

(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 10 月 16 日(16.10.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/167969 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/057588
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 19 日(19.03.2014)
- (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 2013-080303 2013 年 4 月 8 日(08.04.2013) JP
- (71) 出願人: 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 1 番 8 号 Osaka (JP). テオリアサイエンス株式会社(THEORIA SCIENCE INC.) [JP/JP]; 〒1010032 東京都千代田区岩本町 2-1-9-1 4 O 1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 太田 英樹(OHTA, Hideki). 岡本 博之(OKAMOTO, Hiroyuki). 園田 光(SONODA, Hikaru). 落合 孝広(OCHIYA, Takahiro).
- (74) 代理人: 細田 芳徳(HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMMビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka (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, 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.
- (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 (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).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING COLON CANCER

(54) 発明の名称: 大腸がんの検出方法

(57) Abstract: A method for detecting colon cancer that comprises a step for using an anti-CD147 monoclonal antibody or a fragment thereof and quantifying CD147-expressing exosomes in a body fluid sample derived from a test subject, and a step for comparing the signal strength of the exosomes in the above step with the signal strength of a reference subject, wherein, in the case where the signal strength of the test subject is stronger than the signal strength of the reference subject, the result is interpreted as an index of colon cancer. According to the method of the present invention, whether or not a sample donor is likely to suffer colon cancer can be determined. On the basis of the result, means for preventing the progress of cancer in the sample donor can be taken and, therefore, the method of the present invention is highly useful.

(57) 要約: 抗 CD 1 4 7 モノクローナル抗体又はその断片を用い、被験者に由来する体液試料中の CD 1 4 7 を発現しているエクソソーム量を測定する工程と、前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、対照者におけるシグナル強度とを対比する工程とを含み、前記被験者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合が、大腸がんの存在の指標となる、大腸がんの検出方法。本発明の方法により、サンプル提供者が大腸がんを発症している可能性が高いか否かを判定することができる。これにより、サンプル提供者は癌の進行を阻止する手段を講じることができるため、有用である。



WO 2014/167969 A1

明 細 書

発明の名称：大腸がんの検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、大腸がんの検出方法に関する。さらに詳しくは、サンプル中のエクソソーム（Exosome）表面の特定抗原（CD9、CD63、CD147）に対するモノクローナル抗体又はそれらの抗体断片を用いて、大腸がんの存在を検出するための方法や大腸がんの治療効果を評価する方法、及びこれらの方法に用いるキットに関する。

背景技術

[0002] エクソソームは、生体内の体液中に存在する小胞顆粒である。エクソソーム表面には、一般的な細胞表面と同様に、種々の膜タンパク質が存在することが知られている。また、エクソソームは、種々の細胞、例えば免疫系の細胞や各種がん細胞から分泌されることが報告されており、生体内の細胞間コミュニケーションの媒介役として機能し生理現象と関連することや、がんなどの疾患との関連性が注目されている。

[0003] 例えば、非特許文献1では、卵巣がん患者の腹水と血中からエクソソームを単離し、それらが免疫系細胞へ取り込まれて免疫を抑制することで、腫瘍が増大することを報告している。エクソソームの検出には、CD24、ADAM10、CD9の抗体を用いている。

[0004] また、特許文献1では、生体に存在する小胞の表面マーカーとして、CD9、CD31、CD63、CD81、CD82、CD37、CD53等を用いて各種がんの診断を行なうことが開示されている。非特許文献2では、HAb18G／CD147が28種のがん細胞において正常細胞より多く発現していることから、該タンパク質のモノクローナル抗体を腫瘍バイオマーカーとして用いることができると開示されている。非特許文献3では、胃がん患者の血漿に存在する微小胞には、MAGE-1とHER-2/neuの発現が増加していることが報告されている。非特許文献4には、血清中のCA

19-9を測定する癌抗原診断用キットが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO 2012/115885号パンフレット

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Sascha Keller, et al., Cancer Letters、2009、278、p73-81

非特許文献2：Yu Li, et al., Histopathology、2009、54、p677-687

非特許文献3：Jaroslaw Baran, et al., Cancer Immunol Immunother、2010、59、p841-850

非特許文献4：アキシム(登録商標)CA 19-9ダイナパック(登録商標)添付文書、アボットジャパン株式会社

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] エクソソームなどの小胞顆粒に存在する膜タンパク質をバイオマーカーとして、がんを検出することは可能である。しかしながら、サンプルの種類や用いる抗体によっては、感度や特異性の変動が大きい等の理由から十分な結果を得ることが困難であり、従前からのがんの診断では、偽陽性となる場合があり、診断の精度に問題があった。よって、エクソソームを検出することで精度よくがんを検出するために、さらなる技術の開発が必要である。

[0008] 本発明の課題は、エクソソームを測定することで大腸がんを検出する方法、及び該方法に用いるキットを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の〔1〕～〔7〕に関する。

〔1〕 抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を用い、被験者に由来する体液試料中のCD147を発現しているエクソソーム量を測定する工程と、

前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、対照者におけるシグナル

強度とを対比する工程

とを含み、前記被験者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合が、大腸がんの存在の指標となる、大腸がんの検出方法。

〔２〕 抗ＣＤ９モノクローナル抗体及びその断片、抗ＣＤ６３モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも１つと、抗ＣＤ１４７モノクローナル抗体又はその断片とを用い、被験者に由来する体液試料中のＣＤ９及び／又はＣＤ６３とＣＤ１４７とを発現しているエクソソーム量を測定する工程と、

前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、対照者におけるシグナル強度とを対比する工程

とを含み、前記被験者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合が、大腸がんの存在の指標となる、大腸がんの検出方法。

〔３〕 抗ＣＤ９モノクローナル抗体及びその断片、抗ＣＤ６３モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも１つと、抗ＣＤ１４７モノクローナル抗体又はその断片とを用い、治療後の被験者に由来する体液試料中のＣＤ９及び／又はＣＤ６３とＣＤ１４７とを発現しているエクソソーム量を測定する工程と、

前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、治療前の被験者におけるシグナル強度とを対比する工程と、

を含み、治療後におけるシグナル強度が治療前におけるシグナル強度より弱いと認められる場合に、前記治療が大腸がんの治療効果を有すると評価する工程を含む、大腸がん治療の評価方法。

〔４〕 抗ＣＤ１４７モノクローナル抗体又はその断片を含有してなる、前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法に使用するためのキット。

〔５〕 抗ＣＤ９モノクローナル抗体及び／又は抗ＣＤ６３モノクローナル抗体あるいはそれらの断片と、抗ＣＤ１４７モノクローナル抗体又はその断

片とを含有してなる、前記〔2〕又は〔3〕に記載の方法に使用するためのキット。

〔6〕抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とによって認識されるエクソソームの大腸がんのマーカーとしての使用。

〔7〕 抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とによって認識されるエクソソームを、被験者に由来する体液試料中から検出することを特徴とする、大腸がん又は大腸がんの疑いの情報を提供する方法。

発明の効果

[0010] 本発明の方法により、偽陽性の心配もなく、エクソソームを測定することで大腸がんを検出することができ、これにより、大腸がんの発症の有無や進行程度を判断することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、ヒト大腸癌細胞株HCT116由来のエクソソームを用いたプロテオーム解析の結果を示す図である。

[図2]図2は、ウェスタンブロット法によるCD147の検出の結果を示す図である。各レーン500ngのエクソソーム抽出液を泳動し、抗CD147マウスモノクローナル抗体を用いて検出した。

[図3]図3は、エクソスクリーン法を用いた大腸がん細胞株由来エクソソームにおけるCD147の検出結果を示す図である。ビオチン化抗体；CD147、アクセプタービーズ結合抗体；CD9。

[図4]図4は、エクソスクリーン法を用いた大腸がん患者血清由来エクソソームにおけるCD147の検出結果を示す図である。ビオチン化抗体；CD147、アクセプタービーズ結合抗体；CD63（左図）、CD9（右図）。

[図5]図5は、エクソスクリーン法を用いた大腸がん患者血清由来エクソソーム

ムにおけるCD147の検出結果を示す図である。ビオチン化抗体；CD147、アクセプタービーズ結合抗体；CD9。

[図6]図6は、大腸がん患者血清において、エクソソーム由来CD147、CEA、及びCA19-9のそれぞれの検出結果を対比した図である。

[図7A]図7Aは、エクソソーム由来のCD147を指標として大腸がんを診断した場合（図5）のROC解析した結果を示す図である。

[図7B]図7Bは、CEAを指標として大腸がんを診断した場合のROC解析した結果を示す図である。

[図7C]図7Cは、CA19-9を指標として大腸がんを診断した場合のROC解析した結果を示す図である。

[図8]図8は、エクソスクリーン法を用いた術前及び術後の大腸がん患者血清由来エクソソームにおけるCD147の検出結果を示す図である。各データの中央部の線は、検出結果の中央値を示す。ビオチン化抗体；CD147、アクセプタービーズ結合抗体；CD9。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、被験者における大腸がんを検出するための方法であって、体液試料中のエクソソーム由来のシグナルを特定のモノクローナル抗体を用いて測定し、その値が健常人のそれより大きい場合に大腸がん罹患している可能性があることを大きな特徴とする。具体的には、特定抗原に対するモノクローナル抗体又はその断片を用い、被験者に由来する体液試料中の該抗原を発現しているエクソソーム量を測定する工程（以降、工程Aともいう）と、前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、対照者におけるシグナル強度とを対比する工程（以降、工程Bともいう）とを含み、ここで、前記被験者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合が、大腸がんの存在の指標となる。なお、本明細書において、大腸がんを検出するとは、大腸がんの発症の有無、病態の進行度を検出することを含む。

[0013] 本発明者らは、抗CD9抗体と抗CD63抗体の組み合わせからなる測定

系により大腸がん患者の血液では健常人の血液よりも強いシグナル強度が得られることを既に見出していたが、健常人においてもある程度の強いシグナルが検出されるなどの問題があり、大腸がんの診断法としては問題があった。しかしながら、本発明においては、大腸がん細胞株のプロテオーム解析から、悪性度の高い大腸がん細胞から分泌されるエクソソームに特異的な抗原としてCD147を同定することに成功した。さらに、本発明者らが鋭意検討した結果、このCD147抗原に対する抗体と抗CD9抗体あるいは抗CD63抗体を組み合わせることにより、健常人の測定値はばらつきが少なく偽陽性が検出されず、大腸がん患者のみからシグナルが検出されるという良好な結果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0014] 以下に、本発明における各工程について説明する。

[0015] 工程Aは、特定抗原に対するモノクローナル抗体又はその断片を用い、被験者に由来する体液試料中の該抗原を発現しているエクソソーム量を測定する工程である。

[0016] 工程Aで用いるモノクローナル抗体又はその断片としては、3種類のモノクローナル抗体又はその断片が挙げられる。具体的には、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片、抗CD9モノクローナル抗体又はその断片、抗CD63モノクローナル抗体又はその断片であり、少なくとも抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を用いる。

[0017] 本発明で用いるモノクローナル抗体又はその断片は、それぞれ特定抗原を認識するものであればよく、公知の方法に従って調製することができる。即ち、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片はCD147を認識し、抗CD9モノクローナル抗体又はその断片はCD9を認識し、抗CD63モノクローナル抗体又はその断片はCD63を認識するものであり、哺乳動物の免疫応答により調製してもよく、各抗原の配列情報に基づいて調製してもよい。

[0018] また、本発明では、抗CD9モノクローナル抗体及び抗CD63モノクローナル抗体としては、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマと

して、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1 つくばセンター中央第6)に下記受託番号のもとで寄託された細胞より得られるものを使用することもできる。

FERM BP-11519 (産生されるモノクローナル抗体がCD9-12A12抗体、表示CD9:12A12、受託日2011年11月8日)

FERM BP-11520 (産生されるモノクローナル抗体がCD63-8A12抗体、表示CD63:8A12、受託日2011年11月8日)

FERM BP-11521 (産生されるモノクローナル抗体がCD63-13C8抗体、表示CD63:13C8、受託日2011年11月8日)

[0019] 本発明において「モノクローナル抗体断片」とは、前述するモノクローナル抗体の一部であって、当該モノクローナル抗体と同様にCD9、CD63又はCD147に特異的な結合性を有する断片を意味する。CD9、CD63又はCD147に対して特異的な結合性を有する断片とは、具体的には、Fab、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体(scFv)、ジスルフィド安定化抗体(dsFv)、2量化体V領域断片(Diabody)、CDRを含むペプチド等を挙げることができる(エキスパート・オピニオン・オン・セラピューティック・パテンツ、第6巻、第5号、第441~456頁、1996年)。

[0020] これらのモノクローナル抗体又はその断片は、例えば、以下の2つの態様で用いられる。

態様1: 抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を用いる態様

態様2: 抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体又はその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とを組み合わせる態様

[0021] 態様1では、エクソソーム上のCD147を標識した抗CD147モノクローナル抗体又はその断片により認識して、CD147を発現しているエクソソームを定量することができる。抗CD147モノクローナル抗体又はその断片の標識化は、特に限定はなく、公知の方法に従って行うことができる。

。態様1のモノクローナル抗体又はその断片は、後述のウェスタンブロット法に好適に用いられる。

[0022] 態様2では、エクソソーム上のCD9及び／又はCD63とCD147とを、これらのモノクローナル抗体又はその断片により認識して、CD9及び／又はCD63とCD147が発現しているエクソソームを定量することができる。態様2では、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を固相抗体として、抗CD9モノクローナル抗体又はその断片を標識抗体として用いてもよい。あるいは、抗CD9モノクローナル抗体又はその断片を固相抗体として、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を標識抗体として用いてもよい。また、抗CD63モノクローナル抗体又はその断片を固相抗体として、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を標識抗体として用いてもよい。あるいは、抗CD63モノクローナル抗体又はその断片を標識抗体として、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を固相抗体として用いてもよい。また、抗CD9モノクローナル抗体又はその断片と抗CD63モノクローナル抗体又はその断片を固相抗体として、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を標識抗体として用いてもよい。あるいは、抗CD9モノクローナル抗体又はその断片と抗CD63モノクローナル抗体又はその断片を標識抗体として、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を固相抗体として用いてもよい。固相抗体及び標識抗体の調製は、特に限定はなく、公知の方法に従って行うことができる。態様2のモノクローナル抗体又はその断片は、後述のサンドイッチELISA法、エクソスクリーン法に好適に用いられる。

[0023] 本発明における、エクソソーム量の測定用に供されるサンプルとしては、体液試料であれば限定はなく、例えば、血液、血清、血漿、尿、唾液、乳汁、鼻汁、脳脊髄液からなる群より選択されるものが例示される。

[0024] エクソソーム量の測定は、前記モノクローナル抗体又はその断片を用いる方法であればよく、例えば、ウェスタンブロット法、サンドイッチELISA法、エクソスクリーン法に従って行なうことができる。

- [0025] ウェスタンブロット法では、例えば、態様1のモノクローナル抗体又はその断片を用いることができる。具体的には、大腸がん患者の血液を抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を用いてウェスタンブロット法で解析することにより、大腸がん細胞に由来するエクソソーム上に存在するCD147を検出することができる。
- [0026] サンドイッチELISA法では、例えば、態様2のモノクローナル抗体又はその断片を用いることができる。具体的には、先ず、一種類のモノクローナル抗体又はその断片を固相抗体とし、エクソソームを含有するサンプルと接触させて複合体を形成させる。その後、そこに、別のモノクローナル抗体又はその断片を標識後添加して、さらなる複合体を形成させて標識を検出することにより、両抗体が認識する抗原を発現しているエクソソーム量を測定することができる。
- [0027] エクソスクリーン法はPerkinElmer社が開発したAlphaLISAを応用したものである。本方法はエピトープの異なる2種類の抗体を用いて、片方の抗体はビオチン化を、もう片方にはAlphaLISAアクセプタービーズを結合させた抗体を用いて解析試料と反応させる。その後、ストレプトアビジンが結合したドナービーズを添加することで、ビオチン化抗体とドナービーズがストレプトアビジンを介して結合し、アクセプタービーズとドナービーズが隣接する。隣接した状態で(200nm以内)、680nm励起により、ドナービーズから一重項酸素が発生し、アクセプタービーズに一重項酸素が到達すると615nmの光を発してシグナルとして検出することができる。態様2のモノクローナル抗体又はその断片をこの方法を応用することで、100nm程度の大きさであるエクソソームを解析試料として測定することができる。
- [0028] かくして、体液試料中の標的タンパク質を含むエクソソーム量を測定することができる。得られたエクソソーム量を用いて、次の工程Bを行う。
- [0029] 工程Bは、工程Aで得られたエクソソームのシグナル強度と、対照者におけるシグナル強度とを対比する工程であり、前記被験者におけるシグナル強

度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合が、大腸がんの存在の指標となる。なお、本明細書において、対照者とは、大腸がんを発症していない者であれば良く、健常人が挙げられる。

[0030] 対照者におけるシグナル強度は、対照者に由来する体液試料中のエクソソーム量であり、工程 A で被験者のエクソソーム量を測定する際に併せて測定しても、別途測定してもよい。また、複数の対照者のエクソソーム量を測定し、その統計から対照者のエクソソーム量を設定してもよい。

[0031] 対照者由来の体液試料としては、被験者由来の体液試料と同種の試料であることが好ましく、例えば、被験者由来の体液試料が血液である場合、対照者由来の体液試料も血液である。

[0032] 被験者のシグナル強度と対照者のシグナル強度とを対比するには、被験者のエクソソーム量と対照者のエクソソーム量とを対比して解析すればよく、かかる方法としては、特に限定はなく、公知の方法(Steel法、t検定、Wilcoxon検定等)を用いることができる。前記解析により対照者のエクソソーム量に対する被験者のエクソソーム量がより有意に増加していることが示された場合は、被験者に大腸がんが存在している可能性が高いと判断される。

[0033] なお、前記抗体を用いて体液試料中に存在するエクソソームを検出することにより、大腸がんの存在可能性の有無を判断することができることから、本発明の一態様として、抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とによって認識されるエクソソームを、被験者に由来する体液試料中から検出することを特徴とする、大腸がん又は大腸がんの疑いの情報を提供する方法を挙げることができる。

[0034] また、前記解析において、対照者のエクソソーム量を被験者の術前のエクソソーム量に設定し、術後のエクソソーム量を被験者のエクソソーム量として対比することで、術後のエクソソーム量が減少していることが示された場合は、大腸がんが縮小又は減退している可能性が高いと判断することができる。

る。

[0035] またさらに、前記解析において、例えば、被験者が大腸がんと診断された場合においては、対照者のエクソソーム量を被験者の治療前のエクソソーム量に設定し、治療後のエクソソーム量を被験者のエクソソーム量として対比することで、治療後のエクソソーム量が減少していることが示された場合は、当該治療が大腸がんの治療に有効である可能性が高いと判断することができる。従って、本発明はまた、大腸がんの治療を受ける前と受けた後において、前記モノクローナル抗体又はその断片を用いてエクソソーム由来のシグナルを測定し、治療後の値が治療前のそれより小さい場合に、当該治療が効果を有すると判断することを特徴とする評価方法を提供することができる。

[0036] また、本発明の別の態様では、大腸がんを検出するためのキットが提供される。

[0037] 本発明のキットには、体液試料中のエクソソームを検出することができるものであれば全て含まれる。具体的には、前記エクソソーム表面に存在する抗原を認識できる抗体、即ち、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片、抗CD9モノクローナル抗体又はその断片、抗CD63モノクローナル抗体又はその断片を含有するキットが挙げられる。なかでも、これらの抗体又はその断片を用いる態様から、

態様1：抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を含有する態様

態様2：抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体又はその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とを組み合わせる含有する態様が挙げられる。

[0038] これらのキットは、体液試料中のエクソソームを検出する際に抗体を用いる検出方法であれば(例えば、ウェスタンブロット法、ELISA法、エクソスクリーン法等)、用いることができる。なお、エクソソームが検出されるのであれば、エクソソーム以外のタンパク質も前記抗体により同時に検出されることがあってもよい。

[0039] 本発明のキットを用いて、例えば、健常人と被験者の血液サンプル中に存在するエクソソーム量を測定して、両者の発現量に有意差が生じた場合には、被験者における大腸がんの発症の決定及び／又は診断を行うことができる。

実施例

[0040] 以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、実施例は本発明をより良く理解するために例示するものであって、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されることを意図するものではない。

[0041] 試験例 1 (CD147 抗体を用いた大腸がん細胞株由来エクソソームの検出)

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 (American Type Culture Collection) 由来のエクソソームを用いたプロテオーム解析の結果を図 1 に示す。この結果から抽出した抗原 CD147 について、大腸がん細胞株由来エクソソームでの発現をマウス抗ヒト CD147 モノクローナル抗体 (Novus Biologicals 社製、クローン MEM-M6/1) によるウェスタンブロット法を用いて評価した。ヒト大腸がん細胞株としては、非常に悪性度の高い HCT116 細胞と悪性度の低い Caco2 細胞 (American Type Culture Collection) を用いて比較した。結果、悪性度の高い HCT116 細胞株由来のエクソソームで CD147 の存在を確認することができ、悪性度の低い Caco2 細胞由来のエクソソームでは検出されなかった (図 2)。

[0042] 次に、ビオチン化した抗 CD147 モノクローナル抗体 (Novus Biologicals 社製、クローン MEM-M6/1) とアクセプタービーズが結合した抗 CD9 モノクローナル抗体 (受託番号 FERM BP-11519 として寄託されているハイブリドーマにより産出されるモノクローナル抗体) を用いて、エクソスクリーン法により、各大腸がん細胞株由来の CD9 と CD147 が発現しているエクソソーム由来のシグナルを測定した。その結果、ウェスタンブロット法による結果と同様、悪性度の高い HCT

116細胞株由来のエクソソームにおけるCD147の発現が確認された（図3）。これらの結果より、一部の大腸がん細胞ではCD147を発現するエクソソームを多く分泌していると推察される。

[0043] 試験例2（CD147抗体を用いた大腸がん患者血清由来エクソソームの検出1）

大腸がん患者血清5 μ L中のCD9又はCD63を発現しており、かつCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナル強度をエクソスクリーン法によって検出した。エクソスクリーン法では、試験例1で用いたビオチン化した抗CD147モノクローナル抗体とアクセプタービーズが結合した抗CD63モノクローナル抗体（受託番号FERM BP-11520として寄託されているハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体）もしくはアクセプタービーズが結合した前述の抗CD9モノクローナル抗体を用いた。大腸がん患者由来の血清10例と健常人由来の血清10例の解析を行ったところ、10例中5例の患者由来の血清から高いシグナルが検出された。これらの解析においては、偽陰性率は50%であったが、健常人の測定値のばらつきが小さく偽陽性もまったく見られず、大腸がん検査として優れていることが判明した（図4）。

[0044] 試験例3（CD147抗体を用いた大腸がん患者血清由来エクソソームの検出2）

試験例2と同様の方法で、さらに多くの大腸がん患者由来の血清と健常人由来の血清を用いて、CD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルを測定した（図5）。具体的には、大腸がん患者由来の血清194例と健常人由来の血清191例を用いた。

[0045] 次に、前記にてエクソソーム由来シグナルを測定した大腸がん患者由来の血清と同じ血清194例について、CEA及びCA19-9の測定を行った。CEA及びCA19-9の測定結果と、CD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルをエクソスクリーン法で測定した結果をまとめて図6に示す。

[0046] 図6より、CEAとCA19-9の測定結果を比較すると、CEA陽性例62例、CA19-9陽性例36例のうち、33例が共通しており、この2つの方法では同じ大腸がん患者を高い相関性で検出できることが判る。一方、CD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルをエクソスクリーン法で測定した結果と、CEAとCA19-9の測定結果との間に相関は見られない。つまり、CD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルを用いた検査は、CEAあるいはCA19-9という公知の、大腸がん検査で汎用される項目と組み合わせることによって、異なる陽性例を見出すことが可能となって、より多くの大腸がん患者を診断できることが示唆される。

[0047] また、図7A、図7B、及び図7Cは、ROC解析を行い、各測定方法の大腸がんの検出能を比較したものであり、AUCが1に近いほど検出能が高いことを示す。CD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルを用いた場合にはAUCが0.820と、CEAやCA19-9のそれ（それぞれ0.669と0.622）より、はるかに大きいことが判明した。CD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルを用いた大腸がんの検査は、CEAやCA19-9よりも優れていることが示された。

[0048] 試験例4（手術前と手術後のシグナル強度の変化の解析）

Stage IとIIの大腸がん切除術を受けた15名の患者由来の血清を用いて、手術前と手術後のCD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルの変化を調べた（図8）。CD9とCD147を発現しているエクソソーム由来のシグナルを用いた検査は、手術後や薬物投与後の追跡検査としても優れていることがわかった。

産業上の利用可能性

[0049] 本発明の方法により、サンプル提供者が大腸がんを発症している可能性が高いか否かを判定することができる。これにより、サンプル提供者は癌の進行を阻止する手段を講じることができるため、有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を用い、被験者に由来する体液試料中のCD147を発現しているエクソソーム量を測定する工程と、
前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、対照者におけるシグナル強度とを対比する工程
とを含み、前記被験者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合が、大腸がんの存在の指標となる、大腸がんの検出方法。
- [請求項2] 抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とを用い、被験者に由来する体液試料中のCD9及び／又はCD63とCD147とを発現しているエクソソーム量を測定する工程と、
前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、対照者におけるシグナル強度とを対比する工程
とを含み、前記被験者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合が、大腸がんの存在の指標となる、大腸がんの検出方法。
- [請求項3] 抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とを用い、治療後の被験者に由来する体液試料中のCD9及び／又はCD63とCD147とを発現しているエクソソーム量を測定する工程と、
前記工程におけるエクソソームのシグナル強度と、治療前の被験者におけるシグナル強度とを対比する工程と、
を含み、治療後におけるシグナル強度が治療前におけるシグナル強度より弱いと認められる場合に、前記治療が大腸がんの治療効果を有す

ると評価する工程を含む、大腸がん治療の評価方法。

[請求項4] 体液試料中のエクソソーム量を測定する工程が、エクソスクリーン法又はサンドイッチELISA法を使用する請求項1～3のいずれかに記載の方法。

[請求項5] 抗CD9モノクローナル抗体又はその断片が、受託番号FERMBP-11519として寄託されているハイブリドーマにより産出されるモノクローナル抗体である請求項2～4のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 抗CD63モノクローナル抗体又はその断片が、受託番号FERMBP-11520として寄託されているハイブリドーマにより産出されるモノクローナル抗体又は受託番号FERMBP-11521として寄託されているハイブリドーマにより産出されるモノクローナル抗体である請求項2～4のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 抗CD147モノクローナル抗体又はその断片を含有してなる、請求項1～6のいずれかに記載の方法に使用するためのキット。

[請求項8] 抗CD9モノクローナル抗体及び／又は抗CD63モノクローナル抗体あるいはそれらの断片と、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とを含有してなる、請求項2～6のいずれかに記載の方法に使用するためのキット。

[請求項9] 抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とによって認識されるエクソソームの大腸がんのマーカーとしての使用。

[請求項10] 抗CD9モノクローナル抗体及びその断片、抗CD63モノクローナル抗体及びその断片からなる群より選ばれる少なくとも1つと、抗CD147モノクローナル抗体又はその断片とによって認識されるエクソソームを、被験者に由来する体液試料中から検出することを特徴とする、大腸がん又は大腸がんの疑いの情報を提供する方法。

[図1]

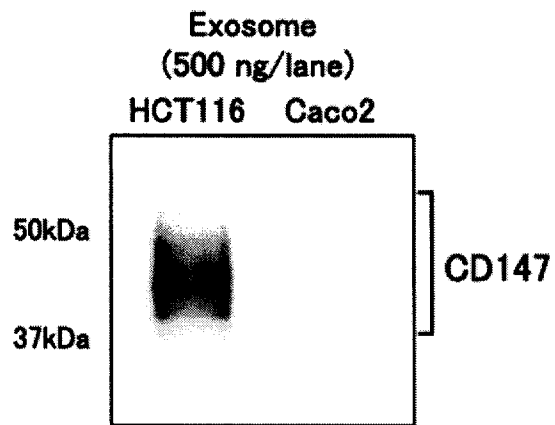
図 1

1	Clathrin heavy chain 1
2	Histone H4
3	Annexin A2
4	Programmed cell death 6-interacting protein
5	Annexin A5
6	Histone H2B type 1-B
7	Ezrin
8	Galectin-3-binding protein
9	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
10	Prostaglandin F2 receptor negative regulator
11	Actin, cytoplasmic 1
12	Annexin A1
13	Integrin beta-4
14	Moesin
15	Neutral amino acid transporter B(0)
16	Actin, aortic smooth muscle
17	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
18	Junction plakoglobin
19	Epithelial cell adhesion molecule
20	CD9 antigen
21	4F2 cell-surface antigen heavy chain
22	Catenin beta-1
23	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2
24	Integrin beta-1
25	14-3-3 protein zeta/delta
26	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
27	Heat shock cognate 71 kDa protein
28	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
29	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
30	Serum albumin
31	Programmed cell death protein 6
32	Lactadherin
33	Elongation factor 2
34	Heat shock protein HSP 90-alpha
35	Collagen alpha-1(XVIII) chain
36	Ras-related protein Rap-1A
37	Histone H3.2
38	Catenin alpha-1
39	Syntenin-1
40	Fatty acid synthase
41	Ras-related protein Rap-2b
42	Tubulin alpha-1B chain
43	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
44	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
45	CUB domain-containing protein 1
46	Histone H3.1
47	Elongation factor 1-alpha 1
48	Integrin alpha-3
49	Histone H2A type 1-B/E
50	Heat shock protein HSP 90-beta

51	Integrin alpha-6
52	Podocalyxin
53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
54	Multivesicular body subunit 12A
55	L-lactate dehydrogenase B chain
56	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
57	Histone H1.3
58	Ras-related protein Rab-10
59	14-3-3 protein theta
60	Monocarboxylate transporter 4
61	DnaJ homolog subfamily A member 1
62	Ephrin type-A receptor 2
63	14-3-3 protein epsilon
64	Catenin delta-1
65	CD63 antigen
66	CD44 antigen
67	CD81 antigen
68	X-ray repair cross-complementing protein 6
69	Macrophage migration inhibitory factor
70	40S ribosomal protein S2
71	Plastin-1
72	CD151 antigen
73	Basigin (CD147)
74	Ferritin heavy chain
75	Profilin-1
76	Tetraspanin-6
77	Tetraspanin-14
78	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas
79	Alpha-enolase
80	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12
81	A-kinase anchor protein 12
82	Choline transporter-like protein 1
83	Unconventional myosin-1c
84	Laminin subunit alpha-5
85	Cofilin-1
86	Nucleoside diphosphate kinase B
87	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
88	Peroxiredoxin-1
89	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
90	Glutathione S-transferase P
91	ADP-ribosylation factor 6
92	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
93	ADP-ribosylation factor 1
94	Alpha-actinin-1
95	Annexin A11
96	Equilibrative nucleoside transporter 1
97	Transferrin receptor protein 1
98	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
99	Ras-related protein Rab-7a
100	Fructose-bisphosphate aldolase A

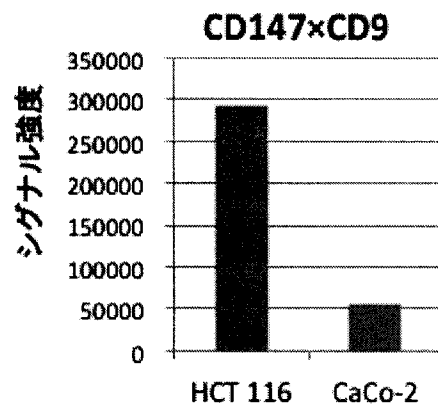
[図2]

図 2



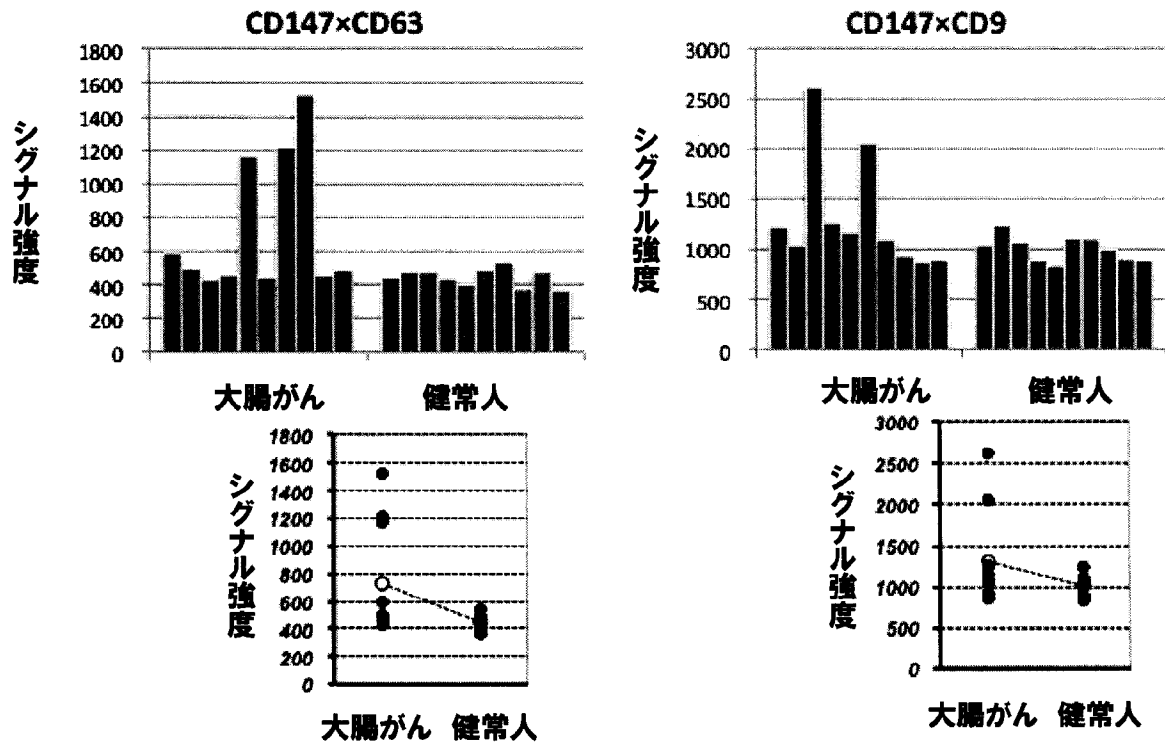
[図3]

図 3



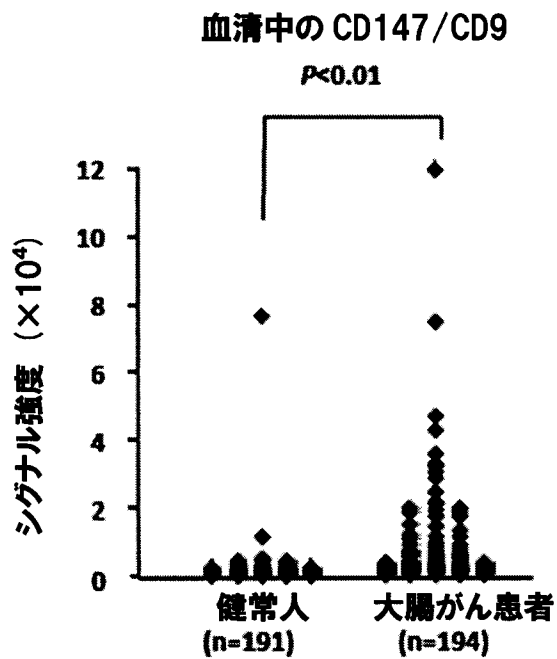
[図4]

図 4



[図5]

図 5



[図6]

図 6

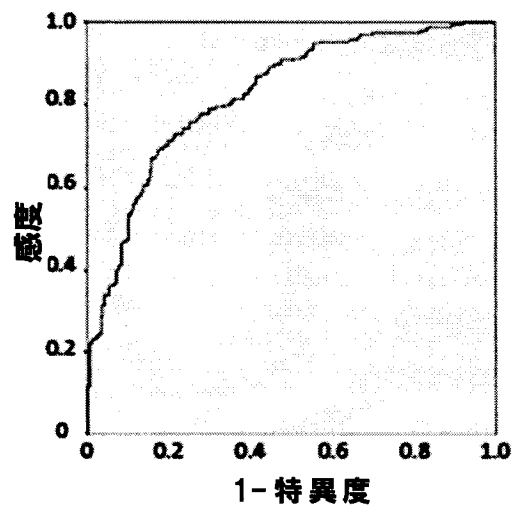
患者 #	シグナル強度 CD147/CD9	CEA (ng / ml)	CA19-9 (U / ml)	患者 #	シグナル強度 CD147/CD9	CEA (ng / ml)	CA19-9 (U / ml)	患者 #	シグナル強度 CD147/CD9	CEA (ng / ml)	CA19-9 (U / ml)
1	839	2	5	86	1879	2	6	131	3016	1	9
2	723	5	13	87	1891	9	46	132	3048	2	9
3	790	896	1010	88	1892	4	6	133	3074	8	99
4	804	2	14	89	1896	13	37	134	3134	1	117
5	812	3	13	70	1897	6	64	135	3139	999	1329
6	881	3	13	71	1912	1	14	136	3242	6	18
7	1009	2	5	72	1919	1	11	137	3302	1	10
8	1017	11	130	73	1926	9	5	138	3332	2	19
9	1022	4	10	74	1964	2	12	139	3354	1	5
10	1085	2	8	75	1974	1	6	140	3370	2	26
11	1101	1	9	76	1977	25	29	141	3419	2	5
12	1102	2	19	77	1999	1	14	142	3454	6	25
13	1108	2	8	78	2005	27	24	143	3479	2	11
14	1125	2	5	79	2015	2	5	144	3483	3	17
15	1131	15	12	80	2016	8	12	145	3677	2	16
16	1145	1	7	81	2045	5	19	146	3679	2	11
17	1182	2	11	82	2054	2	13	147	3940	15	23
18	1216	2	28	83	2067	46	12	148	4188	1	5
19	1268	78	43	84	2074	7	11	149	4268	6	45
20	1274	3	5	85	2074	3	16	150	4407	1	7
21	1306	11	766	86	2082	1	5	151	4487	3	9
22	1313	5	10	87	2158	4	9	152	4955	2	21
23	1318	1	16	88	2164	80	131	153	5004	1	5
24	1328	3	16	89	2191	4	14	154	5487	1	6
25	1357	1	8	90	2198	2	8	155	5798	5	6
26	1364	44	39	91	2208	1	5	156	5834	2	16
27	1375	6	40	92	2220	2	6	157	6142	7	25
28	1393	44	740	93	2225	3	5	158	6487	3	5
29	1395	1	8	94	2260	2	9	159	6521	6	88
30	1401	5	13	95	2295	1	6	160	6903	5	9
31	1410	9	29	96	2297	50	64	161	6996	1	17
32	1415	36	64	97	2308	1	22	162	7799	1	13
33	1429	8	11	98	2321	4	38	163	7854	2	13
34	1432	2	9	99	2328	94	78	164	8272	2	11
35	1443	13	42	100	2327	3	13	165	8854	4	26
36	1445	2	5	101	2347	1	5	166	9212	6	18
37	1485	4	24	102	2353	9	15	167	9379	328	269
38	1483	2	5	103	2376	3	19	168	10010	141	79
39	1505	1	6	104	2399	1	6	169	10935	1	25
40	1515	63	14780	105	2409	3	7	170	11430	2	21
41	1546	6	5	106	2419	12	233	171	11726	3	164
42	1570	34	92	107	2420	1	5	172	12388	5	24
43	1572	1	14	108	2420	11	10	173	13804	3	6
44	1594	3	20	109	2423	8	66	174	14806	450	970
45	1597	55	56	110	2427	2	9	175	15412	32	5
46	1614	2	5	111	2461	2	7	176	17139	3	23
47	1614	8	11	112	2487	1	7	177	17502	2	18
48	1670	3	22	113	2490	7	28	178	18476	81	1258
49	1704	1	5	114	2503	1	6	179	18502	1	13
50	1711	4	95	115	2516	4	30	180	19104	4	18
51	1721	31	75	116	2543	8	19	181	19872	1	11
52	1732	1	8	117	2551	46	12	182	20121	1	5
53	1741	5	8	118	2566	10	10	183	20943	28	80
54	1761	34	19	119	2597	1	23	184	21420	10	83
55	1768	3	20	120	2613	4	37	185	24641	16	68
56	1769	2	6	121	2641	3	6	186	28622	6	9
57	1783	1	5	122	2658	13	17	187	30618	2	5
58	1796	1	5	123	2675	4	5	188	32289	1	5
59	1824	4	5	124	2768	9	41	189	33081	3	9
60	1836	21	853	125	2907	2	34	190	35710	1	26
61	1851	2	8	126	2921	4	32	191	42913	2	17
62	1859	1	10	127	2947	2	7	192	47096	7	15
63	1860	3	52	128	2964	2	5	193	74764	366	295
64	1866	3	6	129	3015	5	9	194	119708	3	12
65	1879	2	9	130	3015	1	5				

CEA の健常者の基準値は 5 ng/ml 以下である。

CA19-9 の健常者の基準値は 37 U/ml 以下である。

[図7A]

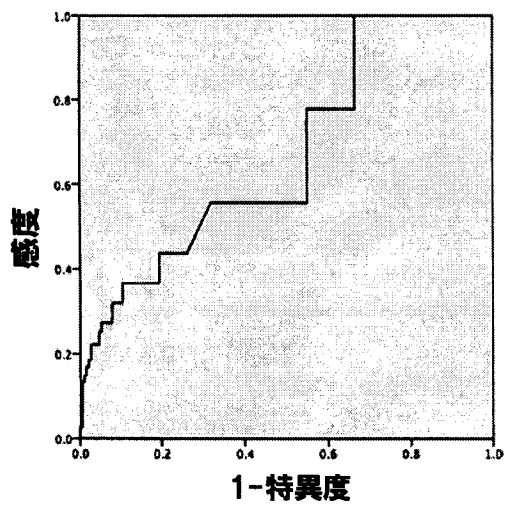
図 7 A



AUC:0. 820

[図7B]

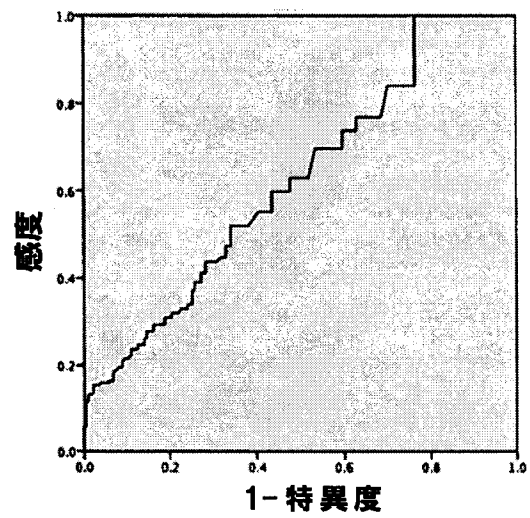
図 7 B



AUC:0. 669

[図7C]

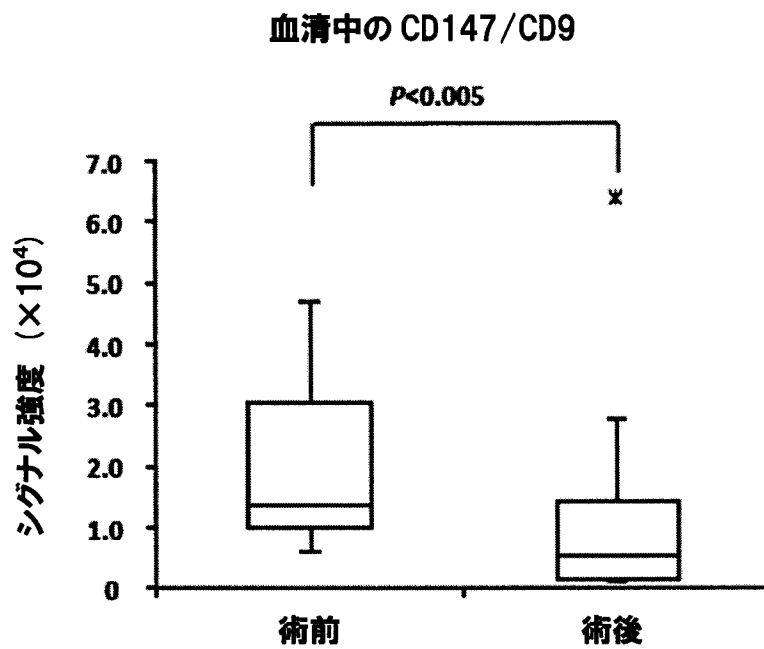
図 7 C



AUC:0.622

[図8]

図 8



* 各データの中央部の線は、検出結果の中央値を示す。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/057588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n

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, G01N33/53, C07K16/28, C12P21/08

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	US 2012/0309018 A1 (Skolnick Mark et al.), 06 December 2012 (06.12.2012), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0004], [0031] to [0033], [0111], [0112], [0117]; tables 1, 5, 6 (Family: none)	1-4, 6-10/5
Y	WO 2012/006476 A2 (AETHLON MEDICAL, INC.), 12 January 2012 (12.01.2012), entire text; particularly, paragraphs [0028], [0029], [0033] & EP 2591359 A	5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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 application or patent 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
17 June, 2014 (17.06.14)

Date of mailing of the international search report
24 June, 2014 (24.06.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/057588

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/040525 A1 (Japan Health Sciences Foundation), 07 April 2011 (07.04.2011), entire text & US 2012/0231970 A1	1-10
A	SILVA J. et al., Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer., Genes Chromosomes Cancer., 2012.04, Vol.51, No.4, Page.409-418	1-10
A	Cauchon E. et al., Development of a homogeneous immunoassay for the detection of angiotensin I in plasma using AlphaLISA acceptor beads technology., Analytical Biochemistry, 2009.05, Vol.388, No.1, Page.134-139	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n

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（I P C））

Int.Cl. G01N33/574, G01N33/53, C07K16/28, C12P21/08

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 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), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

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
X/Y	US 2012/0309018 A1 (Skolnick Mark et al.) 2012.12.06, 全文・全図、特に、段落 [0004]、[0031] - [0033]、[0111]、[0112]、[0117]、[TABLE 1]、[TABLE 5]、[TABLE 6] 等参照（ファミリーなし）	1-4, 6-10/5
Y	WO 2012/006476 A2 (AETHLON MEDICAL, INC.) 2012.01.12, 全文、特に、段落 [0028]、[0029]、[0033] 等参照 & EP 2591359 A	5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ 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

1 7 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

草川 貴史

2 J

4 0 7 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

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
A	WO 2011/040525 A1 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2011. 04. 07, 全文等参照 & US 2012/0231970 A1	1-10
A	SILVA J. et al., Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer., Genes Chromosomes Cancer., 2012. 04, Vol. 51, No. 4, Page. 409-418	1-10
A	Cauchon E. et al., Development of a homogeneous immunoassay for the detection of angiotensin I in plasma using AlphaLISA acceptor beads technology., Analytical Biochemistry, 2009. 05, Vol. 388, No. 1, Page. 134-139	1-10