。

30

次に、免疫組織化学的方法により、細胞におけるCD34発現状況を評価する場合、例えば、Jimenez et al., Mod Pathol., 13:37-45, 2000に記載の方法に従って行うことができる。すなわち、低倍率で染色した組織又は細胞標本を顕微鏡観察し、最も染色強度が強い領域を選択し、次いで、その領域を高倍率視野下で観察を行い、観察対象の細胞100個を選ぶ。

選んだ100個の細胞の各々の染色強度を以下の4つに分類する(図1も参照のこと)

0: 染色性が認められない、あるいは、バックグラウンドと同程度にわずかに染色されている細胞。

40

1+: 低倍率では0と区別がつかないが、高倍率で淡く染色性が確認される細胞。

2+: 低倍率で染色性が確認可能で、高倍率で完全に染色性が確認される細胞。

3+: 低倍率で完全に染色性が確認される細胞。

選んだ100個の細胞に対する染色性2+以上の細胞を、「CD34を発現している細胞」と判定しその割合を算出し、その割合が10%以上、15%以上、より好ましくは20%以上の場合に、抗CD34抗体による染色性が「陽性」とであると判断する。そして、「陽性」と判断された試料が由来する腫瘍細胞の予後は、不良であると評価することができる。

また、採取された試料の染色性の状態をカメラ等で撮影し、染色処理した細胞の画像を取得し、当該画像を電子情報化処理し、解析することも可能である。画像から得られる染色強度を定量し、数値化することで、上記の4段階の染色レベルを評価してもよい。例え

50

ば、顕微鏡上で主となる腫瘍細胞の集団を染色した強倍率視野像（200から400倍）を撮影し、撮影した画像内のCD34発現陽性と染色された色を、バイオイメージング解析システム（Lumina Vision, 三谷商事）を用いて、赤、緑、青のRGBカラーに分け、色の染色性を各々、色相によって表して、二値化する。撮影した画像上の染色された陽性面積を、陰性抗体によって非特異的に染色された陰性面積を引くことにより求め、陽性面積と転移および生存結果の間の統計解析からROC曲線を求めてカットオフ値を設定し、カットオフ値以上を陽性と判定することができる。

【0020】

また、いわゆるハイブリダイゼーション法により、試料中の腫瘍細胞に発現するCD34のmRNAを検出し、CD34の発現状況をモニターしてもよい。使用可能なハイブリダイゼーション法として、例えば、*in situ* ハイブリダイゼーション法などを挙げることができる（例えば、Pascucci et al., Vet Dermatol. 2006 Aug;17(4):244-51などを参照のこと）。予後診断の対象となる腫瘍から取得した組織切片又は細胞標本に対し、CD34のmRNAに相補的な標識プローブ、例えば、放射性標識プローブ、ジゴキシゲニン（DIG）プローブ、蛍光標識（FITC, RITCなど）プローブなどを使用して、試料切片又は標本中におけるCD34のmRNA量を検出することができる。試料中のCD34のmRNA量の評価は、標識プローブから得られるシグナルを顕微鏡下で観察し、標識からシグナル強度に基づいて、観察される細胞を上記【0019】のように4段階に分類し、シグナル強度が2+以上の細胞の割合を算出して、予後の判断の指標とすることができる。

その他、免疫組織化学的方法以外にも、試料中の腫瘍細胞に発現するCD34のレベルを検出する方法として、定量RT-PCR（real time PCR）法により、試料中のCD34 mRNAの発現量を検出してもよい。

【0021】

本発明の他の実施形態は、イヌ又はネコ等の非ヒト動物に発症する腫瘍細胞、例えば、肥満細胞腫の悪性度の評価用キット、あるいは、予後の診断用キットである。上述のように、本発明は、CD34の腫瘍細胞における発現レベルを指標にして、該腫瘍細胞の悪性度の評価、及び、予後を予測する方法を提供するものである。従って、試料中に含まれる腫瘍細胞におけるCD34の発現量を測定するために使用する、抗CD34抗体やCD34 mRNAの発現量を測定するために使用するプローブ、又はプライマー等は、非ヒト動物の予後を診断するための用途を有しており、該用途は本発明において初めて開示されるものである。本発明の腫瘍細胞の予後の診断用キットには、その必須の構成物として細胞に発現しているCD34を検出するためのもの、例えば、抗CD34抗体、CD34 mRNAを検出するためのプローブが含まれる。それ以外に、付属的な構成物として、例えば、診断対象となる組織又は細胞を免疫染色するために必要な、ホルマリン等の固定剤の他、免疫組織化学染色、あるいは、定量RT-PCRを行うために必要な発色基質やバッファー等を含んでいてもよい。

【0022】

以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0023】

1. 実験方法

1-1. 供試動物

2007年から2011年の間に麻布大学附属動物病院腫瘍科に来院し、外科切除術を受けて腫瘍を摘出したのち、同病院病理検査室に提出されて肥満細胞腫と診断された15症例を対象とした。それぞれの症例についての臨床経過、採材年月日、年齢、性別、犬種、体重、腫瘍病変の分布と数、腫瘍の発生部位、外科的マージンを含む情報は、病理組織検査依頼書から得られた。症例に関する情報を表1にまとめた。

【0024】

10

20

30

40

症例番号	犬種	性別	年齢(歳)	検体部位(腫瘍)	投薬の有無	手術時の腫瘍の大きさ(cm)	発生状況	再発の有無
1	トイプードル	避妊雌	4	右側大腿部	有り	0.5	単発	初発
2	パピヨン	避妊雌	13	左側後肢内側	有り	0.7	単発	初発
3	フレンチブルドッグ	雄	4	右側臀部	有り	0.5	単発	初発
4	バグ	去勢雄	10	右側腋窩	有り	0.8	単発	初発
5	トイプードル	避妊雌	7	左側前肢パッド部	有り	1.0	単発	初発
6	雑種	避妊雌	8	右側胸部、 左側大腿部	有り	1.0	多発	初発
7	シェットランドシープドッグ	雄	14	左側体壁	無し	2.0	単発	初発
8	雑種	去勢雄	10	右側耳介	有り	5.0	単発	初発
9	シーザー	雄	11	右側腋窩	有り	13.0	単発	再発
10	バグ	雌	10	頭部	有り	2.5	単発	初発
11	マルチーズ	雌	7	下顎口唇	無し	2.0	単発	初発
12	ブルドッグ	去勢雄	6	右側前肢第3指	有り	3.5	単発	初発
13	バグ	去勢雄	6	右側大腿部外側、 右側大腿部内側	無し	3.0	多発	初発
14	フレンチブルドッグ	雄	7	右側前肢端	無し	ND	単発	再発
15	マルチーズ	雌	11	左側肘関節部	有り	3.5	単発	初発

ND:記載なし

【 0 0 2 5 】

1 - 2 . 免疫染色標本の作成手順

(1) 固定と切り出し

組織検体は外科切除後直ちに10%中性緩衝ホルマリンに浸漬し、室温下で18~23時間の一次固定を行った。単発性小型の腫瘍は周囲組織までを含むように、単発性大型の腫瘍は分割し、多発性腫瘍は、それぞれ個々の大きさに応じて行った。症例1~5、7、10~12は単発性小型腫瘍であった。症例6、13は多発性腫瘍であった。症例8、9、14、15は単発性大型腫瘍で、それぞれ症例8からは3ブロック、症例9からは4ブロック、症例14からは3ブロック、症例15からは1ブロック作成した。

【 0 0 2 6 】

(2) 包埋処理

切り出した固定標本は10%中性緩衝ホルマリンに再度浸漬し、室温下で30~31時間の二次固定を行い、自動固定包埋装置(ティッシュ・テック VIRT5ジュニア、code VIP-5-Jr-J0、サクラ精機株式会社)を用いて70%アルコール、80%アルコール、90%アルコール、95%アルコール、99%アルコールI、99%アルコールII、99%アルコールIIIを各2時間、キシレンI、キシレンII、キシレンIIIを各45分、パラフィンIを30分、パラフィンIIを30分、パラフィンIIIを45分、パラフィンIVを45分の順で浸透させた後、包埋皿に入れて、パラフィンブロックとして包埋した。包埋した組織は、3~5μmに薄切後、スライドグラス(MICRO SLIDE GLASS プレクリン水切放、code S-7224、松浪硝子工業)(MICRO SLIDE GLASS 水縁磨フロスト、code S-8215、松浪硝子工業)に張り付けて組織切片とし、免疫組織化学染色を実施した。

【 0 0 2 7 】

(3) ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色

組織切片は脱パラフィン処理(キシレンIを7分、キシレンIIを7分、99%アルコールIを5分、99%アルコールIIを10分、80%アルコールを7分、70%アルコールを7分)し、蒸留水に10回通した。次いでヘマトキシリン液(ティッシュ・テックヘマトキシリン3G、code 8656、サクラファインテックジャパン)に3分、流水洗30分、蒸留水に10回通した。その後、エオジン液(ティッシュ・テック エオジン、code 8659サクラファインテックジャパン)で22分間染色し、分色・脱水処理(70%アルコール、80%アルコール、90%アルコール、95%アルコールに各数回通し、99%アルコールI、99%アルコールII、99%アルコールIII、99%アルコールIVを各5分)と透徹処理(キシレンIを7分、キシレンIIを7分、キシレンIIIを10分)を行い、標本用封入剤(NEW M・X、code FX00500、松浪硝子工業)を用いて封入した。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

(4) CD34の免疫組織化学染色

免疫組織化学染色はストレプトアビジンビオチン (SAB) 法およびポリマー法を用いて行った。まず、組織切片は脱パラフィン処理 (キシレンI、キシレンII、99%アルコールI、99%アルコールII、80%アルコール、70%アルコールを各10分) し、蒸留水に10回通した。次いでリン酸緩衝液 (PBS) (リン酸緩衝液 20倍濃縮液 pH7.4 1/15mol/L、code 2S048 1、関東化学) で5分、2回洗浄し、蒸留水に30秒通し、PBSで5分、1回洗浄した。内因性ペルオキシダーゼを阻止するために、余分な水分を取り除いた後、3%過酸化水素加メタノール (過酸化水素水、code18084-00、関東化学; 99.8%メタノール、code25183-70、関東化学) に室温下で15分間浸した。その後PBSで5分、2回洗浄し、蒸留水に30秒通し、PBSで5分、1回洗浄した (以下、この過程をPBS洗浄と記載する)。抗原賦活化処理は圧力釜 (ティファール クリブソクレール、型式P4310731、グループセブジャパン) を用い、切片は抗原賦活化液 (Dako REALTM Target Retrieval Solution、code S2031、Dako) に浸して、5分間加圧処理した。加圧処理後に室温下で20分冷却し、その後、PBS洗浄を行った。

10

【 0 0 2 9 】

次いで余分な水分を取り除いた後、ブロッキング試薬として10%ウサギ正常血清 (code 426052、ニチレイ) を切片に滴下し、室温下で10分、湿潤箱の中で反応させた。ブロッキング反応以降の抗体反応および発色の作業は全て湿潤箱内で行った。一次抗体は、免疫組織化学的にイヌとの交差性が知られている抗ヒトCD34ヤギポリクローナル抗体 (sc-7045、SANTA CRUZ; Jennings et al., Vet Pathol., 49:532-537, 2012) を用いた。ブロッキング血清を流した後、一次抗体を滴下し、1:100の濃度で、4 一晚 (約12時間) 反応させた。コントロールとして、ヤギIgG (PURIFIED GOAT IgG、code PCP001、AbD SEROTEC) を同じ濃度に希釈をして滴下した。反応後、KITPBS洗浄を行い、余分な水分を取り除いた。二次抗体としてヒストファインビオチン標識抗ヤギIgG抗体 (code 416022、ニチレイ) を用いた。二次抗体は室温下で10分反応させた。酵素試薬としてヒストファインペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (code 426062、ニチレイ) を滴下し、室温下で5分間反応させた。その後、PBS洗浄を行い、余分な水分を取り除いた。その後、シンプルステインDAB液 (code 415172、ニチレイ) を滴下し、顕微鏡で確認のもと、7分間、発色を行った。蒸留水による発色停止後、マイヤーのヘマトキシリン (code 30002、武藤化学) にて30秒対比染色を行い、流水洗30分、蒸留水に10回通した。その後、脱水処理 (70%アルコール、80%アルコール、90%アルコール、99%アルコールI、99%アルコールII、99%アルコールIIIを各7分) と透徹処理 (キシレンI、キシレンII、キシレンIIIを各7分) をを行い、M・Xを用いて封入した。

20

30

【 0 0 3 0 】

1 - 3 . 病理組織学的評価

(1) HE染色

皮膚肥満細胞腫と診断された各症例の切片について、Patnaikの報告 (Patnaik et al., Vet Pathol., 21:469-474, 1984) に従いグレード分類を行った。観察は、腫瘍の浸潤部位、細胞密度、細胞および核の形態、細胞境界、細胞質内顆粒の有無、高倍率視野中の核分裂像、好酸球浸潤の有無および程度、汗腺、リンパ管の拡張の有無および程度、膠原線維の変性の有無、壊死、浮腫および出血を含む間質反応について行った。腫瘍の浸潤部位を評価するうえで、表皮は角化層を持つ重層扁平上皮細胞で構成される層、真皮は毛包、脂腺、汗腺、リンパ管などが認められる、表皮下にある密線維性結合組織、皮下組織は脂肪組織を含む疎線維性結合組織とした。さらに、真皮を3層にわけ、表皮から付属器が存在する領域までの層を浅層、付属器が存在する領域を中層、中層より下層を深層とした。皮下組織は真皮に近い上層を浅層、筋層に近い下層を深層とした。

40

【 0 0 3 1 】

(2) CD34陽性細胞の評価

抗CD34抗体を用いた免疫組織化学的染色結果は、その染色強度によりJimenez et al., Vet Pathol., 49:532-537, 2000において報告されている評価方法に従い、評価した。具

50

体的には、低倍率で染色切片を観察し、最も染色強度が強い領域を選出し、その領域を高倍率視野下で観察し、腫瘍性肥満細胞を100個計測した。100個それぞれの細胞の染色強度を分類し、それぞれの陽性率(%)を算出した。染色強度は以下の4つに分類した。

0：染色性が認められない、あるいはバックグラウンドと同程度の殆ど僅かに染色されているもの。

1＋：低倍率では0と区別がつかないが、高倍率で淡く染色性が確認されるもの。

2＋：低倍率で染色性が確認可能で、高倍率で完全に染色性が確認されるもの。

3＋：低倍率で完全に染色性が確認されるもの。

【0032】

1 - 4 . 統計解析

10

上記の手順により得られた「CD34陽性細胞の評価」のデータについて、グレードとの関係について統計解析としてクラスカル・ワリス検定を行い、検定の結果有意差が認められた場合、水準間の差を検定するために多重比較検定(Turkey-Kramer法)を行った。有意水準5%以下を有意差ありとした。

肥満細胞腫の転移の有無と生存日数との関係、及び、CD34の染色性と生存日数の関係について、ROC曲線(図1)を用いて陽性である染色性を判断し、ログランク検定を行った。ログランク検定は、JMPversion8.02を用いて行った。

【0033】

2 . 結果

2 - 1 . Patnaikの分類

20

15の症例に由来する検体について、HE染色標本作製し、観察して、Patnaikの報告(上掲)に基づいて、イヌの皮膚肥満細胞腫のグレード分類を行った。

その結果を表2にまとめた。

2 - 2 . 抗CD34抗体の免疫組織学的染色の結果

肥満細胞腫の症例15例に由来する検体について、抗CD34抗体で染色し、その染色性に関し、+2(「++」)以上の染色性を示すものを「陽性」と判断した(図1、表2)。肥満細胞腫のPatnaikグレード3の染色性は、染色性+1以上を陽性と判断した場合、グレード1および2と比較して、有意に陽性細胞率が高いことが明らかとなった(図2)。また、各検体の手術日から計測した生存日数、転移の有無について予後調査を行った。以上の結果を表2にまとめた。抗CD34抗体の染色性を示す典型的な染色像を図3に示す。

30

【0034】

【表 2】

検体ID	Patnaikグレード	CD34の染色性「++」以上	染色性の判断	判断	生存日数	転移の有無	外科切除
1	1	1	陰性	生存	673	なし	十分
2	1	3	陰性	生存	589	なし	十分
3	1	2	陰性	生存	589	なし	十分
4	1	4	陰性	生存	561	なし	十分
5	1	8	陰性	生存	966	なし	十分
6	2	0	陰性	生存	715	なし	十分
7	2	3	陰性	生存	1129	なし	十分
8	2	1	陰性	死亡	180	あり	十分
9	2	22	陽性	死亡	81	あり	十分
10	2	2	陰性	生存	890	あり	十分
11	3	76	陽性	死亡	79	あり	不十分
12	3	1	陰性	生存	1156	なし	十分
13	3	68	陽性	生存	1324	なし	十分
14	3	89	陽性	死亡	379	あり	十分
15	3	38	陽性	生存	1982	あり	十分

- CD34の染色性「++」以上の数字は100個中の陽性細胞の割合(%)。20%以上を染色性陽性と判断した。
- 生存日数は手術日から計測した日数であり、明らかに肥満細胞腫と関係のない要因によって死亡した症例(熱中症、併発腫瘍など)は生存と判断した。

通常、Patnaikの分類で、グレード3の肥満細胞腫の予後は悪いとされているが、切除マージンが十分である場合、予後が良好な場合が存在する。従って、Patnaikグレード分類だけでは、予後指標として不十分な場合があると考えられる。

【0035】

2-3. ログランク検定

まず、転移の有無と生存日数との相関について検討した。その結果、転移の有るものは、無いものに比べて、有意に生存日数が短かった。このことから、症例の検査結果が信頼できるデータであることが確認された(図4)

次に、CD34の染色性と生存日数の関係について検討した。染色陽性の症例は、陰性の症例より生存日数が短く、予後が悪いと判断することができる(図5)。今回検討した症例における転移の有無は、腫瘍切除後に明らかとなった症例も含まれており、初診時の段階で判別ができなかった症例もあった。

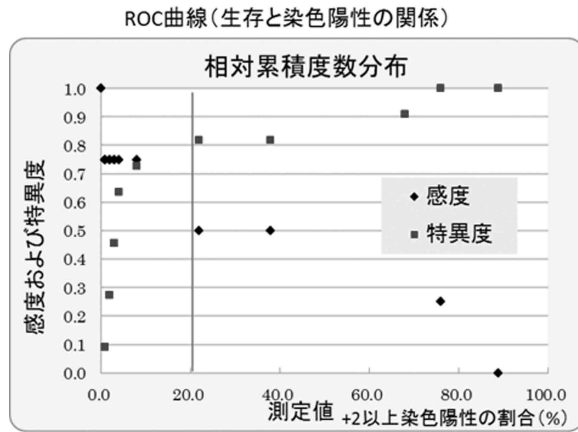
以上の結果から、CD34の染色性による分類が、Patnaikグレード分類よりも優れた予後の使用になるものと言える。

【産業上の利用可能性】

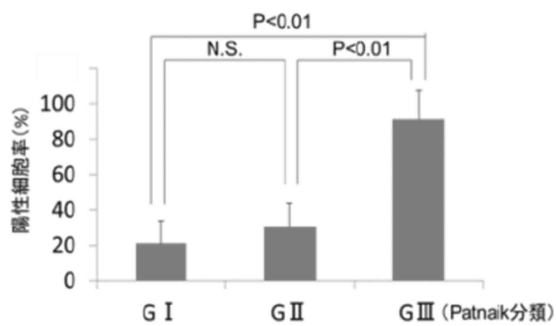
【0036】

本発明は、非ヒト動物の腫瘍の悪性度の評価方法、及び、予後を判断する方法及び該方法の使用に適するキットを提供するものである。非ヒト動物、特に、イヌ、ネコ等のペット動物等の腫瘍の予後を適切に判断することを可能にする本発明の方法は、動物医療の分野において、その実用化が大いに期待される。

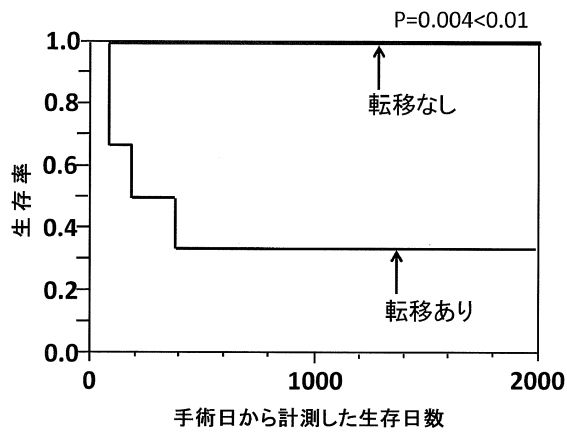
【図1】



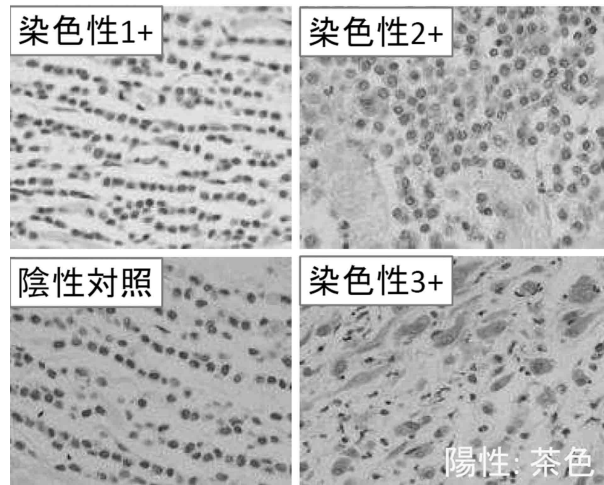
【図2】



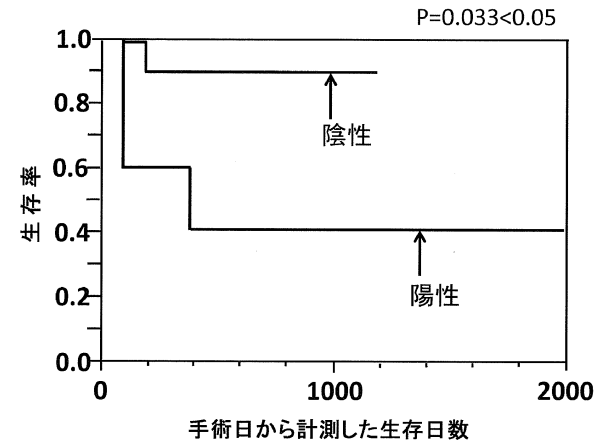
【図4】



【図3】



【図5】



【配列表】

0006583785000001.app

フロントページの続き

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 国際公開第2005/100999(WO,A2)
国際公開第2013/056217(WO,A1)
特開2007-263958(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	非人类动物恶性肿瘤的恶性评估方法		
公开(公告)号	JP6583785B2	公开(公告)日	2019-10-02
申请号	JP2015557918	申请日	2015-01-20
申请(专利权)人(译)	学校法人麻布獣医学園		
当前申请(专利权)人(译)	Kawaharai晋平		
[标]发明人	川原井 晋平 斑目 広郎 圓尾 拓也		
发明人	川原井 晋平 斑目 広郎 圓尾 拓也		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.D G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y		
优先权	2014007607 2014-01-20 JP		
其他公开文献	JPWO2015108195A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于评估非人类动物中的恶性肿瘤的恶性的方法以及用于评估的组合物。评价非人类动物中的肿瘤的恶性的方法包括：检测在源自对象动物的含肿瘤细胞的样品的细胞中表达的CD34。当样品中表达CD34的细胞与总细胞的比例达到预定水平或更高时，将肿瘤评估为恶性。还提供了用于评估非人类动物中的肿瘤恶性的诊断试剂盒，所述试剂盒包含抗CD34抗体。

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6583785号 (P6583785)
(45) 発行日 令和1年10月2日 (2019. 10. 2)		(24) 登録日 令和1年9月13日 (2019. 9. 13)	
(51) Int. Cl.		F 1	
G O 1 N 33/574 (2006. 01)		G O 1 N 33/574 D	
G O 1 N 33/48 (2006. 01)		G O 1 N 33/574 A	
G O 1 N 33/53 (2006. 01)		G O 1 N 33/48 P	
		G O 1 N 33/53 Y	
請求項の数 10 (全 14 頁)			
(21) 出願番号 特願2015-557918 (P2015-557918)		(73) 特許権者 518018333 川原井 晋平 神奈川県横浜市中央区瀬野辺1丁目17 - 7 1 麻布大学内	
(86) (22) 出願日 平成27年1月20日 (2015. 1. 20)		(74) 代理人 110001807 特許業務法人磯野国際特許商標事務所	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/051290		(72) 発明者 川原井 晋平 神奈川県横浜市中央区瀬野辺1-17-7 1 麻布大学内	
(87) 国際公開番号 W02015/108195		(72) 発明者 斑目 広郎 神奈川県横浜市中央区瀬野辺1-17-7 1 麻布大学内	
(87) 国際公開日 平成27年7月23日 (2015. 7. 23)		(72) 発明者 圓尾 拓也 神奈川県横浜市中央区瀬野辺1-17-7 1 麻布大学内	
審査請求日 平成30年1月17日 (2018. 1. 17)			
(31) 優先権主張番号 特願2014-7607 (P2014-7607)			
(32) 優先日 平成26年1月20日 (2014. 1. 20)			
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)			
(54) 【発明の名称】ネミト動物の悪性腫瘍の悪性度の評価方法			

(54) 【発明の名称】 非ヒト動物の悪性腫瘍の悪性度の評価方法