

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-501929

(P2014-501929A)

(43) 公表日 平成26年1月23日(2014.1.23)

(51) Int.Cl.

**G01N 33/574 (2006.01)**  
**G01N 33/48 (2006.01)**  
**G01N 33/493 (2006.01)**  
**G01N 33/543 (2006.01)**

F 1

GO1N 33/574  
 GO1N 33/48  
 GO1N 33/493  
 GO1N 33/543

D S A 597

テーマコード(参考)

2 G045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2013-547903 (P2013-547903)  
 (86) (22) 出願日 平成24年1月6日 (2012.1.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月30日 (2013.8.30)  
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2012/000008  
 (87) 國際公開番号 WO2012/093251  
 (87) 國際公開日 平成24年7月12日 (2012.7.12)  
 (31) 優先権主張番号 1100223.5  
 (32) 優先日 平成23年1月7日 (2011.1.7)  
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(71) 出願人 510188148  
 サイトシステムズ リミテッド  
 イギリス国, アバディーン エービー21  
 9ティーアール, クレイブストーン, ク  
 リュックシャンク ビルディング  
 (74) 代理人 100149294  
 弁理士 内田 直人  
 (72) 発明者 ギャロウェイ, デイビッド  
 イギリス国, アバディーン エービー21  
 9ティーアール, クレイブストーン, ク  
 リュックシャンク ビルディング, サイト  
 システムズ リミテッド

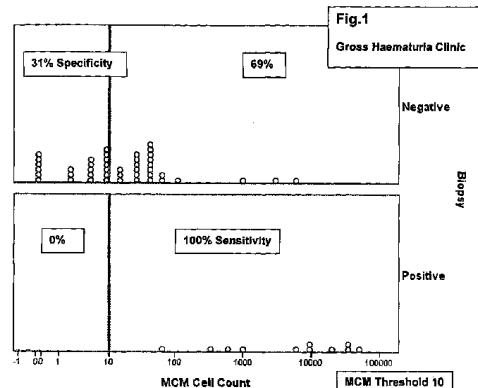
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】診断方法

## (57) 【要約】

本発明は、膀胱癌を罹患しているかまたは罹患するリスクにある被検体を検出する方法であって、i) 被検体から単離された体液試料を提供する、ii) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、iii) 該試料を、ミニ染色体維持(MCM)ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定することを含む方法を提供する。

【選択図】図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

膀胱癌を罹患しているかまたは罹患するリスクにある被検体を検出する方法であって、  
i) 被検体から単離された体液試料を提供する、  
ii) 試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、  
iii) 試料を、ミニ染色体維持（MCM）ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、  
iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、  
v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、  
vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、  
ことを含む方法。

**【請求項 2】**

前記決定工程（vi）が閾値数と比較したMCM標識細胞の測定に基づき、このとき該閾値より上または該閾値と同じ測定値が膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

被検体が膀胱癌と関連する症状を呈する、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】**

膀胱癌の症状が血尿を含む、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

閾値数が少なくともおよそ10細胞である、請求項1から4のいずれか一に記載の方法。

**【請求項 6】**

閾値数が少なくともおよそ30細胞である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

閾値数が少なくともおよそ50細胞である、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

閾値数がおよそ50から400である、請求項7に記載の方法。

**【請求項 9】**

被検体が膀胱癌を以前に発症したことがある、または再発した、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 10】**

閾値数が少なくともおよそ10細胞である、請求項1から9のいずれか一に記載の方法。

**【請求項 11】**

閾値数が少なくともおよそ30細胞である、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

閾値数が少なくともおよそ50細胞である、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

閾値数が少なくともおよそ200細胞である、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

閾値数がおよそ200から400である、請求項13に記載の方法。

**【請求項 15】**

膀胱癌に罹患している、または罹患するリスクにある被検体の検出方法であって、

i) 被検体から単離された体液試料を提供する、  
ii) 試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、  
iii) 試料を、ミニ染色体維持（MCM）ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、  
iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、

10

20

30

40

50

v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、  
 vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、  
 ことを含み、

このとき、該決定工程(vi)が閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくものであり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値が膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す、方法。

**【請求項16】**

閾値数が少なくともおよそ50細胞である、請求項8に記載の方法。

**【請求項17】**

閾値数があよそ50から400細胞である、請求項9に記載の方法。

**【請求項18】**

閾値数があよそ50細胞である、請求項10に記載の方法。

**【請求項19】**

膀胱癌の既往を有するかまたは再発している被検体における膀胱癌の検出方法であって、

- i) 被検体から単離された体液試料を提供する、
- ii) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
- iii) 該試料を、ミニ染色体維持(MCM)ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、

iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、

v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、そして、

vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、

ことを含み、

このとき、該決定工程(vi)が閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくものであり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値が膀胱癌もしくは膀胱癌の再発のリスクを表す、方法。

**【請求項20】**

閾値数が少なくともおよそ200細胞である、請求項19に記載の方法。

**【請求項21】**

閾値数があよそ200から400細胞である、請求項9に記載の方法。

**【請求項22】**

閾値数があよそ200細胞である、請求項10に記載の方法。

**【請求項23】**

体液が尿である、請求項1から22のいずれか一に記載の方法。

**【請求項24】**

MCMがMCM2、3、4、5、6および7からなる群から選択される、請求項1から23のいずれか一に記載の方法。

**【請求項25】**

MCMがMCM2、5および7からなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

**【請求項26】**

MCMがMCM2および7からなる群から選択される、請求項25に記載の方法。

**【請求項27】**

MCMがMCM2である、請求項26に記載の方法。

**【請求項28】**

MCMがMCM7である、請求項1から27のいずれか一に記載の方法。

**【請求項29】**

細胞が、体液試料の濾過により体液試料から単離される、請求項1から28のいずれか

10

20

30

40

50

ーに記載の方法。

【請求項 3 0】

特異的結合メンバーが、抗体またはその断片である、請求項 1 から 2 9 のいずれか一に記載の方法。

【請求項 3 1】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

細胞数がフローサイトメトリーにより測定される、請求項 1 から 3 1 のいずれか一に記載の方法。

【請求項 3 3】

細胞数が自動細胞計数機を用いて測定される、請求項 1 から 3 1 のいずれか一に記載の方法。

【請求項 3 4】

膀胱癌に罹患しているか、または罹患すると思われる被検体を診断および治療する方法であって、

i ) 被検体から単離された体液試料を提供する工程、

ii ) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する工程、

iii ) 該試料を、ミニ染色体維持 ( M C M ) ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる工程、

iv ) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する工程、

v ) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める工程、

vi ) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する工程、

vii ) 被検体の予期される膀胱癌 / 膀胱癌それぞれを予防および / または治療するための治療処方計画を決定する工程、および、

viii ) 該治療処方計画を投与して、被検体の予期される膀胱癌 / 膀胱癌それぞれを予防および / または治療する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は膀胱癌のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

膀胱癌は、毎年世界中で推定 1 0 0 万例が診断される一般的な疾患である。発生率は先進国が最も多く、膀胱癌の 9 0 % 以上が移行性起源である。最初に移行上皮癌と診断された患者の約 7 5 % が、経尿道的切除術によって治療することができる表在性腫瘍を呈する。表在性疾患の再発率は 6 0 % を超え、表在性疾患患者の約 4 0 % は経尿道的切除のみによって治療した場合に 5 年以内に腫瘍の再発があるので、移行上皮癌患者の臨床管理は困難である ( Ozono et al., Jpn J Clin Oncol 2001; 31: 536-540 ) 。また、再発性膀胱腫瘍の 3 0 % 以下は侵襲性疾患に進行する ( Zieger et al., BJU Int 2000; 85: 824-828 ) 。よって、膀胱癌を有する、または有する疑いがある患者の早期発見とモニタリングは治療の成功のために重要である。

【0 0 0 3】

膀胱癌を診断するための現在の臨床ゴールドスタンダードは、局所または全身麻酔下での膀胱鏡検査と、適する場合にはその後に固形組織生検を行う。膀胱鏡検査は、日常的に血尿や刺激性排尿障害を呈する患者を試験するために用いられ、これら早期移行上皮癌の両症状は尿路感染症や前立腺肥大などのさほど深刻でない疾患に関連していることが多い。これら非特異的症状を有する患者は、たとえ実際に悪性腫瘍を持っているのがわずかな

10

20

30

40

50

割合だとしても、広域の泌尿器検査を受ける可能性がある。膀胱鏡検査は侵襲的で高価であるため、患者および臨床医の両方が膀胱癌の診断および調査のための費用対効果が高く非侵襲的なツールの開発の恩恵を受けるであろう。したがって、膀胱癌の診断のための信頼性のある、非侵襲的スクリーニングツールが至急求められている。

#### 【0004】

排尿の尿細胞診分析は移行上皮癌を検出するための最も一般的に使用される非侵襲的方法であるが、その有用性は、高グレード悪性腫瘍の症例以外では低感度であるため制約がある（グレード2やグレード3）。

#### 【0005】

これまでの研究では、上皮組織の細胞周期プロセスにおける重要な調節因子としてミニ染色体維持タンパク質（MCM）を同定している（Baldwin et al., Nature Reviews Cancer 2003; 3:217-26、Chatrath et al., British Journal of Cancer 2003; 89:1048-54、Sirieix et al., Clinical Cancer Research 2003; 9:2560-6；Davies et al., Lancet 2002; 359: 1917-19；Freeman et al., Clinical Cancer Research 1999; 5: 2121-2132；Stoeber et al., Lancet 1999; 354: 1524-1525；Williams et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 14932-14937）。複数の保存されたメカニズムは、DNA複製を細胞周期ごとに1回に限定する。MCMおよびそれらの調節因子の増殖における重要な役割により、これらが癌検出と予後における日常的な臨床使用のための潜在的に重要なバイオマーカーとなる。

#### 【0006】

本発明は、個体の尿中のMCM陽性細胞の数と膀胱癌を有するかまたは発症のリスクとの間に関連があるという知見に基づくものである。具体的には、本発明者等は、健康な個体の尿中に見つけることが期待されるMCM陽性細胞の数に正常範囲があり、この正常範囲より上の陽性細胞数を有する患者は膀胱癌を有するか、または膀胱癌を発症するリスクが有意に高いことを示した。さらに、本発明者等は、この発見を、すでに癌を有する患者および再発のリスクが高い患者にも応用した。

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

本発明の第一態様によると、膀胱癌を罹患しているかまたは罹患するリスクにある被検体を検出する方法であって、

- i) 被検体から単離された体液試料を提供する、
  - ii) 試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
  - iii) 試料を、ミニ染色体維持（MCM）ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、
  - iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
  - v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、
  - vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、
- ことを含む方法が提供される。

#### 【0008】

好ましくは、前記決定工程（vi）は、閾値数と比較したMCM結合／標識細胞の測定に基づき、このとき該閾値より上または該閾値と同じ測定値は膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す。

#### 【0009】

閾値数は少なくともおよそ10細胞であってもよく、例えば、閾値数は少なくともおよそ10細胞であるがおよそ40細胞未満であってよい。例えば、閾値数は少なくとも30細胞、例えば、少なくとも40または50細胞であってよい。閾値数は、少なくとも100細胞、例えば少なくとも200細胞であってよい。ここで用いる「およそ」なる用語は、示した値からの理解されうる変動値を指す。特記しているか否かにかかわらず、このような変動値は常にここで示す任意の所定値に包含されると理解されるものである。この変

10

20

30

40

50

動値の例には + または - 10 が含まれる。

【 0 0 1 0 】

被検体は、血尿または下部尿路症状（例えば頻尿、排尿障害、排尿の緊急性、または夜間頻尿）を含む膀胱癌と関連しうる症状を呈しうる。よって、本発明は、膀胱癌と関連する症状、例えば血尿を呈する被検体における膀胱癌の検出方法であって、

- i ) 被検体から単離された体液試料を提供する、
- ii ) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
- iii ) 該試料を、ミニ染色体維持（MCM）ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、
- iv ) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
- v ) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、そして、
- vi ) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、

ことを含み、このとき、前記決定工程（vi）は、閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくもの

であり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値は膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す、

方法を提供する。閾値数は、少なくともおよそ10細胞、例えばおよそ30または50細胞であってよい。好ましくは、閾値数は、少なくともおよそ50細胞、例えばおよそ50から400細胞、例としておよそ50から200、または50から100細胞である。好ましくはまた、閾値数はおよそ50細胞である。

【 0 0 1 1 】

一実施形態では、本発明は、肉眼的血尿（尿中の血液）を呈する被検体における膀胱癌の検出方法であって、

- i ) 被検体から単離された体液試料を提供する、
- ii ) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
- iii ) 該試料を、ミニ染色体維持（MCM）ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、
- iv ) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
- v ) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、そして、
- vi ) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、

ことを含み、このとき、前記決定工程（vi）は、閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくものであり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値は膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す、

方法を提供する。閾値数は、少なくともおよそ10細胞、例えばおよそ30または50細胞であってよい。好ましくは、閾値数は、少なくともおよそ50細胞、例えばおよそ50から200細胞、または50から100細胞である。好ましくはまた、閾値数はおよそ50細胞である。

【 0 0 1 2 】

他の実施形態では、本発明は、下部尿路症状（例えば頻尿、排尿障害、排尿の緊急性、または夜間頻尿）および／または微小血尿を含む膀胱癌と関連し得る症状を呈する被検体における膀胱癌の検出方法であって、

- i ) 被検体から単離された体液試料を提供する、
- ii ) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
- iii ) 該試料を、ミニ染色体維持（MCM）ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、

10

20

30

40

50

- iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
  - v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、そして、
  - vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、
- ことを含み、

このとき、前記決定工程(vi)は、閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくものであり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値は膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す、

方法を提供する。閾値数は、少なくともおよそ10細胞、例えばおよそ30または50細胞であってよい。好ましくは、閾値数は、少なくともおよそ30細胞、例えばおよそ50から400細胞、例としておよそ50から200細胞、または50から100細胞である。好ましくはまた、閾値数はおよそ30細胞である。典型的に、被検体は肉眼的血尿を呈していない。

#### 【0013】

被検体は、膀胱癌陽性の生検の既往歴があり得る、および/または、症状(特に血尿)を呈するかまたは腫瘍の再発を表す外来患者の膀胱鏡検査後に腫瘍が回復して再発したかもしれない。よって、本発明は、膀胱癌の既往を有するかまたは再発した被検体における膀胱癌の検出方法であって、

- i) 被検体から単離された体液試料を提供する、
  - ii) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
  - iii) 該試料を、ミニ染色体維持(MCM)ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、
  - iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
  - v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、そして、
  - vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、
- ことを含み、

このとき、前記決定工程は、閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくものであり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値は膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す、方法を提供する。閾値数は、少なくともおよそ10細胞であってよい。好ましくは、閾値数は、少なくともおよそ200細胞、例えばおよそ200から400細胞である。好ましくはまた、閾値数はおよそ200細胞である。

#### 【0014】

被検体は、血尿を含む膀胱癌と関連しうる症状を呈するか、または膀胱癌陽性の生検の既往があるかもしれない。よって、本発明は、膀胱癌と関連する症状、例えば血尿を呈する被検体、または膀胱癌の既往がある被検体における膀胱癌の検出方法であって、

- i) 被検体から単離された体液試料を提供する、
  - ii) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
  - iii) 該試料を、ミニ染色体維持(MCM)ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、
  - iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
  - v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、そして、
  - vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、
- ことを含み、

このとき、前記決定工程(vi)は、閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくものであり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値は膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す

10

20

30

40

50

方法を提供する。閾値数は、少なくともおよそ10細胞であってよい。好ましくは、閾値数は、少なくともおよそ50細胞、例えばおよそ50から400細胞、例としておよそ50から200、または50から100細胞である。好ましくはまた、閾値数はおよそ50から100細胞、例えばおよそ70から80細胞である。

#### 【0015】

被検体は膀胱癌の症状を呈さないかもしれない。よって、本発明は、膀胱癌の症状を呈さない被検体における膀胱癌の検出方法であって、

- i) 被検体から単離された体液試料を提供する、
  - ii) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
  - iii) 該試料を、ミニ染色体維持（MCM）ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、
  - iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
  - v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、そして、
  - vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、
- ことを含み、

このとき、前記決定工程（vi）は、閾値数と比較したMCM結合細胞の測定に基づくものであり、該閾値より上または該閾値と同じ測定値は膀胱癌もしくは膀胱癌のリスクを表す

方法を提供する。閾値数は、少なくともおよそ10細胞、例えばおよそ10から50細胞である。好ましくは、閾値数はおよそ10以下、例えば5から10細胞である。

#### 【0016】

典型的には、体液は、血液または脳脊髄液ではない。体液は尿または精液であってよい。あるいは体液は糞便であってよい。好ましくは、体液は尿である。

#### 【0017】

好ましくは、本発明の方法は、被検体、好ましくはヒトの尿などの体液の試料における膀胱癌細胞の存在を検出又は測定するのに有用である。

#### 【0018】

細胞は、当業者に公知な任意の手段によって体液試料から単離してよい。典型的には、細胞は体液試料の遠心分離または濾過のいずれかによって単離される。好ましくは、細胞は体液試料の濾過により単離される。本発明の好ましい方法では、試料は抗原検索の対象となる。抗原検索は当分野での標準手法である（Hiraiwa et alは例示的アプローチを示すShin et al (1991) Lab. Invest. 64, 693-702を参照している）。抗原検索条件は、水浴またはマイクロ波で45分間、95のpH 7.8 EDTA緩衝液に細胞試料を接触させることを含んでよい。

#### 【0019】

本発明の方法では、MCMは、MCM2、3、4、5、6および7からなる群から選択される。MCMは、2つ以上の異なるMCMの組み合わせ、例えば、MCM2、3、4、5、6および7からなる群から選択される2つの異なるMCMであってよい。例えば、MCMは、MCM2とMCM3、4、5、6、7から選択される1つの他のMCMとを含みうる。さらなる例として、MCMは、MCM5とMCM2、3、4、6、および7から選択される1つの他のMCMとを含みうる。本発明の好ましい方法では、MCMはMCM2、5及び7からなる群から選択される。本発明のさらに好ましい方法では、MCMはMCM2および7からなる群から選択される。

#### 【0020】

本発明の好ましい方法では、MCMはMCM2である。

#### 【0021】

本発明の他の方法では、MCMはMCM7である。

10

20

30

40

50

**【0022】**

本発明の方法では、MCMはMCM2とMCM5を含んでよい。本発明の別 の方法では、MCMはMCM2とMCM7を含んでよい。本発明のさらに別の方法では、MCMはMCM5とMCM7を含んでよい。

**【発明を実施するための形態】****【0023】**

ここで用いる「特異的結合メンバー」は、互いに結合特異性を有する一対の分子のメンバーである。特異的結合対のメンバーは、天然に生じるか、または全体ないしは部分的に合成して生成されてよい。分子の対のメンバーはその表面上に突出ないしは窪みであって、そこに特異的に結合し、ゆえに分子対の他のメンバーの特定の空間および極性有機体に相補的である領域を有する。よって、対のメンバーは互いに結合特異性の性質を有する。

10

**【0024】**

特異的結合対の種類の例は、抗原 - 抗体、ビオチン - アビジン、ホルモン - ホルモンレセプター、レセプター - リガンド、酵素 - 基質、DNA - DNA（例えばオリゴヌクレオチド）である。本発明は、概して、抗原 - 抗体タイプの反応に関するが、ここで定義する抗原に結合する小分子も指す。

**【0025】**

ここで用いる「抗体」なる用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち天然でまたは部分的もしくは全体的に合成により生成されたいずれかの抗原と特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子のことという。この用語は、抗体結合ドメインであるかもしくはそれに相同な結合ドメインを有する任意のポリペプチドまたはタンパク質も包含する。これらは、天然の供給源に由来できるか、またはこれらは、部分的もしくは全体的に合成により生成できる。抗体の例は、免疫グロブリンアイソタイプ（例えばIgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA）およびそれらのアイソタイプサブクラス；Fab、scFv、Fv、dAb、Fdなどの抗原結合ドメインを含む断片；ならびに二重特異性抗体である。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであつてよい。

20

**【0026】**

抗体は、いくつかの方法で改変できるので、「抗体」なる用語は、要求される特異性を有する結合ドメインを有する任意の特異的結合メンバーまたは物質を包含すると解釈される。よって、この用語は、天然または全体的もしくは部分的に合成の免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む抗体断片、誘導体、抗体の機能的等価物および相同体、ヒト化抗体を包含する。

30

**【0027】**

対象の標的に特異的である抗体は、当分野において標準的な技術を用いて得ることができる。抗体を生成する方法は、哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギ）を、タンパク質もしくはその断片あるいはタンパク質もしくは断片を発現する細胞またはウイルスで免疫することを含む。抗体は、免疫された動物から、当分野において知られる様々な技術のいずれかを用いて得て、例えば対象の抗原への抗体の結合を用いてスクリーニングできる。

40

**【0028】**

「抗原結合ドメイン」は、抗原の部分もしくは全体に特異的に結合し相補的である領域を含む抗体の一部分である。抗原が大きい場合、抗体は、抗原の特定の部分にだけ結合し、この部分をエピトープと称する。抗原結合ドメインは、1つまたは複数の抗体可変ドメインによりもたらされてよい。抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（VL）と抗体重鎖可変領域とを含んでよい。

**【0029】**

「特異的」は、概して、特異的結合対の一方のメンバーが、その特異的結合パートナー（または複数）以外の分子といずれの著しい結合を示さない、例えば任意の他の分子と

50

約30%、好ましくは20%、10%または1%未満の交差反応性を有する状況のことをいうために、用いられる。

#### 【0030】

本発明の特異的結合メンバーは、好ましくは、本発明に従って「単離」形である。メンバーは、概して、それらがそれらの天然の環境またはそれらが調製される環境（例えば細胞培養物）（そのような調製がインビトロまたはインビボで実施される組換えDNA技術による場合に）で見出されるその他のポリペプチドなどの、それらが天然で関連する物質を含まないかまたは実質的に含まない。

#### 【0031】

よって、本発明の特異的結合メンバーは、抗体ないしは抗体の断片であるのが好ましい。よって、例えば、(ii)での特異的結合パートナーメンバーは、前立腺組織に特異的な抗原結合ドメインを有する抗体ないしは抗体断片であってよい。例えば、(iii)での特異的結合メンバーは、MCMに特異的な抗原結合ドメインを有する抗体ないしは抗体断片であってよい。

10

#### 【0032】

抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、单鎖抗体、ないしは前記のいずれかの断片であってよい。好ましくは、特異的結合メンバーは、MCMに特異的な抗原結合ドメインを有するモノクローナル抗体である。MCMに特異的なモノクローナル抗体は当分野で知られており、例えば、MRC Cancer Cell Unit (Hutchison/MRC Research Centre, Hills Road, Cambridge CB2 0XZ) にて創出されるクローン D 112A3 に由来する、本研究で用いる抗 MCM 2 抗体である。

20

#### 【0033】

ハイブリドーマ細胞を用いたモノクローナル抗体の生成は当分野でよく知られている。モノクローナル抗体を生成するために用いた方法は、Kohler and Milstein in Nature 256, 495-497 (1975)、およびSchwartz, 1981編, Compendium of Immunology V.II, のDoni llard and Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas" (出典明記によりここに援用する) に開示されている。

30

#### 【0034】

本発明の方法では、本発明の特異的結合メンバーは、抗体画像法の分野で知られる従来の化学を用いて、本発明の特異的結合メンバーに接着しうる検出可能な標識、例えば<sup>1</sup>  
<sup>2</sup>  
<sup>5</sup>、<sup>1</sup><sup>3</sup><sup>1</sup> または<sup>9</sup><sup>9</sup>Tcなどの放射能標識にて標識されてよい。標識はまた、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼのような酵素標識も含む。さらに、標識は、特定の同族検出可能部分、例えばアビジンへの結合により検出されうるビオチンなどの化学部分も含む。

40

#### 【0035】

正常試料および試験試料に対する抗体などの特異的結合メンバーの反応度は、任意の適当な手段により決定してよい。他の標識には、蛍光色素、熒光体、または分光的に単離した吸収もしくは放出特徴を有するレーザ色素が含まれる。適切な蛍光色素には、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリンおよびテキサスレッドが含まれる。適切な色素産生性色素にはジアミノベンジジンが含まれる。その他の標識には、巨大分子コロイド粒子または着色、磁性もしくは常磁性であるラテックスビーズなどの微粒子物質、および視覚的に観察されるか、電気的に検出されるかもしくはそうでなければ記録される検出可能な信号を直接的または間接的に引き起こすことができる生物学的あるいは化学的に活性な物質が含まれる。これらの分子は、例えば、色を発生するかもしくは変化させるか、または電気的特性の変化を引き起こす反応を触媒する酵素であってよい。これらは、分子的に励起して、エネルギー状態間の電子遷移が特徴的な分光的吸収または放出をもたらすことができる。これらには、バイオセンサに関連して用いられる化学的実体が含まれうる。以下に記載する実施例では、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼを採用している。

50

#### 【0036】

細胞数は、限定するものではないが、免疫細胞化学的手段、フローサイトメトリーおよび細胞画像解析を含む適切な任意の手段によって決定されうる。好ましくは、細胞数はフローサイトメトリーまたは自動細胞計数機によって決定される。

#### 【0037】

本発明の方法は、Pap(パパニコロウ)染色と組み合わせて用い、マルチクロマチン染色を用いた細胞の組織学的染色を提供しうる。細胞のPap染色の方法は当分野で知られており、Coleman and Chapman 1989 (Coleman Dulcie; Chapman, Patricia (1989), Clinical Cytotechnology, Butterworth & Co. pp 80-82)、およびCarson and Hladik 2009 (Carson Freida L; Hladik, Christa (2009), Histotechnology: A Self-Instructional Text (3 ed.), Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press. pp. 361-363)などがある。10

#### 【0038】

よって、本発明は、膀胱癌を罹患しているかまたは罹患するリスクにある被検体を検出する方法であって、

- i) 被検体から単離された体液試料を提供する、
  - ii) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
  - iii) 該試料を、ミニ染色体維持(MCM)ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させ、場合によって該細胞をPap染色と接触させる、
  - iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する、
  - v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める、
  - vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する、
- ことを含む方法を提供する。20

#### 【0039】

本発明は、膀胱癌に罹患しているか、または罹患すると思われる被検体を診断および治療する方法であって、

- i) 被検体から単離された体液試料を提供する工程、
  - ii) 該試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する工程、
  - iii) 該試料を、ミニ染色体維持(MCM)ポリペプチドに結合することができる特異的結合メンバーと接触させる工程、30
  - iv) 該細胞試料への該特異的結合メンバーの結合を測定する工程、
  - v) 該特異的結合メンバーに結合した該細胞試料中の細胞を計数して、細胞数を求める工程、
  - vi) 該細胞数に基づいて、該被検体が膀胱癌を有するかまたは有するリスクにあるか否かを決定する工程、
  - vii) 被検体の予期される膀胱癌／膀胱癌それぞれを予防および／または治療するための治療処方計画を決定する工程、および、
  - viii) 該治療処方計画を投与して、被検体の予期される膀胱癌／膀胱癌それぞれを予防および／または治療する工程
- を含む方法を提供する。40

#### 【0040】

本発明の更なる態様は、被検体の体液試料における膀胱癌細胞の存在を検出または測定するための方法であって、

- (i) 試料から細胞を単離して、細胞試料を提供する、
  - (ii) 該細胞試料を、ミニ染色体維持2(MCM2)ポリペプチドおよび／またはミニ染色体維持7(MCM7)ポリペプチドを結合することができる特異的結合メンバーと接触させる、そして、
  - (iii) 該特異的結合メンバーの細胞試料への結合を決定する、
- ことを含む方法を提供する。

#### 【0041】

10

20

30

40

50

ミニ染色体維持7(MCM7)ポリペプチドおよび/またはミニ染色体維持2(MCM2)ポリペプチドを結合することができる特異的結合メンバー、例えば抗MCM7および/または抗MCM2抗体が試料に結合したと決定される場合、被検体における膀胱癌が示される。ゆえに、本発明は、被検体における膀胱癌の進行の早期予後を決定するための方法であって、本発明の第一態様の方法に従って被検体の体液、例えば尿試料における膀胱細胞の存在を検出または決定することを含む方法を提供する。被検体は、(i)膀胱癌の症状を呈さない患者、(ii)血尿または下部尿路症状(例えば感染症)を呈する患者、または(iii)尿路上被腫瘍について膀胱鏡分析による追跡調査を受けている患者から選択される患者のコホートであってよい。

## 【0042】

10

本明細書の記載および特許請求の範囲を通して、「含む(comprise)」および「含有する」ならびにこれらの語句の変形、例えば「含み」および「含む(comprises)」なる語句は、「含むがそれに限定されない」ことを意味し、その他の部分、添加物、成分、整数または工程を除外することを意図しない(かつ除外しない)。

## 【0043】

本明細書の記載および特許請求の範囲を通して、単数形は、文脈がそうでないことを必要としない限り、複数形を包含する。特に、不定冠詞を用いる場合、本明細書は、文脈がそうでないことを必要としない限り、単数形とともに複数形を企図すると理解される。

## 【0044】

20

本発明の具体的な態様、実施形態または実施例と関連して記載される特性、整数、特徴、化合物、化学部分または基は、本明細書に記載する任意のその他の態様、実施形態または実施例に、それと非適合性でない限り、適合できると理解される。

## 【0045】

本発明は、以下の図を参照して例示としてのみ記載する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0046】

【図1】総血尿クリニックに参加した患者から得られたデータを、10、30、50、100、200及び400それぞれの個々のMCM閾値数をとともに示すドットプロット。

【図2】総血尿クリニックに参加した患者から得られたデータを、10、30、50、100、200及び400それぞれの個々のMCM閾値数をとともに示すドットプロット。

【図3】総血尿クリニックに参加した患者から得られたデータを、10、30、50、100、200及び400それぞれの個々のMCM閾値数をとともに示すドットプロット。

【図4】総血尿クリニックに参加した患者から得られたデータを、10、30、50、100、200及び400それぞれの個々のMCM閾値数をとともに示すドットプロット。

【図5】総血尿クリニックに参加した患者から得られたデータを、10、30、50、100、200及び400それぞれの個々のMCM閾値数をとともに示すドットプロット。

【図6】総血尿クリニックに参加した患者から得られたデータを、10、30、50、100、200及び400それぞれの個々のMCM閾値数をとともに示すドットプロット。

【図7】膀胱鏡調査クリニックに参加した患者から入手したデータを示すドットプロットである。ここで参加した患者はすべて新鮮排尿検体と、10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーするMCM閾値とに基づいて尿検査を行った。

【図8】膀胱鏡調査クリニックに参加した患者から入手したデータを示すドットプロットである。ここで参加した患者はすべて新鮮排尿検体と、10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーするMCM閾値とに基づいて尿検査を行った。

【図9】膀胱鏡調査クリニックに参加した患者から入手したデータを示すドットプロットである。ここで参加した患者はすべて新鮮排尿検体と、10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーするMCM閾値とに基づいて尿検査を行った。

30

40

50

【図 10】膀胱鏡調査クリニックに参加した患者から入手したデータを示すドットプロットである。ここで参加した患者はすべて新鮮排尿検体と、10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーするMCM閾値に基づいて尿検査を行った。

【図 11】膀胱鏡調査クリニックに参加した患者から入手したデータを示すドットプロットである。ここで参加した患者はすべて新鮮排尿検体と、10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーするMCM閾値に基づいて尿検査を行った。

【図 12】膀胱鏡調査クリニックに参加した患者から入手したデータを示すドットプロットである。ここで参加した患者はすべて新鮮排尿検体と、10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーするMCM閾値に基づいて尿検査を行った。

【図 13】肉眼的血尿を呈するかまたは過去に生検陽性疾患を有して膀胱鏡調査に訪れた患者の集団ベースのコントロールとして用いた、50歳以上の健康被検体から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 14】肉眼的血尿を呈するかまたは過去に生検陽性疾患を有して膀胱鏡調査に訪れた患者の集団ベースのコントロールとして用いた、50歳以上の健康被検体から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 15】肉眼的血尿を呈するかまたは過去に生検陽性疾患を有して膀胱鏡調査に訪れた患者の集団ベースのコントロールとして用いた、50歳以上の健康被検体から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 16】肉眼的血尿を呈するかまたは過去に生検陽性疾患を有して膀胱鏡調査に訪れた患者の集団ベースのコントロールとして用いた、50歳以上の健康被検体から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 17】肉眼的血尿を呈するかまたは過去に生検陽性疾患を有して膀胱鏡調査に訪れた患者の集団ベースのコントロールとして用いた、50歳以上の健康被検体から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 18】肉眼的血尿を呈するかまたは過去に生検陽性疾患を有して膀胱鏡調査に訪れた患者の集団ベースのコントロールとして用いた、50歳以上の健康被検体から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 19】10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーする、腎路疾患の所見がない患者（特に、過去または現在に膀胱癌の既往がなく、最近の尿路感染の所見がない）から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 20】10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーする、腎路疾患の所見がない患者（特に、過去または現在に膀胱癌の既往がなく、最近の尿路感染の所見がない）から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 21】10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーする、腎路疾患の所見がない患者（特に、過去または現在に膀胱癌の既往がなく、最近の尿路感染の所見がない）から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 22】10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーする、腎路疾患の所見がない患者（特に、過去または現在に膀胱癌の既往がなく、最近の尿路感染の所見がない）から入手したデータを示すドットプロットである。

【図 23】10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーする、腎路疾患の所見がない患者（特に、過去または現在に膀胱癌の既往がなく、最近の尿路感染の所見がない）から入手したデータを示すドットプロットである。

10

20

30

40

50

【図24】10、30、50、100、200および400それぞれの染色MCM細胞の同じ範囲をカバーする、腎路疾患の所見がない患者（特に、過去または現在に膀胱癌の既往がなく、最近の尿路感染の所見がない）から入手したデータを示すドットプロットである。

【図25】GHクリニック患者の70%以下を表す、GHクリニックを訪れ、顕微鏡的血尿（MH）があることが明らかとなった患者から入手したデータを示すドットプロットである。これらの患者は、TCCの発生が非常に低く、標準的膀胱鏡検査では通常クリニックで生検が行われない。これは、TCC調査の下での患者の管理における付加的な診断補助としてのMCMの価値を示し、慣例的な膀胱鏡検査の必要性をなくすかもしない。

【図26】GHクリニック患者の70%以下を表す、GHクリニックを訪れ、顕微鏡的血尿（MH）があることが明らかとなった患者から入手したデータを示すドットプロットである。これらの患者は、TCCの発生が非常に低く、標準的膀胱鏡検査では通常クリニックで生検が行われない。これは、TCC調査の下での患者の管理における付加的な診断補助としてのMCMの価値を示し、慣例的な膀胱鏡検査の必要性をなくすかもしない。

【図27】GHクリニック患者の70%以下を表す、GHクリニックを訪れ、顕微鏡的血尿（MH）があることが明らかとなった患者から入手したデータを示すドットプロットである。これらの患者は、TCCの発生が非常に低く、標準的膀胱鏡検査では通常クリニックで生検が行われない。これは、TCC調査の下での患者の管理における付加的な診断補助としてのMCMの価値を示し、慣例的な膀胱鏡検査の必要性をなくすかもしない。

【図28】GHクリニック患者の70%以下を表す、GHクリニックを訪れ、顕微鏡的血尿（MH）があることが明らかとなった患者から入手したデータを示すドットプロットである。これらの患者は、TCCの発生が非常に低く、標準的膀胱鏡検査では通常クリニックで生検が行われない。これは、TCC調査の下での患者の管理における付加的な診断補助としてのMCMの価値を示し、慣例的な膀胱鏡検査の必要性をなくすかもしない。

【図29】GHクリニック患者の70%以下を表す、GHクリニックを訪れ、顕微鏡的血尿（MH）があることが明らかとなった患者から入手したデータを示すドットプロットである。これらの患者は、TCCの発生が非常に低く、標準的膀胱鏡検査では通常クリニックで生検が行われない。これは、TCC調査の下での患者の管理における付加的な診断補助としてのMCMの価値を示し、慣例的な膀胱鏡検査の必要性をなくすかもしない。

【図30】GHクリニック患者の70%以下を表す、GHクリニックを訪れ、顕微鏡的血尿（MH）があることが明らかとなった患者から入手したデータを示すドットプロットである。これらの患者は、TCCの発生が非常に低く、標準的膀胱鏡検査では通常クリニックで生検が行われない。これは、TCC調査の下での患者の管理における付加的な診断補助としてのMCMの価値を示し、慣例的な膀胱鏡検査の必要性をなくすかもしない。

#### 【実施例】

##### 【0047】

###### 実施例1

###### 材料および方法

アデンブルックズ病院で行った本試験では、定期的に外科外来（アデンブルックズ病院泌尿器科、ケンブリッジ）を訪問した合計246人の患者を、膀胱癌の可能性または再発について試験した。以前の試験では、移行上皮癌（TCC）を持つすべての患者の生態は便宜上2つの主なグループに分けることができたことを示した。

1. 肉眼的血尿、すなわち、尿中の明らかな血液所見を呈して、膀胱癌の可能性の早急な検査のために初めてクリニックを訪れた患者（GH患者）、および、
2. 過去のある時期に膀胱癌の陽性生検診断を下され、腫瘍の性質および悪性度に応じた治療を受け、現在膀胱鏡検査のために来ていた患者（CS患者）。

##### 【0048】

これらの患者は、クリニックでの成功事例と一致する定期的な詳細調査を行って追跡調査した。この調査には、定期的な尿細胞診（ここではMCM抗体検査）のための全量尿採取とともに、特に記載がない限り、詳細な体系的調査、詳細な身体検査、静脈性尿路造影

10

20

30

40

50

、心電図（ E C G ）および胸部 X 線、並びに、最初の発現時または膀胱鏡追跡調査時の外来患者として定期的膀胱スキャンおよび / またはフレキシブル膀胱鏡検査を行った。

#### 【 0 0 4 9 】

その科への受付時または外科外来への受付後科内で尿試料を収集し（ 8 3 0 ~ 1 2 3 0 ）、その後全尿試料を排尿から 1 ~ 2 時間以内に試験室へ移し、試験室の 5 0 m l 試料から収集した全試料中の十分な数の膀胱上皮細胞を生成した。

#### 【 0 0 5 0 】

次いで、試験室内の指定実施者によって尿を遠心分離（ 2 5 0 0 r p m × 1 0 分 ）するという所定の試験手順を実施した。排尿の全量から 5 0 m l を試験室へ運び、異なる実験のためにファルコンチューブに分注した。遠心分離後、上清をビルコンに移し、集めた細胞材料を C y t o l y t を用いて 1 つのファルコンチューブに洗い入れた。次いで、チューブを C y t o l y t で満たし、 5 分間ボルテックスにかけ、再び遠心分離し、再度上清をビルコンに移した。次いで、細胞ペレットを懸濁し、 2 つの P r e s e r v C y t バイアル（ 1 つは P A P 染色用、 1 つは I C C 染色用 ）を調製した後、細胞堆積物のすべてを使い切るまで 1 回に 1 滴、バイアルを交互に、細胞堆積物を、調製したバイアルに分注した。次いで、 2 つの T h i n P r e p スライド（ 1 つは P A P 染色用、 1 つは I C C 染色用 ）を調製し、 T h i n P r e p 2 0 0 0 機器にて処理した。 P A P 染色用のスライドは酢酸アルコール中に置き、 I C C 用のスライドは T P 2 0 0 0 浴槽中に酒精にて固定し、排水した後 S u r g i p a t h コートスプレーを用いて固定し、平らに置いて自然乾燥させた。液体ベースの細胞診培地（ L B C ）中の尿路上皮細胞の処理標本と染色を D a k o 自動染色機にて行った。標本は 4 つの区分がある。

a . 前染色プロトコール組織像スライド。スライドは、酒精および水を順に用いてキシレンから再水和し、マイクロ波中で pH 6 のクエン酸緩衝液中で 1 0 + 1 0 分間抗原検索を行った。次いでスライドを水で洗浄し、自動染色機にかけた。

b . 前染色プロトコール細胞診スライド。まず、スライドを 5 0 % エタノールに 5 分間浸し、蒸留水にてすすぎ、 T B S に置いた。 pH 7 . 8 の E D T A 緩衝液中で抗原検索を行い、次いでスライドを 2 0 分間室温で冷ました。スライドを水、その後緩衝液ですすぎ、自動染色機にかけた。

c . 自動染色機染色プロトコール（ E n v i s i o n H R P ） D a k o K i t 5 0 0 7 。一連の染色は、ペルオキシダーゼブロックと 5 分間の H 2 O 2 とさらに 5 分間の H 2 O 2 を伴う。次いでスライドを T B S 緩衝液にて 3 回すすぎ、抗体とコントロールを加えて 6 0 分おき、 T B S 緩衝液にて 2 回すすぎ、 E n v i s i o n H R P を加えて 3 0 分置いた。最後に、スライドを T B S 緩衝液にて 2 回すすぎ、 D A B 基質を加えて 5 分置いた。

d . 後染色プロトコール。初回の自動染色機染色プロトコールの後、スライドを水ですすぎ、 C u S O 4 に 3 分間浸し、水ですすぎ、ヘマトキシリンにて 1 0 秒間対比染色した。次いで、スライドを水、その後スコット水道水にて 4 0 秒間すすぎ、水ですすぎ、酒精、つまりアルコールおよびキシレンにて 2 回脱水した。最後に、スライドに D P X にてカバーガラスをかけた。

#### 【 0 0 5 1 】

詳細な方法論は以下の通りである。

1 . 尿中の膀胱癌細胞の検出に用いる本プロトコールは、 M C M 2 / D A B （ ジアミノベンジジン ）組み合わせによる臨床上皮 B C 細胞の染色に基づく。

2 . 核内の M C M 2 抗体（ The MRC Cancer Cell Unit, Hutchison MRC Research Centre, Hills Road, Cambridge, CB2 0XZ ）の結合と発色団 D A B の効果は、白色顕微鏡下での暗褐色核染色によって可視化することができる。

3 . 上皮膀胱細胞に I C C 染色を応用するための方法論は以下の通りである。

A . 前染色プロトコールは、 5 0 % メタノールにスライドを 5 分間浸し、蒸留水にてすすぎ、抗原検索のために pH 7 . 8 の E D T A 緩衝液に 9 5 、 4 5 分間置く。

B . 4 5 分後、容器を室温で 2 0 分間冷まし、蒸留水にてすすぎ、その後スライドを自動

10

20

30

40

50

染色機に置く。

C . 染色手順には、 D A K O E n v i s i o n キット 5 0 0 7 を用い、スライドに 5 分間 H 2 O 2 を添加し、 T B S 緩衝液にて 3 回すすぐペルオキシダーゼブロックを行う。

D . ブロック手順の後、 4 0 0 分の 1 に希釈した M C M 抗体にてスライドを処理し、 6 0 分間インキュベートし、次いで再度 T B S 緩衝液にて 3 回すすぐ。

E . この手順の後、 E n v i s i o n H R P をスライドに 3 0 分間添加する。

F . 次いで、スライドを緩衝液にて 2 回すすぐだ後、 D A B を 1 0 分間添加する。

G . スライドを再度緩衝液にて 1 回、蒸留水にて 1 回すすぎ、硫化銅溶液を 5 分間スライドに添加し、次いで蒸留水にてすすぐ。

H . 染色が完了した後、スライドを標準的な n o n - g y n a e S O P に従って P A P にて対比染色する。

#### 【 0 0 5 2 】

本試験の詳細な統計は、記載するように、液体ベースの細胞診スライド調製と M C M 2 抗体を用いて評価した。主分析は最適な統計パッケージとして S P S S を用いて実行した。各患者群 ( G H クリニックの 1 6 陽性生検および C S クリニックの 2 4 陽性生検 ) における年齢分布、性別分布および生検結果に関するデータに注釈を付けた。

#### 【 0 0 5 3 】

データを 5 つの項目、つまり、肉眼的血尿クリニックに来たが腫瘍は見つからなかった患者 ; 肉眼的血尿クリニックに来て、膀胱の T C C が見つかった患者 ; 顕微鏡血尿の仮診断を受けて肉眼的血尿クリニックに来たが、腫瘍が見つからなかった患者 ; 膀胱鏡検査クリニックに来たが、腫瘍が見つからなかった患者 ; および、膀胱鏡検査クリニックの訪問により腫瘍が見つかった第 5 群、にまとめた。

#### 【 0 0 5 4 】

#### 結果

##### 肉眼的血尿 ( G H ) 患者

肉眼的血尿 ( クリニックに来た患者の尿中の可視的鮮血 ) を初めて呈する患者において、 1 0 ~ 4 0 0 の M C M 染色細胞の範囲に対する 6 つの M C M 閾値を実証した。各症例において、感度割合、すなわち既知の膀胱癌陽性組織を有する患者と、特異度割合、すなわち膀胱悪性腫瘍に基づく組織所見を示さない患者を、生検データに対して測定した。

#### 【 0 0 5 5 】

M C M 閎値 = 1 0 これは、 1 0 M C M 陽性細胞の M C M 染色細胞閎値を用いたとき、陽性生検に対して 1 0 0 % の感度が達成され、その患者群では 5 1 % の特異度であることが実証される。

M C M 閎値 = 3 0 陽性生検に対して常法の液体ベースの細胞診スライドに 3 0 以上の染色 M C M 細胞が存在する患者では、その 1 0 0 % すべての患者が本試験を用いて検出されるであろう。同時に、陰性生検情報を得た患者では、 M C M 試験によって 7 2 % の特異度の結果が検出される。

M C M 閎値 = 5 0 膀胱癌陽性生検患者において 5 0 以上の染色細胞の M C M 閎値を有する患者では、その悪性腫瘍検出について 9 2 % の感度がある。同時に、 5 0 未満の染色細胞の M C M 閎値を有する陰性生検患者では、この陰性所見の定義について 8 3 % の偶発 ( チャンス ) がある。

M C M 閎値 = 1 0 0 M C M 閎値が陽性生検組織に対して 1 0 0 以上の染色細胞であるとき、その陽性結果の検出について 7 5 % の感度がある。それに応じて、陰性生検結果を有する同じ患者群では、腫瘍が存在しないことを示す 8 9 % の特異度がある。

M C M 閎値 = 2 0 0 2 0 0 以上の染色細胞の M C M 閎値がある患者では、この患者における悪性腫瘍検出について陽性生検組織に対して 6 7 % の感度がある。それに応じて、 2 0 0 未満の染色 M C M 細胞がある患者では悪性腫瘍が存在しないことを示す 9 8 % の特異度がある。

M C M 閎値 = 4 0 0 M C M 閎値が 4 0 0 以上であるとき、その患者における悪性腫瘍検出について陽性生検に対して 4 2 % の感度がある。同時に、 4 0 0 未満の M C M 染色細

10

20

30

40

50

胞を有する患者では示した陰性生検に対して 9 8 % の特異度が記録される。

【 0 0 5 6 】

膀胱鏡調査 ( C S ) 患者

本グループの患者では、膀胱癌陽性生検の既往があり、これは通常最も一般的なタイプの移行上皮癌 ( TCC ) である。存在するとしても、悪性細胞が尿中に排出される場合には他のタイプの癌も検出されるであろう。

【 0 0 5 7 】

MCM 閾値 = 1 0 MCM 染色閾値が 1 0 染色細胞である場合、本グループでは生検陽性である患者の検出について 1 0 0 % の感度がある。同様に、生検陰性群では膀胱癌の再発を有さない患者の検出について 4 1 % の特異度がある。

MCM 閎値 = 3 0 3 0 以上の染色細胞の MCM 閎値では、これらの患者での悪性腫瘍を検出する生検陽性組織に対して 9 5 % の感度がある。同時に、生検陰性患者では膀胱腫瘍の再発がないことを示す 5 4 % の特異度がある。

MCM 閎値 = 5 0 これら患者では、MCM 閎値が 5 0 以上の染色細胞である場合、生検陽性組織と MCM 染色細胞との間に 9 0 % の感度がある。同時に、膀胱腫瘍の所見がないことを示す患者における生検陰性組織に対して 6 9 % の特異度がある。

MCM 閎値 = 1 0 0 MCM 閎値が 1 0 0 以上の染色細胞である本患者群では、これらの患者での悪性腫瘍を検出する生検陽性材料に対して 9 0 % の感度がある。同時に、膀胱腫瘍の再発が存在しないことを示す生検陰性個体では 8 1 % の特異度がある。

MCM 閎値 = 2 0 0 2 0 0 以上の染色細胞の MCM 閎値を有するこれら患者では、組織試料では生検陽性悪性腫瘍を有する患者を検出する 9 0 % の感度がある。同時に、生検陰性個体において再発が起こっていないことを示す 9 6 % の特異度がある。

MCM 閎値 = 4 0 0 本患者群では、生検陽性患者において膀胱腫瘍の再発が生じていることを示す 5 3 % の感度がある。同時に、生検陰性患者において再発が起こっていない患者を検出する 9 8 % の特異度がある。

【 0 0 5 8 】

正常被検体

第三の被検体群には、標準 5 0 m l の尿試料を採取するよう依頼した ( アバディーンロイヤル診療所およびアデンブルックズ病院 ( ケンブリッジ ) の両泌尿器外来科で患者が行った通りに )。ここでは、個体が泌尿器疾患および特に感染の所見または既往がないことを要件とした。本グループを、一連の膀胱癌試験にあるすべての患者、肉眼的血尿を呈する患者 ( 初診 ) および膀胱鏡検査のためにクリニックに戻ってきた患者両方の正常コントロールとした。すべての該被検体の尿は、全く同じように、同じ染料 ( MCM 2 ) を用いた同じ方法によって、そして同じ時間軸内 ( 4 時間未満 ) に分析した。

【 0 0 5 9 】

MCM 閎値 = 1 0 本正常被検体群では膀胱腫瘍の非存在の生検検証は行われず、膀胱鏡検査も行われなかった。よって、データは、様々な異なる MCM 閎値での感度および特異度を示す MCM 細胞数を表す。1 0 の MCM 閎値では、5 8 % の正常成人は所定の尿試料において感染または悪性腫瘍の可能性を示す染色 MCM 細胞数を持っていた。同時に、この異常が存在しないことを示す 4 2 % の特異度読み取り値があった。

MCM 閎値 = 3 0 正常な尿において 3 0 染色 MCM 細胞の閎値では、その正常値の 3 3 % の感度と 6 7 % の特異度があった。これは比較データの増加が重要であることを示し、異常所見がないことを示す特異度が増加するにつれて、悪性腫瘍の可能性を示す感度が低減する。

MCM 閎値 = 5 0 5 0 以上の MCM 染色細胞数を有するこれら尿試料では、2 3 % の試料がいくらかの染色と適度な感度を示したのに対して、7 7 % が悪性腫瘍の転帰がないとする特異度を示した。

MCM 閎値 = 1 0 0 正常な尿において 1 0 0 以上の染色 MCM 細胞が見られた場合、更なる調査について陽性の転帰を示す 1 5 % の感度があるのに対して、同時に、その心配がないことを示す 8 5 % の特異度があった。

10

20

30

40

50

MCM閾値 = 200 200以上のMCM染色細胞が見られた場合、炎症または悪性腫瘍の可能性の4%の感度と、その心配または障害の所見がないことを示す96%の特異度があった。

MCM閾値 = 400 正常被検体の尿において400以上の染色MCM細胞が見られた場合、懸念の所見、特に悪性腫瘍がないことを示す0%の感度と、そのような障害または懸念が存在しないことを示す100%の特異度があった。

#### 【0060】

説明として、感度の割合、つまり膀胱癌の存在を決定する能力は、生検材料における陽性の組織学的転帰の存在に対して評価した。同様に、これら患者において、特異度、つまり膀胱癌所見の非存在は、生検陰性組織像の所見に対して評価した。正常、つまり泌尿器疾患の所見がないと見られたこれら被検体において得られたこの状況に対する例外は、同じ計数方法による同様な尿評価を行ったが、疾患の膀胱鏡または生検の所見がない場合である。

10

#### 【0061】

肉眼的血尿および膀胱鏡調査患者群のデータは、感度が増加するにつれて特異度が低減することを示した。逆に、過去に膀胱癌生検所見があった患者では、特異度が増加するにつれて感度が低減する。

#### 【0062】

データは、個々の患者および分析群ごとに、クリニックおよび転帰（生検分析）に対するMCM数のドットプロットにまとめた（データは示さない）。閾値線は、1スライドあたり50以上の染色細胞のMCM細胞数で描く。各の区分は、GHクリニックまたはCSクリニックまたは正常被検体いずれかにおける生検転帰に関して分析し、50染色MCM細胞の適切な区分スライドにおいてのMCM染色細胞数と関連づける。

20

#### 【0063】

GHクリニックにおける74%の陰性生検は50未満のMCMにより正確に同定され、26%は偽陽性となる。

GHクリニックにおける94%の陽性生検は50以上のMCMにより正確に同定され、6%が偽陰性となる。

CSクリニックにおける67%の陰性生検は50未満のMCMにより正確に同定され、33%が偽陽性となる。

30

CSクリニックにおける83%の陽性生検が50以上のMCMにより正確に同定され、17%が偽陰性となる。

77%の正常な尿が異常を示すMCM染色特徴の所見を示さなかったのに対して、23%の正常な尿が50以上のMCM染色細胞の割合であったことを示した。

#### 【0064】

10染色MCM細胞から400MCM染色細胞までの様々なMCM細胞数を評価し、50より多いMCM染色細胞が1スライド上に存在した場合には悪性腫瘍の頻度が増加したことが明らかとなった。驚くべきことに、50のMCM閾値では、肉眼的血尿により外科外来に初めて訪れた患者では転帰陽性がMCMとPAP（慣例的な細胞診）との間で完全に一致していたことが明らかとなった。さらに、200のMCM閾値では、膀胱癌陽性生検の既往があった患者では転帰陽性がMCMとPAP（慣例的な細胞診）との間で完全に一致していたことが明らかとなった。

40

#### 【0065】

さらに、試験の初めには、全細胞数が1000以上である症例（「細胞適正1000」と称する）のみ分析し、MCM陽性か否かを決定した。これにより細胞診の質の向上が見られ、個々の細胞病理学者により承認され、調製された。

#### 【0066】

本明細書中の分析を繰り返し、結果を実施例2に示す。

#### 【0067】

実施例2

50

## 材料および方法

プラッドフォールドロイヤル診療所、アデンブルックス病院（ケンブリッジ）、ホーマートン病院（ロンドン）およびウェスタン総合病院（エディンバラ）の英国全域の4つの異なる病院で行った本試験では、定期的に各病院の泌尿器外科外来を訪問した合計107人の患者を、膀胱癌の可能性または再発について試験した。以前の試験では、移行上皮癌（TCC）について調査されたか、またはTCC陽性生検の膀胱鏡調査のために戻ってきたすべての患者の生態は便宜上2つの主なグループに分けることができたことを示した。

1. 肉眼的血尿、すなわち、尿中の明らかな血液所見を呈して、膀胱癌の可能性の早急な検査のために初めてクリニックを訪れた患者（GH患者）であり、このグループには顕微鏡的血尿、すなわち視覚的診断でなく尿中での生化学的血液所見を呈して初めて訪れた患者も含まれる、および、

2. 過去のある時期に膀胱癌の陽性生検診断を下され、腫瘍の性質および悪性度に応じた治療を受け、現在膀胱鏡検査のために来ていた患者（CS患者）。

### 【0068】

これらの患者は、クリニックでの成功事例と一致する定期的な詳細調査を行って追跡調査した。この調査には、定期的な尿細胞診（ここではMCM抗体検査）のための全量尿採取とともに、特に記載がない限り、詳細な体系的調査、詳細な身体検査、静脈性尿路造影、心電図（ECG）および胸部X線、並びに、最初の発現時または膀胱鏡追跡調査時の外来患者として定期的膀胱スキャンおよび／またはフレキシブル膀胱鏡検査を行った。

### 【0069】

関連病院の外科外来科への受付時（830～1230）または受付後科内で尿試料を収集した。その後全尿試料を排尿から1時間以内に試験室へ移し、試験室の50ml試料から収集した全試料中の十分な数の膀胱上皮細胞を生成した。

### 【0070】

次いで、試験室内の指定実施者によって尿を遠心分離（2500rpm×10分）するという所定の試験手順を実施した。上清液を注ぎ出し、細胞ペレットをSurePath固定液に添加した。試料を15分間放置し、その後2500rpmで10分間再遠心分離した。再度、上清液を注ぎ出し、残りの細胞ペレットを密閉した試料チューブに入れボルテックスをかけた。次いで、試料チューブをTripath機の桶に入れ、スライドと設定チャンバーを組み入れ、EA/OGについて標識したチューブをDI水から除き、対応する試薬ボトルに置いた。「Hema」と標識した細いチューブもDI水の外に出し、ヘマトキシリソのボトルに置いた。次いで、操作者はSurePath機上のピペット先端ボックスが平らなままであり、廃棄物桶ポンプが作動し、コンピューターが接続され、SurePath尿細胞診分析に特異的なプログラムが実行されたことを確認した。その後、Tripath（SurePath）システムのための残りのプロトコールは標準非婦人科プログラムSOPを用いて実施された。Tripath非婦人科プログラムSOPが完了した後、スライド調製のためのTripathアプローチの標準清浄システムが実施された。

### 【0071】

本試験の詳細な統計は、記載するように、液体ベースの細胞診スライド調製とMCM2抗体を用いて評価した。主分析は最適な統計パッケージとしてSPSSを用いて実行した。各患者群における年齢分布、性別分布および生検結果に関するデータに注釈を付けた。

### 【0072】

データを6つの項目、つまり、肉眼的血尿クリニックに来たが腫瘍は見つからなかった患者；肉眼的血尿クリニックに来て、膀胱のTCCが見つかった患者；顕微鏡血尿の仮診断を受けて肉眼的血尿クリニックに来たが、腫瘍が見つからなかった患者；膀胱鏡検査クリニックに来たが、腫瘍が見つからなかった患者；膀胱鏡検査クリニックに来て、膀胱のTCCが見つかった患者；および、尿路感染および尿路疾患のいずれの症状もない50歳以上の健康なボランティア群も同じクリニックから選択し、本一連の評価にわたって正常コントロール被検体として用いた第6群、にまとめた。

10

20

30

40

50

## 【0073】

## 結果

## 肉眼的血尿（G H）患者

肉眼的血尿（クリニックに来た患者の尿中の可視的鮮血）を初めて呈する患者において、10～400のMCM染色細胞の範囲に対する6つのMCM閾値を実証した。各症例において、感度割合、すなわち既知の膀胱癌陽性組織を有する患者と、特異度割合、すなわち膀胱悪性腫瘍に基づく組織所見を示さない患者を、生検データに対して測定した。

## 【0074】

## MCM閾値 = 10（図1）

これは、10MCM陽性細胞のMCM染色細胞閾値を用いたとき、陽性生検に対して100%の感度が達成され、その患者群では31%の特異度であることが実証される。

## MCM閾値 = 30（図2）

陽性生検に対して常法の液体ベースの細胞診スライドに30以上の染色MCM細胞が存在する患者では、その100%すべての患者が本試験を用いて検出されるであろう。同時に、陰性生検情報を得た患者では、MCM試験によって63%の特異度の結果が検出される。

## MCM閾値 = 50（図3）

膀胱癌陽性生検患者において50以上の染色細胞のMCM閾値を有する患者では、その悪性腫瘍検出について83%の感度がある。同時に、50未満の染色細胞のMCM閾値を有する陰性生検患者では、この陰性所見の定義について81%の偶発（チャンス）、すなわち特異度がある。

## MCM閾値 = 100（図4）

MCM閾値が陽性生検組織に対して100以上の染色細胞であるとき、その陽性結果の検出について83%の感度がある。それに応じて、陰性生検結果を有する同じ患者群では、腫瘍が存在しないことを示す81%の特異度がある。

## MCM閾値 = 200（図5）

200以上の染色細胞のMCM閾値がある患者では、この患者における悪性腫瘍検出について陽性生検組織に対して83%の感度がある。それに応じて、200未満の染色MCM細胞がある患者では悪性腫瘍が存在しないことを示す88%の特異度がある。

## MCM閾値 = 400（図6）

MCM閾値が400以上であるとき、その患者における悪性腫瘍検出について陽性生検に対して83%の感度がある。同時に、400未満のMCM染色細胞を有する患者では示した陰性生検に対して87%の特異度が記録される。

## 【0075】

## 膀胱鏡調査（C S）患者

本グループの患者では、膀胱癌陽性生検の既往があり、これは通常最も一般的なタイプの移行上皮癌（TCC）である。存在するとしても、悪性細胞が尿中に排出される場合には他のタイプの癌も検出されるであろう。

## 【0076】

## MCM閾値 = 10（図7）

MCM染色閾値が10染色細胞である場合、本グループでは生検陽性である患者の検出について100%の感度がある。同様に、生検陰性群では膀胱癌の再発を有さない患者の検出について39%の特異度がある。

## MCM閾値 = 30（図8）

30以上の染色細胞のMCM閾値では、これらの患者での悪性腫瘍を検出する生検陽性組織に対して100%の感度がある。同時に、生検陰性患者では膀胱腫瘍の再発がないことを示す64%の特異度がある。

## MCM閾値 = 50（図9）

これら患者では、MCM閾値が50以上の染色細胞である場合、生検陽性組織とMCM染色細胞との間に100%の感度がある。同時に、膀胱腫瘍の所見がないことを示す患者

10

20

30

40

50

における生検陰性組織に対して 82% の特異度がある。

MCM 閾値 = 100 (図 10)

MCM 閾値が 100 以上の染色細胞である本患者群では、これらの患者での悪性腫瘍を検出する生検陽性材料に対して 91% の感度がある。同時に、膀胱腫瘍の再発が存在しないことを示す生検陰性個体では 91% の特異度がある。

MCM 閾値 = 200 (図 11)

200 以上の染色細胞の MCM 閾値を有するこれら患者では、組織試料では生検陽性悪性腫瘍を有する患者を検出する 91% の感度がある。同時に、生検陰性個体において再発が起こっていないことを示す 93% の特異度がある。

MCM 閾値 = 400 (図 12)

本患者群では、生検陽性患者において膀胱腫瘍の再発が生じていることを示す 82% の感度がある。同時に、生検陰性患者において再発が起こっていない患者を検出する 93% の特異度がある。

【0077】

併用クリニック (GH + CS)

本患者群では、肉眼的血尿、すなわちクリニックに来た患者の尿中に可視的鮮血を初めて呈する患者と、加えて以前の治療およびその後の治療の腫瘍について生検陽性であり膀胱鏡検査 (CS) のためにクリニックに戻ってきた患者からのデータであり、これらの症例を、移行上皮細胞生検陽性腫瘍を有する単一群の患者として表す。

【0078】

MCM 閾値 = 10 (図 13)

MCM 染色閾値が 10 染色細胞である場合、本グループでは生検陽性である患者の検出について 100% の感度がある。同様に、生検陰性群では膀胱癌の再発を有さない患者の検出について 37% の特異度がある。

MCM 閾値 = 30 (図 14)

30 以上の染色細胞の MCM 閾値では、これらの患者での悪性腫瘍を検出する生検陽性組織に対して 100% の感度がある。同時に、生検陰性患者では膀胱腫瘍の再発がないことを示す 63% の特異度がある。

MCM 閾値 = 50 (図 15)

MCM 閾値が 50 以上の染色細胞である本患者群では、生検陽性組織と MCM 染色細胞との間に 94% の感度がある。同時に、膀胱腫瘍の所見がないことを示す患者における生検陰性組織に対して 82% の特異度がある。

MCM 閾値 = 100 (図 16)

MCM 閾値が 100 以上の染色細胞である本患者群では、これらの患者での悪性腫瘍を検出する生検陽性材料に対して 88% の感度がある。同時に、膀胱腫瘍の再発が存在しないことを示す生検陰性個体では 88% の特異度がある。

MCM 閾値 = 200 (図 17)

200 以上の染色細胞の MCM 閾値を有するこれら患者では、組織試料では生検陽性悪性腫瘍を有する患者を検出する 88% の感度がある。同時に、生検陰性個体において再発が起こっていないことを示す 92% の特異度がある。

MCM 閾値 = 400 (図 18)

本患者群では、生検陽性患者において膀胱腫瘍の再発が生じていることを示す 82% の感度がある。同時に、生検陰性患者において再発が起こっていない患者を検出する 92% の特異度がある。

【0079】

正常被検体 (膀胱腫瘍の所見なし)

50 歳以上の正常被検体のグループを、肉眼的血尿または過去に生検陽性疾患を有していた膀胱鏡検査のいずれかを呈する患者の集団ベースのコントロールとして用いた。この被検体のデータ (正常クリニックという) は感度以外全く同じように注釈を付けた。つまり、生検上の陽性腫瘍の所見は記録しなかった。これは、これら被検体が正常コントロー

10

20

30

40

50

ルのメカニズムとして膀胱鏡も生検も受けていないことと関連する。

#### 【0080】

MCM閾値 = 10 (図19)

MCM染色細胞閾値に10のMCM陽性細胞を用いている本被検体群では、疾患が存在しないことを裏付ける18%の特異度がある。本群の残りの被検体は、ここで取り上げた症状が否定されたとしても、泌尿器感染または一ないしは他の臨床分類の混同と関連していたかもしれない。

MCM閾値 = 30 (図20)

30以上の染色MCM細胞が存在するこれら被検体では、慣例的な液体ベースの細胞診スライドにおいて、36%の被検体が膀胱腫瘍の所見がないことを示す特異度を示した。

MCM閾値 = 50 (図21)

50以上の染色細胞のMCM閾値を有する被検体では、腫瘍発生の所見がないことを示す55%の特異度があった。

MCM閾値 = 100 (図22)

尿中に100以上の染色細胞のMCM閾値を有する本被検体群では、膀胱癌の所見がないことを示す91%の特異度がある。

MCM閾値 = 200 (図23)

200以上の染色細胞のMCM閾値が存在する本被検体群では、悪性膀胱疾患の所見がないことを示す91%の特異度がある。

MCM閾値 = 400 (図24)

この例では、MCM閾値が400以上である場合、これら被検体に膀胱癌の所見がないことを示す91%の特異度がある。

#### 【0081】

顕微鏡的血尿(MH)患者

本患者群では、たとえこれら患者がGHクリニックへの紹介の70%以下を構成するとしても、特にTCC頻度が低い。ゆえに、彼らは、患者の膀胱鏡が共通して陰性である、つまり腫瘍が見られないのでほとんどが生検を受けていない重要な患者群を含む。更なる診断試験としてMCMを使用することは、膀胱癌がないことを確認する上で非常に有益である。

#### 【0082】

MCM閾値 = 10 (図25)

10以上の染色細胞のMCM閾値が存在する本患者群では、膀胱癌の所見が存在しないことを示す80%の特異度がある。生検所見がない場合には感度は求められない。

MCM閾値 = 30 (図26)

30以上の染色細胞のMCM閾値が存在する本患者群では、膀胱癌の所見が存在しないことを示す90%の特異度がある。

MCM閾値 = 50 (図27)

50以上の染色細胞のMCM閾値が存在する本患者群では、膀胱癌の所見が存在しないことを示す90%の特異度がある。

MCM閾値 = 100 (図28)

100以上の染色細胞のMCM閾値が存在する本患者群では、膀胱癌の所見が存在しないことを示す90%の特異度がある。

MCM閾値 = 200 (図29)

200以上の染色細胞のMCM閾値が存在する本患者群では、膀胱癌の所見が存在しないことを示す93%の特異度がある。

MCM閾値 = 400 (図30)

400以上の染色細胞のMCM閾値が存在する本患者群では、膀胱癌の所見が存在しないことを示す97%の特異度がある。

#### 【0083】

図1から12の説明として、感度の割合、つまり膀胱癌の存在を決定する能力は、生検

10

20

30

40

50

材料における陽性の組織学的転帰の存在に対して評価した。同様に、これら患者において、特異度、つまり膀胱癌所見の非存在は、生検陰性組織像の所見に対して評価した。図13から18では、全体の感度と特異度の割合を、生検陽性TCCの所見を有する患者または膀胱鏡調査のために戻ってくる患者すべてにおいて注釈する。さらに、図19から24では、特に過去も現在も泌尿器疾患の既往がない50歳+の正常被検体群を比較群として用いる。図25から30では、GHクリニックに受診し、顕微鏡的血尿が見られた患者群は、公知のTCC低発症率を示し、陰性膀胱鏡に基づいて生検材料が無い場合には、MCM細胞数を増やして対応する高い特異度を示す。

#### 【0084】

肉眼的血尿および膀胱鏡調査患者群のデータは、感度が増加するにつれて特異度が低減することを示した。逆に、過去に膀胱癌生検所見があった患者では、特異度が増加するにつれて感度が低減する。

#### 【0085】

データは、個々の患者および分析群ごとに、クリニックおよび転帰（生検分析）に対するMCM数のドットプロットにまとめた。

#### 【0086】

GHクリニックにおける81%の陰性生検は50未満のMCMにより正確に同定され、19%は偽陽性となる。

GHクリニックにおける83%の陽性生検は50以上のMCMにより正確に同定され、17%が偽陰性となる。

CSクリニックにおける82%の陰性生検は50未満のMCMにより正確に同定され、18%が偽陽性となる。

CSクリニックにおける100%の陽性生検が50以上のMCMにより正確に同定され、0%が偽陰性となる。

55%の正常な尿は異常を示すMCM染色特徴の所見を示さなかったのに対して、45%の正常な尿は50以上のMCM染色細胞の割合であったことを示した。

MHクリニックでの90%の尿は異常を示すMCM染色特徴の所見を示さなかったのに対して、10%は50以上のMCM染色細胞の割合であったことを示した。

#### 【0087】

10染色MCM細胞から400MCM染色細胞までの様々なMCM細胞数を評価し、50より多いMCM染色細胞が1スライド上に存在した場合には疾患の起源、つまり初診か膀胱鏡検査かにかかわらず悪性腫瘍の頻度が増加したことが明らかとなった。GHクリニックでの50以上の染色細胞の閾値でMCMをPAP評価と比較した場合、77.8%のTCCが同定され、91.7%が腫瘍の所見がない特異度を示した。

加えて、CSクリニックでの200以上の染色細胞のMCM閾値では、MCMとPAP（慣例的細胞診）との間で84.6%のTCCが同定され、重要なことに、本患者群では、97.2%は膀胱腫瘍の再発がないことが認められた。

#### 【0088】

併用クリニック（GHおよびCS）では、MCMとPAPとの併用は、悪性腫瘍の変化を決定するのに81.8%の相関を示し、悪性腫瘍の所見がないことの決定について95.8%の特異度であった。

#### 【0089】

重要なことには、試験の初めには、全細胞数が5000以上である症例（「細胞適正5000」と称する）のみ分析し、MCM陽性か否かを決定した。これにより細胞診の質の向上が見られ、個々の細胞病理学者により承認され、調製された。

#### 【0090】

#### 膀胱癌におけるMCMの予後の指標

泌尿器クリニックで再調査した患者の慣例的な追跡調査の一部として、過去に膀胱癌陽性生検があった患者に追跡調査を実施した。このような患者への追跡調査のパターンは、繰り返しの調査および膀胱鏡検査のための一連の来院を初めの2年間は平均年に4回、3

10

20

30

40

50

年目および4年目は年に2回、それ以降腫瘍再発の所見が見られなければ年に1回が最良の方法であることを示した。しかしながら、いずれのセンターでも多くの症例において、組織学的に膀胱癌の根拠はなく実際に癌の再発はないが、尿試験において顕著にMCM陽性であった患者がいたことは興味深いことであった。あるセンターでは、5人の患者が最後の18か月に再検討されたが、すべての患者はCSクリニックのもので、そのセンターでの偶発的定期調査で退院した。しかしながら、18か月から2年の期間内での症例の再発に基づいて、この5人の患者は急性調査のために来院し、再生検を行ったところ、すべてが悪性膀胱疾患を持っていた（表1）。発明者等は、MCMは、過去に生検陰性であったがMCM陽性であった患者の予後の指標となり、このような患者の膀胱癌転帰および患者管理の点で価値があると考える。

10

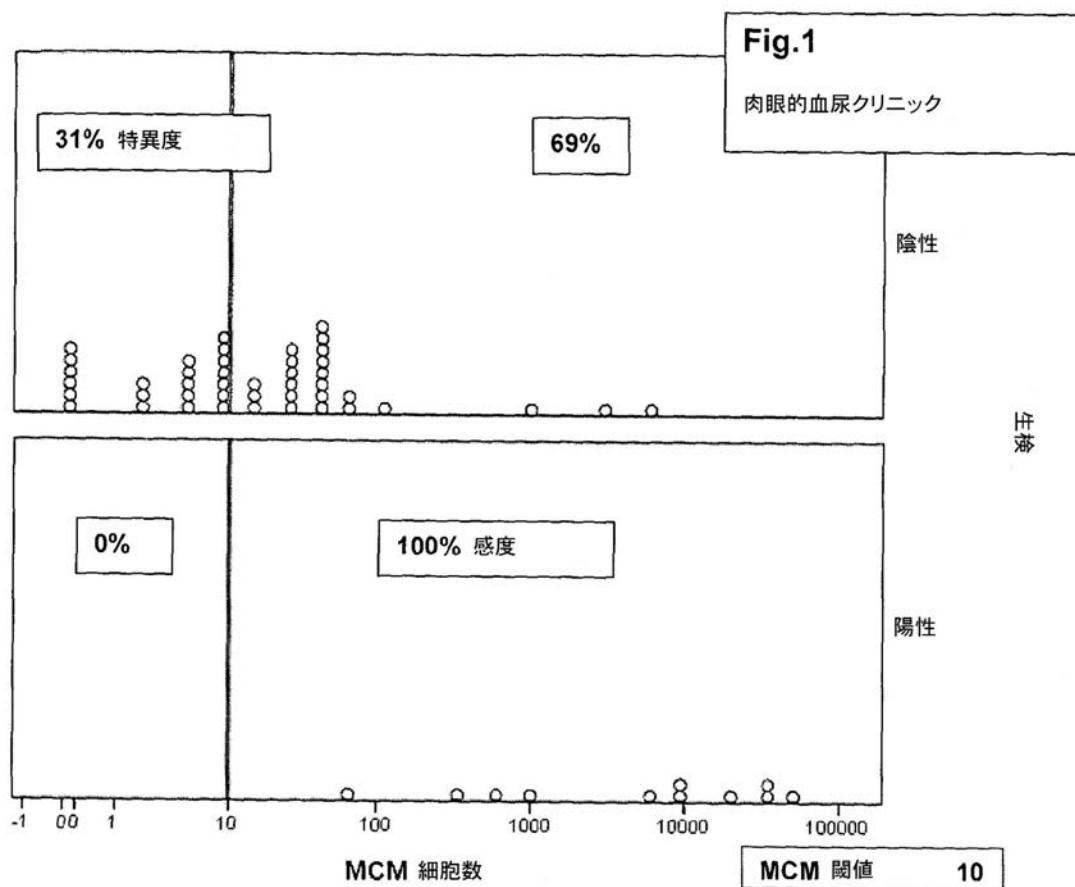
20

【表1】

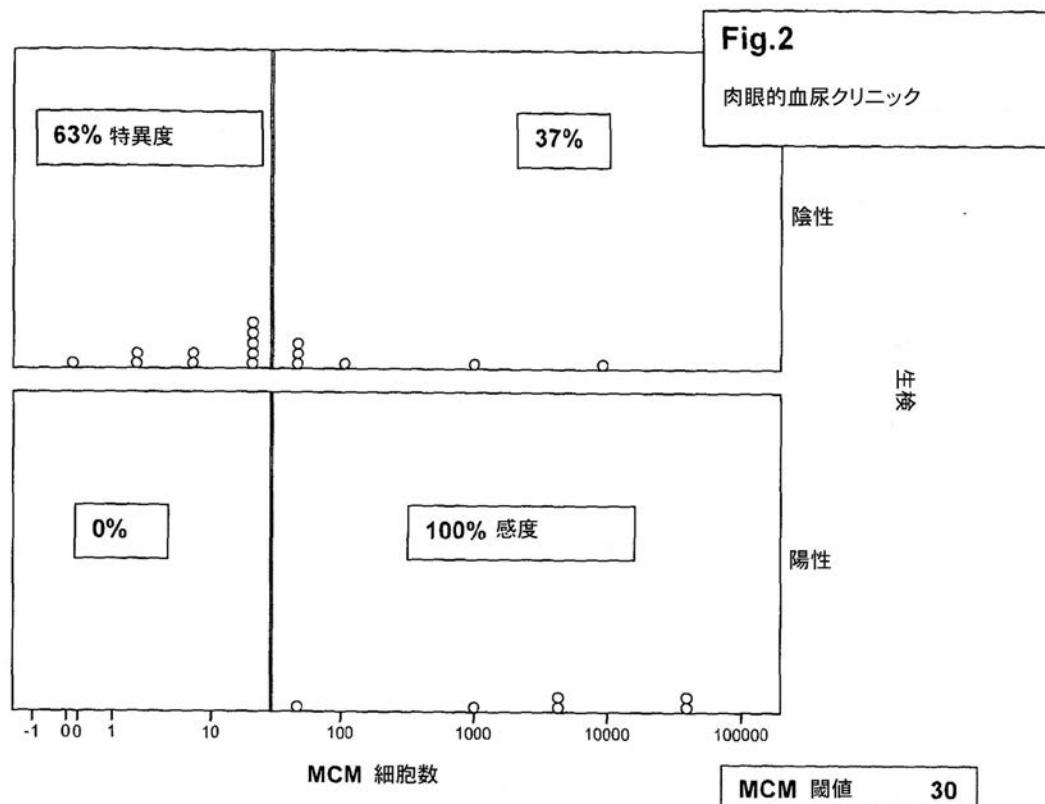
## MCM/TCC/002: 試験中のMCM陽性; 生検陰性

S.No	試験番号	コホート	MCM 細胞数	追跡調査
1	3	CS	200	悪性
2	29	CS	1000	悪性
3	65	CS	2000	悪性
4	1017	CS	3000	悪性
5	14	CS	300	悪性

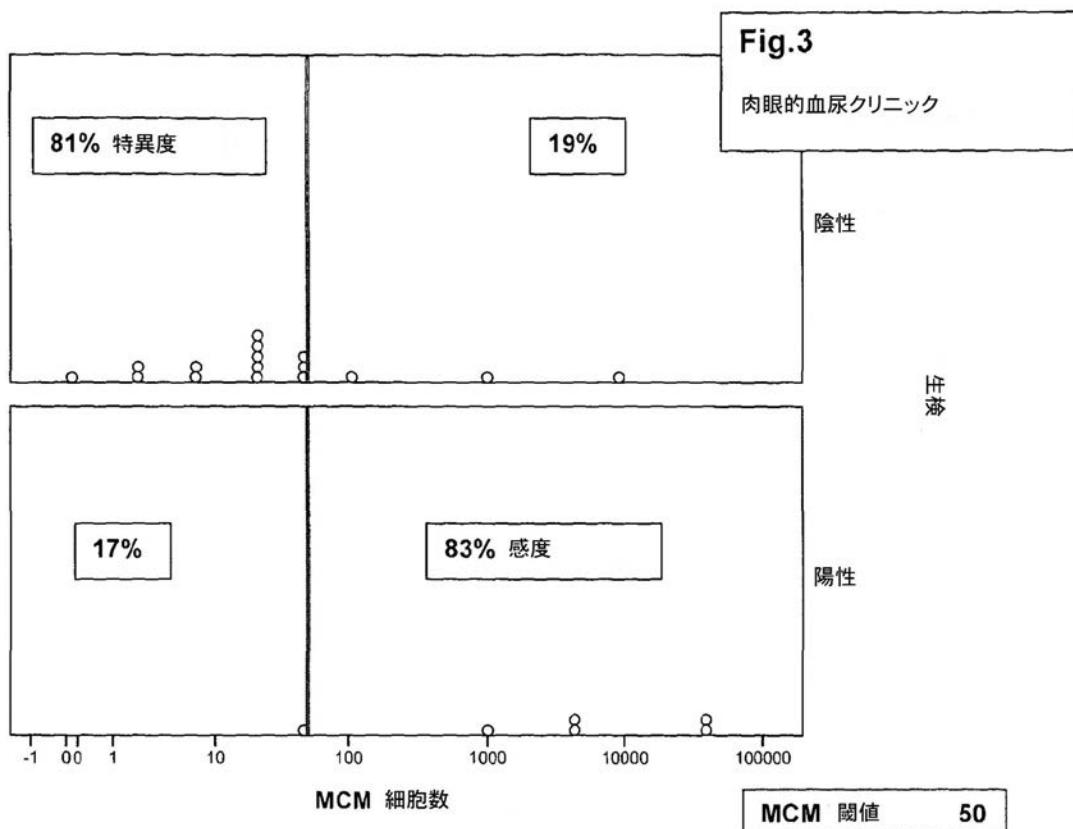
【図 1】



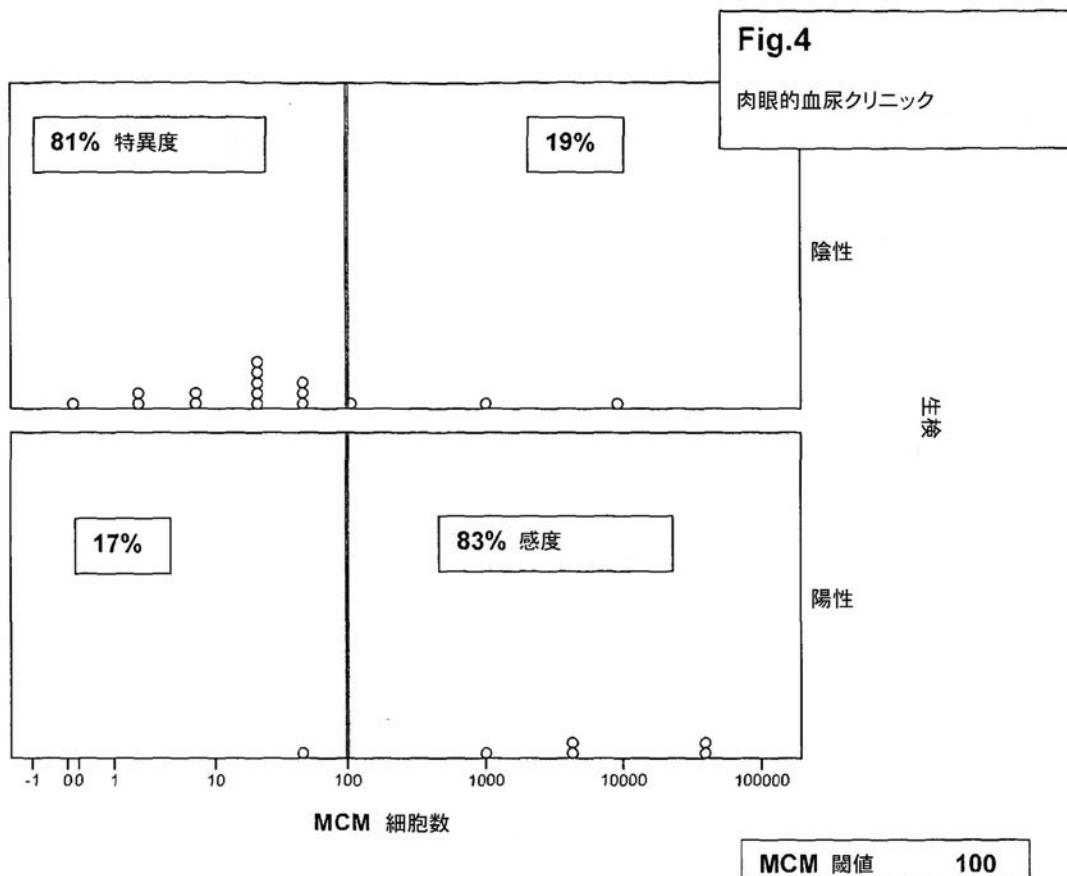
【図 2】



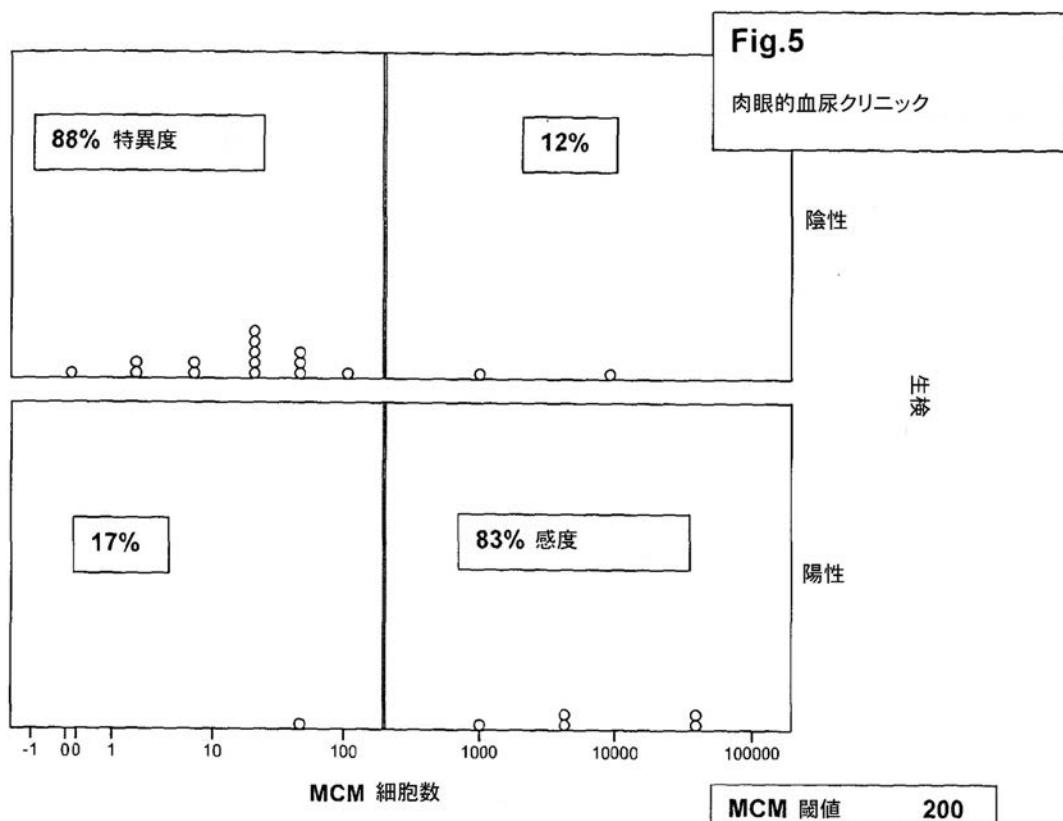
【図3】



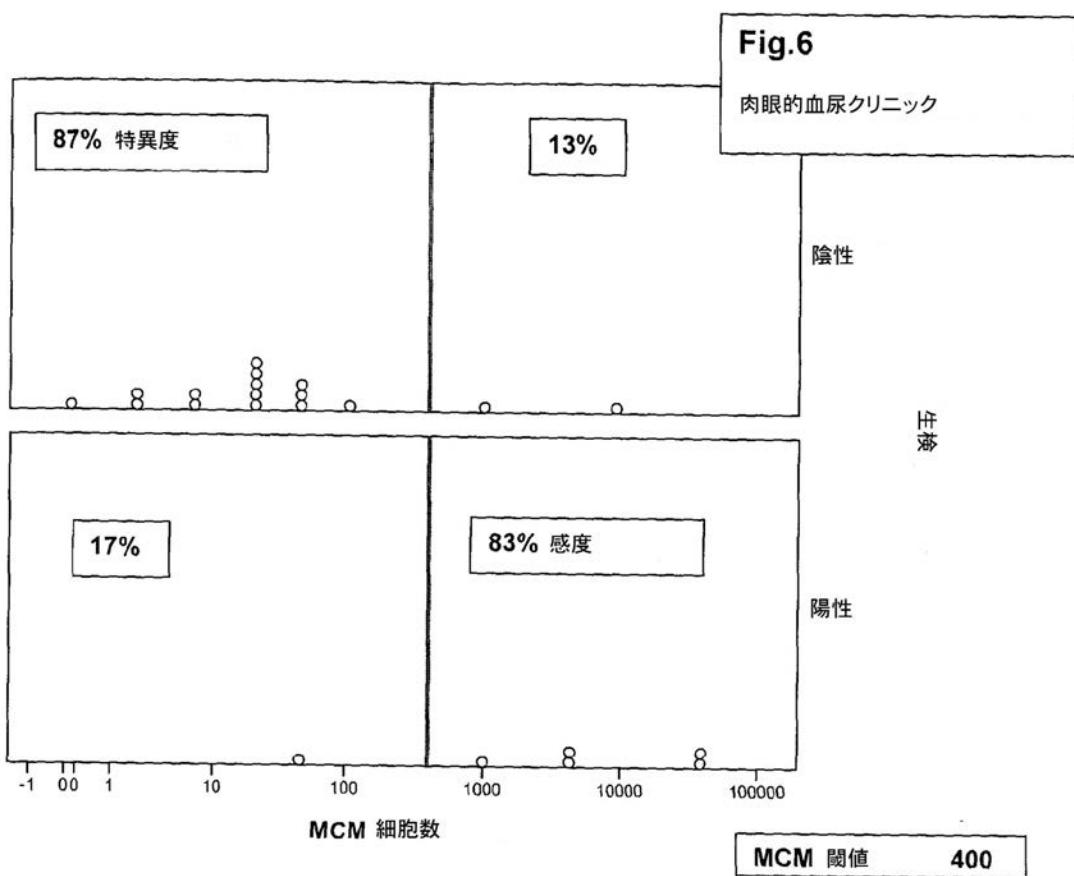
【図4】



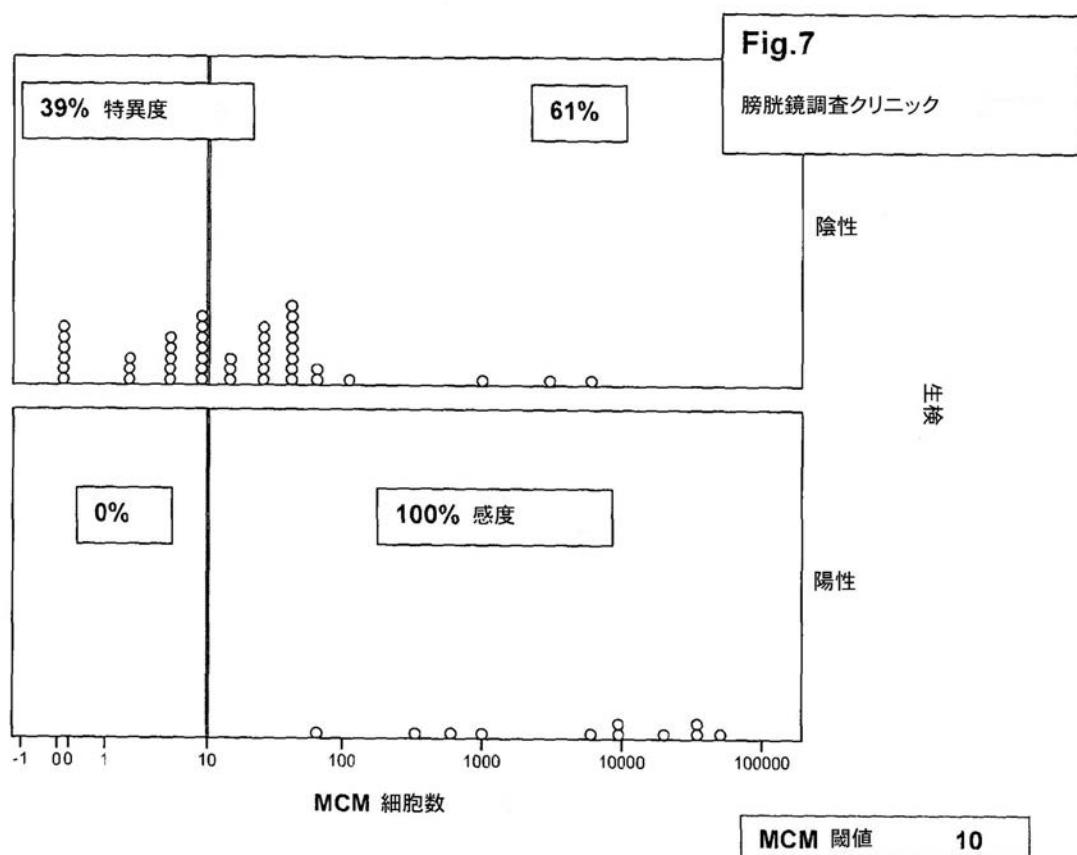
【図 5】



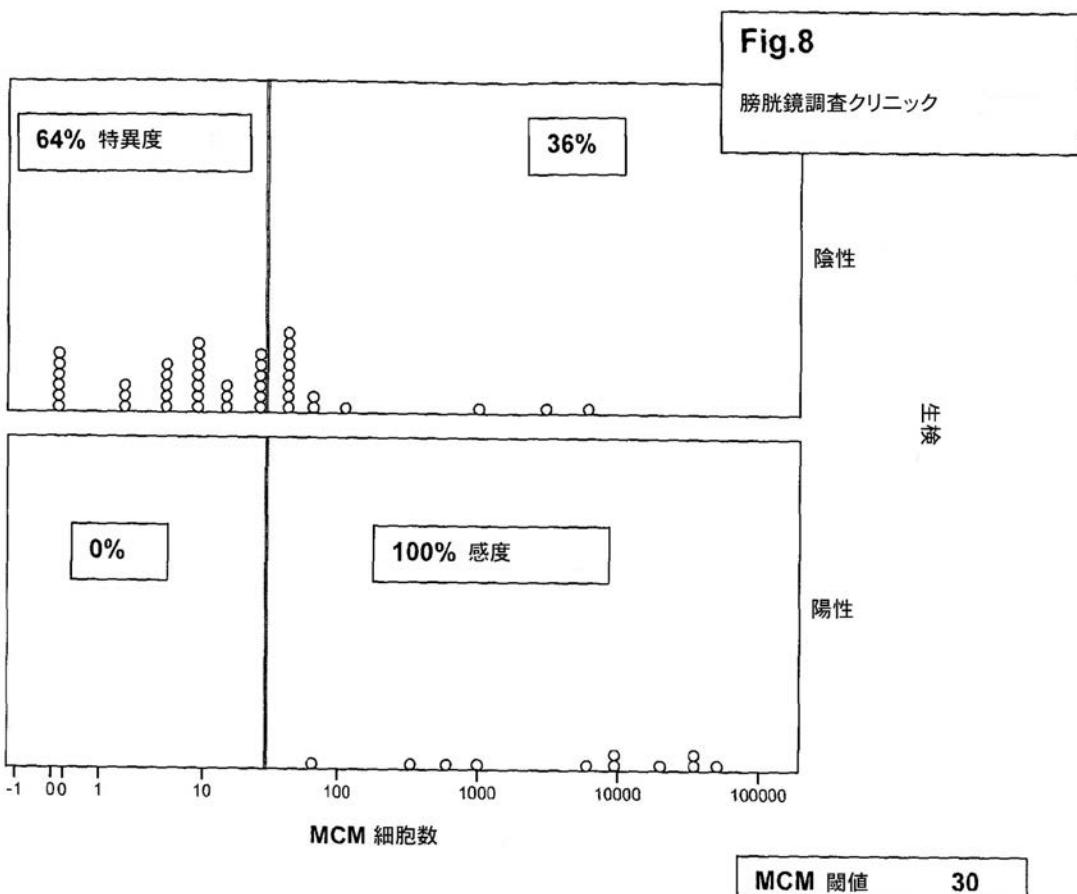
【図 6】



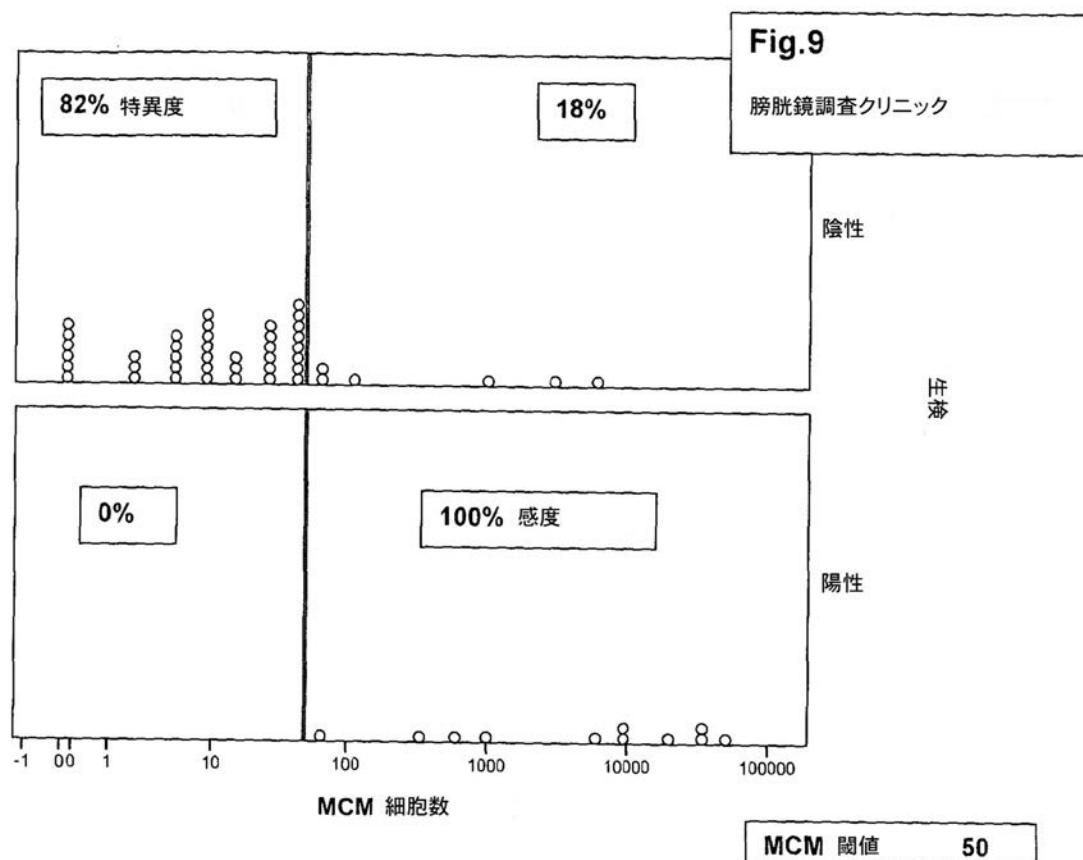
【図7】



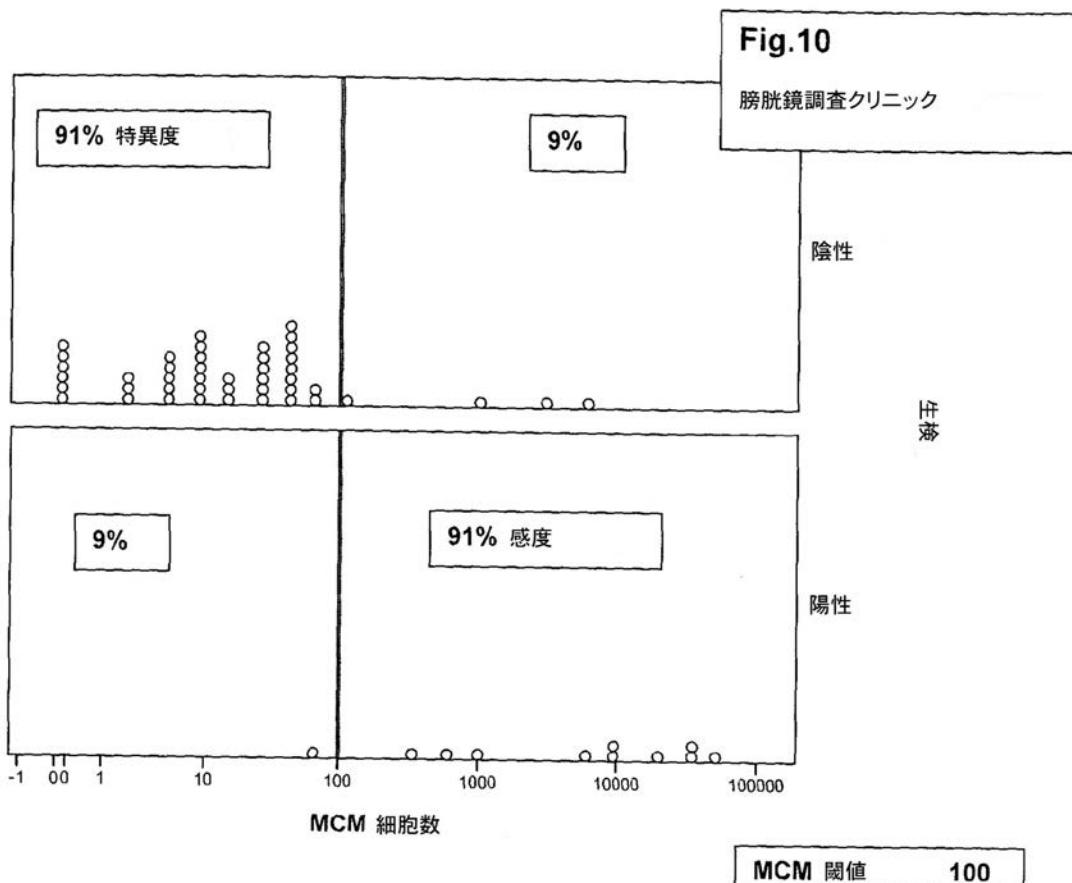
【図8】



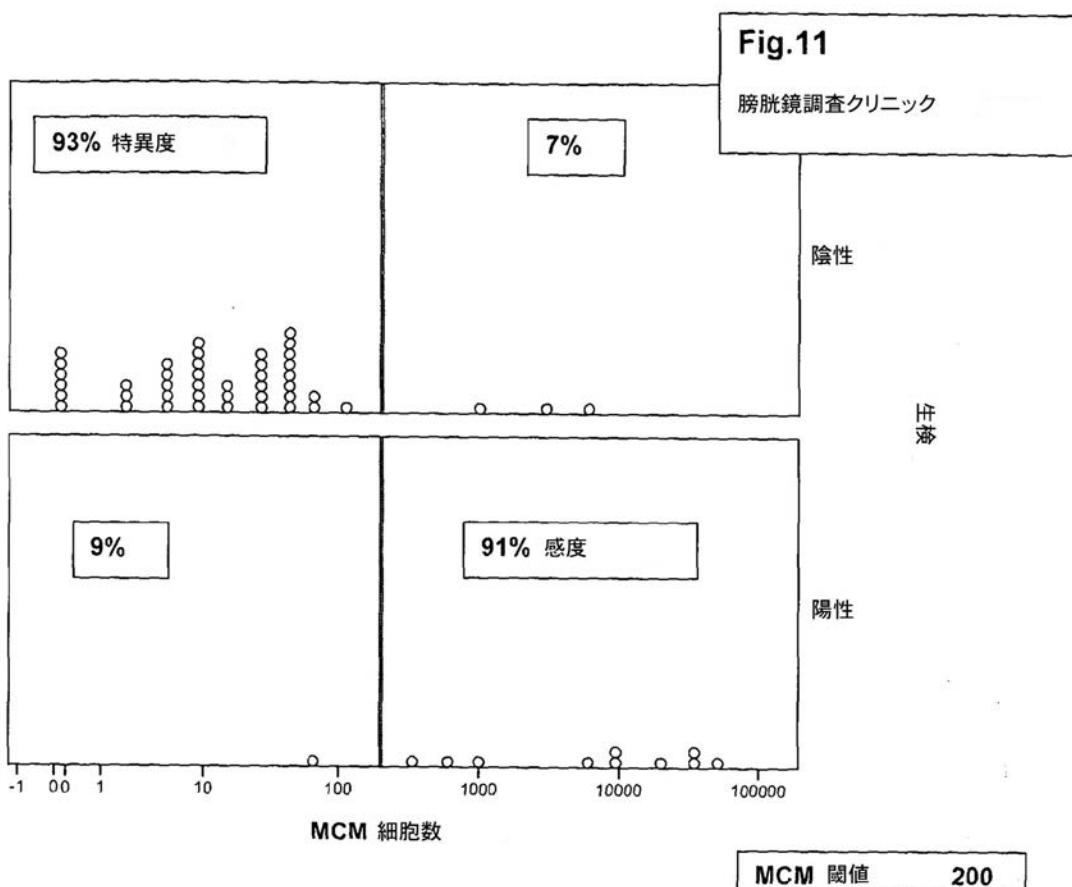
【図 9】



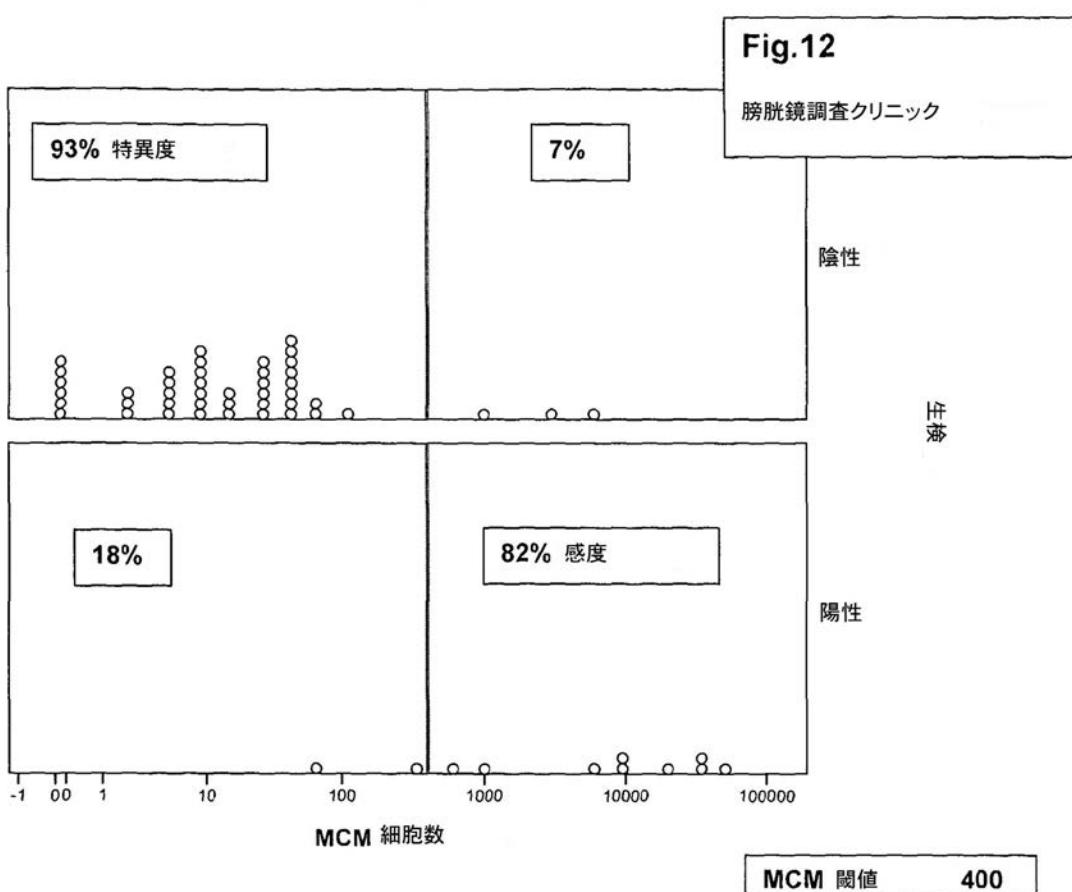
【図 10】



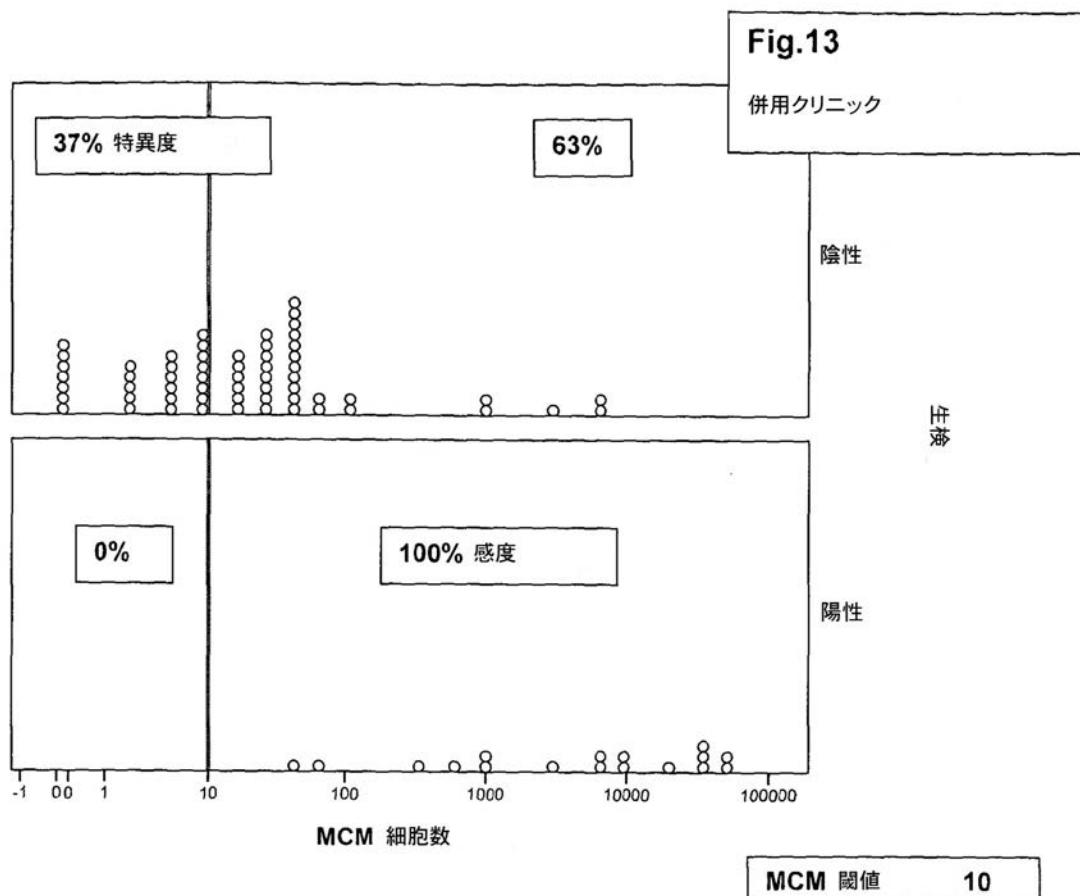
【図 1 1】



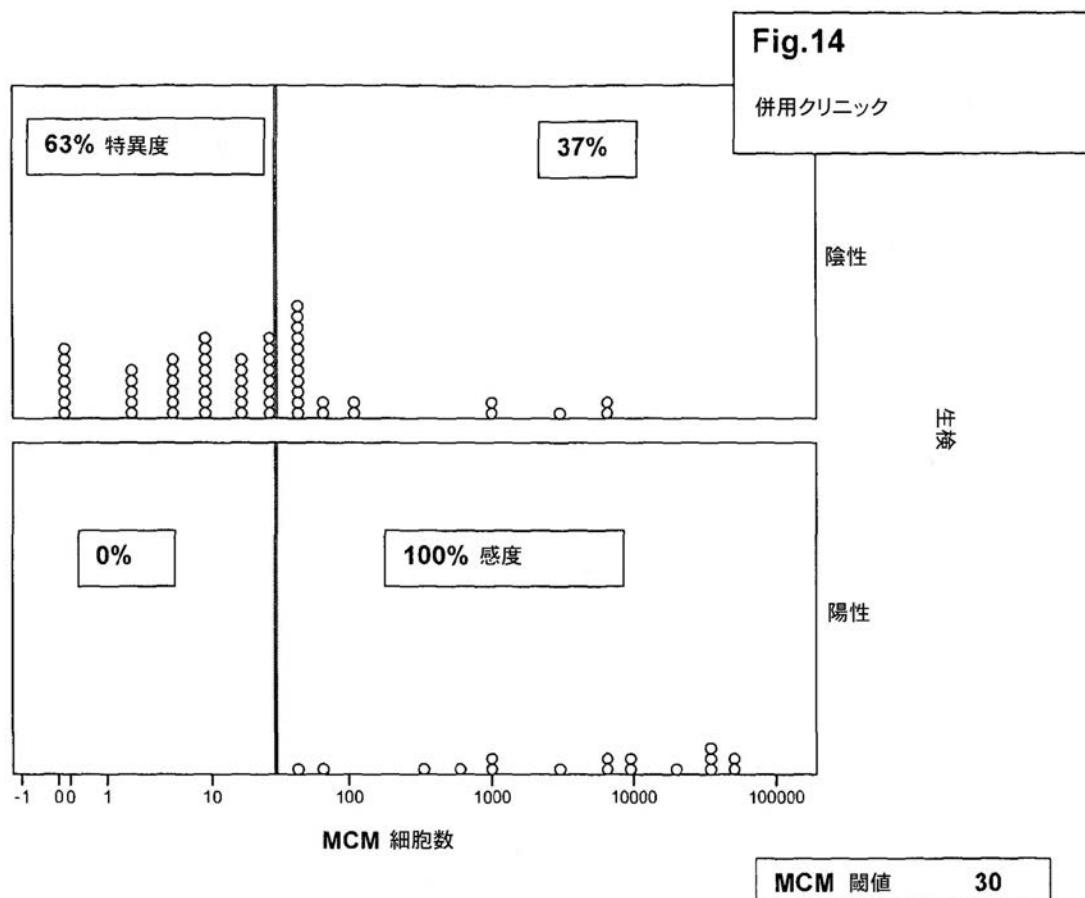
【図 1 2】



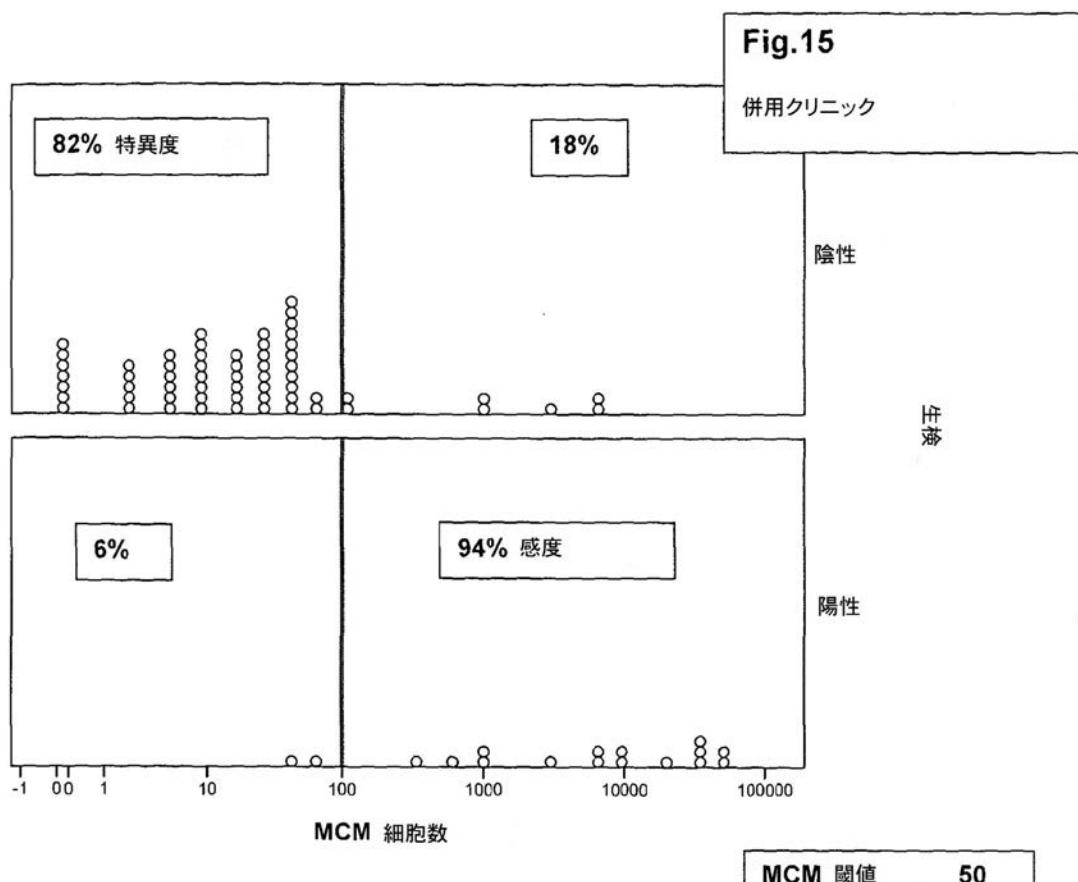
【図 1 3】



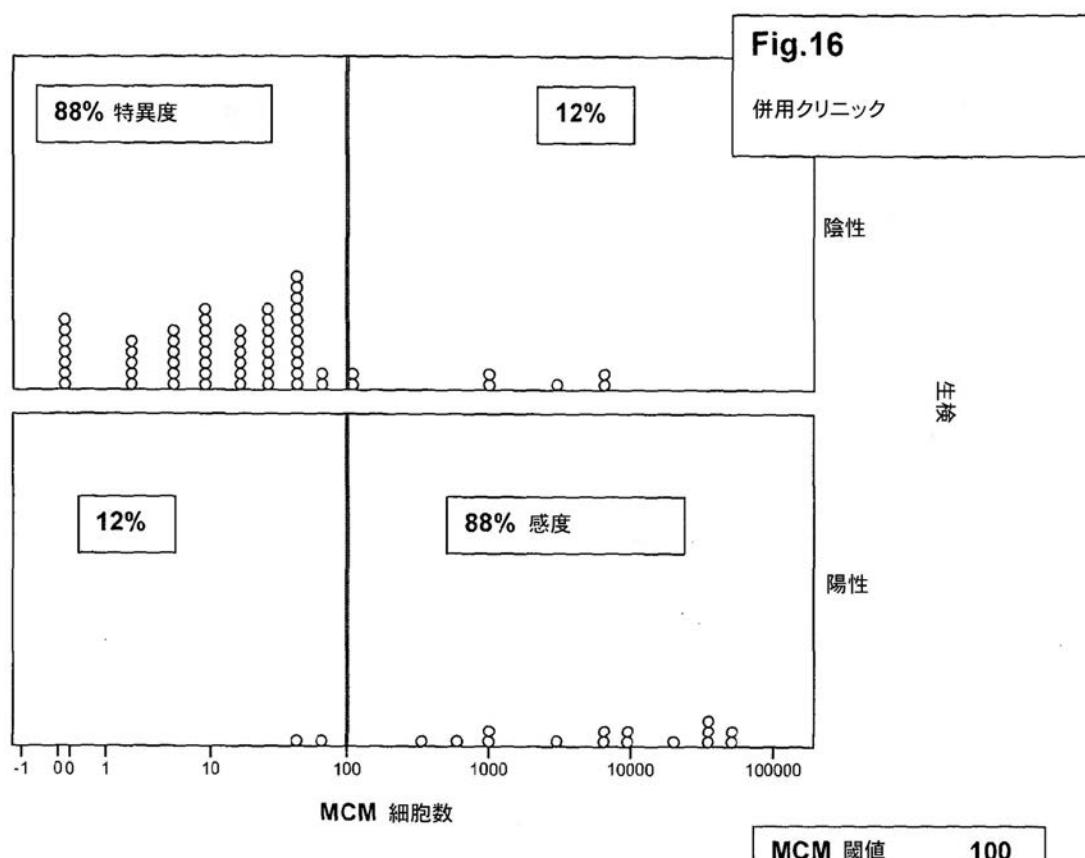
【図 14】



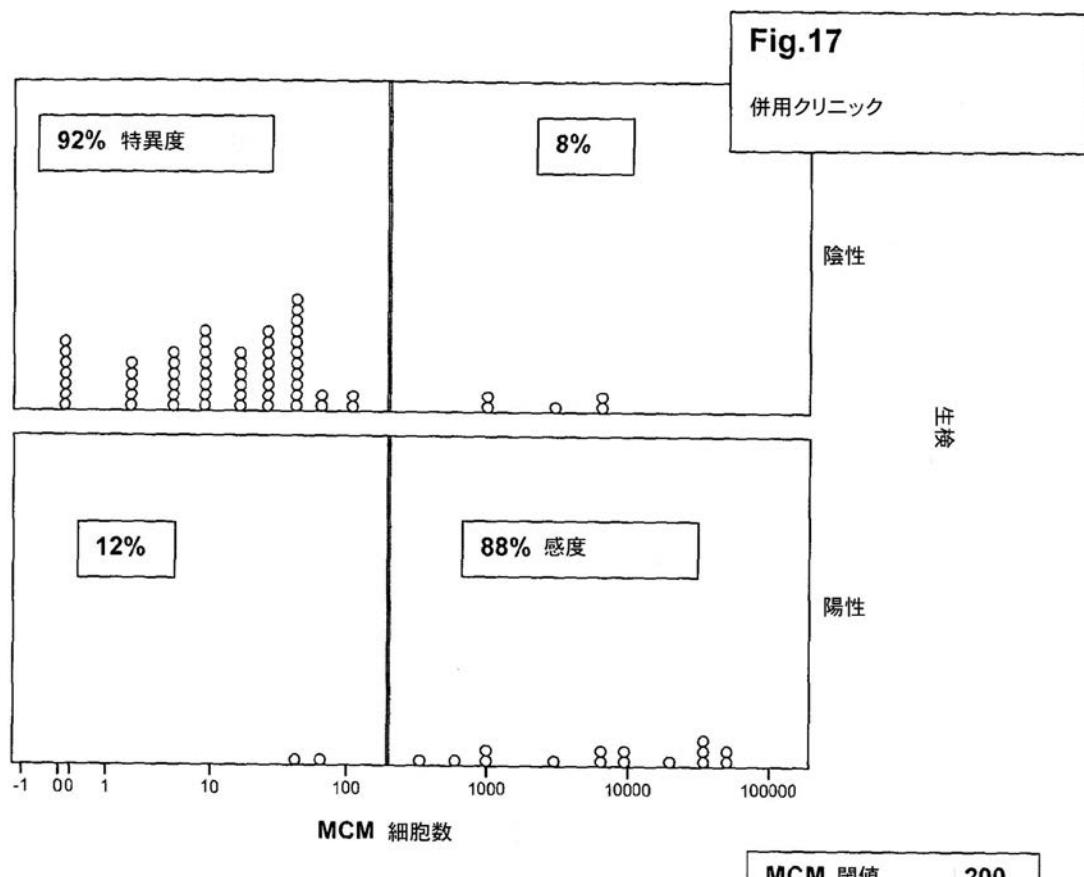
【図 15】



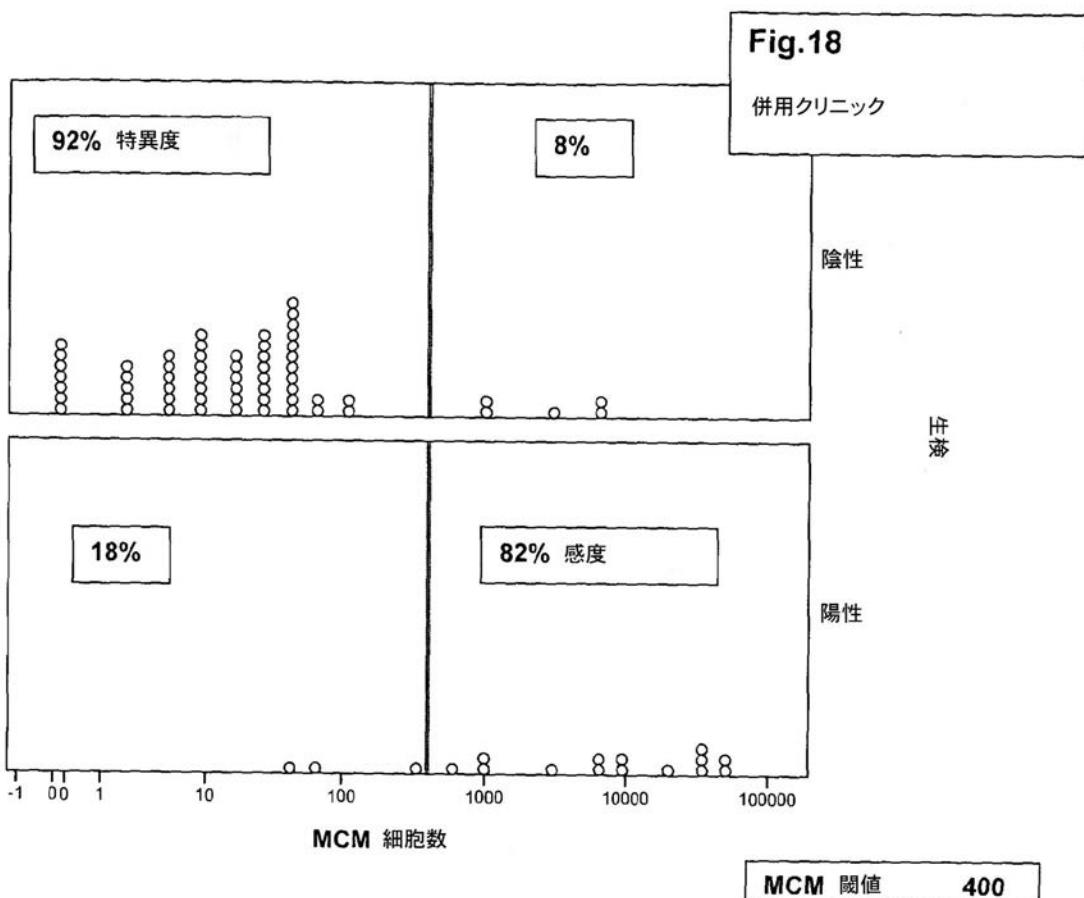
【図 16】



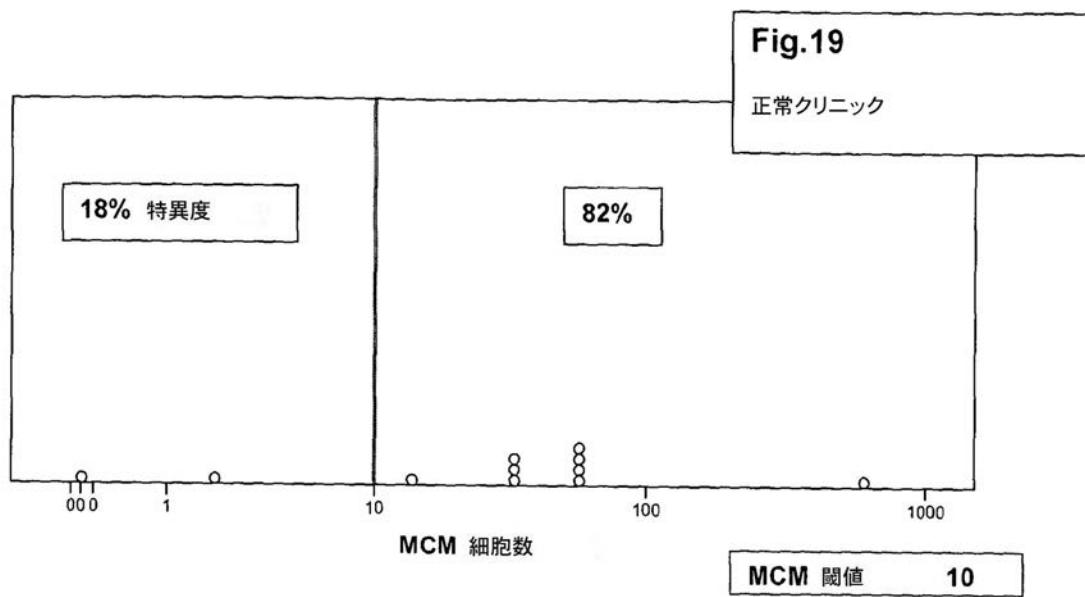
【図17】



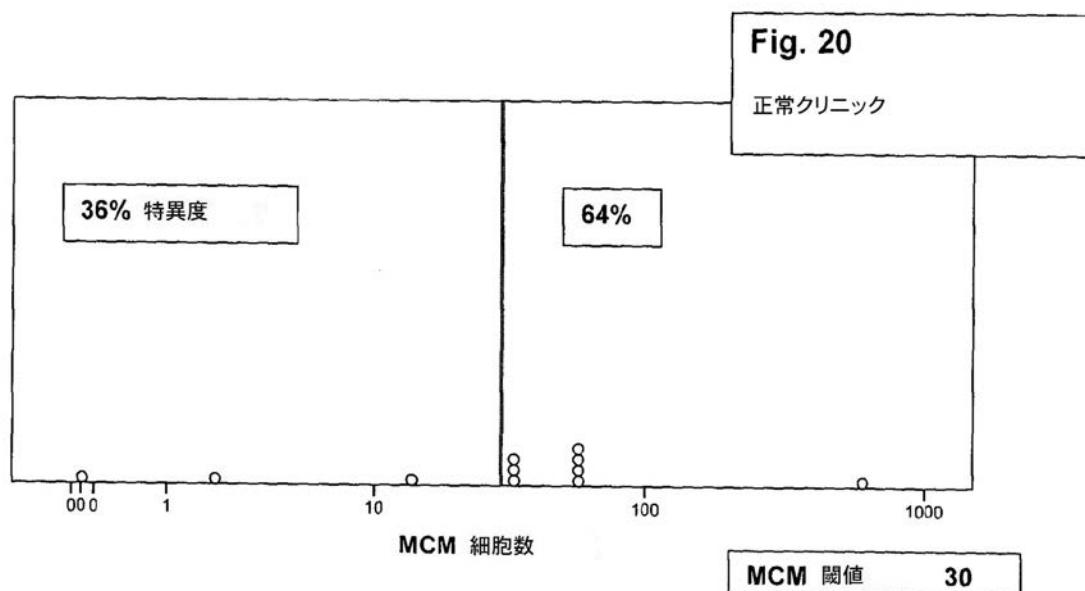
【図18】



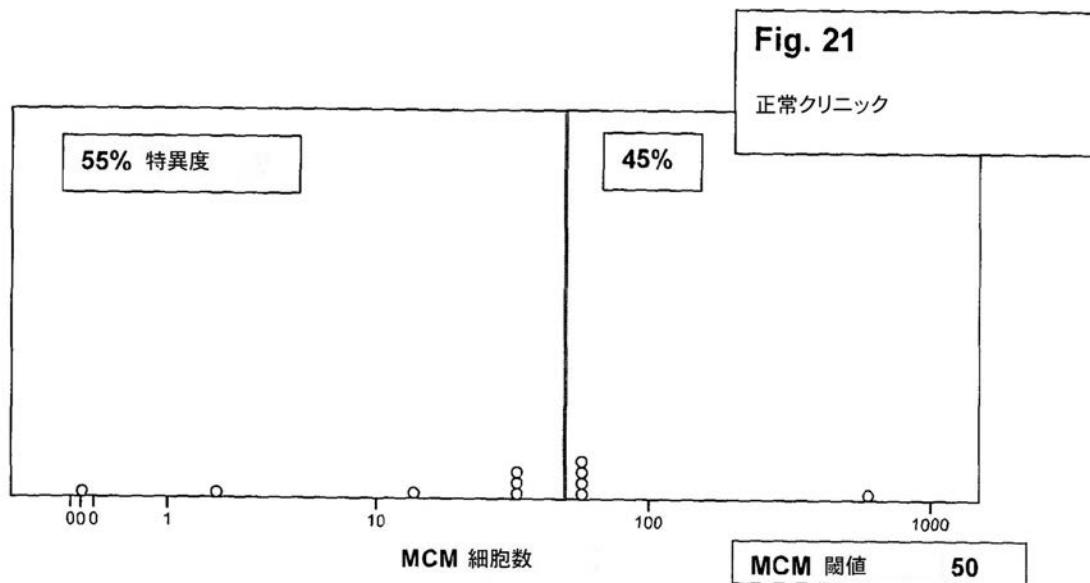
【図 19】



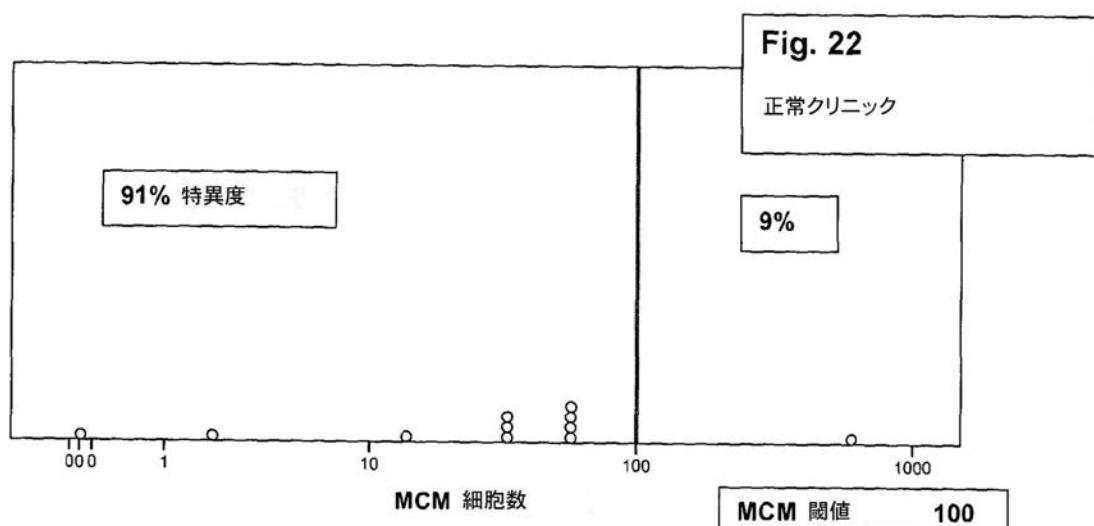
【図 20】



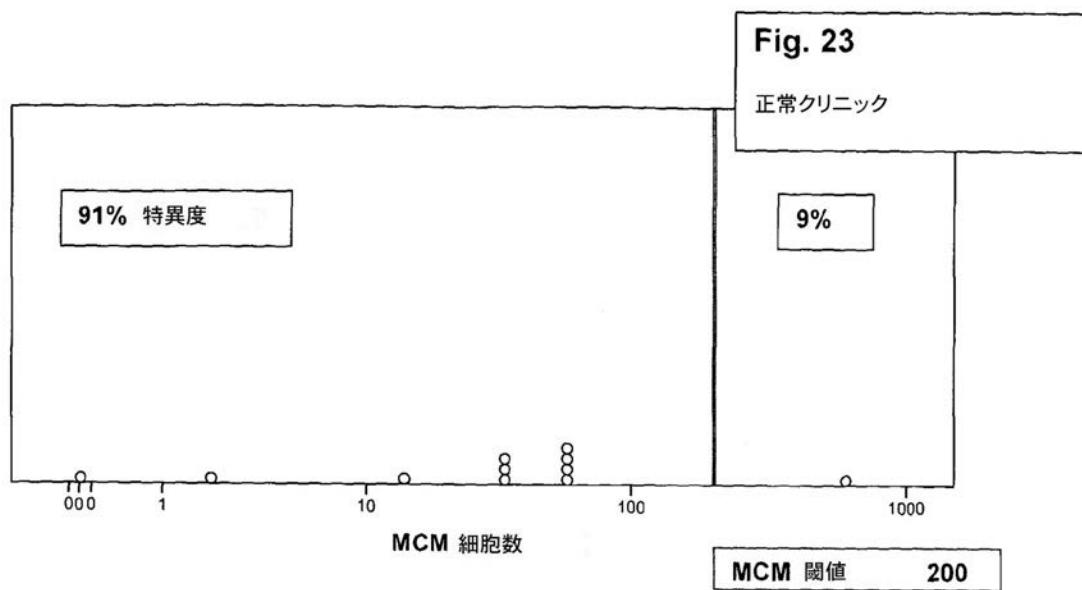
【図 2 1】



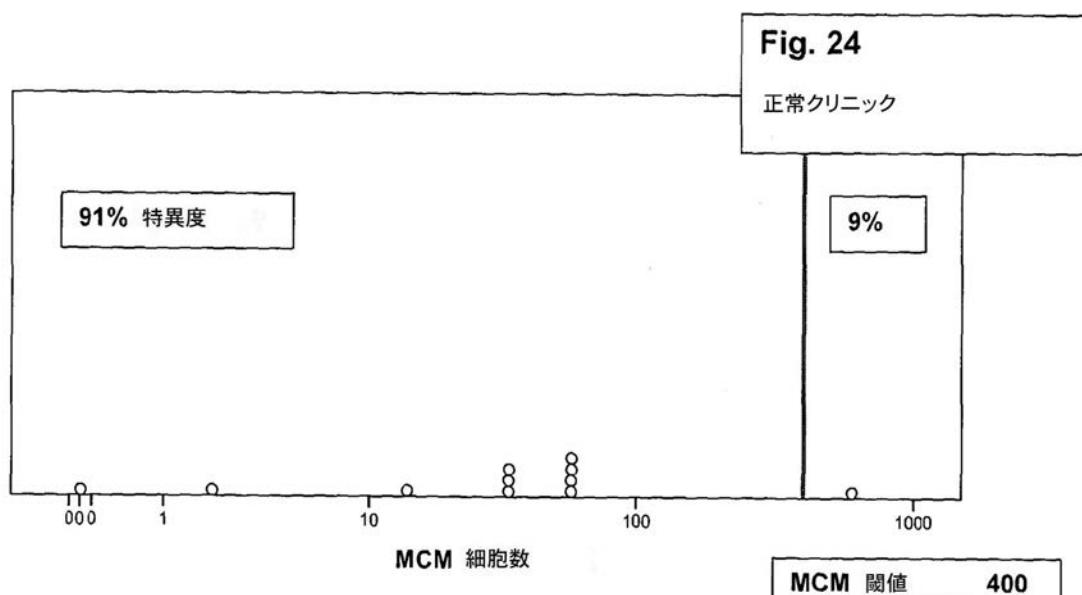
【図 2 2】



【図 2 3】

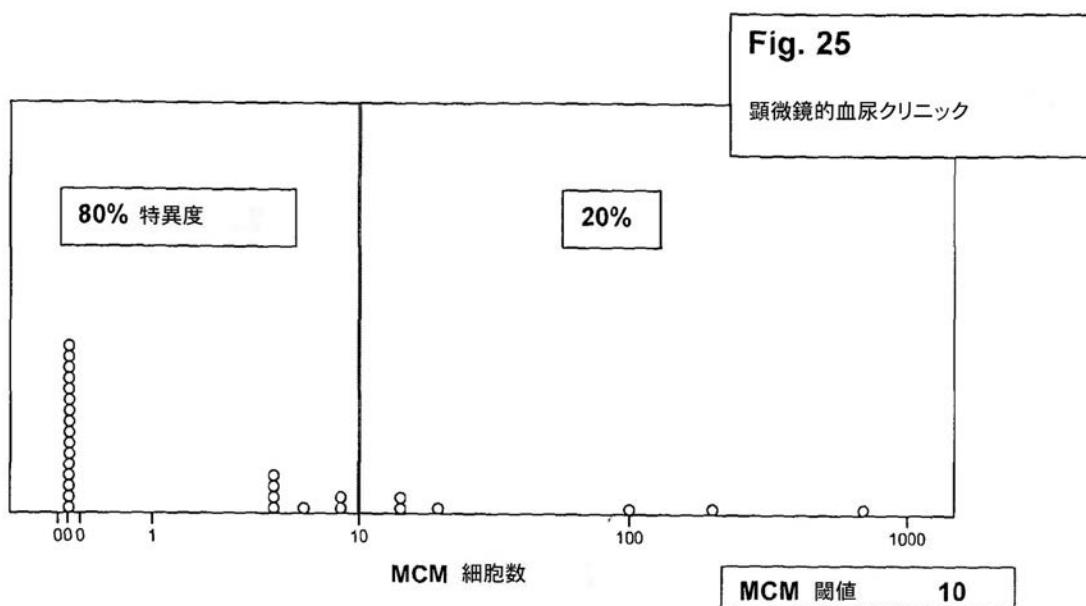


【図 2 4】

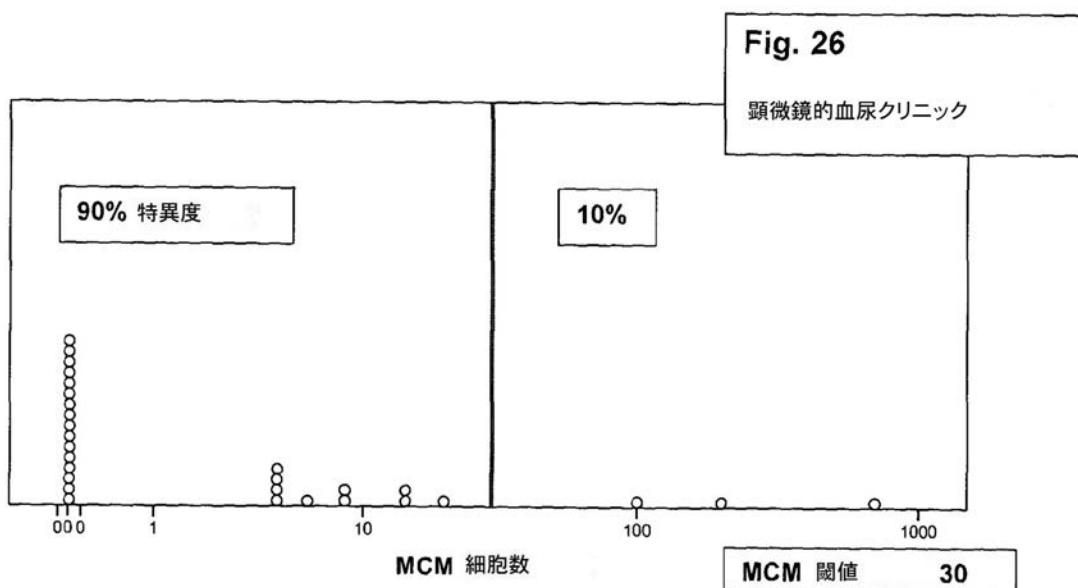


【図 25】

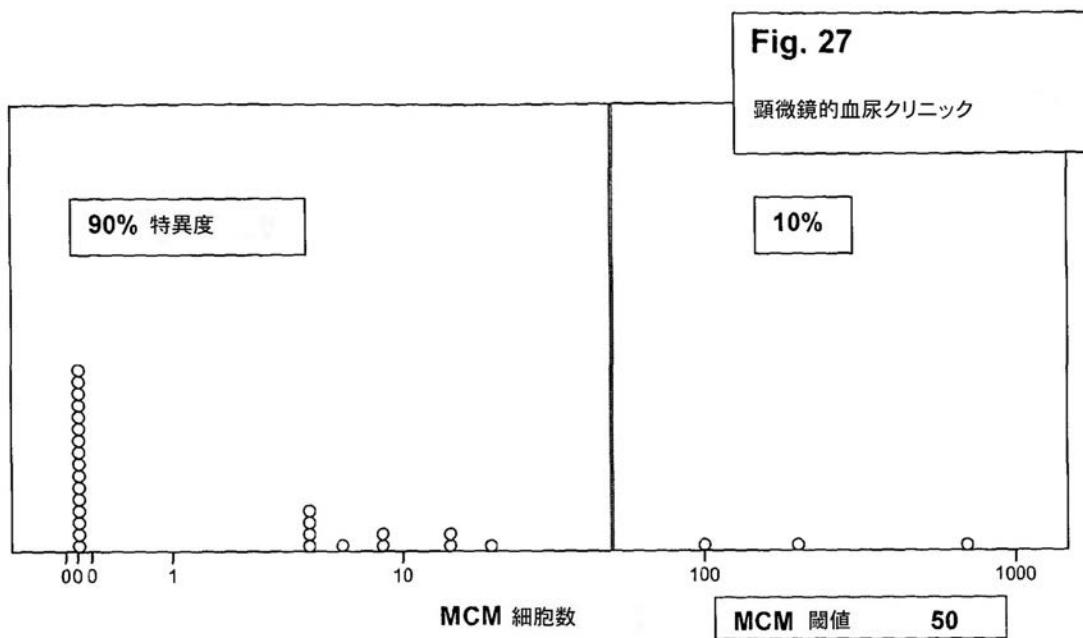
## 顕微鏡的血尿を有する患者



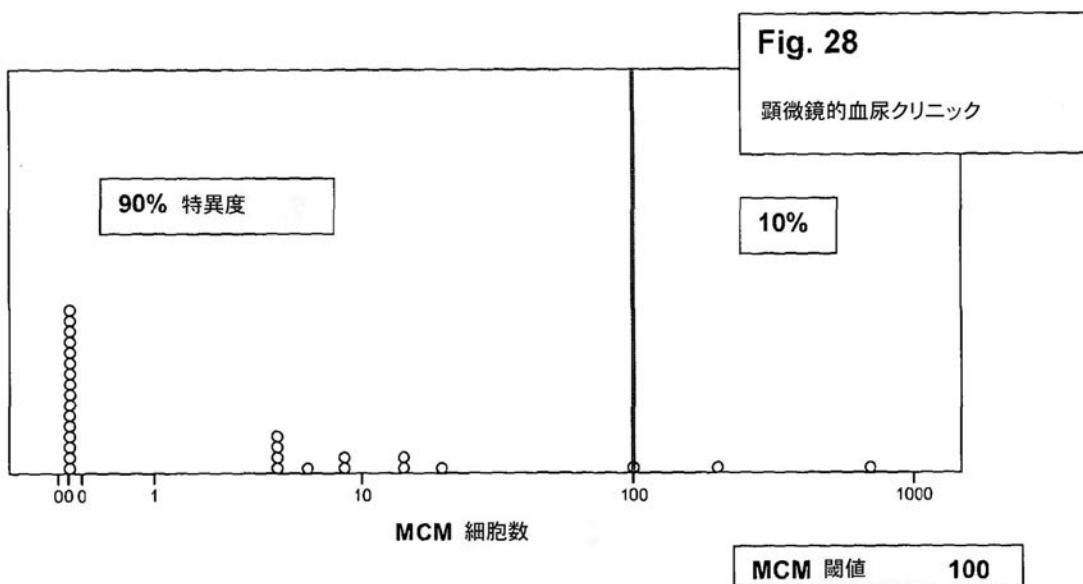
【図 26】



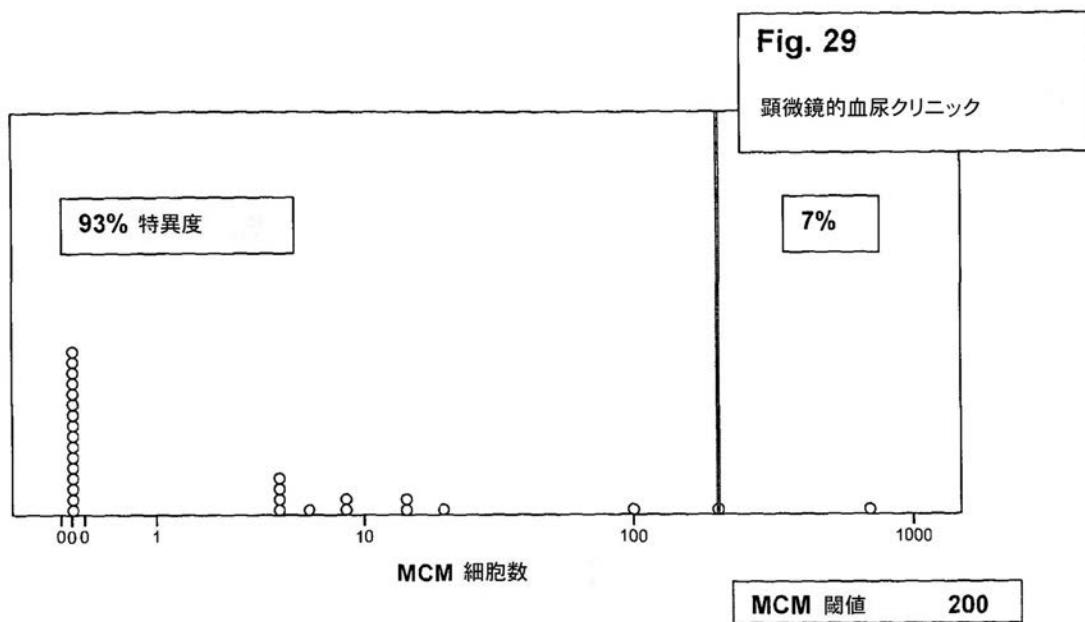
【図 27】



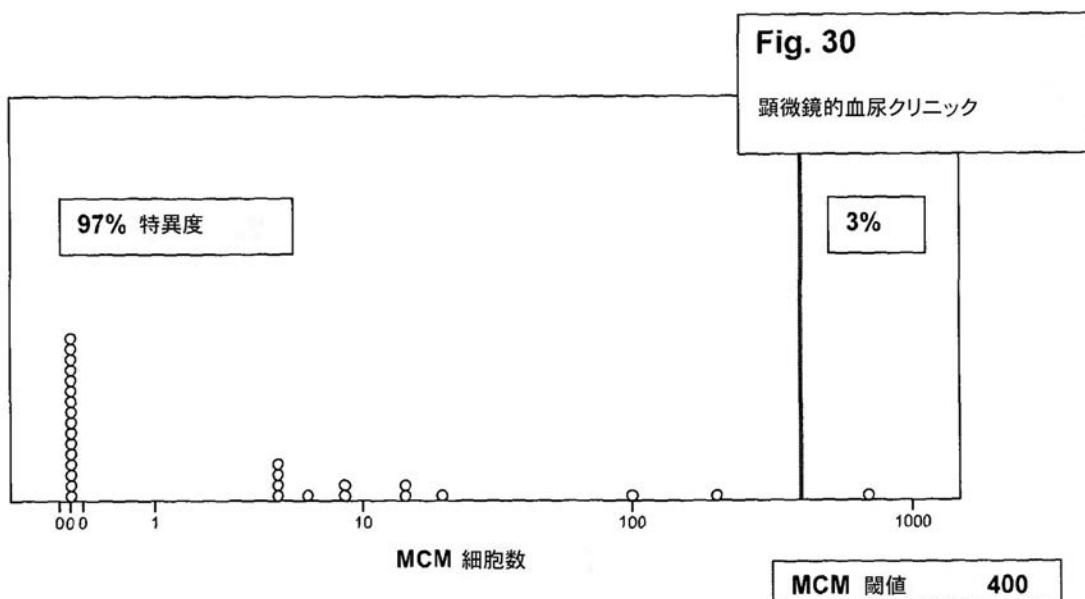
【図 28】



【図 29】



【図 30】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/000008
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.
--

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) G01N
---

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
---

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
--

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE
------------------------------

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>STOEBER KAI ET AL: "Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments", JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE (BETHESDA), , vol. 94, no. 14, 17 July 2002 (2002-07-17), , pages 1071-1079, XP002548404, abstract</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-34

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.
--

<input checked="" 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 document 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
---

Date of mailing of the international search report
--

20 March 2012
---------------

30/03/2012
------------

Name and mailing address of the ISA/
--------------------------------------

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Authorized officer
--------------------

Rosin, Oliver
---------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/000008
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STOEBER K ET AL: "Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine", THE LANCET, LANCET LIMITED, LONDON, GB, vol. 354, no. 9189, 30 October 1999 (1999-10-30), pages 1524-1525, XP004828043, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(99)04265-8 the whole document	1-34
X	IAN PROCTOR ET AL: "Biomarkers in bladder cancer", HISTOPATHOLOGY, vol. 57, no. 1, 23 June 2010 (2010-06-23), pages 1-13, XP55022179, ISSN: 0309-0167, DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03592.x chapter "MCM5"	1-34
X	US 6 303 323 B1 (LASKEY RONALD A [GB] ET AL) 16 October 2001 (2001-10-16) column 13; example 23	1-3,5-34
X	KRÜGER S ET AL: "Prognostic value of MCM2 immunoreactivity in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder", EUROPEAN UROLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 43, no. 2, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 138-145, XP002406882, ISSN: 0302-2838, DOI: 10.1016/S0302-2838(02)00580-8 abstract	1-34
X	M BURGER ET AL: "Mcm2 predicts recurrence hazard in stage Ta/T1 bladder cancer more accurately than CK20, Ki67 and histological grade", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 96, no. 11, 15 May 2007 (2007-05-15), pages 1711-1715, XP55022188, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/sj.bjc.6603784 abstract	1-34
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/000008
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BREMS-ESKILDSEN ANNE SOFIE ET AL: "Prediction and diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary content of hTERT, SENP1, PPP1CA, and MCM5 transcripts", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 1, 24 November 2010 (2010-11-24), page 646, XP021087163, ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-10-646 abstract -----	1-34
X	KORKOLOPOULOU ET AL: "Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: a multivariate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators", HUMAN PATHOLOGY, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 36, no. 8, 1 August 2005 (2005-08-01) , pages 899-907, XP005012618, ISSN: 0046-8177 abstract -----	1-34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2012/000008

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6303323 B1	16-10-2001	US 6303323 B1 US 2003143646 A1	16-10-2001 31-07-2003

---

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,R0,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,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,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 コールマン , ニック

イギリス国 , シービー 21 5エヌワイ , ケンブリッジ , ウェストン コルヴィル , ミル ヒル  
32 / 33

F ターム(参考) 2G045 AA26 BA13 BB05 BB10 CB03 DA36 DA78 FB03 GC22