

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年4月17日(17.04.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/057983 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/077495
- (22) 国際出願日: 2013年10月9日(09.10.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-226489 2012年10月12日(12.10.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人弘前大学(HIROSAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 Aomori (JP). 静岡県公立大学法人(SHIZUOKA PREFECTURAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒4228021 静岡県静岡市駿河区小鹿二丁目2番1号 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者: 大山 力(OHYAMA Chikara); 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 米山 徹(YONEYAMA Tohru); 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 飛澤 悠葵(TO-

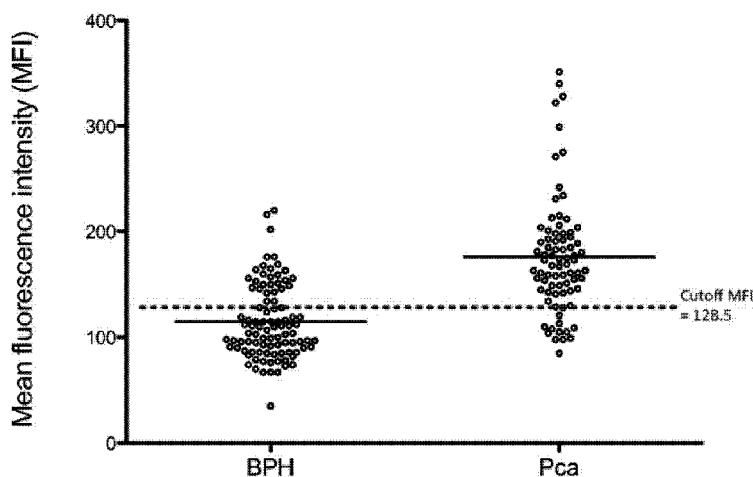
BISAWA Yuki); 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 畠山 真吾(HATAKEYAMA Shingo); 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 鈴木 隆(SUZUKI Takashi); 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1 静岡県公立大学法人静岡県立大学内 Shizuoka (JP). 左 一八(JWA Iipal); 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1 静岡県公立大学法人静岡県立大学内 Shizuoka (JP). 山口 真帆(YAMAGUCHI Maho); 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1 静岡県公立大学法人静岡県立大学内 Shizuoka (JP).

- (74) 代理人: 辻田 幸史, 外(TSUJITA Takashi et al.); 〒1710033 東京都豊島区高田3-11-12 K Tビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DISTINGUISHING BETWEEN PROSTATE CARCINOMA AND BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA

(54) 発明の名称: 前立腺癌と前立腺肥大を識別するための方法およびキット



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for distinguishing between prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia with high sensitivity and good reproducibility using an analyte sample in a small amount. The method for distinguishing between prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia according to the present invention, which is a solution for the problem, is as follows: an analyte sample containing a prostate-specific antigen (PSA) is brought into contact with a carrier having an anti-free PSA antibody immobilized thereon, thereby causing the binding of a free PSA to the anti-free PSA antibody immobilized on the carrier; the carrier in which the free PSA has been bound to the immobilized anti-free PSA antibody is brought into contact with a monoclonal antibody capable of specifically recognizing a sugar chain in which a terminal sialic acid residue is bound to galactose via an $\alpha(2,3)$ bond, thereby causing the binding of the monoclonal antibody capable of specifically recognizing the sugar chain in which the terminal sialic acid residue has been bound to galactose via an $\alpha(2,3)$ bond to the free PSA that has been bound to the anti-free PSA antibody immobilized on the carrier; the amount of the free PSA that has an N-type sugar chain in which the terminal sialic acid residue has been bound to galactose via an $\alpha(2,3)$ bond is measured; and subsequently the amount measured in the preceding step is compared

[続葉有]



WO 2014/057983 A1



LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

パ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

with a preset cut-off value for prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. When the measured amount is larger than the cut-off value, it is determined that prostate carcinoma is developed or the probability of prostate carcinoma is high. When the measured amount is smaller than the cut-off value, it is determined that benign prostatic hyperplasia is developed or the probability of benign prostatic hyperplasia is high.

(57) 要約: 本発明の課題は、少ない分析試料で高感度に再現性よく前立腺癌と前立腺肥大を識別する方法を提供することである。その解決手段として本発明の前立腺癌と前立腺肥大を識別する方法は、前立腺特異抗原 (PSA) を含む分析試料と抗フリー PSA 抗体を固定化した担体を接触させて担体に固定化した抗フリー PSA 抗体にフリー PSA を結合させた後、固定化した抗フリー PSA 抗体にフリー PSA が結合した担体と末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を接触させて担体に固定化した抗フリー PSA 抗体に結合したフリー PSA に末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を結合させ、末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合した N 型糖鎖を有するフリー PSA 量を測定し、得られた測定量を予め設定された前立腺癌と前立腺肥大のカットオフ値と比較することにより、カットオフ値よりも多い場合は前立腺癌であるかその蓋然性が高く、少ない場合は前立腺肥大であるかその蓋然性が高いと判定することによる。

明 細 書

発明の名称：

前立腺癌と前立腺肥大を識別するための方法およびキット

技術分野

[0001] 本発明は、前立腺癌と前立腺肥大を識別するための方法およびキットに関する。

背景技術

[0002] 前立腺癌 (prostate carcinoma: 以下「Pca」と略す) は男性の主要な死亡原因であることは周知の通りであり、前立腺特異抗原 (prostate specific antigen: 以下「PSA」と略す) はPcaに対する最も重要な腫瘍マーカーとして認識されている (非特許文献1)。PSAは約34kDaの糖蛋白で、糖鎖はその約8%を占める。Pcaの早期診断に対する血清PSAテストの有用性は既に多くの文献に記載されているが、Pcaに罹患している男性と前立腺肥大 (benign prostate hyperplasia: 以下「BPH」と略す) に罹患している男性の間にはグレーゾーン (gray zone) と呼ばれるPcaともBPHともどちらとも言えない領域がある (非特許文献2)。そこで2つの病変を正確に区別するための試み、例えば、PSA密度、PSA勾配、フリーPSA/トータルPSAの比などを指標にした試みがこれまで実施されてきた。しかしながら、こうした方法では2つの病変を正確に区別することは困難である。そのため、現在の血清PSAテストはPcaに特異的ではなく、感度と特異度を共に満足させる適切なカットオフ値がないことが世界的な問題となっている。

[0003] このような背景のもと、本発明者である大山らのグループは、精囊液から精製したPSAをN-Glycosidase Fで処理し、PSAのN型糖鎖を切り出してmatrix associated laser desorption/ionization time-of-flight

(MALDI TOF) mass spectrometry (MS) によって解析することで、PSAの糖鎖として19種類を同定し、PSAの糖鎖が非常に多様性に富んでいることを明らかにした(非特許文献3)。それ以前にStameyらのグループは、PSAの糖鎖としては2本鎖で末端にシアル酸が $\alpha(2,6)$ 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖のみが発現していると報告していたが(非特許文献4)、末端のシアル酸は $\alpha(2,6)$ 結合でのみでなく $\alpha(2,3)$ 結合でガラクトースに結合しているものも約10%存在することが大山らのグループによって明らかになった。その後、大山らのグループは、PSAを糖鎖のみでなく、PSAのペプチド配列を含む状態でMS-MSによって解析することで、PSAのN型糖鎖の末端シアル酸残基は、癌化に伴い、 $\alpha(2,6)$ 結合でよりも $\alpha(2,3)$ 結合でガラクトースに結合するものが増加することを明らかにした(非特許文献5)。

[0004] 以上の知見に鑑みれば、末端シアル酸残基が $\alpha(2,3)$ 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するPSA量を指標にしてPcaとBPHを識別することが可能であると考えられ、実際に、本発明者である大山が特許文献1において提案した末端シアル酸残基が $\alpha(2,3)$ 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するイヌエンジュレクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、PcaとBPHを識別できることが確認されている。しかしながら、イヌエンジュレクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーによってPcaとBPHを識別する方法は、これまでに提案されてきた方法と全く異なる方法として注目されるが、末端シアル酸残基が $\alpha(2,3)$ 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するPSA量はトータルPSA量のわずか1~2%と極微量であるため、精度の高い識別を行うためには分析試料として血清を大量(10ml程度)に必要とするという問題がある。また、使用するイヌエンジュレクチンは天然物からの抽出物であるため、ロット間での品質のばらつきが認められるという問題もある。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第4514919号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Stamey TA, Yang N, Hay AR, et al., N. Engl. J. Med. 1987; 317: 909-916

非特許文献2：Catalona WJ, et al., JAMA 1998; 279: 1542-1547

非特許文献3：Ohyama C, et al., Glycobiology, 2004; 14: 671-679

非特許文献4：Belanger A, Van Halbeek H, Gravuxes HC, et al. Prostate, 1995; 27: 187-197

非特許文献5：Tajiri M, Ohyama C, Wada Y, Glycobiology, 2008; 18: 2-8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] そこで本発明は、少ない分析試料で高感度に再現性よくPcaとBPHを識別する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

[0008] 本発明者らは上記の点に鑑みて鋭意検討を行った結果、末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた免疫学的測定法によって分析試料中に含まれる末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量を測定することで、少ない分析試料で高感度に再現性よくPcaとBPHを識別できることを見出した。

[0009] 上記の知見に基づいてなされた本発明のPcaとBPHを識別するための

方法は、請求項1記載の通り、PSAを含む分析試料と抗フリーPSA抗体を固定化した担体を接触させて担体に固定化した抗フリーPSA抗体にフリーPSAを結合させた後、固定化した抗フリーPSA抗体にフリーPSAが結合した担体と末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を接触させて担体に固定化した抗フリーPSA抗体に結合したフリーPSAに末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を結合させ、末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量を測定し、得られた測定量を予め設定されたPcaとBPHのカットオフ値と比較することにより、カットオフ値よりも多い場合はPcaであるかその蓋然性が高く、少ない場合はBPHであるかその蓋然性が高いと判定することによるものである。

また、請求項2記載の方法は、請求項1記載の方法において、PSAを含む分析試料が、血清、尿、前立腺組織抽出液、精液、膀胱洗浄液からなる群より選択される少なくとも1つであるものである。

また、請求項3記載の方法は、請求項1記載の方法において、抗フリーPSA抗体が抗ヒトフリーPSA特異的モノクローナル抗体（コンプレックスPSAと反応しないもの）であるものである。

また、請求項4記載の方法は、請求項1記載の方法において、担体が磁性粒子であるものである。

また、本発明のPcaとBPHを識別するためのキットは、請求項5記載の通り、抗フリーPSA抗体を固定化した担体と、末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を少なくとも含むものである。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、少ない分析試料で高感度に再現性よくPcaとBPHを識別する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例1における、Pca患者とBPH患者の血清中の末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量の測定結果である(蛍光強度による)。

[図2]同、測定結果に基づくROC曲線である。

[図3]実施例2における、Pca患者とBPH患者の血清中の末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量の測定結果(左)と、この測定結果に基づくROC曲線(右)である。

[図4]実施例3における、Pca患者とBPH患者の血清中の末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量の測定結果(左)と、この測定結果に基づくROC曲線(右)である。

[図5]実施例4における、Pca患者とBPH患者の血清中の末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量の測定結果である(ブランク試料の蛍光強度またはHLT試料の蛍光強度で補正したもの)。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明のPcaとBPHを識別するための方法は、PSAを含む分析試料と抗フリーPSA抗体を固定化した担体を接触させて担体に固定化した抗フリーPSA抗体にフリーPSAを結合させた後、固定化した抗フリーPSA抗体にフリーPSAが結合した担体と末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を接触させて担体に固定化した抗フリーPSA抗体に結合したフリーPSAに末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を結合させ、末端シアル酸残基が α (2, 3)結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量を測定し、得られた測定量を予め設定されたPcaとBPHのカットオフ値と比較することにより、カットオフ値よりも多い場合はPcaであるかその蓋然性が

高く、少ない場合はBPHであるかその蓋然性が高いと判定することによるものである。

[0013] 本発明において、PSAを含む分析試料としては、血清、尿、前立腺組織抽出液、精液、膀胱洗浄液などが挙げられる。その調製は自体公知の方法によって行えばよい。分析試料は少量であってよい。望ましくは1~1000 μ l、より望ましくは5~500 μ l、最も望ましくは10~100 μ lである。

[0014] 抗フリーPSA抗体を固定化した担体は、市販の抗フリーPSA抗体と担体を用いて自体公知の方法によって調製することができる。末端シアル酸残基が α (2,3)結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量を高感度で測定するため、抗フリーPSA抗体として、抗ヒトフリーPSA特異的モノクローナル抗体(コンプレックスPSAと反応しないもの)を用いることが望ましい(例えばクローン2E2由来のものやクローン8A6由来のものなどが市販されている)。担体は、磁性粒子やウェルプレートなどの抗体を固定化することができるものであればどのようなものであってもよいが、磁力によって容易に回収することができるので取扱い性に優れるという点において磁性粒子が望ましい。なお、本発明において「フリーPSA」は α 1-アンチキモトリプシンなどの蛋白と結合していないPSAを意味し、非蛋白結合型PSAや遊離型PSAとも称される(コンプレックスPSAは蛋白と結合しているPSAを意味する)。

[0015] 末端シアル酸残基が α (2,3)結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体は、末端シアル酸残基が α (2,3)結合でガラクトースに結合した糖鎖、即ち、Sia α (2,3)Gal糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体であればどのようなものであってもよい。市販のものとしては本発明者である鈴木らのグループによって確立されたHYB4モノクローナル抗体(和光純薬社)が例示されるがこれに限定されるわけではない。

[0016] PSAを含む分析試料と抗フリーPSA抗体を固定化した担体を接触させ

て担体に固定化した抗フリーP S A抗体にフリーP S Aを結合させる工程と、固定化した抗フリーP S A抗体にフリーP S Aが結合した担体と末端シアル酸残基が α (2 , 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を接触させて担体に固定化した抗フリーP S A抗体に結合したフリーP S Aに末端シアル酸残基が α (2 , 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を結合させる工程は、いずれも例えば、 2°C ~ 5°C の温度条件で10分間~3時間行えばよい。末端シアル酸残基が α (2 , 3) 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーP S A量の測定は、例えばELISA (E n z y m e - L i n k e d I m m u n o s o r b e n t A s s a y) サンドイッチ法やフローサイトメトリー法によって行うことができる。後者の場合、測定は例えば検出可能な蛍光標識を行った二次抗体を用いて行えばよいが、末端シアル酸残基が α (2 , 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を蛍光標識して二次抗体を用いずに行うこともできる。なお、抗体の標識は検出可能なものであればどのようなものであってもよく、蛍光標識に限定されるわけではない。測定の際に必要なに応じて、洗浄、精製、分画といった操作を行ってもよいことは言うまでもない。また、抗フリーP S A抗体を固定化した担体と、末端シアル酸残基が α (2 , 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体は、P c aとB P Hを容易かつ簡便に識別することができるように洗浄液などと同時にキット化してもよい。

[0017] こうして測定された末端シアル酸残基が α (2 , 3) 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーP S A量を予め設定されたP c aとB P Hのカットオフ値と比較することにより、カットオフ値よりも多い場合はP c aであるかその蓋然性が高く、少ない場合はB P Hであるかその蓋然性が高いと判定することができる。カットオフ値は、P c aに罹患している男性群の測定値とB P Hに罹患している男性群の測定値をもとに設定することができる。例えば蛍光標識を用いて測定する場合、カットオフ値は蛍光強度 (

MFI : Mean Fluorescence Intensity) として、測定条件などに応じて1~10000の範囲にある数値で設定することができる。

実施例

[0018] 以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は以下の記載に限定して解釈されるものではない。

[0019] 参考例1：末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するHYB4モノクローナル抗体の作製

本発明による前立腺癌と前立腺肥大の識別に用いる末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を次の手順によって作製した。

[0020] (1) 抗原の調製

糖脂質である $IV^3NeuAcnLc_4Cer$ ($NeuAc\alpha 2-3Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc\beta 1-1' Cer$) を免疫原として使用した。

[0021] (2) ハイブリドーマの作製

$IV^3NeuAcnLc_4Cer$ ($NeuAc\alpha 2-3Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc\beta 1-1' Cer$) $228\mu g$ を $EtOH 114\mu l$ に溶かし、超音波処理後、 $PBS 1820\mu l$ を加えて、 $37^\circ C$ に加温した。その後、アジュバントとして酸処理した *Salmonella minnesota* 菌体膜画分を PBS で $1mg/ml$ に懸濁した溶液 $568\mu l$ を加えて $37^\circ C$ 、10分間静置させた。この混合溶液 $200\mu l$ を0, 4, 7, 11, 21, 25日目にC3Hマウスに尾静脈内投与した。最終投与後3日目に、免疫したマウスの脾臓から調製したリンパ球をケーラーとミルシュタインの常法 (*Nature*, 256, 495, 1975) に従って、細胞融合に供した。融合相手の親細胞に、マウス骨髓腫細胞株であるPA1 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB0113) を用い、融合剤としてはポリエチレングリコール4000 (メルク社) を用

いた。このようにして融合した細胞は、HAT培地に懸濁し、96穴のマイクロカルチャープレートに分注して培養した。約2週間後、コロニー陽性ウエルの培養上清中の抗体産生を $IV^3NeuAcnLc_4Cer$ を抗原とするELISA法でスクリーニングした。スクリーニングは96穴マイクロタイタープレート（ダイナテック社、IMMULON 1B）を用いて次のようにして行った。 $IV^3NeuAcnLc_4Cer$ を95%EtOHで0.1nmol/50 μ lに調製し、50 μ l/wellとなるように加えた。ブランクとなるウェルには95%EtOH50 μ lを入れた。減圧下でEtOHを蒸発させ、抗原糖脂質を固相化後、1% human serum albumin（Sigma社、A6784）含有PBS（PBS-1）を200 μ l/wellとなるように加え、室温に1時間放置した。PBS-1を除去後、ハイブリドーマ培養上清を50 μ l/wellとなるように加え、室温にて1時間反応させた。培養上清を除去後、PBS100 μ l/wellでウェルを1回洗浄した。PBS-1で10000倍希釈した二次抗体（Protein A-HRP）溶液を100 μ l/wellとなるように加え、室温にて1時間反応させた。二次抗体溶液を除去後、ウェルをPBS100 μ l/wellで5回洗浄した。ペルオキシダーゼ基質（O-フェニレンジアミン2mgを80mMクエン酸-リン酸緩衝液（pH5.6）5ml、30%過酸化水素2 μ lで溶解したもの）を100 μ l/wellとなるように加えた。遮光放置して発色が見られたところで1M HCl100 μ l/wellを加えて発色を停止させた。その後、測定波長492nm、対照波長630nmに設定したマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。高い抗体産生能、良好な増殖能をもつ3つのハイブリドーマクローンが得られた（抗体産生陽性率：0.5%）。得られたクローンが産生する抗体のクラス（免疫グロブリンのタイプ）はすべてIgG3（ κ ）であった。以上のようにして選択されたハイブリドーマのうち、クローンHYB4由来のモノクローナル抗体がSia α （2,3）Gal糖鎖と特異的に反応した。

[0022] (3) HYB4モノクローナル抗体の調製

(2) において得られたハイブリドーマ (クローンHYB4) を、75 cm² フラスコ (CORNING社、430720) を用いて、10% (v/v) Fetal bovine serum (FBS) 含有RPMI 1640培地 (ニッスイ社、05918) 25 ml 中、37℃、5%CO₂存在下で2日間前培養した。75 cm² フラスコ2本から細胞を回収し、E-RDF培地 (極東社、26500) 1 l に懸濁後、大量培養装置 (スピナーフラスコ) に移し、37℃で4日間回転培養を行った。この培養液中にSia α (2, 3)Gal糖鎖と特異的に反応するモノクローナル抗体が高濃度に含まれていた。クローンHYB4由来の培養液は、プロテインAセファロースによるアフィニティクロマトグラフィーで精製した。こうしてハイブリドーマ (クローンHYB4) から調製したHYB4モノクローナル抗体は、免疫グロブリンのタイプがIgG3で、分子量は約15万ダルトンであった。こうして確立されたHYB4モノクローナル抗体は、和光純薬社から市販されている。

[0023] 実施例1 : HYB4モノクローナル抗体を用いたPcaとBPHの識別 (その1)

以下の手順によって行った。

[0024] (1) 担体への抗フリーPSA抗体の固定化

磁性ビーズであるMagplex microsphere (Luminex社) を担体として用い、その表面に抗フリーPSA抗体をXMAP Antibody Coupling Kitのマニュアルに従って固定した。具体的には、1.5 ml チューブに 6.25×10^6 個/500 μ l のMagplex microsphereを添加し、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。チューブへ500 μ l のActivation bufferを添加し、10秒間混合後、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。再度チューブへ400 μ l のActivation bufferを添加し、10秒間混合

した。次に50 μ lのSulfo-NHSと50 μ lのEDC溶液を添加し、10秒間混合後、20分間室温で放置した。Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。磁性ビーズを洗浄するため、500 μ lのWash bufferを添加し、10秒間混合後、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。この洗浄操作を計3回繰り返した。25 μ gの抗ヒトフリーPSA特異的モノクローナル抗体（クローン2E2由来のコンプレックスPSAと反応しない抗フリーPSA抗体）（フナコシ社）を1000 μ lのActivation bufferに混合し、磁性ビーズの入ったチューブに添加した。室温で緩やかに混合（15–30rpm）しながら2時間放置した。Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。磁性ビーズを洗浄するため、500 μ lのWash bufferを添加し、10秒間混合後、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。この洗浄操作を計3回繰り返した。最後に1mlのWash bufferを添加し、1 μ lあたり6250個の抗フリーPSA抗体を固定化したMagplex microsphereを調製し、使用するまで4 $^{\circ}$ Cで保存した。

[0025] (2) LumineXシステムを用いた末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSAの定量

(A) 定量対象者

トータルPSAのレベルが20.0ng/ml以下のPca患者79名およびBPH患者96名とし、それぞれの患者から血清を採取し、測定を行った。患者の組織病理学的診断は前立腺生検を行って確認した。患者の年齢、PSA値、病理組織学的悪性度分類および臨床病期を表1に示す。

[0026]

[表1]

	BPH	Pca	P-value
患者数	96	79	
年齢(中央値)	69.5±8.0	72.0±7.3	0.2634
トータルPSA値 (ng/mL)	2.1-19.7	3.0-17.6	0.1421
トータルPSA値中央値	6.60	7.5	
0-4 ng/mL (%)	2.1	2.5	
4-10 ng/mL (%)	78.1	69.6	
10-20 ng/mL (%)	19.7	27.8	
>20 ng/ml (%)	0	0	
Gleason score			
GS6 (%)	-	3.3	
GS7 (%)	-	43.3	
GS8 (%)	-	18.3	
GS9 (%)	-	35	
GS10 (%)	-	0	
cT stage (臨床的腫瘍径)			
T1c-T2a (%)	-	75.9	
T2b (%)	-	7.6	
T2c-T3 (%)	-	13.9	
T4	-	0	

[0027] (B) 定量方法

96穴白色プレート(WATMAN社)の各ウェルに(1)において調製した12500個/2 μ lの抗フリーPSA抗体固定化Magplex microspheresを添加した。Carbofree Blocking buffer(フナコシ社)を50 μ l添加し、磁性ビーズをブロッキングした後、各ウェルに分析試料である血清を20 μ l添加し、1時間、4℃

で放置後、磁性ビーズを100 μ lの0.01%Tween20を含むTris-buffered saline (TBST) で3回洗浄した。次に50 μ lのHYB4モノクローナル抗体を混合し、1時間、4 $^{\circ}$ Cで放置した。磁性ビーズを50 μ lのTBSTで3回洗浄後、50 μ lのPhycoerythrin蛍光色素 (PE) 標識抗マウスIgG3抗体 (Santa Cruz Biotechnology社) を混合し、45分、室温で放置後、Luminex100フローメトリーに96穴白色プレートを設定し、各ウェルの蛍光強度 (MFI: Mean Fluorescence Intensity) を測定した。

[0028] (C) 定量結果

図1に示す。図1から明らかなように、Pca患者の血清の蛍光強度は、BPH患者の血清の蛍光強度よりも有意に高かった ($P < 0.001$, Mann-Whitney U-TEST)。これは即ち、Pca患者の血清中の末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量は、BPH患者の血清中のそれより多いことを意味する。また、この定量結果からRelative Operating Characteristic curve (ROC曲線) により解析を行ったところ、MFI値のcut off = 128.5で、感度0.8354、特異度0.7083、AUC (曲線下面積: Area Under the Curve) = 0.8445であった (図2)。

[0029] (3) PcaとBPHの識別

(2) で設定したMFIのカットオフ値を基準にして本発明の方法によってPcaとBPHの識別を行ったところ、従来のPSA検査でPcaの疑いがあると判断された患者 (177名) で針生検を施行してBPHと診断された患者 (98名) のうちの約75% (73名) の患者についてBPHと判定できた。以上の結果から、本発明によってPcaとBPHを少ない分析試料で高感度に再現性よく識別できることがわかった。現在行われているPca診断法としての血清PSAテストではPcaとBPHの識別は困難であり、

PSA値が4 ng/ml以上の場合、前立腺に針を刺入する生検が必要となる。しかしながら、針生検を施行した患者のうちPcaと診断される患者は約20%に過ぎず、結果として残りの約80%の患者には本来不要であった針生検を施行せざるを得ないのが現状である。しかも針生検は侵襲的であり、出血や感染症などの重篤な有害事象を伴うことが懸念される。本発明によれば、PcaとBPHを少ない分析試料で高感度に再現性よく識別できるので、針生検の施行を必要とする症例の絞り込みが可能になるため、これまで困難であった非侵襲的なPca診断の実施ができる。

[0030] 実施例2：HYB4モノクローナル抗体を用いたPcaとBPHの識別（その2）

以下の手順によって行った。

[0031] (1) 担体への抗フリーPSA抗体の固定化

磁性ビーズであるMagplex microsphere (Luminex社)を担体として用い、その表面に抗フリーPSA抗体をXMAP Antibody Coupling Kitのマニュアルに従って固定した。具体的には、1.5mlチューブに 1.25×10^7 個/1000 μ lのMagplex microsphereを添加し、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。チューブへ500 μ lのActivation bufferを添加し、10秒間混合後、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。再度チューブへ400 μ lのActivation bufferを添加し、10秒間混合した。次に50 μ lのSulfo-NHSと50 μ lのEDC溶液を添加し、10秒間混合後、20分間室温で放置した。Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。磁性ビーズを洗浄するため、500 μ lのWash bufferを添加し、10秒間混合後、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。この洗浄操

作を計3回繰り返した。62.5 μ gの抗ヒトフリーPSA特異的モノクローナル抗体（クローン8A6由来のコンプレックスPSAと反応しない抗フリーPSA抗体）（Abcam社）を500 μ lのActivation bufferに混合し、磁性ビーズの入ったチューブに添加した。室温で緩やかに混合（15-30 rpm）しながら2時間放置した。Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。磁性ビーズを洗浄するため、500 μ lのWash bufferを添加し、10秒間混合後、Magnetic Separator上で2分間、静置した。磁性ビーズ沈殿後、上清を吸引し、除去した。この洗浄操作を計3回繰り返した。最後に2mlのWash bufferを添加し、1 μ lあたり6250個の抗フリーPSA抗体を固定化したMagplex microspheresを調製し、使用するまで4°Cで保存した。

[0032] (2) LumineXシステムを用いた末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSAの定量

(A) 定量対象者

トータルPSAのレベルが10.0 ng/ml以下のPca患者138名およびBPH患者176名とし、それぞれの患者から血清を採取し、測定を行った。患者の組織病理学的診断は前立腺生検を行って確認した。患者の年齢、PSA値、病理組織学的悪性度分類および臨床病期を表2に示す（表中、Non-PCaはBPH患者を意味する）。

[0033]

[表2]

Characteristics	Non-PCa	PCa	<i>P</i>
Patients (n)	176	138	
Median Age (range)	68.0 (51–83)	69.0 (50–84)	0.0181
Median PSA, ng/mL (range)	5.8 (2.0–10.0)	6.4 (2.2–10.0)	0.0008
Median fPSA, ng/mL (range)	0.12 (0–2.43)	0.10 (0–4.40)	0.1267
Median %fPSA (% , range)	2.1 (0–51.6)	1.6 (0–44.0)	0.0020
Median S2,3PSA, MFI(range)	940 (395–2221)	1484 (693–2971)	<0.0001
Biopsy Gleason Sum ,n (%)			
5–6		24 (17.5)	
7		66 (48.2)	
8–10		48 (34.3)	
Clinical stage (n, %)			
cT1c–cT2a		127 (92.0)	
cT2b		3 (2.2)	
cT2c		7 (5.1)	
unknown		1 (0.7)	
D'Amico Risk category (n, %)			
low		24 (17.4)	
intermediate		64 (46.4)	
high		50 (36.2)	

[0034] (B) 定量方法

実施例 1 に記載の方法と同様の方法で行った。

[0035] (C) 定量結果

図 3 左に示す (図中、Non-PCa は BPH 患者を意味する)。図 3 左から明らかなように、Pca 患者の血清の蛍光強度は、BPH 患者の血清の蛍光強度よりも有意に高かった ($P < 0.0001$, *Man whitney U-TEST*)。これは即ち、Pca 患者の血清中の末端シアル酸残基が $\alpha(2, 3)$ 結合でガラクトースに結合した N 型糖鎖を有するフリー PSA 量は、BPH 患者の血清中のそれより多いことを意味する。また、この定量結果から *Relative Operating Characteristic curve* (ROC 曲線) により解析を行ったところ、MFI 値の *cut off* = 1130 で、感度 90.6%、特異度 64.2%、*AUC* = 0.84 であった (図 3 右: S2, 3PSA)。これに対し、トータル P

S A測定法はAUC=0.61、%フリーPSA測定法（フリーPSA／トータルPSAの比を指標にした方法）はAUC=0.60であった（図3右：図中、PSAはトータルPSA測定法、%fPSAは%フリーPSA測定法を意味する）。よって、本発明の方法は感度90%以上であってAUC=0.80以上であることは、本発明の方法がPcaとBPHの識別精度に優れていることを裏付けるものであった。本発明の方法と、トータルPSA測定法および%フリーPSA測定法について、特異度、診断精度、陽性診断率、陰性診断率を比較した結果を表3に示す（表中、S2,3PSAは本発明の方法、PSAはトータルPSA測定法、%fPSAは%フリーPSA測定法を意味する）。表3から明らかのように、本発明の方法によれば、特異度60%以上、診断精度70%以上、陽性診断率60%以上、陰性診断率80%以上でもって、PcaとBPHを識別できることがわかった。

[0036] [表3]

	S2,3PSA,	PSA	%fPSA
Cutoff values normalized by sensitivity for S2,3PSA test	>1130 (MFI)	>4.5 ng/mL	<5.39 %
Sensitivity (%)	90.6	90.6	90.6
Specificity (%)	64.2	9.7	11.9
Accuracy (%)	75.8	45.2	46.5
Positive predictive value (%)	66.5	44.0	44.6
Negative predictive value (%)	89.7	56.7	61.8

[0037] 実施例3：HYB4モノクローナル抗体を用いたPcaとBPHの識別とイヌエンジュレクチンを用いたPcaとBPHの識別の比較

以下の手順によって行った。

[0038] (1) 担体への抗フリーPSA抗体の固定化

実施例2に記載の方法と同様の方法で行った。

[0039] (2) LumineXシステムを用いた末端シアル酸残基が α (2, 3) 結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSAの定量

(A) 定量対象者

トータルPSAのレベルが20.0 ng/ml以下のPca患者48名およびBPH患者54名とし、それぞれの患者から血清を採取し、測定を行った。患者の組織病理学的診断は前立腺生検を行って確認した。患者の年齢、PSA値、病理組織学的悪性度分類および臨床病期を表4に示す(表中、Non-PCaはBPH患者を意味する)。

[0040] [表4]

Characteristics	Non-PCa	PCa	<i>P</i>
Patients (n)	54	48	
Median Age (range)	69.0 (53–81)	72.5 (58–84)	0.0737
Median PSA (ng/mL, range)	6.65 (2.4–17.1)	7.10 (3.1–15.3)	0.5989
Median fPSA (ng/mL, range)	0.23 (0.05–1.09)	0.16 (0.00–0.69)	0.0166
Median %fPSA (% , range)	3.00 (0.84–18.7)	2.24 (0.14–9.02)	0.0083
Median S2,3PSA HYB4(MFI, range)	922 (621–2030)	1670 (716–3545)	<0.0001
Median S2,3PSA MAA(MFI, range)	953 (239–1436)	1095 (118–1970)	0.0288
Biopsy Gleason Sum (n, %)			
5–6		0 (0)	
7		26 (54.2)	
8–10		22 (45.8)	
Clinical stage (n, %)			
cT1c–cT2a		39 (81.25)	
cT2b		3 (6.25)	
cT2c–cT3		6 (12.5)	
D’Amico Risk category (n, %)			
low		0 (0)	
intermediate		23 (47.9)	
high		25 (52.1)	

[0041] (B) 定量方法

(i) HYB4モノクローナル抗体を用いる場合
実施例1に記載の方法と同様の方法で行った。

[0042] (i i) イヌエンジュレクチンを用いる場合

96穴白色プレート(WATMAN社)の各ウェルに(1)において調製した12500個/2 μ lの抗フリーPSA抗体固定化Magplex microspher eを添加した。Carbofree Blocking buffer (フナコシ社)を50 μ l添加し、磁性ビーズをブロッキングした後、各ウェルに分析試料である血清を20 μ l添加し、1時間、4 $^{\circ}$ Cで放置後、磁性ビーズを100 μ lの0.01%Tween20を含むTris-buffered saline (TBST)で3回洗浄した。次に50 μ lのビオチン標識イヌエンジュレクチン(Biotinylated MAA:Vector laboratories社)を混合し、1時間、4 $^{\circ}$ Cで放置した。磁性ビーズを50 μ lのTBSTで3回洗浄後、50 μ lのPhycocerythrin蛍光色素(PE)標識ストレプトアビジン(Santa Cruz Biotechnology社)を混合し、45分、室温で放置後、Luminex100フローメトリーに96穴白色プレートをセットし、各ウェルの蛍光強度(MFI)を測定した。

[0043] (C) 定量結果

図4左に示す(図中、Non-PCaはBPH患者、HYB4は本発明の方法、MAAはイヌエンジュレクチンを用いた方法を意味する)。図4左から明らかのように、本発明の方法によれば、Pca患者の血清の蛍光強度とBPH患者の血清の蛍光強度の違いを、20 μ lという少ない血清量で認識することができたが、イヌエンジュレクチンを用いた方法ではできなかった。また、この定量結果からRelative Operating Characteristic curve (ROC曲線)により解析を行ったところ、図4右から明らかのように、本発明の方法はAUC=0.8561であった(S2, 3PSA HYB4)。これに対し、イヌエンジュレクチンを用いた方法はAUC=0.6256であり(S2, 3PSA MAA)、トータルPSA測定法のAUC(0.5305:PSA)と%フリーPSA測定法のAUC(0.6582:%fPSA)と大差がなかった。よって、

本発明の方法は、イヌエンジュレクチンを用いた方法と比較して、少ない分析試料でもP c aとB P Hの識別精度が優れていることがわかった。

[0044] 実施例4：H Y B 4モノクローナル抗体を用いたP c aとB P Hの識別のためのカットオフ値の設定

実施例2における本発明の方法によるP c aとB P Hの識別のためのカットオフ値を規格化するため、27例の血清を含まない試料（空白試料：リン酸緩衝液）または80例の健常者の血清（H L T試料）について実施例2に記載の方法と同様の方法で測定した蛍光強度で分析試料である血清の蛍光強度を除算することによって比率で表した。結果を図5に示す。図5から明らかのように、H L T試料では末端シアル酸残基が α （2，3）結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーP S Aが存在しないため、その蛍光強度は空白試料の蛍光強度とほぼ同じであった。27例の空白試料の蛍光強度の平均値あるいは中央値または80例のH L T試料の蛍光強度の平均値あるいは中央値でP c a患者の血清の蛍光強度およびB P H患者の血清の蛍光強度を除算し、比率を求めた結果、検出感度90%を満たすカットオフ値は表5の通りであり、P c aが疑われる患者の血清の蛍光強度を空白試料の蛍光強度の平均値あるいは中央値またはH L T試料の蛍光強度の平均値あるいは中央値で除算した値がカットオフ値よりも高い場合はP c aであるかその蓋然性が高く、少ない場合はB P Hであるかその蓋然性が高いと判定することができることがわかった。

[0045] [表5]

(1)「分析試料である血清の蛍光強度／空白試料の蛍光強度の平均値」を採用する場合 カットオフ値4.975-4.990、感度90.58%、特異度71.59-72.16%
(2)「分析試料である血清の蛍光強度／空白試料の蛍光強度の中央値」を採用する場合 カットオフ値5.335-5.350、感度90.65%、特異度70.79-71.35%
(3)「分析試料である血清の蛍光強度／H L T試料の蛍光強度の平均値」を採用する場合 カットオフ値5.260-5.300、感度90.58%、特異度71.02-72.16%
(4)「分析試料である血清の蛍光強度／H L T試料の蛍光強度の中央値」を採用する場合 カットオフ値5.565-5.600、感度90.58%、特異度71.02-72.16%

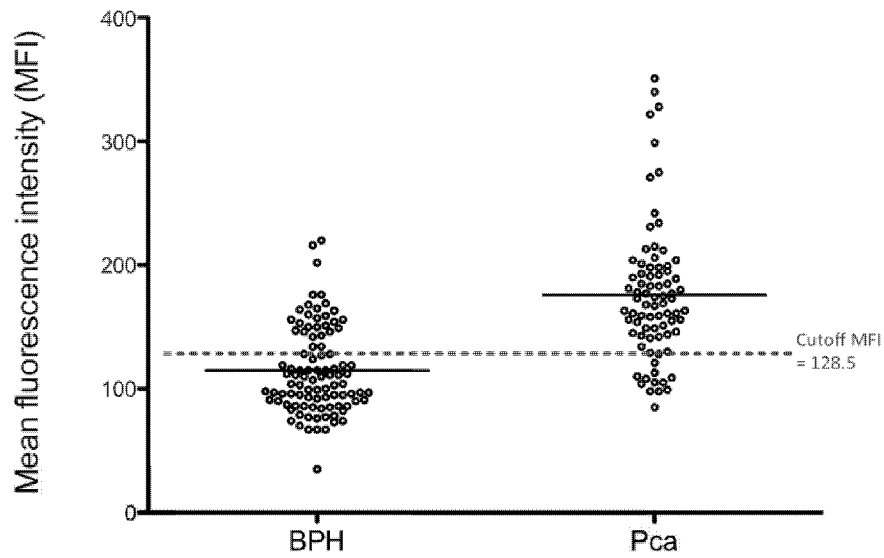
産業上の利用可能性

[0046] 本発明は、少ない分析試料で高感度に再現性よく P c a と B P H を識別する方法を提供することができる点において産業上の利用可能性を有する。

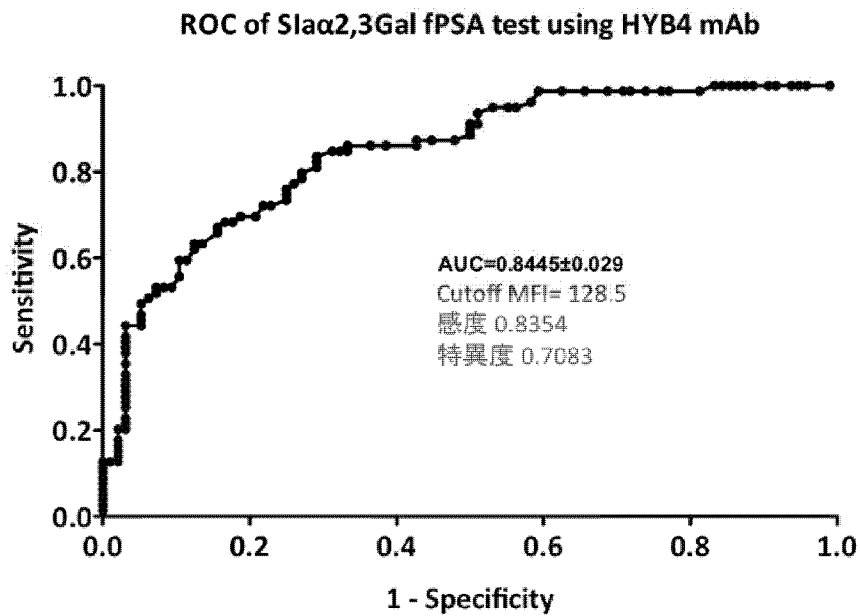
請求の範囲

- [請求項1] 前立腺癌と前立腺肥大を識別するための方法であって、前立腺特異抗原（PSA）を含む分析試料と抗フリーPSA抗体を固定化した担体を接触させて担体に固定化した抗フリーPSA抗体にフリーPSAを結合させた後、固定化した抗フリーPSA抗体にフリーPSAが結合した担体と末端シアル酸残基が α （2，3）結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を接触させて担体に固定化した抗フリーPSA抗体に結合したフリーPSAに末端シアル酸残基が α （2，3）結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を結合させ、末端シアル酸残基が α （2，3）結合でガラクトースに結合したN型糖鎖を有するフリーPSA量を測定し、得られた測定量を予め設定された前立腺癌と前立腺肥大のカットオフ値と比較することにより、カットオフ値よりも多い場合は前立腺癌であるかその蓋然性が高く、少ない場合は前立腺肥大であるかその蓋然性が高いと判定することによる方法。
- [請求項2] PSAを含む分析試料が、血清、尿、前立腺組織抽出液、精液、膀胱洗浄液からなる群より選択される少なくとも1つである請求項1記載の方法。
- [請求項3] 抗フリーPSA抗体が抗ヒトフリーPSA特異的モノクローナル抗体（コンプレックスPSAと反応しないもの）である請求項1記載の方法。
- [請求項4] 担体が磁性粒子である請求項1記載の方法。
- [請求項5] 抗フリーPSA抗体を固定化した担体と、末端シアル酸残基が α （2，3）結合でガラクトースに結合した糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を少なくとも含む前立腺癌と前立腺肥大を識別するためのキット。

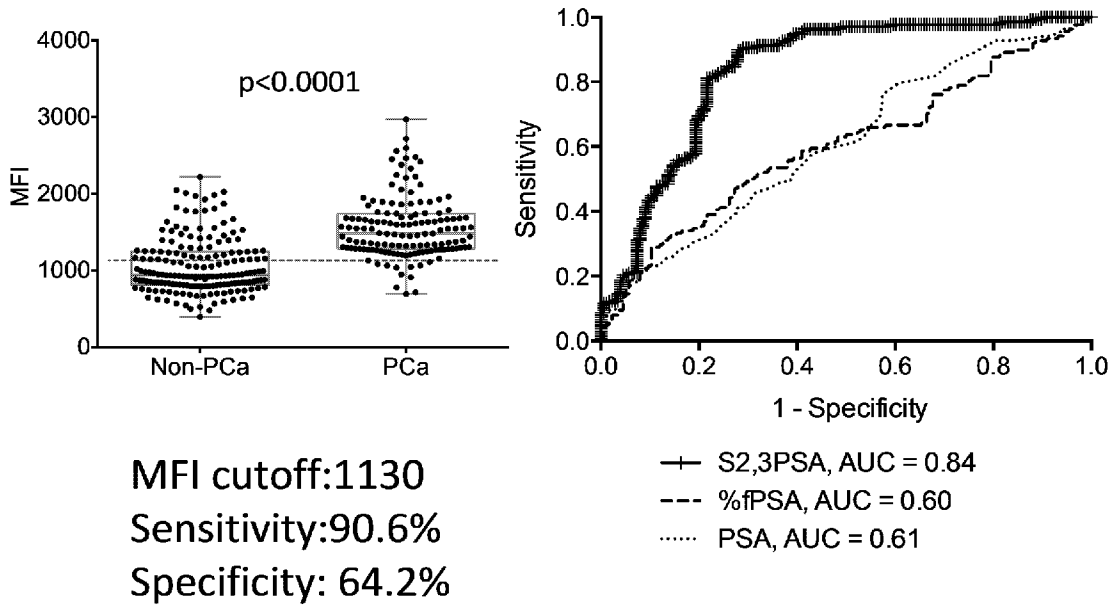
[図1]



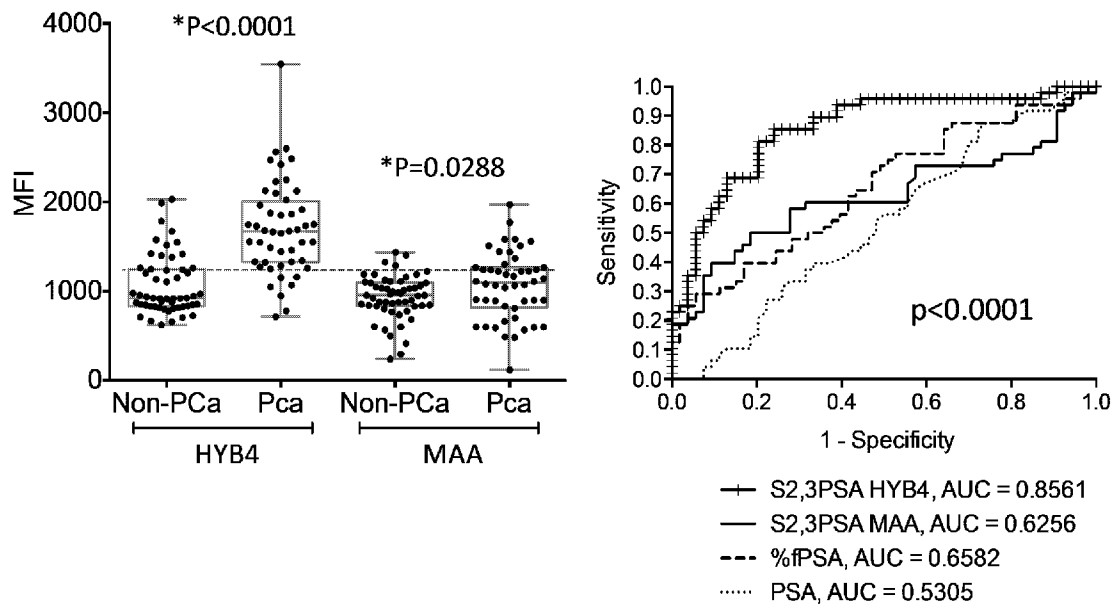
[図2]



[圖3]

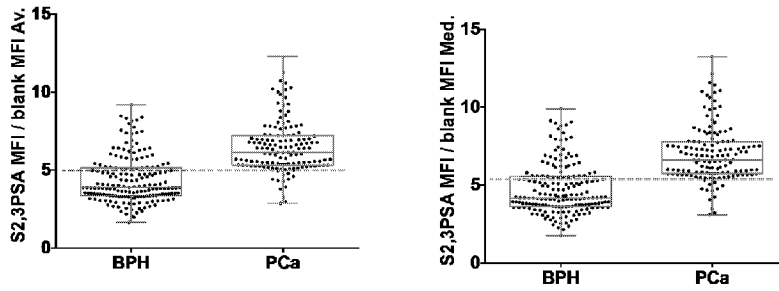


[圖4]

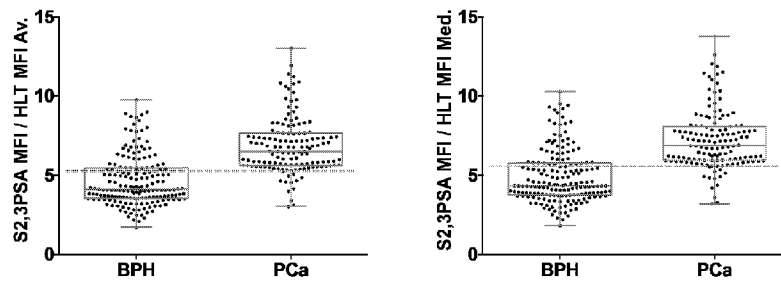


[図5]

ブランク試料を測定した場合の蛍光強度平均値(242)あるいは、蛍光強度中央値(225)をAとし、測定値比となる『B(分析試料の蛍光強度測定値)／A』の値を算出した結果(左:Aが蛍光強度平均値、右:Aが蛍光強度中央値)



HLT試料を測定した場合の蛍光強度平均値(228)あるいは、蛍光強度中央値(215)をAとし、測定値比となる『B(分析試料の蛍光強度測定値)／A』の値を算出した結果(左:Aが蛍光強度平均値、右:Aが蛍光強度中央値)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/077495

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/574(2006.01)i, G01N33/553(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)
G01N33/574, G01N33/553

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-55108 A (Tsutomu OYAMA), 20 February 2002 (20.02.2002), fig. 1; paragraphs [0012], [0006], [0009] (Family: none)	1-5
Y	Taro KINOSHITA, "Tosa no Seibutsu Kino no Kaimei to Riyo Gijutsu", URL (http://www.jst. go.jp/kisoken/crest/report/heisei17/pdf/a10/ f01/s013.pdf), 2005	1-5
Y	JP 2011-529184 A (The Johns Hopkins University), 01 December 2011 (01.12.2011), paragraphs [0019], [0020], [0054] & US 2011/0129849 A1 & EP 2316033 A	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 22 October, 2013 (22.10.13)	Date of mailing of the international search report 05 November, 2013 (05.11.13)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/077495

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Susumu AKIMOTO, "Measurement of serum prostate-specific antigen by DPC immulyze PSA kit and clinical evaluation in patients with prostate cancer", Hinyoki Geka, 1995.10, vol.8, no.10, 939 to 943	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, G01N33/553(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. G01N33/574, G01N33/553			
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)			
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 2002-55108 A (大山力) 2002.02.20, 【図1】【0012】【0006】【0009】 (ファミリーなし)	1-5	
Y	木下タロウ, 「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」, URL(http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/heisei17/pdf/a10/f01/s013.pdf), 2005	1-5	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <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 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日	22.10.2013	国際調査報告の発送日	05.11.2013
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J	4636

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	JP 2011-529184 A (ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ) 2011.12.01, 【0019】【0020】【0054】 & US 2011/0129849 A1 & EP 2316033 A	1-5
A	秋元晋, DPC-イムライズ PSA キットの臨床的検討, 泌尿器外科, 1995.10, Vol.8/No.10, 939-943	1-5