(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
2013 年 12 月 19 日(19.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/187371 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)　*G01N 27/62* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)　*G01N 33/53* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)　*C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/065975

(22) 国際出願日: 2013 年 6 月 10 日(10.06.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-131970 2012 年 6 月 11 日(11.06.2012) JP
特願 2012-272285 2012 年 12 月 13 日(13.12.2012) JP

(71) 出願人: 東ソー株式会社(TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町４５６０番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 仲田　大輔(NAKATA, Daisuke); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１　東ソー株式会社　東京研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 青木　篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目５番１号　虎ノ門３７森ビル青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, 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, 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).

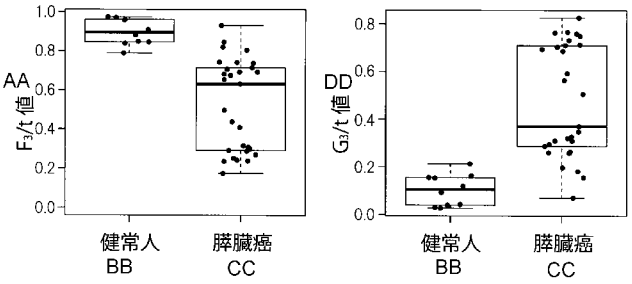
添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR DETECTING CANCER, AND ANTIBODY CAPABLE OF RECOGNIZING PANCREAS-SPECIFIC RIBONUCLEASE 1

(54) 発明の名称 : 癌の検出方法及び膵臓特異的リボヌクレアーゼ１を認識する抗体

図11



AA F_3/t value
BB Normal person
CC Pancreatic cancer
DD G_3/t value

(57) **Abstract**: Pancreatic cancer can be detected by producing a monoclonal antibody which can bind to pancreas-specific RNase 1 when no sugar chain is bound to a site located in the pancreas-specific RNase 1 and capable of being modified with an N-type sugar chain and of which the binding to the pancreas-specific RNase 1 is inhibited when an N-type sugar chain is bound to the site, also producing a monoclonal antibody which can bind to the pancreas-specific RNase 1 simultaneously with the binding of the aforementioned antibody to the pancreas-specific RNase 1, and determining the ratio of A to B using the antibodies, wherein A represents the amount of the site located in the pancreas-specific RNase 1 and capable of being modified with an N-type sugar chain wherein an N-type sugar chain is bound or unbound to the site; and B represents the amount of the site located in the pancreas-specific RNase 1 and capable of being modified with an N-type sugar chain.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2013/187371 A1

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則 5.2(a)）

膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位に、糖鎖が結合していない場合に結合し、Ｎ型糖鎖が結合している場合に結合が阻害されるモノクローナル抗体を作製し、またこの抗体と同時に同膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に結合できるモノクローナル抗体とを作製し、それらを用いて、ＡとＢとの比を求めることにより膵臓癌を検出する。Ａ＝膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量。Ｂ＝膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位の量。

明　細　書

発明の名称 ：

癌の検出方法及び膵臓特異的リボヌクレアーゼ１を認識する抗体

技術分野

[0001] 本発明は、癌の検出方法及び膵臓特異的リボヌクレアーゼ１を認識する抗体に関する。より詳しくは、糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位における糖鎖の結合の有無を測定することによる癌の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 診断初期段階での癌の検出方法としては、非侵襲的な生体由来の試料、例えば血液や尿などの比較的採取が容易な体液を被検体とすることが好ましい。現在の膵臓癌の診断の際に使用される血清マーカーとしてＣＡ１９－９、ＤＵＰＡＮ－２などがある。しかしながら、これらのマーカーは臓器特異性が低いことや、遺伝的理由から当該マーカーは反応しない場合があるなど、決定的な確定診断にはならないという欠点がある。

[0003] リボヌクレアーゼファミリーの１つである膵臓特異的リボヌクレアーゼ１（以下、リボヌクレアーゼ１を「ＲＮａｓｅ　１」と称する）は膵臓特異的に発現し、細胞外の体液中に分泌される糖タンパク質である。このタンパク質は、１５６アミノ酸からなるペプチド（配列番号１）として翻訳され、分泌シグナルの除去、糖鎖修飾を受けた後、１２８アミノ酸のペプチド配列（配列番号２）を持つ成熟糖タンパク質として細胞外に分泌される。Ｎ型糖鎖修飾可能部位、即ちＮ型糖鎖修飾を受ける可能性があるアミノ酸残基は、配列番号２における３４番目、７６番目、８８番目アスパラギン残基である。

[0004] 膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１は古くから研究され、癌における発現や活性の変化などが報告されているが、実際に臨床応用されている例はない。１９８０年にＤｏｒａｎらは、血清中のリボヌクレアーゼ活性が、膵臓癌患者で増加すると報告しているが（非特許文献１）、活性のみの記載であり、リボヌクレアーゼの分子種に関しては特定されていない。膵臓特異的ＲＮａｓｅ

１の糖鎖修飾に関しては、１９９４年に健常人から得たリボヌクレアーゼに関して報告され、３カ所ある糖鎖修飾可能部位のそれぞれの糖鎖付加の程度について報告が有るが、膵臓癌との関連性に付いては報告されていない（非特許文献２）。２０００年に、Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ－Ｓａｌａｓらは膵臓癌由来培養細胞から分泌された膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の分子量が、正常の膵臓から得られたものと比べて大きくなることを報告し、その理由の１つとして糖鎖修飾量の増加を指摘した（非特許文献３）。さらに同研究グループは、２００３年と２００７年に、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の糖鎖修飾に関する報告を発表し、その中で膵癌患者の血清から得られた膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖構造が変化していることを指摘し、特にコアフコシル化された２本分岐複合型糖鎖が増加することを明らかにし、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の分子量増加は付加している糖鎖構造自体の分子量増加に起因しているとした（非特許文献４、５）。しかしながら、糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位における糖鎖結合の有無と癌とを関連付ける報告はこれまでになかった。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｊ．　Ｃｌｉｎ．　Ｐａｔｈｏｌ．　３３，　１２１２－１３　（１９８０）

非特許文献2：Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　Ｈｏｐｐｅ　Ｓｅｙｌｅｒ　３７５，　３５７－６３　（１９９４）

非特許文献3：Ｅｕｒ　Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　２６７，　１４８４－１４９４　（２０００）

非特許文献4：Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１３，　２２７－２４４　（２００３）

非特許文献5：Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１７，　３８８－４００　（２００７）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位に着目し、癌の検出方法及び膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を認識する抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、癌患者では膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位において糖鎖が結合している場合が健常人と比べて増加していることを見いだし、本発明を完成するに至った。また本発明者は膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に対して特異的に結合する抗体であって、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とし、Ｎ型糖鎖修飾可能部位に糖鎖が結合している場合には膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に対する結合が阻害される抗体を見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち本発明は、以下のとおりである。

（１）糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を測定することを特徴とする癌の検出方法。

（２）癌が膵臓癌である、（１）に記載の方法。

（３）糖タンパク質が膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１である（１）又は（２）に記載の方法。

（４）膵臓癌患者では健常人に比べてＮ型糖鎖が結合している部位の量が増加する、（２）又は（３）に記載の方法。

（５）下記Ａ，Ｂにおいて、ＡとＢとの比を求めることを特徴とする、癌の検出方法。

Ａ＝糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量

Ｂ＝糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位の量

（６）癌が膵臓癌である、（５）に記載の方法。

（７）糖タンパク質が膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１である（５）又は（６）に記載の方法。

（８）上述の（６）又は（７）に記載の方法において、Ａ＝Ｎ型糖鎖が結合していない部位の量、であり、膵臓癌患者では、健常人と比べて、Ａ／Ｂの値が小さくなる方法。

（９）上述の（６）又は（７）に記載の方法において、Ａ＝Ｎ型糖鎖が結合している部位の量、であり、膵臓癌患者では、健常人と比べて、Ａ／Ｂの値が大きくなる方法。

[0009] （１０）上述の（７）～（９）いずれかに記載の方法において、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の量を求め、その値を換算してＢの値とする方法。

（１１）Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の３４番目、７６番目及び８８番目から選ばれる１つ以上のアスパラギン残基である、（１）～（１０）いずれか１項に記載の方法。

（１２）Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の８８番目のアスパラギン残基である、（１１）に記載の方法。

（１３）Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の７６番目のアスパラギン残基である、（１１）に記載の方法。

（１４）Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の３４番目のアスパラギン残基である、（１１）に記載の方法。

（１５）膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とするモノクローナル抗体またはその断片。

（１６）膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位に、糖鎖が結合していない場合に結合し、Ｎ型糖鎖が結合している場合に結合が阻害される、（１５）に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

（１７）抗原認識部位が、配列番号２に示された配列の８８番目のアスパラギン残基を含む領域である（１５）又は（１６）に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

（１８）上述の（１５）～（１７）のいずれか１項に記載されたモノクロー

ナル抗体またはその断片と同時に膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に結合できることを特徴とする、モノクローナル抗体またはその断片。

[0010] （１９）（ａ）上述の（１５）～（１７）のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体またはその断片、及び試料、を接触させ、（ａ）のモノクローナル抗体またはその断片と複合体を形成した膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を測定する、（１）～（１４）のいずれか１項に記載の方法。

（２０）上述の（１９）において、さらに（ｂ）上述の（１８）に記載のモノクローナル抗体またはその断片、を試料と接触させ、（ａ）及び（ｂ）の２つのモノクローナル抗体または抗体断片と複合体を形成した膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を測定する方法。

（２１）上述の（２０）に記載の方法において、試料を、（ａ）又は（ｂ）の一方と接触させる第一の接触工程と、第一の接触工程で得られたものに（ａ）又は（ｂ）の他方を接触させる第二の接触工程を含む方法。

（２２）上述の（１５）～（１７）のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体またはその断片を含有することを特徴とする医薬品。

（２３）糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を質量分析法によって求める、（１）～（１４）いずれか１項に記載の方法。

（２４）上述の（２３）に記載の方法において、糖タンパク質のペプチド断片および／または糖ペプチド断片の質量を質量分析法によって測定する方法。

[0011] 以下に本発明を更に詳細に説明する。本発明は、糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を測定することにより、癌を検出するものである。このとき、糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している「部位」の量、またはＮ型糖鎖が結合していない「部位」の量を測定するものであって、Ｎ型糖鎖修飾可能部位に対して結合している「糖鎖」の量を測定するものではない。癌としては特に限定されるものではないが、特に膵臓癌を検出

することができる。

[0012] 測定対象となる糖タンパク質としては、特に限定はされないが、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１が好ましい。またそれはヒト生体試料由来であることが好ましい。これらを測定対象とすることにより、とりわけヒトの膵臓癌を検出することができる。このとき、膵臓癌患者では、健常人と比べてＮ型糖鎖修飾可能部位にＮ型糖鎖が結合している場合が多く、Ｎ型糖鎖修飾可能部位の中でＮ型糖鎖が結合している部位が増加するため、これを指標として膵臓癌を検出することができる。

[0013] また本発明は、下記Ａ，Ｂにおいて、ＡとＢとの比を求めることを特徴とする、癌の検出方法である。

Ａ＝糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量

Ｂ＝糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位の量

癌としては特に限定されるものではないが、特に膵臓癌を検出することができる。測定対象となる糖タンパク質としては、特に限定はされないが、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１が好ましい。

[0014] また、Ａ＝Ｎ型糖鎖が結合していない部位の量、であり、膵臓癌患者では、健常人と比べて、Ａ／Ｂの値が小さくなる方法であることが好ましい。またＡ＝Ｎ型糖鎖が結合している部位の量、であり、膵臓癌患者では、健常人と比べて、Ａ／Ｂの値が大きくなる方法であることも好ましい。

[0015] Ｂ＝膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位の量、の場合、その求め方には特に限定はなく、例えば膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の量を求め、その値を換算してＢの値とすることができる。具体的には、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１は前述のように３つのＮ型糖鎖修飾可能部位（配列番号２の３４，７６，８８番目のアスパラギン残基）を有するので、測定対象としてそのいずれか１つ、もしく２つの部位、またはすべての部位の量としたときには、それに応じてＢ＝膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位の量も、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の量のそれぞれ１倍、２倍または３倍と換

算することができる。なお、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の量は、例えば免疫学的測定法や質量分析を使用した方法により求めることができる。

[0016] なお、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１は、前述のように３つのＮ型糖鎖修飾可能部位（配列番号２の３４，７６，８８番目のアスパラギン残基）を有する。そのいずれか１つもしくは２つの部位またはすべての部位において、Ｎ型糖鎖が結合している部位の量または結合していない部位の量を測定することにより、又はその量と膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位の量との比を求めることにより、癌を検出することができる。特にＮ型糖鎖修飾可能部位として、配列番号２の８８番目のアスパラギン残基に対して上述の量を測定すると、癌患者と健常人とではその値に顕著な差がみられるため、癌の検出方法として好ましいものである。同様に、配列番号２の７６番目又は３４番目のアスパラギン残基に対して上述の量を測定することも好ましい。

[0017] また本発明は、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とするモノクローナル抗体またはその断片である。このようなモノクローナル抗体は、例えば膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１またはそのＮ型糖鎖修飾可能部位を含む近傍のペプチド配列を免疫原とし、常法に従い作製することができる。また抗体の抗原特異性は、その抗原決定基への抗体の結合を標準アッセイ、たとえばＥＬＩＳＡまたはＦＡＣＳ分析を用いて決定することができる。またモノクローナル抗体の断片としては、様々な酵素で全抗体を消化して得られるＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント等があげられる。このようなモノクローナル抗体又はその断片の中で、本発明においては、特に膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位に、糖鎖が結合していない場合に結合し、Ｎ型糖鎖が結合している場合に結合が阻害されるものが好ましい。

[0018] さらに、このようなモノクローナル抗体またはその断片の中でも、本発明においては、抗原認識部位が、配列番号２に示された配列の８８番目のアスパラギン残基を含む領域であるものが好ましい。とりわけ、膵臓特異的ＲＮ

ａｓｅ　１の糖鎖修飾可能部位のうち最もカルボキシル末端側に位置する部位の近傍のアミノ酸配列（配列番号３）を認識部位の一部に含むモノクローナル抗体またその断片であることが好ましい。このようなモノクローナル抗体として、本発明で作製した抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１モノクローナル抗体ＲｒｈＲＮ０７２３をあげることができる。このモノクローナル抗体ＲｒｈＲＮ０７２３は、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位のうち、配列番号２の８８番目のアスパラギン残基にＮ型糖鎖が結合している場合には、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１への結合が阻害されるものである。

[0019] また本発明は、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とするモノクローナル抗体またはその断片と同時に膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に結合できることを特徴とする、モノクローナル抗体またはその断片である。このようなモノクローナル抗体は、例えば膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を免疫原とし、常法に従い作製し、上述の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を認識するモノクローナル抗体またはその断片と同時に膵臓特異的ＲＮａｓｅに結合することができるものをスクリーニングすればよい。またモノクローナル抗体の断片は、例えば様々な酵素で全抗体を消化して得られるＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントなどがあげられる。このようなモノクローナル抗体として、本発明で作製した抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１モノクローナル抗体ＭｒｈＲＮ０６１４をあげることができる。このモノクローナル抗体ＭｒｈＲＮ０６１４は、前述のモノクローナル抗体ＲｒｈＲＮ０７２３と同時に膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に結合することができる。

[0020] 本発明においては、このようなモノクローナル抗体またはその断片は、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ビオチン、フルオレセインイソチオシアネート等で標識されていてもよい。

[0021] また本発明は、（ａ）膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とするモノクローナル抗体またはその断片、及び試料、を接触させ、（ａ）のモノクローナル抗体またはその断片と複合体を形成

した膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を測定する、癌の検出方法である。このような方法としては、例えば競合法や抗体アレイ法をあげることができる。

[0022] また本発明は、上述の（ａ）のモノクローナル抗体又はその断片に加えて、さらに（ｂ）として（ａ）と同時に膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に結合できるモノクローナル抗体またはその断片を試料と接触させ、（ａ）及び（ｂ）の２つのモノクローナル抗体または抗体断片と複合体を形成した膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の糖鎖修飾可能部位であってＮ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を測定する癌の検出方法である。このとき、（ａ）および（ｂ）のモノクローナル抗体又はその断片は、試料に対して同時に接触させてもよいが、順次接触させる方が好ましい。順次接触させる場合、試料と（ａ）または（ｂ）の一方と接触させる第一の接触工程と、次いで第一の接触工程で得られたものに（ａ）又は（ｂ）の他方を接触させる第二の接触工程とを含む。このとき、第一の接触工程では試料と（ｂ）とを接触させ、次いで第二の接触工程で（ａ）と接触させることが好ましい。（ａ）、（ｂ）としては、前述の本発明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、特に（ａ）としてはモノクローナル抗体ＲｈＲＮ０７２３またはその断片、（ｂ）としてはモノクローナル抗体ＭｒｈＲＮ０６１４またはその断片を用いることが更に好ましい。このような方法としては、たとえばＥＬＩＳＡ法やＥＩＡ法のほか、液体クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法、イムノクロマト法等により、形成された免疫複合体を分離し測定してもよい。

[0023] このように膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とするモノクローナル抗体またはその断片は、診断薬等の医薬品として使用することができる。

[0024] 本発明において、糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を求める方法としては、特に限定はなく、上述のようなイムノアッセイを用いた方法でもよく、また質量分析法によって求めてもよい。質量分析法によって求める場合、例えば

糖タンパク質を酵素等で分解し、得られたペプチド断片及び／又は糖ペプチド断片の質量を質量分析器等で測定することにより、糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を求めることができる。質量分析器を使用する方法において、糖タンパク質からペプチド断片を得る方法としては、例えばＪ．　Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　Ｒｅｓ．３，５５６－５６６　（２００４）に報告されているように、糖鎖分解酵素による一連の糖鎖除去処理とエンド型ペプチダーゼによるタンパク質のペプチド骨格の断片化が挙げられる。糖鎖分解酵素による一連の糖鎖除去処理の一例を挙げると、エキソ型糖鎖分解酵素であるシアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、ヘキソサミニダーゼ、マンノシダーゼ、フコシダーゼの中から選ばれる１つ以上の酵素と、Ｎ型糖鎖の基幹構造部分のキトビオース構造に作用するエンド型グリコシダーゼ、例えばエンドグリコシダーゼＨなどを使用して、Ｎ－アセチルグルコサミンの単糖構造をＮ型糖鎖修飾可能部位のアスパラギン残基上に残す方法がある。この方法では、Ｎ－アセチルグルコサミンの単糖構造がタンパク質のペプチド骨格上に残るため、任意のエンド型ペプチダーゼ処理によって得られた断片のうち、アミノ酸配列から計算上求められる推定分子量からＮ－アセチルグルコサミンの分子量だけ質量が増加した糖ペプチド断片を検出することで、特定のＮ型糖鎖修飾可能部位における糖鎖の付加状態が判別可能となる。以上に挙げた方法によって膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を分析することで、質量分析法によって糖鎖付加状態の有無を確認することができる。

発明の効果

[0025] 本発明により、癌の検出、特に膵臓癌の検出を行うことができる。また本発明により、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とするモノクローナル抗体、及びそのモノクローナル抗体と同時に膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に結合することができるモノクローナル抗体が提供される。この２つの抗体を使用し、前述の癌の検出を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]実施例２で、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体の糖鎖修飾欠損変異導入抗原に対する結合性を測定した結果を示す図である。

[図2]実施例２で、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体のアミノ酸置換変異導入抗原に対する結合性を測定した結果を示す図である。

[図3]実施例２で、糖鎖修飾欠損変異導入抗原ｍ００１の糖鎖結合状態を分析した結果を示す図である。

[図4]実施例２で、各フラクションにおけるアルファーメチルマンノシドの濃度と、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体の結合性を測定した結果を示す図である。

[図5]実施例３で、検体中の糖鎖修飾膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を測定した結果を示す図である。

[図6]実施例３で、膵臓癌と非膵臓癌の測定値の分布と２群間での有意差を示す図である。

[図7]実施例３で、膵臓癌と非膵臓癌のＲＯＣ統計解析の結果を示す図である。

[図8]実施例４で、ウェスタンブロット法により抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体の抗原認識性能を検討した結果を示す図である。

[図9]実施例４で、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体を使用したウェスタンブロット法により、健常人血清および膵臓癌患者血清中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＡｓｎ８８における糖鎖結合の有無を調べた結果を示す図である。

[図10]実施例５で、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体ＲｒｈＲＮ１１１１の糖鎖修飾欠損変異導入抗原に対する結合性を測定した結果を示す図である。

[図11]実施例５で、健常人と膵臓癌のＲＮａｓｅ　１の測定値から、F_3／ｔ値およびG_3／ｔ値を求めた結果を示す図である。

[図12]実施例６で、ＲｒｈＲＮ０７２３抗体を用いた抗原固相競合法により

、競合抗原の希釈系列を測定した結果を示す図である。

実施例 1

[0027] 実施例１　抗体の作製

免疫原の調製

ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１全長を含むポリペプチドを取得するために、昆虫細胞で発現可能なプラスミドベクターに成熟型ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１（配列番号２）をコードする遺伝子配列を挿入した発現プラスミドを作製した。詳しく説明すると、昆虫細胞組換えタンパク質発現用プラスミドであるｐＩＺ／Ｖ５Ｈｉｓ　ｖｅｃｔｏｒ（ライフテクノロジー社）のマルチクローニングサイトに、５’上流側からヒトイムノグロブリンカッパー鎖をコードする遺伝子配列、Ｈｉｓタグをコードする遺伝子配列、ＦＬＡＧタグをコードする遺伝子配列、ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１をコードする遺伝子配列（配列番号１）からシグナルペプチドであるアミノ酸１番から２８番までに相当する８４核酸残基の遺伝子を除いた領域（配列番号２）を挿入した。作製された発現プラスミドｐＩＺ－ＫＦＨ－ｈＲＮａｓｅ１は、昆虫細胞株Ｓｆ９にＣｅｌｌｆｅｃｔｉｎ　ＩＩ　（ライフテクノロジー社）を用いて遺伝子導入を実施したことにより、Ｎ末端側にヒトイムノグロブリンカッパー鎖が付加した組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１が培地中に分泌されることを確認した。培地中に分泌されたタンパク質は、培養上清から抗ヒトイムノグロブリンカッパー軽鎖抗体を用いたアフィニティー精製により濃縮精製して免疫原とした。

[0028] 免疫動物への免疫

上述の免疫原を用いてマウスおよびラットに免疫を実施した。詳しくは、マウスへの免疫の場合、１００μｇの免疫原をフロイント完全アジュバンドと共に、６週齢Ｂａｌｂ／ｃ雌マウス腹腔に投与し初回免疫とした。その後、７日後、１４日後、２１日後、２８日後、３５日後に免疫原１００μｇをフロイント不完全アジュバンドと共に腹腔投与し、追加免疫とした。さらに、４２日後に免疫原１００μｇを生理食塩水と共に腹腔投与し、最終免疫と

した。ラットへの免疫の場合は、１００μｇの免疫原をフロイント完全アジュバンドと共に、６週齢ＷＨＹ雌ラット両後肢フットパッドへ投与し初回免疫とした。その後、２８日後に免疫原１００μｇを生理食塩水と共に後肢フットパッドへ投与し、最終免疫とした。

[0029] 抗体産生ハイブリドーマの作製

最終免疫の３日後に、マウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を回収した。ラットからは、腸骨リンパ節と鼠蹊リンパ節を摘出し、リンパ節細胞を得た。マウス脾臓細胞およびラットリンパ節細胞は、それぞれマウスミエローマ細胞株と電気細胞融合法により融合させた後、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを添加したＧＩＴ培地（和光純薬工業株式会社）で細胞培養用９６ウェルプレートに播種することにより、融合細胞を選択した。

[0030] マウス抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体産生融合細胞株の選定

マウス抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体産生融合細胞株は、融合細胞が培地中に分泌する抗体の、組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に対する反応性を指標にしたＥＬＩＳＡ法によるスクリーニングにより選択した。スクリーニングに用いたＥＬＩＳＡは以下の通りである。９６穴マイクロタイタープレート（グライナー社製）の各ウェルに２５ｎｇのヤギ抗ヒトイムノグロブリンカッパー鎖抗体（シグマアルドリッチ社製）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ　リン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を５０μｌ加えて４℃、１６時間固定した。これらのウェルを３００μｌの洗浄液（２０　ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，　１５０　ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、３％ＢＳＡを含むブロッキング溶液（３％ＢＳＡ，２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）を２００μｌ加えて室温で２時間放置してブロッキングを行った（抗ヒトイムノグロブリンカッパー鎖抗体固相化プレート）。各ウェルを３００μｌの洗浄液で３回洗浄した後、０．５μｇ／ｍｌとなるように希釈液（１％ＢＳＡ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で希釈した組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１

を加え、室温で１時間放置した。各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、５０μｌの融合細胞培養上清を加えて室温で１時間放置した。次に、各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、０．０１μｇのホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識された抗マウスＩｇＧ抗体（Ｒｏｃｋｌａｎｄ社製）を含む希釈液を５０μｌ加えて、室温で１時間放置した。最後に、各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、５０μｌのテトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）溶液（ＫＰＬ社製）を添加して１５分間発色させた後に、１Ｍのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。スクリーニングの結果から、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に強い親和性を示す抗体を産生する融合細胞を得た。得られた融合細胞は、限界希釈法によりモノクローン化され、モノクローナル抗体ＭｒｈＲＮ０６１４を得た。

[0031]　ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体産生融合細胞株の選定

ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体産生融合細胞株は、融合細胞が培地中に分泌する抗体の、ヒト膵臓癌細胞（Ｃａｐａｎ１）由来の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に対する反応性を指標にしたＥＬＩＳＡ法によるスクリーニングにより選択した。スクリーニングに用いたＥＬＩＳＡは以下の通りである。９６穴マイクロタイタープレート（グライナー社製）の各ウェルに２５ｎｇのマウス抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＭｒｈＲＮ０６１４）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ　リン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を５０μｌ加えて４℃、１６時間固定した。これらのウェルを３００μｌの洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、３％ＢＳＡを含むブロッキング溶液（３％ＢＳＡ，２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）を２００μｌ加えて室温で２時間放置してブロッキングを行った（抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体固相化プレート）。各ウェルを３０

０μｌの洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、希釈液（１％ＢＳＡ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で２倍に希釈したヒト膵臓癌細胞（Ｃａｐａｎ１）の培養上清を加え、室温で１時間放置した。各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、５０μｌの融合細胞培養上清を加えて室温で１時間放置した。次に、各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、０．０１μｇのＨＲＰ標識された抗ラットＩｇＧ抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ社製）を含む希釈液を５０μｌ加えて、室温で１時間放置した。最後に、各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、５０μｌのＴＭＢ溶液を添加して１５分間発色させた後に、１Ｍのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。スクリーニングの結果から、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に強い親和性を示す抗体を産生する融合細胞を得た。得られた融合細胞は、限界希釈法によりモノクローン化され、モノクローナル抗体ＲｒｈＲＮ０７２３を得た。

[0032] 実施例２　抗体の特異性測定

哺乳動物発現系による組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の調製

哺乳動物細胞でヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１全長を含むポリペプチドを取得するために、ｐｃＤＮＡ３．１－ｍｙｃＨｉｓベクター（ライフテクノロジー社）にヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１をコードする遺伝子配列（配列番号２）を挿入した発現ベクターを作製した。より詳しくは、免疫原の調製のために作製した昆虫細胞発現用プラスミド（ｐＩＺ－ＫＦＨ－ｈＲＮａｓｅ１）の組換え体タンパク質をコードする遺伝子配列部分を分子生物学的手法によりｐｃＤＮＡ３．１－ｍｙｃＨｉｓベクター（ライフテクノロジー社）に挿入してｐｃＤＮＡ－ＫＦＨ－ｈＲＮａｓｅ１を作製した。作製した哺乳動物細胞用発現プラスミドは、チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞

株（以下、ＣＨＯ－Ｋ１株）にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ライフテクノロジー社）を用いて遺伝子導入を実施したことにより、Ｎ末端側にヒトイムノグロブリンカッパー鎖が付加した組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１が培地中に分泌されることを確認した。培地中に分泌されたタンパク質は、培養上清から抗ヒトイムノグロブリンカッパー軽鎖抗体を用いたアフィニティー精製により濃縮精製して組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を取得した。精製された組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１は、抗体の特異性を明らかにする実験に供された。

[0033] 糖鎖修飾欠損変異抗原の調製

前項で作製した発現ベクター（ｐｃＤＮＡ－ＫＦＨ－ｈＲＮａｓｅ１）を鋳型として、ＰＣＲ変異導入法によってアミノ酸置換変異を繰り返し導入することで、糖鎖修飾欠損変異導入抗原を発現するプラスミドを作製した。ＰＣＲ変異導入法には、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｂａｓａｌ　Ｋｉｔ（タカラバイオ株式会社）を使用し、添付の説明書に従って実施した。詳しくは、Ｎ型糖鎖修飾可能部位のコンセンサス配列（Ａｓｎ－Ｘａａ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、Ｘａａはプロリン以外のアミノ酸残基を指す）の３番目のアミノ酸残基をセリン残基もしくはスレオニン残基以外のアミノ酸に置換することで、糖鎖修飾欠損変異組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ１を発現するプラスミドを作製した（表１）。作製した糖鎖修飾欠損変異導入発現プラスミドは、ＣＨＯ－Ｋ１株にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（ライフテクノロジー社）を用いて遺伝子導入を実施したことにより、Ｎ末端側にヒトイムノグロブリンカッパー鎖が付加した糖鎖修飾欠損変異組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１が培地中に分泌されることを確認した。培地中に分泌された糖鎖修飾欠損変異組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ１は、抗体の特異性を明らかにする実験に供された。

[表1]

変異体名	アミノ酸変異導入部位	糖鎖修飾の可能性		
		Asn34	Asn76	Asn88
WT	変異導入無し	可	可	可
m011	Thr 36 -> Ala	不可	可	可
m101	Ser 78 -> Ala	可	不可	可
m110	Ser 90 -> Ala	可	可	不可
m001	Thr 36 -> Ala, Ser 78 -> Ala	不可	不可	可
m010	Thr 36 -> Ala, Ser 90 -> Ala	不可	可	不可
m100	Ser 78 -> Ala, Ser 90 -> Ala	可	不可	不可
m000	Thr 36 -> Ala, Ser 78 -> Ala, Ser 90 -> Ala	不可	不可	不可
m000-N88D	Thr 36 -> Ala, Ser 78 -> Ala, Asn 88 -> Asp	不可	不可	不可

[0034] 糖鎖修飾欠損変異抗原に対する抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体の反応性の測定

糖鎖修飾欠損変異組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１に対する抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体の反応性は、以下に記載するサンドイッチＥＬＩＳＡ法により測定した。９６穴マイクロタイタープレート（グライナー社製）の各ウェルに２５ｎｇのヤギ抗ヒトイムノグロブリンカッパー鎖抗体（シグマアルドリッチ社製）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を５０μｌ加えて４℃、１６時間固定した。これらのウェルを３００μｌの洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、３％ＢＳＡを含むＴＢＳ溶液を２００μｌ加えて室温で２時間放置してブロッキングを行った（抗ヒトイムノグロブリンカッパー鎖抗体固相化プレート）。各ウェルを３００μｌの洗浄液で３回洗浄した後、前述の糖鎖修飾欠損変異導入発現プラスミドが遺伝子導入されたＣＨＯ－ＫＩ細胞の培養上清を加え、室温で１時間放置した。各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、２５ｎｇのＨＲＰ標識マウス抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＭｒｈＲＮ０６１４）または、２５ｎｇのＨＲＰ標識ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＲｒｈＲＮ０７

２３）を含む希釈液を５０μｌ加え、室温で１時間放置した。最後に、各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、５０μｌのＴＭＢ溶液を添加して１０分間発色させた後に、１Ｍのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。

[0035] 図１に測定した結果を示す。横軸は、各抗体が変異未導入組換え抗原ＷＴに対する結合量を１．０とした時の相対値を示す。縦軸は、各糖鎖修飾欠損変異導入抗原を示す。塗りつぶしの横棒はＲｒｈＲＮ０７２３抗体の結合量、白抜きの横棒はＭｒｈＲＮ０６１４抗体の結合量を示す。９０番目のセリン残基をアラニン残基に置換することにより、８８番目アスパラギン残基が糖鎖修飾されなくなった変異体（ｍ１１０，ｍ０１０，ｍ１００，ｍ０００）に対してのＲｒｈＲＮ０７２３抗体の反応性が、ＭｒｈＲＮ０６１４抗体の反応性に対して低下していることから、ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＲｒｈＲＮ０７２３）が、８８番目のアスパラギン残基の糖鎖修飾可能部位周辺を認識していることが明らかとなった。また、マウス抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＭｒｈＲＮ０６１４）は、どの糖鎖修飾欠損変異抗原に対しても変異未導入組換え抗原ＷＴと同等に反応性を維持していることから、糖鎖修飾可能部位に依存せずに膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を認識する抗体であることが明らかとなった。

[0036] アミノ酸置換変異抗原の調製

前述の発現ベクター（ｐｃＤＮＡ－ＫＦＨ－ｈＲＮａｓｅ１）を鋳型として、ＰＣＲ変異導入法によってアミノ酸置換変異を導入することで、アミノ酸置換変異導入抗原を発現するプラスミドを作製した。ＰＣＲ変異導入法には、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｂａｓａｌ　Ｋｉｔ（タカラバイオ株式会社）を使用し、添付の説明書に従って実施した。詳しくは、配列番号２において８５番目のアミノ酸から９２番目のアミノ酸残基をそれぞれ別のアミノ酸残基に置換することで、アミノ酸置換変異組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を発現するプラスミドを作製した（表２）。作製したアミノ酸置換変異導入発現プラスミドは、ＣＨＯ－Ｋ１株にＬｉｐｏ

ｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ライフテクノロジー社）を用いて遺伝子導入を実施したことにより、Ｎ末端側にヒトイムノグロブリンカッパー鎖が付加したアミノ酸置換変異導入組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ １が培地中に分泌されることを確認した。培地中に分泌されたアミノ酸置換変異導入組換え体ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ １は、抗体の特異性を明らかにする実験に供された。

[0037] [表2]

変異体名	アミノ酸変異導入部位
WT	変異導入無し
R85K	Arg 85 -> Lys
L86I	Leu 86 -> Ile
T87S	Thr 87 -> Ser
N88D	Asn 88 -> Asp
G89S	Gly 89 -> Ser
S90A	Ser 90 -> Ala
R91K	Arg 91 -> Lys
Y92F	Thy 92 -> Phe

アミノ酸置換変異導入抗原に対する抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ １抗体の反応性の測定

アミノ酸置換変異導入抗原に対する抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ １抗体の反応性は、以下に記載するサンドイッチＥＬＩＳＡ法により測定した。９６穴マイクロタイタープレート（グライナー社製）の各ウェルに２５ｎｇのヤギ抗ヒトイムノグロブリンカッパー鎖抗体（シグマアルドリッチ社製）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ リン酸ナトリウム、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を５０μｌ加えて４℃、１６時間固定した。これらのウェルを３００μｌの洗浄液（２０ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、３％ＢＳＡを含むＴＢＳ溶液を２００μｌ加えて室温で２時間放置してブロッキングを行った（抗ヒトイムノグロブリンカッパー鎖抗体固相化プレート）。各ウェルを３００μｌの洗浄液で３回洗浄した後、アミノ酸置換変異導入抗原を発現するプラスミドが遺伝子

導入されたＣＨＯ－ＫＩ細胞の培養上清を加え、室温で１時間放置した。各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、２５ｎｇのＨＲＰ標識マウス抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＭｒｈＲＮ０６１４）または、２５ｎｇのＨＲＰ標識ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＲｒｈＲＮ０７２３）を含む希釈液を５０μｌ加え、室温で１時間放置した。最後に、各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、５０μｌのＴＭＢ溶液を添加して１０分間発色させた後に、１Ｍのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。

[0038] 図２にその結果を示す。横軸は、各抗体が変異未導入組換え抗原ＷＴに対する結合量を１．０とした時の相対値を示す。縦軸は、各アミノ酸置換変異導入抗原を示す。塗りつぶしの横棒はＲｒｈＲＮ０７２３抗体の結合量、白抜きの横棒はＭｒｈＲＮ０６１４抗体の結合量を示す。変異体Ｒ８５Ｋ，Ｌ８６Ｉ，Ｎ８８Ｄ，Ｇ８９Ｓ，Ｓ９０Ａに対するＲｒｈＲＮ０７２３の反応性が、ＭｒｈＲＮ０６１４に対する反応性に比べ極端に低下していることから、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体ＲｒｈＲＮ０７２３が、糖鎖修飾可能部位である８８番目アスパラギン残基の周辺のアミノ酸残基、特に８５番目のアルギニン残基から、９０番目のセリン残基までを認識していることが確認された。

[0039] Ａｓｎ８８糖鎖修飾可能部位における糖鎖修飾抗原に対する抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体の反応性

ＣＨＯ－Ｋ１細胞で発現させた８８番目アスパラギン残基のみが糖鎖修飾を受ける糖鎖修飾欠損変異導入ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１（ｍ００１）をウエスタンブロット法により分析した。即ち、変異未導入組換え抗原ＷＴと糖鎖修飾欠損変異導入抗原ｍ００１を、抗ヒトイムノグロブリンカッパー軽鎖抗体を使用して免疫沈降後にＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により分離した。分離されたタンパク質は、ＰＶＤＦ膜に転写した後に膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１

のＮ末端側１４アミノ酸配列を認識する抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＲＮ１５０１３）と反応させて検出した。発現した組換え体タンパク質のうち、ＷＴでは糖鎖が付加していない分子から糖鎖が１、２、３箇所に付加した分子まで検出され糖鎖付加量にばらつきがあり、ｍ００１では糖鎖が一箇所付加した分子と糖鎖が付加していない分子の２種類が含まれることが明らかとなった（図３）。

[0040] 次に、８８番目アスパラギン残基が糖鎖修飾を受けた糖鎖修飾欠損変異導入抗原ｍ００１に対する抗体の反応性を検討した。即ち、糖タンパク質のＮ型糖鎖を認識して結合するコンカナバリンＡレクチンを固定化したレクチンカラムを使用して、８８番目アスパラギン残基が糖鎖修飾を受けた糖鎖修飾欠損変異導入抗原ｍ００１を分画した。具体的には、レクチンカラム結合緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　$CaCl_2$、０．５ｍＭ　$MgCl_2$、ｐＨ７．４）で平衡化したコンカナバリンＡレクチン結合カラム（ＨｉＴｒａｐ－ＣｏｎＡ、ＧＥヘルスケア社製）に、糖鎖修飾欠損変異導入ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１（ｍ００１）を発現させたＣＨＯ－Ｋ１培養細胞上清を流して、糖鎖修飾欠損変異導入ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１（ｍ００１）を結合させた。コンカナバリンＡレクチン結合カラムは、レクチンカラム結合緩衝液で充分に洗浄した後、アルファーメチルマンノシド（シグマアルドリッチ社製）を含むレクチンカラム結合緩衝液を使用して、結合した糖鎖修飾欠損変異導入ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１（ｍ００１）を溶出した。サンプル注入からすべての溶出画分をフラクションコレクターで回収して、分画した各画分に含まれる組換え体抗原の量をサンドイッチＥＬＩＳＡ法により測定した。検出には、糖鎖修飾の影響を受けない抗体ＭｒｈＲＮ０６１４と、Ａｓｎ８８糖鎖修飾可能部位近傍を認識する抗体ＲｒｈＲＮ０７２３を使用した。

[0041] 結果を図４に示す。横軸は、カラム分離での各画分を示し、第一縦軸はＥＬＩＳＡ分析の測定値を示し、第二縦軸はアルファーメチルマンノシドの濃度を示している。破線はＭｒｈＲＮ０６１４抗体の結合量の変化を示し、実

線はＲｒｈＲＮ０７２３抗体の結合量を示す。点線は、溶出糖であるアルファーメチルマンノシドの各フラクションでの濃度を示す。図４に示した通り、ＭｒｈＲＮ０６１４では、コンカナバリンＡ結合画分（アルファーメチルマンノシド溶出画分）に抗原が溶出されてきていることが明らかとなったが、同じ画分に対してＲｒｈＲＮ０７２３は反応性を示さないことが明らかとなった。一方、コンカナバリンＡに結合しない画分（素通り画分）は、両抗体とも反応性を示すことが明らかとなった。コンカナバリンＡ結合画分に含まれる抗原をウエスタンブロット法により解析すると、この画分には糖鎖修飾された抗原のみが含まれることが示された。以上の結果から、新たに取得した抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＲｒｈＲＮ０７２３）は、８８番目アスパラギン残基が糖鎖修飾を受けた膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１には反応せず、当該残基が糖鎖修飾を受けていない場合にのみ結合する抗体であることが示された。すなわち、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＲｒｈＲＮ０７２３）を使用した免疫学的測定系においては、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の８８番目アスパラギン残基に糖鎖が結合していない場合の量を測定していることが明らかとなった。

[0042] 実施例３　サンドイッチＥＬＩＳＡによるヒト血清検体の測定

生体試料を被検体として以下のサンドイッチＥＬＩＳＡによって測定した。

[0043] 膵臓癌患者由来生体試料中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位のうち、Ｎ型糖鎖が結合していない部位の測定

[0044] ヒト生体試料中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ型糖鎖修飾可能部位のうち、Ｎ型糖鎖が結合していない部位を測定するために、健常人血清（４０検体）、膵臓癌患者血清（５０検体、ＢｉｏＴｈｅｍｅ社）、膵臓疾患患者血清（非癌、１２検体、ＢｉｏＴｈｅｍｅ社）、乳癌患者血清（２０検体　ＢｉｏＴｈｅｍｅ社）、良性乳腺腫瘍患者血清（１８検体）、前立腺癌患者血清（２４検体、ＳＬＲ社）、前立腺肥大症患者血清（２４検体、ＳＬＲ社）を用意した（表３）。

[表3]

被検体分類	検体数
健常人血清	40
膵臓癌患者血清	50
非癌膵臓疾患患者血清	12
乳癌患者血清	20
良性乳腺腫瘍患者血清	18
前立腺癌患者血清	24
前立腺肥大症患者血清	24
総計	188

測定は以下に示す方法で実施した。９６穴マイクロタイタープレート（グライナー社製）の各ウェルに２５ｎｇのマウス抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ１抗体（ＭｒｈＲＮ０６１４）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ　リン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を５０μｌ加えて４℃、１６時間固定した。これらのウェルを３００μｌの洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、３％ＢＳＡを含むブロッキング溶液（３％ＢＳＡ，２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）を２００μｌ加えて室温で２時間放置してブロッキングを行った（抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体固相化プレート）。各ウェルを３００μｌの洗浄液で３回洗浄した後、希釈液（１％ＢＳＡ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で１０倍に希釈した膵臓癌患者血清または対照被検体として健常人血清を加え、室温で１時間放置した。各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、２５ｎｇのＨＲＰ標識ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１抗体（ＲｒｈＲＮ０７２３）を含む希釈液を５０μｌ加え、室温で１時間放置した。次に、各ウェルを３００μｌの洗浄液で３回洗浄した後、５０μｌのＴＭＢ溶液を添加して１０分間発色させた後に、１Ｍのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。他の検体

についても同様に測定した。

[0045] 図５にその結果を示す。横軸は癌の種類を示し、縦軸はＥＬＩＳＡ測定の測定値を示す。黒丸は各検体の測定値を示し、その統計的分布をボックスプロットで示す。膵臓癌以外はある特定の値以上を示すのに対して、膵臓癌は他の群と比べて有意に低値を示している。即ち、膵臓癌患者では、健常人に比べて、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＲｒｈＲＮ０７２３が認識するＮ型糖鎖修飾可能部位にＮ型糖鎖が結合していない場合が少ないことを示している。これは裏返して言えば、膵臓癌患者では、健常人に比べて、このＮ型糖鎖修飾可能部位にＮ型糖鎖が結合している場合が多いことを示すものである。また膵臓癌以外の６つの群をあわせたもの（非膵臓癌群）と膵臓癌群に分けた場合の有意差検定の結果、ｐ値は７．３×１０$^{-15}$という非常に低い値となり、明らかに有意差が認められた（図６）。

[0046] この測定結果をもとに、膵臓癌の判別精度解析結果を図７と表４に示す。ＲＯＣ統計解析は、統計解析ソフトウェアであるＲを使用して実施した。最適化されたカットオフ値（ＡＢＳ４５０ｎｍ＝０．８１１）での特異性は９６％、感度は７８％であり、診断性能の１つの指標となるＡＵＣは０．９３３と充分に高い値を示した。

[表4]

特異性	96%
感度	78%
AUC	0.933

実施例４　膵臓癌患者血清中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の糖鎖修飾可能部位Ａｓｎ８８における糖鎖結合の検討

以下の手順に従って、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１の糖鎖修飾可能部位Ａｓｎ８８を認識して結合する抗体を作製し、ウェスタンブロット法の１次抗体として使用した。

[0047] 免疫動物への免疫

配列番号２のアミノ酸配列８５～９５に相当する部分を化学合成したペプ

チド（配列番号４）をＫＬＨに縮合して免疫原とし、それを用いてラットに免疫を実施した。詳しくは、１００μｇの免疫原をフロイント完全アジュバンドと共に、６週齢ＷＨＹ雌ラット両後肢フットパッドへ投与し初回免疫とした。その後、２８日後に免疫原１００μｇを生理食塩水と共に後肢フットパッドへ投与し、最終免疫とした。

[0048] 抗体産生ハイブリドーマの作製

最終免疫の３日後に、免疫したラットの腸骨リンパ節と鼠蹊リンパ節を摘出し、リンパ節細胞を得た。ラットリンパ節細胞は、マウスミエローマ細胞株と電気細胞融合法により融合させた後、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを添加したＧＩＴ培地（和光純薬工業株式会社）で細胞培養用９６ウェルプレートに播種することにより、融合細胞を選択した。

[0049] ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体産生融合細胞株の選定

前述の融合細胞が培地中に分泌する抗体について、スクリーニング用ペプチド（配列番号５又は６）をＢＳＡに縮合させたスクリーニング抗原を用いたＥＬＩＳＡ法によりスクリーニングを行い、ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体産生融合細胞株を選択した。スクリーニングに用いたＥＬＩＳＡは以下の通りである。９６穴マイクロタイタープレート（グライナー社製）の各ウェルに、２５ｎｇのスクリーニング用ペプチド縮合ＢＳＡを含むリン酸緩衝液（５０ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）をそれぞれ５０μｌ加えて４℃、１６時間固定した。これらのウェルを３００μｌの洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、３％ＢＳＡを含むブロッキング溶液（３％ＢＳＡ，２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を２００μｌ加えて室温で２時間放置してブロッキングを行った（スクリーニング用ペプチド縮合ＢＳＡ固相化プレート）。各ウェルを３００μｌの洗浄液で３回洗浄した後、５０μｌの融合細胞培養上清をそれぞれのウェルに加えて室温で１時間放置した。次に、各ウェルを３００μｌ

の界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、０．０１μｇのＨＲＰ標識された抗ラットＩｇＧ抗体（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ社製）を含む希釈液を５０μｌ加えて、室温で１時間放置した。最後に、各ウェルを３００μｌの界面活性剤を含む洗浄液で３回洗浄した後、５０μｌのＴＭＢ溶液を添加して１５分間発色させた。その後、１Ｍのリン酸溶液を添加することで反応を停止し、４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体産生融合細胞株の選定基準は、前述のスクリーニング用ペプチドのうち、配列番号５のペプチドに反応し、かつ配列番号６のペプチドには反応しない抗体を産生する融合細胞とした。なお、配列番号５のペプチドは、天然型の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１（配列番号２）の８５～９５番目に相当する配列を含むものである。また配列番号６のペプチドは、配列番号５のペプチドにおいて５番目のＡｓｎ残基をＡｓｐ残基に置換した配列に相当し、当該置換箇所は配列番号２の８８番目Ａｓｎ残基に相当するものである。

[0050] 選択された融合細胞株の上清は、さらにウェスタンブロット法によるスクリーニングを実施し、ウェスタンブロットのＰＶＤＦ膜上で変異導入無しの組換え体抗原ＷＴに対して結合することが確認できた抗体を生産する融合細胞株を最終的に選択した。

[0051] スクリーニングの結果から、ウェスタンブロット法の一次抗体として膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１特異的に検出することが可能な抗体を産生する融合細胞を得た。得られた融合細胞は、限界希釈法によりモノクローン化され、モノクローナル抗体ＲＮ３Ｆ３４を得た。

[0052] ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体の抗原認識特異性の確認

得られたラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体（ＲＮ３Ｆ３４）の抗原認識特異性を確認する為に、Ａｓｎ８８の糖鎖修飾可能部位のみが残された糖鎖修飾欠損変異導入ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１（ｍ００１）に対する反応性を、ウェスタンブロット法により確認した。図８に示す

ように膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ末端側１４アミノ酸配列に結合する抗体ＲＮ１５０１３では、ｍ００１に糖鎖が結合した高分子量側の分子と、糖鎖が結合していない低分子量側の分子の両方が検出された。これに対して、ＲＮ３Ｆ３４抗体では、糖鎖が結合していない低分子量側の分子のみが検出された。以上の結果から、作製したラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体（ＲＮ３Ｆ３４）は、Ａｓｎ８８に糖鎖が結合した構造の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１には結合しない抗体であることが確認された。

[0053] 前述の発現ベクター（ｐｃＤＮＡ－ＫＦＨ－ｈＲＮａｓｅ１　ｍ００１）を鋳型としたＰＣＲ変異導入法によって、変異体ｍ００１の８８番目のＡｓｎをアスパラギン酸に置換させた変異体発現ベクター（ｐｃＤＮＡ－ＫＦＨ－ｈＲＮａｓｅ１　ｍ０００－Ｎ８８Ｄ）を作製して、ＣＨＯ－Ｋ１細胞株に発現させた変異導入抗原（ｍ０００－Ｎ８８Ｄ、表１）に対する反応性も、同様に確認した。図８に示すように膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ末端側１４アミノ酸配列に結合する抗体ＲＮ１５０１３によって、ｍ０００－Ｎ８８Ｄが検出されたのに対して、ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体（ＲＮ３Ｆ３４）はｍ０００－Ｎ８８Ｄを検出できないことが確認できた。このようにＡｓｎ８８がアスパラギン酸に置換したものには、ＲＮ３Ｆ３４抗体が結合しないことが確認された。これは即ち、ＰＮＧａｓｅＦ等によりＡｓｎ８８に結合している糖鎖の脱糖鎖処理を行った場合に、それに伴ってアスパラギンからアスパラギン酸へアミノ酸変換された膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１には、ＲＮ３Ｆ３４抗体が結合しないことを意味する。したがって、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＡｓｎ８８に糖鎖が結合していてＰＮＧａｓｅＦによる脱糖鎖に伴いアスパラギン酸へアミノ酸変換された部位には、ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体（ＲＮ３Ｆ３４）は結合せず、Ａｓｎ８８に糖鎖が結合しておらず脱糖鎖処理によってもアミノ酸変換を起こさなかった部位に結合する。このようにＰＮＧａｓｅＦ等による脱糖鎖処理後の反応性を見た場合に、ＲＮ３Ｆ３４抗体は、配列番号２のアミノ酸配列の８８番目のＡｓｎが糖鎖結合していなかった場合に結合し

、糖鎖結合していた場合には結合しないという意味において、ＲｒｈＲＮ０７２３と同等の性能を持つものである。

[0054] ヒト血清中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＡｓｎ８８の糖鎖結合の変化の確認

ラット抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体（ＲＮ３Ｆ３４）を使用して、ＰＮＧａｓｅＦによる脱糖鎖処理をしたヒト血清中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１をウェスタンブロット法で検出し、ヒト血清中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＡｓｎ８８における糖鎖結合の有無を測定した。即ち、健常人血清５検体と膵臓癌患者血清６検体から、ＭｒｈＲＮ０６１４抗体を使用して免疫沈降法により膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を抽出し、可溶化変性バッファーで膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を変性した後に、ＰＮＧａｓｅＦによって脱糖鎖処理を行った。処理された試料は、ウェスタンブロット法によって解析した。検出には、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＮ末端側１４アミノ酸配列を認識するＲＮ１５０１３と、抗ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１ペプチド抗体ＲＮ３Ｆ３４を使用した。図９に示したように、ＲＮ１５０１３では健常人血清、膵臓癌患者血清ともに一定量の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１が検出され、両者の間に著しい差は認められなかった。一方、ＲＮ３Ｆ３４による検出では、健常人血清では膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１が検出されたのに対し、膵臓癌患者血清では検出されない、または検出量が健常人血清と比べて著しく低いという結果となった。この結果から、膵臓癌患者血清中の膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１は、健常人血清に比べて、Ａｓｎ８８にＮ型糖鎖が結合している場合が多いことが確認できた。

[0055] 実施例５　ＲＮａｓｅ　１のＡｓｎ８８の糖鎖修飾可能部位において糖鎖が結合していない部位の量と、Ａｓｎ８８の糖鎖修飾可能部位の量との比を求めることによる膵癌の検出

[0056] ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を特異的に認識し、かつ３つの糖鎖修飾可能部位における糖鎖の有無に拘らず結合可能な２つの抗体を使用した免疫測定試薬と、Ａｓｎ８８に糖鎖が結合していないＲＮａｓｅ　１を特異的に測

定する免疫測定試薬を作製して、それぞれの試薬で血清試料中のＲＮａｓｅ１を測定した。具体的には、ヒト膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１を特異的に認識し、かつ３つの糖鎖修飾可能部位における糖鎖の有無に拘らず結合可能な２つの抗体としては、前述のＭｒｈＲＮ０６１４とＲｒｈＲＮ１１１１を用いた。ＲｒｈＲＮ１１１１は、ＲｒｈＲＮ０７２３を取得した際に、３つの糖鎖修飾可能部位における糖鎖の有無に拘らず結合可能な抗体として単離されたものである。ＲｒｈＲＮ１１１１の抗原認識特異性は、実施例２で抗体の特異性の測定に使用した、糖鎖修飾欠損変異抗原を用いたＥＬＩＳＡ法と同じ方法で検討した。結果を図１０に示す。横軸は、各抗体が変異未導入組換え抗原ＷＴに対する結合量を１．０とした時の相対値を示す。縦軸は、各糖鎖修飾欠損変異導入抗原を示す。塗りつぶしの横棒はＲｒｈＲＮ０７２３抗体の結合量、白抜きの横棒はＲｒｈＲＮ１１１１抗体の結合量を示す。図１０に示した通り、ＲｒｈＲＮ０７２３は、糖鎖修飾可能部位全てに変異を入れ糖鎖修飾を全く受けない変異体ｍ０００に対して反応性がないのに対して、ＲｒｈＲＮ１１１１のｍ０００に対する反応性は、変異未導入組換え抗原ＷＴと比べて約９０％の反応性を保持している。よって、ＲｒｈＲＮ１１１１は３つの糖鎖修飾可能部位における糖鎖の有無に拘らず結合可能な抗体であると確認された。

[0057] 以下に、これらの抗体を用いて構築した免疫測定系の測定試薬の調製法、評価方法を示す。水不溶性担体（内部にフェライトを練り込んだ粒子径約１．５ｍｍのＥＶＡ製）にＭｒｈＲＮ０６１４を９０ｎｇ／担体となるよう物理的に吸着させ、吸着後ＢＳＡを用いてブロッキング処理を行った。水不溶性担体については、１個当たり約１００ｎｇの蛋白質を物理的に吸着可能である。磁力透過性の容器（容量１．２ｍｌ）に１２個の担体を入れた後、０．５μｇ／ｍＬのアルカリ性フォスファターゼ標識を施した抗体ＲｒｈＲＮ０７２３または０．５μｇ／ｍＬのアルカリ性フォスファターゼ標識を施した抗体ＲｒｈＲＮ１１１１を含む緩衝液（１％　ＢＳＡ、２．５％デキストラン、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０，２０ｍＭトリ

ス緩衝液、ｐＨ７．４）を加え、凍結乾燥した。この試薬を市販の全自動免疫測定装置（東ソー（株）製、商品名ＡＩＡ－６００ＩＩ）を用いて全自動での測定を行った。その測定原理は以下の通りである。即ち、測定サンプルを１５０μＬ加え、水不溶性担体を３７℃で１０分間磁石を用いて運動させ、混合液を攪拌した状態で免疫反応させた。反応後、Ｂ／Ｆ分離操作を行って遊離の標識抗体を分離除去し、アルカリ性フォスファターゼの基質である４－メチルウンベリフェリルリン酸を加え、該基質添加後２０秒から２９５秒までの酵素反応分解物（４メチルウンベリフェロン）の単位時間あたりの生成速度（ｎＭ／秒）を測定した。前述の標識化抗体ＲｈＲＮ０７２３を含む凍結乾燥試薬を用いてサンプルの測定を行い、膵臓特異的ＲＮａｓｅ１の８８番目の糖鎖修飾可能部位において糖鎖が結合していない部位の量（以下、F_3値という）を求めた。また前述の標識化抗体ＲｈＲＮ１１１１を含む凍結乾燥試薬を用いてサンプルの測定を行い、膵臓特異的ＲＮａｓｅ１の量（以下、トータル値という）を求めた。そしてその比（F_3／ｔ）を以下の式（１）によって求めた。

[0058] F_3／ｔ＝F_3値／トータル値　　（１）

図１１にその結果を示す。健常人から得られた血清検体中のF_3／ｔ値は、０．８－１．０前後であるのに対して、膵臓癌患者検体から得られた検体においては、０．１－０．７前後に幅広く分布しており、健常人検体と有意に差があることが確認できた。

[0059] また以下の式（２）の値を求めることにより、膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のトータル値と、８８番目の糖鎖修飾可能部位において糖鎖が結合している部位の量との比（G_3／ｔ）を求めた。その結果を図１１に示す。膵臓癌患者検体から得られた検体においては、健常人検体と有意に差があることが確認できた。

G_3／ｔ＝１－（F_3／ｔ）　　（２）

[0060] 実施例６　抗原固相競合法による測定

膵臓特異的ＲＮａｓｅ　１のＡｓｎ８８糖鎖修飾可能部位において糖鎖が

結合していない部位の量を、抗原固相競合法により測定する方法を構築した。即ち、膵臓癌由来培養細胞株Ｃａｐａｎ　１の培養上清から、ＲｒｈＲＮ０７２３固定化カラムを使用してＲｒｈＲＮ０７２３抗体に反応するＲＮａｓｅ　１を精製した。この抗原を濃縮後、タンパク質測定キットにより抗原溶液のタンパク質濃度を決定した。精製したＲＮａｓｅ　１は、ビオチン導入試薬　（ｓｕｌｆｏＮＨＳ－ＬＣＬＣ－ｂｉｏｔｉｎ、Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を用いてビオチン化し、固相用抗原とした。ストレプトアビジン固定化ダイナビーズ（Ｄｙｎａｌ社）に対して、１００μｌビーズ懸濁液に対して約２．５μｇの上述のＲＮａｓｅ　１を固定化して抗原固相化ビーズを作製した。

[0061] この抗原固相化ビーズ（４μｌ）、ＨＲＰ標識ＲｒｈＲＮ０７２３抗体（１０ｎｇ）、連続希釈した競合抗原（０ｎｇ－１００ｎｇ）を混合した後、１時間反応させた。反応後の溶液から、磁石を使用して磁性ビーズのみを回収し、洗浄液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で３回洗浄した後、ビーズをＴＭＢ溶液を添加して１０分間発色させた。発色した溶液に、１Ｍリン酸を添加することで反応を停止させて、４５０ｎｍにおける吸光度を測定することで、ビーズに結合したＨＲＰ標識ＲｒｈＲＮ０７２３抗体量を測定した。図１２に、抗原固相化競合法による前述の精製ＲＮａｓｅ　１の測定結果を示す。実線（第１軸）は測定値を示し、破線（第２軸）は抗原濃度が０の時の測定値を各濃度における測定値で除した値である。競合抗原として反応に持ち込んだＲＮａｓｅ１の量に依存して測定値が変化していることが分かる。以上の結果から、ＲｒｈＲＮ０７２３抗体を使用した抗原固相化競合法により、Ａｓｎ８８に糖鎖が結合していないＲＮａｓｅ　１量の測定が可能であることが示された。

請求の範囲

[請求項1] 糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を測定することを特徴とする癌の検出方法。

[請求項2] 癌が膵臓癌である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 糖タンパク質が膵臓特異的リボヌクレアーゼ１である請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 膵臓癌患者では健常人に比べてＮ型糖鎖が結合している部位の量が増加する、請求項２又は３に記載の方法。

[請求項5] 下記Ａ，Ｂにおいて、ＡとＢとの比を求めることを特徴とする、癌の検出方法。

Ａ＝糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量

Ｂ＝糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位の量

[請求項6] 癌が膵臓癌である、請求項５に記載の方法。

[請求項7] 糖タンパク質が膵臓特異的リボヌクレアーゼ１である請求項５又は６に記載の方法。

[請求項8] 請求項６又は７に記載の方法において、Ａ＝Ｎ型糖鎖が結合していない部位の量、であり、膵臓癌患者では、健常人と比べて、Ａ／Ｂの値が小さくなる方法。

[請求項9] 請求項６又は７に記載の方法において、Ａ＝Ｎ型糖鎖が結合している部位の量、であり、膵臓癌患者では、健常人と比べて、Ａ／Ｂの値が大きくなる方法。

[請求項10] 請求項７～９いずれかに記載の方法において、膵臓特異的リボヌクレアーゼ１の量を求め、その値を換算してＢの値とする方法。

[請求項11] Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の３４番目、７６番目及び８８番目から選ばれる１つ以上のアスパラギン残基である、請求項１～１０いずれか１項に記載の方法。

[請求項12] Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の８８番目のアスパラギン残基である、請求項１１に記載の方法。

[請求項13] Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の７６番目のアスパラギン残基である、請求項１１に記載の方法。

[請求項14] Ｎ型糖鎖修飾可能部位が、配列番号２に示された配列の３４番目のアスパラギン残基である、請求項１１に記載の方法。

[請求項15] 膵臓特異的リボヌクレアーゼ１のＮ型糖鎖修飾可能部位を抗原認識部位の一部とするモノクローナル抗体またはその断片。

[請求項16] 膵臓特異的リボヌクレアーゼ１のＮ型糖鎖修飾可能部位に、糖鎖が結合していない場合に結合し、Ｎ型糖鎖が結合している場合に結合が阻害される、請求項１５に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

[請求項17] 抗原認識部位が、配列番号２に示された配列の８８番目のアスパラギン残基を含む領域である請求項１５又は１６に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

[請求項18] 請求項１５～１７のいずれか１項に記載されたモノクローナル抗体またはその断片と同時に膵臓特異的リボヌクレアーゼ１に結合できることを特徴とする、モノクローナル抗体またはその断片。

[請求項19] （ａ）請求項１５～１７のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体またはその断片、及び試料、を接触させ、（ａ）のモノクローナル抗体またはその断片と複合体を形成した膵臓特異的リボヌクレアーゼ１を測定する、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項20] 請求項１９において、さらに（ｂ）請求項１８に記載のモノクローナル抗体またはその断片、を試料と接触させ、（ａ）及び（ｂ）の２つのモノクローナル抗体または抗体断片と複合体を形成した膵臓特異的リボヌクレアーゼ１を測定する方法。

[請求項21] 請求項２０に記載の方法において、試料を、（ａ）又は（ｂ）の一方と接触させる第一の接触工程と、第一の接触工程で得られたものに

（ａ）又は（ｂ）の他方を接触させる第二の接触工程を含む方法。

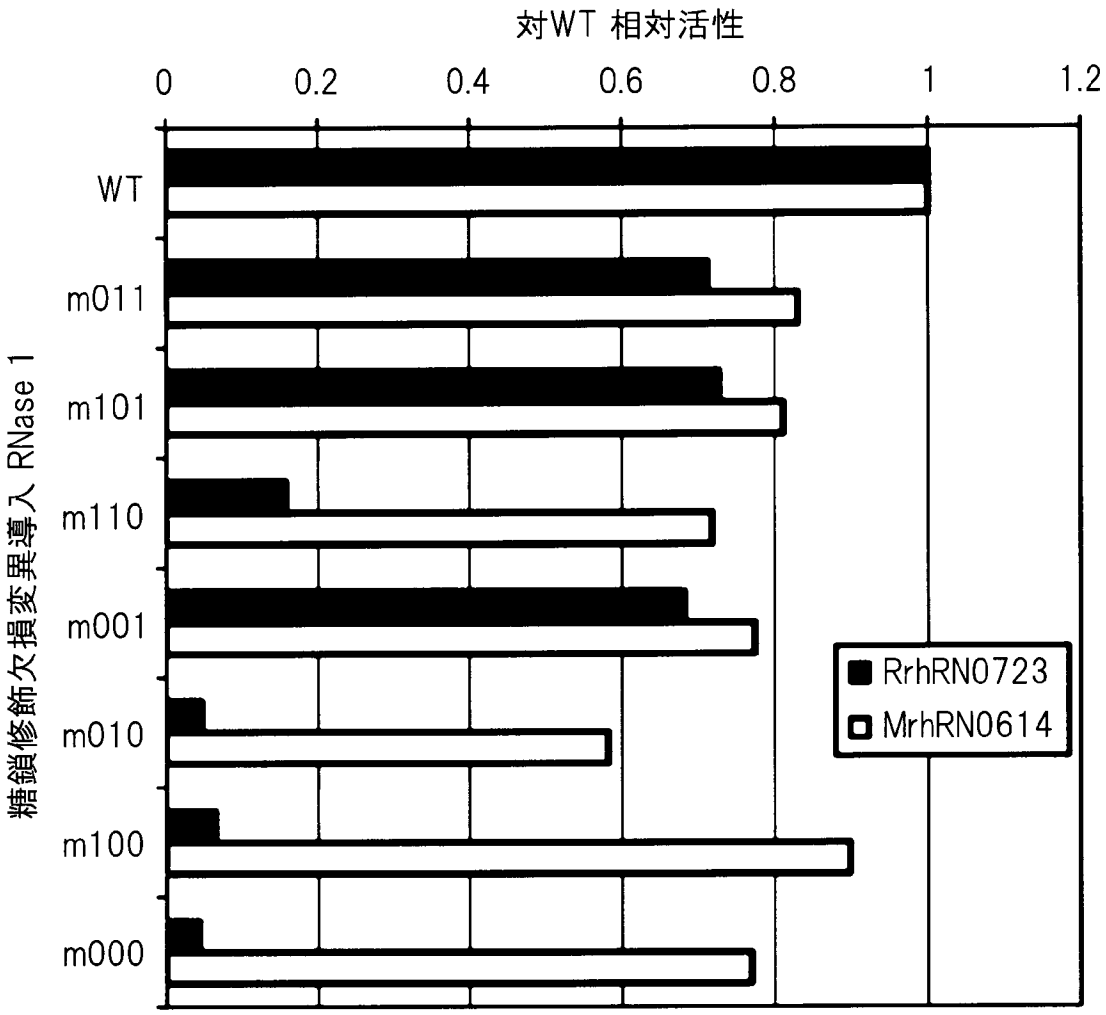
[請求項22] 請求項１５～１７のいずれか１項に記載のモノクローナル抗体またはその断片を含有することを特徴とする医薬品。

[請求項23] 糖タンパク質のＮ型糖鎖修飾可能部位であって、Ｎ型糖鎖が結合している部位又は結合していない部位の量を質量分析法によって求める、請求項１～１４いずれか１項に記載の方法。

[請求項24] 請求項２３に記載の方法において、糖タンパク質のペプチド断片および／または糖ペプチド断片の質量を質量分析法によって測定する方法。

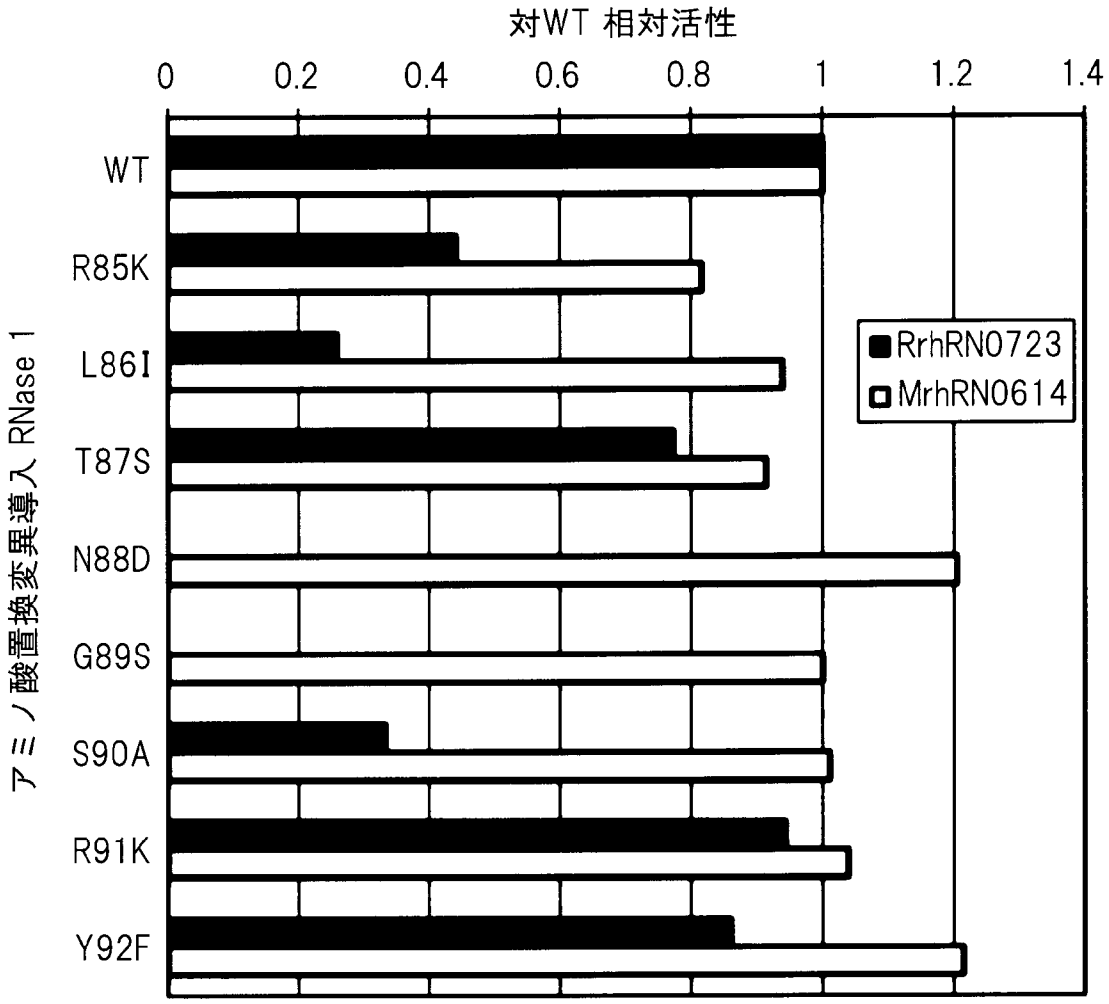
[図1]

図1


対WT 相対活性
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
WT
m011
m101
m110
m001
m010
m100
m000
糖鎖修飾欠損変異導入 RNase 1
RrhRN0723
MrhRN0614

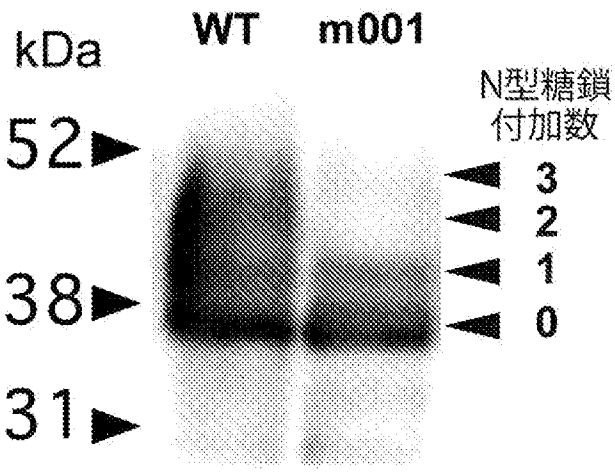
[図2]

図2


対WT 相対活性
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
WT
R85K
L86I
T87S
N88D
G89S
S90A
R91K
Y92F
アミノ酸置換変異導入 RNase 1
RrhRN0723
MrhRN0614

[図3]

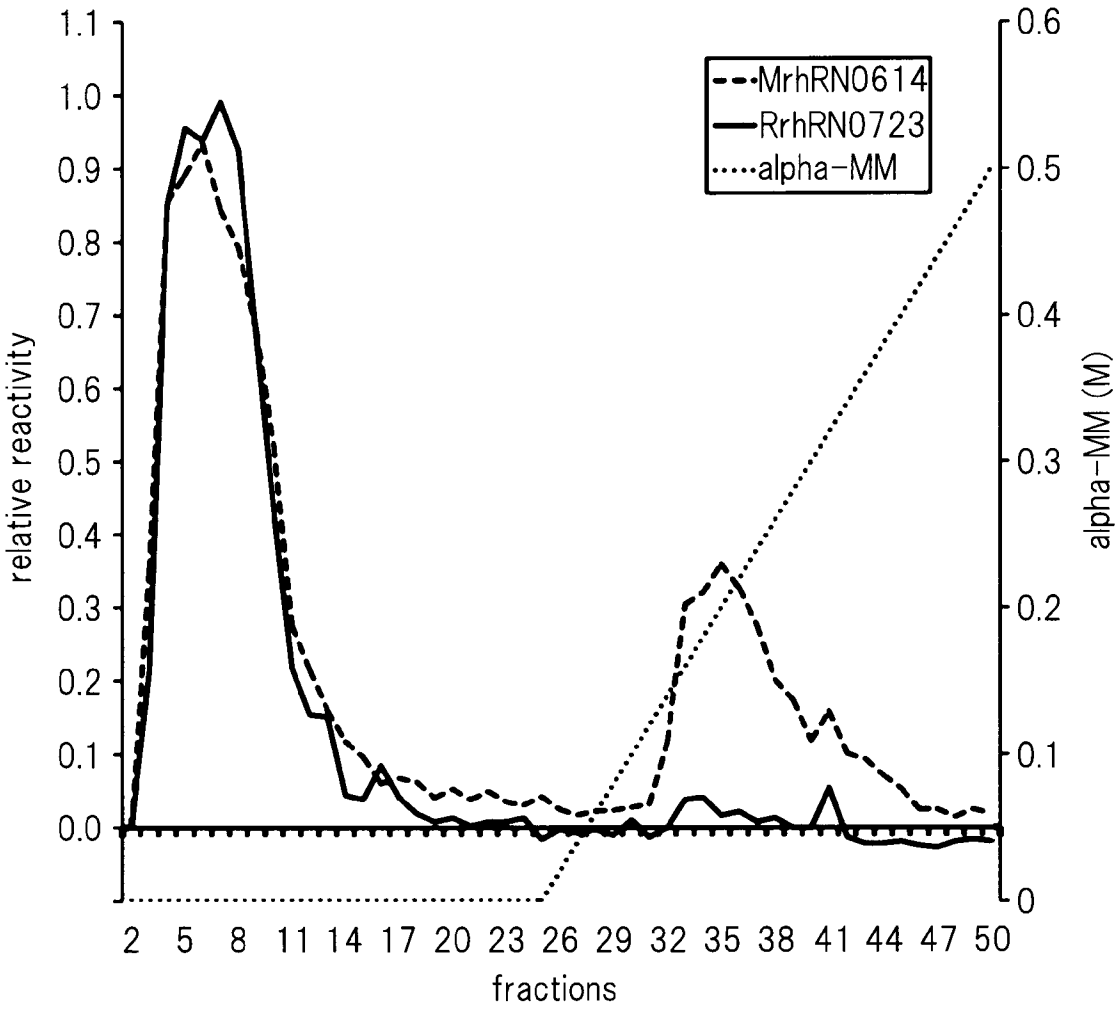
図3



免疫沈降抗体: 抗ヒト kappa 軽鎖抗体
免疫染色抗体: 抗RNase1抗体 (RN15013)

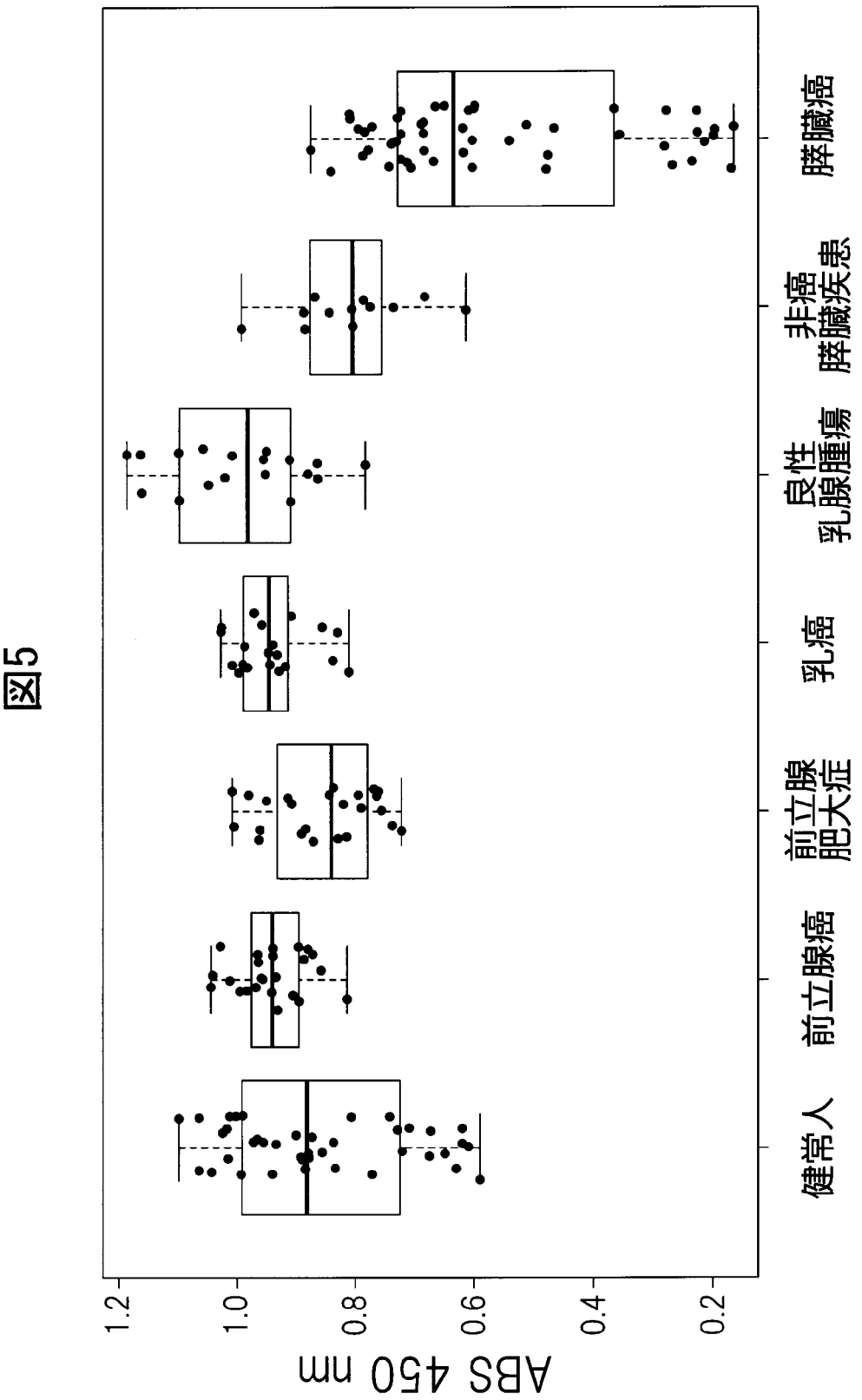
[図4]

図4


MrhRN0614
RrhRN0723
alpha-MM
relative reactivity
alpha-MM (M)
fractions
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2 5 8 11 14 17 20 23 26 29 32 35 38 41 44 47 50

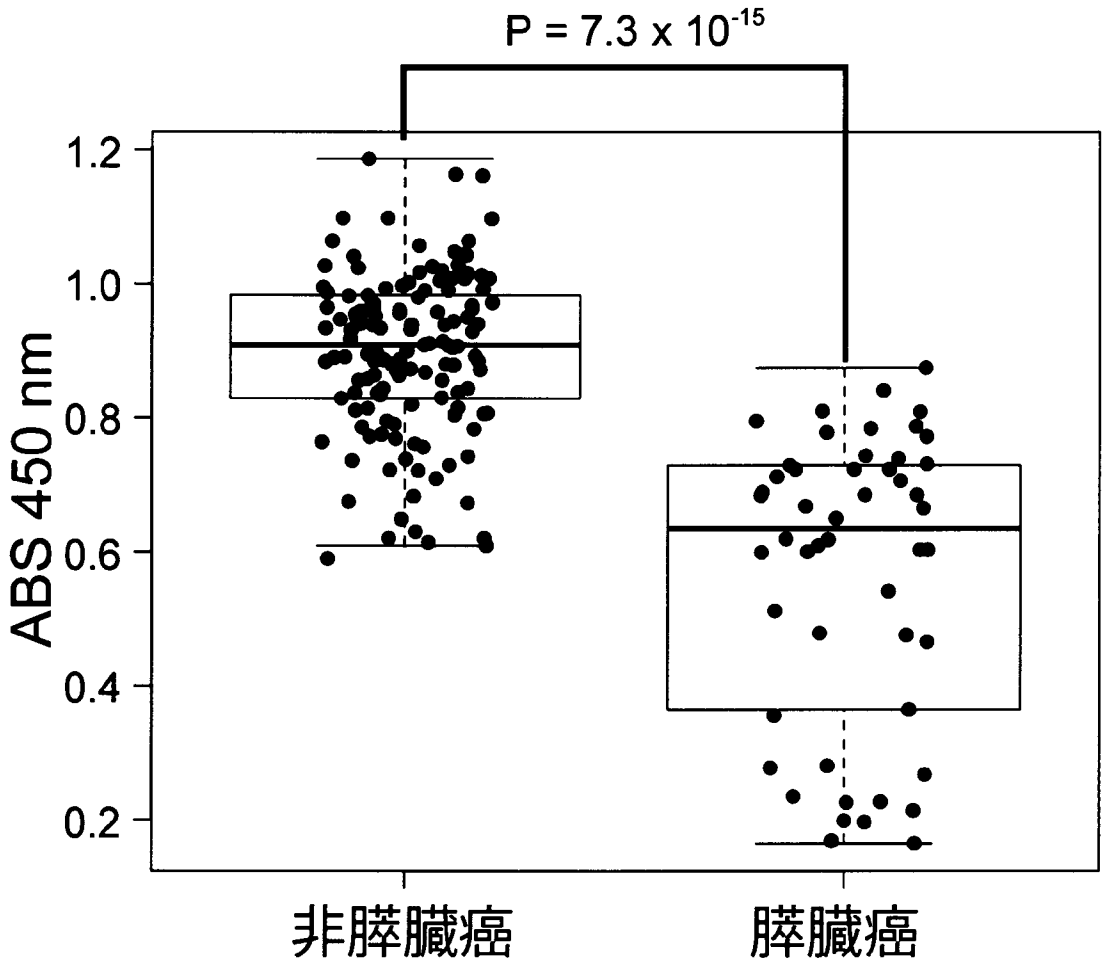
[図5]

図5


ABS 450 nm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
健常人
前立腺癌
前立腺肥大症
乳癌
良性乳腺腫瘍
非癌膵臓疾患
膵臓癌

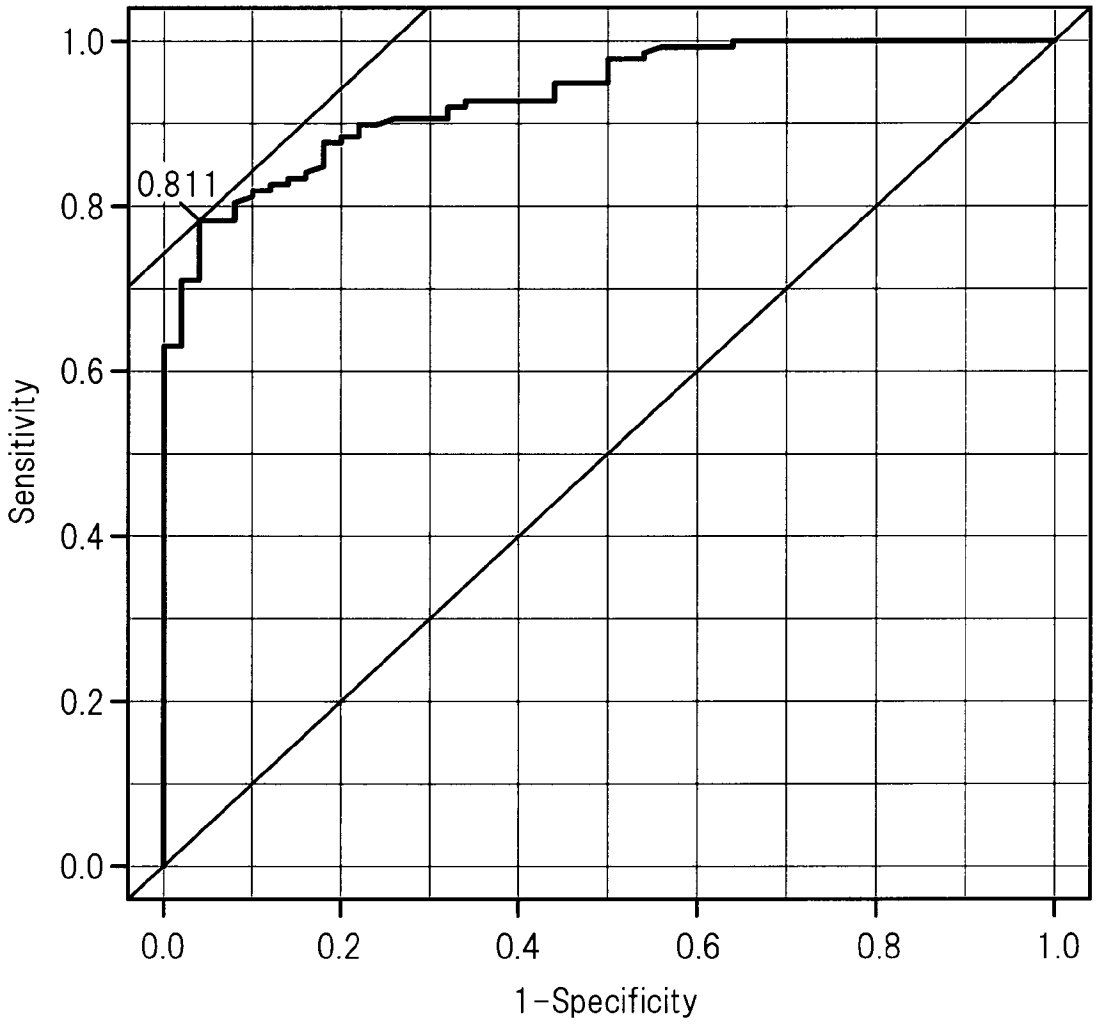
[図6]

図6



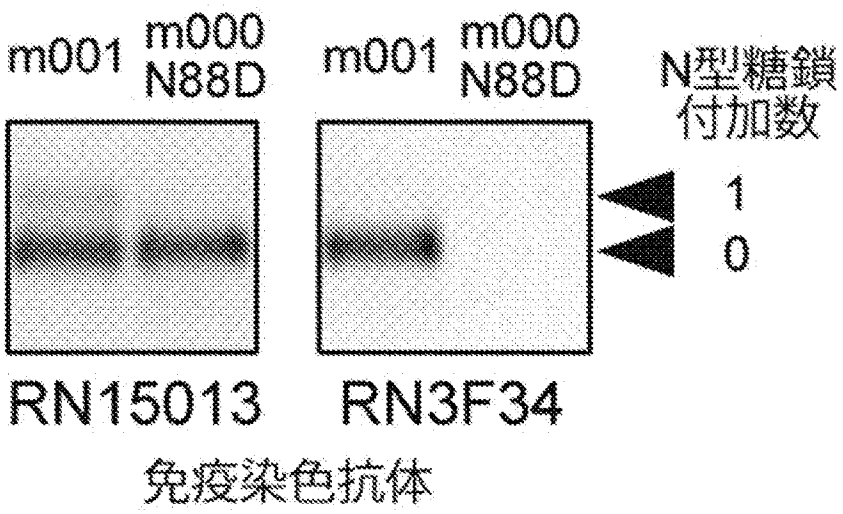
[図7]

図7


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.811
Sensitivity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1-Specificity

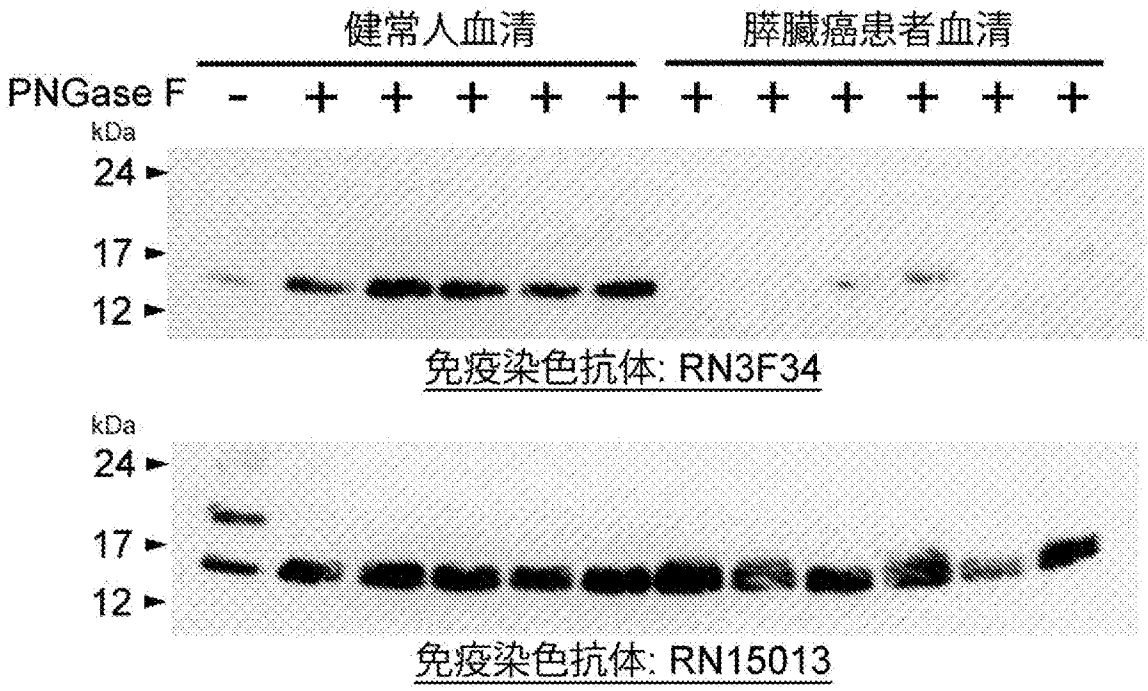
[図8]

図8


m001
m000 N88D
m001
m000 N88D
N型糖鎖付加数
1
0
RN15013
RN3F34
免疫染色抗体

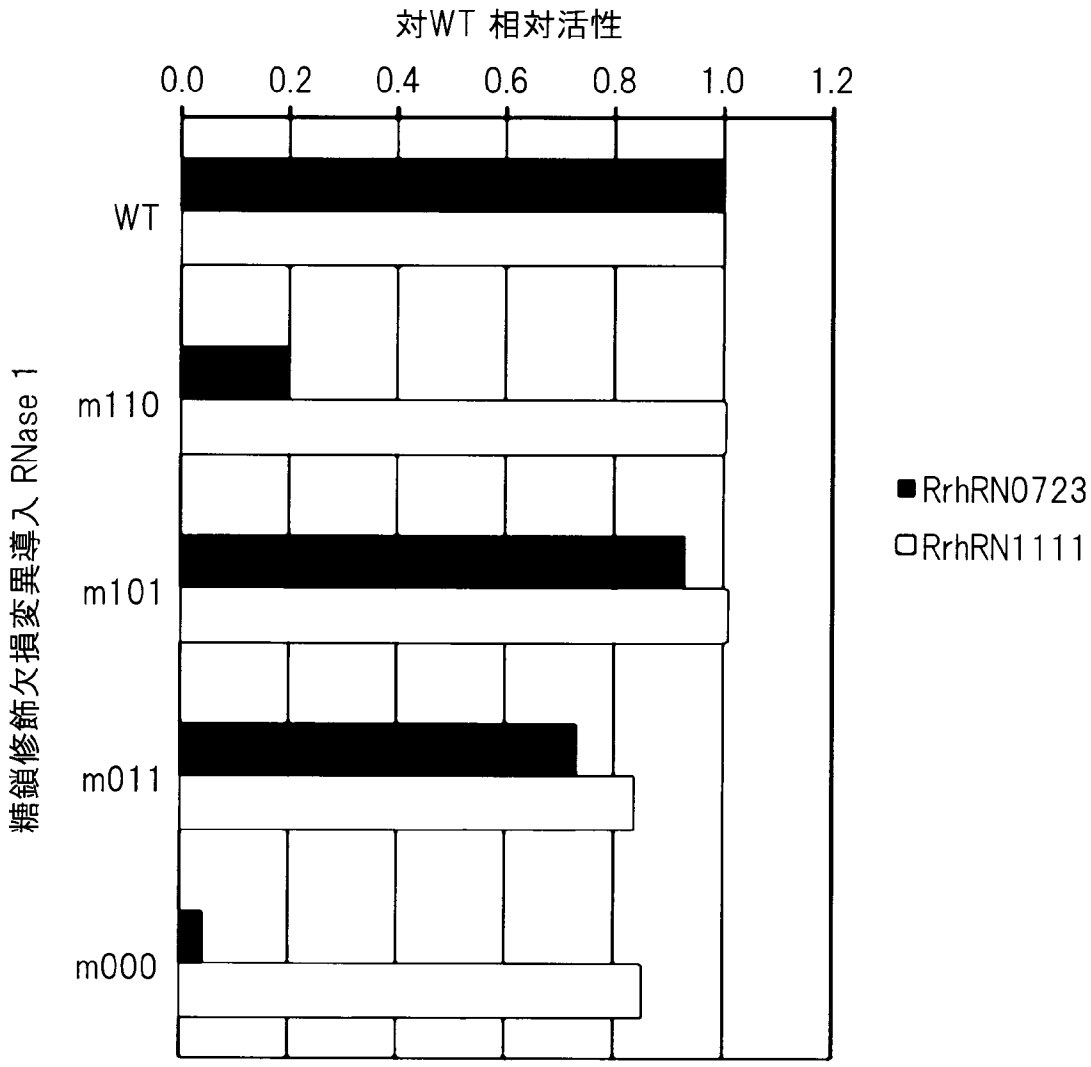
[図9]

図9


健常人血清
膵臓癌患者血清
PNGase F - + + + + + + + + + + +
kDa
24
17
12
免疫染色抗体: RN3F34
kDa
24
17
12
免疫染色抗体: RN15013

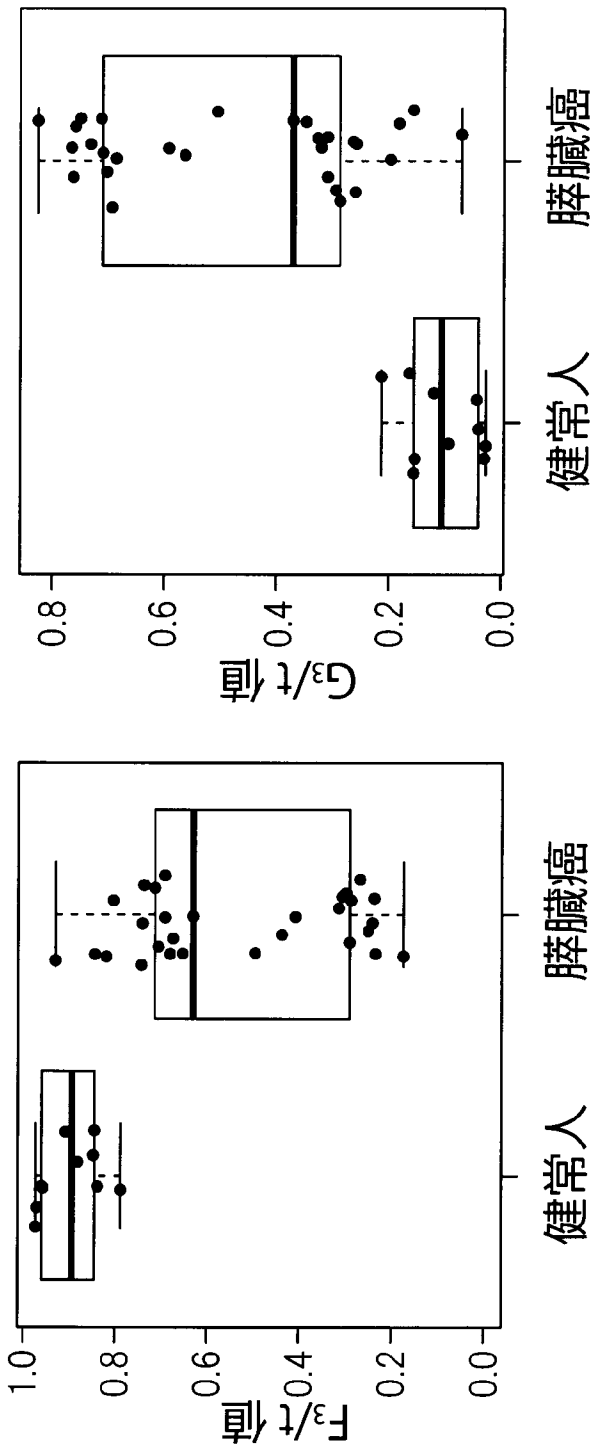
[図10]

図10


対WT 相対活性
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
WT
m110
m101
m011
m000
糖鎖修飾欠損変異導入 RNase 1
RrhRN0723
RrhRN1111

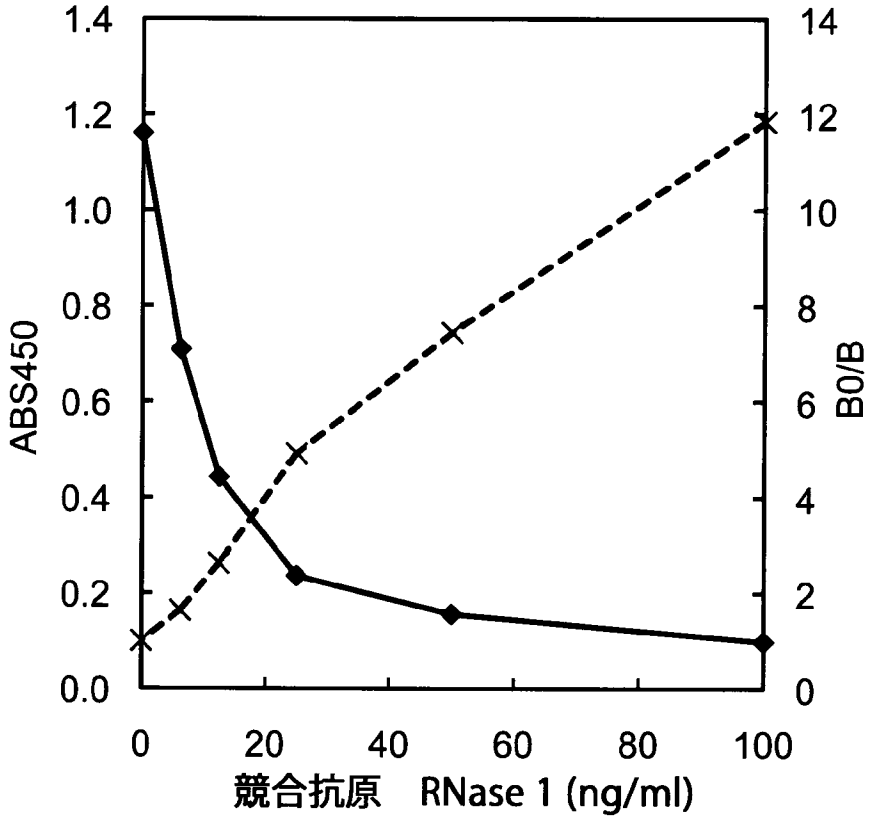
[図11]

図11



[図12]

図12


1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ABS450
14
12
10
8
6
4
2
0
B0/B
0
20
40
60
80
100
競合抗原　RNase 1 (ng/ml)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/065975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *C07K16/40*(2006.01)i, *G01N27/62*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *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)
C12N15/09, A61K39/395, C07K16/40, G01N27/62, G01N33/53, 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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	BARRABÉS S., ET AL, Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer., Glycobiology, 2007, Vol.17, No.4, p.388-400, entire text	1-15,19-24/16-18
X/A	FUTAMI J., ET AL, Recombinant Human Pancreatic Ribonuclease Produced in E. coli : Importance of the Amino-Terminal Sequence., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, Vol.216, No.1, p.406-413, entire text	18/15-17

☐ 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	Date of mailing of the international search report
20 August, 2013 (20.08.13)	03 September, 2013 (03.09.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/065975

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The common matter among the inventions described in claims 1-14, 19-21, 23 and 24 is "a method for detecting cancer", and the common matter among the inventions described in claims 15-22 is "an antibody capable of recognizing a pancreas-specific ribonuclease 1". Thus, it is considered that there is no common "special technical feature" among the inventions described in the above-mentioned claims.

Consequently, two inventions, which comprise Invention 1: claims 1-14, 19-21, 23 and 24, and Invention 2: claims 15-22, are involved in claims.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０６５９７５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, 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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, A61K39/395, C07K16/40, G01N27/62, G01N33/53, 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　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE(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/A	BARRABÉS S., ET AL, Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer., Glycobiology, 2007, Vol.17, No.4, p.388-400, 全文	1-15,19-24/16-18
X/A	FUTAMI J., ET AL, Recombinant Human Pancreatic Ribonuclease Produced in E. coli : Importance of the Amino-Terminal Sequence., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, Vol.216, No.1, p.406-413, 全文	18/15-17

☐　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	国際調査報告の発送日
２０．０８．２０１３	０３．０９．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３５３４
柴原　直司
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０６５９７５

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-14,19-21,23及び24に記載される発明に共通する事項は、「癌の検出方法」であり、請求項15-22に記載される発明に共通する事項は、「膵臓特異的リボヌクレアーゼ１を認識する抗体」であるから上記請求項に記載された発明に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

よって、請求の範囲には、
発明1：請求項1-14,19-21,23及び24、
発明2：請求項15-22、
の2発明が包含されている。

１．☑ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☑ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。