

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6592854号  
(P6592854)

(45) 発行日 令和1年10月23日(2019.10.23)

(24) 登録日 令和1年10月4日(2019.10.4)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
C 12 Q 1/04	(2006.01)	C 12 Q 1/04	
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	P

請求項の数 2 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2017-196492 (P2017-196492)
(22) 出願日	平成29年10月10日 (2017.10.10)
(65) 公開番号	特開2019-70571 (P2019-70571A)
(43) 公開日	令和1年5月9日 (2019.5.9)
審査請求日	平成30年3月29日 (2018.3.29)

(73) 特許権者	508250475 一迫 玲 宮城県仙台市青葉区福沢町2-10
(74) 代理人	100095359 弁理士 須田 篤
(74) 代理人	100143834 弁理士 楠 修二
(72) 発明者	一迫 玲 宮城県仙台市青葉区福沢町2-10
審査官 高田 亜希	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c - M Y C 遺伝子転座の判定方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

c - m y c 蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を少なくとも陽性と弱陽性と陰性との3種類に分類し、観察領域に占める各種類の反応性の面積比率を求め、各種類の反応性を示す反応性記号と、各種類の反応性の他の種類の反応性に対する面積比率を示す比率記号とが関連付けて表示された表示記号を被表記物に表示し、前記陽性が前記観察領域の30~35%、前記弱陽性が前記観察領域の30~35%、前記陰性が前記観察領域の30~35%を占めるとき、c - M Y C 遺伝子の転座が陰性であると判定することを特徴とするc - M Y C 遺伝子転座の判定方法。

## 【請求項 2】

c - m y c 蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を少なくとも陽性と弱陽性と陰性との3種類に分類し、観察領域に占める各種類の反応性の面積比率を求め、各種類の反応性を示す反応性記号と、各種類の反応性の他の種類の反応性に対する面積比率を示す比率記号とが関連付けて表示された表示記号を被表記物に表示し、前記陽性が前記観察領域の75~90%であるとき、c - M Y C 遺伝子の転座が陽性になり得る確率が高いと判定することを特徴とするc - M Y C 遺伝子転座の判定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、c - M Y C 遺伝子転座の判定方法に関する。

10

20

## 【背景技術】

## 【0002】

従来、免疫組織化学の結果については抗原発現の反応性 (immunoreactivity: 陽性、弱陽性、陰性等) と、それらが面積的に占める大まかな割合 (proportion) との 2 要素を病理医が個々に自分の文章で記載しており、双方を共に示すための共通した表記方法がなかった。このため、数値という絶対値で結果を示すことが多い他の医学データと異なり、データの相互比較は行われていなかった。

例えば、骨髄、血液およびリンパ節からなる群から選択される試料中の血液系悪性腫瘍由来の悪性細胞を同定するためのインピトロ法として、悪性細胞における 1 型 5 - HTR および / または 2 型 5 - HTR の発現細胞を免疫細胞化学によって検出する方法が開示されている (例えば、特許文献 1 参照)。

10

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0003】

## 【特許文献 1】特表 2017 - 526629 号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

特許文献 1 の方法においても、免疫組織化学の結果の表記方法は示されておらず、病理医が個々に抗原発現の反応性を陽性と陰性の 2 種類に分け、その面積比率を感覚的にとらえて悪性細胞を言語で同定することから、同定の精度や再現性、イメージ想定が悪いという課題があった。

20

## 【0005】

本発明は、このような従来の課題に着目してなされたもので、c - MYC 遺伝子の転座の陰性・高確率な陽性の判定を容易にする c - MYC 遺伝子転座の判定方法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に、本発明に関する抗原発現の反応性の表記物は、免疫組織化学による抗原発現の所定の反応性を示す反応性記号と、前記所定の反応性の他の反応性に対する面積比率を示す比率記号とが関連付けて表示された表示記号を有することを、特徴とする。

30

## 【0007】

本発明に関する抗原発現の反応性の表記物は、c - myc 蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を少なくとも陽性と弱陽性と陰性との 3 種類に分類したとき各種類の反応性を示す反応性記号と、各種類の反応性の他の反応性に対する面積比率を示す比率記号とが関連付けて表示された表示記号を有することが好ましい。

## 【0008】

抗原発現の反応性の分類は、3 種類のほか、4 種類または 5 種類以上であってもよい。4 種類の場合、抗原発現の所定の反応性を示す反応性記号としては、例えば、陽性を「+」、弱陽性を「(weak) +」、非常に弱い陽性を「(very weak) +」、陰性を「-」で示す記号が挙げられる。なお、「陽性」は、通常強度の陽性を意味する。

40

## 【0009】

面積比率を示す比率記号としては、例えば、左側に反応性記号で示される反応性が 60 % ~ 70 % のとき「>」、左側に反応性記号で示される反応性が 75 % ~ 90 % のとき「>>」、左側に反応性記号で示される反応性が 99 % 以上のとき「>>>」で示す記号が挙げられる。

## 【0010】

本発明において、表記物は、記号を表示可能ないかなるものであってもよく、例えば、印刷物その他の紙面、黒板、モニター画像、スライド投射画像などが挙げられる。

50

本発明に関する抗原発現の反応性の表記物を用いることにより、c - M Y C 遺伝子の転座の陰性・陽性の判定を容易にすることができます。

【0011】

本発明に係る c - M Y C 遺伝子転座の判定方法は、c - m y c 蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を少なくとも陽性と弱陽性と陰性との3種類に分類し、観察領域に占める各種類の反応性の面積比率を求め、各種類の反応性を示す反応性記号と、各種類の反応性の他の種類の反応性に対する面積比率を示す比率記号とが関連付けて表示された表示記号を被表記物に表示して前述の抗原発現の反応性の表記物を作成し、前記陽性が前記観察領域の 30 ~ 35 %、前記弱陽性が前記観察領域の 30 ~ 35 %、前記陰性が前記観察領域の 30 ~ 35 % を占めるとき、c - M Y C 遺伝子の転座が陰性であると判定することを特徴とする。

【0012】

本発明に係る他の c - M Y C 遺伝子転座の判定方法は、c - m y c 蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を少なくとも陽性と弱陽性と陰性との3種類に分類し、観察領域に占める各種類の反応性の面積比率を求め、各種類の反応性を示す反応性記号と、各種類の反応性の他の種類の反応性に対する面積比率を示す比率記号とが関連付けて表示された表示記号を被表記物に表示して前述の抗原発現の反応性の表記物を作成し、前記陽性が前記観察領域の 75 ~ 90 % であるとき、c - M Y C 遺伝子の転座が陽性になり得る確率が高いと判定することを特徴とする。

【0013】

本発明に係る c - M Y C 遺伝子転座の判定方法は、本発明者が c - m y c 蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を陽性と弱陽性と陰性との3種類に分類して臨床データを分析することにより、経験的に得られた判定方法である。

本発明に係る c - M Y C 遺伝子転座の判定方法により、所定の条件を満たす場合には、精密な検査を行わずに、高い精度で c - M Y C 遺伝子の転座の陰性・陽性の判定が可能となる。

なお、本発明において、「観察領域」は、撮影された顕微鏡写真全体でも、範囲を特定した一部の領域であってもよい。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、c - M Y C 遺伝子の転座の陰性・高確率な陽性の判定を容易にする c - M Y C 遺伝子転座の判定方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の実施の形態の抗原発現の反応性の表記物の表記方法を示すフローチャートである。

【図2】病変部生検を免疫組織化学的に染色した4つの顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、図面に基づき、本発明の実施の形態について説明する。

図1は、本発明の実施の形態の抗原発現の反応性の表記物の表記方法を示すフローチャートである。図2は、病変部生検を免疫組織化学的に染色した4つの顕微鏡写真である。

【0017】

悪性腫瘍由来の悪性細胞や正常ないし病的細胞における各種蛋白質を同定するため、病変部生検を免疫組織化学的に染色した顕微鏡写真から抗原発現の反応性が陽性か陰性かを判定することが行われている。病変部生検の顕微鏡写真の準備と、抗原発現の反応性の評価は以下の方法で行う。

【0018】

まず、病変部位を採取し、ホルマリン固定後に型の如く、パラフィン切片を作製する。次に、抗 c - m y c 抗体を一次抗体として用い、パラフィン切片を免疫組織化学的に染色

10

20

30

40

50

する。染色標本を顕微鏡で観察して、c-myc蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を表示記号により表記し、接眼10倍・対物40倍レンズの光学顕微鏡で観察する。

#### 【0019】

抗原発現の反応性の表示記号から反応性の評価を行い、c-MYC遺伝子の転座の、悪性細胞におけるc-myc蛋白の発現の程度を陽性、弱陽性、非常に弱い陽性（弱陽性と陰性の間の強度）、陰性の4種類に分けて観察し、それぞれの抗原発現の面積的な割合を、図1に示すフローチャートに従って記号表記する。記号表記を行う被表記物は、所定の用紙のほか、パソコン用コンピュータのモニター画像であってもよい。

#### 【0020】

図1に示すように、抗原発現の反応性の表記物を表記するとき、観察領域に占める面積で「優に5割を超える反応性パターンがあるか？」で2つに分け、yesの場合、「反応性パターンは1種類か2種類か3種類か？」で3つに分け、1種類のとき、「+」、「(weak)+」、「(very weak)+」、「-」のいずれかの反応性記号を表示記号とする。

10

#### 【0021】

「+」、「(weak)+」、「(very weak)+」、「-」の反応性記号は、c-myc蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を4種類に分類したときの各種類の反応性を示している。免疫組織化学による抗原発現の所定の反応性のうち、「+」は陽性を、「(weak)+」は弱陽性を、「(very weak)+」は非常に弱い陽性を、「-」は陰性を示している。病変部生検を免疫組織化学的に染色したカラーの顕微鏡写真では、陽性は茶色に、弱陽性は薄い茶色に、非常に弱い陽性はかなり薄い茶色（ベージュ系）に、陰性は完全な白色に写っている。

20

#### 【0022】

反応性パターンが2種類のときには、「+」、「(weak)+」、「(very weak)+」、「-」のうちの2種類の反応性記号の間に「>」、「>>」、「>>>」、「>>>\*」の比率記号を表示する。図1に示すように2種類の反応性記号の反応性の面積比率に応じて、左側により強い反応性の反応性記号を表示し、右側により弱い反応性の反応性記号を表示して、比率記号を2種類の反応性記号と関連付けた表示記号とする。

30

#### 【0023】

反応性パターンが3種類のときには、「+」、「(weak)+」、「(very weak)+」、「-」のうちの3種類の反応性記号の各反応性記号の間に「>」、「>>」の比率記号を表示する。図1に示すように3種類の反応性記号の反応性の面積比率に応じて、左側により強い反応性の反応性記号を表示し、右側により弱い反応性の反応性記号を表示して、比率記号を3種類の反応性記号と関連付けた表示記号とする。

#### 【0024】

「優に5割を超える反応性パターンがあるか？」でnoの場合、「ほぼ5割の反応性パターンがあるか？」で2つに分け、yesのとき、「+」、「(weak)+」、「(very weak)+」、「-」のうちの2種類または3種類の反応性記号の間に「/」、「>」、「>>」、「>>>」の比率記号を表示して、比率記号を2種類または3種類の反応性記号と関連付けた表示記号とする。「/」の比率記号は、左側のより強い反応性記号の反応性と、右側のより弱い反応性の反応性記号の反応性との面積比率が47～53%であることを示している。

40

#### 【0025】

「ほぼ5割の反応性パターンがあるか？」でnoのとき、「+」、「(weak)+」、「(very weak)+」、「-」のうちの3種類の反応性記号の間に「/」、「>」、「>>」、「>>>」の比率記号を表示して、比率記号を3種類の反応性記号と関連付けた表示記号とする。3種類の反応性記号の間に表示される「/」の比率記号は、各反応性記号の反応性の面積比率が30～35%であることを示している。

#### 【0026】

50

図2に示す顕微鏡写真について、各写真の抗原発現の反応性を表示記号で示すと、Aは「+ > > (weak) +」で、Bは「+ / (weak) + > > -」で、Cは「+ / (weak) + / -」で、Dは「-」で示される。

【実施例】

【0027】

病変部位を採取し、ホルマリン固定後にパラフィン切片を作製し、抗c-myc抗体を一次抗体として用いて、パラフィン切片を免疫組織化学的に染色した。染色標本を顕微鏡で観察し、図1に示すフローチャートに従って、c-myc蛋白の免疫組織化学による抗原発現の反応性を表示記号で示した。また、FISH(Fluorescence in situ hybridization)用プローブセットを用いて、c-MYC遺伝子の転座の陽性(分断ないし他遺伝子との融合を含む)と陰性(分断ないし他遺伝子との融合を含まない)を検出した。

10

【0028】

その結果は、以下のとおりである。左側にフローチャートに従って表記した表示記号を示す。それぞれの表記の右側にFISH用プローブセットを用いて検出した、検索対象とした症例数におけるc-MYC遺伝子転座陽性の症例数を示す。また、A群、B群、C群の右側には同様の症例数とともに括弧内に割合を示す。

【0029】

A群：0 / 43 (0%)

c-myc + / (weak) + / - . . . 0 / 43

B群：13 / 25 (52%)

20

c-myc + / (weak) + > > - . . . 3 / 4

c-myc + / (weak) + > > > - . . . 1 / 2

c-myc + > (weak) + > - . . . 0 / 1

c-myc + > (weak) + > > - . . . 3 / 9

c-myc + > > (weak) + > - . . . 6 / 9

C群：8 / 9 (89%)

c-myc + > > (weak) + . . . 7 / 7

c-myc + > > > (weak) + . . . 1 / 2

【0030】

このように、免疫組織化学の結果が「c-myc + / (weak) + / -」の表示記号で示される場合、陽性が観察領域の30~35%、弱陽性が観察領域の30~35%、陰性が観察領域の30~35%と、それぞれほぼ同じ3分の1程度を占めている。この場合、43件の症例中、c-MYC遺伝子の転座が陽性のものは0件、陰性のものが43件すべてであった。このことから、免疫組織化学の結果が「c-myc + / (weak) + / -」の場合、c-MYC遺伝子の転座が陰性であると判定することができる。

30

【0031】

また、免疫組織化学の結果が「c-myc + > > (weak) +」の表示記号で示される場合、陽性が前記観察領域の75~90%を占めている。この場合、7件の症例中、c-MYC遺伝子の転座が陽性のものは7件すべて、陰性のものが0件であった。このことから、免疫組織化学の結果が「c-myc + > > (weak) +」の場合、症例数が少ないもののc-MYC遺伝子の転座が高い確率で陽性になり得るものと判定することができる。

40

【0032】

「c-myc + > > (weak) +」の表示記号で示される場合、すなわち、陽性が観察領域の75~90%を占める場合、遺伝子Aに異常が生じている確率は9割以上になる。蛋白質レベルの発現様式を上述の表示記号で示すことによって、遺伝子異常の検出が容易になる。遺伝子Aの異常があると、患者の予後は不良になることが既に知られているので、免疫組織化学による蛋白質発現様式で患者の予後まで推定することができる。

【0033】

このように、免疫組織化学の結果が「c-myc + / (weak) + / -」の表示記号

50

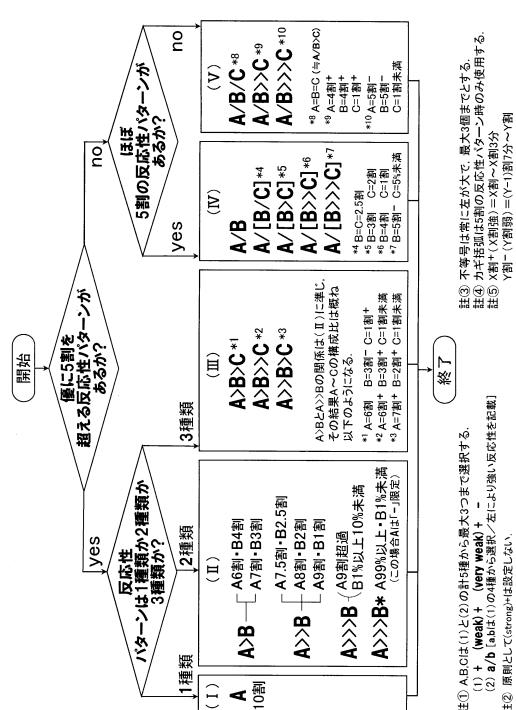
で示される場合、精密な検査を行わずに c - M Y C 遺伝子の転座の陰性判定が可能となる。また、「c - myc + > > (weak) +」の表示記号で示される場合には、抗原発現の反応性の表記物を用いることにより、c - M Y C 遺伝子の転座の陽性判定をかなり高い確率で行うことを容易にすることができます。

( 0 0 3 4 )

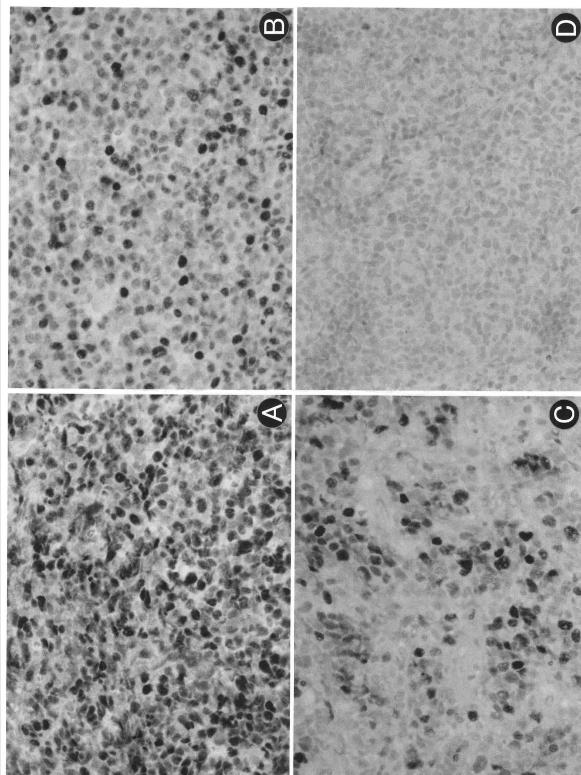
前述の表示記号によって、これまで個々の病理医がまちまちの長さで文章表記してきた免疫組織化学の所見が一定の法則に従ってかなり短く記号化され、それによって見易くかつ相互の比較が容易になる。記載時間の短縮にもなる。また、従来、抗原発現の反応性を陽性と陰性の2段階でとらえていたものが少なくとも陽性と弱陽性と陰性の3段階等でとらえることとなり、c-MYC遺伝子の転座の陰性・陽性の判定の精度を向上させることができる。

さらに、免疫組織化学の所見をビッグデータとして取り扱って、大規模症例数の解析や分析が可能となる。

〔 义 1 〕



〔图2〕



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2017-526629(JP,A)

特表2013-517772(JP,A)

染色体異常の簡便な表記法, 染色体異常をみつけたら, 日本, 日本人類遺伝学会, 2009年

4月25日, P1-2, URL, <http://www.cytogen.jp/index/pdf/11-f.pdf>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	c-MYC基因易位的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6592854B2</a>	公开(公告)日	2019-10-23
申请号	JP2017196492	申请日	2017-10-10
申请(专利权)人(译)	Ichihasama川		
当前申请(专利权)人(译)	Ichihasama川		
[标]发明人	一迫玲		
发明人	一迫玲		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/04 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.Y C12Q1/04 G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/FB03 2G045/GC12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QS03 4B063/QS33 4B063/QX01		
代理人(译)	须田淳		
其他公开文献	<a href="#">JP2019070571A</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

为方便c-MYC基因易位的绝对阴性/高概率阳性检测提供抗原表达的反应性，以及c-MYC基因易位的测定方法。解决方案：通过对c-myc蛋白的免疫组织化学来分类抗原表达的反应性分为至少3种类型：正面，负面和负面。用光学显微镜计算观察区域中每种反应性的面积比。反应性符号表示每种类型的反应性。比率符号表示每种类型的反应性与其他类型的反应性的面积比。在将反应性符号与比率符号相关联时显示的显示符号被指示到显示的项目，并且创建抗原表达的反应性的指示。当各个项目占据大约相同的三分之一时；即阳性观察面积为30%至35%；弱阳性的观察面积为30%至35%。阴性观察区域为30%到35%，确定基因位点为c-MYC基因易位。图1

(19)日本国特許庁(JP)	(12)特許公報(B2)	(11)特許番号
		特許第6592854号 (P6592854)
(45)発行日 令和1年10月23日 (2019.10.23)		(24)登録日 令和1年10月4日 (2019.10.4)
(51)Int.Cl.	F I	
G 0 1 N   3 3/5 3   (2 0 0 6. 0 1)	G 0 1 N   3 3/5 3	Y
C 1 2 Q   1/0 4   (2 0 0 6. 0 1)	C 1 2 Q   1/0 4	
G 0 1 N   3 3/4 8   (2 0 0 6. 0 1)	G 0 1 N   3 3/4 8	P
請求項の数 2 (全 7 頁)		
(21)出願番号	特願2017-196492 (P2017-196492)	(73)特許権者 508250475 一迫玲 宮城県仙台市青葉区福沢町2-10
(22)出願日	平成29年10月10日 (2017.10.10)	(74)代理人 100095359 弁理士 须田 淳
(65)公開番号	特開2019-70571 (P2019-70571A)	(74)代理人 100143834 弁理士 楠 修二
(43)公開日	令和1年5月9日 (2019.5.9)	(72)発明者 一迫玲 宮城県仙台市青葉区福沢町2-10
審査請求日	平成30年3月29日 (2018.3.29)	審査官 高田 亜希
最終頁に続く		
(54)【発明の名称】c-MYC遺伝子転座の判定方法		