

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第6017724号
(P6017724)

(45) 発行日 平成28年11月2日(2016.11.2)

(24) 登録日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/37	(2006.01)	C 1 2 Q	1/37
G O 1 N 33/68	(2006.01)	G O 1 N	33/68
G O 1 N 33/58	(2006.01)	G O 1 N	33/58 Z
G O 1 N 33/48	(2006.01)	G O 1 N	33/48 S

請求項の数 6 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2016-504825 (P2016-504825)	(73) 特許権者	000000376
(86) (22) 出願日	平成27年2月25日 (2015.2.25)		オリンパス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/055403		東京都八王子市石川町2951番地
審査請求日	平成28年2月1日 (2016.2.1)	(74) 代理人	100106909
早期審査対象出願			弁理士 棚井 澄雄
		(74) 代理人	100064908
			弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義
		(74) 代理人	100086379
			弁理士 高柴 忠夫
		(74) 代理人	100139686
			弁理士 鈴木 史朗
		(74) 代理人	100161702
			弁理士 橋本 宏之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 十二指腸液試料の腭液由来成分検出用試料としての適性評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 十二指腸液試料とキモトリプシン特異的基質を混合し、前記十二指腸液試料による前記キモトリプシン特異的基質の分解物量を測定する工程と、

(b) 前記十二指腸液試料とペプシン特異的基質を混合し、前記十二指腸液試料による前記ペプシン特異的基質の分解物量を測定する工程と、

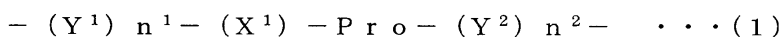
(c) 前記十二指腸液試料の前記キモトリプシン特異的基質の分解物量が所定の閾値よりも多く、かつ前記十二指腸液試料の前記ペプシン特異的基質の分解物量が所定の閾値よりも少ない場合に、前記十二指腸液試料を腭液由来成分の検出用資料として適していると評価する工程と、

を有する、十二指腸液試料の腭液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

【請求項2】

前記キモトリプシン特異的基質におけるキモトリプシンによる切断部位が、下記一般式(1)

【化1】

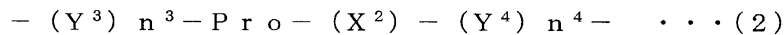


[式(1)中、Y¹及びY²はそれぞれ独立して、アミノ酸残基又は-CH₂-NH-を表し、X¹はPhe、Trp、又はTyrを表し、n¹及びn²はそれぞれ独立して、1

～ 10 の整数を表す。]

で表される構造であり、前記ペプシン特異的基質におけるペプシンによる切断部位が、下記一般式(2)

【化2】



[式(2)中、 Y^3 及び Y^4 はそれぞれ独立して、アミノ酸残基又は $-CH_2-NH-$ を表し、 X^2 はPhe、Trp、又はTyrを表し、 n^3 及び n^4 はそれぞれ独立して、1～10の整数を表す。]

10

で表される構造である、請求項1に記載の十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

【請求項3】

前記キモトリプシン特異的基質及び前記ペプシン特異的基質が、互いに同種又は異種の標識物質により標識されている、請求項1又は2に記載の十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

【請求項4】

前記キモトリプシン特異的基質の分解物量及び前記ペプシン特異的基質の分解物量を、前記標識物質を指標として決定する、請求項3に記載の十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

20

【請求項5】

前記標識物質が蛍光物質である、請求項3又は4に記載の十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

【請求項6】

同一被検者の消化管のうちの2以上の異なる部位から採取された複数の十二指腸液試料について、それぞれ前記工程(a)～(b)を行い、前記工程(c)が、

(c')前記複数の十二指腸液試料のうち、前記キモトリプシン特異的基質の分解物量が多く、前記ペプシン特異的基質の分解物量が少ないものを、膵液由来成分の検出用試料として適していると評価する工程、

である、請求項1に記載の十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物から採取された十二指腸液試料について、膵液由来成分の検出に適しているかどうか、すなわち、当該十二指腸液試料を膵液由来成分の検出に供試することによって信頼性の高い結果を得られるかどうかを評価する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

膵液(膵管から排出される体液)は膵臓の状態を知るための重要な生体試料であり、細胞診、重炭酸塩測定、細菌検査、タンパク質や核酸等からなるマーカーの検査等の膵疾患の検査に用いられている。特に、膵液中に含まれる細胞や各種生体成分を解析することにより、早期発見が難しい上に予後が非常に悪いとされる膵癌の早期発見が期待できる。

40

【0003】

膵液は、一般的に、経内視鏡的に十二指腸乳頭部から膵臓の膵管にカテーテルを挿入して採取される。しかし、当該方法は、患者への侵襲性が高く、また医師の高度な手技の獲得が必要であるなど、問題がある。そこで、膵管から採取された膵液に代えて、十二指腸液(十二指腸内から採取される体液)を用いて膵疾患を検査する方法が報告されている(例えば、特許文献1参照)。膵液は膵臓から十二指腸へ排出されるため、十二指腸液中の膵液成分を検出することによって、膵疾患を検査し得る。十二指腸液は、採取工程にお

50

いて膵管へのアプローチが不要であり、内視鏡を十二指腸まで挿入し、その場で吸引するだけで採取可能である。すなわち、十二指腸液の採取は、膵管からの膵液採取に比べて、低侵襲かつより簡便な手技で実施することができる。

【0004】

十二指腸液には、膵臓から排出される膵液の他にも、肝臓で生成され胆嚢を経て排出される胆汁、十二指腸で分泌される粘液、胃から排出される胃液が含まれ得る。つまり、十二指腸液は、膵液、胆汁、十二指腸で分泌される粘液、及び胃液が混合された体液であり、各成分の含有量は様々である。このため、被検者から採取された十二指腸液中に、膵疾患を検査する上で最も重要な情報を持つと考えられる膵液が必ず入っているかどうかは不明である。仮に、同一被検者から複数分画採取した場合、膵液の分布に偏りがあると考えられ、採取した十二指腸液に必ず膵液が含まれているとは限らない。

10

【0005】

一方で、タンパク質等の生体成分は、分解や失活等を起こしやすい。このため、信頼性の高い結果を得るためには、生体試料の質を調べることが重要である。例えば特許文献2には、血清、血漿、全血等の生体試料中のペプチド又はタンパク質サンプルの変化や変動をモニターするために、プロテアーゼによる切断部位を備える標識されたペプチド又はタンパク質をスタンダードとし、当該スタンダードを生体試料に添加し、その経時的な濃度変化をモニタリングする方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0006】

【特許文献1】国際公開第2013/038981号

【特許文献2】特開2008-506373号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、動物から採取された十二指腸液試料について、当該十二指腸液試料が膵液由来成分の検出用試料として適しているか否かを評価する方法、及び当該方法を利用して、膵液由来成分の検出用試料として適した十二指腸液試料の採取を練習する方法に関する。

【課題を解決するための手段】

30

【0008】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、膵液含有量が多く、胃液含有量が少ない十二指腸液試料が膵液由来成分検出に適していること、十二指腸液試料の膵液含有量と胃液含有量の多寡は、それぞれ、キモトリプシンに特異的な基質とペプシンに特異的な基質に対する分解活性に基づいて判断できることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明に係る十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法は、下記[1]～[6]である。

[1] (a) 十二指腸液試料とキモトリプシン特異的な基質を混合し、前記十二指腸液試料による前記キモトリプシン特異的な基質の分解物量を測定する工程と、

40

(b) 前記十二指腸液試料とペプシン特異的な基質を混合し、前記十二指腸液試料による前記ペプシン特異的な基質の分解物量を測定する工程と、

(c) 前記十二指腸液試料の前記キモトリプシン特異的な基質の分解物量が所定の閾値よりも多く、かつ前記十二指腸液試料の前記ペプシン特異的な基質の分解物量が所定の閾値よりも少ない場合に、前記十二指腸液試料を膵液由来成分の検出用試料として適していると評価する工程と、

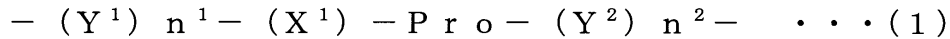
を有する、十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

[2] 前記キモトリプシン特異的な基質におけるキモトリプシンによる切断部位が、下記一般式(1)

【0010】

50

【化1】



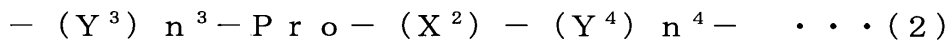
【0011】

[式(1)中、 Y^1 及び Y^2 はそれぞれ独立して、アミノ酸残基又は $-CH_2-NH-$ を表し、 X^1 はPhe、Trp、又はTyrを表し、 n^1 及び n^2 はそれぞれ独立して、1~10の整数を表す。]

で表される構造であり、前記ペプシン特異的基質におけるペプシンによる切断部位が、下記一般式(2)

【0012】

【化2】



【0013】

[式(2)中、 Y^3 及び Y^4 はそれぞれ独立して、アミノ酸残基又は $-CH_2-NH-$ を表し、 X^2 はPhe、Trp、又はTyrを表し、 n^3 及び n^4 はそれぞれ独立して、1~10の整数を表す。]

で表される構造である、前記[1]の十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

[3] 前記キモトリプシン特異的基質及び前記ペプシン特異的基質が、互いに同種又は異種の標識物質により標識されている、前記[1]又は[2]の十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

[4] 前記キモトリプシン特異的基質の分解物量及び前記ペプシン特異的基質の分解物量を、前記標識物質を指標として決定する、前記[3]の十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

[5] 前記標識物質が蛍光物質である、前記[3]又は[4]の十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

[6] 同一被検者の消化管のうちの2以上の異なる部位から採取された複数の十二指腸液試料について、それぞれ前記工程(a)~(b)を行い、前記工程(c)が、(c')前記複数の十二指腸液試料のうち、前記キモトリプシン特異的基質の分解物量が多く、前記ペプシン特異的基質の分解物量が少ないものを、腓液由来成分の検出用試料として適していると評価する工程、

である、前記[1]の十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法。

【発明の効果】

【0018】

本発明に係る十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法を検査に供される前の十二指腸液試料に対して行うことにより、適性が有り、信頼性の高い結果が期待できる試料を選定して腓液由来成分検出のための検査に供することができる。また、当該適性評価方法を腓液由来成分検出のための検査に供された後の十二指腸液試料に対して行うことにより、当該検査により得られた結果の信頼性を評価することができる。

また、本発明に係る十二指腸液試料採取の練習方法により、液体採取用カテーテル付内視鏡による、腓液由来成分検出用試料として適する十二指腸液試料の採取を練習することができる。

【発明を実施するための形態】

【0019】

<十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法>

本発明に係る十二指腸液試料の腓液由来成分検出用試料としての適性評価方法(以下、「本発明に係る適性評価方法」ということがある。)は、下記工程(a)~(c)を有する。

(a) 十二指腸液試料とキモトリプシン特異的基質を混合し、前記十二指腸液試料による

10

20

30

40

50

前記キモトリプシン特異的基質の分解活性を測定する工程と、

(b) 前記十二指腸液試料とペプシン特異的基質を混合し、前記十二指腸液試料による前記ペプシン特異的基質の分解活性を測定する工程と、

(c) 前記十二指腸液試料の前記キモトリプシン特異的基質の分解活性及び前記十二指腸液試料の前記ペプシン特異的基質の分解活性に基づき、前記十二指腸液試料が膵液由来成分の検出用試料として適しているか否かを評価する工程。

【0020】

膵液含有量が低い又は膵液を含まない十二指腸液試料を検査に供した場合には、仮に膵液中には目的の膵疾患マーカーが含まれていたとしても、検査で当該膵疾患マーカーは検出されず、偽陰性となる。また、十二指腸液試料に胃液が混入している場合、pHが酸性に偏ることや、胃液由来の各種プロテアーゼにより、当該十二指腸液試料の膵液由来成分が分解や変性、失活する場合がある。このため、胃液の混入量の多い十二指腸液試料を検査に供した場合に、膵液を含有する場合であっても、検査で偽陰性となる可能性が高い。つまり、十二指腸液試料を用いて膵液由来成分の検査を行う場合に信頼できる検査結果を得るためには、供試される十二指腸液試料中に膵液が含まれており、かつ胃液の混入量が少ないことが必要である。

10

【0021】

そこで、本発明に係る適性評価方法においては、動物から採取された十二指腸液試料について、膵液の含有量と胃液の含有量を指標として、当該十二指腸液試料が膵液由来成分の検出用試料として適しているか否かを評価する。膵液の含有量が多く、胃液の含有量が少ない十二指腸液試料は、膵液由来成分検出用試料としての適性(以下、単に「試料適性」ということがある。)が高く、膵液の含有量が少ない十二指腸液試料や胃液の含有量が多い十二指腸液試料は試料適性が低い、と評価される。

20

【0022】

本発明においては、十二指腸液試料中の膵液含有量と胃液含有量の多寡は、それぞれ、キモトリプシンに特異的な基質とペプシンに特異的な基質に対する分解活性に基づいて調べる。消化液には臓器特異性があり、膵液と胃液はそれぞれ様々な消化酵素を含んでいるが、膵液の主な消化酵素はキモトリプシン及びトリプシンであり、胃液の主な消化酵素はペプシンである。つまり、キモトリプシン特異的基質の分解活性が高い十二指腸液試料は、キモトリプシン含有量が高く、膵液含有量が高いと推定される。ペプシン特異的基質の分解活性が高い十二指腸液試料は、ペプシン含有量が高く、胃液含有量が高いと推定される。

30

【0023】

キモトリプシンは、セリンプロテアーゼの1種であり、pH8の時に最大の活性を示す。キモトリプシンは、ペプチド中のプロリン残基(Pro)の後に位置していないフェニルアラニン残基(Phe)、トリプトファン残基(Trp)、又はチロシン残基(Tyr)のC末端側を切断する。トリプシンは、セリンプロテアーゼの1種であり、pH5~6の時に最大の活性を示す。トリプシンは、ペプチド中のプロリン残基の後に位置していないアルギニン残基(Arg)又はリシン残基(Lys)のC末端を切断する。ペプシンは、酸性プロテアーゼであり、pH2の時に最大の活性を示す。ペプシンは、ペプチド中のプロリン残基の前に位置していないロイシン残基(Leu)、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、又はチロシン残基のN末端側を切断する。

40

【0024】

胃液は酸性であるため、pHが低い十二指腸液試料は胃液含有量が高いといえる。つまり、十二指腸液試料のpHは、胃液含有量の指標となり得る。ただし、十二指腸液試料には、緩衝作用を有する胆汁も含まれているため、十二指腸液試料のpHが低いことは、必ずしも胃液の混入がないことを意味しない。このように、十二指腸液試料のpHは、胃液の含有量の指標としては感度が低い上に、胆汁の含有量の影響も受ける。また、採取した十二指腸液試料を直ちに、緩衝液や保存液に混合する時には、pHは胃液混入の指標にならない。本発明においては、胃液含有量の指標としてペプシン特異的基質の分解活性

50

を用いるため、pHを指標とした場合よりもより高感度に胃液の混入の有無を調べることができる。

【0025】

本発明に係る適性評価方法のうち、工程(a)においては、評価対象である十二指腸液試料のキモトリプシン特異的基質の分解活性を測定する。キモトリプシン特異的基質の分解活性は、キモトリプシン特異的基質の分解物量に基づき決定される。すなわち、キモトリプシン特異的基質の分解物の量が多いほど、十二指腸液試料のキモトリプシン特異的基質の分解活性は高い。具体的には、十二指腸液試料にキモトリプシン特異的基質を混合し、所定期間インキュベートして酵素反応を行わせた後、当該キモトリプシン特異的基質の分解物の量を測定する。なお、当該工程において、十二指腸液試料に混合されるキモトリプシン特異的基質は、1種類のみであってもよく、2種類以上であってもよい。

10

【0026】

本発明に係る適性評価方法のうち、工程(b)においては、評価対象である十二指腸液試料のペプシン特異的基質の分解活性を測定する。ペプシン特異的基質の分解活性は、ペプシン特異的基質の分解物量に基づき決定される。すなわち、ペプシン特異的基質の分解物の量が多いほど、十二指腸液試料のペプシン特異的基質の分解活性は高い。具体的には、十二指腸液試料にペプシン特異的基質を混合し、所定期間インキュベートして酵素反応を行わせた後、当該ペプシン特異的基質の分解物の量を測定する。なお、当該工程において、十二指腸液試料に混合されるペプシン特異的基質は、1種類のみであってもよく、2種類以上であってもよい。

20

【0027】

本発明において用いられるキモトリプシン特異的基質は、キモトリプシンにより分解されるが、胃液に含まれる消化酵素によっては分解されない物質であれば特に限定されるものではなく、キモトリプシンのみによって分解される物質であることが好ましいが、キモトリプシンに加えて胃液に含まれていない酵素によっても分解される物質であってもよい。同様に、本発明において用いられるペプシン特異的基質は、ペプシンにより分解されるが、膵液に含まれる消化酵素によっては分解されない物質であれば特に限定されるものではなく、ペプシンのみによって分解される物質であることが好ましいが、ペプシンに加えて膵液に含まれていない酵素によっても分解される物質であってもよい。

【0028】

本発明において用いられるキモトリプシン特異的基質としては、キモトリプシンにより認識されて切断される部位(キモトリプシン認識部位)が、下記一般式(1)で表される構造である物質が好ましい。キモトリプシン認識部位が下記一般式(1)で表される構造であることにより、ペプシンをはじめとする胃液に含まれる消化酵素によっては切断されず、キモトリプシンによって特異的に切断される。下記一般式(1)中、 Y^1 及び Y^2 はそれぞれ独立して、アミノ酸残基又は $-CH_2-NH-$ を表し、 X^1 はPhe、Trp、又はTyrを表し、 n^1 及び n^2 はそれぞれ独立して、1~10の整数を表す。

30

【0029】

【化5】



40

【0030】

本発明において用いられるキモトリプシン特異的基質としては、キモトリプシン認識部位のみからなる物質であってもよく、キモトリプシン認識部位以外の領域を含む物質であってもよい。キモトリプシン特異的基質中、キモトリプシン認識部位以外の領域としては、ペプシンをはじめとする胃液に含まれる消化酵素によっては分解されない構造からなることが必要である。例えば、キモトリプシン認識部位が前記一般式(1)で表される構造の場合、キモトリプシン特異的基質としては、前記一般式(1)で表される構造の両端が水素原子に結合している物質であってもよく、前記一般式(1)で表される構造の両端又はいずれか一方が、水素原子以外であっても胃液に含まれる消化酵素によっては分解されな

50

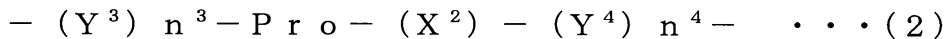
い構造と結合している物質であってもよい。

【0031】

本発明において用いられるペプシン特異的基質としては、ペプシンにより認識されて切断される部位（ペプシン認識部位）が、下記一般式（2）で表される構造である物質が好ましい。ペプシン認識部位が下記一般式（2）で表される構造であることにより、キモトリプシンをはじめとする膵液に含まれる消化酵素によっては切断されず、ペプシンによって特異的に切断される。下記一般式（2）中、 Y^3 及び Y^4 はそれぞれ独立して、アミノ酸残基又は $-CH_2-NH-$ を表し、 X^2 は Phe、Trp、又は Tyr を表し、 n^3 及び n^4 はそれぞれ独立して、1～10の整数を表す。

【0032】

【化6】



【0033】

一般式（1）中、 n^1 及び n^2 は、それぞれ独立して、1～5の整数であることが好ましく、1～3の整数であることがより好ましい。一般式（2）中、 n^3 及び n^4 は、それぞれ独立して、1～5の整数であることが好ましく、1～3の整数であることがより好ましい。

【0034】

一般式（1）中の Y^1 及び Y^2 並びに一般式（2）中の Y^3 及び Y^4 が、アミノ酸残基の場合、当該アミノ酸残基としては特に限定されるものではなく、動物の遺伝子にコードされている20種のいわゆる天然型のアミノ酸残基（プロリンを含む。）であってもよく、非天然型のアミノ酸残基であってもよい。また、光学異性体を有するアミノ酸残基の場合、D体であってもよく、L体であってもよい。天然型のアミノ酸残基としては、一般式（1）及び一般式（2）で表される構造である物質が水性溶媒に対して十分な溶解度を有するように、側鎖が極性のアミノ酸残基であることが好ましく、中でも、リジン残基、ヒスチジン残基、アルギニン残基等の塩基性アミノ酸残基であることがより好ましく、構造安定性の点からリジン残基又はアルギニン残基であることがさらに好ましい。非天然型のアミノ酸残基としては、イプシロン-アミノカプロン酸（ $-Acp$ ）、ヒドロキシリジン、ピロリジン、アセチルリジン、エチルアラニン等が挙げられ、 $-Acp$ が好ましい。なお、 n^1 が2以上の整数の場合、一分子中に複数存在する Y^1 は、全て同種であってもよく、異種であってもよい。 n^2 、 n^3 、及び n^4 が2以上の整数の場合も同様に、一分子中に複数存在する Y^2 、 Y^3 、及び Y^4 は、全て同種であってもよく、異種であってもよい。

【0035】

一般式（1）で表される構造である物質としては、 Y^1 が $-Acp$ であり、 Y^2 が塩基性アミノ酸残基であり、 n^1 及び n^2 がそれぞれ独立して1～3の整数である物質（ただし、 n^2 が2又は3の場合、複数ある Y^2 がいずれも同種のアミノ酸残基であってもよく、互いに異種のアミノ酸残基であってもよい。）であることが好ましい。同様に、一般式（2）で表される構造である物質としては、 Y^3 が $-Acp$ であり、 Y^4 が塩基性アミノ酸残基であり、 n^3 及び n^4 がそれぞれ独立して1～3の整数である物質（ただし、 n^4 が2又は3の場合、複数ある Y^4 がいずれも同種のアミノ酸残基であってもよく、互いに異種のアミノ酸残基であってもよい。）であることが好ましい。

【0036】

本発明において用いられるペプシン特異的基質としては、ペプシン認識部位のみからなる物質であってもよく、ペプシン認識部位以外の領域を含む物質であってもよい。ペプシン特異的基質中、ペプシン認識部位以外の領域としては、キモトリプシンをはじめとする膵液に含まれる消化酵素によっては分解されない構造からなることが必要である。例えば、ペプシン認識部位が前記一般式（2）で表される構造の場合、ペプシン特異的基質としては、前記一般式（2）で表される構造の両端が水素原子に結合している物質であっても

10

20

30

40

50

よく、前記一般式(2)で表される構造の両端又はいずれか一方が、水素原子以外であって唾液に含まれる消化酵素によっては分解されない構造と結合している物質であってもよい。

【0037】

本発明において用いられるキモトリプシン特異的基質は、キモトリプシンにより分解された分解物と未分解のものとを区別して検出できるように、1種又は2種以上の標識物質により標識されていることが好ましい。同様に、本発明において用いられるペプシン特異的基質は、ペプシンにより分解された分解物と未分解のものとを区別して検出できるように、1種又は2種以上の標識物質により標識されていることが好ましい。当該標識物質としては、ペプチド等の生体分子の標識に一般的に用いられている標識物質の中から適宜選択して用いることができる。キモトリプシン特異的基質を標識する標識物質とペプシン特異的基質を標識する標識物質は、同種であってもよく、異種であってもよい。このような標識物質としては、例えば、発光物質、磁性粒子、放射性同位体、非放射性同位体、同重体、核酸、ペプチドタグ、低分子化合物等が挙げられる。発光物質としては、典型的には蛍光物質であるが、りん光、化学発光、生物発光、光散乱等により光を発する物質であってもよい。高感度であり、かつ安全性が高い点から、少なくとも蛍光物質を標識物質として用いることが好ましい。

10

【0038】

キモトリプシン特異的基質等の標識物質として用いられる蛍光物質としては、特定の波長の光を放射することにより蛍光を放出する物質であれば特に限定されるものではなく、タンパク質や核酸等の標識に通常使用されている蛍光物質や量子ドット等の中から適宜選択して用いることができる。具体的には、蛍光物質としては、FITC(フルオレセインイソチオシアナート)、フルオレセイン、ローダミン(Rhodamine)、TAMRA、NBD、TMR(テトラメチルローダミン)、Nma(2-(N-メチルアミノ)ベンゾイル[ex 340nm/em 440nm])、CAL Fluor(登録商標)シリーズ(Biosearch Technologies社製)、Cy(登録商標)シリーズ(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)、HiLyte Fluor(登録商標)シリーズ(AnaSpec社製)、Alexa Fluor(登録商標)シリーズ(インビトロジェン社製)、ATTO(登録商標)dyeシリーズ(ATTO-TEC社製)、Dnp(2,4-dinitrophenol)、BHQ2C等が挙げられる。量子ドットとしては、CdSe等が挙げられる。

20

30

【0039】

本発明において用いられるキモトリプシン特異的基質及びペプシン特異的基質(以下、両者をまとめて「本発明において用いられるプロテアーゼ基質」ということがある。)の分解物量は、標識物質を指標として決定することができる。当該分解物量の測定方法は、各基質を標識する標識物質に応じて、様々な方法を用いることができる。測定方法としては、例えば、蛍光強度測定法、分光光度計を用いて特定の波長の光に対する透過光量の変化を測定する方法、発光測定法、放射活性測定法、顕微鏡法、免疫学的方法、分子生物学的方法、質量分析、SELDI(Surface-enhanced laser desorption/ionization)、核磁気共鳴、プラズモン共鳴等が挙げられる。

40

【0040】

例えば、分解前のプロテアーゼ基質と分解後の分解物の大きさが十分に相違する場合には、物の大きさにより区別して検出する方法を利用して、分解されたプロテアーゼ基質の量を測定する。当該検出方法としては、例えば、インキュベート後の反応溶液をSDS-PAGEにかけて未分解のプロテアーゼ基質から分離した分解物は、CBB染色、シルバーステイン染色等により検出することができる。分解物の量は、染色強度により求められる。また、インキュベート後の反応溶液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけて未分解のプロテアーゼ基質から分離した分解物のクロマトグラフ上のピークから、分解物の量を求めることもできる。

【0041】

50

また、例えば、ドナーである蛍光物質とアクセプターとなる消光物質とをプロテアーゼ認識部位を挟むようにして結合させたものをプロテアーゼ基質とし、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) を利用することにより、プロテアーゼ基質の分解物を、未分解のプロテアーゼ基質と区別して検出することができる。この場合、未分解のプロテアーゼ基質では、FRETにより蛍光をほぼ生じないが、プロテアーゼによりプロテアーゼ認識部位で切断されると、蛍光物質と消光物質の距離が開くことから、FRETが生じなくなり、蛍光物質からの蛍光が強く検出される。すなわち、分解されたプロテアーゼ基質の量は、インキュベート後の反応溶液中の蛍光を発している蛍光物質の量により表される。

【0042】

また、固相担体又は固相担体と直接若しくは間接的に結合可能な物質（以下、「リンカー物質」という。）と蛍光物質とをプロテアーゼ認識部位を挟むようにして結合させたものをプロテアーゼ基質とし、固相担体を用いた固液分離処理を利用して、プロテアーゼ基質の分解物を、未分解のプロテアーゼ基質と区別して検出することができる。未分解のプロテアーゼ基質由来の蛍光物質は固相担体と直接又は間接的に結合するが、プロテアーゼにより分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質は、固相担体から遊離する。このため、プロテアーゼ基質と十二指腸液試料を混合した混合物（反応液）をインキュベートした後、固液分離処理を行うと、未分解のプロテアーゼ基質由来の蛍光物質は固相担体とともに分離され、液相には分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質が回収される。つまり、プロテアーゼ基質の分解物の量は、当該液相中の蛍光物質の量により表される。プロテアーゼ基質がリンカー物質を介して固相担体に結合する場合、固相担体は、プロテアーゼ基質と共に十二指腸液試料に添加してインキュベートしてもよく、プロテアーゼ基質と十二指腸液試料をインキュベートした後、インキュベート後の反応溶液を固相担体に接触させてもよい。

【0043】

当該固相担体としては、プロテアーゼ認識部位又はリンカー物質と直接又は間接的に結合する部位を備えている固体であれば、その形状、材質等は特に限定されるものではない。例えば、ビーズ等の水に懸濁可能であり、かつ一般的な固液分離処理によって液体と分離可能な粒子であってもよく、メンブレンであってもよく、容器やチップ基板等であってもよい。固相担体としては具体的には、例えば、磁気ビーズ、シリカビーズ、アガロースゲルビーズ、ポリアクリルアミド樹脂ビーズ、ラテックスビーズ、ポリスチレンビーズ等のプラスチックビーズ、セラミックビーズ、ジルコニアビーズ、シリカメンブレン、シリカフィルター、プラスチックプレート等が挙げられる。

【0044】

当該リンカー物質としては、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、グルタチオン、Dnp、ジゴキシゲニン、ジゴキシン、2以上の糖からなる糖鎖、Hisタグ、Flagタグ、Mycタグ等の4以上のアミノ酸からなるポリペプチド、オーキシン、ジベレリン、ステロイド、タンパク質、親水性有機化合物、及び、それらの類縁体等が挙げられる。例えば、リンカー物質がビオチンの場合には、アビジン又はストレプトアビジンが表面に結合しているビーズやフィルターを固相担体として用いることができる。同様に、リンカー物質がグルタチオン、ジゴキシゲニン、ジゴキシン、Hisタグ、Flagタグ、Mycタグ等の場合には、これらに対する抗体が表面に結合しているビーズやフィルターを固相担体として用いることができる。

【0045】

固液分離処理としては、溶液中の固相担体を液体成分とは分離して回収可能な方法であれば、特に限定されるものではなく、固液分離処理に用いられる公知の処理の中から適宜選択して用いることができる。例えば、固相担体がビーズ等の粒子の場合、固相担体を含む懸濁液に対して静置したり、遠心分離処理を行うことにより、固相担体を沈殿させ、上清を除去してもよく、当該溶液を濾紙又は濾過フィルターを用いて濾過し、濾紙等の表面に残留した固相担体を回収してもよい。また、固相担体が磁気ビーズである場合には、当

10

20

30

40

50

該溶液が入られている容器に磁石を接近させ、該容器の該磁石に最も近接する面に固相担体を収束させた後、上清を除去してもよい。なお、固相担体がメンブレンやフィルターの場合、インキュベート後の反応溶液を当該固相担体に透過させることにより、当該反応溶液から、未分解のプロテアーゼ基質を分離除去することができる。

【0046】

分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質の量は、一般的な蛍光測定法により測定することができる。例えば、溶液中の全蛍光分子から発される蛍光強度を測定する方法であってもよく、一分子ごとに蛍光強度を測定する方法であってもよい。

【0047】

溶液の蛍光強度は、蛍光プレートリーダー等の蛍光分光光度計等を用いて常法により測定することができる。溶液の蛍光強度は、溶液中の蛍光物質の量に依存する。そこで、例えば、予め検出対象である蛍光物質の濃度と蛍光強度との関係を示す検量線を作成しておくことにより、溶液中の蛍光物質の量、すなわち、分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質の量を定量することができる。

【0048】

試料溶液中の一分子ごとに蛍光強度を測定する方法としては、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) (例えば、特開2005-098876号公報参照。)、蛍光強度分布解析法 (Fluorescence Intensity Distribution Analysis, FIDA) (例えば、特許第4023523号公報参照。)、走査分子計数法 (Scanning Single-Molecule Counting, SSMC) (例えば、特許05250152号公報参照。)が挙げられる。その他、特表2011-508219号公報に記載されている単一分子検出走査分析器や特開2012-73032号公報で開示されている蛍光1粒子検出装置等を用いて測定してもよい。本発明においては、より微量の試料から高感度に蛍光物質を定量的に検出できることから、分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質は、SSMC法により測定することが好ましい。

【0049】

例えば、FCSにより、共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度の揺らぎを検出した後、統計解析を行うことによって、溶液中の分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質の分子数を算出することができる。

また、FIDAにより、共焦点光学系における焦点領域に存在している分子の蛍光強度の揺らぎを検出した後、統計解析を行うことによって、溶液中の分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質の分子数を算出することができる。

また、SSMCにより、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて、溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動させながら、当該光検出領域からの蛍光を検出することにより、溶液中に遊離している分解されたプロテアーゼ基質由来の蛍光物質の分子数を算出することができる。

なお、FCSやFIDA、SSMCは、例えば、MF20(オリンパス社製)等の公知の一分子蛍光分析システム等を用いて、常法により行うことができる。

【0050】

プロテアーゼ基質由来の蛍光物質の量を、蛍光シグナルを利用して測定する場合、測定された蛍光シグナルをそのまま当該蛍光物質の量としてもよいが、測定バックグラウンドレベルが無視できない場合には、バックグラウンドを差し引いたものを、当該蛍光物質の量とすることが好ましい。

【0051】

工程(a)と工程(b)は、工程(c)の前に行われていればよく、どちらを先に行ってもよく、同時に行ってもよい。また、工程(a)においてキモトリプシン特異的基質の分解活性を調べる十二指腸液試料と工程(b)においてペプシン特異的基質の分解活性を調べる十二指腸液試料は、同じであればよい。たとえば、一の十二指腸液試料の一部を分注したものに対して工程(a)を行い、当該十二指腸液試料の別の一部を分注したものに

10

20

30

40

50

対して工程 (b) を行ってもよく、工程 (a) においてキモトリプシン特異的基質の分解活性を調べた後の反応液にペプシン特異的基質を添加して工程 (b) を行ってもよく、工程 (b) においてペプシン特異的基質の分解活性を調べた後の反応液にキモトリプシン特異的基質を添加して工程 (a) を行ってもよい。また、一の十二指腸液試料に、キモトリプシン特異的基質とペプシン特異的基質を添加して、工程 (a) と工程 (b) における消化反応を同時に行い、反応後 (反応液のインキュベート後) に、キモトリプシン特異的基質の分解物量とペプシン特異的基質の分解物量を順次測定してもよい。

【 0 0 5 2 】

キモトリプシン特異的基質とペプシン特異的基質が蛍光物質により標識されており、キモトリプシン特異的基質の分解物量とペプシン特異的基質の分解物量を、それぞれ各プロテアーゼ基質を標識していた蛍光物質に基づいて決定する場合には、両者を標識する蛍光物質は、互いに蛍光特性が異なる。ここで、蛍光特性が異なるとは、FITCとローダミンのように、励起光照射により発される蛍光の波長が、区別して検出し得るほど異なることを意味する。

10

【 0 0 5 3 】

工程 (a) 及び (b) において、十二指腸液試料とプロテアーゼ基質を混合した混合物 (反応液) をインキュベートする際、当該反応液には、水又は各種バッファーを混合してもよい。水又は緩衝液により、当該反応液の濃さや pH を調整することができる。当該バッファーとしては、当該技術分野において一般的に用いられているバッファーの中から、適宜選択して用いることができる。当該バッファーとして、例えば、PBS (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7 . 4) 等のリン酸バッファーやトリスバッファー、HEPESバッファー、Hunksバッファー等が挙げられる。

20

【 0 0 5 4 】

工程 (a) においては、当該反応液には、キモトリプシンの至適 pH 付近となるように、pH 7 ~ 9 のバッファーを混合することが好ましい。また、工程 (b) においては、当該反応液には、ペプシンの至適 pH 付近となるように、pH 1 ~ 4 のバッファーを混合することが好ましい。

【 0 0 5 5 】

さらに、工程 (a) 及び (b) における十二指腸液試料とプロテアーゼ基質を混合した反応液には、キモトリプシンやペプシンによる消化反応を阻害しない限り、その他の物質を混合してもよい。当該他の物質としては、界面活性剤、ヌクレアーゼ阻害剤等が挙げられる。

30

【 0 0 5 6 】

工程 (a) 及び (b) において、十二指腸液試料とプロテアーゼ基質を混合した反応液をインキュベートする時間は、プロテアーゼ反応が起こるために十分な時間であれば特に限定されるものではなく、反応液の pH や量、インキュベート温度等を考慮して適宜調整できる。例えば、当該反応液を 5 分間 ~ 2 時間インキュベートすることにより、キモトリプシン又はペプシンによる酵素反応を行うことができる。また、当該インキュベートの温度は、プロテアーゼ反応が可能な温度であればよく、室温 (1 ~ 3 0) であってもよく、動物の体温付近 (例えば、3 0 ~ 3 8) であってもよい。また、当該インキュベートは、恒温条件下で行ってもよく、温度制御をせずに行ってもよい。

40

【 0 0 5 7 】

本発明に係る適性評価方法を、複数の十二指腸液試料に対して行う場合、又は、独立して本発明に係る適性評価方法を行って評価した又は評価する別の十二指腸液試料の評価結果と比較する場合、測定試料間のばらつきをふせげることから、インキュベートの反応液の組成、時間及び温度は、測定試料間で同一の条件とすることが好ましい。

【 0 0 5 8 】

工程 (a) 及び工程 (b) の後、工程 (c) として、測定に供された十二指腸液試料の試料適性を評価する。キモトリプシン特異的基質の分解活性が高く、ペプシン特異的基質の分解活性が低い十二指腸液試料は、試料適性が高いと評価する。すなわち、キモトリプ

50

シン特異的基質の分解物量が多く、かつペプシン特異的基質の分解物量が測定限界値以下の十二指腸液試料が最も試料適性が高い。また、キモトリプシン特異的基質の分解活性が低く、ペプシン特異的基質の分解活性が高い十二指腸液試料は、試料適性が低いと評価する。キモトリプシン特異的基質の分解活性が同程度の2以上の十二指腸液試料は、ペプシン特異的基質の分解活性が低いもののほうが試料適性は高いと評価する。つまり、キモトリプシン特異的基質の分解活性が高いが、ペプシン特異的基質の分解活性も高い十二指腸液試料は、試料適性はあるものの、キモトリプシン特異的基質の分解活性が高く、ペプシン特異的基質の分解活性が低い十二指腸液試料よりも、試料適性は低いと評価される。キモトリプシン特異的基質の分解活性が低く、ペプシン特異的基質の分解活性も低い十二指腸液試料は、試料適性は低い、キモトリプシン特異的基質の分解活性が低く、ペプシン特異的基質の分解活性は高い十二指腸液試料よりは、試料適性は高いと評価される。

10

【0059】

工程(a)を同じ条件で行った2以上の十二指腸液試料のキモトリプシン特異的基質の分解活性の高低は、キモトリプシン特異的基質の分解物量の測定値を比較することにより決定することができる。同様に、工程(b)を同じ条件で行った2以上の十二指腸液試料のペプシン特異的基質の分解活性の高低は、ペプシン特異的基質の分解物量の測定値を比較することにより決定することができる。

【0060】

その他、予め閾値を決定しておき、キモトリプシン特異的基質の分解物量が、所定の閾値よりも高い十二指腸液試料は試料適性が高く、所定の閾値よりも低い十二指腸液試料は試料適性が低い、と評価できる。また、ペプシン特異的基質の分解物量が、所定の閾値よりも低い十二指腸液試料は試料適性が高く、所定の閾値よりも高い十二指腸液試料は試料適性が低い、と評価できる。

20

【0061】

本発明に係る適性評価方法においては、十二指腸液試料のキモトリプシン特異的基質の分解活性は、十二指腸液試料のキモトリプシン含有量に基づき決定することができ、十二指腸液試料のペプシン特異的基質の分解活性は、十二指腸液試料のペプシン含有量に基づき決定することもできる。十二指腸液試料のキモトリプシン含有量及びペプシン含有量は、キモトリプシンやペプシンに対する特異的な抗体を用いた抗原抗体反応を利用して測定することができ、ELISA法を利用した市販の測定キットを用いることもできる。例えば、キモトリプシン濃度を測定するためのキットとしては「トリプシン(E)[S]」(協和メディックス社製)があり、ペプシン濃度を測定するためのキットとしては、「Human Pepsin, PG ELISA Kit」(CUSABIO社製)がある。

30

【0062】

本発明に係る適性評価方法において評価の対象となる十二指腸液試料は、十二指腸の腸管内のどこから採取された十二指腸液であってもよいが、十二指腸の第二ポーション又は第三ポーションに存在する十二指腸液であることが好ましい。十二指腸の第一ポーションは胃の幽門部から直接つながる部位であり、胃液の混入の可能性があること、また、採取のための内視鏡の固定が比較的難しく、採取が難しい場合があること等のためである。

【0063】

なお、十二指腸液は、常法により採取することができる。例えば、十二指腸液を内視鏡に設けた液体採取用カテーテルに接続したシリンジや真空ポンプなどの吸引手段にて採取することができる。具体的には、内視鏡を口腔から十二指腸まで挿入し、鉗子チャンネルを挿通して挿入したカテーテルを用いて、十二指腸の第二・第三ポーションに存在する十二指腸液を吸引し採取する。例えば、いわゆる胃カメラとしての胃・十二指腸の内視鏡検査(上部内視鏡検査)のついでに、十二指腸の腸管内に貯留している十二指腸液を採取してもよい。

40

【0064】

十二指腸液の組成は、個体差が大きく、また、同一被験者であっても、日内変動と日差変動が大きい。さらに、十二指腸中の採取場所によっても十二指腸液の組成は異なる。こ

50

のため、同一被験者から同日に採取された十二指腸液試料同士であっても、十二指腸液試料を採取する部位や採取するタイミングの違いにより、膵液含有量と胃液含有量は様々である。そこで、同一被験者の十二指腸の様々な部位から独立して採取した複数の十二指腸液試料に対して、それぞれ本発明に係る適性評価方法の工程（a）及び（b）を行い、測定された各プロテアーゼ基質の分解活性を比較し、最も試料適性の高い試料を、実際に膵液由来成分の検査に供することが好ましい。試料適性の高い十二指腸液試料を選択して膵液由来成分の検査に供することにより、偽陰性による検査精度の低下を抑制し、検査の効率を高めることができる。

【0065】

なお、本発明及び本願明細書において、膵液由来成分は、膵液中に含まれているタンパク質、核酸、脂質、細胞等の各種生体分子を意味する。本発明に係る適性評価方法は、膵疾患マーカーの検査に供される十二指腸液試料の試料適性の評価に用いられることが好ましい。膵疾患マーカーは、膵疾患の非罹患者と比較して、膵疾患に罹患している患者において、膵液中の濃度が有意に高くなる生体分子である。なお、膵疾患の非罹患者は、健常人に限らず、膵疾患以外の疾患の罹患者をも含む。また、膵疾患としては、例えば、膵癌、IPMN（膵管内乳頭粘液性腫瘍）、MCN（粘液性嚢胞腫瘍）、SCN（漿液性嚢胞腫瘍）、NET（膵内分泌腫瘍）、慢性膵炎（CP）、急性膵炎等が挙げられる。

【0066】

< 十二指腸液試料採取の練習方法 >

十二指腸液試料は、十二指腸のうち、胃の幽門部に近い部位で採取されたものは胃液の混入量が高く、乳頭部に近い部位で採取されたものは膵液含有量が高い傾向にある。つまり、十二指腸液試料の試料適性は、採取部位の影響を大きく受ける。本発明に係る十二指腸液試料採取の練習方法（以下、「本発明に係る採取練習方法」ということがある。）は、消化管模擬装置を用い、試料適性の高い模擬十二指腸液試料が採取できるよう練習する方法である。

【0067】

本発明に係る採取練習方法において用いられる消化管模擬装置は、動物の口から十二指腸までの消化管の構造を模したものであり、模擬口、模擬食道、模擬胃液が投入される模擬胃、模擬膵液、模擬胆汁が模擬乳頭部を介して投入される模擬十二指腸を少なくとも備えている。模擬十二指腸内にある模擬十二指腸には、模擬胃から徐々に漏れてきた模擬胃液と、模擬乳頭部から投入される模擬膵液、模擬胆汁が含まれる。模擬十二指腸液内の模擬胃液の含有量は、模擬胃から遠くなるほど低くなり、模擬膵液の含有量は、模擬乳頭部から遠くなるほど低くなる。模擬胃液は、ペプシンを含有するpH1～2の溶液であり、模擬膵液は、キモトリプシンを含有するpH7～9の溶液である。模擬胆汁は、ビリルビン含有するpH8～9の溶液である。

【0068】

本発明に係る採取練習方法において用いられる消化管模擬装置は、動物の消化管の構造が模されており、模擬十二指腸内に、模擬胃からの距離が長くなるほどペプシン濃度が低くなり、模擬乳頭部からの距離が長くなるほどキモトリプシン濃度が低くなる液体が充填されているものであればよい。例えば、本発明に係る採取練習方法においては、内視鏡操作の練習に用いられる消化管模擬装置を適宜改変して用いることもできる。

【0069】

本発明に係る採取練習方法においては、下記工程（1）及び（2）を1回又は2回以上繰り返して行う。

（1） 前記消化管模擬装置の前記模擬口から前記模擬十二指腸まで液体採取用カテーテル付内視鏡を挿入し、前記模擬十二指腸の1又は2以上の異なる部位から模擬十二指腸液試料を採取する工程と、

（2） 前記（1）で採取された各模擬十二指腸液試料について、それぞれ、キモトリプシン特異的基質の分解活性及びペプシン特異的基質の分解活性を測定する工程。

【0070】

10

20

30

40

50

工程(2)における各模擬十二指腸液試料のキモトリプシン特異的基質の分解活性及びペプシン特異的基質の分解活性の測定は、本発明に係る適性評価方法における工程(a)及び(b)により行うことができる。本発明に係る採取練習方法において用いられるキモトリプシン特異的基質としては、前記一般式(1)で表される構造のキモトリプシン認識部位を有するものが好ましく、前記一般式(1)で表される構造のキモトリプシン認識部位に1又は2の標識物質が結合しているものがより好ましく、前記一般式(1)で表される構造のキモトリプシン認識部位に1又は2の蛍光物質が結合しているものがさらに好ましい。本発明に係る採取練習方法において用いられるペプシン特異的基質としては、前記一般式(2)で表される構造のペプシン認識部位を有するものが好ましく、前記一般式(2)で表される構造のペプシン認識部位に1又は2の標識物質が結合しているものがより好ましく、前記一般式(2)で表される構造のペプシン認識部位に1又は2の蛍光物質が結合しているものがさらに好ましい。

10

【0071】

本発明に係る採取練習方法においては、下記工程(1)において、キモトリプシン特異的基質の分解活性が所定の閾値よりも高くかつペプシン特異的基質の分解活性が所定の閾値よりも低い模擬十二指腸液試料を採取できるように、下記工程(1)及び(2)を繰り返して練習する。当該閾値は、消化管模擬装置のうち、乳頭部付近から採取された模擬十二指腸液のキモトリプシン特異的基質の分解活性及びペプシン特異的基質の分解活性に基づいて決定することができる。

【0072】

20

本発明に係る採取練習方法においては消化管模擬装置を用いるが、生きている動物を用いることによっても、試料適性の高い模擬十二指腸液試料が採取できるよう練習することができる。当該動物は、液体採取用カテーテル付内視鏡を挿入して十二指腸液試料を採取する動物であればよく、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ等が挙げられる。

【0073】

生きている動物を用いる場合には、まず、被検動物の口から上部内視鏡を挿入し、十二指腸到達後、液体採取用カテーテルを鉗子口から挿入し、十二指腸内の胃の幽門部付近から乳頭部までの複数の箇所において十二指腸液試料を採取し、採取された十二指腸液試料のキモトリプシン特異的基質の分解活性及びペプシン特異的基質の分解活性を測定する。採取された十二指腸液試料のうち、キモトリプシン特異的基質の分解活性が最も高く、かつペプシン特異的基質の分解活性が低い十二指腸液試料を試料適性が高い試料として決定する。次いで、当該被検動物に対して内視鏡を挿入し、十二指腸到達後、液体採取用カテーテルを鉗子口から挿入し、試料適性が高い十二指腸液試料が採取できるよう、繰り返し練習する。練習は、本発明に係る採取練習方法における工程(1)及び(2)と同様にし行うことができる。

30

【実施例】

【0074】

次に実施例等を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0075】

40

[実施例1]

一の被験者の十二指腸のうち様々な部位から独立して採取された10の十二指腸液試料(検体A~J)について、本発明に係る適性評価方法により、試料適性を評価した。

【0076】

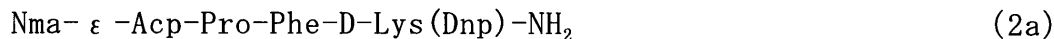
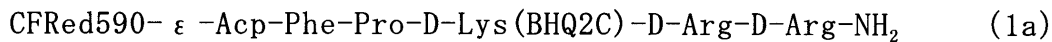
キモトリプシン特異的基質としては、前記一般式(1)で表される構造によって蛍光物質CFRed590(CAL Fluor Red 590 [ex 569nm/em 591nm])と消光物質BHQ2Cが連結された化合物を用い、ペプシン特異的基質としては、前記一般式(2)で表される構造によって蛍光物質Nmaと消光物質Dnpが連結された化合物を用いた。具体的には、キモトリプシン特異的基質として一般式(1a)で表される化合物を用い、ペプシン特異的基質として一般式(2a)で表される化合物を

50

用いた。

【 0 0 7 7 】

【 化 7 】



【 0 0 7 8 】

採取された各十二指腸液試料について、キモトリプシン特異的基質とペプシン特異的基質の分解活性を調べた。具体的には、96ウェルプレートの各ウェルに、50 μ Lの十二指腸液試料にキモトリプシン特異的基質とペプシン特異的基質を、キモトリプシン特異的基質を最終濃度が10 μ Mになるように、ペプシン特異的基質を最終濃度が50 μ Mになるように混合し、トリスバッファー(10mM Tris-HCl、pH=8.5)又は塩酸(10mM HCl、pH=2.0)で最終容量100 μ Lの反応液を調製した。また、十二指腸液試料に代えて1mg/mL パンクレアチン(和光純薬社製)溶液を用いたものをキモトリプシン特異的基質に対するポジティブコントロールとし、十二指腸液試料に代えて人工胃液(日本薬局方の溶出試験法第I液:1L当たり、2gの塩化ナトリウムと7mLの塩酸とを含有する、pH1.2の水溶液)を用いたものをペプシン特異的基質に対するポジティブコントロールとし、十二指腸液試料を添加せずにトリスバッファーで最終容量100 μ Lに調整したものをキモトリプシン特異的基質に対するネガティブコントロールとし、十二指腸液試料を添加せずに塩酸で最終容量100 μ Lに調整したものをペプシン特異的基質に対するネガティブコントロールとした。

【 0 0 7 9 】

当該96ウェルプレートを37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた後、プレートリーダーに設置し、各ウェル内の反応液について、励起波長が569nm、蛍光波長が591nmの蛍光強度[Ex/Em=569/591]と、励起波長が340nm、蛍光波長が440nmの蛍光強度[Ex/Em=340/440]を測定した。

【 0 0 8 0 】

各十二指腸液試料の蛍光強度の測定結果を表1に示す。蛍光強度(Ex/Em=569/591)はキモトリプシン特異的基質の分解物量を表し、蛍光強度(Ex/Em=340/440)はペプシン特異的基質の分解物量を表す。表1中、「NC」はネガティブコントロールを、「PC」はポジティブコントロールを、それぞれ示す。また、「蛍光強度[Ex/Em=569/591]」はキモトリプシン特異的基質の分解により生じた蛍光の強度を、「蛍光強度[Ex/Em=340/440]」はペプシン特異的基質の分解により生じた蛍光の強度を、それぞれ示す。

【 0 0 8 1 】

10

20

30

【表 1】

十二指腸液試料	蛍光強度 [Ex/Em=569/591]	蛍光強度 [Ex/Em=340/440]
検体 A	142.2	60.26
検体 B	132.4	41.98
検体 C	152.6	39.43
検体 D	173.8	46.09
検体 E	140.6	29.86
検体 F	160.1	21
検体 G	156.8	21.9
検体 H	134.71	32.5
検体 I	173.55	83.28
検体 J	98.14	127.23
NC	15.81	1.429
PC	804.4	218.5

10

20

【0082】

この結果、10種の検体全てにおいて、キモトリプシン活性とペプシン活性が確認された。蛍光強度 [Ex/Em=569/591] は、検体 J のみ 100 未満であり、蛍光強度 [Ex/Em=340/440] は、検体 A、I、及び J のみ 50 超であった。つまり、キモトリプシン活性は、検体 J は低かったが、その他の検体は高かった。また、ペプシン活性は、検体 A、I、及び J が高く、その他の検体は低かった。各検体のキモトリプシン活性及びペプシン活性の高低と、これに基づく十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価の結果について、表 2 に示す。表 2 中、「 Δ 」は十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての試料適性が高いことを、「 \times 」は試料適性がやや高いことを、「 \circ 」は試料適性が低いことを、それぞれ示す。これらの結果から、検体 B、C、D、E、F、G、及び H が、十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての試料適性が高いと評価された。

30

【0083】

【表 2】

		キモトリプシン活性	
		高い	低い
ペプシン活性	高い	Δ 検体 A, I	\times 検体 J
	低い	\circ 検体 B, C, D, E, F, G, H	Δ

40

【産業上の利用可能性】

50

【 0 0 8 4 】

本発明に係る適性評価方法により、十二指腸液試料の試料適性を評価し、検査に供する試料を選定することや、検査結果の信頼性を評価することができる。また、本発明に係る採取練習方法により、十二指腸液試料の採取者の試料適性のある十二指腸液試料の採取手技を向上させることができる。すなわち、本発明に係る発明は、試料の採取及び検査の無駄を抑え、かつ膵液由来成分検出における擬陰性を減らすことにより、検査性能を向上させることができ、膵疾患マーカー等の膵液由来成分を解析する分野、特に臨床検査等の分野において利用が可能である。

【 要 約 】

動物から採取された十二指腸液試料について、当該十二指腸液試料が膵液由来成分の検出用試料として適しているか否かを評価する方法を提供する。すなわち、(a) 十二指腸液試料とキモトリブシン特異的基質を混合し、前記十二指腸液試料による前記キモトリブシン特異的基質の分解活性を測定する工程と、(b) 前記十二指腸液試料とペプシン特異的基質を混合し、前記十二指腸液試料による前記ペプシン特異的基質の分解活性を測定する工程と、(c) 前記十二指腸液試料の前記キモトリブシン特異的基質の分解活性及び前記十二指腸液試料の前記ペプシン特異的基質の分解活性に基づき、前記十二指腸液試料が膵液由来成分の検出用試料として適しているか否かを評価する工程と、を有する、十二指腸液試料の膵液由来成分検出用試料としての適性評価方法を提供する。

フロントページの続き

- (72)発明者 朝倉 正教
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリパス株式会社内
- (72)発明者 長岡 智紀
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリパス株式会社内
- (72)発明者 島田 奈緒
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリパス株式会社内

審査官 田中 耕一郎

- (56)参考文献 国際公開第2013/038981(WO, A1)
特表2008-506373(JP, A)
米国特許第08211644(US, B1)
特表2000-503533(JP, A)
国際公開第2015/001831(WO, A1)
国際公開第2011/096515(WO, A1)
生化学辞典(第3版)、2002年、株式会社東京化学同人発行、358頁、1262頁
GUEANT J. L., et al., In-vitro test of haptocorrin degradation for biological diagnosis of exocrine pancreatic dysfunction, THE LANCET, 1986年, Vol.2, No.8509, P.709-712
水野理文 他, 十二指腸液中Chymotrypsin活性の測定とその臨床的意義, 日本消化器病学会雑誌, 1982年, Vol.79, No.3, P.858-863

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - C12Q 3/00
G01N 33/00 - G01N 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS/WPIX(STN)
PubMed