(19)日本国特許庁(JP)

# (12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7656829号
(P7656829)

(45)発行日　令和7年4月4日(2025.4.4)

(24)登録日　令和7年3月27日(2025.3.27)

(51)国際特許分類

| | | FI | | |
|---|---|---|---|---|
| *G01N* | *33/574 (2006.01)* | G01N | 33/574 | A |
| *G01N* | *33/531 (2006.01)* | G01N | 33/531 | A |
| *G01N* | *33/543 (2006.01)* | G01N | 33/543 | 521 |

請求項の数　15　（全32頁）

(21)出願番号　特願2021-551720(P2021-551720)
(86)(22)出願日　令和2年10月9日(2020.10.9)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/038300
(87)国際公開番号　WO2021/070934
(87)国際公開日　令和3年4月15日(2021.4.15)
審査請求日　令和5年10月4日(2023.10.4)
(31)優先権主張番号　特願2019-187197(P2019-187197)
(32)優先日　令和1年10月11日(2019.10.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)
（出願人による申告）令和元年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、橋渡し研究戦略的推進プログラム補助事業、オープンイノベーションの推進により世界のつくばから医療の未来を加速開拓する事業委託事業、産業技術力強化法第１７条の適用を受ける特許出願

(73)特許権者　301021533
国立研究開発法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関１－３－１
(73)特許権者　504171134
国立大学法人 筑波大学
茨城県つくば市天王台一丁目１番１
(74)代理人　110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者　舘野 浩章
茨城県つくば市梅園１－１－１ 中央第１
国立研究開発法人産業技術総合研究所内
(72)発明者　小田 竜也
茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内
(72)発明者　下村 治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　がんの検査方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

対象から得られた生体サンプルを分析する方法であって、

ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるアッセイによって、生体サンプル中に含まれる成分を分析することを含む、方法。

【請求項２】

対象が、がんを有する、またはその可能性を有する、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

対象が、膵がんを有する、またはその可能性を有する、請求項２に記載の方法。

【請求項４】

対象が、ステージ１または２の膵がんを有する、またはその可能性を有する、請求項３に記載の方法。

【請求項５】

対象から得られた生体サンプルを分析する方法であって、

ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるアッセイによって、生体サンプル中に含まれる成分を分析することを含み、

対象が、ステージ１または２の膵がんを有する、またはその可能性を有する、

方法。
【請求項６】
ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを含み、第１の分子と第２の分子とを用いて対象の生体サンプル中の糖タンパク質の量を測定することができる、サンドイッチアッセイ用のキット、イムノクロマトアッセイ用のキット、レクチン電気泳動用のキット、質量分析用のキット、レクチンアフィニティークロマトグラフィー用のキットまたはμＴＡＳ用のキット。
【請求項７】
がんを検出することに用いられる、請求項６に記載のキット。
【請求項８】
がんが、膵がんである、請求項７に記載のキット。
【請求項９】
がんが、ステージ１または２の膵がんである、請求項８に記載のキット。
【請求項１０】
ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子である第２の分子とを含み、第１の分子と第２の分子とを用いて対象の生体サンプル中の糖タンパク質の量を測定することができる、サンドイッチアッセイ用のキット、イムノクロマトアッセイ用のキット、レクチン電気泳動用のキット、質量分析用のキット、レクチンアフィニティークロマトグラフィー用のキットまたはμＴＡＳ用のキットであって、ステージ１または２の膵がんを検出することに用いられる、キット。
【請求項１１】
対象から得られた生体サンプル中において特定成分を検出する方法であって、
特定成分は、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分であり、
対象から得られた生体サンプルから２つのＢＣ２ＬＣＮに同時に結合できる成分、ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分を分離することを含み、
対象が、ステージＩまたはＩＩの膵がんまたはステージＩまたはＩＩの膵がんを有する可能性を有する対象である、
方法。
【請求項１２】
分離された成分の量を測定することをさらに含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
カットオフ値と前記測定された成分の量とを比較することをさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
カットオフ値が、健常者の前記測定された成分に対応する成分の量の平均値以上の値であり、膵がん患者の前記測定された成分に対応する成分の量の平均値以下の値である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
対象から得られた生体サンプル中において特定成分を検出する方法であって、
特定成分は、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分であり、
対象から得られた生体サンプルから２つのＢＣ２ＬＣＮに同時に結合できる成分、ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分を分離することを含み、

前記成分が、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分である、
方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、がんの検査方法およびそのための検査キットに関する。
【背景技術】
【０００２】
ＢＣ２ＬＣＮは、糖結合タンパク質、すなわちレクチンの一種であり、以前の報告によれば、糖タンパク質糖鎖であるＨ－ｔｙｐｅ１（Ｆｕｃα１－２ＧａｌＮＡｃ）およびＨ－ｔｙｐｅ３（Ｆｕｃα１－２ＧａｌβＮＡｃ）に親和性を有し、Ｈ－ｔｙｐｅ３糖鎖を有するポドカリキシンを発現するヒトＥＳ細胞やｉＰＳ細胞の未分化マーカー検出用プローブとして用いることができることが明らかにされている（特許文献１）。また、以前の報告によれば、ＢＣ２ＬＣＮは、がんの組織に強く結合し、がんマーカー検出プローブとして用いることができることが明らかにされている（特許文献２）。特許文献２によれば、ＢＣ２ＬＣＮとケラタン硫酸に結合する抗体とのサンドイッチアッセイによって、一部のがん患者の血液成分において、ＢＣ２ＬＣＮとケラタン硫酸により認識されるタンパク質の存在が確認されている。
【０００３】
ＳｅｒｐｉｎＡ３は、α１－アンチキモトリプシンともよばれ、いくつかの腫瘍などの疾患に関連していることが知られる。ＳｅｒｐｉｎＡ３は、血液検査マーカーとして開発されている（非特許文献１）。
【０００４】
Ｇａｌ３ＢＰは、ＬＧＡＬ３ＳＢＰもしくはＭＡＣ－２－ＢＰともよばれ、乳がん、肺がん、直腸結腸がん、卵巣がん、および子宮内膜がんの患者の血清において高濃度で見出される（非特許文献２）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【文献】ＷＯ２０１４／１２６１４６
【文献】ＷＯ２０１７／０６１４４９
【非特許文献】
【０００６】
【文献】Ｎｉｅ，Ｓ．ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｐｒｏｔｅｏｍｅ Ｒｅｓ．１３：１８７３－１８８４，２０１４
【文献】Ｋｏｔｈｓ，Ｋ．ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１４２４５－１４２４９，１９９３
【発明の概要】
【０００７】
本発明は、がんの検査方法およびそのための検査キットに関する。
【０００８】
本発明によれば以下の発明が提供される。
（１）対象から得られた血液サンプル中を分析する方法であって、
ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるサンドイッチアッセイまたはイムノクロマトアッセイによって、血液サンプル中に含まれる血液成分を分析することを含む、方法。
（２）第１の分子がＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体である、上記（１）に記載の方法。
（３）第１の分子がＧａｌ３ＢＰに結合する抗体である、上記（１）に記載の方法。

（４）第１の分子がＢＣ２ＬＣＮである、上記（１）に記載の方法。
（５）対象が、がんを有する、またはその可能性を有する、上記（１）～（４）のいずれかに記載の方法。
（６）対象が、膵がんを有する、またはその可能性を有する、上記（５）に記載の方法。
（７）対象が、ステージ１または２の膵がんを有する、またはその可能性を有する、上記（６）に記載の方法。
（８）ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを含み、第１の分子と第２の分子とを用いて対象の血液サンプル中の糖タンパク質の量を測定することができる、サンドイッチアッセイ用またはイムノクロマトアッセイ用のキット。
（９）第１の分子がＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体であり、糖タンパク質におけるタンパク質部分がＳｅｒｐｉｎＡ３である、上記（８）に記載のキット。
（１０）第１の分子がＧａｌ３ＢＰに結合する抗体であり、糖タンパク質におけるタンパク質部分がＧａｌ３ＢＰである、上記（８）に記載のキット。
（１１）固相化されたＢＣ２ＬＣＮである第２の分子と、標識されたＢＣ２ＬＣＮ、標識されたＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、および標識されたＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される標識された第１の分子とを含む、上記（８）に記載のキット。
（１２）がんを検出することに用いられる、上記（８）～（１１）のいずれかに記載のキット。
（１３）がんが、膵がんおよび大腸がんからなる群から選択されるがんである、上記（１２）に記載のキット。
（１４）がんが、ステージ１または２の膵がんである、上記（１３）に記載のキット。
（１５）対象ががんであるか否かを予測する方法であって、上記（１）～（７）のいずれかに記載の方法を実施することを含む、方法。
（１６）対象から得られた血液サンプル中を分析する方法であって、
血液サンプル中の血液成分の有無または濃度を分析することを含み、血液成分は、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分である、方法。
本発明によればまた、以下の発明が提供され得る。
（１Ａ）対象から得られた生体サンプルを分析する方法であって、
ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるアッセイによって、生体サンプル中に含まれる成分を分析することを含む、方法。
（２Ａ）第１の分子がＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体である、上記（１Ａ）に記載の方法。
（３Ａ）第１の分子がＧａｌ３ＢＰに結合する抗体である、上記（１Ａ）に記載の方法。
（４Ａ）第１の分子がＢＣ２ＬＣＮである、上記（１Ａ）に記載の方法。
（５Ａ）対象が、がんを有する、またはその可能性を有する、上記（１Ａ）～（４Ａ）のいずれかに記載の方法。
（６Ａ）対象が、膵がんを有する、またはその可能性を有する、上記（５Ａ）に記載の方法。
（７Ａ）対象が、ステージ１または２の膵がんを有する、またはその可能性を有する、上記（６Ａ）に記載の方法。
（８Ａ）ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子である第２の分子とを含み、第１の分子と第２の分子とを用いて対象の生体サンプル中の糖タンパク質の量を測定することができる、サンドイッチアッセイ用のキット、イムノクロマトアッセイ用のキット、レクチン電気泳動用のキット、質量分析用のキット、レク

チンアフィニティークロマトグラフィー用のキットまたはμＴＡＳ用のキット。
（９Ａ）第１の分子がＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体であり、糖タンパク質におけるタンパク質部分がＳｅｒｐｉｎＡ３である、上記（８Ａ）に記載のキット。
（１０Ａ）第１の分子がＧａｌ３ＢＰに結合する抗体であり、糖タンパク質におけるタンパク質部分がＧａｌ３ＢＰである、上記（８Ａ）に記載のキット。
（１１Ａ）固相化されたＢＣ２ＬＣＮである第２の分子と、標識されたＢＣ２ＬＣＮ、標識されたＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、および標識されたＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される標識された第１の分子とを含む、上記（８Ａ）に記載のキット。
（１２Ａ）がんを検出することに用いられる、上記（８Ａ）～（１１Ａ）のいずれか一項に記載のキット。
（１３Ａ）がんが、膵がんである、上記（１２Ａ）に記載のキット。
（１４Ａ）がんが、ステージ１または２の膵がんである、上記（１３Ａ）に記載のキット。
（１５Ａ）対象ががんであるか否かを予測する方法であって、上記（１Ａ）～（７Ａ）のいずれかに記載の方法を実施することを含む、方法。
（１６Ａ）対象から得られた生体サンプル中において特定成分を検出する方法であって、
特定成分は、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分である、方法。
（１７Ａ）対象から得られた生体サンプルから２つのＢＣ２ＬＣＮに同時に結合できる成分、ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分を分離することを含む、方法。
（１８Ａ）対象が、膵がんまたは膵がんを有する可能性を有する対象である、上記（１７Ａ）に記載の方法。
（１９Ａ）膵がんが、ステージＩまたはＩＩの膵がんである、上記（１７Ａ）に記載の方法。
（２０Ａ）分離された成分の量を測定することをさらに含む、上記（１７Ａ）～（１９Ａ）のいずれかに記載の方法。
（２１Ａ）カットオフ値と前記測定された成分の量とを比較することをさらに含む、上記（２０Ａ）に記載の方法。
（２２Ａ）カットオフ値が、健常者の前記測定された成分に対応する成分の量の平均値以上の値であり、膵がん患者の前記測定された成分に対応する成分の量の平均値以下の値である、上記（２１Ａ）に記載の方法。
（２３Ａ）分離された成分を検出することをさらに含む、上記（１７Ａ）～（１９Ａ）のいずれかに記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【０００９】
【図１】図１は、各種がんを有する患者と健常者の血液サンプル中で、２分子のＢＣ２ＬＣＮにより同時に認識できる血液因子の濃度を測定したサンドイッチアッセイの結果である。
【図２】図２は、血液サンプルからＢＣ２ＬＣＮを用いてＢＣ２ＬＣＮに結合する血液成分を沈降させ、その後、ゲル電気泳動を行ってＢＣ２ＬＣＮを用いてウェスタンブロットした結果（左）および銀染色した結果（右）を示す。
【図３】図３は、血液サンプルからＢＣ２ＬＣＮを用いてＢＣ２ＬＣＮに結合する血液成分を沈降させ、その後、ゲル電気泳動を行って、それぞれＳｅｐｒｉｎＡ３に対する抗体（左）およびＧａｌ３ＢＰに対する抗体（右）でウェスタンブロットした結果を示す。
【図４】図４は、各種がんを有する患者と健常者の血液サンプル中で、ＢＣ２ＬＣＮとＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体を用いてサンドイッチアッセイを行った結果を示す。
【図５】図５は、各種がんを有する患者と健常者の血液サンプル中で、ＢＣ２ＬＣＮとＧａｌ３ＢＰに結合する抗体を用いてサンドイッチアッセイを行った結果を示す。

【図６】図６は、膵がん患者と健常者の血液サンプル中で、２分子のＢＣ２ＬＣＮにより同時に認識できる血液因子の濃度、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３の濃度、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰの濃度、および２種類の異なる抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いて測定したＳｅｒｐｉｎＡ３の濃度の結果を示す。
【図７】図７は、膵がん患者と健常者の血液サンプル中の、２分子のＢＣ２ＬＣＮにより同時に認識できる血液因子の濃度、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３の濃度、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰの濃度、および２種類の異なる抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いて測定したＳｅｒｐｉｎＡ３の濃度を指標として膵がんを検出する評価系における感度（Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ）および特異度（Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）との関係を示すＲＯＣ曲線である。
【図８Ａ】図８Ａは、２分子のＢＣ２ＬＣＮにより同時に認識できる血液因子の膵がん患者の血液サンプル中における濃度をＵＩＣＣ　ＴＭＮ分類におけるステージ別に測定した結果を示す。
【図８Ｂ】図８Ｂは、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３の膵がん患者の血液サンプル中における濃度をＵＩＣＣ　ＴＭＮ分類におけるステージ別に測定した結果を示す。
【図８Ｃ】図８Ｃは、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰの膵がん患者の血液サンプル中における濃度をＵＩＣＣ　ＴＭＮ分類におけるステージ別に測定した結果を示す。
【図８Ｄ】図８Ｄは、２種類の異なる抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いて測定したＳｅｒｐｉｎＡ３の膵がん患者の血液サンプル中における濃度をＵＩＣＣ　ＴＭＮ分類におけるステージ別に測定した結果を示す。
【図９】図９は、正常（ｎｏｒｍａｌ）および膵がんを含む膵臓の組織切片のｒＢＣ２ＬＣＮ（図中では、単に「ｒＢＣ２」と記載することがある）を用いた組織学染色、並びにＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰに対する免疫組織学染色の結果を示す。
【図１０】図１０は、２分子のＢＣ２ＬＣＮを用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイ、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたＥＬＩＳＡ、抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたＥＬＩＳＡの系における、健常者、慢性膵炎患者、および膵がん患者の血液サンプルの分析結果を示す。
【図１１】図１１は、２分子のＢＣ２ＬＣＮを用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイ、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたＥＬＩＳＡ、抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたＥＬＩＳＡの系における、健常者および慢性膵炎患者に対して膵がん患者を検出するＲＯＣ曲線を示す。分析は、血液サンプルを用いて行った。
【図１２】図１２は、２分子のＢＣ２ＬＣＮを用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイ、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたＥＬＩＳＡ、抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたＥＬＩＳＡの系における、健常者に対してステージＩの膵がん患者を検出するＲＯＣ曲線を示す。分析は、血液サンプルを用いて行った。
【図１３】図１３は、２分子のＢＣ２ＬＣＮを用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイ、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたＥＬＩＳＡ、抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたＥＬＩＳＡの系における、健常者に対してステージＩＩの膵がん患者を検出するＲＯＣ曲線を示す。分析は、血液サンプルを用いて行った。
【図１４】図１４は、２分子のＢＣ２ＬＣＮを用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイの系における、健常者に対してステージＩＩＩの膵がん患者を検出するＲＯＣ曲線を示す。分析は、血液サンプルを用いて行った。
【図１５】図１５は、２分子のＢＣ２ＬＣＮを用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイ、ＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイの系における、健常者に対してステージＩＶの膵

がん患者を検出するＲＯＣ曲線を示す。分析は、血液サンプルを用いて行った。
【図１６】図１６は、膵がん摘出手術の前、当該手術の３０日後（３０ＰＯＤ）、および当該手術の３ヶ月後（３ｍ）の患者の血液サンプルを、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイにより分析した結果を示す。
【図１７】図１７は、膵がん摘出手術の前、当該手術の３０日後（３０ＰＯＤ）、および当該手術の３ヶ月後（３ｍ）の患者の血液サンプルを、ＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイにより分析した結果を示す。
【図１８】図１８は、膵がん摘出手術の前、当該手術の３０日後（３０ＰＯＤ）、および当該手術の３ヶ月後（３ｍ）の患者の血液サンプルを、ＣＡ１９－９を用いたＥＬＩＳＡＡにより分析した結果を示す。
【図１９】図１９は、膵がん摘出術の前、当該手術の１日後（１ＰＯＤ）、当該手術の７日後（７ＰＯＤ）、および当該手術の３０日後（３０ＰＯＤ）、および再発後の患者（患者Ａ）の血液サンプルを、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイで分析した結果を示す。
【発明の具体的な説明】
【００１０】
本明細書では、「対象」とは、哺乳動物、特に、ヒトを含むほ乳類を意味する。本明細書では、「対象」は、健常者であり得、または、がんを有する患者であり得、若しくはがんを有する可能性を有する患者であり得る。
【００１１】
本明細書では、「腫瘍」とは、自立性増殖を示す細胞集団を意味する。自立性増殖とは、体内の正常な細胞増殖制御を逃れて、自律的に増殖を続ける細胞の性質を意味する。腫瘍は、良性腫瘍と悪性腫瘍（がん）に大別される。良性腫瘍は、自立性増殖をするが、転移および浸潤、並びに悪液質を起こすことがない腫瘍である。悪性腫瘍は、自律増殖に加えて、正常組織への浸潤、転移、および悪液質のいずれか１以上を起こす。
【００１２】
本明細書では、「生体サンプル」とは、対象から得られるサンプル（例えば、組織、細胞、細胞外液、および体液）を意味する。体液としては、血液、尿、腹水、胸水、および分泌液（例えば、内分泌液および外分泌液、例えば、膵液などの消化液）が挙げられる。本明細書では、「血液サンプル」とは、対象から得られる血液（例えば、末梢血）または血液に由来するサンプル（例えば、血清および血漿）である。本明細書では、「血液成分」とは、血液に含まれる成分であり、特に血液に含まれる液体成分である。本明細書では、後述するように、生体サンプルが血液サンプルである場合、成分は血液成分である。
【００１３】
本明細書では、「抗体」は、免疫グロブリンを意味する。抗体は、抗原に対して結合する特性を有する生体分子である。抗体は、抗原に対して特異性を有し得る。抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、二重特異性抗体を含み得る。抗体は、全長の抗体と、抗原に対する結合性を有するその断片であり得る。
【００１４】
本明細書では、「ＢＣ２ＬＣＮ」とは、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ由来のレクチンであるＢＣ２Ｌ－ＣのＮ末端ドメインである（Ｓｕｌａｋ，Ｏ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，１８（１）：５９-７２，２０１０）。以前の報告によれば、ＢＣ２ＬＣＮは、糖タンパク質糖鎖であるＨ－ｔｙｐｅ１（Ｆｕｃα１－２Ｇａｌβ１－３ＧｌｃＮＡｃ）およびＨ－ｔｙｐｅ３（Ｆｕｃα１－２Ｇａｌβ１－３ＧａｌＮＡｃ）に親和性を有することが明らかにされ、かつ、ＢＣ２ＬＣＮは、Ｈ－ｔｙｐｅ３糖鎖を有するポドカリキシンを発現するヒトＥＳ細胞やｉＰＳ細胞の未分化マーカーとして用いることができることが明らかにされている（ＷＯ２０１４／１２３６１４６）。また、以前の報告によれば、ＢＣ２ＬＣＮは、がんの組織に特異的に発現し、がんを検出するものとして用いることができることが明らかにされている（ＷＯ２０１７／０６１４４９）。ＷＯ２０１７／０６１４４９によれば、ＢＣ２ＬＣＮとケラタン硫酸に結合する抗

体とのサンドイッチアッセイによって、一部のがん患者の血液成分において、ＢＣ２ＬＣＮとケラタン硫酸により認識されるタンパク質の存在が確認されている。本明細書では、大腸菌等のＢ．　ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ以外の宿主を用いて産生されたＢＣ２ＬＣＮを、組換えＢＣ２ＬＣＮまたはｒＢＣ２ＬＣＮということがある。本明細書では、ＢＣ２ＬＣＮが結合する糖鎖またはタンパク質を、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖またはタンパク質という。ＢＣ２ＬＣＮ結合性のタンパク質は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖により修飾されている。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖は、Ｈ－ｔｙｐｅ１の糖鎖および／またはＨ－ｔｙｐｅ３の糖鎖であり得る。ＢＣ２ＬＣＮとしては、例えば、米国国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）においてＹＰ＿００２２３２８１８として登録されたレクチンが挙げられる。ＢＣ２ＬＣＮとしては糖鎖に対する結合能を有する限り用いることができるが、ＢＣ２ＬＣＮとしては、ＪＰ２０２０－１４６０２７に開示されるような糖鎖に対する結合能を改変（例えば、向上）したものを用いることもできる。ＢＣ２ＬＣＮの改変体を用いてもよい。ＢＣ２ＬＣＮとしては、ＹＰ＿００２２３２８１８として登録されたレクチンのアミノ酸配列と９０％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上または１００％同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（ＢＣ２ＬＣＮ）が挙げられる。ＢＣ２ＬＣＮは、少なくともＨ－ｔｙｐｅ３糖鎖およびＨ－ｔｙｐｅ１糖鎖からなる群から選択される1以上に結合する。

【００１５】

本明細書では、「ＳｅｒｐｉｎＡ３」とは、α１アンチキモトリプシン（ＡＡＣＴ）としても知られるセリンプロテアーゼ阻害剤（セルピン）である。ヒトでは、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｋ０１５００．１として登録された塩基配列を有するｍＲＮＡから翻訳されて得られるタンパク質であり得る。ヒトでは、ＳｅｒｐｉｎＡ３のタンパク質は、４２３アミノ酸長の前駆体（例えば、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００１０７６．２）から１～２３番目のアミノ酸配列からなるシグナルペプチドが切断されて生じ得る。

【００１６】

本明細書では、「Ｇａｌ３ＢＰ」とは、ガレクチン－３－結合タンパク質である。Ｇａｌ３ＢＰは、米国国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）参照番号ＮＭ＿００５５６７．４として登録された塩基配列を有するｍＲＮＡから翻訳されて得られるタンパク質であり得る。ヒトでは、Ｇａｌ３ＢＰのタンパク質は、例えば、５８５アミノ酸長の前駆体（例えば、ＮＣＢＩ参照番号：ＮＰ＿００５５５８．１として登録されたアミノ酸配列を有する）から１～１８番目のアミノ酸配列からなるシグナルペプチドが切断されて生じ得る。Ｇａｌ３ＢＰは、血清中では９０ｋＤａの分子量を有し、乳がん、肺がん、直腸結腸がん、卵巣がん、および子宮内膜がんの患者の血清で高濃度で見出される（Ｋｏｔｈｓ，Ｋ．ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１４２４５－１４２４９，１９９３）。

【００１７】

本明細書では、「サンドイッチアッセイ」とは、サンプルに含まれる目的成分を検出することに用いられるアッセイである。サンドイッチアッセイは、当業者であれば常法により実施することができる。サンドイッチアッセイは、通常は、支持体（例えば、基板およびビーズ）に固相化された目的成分に結合する捕捉分子Ａに当該目的成分を接触させて、支持体上に目的成分を捕捉し、その後、未結合の当該目的成分を除去した（または分離した）後に、標識された当該目的成分に結合する捕捉分子Ｂを接触させて、支持体上に補足された目的成分を標識を指標として検出するアッセイである。本発明で用いられ得る支持体としては、通常の免疫学的測定法で用いられる支持体（特に、不溶性の支持体）であれば何れも使用可能であるが、例えば、ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリルアミド、ポリグリシジルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリエステル、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンラバー、アガロース、デキストラン、エチレン－無水マレイン酸共重合物等の有機物；ガラス、酸化ケイ素、ケイソウ、多孔性ガラス、スリガラス、アルミナ、シリカゲル、金属酸化物等の無機物質；鉄、コバルト、ニッケル、マグネタイト、クロマイト等の磁性体等；及びこれ

らの磁性体の合金を材料として調製されたものが挙げられる。固相化は、固相（例えば、ビーズ、磁気ビーズ、メンブレン、プレートなどのあらゆる表面）に対してなされ得る。磁気ビーズは、市販の様々なものを用いることができる。磁気ビーズとしては、例えば、ＷＯ２０１２／１７３００２Ａに開示されるビーズを用いてもよい。サンドイッチアッセイでは、通常、固相化される上記捕捉分子Ａと標識された上記捕捉分子Ｂとは、目的成分との結合に関して互いに競合せず、同時に目的成分に結合する必要がある。捕捉分子Ａは、以下に説明する第１の分子であり得、捕捉分子Ｂは、第２の分子であり得る。捕捉分子Ａは、以下に説明する第２の分子であり得、捕捉分子Ｂは、第１の分子であり得る。

【００１８】

サンドイッチアッセイは、マイクロ流体チップ（ｍｉｃｒｏ－ｔｏｔａｌ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｓｙｓｔｅｍｓ；μＴＡＳ）によって行うこともできる。マイクロ流体チップは、流路を備え、流路はサンプル導入口を有し、例えば、サンプル導入口において、ポリカチオンまたはポリアニオン（例えば、ＤＮＡ）を結合した捕捉分子Ｘとサンプルとを接触させて捕捉分子Ｘと目的成分との複合体を形成させ、電場をかけて複合体を移動させ、流路の途中に存在する標識された捕捉分子Ｙと複合体が接触すると、目的成分と捕捉分子Ｘと捕捉分子Ｙの複合体が形成され、更に電場により複合体は、流路を移動し、流路上の検出部に到達し、そこで捕捉分子Ｙに結合した標識によって検出され得る。検出は、例えば、レーザー等により光学的に実施され得る。捕捉分子Ｘは、以下に説明する第１の分子であり得、捕捉分子Ｙは、第２の分子であり得る。捕捉分子Ｘは、以下に説明する第２の分子であり得、捕捉分子Ｙは、第１の分子であり得る。μＴＡＳを用いて複数のバイオマーカーの存在を並列的に検出することもできる。

その他サンドイッチアッセイとしては、補足分子Ｎと補足分子Ｍとがそれぞれ別のビーズＡおよびＢに固相化され、目的分子が存在するときには、目的分子、補足分子Ｎおよびビーズ Ａ並びに補足分子Ｍおよびビーズ Ｂとが複合体を形成し、励起によって一重項酸素を放出するフォトセンシタイザーを含むビーズＡに励起光を照射することによって、複合体が形成されているとき（ビーズＡとＢとが近接しているとき）のみビーズＢに一重項酸素が到達し、それによりビーズＢが化学発光するようにして、ビーズＢからの光を検出することによって目的分子の存在を検出するアッセイ（例えば、ＡｌｐｈａＬＩＳＡ）が挙げられる。従って、本発明では、ＢＣ２ＬＣＮが固相化されたビーズと、ＳｅｒｐｉｎＡ３またはＧａｌ３ＢＰに結合する抗体が固相化されたビーズとを含む、ＡｌｐｈａＬＩＳＡアッセイキットが提供されうる。本発明では、第１の蛍光分子で標識されたＢＣ２ＬＣＮと第２の蛍光分子で標識されたＳｅｒｐｉｎＡ３またはＧａｌ３ＢＰに結合する抗体との間の蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）および生体発光共鳴エネルギー転移（ＢＲＥＴ）等を用いて目的分子の存在を検出するアッセイキットも用い得る。この場合には、固相化のためのビーズや支持体は必要ではない。本発明では、そのようなアッセイ用のキットが提供されうる。

【００１９】

本明細書では、「イムノクロマトアッセイ」とは、サンプルに含まれる目的成分を検出することに用いられるアッセイであり、通常は、金コロイド等の標識で標識された捕捉分子Ｃと液体試料に含まれる目的成分とを接触させ、標識捕捉分子Ｃと目的成分との複合体を形成させ、その後クロマトメンブレン上を複合体に移動させ、テストライン上に固相化されている補足分子Ｄに接触させて、テストライン上に標識捕捉分子Ｃと目的成分との複合体を捕捉させ、テストライン上の標識を指標として検出するアッセイである。イムノクロマトアッセイでは、通常、標識された捕捉分子Ｃとテストライン上に固相化されている捕捉分子Ｄとは、目的成分との結合に関して互いに競合せず、同時に目的成分に結合する必要がある。イムノクロマトアッセイでは、テストラインの他に対照ラインが設けられ、対照ラインには、捕捉分子Ｃに結合する分子（抗体等であり、捕捉分子ＣがＩｇＧ抗体の場合は抗ＩｇＧ抗体であり得る）が固相化され、目的成分と結合しなかった標識捕捉成分Ｃを捕捉することができる。イムノクロマトアッセイでは、サンプルを含ませるサンプルパッドと、標識捕捉分子Ｃが存在するコンジュゲートパッドと、サンプル中の目的成分と

捕捉分子Ｃとの複合体が移動する移動層であるメンブレンと、サンプル中の水分を吸収する吸収パッドとをこの順番で含むストリップが提供され、メンブレン上には、捕捉分子Ｄが固相化されたテストラインと捕捉分子Ｃに対する抗体が固相化された対照ラインが存在する。サンプルパッドにサンプルを含ませると、サンプルが目的成分を含む場合は、ストリップ上を吸収パッドに向けて移動する。コンジュゲートパッドに移動したところで、標識捕捉分子Ｃと目的成分とが複合体を形成し、複合体はテストラインに固相化された捕捉分子Ｄに捕捉され、かつ、対照ラインにも捕捉される。サンプルが目的成分を含まない場合は、サンプルは吸収パッドに向けて移動し、標識捕捉分子Ｃは、複合体を形成せず、テストラインに捕捉されることはなく、対照ラインにのみ捕捉されることとなる。結果、対照ラインが発色し、テストラインが発色した場合には、サンプルに目的成分が含まれていることが示され、対照ラインが発色し、テストラインが発色しない場合には、サンプルに目的成分が含まれていないことが示される。対照ラインが発色しない場合は、イムノクロマトによる評価系が正しく作動していないと判断することができる。捕捉分子Ｃは、以下に説明する第１の分子であり得、捕捉分子Ｄは、第２の分子であり得る。捕捉分子Ｃは、以下に説明する第２の分子であり得、捕捉分子Ｄは、第１の分子であり得る。

【００２０】

本明細書では、「レクチン電気泳動」は、レクチンを含むゲルを用いた電気泳動であり、電気泳動中にレクチンと相互作用する分子は、移動速度が、相互作用しない分子よりも遅くなることを利用した、レクチン結合分子の分離方法である。レクチンは、ゲル中に遊離しているか、または、ゲル上に固相化されている。レクチンは、電気泳動によってほとんど移動しないため、単にゲルの材料と混合してゲルを作製することによって、糖タンパク質の泳動速度を低下させることができる。あるいは、レクチンは、ゲルに対して非共有結合または共有結合で連結されている。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の分子を、ＢＣ２ＬＣＮに対して非結合性の分子と分離する場合には、レクチンとしてＢＣ２ＬＣＮを用いたレクチン電気泳動により、生体サンプルを分離することができる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有する分子は、泳動中にゲル上に固相化されたレクチンと相互作用を繰り返すために、泳動が遅延する。他方で、ＢＣ２ＬＣＮ非結合性の分子は、ゲル上に固相化されたレクチンとの相互作用がなく、泳動が早い。この原理を用いると、電気泳動によって、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有する分子と、ＢＣ２ＬＣＮ非結合性との分子を分離することができる。レクチン電気泳動は、当業者であれば適宜実施することができる。

【００２１】

本明細書では、「レクチンアフィニティークロマトグラフィー」は、レクチンが糖鎖と特異的に結合する性質を有することを利用したクロマトグラフィーである。レクチンアフィニティークロマトグラフィーでは、例えば、レクチンを固相化した不溶性の支持体を含むカラムを用いて、試料に対してアフィニティークロマトグラフィーを行う。試料中の成分がレクチンに親和性を有する場合には、当該成分は、他の成分から分離されることとなる。本発明では、レクチンとしては、例えば、ＢＣ２ＬＣＮを用いることができる。

【００２２】

本発明によれば、様々ながんを有する患者の血清を分析したところ、固相化したＢＣ２ＬＣＮと標識したＢＣ２ＬＣＮとを用いたサンドイッチアッセイにおいて、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる血液成分が存在すること、およびがんを有する患者における当該血液成分の血清中の量が、健常者よりも高い傾向があることを見出した。

本発明によればまた、様々ながんを有する患者の血清を分析したところ、ＢＣ２ＬＣＮとＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体とを用いたサンドイッチアッセイにおいて、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３が血液成分として存在すること、およびがんを有する患者におけるＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３の血清中の量が、健常者よりも高い傾向があることを見出した。

本発明によればさらに、様々ながんを有する患者の血清を分析したところ、ＢＣ２ＬＣＮとＧａｌ３ＢＰに結合する抗体とを用いたサンドイッチアッセイにおいて、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰが血液成分として存在すること、およびがんを有する患者におけ

るＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰの血清中の量が、健常者よりも高い傾向があることを見出した。

【００２３】

本発明によれば、

対象から得られた生体サンプルを分析する方法であって、

対象から得られた生体サンプル中のＳｅｒｐｉｎＡ３（例えば、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３）およびＧａｌ３ＢＰ（例えば、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰ）からなる群から選択される１以上の成分（「目的成分」ということがある）を検出することを含む、

方法

が提供される。本発明の方法では、生体サンプルを用意することを含んでもよい。本発明の方法では、上記の成分の量を測定することをさらに含んでもよい。

【００２４】

本発明によれば、ＳｅｒｐｉｎＡ３（例えば、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３）およびＧａｌ３ＢＰ（例えば、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰ）からなる群から選択される１以上の成分は、当該成分に結合する分子を用いて検出することができる。

ある態様では、上記１以上の成分をそれ以外の成分から分離してから、前記１以上の成分を検出することができる。

例えば、ＳｅｒｐｉｎＡ３は、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子を用いて検出することができる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に同時に結合することができる２つの異なる分子を用いることもできる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に同時に結合することができる２つの異なる分子を用いると、イムノクロマトアッセイやサンドイッチアッセイによってＳｅｒｐｉｎＡ３を検出することができる。ＳｅｒｐｉｎＡ３はまた、質量分析によっても検出することができる。いずれの場合もＳｅｒｐｉｎＡ３の標準物質を用いて検量線を得ることができる。また、得られた検証線に対して、ＳｅｒｐｉｎＡ３に関する測定値をあてはめて、ＳｅｒｐｉｎＡ３を定量することができる。

また、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子とＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子を用いて検出することができる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子が、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子を用いて、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の分子をそれ以外と分離することを含んでいてもよいし、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子が、ＢＣ２ＬＣＮである場合、レクチンアフィニティークロマトグラフィーやレクチン電気泳動を用いて、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の分子をそれ以外と分離することを含んでいてもよい。また、ＳｅｒｐｉｎＡ３をそれ以外の成分と分離することを含んでいてもよい。ＳｅｒｐｉｎＡ３の分離と、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の成分の分離は、どちらを先に実施してもよい。

例えば、Ｇａｌ３ＢＰは、Ｇａｌ３ＢＰに結合する分子を用いて検出することができる。Ｇａｌ３ＢＰに同時に結合することができる２つの異なる分子を用いることもできる。Ｇａｌ３ＢＰに同時に結合することができる２つの異なる分子を用いると、イムノクロマトアッセイやサンドイッチアッセイによってＧａｌ３ＢＰを検出することができる。Ｇａｌ３ＢＰはまた、質量分析によっても検出することができる。いずれの場合もＧａｌ３ＢＰの標準物質を用いて検量線を得ることができる。また、得られた検証線に対して、Ｇａｌ３ＢＰに関する測定値をあてはめて、Ｇａｌ３ＢＰを定量することができる。

また、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰは、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子とＧａｌ３ＢＰに結合する分子を用いて検出することができる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子が、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子を用いて、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の分子をそれ以外と分離することを含んでいてもよいし、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子が、ＢＣ２ＬＣＮである場合、レクチン電気泳動を用いて、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の分子をそれ以外と分離することを含んでいてもよい。また、Ｇａｌ３ＢＰをそれ以外の成分と分離することを含んでいてもよい。Ｇａｌ３ＢＰの分離と、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の成分の分離は、どちらを先に実施してもよい。

【００２５】
本発明によれば、
対象から得られた生体サンプルを分析する方法であって、
ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるアッセイによって、生体サンプル中に含まれる成分（「目的成分」ということがある）を分析することを含む、方法
が提供される。
【００２６】
生体サンプルは、上記対象から得られた生体サンプルである。対象は、がんを有する、またはがんを有する可能性を有する対象であり得る。がんは、例えば、膵がんであり得る。膵がんは、例えば、ステージＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、およびＩＶからなる群から選択されるステージの膵がんであり得、例えば、ステージＩの膵がんであり得、例えば、ステージＩＩの膵がんであり得る。生体サンプルとしては、例えば、組織、細胞、および体液が上げられる。体液としては、血液（例えば、血漿および血清）、汗、唾液、尿、腹水、胸水、および分泌液（例えば、内分泌液および外分泌液、例えば、膵液などの消化液）が挙げられる。組織および細胞はそれぞれ、例えば、がんであるか、またはがんであると疑われる組織および細胞とすることができる。組織および細胞はそれぞれ、例えば、がんであるか、またはがんであると疑われる部分を含む。
【００２７】
ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子としては、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する抗体またはその抗原結合性断片が挙げられる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子としてはまた、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合するアプタマー（例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡからなる群から選択される核酸アプタマー）が挙げられる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子としてはさらに、環状ペプチドなどの中分子が挙げられる。これらのＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子は、当業者に周知の方法によって取得することができる。例えば、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する抗体は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を免疫した非ヒト哺乳動物から得ることができる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合するアプタマーは、核酸プールからＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に対する親和性を利用して取得することができる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する環状ペプチドは、環状ペプチドプールからＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に対する親和性を利用して取得することができる。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子は、例えば、ＢＣ２ＬＣＮであり得る。
【００２８】
ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子としては、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体またはその抗原結合性断片が挙げられる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子としてはまた、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合するアプタマー（例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡからなる群から選択される核酸アプタマー）が挙げられる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子としてはさらに、環状ペプチドなどの中分子が挙げられる。これらのＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子は、当業者に周知の方法によって取得することができる。例えば、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体は、ＳｅｒｐｉｎＡ３を免疫した非ヒト哺乳動物から得ることができる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合するアプタマーは、核酸プールからＳｅｒｐｉｎＡ３に対する親和性を利用して取得することができる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する環状ペプチドは、環状ペプチドプールからＳｅｒｐｉｎＡ３に対する親和性を利用して取得することができる。ＳｅｒｐｉｎＡ３は、生体試料中で他の成分と複合体を形成している場合がある。本発明では、そのような複合体を検出してもよい。例えば、ＳｅｒｐｉｎＡ３と複合体を形成する他の成分としてはＰＳＡがあげられる。したがって、ＰＳＡに結合する分子とＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子を用いてＳｅｒｐｉｎＡ３を検出することもできる。または、標識した組換えＰＳＡを用いて、ＳｅｒｐｉｎＡ３がＰＳＡに結合する性質を利用してＳｅｒｐｉｎＡ３を検出することもできる。
【００２９】

Ｇａｌ３ＢＰに結合する分子としては、Ｇａｌ３ＢＰに結合する抗体またはその抗原結合性断片が挙げられる。Ｇａｌ３ＢＰに結合する分子としてはまた、Ｇａｌ３ＢＰに結合するアプタマー（例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡからなる群から選択される核酸アプタマー）が挙げられる。Ｇａｌ３ＢＰに結合する分子としてはさらに、環状ペプチドなどの中分子が挙げられる。これらのＧａｌ３ＢＰに結合する分子は、当業者に周知の方法によって取得することができる。例えば、Ｇａｌ３ＢＰに結合する抗体は、Ｇａｌ３ＢＰを免疫した非ヒト哺乳動物から得ることができる。Ｇａｌ３ＢＰに結合するアプタマーは、核酸プールからＧａｌ３ＢＰに対する親和性を利用して取得することができる。Ｇａｌ３ＢＰに結合する環状ペプチドは、環状ペプチドプールからＧａｌ３ＢＰに対する親和性を利用して取得することができる。Ｇａｌ３ＢＰは、生体試料中で他の成分と複合体を形成している場合がある。本発明では、そのような複合体を検出してもよい。例えば、Ｇａｌ３ＢＰと複合体を形成する他の成分としてはガレクチン（特に、ガレクチン３）があげられる。したがって、ガレクチン（特に、ガレクチン３）に結合する分子とＧａｌ３ＢＰに結合する分子を用いてＧａｌ３ＢＰを検出することもできる。または、標識した組換えガレクチン（特に、ガレクチン３）を用いて、Ｇａｌ３ＢＰがガレクチン（特に、ガレクチン３）に結合する性質を利用してＧａｌ３ＢＰを検出することもできる。

【００３０】

本発明によれば、対象から得られた生体サンプル（例えば、血液サンプル）を分析する方法であって、

生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の成分（特定成分、例えば、血液成分）の有無または濃度を分析することを含み、成分（例えば、血液成分）は、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＳｅｒｐｉｎＡ３（例えば、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３）、およびＧａｌ３ＢＰ（例えば、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰ）からなる群から選択される成分（目的成分（例えば、目的血液成分）ということがある）である、方法が提供される。本発明の分析方法においては、上記成分の１、２またはすべてが検出された場合には、対象ががんである可能性が示される。本発明の分析方法においては、上記成分の１つの濃度が、カットオフ値よりも大きい場合には、対象ががんである可能性が示される。

【００３１】

本発明の分析方法では、対象は、ヒトであり得、例えば、健常者、がんを有する患者、およびがんを有する可能性を有する患者であり得る。

【００３２】

ある態様では、がんは、膵がん、大腸がん、直腸腺がん、膀胱がん、乳がん、非小細胞肺がん、胃がん、子宮頸部がん、子宮体がん、肝細胞がん、甲状腺がん、前立腺がん、メラノーマ、食道がん、卵巣がん、胆管がん、非ホジキンリンパ腫、および慢性骨髄性白血病からなる群から選択される１以上のがんであり得る。ある態様では、がんは、膵がんであり得る。ある態様では、膵がんは、ステージＩおよびＩＩからなる群から選択されるステージの膵がんであり得る。ある態様では、膵がんは、ステージＩであり得る。ある態様では、膵がんは、ステージＩＩであり得る。

【００３３】

ある態様では、目的成分または目的血液成分は、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分である。ある態様では、目的成分または目的血液成分は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３である。ある態様では、目的成分または目的血液成分は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰである。これらの態様において、がんは、上記の通りであり得るが、例えば、膵がん、大腸がん、直腸腺がん、膀胱がん、乳がん、子宮体がん、肝細胞がん、甲状腺がん、メラノーマ、食道がん、胆管がん、卵巣がん、非ホジキンリンパ腫、および慢性骨髄性白血病からなる群から選択される１以上のがんであり得る。ある態様では、がんは、膵がんであり得る。ある態様では、膵がんは、ステージＩおよびＩＩからなる群から選択されるステージの膵がんであり得る。ある態様では、膵がんは、ステージＩであり得る。ある態様では、膵がんは、ステージＩＩであり得る。

【００３４】
ある態様において、カットオフ値は、例えば、０、健常者群の目的成分（例えば、目的血液成分）濃度の第１四分位値、平均値、第３四分位値、若しくは最大値、またはこれらのいずれか２つの間の値（例えば、第３四分位値若しくは最大値またはその間の値）とすることができる。ある態様において、カットオフ値は、例えば、０、がん患者群の目的成分（例えば、目的血液成分）濃度の第１四分位値、平均値、第３四分位値、若しくは最大値、またはこれらのいずれか２つの間の値とすることができる。
ある態様において、カットオフ値は、ＲＯＣ曲線上の感度１および特異度１の点からの距離が最も近い点におけるカットオフ値、当該カットオフ値より大きな値、または当該カットオフ値よりも小さな値であり得る。ある態様において、カットオフ値はまた、Ｙｏｕｄｅｎ Ｉｎｄｅｘが最大値となる点におけるカットオフ値、当該カットオフ値より大きな値、または当該カットオフ値よりも小さな値であり得る。
【００３５】
カットオフ値は、感度と偽陽性率との兼ね合いによって決めることができる。カットオフ値は、擬陽性が多くてもがん患者をできるだけ多く検出したい場合（感度を高めたい場合）には、低く設定することができ、擬陽性を減らしたい（その代わり、感度が低下してもよい場合）には、高く設定することができ、当業者であれば、検査の目的に応じて適宜設定することができる。
【００３６】
本発明の分析方法において、対象から得られた生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の目的成分（例えば、目的血液成分）の濃度がカットオフ値よりも大きい場合には、当該対象は、がんを有する可能性があるとの情報を得ることができる。従って、本発明の分析方法は、対象から得られた生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の目的成分（例えば、目的血液成分）の濃度がカットオフ値よりも大きい場合に、当該対象が、がんを有する可能性があることを示す情報を提供することを含みうる。
【００３７】
本発明の分析方法において、対象から得られた生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の目的成分（例えば、目的血液成分）の濃度がカットオフ値よりも大きい場合には、当該対象は、膵がんを有する可能性があるとの情報を得ることができる。従って、本発明の分析方法は、対象から得られた生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の目的成分（例えば、目的血液成分）の濃度がカットオフ値よりも大きい場合に、当該対象が、膵がんを有する可能性があることを示す情報を提供することを含みうる。
【００３８】
本発明の分析方法においては、早期がん（ステージＩおよびＩＩ）を有する患者の生体サンプル（例えば、血液サンプル）中においても目的成分（例えば、目的血液成分）が検出されうる。従って、本発明の分析方法は、対象から得られた生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の目的成分（例えば、目的血液成分）の濃度がカットオフ値よりも大きい場合に、当該対象が、早期がんを有する可能性があることを示す情報を提供することを含みうる。早期がんは、早期膵がんであり得る。膵がんのステージ分類は、ＵＩＣＣ ＴＮＭ分類（ＵＩＣＣ： ＴＮＭ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍａｌｉｇｎａｎｔ Ｔｕｍｏｕｒｓ， ８ｔｈ Ｅｄｎ． Ｗｉｌｅｙ－Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ； ２０１７．９４－９５）に基づいて医師が決定することができる。ステージＩは、ステージ１Ａおよび１Ｂを含み、ステージＩＩは、ステージ２Ａと２Ｂを含む。ステージＩＩＩおよびＩＶは、ステージ３および４とそれぞれ同義である。
【００３９】

【表１】

表１：膵がんのステージ分類（ＵＩＣＣ　ＴＭＮ分類、第８版）

| | 領域リンパ節への転移 | | | 離れた臓器への転移 |
|---|---|---|---|---|
| | なし | あり | | |
| | | １～３個 | ４個以上 | |
| がんの大きさが２ｃｍ以下 | １Ａ | ２Ｂ | ３ | ４ |
| がんの大きさが２ｃｍ超４ｃｍ以下 | １Ｂ | | | |
| がんの大きさが４ｃｍ超 | ２Ａ | | | |
| がんが、腹腔動脈、上腸間膜動脈、または総肝動脈に及ぶ | ３ | | | |

【００４０】
情報の提供は、情報の送信または出力により行うことができる。情報の出力は、ディスプレイまたは印刷物上になされ得る。
【００４１】
本発明の分析方法は、さらに対象ががんを有する可能性を有すると決定することを含んでいてもよい。
【００４２】
本発明によれば、本発明の分析方法においてがんを有する可能性があると決定された対象の少なくとも一部をがん療法に供することを含む、がんを処置する方法が提供される。がん療法としては、放射線療法、化学療法、および外科的療法からなる群から選択される１以上が挙げられる。がん療法は、標準療法であり得る。放射線療法は、がんに対して放射線を照射することを含み得る。化学療法は、対象に抗がん剤を投与することを含み得る。外科的療法は、がんを切除することを含み得る。がん（例えば、膵臓がん）に対する化学療法としては、例えば、フォルフィリノックス療法、ゲムシタビン・ナブパクリタキセル療法（ＧｎＰ療法）、ゲムシタビン・Ｓ１療法（ＧＳ療法）、リポソーマルイリノテカン・５ＦＵ／ＬＶ療法（Ｎａｌ－ＩＲＩ／ＦＬ療法）、ゲムシタビン療法、およびＳ１療法などが挙げられ、これらの療法のいずれか１以上により対象を処置することができる。抗がん剤としては、例えば、オキサリプラチンなどの白金製剤、イリノテカン、リポソーム型イリノテカン、レボホリナート、ゲムシタビン、ナブパクリタキセル、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、およびＳ－１からなる群から選択される１以上が挙げられる。
本発明によれば、上記の抗がん剤からなる群から選択される１以上の治療上有効量を含む医薬組成物であって、本発明の分析方法においてがんを有する可能性があると決定された対象においてがんを処置することに用いるための医薬組成物が提供され得る。医薬組成物は、医薬有効成分に加えて、薬学上許容可能な賦形剤をさらに含んでいてもよい。薬学上許容可能な賦形剤は、当業者であれば適宜選択することができる。
【００４３】
本発明の分析方法のある態様では、
対象から得られた生体サンプル（例えば、血液サンプル）中を分析する方法であって、
ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるサンドイッチアッセイまたはイムノクロマトアッセイによって、生体サンプル（例えば、血液サンプル）中に含まれる成分（例えば、血液成分）を分析することを含む、方法が提供される。
【００４４】
ある態様では、第１の分子は、支持体（例えば、基板）に固相化され、第２の分子は、標識され得る。ある態様では、第１の分子は、標識され、第２の分子は、支持体に固相化

され得る。

【００４５】

固相化は、例えば、直接法、ポリスチレンタグ法（ＷＯ２０１８／１９０３５７）、ビオチン－ストレプトアビジン法、ＨａｌｏＴａｇ法、アミンカップリング法などの化学結合を用いた方法、およびＶ５タグ法などの公知の固相化法を用いることができる。直接法では、固相化される捕捉分子は、そのまま支持体と接触され、これにより、支持体上に固相化される。ポリスチレンタグ法では捕捉分子に融合させたポリスチレンタグを介して、ポリスチレンプレートに固相化される。ビオチン－ストレプトアビジン法では、ストレプトアビジンで被覆した支持体に対して、ビオチンで修飾した捕捉分子が結合することにより、捕捉分子が支持体上に固相化される。ＨａｌｏＴａｇ法では、捕捉分子に融合させたＨａｌｏＴａｇタンパク質を介して、ＨａｌｏＴａｇで被覆した支持体上に捕捉分子が固相化される。アミンカップリング法では、固相表面に形成したカルボキシル基を活性エステル化し、アミノ基を介してタンパク質などを化学結合により固定化することができる。Ｖ５タグ法では、抗Ｖ５タグ抗体で被覆した支持体に対して、Ｖ５タグを連結させた捕捉分子を結合することにより、捕捉分子が支持体上に固相化される。

【００４６】

標識としては、サンドイッチアッセイにおいては、基質（発色基質、蛍光基質、および発光基質）、酵素抗体法で用いられる酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、およびアルカリフォスファターゼ）を用いることができる。標識は、当業者であれば常法を用いて行うことができる。標識は、例えば、共有結合性に行うことができる。標識は、例えば、ビオチン連結抗体とアビジン連結標識とを反応させて行ってもよい。基質としては、例えば、蛍光基質が挙げられる。ペルオキシダーゼとしては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼが用いられ得る。西洋ワサビペルオキシダーゼは、発色基質、蛍光基質または発光基質を加えることにより発色、蛍光または化学発光を生じる。従って、発色、蛍光または化学発光を指標として標識した捕捉分子の存在を検出することができる。西洋ワサビペルオキシダーゼの発色基質としては、例えば、テトラメチルベンジダイン（ＴＭＢ）、ｏ－フェニレンジアミン（ＯＰＤ）、２，２－アジノビス［３－エチルベンゾ－チアゾリン－６－スルホン酸（ＡＢＴＳ）、およびＡｍｐｌｅｘ（商標）Ｒｅｄが挙げられ、過酸化水素存在下において、標識分子の検出に用いることができる。アルカリフォスファターゼの発光基質としては、ｐ－ニトロフェニルホスフェート（ｐＮＰＰ）、４－メチルウンベリフェリルホスフェート（４－ＭＵＰ）、およびＡｔｔｏＰｈｏｓ（商標）が挙げられ、捕捉分子の検出に用いることができる。グルコースオキシダーゼは、グルコースを酸化し、グルコン酸と過酸化水素を発生する。過酸化水素は、例えば、過酸化水素検出用の比色プローブ（例えば、ペルオキシダーゼ）を用いて容易に検出できる。過酸化水素は、例えば、ペルオキシダーゼとその発色基質存在下において、発色させることができる。

【００４７】

標識としては、イムノクロマトアッセイにおいては、色素（例えば、着色料、例えば、金コロイド）を用いることができる。

【００４８】

ある態様では、第１の分子は、ＢＣ２ＬＣＮである。この態様では、ＢＣ２ＬＣＮとしては、組換えＢＣ２ＬＣＮを用いることができる。ＢＣ２ＬＣＮは、直接固相化しても、例えば、ビオチン標識した上でストレプトアビジン（またはニュートラビジン）被覆された支持体に対して固相化してもよい。その他、ＢＣ２ＬＣＮをＨａｌｏＴａｇタンパク質と融合させた上でＨａｌｏＴａｇリガンドで被覆された支持体に固相化してもよい。また、ＢＣ２ＬＣＮにポリスチレンタグを融合させた上でポリスチレンプレートに直接固相化しても良い。サンドイッチアッセイにおいてもイムノクロマトアッセイにおいても、第１の分子がＢＣ２ＬＣＮである場合、目的成分は、第１の分子であるＢＣ２ＬＣＮと第２の分子であるＢＣ２ＬＣＮの両方と同時に結合するものである。従って、第１の分子がＢＣ２ＬＣＮであるサンドイッチアッセイおよびイムノクロマトアッセイにより検出される目

的成分は、複数のＢＣ２ＬＣＮと同時に結合することができる成分である。イムノクロマトアッセイにおいては、対照ラインには、ＢＣ２ＬＣＮに対する抗体や、Ｈ－ｔｙｐｅ１糖鎖抗原やＨ－ｔｙｐｅ３糖鎖抗原等のＢＣ２ＬＣＮと結合する糖鎖抗原が固相化され得る。

【００４９】

ある態様では、第１の分子は、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体である。この態様では、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有するＳｅｒｐｉｎＡ３が検出されていると考えられる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体は、ＳｅｒｐｉｎＡ３に対する結合性を指標として常法により調製することができる。

【００５０】

ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有するＳｅｒｐｉｎＡ３に対する結合性を有することでさらに確認してもよい。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有するＳｅｒｐｉｎＡ３は、実施例で用いたように、固相化したＢＣ２ＬＣＮとＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体に反応する成分として精製することができる。ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体は、当該精製された成分に結合するか否かを指標として、選択してもよい。

【００５１】

第１の分子がＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体である態様において、第１の分子は、支持体（例えば、基板またはビーズ）に固相化され、第２の分子は、標識され得る；または、第１の分子は、標識され、第２の分子は、支持体に固相化され得る。

【００５２】

ある態様では、第１の分子は、Ｇａｌ３ＢＰに結合する抗体である。この態様では、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有するＧａｌ３ＢＰが検出されていると考えられる。Ｇａｌ３ＢＰに結合する抗体は、Ｇａｌ３ＢＰに対する結合性を指標として常法により調製することができる。

【００５３】

Ｇａｌ３ＢＰに結合する抗体は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有するＧａｌ３ＢＰに対する結合性を有することでさらに確認してもよい。ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖を有するＧａｌ３ＢＰは、実施例で用いたように、固相化したＢＣ２ＬＣＮとＧａｌ３ＢＰに結合する抗体に反応する成分として精製することができる。Ｇａｌ３ＢＰに結合する抗体は、当該精製された成分に結合するか否かを指標として、選択してもよい。

【００５４】

第１の分子がＧａｌ３ＢＰに結合する抗体である態様において、第１の分子は、支持体（例えば、基板またはビーズ）に固相化され、第２の分子は、標識され得；または、第１の分子は、標識され、第２の分子は、支持体に固相化され得る。

【００５５】

本発明によれば、対象ががんであるか否かを予測する方法、対象ががんであるか否かの予備的情報を得る方法、対象ががんであるか否かを判定する方法、対象ががんであるか否かを予測するための方法若しくは予備的方法、対象においてがんを検出する方法、対象においてがん細胞を検出する方法、対象においてがんのバイオマーカーを検出する方法（バイオマーカーは、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分である）、または対象ががんであるか否かを分析する方法であって、

当該方法は、

生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の成分（例えば、血液成分）の有無または濃度を分析することを含み、成分（例えば、血液成分）は、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分であるか；または

ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるサンドイッチアッセイまたはイムノクロマトアッセイによって、生体サンプル（例

えば、血液サンプル）中に含まれる成分（例えば、血液成分）を分析することを含む、方法が提供される。

【００５６】

本発明によれば、対象の生体サンプル（例えば、血液サンプル）において成分（例えば、血液成分）を検出する方法であって、成分（例えば、血液成分）が、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分である方法が提供される。この方法は、ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを生体サンプル（例えば、血液サンプル）と接触させることと、その結果、形成された成分（例えば、血液成分）と第１の分子と第２の分子との複合体を検出することを含み得る。この方法は、ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるサンドイッチアッセイまたはイムノクロマトアッセイによって、前記成分（例えば、血液成分）を検出することを含み得る。

【００５７】

本発明によれば、ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを含み、第１の分子と第２の分子とを用いて対象の生体サンプル（例えば、血液サンプル）中の糖タンパク質の量を測定することができる、サンドイッチアッセイ用またはイムノクロマトアッセイ用のキットが提供される。本発明のキットにおいて、ある態様では、第１の分子は、基板またはストリップ上に固相化され、第２の分子は標識されている。本発明のキットにおいて、ある態様では、第１の分子は標識され、第２の分子は基板またはストリップ上に固相化されている。ある態様では、第１の分子は標識され、第２の分子はゲル中に含まれる、またはゲル上に固相化されている。本発明のキットは、標識が酵素抗体法で用いられる酵素である場合には、発色基質をさらに含んでいてもよい。生体サンプルが血液サンプルである場合、成分は血液成分である。

【００５８】

本発明のキットのある態様では、第１の分子は、ＢＣ２ＬＣＮである。本発明のある態様では、第１の分子は、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体である。本発明のある態様では、第１の分子は、Ｇａｌ３ＢＰに結合する抗体である。

【００５９】

本発明のキットは、目的分子の検出、またはがんの検出、判定、予測、若しくは診断の用途において用いることができる。

【００６０】

本発明によれば、ＢＣ２ＬＣＮ、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する抗体、およびＧａｌ３ＢＰに結合する抗体からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子との組合せが提供される。本発明の組合せは、２つのＢＣ２ＬＣＮを同時に結合することができる成分、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される成分をサンプル中（例えば、生体サンプルまたは生体サンプル（例えば、血液サンプル））において検出することに用いることができる。上記組合せにおいては、第１の分子および第２の分子の一方は支持体に固相化されていてもよく、かつ、他方は検出のために標識されていてもよい。上記組合せは、生体サンプル（例えば、血液サンプル）を用いてがんを診断することに用いることができる。本発明によれば、上記組合せを含む、生体サンプル（例えば、血液サンプル）を用いてがんを診断することに用いるキットが提供される。上記組合せは、サンドイッチアッセイ用のキット、イムノクロマトアッセイ用のキット、レクチン電気泳動用のキット、質量分析用のキット、レクチンアフィニティークロマトグラフィー用のキットまたはμＴＡＳ用のキットであり得る。レクチン電気泳動用のキットは、レクチンを含むゲルを含んでいることができる。レクチンアフィニティークロマトグラフィー用のキットは、レクチンが固相化された

支持体を含むカラムを含んでいることができる。これらのキットには、標準物質として、精製されたＳｅｒｐｉｎＡ３、精製されたＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、精製されたＧａｌ３ＢＰ、または精製されたＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰなどがさらに含まれていてもよい。μＴＡＳ用のキットは、マイクロ流体チップを含んでいてもよい。マイクロ流体チップは、検出部を有し、検出部には、ＳｅｒｐｉｎＡ３、ＢＣ２ＬＣＮ結合性のＳｅｒｐｉｎＡ３、Ｇａｌ３ＢＰ、およびＢＣ２ＬＣＮ結合性のＧａｌ３ＢＰ、並びにこれらを含むタンパク質複合体からなる群から選択される１以上を結合する分子が固相化されていることができる。

【００６１】

本発明における

対象から得られた生体サンプルを分析する方法であって、

ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖に結合する分子、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子、およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子からなる群から選択される第１の分子と、ＢＣ２ＬＣＮである第２の分子とを用いて実施されるアッセイによって、生体サンプル中に含まれる成分（「目的成分」ということがある）を分析することを含む、方法

では、アッセイによって得られるシグナルが、体内のがんが減少すること（例えば、がんが摘出されること）によって減少し得る。したがって、本発明の方法では、アッセイシグナルは、体内のがんの量を示し得る。また、上記方法では、アッセイによって得られるシグナルが、再発することによって増大し得る。したがって、本発明の方法では、シグナルが増大したことは、がんの再発を示し得る。

【００６２】

本発明によれば、対象から得られた生体サンプルから、２つのＢＣ２ＬＣＮに同時に結合できる成分、ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分を分離することを含む、方法が提供される。本発明によればまた、対象から得られた生体サンプルから、２つのＢＣ２ＬＣＮに同時に結合できる成分、ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分を検出することを含む、方法が提供される。本発明によればまた、

対象から得られた生体サンプルを分析する方法であって、

対象から得られた生体サンプル中の、２つのＢＣ２ＬＣＮに同時に結合できる成分、ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分を分離することを含む、

方法

が提供される。分離とは、それ以外の成分の少なくとも１以上から目的の成分を分離することを意味する。分離は、目的の成分の濃縮、富化、および精製を含み得る。濃縮は、濃度を高めることを意味する。富化および精製は、他の成分に対して目的の成分の存在比率を選択的に高めることを意味する。富化および精製は、目的の成分の濃縮を伴っていてもよい。分離はまた、固相化された分子に結合させることを含み得る。この場合、固相化された分子に結合することによって、結合しない他の成分から分離されている。分離は、目的の成分の固相化表面への吸着に加えて、吸着しなかった成分を除去することを含んでいてもよい。吸着しなかった成分の除去は、前記表面の洗浄によって行うことができる。吸着しなかった成分の除去はまた、液相の除去によって行うことができる。吸着しなかった成分の除去はまた、固相がビーズ表面上に存在する場合には、ビーズを回収することによって行ってもよい。この態様において、本発明は、分離された成分の量を測定することをさらに含んでいてもよい。測定は、種々の当業者に周知のアッセイによって行うことができ、これによりアッセイシグナルを得ることができる。測定された量は、指標となる他の量（例えば、カットオフ値）と比較することができる。カットオフ値は、上記で説明した通りであり得る。

【００６３】

本発明の方法では、測定された量が、指標となる他の量と比較した多い場合には、生体サンプルが由来する対象ががんである可能性が示され得る。したがって、本発明の方法は

、がんを検出する方法、がん細胞を検出する方法、がんであると診断する方法、がんであると診断するための非診断的な方法、がんであると診断するための予備的情報を得る方法、がんであると予測する方法、またはがんであると予測するための非診断的方法であり得る。本発明の方法では、アッセイによって得られるシグナルが、体内のがんが減少すること（例えば、がんが摘出されること）によって減少し得る。したがって、本発明の方法では、アッセイシグナルは、体内のがんの量を示し得る。また、上記方法では、アッセイによって得られるシグナルが、再発することによって増大し得る。したがって、本発明の方法では、シグナルが増大したことは、がんの再発を示し得る。本発明の方法は、異なる時点で回収された２以上の生体サンプルに対して実施することができる。したがって、ある態様では、生体サンプルは、異なる時点で回収された２以上の生体サンプルであり得る。ある態様では、本発明の方法は、アッセイによって得られるシグナル（測定された量に対応する）は、当該異なる時点で回収され得た別のサンプルにおいて得られたシグナルと比較することをさらに含んでいてもよい。このようにすることで、本発明は、患者のがんの治療過程および／または再発過程のモニタリングに用いることができる。

【００６４】

本発明の方法は、既存の方法と組み合わせて実施されてもよい。例えば、既存の方法として、体液サンプル中のＣＡ１９－９の量を測定することを含む方法が知られている。ＣＡ１９－９は、がんを有する体液サンプル中で濃度を高めている。また、がんの量が増えるとその濃度が高まり、がんの量が減少するとその濃度が低下する。このように、ＣＡ１９－９と本発明の方法とを組み合わせることで、体液サンプルの分析によるがんの検出の精度および／または特異度を高め得る。ＣＡ１９－９は、膵がん、特に、ステージＩＩＩおよびＩＶなどの膵がんの指標となり得る。したがって、本発明は、生体サンプル中のＣＡ１９－９の濃度を測定することをさらに含んでいてもよい。

【００６５】

測定されるＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分は、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖修飾を有することを指標としてさらに分析されてもよい。ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分が、ＢＣ２ＬＣＮ結合性の糖鎖修飾を有するか否かは、上述のように、当該糖修飾（糖鎖）に結合する因子を用いて決定することができる。あるいは、ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分は、当該糖修飾（糖鎖）に結合する因子を用いて分離した後に検出されてもよい。ＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰからなる群から選択される１以上の成分は、ＳｅｒｐｉｎＡ３に結合する分子およびＧａｌ３ＢＰに結合する分子を用いて分離した後に検出されてもよい。

【実施例】

【００６６】

実施例１：がん患者の血清中の糖タンパク質のｒＢＣ２ＬＣＮを用いた検出

各種がんを有する患者の血清中の糖タンパク質をｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイによって検出した。

【００６７】

まず、ビオチン化ｒＢＣ２ＬＣＮをＰＢＳで０．３μｇ／ｍＬに希釈し、５０μＬ／ｗｅｌｌでアビジンプレート（ブロッキングレスタイプ）（住友ベークライト社、ＢＳ－Ｘ７６０３）に添加し、室温で１時間インキュベートした。得られたｒＢＣ２ＬＣＮ固相化プレートをＰＢＳ／０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄後、ＰＢＳで１００倍希釈した各種がん患者の希釈血清５０μＬ／ｗｅｌｌ（ｎ＝３）と反応させた。室温１時間反応後、プレートをＰＢＳ／０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄して、ＨＲＰ標識ｒＢＣ２ＬＣＮ（１μｇ／ｍＬ）を５０μＬ／ｗｅｌｌアプライし、室温１時間反応させた。ＰＢＳ／０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄後、ＴＭＢ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（富士フィルム和光純薬）を５０μＬ／ｗｅｌｌアプライし、室温３０分発色させて、１Ｎ　ＨＣｌを５０μＬ／ｗｅｌｌ反応させて発色反応を停止させ、ＯＤ４５０／６２０を測定した。得られた数値の平均を示した。本ｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイにおいては、ＯＤ４

５０／６２０の値が高いほど、ｒＢＣ２ＬＣＮに結合する糖タンパク質が大量に存在していることを意味する。

【００６８】

結果は、図１に示される通りであった。図１に示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイにより検出される糖タンパク質は、膵がん患者、結腸がん患者、膀胱がん患者、乳がん患者、非ホジキンリンパ腫患者、子宮体がん患者、卵巣がん患者、および慢性骨髄性白血病患者において、健常者群において認められた最大値よりも高い濃度を有することが明らかとなった。

【００６９】

検出された糖タンパク質は、固相化されたｒＢＣ２ＬＣＮと検出用のｒＢＣ２ＬＣＮの２分子と同時に結合することができなければならない。本実施例の結果から、２分子のｒＢＣ２ＬＣＮと同時に結合することができる成分（例えば、血液成分）が、がん患者において広く、健常者よりも高い濃度を有し、従って、成分（例えば、血液成分）の分析に有用であることが明らかとなった。

【００７０】

実施例２：ｒＢＣ２ＬＣＮにより認識される糖タンパク質の同定

本実施例では、ｒＢＣ２ＬＣＮ結合ビーズで膵がん患者および健常者の血清中の糖タンパク質をそれぞれ沈降させ、沈降した糖タンパク質をｒＢＣ２ＬＣＮで溶出して、得られた溶出液を電気泳動し、膵がんに固有の糖タンパク質を質量分析により同定した。

【００７１】

ＤｙｎａｂｅａｄｓＭ２８０　Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にビオチン化ｒＢＣ２ＬＣＮを結合させた。そして、膵がん及び健常者血清と４℃一晩インキュベートして、洗浄後、０．２Ｍフコースを添加して、室温１時間インキュベートすることで、ｒＢＣ２ＬＣＮに結合した糖タンパク質を溶出した。得られた溶出液を電気泳動して、ＰＶＤＦ膜に転写後、ＨＲＰ標識ｒＢＣ２ＬＣＮでブロットした。その結果、健常者血清ではｒＢＣ２ＬＣＮブロットで反応性が見られなかったものの、膵がん血清では７５－１５０ｋＤａ付近に反応性が認められた。そこで、電気泳動して銀染色したゲルから、１００－１５０　ｋＤａの赤で囲った部分を切り出した。切り出した各ゲル片からトリプシン加水分解を経てペプチド混合物を得た。ペプチド混合物をＬＣ－ＭＳ／ＭＳに供し、ＭＳ／ＭＳデータを取得した。ＭＳ／ＭＳデータのアミノ酸配列データベース検索の結果をペプチド同定一覧として出力した。その結果、ＳｅｒｐｉｎＡ３とＧａｌ３ＢＰがｒＢＣ２ＬＣＮによりがん患者において検出される候補タンパク質として取得された。

【００７２】

そこで、膵がん及び健常者血清からｒＢＣ２ＬＣＮ固定化ビーズに結合性を示した糖タンパク質を電気泳動して、ＳｅｒｐｉｎＡ３に対する抗体およびＧａｌ３ＢＰに対する抗体とＨＲＰ標識２次抗体を用いてウエスタンブロットした。その結果、図３に示されるように、ＳｅｒｐｉｎＡ３、およびＧａｌ３ＢＰは、健常者と比べて膵がん患者血清で有意に強く検出された。ＳｅｒｐｉｎＡ３とＧａｌ３ＢＰは、ｒＢＣ２ＬＣＮでビーズに吸着するタンパク質として得られたものであり、そのため、これら糖タンパク質はｒＢＣ２ＬＣＮに反応性であることがわかった。

【００７３】

正常な膵臓の組織と膵がんの組織とを患者から得て、免疫組織化学染色に供した。免疫組織化学染色は常法に基づいて行った。一次抗体としては、ＳｅｒｐｉｎＡ３の染色に対しては、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製，製品番号：ＭＡＢ１２９４５、希釈倍率：２００倍）を用い、Ｇａｌ３ＢＰの染色に対しては、抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製，製品番号：ＡＦ２２２６、１　μｇ／ｍＬ）を用いた。また、二次抗体としては、それぞれビオチン化抗マウスＩｇＧ（ニチレイバイオサイエンス社製、製品番号：４２４０２１、希釈倍率：原液）、及びビオチン化抗ヤギＩｇＧ（ニチレイバイオサイエンス社製、製品番号：４１４０１１、希釈倍率：原液）を用いた。結果は、図９に示される通りであった。図９に示される通り、正常膵臓組織では、染色像

がほとんど認められなかったのに対して、膵がん組織では、膵管においてＳｅｒｐｉｎＡ３とＧａｌ３ＢＰが強く発現していることが明らかになった。

【００７４】

血液中で検出されるＳｅｒｐｉｎＡ３およびＧａｌ３ＢＰは、膵がん組織の膵管に由来することが示唆される。

【００７５】

実施例３：ｒＢＣ２ＬＣＮとＳｅｒｐｉｎＡ３抗体またはＧａｌ３ＢＰ抗体を用いたサンドイッチアッセイにおけるがん患者の血清の分析

そこで、ｒＢＣ２ＬＣＮとＳｅｒｐｉｎＡ３抗体のサンドイッチアッセイを構築して、健常者、及び膵がんを含む各種がん患者の血清の解析を行った。ビオチン化ｒＢＣ２ＬＣＮをＰＢＳで０．３μｇ／ｍＬに希釈し、５０μＬ／ｗｅｌｌでアビジンプレート（ブロッキングレスタイプ）（住友ベークライト社、ＢＳ－Ｘ７６０３）に添加し、室温で１時間インキュベートした。得られたｒＢＣ２ＬＣＮ固相化プレートをＰＢＳ／０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄後、ＰＢＳで１００倍希釈した各種がん患者の希釈血清５０μＬ／ｗｅｌｌ（ｎ＝３）と反応させた。室温１時間反応後、プレートをＰＢＳ／０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄して、ＨＲＰ標識ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体（１μｇ／ｍＬ；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ＃：ＡＦ１２９５）を５０μＬ／ｗｅｌｌアプライし、室温１時間反応させた。ＰＢＳ／０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄後、ＴＭＢ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（富士フィルム和光純薬）を５０μＬ／ｗｅｌｌアプライし、室温３０分発色させて、１Ｎ ＨＣＬを５０μＬ／ｗｅｌｌ反応させて発色反応を停止させ、ＯＤ４５０／６２０を測定した。得られた数値の平均を示した。

【００７６】

結果は、図４に示される通りであった。図４に示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮとＳｅｒｐｉｎＡ３抗体のサンドイッチアッセイにより検出される糖タンパク質（すなわち、ＢＣ２ＬＣＮレクチンと結合する特定の糖鎖を有するＳｅｒｐｉｎＡ３）は、健常者においてはほとんど検出することができなかった一方で、結腸がん、膵がん、膀胱がん、胃がん、小細胞肺がん、乳がん、非ホジキンリンパ腫、子宮頸部がん、直腸腺がん、幹細胞がん、甲状腺がん、前立腺がん、子宮体がん、メラノーマ、食道がん、卵巣がん、胆管がん、および慢性骨髄性白血病のすべて（調べたがんのすべて）において、強く検出された。

【００７７】

次にｒＢＣ２ＬＣＮとＧａｌ３ＢＰ抗体のサンドイッチアッセイを構築して、健常者、膵がんを含む各種がん患者の血清の解析を行った。ビオチン化ｒＢＣ２ＬＣＮをＰＢＳで０．３μｇ／ｍＬに希釈し、５０μＬ／ｗｅｌｌでアビジンプレート（ブロッキングレスタイプ）（住友ベークライト社、ＢＳ－Ｘ７６０３）に添加し、室温で１時間インキュベートした。得られたｒＢＣ２ＬＣＮ固相化プレートをＰＢＳ／０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄後、ＰＢＳで１００倍希釈した各種がん患者の希釈血清５０μＬ／ｗｅｌｌ（ｎ＝３）と反応させた。室温１時間反応後、ＰＢＳ／０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄して、ＨＲＰ標識Ｇａｌ３ＢＰ抗体（１μｇ／ｍＬ；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ＃：ＡＦ２２２６）を５０μＬ／ｗｅｌｌアプライし、室温１時間反応させた。ＰＢＳ／０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０で５回洗浄後、ＴＭＢ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（富士フィルム和光純薬）を５０μＬ／ｗｅｌｌアプライし、室温３０分発色させて、１Ｎ ＨＣＬを５０μＬ／ｗｅｌｌ反応させて発色反応を停止させ、ＯＤ４５０／６２０を測定した。得られた数値の平均でグラフを作成した。得られた数値の平均を示した。

【００７８】

結果は、図５に示される通りであった。図５に示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮとＧａｌ３ＢＰ抗体のサンドイッチアッセイにより検出される糖タンパク質（すなわち、ＢＣ２ＬＣＮレクチンと結合する特定の糖鎖を有するＧａｌ３ＢＰ）は、健常者においてはほとんど検出することができなかった一方で、結腸がん、膵がん、膀胱がん、胃がん、小細胞肺がん、乳がん、非ホジキンリンパ腫、子宮頸部がん、直腸腺がん、幹細胞がん、甲状腺がん、前立腺がん、子宮体がん、メラノーマ、食道がん、卵巣がん、胆管がん、および慢

性骨髄性白血病のすべて（調べたがんのすべて）において、強く検出された。

【００７９】

また、図１０では、健常者、膵炎患者、および膵臓がん患者とで分けて、比較を行った。その結果、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮのサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体とのサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮおよび抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体とのサンドイッチアッセイ、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体と抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体とのサンドイッチアッセイにおいて、膵がん患者で、健常者や膵炎患者と比較して強いシグナルを検出した。このことから、これらのアッセイにより、膵臓がん患者を、健常者や膵炎患者とから区別できることが示唆された。

【００８０】

このことから、がん患者の血清において広く、ＢＣ２ＬＣＮレクチンと結合する特定の糖鎖を有するＳｅｒｐｉｎＡ３及びＢＣ２ＬＣＮレクチンと結合する特定の糖鎖を有するＧａｌ３ＢＰが存在することが明らかとなった。

【００８１】

さらに、他の健常者の血清検体および膵がん患者の血清検体を用いて、上記に記載された通りの方法で、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイ、および抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ＃：ＡＦ１２９５）と抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ＃：ＡＦ１２９５）によるサンドイッチアッセイを実施した。

【００８２】

結果は、図６に示される通りであった。図６に示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ、およびｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイにおいては、健常者の血清よりも、膵がん患者の血清においてサンドイッチアッセイで高い測定強度が得られた。これに対して、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体と抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイでは、健常者と膵がん患者の血清とで測定強度が同等であった。このことは、健常者血清においても、膵がん患者の血清においても、ＳｅｒｐｉｎＡ３は存在するが、膵がん患者において特異的にＳｅｒｐｉｎＡ３がｒＢＣ２ＬＣＮによって認識可能な糖による修飾を受けていることを示唆する結果である。

【００８３】

上記で得られた結果を解析し、特異度（Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）を横軸とし、感度（Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ）を縦軸として、ＲＯＣ曲線を描いた。結果は、図７に示される通りであった。

図７の左上パネルに示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－ｒＢＣ２）では、ＲＯＣ曲線下面積（ＡＵＣ）が０．６７９であり、当該ＲＯＣ曲線におけるカットオフ（感度１、特異度１からの最短距離にあるＲＯＣ曲線状の点から求められる）は０．３２９であり、そのときの特異度は０．８２０であり、感度は０．５７５であった。

図７の右上パネルに示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－ＳｅｒｐｉｎＡ３）では、ＲＯＣ曲線下面積（ＡＵＣ）が０．８９２であり、当該ＲＯＣ曲線におけるカットオフ（感度１、特異度１からの最短距離にあるＲＯＣ曲線状の点から求められる）は０．０１４であり、そのときの特異度は０．８４０であり、感度は０．８２５であった。

図７の左下パネルに示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－Ｇａｌ３ＢＰ）では、ＲＯＣ曲線下面積（ＡＵＣ）が０．７４３であり、当該ＲＯＣ曲線におけるカットオフ（感度１、特異度１からの最短距離にあるＲＯＣ曲線状の点から求められる）は０．０１であり、そのときの特異度は０．９００であり、感度は０．５７５であった。

さらに、図７の右下パネルに示されるように、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体と抗Ｓｅｒｐｉ

ｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ（ＳｅｒｐｉｎＡ３－ＳｅｒｐｉｎＡ３）では、ＲＯＣ曲線下面積（ＡＵＣ）が０．７１８であり、当該ＲＯＣ曲線におけるカットオフ（感度１、特異度１からの最短距離にあるＲＯＣ曲線状の点から求められる）は１．０５６であり、そのときの特異度は０．８であり、感度は０．６５であった。

【００８４】

上記結果からは、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－ＳｅｒｐｉｎＡ３）が、最も優れた精度を有し、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－Ｇａｌ３ＢＰ）が、最も優れた特異度を示すことが明らかとなった。また、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－ｒＢＣ２）や、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体と抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ（ＳｅｒｐｉｎＡ３－ＳｅｒｐｉｎＡ３）でも、一定の有用性を有する精度を示すことが明らかとなった。

【００８５】

さらに、健常者（ｎ＝４９）および膵炎患者（ｎ＝９）と膵がん患者（ｎ＝８５）とを区別できる否かをＲＯＣ曲線を作成して検討した。すると、図１１に示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－ＳｅｒｐｉｎＡ３）とｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－Ｇａｌ３ＢＰ）が、最も優れたＡＵＣを示すことが明らかとなった。また、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ（ｒＢＣ２－ｒＢＣ２）や、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体と抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ（ＳｅｒｐｉｎＡ３－ＳｅｒｐｉｎＡ３）でも、一定の有用性を有することが明らかとなった。

【００８６】

実施例５：ステージ別膵がん患者の血清の分析

本実施例では、ステージ１Ａからステージ４までの様々な膵がんを有する患者の血清検体を、サンドイッチアッセイによって評価した。

【００８７】

がんのステージは、ＵＩＣＣ　ＴＮＭ分類（ＵＩＣＣ：　ＴＮＭ　Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｍａｌｉｇｎａｎｔ　Ｔｕｍｏｕｒｓ，　８ｔｈ　Ｅｄｎ．　Ｗｉｌｅｙ－Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ；　２０１７．９４－９５）に基づいて医師が決定した。がん患者の血清を実施例１および３の記載の通りに、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイ、および抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体と抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイにそれぞれ供した。結果は、図８Ａ～８Ｄに示される通りであった。

【００８８】

図８Ａ～８Ｃに示されるように、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ、およびｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイでは、ステージ１から４までのすべてのステージにおいて、高い測定強度を示すサンプルが認められた。

図８Ｄに示されるように、抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体と抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイでは、図６で示されたのと同様に、すべてのサンプルにおいて高い測定強度が示された。

【００８９】

ステージⅠの膵がん患者（ｎ＝９）と健常者（ｎ＝４９）との間でＲＯＣ曲線を作成した。結果は、図１２に示される通りであった。図１２に示されるように、いずれのサンドイッチアッセイにおいても、ステージIの膵がん患者を良好に検出することができた。ステージIIの膵がん患者（ｎ＝５１）と健常者（ｎ＝４９）との間でＲＯＣ曲線を作成した。結果は、図１３に示される通りであった。図１３に示されるように、いずれのサンドイッチアッセイにおいても、ステージIIの膵がん患者を良好に検出することができた。ステージIIIの膵がん患者（ｎ＝８）と健常者との間（ｎ＝４９）のＲＯＣ曲線を作成した。結果

は、図１４に示される通りであった。図１４に示されるように、示されるいずれのサンドイッチアッセイにおいても、ステージIIIの膵がん患者を良好に検出することができた。ステージIVの膵がん患者（ｎ＝１７）と健常者（ｎ＝４９）との間のＲＯＣ曲線を作成した。結果は、図１５に示される通りであった。図１５に示されるように、示されるいずれのサンドイッチアッセイにおいても、ステージIVの膵がん患者を良好に検出することができた。

【００９０】

膵がん患者に対して膵がんの摘出手術を実施した。術前と術後の血液サンプル（ｎ＝３８）についてサンドイッチアッセイで分析した。ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体とのサンドイッチアッセイの結果は図１６に示され、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体とのサンドイッチアッセイの結果は図１７に示され、ＣＡ１９－９アッセイの結果は図１８に示された。それぞれの図において、３０ＰＯＤは術後３０日を意味し、３ｍは術後３ヶ月を意味する。図１６～１８に示されるように、各サンドイッチアッセイのシグナルは、がんの摘出術によって低下した。したがって、これらのアッセイでは、がんの摘出の結果が、血液中の成分含量に影響することが理解できる。

【００９１】

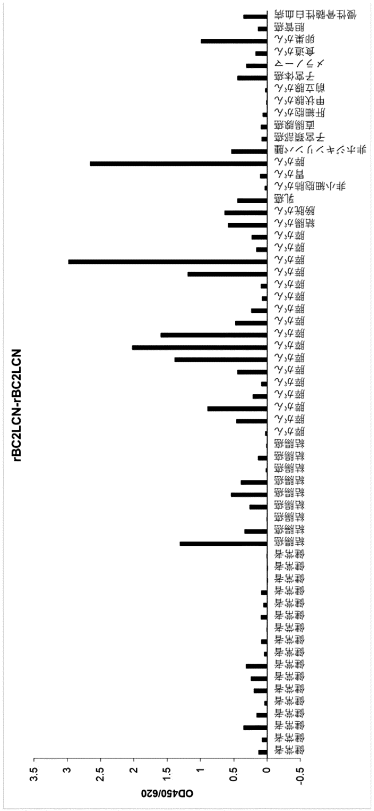
さらに、再発した患者の血液サンプルを経時的にアッセイした。アッセイは、ＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体を用いたサンドイッチアッセイとした。結果は図１９に示される通りであった。図１９に示されるように、患者Aにおいては、手術後、時間経過と共にアッセイのシグナルが低下した。しかしながら、再発した患者Aの血液を分析すると、シグナルが顕著に増大していた。このことから、本発明のアッセイ系は、再発の検出に用いることができることが示唆された。

【００９２】

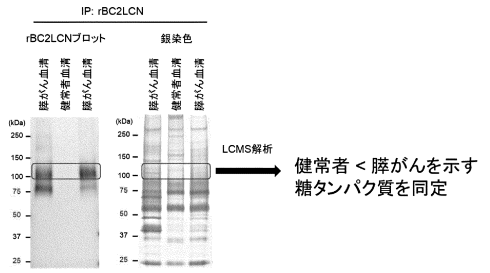
このことから、ｒＢＣ２ＬＣＮとｒＢＣ２ＬＣＮによるサンドイッチアッセイ、ｒＢＣ２ＬＣＮと抗ＳｅｒｐｉｎＡ３抗体によるサンドイッチアッセイ、およびｒＢＣ２ＬＣＮと抗Ｇａｌ３ＢＰ抗体によるサンドイッチアッセイでは、適切にカットオフ値を設定することによってステージ１および２などの早期膵がんからステージ４の膵がんまでを幅広く検出することができる。

【図面】

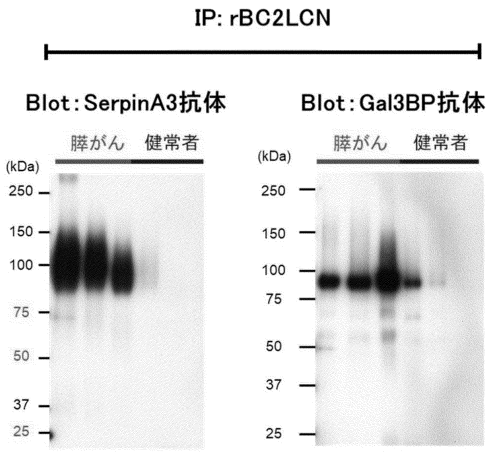
【図１】


rBC2LCN-rBC2LCN
OD450/620
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5

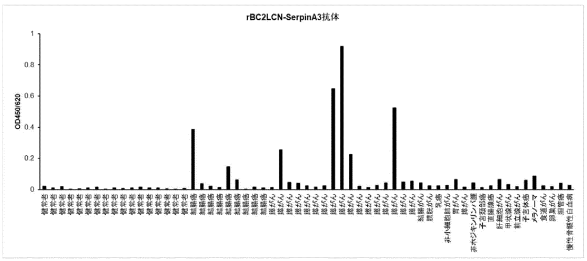
【図２】


IP: rBC2LCN
rBC2LCNブロット
銀染色
膵がん血清
健常者血清
膵がん血清
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
LCMS解析
健常者 < 膵がんを示す
糖タンパク質を同定

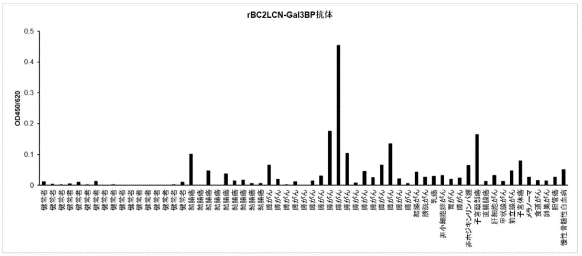
【図３】


IP: rBC2LCN
Blot：SerpinA3抗体
Blot：Gal3BP抗体
膵がん
健常者
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25

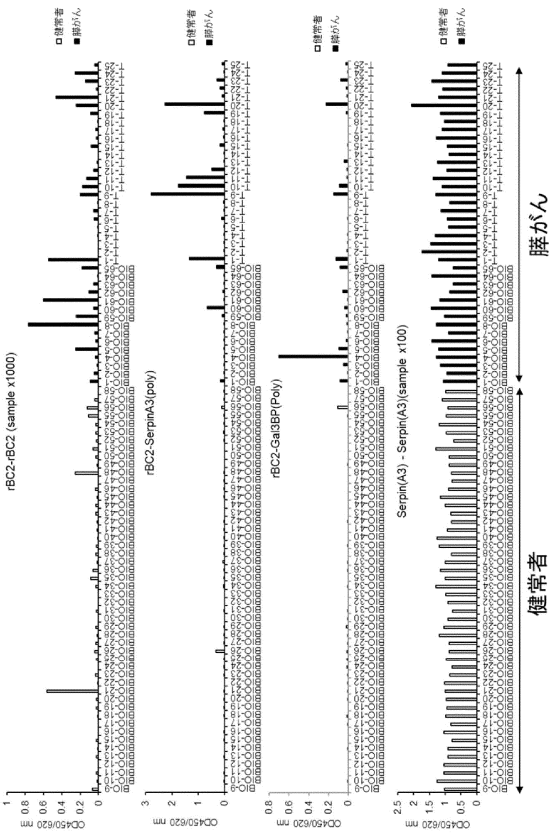
【図４】


rBC2LCN-SerpinA3抗体
OD450/620
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0

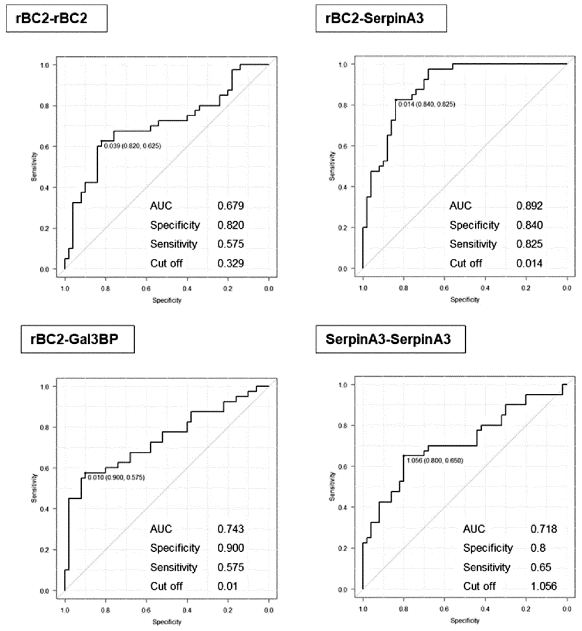
【図５】


rBC2LCN-Gal3BP抗体
OD450/620

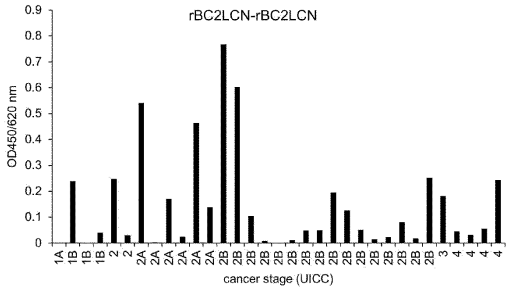
【図６】


健常者
膵がん
rBC2-rBC2 (sample x1000)
rBC2-SerpinA3(poly)
rBC2-Gal3BP(Poly)
Serpin(A3) - Serpin(A3)(sample x100)
膵がん
健常者

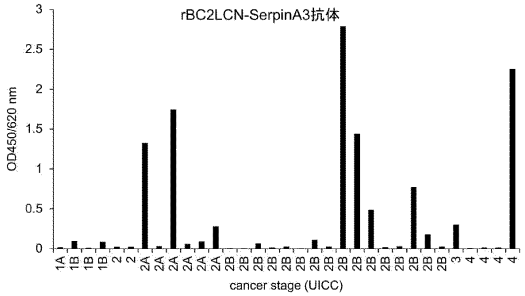
【図７】


rBC2-rBC2
AUC 0.679
Specificity 0.820
Sensitivity 0.575
Cut off 0.329
rBC2-SerpinA3
AUC 0.892
Specificity 0.840
Sensitivity 0.825
Cut off 0.014
rBC2-Gal3BP
AUC 0.743
Specificity 0.900
Sensitivity 0.575
Cut off 0.01
SerpinA3-SerpinA3
AUC 0.718
Specificity 0.8
Sensitivity 0.65
Cut off 1.056
Sensitivity
Specificity

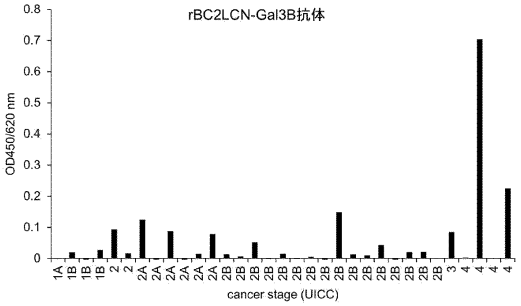
【図８Ａ】


rBC2LCN-rBC2LCN
OD450/620 nm
cancer stage (UICC)

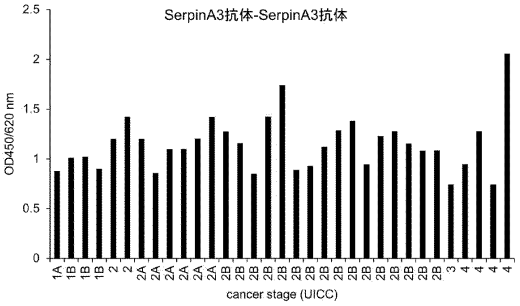
【図８Ｂ】



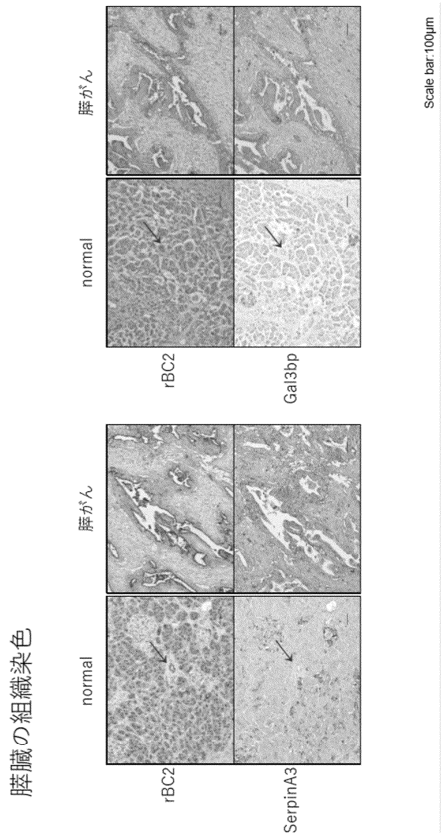

【図８Ｃ】



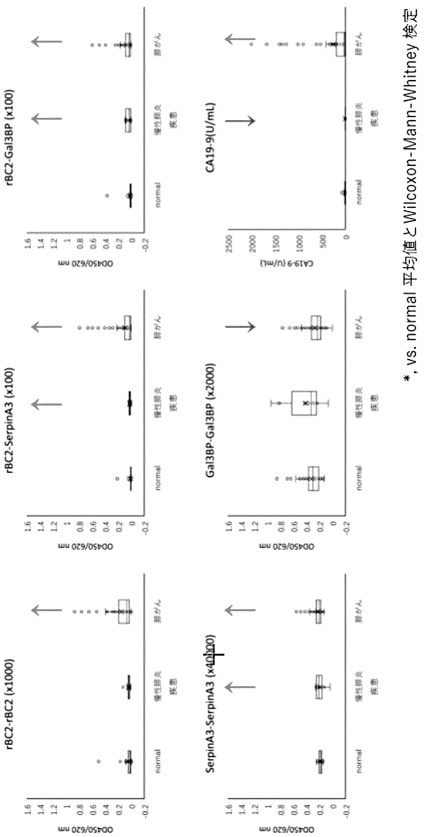

【図８Ｄ】



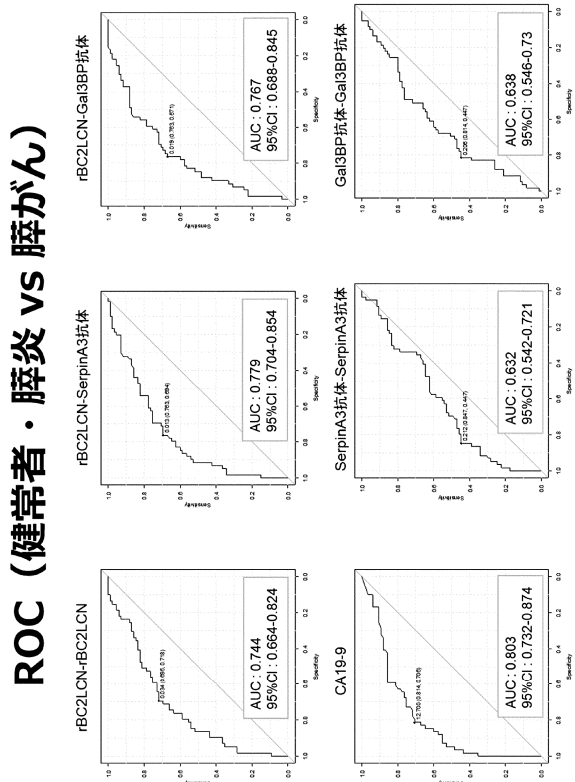

【図９】



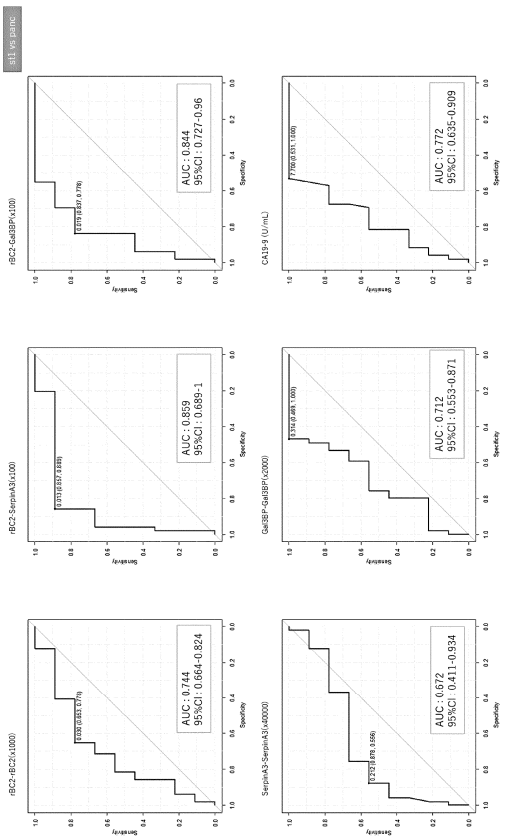
【図１０】



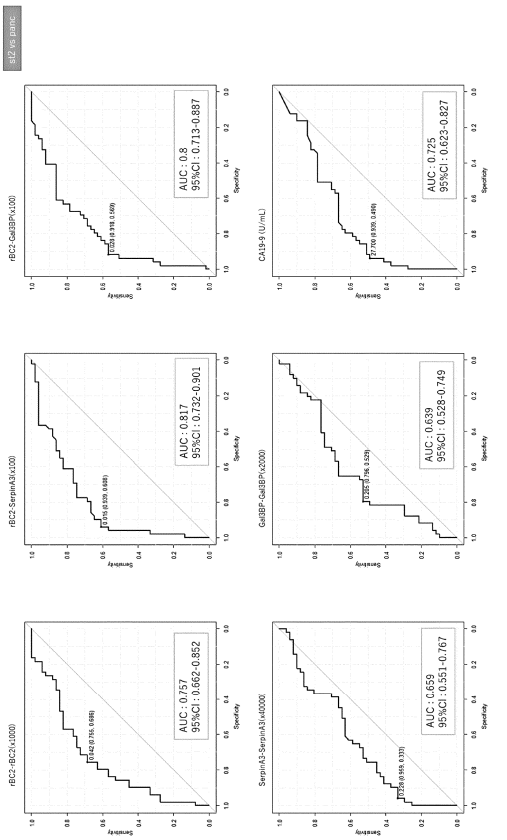

【図１１】



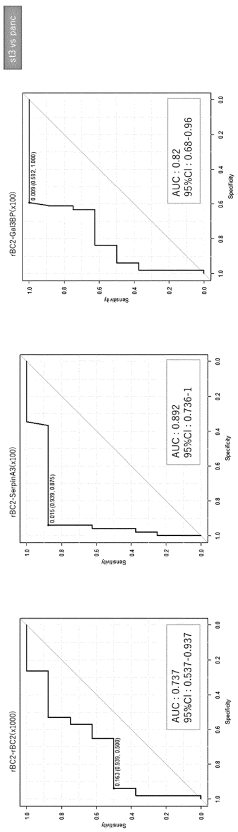

【図１２】



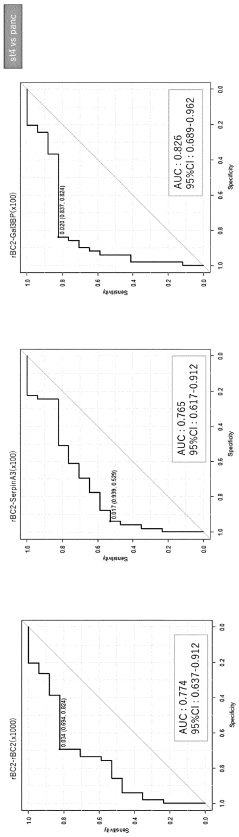

【図１３】



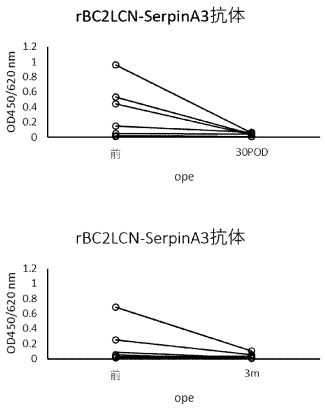
【図１４】



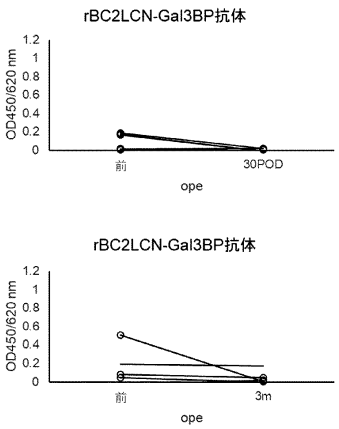

【図１５】



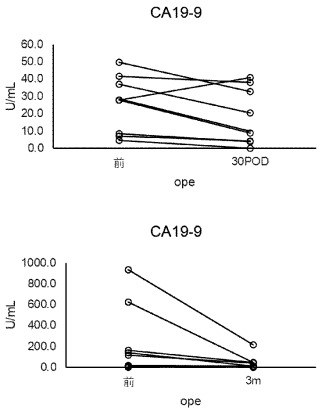

【図１６】



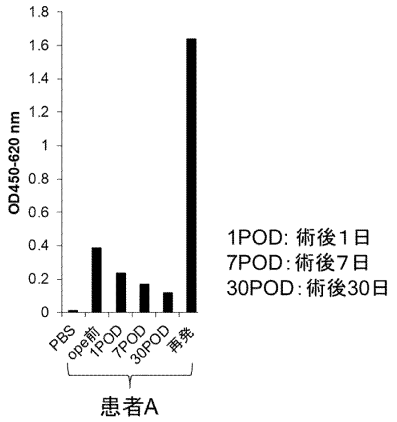

【図１７】



【図１８】


CA19-9
U/mL
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
前
30POD
ope
CA19-9
U/mL
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
前
3m
ope

【図１９】


OD450-620 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PBS
ope前
1POD
7POD
30POD
再発
患者A
1POD: 術後1日
7POD: 術後7日
30POD: 術後30日

フロントページの続き

茨城県つくば市天王台一丁目１番１ 国立大学法人筑波大学内

審査官 小澤 理

(56)参考文献

国際公開第２０１８／１９０３５７（WO，Ａ１）
国際公開第２０１７／０６１４４９（WO，Ａ１）
木明琢磨, 外，血清糖タンパク質結合糖鎖を利用した新たな臨床マーカーの開発，臨床病理，2014年，Vol.62補冊，p.140，ISSN: 0047-1860
KOTHS, K. et al.，Cloning and characterization of a human Mac-2-binding protein, a new member of the superfamily defined by the Macrophage Scavenger Receptor Cysteine-rich Domain，J. Biol. Chem.，1993年，Vol.268, No.19，p.14245-14249，ISSN: 0021-9258

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｇ０１Ｎ ３３／５７４
Ｇ０１Ｎ ３３／５３１
Ｇ０１Ｎ ３３／５４３
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
Ｓｃｏｐｕｓ