(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-12181
(P2017-12181A)
(43)公開日　平成29年1月19日(2017.1.19)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA	4B064
C07K 16/28	(2006.01)	C07K 16/28		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N 1/15		4H045
C12N 1/19	(2006.01)	C12N 1/19		
C12N 1/21	(2006.01)	C12N 1/21		

審査請求 有　請求項の数 10　ＯＬ　（全 143 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-156097(P2016-156097)
(22)出願日　平成28年8月9日(2016.8.9)
(62)分割の表示　特願2015-18098(P2015-18098)の分割
原出願日　平成19年7月9日(2007.7.9)
(31)優先権主張番号　特願2006-189872(P2006-189872)
(32)優先日　平成18年7月10日(2006.7.10)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2007-58458(P2007-58458)
(32)優先日　平成19年3月8日(2007.3.8)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　000125381
学校法人藤田学園
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪１番地９８
(74)代理人　100114362
弁理士　萩野　幹治
(72)発明者　杉岡　篤
愛知県名古屋市天白区野並境根２００６－５　グリーンヒル　相生山第二－１棟－４０１号
(72)発明者　黒澤　仁
愛知県名古屋市名東区藤巻町３－２－１２７１
(72)発明者　住友　万里子
愛知県名古屋市天白区元植田２－１８０５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体及びその用途

(57)【要約】　（修正有）
【課題】細胞表面抗原に対する複数のヒト抗体・抗原を迅速に分類する手段の提供して、癌の治療や診断などに有効な抗体の提供すること。
【解決手段】特定の配列番号の組合せで規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えることを特徴とするCD73に対する特異的結合性を有する前記ヒト抗体。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、
を特徴とする、CD73に対する特異的結合性を有するヒト抗体。
(1)配列番号：４６８(VH CDR1)、配列番号：４６９(VH CDR2)、配列番号：４７０(VH CDR3)、配列番号：４７２(VL CDR1)、配列番号：４７３(VL CDR2)、配列番号：４７４(VL CDR3)
【請求項２】
前記(1)の配列番号の組合せで規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える抗体は、配列番号４６７で規定される重鎖可変領域におけるフレームワークと配列同一性が９０％を超える重鎖可変領域フレームワークと、配列番号４７１で規定される軽鎖可変領域におけるフレームワークと配列同一性が９０％を超える軽鎖可変領域フレームワークを有する、請求項１に記載のヒト抗体。
【請求項３】
請求項１又は２に記載のヒト抗体の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域をコードする、単離された核酸分子。
【請求項４】
請求項３に記載の核酸分子を発現可能に保持するベクター。
【請求項５】
請求項３に記載の核酸分子が導入されている形質転換体。
【請求項６】
請求項１又は２に記載のヒト抗体を含んでなる、ヒト由来組織又は細胞におけるCD73の検出用又は癌研究用試薬。
【請求項７】
CD73に対する特異的結合性を有する抗体を作製するための、配列番号：４６８のアミノ酸配列で特定される重鎖可変領域CDR1、配列番号：４６９のアミノ酸配列で特定される重鎖可変領域CDR2、配列番号：４７０のアミノ酸配列で特定される重鎖可変領域CDR3、配列番号：４７２のアミノ酸配列で特定される軽鎖可変領域CDR1、配列番号：４７３のアミノ酸配列で特定される軽鎖可変領域CDR2、及び配列番号：４７４のアミノ酸配列で特定される軽鎖可変領域CDR3の使用。
【請求項８】
CD73に対する特異的結合性を有する抗体がヒトIgG型抗体である、請求項７に記載の使用。
【請求項９】
配列番号：４６８のアミノ酸配列で特定される重鎖可変領域CDR1、配列番号：４６９のアミノ酸配列で特定される重鎖可変領域CDR2、配列番号：４７０のアミノ酸配列で特定される重鎖可変領域CDR3を含む重鎖可変領域をコードする塩基配列を作製し、ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込み重鎖発現ベクターを構築するステップと、
配列番号：４７２のアミノ酸配列で特定される軽鎖可変領域CDR1、配列番号：４７３のアミノ酸配列で特定される軽鎖可変領域CDR2、配列番号：４７４のアミノ酸配列で特定される軽鎖可変領域CDR3を含む軽鎖可変領域をコードする塩基配列を作製し、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込み軽鎖発現ベクターを構築するステップと、
構築した重鎖発現ベクターと軽鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換するステップと、

形質転換体の細胞内又は培養液より、発現した抗体を分離するステップと、
を含む、CD73に対する特異的結合性を有する抗体の調製方法。
【請求項１０】
重鎖可変領域が、配列番号４６７で規定される重鎖可変領域におけるフレームワークと配列同一性が９０％を超える重鎖可変領域フレームワークを有し、
軽鎖可変領域が、配列番号４７１で規定される軽鎖可変領域におけるフレームワークと配列同一性が９０％を超える軽鎖可変領域フレームワークを有する、請求項９に記載の調製方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は複数の抗体を分類する方法、抗原の同定法、抗体の特徴などを表示したパネル、並びに疾患との関連性を有する抗体及びその用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
乳癌に対するハーセプチン（非特許文献１）や悪性Bリンパ腫に対するリツキサン（非特許文献２）の成功は、癌に対する治療薬として抗体が有効であることを示した。ある種の抗体は、細胞膜上に存在する抗原分子と複合体を形成することでADCC作用（非特許文献３）及び／又はCDC作用（非特許文献４）を発揮し、この作用によって標的細胞（抗原を発現する細胞）を殺傷する。ADCC作用やCDC作用がアポトーシスの引き金となることもある。このような抗体の作用は抗原特異的である。つまり、それが認識する抗原を発現している限り、癌細胞であるか正常細胞であるかを区別することなく抗体は作用を及ぼす。従って、癌に対する抗体治療薬開発の成否は、癌特異的に発現し、それを抗体が認識することでADCC作用やCDC作用が引き起こされることになる抗原をいかに見つけ出すかにかかっている。このような抗原に対する抗体は、正常細胞に対する影響（副作用）を最小限に抑えつつ標的癌細胞を確実に殺すことが可能な治療薬の有望な候補となる。
【０００３】
ところで、抗体創薬においては、細胞膜表面に存在する「インタクトな状態の」標的癌抗原を認識する抗体を取得することが不可欠といえるが、標的癌抗原が膜タンパク質であるという理由から、既知の癌抗原に対する抗体であってもその取得には困難が伴っていた。このような問題点を解消すべく、本発明者らはこれまでに1000億個もの独立したクローンからなる巨大なヒト抗体ライブラリーを作製し、それを利用した癌細胞及び組織の細胞膜表面に存在するタンパク質（細胞表面抗原）に対する抗体の網羅的取得法を確立した。（特許文献１～３）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【特許文献１】国際公開第０１／０６２９０７号パンフレット
【特許文献２】国際公開第２００１／０９６４０１号パンフレット
【特許文献３】特開２００５－１８５２８１号公報
【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Mass R, et al.: The Concordance Between the Clinical Trials Assay(CTA) and Fluorescence in Situ Hybridization(FISH) in the Herceptin Pivotal Trials. : Proc Am Soci Clin Oncol 19, 75a, 2000
【非特許文献２】Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bence-Bruckler I, Maloney D, Czuczman M, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. Annals of Oncology 1998, 9:995-1001.
【非特許文献３】Bruggemann M., Williams G. T., Bindon C. I., Clark M. R., Walker

M. R., Jefferis R., Waldmann H., Neuberger M. S. (1987). Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. J. Exp. Med., 166, 1351-1361.
【非特許文献４】Loos M. (1982). The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes. Prog. Allergy, 30, 135-192. Mol Immunol. 1982 May;19(5):651-7.

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
現在、本発明者らは、細胞表面抗原に対する抗体を網羅的に取得できる状態にある。次の段階として各抗体の抗原の同定、有用な抗体の選別が必要となる。しかしながら、網羅的に取得された抗体の抗原を個別に同定しようとすれば膨大な労力と時間、及び相当な費用が必要とされる。
また、網羅的に取得された抗体の中には、親和性や反応性等の点から劣るという理由又は他の抗体と実質的に同等であるとの理由などから不要と考えられるものが含まれている可能性があり、効率的に有用な抗体を選別する手段の提供が求められる。
一方、網羅的に取得された抗体の中には診断薬や治療薬の候補など医療的見地からみて非常に重要な抗体も含まれている可能性がある。
【０００７】
以上の背景の下で本発明は、網羅的に取得された、細胞表面抗原に対する抗体が医療分野や研究分野などにおいて有効に利用されることを目指し、そのために有用な手段を提供することを目的とする。即ち本発明は、細胞表面抗原に対する複数の抗体を迅速に分類する手段を提供することを目的とする。また、これらの抗体の抗原を迅速に同定する手段を提供することを目的の一つとする。さらに、これらの手段によって得られる有益な情報の利用促進を図る手段を提供することも目的の一つとする。癌の治療や診断などに有効な抗体を提供することも本発明の目的の一つである。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
以上の目的に鑑み、本発明者らは次のアプローチで抗体の解析を進めた。即ち、取得された抗体に対する細胞表面抗原を発現していると予想される細胞株を用意し、それに対して各抗体を反応させた後、フローサイトメトリー解析を行った。フローサイトメトリー解析の結果を示したヒストグラムに注目し、その類似性を基に各抗体を分類し、複数の抗体グループを得た。そして同一の抗体グループに属する抗体の抗原は共通することを確認した。この事実は、各抗体グループについて代表を選抜し、その抗原を同定すれば全ての抗体の抗原を決定できることを意味する。このように、本発明者らは網羅的且つ迅速に抗原を同定する手段を見出すことに成功した。一方、以上の手法に従って抗体の分類、抗原の同定を行うともに、各抗体グループと臨床検体との反応性を検討し、臨床応用可能な有用な抗体を検索した。その結果、特定の癌種に特異的な新規な抗体を見出すことに成功した。また、臨床検体を使用して得られた情報（抗体と疾患との関連性）は診断法ないし治療法の確立に極めて有益になるとの知見を得るに至った。
本発明は主として以上の成果ないし知見に基づき、以下の抗体の分類法などを提供する。
＜抗体の分類法＞
［１］　以下のステップを含む、抗体の分類法、
（１）細胞表面抗原を認識する複数の抗体を用意するステップ、
（２）前記抗体の各々を同種類の細胞に接触させるステップ、
（３）ステップ（２）後の各細胞をフローサイトメトリーで解析し、抗体と細胞表面との反応性を示すデータを得るステップ、及び
（４）得られたデータを比較し、その類似性に基づいて各抗体を分類するステップ。
［２］　前記細胞表面抗原がインタクトな状態の細胞表面抗原である、［１］に記載の分

類法。
［３］　前記細胞表面抗原が癌細胞の細胞表面抗原である、［１］又は［２］に記載の分類法。
［４］　前記複数の抗体が、細胞表面抗原を認識するものとして抗体ライブラリーの中から選抜された各抗体クローンに由来する抗体の集合からなる、［１］に記載の分類法。
［５］　前記抗体ライブラリーがファージ抗体ライブラリーである、［４］に記載の分類法。
［６］　前記抗体が、標識物質が結合又は融合された抗体である、［１］に記載の分類法。
［７］　前記抗体が標識物質を含まない抗体であり、ステップ（２）の後、前記細胞に結合した抗体を標識化するステップが実施される、［１］に記載の分類法。
［８］　前記細胞が株化細胞である、［１］に記載の分類法。
［９］　前記細胞が株化癌細胞である、［１］に記載の分類法。
［１０］　前記データが抗体結合量と細胞数との関係を示すヒストグラムであり、該ヒストグラムの形状の比較によって前記データの類似性が判定される、［１］に記載の分類法。
［１１］　前記データが抗体結合量と細胞数との関係を示すヒストグラムであり、該ヒストグラムの中央値、最頻値、最大値、範囲、標準偏差、尖度、及び歪度からなる群より選択される一以上の値に基づいて前記データの類似性が判定される、［１］に記載の分類法。
［１２］　前記ヒストグラムの中央値、最頻値、及び尖度の値に基づいて前記データの類似性が判定される、［１１］に記載の分類法。
［１３］　前記抗体結合量が蛍光強度で示される、［１０］又は［１１］に記載の分類法。
［１４］　ステップ（４）において、同一の又は類似性の高いデータを与える複数の抗体を一つの抗体グループとして分類する、［１］に記載の分類法。
［１５］　二種類以上の細胞を用意し、各細胞を用いてステップ（２）～（４）を行う、［１］に記載の分類法。
［１６］　前記細胞の中で少なくとも二種類の細胞に関して同一又は類似性の高いデータを与える複数の抗体を一つの抗体グループとして分類する、［１５］に記載の分類法。
［１７］　分類の際又は分類後、細胞表面抗原に対する反応性が低いと判定された抗体を排除する、［１］に記載の分類法。
［１８］　抗体の分類結果をパネルとして表示する、［１］に記載の分類法。
［１９］　ステップ（４）の後、以下のステップを行う、［１］～［１８］のいずれかに記載の分類法、
（ｉ）分類した抗体にそれぞれ、第１パラメータ、第２パラメータ、・・、及び第ｎパラメータからなるｎ個のパラメータ（但し、ｎは２以上の整数であり、各パラメータは２個以上のパラメータ値を有し、各パラメータについて同一のパラメータ値が２種類以上の抗体に付与される）の組合せを関連付けるステップ、
（ｉｉ）同一のパラメータ値を有する抗体を混合した抗体混合物をパラメータ毎に調製するステップ、
（ｉｉｉ）前記抗体混合物の各々について標的抗原との反応性をELISAで調べ、反応性を示す抗体混合物を特定するステップ、
（ｉｖ）特定した抗体混合物が含有する抗体群に共通する、パラメータ名とパラメータ値の組合せを特定するステップ、
（ｖ）ステップ（ｉ）に供した抗体の中から、全パラメータに関して、前記ステップ（ｉｖ）で特定した組合せが該当する抗体を選抜するステップ、
（ｖｉ）選抜した抗体を一つの抗体グループとして分類するステップ。
［２０］　各回の試行でパラメータの組合せが異なる条件下、前記ステップ（ｉ）～（ｖ）を複数回試行し、各回の結果が相矛盾しない抗体を選抜し、該抗体について前記ステッ

プ（ｖｉ）を行う、［１９］に記載の分類法。
［２１］　ステップ（ｖ）とステップ（ｖｉ）の間に以下のステップを実施する、［１９］に記載の分類法、
（ｖ－１）ステップ（ｖ）で選抜した各抗体に対して、前記ステップ（ｉ）と同じ要領でｎ個のパラメータの組合せを新たに関連付けるステップ、
（ｖ－２）同一のパラメータ値を有する抗体を混合した抗体混合物をパラメータ毎に調製するステップ、
（ｖ－３）前記抗体混合物の各々について標的抗原との反応性をELISAで調べ、反応性を示す抗体混合物を特定するステップ、
（ｖ－４）特定した抗体混合物が含有する抗体群に共通する、パラメータ名とパラメータ値の組合せを特定するステップ、
（ｖ－５）ステップ（ｖ－１）に供した抗体の中から、全パラメータに関して、前記ステップ（ｖ－４）で特定した組合せに該当する抗体を選抜するステップ。
［２２］　前記ステップ（ｖ－１）～（ｖ－４）を２回以上繰り返す、［２１］に記載の分類法。
［２３］　ｎ＝３である、［１９］～［２２］のいずれかに記載の分類法。
［２４］　二種類以上の標的抗原を用意し、各標的抗原を用いてステップ（ｉｉｉ）～（ｖｉ）を行う、［１９］～［２３］のいずれかに記載の分類法。
［２５］　前記標的抗原が、HER1、HER2、CD46、ITGA3、ICAM1、ALCAM、CD147、IgSF4、BCAM、C1qR、CD44、CD73、LAR、EpCAM及びHGFRからなる群より選択される抗原である、［１９］～［２４］のいずれかに記載の分類法。
【０００９】
＜抗原の同定法＞
［２６］　以下のステップを含む、抗原の同定法、
（１）細胞表面抗原を認識する複数の抗体を用意するステップ、
（２）前記抗体の各々を同種類の細胞に接触させるステップ、
（３）ステップ（２）後の各細胞をフローサイトメトリーで解析し、抗体と細胞表面との反応性を示すデータを得るステップ、
（４）得られたデータを比較し、その類似性に基づいて各抗体を分類するステップ、
（５）ステップ（４）で形成された各抗体グループより一又は数個の抗体を選抜し、それらの抗原を同定するステップ、及び
（６）同一の抗体グループに属する各抗体の抗原は同一又は相互に高い関連性を有すると推定し、ステップ（５）で同定された抗原を抗体グループに関連付けるステップ。
［２７］　ステップ（５）において、各抗体グループより一の抗体が選抜される、［２６］に記載の同定法。
［２８］　ステップ（５）において、フローサイトメトリー解析の結果より、抗原に対して高反応性であると判断された抗体が選抜される、［２６］に記載の同定法。
［２９］　ステップ（５）において、抗原の同定が免疫沈降試験、ウエスタンブロット、アフィニティークロマトグラフィー、プロテオミクスの手法（電気泳動、質量分析、ゲノムデータベース検索、バイオインフォマティックスによる分析）、及び対応遺伝子の発現解析からなる群より選択される一以上の方法で行われる、［２６］に記載の同定法。
［３０］　ステップ（５）で同定された抗原と、ステップ（６）で該抗原が関連付けられた抗体グループに属する抗体との反応性を調べ、前記推定が正しいことを確認するステップを更に含む、［２６］に記載の同定法。
［３１］　抗原の同定結果をパネルとして表示する、［２６］に記載の同定法。
［３２］　前記パネルが以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかである、［３１］に記載の同定法、
（ａ）ステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は相互に類似性の高いデータを与えた複数の抗体が一つの抗体グループとして表示され、各抗体グループとその抗原が関連付けられたパネル、

（ｂ）ステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は相互に類似性の高いデータを与えた複数の抗体が一つの抗体グループとして表示され、各抗体グループとそれに認識される細胞表面抗原を発現する細胞とが関連付けられたパネル、及び
（ｃ）ステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は相互に類似性の高いデータを与えた複数の抗体が一つの抗体グループとして表示され、各抗体グループと、その抗原と、及び該各抗体グループに認識される細胞表面抗原を発現する細胞とが相互に関連付けられたパネル。
【００１０】
＜抗体又は抗体セットの取得法、取得される抗体又は抗体セット＞
［３３］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体の取得法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループの抗体を有用な抗体として選択するステップ。
［３４］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体の取得法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループの抗体を有用な抗体として選択するステップ。
［３５］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３’）二つ以上の抗体が特異的反応性を示した疾患を選抜した後、該疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループからそれぞれ抗体を選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。
［３６］
以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループからそれぞれ抗体を選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。
［３７］
以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループの抗体と、該抗体グループと抗原が共通する他の抗体グループの抗体とを選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。
［３８］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得

法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が共通する二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患の病態との反応性を、一種類又は二種類以上の病態について調べるステップ、及び
（３）反応性に関する情報を関連付けた上で、前記各抗体グループの抗体同士を組み合わせるステップ。
［３９］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３’）二つ以上の抗体が特異的反応性を示した疾患を選抜した後、該疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループからそれぞれ抗体を選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。
［４０］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループからそれぞれ抗体を選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。
［４１］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループの抗体と、該抗体グループと抗原が共通する他の抗体グループの抗体とを選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。
［４２］　以下のステップを含む、特定の疾患との間に関連性を有する抗体セットの取得法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が共通する二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患の病態との反応性を、一種類又は二種類以上の病態について調べるステップ、及び
（３）反応性に関する情報を関連付けた上で、前記各抗体グループの抗体同士を組み合わせるステップ。
［４３］　前記疾患が、腎臓癌、肝細胞癌、胆肝癌、肺胞上皮癌、肺扁平上皮癌、肺腺癌、膵臓癌、大腸腺癌、及び卵巣癌からなる群より選択される疾患である、［３３］～［４２］のいずれかに記載の取得法。
［４４］　ステップ（２）において、前記反応性が免疫染色法、免疫沈降法、フローサイトメトリー解析、細胞ELISA、疾患関連分子（疾患原因遺伝子産物等）と抗体との分子間相互作用解析、疾患モデル細胞（あるいは動物）への適用試験からなる群より選択される一以上の方法で調べられる、［３３］～［４２］のいずれかに記載の取得法。
［４５］　［３３］又は［３４］に記載の方法で取得される、単離された抗体。
［４６］　［３５］～［４２］のいずれかに記載の方法で取得される抗体セット。

【００１１】
＜パネルの作成法、パネル、抗体又は抗体セットとパネルとの組合せ＞
［４７］　以下のステップを含む、抗体と疾患との関連性を表示したパネルの作成法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
［４８］　以下のステップを含む、抗体と疾患との関連性を表示したパネルの作成法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
［４９］　以下のステップを含む、抗体と病態との関連性を表示したパネルの作成法、
（１）［１］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が共通する二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患の病態との反応性を、一種類又は二種類以上の病態について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
［５０］　以下のステップを含む、抗体と疾患との関連性を表示したパネルの作成法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
［５１］　以下のステップを含む、抗体と疾患との関連性を表示したパネルの作成法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
［５２］　以下のステップを含む、抗体と病態との関連性を表示したパネルの作成法、
（１）［１９］に記載の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が共通する二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患の病態との反応性を、一種類又は二種類以上の病態について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
［５３］　［４７］～［５２］のいずれかに記載の方法で作成されたパネル。
［５４］　以下の（ａ）～（ｄ）からなる群より選択される、抗体又は抗体セットとパネルとの組合せ、
（ａ）［３３］に記載の方法で取得される単離された抗体と、［４７］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、
（ｂ）［３５］に記載の方法で取得される抗体セットと、［４７］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、
（ｃ）［３６］に記載の方法で取得される抗体セットと、［４８］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、
（ｄ）［３７］に記載の方法で取得される抗体セットと、［４８］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、
（ｅ）［３８］に記載の方法で取得される抗体セットと、［４９］に記載の方法で作製

されたパネルとの組合せ、
（ｆ）［３４］に記載の方法で取得される単離された抗体と、［５０］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、
（ｇ）［３９］に記載の方法で取得される抗体セットと、［５０］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、
（ｈ）［４０］に記載の方法で取得される抗体セットと、［５１］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、
（ｉ）［４１］に記載の方法で取得される抗体セットと、［５１］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ、及び
（ｊ）［４２］に記載の方法で取得される抗体セットと、［５２］に記載の方法で作製されたパネルとの組合せ。
［５５］　以下のステップを含む、細胞表面抗原が指標となる疾患の検査法、
（１）被検者より分離された細胞又は組織を用意するステップ、
（２）該細胞又は組織と、［５３］に記載のパネルに表示された各抗体との反応性を調べるステップ、
（３）ステップ（２）の結果を前記パネルに照合するステップ。
【００１２】
＜最適な治療法を選択する方法＞
［５６］　以下のステップを含む、特定の疾患に対する最適な治療法を選択する方法、
（１）被検者より分離された細胞又は組織を用意するステップ、
（２）該細胞又は組織と、請求項５３に記載のパネルに表示された各抗体との反応性を調べるステップ、
（３）ステップ（２）の結果を前記パネルに照合するステップ、
（４）照合結果に従い、有効な抗体を選択するステップ。
［５７］　前記有効な抗体が、ステップ（２）において特異的な反応性を示した抗体又はそれと等価な抗体である、［５６］に記載の方法。
［５８］　前記特定の疾患が、HER1、HER2、CD46、ITGA3、ICAM1、ALCAM、CD147、IgSF4、BCAM、C1qR、CD44、CD73、LAR、EpCAM及びHGFRからなる群より選択される細胞表面抗原が指標となる疾患である、［５６］又は［５７］に記載の方法。
［５９］　前記パネルに、048-006抗体、057-091抗体、059-152抗体、048-040抗体、054-101抗体、055-147抗体、059-173抗体、067-149抗体、067-176抗体、015-126抗体、015-044抗体、015-102抗体、015-136抗体、015-143抗体、015-209抗体、039-016抗体、053-216抗体、075-024抗体、075-110抗体、086-032抗体、086-035抗体、086-036抗体、086-061抗体、086-138抗体、086-182抗体、035-224抗体、045-011抗体、051-144抗体、052-053抗体、052-073抗体、053-049抗体、3172-120抗体、066-069抗体、015-003抗体、064-002抗体、064-006抗体、064-012a抗体、064-012b抗体、064-014抗体、064-054抗体、064-085抗体、064-093抗体、064-116抗体、065-183抗体、067-142抗体、068-007抗体、052-033抗体、053-042抗体、053-051抗体、053-059抗体、053-085抗体、035-234抗体、040-107抗体、041-118抗体、066-174抗体、083-040抗体、029-143抗体、045-134抗体、062-101抗体、062-109抗体、084-103抗体、052-274抗体、029-067抗体、083-131抗体、059-053抗体、064-003抗体、067-213抗体、067-153抗体、067-126抗体、067-133抗体、067-287抗体、064-044抗体、065-030抗体、065-358抗体、066-019抗体、079-085抗体、067-024抗体及び076-048抗体からなる群より選択される二以上の抗体が表示されている、［５６］～［５８］のいずれかに記載の方法。
［６０］　以下のステップを含む、特定の疾患に対する最適な治療法を選択する方法、
（１）048-006抗体、015-126抗体、067-133抗体、064-044抗体、076-048抗体及び059-053抗体からなる群より選択される一以上の抗体と、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、細気管支肺胞上皮癌、腺癌、及び大細胞癌からなる群より選択される一以上の疾患の臨床癌組織との反応性が表示されたパネルと、被検者より分離された細胞又は組織を用意するステップ、

（２）該細胞又は組織と、該パネルに表示された各抗体との反応性を調べるステップ、
（３）ステップ（２）の結果を前記パネルに照合するステップ、
（４）照合結果に従い、有効な抗体を選択するステップ。
［６１］　前記有効な抗体が、ステップ（２）において特異的な反応性を示した抗体又はそれと等価な抗体である、［６０］に記載の方法。
［６２］　前記特定の疾患が、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、細気管支肺胞上皮癌、腺癌、及び大細胞癌からなる群より選択される疾患である、［６０］又は［６１］に記載の方法。

【００１３】
＜単離された抗体＞
［６３］　以下の(1)～(3)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備えること、
以下の(4)～(6)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備えること、
以下の(7)～(9)及び(13)～(18)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は
以下の(10)～(12)及び(19)～(24)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とするHER1に対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：４、配列番号：８
(2)配列番号：１２、配列番号：１６
(3)配列番号：２０、配列番号：２４
(4)配列番号：３、配列番号：４、配列番号：７、配列番号：８
(5)配列番号：１１、配列番号：１２、配列番号：１５、配列番号：１６
(6)配列番号：１９、配列番号：２０、配列番号：２３、配列番号：２４
(7)配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６、配列番号：７、配列番号：８
(8)配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２、配列番号：１４、配列番号：１５、配列番号：１６
(9)配列番号：１８、配列番号：１９、配列番号：２０、配列番号：２２、配列番号：２３、配列番号：２４
(10)配列番号：１、配列番号：５
(11)配列番号：９、配列番号：１３
(12)配列番号：１７、配列番号：２１
(13)配列番号：４８４(VH CDR1)、配列番号：４８５(VH CDR2)、配列番号：４８６(VH CDR3)、配列番号：４８８(VL CDR1)、配列番号：４８９(VL CDR2)、配列番号：４９０(VL CDR3)
(14)配列番号：４９２(VH CDR1)、配列番号：４９３(VH CDR2)、配列番号：４９４(VH CDR3)、配列番号：４９６(VL CDR1)、配列番号：４９７(VL CDR2)、配列番号：４９８(VL CDR3)
(15)、配列番号：５００(VH CDR1)、配列番号：５０１(VH CDR2)、配列番号：５０２(VH CDR3)、配列番号：５０４(VL CDR1)、配列番号：５０５(VL CDR2)、配列番号：５０６(VL

CDR3)
(16)配列番号：５０８(VH CDR1)、配列番号：５０９(VH CDR2)、配列番号：５１０(VH CDR3)、配列番号：５１２(VL CDR1)、配列番号：５１３(VL CDR2)、配列番号：５１４(VL CDR3)
(17)配列番号：５１６(VH CDR1)、配列番号：５１７(VH CDR2)、配列番号：５１８(VH CDR3)、配列番号：５２０(VL CDR1)、配列番号：５２１(VL CDR2)、配列番号：５２２(VL CDR3)
(18)配列番号：５２４(VH CDR1)、配列番号：５２５(VH CDR2)、配列番号：５２６(VH CDR3)、配列番号：５２８(VL CDR1)、配列番号：５２９(VL CDR2)、配列番号：５３０(VL CDR3)
(19)配列番号：４８３(VH)、配列番号：４８７(VL)
(20)配列番号：４９１(VH)、配列番号：４９５(VL)
(21)配列番号：４９９(VH)、配列番号：５０３(VL)
(22)配列番号：５０７(VH)、配列番号：５１１(VL)
(23)配列番号：５１５(VH)、配列番号：５１９(VL)
(24)配列番号：５２３(VH)、配列番号：５２７(VL)
［６４］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備えること、
以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備えること、
以下の(3)及び(5)～(19)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は
以下の(4)及び(20)～(34)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とする、HER2に対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：２８、配列番号：３２
(2)配列番号：２７、配列番号：２８、配列番号：３１、配列番号：３２
(3)配列番号：２６、配列番号：２７、配列番号：２８、配列番号：３０、配列番号：３１、配列番号：３２
(4)配列番号：２５、配列番号：２９
(5)配列番号：５３２(VH CDR1)、配列番号：５３３(VH CDR2)、配列番号：５３４(VH CDR3)、配列番号：５３６(VL CDR1)、配列番号：５３７(VL CDR2)、配列番号：５３８(VL CDR3)
(6)配列番号：５４０(VH CDR1)、配列番号：５４１(VH CDR2)、配列番号：５４２(VH CDR3)、配列番号：５４４(VL CDR1)、配列番号：５４５(VL CDR2)、配列番号：５４６(VL CDR3)
(7)配列番号：５４８(VH CDR1)、配列番号：５４９(VH CDR2)、配列番号：５５０(VH CDR3)、配列番号：５５２(VL CDR1)、配列番号：５５３(VL CDR2)、配列番号：５５４(VL CDR3)
(8)配列番号：５５６(VH CDR1)、配列番号：５５７(VH CDR2)、配列番号：５５８(VH CDR3)、配列番号：５６０(VL CDR1)、配列番号：５６１(VL CDR2)、配列番号：５６２(VL CDR3)

(9)配列番号：５６４(VH CDR1)、配列番号：５６５(VH CDR2)、配列番号：５６６(VH CDR3)、配列番号：５６８(VL CDR1)、配列番号：５６９(VL CDR2)、配列番号：５７０(VL CDR3)
(10)配列番号：５７２(VH CDR1)、配列番号：５７３(VH CDR2)、配列番号：５７４(VH CDR3)、配列番号：５７６(VL CDR1)、配列番号：５７７(VL CDR2)、配列番号：５７８(VL CDR3)
(11)配列番号：５８０(VH CDR1)、配列番号：５８１(VH CDR2)、配列番号：５８２(VH CDR3)、配列番号：５８４(VL CDR1)、配列番号：５８５(VL CDR2)、配列番号：５８６(VL CDR3)
(12)配列番号：５８８(VH CDR1)、配列番号：５８９(VH CDR2)、配列番号：５９０(VH CDR3)、配列番号：５９２(VL CDR1)、配列番号：５９３(VL CDR2)、配列番号：５９４(VL CDR3)
(13)配列番号：５９６(VH CDR1)、配列番号：５９７(VH CDR2)、配列番号：５９８(VH CDR3)、配列番号：６００(VL CDR1)、配列番号：６０１(VL CDR2)、配列番号：６０２(VL CDR3)
(14)配列番号：６０４(VH CDR1)、配列番号：６０５(VH CDR2)、配列番号：６０６(VH CDR3)、配列番号：６０８(VL CDR1)、配列番号：６０９(VL CDR2)、配列番号：６１０(VL CDR3)
(15)配列番号：６１２(VH CDR1)、配列番号：６１３(VH CDR2)、配列番号：６１４(VH CDR3)、配列番号：６１６(VL CDR1)、配列番号：６１７(VL CDR2)、配列番号：６１８(VL CDR3)
(16)配列番号：６２０(VH CDR1)、配列番号：６２１(VH CDR2)、配列番号：６２２(VH CDR3)、配列番号：６２４(VL CDR1)、配列番号：６２５(VL CDR2)、配列番号：６２６(VL CDR3)
(17)配列番号：６２８(VH CDR1)、配列番号：６２９(VH CDR2)、配列番号：６３０(VH CDR3)、配列番号：６３２(VL CDR1)、配列番号：６３３(VL CDR2)、配列番号：６３４(VL CDR3)
(18)配列番号：６３６(VH CDR1)、配列番号：６３７(VH CDR2)、配列番号：６３８(VH CDR3)、配列番号：６４０(VL CDR1)、配列番号：６４１(VL CDR2)、配列番号：６４２(VL CDR3)
(19)配列番号：６４４(VH CDR1)、配列番号：６４５(VH CDR2)、配列番号：６４６(VH CDR3)、配列番号：６４８(VL CDR1)、配列番号：６４９(VL CDR2)、配列番号：６５０(VL CDR3)
(20)配列番号：５３１(VH)、配列番号：５３５(VL)
(21)配列番号：５３９(VH)、配列番号：５４３(VL)
(22)配列番号：５４７(VH)、配列番号：５５１(VL)
(23)配列番号：５５５(VH)、配列番号：５５９(VL)
(24)配列番号：５６３(VH)、配列番号：５６７(VL)
(25)配列番号：５７１(VH)、配列番号：５７５(VL)
(26)配列番号：５７９(VH)、配列番号：５８３(VL)
(27)配列番号：５８７(VH)、配列番号：５９１(VL)
(28)配列番号：５９５(VH)、配列番号：５９９(VL)
(29)配列番号：６０３(VH)、配列番号：６０７(VL)
(30)配列番号：６１１(VH)、配列番号：６１５(VL)
(31)配列番号：６１９(VH)、配列番号：６２３(VL)
(32)配列番号：６２７(VH)、配列番号：６３１(VL)
(33)配列番号：６３５(VH)、配列番号：６３９(VL)
(34)配列番号：６４３(VH)、配列番号：６４７(VL)

［６５］　以下の(1)～(7)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で

規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備えること、
以下の(8)～(14)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備えること、
以下の(15)～(22)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は
以下の(23)～(30)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とする、CD46抗原に対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：３６、配列番号：４０
(2)配列番号：４４、配列番号：４８
(3)配列番号：５２、配列番号：５６
(4)配列番号：６０、配列番号：６４
(5)配列番号：６８、配列番号：７２
(6)配列番号：７６、配列番号：８０
(7)配列番号：８４、配列番号：８８
(8)配列番号：３５、配列番号：３６、配列番号：３９、配列番号：４０
(9)配列番号：４３、配列番号：４４、配列番号：４７、配列番号：４８
(10)配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５５、配列番号：５６
(11)配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６３、配列番号：６４
(12)配列番号：６７、配列番号：６８、配列番号：７１、配列番号：７２
(13)配列番号：７５、配列番号：７６、配列番号：７９、配列番号：８０
(14)配列番号：８３、配列番号：８４、配列番号：８７、配列番号：８８
(15)配列番号：３４、配列番号：３５、配列番号：３６、配列番号：３８、配列番号：３９、配列番号：４０
(16)配列番号：４２、配列番号：４３、配列番号：４４、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８
(17)配列番号：５０、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６
(18)配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４
(19)配列番号：６６、配列番号：６７、配列番号：６８、配列番号：７０、配列番号：７１、配列番号：７２
(20)配列番号：７４、配列番号：７５、配列番号：７６、配列番号：７８、配列番号：７９、配列番号：８０
(21)配列番号：８２、配列番号：８３、配列番号：８４、配列番号：８６、配列番号：８７、配列番号：８８
(22)配列番号：７５６(VH CDR1)、配列番号：７５７(VH CDR2)、配列番号：７５８(VH CDR3)、配列番号：７６０(VL CDR1)、配列番号：７６１(VL CDR2)、配列番号：７６２(VL CDR3)
(23)配列番号：３３、配列番号：３７
(24)配列番号：４１、配列番号：４５
(25)配列番号：４９、配列番号：５３

(26)配列番号：５７、配列番号：６１
(27)配列番号：６５、配列番号：６９
(28)配列番号：７３、配列番号：７７
(29)配列番号：８１、配列番号：８５
(30)配列番号：７５５(VH)、配列番号：７５９(VL)
［６６］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備えること、
以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備えること、
以下の(3)及び(5)～(16)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は
以下の(4)及び(17)～(28)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とする、ITGA3に対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：９２、配列番号：９６
(2)配列番号：９１、配列番号：９２、配列番号：９５、配列番号：９６
(3)配列番号：９０、配列番号：９１、配列番号：９２、配列番号：９４、配列番号：９５、
(4)配列番号：８９、配列番号：９３
(5)配列番号：６７６(VH CDR1)、配列番号：６７７(VH CDR2)、配列番号：６７８(VH CDR3)、配列番号：６８０(VL CDR1)、配列番号：６８１(VL CDR2)、配列番号：６８２(VL CDR3)
(6)配列番号：６８４(VH CDR1)、配列番号：６８５(VH CDR2)、配列番号：６８６(VH CDR3)、配列番号：６８８(VL CDR1)、配列番号：６８９(VL CDR2)、配列番号：６９０(VL CDR3)
(7)配列番号：６９２(VH CDR1)、配列番号：６９３(VH CDR2)、配列番号：６９４(VH CDR3)、配列番号：６９６(VL CDR1)、配列番号：６９７(VL CDR2)、配列番号：６９８(VL CDR3)
(8)配列番号：７００(VH CDR1)、配列番号：７０１(VH CDR2)、配列番号：７０２(VH CDR3)、配列番号：７０４(VL CDR1)、配列番号：７０５(VL CDR2)、配列番号：７０６(VL CDR3)
(9)配列番号：７０８(VH CDR1)、配列番号：７０９(VH CDR2)、配列番号：７１０(VH CDR3)、配列番号：７１２(VL CDR1)、配列番号：７１３(VL CDR2)、配列番号：７１４(VL CDR3)
(10)配列番号：７１６(VH CDR1)、配列番号：７１７(VH CDR2)、配列番号：７１８(VH CDR3)、配列番号：７２０(VL CDR1)、配列番号：７２１(VL CDR2)、配列番号：７２２(VL CDR3)
(11)配列番号：７２４(VH CDR1)、配列番号：７２５(VH CDR2)、配列番号：７２６(VH CDR3)、配列番号：７２８(VL CDR1)、配列番号：７２９(VL CDR2)、配列番号：７３０(VL CDR3)
(12)配列番号：７３２(VH CDR1)、配列番号：７３３(VH CDR2)、配列番号：７３４(VH CDR3)、配列番号：７３６(VL CDR1)、配列番号：７３７(VL CDR2)、配列番号：７３８(VL C

DR3)
(13)配列番号：７４０(VH CDR1)、配列番号：７４１(VH CDR2)、配列番号：７４２(VH CDR3)、配列番号：７４４(VL CDR1)、配列番号：７４５(VL CDR2)、配列番号：７４６(VL CDR3)
(14)配列番号：７４８(VH CDR1)、配列番号：７４９(VH CDR2)、配列番号：７５０(VH CDR3)、配列番号：７５２(VL CDR1)、配列番号：７５３(VL CDR2)、配列番号：７５４(VL CDR3)
(15)配列番号：７６４(VH CDR1)、配列番号：７６５(VH CDR2)、配列番号：７６６(VH CDR3)、配列番号：７６８(VL CDR1)、配列番号：７６９(VL CDR2)、配列番号：７７０(VL CDR3)
(16)配列番号：７７２(VH CDR1)、配列番号：７７３(VH CDR2)、配列番号：７７４(VH CDR3)、配列番号：７７６(VL CDR1)、配列番号：７７７(VL CDR2)、配列番号：７７８(VL CDR3)
(17)配列番号：６７５(VH)、配列番号：６７９(VL)
(18)配列番号：６８３(VH)、配列番号：６８７(VL)
(19)配列番号：６９１(VH)、配列番号：６９５(VL)
(20)配列番号：６９９(VH)、配列番号：７０３(VL)
(21)配列番号：７０７(VH)、配列番号：７１１(VL)
(22)配列番号：７１５(VH)、配列番号：７１９(VL)
(23)配列番号：７２３(VH)、配列番号：７２７(VL)
(24)配列番号：７３１(VH)、配列番号：７３５(VL)
(25)配列番号：７３９(VH)、配列番号：７４３(VL)
(26)配列番号：７４７(VH)、配列番号：７５１(VL)
(27)配列番号：７６３(VH)、配列番号：７６７(VL)
(28)配列番号：７７１(VH)、配列番号：７７５(VL)
［６７］　以下の(1)～(5)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備えること、
以下の(6)～(10)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備えること、
以下の(11)～(15)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は
以下の(16)～(20)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とする、ICAM1に対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：１００、配列番号：１０４
(2)配列番号：１０８、配列番号：１１２
(3)配列番号：１１６、配列番号：１２０
(4)配列番号：１２４、配列番号：１２８
(5)配列番号：１３２、配列番号：１３６
(6)配列番号：９９、配列番号：１００、配列番号：１０３、配列番号：１０４
(7)配列番号：１０７、配列番号：１０８、配列番号：１１１、配列番号：１１２

(8)配列番号：１１５、配列番号：１１６、配列番号：１１９、配列番号：１２０
(9)配列番号：１２３、配列番号：１２４、配列番号：１２７、配列番号：１２８
(10)配列番号：１３１、配列番号：１３２、配列番号：１３５、配列番号：１３６
(11)配列番号：９８、配列番号：９９、配列番号：１００、配列番号：１０２、配列番号：１０３、配列番号：１０４
(12)配列番号：１０６、配列番号：１０７、配列番号：１０８、配列番号：１１０、配列番号：１１１、配列番号：１１２
(13)配列番号：１１４、配列番号：１１５、配列番号：１１６、配列番号：１１８、配列番号：１１９、配列番号：１２０
(14)配列番号：１２２、配列番号：１２３、配列番号：１２４、配列番号：１２６、配列番号：１２７、配列番号：１２８
(15)配列番号：１３０、配列番号：１３１、配列番号：１３２、配列番号：１３４、配列番号：１３５、配列番号：１３６
(16)配列番号：９７、配列番号：１０１
(17)配列番号：１０５、配列番号：１０９
(18)配列番号：１１３、配列番号：１１７
(19)配列番号：１２１、配列番号：１２５
(20)配列番号：１２９、配列番号：１３３

［６８］　以下の(1)～(5)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備えること、

以下の(6)～(10)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備えること、

以下の(11)～(15)及び(21)～(28)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は

以下の(16)～(20)及び(29)～(36)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、

を特徴とする、ALCAMに対する特異的結合性を有する単離された抗体。

(1)配列番号：１４０、配列番号：１４４
(2)配列番号：１４８、配列番号：１５２
(3)配列番号：１５６、配列番号：１６０
(4)配列番号：１６４、配列番号：１６８
(5)配列番号：１７２、配列番号：１７６
(6)配列番号：１３９、配列番号：１４０、配列番号：１４３、配列番号：１４４
(7)配列番号：１４７、配列番号：１４８、配列番号：１５１、配列番号：１５２
(8)配列番号：１５５、配列番号：１５６、配列番号：１５９、配列番号：１６０
(9)配列番号：１６３、配列番号：１６４、配列番号：１６７、配列番号：１６８
(10)配列番号：１７１、配列番号：１７２、配列番号：１７５、配列番号：１７６
(11)配列番号：１３８、配列番号：１３９、配列番号：１４０、配列番号：１４２、配列番号：１４３、配列番号：１４４
(12)配列番号：１４６、配列番号：１４７、配列番号：１４８、配列番号：１５０、配列番号：１５１、配列番号：１５２

(13)配列番号：１５４、配列番号：１５５、配列番号：１５６、配列番号：１５８、配列番号：１５９、配列番号：１６０
(14)配列番号：１６２、配列番号：１６３、配列番号：１６４、配列番号：１６６、配列番号：１６７、配列番号：１６８
(15)配列番号：１７０、配列番号：１７１、配列番号：１７２、配列番号：１７４、配列番号：１７５、配列番号：１７６
(16)配列番号：１３７、配列番号：１４１
(17)配列番号：１４５、配列番号：１４９
(18)配列番号：１５３、配列番号：１５７
(19)配列番号：１６１、配列番号：１６５
(20)配列番号：１６９、配列番号：１７３
(21)配列番号：７８０(VH CDR1)、配列番号：７８１(VH CDR2)、配列番号７８２(VH CDR3)、配列番号：７８４(VL CDR1)、配列番号：７８５(VL CDR2)、配列番号：７８６(VL CDR3)
(22)配列番号：７８８(VH CDR1)、配列番号：７８９(VH CDR2)、配列番号：７９０(VH CDR3)、配列番号：７９２(VL CDR1)、配列番号：７９３(VL CDR2)、配列番号：７９４(VL CDR3)
(23)配列番号：７９６(VH CDR1)、配列番号：７９７(VH CDR2)、配列番号：７９８(VH CDR3)、配列番号：８００(VL CDR1)、配列番号：８０１(VL CDR2)、配列番号：８０２(VL CDR3)
(24)配列番号：８０４(VH CDR1)、配列番号：８０５(VH CDR2)、配列番号：８０６(VH CDR3)、配列番号：８０８(VL CDR1)、配列番号：８０９(VL CDR2)、配列番号：８１０(VL CDR3)
(25)配列番号：８１２(VH CDR1)、配列番号：８１３(VH CDR2)、配列番号：８１４(VH CDR3)、配列番号：８１６(VL CDR1)、配列番号：８１７(VL CDR2)、配列番号：８１８(VL CDR3)
(26)配列番号：８２０(VH CDR1)、配列番号：８２１(VH CDR2)、配列番号：８２２(VH CDR3)、配列番号：８２４(VL CDR1)、配列番号：８２５(VL CDR2)、配列番号：８２６(VL CDR3)
(27)配列番号：８２８(VH CDR1)、配列番号：８２９(VH CDR2)、配列番号：８３０(VH CDR3)、配列番号：８３２(VL CDR1)、配列番号：８３３(VL CDR2)、配列番号：８３４(VL CDR3)
(28)配列番号：８３６(VH CDR1)、配列番号：８３７(VH CDR2)、配列番号：８３８(VH CDR3)、配列番号：８４０(VL CDR1)、配列番号：８４１(VL CDR2)、配列番号：８４２(VL CDR3)
(29)配列番号：７７９(VH)、配列番号：７８３(VL)
(30)配列番号：７８７(VH)、配列番号：７９１(VL)
(31)配列番号：７９５(VH)、配列番号：７９９(VL)
(32)配列番号：８０３(VH)、配列番号：８０７(VL)
(33)配列番号：８１１(VH)、配列番号：８１５(VL)
(34)配列番号：８１９(VH)、配列番号：８２３(VL)
(35)配列番号：８２７(VH)、配列番号：８３１(VL)
(36)配列番号：８３５(VH)、配列番号：８３９(VL)

［６９］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備えること、

以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備えること、

以下の(3)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は

以下の(4)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、

を特徴とする、CD147抗原に対する特異的結合性を有する単離された抗体。

(1)配列番号：１８０、配列番号：１８４

(2)配列番号：１７９、配列番号：１８０、配列番号：１８３、配列番号：１８４

(3)配列番号：１７８、配列番号：１７９、配列番号：１８０、配列番号：１８２、配列番号：１８３、配列番号：１８４

(4)配列番号：１７７、配列番号：１８１

［７０］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は

以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、

を特徴とする、C1qRに対する特異的結合性を有する単離された抗体。

(1)配列番号：(VH CDR1)４５２、配列番号：４５３(VH CDR2)、配列番号：４５４(VH CDR3)、配列番号：(VL CDR1)４５６、配列番号：４５７(VL CDR2)、配列番号：４５８(VL CDR3)

(2)配列番号：４５１(VH)、配列番号：４５５(VL)

［７１］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は

以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、

を特徴とする、CD44に対する特異的結合性を有する単離された抗体。

(1)配列番号：４６０(VH CDR1)、配列番号：４６１(VH CDR2)、配列番号：４６２(VH CDR3)、配列番号：４６４(VL CDR1)、配列番号：４６５(VL CDR2)、配列番号：４６６(VL CDR3)

(2)配列番号：４５９(VH)、配列番号：４６３(VL)

［７２］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は

以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、

を特徴とする、CD73に対する特異的結合性を有する単離された抗体。

(1)配列番号：４６８(VH CDR1)、配列番号：４６９(VH CDR2)、配列番号：４７０(VH CDR

3)、配列番号：４７２(VL CDR1)、配列番号：４７３(VL CDR2)、配列番号：４７４(VL CDR3)
(2)配列番号：４６７(VH)、配列番号：４７１(VL)
［７３］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は
以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とする、EpCAMに対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：４７６(VH CDR1)、配列番号：４７７(VH CDR2)、配列番号：４７８(VH CDR3)、配列番号：４８０(VL CDR1)、配列番号：４８１(VL CDR2)、配列番号：４８２(VL CDR3)
(2)配列番号：４７５(VH)、
配列番号：４７９(VL)
［７４］　以下の(1)～(3)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備えること、又は
以下の(4)～(6)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とする、HGFRに対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：６５２(VH CDR1)、配列番号：６５３(VH CDR2)、配列番号：６５４(VH CDR3)、配列番号：６５６(VL CDR1)、配列番号：６５７(VL CDR2)、配列番号：６５８(VL CDR3)
(2)配列番号：６６０(VH CDR1)、配列番号：６６１(VH CDR2)、配列番号：６６２(VH CDR3)、配列番号：６６４(VL CDR1)、配列番号：６６５(VL CDR2)、配列番号：６６６(VL CDR3)
(3)配列番号：６６８(VH CDR1)、配列番号：６６９(VH CDR2)、配列番号：６７０(VH CDR3)、配列番号：６７２(VL CDR1)、配列番号：６７３(VL CDR2)、配列番号：６７４(VL CDR3)
(4)配列番号：６５１(VH)、配列番号：６５５(VL)
(5)配列番号：６５９(VH)、配列番号：６６３(VL)
(6)配列番号：６６７(VH)、配列番号：６７１(VL)
［７５］　以下の(1)～(5)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備えること、
を特徴とする、LARに対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：９４４(VH)、配列番号：９４５(VL)
(2)配列番号：９４６(VH)、配列番号：９４７(VL)
(3)配列番号：９４８(VH)、配列番号：９４９(VL)
(4)配列番号：９５０(VH)、配列番号：９５１(VL)
(5)配列番号：９５２(VH)、配列番号：９５３(VL)
［７６］　以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖

可変領域を備えること、
を特徴とする、BCAMに対する特異的結合性を有する単離された抗体。
(1)配列番号：９５４(VH)、配列番号：９５５(VL)
【００１４】
＜単離された核酸分子、ベクターなど＞
［７７］　［６３］～［７６］のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域をコードする、単離された核酸分子。
［７８］　［７７］に記載の核酸分子を発現可能に保持するベクター。
［７９］　［７７］に記載の核酸分子が導入されている形質転換体。
［８０］　［６３］～［７６］のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む癌治療剤。
［８１］　［６３］～［７６］のいずれかに記載の抗体を含んでなる癌検査用又は癌研究用試薬。
【００１５】
＜検査法＞
［８２］　胆肝癌又は膵臓癌の検査法であって、
(1)生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ、及び
(2)被検細胞又は組織を対象としてCD46抗原を検出するステップ、
を含む方法。
［８３］　胆肝癌又は膵臓癌の検査法であって、
(1)生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ、及び
(2)被検細胞又は組織を対象としてITGA3を検出するステップ、
を含む方法。
［８４］　腎臓癌、肝細胞癌又は胆肝癌の検査法であって、
(1)生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ、及び
(2)被検細胞又は組織を対象としてALCAMを検出するステップ、
を含む方法。
［８５］　腎臓癌の検査法であって、
(1)生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ、及び
(2)被検細胞又は組織を対象としてCD147抗原を検出するステップ、
を含む方法。
【図面の簡単な説明】
【００１６】
【図１】特定の疾患に関連する抗体又は抗体セットの取得法の一例を示す図。
【図２】特定の疾患に関連する抗体セットの取得法の他の例を示す図。
【図３】特定の疾患に関連する抗体セットの取得法の他の例を示す図。
【図４】特定の疾患に関連する抗体セットの取得法の他の例を示す図。
【図５】scFv抗体遺伝子ライブラリーの作製に用いたベクターの模式図である。
【図６】pscFvCA9-E8VHdVLdの構造を模式的に示した図である。
【図７－１】pscFvCA9-E8VHdVLdのインサート部の塩基配列（配列番号：４０１）及びそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：４０２）を示した図である。
【図７－２】図７－１の続き。
【図８－１】pscFvCA-E8VHdのインサートの塩基配列（配列番号：４０５）及び制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列（配列番号：４０６）を示した図である。
【図８－２】図８－１の続き。
【図９】肝癌細胞特異的抗体クローンのスクリーング過程を示す図である。
【図１０】抗体クローンのFCM反応性（代表例）。抗体クローン035-011及び041-101と未分化悪性肝臓癌細胞株HLFとの反応性を示すヒストグラム（右）及び細胞蛍光染色像（左）が示される。
【図１１】抗体クローンのFCM反応性（代表例）。抗体クローン041-129、045-134及び052

-042と未分化悪性肝臓癌細胞株HLFとの反応性を示すヒストグラム（右）及び細胞蛍光染色像（左）が示される。
【図１２】７種類の抗体についてFCMで得られたヒストグラムを重ね書きした図。各ヒストグラムがユニークな形状を有することがわかる。
【図１３】７種類の抗体についてFCMで得られたヒストグラムを重ね書きした図。全てのヒストグラムが相互に高い類似性を有することがわかる。
【図１４】４種類の抗体についてFCMで得られたヒストグラムを重ね書きした図。全てのヒストグラムが相互に高い類似性を有することがわかる。
【図１５】２種類の抗体についてFCMで得られたヒストグラムを重ね書きした図。二つのヒストグラムが相互に高い類似性を有することがわかる。
【図１６】３種類の抗体について、様々な細胞を対象にFCMを行い得られたヒストグラムを重ね書きした図。いずれの細胞を用いても、これらの抗体は相互に類似性の高いヒストグラムを与えることがわかる。
【図１７】FCM解析の結果を基に抗体群をグループ化する方法を示す図。
【図１８】FCM解析の結果を基に複数の抗体クローンを分類した表。表中の各記号は、ネガティブコントロール抗体が与えるヒストグラム（基準ヒストグラム）からのシフト量を示す。◎はシフト量が２０倍以上であること（ヒストグラムのピーク値が、基準ヒストグラムのピーク値の２０倍以上）、○は同１０倍以上であること、△は同３倍であること、×は同３倍未満であることをそれぞれ示す（斜線はデータなし）。
【図１９】CD147を対象抗原としたRNAiの結果。灰色(a)；RNAiを行わなかった細胞に対し抗インフルエンザ抗体YA14cp3を一次抗体として細胞染色、緑色(b)；RNAiを行わなかった細胞に対し、059-053cp3を一次抗体として細胞染色、赤色(c)；RNAiを行った細胞に対し、059-053cp3を一次抗体として細胞染色。
【図２０】CD166を対象抗原としたRNAiの結果。灰色(a)；RNAiを行わなかった細胞に対し抗インフルエンザ抗体YA14cp3を一次抗体として細胞染色、緑色(b)；RNAiを行わなかった細胞に対し、035-234cp3を一次抗体として細胞染色、赤色(c)；RNAiを行った細胞に対し、035-234cp3を一次抗体として細胞染色。
【図２１】HER1を対象抗原としたRNAiの結果。灰色(a)；RNAiを行わなかった細胞に対し抗インフルエンザ抗体YA14cp3を一次抗体として細胞染色。緑色(b)；RNAiを行わなかった細胞に対し、048-006cp3を一次抗体として細胞染色。赤色(c)；RNAiを行った細胞に対し、048-006cp3を一次抗体として細胞染色。
【図２２】HER2を対象抗原としたRNAiの結果。灰色(a)；RNAiを行わなかった細胞に対し抗インフルエンザ抗体YA14cp3を一次抗体として細胞染色、緑色(b)；RNAiを行わなかった細胞に対し、015-126cp3を一次抗体として細胞染色、赤色(c)；RNAiを行った細胞に対し、015-126cp3を一次抗体として細胞染色。
【図２３】IgSF4を対象抗原としたRNAiの結果。灰色(a)；RNAiを行わなかった細胞に対し抗インフルエンザ抗体YA14cp3を一次抗体として細胞染色、水色(b)；RNAiを行わなかった細胞に対し、035-273cp3を一次抗体として細胞染色、橙色(c)；RNAiを行った細胞に対し、035-273cp3を一次抗体として細胞染色。
【図２４】Ａ：048-006抗体及び059-15抗体のEGF結合阻害活性（A431細胞を使用）。Ｂ：048-006抗体のEGF結合阻害活性（低濃度領域、A431細胞を使用）。Ｃ：048-006抗体のEGF結合阻害活性（低濃度領域、A431細胞を使用）。
【図２５】Ａ：048-006抗体、059-152抗体のHER1リン酸化シグナル阻害活性（ウエスタンブロットの結果）。レーン１；抗体無添加、レーン２；HR1-007添加（10 μg/ml）、レーン３；048-006抗体添加（1 μg/ml）、レーン４；048-006抗体添加（10 μg/ml）、レーン５；059-152抗体添加（1 μg/ml）、レーン６；059-152抗体添加（10 μg/ml）。上段は、抗リン酸化チロシン抗体（マウスモノクローナル抗体）によるウェスタンブロットの結果。下段は、抗βactin抗体（ウサギポリクローナル抗体）によるウエスタンブロットの結果。Ｂ：048-006抗体のHER1リン酸化シグナル阻害活性（低濃度領域）。レーン１；無処理、レーン２；抗体無添加、レーン３；HR1-007添加（1 μg/ml）、レーン４；048-0

06抗体添加（0.5 μg/ml）、レーン５；048-006抗体添加（0.1 μg/ml）、レーン６；048-006抗体添加（0.05 μg/ml）。抗体と30分間インキュベーションの後Her1が添加された。上段は、抗リン酸化チロシン抗体（マウスモノクローナル抗体）によるウェスタンブロットの結果。下段は、抗βactin抗体（ウサギポリクローナル抗体）によるウエスタンブロットの結果。Ｃ：048-006抗体及び059-152抗体とErbitux（エルビタックス）のHER1リン酸化シグナル阻害効果の比較（A-431細胞を使用。レーン１；HR1-007、レーン２；048-006抗体、レーン３；059-152抗体、レーン４；Erbitux、レーン５；抗体無添加（EGF(+)）、レーン６；抗体無添加（EGF(-)）。Ｄ：048-006抗体及び059-152抗体とErbitux（エルビタックス）のHER1リン酸化シグナル阻害効果の比較（CCF-RC1細胞を使用）。レーン１；HR1-007、レーン２；048-006抗体、レーン３；059-152抗体、レーン４；Erbitux、レーン５；抗体無添加（EGF(+)）、レーン６；抗体無添加（EGF(-)）。Ｅ：048-006抗体及び059-152抗体クローンとErbitux（エルビタックス）のHER1リン酸化シグナル阻害効果の比較（Caki-1細胞を使用）。レーン１；HR1-007、レーン２；048-006抗体、レーン３；059-152抗体、レーン４；Erbitux、レーン５；抗体無添加（EGF(+)）、レーン６；抗体無添加（EGF(-)）。

【図２６】BIACORE実験結果。固定方法：BIAcoreのCM5チップを使用しNHSを使用してHER1の部分配列をセンサーに固定。048-006抗体を標記の濃度で流し、シグナルを観察した。

【図２７】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：ITGA3抗体、標的培養細胞：HLF。

【図２８】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体、標的培養細胞：A-431。

【図２９】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体、標的培養細胞：A549。

【図３０】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体、標的培養細胞：ACHN。

【図３１】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体、標的培養細胞：CCF-RC-1。

【図３２】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体、標的培養細胞：NCI-H1373。

【図３３】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体、標的培養細胞：SK-OV-3。

【図３４】ADCC活性試験の結果を示す図。使用抗体：HER2抗体、標的培養細胞：BT-474。

【図３５】ADCC活性試験の結果を示す図。（ａ）使用抗体：ALCAM抗体である066-174、標的培養細胞：NCI-H1373。（ｂ）使用抗体：ALCAM抗体である066-174、標的培養細胞：CW2。（ｃ）使用抗体：ALCAM抗体である066-174、標的培養細胞：NCI-H441。

【図３６】ADCC活性試験の結果を示す図。（ａ）使用抗体：ALCAM抗体である035-234、標的培養細胞：CW2。（ｂ）使用抗体：：ALCAM抗体である035-234、標的培養細胞：NCI-H441。

【図３７】ADCC活性試験の結果を示す図。（ａ）使用抗体：ICAM抗体である053-051、標的培養細胞：NCI-H441。（ｂ）使用抗体：ICAM抗体である053-051、標的培養細胞：HepG2。

【図３８】ADCC活性試験の結果を示す図。（ａ）使用抗体：ICAM抗体である053-059、標的培養細胞：NCI-H441。（ｂ）使用抗体：ICAM抗体である053-059、標的培養細胞：HepG2。

【図３９】ADCC活性試験の結果を示す図。（ａ）使用抗体：ICAM抗体である053-085、標的培養細胞：NCI-H441。（ｂ）使用抗体：ICAM抗体である053-085、標的培養細胞：HepG2。

【図４０】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：HER1抗体である048-006抗体又は059-152抗体、標的培養細胞：CCF-RC-1。

【図４１】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：HER1抗体である048-006抗体又は059-152抗体、標的培養細胞：NCI-H1373。

【図４２】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：HER1抗体である048-006抗体又は059-152抗体、標的培養細胞：A-431。

【図４３】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：ALCAM抗体である041-118抗体、標的培

養細胞：NCI-H1373。
【図４４】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：EPCAM抗体である067-153抗体、標的培養細胞：MKN-45。
【図４５】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：EPCAM抗体である067-153抗体、標的培養細胞：HT-29。
【図４６】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：EPCAM抗体である067-153抗体、標的培養細胞：NCI-H1373。
【図４７】ADCC活性の抗体用量依存性。使用抗体：HGFR抗体である067-133抗体、標的培養細胞：NCI-H1373。
【図４８】細胞増殖阻害試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（048-006）、標的対象培養細胞：A-431。
【図４９】細胞増殖阻害試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（048-006）、標的対象培養細胞：ACHN。
【図５０】細胞増殖阻害試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（048-006）、標的対象培養細胞：NCI-H1373。
【図５１】細胞増殖阻害試験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（048-006）、標的対象培養細胞：SK-OV-3。
【図５２】細胞増殖阻害試験の結果を示す図。使用抗体：HER2抗体（015-126）、標的対象培養細胞：BT-474。
【図５３】マウスを用いた抗腫瘍実験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（048-006）、対象移植細胞：ヒト肺癌細胞H1373細胞。
【図５４】マウスを用いた抗腫瘍実験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（048-006）、対象移植細胞：類上皮腫A-431。
【図５５】マウスを用いた抗腫瘍実験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（048-006）、対象移植細胞：類上皮腫A-431。
【図５６】マウスを用いた抗腫瘍実験の結果を示す図。使用抗体：HER1抗体（059-152）、対象移植細胞：類上皮腫A-431。
【図５７】実験に使用した細胞株の培養条件を示す表。
【図５８】３次元ELISAの概念図。各混合抗体の調製の仕方が示される。
【図５９】３次元ELISAの概念図。抗体クローンの特定の手順が示される。
【図６０】プレート混合抗体を用いたElISA（抗原はCD147）の結果。
【図６１】行混合抗体を用いたElISA（抗原はCD147）の結果。
【図６２】列混合抗体を用いたElISA（抗原はCD147）の結果。
【図６３】プレート混合抗体を用いたElISA（抗原はHER1）の結果。
【図６４】行混合抗体を用いたElISA（抗原はHER1）の結果。
【図６５】列混合抗体を用いたElISA（抗原はHER1）の結果。
【図６６】選抜した抗体クローンを用いたELISA（抗原はHER1）の結果。
【図６７】SKOv-3細胞に対するRNAi効果。Ａ：抗ITGA3抗体、Ｂ：抗ITGB1抗体、Ｃ：015-003 cp3抗体。破線：RNAiなし、実線：ITGA3 RNAi、薄い実線：ITGB1 RNAi、灰色：１次抗体なし。
【図６８】臨床癌検体を用いた免疫染色によって特異的と判断された組織と、各抗体クローンとの対応関係。
【図６９】臨床癌検体と各抗体クローンの反応性。＋は免疫染色陽性、±は弱陽性、－は免疫染色陰性を表す。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
（用語）
説明の便宜上、本明細書に使用される用語の一部についてその定義をまとめて以下に示す。
本明細書において用語「～を含む」又は「～を含んでなる」は、「～からなる」の意味

をも含む表現として使用される。したがって例えば、「複数の要素（部材）を含んで構成される物（又は方法）」と記載した場合には、それが意味するものとして「当該複数の要素（部材）から構成される物（又は方法）」も当然に考慮される。

【００１８】

「疾患」は病気や疾病と同義であり、体に何らかの機能障害が起きている状態をいう。また、特に言及しない限り、本明細書では病状、病態、症状、容態など病気の状態（様子）を表す語を包括するものとして用語「疾患」を使用する。即ち、用語「疾患」は、病状や病態などと置換可能なものとして使用される。

「単離された」とは、その本来の環境（例えば天然の物質の場合は天然の環境）から取り出された状態、即ち人為的操作によって本来の存在状態と異なる状態で存在していることを意味する。

「単離された抗体」には、天然であって且つ何ら外的操作（人為的操作）が施されていない抗体、即ちある個体の体内で産生され、そこに留まっている状態の抗体は含まれない。尚、単離された抗体は、典型的には、他の種類の抗体が混在していない状態、即ち単独で（同種の抗体の集合として）存在している。CDR領域の場合の「単離された」状態には、単独で存在している状態に加え、抗体の他の領域とともに存在している状態も含まれる。即ち、用語「単離されたCDR」には、単独で存在しているCDRは勿論のこと、単離された抗体の一部として存在しているCDRも含まれる。

【００１９】

「HER1」は別名erbB1、c-erbB-1、EGFR（Epidermal Growth Factor Receptor）、又はv-erbBとも呼ばれる。元来、ニワトリに感染して発癌(erythroleukemia)を起こすレトロウイルス中に見出された癌遺伝子erbBに対応して、ゲノム上に存在する遺伝子が単離され、それがEGFの受容体であることが判明した。ところで、リガンドであるEGF（Epidermal Growth Factor）は１９６２年、マウス顎下線抽出液中に、新生マウスの眼瞼の開裂と、切歯の発生を促進する因子として見いだされ、細胞増殖・分化・生存因子として幅広く研究されてきた。EGFは５３個のアミノ酸からなるペプチドで、６個のシステイン残基によって形成される３個のジスルフィドループからなる特徴的な構造を持つ。この構造はその後、数多くの蛋白質にも認められ、EGF様ドメインと呼ばれている。EGFファミリーは、１個以上のEGF様ドメインを持ち、受容体型チロシンキナーゼEGF受容体(EGFR)ファミリー（別名ErbBファミリー）に直接結合し、これを活性化する。

一方、受容体ErbBファミリーは、現在４種が明らかにされており、EGFR(ErbB-1)、ErbB-2、ErbB-3、ErbB-4と名付けられている。ErbB-1とErbB-2はさまざまなヒトの腫瘍に過剰発現し、予後や生存率の低下に関与している。また、これら受容体の刺激は細胞増殖に関与し、さらには腫瘍の進行、浸潤、転移に関わる複数のプロセスに関与している。現在までに、EGFRに対する特異的リン酸化阻害剤が肺癌の治療薬として承認されている。多くの癌で高発現が見られており、ImClone Systems社によりcetuximab (Erbitux、これはマウス/ヒトキメラ抗体)が開発され、既に上市されている。Erbituxは、リガンドであるEGFのレセプターへの結合による二量体化－EGFRのリン酸化による情報伝達経路の活性化の初期過程を阻害する。尚、HER1のアミノ酸配列を配列番号：３６９に示す。

【００２０】

「HER2」は別名erbB-2、c-erbB-2、又はneuと呼ばれる。HER2はレセプター型チロシンカイネースファミリーに属し、乳癌、卵巣癌、胃癌などにおいて過剰発現や遺伝子の増幅が報告されている。1985年にグリア細胞由来の脳腫瘍および乳癌でEGFR類似遺伝子の領域を含むDNAが増幅（gene amplification）していることが見出されたことにより発見された分子である。HER2はそのshedding levelが低く、癌治療におけるターゲット分子として非常に有効と考えられている。多くの施設において、腫瘍増殖促進あるいは抑制の作用を示すモノクローナル抗体(MoAb)が作製されている。腫瘍増殖抑制効果を示すMoAbは抗体単独で、あるいはシスプラチンなどの抗癌剤との併用で臨床試験が行われその有効性が報告されている。EGFRファミリーには4種類存在するが、リガンド結合部位およびチロシンリン酸化酵素活性部位両方共有するのはEGFR(HER1)とHER4のみで、HER2はリガンドを結合で

きず、その代わり二量体形成能力の点では、リガンドなしに初めから活性化された構造をとっている。因みにHER3はチロシンリン酸化活性を欠いている。そのためHER2-HER3ヘテロ二量体は機能分子となる。Genentech社は1989年に既にHER2に対するマウスモノクローン抗体を11種類単離していた。その中の4D5をヒト化抗体化してTrastuzumab (Herceptin)開発に成功した。尚、HER2のアミノ酸配列を配列番号：３７０に示す。

【００２１】

「CD46抗原」は別名MCP（Membrane Co-factor Protein）、gp45-70、HuLY-m5、measles virus receptor、MIC10、TLX-B antigen、TRA2、trophoblast leucocyte common antigen、trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigenと呼ばれ、分子量56～66kDaのO型糖鎖結合非ジスルフィド結合ダイマータンパクである。この分子は、C3bまたはC4bに結合し、血漿中のセリンプロテアーゼやＩ因子による分解を促す補因子であるMembrane Co-factor Protein（MCP）として知られている。はしかウイルス凝集素やA群連鎖球菌表面タンパクのレセプターでもある。胸腺細胞やTリンパ球、Bリンパ球、単球、顆粒球、NK細胞、血小板、内皮細胞、上皮細胞および繊維芽細胞に発現しているが、赤血球には発現していないと報告されている。発癌に際して異常発現する癌特異抗原に対して、抗体産生が誘導され、補体による癌組織の攻撃(complement-dependent cytotoxicity, CDC)を免れた細胞だけが実際には癌となるのではないかという仮説に立って補体の阻害作用を持つ分子群の発現が詳細に解析されている。癌細胞に於けるCD46の異常発現の報告は多いが、癌特異抗原に対して抗体産生が誘導されていることを示す証拠は少ない。尚、CD46抗原のアミノ酸配列を配列番号：３７１に示す。

【００２２】

「ITGA3(integrin alpha3)」は別名alpha3beta1 Epiligrin Receptor、alpha3beta1 Integrin、Epiligrin Receptor、CD49c、VLA-3、Gap b3、Galactoprotein b3、又はLaminin-5 Receptorと呼ばれ、分子量150kDaのインテグリンα3鎖で、130kDaのインテグリンβ1鎖（CD29分子）と非共有結合的に結合してVLA-3複合体（α３β１またはCD49c/CD29）を形成する。ラミニンやコラーゲン、フィブロネクチン、インベーシンおよびエピリグリンのレセプターとして知られている。インテグリンはα鎖とβ鎖からなるヘテロ二量体分子である。α鎖には24種類、β鎖には9種類あり、様々な組合せと選択的スプライシングによって多様な分子集団から構成されている。細胞外ドメインは細胞外マトリックス（コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等）と結合し、細胞質側はタリン、フィラニン、αアクチニンを介してアクチンフィラメントに結合する。接着分子として機能するが、情報伝達分子としての役割が重要である。とりわけα３β１分子はテトラスパニン分子C151と会合している。尚、ITGA3のアミノ酸配列を配列番号：３７２に示す。

【００２３】

「ICAM1（Intercellular adhesion molecule-1）」は別名Intercellular Adhesion Molecule 1又はCD54 Antigenと呼ばれ、膜貫通糖タンパクであり、N-結合型糖鎖の結合部位が7箇所存在する。分子量は90kDaである。ICAMは、Ig-superfamilyに属し、主として白血球の接着に係わることが知られる。抗原提示細胞（APC）へのTリンパ球接着を媒介し、T細胞とT細胞、またはT細胞とB細胞の相互作用にも関与している。また単球やリンパ球、好中球が活性化した内皮細胞に接着する際にも関与する。LFA-1（CD11ａ／CD18）およびMac-1（CD11b／CD18）のインテグリンに結合する。またライノウィルスのレセプターでもある。内皮細胞の他、活性化した様々な種類の細胞に発現している。例えば単球に発現し、BおよびTリンパ球、胸腺細胞、樹状細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、軟骨細胞および上皮細胞で発現増強する。上皮細胞が癌化するプロセスで獲得する必要がある性質は、細胞間に侵入（invasion）すること、更には転移に際して遊送（migration）し、定着する能力を挙げられる。そこで接着因子の発現が発癌に寄与すると考えられている。接着因子は大きく、セレクチン(E-、P-、L-)、免疫グロブリン様ドメインを持つ分子(Ig-superfamily)、インテグリン、カドヘリンそしてCD44と5群に分けられている。癌化に際して、Eカドヘリンの発現が抑制されていることは広く認められている。幾つかの癌で異常発現していることが報告されている。尚、ICAM1のアミノ酸配列を配列番号：３７３に示

す。

【００２４】

「ALCAM（Activaed leukocyte cell adhesion molecule)」は別名CD166抗原、KG-CAM、CD6 Ligand、Neurolinとも呼ばれる膜貫通タンパクである。10箇所のN結合型糖鎖附加部位を含む、免疫グロブリンスーパーファミリー分子である。分子量100～105kDaで、5個の細胞外Ig様ドメインと32アミノ酸の細胞内末端、短い膜貫通領域で構成されている。ALCAMは接着分子の一つで、活性化された白血球上にあり、CD6分子（T細胞でシグナル受容体として働く）に対するリガンド分子として同定された。ALCAMは、homophylic（ALCAM-ALCAM)もしくはheterophylic（ALCAM-CD6)な相互作用で接着因子としても働く。細胞間接着部位で、ALCAMが膜に近い3個のC2様ドメインを介してオリゴマーを形成しうることが示唆されている。ALCAMの分布には細胞系統による限定はみられず、造血系細胞、内皮細胞、胸腺皮質及び髄質の上皮細胞、骨髄の間葉系幹細胞、線維芽細胞、肝細胞など様々な細胞種に発現している。末梢血では、活性化T及びB細胞、単球、循環樹状細胞、そして顆粒球に弱く発現している。広範な組織分布を示す一方で、ALCAMの発現は通常は増殖や遊走に関与する細胞集団に限定されている。胸腺では、CD6+胸腺細胞や胸腺上皮細胞にALCAMが発現することから、CD6分子との相互作用がT細胞の分化成熟に役立っていると考えられている。他にも、ALCAM接着分子が胎児造血や血管芽細胞の分化、毛細血管形成に関与している可能性が示唆されている。ALCAMの癌化に於ける役割として様々な推定(MMP活性の制御、internalizationとrecylingが起こる、ADM17やADAM10（a disintegrin and metalloproteaseの略)の基質となっている、apoptosisやautophasyからの防御)されているが、決定的なものはない。ALCAM-CD6の相互作用は相方向性のものと考えられる。尚、ALCAMのアミノ酸配列を配列番号：３７４に示す。

【００２５】

「CD147抗原」は別名BSG、TCSF（Tumor cell-derived collagenase stimulatory factor）、5F7 protein、OK blood group protein、basigin protein、collagenase stimulatory factor protein、EMMPRIN（Extracellular matrix metalloproteinase Inducer）、M6 activation antigen、又はhuman leukocyte activation antigen M6などと呼ばれ、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜糖タンパク質である。CD147抗原は2つの顔を持つ。1つは細胞表面で機能する場合であり、2つのIgドメインを持つ膜糖タンパク質としてMMP-1、2、3(マトクックスメタロプロテアーゼ）の活性化およびオリゴマンノースを認識するレクチン活性を発揮する。MMPの活性化はとくに癌で注目されている（欧米ではEMMPRINの名前でも知られる）。すなわち、癌細胞で発現するCD147抗原が周りの線維芽細胞で発現するMMPを活性化し、癌の浸潤に寄与するというものである。一方、オリゴマンノースレクチンの活性は神経細胞の相互作用に殊に重要で神経突起伸長などとの関わりが指摘されている。2つ目の顔は細胞内での機能である。CD147抗原はホモ2量体を形成し、それにN末側のIgドメインが必要で糖鎖の付加は不要であると報告されている。CD147については次のような興味深い報告がある。integrinα３β１とCD147が複合体を作っており、その場合はTM4SF（tetraspanin)分子は複合体に加わらない。癌化に際してCD147の産生がanchorage-dependentなgrowthからindependentなgrowthへの変化を導くが、それはヒアルロン酸(hyaluronam)の産生によって促進されている。ヒアルロン酸のレセプターがCD44とRHAMMであることから興味深い。CD147はMMP産生を誘導するがそのMMPの作用によりCD147の一部は可溶化する。CD147はintegrinと作用し細胞の構造に変化をもたらす。CD147は血管新生に最も影響を与える。更にCD147とCyclophin Aの大量発現－細胞増殖の関係も見つかっている。

尚、CD147抗原のアミノ酸配列を配列番号：３７５に示す。

【００２６】

「IgSF4」は、イムノグロブリン・スーパーファミリー・メンバー４（Immunogloblin superfamily member4）の略称であり、BL2、ST17、NECL2、TSLC1、IGSF4A、SYNCAM、sTSLC-1とも呼ばれ、NCAM(neural cell adhesion molecule)とアミノ酸配列の相同性を持つ。IgSF4はヒト11番染色体の11q23.2から発現していると考えられている。IgSF4が抑制遺伝子

として肺癌特異的に発現していること、脳の神経接合にIgSF4が関与していること等がこれまで報告されている（Biederer T et al. Science. 2002 Aug 30;297(5586):1525-31）。IgSF4の配列情報はNCBI-PUBMEDデータベースに収録されている。（Accession No.NM_01433、Definition: Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 4 (IGSF4), mRNA）。発癌との関連ではTSLC1(tumor suppressor in lung cancer 1)の名前で示される様に、癌抑制遺伝子として注目されている。しかし、100%の成人性T細胞白血病（ATL）細胞で高発現が観察され、癌遺伝子と機能する可能性（機能は不明）も示唆されている。尚、IgSF4のアミノ酸配列を配列番号：３７６に示す。

【００２７】

「C1qR」は、タイプI膜蛋白をコード化する補体レセプターである。このタンパク質は補体タンパク質C1q、マンノース結合性レクチン、及び肺のサーファクタント蛋白Aのための受容体として作用する。70kDaの2つ以上のポリペプチドがジスルドフィド結合しC1qRを形成している。免疫複合体の除去は補体の重要な機能であり、C1qレセプターはC1qのコラーゲン部分と結合することによって免疫複合体を食細胞と結合させる機能的な受容体である。CD43と複合体を形成することが示唆されている。尚、C1qRのアミノ酸配列を配列番号：４４６に示す。

【００２８】

「CD44」は、細胞相互作用、細胞接着と細胞移動に関わる細胞表面糖蛋白質であるhyaladherinファミリーに属する膜貫通タンパクである。ヒアルロン酸受容体で、この分子の選択的スプライシングや翻訳後修飾によるタンパク質の構造的で機能的な多様なアイソフォームが、腫瘍転移に関連しているかもしれないと考えられている。CD44分子は、ほとんどの細胞及び組織に発現しているが、通常、血小板、肝細胞、心筋、腎尿細管上皮、精巣、皮膚には発現していない。尚、CD44のアミノ酸配列を配列番号：４４７に示す。

【００２９】

「CD73」は5-prime-ribonucleotide phosphohydrolaseとも呼ばれ、中性pH下にてpurine 5-prime mononucleotidesをnucleosidesに変換する。酵素は原形質膜の外部の表面へのグリコシルホスファチジル・イノシトールを仲介し原形質膜の外部の表面へ結合している。2つの70kDaサブユニットのホモダイマーである。リンパ球分化のマーカーとして使用されている。この遺伝子の欠損が様々な免疫欠損病と関連していることがわかっている。尚、CD73のアミノ酸配列を配列番号：４４８に示す。

【００３０】

「EpCAM」は、論文で複数回使用、引用されているものだけでも22以上の呼称を有する。本抗原はゲノム上2p21に存在し、全長314aa, 34920 Daの蛋白である。本分子をmRNAレベルで調査した文献では、健常人において末梢血（PB）レベルで100%、骨髄（BM）レベルで40％のヒトからPCRにて検出が見られるようである。臓器別には大腸にては検出出来るが、肝臓、前立腺、肺では検出出来ないとの報告されている。癌細胞株においてp53との関連でp53の変異や欠損によってEpCAMのメチレーションが失われamplificationを誘導するという報告も存在する。尚、EpCAMのアミノ酸配列を配列番号：４４９に示す。

【００３１】

NIH3T3細胞を用いた癌遺伝子の探索の産物として最初に見つけられたMet遺伝子がHGFR(Hepatocyte growth factor receptor)である。HGFはscatter factorとも呼ばれ、見かけ上の機能が非常に異なる分子として全く独立に単離された。HGFRは、HER1やPDGFと同様に細胞外にリガンド結合ドメインを有し、細胞質側にチロシンリン酸化酵素活性部位を有する受容体だが、その機能が非常に異なる。通常細胞増殖因子や分化誘導因子がレセプターに結合し、タンパク質のリン酸化が起こると、限られた幾つかの情報伝達経路（Ras/MAPキナーゼ経路等）を通って最後に転写因子を活性化して特定の遺伝子セットを発現させる。この場合、その細胞応答の型を最終的に決めるのは転写因子である。そこで癌化によってどれかの増殖因子-レセプターの活性化が起こった場合も、癌化以外に細胞自身の劇的な変化が起こるとは考えにくい。現在癌化でepithelial-mesenchymal transition (EMT)と呼ばれる現象が注目されており、その中で中心的役割を果たす。そういった例では多数

の分子が協調的に機能するので詳細な解析が必要となる。尚、HGFRのアミノ酸配列を配列番号：４５０に示す。

【００３２】

LAR（Leukocyte common Antigen-Related）はPTP(protein tyrosine phosphatase)ファミリーに属する。PTPsは細胞の癌化、分裂サイクル、分化、細胞成長などの様々な局面でのプロセスを調節する分子として知られている。構造は細胞外領域、一回膜貫通領域、そして2つのタンデムな細胞質内触媒ドメイン（protein tyrosine phosphataseのホモログ）に分かれる。細胞外領域は3つのIg様ドメインと9つの非Ig様ドメインからなる神経細胞接着因子に似た構造（NCAMのホモログ）を保持している。本分子の機能として上皮におけるadherents junctions形成の細胞接着に関与している。なお本分子はインスリン感受性の肥満細胞、インスリン耐性の細胞において高発現が確認されており、インスリンとの関係が示唆されている。また、インスリン受容体強制発現体のインスリン受容体阻害活性を抗抗LAR抗体が有することが報告されている（Knock-down of LAR protein tyrosine phosphatase induces insulin resistance.:Mander A, Hodgkinson CP, Sale GJ. :FEBS Lett. 2005 Jun 6;579(14):3024-8.）。

また、LARは、白血球全般の膜に発現しタンパクチロシンホスファターゼレセプタータイプF（protein tyrosine phosphatase, receptor type, F；PTPRF）とも呼ばれ、Protein sequence database of the Protein Information Resource（PIR）にTDHULKとしてタンパク配列（配列番号：９４１）が登録されている。

【００３３】

BCAM（basal cell adhesion molecule）(Lutheran blood group)は、CD239抗原とも呼ばれ、Q86VC7(UniProtKB/Swiss-Prot)及びI3800（PIR）でタンパク配列が登録されている（配列番号：９４２）。染色体19q13.2-q13.3における単一な遺伝子から選択的スプライシング産物を生じる。免疫グロブリン様ドメインをもつ糖タンパクである。一回膜貫通型で広く発現するが、すい臓に高発現し、脳での発現が低い。BCAM抗原は、ある種の細胞で過剰調節され癌悪性化の誘起や、卵巣癌の生体内で過剰発現されていることが示されている。

【００３４】

本発明において「肝癌」は広義に解釈することとし、肝癌腫及び肝肉腫を含む。また、本発明において用語「癌」は「腫瘍」と互換的に使用される。また、病理学的に診断が確定される前の段階、すなわち腫瘍としての良性、悪性のどちらかが確定される前には、良性腫瘍、良性悪性境界病変、悪性腫瘍を総括的に含む場合もあり得る。

癌はその発生の母体となった臓器の名、もしくは発生母組織の名で呼ばれ、主なものを列記すると、舌癌、歯肉癌、咽頭癌、上顎癌、喉頭癌、唾液腺癌、食道癌、胃癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌、肝臓癌、胆道癌、胆嚢癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、甲状腺癌、副腎癌、脳下垂体腫瘍、松果体腫瘍、子宮癌、卵巣癌、膣癌、膀胱癌、腎臓癌、前立腺癌、尿道癌、網膜芽細胞腫、結膜癌、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、皮膚癌、白血病、悪性リンパ腫、睾丸腫瘍、骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、血管肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫などである。そして、さらに発生臓器の部位の特徴によって、上・中・下咽頭癌、上部・中部・下部食道癌、胃噴門癌、胃幽門癌、子宮頚癌、子宮体癌などと細分類されているが、これらが限定的ではなく本発明の「癌」としての記載に含まれる。

【００３５】

本明細書では必要に応じて、慣例に従い以下の略号（括弧内）を使用する。

重鎖（H鎖）、軽鎖（L鎖）、重鎖可変領域（VH）、軽鎖可変領域（VL）、相補性決定領域（CDR）、第１相補性決定領域（CDR1）、第２相補性決定領域（CDR2）、第３相補性決定領域（CDR3）重鎖の第１相補性決定領域（VH CDR1）、重鎖の第２相補性決定領域（VH CDR2）、重鎖の第３相補性決定領域（VH CDR3）軽鎖の第１相補性決定領域（VL CDR1）、軽鎖の第２相補性決定領域（VL CDR2）、軽鎖の第３相補性決定領域（VL CDR3）

【００３６】

本発明の第１の局面は抗体の分類法に関する。本発明の分類法は以下のステップを含む

ことを特徴とする。
（１）細胞表面抗原を認識する複数の抗体を用意するステップ、
（２）前記抗体の各々を同種類の細胞に接触させるステップ、
（３）ステップ（２）後の各細胞をフローサイトメトリーで解析し、抗体と細胞表面との反応性を示すデータを得るステップ、及び
（４）得られたデータを比較し、その類似性に基づいて各抗体を分類するステップ。
【００３７】
ステップ（１）
本発明の分類法ではまず、細胞表面抗原を認識する複数の抗体を用意する。説明の便宜上、本発明の分類法で分類される当該抗体のことを「サンプル抗体」とも呼ぶ。
本発明において「細胞表面抗原」とは、少なくともその一部が細胞外に存在し、細胞の表面に抗原決定基を形成する分子をいう。例えば細胞膜貫通ドメイン及び細胞外ドメインを有する膜貫通型タンパク質や、GPIアンカー型タンパク質のように糖脂質などを介して細胞膜に繋がれ、細胞外表面に存在することになるタンパク質などはこのような抗原決定基を形成することができる。細胞表面抗原は単純タンパク質（基本的にアミノ酸のみを構成成分とするもの）や複合タンパク質（アミノ酸以外の構成成分を含むもの。例えば糖タンパク質やリポタンパク質）、或いは修飾タンパク質（リン酸化やアセチル化、メチル化などの修飾を受けたタンパク質）等によって形成され得る。また、二以上の同種又は異種の分子が協同して抗原決定基を形成する場合もある。
本発明における「細胞表面抗原」は、動物細胞に限らず、植物細胞、微生物細胞等の細胞表面抗原を含む。好ましくは、本発明の「細胞表面抗原」は動物細胞の細胞表面抗原である。動物細胞は多様な細胞表面抗原を有することが知られている。ここでの「動物細胞」は哺乳動物細胞及び非哺乳動物細胞を含むが、好ましくは哺乳動物細胞である。中でもヒト細胞が特に好ましい。
【００３８】
好ましくは、インタクトな状態の細胞表面抗原を認識する複数の抗体が用意される。「インタクトな状態」とは、本来の状態を維持していることをいい、「変性されていない状態」と同義である。
【００３９】
「細胞表面抗原を認識する抗体」とは、抗原抗体間の特異性の高い認識機構によって、細胞表面抗原を認識・結合する抗体をいう。抗体の由来、種類、クラス、形態などは特に限定されない。従って、本発明における「抗体」にはマウス、ラットなどの非ヒト動物の抗体、一部の領域を他の動物（ヒトを含む）のものに置換したキメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体が含まれる。好ましくはヒト抗体又はヒト型抗体が用いられる。Fab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv、又はdsFv抗体などの抗体断片を用いてもよく、また治療用途においてそれらのVH及びVL（Ｆｖ領域）を用いIgG型に変換された抗体なども含まれる。
【００４０】
細胞表面抗原を認識する抗体は例えば、抗体ライブラリーを細胞表面抗原に接触させた後、細胞表面抗原に結合した抗体を回収することにより調製することができる。このような調製法の一つとして、本発明者らが先に報告した方法（特開２００５－１８５２８１号公報）がある。当該方法によればファージ抗体ライブラリーの中から、インタクトな細胞表面抗原を認識する抗体クローンを効率的に選抜することができる。本発明では当該方法を利用して選抜された各抗体クローンに由来する抗体の集合を好適に利用できる。ここでの「各抗体クローンに由来する抗体」とは、選抜された各抗体クローンそのもの、又はその遺伝子を利用して調製されたものをいう。後者として例えば、選抜された抗体クローンの遺伝子で適当な宿主（例えば大腸菌）を形質転換し、当該宿主で発現させた抗体や、当該宿主内又は他の宿主を利用して更なる遺伝子工学的改変を加えた後に発現させた抗体が該当する。
上記公報ではヒトFv領域をもつ抗体として、scFv-CL-cp3抗体（軽鎖定常領域を介してファージタンパク質cpIIIがscFVに融合した抗体）、scFv-CL-pp抗体（軽鎖定常領域を介

して二つのプロテインAがscFVに融合した抗体）、scFv-CL-pp-Avi抗体（scFv-CL-pp抗体にアビジンが融合した抗体）、scFv-CL-Avi抗体（軽鎖定常領域を介してアビジンがscFVに融合した抗体）、scFv-CL-pp-Avi又は抗体scFv-CL-Avi抗体がビオチン化された抗体（アビジン部分にビオチンが結合した抗体）等が開示される。本発明ではこれらのいずれかの型の抗体を好適に用いることができる。これらヒトＦｖ領域をもつ抗体は治療用抗体を提供する上で非常に有用である（治療用抗体の作製を有利に進めることができる）。
尚、特開２００５－１８５２８１号公報に開示された全ての内容は参照により援用される。

【００４１】

別々に調製された抗体同士を組み合わせたものを、本発明における「細胞表面抗原を認識する複数の抗体」として使用してもよい。この場合、各抗体の調製方法は同一であっても異なっていてもよい。

【００４２】

予め標識物質が結合又は融合された抗体（これらをまとめて「標識済サンプル抗体」ともいう）を使用することもできる。前者の例として、蛍光色素で標識化した抗体を挙げることができる。後者の例としてGFP（Green Fluorescent Protein）やRFP（Red Fluorescent Protein）等の蛍光タンパク質が融合された抗体（蛍光タンパク質融合抗体）を挙げることができる。このような蛍光タンパク質融合型抗体は遺伝子工学的手法を用いて容易に調製することができる。

【００４３】

ステップ（２）

次に、サンプル抗体の各々を同種類の細胞に接触させる。即ち、使用する細胞を定め、当該細胞とサンプル抗体との接触操作をサンプル抗体ごとに実施する。使用する細胞の表面抗原を認識するサンプル抗体であれば細胞表面に結合する。サンプル抗体の結合量はそれが認識する細胞表面抗原の発現量に依存する。

サンプル抗体との接触に供される細胞は特に限定されず、様々な動物細胞、植物細胞、微生物細胞等の中から任意に選択することができる。例えば、好ましい一態様として、特定の疾患に罹患した（又は特定の病態を呈する）患者由来の細胞を用いる。「特定の疾患」とは例えば例えば各種の癌などが挙げられる。細胞の由来する組織や臓器は特に限定されないが、例えば腎臓癌、肝細胞癌、胆肝癌、肺胞上皮癌、肺扁平上皮癌、肺腺癌、膵臓癌、大腸腺癌、卵巣癌等である。

【００４４】

均一性の高い細胞集団を形成する細胞を用いることが好ましい。後述のフローサイトメトリー解析の際により簡単ないし単純なデータが得られ、データの比較が容易になり、しかも信頼性の高い比較結果をもたらすからである。このような細胞の典型は株化細胞（細胞株）である。例えば肝細胞癌細胞株HepG2、未分化型肝細胞癌細胞株HLF、肝細胞癌細胞株OCTH、肝内胆管細胞癌細胞株RBE、膵癌細胞株PANC-1、膵臓癌細胞株MIA-Paca2、腎臓癌細胞株CCFRC1、腎臓癌細胞株Caki-1、腎臓癌細胞株ACHN、腎臓癌細胞株293T、卵巣癌細胞株KF28、卵巣癌細胞株SKOv3、卵巣癌細胞株KF-28、卵巣癌細胞株RMG-1、卵巣癌細胞株RMG-2、乳癌細胞株BT474、外陰部粘膜上皮細胞株A431、胃癌細胞株SNU-5、胃癌細胞株MKN45、胃癌細胞株NCI-N87、癌細胞株RERF-LC-AI、肺腺癌細胞株PC14、肺癌細胞株NCI-H441、肺扁平上皮癌EBC1、肺腺癌細胞株H1373、肺腺癌細胞株A549、肺腺癌細胞株Calu-3、肺腺癌細胞株PC14、大腸癌細胞株CaCo2、大腸癌細胞株CW2、ハムスター卵巣癌細胞株CHO等の株化癌細胞を好適な細胞として採用することができる。尚、培養操作によって均一性が高められた細胞も好ましい細胞の一つである。

【００４５】

各サンプル抗体と細胞との接触操作は適当な溶液中で行われる。その際、サンプル抗体の特性に影響を与えることなく、且つ細胞に損傷を与えない条件に設定することが好ましい。例えば、当該細胞の生存・増殖に適した培養液中、リン酸系やクエン酸系バッファー中、生理食塩水中、あるいはそれらに非特異的吸着を抑えるためのＢＳＡ等を加えた溶液

などにおいて、室温から低温（例えば０℃～２５℃、好ましくは４℃～１５℃）の温度条件下、２０分～３時間程度、細胞とサンプル抗体とを共存させる。この間、溶液を撹拌することにしてもよい。

尚、信頼性の高いデータが得られるよう、各サンプル抗体と細胞とを接触させる際の条件は原則として統一する。

【００４６】

以上の接触操作の後、必要に応じて（即ち、標識済サンプル抗体を利用した場合以外）、標識化を行う。ここでの「標識化」とは、細胞表面に結合したサンプル抗体を標識することをいう。例えば、サンプル抗体に対する特異的結合能を有する抗体に標識物質を結合させたもの（検出抗体）を、接触操作後の細胞と反応（接触）させることによって標識化を行うことができる。サンプル抗体に検出抗体を直接結合させるのではなく、両者の間に他の抗体等を介在させることにしてもよい。このように様々な標識化の手法を採用することができ、当業者であれば適切な手法を選択することが可能である。フローサイトメトリー解析では通常、蛍光色素が標識物質として使用される。例えば、Alexa488、AMCA、Cascade Blue（登録商標）、FITC、PerCP^{TM}、Cy^{TM}3、Texas Red（登録商標）、Cy^{TM}5、APC、TRITC等の蛍光色素を使用することができる。

【００４７】

ステップ（３）

続いて、ステップ（２）後の各細胞をフローサイトメトリーで解析し、抗体と細胞表面との反応性を示すデータを得る。即ち、サンプル抗体との接触操作を経た細胞をフローサイトメトリー解析に供し、サンプル抗体の結合性を調べる。好ましくは、ここでの「反応性」を示すデータとして、抗体結合量と細胞数との関係を表すヒストグラムが用いられる。即ち、抗体結合量をパラメータとした１パラメータ・ヒストグラムが用いられる。１パラメータ・ヒストグラムとは、フローサイトメトリーにおける表示法の1種であり、通常は、１つの指標（パラメータ）をX軸にとり、細胞数をY軸にとって表示したグラフをいう。フローサイトメトリー解析のための装置は例えばベックマン・コールター株式会社、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社などから販売されており、本発明ではこれらを利用することができる。基本的な操作法、解析条件などは装置に添付の取扱説明書に従えばよい。また、フローサイトメトリー解析に関する論文や成書も数多く存在し、例えば、Cao TM, et al. Cancer. 2001 Jun 15;91(12):2205-13.、Storek KJ, et al. Blood 97: 3380-3389、WEIR’S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY Vol.II <Blackwell Science>、Little MT and R. Storb Nture Reviews Cancer 2002 2: 231-238、等が参考になる。

【００４８】

フローサイトメトリー解析の典型的な操作手順を以下に示す。サンプル抗体と細胞とを反応させた後、蛍光色素で標識した検出抗体を反応させ、細胞を蛍光標識化しておく。細胞表面に存在する抗原量に応じて、結合するサンプル抗体量に差が生じる結果、細胞の蛍光標識量が異なることになる。従って、蛍光強度を測定することによって当該細胞の表面に存在する抗原とサンプル抗体との親和性及び抗原量を推定することができる。通常は、蛍光強度の検出に先行し、前方散乱光（Forward Scatter: FSC）及び側方散乱光（Side Scatter: SSC）を測定してゲートをかけ、目的の細胞集団の蛍光強度のみを測定する。具体的には例えば、前方散乱光及び側方散乱光をそれぞれX軸及びY軸にとり、ドットプロット展開から得られるデータにおいて生細胞と思われる細胞集団（株化細胞や培養細胞を使用した場合は均一性の極めて高い細胞集団となる）にゲートをかけ、ゲート内の蛍光強度を測定する。測定結果はヒストグラムなどの形式に表示する。尚、フローサイトメトリー解析で得られるヒストグラムに関連する各用語の意味を以下に記す。

【００４９】

「標本数」とはデータ数であり、通常ｎで表される。「合計」とはデータの合計であり、通常Ｔと表記される。「平均値（Mean）」とはデータの平均であり、合計を標本数で割ることで求められる。平均値は異常データの影響を受けやすい。「中央値（Median）」とはデータを昇順に並べたとき中央に位置する値である。データ数が偶数の場合は通常、中

央の二つの値の平均を中央値とする。中央値は平均値に比較して異常データの影響を受け難く、集団の特色をより正確に表す。「最頻値（Mode）」とはデータの中で頻度が最大となる値である。フローサイトメトリー解析の場合はピーク値と同義である。最頻値は平均値に比較して異常データの影響を受けにくい。「最大値」とはデータの最大の値であり、通常、Maxと表記される。「範囲（Range）」とは最大値と最小値の差でありレンジとも呼称される。通常Ｒと表記される。「分散」とはデータのばらつきの程度を示す値であり、これが大きい程ばらつきが大きいことになる。通常Ｖと表記される。偏差平方和を標本数（標本調査の場合は（標本数－１））で割った値が分散となる。「標準偏差」とは分散の平方根であり、通常、ｕと表記される。「変動係数」とは標準偏差を平均値で割った値であり、通常ＣＶと表記される。標準偏差ではデータのばらつきの程度がわからないため、標準偏差を平均値で割り正規化する。フローサイトメトリー解析では装置の分解能を示す数値として頻用される。「尖度」とは集団の分布を表す一つの指標であり、通常Ｈと表記される。尖度が0の場合は正規分布である。尖度が0より大きい場合は正規分布よりも頂部が尖った分布となり、0よりも小さい場合は正規分布よりも偏平な分布となる。「歪度」とは集団の分布の左右対称性を示す値であり、通常、Ｇと表記される。歪度が0の場合は左右対称の分布である。歪度が0より大きい場合は右方向に歪んだ分布となる。歪度が0より小さい場合は左方向に歪んだ分布となる。

【００５０】

ステップ（４）

次に、得られたデータを比較し、その類似性に基づいて各サンプル抗体を分類する。ここでの「類似性に基づいて」とは、分類基準としてデータの類似性が利用されることを意味する。データの類似性に基づき分類する際の基準（分類基準）の例を以下に示す。

（ａ）同一の又は類似性の高いデータを与える複数の抗体を、共通の抗原を認識するものとして一つの抗体グループとする。具体的には例えば、細胞の分布を示すヒストグラムの山の形を尖度、歪度等によって判定し、類似性の極めて高いヒストグラムを与える抗体群を一つのグループとする。

（ｂ）特有のデータを与える抗体はそれのみで一つの抗体グループとする。

（ｃ）抗原との反応性が低い抗体を排除する（いずれのグループにも属さないとする）。

本発明では、好ましくは、以上の分類基準（ａ）～（ｃ）から選択されるいずれか又は二つ以上によって各抗体を分類する。

【００５１】

データの類似性は、当該データを規定するパラメータに基づいて判定することができるが、具体的な判定方法はデータの種類に依存する。データが数値で表される場合を例に採れば、数値の近似の程度によってデータの類似性を判断することができる（例えば、データとして１、２、５が与えられた場合、１と２の間において類似性が高いと判断する）。

また、データとしてヒストグラムが与えられた場合、データの類似性をヒストグラムの形状に基づいて判定することができる。本発明者らの検討の結果、フローサイトメトリー解析におけるヒストグラムの形状が抗原の種類に高度に依存することが判明した。換言すれば、認識する抗原が同一であれば、抗体の種類に拘わらず同一の又は類似性の高い形状のヒストグラムが取得されることが明らかとなった。この事実に鑑み本発明の一態様ではフローサイトメトリー解析の結果を示すヒストグラムの形状を比較してデータの類似性を判定する。具体的には目視による形状の比較、又はヒストグラムを規定する一又は二以上のパラメータの値の比較によってデータの類似性を判定することができる。ここでのパラメータとして、ヒストグラムの中央値、最頻値、最大値、範囲、標準偏差、尖度、及び歪度からなる群より選択される一以上の値を用いることができる。好ましくは二つ以上、更に好ましくは三つ以上、より一層好ましくは四つ以上の値に基づいて判定を行う。判定の際に使用するパラメータ数を増やすことによって判定精度を高めることができる。これらのパラメータの中でもヒストグラムの形状に深く関与するパラメータである中央値、最頻値、又は尖度を採用することが高精度の判定を行うために有利であると言える。好ましくはこれらのパラメータの中から二つ以上を組み合わせて用いる。具体的には例えば、中央

値、最頻値、及び尖度に基づきヒストグラムの類似性を判定するとよい。
比較対象の二つのデータが、採用したパラメータについて近似した値を与えるとき、当該二つのデータ間の類似性は高いと判定することができる。二つの値の差（二つの値をＡ、Ｂ（Ａ≧Ｂ）としたときの１００×（Ａ－Ｂ）／Ａ（％））が１０％以内、好ましくは５％以内、更に好ましくは３％以内のときに、当該二つの値は近似していると判断する。
【００５２】
本発明の一態様では、サンプル抗体を分類する際又は分類後、細胞表面抗原に対する反応性が低いと考えられるサンプル抗体を排除する。これによって、有用性の高いサンプル抗体のみからなる抗体グループを形成することができる。抗体の反応性の程度は、フローサイトメトリー解析の結果を利用して判定することができる。具体的には、判定対象のサンプル抗体について得られたヒストグラムの最頻値（ピーク値）と、当該サンプル抗体が属する抗体グループ内において反応性が最大のサンプル抗体について得られたヒストグラムの最頻値（即ち、当該グループ内での最大の最頻値）とを比較する。その結果、前者が後者の１／２以下、好ましくは１／５以下、更に好ましくは１／１０の場合、判定対象のサンプル抗体の反応性は低いと判定する。
【００５３】
本発明の一態様では、二種類以上の細胞に対して各サンプル抗体の反応性が調べられ、その結果を用いて各サンプル抗体を分類する。即ち、二種類以上の細胞を用意し、各細胞を用いてステップ（２）～（４）を行なう。
ところで細胞表面抗原の発現量、分布などは細胞の種類に依存する。従って、ある細胞を用いて得られたデータの類似性が高い二つの抗体、即ち抗原が共通する二つの抗体は、他の細胞を用いた場合にも類似性の高いデータを与えるはずである。このことから、比較される二つの抗体が、二種類以上の細胞について類似性の高いデータを与えた場合、それらの抗原が共通する確率は極めて高いといえる。また、このような結果が得られた場合には当該二つの抗体の抗原が共通するものと容易に判定できる。このように、二種類以上の細胞を用いることによって、抗原の同一性の判断をより正確かつ容易に行うことができる。
本発明の好ましい一態様では、少なくとも二種類の細胞に関して同一又は類似性の高いデータを与えたサンプル抗体同士を一つの抗体グループとして分類する。
また、二種類以上の細胞を用いた場合の分類結果をみれば、発現する抗原の種類や量などを当該細胞間で比較できる。従って、これらの細胞の性状を研究する上でより有益な情報を与えることになる。
【００５４】
本発明の一態様では分類結果をパネルとして表示する。本明細書において「パネル」とは、複数種類の要素（例えば抗原、抗体、抗体グループ、細胞、疾患名、病態名）が互いに関連付けられた状態でディスプレイや紙などの媒体上に表又は図形式で表示されたものをいう。各要素はその通常の名称、略称、通称、又はそれを表す記号や符号などで表される。本発明のパネルでは二種類以上の要素について相互の関連性が示される。
本発明において「関連付ける」とは、二つ以上の要素を結びつけることをいう。従って、抗原と抗体グループとの関連性を示す表形式のパネルでは、例えば、両者を近接して表示したり、両者を同一のセル内に表示したり、或いは両者の間を線などで結んだりすることによって、両者が組を形成していることを理解できるようにする。
【００５５】
ここでのパネルでは、典型的には、フローサイトメトリー解析に供した細胞が発現する抗原毎（又は関連性の高い抗原毎）に抗体グループが関連付けられて表示される。従って、このパネルをみれば、当該細胞の表面抗原の研究などに有用な抗体へのアクセスが可能となる。このように本発明のパネルはそれ自体で大きな価値をもつ。二種類以上の細胞を用いて作成されたパネルの場合、細胞間で共通して発現している抗原の有無、発現量などの把握をも可能となり、一層高い価値を有する。
本発明のパネルにおいて、抗原に対する反応性に従い抗体を規則的に配列させるとよい

。これによって、反応性に関する抗体間の差異が一目瞭然となる。

【００５６】

本発明の分類法によれば、同一の抗原（又は関連性の高い抗原）を認識する複数の抗体が相互に関連付けられることになる。換言すれば、抗原毎（又は関連性の高い複数の抗原毎）にそれを認識する抗体の集合（抗体グループ）が得られる。これら抗体グループは細胞表面抗原の研究に有用であり、特に細胞の分類手段としての利用価値が高い。また、本発明の分類法によれば抗原毎（又は関連性の高い複数の抗原毎）に多数の抗体を迅速に分類できる。即ち、本発明の分類法は多数の抗体を分類するために適したものであり、抗体の網羅的分類を可能とする。抗原について使用する表現「関連性の高い」又は「高い関連性を有する」とは、同一の分子ではないものの、協同して一つの機能を発揮する場合（例えば、結合して機能的に一つの複合体を構成する場合）など、二つ以上の抗原が生体において密接な関連性を有することをいう。

本発明の分類法によれば、典型的には、抗原毎（又は関連性の高い複数の抗原毎）に複数の抗体が関連付けられることになる。従って、ある抗原の研究をする際、複数の抗体を利用することや、場合に応じて適した抗体を選択的に使用することなどが可能となる。このことは、良好な結果や意義深い知見をもたらすことに繋がり、研究を有利に進めることができることを意味する。

一方、本発明の分類法を実行することにより、特定の細胞（即ちサンプル抗体との接触に供した細胞）の細胞表面抗原（抗原は未知であるものの）の発現量や分布状況を把握できる。このように本発明の分類法は、特定の細胞の性状に関する有益な情報を与え、当該細胞（特にその表面抗原）の研究に有用なものでもある。

尚、サンプル抗体の全てついて抗原が未知の場合、各抗体グループが関連付けられた抗原はいずれも未同定のものとなる。一方、サンプル抗体の一部として、同定済の抗原に対する抗体を混ぜておけば、当該抗体が属する抗体グループが関連付けられた抗原は同定済のものとなる。このように、同定済の抗原に対して抗体グループを関連付けることも可能である。

【００５７】

以上の分類法によれば、抗原と特定の細胞の表面との反応性に基づき抗体が分類され、抗体グループが形成される。従って、同一の抗体グループに属する抗体であれば、分類の際に使用した細胞の表面に対する反応性は同一（又は高度に類似）である。しかしながら、同一の抗体グループに属する抗体の全てが同一の抗原を認識するとの保証はない。認識する抗原が同じであっても、当該抗原を細胞表面に発現する細胞に対する反応性が異なる場合があり、またその逆の場合（認識する抗原が異なる場合であっても、当該抗原を細胞表面に発現する細胞に対する反応性が同じ場合、例えば複合体のそれぞれ一方を認識する場合）もあり得るからである。

そこで、認識する抗原毎に抗体グループが形成されるようにするため、本発明の一態様ではステップ（４）の後、以下のステップ（ｉ）～（ｖｉ）を行う。

（ｉ）分類した抗体にそれぞれ、第１パラメータ、第２パラメータ、・・、及び第ｎパラメータからなるｎ個のパラメータ（但し、ｎは２以上の整数であり、各パラメータは２個以上のパラメータ値を有し、各パラメータについて同一のパラメータ値が二以上の抗体に付与される）の組合せを関連付けるステップ、

（ｉｉ）同一のパラメータ値を有する抗体を混合した抗体混合物をパラメータ毎に調製するステップ、

（ｉｉｉ）前記抗体混合物の各々について標的抗原との反応性をELISAで調べ、反応性を示す抗体混合物を特定するステップ、

（ｉｖ）特定した抗体混合物が含有する抗体群に共通する、パラメータ名とパラメータ値の組合せを特定するステップ、

（ｖ）ステップ（ｉ）に供した抗体の中から、全パラメータに関して、前記ステップ（ｉｖ）で特定した組合せが該当する抗体を選抜するステップ、

（ｖｉ）選抜した抗体を一つの抗体グループとして分類するステップ。

【００５８】
この態様の分類法によれば、認識する抗原毎に抗体グループを形成することが可能となる。即ち、同じ抗原を認識する様々な個性を有する抗体群が得られる。また、各抗体に複数のパラメータの組合せを関連付けた上で所定の規則に従い抗体混合物の調製を行い、そして抗体混合物を用いたELISA（Enzyme-Linked imunosorbent assay）の結果を基に標的抗原を認識する抗体を決定するという独自の手法によって、迅速且つ効率的に抗体を分類することができる。さらには、抗体が分類されるのと同時に少なくとも一部の抗体については抗原が同定されることになる。つまり、この態様の分類法は、抗原が同定された抗体を迅速且つ効率的に得る方法であるとみることもでき、抗原が同定された抗体数の飛躍的な増大を促す。一方、分類結果は、フローサイトメトリー解析に使用した細胞表面における抗原の存在様式や発現様式を示すことになり、抗体の用途（癌治療等）の研究・開発にとって極めて有用な情報を与える。また、分類結果によって、ある抗原の存在が明らかになった場合、当該抗原と複合体を形成するなどして存在する蓋然性が高いと考えられる未知抗原（複合体カウンターパートなど）の吊り出しも可能となる。即ち、この態様の分類法は新規抗原又は新規分子複合体の決定に対しても非常に有効に機能する。
以下、各ステップの詳細を説明するが、説明の便宜上、この態様の分類法のことを「ｎ次元ELISA法」とも呼ぶ。

【００５９】
ステップ（ｉ）
このステップでは、先行するステップ（ステップ（１）～（４））によって分類した抗体にそれぞれ、第１パラメータ、第２パラメータ、・・、及び第ｎパラメータからなるｎ個のパラメータの組合せを関連付ける。これによって各抗体はｎ次元の番地（第１パラメータのパラメータ値、第２パラメータのパラメータ値、・・、及び第ｎパラメータのパラメータ値）をもつことになる。
通常、先行するステップによって分類された抗体の全部に対して関連付けを行うが、これに限るものではない。即ち、先行するステップによって分類された抗体の一部のみに関連付けを行うことにしてもよい。この場合、一部の抗体は分類対象から除かれることになる。

【００６０】
ここでのｎは２以上の整数である。つまり、各抗体には２個以上のパラメータの組合せが関連付けられる。ｎの数に上限は特にないが、ｎの数が大きすぎれば後続のステップ（例えば抗体混合物の調製、反応性を示す抗体混合物の特定など）の操作が過度に複雑化することから、ｎの数は好ましくは３～５である。

【００６１】
一方、各パラメータは２個以上のパラメータ値を有することとし、各パラメータについて同一のパラメータ値が２種類以上の抗体に付与されるようにする。具体例を示すと、第１パラメータがとり得るパラメータ値を１、２、３及び４とし、各パラメータ値をそれぞれ５種類の抗体に付与する。パラメータ値の数はパラメータ毎に設定されるものである。またパラメータの数と同様、パラメータ値の数の上限は特にない。後述のステップ（ｉｖ）及び（ｖ）における解析の効率化及び精度向上のために、各抗体混合物に含まれることになる抗体の種類は過度に多くないことが好ましい。従って、各抗体混合物に含まれる抗体の種類が好ましくは２００以下、更に好ましくは１００以下となるように各パラメータ値の数を設定するとよい。具体的には例えばパラメータ値の数を２～１００の間に設定することができる。尚、各抗体混合物に含まれる抗体の種類はパラメータの設定に依存するものであり、抗体混合物間で一致しなくてもよい。

【００６２】
ステップ（ｉｉ）
このステップでは、同一のパラメータ値を有する抗体を混合した抗体混合物を調製する。抗体混合物はパラメータ毎に調製する。例えば、第１パラメータが１、２、３及び４のパラメータ値をとる場合、第１パラメータとして１の値が付与された抗体を混合した抗体

混合物、第１パラメータとして２の値が付与された抗体を混合した抗体混合物、第１パラメータとして３の値が付与された抗体を混合した抗体混合物、第１パラメータとして４の値が付与された抗体を混合した抗体混合物を調製する。同様の手順で残りのパラメータに関しても抗体混合物を調製する。このようにして、第１パラメータが取りうるパラメータ値の数、第２パラメータが取りうるパラメータ値の数、・・・、及び第ｎパラメータが取りうるパラメータ値の数の総計と同数の抗体混合物が調製されることになる。

通常、同一のパラメータ値を有する全抗体を混合した抗体混合物が調製される。但し、これに限るものではなく、同一のパラメータ値を有する全抗体の中から一部を選抜し、それらを混合することで抗体混合物を調製することにしてもよい。このように、この段階で抗体の選別を行ってもよい。

【００６３】

全ての抗体が等量ずつ抗体混合物に含有され、且つ抗体毎の存在量（即ち、抗体の種類ごとの濃度）が抗体混合物間で等しくなるように抗体混合物を調製することが好ましい。このように抗体量を揃えることによって、後続のELISAでの反応性に基づく抗体混合物の特定が容易になる。

【００６４】

ステップ（ｉｉｉ）

このステップでは、抗体混合物の各々について標的抗原との反応性をELISAで調べ、反応性を示す抗体混合物を特定する。抗体混合物を調製する際に使用した抗体の中に、標的抗原を認識する抗体が一つでも含まれていた場合、複数の抗体混合物が反応性を示すことになる。一方、標的抗原を認識する抗体が皆無の場合、いずれの抗体混合物も反応性を示さない。この場合には以降の操作を行うことなく終了する。

ここでの標的抗原としては、HER1、HER2、CD46、ITGA3、ICAM1、ALCAM、CD147、IgSF4、BCAM、C1qR、CD44、CD73、LAR、EpCAM、HGFR等を用いることができる。標的抗原は任意に選択可能である。後述の同定法（ステップ（５）及び（６））によって決定した抗原をここでの標的抗原として用いてもよい。

【００６５】

ステップ（ｉｖ）

このステップでは、特定した抗体混合物が含有する抗体群に共通する、パラメータ名とパラメータ値の組合せを特定する。本発明では、ここで特定された組合せを、「陽性の組合せ」とする。具体的には、陽性の組合せを（第１パラメータ、パラメータ値ａ１）、（第２パラメータ、パラメータ値ａ２）、・・（第ｎパラメータ、パラメータ値ａｎ）のように特定する。ステップ（ｉｉｉ）において反応性の程度が異なる複数の抗体混合物が認められた場合は、反応性の程度毎に同様の特定を行うとよい。例えば中程度の陽性の組合せとして、（第１パラメータ、パラメータ値ａ１）、（第２パラメータ、パラメータ値ａ２）、・・・（第ｎパラメータ、パラメータ値ａｎ）のように特定し、高い陽性の組合せとして（第１パラメータ、パラメータ値ｂ１）、（第２パラメータ、パラメータ値ｂ２）、・・・（第ｎパラメータ、パラメータ値ｂｎ）のように特定すればよい。

【００６６】

ステップ（ｖ）

このステップでは、ステップ（ｉ）に供した抗体の中から、全パラメータに関して、ステップ（ｉｖ）で特定した組合せが該当する抗体を選抜する。即ち、全パラメータが陽性の組合せである抗体を選抜する。例えば、陽性の組合せとして（第１パラメータ、パラメータ値ａ１）、（第２パラメータ、パラメータ値ａ２）、・・・（第ｎパラメータ、パラメータ値ａｎ）が特定された場合、（パラメータ値ａ１、パラメータ値ａ２、・・・・、パラメータ値ａｎ）をもつ抗体が選抜されることになる。

【００６７】

ステップ（ｖｉ）

このステップでは、選抜した抗体を一つの抗体グループとして分類する。これによって標的抗原に反応性を示す抗体群がグループ化されることになる。換言すれば、抗原が決定

された抗体群が得られることになる。尚、ステップ（ｖ）によって一つの抗体のみが選抜された場合は当該抗体のみで一つの抗体グループとする。

【００６８】

二種類以上の標的抗原を用意し、各標的抗原を用いて以上のステップ（ｉｉｉ）～（ｖｉ）を行うことにすれば、認識する抗原が異なる二つ以上の抗体群を得ることが可能となる。

【００６９】

本発明の一態様では、各回の試行でパラメータの組合せが異なる条件下、ステップ（ｉ）～（ｖ）を複数回試行する。例えば、第１回目の試行では数字からなる４個のパラメータの組合せ（例えば、抗体１（００１、００１、００１、００１）、抗体２（００２、００２、００２、００２）、・・・）を各抗体に関連付けて解析し、第２回目の試行ではアルファベットからなる３個のパラメータの組合せ（例えば、抗体１（ａａａ、ａａａ、ａａａ）、抗体２（βββ、βββ、βββ、βββ）、・・・）を各抗体に関連付けて解析する。尚、各回の試行において形成される抗体グループが完全に同一とならないようにする。ここでの「抗体グループが完全に同一」とは、グループ数が一致し、且つ各グループに含まれる抗体の種類が全グループに亘って一致することを意味する。

複数回の試行後、各回の結果が相矛盾することなく、標的抗原と結合陽性反応を示した抗体を選抜する。そして、選抜された抗体（複数の抗体）を用いてステップ（ｖｉ）を行う。

このように複数回の試行を行い、相矛盾しない結果を与える（即ち、辻褄の合う）抗体のみを選抜することによって、標的抗原反応性の抗体（目的の抗体）を効率的に得ることができる。

ステップ（ｉ）～（ｖ）の試行回数は特に制限されるものではなく、扱う抗体数、１回の試行において予想される「陽性の組合せ」の数などを考慮して任意に設定される。例えば試行回数を２～５回とすることができる。

【００７０】

本発明の更なる一態様では、ステップ（ｖ）とステップ（ｖｉ）の間に以下のステップを実施する。

（ｖ－１）ステップ（ｖ）で選抜した各抗体に対して、前記ステップ（ｉ）と同じ要領でｎ個のパラメータの組合せを新たに関連付けるステップ、

（ｖ－２）同一のパラメータ値を有する抗体を混合した抗体混合物をパラメータ毎に調製するステップ、

（ｖ－３）前記抗体混合物の各々について標的抗原との反応性をELISAで調べ、反応性を示す抗体混合物を特定するステップ、

（ｖ－４）特定した抗体混合物が含有する抗体群に共通する、パラメータ名とパラメータ値の組合せを特定するステップ、

（ｖ－５）ステップ（ｖ－１）に供した抗体の中から、全パラメータに関して、前記ステップ（ｖ－４）で特定した組合せが該当する抗体を選抜するステップ。

尚、必要に応じてステップ（ｖ－１）～（ｖ－４）を２回以上繰り返す。

【００７１】

この態様では、１回の試行によって選抜された抗体に対して、新たにパラメータの組合せを関連付けた後、再び抗体の選抜を行う。このように繰り返し試行を行い、目的の抗体を絞り込む。これによって分類精度が向上する。

【００７２】

ここで、図５８及び５９を参照しながら、ｎ次元ELISA法の原理をより具体的に説明する。図５８及び５９はｎ＝３の場合（三次元ELISA法）の概念図である。この例では汎用的な96ウェルマイクロウェルプレートを使用する。まず、抗体クローン数に合わせて必要な数のプレートを用意する。この例では抗体クローン数を4,800とし、プレートを50枚（合計4,800ウェル）用意する。

次に、抗体クローンを順番にウェルに入れ、抗体クローンをプレート内で整列させる。

これによって各抗体クローンには、プレート番号（第１パラメータ）、プレートの行名（第２パラメータ）、及びプレートの列番号（第３パラメータ）からなる番地が関連付けられる。例えば第1プレートの第A行、第１列のウェルの抗体クローンの番地は（1，A，1）となる。

続いて、プレート番号が同一の抗体クローンの混合物（プレート混合抗体と呼ぶ）、プレートの行名が同一のクローンの抗体クローンの混合物（行混合抗体と呼ぶ）、及びプレートの列番号が同一の抗体クローンの混合物（列混合抗体と呼ぶ）をそれぞれ調製する（図５８）。各混合抗体の数は順に50（第1プレート混合抗体～第50プレート混合抗体）、8（第A行混合抗体～第H行混合抗体）、及び12（第1列混合抗体～第12列混合抗体）となる。

以上のようにして調製した混合抗体を、新たに用意した96ウェルマイクロウェルプレートのウェルに順番に入れ、混合抗体をプレート内で整列させる。この例では、プレート内の第1列～第7列をプレート混合抗体に、第8列を行混合抗体に、第9列～第10列を列混合抗体にそれぞれ割り当てる（図５９上段）。このようにして得られたプレートを使用してELISA法を実施する。そして、反応性を示したウェルを調べることによって、目的の抗体クローン（標的抗原に反応性を示す抗体クローン）の番地を特定する。この例では、第3プレートのプレート混合抗体が入れられたウェル、第E行の行混合抗体が入れられたウェル、第3列の列混合抗体が入れられたウェルが反応性を示し、目的の抗体の番地として（3，E，3）が特定されることになる（図５９下段）。最後に、特定した番地が関連付けられた抗体クローンを目的の抗体として得る。

【００７３】

本発明の第２の局面は、本発明の分類法で分類された各抗体の抗原を同定する方法を提供する。本発明の同定法では、上記本発明の分類法の各ステップ（１）～（４）に続いて以下のステップを行う。

（５）ステップ（４）で形成された各抗体グループより一又は数個の抗体を選抜し、それらの抗原を同定するステップ、及び

（６）同一の抗体グループに属する各抗体の抗原は同一又は相互に高い関連性を有すると推定し、ステップ（５）で同定された抗原を抗体グループに関連づけるステップ。

【００７４】

ステップ（５）

このステップでは、同定作業を進めることになる抗体を選抜する。選抜基準は特に限定されるものではないが、フローサイトメトリー解析の結果より、抗原に対して高反応性であると判断される抗体を選抜するとよい。当該抗体を用いれば抗原抗体反応を利用した同定作業を有利に進めることができるからである。

選抜する抗体の数は典型的には一つであるが、これに限られるものではない。必要に応じて数個（例えば二個又は三個）の抗体を選抜する。一つの抗体グループから複数の抗体を選抜することにすれば、各抗体の同定結果を相互に比較することによって同定結果の信頼性を高めることができる。その一方で、必要以上に多くの抗体を選抜してその同定作業を進めることは過度の作業負担をもたらし、本発明が意図する本来の効果を減殺する。そこで、選抜する抗体の数は少数であることが好ましい。具体的には、５個以下であることが好ましく、３個以下であることが更に好ましく、２個以下であることが最も好ましい。本発明の本来の効果を最大とするためには、各抗体グループから選抜する抗体の数を一つとする。

【００７５】

選抜した抗体（以下、「選抜抗体」）についての抗原の同定は、質量分析、免疫沈降試験、ウエスタンブロット、アフィニティークロマトグラフィー、RNAi、プロテオミクスの手法（電気泳動、質量分析、ゲノムデータベース検索、バイオインフォマティックスによる分析）、及び対応遺伝子の発現解析等の方法を利用して行うことができる。この中でも質量分析を基盤技術とするプロテオミクスの手法による方法は未知抗原の同定に適したものであり、本発明の方法において採用する同定法として好ましい。尚、これらの方法は互

いに排他的なものではなく、必要に応じて二つ以上を組み合わせて用いることができる。
【００７６】
質量分析とは、タンパク質やペプチド等の試料から生成させたイオンを質量/電荷(m/z)に従い分離した後、その強度を測定することにより、試料の質量を決定する方法である。ESI法（Electro Spray Ionization：エレクトロスプレーイオン化法）やMALDI法（Matrix Assisted Laser Deporption Ionization：マトリックス支援レーザー脱離イオン化法）などソフトイオン化法が開発されたことによって、タンパク質やペプチド等の生体試料の解析に質量分析が汎用されるようになった。
【００７７】
質量分析装置は一般にイオン源、質量分析計、及び検出器の組み合わせで構成され、試料の種類や分析目的に応じて種々の質量分析装置が市販されている。タンパク質やペプチドの同定には、ESI Q-TOF MS等のタンデム質量分析によるMS/MS（Mass spectrometry / mass spectrometry）、MALDI-TOF MS等が利用される。液体クロマトグラフィーと質量分析器を組み合わせた測定法（LC-MAS（液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化質量分析装置）やLC-MS/MS等）なども利用できる。
【００７８】
タンデム質量分析装置では二つの質量分析計が直列に連結されており、イオン源で生成したイオンを第一の質量分析計（MS1）で分離し、単一のイオンピークのみを選択的に通過させた後、それに不活性ガス粒子などを衝突させてプロダクトイオンに分解し、このプロダクトイオンを第二の質量分析計（MS2）で分析する。第一の質量分析計（MS1）と第二の質量分析計（MS2）の組み合わせにより、Q-TOF、TOF-TOF、Q-Q、Q-IT（Iontrap：イオントラップ）などのタンデム質量分析装置が存在する。Q-TOF（四重極質量分析計（Quadrupole mass spectrometer：Q-MS）とTOF質量分析計（Time-of-flight mass spectrometer：TOF-MS）が直列に連結されているタンデム質量分析装置）のように異なる2種類の質量分析計から構成されたハイブリッド型のタンデム質量分析装置はMS/MS測定能に優れており、タンパク質やペプチドのアミノ酸配列の同定に適する。
質量分析装置による結果からアミノ酸配列を同定するには実験結果を用いてゲノムデータ検索を行うPMF法（ペプチドマスフィンガープリンティング法）やMS/MSイオンサーチ法等が利用される。また、ゲノムデータ検索を伴わずにMS/MSスペクトルから数学的演算によりアミノ酸配列を決定していくde novo sequencing法を利用してもよい。
【００７９】
一方、免疫沈降試験やウエスタンブロット法、アフィニティークロマトグラフィー、RNAiなどは、選抜抗体が既知抗原を認識していると予想される場合に有効な方法である。これらの方法では選抜抗体と既知抗原との反応性が調べられる。即ち、免疫沈降試験においては選抜抗体と特定の既知抗原が免疫沈降物を形成するか否かが調べられ、免疫沈降物を形成する場合には当該既知抗原が選抜抗体の抗原であると判断される。一方、ウエスタンブロット法ではＰＶＤＦ膜等に転写した抗原タンパク質を選抜抗体が認識するか否かが調べられる。また、アフィニティークロマトグラフィーでは特定の既知抗原を担持させたカラムへの選択抗体の吸着性が調べられ、吸着性の有無又はその程度による判断が行われる。ここでの既知抗原としては一般に市販されているもの、或いは遺伝子から独自に発現させ精製したものが利用できる。また、免疫沈降試験やウエスタンブロット法、アフィニティークロマトグラフィー等の操作法は常法に従えばよい。RNAiでの検証は強制発現させた細胞或いは抗体反応対象細胞に既知抗原のRNAiを作用させ、当該対象抗体の染色性がFCM、細胞免疫染色などの度合いが下がった場合、対象抗原を認識していたと判断できる。
【００８０】
ステップ（６）
本発明の同定法では、ステップ（５）に続いて、同一の抗体グループに属する各抗体の抗原は同一又は相互に高い関連性を有すると推定する。この推定に従い、ステップ（５）で同定された抗原を抗体グループに関連づける。これによって、同一の抗体グループに属する全ての抗体が一つの抗原に対して関連付けられることになる。

【００８１】
本発明の一態様では、上記の推定（抗原の関連性に関する推定）を検証する。即ち、この態様では、ステップ（５）で同定された抗原と、ステップ（６）で該抗原が関連付けられた抗体グループに属する抗体との反応性を調べ、上記推定が正しいことを確認する。具体的にはまず、検証が必要な抗体グループの中から抗体を選抜する。好ましくは全ての抗体を選抜し、その反応性を検証する。次に、同定された抗原（以下、「同定抗原」）に対する各抗体の反応性を免疫沈降試験やＥＬＩＳＡ（細胞ＥＬＩＳＡを含む）、RNAiにより調べる。例えば免疫沈降試験では、同定抗原を発現する細胞の溶解液又は抽出液などに抗体を反応させた後、免疫沈降物として回収されたタンパク質を電気泳動などで検出することによって、同定抗原に対する各抗体の反応性を確認することができる。一方、ＥＬＩＳＡでは例えば、同定抗原が固定化されたウェルの調製、抗体の添加、標識抗体の添加、標識量の測定といった一連の操作によって、同定抗原に対する各抗体の反応性を確認することができる。また、同定抗原を強制発現させた細胞に対する結合性を調べること（細胞ＥＬＩＳＡ）によっても、同定抗原に対する各抗原の反応性を確認することができる。RNAiでの検証は同定抗原を強制発現させた細胞或いは抗体反応する対象細胞に既知抗原のRNAiを作用させ、当該対象抗体の染色性がFCM、細胞免疫染色などの度合いが下がった場合、対象抗原を認識していたと判断できる。
さらに、疾患関連分子（疾患原因遺伝子産物、等）が精製蛋白質又はリコンビナント蛋白質等、何らかの形態として得られれば、それと抗体との分子間相互作用をin vitro（蛍光分光法、ゲル濾過、超遠心を用いる古典的な方法、表面プラズモン共鳴現象を用いる方法、水晶発振子マイクロバランスを用いる方法等）又はin vivo（一分子追跡法、蛍光共鳴エネルギー転移（fluorescence resonance energy transfer:FRET）観測法等）で調べることができる。
以上の確認試験によって、同定抗原と各抗体との間に特異的反応性が認められた場合、上記の推定に間違いがないと判断する。
【００８２】
本発明の一態様では同定結果をパネルとして表示する。具体的には以下の（ａ）～（ｃ）のいずれかのパネルを作成する。
（ａ）ステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は相互に類似性の高いデータを与えた複数の抗体が一つの抗体グループとして表示され、各抗体グループとその抗原が関連付けられたパネル。
（ｂ）ステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は相互に類似性の高いデータを与えた複数の抗体が一つの抗体グループとして表示され、各抗体グループとそれに認識される細胞表面抗原を発現する細胞とが関連付けられたパネル。
（ｃ）ステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は類似性の高いヒストグラムを与えた複数の抗体が一つの抗体グループとして表示され、各抗体グループと、その抗原と、及び該各抗体グループに認識される細胞表面抗原を発現する細胞とが相互に関連付けられたパネル。
以上の各パネルは、同定された抗原に関する研究、パネルに表示された特定の細胞の研究や分類などに有用である。
【００８３】
パネル（ａ）では抗原毎に抗体グループが関連付けられて表示される。従って、ある抗原に対する抗体を検索したい場合に有用である。パネル（ａ）は、本発明のステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は相互に類似性の高いデータを与えた複数の抗体を一つの抗体グループとし、本発明のステップ（５）及び（６）による同定結果を用いて各抗体グループとその抗原とを関連付け、図又は表形式で表示することによって作成することができる。
【００８４】
パネル（ｂ）では抗体グループと細胞との関連性が示される。従って、特定の細胞表面抗原に対する抗体を検索したい場合に有用である。また、抗体グループと複数の細胞との

関連性を表示するパネルとすれば、細胞表面抗原の分布に関する有益な情報を与える。パネル（ｂ）は、本発明のステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は相互に類似性の高いデータを与えた複数の抗体を一つの抗体グループとし、本発明のステップ（５）及び（６）による同定結果を用いて各抗体グループとそれに認識される細胞表面抗原を発現する細胞とを関連付け、図又は表形式で表示することによって作成することができる。

【００８５】

パネル（ｃ）はパネル（ａ）とパネル（ｂ）とを組み合わせたものである。このパネルによれば、特定の細胞が発現する細胞表面抗原の種類や分布状況が把握できると同時に、注目する抗原に対する抗体を容易且つ迅速に検索できる。パネル（ｃ）は、本発明のステップ（３）のフローサイトメトリー解析で同一又は類似性の高いヒストグラムを与えた複数の抗体を一つの群とし、本発明のステップ（５）及び（６）による同定結果を用いて各抗体グループと、その抗原と、及び該各抗体グループに認識される細胞表面抗原を発現する細胞とを相互に関連付け、図又は表形式で表示することによって作成することができる。

【００８６】

本発明の同定法では抗体グループ内の一部の抗体についてのみ抗原の同定を行い、その他の抗体については推定により抗原を決定する。従って、抗体毎に同定作業を行う場合に比較して、必要な労力及び時間を大幅に低減できる。即ち、本発明の同定法によれば各抗体の抗原を迅速且つ容易に決定することができる。尚、後述の実施例に示すように、本発明者らが検討した限りにおいて推定の誤りは確認されず、本法の信頼性の高さが確認されている。

一方、本発明の同定法によれば、特定の細胞が発現する表面抗原の種類を把握できる。また、その発現量に関する情報も得られる。二種類以上の細胞を用いて抗体の分類を行った場合においては、細胞表面抗原の分布状況についての情報も得られる。このように本発明の同定法は、細胞表面抗原に関する有益な情報をもたらすものである。

本発明の同定法によれば結果として、同定された抗原毎（又は関連性の高い複数の抗原毎）にそれを認識する抗体の集合（抗体グループ）が得られる。これら抗体グループは細胞表面抗原の研究、疾患の分類・診断などに有用であり、治療分野への応用も期待される。

【００８７】

本発明は更に、本発明の分類法又は同定法で得られる情報の用途を提供する。当該用途の一つとして本発明の第３の局面は、特定の疾患との間に関連性を有する抗体又は抗体セットの取得法に関する。本発明の抗体の取得法（第３の局面の第１態様）は以下のステップを含む。

（１）本発明の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、

（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び

（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループの抗体を有用な抗体として選択するステップ。

【００８８】

一方、本発明の抗体セットの取得法（第３の局面の第２態様）では、ステップ（３）に代えて次のステップ（３’）を行う。

（３’）二つ以上の抗体が特異的反応性を示した疾患を選抜した後、該疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループからそれぞれ抗体を選抜し、選抜した抗体体同士を組み合わせるステップ。

【００８９】

以下、各ステップの詳細について図１を参照しながら説明する。説明の便宜上、図１では、本発明の分類法によって抗体グループ１～５が得られており、各抗体グループには３

個ずつの抗体が属するとする。また、この例では各抗体グループの抗原が既に同定されたものとしている。

まず、ステップ（１）では、注目すべき抗体グループ（抗体グループ１、３、５）を選抜する（図１、（１））。この例のように二以上の抗体グループを選抜することにしてもよい。

次に、ステップ（２）では、選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を調べる。具体的には、特定の疾患に罹患した患者由来の検体（細胞又は組織）を用意し、これに対して各抗体が反応するか否かを調べる（図１、（２））。選抜した各抗体グループの中から二以上の抗体を選抜し、それらについて反応性を調べることにしてもよい。ここでの「特定の疾患」は特に限定されないが、各種の癌、例えば腎臓癌、肝細胞癌、胆肝癌、肺胞上皮癌、肺扁平上皮癌、肺腺癌、膵臓癌、大腸腺癌、又は卵巣癌などである。図１の例では同時に二種類以上の疾患との反応性を調べることにしているがこれに限られるものではなく、一種類の疾患との反応性を調べることにしてもよい。また、ある疾患の中でも特定の病態との反応性を調べることにしてもよい。

【００９０】

患者由来の検体との反応性は、免疫組織化学的染色法、免疫沈降法、フローサイトメトリー解析、細胞ELISAなどを利用して検出・評価することができる。これらの方法は互いに排他的なものではなく、必要に応じて二つ以上を組み合わせて用いることができる。この中でも免疫組織化学的染色法を採用することが好ましい。免疫組織化学的染色法によれば迅速で感度のよい検出が可能である。また、操作も比較的簡便である。

免疫組織化学的染色法では、患者より採取した組織と抗体とを接触させた後、特異的に結合した抗体を検出する。具体的には、以下に示す免疫組織化学的染色法に従って本発明の方法を実施することができる。

【００９１】

生体組織の免疫組織化学的染色は一般に以下の手順（ａ）～（ｊ）で実施される。尚、生体組織の免疫組織化学的染色法については様々な文献及び成書を参照することができる（例えば、「酵素抗体法、改訂第３版」、渡辺慶一、中根一穂編集、学際企画）。

（ａ）固定・パラフィン包埋

外科的に生体より採取した組織をホルマリンやパラフォルムアルデヒド、無水エチルアルコール等によって固定する。その後パラフィン包埋する。一般にアルコールで脱水した後キシレンで処理し、最後にパラフィンで包埋する。パラフィンで包埋された標本を所望の厚さ（例えば3～5μm厚）に薄切し、スライドガラス上に伸展させる。尚、パラフィン包埋標本に代えてアルコール固定標本、乾燥封入した標本、凍結標本などを用いる場合もある。

（ｂ）脱パラフィン

一般にキシレン、アルコール、及び精製水で順に処理する。

（ｃ）前処理（抗原賦活）

必要に応じて抗原賦活のために酵素処理、加熱処理及び／又は加圧処理等を行う。

（ｄ）内因性ペルオキシダーゼ除去

染色の際の標識物質としてペルオキシダーゼを使用する場合、過酸化水素水で処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を除去しておく。

（ｅ）非特異的反応阻害

切片をウシ血清アルブミン溶液（例えば1%溶液）で数分から数十分程度処理して非特異的反応を阻害する。尚、ウシ血清アルブミンを含有させた抗体溶液を使用して次の一次抗体反応を行うこととし、この工程を省略してもよい。

（ｆ）一次抗体反応

適当な濃度に希釈した抗体をスライドガラス上の切片に滴下し、その後数十分～数時間反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。

（ｇ）標識試薬の添加

標識物質としてペルオキシダーゼが頻用される。ペルオキシダーゼを結合させた２次抗

体をスライドガラス上の切片に滴下し、その後数十分～数時間反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。
（ｈ）発色反応
トリス緩衝液にDAB（3,3'-diaminobenzidine）を溶解する。続いて過酸化水素水を添加する。このようにして調製した発色用溶液を数分間（例えば5分間）切片に浸透させ、発色させる。発色後、切片を水道水で十分に洗浄し、DABを除去する。
（ｉ）核染色
マイヤーのヘマトキシリンを数秒～数十秒反応させて核染色を行う。流水で洗浄し色出しする（通常、数分間）。
（ｊ）脱水、透徹、封入
アルコールで脱水した後、キシレンで透徹処理し、最後に合成樹脂やグリセリン、ゴムシロップなどで封入する。
【００９２】
いずれかの疾患に対して特異的反応性が認められた抗体は、当該疾患を特徴づける細胞表面抗原を高感度で検出することが可能であり、当該疾患の診断又は治療用抗体としての利用ないし応用が期待できる。そこでステップ（３）ではこのような抗体が属する抗体グループの抗体を選択する（図１、（３））。その結果、この例では、疾患Ａに関して抗体グループ１の抗体（抗体１－１、１－２又は１－３）と抗体グループ３の抗体（抗体３－１、３－２又は３－３）、疾患Ｂに関して抗体グループ５の抗体（抗体５－１、５－２又は５－３）が選択されることになる。このようにして、特定の疾患に特異的な抗体が取得される。
【００９３】
ステップ（３’）では、二つ以上の抗体が特異的反応性を示した疾患を選抜した後、当該疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループからそれぞれ抗体を選抜し、選抜された抗体同士を組み合わせる（図１、（３’））。即ち、この例では疾患Ａを選抜し、疾患Ａに対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループである抗体グループ１及び３の抗体を組み合わせる。このようにして、特定の疾患に特異的な抗体セットが取得される。
【００９４】
ここで、抗体グループ内の各抗体の間で特異性（交差反応性）等を比較し、最も優れた特性を有する抗体を最終的に選択することにしてもよい（この例では抗体１－２、抗体３－３、抗体５－３が選択される。図１、（４））。このステップを加えることにより、より有用性の高い抗体又は抗体セットを得ることができる。
また、特定の疾患に反応を示すとして選抜された抗体に、当該疾患に反応性を有しない任意の抗体を組み合わせて抗体セットを構成してもよい（この例では抗体グループ１の抗体及び抗体グループ３の抗体に例えば抗体４－１を組み合わせる）。このような抗体セットを利用すれば、当該疾患のさらに詳細な特徴付けが可能となる。
【００９５】
本発明の取得法によれば、疾患特異的抗原に対する抗体（又は抗体セット）が得られる。当該抗体（又は抗体セット）は、そのまま又は必要な改変を加えた上で、当該疾患又は病態の研究・分類・診断・治療などに有用である。このように本法は医療分野において極めて有益なツールを提供する。
【００９６】
この局面の第３態様は、以下のステップを含む抗体セットの取得法を提供する。
（１）本発明の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループからそれぞれ抗体を選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。

【００９７】
以下、各ステップの詳細について図２を参照しながら説明する。説明の便宜上、図２では、本発明の分類法によって抗体グループ１～６が得られており、各抗体グループには３個ずつ抗体が属するとする。抗体グループ１～３の抗原（抗原Ａ）は共通する。同様に抗体グループ４及び５の抗原（抗原Ｂ）は共通する。
この態様のステップ（１）では、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループ（抗体グループ１、４、６）を選抜する（図２、（１））。続くステップ（２）では、選抜した各抗体グループの中の抗体（抗体１－１、４－１、６－１）と特定の疾患（疾患Ａ～Ｄ）との反応性を調べる（図２、（２））。ステップ（３）では、いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループの抗体を組み合わせる。即ち、この例では疾患Ａに特異的反応性を示した抗体１－１が属する抗体グループ１の抗体と、疾患Ｂに特異的反応性を示した抗体４－１が属する抗体グループ４の抗体とを組み合わせて抗体セットとする（図２、（３））。このようにして、疾患Ａに特異的な抗体と、疾患Ｂに特異的な抗体を含む抗体セット（抗体１－１と抗体４－１）が取得される。この抗体セットは例えば疾患Ａ又は疾患Ｂの検出に有用であり、特に疾患ＡとＢの識別に有効な試薬となる。
尚、抗体グループ内の各抗体の間で特異性（交差反応性）等を比較し、最も優れた特性を有する抗体を最終的に選択することにしてもよい（この例では抗体１－２と抗体４－３が選択される。図２、（４））。このステップを加えることにより、より有用性の高い抗体セットを得ることができる。
【００９８】
この局面の第４態様は、本発明の分類法及び同定法を実施した結果、認識する抗原が共通する複数の抗体グループが得られていることを前提として、以下のステップを含む抗体セットの取得法を提供する。
（１）本発明の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）いずれかの疾患に対して特異的反応性を示した抗体が属する抗体グループの抗体と、該抗体グループと抗原が共通する他の抗体グループの抗体とを選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせるステップ。
【００９９】
以下、各ステップの詳細について図３を参照しながら説明する。説明の便宜上、図３では、本発明の分類法によって抗体グループ１～６が得られており、各抗体グループには３個ずつ抗体が属するとする。抗体グループ１～３の抗原（抗原Ａ）は共通する。同様に抗体グループ４及び５の抗原（抗原Ｂ）は共通する。
この態様のステップ（１）では、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループ（抗体グループ１、４、６）を選抜する（図３、（１））。続くステップ（２）では、選抜した各抗体グループの中の抗体（抗体１－１、４－１、６－１）と特定の疾患（疾患Ａ～Ｄ）との反応性を調べる（図３、（２））。ステップ（３）では、いずれかの疾患に対して特異的反応性が認められた抗体が属する抗体グループの抗体と、当該グループと抗原が共通する他の抗体グループの抗体をそれぞれ選抜し、選抜した抗体同士を組み合わせて抗体セットとする（図３、（３））。即ち、この例では疾患Ａに対して特異的反応性を示した抗体１－１が属する抗体グループ１の抗体と、抗体グループ１と抗原が共通する抗体グループ２及び３の抗体とを組み合わせる。このようにして、疾患Ａに特異的な抗体セットが取得される。同様に、疾患Ｂに対して特異的反応性を示した抗体４－１が属する抗体グループ４の抗体と、抗体グループ４と抗原が共通する抗体グループ５の抗体とを組み合わせる。このようにして、疾患Ｂに特異的な抗体セットが取得される。この例に示すように、ここでの「他の抗体グループ」は一つに限らず複数であってもよい。
【０１００】
ここで、同じ臓器の癌であっても患者によって病態（悪性度）が大きく異なることがあ

る。この病態の相違には、特定の抗原の発現態様が関与すると予想される。一方、この態様の方法で得られる抗体セットは、典型的には、認識する抗原のレベルでは差はないが、エピトープのレベルで互いに異なる抗体の集合からなる。即ち、認識するエピトープが異なる複数の抗体を含む抗体セットである。このような抗体セットは、抗原の発現態様を多面的に検出ないし評価することを可能にするものであり、例えば癌等における特定の病態の検出や悪性度の判定に有用である。

尚、抗体グループ内の各抗体の間で特異性（交差反応性）等を比較し、最も優れた特性を有する抗体を最終的に選択することにしてもよい（図３、（４））。このステップを加えることにより、より有用性の高い抗体セットを得ることができる。

【０１０１】

この局面の第５態様は、本発明の分類法及び同定法を実施した結果、認識する抗原が共通する複数の抗体グループが得られていることを前提として、以下のステップを含む抗体セットの取得法を提供する。

（１）本発明の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が共通する二以上の抗体グループを選抜するステップ、

（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患の病態との反応性を、一種類又は二種類以上の病態について調べるステップ、及び

（３）反応性に関する情報を関連付けた上で、前記各抗体グループの抗体同士を組み合わせるステップ。

【０１０２】

以下、各ステップの詳細について図４を参照しながら説明する。説明の便宜上、図４では、本発明の分類法によって抗体グループ１～６が得られており、各抗体グループには３個ずつ抗体が属するとする。抗体グループ１～３の抗原（抗原Ａ）は共通する。同様に抗体グループ４及び５の抗原（抗原Ｂ）は共通する。

この態様のステップ（１）では、認識する抗原が共通する抗体グループの中から二以上の抗体グループ（抗体グループ１～３）を選抜する（図４、（１））。続くステップ（２）では、選抜した各抗体グループの抗体（抗体１－１、２－１、３－１）について、特定の疾患の様々な病態との反応性を調べる（図４、（２））。具体的には特定の疾患の様々な病態についてそれぞれ、患者由来の検体（細胞又は組織）を用意し、それと各抗体との反応性を調べる。ステップ（３）では、得られた反応性に関する情報を関連付けた上で（図４、（２）の右欄）、選抜した各抗体グループ（抗体グループ１～３）の抗体同士を組み合わせて抗体セットとする（図４、（３））。このようにして、特定の疾病に関する病態特異的抗体セットが取得される（この例では抗体グループ１～３の抗体からなる、疾病Ａの病態特異的抗体セットが得られる）。この態様の方法で得られる抗体セットは、典型的には、それに対する抗原のレベルでは差はないが、エピトープのレベルで互いに異なる抗体の集合からなる。従って、上記態様の抗体セットと同様に、例えば癌等における特定の病態の検出や悪性度の判定に有用な抗体セットとなる。尚、いずれの病態との間にも特異的反応性が認められなかった抗体を排除した上で抗体セットを構築することが好ましい。

抗体グループ内の各抗体の間で特異性（交差反応性）等を比較し、最も優れた特性を有する抗体を最終的に選択することにしてもよい（この例では抗体１－２、２－１、３－３が選択される。図４、（４））。このステップを加えることにより、より有用性の高い抗体セットを得ることができる。

【０１０３】

本発明の更なる局面は、抗体と疾患（又は病態）との関連性を表示したパネルを作成する方法を提供する。この局面の第１態様では次のステップが行われる。

（１）本発明の分類法で分類された複数の抗体グループの中から一又は二以上の抗体グループを選抜するステップ、

（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二以上の疾患について調べるステップ、及び

（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
【０１０４】
ステップ（１）で一の抗体グループを選抜することにした場合、一つの抗体に関して、又は抗原が共通する複数の抗体に関して特定の疾患との関連性が表示されたパネルが得られる。後者の場合、抗原が共通する複数の抗体について、疾患との関連性の観点からの差異ないし相違点（交差反応性などに起因するもの）を読み取ることができる。即ち、当該パネルは抗体の特性について重要な示唆を与える。一方、ステップ（１）で二以上の抗体グループを選抜した場合、抗原が異なる複数の抗体（但し、ステップ（１）で各抗体グループより数個の抗体を選抜することにした場合は、抗原が共通する抗体が混在することになる）に関して特定の疾患との関連性が表示されたパネルが得られる。このパネルは疾患の研究・分類・診断などに有用な抗体群に関する情報を与えるものであり、それ自体が大きな価値をもつ。このパネルからは複数の抗原と疾患との関連性も読み取ることができる。即ち、当該パネルは各抗原と疾患との関連性や抗原間の関連性について重要な示唆を与える。
ここで、ステップ（２）において、二種類以上の疾患について抗体の反応性を調べることが好ましい。このようにすれば、抗体毎に二種類以上の疾患との関連性（リンケージ）が表示されたパネルが得られる。当該パネルでは、より多くの情報が提示されることはもとより、疾患間の関連性をも提示され、当該疾患の研究・分類・診断などに有用且つ重要な示唆が得られる。
【０１０５】
この局面の第２態様では次のステップが行われる。
（１）本発明の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が異なる二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患との反応性を、一種類又は二種類以上の疾患について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
【０１０６】
この態様では、抗原が異なる複数の抗体に関して特定の疾患との関連性が表示されたパネルが得られる。このパネルは疾患の研究・分類・診断などに有用な抗体群に関する情報を与えるものであり、それ自体が大きな価値をもつ。このパネルからは複数の抗原と疾患との関連性（リンケージ）も読み取ることができる。即ち、当該パネルは各抗原と疾患との関連性や抗原間の関連性について重要な示唆を与える。
【０１０７】
ここで、ステップ（２）において、二種類以上の疾患について抗体の反応性を調べることが好ましい。このようにすれば、抗体毎に二種類以上の疾患との関連性が表示されたパネルが得られる。当該パネルでは、より多くの情報が提示されることはもとより、疾患間の関連性をも提示され、当該疾患の研究・分類・診断などに有用且つ重要な示唆が得られる。
【０１０８】
この局面の第３態様では次のステップが行われる。
（１）本発明の分類法で分類された複数の抗体グループの中から、認識する抗原が共通する二以上の抗体グループを選抜するステップ、
（２）選抜した各抗体グループの抗体と、特定の疾患の病態との反応性を、一種類又は二種類以上の病態について調べるステップ、及び
（３）ステップ（２）の結果を抗体毎に関連付け、図又は表形式で表示するステップ。
【０１０９】
この態様では、抗原が共通する複数の抗体に関して、特定の疾患の病態との関連性が表示されたパネルが得られる。このパネルは各病態の研究や病態間の差異に関する研究、病態の分類、又は病態レベルでの診断などに有用な抗体群に関する情報を与えるものであり、それ自体が大きな価値をもつ。

ここで、ステップ（２）において、二種類以上の病態について抗体の反応性を調べることが好ましい。このようにすれば、抗体毎に二種類以上の病態との関連性が表示されたパネルが得られる。当該パネルでは、より多くの情報が提示されることはもとより、病態間の関連性をも提示され、各病態の研究・分類・診断などに有用且つ重要な示唆が得られる。

【０１１０】

尚、この局面の第１態様は、本発明の第３局面の第１態様及び第２態様に対応する。同様に、第２態様は第３局面の第３態様及び第４態様に、第３態様は第３局面の第５態様にそれぞれ対応する。従って、この局面において特に言及されない事項についてはそれぞれ、対応する第３局面の説明が援用される。

【０１１１】

本発明のパネルにおいて「抗体と疾患（又は病態）との関連性」は、対象疾患（又は病態）が抗体に陽性又は陰性であることを示す文字（例えば「陽性」「陰性」「ポジティブ」「ネガティブ」）や記号（例えば「○」「×」「Ｐ」「Ｎ」）などで表示される。二段階表示ではなく、例えば強陽性、中程度陽性、弱陽性、及び陰性の４段階で表示する等、多段階表示によって関連性を示すことにしてもよい。

一つのパネルに表示される抗体の数は特に限定されないが、例えば１～１０００、好ましくは２～１００、更に好ましくは５～５０である。

また、抗体と特定の疾患（又は病態）との関連性に加えて、各抗体の抗原を明示することにしてもよい。

【０１１２】

この局面のパネルと、上記本発明の取得法で得られた抗体（又は抗体セット）との組合せは、疾患や病態の研究・分類・診断などに極めて有効なツールとなる。即ち当該組合せによれば、疾患又は病態特異的な抗体（又は抗体セット）と、当該抗体（又は抗体セット）と疾患又は病態との関連性の情報が同時に提供される。

【０１１３】

本発明は更に上記パネルの用途に関する。即ち、以下のステップを含む、細胞表面抗原が指標となる疾患の検査法を提供する。

（１）被検者より分離された細胞又は組織を用意するステップ。

（２）該細胞又は組織と、本発明のパネル（抗体と疾患（又は病態）との関連性を表示したパネル）に表示された各抗体との反応性を調べるステップ。

（３）ステップ（２）の結果を前記パネルに照合するステップ。

【０１１４】

本発明の検査法によれば、検査対象の疾患又は病態（以下、「対象疾患」という）について、被検者の罹患の有無や罹患リスク、病態などに関する情報が得られる。即ち、本発明の検査法は対象疾患の診断のために有益な手段となる。また、治療と並行して本発明の検査法を実施すれば、検査結果を基に治療効果を評価することができる。このように本発明の検査法を治療効果のモニターに利用してもよい。

【０１１５】

ステップ（１）では、被検者（即ち生体）より分離された細胞又は組織（以下、「被検細胞等」という）を用意する。「被検者より分離された」とは、被検者の細胞又は組織の一部が摘出され、生体である被検者と完全に隔離されている状態をいう。対象疾患に関する情報（罹患の有無、罹患リスクなど）を必要とする者が被検者となる。被検者は、対象疾患の患者であっても、見かけ上の健常者であってもよい。「見かけ上の健常者」とは、本発明の検査法が適用される以前において対象疾患の患者と認定されていない者のことをいう。

【０１１６】

ステップ（２）では、被検細胞等と、本発明のパネルに表示された各抗体との反応性を調べる。即ち、免疫学的手法（例えば免疫組織化学的染色法）を用い、各抗体が認識する抗原を被検細胞等が発現しているかを調べる。免疫学的手法によれば通常、抗原の発現量

に関する情報も得られる。そこで、抗原の発現の有無に加えて発現量も調べることにしてもよい。免疫学的手法として例えば、ELISA法、ラジオイムノアッセイ、フローサイトメトリー解析、免疫沈降法、イムノブロッティング等の方法が挙げられる。

【０１１７】

ステップ（３）では、ステップ（２）の結果（各抗体の反応性）を本発明のパネルに照合する。本発明のパネルでは各抗体と疾患又病態との関連性が表示されている。従って、このステップによって、各抗体の反応性を介して被検細胞等と疾患との関連性が明らかとなる。

【０１１８】

上記パネルの更なる用途として、本発明は以下の方法も提供する。即ち、以下のステップを含む、特定の疾患に対する最適な治療法を選択する方法である。

（１）被検者より分離された細胞又は組織を用意するステップ。

（２）該細胞又は組織と、本発明のパネル（抗体と疾患（又は病態）との関連性を表示したパネル）に表示された各抗体との反応性を調べるステップ。

（３）ステップ（２）の結果を前記パネルに照合するステップ。

（４）照合結果に従い、有効な抗体を選択するステップ。

【０１１９】

本発明の選択法では、上記の検査法と同様にステップ（１）～（３）を実施した後、照合結果に従い、有効な抗体を選択する（ステップ（４））。有効な抗体として、典型的には、ステップ（２）において特異的な反応性を示した抗体が選択される。ステップ（２）において特異的な反応性を示した抗体と等価な抗体を選択することにしてもよい。「等価な抗体」とは、基準となる抗体（基準抗体）と同等の特性（反応性や活性）をもつ抗体である。等価な抗体の一例として、重鎖可変領域の配列及び軽鎖可変領域の配列が、基準抗体のそれと実質的な差がない（完全同一、又は反応性や活性などに影響を与えない軽微な差を有する）抗体を挙げることができる。等価な抗体の他の一例として、基準抗体と比較したとき、重鎖可変領域を構成する各CDRの配列及び軽鎖可変領域を構成する各CDRの配列の全てにおいて差が認められない抗体を挙げることができる。

本発明の選択法が適用される疾患は、HER1、HER2、CD46、ITGA3、ICAM1、ALCAM、CD147、IgSF4、BCAM、C1qR、CD44、CD73、LAR、EpCAM及びHGFRからなる群より選択される細胞表面抗原が指標となる疾患である。即ち、これらの細胞表面抗原の発現によって特徴付けられる様々な疾患に対する最適な治療法を選択するために本発明を利用可能である。本発明の選択法によれば、患者毎に最適な治療法を選択でき、テーラーメイド型医療が実現する。

【０１２０】

本発明の選択法で使用されるパネルに、048-006抗体、057-091抗体、059-152抗体、048-040抗体、054-101抗体、055-147抗体、059-173抗体、067-149抗体、067-176抗体、015-126抗体、015-044抗体、015-102抗体、015-136抗体、015-143抗体、015-209抗体、039-016抗体、053-216抗体、075-024抗体、075-110抗体、086-032抗体、086-035抗体、086-036抗体、086-061抗体、086-138抗体、086-182抗体、035-224抗体、045-011抗体、051-144抗体、052-053抗体、052-073抗体、053-049抗体、3172-120抗体、066-069抗体、015-003抗体、064-002抗体、064-006抗体、064-012a抗体、064-012b抗体、064-014抗体、064-054抗体、064-085抗体、064-093抗体、064-116抗体、065-183抗体、067-142抗体、068-007抗体、052-033抗体、053-042抗体、053-051抗体、053-059抗体、053-085抗体、035-234抗体、040-107抗体、041-118抗体、066-174抗体、083-040抗体、029-143抗体、045-134抗体、062-101抗体、062-109抗体、084-103抗体、052-274抗体、029-067抗体、083-131抗体、059-053抗体、064-003抗体、067-213抗体、067-153抗体、067-126抗体、067-133抗体、067-287抗体、064-044抗体、065-030抗体、065-358抗体、066-019抗体、079-085抗体、067-024抗体、及び076-048抗体からなる群より選択される二以上の抗体が表示されていることが好ましい。

【０１２１】

本発明の選択法の一態様では、以下のステップが実施される。

（１）048-006抗体、015-126抗体、067-133抗体、064-044抗体、076-048抗体及び059-053抗体からなる群より選択される一以上の抗体と、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、細気管支肺胞上皮癌、腺癌、及び大細胞癌からなる群より選択される一以上の疾患の臨床癌組織との反応性が表示されたパネルと、被検者より分離された細胞又は組織を用意するステップ。

（２）該細胞又は組織と、該パネルに表示された各抗体との反応性を調べるステップ。

（３）ステップ（２）の結果を前記パネルに照合するステップ。

（４）照合結果に従い、有効な抗体を選択するステップ。

【０１２２】

この態様のステップ（１）では、本発明者らが取得に成功した抗体と、特定の疾患の臨床癌組織との反応性が表示されたパネルを用意する。併せて、被検者より分離された細胞又は組織を用意する。ステップ（２）以降は上記の態様と同様に実施する。尚、この態様で使用されるパネルの具体例は図６９に示すパネルである。

この態様においても、有効な抗体として、ステップ（２）において特異的な反応性を示した抗体又はそれと等価な抗体が選択される。この態様の選択法は、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、細気管支肺胞上皮癌、腺癌、又は大細胞癌に対する最適な治療法の選択に好適である。

【０１２３】

本発明の更なる局面は、以上の抗体の取得法（又は抗体セットの取得法）で取得される単離された抗体（又は抗体セット）を提供する。後述の実施例に示すように、本発明者らは本発明の方法によってHER1に関連性を有する抗体、HER2に関連性を有する抗体、CD46に関連性を有する抗体、ITGA3に関連性を有する抗体、ICAM1に関連性を有する抗体、ALCAMに関連性を有する抗体、CD147に関連性を有する抗体、C1qRに関連性を有する抗体、CD44に関連性を有する抗体、CD73に関連性を有する抗体、EpCAMに関連性を有する抗体、HGFRに関連性を有する抗体、LARに関連性を有する抗体、及びBCAMに関連性を有する抗体を実際に取得することに成功した。また、現在の検査法では同一疾患（病態）と判定される二つの臨床検体を識別できる抗体が得られた。この抗体を用いれば、抗原の発現状態に基づいて特定の疾患を新たに分類することが可能であり、また当該疾患の検査も可能となる。

【０１２４】

本発明の更なる局面は、本発明者らが取得に成功した抗体及びその用途を提供する。後述の実施例に示す通り、本発明者らはHER1に対する抗体を９種類（048-006抗体、057-091抗体、059-152抗体、048-040抗体、054-101抗体、055-147抗体、059-173抗体、067-149抗体、067-176抗体）、HER2に対する抗体を１６種類（015-126抗体、015-044抗体、015-102抗体、015-136抗体、015-143抗体、015-209抗体、039-016抗体、053-216抗体、075-024抗体、075-110抗体、086-032抗体、086-035抗体、086-036抗体、086-061抗体、086-138抗体、086-182抗体）、CD46に対する抗体を８種類（035-224抗体、045-011抗体、051-144抗体、052-053抗体、052-073抗体、053-049抗体、3172-120抗体、066-069抗体）、ITGA3に対する抗体を１３種類（015-003抗体、064-002抗体、064-006抗体、064-012a抗体、064-012b抗体、064-014抗体、064-054抗体、064-085抗体、064-093抗体、064-116抗体、065-183抗体、067-142抗体、068-007抗体）、ICAM1に対する抗体を５種類（052-033抗体、053-042抗体、053-051抗体、053-059抗体、053-085抗体）、ALCAMに対する抗体を１３種類（035-234抗体、040-107抗体、041-118抗体、066-174抗体、083-040抗体、029-143抗体、045-134抗体、062-101抗体、062-109抗体、084-103抗体、052-274抗体、029-067抗体、083-131抗体）、CD147に対する抗体を１種類（059-053抗体）、C1qRに対する抗体を１種類（070-016抗体）、CD44に対する抗体を１種類（064-003抗体）、CD73に対する抗体を１種類（067-213抗体）、EpCAMに対する抗体を１種類（067-153抗体）、HGFRに対する抗体を３種類（067-126抗体、067-133抗体、067-287抗体）、LARに対する抗体を５種類（064-044抗体、065-030抗体、065-358抗体、066-019抗体、079-085抗体）、及びBCAMに対する抗体を１種類（067-024抗体）取得することに成功した。これらの抗体はいずれも、細胞膜表面上

に発現している状態の抗原における細胞外ドメインを認識することから、細胞・組織染色等に有用である。各抗体の可変領域の配列を解析した結果、以下の配列情報が得られた。尚、抗体名に続けて、重鎖可変領域のアミノ酸配列；重鎖CDR1のアミノ酸配列；重鎖CDR2のアミノ酸配列；重鎖CDR3のアミノ酸配列；軽鎖可変領域のアミノ酸配列；軽鎖CDR1のアミノ酸配列；軽鎖CDR2のアミノ酸配列；軽鎖CDR3のアミノ酸配列の順で記載する。

【０１２５】

１．HER1に対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記９種の抗体クローンである。

048-006抗体　配列番号：１(VH)；配列番号：２(VH CDR1)；配列番号：３(VH CDR2）；配列番号：４(VH CDR3）；配列番号：５(VL)；配列番号：６(VL CDR1)；配列番号：７(VL CDR2）；配列番号：８(VL CDR3)

057-091抗体　配列番号：９(VH)；配列番号：１０(VH CDR1)；配列番号：１１(VH CDR2）；配列番号：１２(VH CDR3）；配列番号：１３(VL)；配列番号：１４(VL CDR1)；配列番号：１５(VL CDR2）；配列番号：１６(VL CDR3)

059-152抗体　配列番号：１７(VH)；配列番号：１８(VH CDR1)；配列番号：１９(VH CDR2）；配列番号：２０(VH CDR3）；配列番号：２１(VL)；配列番号：２２(VL CDR1)；配列番号：２３(VL CDR2)；配列番号：２４(VL CDR3)

048-040抗体　配列番号：４８３(VH)；配列番号：４８４(VH CDR1)；配列番号：４８５(VH CDR2)；配列番号：４８６(VH CDR3)；配列番号：４８７(VL)；配列番号：４８８(VL CDR1)；配列番号：４８９(VL CDR2)；配列番号：４９０(VL CDR3)

054-101抗体　配列番号：４９１(VH)；配列番号：４９２(VH CDR1)；配列番号：４９３(VH CDR2)；配列番号：４９４(VH CDR3)；配列番号：４９５(VL)；配列番号：４９６(VL CDR1)；配列番号：４９７(VL CDR2)；配列番号：４９８(VL CDR3)

055-147抗体　配列番号：４９９(VH)；配列番号：５００(VH CDR1)；配列番号：５０１(VH CDR2)；配列番号：５０２(VH CDR3)；配列番号：５０３(VL)；配列番号：５０４(VL CDR1)；配列番号：５０５(VL CDR2)；配列番号：５０６(VL CDR3)

059-173抗体　配列番号：５０７(VH)；配列番号：５０８(VH CDR1)；配列番号：５０９(VH CDR2)；配列番号：５１０(VH CDR3)；配列番号：５１１(VL)；配列番号：５１２(VL CDR1)；配列番号：５１３(VL CDR2)；配列番号：５１４(VL CDR3)

067-149抗体　配列番号：５１５(VH)；配列番号：５１６(VH CDR1)；配列番号：５１７(VH CDR2)；配列番号：５１８(VH CDR3)；配列番号：５１９(VL)；配列番号：５２０(VL CDR1)；配列番号：５２１(VL CDR2)；配列番号：５２２(VL CDR3)

067-176抗体　配列番号：５２３(VH)；配列番号：５２４(VH CDR1)；配列番号：５２５(VH CDR2)；配列番号：５２６(VH CDR3)；配列番号：５２７(VL)；配列番号：５２８(VL CDR1)；配列番号：５２９(VL CDR2)；配列番号：５３０(VL CDR3)

尚、後述の実施例に示すように、これらの抗体と膵癌細胞株PANC-1、腎臓癌細胞株CCFRC1、腎臓癌細胞株Caki-1、卵巣癌細胞株KF28、胃癌細胞株 SNU-5、肺扁平上皮癌細胞株RERF-LC-AI、卵巣癌細胞株RMG-1、未分化型肝細胞癌細胞株HLF、卵巣癌細胞株SKOv3、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株ACHN、肺扁平上皮癌細胞株EBC1、外陰部粘膜上皮細胞株A431、肺腺癌細胞株H1373、肝細胞癌細胞株HepG2、及び腎臓癌臨床検体樹立細胞株との関連性（以上、細胞株染色の結果に基づく）、並びに腎臓癌、肝細胞癌、胆肝癌、肺扁平上皮癌、肺腺癌、及び膵臓癌との関連性（以上、組織染色の結果に基づく）が実験的に確認された。

【０１２６】

２．HER2に対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１６種の抗体クローンである。

015-126抗体　配列番号：２５(VH)；配列番号：２６(VH CDR1)；配列番号：２７(VH CDR2）；配列番号：２８(VH CDR3）；配列番号：２９(VL)；配列番号：３０(VL CDR1)；配

列番号：３１(VL CDR2）；配列番号：３２(VL CDR3）
015-044抗体　配列番号：５３１(VH)；配列番号：５３２(VH CDR1)；配列番号：５３３(VH CDR2)；配列番号：５３４(VH CDR3)；配列番号：５３５(VL)；配列番号：５３６(VL CDR1)；配列番号：５３７(VL CDR2)；配列番号：５３８(VL CDR3)
015-102抗体　配列番号：５３９(VH)；配列番号：５４０(VH CDR1)；配列番号：５４１(VH CDR2)；配列番号：５４２(VH CDR3)；配列番号：５４３(VL)；配列番号：５４４(VL CDR1)；配列番号：５４５(VL CDR2)；配列番号：５４６(VL CDR3)
015-136抗体　配列番号：５４７(VH)；配列番号：５４８(VH CDR1)；配列番号：５４９(VH CDR2)；配列番号：５５０(VH CDR3)；配列番号：５５１(VL)；配列番号：５５２(VL CDR1)；配列番号：５５３(VL CDR2)；配列番号：５５４(VL CDR3)
015-143抗体　配列番号：５５５(VH)；配列番号：５５６(VH CDR1)；配列番号：５５７(VH CDR2)；配列番号：５５８(VH CDR3)；配列番号：５５９(VL)；配列番号：５６０(VL CDR1)；配列番号：５６１(VL CDR2)；配列番号：５６２(VL CDR3)
015-209抗体　配列番号：５６３(VH)；配列番号：５６４(VH CDR1)；配列番号：５６５(VH CDR2)；配列番号：５６６(VH CDR3)；配列番号：５６７(VL)；配列番号：５６８(VL CDR1)；配列番号：５６９(VL CDR2)；配列番号：５７０(VL CDR3)
039-016抗体　配列番号：５７１(VH)；配列番号：５７２(VH CDR1)；配列番号：５７３(VH CDR2)；配列番号：５７４(VH CDR3)；配列番号：５７５(VL)；配列番号：５７６(VL CDR1)；配列番号：５７７(VL CDR2)；配列番号：５７８(VL CDR3)
053-216抗体　配列番号：５７９(VH)；配列番号：５８０(VH CDR1)；配列番号：５８１(VH CDR2)；配列番号：５８２(VH CDR3)；配列番号：５８３(VL)；配列番号：５８４(VL CDR1)；配列番号：５８５(VL CDR2)；配列番号：５８６(VL CDR3)
075-024抗体　配列番号：５８７(VH)；配列番号：５８８(VH CDR1)；配列番号：５８９(VH CDR2)；配列番号：５９０(VH CDR3)；配列番号：５９１(VL)；配列番号：５９２(VL CDR1)；配列番号：５９３(VL CDR2)；配列番号：５９４(VL CDR3)
075-110抗体　配列番号：５９５(VH)；配列番号：５９６(VH CDR1)；配列番号：５９７(VH CDR2)；配列番号：５９８(VH CDR3)；配列番号：５９９(VL)；配列番号：６００(VL CDR1)；配列番号：６０１(VL CDR2)；配列番号：６０２(VL CDR3)
086-032抗体　配列番号：６０３(VH)；配列番号：６０４(VH CDR1)；配列番号：６０５(VH CDR2)；配列番号：６０６(VH CDR3)；配列番号：６０７(VL)；配列番号：６０８(VL CDR1)；配列番号：６０９(VL CDR2)；配列番号：６１０(VL CDR3)
086-035抗体　配列番号：６１１(VH)；配列番号：６１２(VH CDR1)；配列番号：６１３(VH CDR2)；配列番号：６１４(VH CDR3)；配列番号：６１５(VL)；配列番号：６１６(VL CDR1)；配列番号：６１７(VL CDR2)；配列番号：６１８(VL CDR3)
086-036抗体　配列番号：６１９(VH)；配列番号：６２０(VH CDR1)；配列番号：６２１(VH CDR2)；配列番号：６２２(VH CDR3)；配列番号：６２３(VL)；配列番号：６２４(VL CDR1)；配列番号：６２５(VL CDR2)；配列番号：６２６(VL CDR3)
086-061抗体　配列番号：６２７(VH)；配列番号：６２８(VH CDR1)；配列番号：６２９(VH CDR2)；配列番号：６３０(VH CDR3)；配列番号：６３１(VL)；配列番号：６３２(VL CDR1)；配列番号：６３３(VL CDR2)；配列番号：６３４(VL CDR3)
086-138抗体　配列番号：６３５(VH)；配列番号：６３６(VH CDR1)；配列番号：６３７(VH CDR2)；配列番号：６３８(VH CDR3)；配列番号：６３９(VL)；配列番号：６４０(VL CDR1)；配列番号：６４１(VL CDR2)；配列番号：６４２(VL CDR3)
086-182抗体　配列番号：６４３(VH)；配列番号：６４４(VH CDR1)；配列番号：６４５(VH CDR2)；配列番号：６４６(VH CDR3)；配列番号：６４７(VL)；配列番号：６４８(VL CDR1)；配列番号：６４９(VL CDR2)；配列番号：６５０(VL CDR3)
後述の実施例に示すように、これらの抗体と肺腺癌細胞株Calu-3、卵巣癌細胞株SKOv3、及び乳癌細胞株BT474との関連性（以上、細胞株染色の結果に基づく）が実験的に確認された。

【０１２７】

３．CD46に対する抗体
複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。最終的に８７種の抗体クローンが同定された。配列を詳細に解析したのは下記8種の抗体クローンである。
035-224抗体　配列番号：３３(VH)；配列番号：３４(VH CDR1)；配列番号：３５(VH CDR2）；配列番号：３６(VH CDR3）；配列番号：３７(VL)；配列番号：３８(VL CDR1)；配列番号：３９(VL CDR2）；配列番号：４０(VL CDR3)
045-011抗体　配列番号：４１(VH)；配列番号：４２(VH CDR1)；配列番号：４３(VH CDR2）；配列番号：４４(VH CDR3）；配列番号：４５(VL)；配列番号：４６(VL CDR1)；配列番号：４７(VL CDR2）；配列番号：４８(VL CDR3)
051-144抗体　配列番号：４９(VH)；配列番号：５０(VH CDR1)；配列番号：５１(VH CDR2）；配列番号：５２(VH CDR3）；配列番号：５３(VL)；配列番号：５４(VL CDR1)；配列番号：５５(VL CDR2）；配列番号：５６(VL CDR3)
052-053抗体　配列番号：５７(VH)；配列番号：５８(VH CDR1)；配列番号：５９(VH CDR2）；配列番号：６０(VH CDR3）；配列番号：６１(VL)；配列番号：６２(VL CDR1)；配列番号：６３(VL CDR2）；配列番号：６４(VL CDR3)
052-073抗体　配列番号：６５(VH)；配列番号：６６(VH CDR1)；配列番号：６７(VH CDR2）；配列番号：６８(VH CDR3）；配列番号：６９(VL)；配列番号：７０(VL CDR1)；配列番号：７１(VL CDR2）；配列番号：７２(VL CDR3)
053-049抗体　配列番号：７３(VH)；配列番号：７４(VH CDR1)；配列番号：７５(VH CDR2）；配列番号：７６(VH CDR3）；配列番号：７７(VL)；配列番号：７８(VL CDR1)；配列番号：７９(VL CDR2）；配列番号：８０(VL CDR3)
3172-120抗体　配列番号：８１(VH)；配列番号：８２(VH CDR1)；配列番号：８３(VH CDR2）；配列番号：８４(VH CDR3）；配列番号：８５(VL)；配列番号：８６(VL CDR1)；配列番号：８７(VL CDR2）；配列番号：８８(VL CDR3)
066-069抗体　配列番号：７５５(VH)；配列番号：７５６(VH CDR1)；配列番号：７５７(VH CDR2)；配列番号：７５８(VH CDR3)；配列番号：７５９(VL)；配列番号：７６０(VL CDR1)；配列番号：７６１(VL CDR2)；配列番号：７６２(VL CDR3)
後述の実施例に示すように、これらの抗体と大腸癌細胞株CaCo2、胃癌細胞株MKN45、未分化型肝細胞癌細胞株HLF、肝臓癌細胞株HepG2、肝内胆管細胞癌細胞株RBE、膵臓癌細胞株PANC1、腎臓癌細胞株CCFRC1、腎臓癌細胞株Caki-1、肺癌細胞株NCI-H441、肺扁平上皮癌EBC1、胃癌細胞株NCI-N87、胃癌細胞株SNU-5、肺扁平上皮癌細胞株RERF-LC-AI、肝細胞癌臨床検体、乳癌細胞株BT474、腎臓癌細胞株293T、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株ACHN、及び肺腺癌細胞株H1373との関連性（以上、細胞株染色の結果に基づく）、並びに腎臓癌、肝細胞癌、胆肝癌、肺腺癌、及び膵癌との関連性（以上、組織染色の結果に基づく）が実験的に確認された。
【０１２８】
４．ITGA3に対する抗体
複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１３種の抗体クローンである。
015-003抗体　配列番号：８９(VH)；配列番号：９０(VH CDR1)；配列番号：９１(VH CDR2）；配列番号：９２(VH CDR3）；配列番号：９３(VL)；配列番号：９４(VL CDR1)；配列番号：９５(VL CDR2）；配列番号：９６(VL CDR3)
064-002抗体　配列番号：６７５(VH)；配列番号：６７６(VH CDR1)；配列番号：６７７(VH CDR2)；配列番号：６７８(VH CDR3)；配列番号：６７９(VL)；配列番号：６８０(VL CDR1)；配列番号：６８１(VL CDR2)；配列番号：６８２(VL CDR3)
064-006抗体　配列番号：６８３(VH)；配列番号：６８４(VH CDR1)；配列番号：６８５(VH CDR2)；配列番号：６８６(VH CDR3)；配列番号：６８７(VL)；配列番号：６８８(VL CDR1)；配列番号：６８９(VL CDR2)；配列番号：６９０(VL CDR3)
064-012a抗体　配列番号：６９１(VH)；配列番号：６９２(VH CDR1)；配列番号：６９

３(VH CDR2)；配列番号：６９４(VH CDR3)；配列番号：６９５(VL)；配列番号：６９６(VL CDR1)；配列番号：６９７(VL CDR2)；配列番号：６９８(VL CDR3)

064-012b抗体　配列番号：６９９(VH)；配列番号：７００(VH CDR1)；配列番号：７０１(VH CDR2)；配列番号：７０２(VH CDR3)；配列番号：７０３(VL)；配列番号：７０４(VL CDR1)；配列番号：７０５(VL CDR2)；配列番号：７０６(VL CDR3)

064-014抗体　配列番号：７０７(VH)；配列番号：７０８(VH CDR1)；配列番号：７０９(VH CDR2)；配列番号：７１０(VH CDR3)；配列番号：７１１(VL)；配列番号：７１２(VL CDR1)；配列番号：７１３(VL CDR2)；配列番号：７１４(VL CDR3)

064-054抗体　配列番号：７１５(VH)；配列番号：７１６(VH CDR1)；配列番号：７１７(VH CDR2)；配列番号：７１８(VH CDR3)；配列番号：７１９(VL)；配列番号：７２０(VL CDR1)；配列番号：７２１(VL CDR2)；配列番号：７２２(VL CDR3)

064-085抗体　配列番号：７２３(VH)；配列番号：７２４(VH CDR1)；配列番号：７２５(VH CDR2)；配列番号：７２６(VH CDR3)；配列番号：７２７(VL)；配列番号：７２８(VL CDR1)；配列番号：７２９(VL CDR2)；配列番号：７３０(VL CDR3)

064-093抗体　配列番号：７３１(VH)；配列番号：７３２(VH CDR1)；配列番号：７３３(VH CDR2)；配列番号：７３４(VH CDR3)；配列番号：７３５(VL)；配列番号：７３６(VL CDR1)；配列番号：７３７(VL CDR2)；配列番号：７３８(VL CDR3)

064-116抗体　配列番号：７３９(VH)；配列番号：７４０(VH CDR1)；配列番号：７４１(VH CDR2)；配列番号：７４２(VH CDR3)；配列番号：７４３(VL)；配列番号：７４４(VL CDR1)；配列番号：７４５(VL CDR2)；配列番号：７４６(VL CDR3)

065-183抗体　配列番号：７４７(VH)；配列番号：７４８(VH CDR1)；配列番号：７４９(VH CDR2)；配列番号：７５０(VH CDR3)；配列番号：７５１(VL)；配列番号：７５２(VL CDR1)；配列番号：７５３(VL CDR2)；配列番号：７５４(VL CDR3)

067-142抗体　配列番号：７６３(VH)；配列番号：７６４(VH CDR1)；配列番号：７６５(VH CDR2)；配列番号：７６６(VH CDR3)；配列番号：７６７(VL)；配列番号：７６８(VL CDR1)；配列番号：７６９(VL CDR2)；配列番号：７７０(VL CDR3)

068-007抗体　配列番号：７７１(VH)；配列番号：７７２(VH CDR1)；配列番号：７７３(VH CDR2)；配列番号：７７４(VH CDR3)；配列番号：７７５(VL)；配列番号：７７６(VL CDR1)；配列番号：７７７(VL CDR2)；配列番号：７７８(VL CDR3)

後述の実施例に示すように、これらの抗体と未分化型肝細胞癌細胞株HLF、卵巣癌細胞株SKOv3、腎臓癌細胞株ACHN、腎臓癌細胞株Caki-1、肺腺癌細胞株H1373、肺扁平上皮癌EBC1、外陰部粘膜上皮細胞株A431、乳癌細胞株BT474、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株CCFRC1、肝細胞癌細胞株OCTH、肝内胆管細胞癌RBE、膵臓癌細胞株PANC-1、膵臓癌細胞株MIA-Paca2、肺腺癌細胞株A549、肺腺癌細胞株NCI-N441、肺扁平上皮癌細胞株Calu-3、肺扁平上皮癌細胞株RERF-LC-AI、胃癌細胞株SNU5、胃癌細胞株MKN45、胃癌細胞株NCI-N87、大腸癌細胞株CW2、卵巣癌細胞株SKOv3、卵巣癌細胞株KF-28、卵巣癌細胞株RMG-1、及び卵巣癌細胞株RMG-2との関連性（以上、細胞株染色の結果に基づく）、並びに胆肝癌及び膵臓癌の関連性（以上、組織染色の結果に基づく）が実験的に確認された。

【０１２９】

５．ICAM1に対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。最終的に22種の抗体クローンが同定された。配列を詳細に解析したのは下記5種の抗体クローンである。

052-033抗体　配列番号：９７(VH)；配列番号：９８(VH CDR1)；配列番号：９９(VH CDR2)；配列番号：１００(VH CDR3)；配列番号：１０１(VL)；配列番号：１０２(VL CDR1)；配列番号：１０３(VL CDR2)；配列番号：１０４(VL CDR3)

053-042抗体　配列番号：１０５(VH)；配列番号：１０６(VH CDR1)；配列番号：１０７(VH CDR2)；配列番号：１０８(VH CDR3)；配列番号：１０９(VL)；配列番号：１１０(VL CDR1)；配列番号：１１１(VL CDR2)；配列番号：１１２(VL CDR3)

053-051抗体　配列番号：１１３(VH)；配列番号：１１４(VH CDR1)；配列番号：１１５

(VH CDR2）；配列番号：１１６(VH CDR3）；配列番号：１１７(VL)；配列番号：１１８(VL CDR1)；配列番号：１１９(VL CDR2）；配列番号：１２０(VL CDR3)

053-059抗体　配列番号：１２１(VH)；配列番号：１２２(VH CDR1)；配列番号：１２３(VH CDR2）；配列番号：１２４(VH CDR3）；配列番号：１２５(VL)；配列番号：１２６(VL CDR1)；配列番号：１２７(VL CDR2）；配列番号：１２８(VL CDR3)

053-085抗体　配列番号：１２９(VH)；配列番号：１３０(VH CDR1)；配列番号：１３１(VH CDR2）；配列番号：１３２(VH CDR3）；配列番号：１３３(VL)；配列番号：１３４(VL CDR1)；配列番号：１３５(VL CDR2）；配列番号：１３６(VL CDR3)

後述の実施例に示すように、これらの抗体と肝癌細胞株HepG2、肺腺癌細胞株PC14、及び腎臓臨床検体より樹立した細胞株との関連性（以上、細胞株染色の結果に基づく）、並びに肝細胞癌との関連性（以上、組織染色の結果に基づく）が実験的に確認された。

【０１３０】

６．ALCAMに対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記13種の抗体クローンである。

035-234抗体　配列番号：１３７(VH)；配列番号：１３８(VH CDR1)；配列番号：１３９(VH CDR2）；配列番号：１４０(VH CDR3）；配列番号：１４１(VL)；配列番号：１４２(VL CDR1)；配列番号：１４３(VL CDR2）；配列番号：１４４(VL CDR3)

040-107抗体　配列番号：１４５(VH)；配列番号：１４６(VH CDR1)；配列番号：１４７(VH CDR2）；配列番号：１４８(VH CDR3）；配列番号：１４９(VL)；配列番号：１５０(VL CDR1)；配列番号：１５１(VL CDR2）；配列番号：１５２(VL CDR3)

041-118抗体　配列番号：１５３(VH)；配列番号：１５４(VH CDR1)；配列番号：１５５(VH CDR2）；配列番号：１５６(VH CDR3）；配列番号：１５７(VL)；配列番号：１５８(VL CDR1)；配列番号：１５９(VL CDR2）；配列番号：１６０(VL CDR3)

066-174抗体　配列番号：１６１(VH)；配列番号：１６２(VH CDR1)；配列番号：１６３(VH CDR2）；配列番号：１６４(VH CDR3）；配列番号：１６５(VL)；配列番号：１６６(VL CDR1)；配列番号：１６７(VL CDR2）；配列番号：１６８(VL CDR3)

083-040抗体　配列番号：１６９(VH)；配列番号：１７０(VH CDR1)；配列番号：１７１(VH CDR2）；配列番号：１７２(VH CDR3）；配列番号：１７３(VL)；配列番号：１７４(VL CDR1)；配列番号：１７５(VL CDR2）；配列番号：１７６(VL CDR3)

029-143抗体　配列番号：７７９(VH)；配列番号：７８０(VH CDR1)；配列番号：７８１(VH CDR2)；配列番号７８２(VH CDR3)；配列番号：７８３(VL)；配列番号：７８４(VL CDR1)；配列番号：７８５(VL CDR2)；配列番号：７８６(VL CDR3)

045-134抗体　配列番号：７８７(VH)；配列番号：７８８(VH CDR1)；配列番号：７８９(VH CDR2)；配列番号：７９０(VH CDR3)；配列番号：７９１(VL)；配列番号：７９２(VL CDR1)；配列番号：７９３(VL CDR2)；配列番号：７９４(VL CDR3)

062-101抗体　配列番号：７９５(VH)；配列番号：７９６(VH CDR1)；配列番号：７９７(VH CDR2)；配列番号：７９８(VH CDR3)；配列番号：７９９(VL)；配列番号：８００(VL CDR1)；配列番号：８０１(VL CDR2)；配列番号：８０２(VL CDR3)

062-109抗体　配列番号：８０３(VH)；配列番号：８０４(VH CDR1)；配列番号：８０５(VH CDR2)；配列番号：８０６(VH CDR3)；配列番号：８０７(VL)；配列番号：８０８(VL CDR1)；配列番号：８０９(VL CDR2)；配列番号：８１０(VL CDR3)

084-103抗体　配列番号：８１１(VH)；配列番号：８１２(VH CDR1)；配列番号：８１３(VH CDR2)；配列番号：８１４(VH CDR3)；配列番号：８１５(VL)；配列番号：８１６(VL CDR1)；配列番号：８１７(VL CDR2)；配列番号：８１８(VL CDR3)

052-274抗体　配列番号：８１９(VH)；配列番号：８２０(VH CDR1)；配列番号：８２１(VH CDR2)；配列番号：８２２(VH CDR3)；配列番号：８２３(VL)；配列番号：８２４(VL CDR1)；配列番号：８２５(VL CDR2)；配列番号：８２６(VL CDR3)

029-067抗体　配列番号：８２７(VH)；配列番号：８２８(VH CDR1)；配列番号：８２９(VH CDR2)；配列番号：８３０(VH CDR3)；配列番号：８３１(VL)；配列番号：８３２(VL

CDR1)；配列番号：８３３(VL CDR2)；配列番号：８３４(VL CDR3)
083-131抗体　配列番号：８３５(VH)；配列番号：８３６(VH CDR1)；配列番号：８３７(VH CDR2)；配列番号：８３８(VH CDR3)；配列番号：８３９(VL)；配列番号：８４０(VL CDR1)；配列番号：８４１(VL CDR2)；配列番号：８４２(VL CDR3)
後述の実施例に示すように、これらの抗体と肝癌細胞株（HepG2、OCTH、Hep3B、HLF）、腎臓癌細胞株（Caki-1、CCFRC1、ACHN、293T、臨床検体より樹立した細胞株）、肺癌細胞株（PC14、NCI-H441、EBC-1、RERF-LC-AI、A549、H1373）、卵巣癌細胞株（SKOv3、KF-28、RMG1、RMG2）、胃癌細胞株（NCI-N87）、大腸癌細胞株（CW2）、乳癌細胞株（BT474）、急性骨髄性白血病AML臨床検体、及びハムスター卵巣癌細胞株CHOとの関連性（以上、細胞株染色の結果に基づく）、並びに腎臓癌、肝細胞癌、胆肝癌、肺扁平上皮癌、肺胞上皮癌、及び大腸腺癌との関連性（以上、組織染色の結果に基づく）が実験的に確認された。
【０１３１】
７．CD147に対する抗体
複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１種の抗体クローンである。
059-053抗体　配列番号：１７７(VH)；配列番号：１７８(VH CDR1)；配列番号：１７９(VH CDR2）；配列番号：１８０(VH CDR3）；配列番号：１８１(VL)；配列番号：１８２(VL CDR1)；配列番号：１８３(VL CDR2）；配列番号：１８４(VL CDR3)
後述の実施例に示すように、これらの抗体と肝臓癌細胞株HepG2、腎臓癌細胞株CCFRC1、腎臓癌細胞株ACHN、腎臓癌細胞株Caki-1、肺腺癌PC14、及び腎臓癌臨床検体より樹立細胞株との関連性（以上、細胞株染色の結果に基づく）、並びに腎臓癌との関連性（以上、組織染色の結果に基づく）が実験的に確認された。
【０１３２】
８．C1qRに対する抗体
複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１種の抗体クローンである。
070-016抗体　配列番号：４５１(VH)；配列番号：(VH CDR1)４５２；配列番号：４５３(VH CDR2)；配列番号：４５４(VH CDR3)；配列番号：４５５(VL)；配列番号：(VL CDR1)４５６；配列番号：４５７(VL CDR2)；配列番号：４５８(VL CDR3)
この抗体と白血病との関連性が実験的に確認された。即ち、この抗体を用いた細胞株染色では、白血病AML細胞株Nohno1及び白血病AML臨床検体で強陽性（MFI=20以上）であった。また、白血病細胞株を生育する過程において、この抗体を生育環境下に添加すると速やかなる癌細胞の凝集が確認出来る。しかもこれらの現象を引き起こすのに必要な抗体量は比較的低濃度である。
【０１３３】
９．CD44に対する抗体
複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１種の抗体クローンである。
064-003抗体　配列番号：４５９(VH)；配列番号：４６０(VH CDR1)；配列番号：４６１(VH CDR2)；配列番号：４６２(VH CDR3)；配列番号：４６３(VL)；配列番号：４６４(VL CDR1)；配列番号：４６５(VL CDR2)；配列番号：４６６(VL CDR3)
この抗体と肝癌、肺癌、卵巣癌、及び胃癌との関連性が実験的に確認された。即ち、この抗体を用いた細胞株染色では、肝細胞癌HLF、肺腺癌細胞株PC14、肺腺癌細胞株NCI-H1373、卵巣腺癌細胞株SKOv3で強陽性（MFI=20倍以上）であり、類表皮癌細胞株A431、肺扁平上皮癌EBC1で弱陽性（MFI=3倍以上）であった。また、この抗体を用いた免疫染色では、肺腺癌臨床検体において癌特異的染色像を示す例を認め、肺胞上皮癌、肺扁平上皮癌において癌部弱陽性であった。
【０１３４】
１０．CD73に対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１種の抗体クローンである。

067-213抗体　配列番号：４６７(VH)；配列番号：４６８(VH CDR1)；配列番号：４６９(VH CDR2)；配列番号：４７０(VH CDR3)；配列番号：４７１(VL)；配列番号：４７２(VL CDR1)；配列番号：４７３(VL CDR2)；配列番号：４７４(VL CDR3)

この抗体と肝癌、肺癌、及び卵巣癌との関連性が実験的に確認された。即ち、この抗体を用いた細胞株染色では、肺腺癌細胞株NCI-H1373、肺扁平上皮癌EBC1で強陽性（MFI=20倍以上）であり、肝癌細胞株HLF、卵巣腺癌細胞株SKOv3、肺腺癌細胞株PC14で弱陽性（MFI=3倍以上）であった。また、この抗体を用いた免疫染色では肺腺癌臨床検体において癌特異的染色像が得られ、肺扁平上皮癌において癌部弱陽性の染色像が得られた。

【０１３５】

１１．EpCAMに対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１種の抗体クローンである。

067-153抗体　配列番号：４７５(VH)；配列番号：４７６(VH CDR1)；配列番号：４７７(VH CDR2)；配列番号：４７８(VH CDR3)；配列番号：４７９(VL)；配列番号：４８０(VL CDR1)；配列番号：４８１(VL CDR2)；配列番号：４８２(VL CDR3)

この抗体と肝癌、肺癌、卵巣癌、胃癌、及び大腸癌との関連性が実験的に確認された。即ち、この抗体を用いた細胞株染色では、肺腺癌細胞株NCI-H1373、肺扁平上皮癌細胞株LK-2で強陽性（MFI=20倍以上）であり、肺扁平上皮癌EBC1、肺腺癌細胞株PC14で陽性（MFI=10倍以上）であり、卵巣腺癌細胞株SKOv3で弱陽性（MFI=3倍以上）であった。また、この抗体を用いた免疫染色では大腸癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、胃癌の各臨床検体において極めて良好な癌特異的染色像が得られ、一部の肝細胞癌臨床検体において癌部弱陽性の染色像が得られた。

【０１３６】

１２．HGFRに対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。最終的に８７種の抗体クローンが同定された。配列を詳細に解析したのは下記３種の抗体クローンである。

067-126抗体　配列番号：６５１(VH)；配列番号：６５２(VH CDR1)；配列番号：６５３(VH CDR2)；配列番号：６５４(VH CDR3)；配列番号：６５５(VL)；配列番号：６５６(VL CDR1)；配列番号：６５７(VL CDR2)；配列番号：６５８(VL CDR3)

067-133抗体　配列番号：６５９(VH)；配列番号：６６０(VH CDR1)；配列番号：６６１(VH CDR2)；配列番号：６６２(VH CDR3)；配列番号：６６３(VL)；配列番号：６６４(VL CDR1)；配列番号：６６５(VL CDR2)；配列番号：６６６(VL CDR3)

067-287抗体　配列番号：６６７(VH)；配列番号：６６８(VH CDR1)；配列番号：６６９(VH CDR2)；配列番号：６７０(VH CDR3)；配列番号：６７１(VL)；配列番号：６７２(VL CDR1)；配列番号：６７３(VL CDR2)；配列番号：６７４(VL CDR3)

これら抗体と肺癌、肝癌、卵巣癌、大腸癌、及び胃癌との関連性が実験的に確認された。即ち、これらの抗体を用いた細胞株染色では、肺扁平上皮癌EBC1で強陽性（MFI=20倍以上）であり、肺胞癌NCI-H1373で陽性（MFI=10倍以上）であり、類表皮癌細胞株A431、卵巣腺癌細胞株SKOv3、肺腺癌細胞株PC14、肝細胞癌HLFで弱陽性（MFI=3倍以上）であった。また、これらの抗体を用いた免疫染色では、一部の肺扁平上皮癌臨床検体において癌部弱陽性を認めた。

【０１３７】

１３．LARに対する抗体

複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記５種の抗体クローンである。

064-044抗体　配列番号：９４４(VH)；配列番号：９４５(VL)

065-030抗体　配列番号：９４６(VH)；配列番号：９４７(VL)

065-358抗体　配列番号：９４８(VH)；配列番号：９４９(VL)
066-019抗体　配列番号：９５０(VH)；配列番号：９５１(VL)
079-085抗体　配列番号：９５２(VH)；配列番号：９５３(VL)
これら抗体を用いた免疫染色では、一部の肺癌臨床検体において癌部に陽性を認めた。
【０１３８】
１４．BCAMに対する抗体
複数の抗体クローンが取得された。その中にはアミノ酸配列が同一のものも含まれていた。配列を詳細に解析したのは下記１種の抗体クローンである。
067-024抗体　配列番号：９５４(VH)；配列番号：９５５(VL)
この抗体を用いた免疫染色では、一部の肺癌、肝臓がん、腎臓がん臨床検体において癌部に陽性を認めた。
【０１３９】
この局面の第１の形態は、HER1に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)～(3)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備える。好ましくは以下の(4)～(6)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備える。更に好ましくは以下の(7)～(9)及び(13)～(18)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。最も好ましくは以下の(10)～(12)及び(19)～(24)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。
（CDR3の組合せ）
(1)配列番号：４、配列番号：８
(2)配列番号：１２、配列番号：１６
(3)配列番号：２０、配列番号：２４
【０１４０】
（CDR2とCDR3の組合せ）
(4)配列番号：３、配列番号：４、配列番号：７、配列番号：８
(5)配列番号：１１、配列番号：１２、配列番号：１５、配列番号：１６
(6)配列番号：１９、配列番号：２０、配列番号：２３、配列番号：２４
【０１４１】
（CDR1～CDR3の組合せ）
(7)配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：６配列番号：７、配列番号：８
(8)配列番号：１０、配列番号：１１、配列番号：１２、配列番号：１４、配列番号：１５、配列番号：１６
(9)配列番号：１８、配列番号：１９、配列番号：２０、配列番号：２２、配列番号：２３、配列番号：２４
(13)配列番号：４８４(VH CDR1)、配列番号：４８５(VH CDR2)、配列番号：４８６(VH CDR3)、配列番号：４８８(VL CDR1)、配列番号：４８９(VL CDR2)、配列番号：４９０(VL CDR3)
(14)配列番号：４９２(VH CDR1)、配列番号：４９３(VH CDR2)、配列番号：４９４(VH CDR3)、配列番号：４９６(VL CDR1)、配列番号：４９７(VL CDR2)、配列番号：４９８(VL C

DR3)
(15)、配列番号：５００(VH CDR1)、配列番号：５０１(VH CDR2)、配列番号：５０２(VH CDR3)、配列番号：５０４(VL CDR1)、配列番号：５０５(VL CDR2)、配列番号：５０６(VL CDR3)
(16)配列番号：５０８(VH CDR1)、配列番号：５０９(VH CDR2)、配列番号：５１０(VH CDR3)、配列番号：５１２(VL CDR1)、配列番号：５１３(VL CDR2)、配列番号：５１４(VL CDR3)
(17)配列番号：５１６(VH CDR1)、配列番号：５１７(VH CDR2)、配列番号：５１８(VH CDR3)、配列番号：５２０(VL CDR1)、配列番号：５２１(VL CDR2)、配列番号：５２２(VL CDR3)
(18)配列番号：５２４(VH CDR1)、配列番号：５２５(VH CDR2)、配列番号：５２６(VH CDR3)、配列番号：５２８(VL CDR1)、配列番号：５２９(VL CDR2)、配列番号：５３０(VL CDR3)

【０１４２】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(10)配列番号：１、配列番号：５
(11)配列番号：９、配列番号：１３
(12)配列番号：１７、配列番号：２１
(19)配列番号：４８３(VH)、配列番号：４８７(VL)
(20)配列番号：４９１(VH)、配列番号：４９５(VL)
(21)配列番号：４９９(VH)、配列番号：５０３(VL)
(22)配列番号：５０７(VH)、配列番号：５１１(VL)
(23)配列番号：５１５(VH)、配列番号：５１９(VL)
(24)配列番号：５２３(VH)、配列番号：５２７(VL)

【０１４３】

尚、(1)、(4)、(7)、(10)は048-006抗体に対応し、(2)、(5)、(8)、(11)は057-091抗体に対応し、(3)、(6)、(9)、(12)は059-152抗体に対応し、(13)、(19)は048-040抗体に対応し、(14)、(20)は054-101抗体に対応し、(15)、(21)は055-147抗体に対応し、(16)、(22)は059-173抗体に対応し、(17)、(23)は067-149抗体に対応し、(18)、(24)は067-176抗体に対応する。従って本発明の抗体ではHER1に対する高い特異性を期待できる。

【０１４４】

この局面の第２の形態は、HER2に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備える。好ましくは以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備える。更に好ましくは以下の(3)及び(5)～(19)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。最も好ましくは以下の(4)及び(20)～(34)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR3の組合せ）
(1)配列番号：２８、配列番号：３２

【０１４５】

（CDR2とCDR3の組合せ）
(2)配列番号：２７、配列番号：２８、配列番号：３１、配列番号：３２
【０１４６】
（CDR1～CDR3の組合せ）
(3)配列番号：２６、配列番号：２７、配列番号：２８、配列番号：３０、配列番号：３１、配列番号：３２
(5)配列番号：５３２(VH CDR1)、配列番号：５３３(VH CDR2)、配列番号：５３４(VH CDR3)、配列番号：５３６(VL CDR1)、配列番号：５３７(VL CDR2)、配列番号：５３８(VL CDR3)
(6)配列番号：５４０(VH CDR1)、配列番号：５４１(VH CDR2)、配列番号：５４２(VH CDR3)、配列番号：５４４(VL CDR1)、配列番号：５４５(VL CDR2)、配列番号：５４６(VL CDR3)
(7)配列番号：５４８(VH CDR1)、配列番号：５４９(VH CDR2)、配列番号：５５０(VH CDR3)、配列番号：５５２(VL CDR1)、配列番号：５５３(VL CDR2)、配列番号：５５４(VL CDR3)
(8)配列番号：５５６(VH CDR1)、配列番号：５５７(VH CDR2)、配列番号：５５８(VH CDR3)、配列番号：５６０(VL CDR1)、配列番号：５６１(VL CDR2)、配列番号：５６２(VL CDR3)
(9)配列番号：５６４(VH CDR1)、配列番号：５６５(VH CDR2)、配列番号：５６６(VH CDR3)、配列番号：５６８(VL CDR1)、配列番号：５６９(VL CDR2)、配列番号：５７０(VL CDR3)
(10)配列番号：５７２(VH CDR1)、配列番号：５７３(VH CDR2)、配列番号：５７４(VH CDR3)、配列番号：５７６(VL CDR1)、配列番号：５７７(VL CDR2)、配列番号：５７８(VL CDR3)
(11)配列番号：５８０(VH CDR1)、配列番号：５８１(VH CDR2)、配列番号：５８２(VH CDR3)、配列番号：５８４(VL CDR1)、配列番号：５８５(VL CDR2)、配列番号：５８６(VL CDR3)
(12)配列番号：５８８(VH CDR1)、配列番号：５８９(VH CDR2)、配列番号：５９０(VH CDR3)、配列番号：５９２(VL CDR1)、配列番号：５９３(VL CDR2)、配列番号：５９４(VL CDR3)
(13)配列番号：５９６(VH CDR1)、配列番号：５９７(VH CDR2)、配列番号：５９８(VH CDR3)、配列番号：６００(VL CDR1)、配列番号：６０１(VL CDR2)、配列番号：６０２(VL CDR3)
(14)配列番号：６０４(VH CDR1)、配列番号：６０５(VH CDR2)、配列番号：６０６(VH CDR3)、配列番号：６０８(VL CDR1)、配列番号：６０９(VL CDR2)、配列番号：６１０(VL CDR3)
(15)配列番号：６１２(VH CDR1)、配列番号：６１３(VH CDR2)、配列番号：６１４(VH CDR3)、配列番号：６１６(VL CDR1)、配列番号：６１７(VL CDR2)、配列番号：６１８(VL CDR3)
(16)配列番号：６２０(VH CDR1)、配列番号：６２１(VH CDR2)、配列番号：６２２(VH CDR3)、配列番号：６２４(VL CDR1)、配列番号：６２５(VL CDR2)、配列番号：６２６(VL CDR3)
(17)配列番号：６２８(VH CDR1)、配列番号：６２９(VH CDR2)、配列番号：６３０(VH CDR3)、配列番号：６３２(VL CDR1)、配列番号：６３３(VL CDR2)、配列番号：６３４(VL CDR3)
(18)配列番号：６３６(VH CDR1)、配列番号：６３７(VH CDR2)、配列番号：６３８(VH CDR3)、配列番号：６４０(VL CDR1)、配列番号：６４１(VL CDR2)、配列番号：６４２(VL CDR3)
(19)配列番号：６４４(VH CDR1)、配列番号：６４５(VH CDR2)、配列番号：６４６(VH CDR3)、配列番号：６４８(VL CDR1)、配列番号：６４９(VL CDR2)、配列番号：６５０(VL C

DR3)
【０１４７】
（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(4)配列番号：２５、配列番号：２９
(20)配列番号：５３１(VH)、配列番号：５３５(VL)
(21)配列番号：５３９(VH)、配列番号：５４３(VL)
(22)配列番号：５４７(VH)、配列番号：５５１(VL)
(23)配列番号：５５５(VH)、配列番号：５５９(VL)
(24)配列番号：５６３(VH)、配列番号：５６７(VL)
(25)配列番号：５７１(VH)、配列番号：５７５(VL)
(26)配列番号：５７９(VH)、配列番号：５８３(VL)
(27)配列番号：５８７(VH)、配列番号：５９１(VL)
(28)配列番号：５９５(VH)、配列番号：５９９(VL)
(29)配列番号：６０３(VH)、配列番号：６０７(VL)
(30)配列番号：６１１(VH)、配列番号：６１５(VL)
(31)配列番号：６１９(VH)、配列番号：６２３(VL)
(32)配列番号：６２７(VH)、配列番号：６３１(VL)
(33)配列番号：６３５(VH)、配列番号：６３９(VL)
(34)配列番号：６４３(VH)、配列番号：６４７(VL)
【０１４８】
尚、(1)～(4)は015-126抗体に対応し、(5)、(20)は015-044抗体に対応し、(6)、(21)は015-102抗体に対応し、(7)、(22)は015-136抗体に対応し、(8)、(23)は015-143抗体に対応し、(9)、(24)は015-209抗体に対応し、(10)、(25)は039-016抗体に対応し、(11)、(26)は053-216抗体に対応し、(12)、(27)は075-024抗体に対応し、(13)、(28)は075-110抗体に対応し、(14)、(29)は086-032抗体に対応し、(15)、(30)は086-035抗体に対応し、(16)、(31)は086-036抗体に対応し、(17)、(32)は086-061抗体に対応し、(18)、(33)は086-138抗体に対応し、(19)、(34)は086-182抗体に対応する。従って本発明の抗体ではHER2に対する高い特異性を期待できる。
【０１４９】
この局面の第３の形態は、CD46抗原に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)～(7)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備える。好ましくは以下の(8)～(14)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備える。更に好ましくは以下の(15)～(21)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。最も好ましくは以下の(22)～(28)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。
（CDR3の組合せ）
(1)配列番号：３６、配列番号：４０
(2)配列番号：４４、配列番号：４８
(3)配列番号：５２、配列番号：５６
(4)配列番号：６０、配列番号：６４

(5)配列番号：６８、配列番号：７２
(6)配列番号：７６、配列番号：８０
(7)配列番号：８４、配列番号：８８
【０１５０】
（CDR2とCDR3の組合せ）
(8)配列番号：３５、配列番号：３６、配列番号：３９、配列番号：４０
(9)配列番号：４３、配列番号：４４、配列番号：４７、配列番号：４８
(10)配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５５、配列番号：５６
(11)配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６３、配列番号：６４
(12)配列番号：６７、配列番号：６８、配列番号：７１、配列番号：７２
(13)配列番号：７５、配列番号：７６、配列番号：７９、配列番号：８０
(14)配列番号：８３、配列番号：８４、配列番号：８７、配列番号：８８
【０１５１】
（CDR1～CDR3の組合せ）
(15)配列番号：３４、配列番号：３５、配列番号：３６、配列番号：３８、配列番号：３９、配列番号：４０
(16)配列番号：４２、配列番号：４３、配列番号：４４、配列番号：４６、配列番号：４７、配列番号：４８
(17)配列番号：５０、配列番号：５１、配列番号：５２、配列番号：５４、配列番号：５５、配列番号：５６
(18)配列番号：５８、配列番号：５９、配列番号：６０、配列番号：６２、配列番号：６３、配列番号：６４
(19)配列番号：６６、配列番号：６７、配列番号：６８、配列番号：７０、配列番号：７１、配列番号：７２
(20)配列番号：７４、配列番号：７５、配列番号：７６、配列番号：７８、配列番号：７９、配列番号：８０
(21)配列番号：８２、配列番号：８３、配列番号：８４、配列番号：８６、配列番号：８７、配列番号：８８
(22)配列番号：７５６(VH CDR1)、配列番号：７５７(VH CDR2)、配列番号：７５８(VH CDR3)、配列番号：７６０(VL CDR1)、配列番号：７６１(VL CDR2)、配列番号：７６２(VL CDR3)
【０１５２】
（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(23)配列番号：３３、配列番号：３７
(24)配列番号：４１、配列番号：４５
(25)配列番号：４９、配列番号：５３
(26)配列番号：５７、配列番号：６１
(27)配列番号：６５、配列番号：６９
(28)配列番号：７３、配列番号：７７
(29)配列番号：８１、配列番号：８５
(30)配列番号：７５５(VH)、配列番号：７５９(VL)
【０１５３】
尚、(1)、(8)、(15)、(23)は035-224抗体に対応し、(2)、(9)、(16)、(24)は045-011抗体に対応し、(3)、(10)、(17)、(25)は051-144抗体に対応し、(4)、(11)、(18)、(26)は052-053抗体に対応し、(5)、(12)、(19)、(27)は052-073抗体に対応し、(6)、(13)、(20)、(28)は053-049抗体に対応し、(7)、(14)、(21)、(29)は3172-120抗体に対応し、(22)、(30)は066-069抗体に対応する。従って本発明の抗体ではCD46抗原に対する高い特異性を期待できる。
【０１５４】
この局面の第４の形態は、ITGA3に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供

する。この形態の抗体は、以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備える。好ましくは以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備える。更に好ましくは以下の(3)及び(5)～(17)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。最も好ましくは以下の(4)及び(18)～(30)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR3の組合せ）

(1)配列番号：９２、配列番号：９６

【０１５５】

（CDR2とCDR3の組合せ）

(2)配列番号：９１、配列番号：９２、配列番号：９５、配列番号：９６

【０１５６】

（CDR1～CDR3の組合せ）

(3)配列番号：９０、配列番号：９１、配列番号：９２、配列番号：９４、配列番号：９５、配列番号：９６

(5)配列番号：６７６(VH CDR1)、配列番号：６７７(VH CDR2)、配列番号：６７８(VH CDR3)、配列番号：６８０(VL CDR1)、配列番号：６８１(VL CDR2)、配列番号：６８２(VL CDR3)

(6)配列番号：６８４(VH CDR1)、配列番号：６８５(VH CDR2)、配列番号：６８６(VH CDR3)、配列番号：６８８(VL CDR1)、配列番号：６８９(VL CDR2)、配列番号：６９０(VL CDR3)

(7)配列番号：６９２(VH CDR1)、配列番号：６９３(VH CDR2)、配列番号：６９４(VH CDR3)、配列番号：６９６(VL CDR1)、配列番号：６９７(VL CDR2)、配列番号：６９８(VL CDR3)

(8)配列番号：７００(VH CDR1)、配列番号：７０１(VH CDR2)、配列番号：７０２(VH CDR3)、配列番号：７０４(VL CDR1)、配列番号：７０５(VL CDR2)、配列番号：７０６(VL CDR3)

(9)配列番号：７０８(VH CDR1)、配列番号：７０９(VH CDR2)、配列番号：７１０(VH CDR3)、配列番号：７１２(VL CDR1)、配列番号：７１３(VL CDR2)、配列番号：７１４(VL CDR3)

(10)配列番号：７１６(VH CDR1)、配列番号：７１７(VH CDR2)、配列番号：７１８(VH CDR3)、配列番号：７２０(VL CDR1)、配列番号：７２１(VL CDR2)、配列番号：７２２(VL CDR3)

(11)配列番号：７２４(VH CDR1)、配列番号：７２５(VH CDR2)、配列番号：７２６(VH CDR3)、配列番号：７２８(VL CDR1)、配列番号：７２９(VL CDR2)、配列番号：７３０(VL CDR3)

(12)配列番号：７３２(VH CDR1)、配列番号：７３３(VH CDR2)、配列番号：７３４(VH CDR3)、配列番号：７３６(VL CDR1)、配列番号：７３７(VL CDR2)、配列番号：７３８(VL CDR3)

(13)配列番号：７４０(VH CDR1)、配列番号：７４１(VH CDR2)、配列番号：７４２(VH CDR3)、配列番号：７４４(VL CDR1)、配列番号：７４５(VL CDR2)、配列番号：７４６(VL C

DR3)
(14)配列番号：７４８(VH CDR1)、配列番号：７４９(VH CDR2)、配列番号：７５０(VH CDR3)、配列番号：７５２(VL CDR1)、配列番号：７５３(VL CDR2)、配列番号：７５４(VL CDR3)
(15)配列番号：７６４(VH CDR1)、配列番号：７６５(VH CDR2)、配列番号：７６６(VH CDR3)、配列番号：７６８(VL CDR1)、配列番号：７６９(VL CDR2)、配列番号：７７０(VL CDR3)
(16)配列番号：７７２(VH CDR1)、配列番号：７７３(VH CDR2)、配列番号：７７４(VH CDR3)、配列番号：７７６(VL CDR1)、配列番号：７７７(VL CDR2)、配列番号：７７８(VL CDR3)

【０１５７】
（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(4)配列番号：８９、配列番号：９３
(17)配列番号：６７５(VH)、配列番号：６７９(VL)
(18)配列番号：６８３(VH)、配列番号：６８７(VL)
(19)配列番号：６９１(VH)、配列番号：６９５(VL)
(20)配列番号：６９９(VH)、配列番号：７０３(VL)
(21)配列番号：７０７(VH)、配列番号：７１１(VL)
(22)配列番号：７１５(VH)、配列番号：７１９(VL)
(23)配列番号：７２３(VH)、配列番号：７２７(VL)
(24)配列番号：７３１(VH)、配列番号：７３５(VL)
(25)配列番号：７３９(VH)、配列番号：７４３(VL)
(26)配列番号：７４７(VH)、配列番号：７５１(VL)
(27)配列番号：７６３(VH)、配列番号：７６７(VL)
(28)配列番号：７７１(VH)、配列番号：７７５(VL)

【０１５８】
尚、(1)～(4)は015-003抗体に対応し、(5)、(17)は064-002抗体に対応し、(6)、(18)は064-006抗体に対応し、(7)、(19)は064-012a抗体に対応し、(8)、(20)は064-012b抗体に対応し、(9)、(21)は064-014抗体に対応し、(10)、(22)は064-054抗体に対応し、(11)、(23)は064-085抗体に対応し、(12)、(24)は064-093抗体に対応し、(13)、(25)は064-116抗体に対応し、(14)、(26)は065-183抗体に対応し、(15)、(27)は067-142抗体に対応し、(16)、(28)は068-007抗体に対応する。従って本発明の抗体ではITGA3に対する高い特異性を期待できる。

【０１５９】
この局面の第５の形態は、ICAM1に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)～(5)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備える。好ましくは以下の(6)～(10)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備える。更に好ましくは以下の(11)～(15)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。最も好ましくは以下の(16)～(20)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR3の組合せ）
(1)配列番号：１００、配列番号：１０４
(2)配列番号：１０８、配列番号：１１２
(3)配列番号：１１６、配列番号：１２０
(4)配列番号：１２４、配列番号：１２８
(5)配列番号：１３２、配列番号：１３６
【０１６０】
（CDR2とCDR3の組合せ）
(6)配列番号：９９、配列番号：１００、配列番号：１０３、配列番号：１０４
(7)配列番号：１０７、配列番号：１０８、配列番号：１１１、配列番号：１１２
(8)配列番号：１１５、配列番号：１１６、配列番号：１１９、配列番号：１２０
(9)配列番号：１２３、配列番号：１２４、配列番号：１２７、配列番号：１２８
(10)配列番号：１３１、配列番号：１３２、配列番号：１３５、配列番号：１３６
【０１６１】
（CDR1～CDR3の組合せ）
(11)配列番号：９８、配列番号：９９、配列番号：１００、配列番号：１０２、配列番号：１０３、配列番号：１０４
(12)配列番号：１０６、配列番号：１０７、配列番号：１０８、配列番号：１１０、配列番号：１１１、配列番号：１１２
(13)配列番号：１１４、配列番号：１１５、配列番号：１１６、配列番号：１１８、配列番号：１１９、配列番号：１２０
(14)配列番号：１２２、配列番号：１２３、配列番号：１２４、配列番号：１２６、配列番号：１２７、配列番号：１２８
(15)配列番号：１３０、配列番号：１３１、配列番号：１３２、配列番号：１３４、配列番号：１３５、配列番号：１３６
【０１６２】
（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(16)配列番号：９７、配列番号：１０１
(17)配列番号：１０５、配列番号：１０９
(18)配列番号：１１３、配列番号：１１７
(19)配列番号：１２１、配列番号：１２５
(20)配列番号：１２９、配列番号：１３３
【０１６３】
尚、(1)、(6)、(11)、(16)は052-033抗体に対応し、(2)、(7)、(12)、(17)は053-042抗体に対応し、(3)、(8)、(13)、(18)は053-051抗体に対応し、(4)、(9)、(14)、(19)は053-059抗体に対応し、(5)、(10)、(15)、(20)は053-085抗体に対応する。従って本発明の抗体ではICAM1に対する高い特異性を期待できる。
【０１６４】
この局面の第６の形態は、ALCAMに対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)～(5)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備える。好ましくは以下の(６)～(10)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備える。更に好ましくは以下の(11)～(15)及び(21)～(28)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領

域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。最も好ましくは以下の(16)～(20)及び(29)～(36)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR3の組合せ）

(1)配列番号：１４０、配列番号：１４４

(2)配列番号：１４８、配列番号：１５２

(3)配列番号：１５６、配列番号：１６０

(4)配列番号：１６４、配列番号：１６８

(5)配列番号：１７２、配列番号：１７６

【０１６５】

（CDR2とCDR3の組合せ）

(6)配列番号：１３９、配列番号：１４０、配列番号：１４３、配列番号：１４４

(7)配列番号：１４７、配列番号：１４８、配列番号：１５１、配列番号：１５２

(8)配列番号：１５５、配列番号：１５６、配列番号：１５９、配列番号：１６０

(9)配列番号：１６３、配列番号：１６４、配列番号：１６７、配列番号：１６８

(10)配列番号：１７１、配列番号：１７２、配列番号：１７５、配列番号：１７６

【０１６６】

（CDR1～CDR3の組合せ）

(11)配列番号：１３８、配列番号：１３９、配列番号：１４０、配列番号：１４２、配列番号：１４３、配列番号：１４４

(12)配列番号：１４６、配列番号：１４７、配列番号：１４８、配列番号：１５０、配列番号：１５１、配列番号：１５２

(13)配列番号：１５４、配列番号：１５５、配列番号：１５６、配列番号：１５８、配列番号：１５９、配列番号：１６０

(14)配列番号：１６２、配列番号：１６３、配列番号：１６４、配列番号：１６６、配列番号：１６７、配列番号：１６８

(15)配列番号：１７０、配列番号：１７１、配列番号：１７２、配列番号：１７４、配列番号：１７５、配列番号：１７６

(21)配列番号：７８０(VH CDR1)、配列番号：７８１(VH CDR2)、配列番号７８２(VH CDR3)、配列番号：７８４(VL CDR1)、配列番号：７８５(VL CDR2)、配列番号：７８６(VL CDR3)

(22)配列番号：７８８(VH CDR1)、配列番号：７８９(VH CDR2)、配列番号：７９０(VH CDR3)、配列番号：７９２(VL CDR1)、配列番号：７９３(VL CDR2)、配列番号：７９４(VL CDR3)

(23)配列番号：７９６(VH CDR1)、配列番号：７９７(VH CDR2)、配列番号：７９８(VH CDR3)、配列番号：８００(VL CDR1)、配列番号：８０１(VL CDR2)、配列番号：８０２(VL CDR3)

(24)配列番号：８０４(VH CDR1)、配列番号：８０５(VH CDR2)、配列番号：８０６(VH CDR3)、配列番号：８０８(VL CDR1)、配列番号：８０９(VL CDR2)、配列番号：８１０(VL CDR3)

(25)配列番号：８１２(VH CDR1)、配列番号：８１３(VH CDR2)、配列番号：８１４(VH CDR3)、配列番号：８１６(VL CDR1)、配列番号：８１７(VL CDR2)、配列番号：８１８(VL CDR3)

(26)配列番号：８２０(VH CDR1)、配列番号：８２１(VH CDR2)、配列番号：８２２(VH CDR3)、配列番号：８２４(VL CDR1)、配列番号：８２５(VL CDR2)、配列番号：８２６(VL CDR3)

(27)配列番号：８２８(VH CDR1)、配列番号：８２９(VH CDR2)、配列番号：８３０(VH CDR3)、配列番号：８３２(VL CDR1)、配列番号：８３３(VL CDR2)、配列番号：８３４(VL C

DR3)
(28)配列番号：８３６(VH CDR1)、配列番号：８３７(VH CDR2)、配列番号：８３８(VH CDR3)、配列番号：８４０(VL CDR1)、配列番号：８４１(VL CDR2)、配列番号：８４２(VL CDR3)
【０１６７】
（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(16)配列番号：１３７、配列番号：１４１
(17)配列番号：１４５、配列番号：１４９
(18)配列番号：１５３、配列番号：１５７
(19)配列番号：１６１、配列番号：１６５
(20)配列番号：１６９、配列番号：１７３
(29)配列番号：７７９(VH)、配列番号：７８３(VL)
(30)配列番号：７８７(VH)、配列番号：７９１(VL)
(31)配列番号：７９５(VH)、配列番号：７９９(VL)
(32)配列番号：８０３(VH)、配列番号：８０７(VL)
(33)配列番号：８１１(VH)、配列番号：８１５(VL)
(34)配列番号：８１９(VH)、配列番号：８２３(VL)
(35)配列番号：８２７(VH)、配列番号：８３１(VL)
(36)配列番号：８３５(VH)、配列番号：８３９(VL)
【０１６８】
尚、(1)、(6)、(11)、(16)は035-234抗体に対応し、(2)、(7)、(12)、(17)は040-107抗体に対応し、(3)、(8)、(13)、(18)は041-118抗体に対応し、(4)、(9)、(14)、(19)は066-174抗体に対応し、(5)、(10)、(15)、(20)は083-040抗体に対応し、(21)、(29)は029-143抗体に対応し、(22)、(30)は045-134抗体に対応し、(23)、(31)は062-101抗体に対応し、(24)、(32)は062-109抗体に対応し、(25)、(33)は084-103抗体に対応し、(26)、(34)は052-274抗体に対応し、(27)、(35)は029-067抗体に対応し、(28)、(36)は083-131抗体に対応する。従って本発明の抗体ではALCAMに対する高い特異性を期待できる。
【０１６９】
この局面の第７の形態は、CD147抗原に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される重鎖可変領域CDR3と軽鎖可変領域CDR3を備える。好ましくは以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR2及びCDR3と軽鎖可変領域CDR2及びCDR3を備える。更に好ましくは以下の(3)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。最も好ましくは以下の(4)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。
（CDR3の組合せ）
(1)配列番号：１８０、配列番号：１８４
【０１７０】
（CDR2とCDR3の組合せ）
(2)配列番号：１７９、配列番号：１８０、配列番号：１８３、配列番号：１８４
【０１７１】
（CDR1～CDR3の組合せ）

(3)配列番号：１７８、配列番号：１７９、配列番号：１８０、配列番号：１８２、配列番号：１８３、配列番号：１８４

【０１７２】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）

(4)配列番号：１７７、配列番号：１８１

【０１７３】

尚、(1)～(4)は059-053抗体に対応する。従って本発明の抗体ではCD147抗原に対する高い特異性を期待できる。

【０１７４】

この局面の第８の形態は、C1qRに対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。好ましくは以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR1～CDR3の組合せ）

(1)配列番号：(VH CDR1)４５２、配列番号：４５３(VH CDR2)、配列番号：４５４(VH CDR3)、配列番号：(VL CDR1)４５６、配列番号：４５７(VL CDR2)、配列番号：４５８(VL CDR3)

【０１７５】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）

(2)配列番号：４５１(VH)、配列番号：４５５(VL)

【０１７６】

尚、(1)、(2)は070-016抗体に対応する。従って本発明の抗体ではC1qRに対する高い特異性を期待できる。

【０１７７】

この局面の第９の形態は、CD44に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。好ましくは以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR1～CDR3の組合せ）

(1)配列番号：４６０(VH CDR1)、配列番号：４６１(VH CDR2)、配列番号：４６２(VH CDR3)、配列番号：４６４(VL CDR1)、配列番号：４６５(VL CDR2)、配列番号：４６６(VL CDR3)

【０１７８】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）

(2)配列番号：４５９(VH)、配列番号：４６３(VL)

【０１７９】

尚、(1)、(2)は064-003抗体に対応する。従って本発明の抗体ではCD44に対する高い特異性を期待できる。

【０１８０】

この局面の第１０の形態は、CD73に対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供

する。この形態の抗体は、以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。好ましくは以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR1～CDR3の組合せ）

(1)配列番号：４６８(VH CDR1)、配列番号：４６９(VH CDR2)、配列番号：４７０(VH CDR3)、配列番号：４７２(VL CDR1)、配列番号：４７３(VL CDR2)、配列番号：４７４(VL CDR3)

【０１８１】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）

(2)配列番号：４６７(VH)、配列番号：４７１(VL)

【０１８２】

尚、(1)、(2)は067-213抗体に対応する。従って本発明の抗体ではCD73に対する高い特異性を期待できる。

【０１８３】

この局面の第１１の形態は、EpCAMに対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。好ましくは以下の(2)に示す配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR1～CDR3の組合せ）

(1)配列番号：４７６(VH CDR1)、配列番号：４７７(VH CDR2)、配列番号：４７８(VH CDR3)、配列番号：４８０(VL CDR1)、配列番号：４８１(VL CDR2)、配列番号：４８２(VL CDR3)

【０１８４】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）

(2)配列番号：４７５(VH)、
配列番号：４７９(VL)

【０１８５】

尚、(1)、(2)は067-153抗体に対応する。従って本発明の抗体ではEpCAMに対する高い特異性を期待できる。

【０１８６】

この局面の第１２の形態は、HGFRに対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)～(3)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域CDR1～CDR3と軽鎖可変領域CDR1～CDR3を備える。好ましくは以下の(4)～(6)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

（CDR1～CDR3の組合せ）

(1)配列番号：６５２(VH CDR1)、配列番号：６５３(VH CDR2)、配列番号：６５４(VH CDR3)、配列番号：６５６(VL CDR1)、配列番号：６５７(VL CDR2)、配列番号：６５８(VL CDR3)
(2)配列番号：６６０(VH CDR1)、配列番号：６６１(VH CDR2)、配列番号：６６２(VH CDR3)、配列番号：６６４(VL CDR1)、配列番号：６６５(VL CDR2)、配列番号：６６６(VL CDR3)
(3)配列番号：６６８(VH CDR1)、配列番号：６６９(VH CDR2)、配列番号：６７０(VH CDR3)、配列番号：６７２(VL CDR1)、配列番号：６７３(VL CDR2)、配列番号：６７４(VL CDR3)

【０１８７】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(4)配列番号：６５１(VH)、配列番号：６５５(VL)
(5)配列番号：６５９(VH)、配列番号：６６３(VL)
(6)配列番号：６６７(VH)、配列番号：６７１(VL)

【０１８８】

尚、(1)、(4)は067-126抗体に対応し、(2)、(5)は067-133抗体に対応し、(3)、(6)は067-287抗体に対応する。従って本発明の抗体ではHGFRに対する高い特異性を期待できる。

【０１８９】

この局面の第１３の形態は、LARに対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)～(5)からなる群より選択される配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

【０１９０】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(1)配列番号：９４４(VH)、配列番号：９４５(VL)
(2)配列番号：９４６(VH)、配列番号：９４７(VL)
(3)配列番号：９４８(VH)、配列番号：９４９(VL)
(4)配列番号：９５０(VH)、配列番号：９５１(VL)
(5)配列番号：９５２(VH)、配列番号：９５３(VL)

【０１９１】

尚、(1)は064-044抗体に対応し、(2)は065-030抗体に対応し、(3)は065-358抗体に対応し、(4)は066-019抗体に対応し、(5)は079-085抗体に対応する。従って本発明の抗体ではLARに対する高い特異性を期待できる。

【０１９２】

この局面の第１４の形態は、BCAMに対する特異的結合性を有する単離された抗体を提供する。この形態の抗体は、以下の(1)の配列番号の組合せ（重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す配列番号）で規定される、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を備える。

【０１９３】

（重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組合せ）
(1)配列番号：９５４(VH)、配列番号：９５５(VL)

【０１９４】

尚、(1)は067-024抗体に対応する。従って本発明の抗体ではBCAMに対する高い特異性を期待できる。

【０１９５】

本発明の抗体の可変領域においてフレームワーク領域（FR領域）の配列は、対応する抗原に対する特異的結合性に実質的な影響のない限り、特に限定されない。例えば、本発明の抗体をヒト化抗体として構築する場合には、公知のヒト抗体のFR領域を用いることができる。また、検出用の試薬として使用される抗体又はヒト以外の動物種への適用に使用される抗体を構築する場合など、ヒト抗体FR領域を使用しなくとも期待される効果が奏され

る場合やヒト抗体FR領域を使用することがむしろ適当でない場合がある。このような場合には、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）のFR領域を用いることができる。

【０１９６】

本発明の抗体は一態様において、可変領域に加えて定常領域を含む（例えばIgG型抗体の場合など）。当該態様における定常領域の配列は特に限定されない。例えば、後述のように本発明の抗体をヒト化抗体として構築する場合には、公知のヒト抗体の定常領域を用いることができる。また、上記FR領域と同様に、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）の定常領域を用いることもできる。

【０１９７】

本発明の抗体の一形態はヒト化抗体である。ここでの「ヒト化抗体」とは、ヒトの抗体に構造を類似させた抗体のことをいい、抗体の定常領域のみをヒト抗体のものに置換したヒト型キメラ抗体、及び定常領域及び可変領域に存在するCDR（相補性決定領域）以外の部分をヒト抗体のものに置換したヒト型CDR移植（CDR-grafted）抗体（P.T.Johons et al., Nature 321,522(1986)）を含む。ヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を高めるため、マウス抗体と相同性の高いヒト抗体FRを選択する方法、相同性の高いヒト型化抗体を作製する方法、ヒト抗体にマウスCDRを移植した後さらにFR領域のアミノ酸を置換する方法の改良技術もすでに開発され（米国特許第5585089号、米国特許第5693761号、米国特許第5693762号、米国特許第6180370号、欧州特許第451216号、欧州特許第682040号、特許第2828340号などを参照）、本発明のヒト型抗体の作製に利用することもできる。

ヒト型キメラ抗体は例えば、上記のH鎖可変領域の構造及び／又はL鎖可変領域の構造を有する抗体の定常領域をヒト抗体の定常領域に置換することにより作製することができる。ヒト抗体の定常領域としては公知のものを採用することができる。以下に、ヒト型キメラ抗体の作製方法の一例を示す。

まず、特定の抗原（例えば、今回判明した特定癌発現性抗原のHER1、HER2、CD46、ITGA3、ICAM1、ALCAM、又はCD147等）に対するマウス抗体を産生するハイブリドーマよりmRNAを抽出し、常法に従ってcDNAを合成する。合成したcDNAをベクターに組み込みcDNAライブラリーを構築する。このcDNAライブラリーから、H鎖遺伝子フラグメント及びL鎖遺伝子フラグメントをプローブとして用いることにより、H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を含有するベクターを選択する。選択されたベクターの挿入配列のシークエンシングを行うことにより、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の遺伝子の配列が決定される。このようにして得られた配列データを基にH鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等により作製する。得られたH鎖可変領域をコードするDNAを、ヒトH鎖定常領域をコードするDNAとライゲーションして発現用ベクターに組込むことによりH鎖発現ベクターを作製する。発現ベクターとしては例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV（パピローマウイルス）basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。一方、同様の方法によりL鎖発現ベクターを作製する。これらH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としてはCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright& S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998))、SP2/0細胞(マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5,512-519 (1996),R.P.Junghans et al.,Cancer Res.50,1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,6077 (1989), P.L.Felgner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb,Virology 52,456-467(1973))、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型キメラ抗体を分離する。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫安分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて利用することができる。

【０１９８】

一方、ヒト型CDR移植抗体は例えば以下の方法により作製することができる。まず、上

記キメラ抗体の製造方法の欄で述べた方法により、特定の抗原に対する抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を決定する。併せて各CDR領域のアミノ酸配列及び塩基配列を決定する。

具体的なCDRの塩基配列として、以下のいずれかの組合せを用いることが好ましい。尚、重鎖可変領域CDR1の塩基配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR2の塩基配列を示す配列番号、重鎖可変領域CDR3の塩基配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR1の塩基配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR2の塩基配列を示す配列番号、軽鎖可変領域CDR3の塩基配列を示す配列番号の順で示す。

(1)配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１９０、配列番号１９１、配列番号１９２

(2)配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９８、配列番号１９９、配列番号２００

(3)配列番号：２０２、配列番号：２０３、配列番号：２０４、配列番号：２０６、配列番号：２０７、配列番号：２０８

(4)配列番号：２１０、配列番号：２１１、配列番号：２１２、配列番号：２１４、配列番号：２１５、配列番号：１２６

(5)配列番号：２１８、配列番号：２１９、配列番号：２２０、配列番号：２２２、配列番号：２２３、配列番号：２２４

(6)配列番号：２２６、配列番号：２２７、配列番号：２２８、配列番号：２３０、配列番号：２３１、配列番号：２３２

(7)配列番号：２３４、配列番号：２３５、配列番号：２３６、配列番号：２３８、配列番号：２３９、配列番号：２４０

(8)配列番号：２４２、配列番号：２４３、配列番号：２４４、配列番号：２４６、配列番号：２４７、配列番号：２４８

(9)配列番号：２５０、配列番号：２５１、配列番号：２５２、配列番号：２５４、配列番号：２５５、配列番号：２５６

(10)配列番号：２５８、配列番号：２５９、配列番号：２６０、配列番号：２６２、配列番号：２６３、配列番号：２６４

(11)配列番号：２６６、配列番号：２６７、配列番号：２６８、配列番号：２７０、配列番号：２７１、配列番号：２７２

(12)配列番号：２７４、配列番号：２７５、配列番号：２７６、配列番号：２７８、配列番号：２７９、配列番号：２８０

(13)配列番号：２８２、配列番号：２８３、配列番号：２８４、配列番号：２８６、配列番号：２８７、配列番号：２８８

(14)配列番号：２９０、配列番号：２９１、配列番号：２９２、配列番号：２９４、配列番号：２９５、配列番号：２９６

(15)配列番号：２９８、配列番号：２９９、配列番号：３００、配列番号：３０２、配列番号：３０３、配列番号：３０４

(16)配列番号：３０６、配列番号：３０７、配列番号：３０８、配列番号：３１０、配列番号：３１１、配列番号：３１２

(17)配列番号：３１４、配列番号：３１５、配列番号：３１６、配列番号：３１８、配列番号：３１９、配列番号：３２０

(18)配列番号：３２２、配列番号：３２３、配列番号：３２４、配列番号：３２６、配列番号：３２７、配列番号：３２８

(19)配列番号：３３０、配列番号：３３１、配列番号：３３２、配列番号：３３４、配列番号：３３５、配列番号：３３６

(20)配列番号：３３８、配列番号：３３９、配列番号：３４０、配列番号：３４２、配列番号：３４３、配列番号：３４４

(21)配列番号：３４６、配列番号：３４７、配列番号：３４８、配列番号：３５０、配列番号：３５１、配列番号：３５２

(22)配列番号：３５４、配列番号：３５５、配列番号：３５６、配列番号：３５８、配列番号：３５９、配列番号：３６０
(23)配列番号：３６２、配列番号：３６３、配列番号：３６４、配列番号：３６６、配列番号：３６７、配列番号：３６８
尚、これらの組合せは上から順に048-006抗体、057-091抗体、059-152抗体（以上、HER1に対する抗体）、015-126抗体（HER2に対する抗体）、035-224抗体、045-011抗体、051-144抗体、052-053抗体、052-073抗体、053-049抗体、3172-120抗体（以上、CD46に対する抗体）、015-003抗体（ITGA3に対する抗体）、052-033抗体、053-042抗体、053-051抗体、053-059抗体、053-085抗体（以上、ICAM1に対する抗体）、035-234抗体、040-107抗体、041-118抗体、066-174抗体、083-040抗体（以上、ALCAMに対する抗体）、059-053抗体（CD147に対する抗体）におけるCDR1～CDR3の組合せに相当する。

【０１９９】

次に、CDR領域を挟んで存在するFR（フレームワーク領域）を選択する。FRの選択には、およそ三つの方法が採用できる。１つめの方法は、NEWM、REIなど既に三次元構造の明らかとなったヒト抗体フレームを用いる方法である（Riechmann L. et al., Nature 332, 323-3Z7 (1988); Tempst, PR. et al., Protein Engineering 7, 1501-1507 (1994); Ellis JH. etal., J. Immunol 155, 925-937 (1995)）。２つめの方法は、目的のマウス抗体可変領域と最も高いホモロジーを持つヒト抗体可変領域をデータベースより選択し、そのFRを用いる方法である（Queen C. et al., Proc Natl Acad SciUSA 86, 10029-10033 (1989); Rozak MJ. et al., J Biol Chem 271, 22611-22618 (1996); Shearman CW. et al., J.Immunol 147, 4366-4373 (1991)）。３つめの方法は、ヒト抗体のFRで最も共通に用いられるアミノ酸を選択する方法である（Sato K. et al., Mol Immunol 31, 371-381 (1994); Kobinger F. et al., Protein Engineering 6, 971-980 (1993); Kettleborough CA. et al., Protein Engineering 4, 773-783 (1991)）。本発明ではこれらいずれの方法を用いることもできる。

【０２００】

尚、選択されたヒトFRのアミノ酸配列を改変したアミノ酸配列であっても、最終的に得られるヒト型CDR移植抗体が、対応する抗原（HER1、HER2、CD46、ITGA3、ICAM1、ALCAM、CD147等）に対する特異的結合性を有する限り、FRのアミノ酸配列として利用することができる。特に、選択されたヒトFRのアミノ酸の一部をCDRの由来となった抗体のFRのアミノ酸に変更した場合、抗体の特性が維持される可能性が高い。改変されるアミノ酸の数は好ましくはFR全体の３０％以下であり、更に好ましくはFR全体の２０％以下であり、更に更に好ましくはFR全体の１０％以下である。

次に、これらいずれかの方法により選択したFRと上記CDRとを組み合わせることによりH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAを設計する。この設計を基にH鎖可変領域をコードするDNAとL鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等によりそれぞれ作製する。そしてH鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンH鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みH鎖発現ベクターを構築する。同様に、L鎖可変領域をコードするDNAを、ヒト免疫グロブリンL鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みL鎖発現ベクターを構築する。発現ベクターとしては例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV（パピローマウイルス）basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

以上の方法で作製されたH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としてはCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright& S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998))、SP2/0細胞(マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5,512-519 (1996),R.P.Junghans et al.,Cancer Res.50,1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,6077 (1989), P.L.Felgner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb,Virology 52,456-467(1973))、DEAE-Dextran法等が好適に用いられ

る。
形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型CDR移植抗体を分離する。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫安分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて利用することができる。
【０２０１】
本発明の抗体を基にして又は本発明の抗体をコードする遺伝子の配列情報を基にして抗体断片を作製することができる。抗体断片としてはFab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv、dsFv抗体が挙げられる。
Fabは、IgGをシステイン存在下パパイン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにC_H1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される分子量約５万の断片である。本発明では、上記抗体をパパイン消化することにより得ることができる。また、上記抗体のH鎖の一部及びL鎖をコードするDNAを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりFabを調製することもできる。
Fab'は、後述の$F(ab')_2$のH鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得られる分子量が約５万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することにより得られる。また、Fab同様に、Fab'をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。
$F(ab')_2$は、IgGをペプシン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにC_H1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される断片（Fab'）がジスルフィド結合で結合した分子量約１０万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化することにより得られる。また、Fab同様に、$F(ab')_2$をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。
scFvは、H鎖可変領域とL鎖可変領域とからなるFvを、片方の鎖のC末端と他方のN末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。ペプチドリンカーとしては例えば柔軟性の高い（GGGGS）$_3$などを用いることができる。例えば、上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAとペプチドリンカーをコードするDNAを用いてscFv抗体をコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりscFvを調製することができる。
dsFvは、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の適切な位置にCys残基を導入し、H鎖可変領域とL鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させたFv断片である。各鎖におけるCys残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。本発明では例えば上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入したH鎖可変領域及びL鎖可変領域をそれぞれコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりdsFvを調製することができる。
尚、適当なリンカーを用いてscFv抗体、dcFv抗体などを連結させたり、ストレプトアビジンを融合させたりして抗体断片を多量体化することもできる。
本発明の抗体（抗体断片を含む）に低分子化合物、タンパク質、標識物質などを融合又は結合させることにより、融合抗体又は標識化抗体を構成することができる。標識物質としては^{125}I等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（RITC）、アルカリホスファターゼ、ビオチンなどを用いることができる。
【０２０２】
本発明の抗体（抗体断片を含む）は、対応する抗原に対する特異的結合性によって、当該抗原を特異的に発現する癌細胞に対して特異的に結合する。この特性を利用すれば、癌細胞（又は癌組織）の標識、検出などが行える。遺伝子組み換え技術によって、この特異的結合能のあるVH、VLをIgGの定常領域（Fc領域）と融合させることでIgG型抗体へ変換することもできる。こうして得られるIgG型抗体には、NK細胞上のFcレセプターを介した細

胞傷害作用の発揮も期待される。ところで、IgG定常領域にはサブクラスが存在する。ヒトの各IgGサブクラスのＦｃレセプターとの結合については、IgG1とIgG3が最も強く、IgG4は中程度であり、IgG2は弱いといわれており、IgG型抗体への変換の際にはこの点を考慮して定常領域を選択するのが好ましい。尚、以前の出願（特開2005-185281及びPCT/JP2006/303195）で本発明者らはIgG型抗体に変換する代わりに、二次抗体を介した細胞傷害作用のアッセイ法を提案している。

実際、後述の実施例に示すようにITGA3抗体である015-003抗体、HER1抗体である048-006抗体、及びHER2抗体である015-126抗体にはADCC活性が認められることから、それ自体を癌細胞の傷害（殺傷）に利用できる。ここで、ヒト化或いはヒトＩｇＧ型抗体に変換した本発明の抗体を用いれば、免疫系によって攻撃、排除されにくくなり、期待される作用を良好に発揮するとともに、重篤な副作用の発生を回避することが可能となる。

さらには、本発明の抗体を、薬物等を特定の癌細胞特異的に送達させるための媒体（運搬体）として利用することもできる。即ち、本発明の抗体の用途として、特定の癌細胞を標的としたＤＤＳ（Drug delivery system）が想定される。

尚、本発明の抗体の各用途については以下に詳述される。

【０２０３】

（診断用途）

本発明の他の局面は、CD46抗原、ITGA3、ALCAM及びCD147抗原の発現（分布）に関する知見に基づき、これらの診断マーカーとしての利用に関する。具体的には、この局面の一態様は、CD46抗原が胆肝癌及び膵臓癌に発現していることを見出したことに基づき、胆肝癌又は膵臓癌の検査法を提供する。当該方法は以下のステップを含む。

ステップ(1)：生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ。

ステップ(2)：被検細胞又は組織を対象としてCD46抗原を検出するステップ。

本発明の検査法によって得られる情報は、胆肝癌の診断又は膵臓癌の診断に有益である。例えば、胆肝癌患者を対象として上記方法を実施して得られた情報は、当該患者の病態の評価ないし把握、治療効果の評価などに利用できる。例えば、胆肝癌の治療と並行して本発明の方法を実施すれば、結果として得られる情報を基に治療効果を評価することができる。具体的には、薬剤投与後に本発明の方法を実施することで肝細胞におけるCD46抗原の発現量の変化を調べ、発現量の増減から治療効果を判定することができる。このように本発明の方法を治療効果のモニターに利用してもよい。

一方、患者以外の者、即ち胆肝癌が認定されていない者を対象とした場合に得られた情報は、胆肝癌に関して罹患の有無の判定、罹患リスクの評価等に利用できる。本発明の方法によれば遺伝子の発現量という客観性に優れた指標を基に肝癌の診断を行えることから、その価値は非常に高いといえる。

【０２０４】

以下、本発明を構成する各ステップを詳細に説明する。

１．ステップ(1)

ステップ(1)では対象（被検者、生体）から分離された細胞又は組織を用意する。患者（胆肝癌患者又は膵臓癌患者）に限らず、健常者（胆肝癌又は膵臓癌のおそれがある者を含む）をここでの対象とすることもできる。例えば、バイオプシー（生検）で採取した、対象の組織の一部を被検細胞又は組織として本発明の方法に供することができる。

本発明において「被検細胞又は組織」とは、本発明の方法における検出をする際の試料（対象）となる細胞又は組織である。被検細胞又は組織は生体より分離される。即ち、生体より分離された状態の被検細胞又は組織に対して本発明が適用される。「生体より分離された」とは、被検細胞又は組織が存在する生体組織の一部を摘出することによって、被検細胞又は組織がその由来の生体と完全に隔離されている状態をいう。ステップ(2)において免疫学的検出法を採用する場合には通常、被検細胞は生体で存在していた状態、即ち周囲の細胞と結合した状態で（組織片として）調製され、本発明の方法に使用される。尚、被検細胞を周囲の細胞から分離（単離）した後に本発明の方法に使用してもよい。

【０２０５】

２．ステップ(2)

ステップ(2)では、用意した被検細胞又は組織を対象としてCD46抗原を検出する。「CD46抗原を検出する」とは、CD46抗原が発現しているか否か（発現の有無）を調べること、又はCD46抗原の発現量を絶対量として又は相対量として把握することをいう。ここでの相対量の基準を例えば、悪性度に応じて用意した標準試料のCD46抗原量にすることができる。通常は、CD46抗原の発現の有無、及び発現している場合にはその量が調べられることになる。CD46抗原を検出する際に厳密にCD46抗原量を定量することは必須でない。

本発明の一態様ではCD46抗原の転写産物であるmRNAをターゲットとした検出法を実施する。mRNAの検出（測定）にはRT-PCR法、特異的なプローブを用いた各種ハイブリダイゼーション法（例えばノザンハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーション）などの常法を採用できる。本発明の他の態様では、CD46抗原の発現産物（タンパク質）をターゲットとした検出法を実施する。

免疫学的手法（例えば免疫組織化学的染色法）でCD46抗原を検出することが好ましい。免疫学的手法では抗CD46抗原抗体が使用され、当該抗体の結合性（結合量）を指標としてCD46抗原タンパク質が検出される。免疫学的検出法によれば迅速で感度のよい検出が可能となる。また、操作も簡便である。尚、検出方法としては例えば、ELISA法、ラジオイムノアッセイ、FCM、免疫沈降法、イムノブロッティング等の方法が挙げられる。

免疫組織化学的染色法によれば、迅速に且つ感度よくCD46抗原を検出できる。また、操作も簡便である。従って、CD46抗原の検出に伴う被検者（患者）への負担も小さくなる。

免疫組織化学的染色法では通常、まず被検細胞に抗CD46抗体を接触させるステップを実施し、その後、抗CD46抗体の結合量を調べる。具体的には、上記の免疫組織化学的染色法に従って本発明の方法を実施することができる。

【０２０６】

免疫学的染色法に使用する抗CD46抗体は、CD46抗原に対する特異的結合性を有する限り、その種類や由来などは特に限定されない。抗CD46抗体はポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体（数種～数十種の抗体の混合物）、及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。ポリクローナル抗体又はオリゴクローナル抗体としては、動物免疫して得た抗血清由来のIgG画分のほか、抗原によるアフィニティー精製抗体を使用できる。抗CD46抗体が、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv、dsFv抗体などの抗体断片であってもよい。

【０２０７】

抗CD46抗体は、免疫学的手法、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法などを利用して調製することができる。

免疫学的手法によるポリクローナル抗体の調製は次の手順で行うことができる。抗原（CD46又はその一部）を調製し、これを用いてウサギ等の動物に免疫を施す。抗原としては、ヒトCD46の他、マウスCD46などヒト以外の種のCD46を用いることができる。これらのCD46は、生体試料を精製することにより得ることができる。また、組換えCD46を用いることもできる。組換えヒトCD46は例えば、CD46をコードする遺伝子（遺伝子の一部であってもよい）を、ベクターを用いて適当な宿主に導入し、得られた組換え細胞内で発現させることにより調製される。

免疫惹起作用を増強するために、キャリアタンパク質を結合させた抗原を用いてもよい。キャリアタンパク質としてはKLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）、BSA（Bovine Serum Albumin）、OVA（Ovalbumin）などが使用される。キャリアタンパク質の結合にはカルボジイミド法、グルタールアルデヒド法、ジアゾ縮合法、MBS（マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド）法などを使用できる。一方、CD46（又はその一部）を、GST、βガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク、又はヒスチジン（His）タグ等との融合タンパク質として発現させた抗原を用いることもできる。このような融合タンパク質は、汎用的な方法により簡便に精製することができる。

【０２０８】

必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で採血し、遠心処理などによって血清を得る。得られた抗血清をアフィニティー精製し、ポリクローナル抗体とする

。
一方、モノクローナル抗体については次の手順で調製することができる。まず、上記と同様の手順で免疫操作を実施する。必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で免疫動物から抗体産生細胞を摘出する。次に、得られた抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合してハイブリドーマを得る。続いて、このハイブリドーマをモノクローナル化した後、目的タンパク質に対して高い特異性を有する抗体を産生するクローンを選択する。選択されたクローンの培養液を精製することによって目的の抗体が得られる。一方、ハイブリドーマを所望数以上に増殖させた後、これを動物（例えばマウス）の腹腔内に移植し、腹水内で増殖させて腹水を精製することにより目的の抗体を取得することもできる。上記培養液の精製又は腹水の精製には、プロテインG、プロテインA等を用いたアフィニティークロマトグラフィーが好適に用いられる。また、抗原を固相化したアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。更には、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、硫安分画、及び遠心分離等の方法を用いることもできる。これらの方法は単独ないし任意に組み合わされて用いられる。

【０２０９】

CD46抗原への特異的結合性を保持することを条件として、得られた抗体に種々の改変を施すことができる。本発明では、このような改変抗体を利用してもよい。

【０２１０】

抗CD46抗体として標識化抗体を使用すれば、標識量を指標に結合抗体量を直接検出することが可能である。従って、より簡易な方法となる。その反面、標識物質を結合させた抗CD46抗体を用意する必要があることに加えて、検出感度が一般に低くなるという問題点がある。そこで、標識物質を結合させた二次抗体を利用する方法、二次抗体と標識物質を結合させたポリマーを利用する方法など、間接的検出方法を利用することが好ましい。ここでの二次抗体とは、抗CD46抗体に特異的結合性を有する抗体であって例えばウサギ抗体として抗CD46抗体を調製した場合には抗ウサギIgG抗体を使用できる。ウサギやヤギ、マウスなど様々な種の抗体に対して使用可能な標識二次抗体が市販されており（例えばフナコシ株式会社やコスモ・バイオ株式会社など）、本発明で使用する抗CD46抗体に応じて適切なものを適宜選択して使用することができる。

【０２１１】

標識物質には、ペルオキシダーゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（RITC）、アルカリホスファターゼ、ビオチン、及び放射性物質の中から任意に選択されるものが好適に用いられる。特に、ビオチンを標識物質として用いてアビジンペルオキシダーゼを反応させる方法によれば高感度の検出が可能である。

【０２１２】

上記本発明の抗体をここでの抗CD46抗体として利用してもよい。具体的には例えば、本発明者らが取得に成功した抗体（035-224抗体、045-011抗体、051-144抗体、052-053抗体、052-073抗体、053-049抗体、又は3172-120抗体）を利用することができる。

【０２１３】

この局面の他の態様は、ITGA3が胆肝癌及び膵臓癌に発現していることを見出したことに基づき、胆肝癌又は膵臓癌の検査法を提供する。当該方法は以下のステップを含む。

ステップ(1)：生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ。

ステップ(2)：被検細胞又は組織を対象としてITGA3を検出するステップ。

本発明の検査法によって得られた情報は、胆肝癌の診断又は膵臓癌の診断に有益である。尚、検査結果の利用法や各ステップの詳細については、CD46抗原の場合と同様であるのでその説明を省略する。

【０２１４】

この局面の更なる態様では、ALCAMが腎臓癌、肝細胞癌及び胆肝癌に発現していることを見出したことに基づき、腎臓癌、肝細胞癌又は胆肝癌診断用の情報を取得する方法が提

供される。当該方法は以下のステップを含む。
ステップ(1)：生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ。
ステップ(2)：被検細胞又は組織を対象としてALCAMを検出するステップ。
本発明の検査法によって得られた情報は、腎臓癌の診断、肝細胞癌の診断、又は胆肝癌の診断に有益である。尚、検査結果の利用法や各ステップの詳細については、CD46抗原の場合と同様であるのでその説明を省略する。

【０２１５】
この局面はさらに他の態様として、CD147抗原が腎臓癌に発現していることを見出したことに基づき、腎臓癌の検査法が提供される。当該方法は以下のステップを含む。
ステップ(1)：生体から分離された被検細胞又は組織を用意するステップ。
ステップ(2)：被検細胞又は組織を対象としてCD147抗原を検出するステップ。
本発明の検査法によって得られた情報は、腎臓癌の診断に有益である。尚、検査結果の利用法や各ステップの詳細については、CD46抗原の場合と同様であるのでその説明を省略する。

【０２１６】
（治療用途）
後述の実施例に示すように、本発明者らは特定の癌細胞に対して抗体依存性細胞性細胞傷害（Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity、以下ADCCと略す）活性を発揮する抗体の取得に成功した。また、これらの抗体をIgG型に変換し、抗体治療薬への応用の可能性を検討したところ、いずれの抗体も良好な抗腫瘍効果を示した。これらの知見に基づき本発明の更なる局面は、本発明者らが取得に成功した抗体の癌治療用途への適用に関する。
この局面ではまず、ITGA3、HER1、HER2、ALCAM、EpCAM又はHGFRを標的として利用することで、癌細胞特異的に作用し傷害することが可能な薬剤（癌治療剤）及びそれを用いた治療方法が提供される。本発明の薬剤の一態様では、抗ITGA3抗体が有効成分として含有される。本発明の薬剤の好ましい一態様では、ADCC活性を有する抗ITGA3抗体が有効成分として含有される。この態様の薬剤では、ADCC活性を利用した細胞傷害によって治療効果を得ることができる。ADCC活性を有する抗ITGA3抗体として、後述の実施例に示す015-003抗体（ITGA3に対する特異的結合性及びADCC活性を維持する限りにおいて一部改変したものであってもよい）、又はこれを基に構築されたタイプの異なる抗体（例えばIgG型）を用いることができる。この抗体はITGA3に対する特異的結合性とADCC活性を併せ持つ。従って、ITGA3を発現する癌細胞に特異的に結合し、その後ADCC活性を発揮し、癌細胞に傷害を与えることが可能である。この態様の薬剤の標的癌細胞は特に限定されないが、例えば胆肝癌細胞、膵臓癌細胞を標的とすることができる。

【０２１７】
本発明の他の態様では、抗HER1抗体が有効成分として含有される。本発明の薬剤の好ましい一態様では、ADCC活性を有する抗HER1抗体が有効成分として含有される。この態様の薬剤では、ADCC活性を利用した細胞傷害によって、治療効果を得ることができる。さらに好ましい態様の薬剤では、ADCC活性を利用した細胞傷害に加え、リガンドであるEGFのHER1への結合阻害、及び/又はHER1のリン酸化シグナル阻害を伴っていることにより、いっそう高い治療効果を得ることができる。このようなADCC活性を有する抗HER1抗体として、後述の実施例に示す048-006、059-152抗体（HER1に対する特異的結合性及びADCC活性を維持する限りにおいて一部改変したものであってもよい）、又はこれを基に構築されたタイプの異なる抗体（例えばIgG型）を用いることができる。これらの抗体はHER1に対する特異的結合性と、EGFのHER1への結合阻害、HER1のリン酸化シグナル阻害及びADCC活性を併せ持つ。従って、HER1を発現する癌細胞に特異的に結合し、EGFのHER1への結合阻害及び/又はHER1のリン酸化シグナル阻害によってHER1活性を阻害し、その後ADCC活性を発揮し、癌細胞に傷害を与えることが可能である。また、当該抗体は癌細胞に対する増殖抑制作用及び動物モデルでの抗腫瘍効果も発揮することが確認されており、抗体医薬へのその利用が大いに期待される。この態様の薬剤の標的癌細胞は特に限定されないが、例えば腎臓癌細

胞、肝細胞癌細胞、胆肝癌細胞、肺扁平上皮癌細胞、肺腺癌細胞、膵臓癌細胞を標的とすることができる。

【０２１８】

本発明のさらに他の態様では、抗HER2抗体が有効成分として含有される。本発明の薬剤の好ましい一態様では、ADCC活性を有する抗HER2抗体が有効成分として含有される。この態様の薬剤では、ADCC活性を利用した細胞傷害によって治療効果を得ることができる。ADCC活性を有する抗HER2抗体として、後述の実施例に示す015-126抗体（HER2に対する特異的結合性及びADCC活性を維持する限りにおいて一部改変したものであってもよい）、又はこれを基に構築されたタイプの異なる抗体（例えばIgG型）を用いることができる。この抗体はHER2に対する特異的結合性とADCC活性を併せ持つ。従って、HER2を発現する癌細胞に特異的に結合し、その後ADCC活性を発揮し、癌細胞に傷害を与えることが可能である。また、当該抗体は癌細胞に対する増殖抑制作用も発揮することが確認されており、抗体医薬へのその利用が大いに期待される。この態様の薬剤の標的癌細胞は特に限定されないが、例えば腎臓癌細胞、肝癌細胞、肺腺癌細胞を標的とすることができる。

【０２１９】

本発明のさらに他の態様では、抗ALCAM抗体が有効成分として含有される。本発明の薬剤の好ましい一態様では、ADCC活性を有する抗ALCAM抗体が有効成分として含有される。この態様の薬剤では、ADCC活性を利用した細胞傷害によって治療効果を得ることができる。ADCC活性を有する抗ALCAM抗体として、後述の実施例に示す041-118抗体（ALCAMに対する特異的結合性及びADCC活性を維持する限りにおいて一部改変したものであってもよい）、又はこれを基に構築されたタイプの異なる抗体（例えばIgG型）を用いることができる。この抗体はALCAMに対する特異的結合性とADCC活性を併せ持つ。従って、ALCAMを発現する癌細胞に特異的に結合し、その後ADCC活性を発揮し、癌細胞に傷害を与えることが可能である。この態様の薬剤の標的癌細胞は特に限定されないが、例えば肺腺癌細胞を標的とすることができる。

【０２２０】

本発明のさらに他の態様では、抗EpCAM抗体が有効成分として含有される。本発明の薬剤の好ましい一態様では、ADCC活性を有する抗EpCAM抗体が有効成分として含有される。この態様の薬剤では、ADCC活性を利用した細胞傷害によって治療効果を得ることができる。ADCC活性を有する抗EpCAM抗体として、後述の実施例に示す067-153抗体（EpCAMに対する特異的結合性及びADCC活性を維持する限りにおいて一部改変したものであってもよい）、又はこれを基に構築されたタイプの異なる抗体（例えばIgG型）を用いることができる。この抗体はEpCAMに対する特異的結合性とADCC活性を併せ持つ。従って、EpCAMを発現する癌細胞に特異的に結合し、その後ADCC活性を発揮し、癌細胞に傷害を与えることが可能である。この態様の薬剤の標的癌細胞は特に限定されないが、例えば、胃充実型腺癌、結腸腺癌、肺腺癌細胞を標的とすることができる。

【０２２１】

本発明のさらに他の態様では、抗HGFR抗体が有効成分として含有される。本発明の薬剤の好ましい一態様では、ADCC活性を有する抗HGFR抗体が有効成分として含有される。この態様の薬剤では、ADCC活性を利用した細胞傷害によって治療効果を得ることができる。ADCC活性を有する抗HGFR抗体として、後述の実施例に示す067-133抗体（HGFRに対する特異的結合性及びADCC活性を維持する限りにおいて一部改変したものであってもよい）、又はこれを基に構築されたタイプの異なる抗体（例えばIgG型）を用いることができる。この抗体はHGFRに対する特異的結合性とADCC活性を併せ持つ。従って、HGFRを発現する癌細胞に特異的に結合し、その後ADCC活性を発揮し、癌細胞に傷害を与えることが可能である。この態様の薬剤の標的癌細胞は特に限定されないが、例えば、肺腺癌細胞を標的とすることができる。

【０２２２】

本発明は更に、標的細胞においてHER1、HER2、CD46、ITGA3、ICAM1、ALCAM、又はCD147の発現を阻害ないし抑制することによって、標的細胞の悪性度低下又は正常化を促す方法

を提供する。
ここで、本発明者らの検討によって、これまでにCD46との関連性について特別の報告のない胆肝癌及び膵臓癌においてCD46の特異的な発現が認められた（後述の実施例の欄を参照）。同様に、胆肝癌及び膵臓癌とITGA3の発現との関連性、腎臓癌、肝細胞癌及び胆肝癌とALCAMとの関連性、並びに腎臓癌とCD147との関連性が明らかとなった（後述の実施例の欄を参照）。この知見に基づけば、CD46に関しては胆肝癌細胞及び膵臓癌細胞が、ITGA3に関しては胆肝癌細胞及び膵臓癌細胞が、CD147に関しては腎臓癌細胞が、それぞれ新規且つ有効な標的細胞となる。
尚、各抗原の発現の阻害ないし抑制は、アンチセンス法やRNA干渉によって、或いはリボザイムの使用によって行うことができる。

【０２２３】
アンチセンス法による発現阻害を行う場合には例えば、標的細胞内で転写されたときに、本タンパク質をコードするmRNAの固有の部分に相補的なRNAを生成するアンチセンス・コンストラクトが使用される。このようなアンチセンス・コンストラクトは例えば、発現プラスミドの形態で標的細胞に導入される。一方、アンチセンス・コンストラクトとして、標的細胞内に導入されたときに、本タンパク質をコードするmRNA／又はゲノムDNA配列とハイブリダイズしてその発現を阻害するオリゴヌクレオチド・プローブを採用することもできる。このようなオリゴヌクレオチド・プローブとしては、好ましくは、エキソヌクレアーゼ及び／又はエンドヌクレアーゼなどの内因性ヌクレアーゼに対して抵抗性であるものが用いられる。
アンチセンス核酸としてDNA分子を使用する場合、本タンパク質をコードするmRNAの翻訳開始部位（例えば-10～+10の領域）を含む領域に由来するオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【０２２４】
アンチセンス核酸と、標的核酸との間の相補性は厳密であることが好ましいが、多少のミスマッチが存在していてもよい。標的核酸に対するアンチセンス核酸のハイブリダイズ能は一般に、両核酸の相補性の程度及び長さの両方に依存する。通常、使用するアンチセンス核酸が長いほど、ミスマッチの数が多くても、標的核酸との間に安定な二重鎖（又は三重鎖）を形成することができる。当業者であれば、標準的な手法を用いて、許容可能なミスマッチの程度を確認することができる。

【０２２５】
アンチセンス核酸はDNA、RNA、若しくはこれらのキメラ混合物、又はこれらの誘導体や改変型であってもよい。また、一本鎖でも二本鎖でもよい。塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格部分を修飾することで、アンチセンス核酸の安定性、ハイブリダイゼーション能等を向上させることなどができる。また、アンチセンス核酸に、細胞膜輸送を促す物質（例えば Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810, published December 15, 1988を参照されたい)や、特定の細胞に対する親和性を高める物質などを付加してもよい。
アンチセンス核酸は例えば市販の自動ＤＮＡ合成装置（例えばアプライド・バイオシステムズ社等）を使用するなど、常法で合成することができる。核酸修飾体や誘導体の作製には例えば、Stein et al.(1988), Nucl. Acids Res. 16:3209やSarin et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451等を参照することができる。

【０２２６】
標的細胞内におけるアンチセンス核酸の作用を高めるために、pol IIやpol IIIといった強力なプロモーターを利用することができる。即ち、このようなプロモーターの制御下に配置されたアンチセンス核酸を含むコンストラクトを標的細胞に導入すれば、当該プロモーターの作用によって十分な量のアンチセンス核酸の転写を確保できる。
アンチセンス核酸の発現は、哺乳動物細胞（好ましくはヒト細胞）で機能することが知られている任意のプロモーター（誘導性プロモーター又は構成的プロモーター）によって

行うことができる。例えば、SV40初期プロモーター領域 (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'末端領域由来のプロモーター(Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797)、疱疹チミジン・キナーゼ・プロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445)等のプロモーターを使用することができる。

【０２２７】

本発明の一態様では、RNA干渉（RNAi）により本タンパク質の発現阻害を行う。RNAiは、真核細胞内で引き起こすことが可能な、配列特異的な転写後遺伝子抑制のプロセスである。RNA干渉では、標的mRNAの配列に対応する配列を有する二本鎖RNA（dsRNA）が使用される。哺乳動物細胞は、dsRNAの影響を受ける２つの経路（配列特異的経路及び配列非特異的経路）を有することが知られている。配列特異的経路においては、比較的長いdsRNAが短い干渉性のRNA（siRNA）に分割される。このsiRNAは、それぞれが3'末端に突出部を有する約19ヌクレオチドのsiRNAを形成する約21ヌクレオチドのセンス及びアンチセンス鎖を有する。他方、配列非特異的経路は、所定の長さ以上であれば配列に関係なく、任意のdsRNAによって惹起されると考えられている。この経路では、dsRNAが二つの酵素、即ち、活性型となり翻訳開始因子eIF2をリン酸化することでタンパク質合成のすべてを停止させるPKRと、RNAase L活性化分子の合成に関与する2',5'オリゴアデニル酸シンターゼが活性化される。本発明の方法では、この非特異的経路の進行を最小限に留めるために、約30塩基対より短いdsRNAを使用することが好ましい(Hunter et al. (1975) J Biol Chem 250: 409-17; Manche et al. (1992) Mol Cell Biol 12: 5239-48; Minks et al. (1979) J Biol Chem 254: 10180-3; 及び Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-8を参照されたい）。

尚、RNAiは様々な細胞種（例えば、HeLa細胞、NIH/3T3細胞、COS細胞、293細胞等）において遺伝子発現を減少させる効果的な手段であることが確認されている。また、通常は、アンチセンス法よりも効果的に発現阻害を行える。

【０２２８】

RNAiに使用するdsRNAは、化学合成によって、又は適当な発現ベクターを用いてin vitro又はin vivoで調製することができる。後者の方法は、比較的長いdsRNAの調製を行うことに特に有効である。dsRNAの設計には通常、標的核酸に固有の配列（連続配列）が利用される。尚、適当な標的配列を選択するためのプログラム及びアルゴリズムが開発されている。

【０２２９】

本発明の他の一態様ではリボザイムによりITGA3等の発現阻害を行う。部位特異的認識配列でmRNAを開裂させるリボザイムを用いて、本タンパク質をコードするmRNAを破壊することもできるが、好ましくはハンマーヘッド・リボザイムを使用する。ハンマーヘッド・リボザイムの構築方法については例えばHaseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591を参考にすることができる。

アンチセンス法の場合と同様に、例えば安定性やターゲット能を向上させることを目的として、修飾されたオリゴヌクレオチドを用いてリボザイムを構築してもよい。効果的な量のリボザイムを標的細胞内で生成させるために、例えば、強力なプロモーター（例えばpol IIやpol III）の制御下に、当該リボザイムをコードするDNAを配置した核酸コンストラクトを使用することが好ましい。

【０２３０】

本発明の治療方法（癌細胞等の悪性度低下又は正常化を促す方法を含む）に使用される薬剤の製剤化は常法に従って行うことができる。製剤化する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることができる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはア

ラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、ジエチリン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

【０２３１】

製剤化する場合の剤型も特に限定されず、例えば錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、外用剤、及び座剤などとして調製できる。

本発明の薬剤を用いた治療においては、癌細胞又は成人T細胞白血病細胞を保有する対象（患者）に本発明の薬剤が投与される。本発明の薬剤はその形態に応じて経口投与又は非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、腹腔内注射、標的細胞への直接導入など）によって対象（患者）に適用され得る。

薬剤の投与量は症状、患者の年齢、性別、及び体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を設定することが可能である。例えば、成人（体重約60kg）を対象として一日当たりの有効成分量が約0.001mg～約100mgとなるよう投与量を設定することができる。投与スケジュールとしては例えば一日一回～数回、二日に一回、或いは三日に一回などを採用できる。投与スケジュールの設定においては、患者の病状や薬剤の効果持続時間などを考慮することができる。

【０２３２】

本発明の薬剤の別の態様では、抗HER1抗体、抗HER2抗体、抗CD46抗体、抗ITGA3抗体、抗ICAM1抗体、抗ALCAM抗体、抗CD147抗体をDDS用の運搬体として利用する。つまりこの態様は抗HER1抗体等に薬物（細胞毒など）又は放射性同位元素など（これらをまとめて「活性成分」ともいう）を結合して得られる免疫複合体を提供する。殺細胞活性又は細胞傷害活性を持つ薬物（細胞毒）を含有する免疫複合体は一般にイムノトキシンと呼ばれる。細胞毒の例には、タキソール、シトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びプロマイシン並びにこれらの類似体又は同族体を挙げることができる。

本発明の免疫複合体に含有させる活性成分として、所望の生物活性を有するタンパク質又はペプチドを使用してもよい。このような目的において使用可能なタンパク質等の候補として、アブリン、リシンＡ、シュードモナス・エキソトキシン、ジフテリア毒素、腫瘍壊死因子、インターフェロン-γ、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-6（IL-6）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）リンホカインを例示できる。

【０２３３】

活性部分を抗体に結合させる技術は公知であり、例えばMonoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Controlled Drug Delivery (2nd edition.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照することができる。

【０２３４】

（本発明に使用されるキット）

本発明の各方法（診断用の情報を取得する方法など）を、キット化した試薬等を用いて実施してもよい。本発明の他の局面はこのような目的に使用されるキットを提供する。例えば、本発明の方法における検出に利用される核酸（プローブやプライマー）、反応用試薬、希釈液、反応容器などをキットに含めることができる。尚、本発明のキットには通常、使用説明書が添付される。

キットを用いることによって、本発明の方法をより簡便に且つより短時間で実施することが可能となる。

【実施例】

【０２３５】

１．scFv抗体遺伝子ライブラリーを作製するためのベクターの作製

1-1 scFv抗体遺伝子ライブラリーを作製するためのベクターの作製

図５に概念的に示すように、pTZ19Rファージミドベクター（ファルマシア）にM13ファージのpelB(シグナル配列)、His6タグ配列、M13ファージのcp3蛋白質（Δcp3（198aa-406aa）N端欠失キャプシド蛋白質３）配列、proteinA蛋白質配列を適当な制限酵素部位で組み込みベクターpAALFabを作製した(Iba Y. et al., Gene 194 : 35-46, 1997. 参照)。このpAALFabから組み込み用ベクターpFCAH9-E8dを作成した。

【０２３６】

このベクターの所定の位置に重鎖と軽鎖の遺伝子を挿入することにより、実際の抗体蛋白質発現ベクターが完成することとなる。完成したベクターによって発現される抗体の形状はscFv型であり、軽鎖定常領域CL遺伝子は前述のcp3遺伝子と結合されており、結果として発現蛋白質はscFv-CL-cp3の形状となる。具体的には、以下のような操作を行った。

用いたプライマー：

527 Reverse（配列番号：３７７）：

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

599 E8VHf-PstR:（配列番号：３７８）

3'-CGGCTCCAAGTCGACGTCGTCA-5'

544 E8VHf-PstF:（配列番号：３７９）

5'-CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAA-3'

545 E8VHf-XbaR:（配列番号：３８０）

3'-AGACCGAAGTTGTAATTTCTGTGGATATACGTGACCCACTTCGTCTCCGGACTTTTCCCAGATCTCACCTAACCTTCCTAA-5'

546 E8VHf-XbaF:（配列番号：３８１）

5'-AAGGGTCTAGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAGTGGTAATACTAAATATGACCCGAAGGACAAGGCCACTATAACAGCA-3'

547 E8VHf-EcoR（配列番号：３８２）

3'-TTCCTGTTCCGGTGATATTGTCGTCTGTGTAGGAGGTTGTGTCGGATGGATGTCGACTTAAGGGAC-5'

548 E8VHf-EcoF（配列番号：３８３）

5'-CAGCTGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGT-3'

549 E8VHf-BstR（配列番号：３８４）：

3'-CAGATAATGACACGACCAATACTAATGCCGTTGAAACTGATGACCCCGGTTCCGTGGTGCCAGTGGCACAAGG-5'

590 His6-SmaR（配列番号：３８５）：

3'-GGTTCTCTAACAGTAGTGGTAGTAGTGGTAATTATTCTCGATAGGGCCCTCGAA-5'

542 E8VLf-SacF（配列番号：３８６）：

5'-GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGT-3'

539 E8VLf-KpnR（配列番号：３８７）：

3'-TGACAGTGGTAGTGTACAGCTCGTTCACCCTTATAAGTGTTAATAAATCGTACCATGGTCGTC-5'

542 E8VLf-KpnF（配列番号：３８８）：

5'-GCATGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTAT-3'

543 E8VLf-BamR（配列番号：３８９）：

3'-GGAGTCGAGGACCAGATATTACGTTTTTGGAATCGTCTACCACACGGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTAGGCCTTG
TGTT-5'
562 E8VLf-XhoR（配列番号：３９０）：
3'-TCATGAGGCACCTGCAAGCCACCTCCGTGGTTCGAGCTCTAGTTT-5'
563 E8VLf-XhoF（配列番号：３９１）：
5'-AGTACTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAGATCAAA-3'
613 NheR（配列番号：３９２）：
3'-ATCGACAGCT-5'
600 E8VLKpnXhoR（配列番号：３９３）：
3'-AAGCCACCTCCATGGTTCGAGCTCTAGTTT-5'
LCP3ASC（配列番号：３９４）：
3'-TCGAAGTTGTCCTTACTCACAAGCCGCGCGGTCAGCTGAGGTAA-5'
hCH1Bst（配列番号：３９５）：
5'-ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG-3'
hCH1midAS（配列番号：３９６）：
3'-GGGAGTCGTCGCAGCACTGGCACGGGAGGTCGTCGAA-5'
hCH1midS（配列番号：３９７）：
5'-GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCC-3'
hCH1H6（配列番号：３９８）：
3'-GGGTCGTTGTGGTTCCACCTGTTCTTTCAACTCGGGTTTAGAACAGTAGTGGTAGTAGTGGTA-5'
hCH1H6Sma（配列番号：３９９）：
3'-GGGTTTAGAACAGTAGTGGTAGTAGTGGTAATTATTCTCGATAGGGCCCTCGAACG-5'
702 BstXhoF（配列番号：４００）：
5'-GGCACCACGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACC-3'

【０２３７】

＜pFCAH3-E8T H鎖部分の作製＞

１）pAALFabを鋳型にして527-599を用いたPCR，547-590を用いたPCRを行いDNA断片を作製した。

２）544-545,546-547,548-549にてPCRを行いDNA断片を作製した。

３）１）２）を混合し527,590によるPCRを行い、これをpAALFabのHindIII-SmaI siteにクローンニングした。

【０２３８】

＜pFCAH3-E8T L鎖部分＞

４）542-562，561-613を用いたPCRを行いDNA断片を作製した。

５）538-539,542-543にてPCRを行いDNA断片を作製した。

６）４）５）を混合し538,562によるPCRを行い、これをpAALFabのSacI-NheI siteにクローンニングした。

【０２３９】

＜pFCAH9-E8d＞

７）VH stuffer部分の作製

pFCAH3-E8TをXbaI,EcoRIにて消化、klenow fragmentを作用させて平滑末端に変えた後self ligationさせてVH部分のstufferを作製した。

８）VL stuffer部分の作製

pFCAH3-E8Tを鋳型にして527-600にてPCR。７）のHindIII-XhoI siteにクローニングした。

９）これをKpnIにて消化、self ligationさせてVL部分のstufferを作製した。

１０）SfiI,NcoI,SpeI siteの導入

pFCAH3-E8Tを鋳型にして527-663にてPCR。１）のHindIII-SacI siteにクローニングした。

１１）AscI siteの導入

pFCAH3-E8Tを鋳型にして527-LCP3ASCにてPCRし、それをSacI完全消化、SalI部分消化した２）にクローニングした。
１２）gammaCH1部分をヒト遺伝子に変換
ヒトgammaCH1部分にはBstPI siteが存在するためこれをなくす設計でクローニングを行った。ヘントウ腺cDNAを鋳型にしてhCH1Bst-hCH1midS, hCH1midAS-hCH1H6にてPCRしたのち、これを混合してhCH1Bst-hCH16SmaにてPCRし、そのDNA断片を３）のBstPI-Sma siteにクローニングした
１３）Xho siteの導入
１２）を鋳型に702-663にてPCRを行い、これを１２）のBstPI-SacI siteにクローニングした。

【０２４０】
＜pscFvCA9-E8VHdVLdの作製＞
pFCAH9-E8d ３μg（3μL）（図５Ｄを参照）をBstPI（3U/μL）3μL、10×H buffer 5μL、DW39μLと混合し、37℃で2時間、制限酵素処理を行った。処理後、エタノール沈殿して得られた沈殿を10μLのTEバッファーに溶解した。これに、SacI（10 U/μL）1μL、10×L buffer 5μL、DW34μLを混合して37℃で2時間、制限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動して、4.7kb断片を回収した。回収物をエタノール沈殿して10μLとした（pFCAH9-E8d BstPI- SacI断片）。

【０２４１】
一方、プライマーlinF(100pmol/μL)5μLとプライマーlinR(100pmol/μL) 5μLを混合し、94℃で5分加熱した後、80℃5分、70℃5分、室温放置30分によりアニールさせた。このうち、2μLと上記で得られたpFCAH9-E8d BstPI- SacI断片1μL、10×ligation buffer1.5μL、DW 9.5μL、T4DNAligase 1μLを混合し、16℃で16時間反応させた。反応後、エタノール沈殿して3μLに濃縮し、そのうち1.5μLを用いて、大腸菌DH12Sコンピテントセル20μLをエレクトロポレーションにより形質転換した。得られたクローンのプラスミドを抽出し、塩基配列を確認して、pscFvCA9-E8VHdVLdと名づけた。図６にpscFvCA9-E8VHdVLdの構造を模式的に示した。また、図７－１～図７－２にpscFvCA9-E8VHdVLdのインサート部の塩基配列（配列番号：４０１）及びそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：４０２）を示した。
プライマーlinF（配列番号：４０３）
GTCACCGTCTCGAGAGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCCATGGCCGACATCGAGCT
プライマーlinR（配列番号：４０４）
CGATGTCGGCCATGGACCCACCACCGCCACTTCCACCGCCACCTGATCCGCCACCGCCTCTCGAGACG

【０２４２】
1-2 重鎖可変領域（VH）を一時的にクローニングするためのベクターの作製
公知の手法(Iba Y. et al., Gene 194:35-46, 1997.参照)に従って、まずpAALFabベクター（図５Ａ）を作製した。pAALFabベクターのXbaIからEcoRIの間を欠落させ、新たに制限酵素切断部位Kpn I, Sfi I, Nco I, Spe Iを付加して、pFCAH3-E8T（図５Ｂ）を経て、VH(重鎖可変領域)をクローニング可能としたベクターpscFvCA-E8VHd（図５Ｃ）を作製し、重鎖可変領域を一時的にクローニングするためのベクターとした。図８－１～図８－２にpscFvCA-E8VHdのインサートの塩基配列（配列番号：４０５）及び制限酵素サイトと塩基配列によってコードされるアミノ酸配列（配列番号：４０６）を示した。

【０２４３】
具体的には、primer610とprimer611をアニールさせ、それをpFCAH3-E8TのBstPI-SacI siteにクローニングしてsingle chainの作製を行なった。さらに、primer527とprimer619にてPCRを行い、これをさらにHindIII-PstI siteにクローニングし、SfiI,NcoI siteの導入を行った。以下にベクターの作製に用いたプライマー配列を示す。
610 scBstSpeSacF（配列番号：４０７）：
5'-CACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCTACTAGTGACATCGAGCTCACCCAG-3'

611 scBstSpeSacR（配列番号：４０８）：
3'-GTGGTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCGCCACCGCCTAGTCCACCGCCACCTTCACCGCCACCACCCAGATGATCACTGTAGCTCGAGTGGGTC-5'
527 Reverse（配列番号：４０９）：
5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
619 E8VHf-SfiNcoPstR（配列番号：４１０）：
3'-GACGCCGGGTCGGCCGGTACCGGCTCCAAGTCGACGTCGTCA-5'
【０２４４】
２．イムノグロブリン軽鎖ライブラリーの作製
2-1 PCRを用いたイムノグロブリン軽鎖遺伝子の単離
骨髄細胞（検体No.59）4×107 cells、および臍帯血と末梢血のリンパ球から、市販のキット（Pharmacia Biotech社製 QuickPrep Micro mRNA Purification Kit）を用いて、2.6μgのmRNAを得た。このmRNAからcDNAを作製した。cDNAは、GibcoBRL社製 SuperScriptPreamplification Systemによって作製した。プライマーには、オリゴdTを用いた。得られたcDNAを鋳型にして、軽鎖遺伝子の取得用５’プライマー（κ１～κ6、λ1～λ６）と3’プライマー（hCKASCプライマーまたはhCLASCプライマー）を用いて、PCRを行った。PCR産物は、フェノール処理後、エタノール沈殿して10μLのTEバッファーに懸濁した。用いたプライマーの塩基配列とPCRの条件は以下のとおりである。軽鎖遺伝子取得用プライマーの塩基配列中、下線部はNcoIサイト、AscIサイトを示す。
【０２４５】
5’-プライマーκ1～κ6
hVK1a（配列番号：４１１）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
hVK2a（配列番号：４１２）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
hVK3a（配列番号：４１３）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
hVK4a（配列番号：４１４）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
hVK5a（配列番号：４１５）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
hVK6a（配列番号：４１６）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
5’-プライマーλ1～λ6
hVL1（配列番号：４１７）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
hVL2（配列番号：４１８）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
hVK3a（配列番号：４１９）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
hVL3b（配列番号：４２０）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
hVL4（配列番号：４２１）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CACGTTATACTGACTCAACCGCC
hVL5（配列番号：４２２）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGCC
hVL6（配列番号：４２３）：
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA
3’-プライマーhCKASC（配列番号：４２４）：
TCGACTGGCGCGCCGAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTG

3’-プライマーHCLASC（配列番号：４２５）：
TCGACTGGCGCGCCGAACATTCTGTAGGGGCCACTGTCTTCTC
【０２４６】
PCRの条件

cDNA	2μL
10× buffer ＃1（KODに添付）	10μL
dNTP mix(2.0mM)	10μL
25mM $MgCl_2$	4μL
5'側プライマー(100pmol/μL)	1μL
3'側プライマー(100pmol/μL)	1μL
滅菌済MilliQ	71μL
KOD DNA polymerase(東洋紡2.5U/μL)	1μL

94℃ 1分、55℃ 2分、74℃ 1分を35サイクル
【０２４７】
2-2-1 軽鎖遺伝子のファージミドへの組込み
１で得たPCR産物を以下の条件で制限酵素処理した。

PCR産物	10μL
10×NEB4（AscIに添付）	5μL
滅菌済MilliQ	33μL
AscI（NEB社 10 U/μL）	1μL
NcoI（宝酒造社 10 U/μL）	1μL

【０２４８】
37℃で1時間、50℃で1時間反応後、そのうち10μL分をアガロースゲル電気泳動し、600bp付近のバンドを切り出して、ジーンクリーンIIキット（フナコシ株式会社）で精製した。PCR産物と同様に制限酵素処理したpscFvCA9-E8VHdVLdをジーンクリーンIIキットで精製し、制限酵素処理したPCR産物と以下の条件で16℃で4時間～一晩反応させることによりライゲーションした。

制限酵素処理したpscFvCA9-E8VHdVLd	2μL
制限酵素処理したPCR産物	1μL
10×ligation buffer（T4 DNA ligaseに添付）	1.5μL
10mM ATP	1.5μL
滅菌済MilliQ	8μL
T4 DNA ligase （宝酒造 10 U/μL）	1μL

【０２４９】
2-2-2 ファージミドの大腸菌への導入
得られたligated DNAを用いて以下のように大腸菌DH12Sを形質転換した。即ち、ligated DNA を一旦エタノール沈殿し、1/5TE(TEを滅菌済MilliQで5倍希釈したもの)3μLに溶解した。そのうち、1.5μLをコンピテントセルDH12S(GIBCO BRL製)20μLに懸濁し、以下の条件でエレクトロポレーションを行った。
エレクトロポレーター
BRL社Cell-Porator(Cat.series 1600)

設定条件；	voltage booster	4kΩ
	capacitance	330μF
	DC volts	LowΩ
	charge rate	Fast

【０２５０】
形質転換した上記の大腸菌を形質転換用培地（SOB）2mLに植え、37℃で1時間振盪培養したあと、一部を寒天培地（Ampプレート）にまき、残りは、0.1%グルコース、100μg/mLアンピシリン含有2×TY培地で培養し、グリセリンストックした。寒天培地は30℃でincub

ateし、生えてきたコロニーを楊枝でつついて分離し、それぞれプラスミドを調製し、軽鎖遺伝子の塩基配列を調べた。

【０２５１】

SOB培地：950mLの精製水に次の成分を加えて振とうし、完全に溶解した後250mMのKCl溶液10mLを加え、5N NaOHでpH7.0に調製した。精製水を加えて1000mLに調整した後、オートクレーブで２０分間滅菌し、使用直前に滅菌した2MのMgCl$_2$を5mL加えた。

bacto-tryptone 20g
bacto-yeast extract 5g
NaCl 0.5g

2×YT培地：900mLの精製水に次の成分を加えて振とうし、完全に溶解した後5N NaOHでpHを7.0に調製し、精製水を加えて1000mLとした。オートクレーブで20分間滅菌して使用した。

bacto-tryptone 16g
bacto-yeast extract 10g
NaCl 5g

その他の試薬は以下から購入した。

メーカー	品名
シグマ	アンピシリンナトリウム
和光純薬	フェノール
シグマ	BSA
DIFCO	２×YT培地
和光純薬	カナマイシン硫酸塩
ナカライテスク	ポリエチレングリコール6000
ナカライテスク	Tween20
片山化学	NaCl
和光純薬	IPTG
和光純薬	スキムミルク
和光純薬	アジ化ナトリウム
和光純薬	トリエチルアミン
和光純薬	過酸化水素
和光純薬	ＯＰＤ錠
和光純薬	エタノール

【０２５２】

κ1、κ2、κ3、κ4、κ5、およびκ6、並びにλ1、λ2、λ3a、λ3b、λ4、λ5、λ6、λ7、λ8、λ9、およびλ10の全てについて以上の操作を行い、目的のクローンが得られているかどうか確認した。続いてκ1、κ2などの各グループのクローンをin vivoでの使用頻度に近い比率になるように混合した。これら軽鎖の各グループは、それぞれ実際の生体内でどのような割合で発現しているのかが既に知られている。PCR法で増幅してベクターに組み込んだこれらの遺伝子クローンを、in vivoでの使用頻度に近い比率になるように混合しVLライブラリーとした。VLライブラリーにおける各familyの構成比率を以下に示す。

【０２５３】

【表１】

Vκ

family	in vivoでの使用頻度(%)*	VLライブラリーでの構成比率(%)	KL200での構成比率(%)
Vκ1	39	37	30.7
Vκ2	12	12	19.8
Vκ3	36	35	33.7
Vκ4	12	12	10.9
Vκ5	1	2	5.0
Vκ6	-**	2***	0.0

* Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.
**発表時記載なし。
*** プライマーVK6-2で作製したcDNAとプライマーVK6-3で作製したcDNAを等量混合。

【０２５４】

【表２】

Vλ

family	in vivoでの使用頻度(%)*	VLライブラリーでの構成比率(%)	KL200での構成比率(%)
Vλ1	43	41	34.1
Vλ2	15	15*3	15.2
Vλ3	34	32*4	25.3
Vλ4	0	1.5*5	0.0
Vλ5	0	1.0*6	11.1
Vλ6	0	1.0	14.1
Vλ7	6	6	0.0
Vλ8	1	1	0.0
Vλ9	1	1	0.0
Vλ10	-*2	1	0.0

* Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.
*2 発表時記載なし。
*3 プライマーVL2で作製したcDNA5%とプライマーVL2-2で作製したcDNA10%を混合。
*4 プライマーVL3a-2で作製したcDNA17%とプライマーVL3bで作製したcDNA15%を混合。
*5 プライマーVL4aで作製したcDNA0.5%とプライマーVL4bで作製したcDNA0.5%とプライマーVL4cで作製したcDNA0.5%を混合。
*6 プライマーVL5abdeで作製したcDNA0.5%とプライマーVL5cで作製したcDNA0.5%を混合。

【０２５５】

３．軽鎖遺伝子ライブラリーと重鎖遺伝子ライブラリーの組み合わせライブラリー（scFv抗体遺伝子ライブラリー）の作製

3-1-1 PCRを用いたイムノグロブリン重鎖遺伝子の単離

2-1と同様の手順を用いて臍帯血、骨髄液、および末梢血のリンパ球、並びに扁桃腺からhuman μ primer（以下に示すプライマーの６３４）あるいはrandom hexamerを用いてcDNAを調製し、このcDNAを鋳型にして、以下に示すヒト抗体重鎖遺伝子の取得用5’プライマー（VH1～VH7）と3’プライマー（human JHプライマー4種を等量混合したもの、以下に示すプライマーの６９７～７００）、または、humanμプライマー（以下に示すプライマーの６３４）を用いて、PCRを行った。表中、下線をつけた部分はSfiIサイトを示す。hVH2aはgerm line VH2 familyに対応していないため、新たにVH2a-2を設計した。またhVH4aではVH4ファミリー全体に対応していないため、新たにhVH4a-2を設計した。VH5aもgerm line VH5 subfamilyに対応していなかったため新たにVH5a-2を設計した。またVH7に対応するprimerとしてhVH7を設計した。これらについても遺伝子増幅を行い、pscFvCA-E8VHdに組み込み、どのような遺伝子がとれたのかを塩基配列決定した。hVH5a-2についてはhVH1aと配列が酷似しているため、hVH1aで増幅させたものと同様の遺伝子産物が得られることが予想されるためこれについては使用しなかった。PCR産物は、フェノール処理後、エタノール沈殿して10μLのTEバッファーに懸濁した。

【０２５６】

634 humμCH1R（配列番号：４２６）:ATGGAGTCGGGAAGGAAGTC

各VH familyの増幅に使用したprimer

Human VH primer SfiI siteを下線で示す。

628 hVH1a（配列番号：４２７）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

629 hVH2a（配列番号：４２８）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG

630 hVH3a（配列番号：４２９）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

631 hVH4a（配列番号：４３０）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG

632 hVH5a（配列番号：４３１）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC

633 hVH6a（配列番号：４３２）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG

629-2 hVH2a-2（配列番号：４３３）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGRTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC

631-2 hVH4a-2（配列番号：４３４）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG

632-2 hVH5a-2（配列番号：４３５）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG

712 hVH7（配列番号：４３６）:

GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT

Human JH primer BstPI, XhoI siteを下線で示す。

697 hJH1-2（配列番号：４３７）:

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTGC

698 hJH3（配列番号：４３８）:

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCATTGTCC

699 hJH4-5（配列番号：４３９）:

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTTC

700 hJH6（配列番号：４４０）:

GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCGTGGTCC

cDNA 2μL
10× buffer ＃1（KODに添付） 10μL
dNTP mix(2.0mM) 10μL
25mM $MgCl_2$ 4μL
5'側プライマー(100pmol/μL) 1μL
3'側プライマー(100pmol/μL) 1μL
滅菌済MilliQ 71μL
KOD DNA polymerase(東洋紡2.5U/μL) 1μL
PCR条件：94℃ 1分、55℃ 2分、74℃ 1分を35サイクル

【０２５７】

3-1-2 重鎖遺伝子ライブラリーの作製

3-1-1で得たPCR産物を以下の条件で制限酵素処理した。

PCR産物 10μL
10×K buffer（宝酒造） 5μL
滅菌済MilliQ 33μL
SfiI (NEB社10 U/μL) 1μL
XhoI (宝酒造12 U/μL) 1μL

37℃で2時間反応後、そのうち10μL分をアガロース電気泳動し、400bp付近のバンドを切り出して、ジーンクリーンIIキット（フナコシ株式会社）で精製した。PCR産物と同様に制限酵素処理したpscFvCA-E8VHdをジーンクリーンIIキットで精製し、制限酵素処理したPCR産物と以下の条件で16℃で4時間～一晩反応させることによりライゲーションした。

制限酵素処理したpscFvCA-E8VHd 2μL
制限酵素処理したPCR産物 1μL
10×ligation buffer 1.5μL
（T4 DNA ligaseに添付）
10mM ATP 1.5μL
滅菌済MilliQ 8μL
T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/μL)1μL

【０２５８】

3-1-3 ファージミドの大腸菌への導入

得られたDNAを大腸菌DH12Sに形質転換した。具体的には DNA を一旦エタノール沈殿し、1/5TE(TEを滅菌済MilliQで5倍希釈したもの)3μLに溶解する。そのうち、1.5μLをコンピテントセルDH12S(GIBCO BRL製)20μLに懸濁し、エレクトロポレーション法により形質転換を行った。

エレクトロポレーター
BRL社Cell-Porator(Cat.series 1600)
設定条件；voltage booster 4kΩ
capacitance 330μF
DC volts Low Ω
charge rate Fast

【０２５９】

形質転換用培地（SOB）2mLに上記操作の終了した形質転換大腸菌を植え、37℃で1時間振盪培養したあと、一部を寒天培地（Ampプレート）にまき、残りは、0.1%グルコース、100μg/mLアンピシリン含有2×YT培地で培養し、グリセリンストックした。寒天培地は30℃でインキュベートし、生えてきたコロニーを楊枝でつついて分離し、それぞれプラスミドを調製し、重鎖遺伝子の塩基配列を調べた。VH1～VH7の全てについてこれらのことを行い、目的のクローンが得られているかどうか確認した。これらの各グループ（ファミリー）のクローンをin vivoでの使用頻度に近い比率になるように混合してVHライブラリーとした。VHライブラリーにおける各ファミリーの構成比率を以下に示す。

【０２６０】

【表３】

family	in vivoでの使用頻度(%)*	VHライブラリーでの構成比率(%)
VH1	25	29**
VH2	6.6	7
VH3	40	40
VH4	19	19***
VH5	5	- **
VH6	3.8	4
VH7	1.2	2

*Griffith AD et al. EMBO J. (1994) 13, 3245-60.
** 実際にはVH1とVH5は同一のプライマーで増幅されるため、分離して集計できない。
***VH4プライマーで作製したcDNAとVH4-2プライマーで作製したcDNAを混合してこの割合とした。

【０２６１】

3-2 組み合わせ遺伝子ライブラリーの作製

VHライブラリー200μgを下記条件でHindIIIとXhoIで消化し、重鎖遺伝子を切り出して、ジーンクリーンIIキットで精製した。

VHライブラリー200μg	100μL
10×K buffer（宝酒造）	40μL
滅菌済MilliQ	205μL
HindIII（宝酒造40 U/μL）	30μL
XhoI（宝酒造50 U/μL）	25μL

VLライブラリーの挿入されたベクターpscFvCA9-E8VHdVLdについても下記条件でHindIIIとXhoIで消化し、軽鎖遺伝子を含む断片を、ジーンクリーンIIキットで精製した。

VLライブラリーを挿入したpscFvCA9-E8VHdVLd	100μg	100μL
10×K buffer（宝酒造）		40μL
滅菌済Milli-Q		230μL
HindIII（宝酒造40 U/μL）		15μL
XhoI（宝酒造50 U/μL）		15μL

【０２６２】

次に、VH遺伝子ライブラリー断片と軽鎖遺伝子の挿入されたpscFvCA9-E8VHdVLdベクターを、次の条件下、16℃で一晩反応させてライゲーションした。

制限酵素処理した		
VHライブラリー断片	10μg	50μL
制限酵素処理した		

VLライブラリーの断片
を含むpscFvCA9-E8VHdVLd 40μg 50μL
10×ligation buffer
（T4 DNA ligaseに添付） 100μL
10mM ATP 100μL
滅菌済MilliQ 670μL
T4 DNA ligase (宝酒造 10 U/μL) 30μL

反応の終了したDNAを用いて大腸菌DH12Sを形質転換した。具体的にはDNAを一旦エタノール沈殿し、1/5TE(TEを滅菌済MilliQで5倍希釈したもの)30μLに溶解した。これをコンピテントセルDH12S(GIBCO BRL製)500μLに懸濁し、エレクトロポレーションを行った。

【０２６３】

エレクトロポレーター
BRL社Cell-Porator(Cat.series 1600)
設定条件；voltage booster 4kΩ
capacitance 330μF
DC volts Low Ω
charge rate Fast

【０２６４】

形質転換用培地（SOB）12mLに上記操作の終了した大腸菌を植え、37℃で1時間振盪培養したあと、一部を寒天培地（Ampプレート）にまき、残りは、0.1%グルコース、100μg/mLアンピシリン含有2×YT培地500 mLで培養し、グリセリンストックした。寒天培地は30℃でインキュベートし、生えてきたコロニーの数から得られたクローンの数を推定した。8.5×10^{10}クローンが得られた。

【０２６５】

４． scFv-CL抗体遺伝子ライブラリーからscFv-CL抗体ファージライブラリーの作製

１％グルコース及び100μg/mL のアンピシリンを加えた2×YT培地300mLを入れた５リットルのフラスコ16本にAIMS-5懸濁液を2.5mLを加え、３７℃で振とう培養し１時間おきに波長600nmにおける吸光度を測定しながら、吸光度が1.0になるまで増殖させた。培養液にヘルパーファージ液(M13KO7)をフラスコ当たり12mL加えてヘルパーファージを感染させ、３７℃で２時間培養し、ヘルパーファージ感染済みDH12Sとした。

5リットルのフラスコ24本に2×YT培地600mLと100μg/mLのアンピシリン0.6mL、50μg/m、38Lのカナマイシン0.8mL、ヘルパーファージ感染済みDH12S 200mLを加えて３７℃で20時間振とう培養した。

【０２６６】

菌体は４℃で8000rpm、１０分間遠心し、上清を集めた。上清に20％のポリエチレングリコール／2.5M NaCl 4Lを加えて約２０分間静かに攪拌した後、４℃で8000rpm、２０分間遠心、沈殿を1LのPBSで溶かし、20％のポリエチレングリコール／2.5M NaCl 200mLを加えて約２０分間静かに攪拌した後、４℃で8000rpm、２０分間遠心した。上清を捨ててさらに４℃で8000rpm、３分間遠心して沈殿を回収した。沈殿は0.05％ NaN_3を加えたPBSで溶解し、４℃で1000rpm、１５分間遠心し、上清を回収した後、４℃で8000rpm、３分間さらに遠心して上清を回収した。

回収したファージ溶液の力価は以下のようにチェックした。すなわち、ファージ溶液をPBSで10^6、10^7、10^8倍希釈し、その10μLをDH12S 990μLに感染させ、３７℃で１時間培養した。これをLBGAプレートに100μL播いて３０℃で１８時間培養した。コロニーの数をカウントすることにより希釈前の原液の力価を算出した。ファージ溶液原液を0.05％ NaN_3を含むPBSに2×10^{14}/mLになるよう懸濁した。

【０２６７】

５．癌細胞特異的抗体クローンの取得

5-1 癌細胞株を使用したファージ抗体スクリーニング

各種癌細胞株或いは臨床検体に関するファージ抗体を以下の手順で単離した。用いた細

胞株の種類は以下の通りである。各細胞株の培養条件は図３８の表に記載される。
膵癌細胞株PANC-1、MIA-Paca2
腎臓癌細胞株CCFRC1、Caki-1、CCFRC1、Caki-1、ACHN
卵巣癌細胞株KF28、RMG-1、RMG-2、SKOv3
胃癌細胞株SNU-5、MKN45、NCI-N87
肺扁平上皮癌細胞株RERF-LC-AI、EBC1
肺腺癌細胞株Calu-3、NCI-H441、A549、PC14
肝細胞癌細胞株HepG2、OCTH、Hep3B
肝細胞癌臨床検体（HCV陽性）、
肝内胆管細胞癌細胞株RBE
胃癌細胞株SNU5、MKN45、NCI-N87
大腸癌細胞株CW2、CaCo2
急性骨髄性白血病AML臨床検体

【０２６８】

付着性細胞株群については6ウェルプレート（Falcon 3516）において、ATL由来細胞株などの浮遊細胞株は浮遊培養フラスコ（70ml(スラントネック)）において、培地（RPMI-1640：Sigma-Aldrich 社製、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシン溶液）を用い、CO_2インキュベーター内、37℃で培養したものを使用した。

付着性細胞株は2mg/ml collagenase I(Gibco BRL)/cell dissociation buffer(Gibco BRL)で培養皿から解離させたのち、10%FBS/DMEMにて回収した。一方、浮遊系細胞の場合は一度培地を除くためにそのままの状態で遠心分離（400xg，4℃，2分）した。

このような操作の後、各細胞を1%BSA，0.05%NaN_3/PBS(BSA液)にて洗浄し、遠心分離（400xg，4℃，2分）し上清を除いた。

臨床組織材料に由来する臨床検体からの細胞の調製に関しては6ウェルプレート（Falcon 3516）において、培地（RPMI-1640：Sigma-Aldrich 社製、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシン溶液）を用い、CO_2インキュベーター内、37℃で培養したものを使用した。

【０２６９】

細胞を冷却したPBSで洗い、細胞数4x10^7をスクリーニングに使用した。これに1x10^{13}cfuのヒト抗体ファージライブラリーを混ぜ、反応液の終濃度を1%BSA-0.1%NaN_3/MEM、容積1.6mlとし、４℃にて４時間ゆっくり回転させて反応させた。反応終了後、反応液を二つに分け、それぞれを0.6mlの有機溶液(dibutyl phtalate cycloheximide 9:1)の上に重層し、マイクロ遠心機にて3000rpmの遠心力を２分間作用させ、細胞をチューブの底に沈降させた。それぞれのチューブについて、溶液を捨て、細胞を0.7mlの1%BSA/MEMで懸濁、0.7mlの有機溶媒の上に重層して遠心した。この操作をもう一度繰り返したのち、溶液を捨て、細胞を0.3mlのPBSで懸濁、液体窒素で凍結し、３７℃で融解した。

【０２７０】

これをOD0.5の大腸菌DH12S 20mlに１時間感染させ、その一部をアンピシリンプレートに蒔いて回収されたファージのtiterを算出した。ファージ感染大腸菌は600mlの2xYTGA培地（2xYT，200μg/ml ampicillin sulfate，1% glucose）にて30℃で通夜培養した。この通夜培養10mlを2xYTA培地（2xYT，200μg/ml ampicillin sulfate）200mlと混ぜ、37℃にて1時間培養後ヘルパーファージKO7を1x10^{11}入れ、３７℃にて１.5時間培養したのち、800mlの2xYTGAK(2xYT，200μg/ml ampicillin sulfate，0.05% glucose，50μg/ml kanamycin)を入れて３０℃にて通夜培養した。これを8000rpmにて10分間遠心して上清1lを調製、それに200mlのPEG液（20% polyetyleneglycol 6000，2.5M NaCl）を混ぜてよくかきまぜたのち、8000rpm 10分間の遠心を行いファージを沈殿させた。これを10mlのPBS/0.05%NaN_3に懸濁し、その一部を使用して大腸菌感染数を調べた。これが1stスクリーニングのファージである。

2ndスクリーニングには細胞数2x10^7と1stスクリーニングファージ1x10^{10}cfuを使用し、反応液の容積を0.8mlとした。反応液は1%BSA-0.1%NaN_3/MEMで、全体のスケールを1stスク

リーニングと同量で行った。
3rdスクリーニングは2ndファージ1x10^9 cfuを使用する以外は2ndスクリーニングと同じ条件で行った。
ファージ回収率が上がった場合その時点でスクリーニングラウンドを終了とし回収率が上がらない場合4th以降スクリーニングラウンドの場合も行うが、直前のラウンドで回収したファージを使用し、1x10^9 cfuの量のファージを用い同様におこなった。
各種細胞株についてのスクリーニングも上記に対するスクリーニングと同様にして行った。
【０２７１】
5-2 抗体クローンの選抜
HepG2でのスクリーニングを例に取るとスクリーニングラウンド3rdスクリーニングで回収率が上がったことから（図９）、この段階でHepG2細胞特異的な抗体クローンが濃縮されたと判断し、数百個のクローンをピックアップした。次にこれらの陽性のクローンについて、H鎖部分の塩基配列解析を行い、塩基配列の種類から重複を除き取得した抗体を分類しこれらについて、抗体発現チェックを行い、さらに以下の手順で発現陽性のクローンを選択した。
【０２７２】
６．抗体クローンの塩基配列決定
スクリーニングによって得られた抗体ファージ感染大腸菌を希釈して、100μg/mlのampicillinの入った普通寒天培地に蒔き、得られるコロニーをピックアップして2xYTGA培地にて30℃通夜培養、クラボウのPI-50にてDNAを抽出、dideoxy法で塩基配列を決定し、塩基配列の同一な重複クローンを除いた。また、この通夜培養0.05mlを1.2mlの2xYTAI(2xYT, 200μg/ml ampicillin sulfate,0.5mM IPTG)に植えて30℃にて通夜培養、マイクロ遠心機にて15000rpm 5分間遠心して上清をとった。
【０２７３】
７．抗体クローンの発現確認
7-1 抗体クローンの選択
抗体はcp3融合タンパクとして発現されるので、それを用いた発現検討を行った。即ち、まず前段落で得られた上清をMaxisorp(NUNC)に37℃にて２時間反応させた後、液を捨て、5%BSA/PBS/0.05%NaN_3を37℃にて2時間反応させてブロッキングを行った。液を捨て、0.05%Tween/PBSで5000倍希釈したウサギ抗cp3抗体（株式会社医学生物学研究所）を室温にて1時間反応させた後PBSで洗浄し、0.05%Tween/PBSで2000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（株式会社医学生物学研究所）を室温にて1時間反応させた後PBSで洗浄し、100μlのOPD液を室温にて2～10分反応させ、2N硫酸にて反応を停止し、SPECTRAmax 340PC（Molecular Devices）にて492nmの吸光度を測定した。
上清を反応させないネガティブwellをコントロールとし、その吸光度の２倍以上にならないものは、発現していないと判断し、以後の解析からは除いた。
【０２７４】
7-2 抗体サンプルの調製
7-2-1 cp型抗体発現大腸菌の作製
発現していた抗体クローンに関して該当のファージ感染大腸菌10mlをYTGAに植菌し、30℃にて一昼夜震盪培養した(前培養液)。これを4lのYT0.05GAに加え、30℃にて培養した。菌のO.D.が0.5になったとき、1M IPTGを4ml加え、その後30℃にて一昼夜震盪培養した。培養終了後、冷却遠心機にて10000g、4℃、10分間遠心し、得られた培養上清に等量の飽和硫酸アンモニウム水溶液を加え、室温にて1時間攪拌した。この溶液を冷却遠心機にて10000g、4℃、15分間遠心したのち、上清を捨て、得られた沈澱をPBS-NaN_3溶液20mlにて懸濁したのち、冷却遠心機にて10000g、4℃、5分間遠心し上清を回収した。これをPBSにて一昼夜透析した。これに、0.05%NaN_3/PBSにて平衡化したその上清抗cp3マウスモノクローナル抗体（株式会社医学生物学研究所）を化学的に固定化セファロースビーズを用い、抗体アフィニティーカラムを作成、上清を自然滴下させてビーズに反応しなかった成分をパ

スルーさせた。このカラムをPBS 100mlにて2回洗浄したのち、0.1%Tween20/PBS 30mlにて4回洗浄、さらにPBS 100mlにて2回洗浄した。これに0.2M Glycine-HCl pH3 4mlを3回ゆっくり加えて溶出成分を回収したのち、3M Tris 80μlを添加して中和した（抗体溶液）。これをMILLEX-GP 0.22μmフィルターにて濾過した後O.D.を測定し、抗体収量を求めた。

【０２７５】

7-2-2 pp型抗体発現大腸菌の作製

得られた抗体クローンは元々cp3型である。このDNAをクラボウPI-50にて抽出し、制限酵素SalIにて消化、自己再結合させたのち大腸菌DH12Sに導入して形質転換したのちLBGAプレートに蒔いて30℃にて通夜培養、得られた大腸菌コロニーを2xYTGAにて通夜培養し、pp型抗体発現大腸菌液を得た。

pp型の抗体クローンを発現するプラスミドを組み込んだ大腸菌10mlをYTGAに植菌し、30℃にて一昼夜震盪培養した(前培養液)。これを4lのYT0.05GAに加え、30℃にて培養した。菌のO.D.が0.5になったとき、1M IPTGを4ml加え、その後30℃にて一昼夜震盪培養した。培養終了後、冷却遠心機にて10000g、4℃、10分間遠心し、得られた培養上清に等量の飽和硫酸アンモニウム水溶液を加え、室温にて1時間攪拌した。この溶液を冷却遠心機にて10000g、4℃、15分間遠心したのち、上清を捨て、得られた沈澱をPBS-NaN_3溶液20mlにて懸濁したのち、冷却遠心機にて10000g、4℃、5分間遠心し上清を回収した。これをPBSにて一昼夜透析した。これに、0.05%NaN_3/PBSにて平衡化したIgG sepharose 6 Fast Flow（AmershamBiosciences社）2mlを添加し4℃にて一昼夜震盪させながら反応させた。この混合液をカラムに移したのち自然滴下させてビーズに反応しなかった成分をパススルーさせた。このカラムをPBS 100mlにて2回洗浄したのち、0.1%Tween20/PBS 30mlにて4回洗浄、さらにPBS 100mlにて2回洗浄した。これに0.2M Glycine-HCl pH3 4mlを3回ゆっくり加えて溶出成分を回収したのち、3M Tris 80μlを添加して中和した（抗体溶液）。これをMILLEX-GP 0.22μmフィルターにて濾過した後O.D.を測定し、抗体収量を求めた。

【０２７６】

８．抗体クローンの各種細胞株に対する反応性

8-1 FCM（フローサイトメトリー）解析

単離した各種抗体クローンの各種細胞株に対する反応性を以下の通りFCMで確認した。実験操作は次の通りとした。まず、付着性細胞株については6ウェルプレート（Falcon 3516）において、ATL由来細胞株などの浮遊細胞株は浮遊培養フラスコ（70ml(スラントネック)）において、培地（RPMI-1640：Sigma-Aldrich 社製、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシン溶液）を用い、CO_2インキュベーター内、37℃で培養したものを使用した。

【０２７７】

i）付着性細胞株は2mg/ml collagenase I(Gibco BRL)/cell dissociation buffer(Gibco BRL)で培養皿から解離させたのち、10%FBS/D MEMにて回収した。一方、浮遊系細胞の場合は一度培地を除くためにそのままの状態で遠心分離（400xg，4℃，2分）した。このような操作の後、各細胞を2.5%BSA，0.05%NaN_3/PBS(BSA液)にて洗浄し、2.5% normal goat serum/BSA液100μlに懸濁して氷上に30分静置した後、10^6個/wellになるように分注し、遠心分離（400xg，4℃，2分）し上清を除いた。

【０２７８】

ii-1）cp3型抗体の場合、5μg/mlになるように加えて、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて一度洗浄したのち、抗cp3マウスモノクローナル抗体（株式会社医学生物学研究所）5μg/ml BSA液100μlにて懸濁し、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて一度洗浄したのち、Alexa488結合抗マウスIgGヤギ抗体（Molecularprobe社製）5μg/ml BSA液100μlにて懸濁し、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて二度洗浄したのち、BSA液500μlにて懸濁し、固定液（ホルムアル デヒド）50μlを添加し、10分静置した。その後PBS 150μl添加し、セルストレイナー（Becton Dickinson社製）にて処理したのち、Becton Dickinson社製FACScaliver（FCM）にて 細胞集団の蛍光強度を解析した（(1)～(3)）。

【０２７９】
ii-2）pp型(protein A型)抗体の場合、５μg/mlになるように加えて、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて一度洗浄したのち、Alexa488結合抗マウスIgGヤギ抗体（Molecularprobe社製）５μg/ml BSA液100μｌにて懸濁し、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて二度洗浄したのち、BSA液500μｌにて懸濁し、固定液（ホルムアルデヒド）50μｌを添加し、10分静置した。その後PBS 150μl添加し、セルストレイナー（Becton Dickinson社製）にて処理したのち、Becton Dickinson社製FACScaliver（FCM）にて細胞集団の蛍光強度を解析した。
【０２８０】
本解析では検出抗体にあらかじめ蛍光色素（Alexa488等）を標識しておき、サンプル抗体を細胞と反応させた後、検出抗体と反応させた。細胞の表面に存在する抗原量に応じて結合する抗体量に差が生じ、その結果蛍光強度が異なってくるため、その細胞の表面に存在する抗原との親和性及び抗原量を推定することができる。更に死細胞およびデブリス等を測定値から除去する為、前方散乱光(Foward Scatter: FSC)をX軸に、側方散乱光(Side Scatter: SSC)をY軸にとり、ドットプロット展開から得られるデータより、生細胞と思われる集団（培養細胞使用の為ほぼ同一集団）にゲートをかけ、このゲート内のみ蛍光強度の測定を行った。
【０２８１】
8-2　パネル作成
FCMの結果から、抗体結合量と細胞数との関係を表すヒストグラムを作成した。抗体結合量をパラメータとした１パラメータ・ヒストグラムを描いた。１パラメータ・ヒストグラムとは、フローサイトメトリーにおける表示法の1種で、１つの指標（パラメータ）をX軸にとり、細胞数をY軸にとって表示したグラフである。
FCMの結果の代表例を図１０～１２に示す。これらの図に示されるように、基本的にはFCMの挙動は細胞と抗体の組み合わせによりユニークなものとなる。尚、図１０及び１１は、上記の方法で得られたscFv抗体と未分化悪性肝臓癌細胞株HLFとの反応性を示すヒストグラム（右）と細胞蛍光染色像（左）である。全ての抗体（５種類）について陽性パターンが得られているが、それぞれ非常に個性のある山の形を示している。この山の形状は抗原のエピトープの個性を反映していると思われる。図１２は複数のヒストグラム（使用した抗体が異なる）を重ねたものである。ヒストグラムの山がそれぞれ非常に個性的であることがわかる。しかしながら網羅的にFCM解析を続けていく中で、図１３～１５に示すような類似性の極めて高いヒストグラムを与える抗体群が認められた。また、図１６に示すように、どの細胞株を用いてFCM解析を行なっても一貫して類似性の高いヒストグラムを与える抗体群が認められた。図１６は３種類の抗体（035-234抗体、040-107抗体、041-118抗体）について得られたヒストグラムを比較した図である。後の検討によって、これら三種類の抗体は全てALCAMを認識していることが判明した。
図１７はFCM解析の結果を基に抗体群をグループ化する方法を示すものである。即ち、使用する細胞の種類に関わらず、FCM解析での挙動（ヒストグラムの形状）が類似する複数の抗体を同一のグループとし、パネル化する。尚、基本的には、ヒストグラムの形状が同一（重ね書きしたときに山が重なる）となる一群の抗体を一つのグループとするが、ヒストグラムの中央値、最頻値（ピーク値）、尖度等の因子で基準を設定し、それに基づいてグループ化してもよい。
【０２８２】
以上の手法に基づいて、複数の抗体クローンを分類した。まず、使用した細胞株毎に、各抗体クローンについて得られたヒストグラムを重ね書きすることによって各ヒストグラムを相互に比較し、抗体クローン間の類似性、及び抗体クローンの反応性を求めた。そして当該類似性及び反応性に基づき抗体クローンを分類し、表にまとめた（図１８）。このように８個の抗体グループ（以下の説明では、表の上から順にグループ１、２、３、４、５、６、７、８とする）を得られた。尚、図１８では、後に同定された抗原の情報も表示している。表中の各記号は、ネガティブコントロール抗体が与えるヒストグラム（基準ヒ

ストグラム）からのシフト量を示す。◎はシフト量が２０倍以上であること（ヒストグラムのピーク値が、基準ヒストグラムのピーク値の２０倍以上）、○は同１０倍以上であること、△は同３倍であること、×は同３倍未満であることをそれぞれ示す（斜線はデータなし）。尚、シフト量が多いほど反応性が高いことになる。

次に、作成したパネルの各抗体群の抗原が共通していることを以下の手順で検証した。

【０２８３】

９．抗体クローンが認識するタンパク質（抗原）の同定

9-1　免疫沈降用固相化抗体の調製

まず、pp型抗体溶液をカップリング緩衝溶液（0.1M $NaHCO_3$-NaOH pH9）にて透析した。すなわち、抗体溶液を透析膜（Snake Skin Pleated Dialysis Tubing 10,000 MWCO）に封入し、これをカップリング緩衝溶液（0.1M $NaHCO_3$-NaOH pH9）1.5Lに沈め、4℃でスターラーにて2～3時間撹拌したのち、緩衝溶液を交換して更に2～3時間透析した。その後もう一度緩衝溶液を交換して一昼夜透析した。

次に固相化に使用する活性化CNBr-activated Sepharose 4Bを調製した。即ち、Amersham Biosciences社製CNBr-activated Sepharose 4Bを1mM HClにて膨潤させた後、アスピレーターで吸引した。これにカップリング緩衝溶液50mlを添加し撹拌してからアスピレーターで吸引し、吸引したまま更にカップリング緩衝溶液を加えた。

抗体の固相化は以下のようにして行った。即ち、5mgの抗体溶液10mlに対して活性化ゲル1mlを加え、室温にて2時間反応させた。反応終了後、ゲルをカラムに移し、カップリング緩衝溶液1mlにて10回洗浄し、未反応抗体の有無をO.D.測定により確認した。固相化ゲルは、0.2M Glycine-NaOH pH8溶液5mlにて2回置換し、さらに同液5mlを添加して室温にて2時間静置したのち、液を自然滴下し、これに0.2M Glycine-HCl pH3 5mlを添加して置換、さらに同液5ml添加し5分間静置したのち自然滴下した。最後にカラムをPBS 20mlにて置換したのち自然滴下し、1%NP40、プロテアーゼインヒビター、0.05%NaN_3/PBSを添加してゲルを回収した。

【０２８４】

9-2　細胞膜上蛋白のビオチン標識およびcell lysateの作製

培養肝癌細胞株のビオチン標識は以下のようにして行った。即ち、5枚の15cmデイッシュにて培養した培養細胞HLFをPBSにて2回洗浄したのち、cell dissociation buffer(GIBCO社製)にて5mg/ml濃度に調整したcollagenaseI(GIBCO社製)を加えて、CO_2インキュベーターにて37℃で反応させ、細胞を遊離させたのち、培地にて回収し、これをPBS(-)にて2回洗浄したのち、血球計算盤にて細胞数を算出し、約5x10^7/mlになるようPBS(-)にて懸濁した。これにPBSにて1mg/mlになるように調整したEZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit（PIERCE社）を等量加え、室温にて30分静置したのち、PBSにて2回洗浄した。

ビオチン標識細胞についてのcell lysateは以下のように調製した。即ち、上記のビオチン標識細胞に4mlのlysis buffer(1% NP40/detergent base solution, detergent base solutionの組成は20mM HEPES pH8.0, 140mM NaCl, プロテアーゼインヒビター)を加え、細胞を懸濁し、これを冷却しておいたダウンスホモジナイザーに入れてホモジナイズしたのち、溶液に1/2量(2ml)のdetergent mix solution（1%NP40, tritonX-100,b-D-Maltoside,n-Octyl b-D-Glucoside, ,n-Octyl b-D-Maltoside, ,n-Decyl b-D-Maltoside,デオキシコール酸各0.5%/detergent base solution）を加え4℃にて4時間回転混和した。この溶液を100,000rpmにて30分間遠心したのちMILLEX-GP 0.22μmフィルターにて濾過した。

【０２８５】

9-3　免疫沈降反応

まず、固相化された抗体（以降、抗体ビーズと表記）約60μl分（溶液として約150μl）を2mlチューブに入れ、そこに4mM biotinを1/10 volume（15μl程）添加した。これに、培養皿0.5枚分のlysate（600μl)と60μlのbiotin液を混合したものを加え、4℃にて撹拌させながら数時間反応させた後、チューブを遠心（5500g,1分，4℃）し、上清を除いた。これに洗浄用biotin/lysis-T buffer(0.5mM biotin, 0.1%Tween20/PBS)を800μl加え、転倒混和を２、３回行ったのち、チューブを遠心（5500g，1分，4℃）し、上清を除いた

。この洗浄操作を再度行った後、抗体ビーズに溶出用クエン酸液（50mMクエン酸pH2.5）を30μl加え、撹拌したのち、チューブを遠心（5500g，1min，4℃）し、上清を回収した。残った抗体ビーズに再度溶出用クエン酸溶液を30μl加え、撹拌し、チューブを遠心（5500g，1min，4℃）し、上清を回収した。この溶出操作をさらに3回繰り返してサンプル溶液を回収し、それに3M Trisを加えて中和した。このサンプルをSDS-PAGEにて泳動し、銀染色にてバンドの確認を行った。このサンプルについては、同時にストレプトアビジン－HRP（Anti-Streptavidin，IgG Fraction，Conjugated to Peroxidase CORTEX biochem 社）を使用したウエスタンブロットを行いビオチン化された膜蛋白のバンドを検出した。

【０２８６】

9-4　切り出されたバンドについてのマススペクトル解析

9-4-1　ゲル内トリプシン消化

検出された膜蛋白に対応する部分をゲル内でトリプシン消化し、ペプチドを回収した。ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動を常法に従い行い、クマシーブリリアントブルーで染色することで得られたバンドを切り出した。これを200mM重炭酸アンモニウム-50%アセトニトリル溶液に浸し、37℃で45分間振盪後、溶液を廃棄して、同じ操作を2回繰り返すことでクマシーブリリアントブルーを除いた。このゲルを減圧乾燥し、それに40mM重炭酸アンモニウム(pH8.1)-10%アセトニトリルに溶かしたトリプシン（20μg/ml）をゲルスライスの単位面積（mm^2）あたり4μl加えて、室温で1時間置いて充分に浸潤させた。これに先に加えた量の2.5倍量のトリプシン溶液を加えて、37℃で18時間静置した。これをポアサイズが0.22μmのフィルター付きチューブで濾過して、トリプシンにより抗原が切断されて生じたペプチドを回収した。

【０２８７】

9-4-2　質量分析による抗原の同定

ゲル内トリプシン消化により得られた試料を、エレクトロスプレーイオン化方式イオントラップ四重極型質量分析装置につないだHPLCにかけた。HPLCの逆相クロマトグラフィーカラムから、0.1%TFAを含む0%から80%のアセトニトリルの直線濃度勾配変化により、疎水性の違いで順次溶出される各ペプチドをエレクトロスプレー法でイオン化し、各ペプチドの質量を分析した。

【０２８８】

同時に、それらのイオンの飛行経路の途中に置いたヘリウム原子との衝突により生じる各ペプチドの限定分解産物の質量を分析した。限定分解によりひとつのアミノ酸がはずれると、はずれたアミノ酸の質量分だけ小さいイオンが観測されるので、その質量差によりはずれたアミノ酸の種類を同定できる。さらにもうひとつアミノ酸がはずれると、はずれたアミノ酸の質量分だけ小さいイオンが観測されるので、その質量差によりはずれたアミノ酸の種類を同様に同定できる。同様の実験データ解析を進めることで、内部アミノ酸配列を決定することができる。得られたアミノ酸内部配列のセットを、公開されているアミノ酸配列データベースを用いて検索することにより、抗原の同定を行った。その結果、以下に示す通り、各抗体クローンの抗原が同定され、同一のグループの抗体は抗原が共通することが確認された。尚、同定結果は、同定された蛋白質のアミノ酸配列から類推される総質量が、トリプシン分解を行う前の抗原のSDSポリアクリルアミド電気泳動の結果により得られる分子量の実験データと矛盾しないことで、確認された。

グループ1に属する抗体の抗原：HER1（別名：ErbB1、c-erbB-1、EGFR（Epidermal Growth Factor Receptor）、v-erbB）

グループ２に属する抗体の抗原：HER-2（別名：ErbB2、c-erbB-2、neu）

グループ３に属する抗体の抗原：CD46抗原（別名：MCP（membrane cofactor protein）、gp45-70、HuLY-m5、measles virus receptor、MIC10、TLX-B antigen、TRA2、trophoblast leucocyte common antigen、trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen）

グループ４に属する抗体の抗原：ITGA3（integrin alpha3）（別名：alpha3beta1 Epiligrin Receptor、alpha3beta1 Integrin、Epiligrin Receptor、CD49c、VLA-3、Gap b3、Galactoprotein b3、Laminin-5 Receptor ）

グループ５に属する抗体の抗原：ICAM1（Intercellular adhesion molecule-1）（別名：Intercellular Adhesion Molecule 1、CD54 Antigen）
グループ６に属する抗体の抗原：ALCAM（Activaed leukocyte cell adhesion molecule）（別名：KG-CAM、CD166 Antigen、CD6 Ligand、Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule、Neurolin）
グループ７に属する抗体の抗原：CD147抗原（別名：BSG、TCSF（Tumor cell-derived collagenase stimulatory factor）、5F7 protein、OK blood group protein、basigin protein、collagenase stimulatory factor protein、EMMPRIN（Extracellular matrix metalloproteinase Inducer）、M6 activation antigen、human leukocyte activation antigen M6）
グループ８に属する抗体の抗原：IgSF4（別名：BL2、ST17、NECL2、TSLC1、IGSF4A、SYNCAM、sTSLC-1）

【０２８９】

以上の同定結果より、HER1に対する抗体クローンを３個（048-006抗体、057-091抗体、059-152抗体）、HER-2に対する抗体クローンを１個（015-126抗体）、CD46抗原に対する抗体クローンを７個（035-224抗体、045-011抗体、051-144抗体、052-053抗体、052-073抗体、053-049抗体、3172-120抗体）、ITGA3に対する抗体クローンを１個（015-003抗体）、ICAM1に対する抗体クローンを５個（052-033抗体、053-042抗体、053-051抗体、053-059抗体、053-085抗体）、ALCAMに対する抗体クローンを５個（035-234抗体、040-107抗体、041-118抗体、066-174抗体、083-040抗体）、CD147抗原に対する抗体クローンを１個（059-053抗体）、IgSF4に対する抗体クローンを１０個、取得できたことが明らかとなった。尚、以下の通り各抗体クローンのアミノ酸配列が同定された（IgSF4に対する抗体クローンは省略）。

【０２９０】

＜グループ１の抗体＞

(1)048-006抗体

配列番号：１(VH)、配列番号：２(VH CDR1)、配列番号：３(VH CDR2）、配列番号：４(VH CDR3）、配列番号：５(VL)、配列番号：６(VL CDR1)、配列番号：７(VL CDR2）、配列番号：８(VL CDR3)

(2)057-091抗体

配列番号：９(VH)、配列番号：１０(VH CDR1)、配列番号：１１(VH CDR2）、配列番号：１２(VH CDR3）、配列番号：１３(VL)、配列番号：１４(VL CDR1)、配列番号：１５(VL CDR2）、配列番号：１６(VL CDR3)

(3)059-152抗体　配列番号：１７(VH)、配列番号：１８(VH CDR1)、配列番号：１９(VH CDR2）、配列番号：２０(VH CDR3）、配列番号：２１(VL)、配列番号：２２(VL CDR1)、配列番号：２３(VL CDR2）、配列番号：２４(VL CDR3)

【０２９１】

＜グループ２の抗体＞

(1)015-126抗体

配列番号：２５(VH)、配列番号：２６(VH CDR1)、配列番号：２７(VH CDR2）、配列番号：２８(VH CDR3）、配列番号：２９(VL)、配列番号：３０(VL CDR1)、配列番号：３１(VL CDR2）、配列番号：３２(VL CDR3)

【０２９２】

＜グループ３の抗体＞

(1)035-224抗体

配列番号：３３(VH)、配列番号：３４(VH CDR1)、配列番号：３５(VH CDR2）、配列番号：３６(VH CDR3）、配列番号：３７(VL)、配列番号：３８(VL CDR1)、配列番号：３９(VL CDR2）、配列番号：４０(VL CDR3)

(2)045-011抗体

配列番号：４１(VH)、配列番号：４２(VH CDR1)、配列番号：４３(VH CDR2）、配列番

号：４４(VH CDR3)、配列番号：４５(VL)、配列番号：４６(VL CDR1)、配列番号：４７(VL CDR2)、配列番号：４８(VL CDR3)
(3)051-144抗体
配列番号：４９(VH)、配列番号：５０(VH CDR1)、配列番号：５１(VH CDR2)、配列番号：５２(VH CDR3)、配列番号：５３(VL)、配列番号：５４(VL CDR1)、配列番号：５５(VL CDR2)、配列番号：５６(VL CDR3)
(4)052-053抗体
配列番号：５７(VH)、配列番号：５８(VH CDR1)、配列番号：５９(VH CDR2)、配列番号：６０(VH CDR3)、配列番号：６１(VL)、配列番号：６２(VL CDR1)、配列番号：６３(VL CDR2)、配列番号：６４(VL CDR3)
(5)052-073抗体
配列番号：６５(VH)、配列番号：６６(VH CDR1)、配列番号：６７(VH CDR2)、配列番号：６８(VH CDR3)、配列番号：６９(VL)、配列番号：７０(VL CDR1)、配列番号：７１(VL CDR2)、配列番号：７２(VL CDR3)
(6)053-049抗体
配列番号：７３(VH)、配列番号：７４(VH CDR1)、配列番号：７５(VH CDR2)、配列番号：７６(VH CDR3)、配列番号：７７(VL)、配列番号：７８(VL CDR1)、配列番号：７９(VL CDR2)、配列番号：８０(VL CDR3)
(7)3172-120抗体
配列番号：８１(VH)、配列番号：８２(VH CDR1)、配列番号：８３(VH CDR2)、配列番号：８４(VH CDR3)、配列番号：８５(VL)、配列番号：８６(VL CDR1)、配列番号：８７(VL CDR2)、配列番号：８８(VL CDR3)
【０２９３】
＜グループ４の抗体＞
(1)015-003抗体
配列番号：８９(VH)、配列番号：９０(VH CDR1)、配列番号：９１(VH CDR2)、配列番号：９２(VH CDR3)、配列番号：９３(VL)、配列番号：９４(VL CDR1)、配列番号：９５(VL CDR2)、配列番号：９６(VL CDR3)
【０２９４】
＜グループ５の抗体＞
(1)052-033抗体
配列番号：９７(VH)、配列番号：９８(VH CDR1)、配列番号：９９(VH CDR2)、配列番号：１００(VH CDR3)、配列番号：１０１(VL)、配列番号：１０２(VL CDR1)、配列番号：１０３(VL CDR2)、配列番号：１０４(VL CDR3)
(2)053-042抗体
配列番号：１０５(VH)、配列番号：１０６(VH CDR1)、配列番号：１０７(VH CDR2)、配列番号：１０８(VH CDR3)、配列番号：１０９(VL)、配列番号：１１０(VL CDR1)、配列番号：１１１(VL CDR2)、配列番号：１１２(VL CDR3)
(3)053-051抗体
配列番号：１１３(VH)、配列番号：１１４(VH CDR1)、配列番号：１１５(VH CDR2)、配列番号：１１６(VH CDR3)、配列番号：１１７(VL)、配列番号：１１８(VL CDR1)、配列番号：１１９(VL CDR2)、配列番号：１２０(VL CDR3)
(4)053-059抗体
配列番号：１２１(VH)、配列番号：１２２(VH CDR1)、配列番号：１２３(VH CDR2)、配列番号：１２４(VH CDR3)、配列番号：１２５(VL)、配列番号：１２６(VL CDR1)、配列番号：１２７(VL CDR2)、配列番号：１２８(VL CDR3)
(5)053-085抗体
配列番号：１２９(VH)、配列番号：１３０(VH CDR1)、配列番号：１３１(VH CDR2)、配列番号：１３２(VH CDR3)、配列番号：１３３(VL)、配列番号：１３４(VL CDR1)、配列番号：１３５(VL CDR2)、配列番号：１３６(VL CDR3)

【０２９５】
＜グループ６の抗体＞
(1)035-234抗体
配列番号：１３７(VH)、配列番号：１３８(VH CDR1)、配列番号：１３９(VH CDR2)、配列番号：１４０(VH CDR3)、配列番号：１４１(VL)、配列番号：１４２(VL CDR1)、配列番号：１４３(VL CDR2)、配列番号：１４４(VL CDR3)
(2)040-107抗体
配列番号：１４５(VH)、配列番号：１４６(VH CDR1)、配列番号：１４７(VH CDR2)、配列番号：１４８(VH CDR3)、配列番号：１４９(VL)、配列番号：１５０(VL CDR1)、配列番号：１５１(VL CDR2)、配列番号：１５２(VL CDR3)
(3)041-118抗体
配列番号：１５３(VH)、配列番号：１５４(VH CDR1)、配列番号：１５５(VH CDR2)、配列番号：１５６(VH CDR3)、配列番号：１５７(VL)、配列番号：１５８(VL CDR1)、配列番号：１５９(VL CDR2)、配列番号：１６０(VL CDR3)
(4)066-174抗体
配列番号：１６１(VH)、配列番号：１６２(VH CDR1)、配列番号：１６３(VH CDR2)、配列番号：１６４(VH CDR3)、配列番号：１６５(VL)、配列番号：１６６(VL CDR1)、配列番号：１６７(VL CDR2)、配列番号：１６８(VL CDR3)
(5)083-040抗体
配列番号：１６９(VH)、配列番号：１７０(VH CDR1)、配列番号：１７１(VH CDR2)、配列番号：１７２(VH CDR3)、配列番号：１７３(VL)、配列番号：１７４(VL CDR1)、配列番号：１７５(VL CDR2)、配列番号：１７６(VL CDR3)
【０２９６】
＜グループ７の抗体＞
(1)059-053抗体
配列番号：１７７(VH)、配列番号：１７８(VH CDR1)、配列番号：１７９(VH CDR2)、配列番号：１８０(VH CDR3)、配列番号：１８１(VL)、配列番号：１８２(VL CDR1)、配列番号：１８３(VL CDR2)、配列番号：１８４(VL CDR3)
【０２９７】
１０．RNAi及び免疫染色による抗原確認
単離した抗体が、同定された抗原を認識していることを再確認することを目的として、二重鎖オリゴRNAを細胞に作用させて抗原遺伝子ノックダウンを行い、その細胞に対する当該単離抗原同定抗体の免疫染色性を調べた。
まず、細胞を6well培養皿にて培養し、約３０％コンフルになるよう準備した。これにリポフェクタミン2000（Invitrogen社製）を5μlと下記のオリゴRNA 100pmolを混ぜたものを作用させ、２日後に細胞をコラゲナーゼではがして回収し、これにcp3型の検証用精製抗体を5μg/mlの濃度で作用させた。洗浄したのち、ウサギ抗cp3抗体を2μg/ml濃度で作用させた。洗浄後、Alexa488標識抗ウサギIgGを2μg/mlで作用させた。これを洗浄したのちOptiLyse（NOTECH社製）50μlにて１０分間固定し、PBS 1mlを加えて希釈し、これをFACS Caliver（Beckmann社製）にて測定した。抗体反応液及び洗浄は2.5% BSA/PBS液を使用した。
【０２９８】
対象抗原：CD147
使用したオリゴRNAの配列：CAGAGCUACACAUUGAGAACCUGAA（配列番号：４４１）
対象細胞：腎淡明細胞癌CCFRC1細胞
検証抗体：059-053cp3抗体
【０２９９】
対象抗原：CD166
使用したオリゴRNAの配列：UACCUAUGUGCAGAGGAAUUAUGAU（配列番号：４４２）
対象細胞：腎淡明細胞癌CCFRC1細胞

検証抗体：035-234cp3抗体
【０３００】
対象抗原：HER1
使用したオリゴRNAの配列：GCAACCAUCUAAACCUGAAAUUGUA（配列番号：４４３）
対象細胞：肝細胞癌HLF細胞
検証抗体：048-006cp3抗体
【０３０１】
対象抗原：HER2
使用したオリゴRNAの配列：UAAUAGAGGUUGUCGAAGGCUGGGC（配列番号：４４４）
対象細胞：卵巣癌SKOv-3細胞
検証抗体：015-126cp3抗体
【０３０２】
対象抗原：IgSF4
使用したオリゴRNAの配列：CCCAACAGGCAGACCAUUUAUUUCA（配列番号：４４５）
対象細胞：肝細胞癌HLF細胞
検証抗体：035-273cp3抗体
【０３０３】
結果を図１９～２３に示す。図１９はCD147を対象抗原としたRNAiの結果、図２０はCD166を対象抗原としたRNAiの結果、図２１はHER1を対象抗原としたRNAiの結果、図２２はHER2を対象抗原としたRNAiの結果、図２３はIgSF4を対象抗原としたRNAiの結果である。これらの結果から明らかなように、いずれの検証抗体についても、RNAiを行った細胞集団では、RNAiを行わなかった細胞集団に比較して、抗体による染色性（即ち反応性）が著しく低下していた。このように、対応する抗原をノックダウンするオリゴRNAを用いたRNAi実験によって、単離した各抗体が、同定された抗原を認識していることが再確認された。
【０３０４】
１１．細胞染色及び組織染色による、各抗体の反応性の検討
11-1　実験方法
(1)細胞染色
細胞は2mg/ml collagenase I(Gibco BRL)/cell dissociation buffer(Gibco BRL)で培養皿から解離させたのち、10%FBS/DMEMにて回収し、$1x10^5$を使用した。これを2.5%BSA, 0.05%NaN_3/PBS(BSA液)にて洗浄したのち、2.5% normal goat serum/BSA液100μlに懸濁して氷上に30分静置したのち、cp3型抗体を5μg/mlになるように加えて、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて一度洗浄したのち、抗cp3マウスモノクローナル抗体（株式会社医学生物学研究所）5μg/ml BSA液100μlにて懸濁し、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて一度洗浄したのち、ALEXA488結合抗マウスIgGヤギ抗体（Molecularprobe社製）5μg/ml BSA液100μlにて懸濁し、氷上に1時間静置した。これをBSA液にて二度洗浄したのち、上清を捨て、これにベックマン・コールター社製OptiLyse B 50μlを加えて室温にて10分間静置し、細胞を固定した。これに1ng DAPI/BSA液950μlを加え、室温にて10分静置、遠心して細胞を集め、ICN社製MULTITEST SLIDEに封入して顕微鏡観察した。
【０３０５】
(2)組織染色
(2-1)抗体サンプルの調製
大腸菌通夜培養液0.5mlを6mlの2xYTAI(2xYT, , 200μg/ml ampicillin sulfate,0.5mM IPTG)に植えて30℃にて通夜培養、マイクロ遠心機にて10000rpm 5分間遠心して上清を回収した。これに等量の飽和硫安を加えて室温に30分静置したのち、室温にて10000rpm 5分間遠心して上清を捨て、得られた沈殿物を0.6mlのPBS-0.05%NaN_3, complete液にて懸濁、4℃にて15000rpm 5分間遠心して上清を回収した。
(2-2)切片作製
摘出された組織は5mm×5mm×10mmほどの大きさにし、4℃の4%PFA/0.01%グルタールアルデヒド/0.1Mカコジル酸バッファーに入れ（PFAは和光純薬、グルタールアルデヒドは関東

化学、カコジル酸ナトリウムはSIGMA）、電子レンジ（SHARP）を用いてマイクロウェーブ固定した後に、同固定液にて4℃で１時間再固定した。それから10％sucrose/PBSに移し4℃にて4時間浸漬後、15％sucrose/PBSに置換して4℃にて4時間浸漬したのち、20%/sucrose/PBSに置換して4℃にて一晩浸漬させ、OTC compoundにて包埋、ドライアイス・ヘキサン中で急速に凍結した。これを、クリオスタット（Reichert-Jung 2800 FRIGCUT E）にて4μmの厚さに薄切し，シランコートスライドガラス（MATSUNAMI）に貼り付け、冷風ドライヤーにて30分風乾した。

(2-3)染色

切片を貼付したスライドガラスは、PBS中で5分間ずつ3回浸漬して親水化した。次に50μl の0.3%H_2O_2/0.1%NaN_3を滴下し、室温にて10分間反応させて内因性ペルオキシダーゼのブロッキングをおこなった後、PBSで5分間ずつ3回洗浄した。そして2%BSA/PBS中で室温で10分間反応させ、非特異反応のブロッキングをした。その後、余分な液を落としたところへ抗体サンプル50μlを滴下し、室温にて1時間反応させたのち、PBSで5分間ずつ3回洗浄した。次に、50μlの抗CP3ウサギ抗体5μg/mlを滴下し、室温にて45分間二次抗体反応させたのち、PBSで5分間ずつ3回洗浄した。そして50μlのパーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体（DAKO）を滴下して、室温にて30分間三次抗体反応を行った。これをPBSで5分間ずつ3回洗浄したのち、50μlのDAB・H_2O_2発色液を滴下し、褐色に発色後、蒸留水を満たしたバットに移して反応を停止させた。その後10分間水洗したのち、ヘマトキシリンによる核染後、脱水・透徹し、マリノールにて封入し、鏡検した。

【０３０６】

11-2　実験結果

(1)抗HER1抗体群（グループ１）

細胞株染色（含むFACS）で陽性を示した癌種：膵癌細胞株PANC-1、腎臓癌細胞株CCFRC1、腎臓癌細胞株Caki-1、卵巣癌細胞株KF28、胃癌細胞株 SNU-5、肺扁平上皮癌細胞株RERF-LC-AI、卵巣癌細胞株RMG-1、未分化型肝細胞癌細胞株HLF、卵巣癌細胞株SKOv3、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株ACHN、肺扁平上皮癌細胞株EBC1、外陰部粘膜上皮細胞株A431、肺腺癌細胞株H1373、肝細胞癌細胞株HepG2、腎臓癌臨床検体樹立細胞株

細胞株染色（含むFACS）で陰性を示した癌種：乳癌細胞株BT474、ハムスター卵巣癌細胞株CHO

組織染色で陽性を示した癌種：腎臓癌、肝細胞癌、肝内胆管細胞癌、肺扁平上皮癌、肺腺癌、膵臓癌

【０３０７】

(2)抗HER2抗体群（グループ２）

細胞株染色（含むFACS）で陽性を示した癌種：肺腺癌細胞株Calu-3、卵巣癌細胞株SKOv3、乳癌細胞株BT474

細胞株染色（含むFACS）で陰性を示した癌種：肝細胞癌細胞株HLF、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株ACHN、腎臓癌細胞株293T、ハムスター卵巣癌細胞株CHO、腎臓癌細胞株Caki-1、腎臓胃癌細胞株CCFRC1、腎臓癌臨床検体樹立細胞株

【０３０８】

(3)抗CD46抗体群

細胞株染色（含むFACS）で陽性を示した癌種：大腸癌細胞株CaCo2、胃癌細胞株MKN45、未分化型肝細胞癌細胞株HLF、肝臓癌細胞株HepG2、肝内胆管細胞癌細胞株RBE、膵臓癌細胞株PANC1、腎臓癌細胞株CCFRC1、腎臓癌細胞株Caki-1、肺腺癌細胞株NCI-H441、肺扁平上皮癌EBC1、胃癌細胞株NCI-N87、胃癌細胞株SNU-5、肺扁平上皮癌細胞株RERF-LC-AI、肝細胞癌臨床検体、乳癌細胞株BT474、腎臓癌細胞株293T、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株ACHN、肺腺癌細胞株H1373

細胞株染色（含むFACS）で陰性を示した癌種：ハムスター卵巣癌細胞株CHO、外陰部粘膜上皮細胞株A431

組織染色で陽性を示した癌種：腎臓癌、肝細胞癌、肝内胆管細胞癌、肺腺癌、膵癌

尚、これまでにCD46抗原との関連性について特別の報告のない肝内胆管細胞癌及び膵臓癌においてもCD46抗原の特異的な発現が認められた。

【０３０９】

(4)抗ITGA3抗体群（グループ４）

細胞株染色（含むFACS）で陽性を示した癌種：未分化型肝細胞癌細胞株HLF、卵巣癌細胞株SKOv3、腎臓癌細胞株ACHN、腎臓癌細胞株Caki-1、肺腺癌細胞株H1373、肺扁平上皮癌EBC1、外陰部粘膜上皮細胞株A431、乳癌細胞株BT474、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株CCFRC1、肝細胞癌細胞株OCTH、肝内胆管細胞癌細胞株RBE、膵臓癌細胞株PANC-1、膵臓癌細胞株MIA-Paca2、肺腺癌細胞株A549、肺腺癌細胞株NCI-N441、肺腺癌細胞株Calu-3、肺扁平上皮癌細胞株RERF-LC-AI、胃癌細胞株SNU5、胃癌細胞株MKN45、胃癌細胞株NCI-N87、大腸癌細胞株CW2、卵巣癌細胞株SKOv3、卵巣癌細胞株KF-28、卵巣癌細胞株RMG-1、卵巣癌細胞株RMG-2

細胞株染色（含むFACS）で陰性を示した癌種：腎臓癌細胞株293T、肝細胞癌細胞株HepG2、ハムスター卵巣癌細胞株CHO

組織染色で陽性を示した癌種：肝内胆管細胞癌、膵臓癌

尚、これまでにITGA3との関連性について特別の報告のない胆肝癌及び膵臓癌においてもITGA3の特異的な発現が認められた。

【０３１０】

(5)抗ICAM1抗体群（グループ５）

細胞株染色（含むFACS）で陽性を示した癌種：肝癌細胞株HepG2、肺腺癌細胞株PC14、腎臓臨床検体より樹立した細胞株

細胞株染色（含むFACS）で陰性を示した癌種：未分化型肝細胞癌細胞株HLF、卵巣癌細胞株SKOv3、乳癌細胞株BT474、腎臓癌細胞株293T、腎臓癌細胞株ACHN、腎臓癌細胞株Caki-1、肺腺癌細胞株PC14、腎臓癌細胞株CCFRC1、ハムスター卵巣癌細胞株CHO

組織染色で陽性を示した癌種：肝細胞癌

【０３１１】

(6)抗ALCAM抗体群（グループ６）

細胞株染色（含むFACS）で陽性を示した癌種：肝癌細胞株HepG2、OCTH、Hep3B、及びHLF、腎臓癌細胞株Caki-1、CCFRC1、ACHN、293T、及び臨床検体より樹立した細胞株、肺癌細胞株PC14、NCI-H441、EBC-1、RERF-LC-AI、A549、及びH1373、卵巣癌細胞株SKOv3、KF-28、RMG1、及びRMG2、胃癌細胞株NCI-N87、大腸癌細胞株CW2、乳癌細胞株BT474、急性骨髄性白血病AML臨床検体、ハムスター卵巣癌細胞株CHO

細胞株染色（含むFACS）で陰性を示した癌種：外陰部粘膜上皮細胞株A431

組織染色で陽性を示した癌種：腎臓癌、肝細胞癌、肝内胆管細胞癌、肺扁平上皮癌、肺胞上皮癌、大腸腺癌

尚、これまでにALCAMとの関連性について特別の報告のない腎臓癌、肝細胞癌及び胆肝癌においてもALCAMの特異的な発現が認められた。

【０３１２】

(7)抗CD147抗体群（グループ７）

細胞株染色（含むFACS）で陽性を示した癌種：肝臓癌細胞株HepG2、腎臓癌細胞株CCFRC1、腎臓癌細胞株ACHN、腎臓癌細胞株Caki-1、肺腺癌PC14、腎臓癌臨床検体より樹立細胞株

細胞株染色（含むFACS）で陰性を示した癌種：ハムスター卵巣癌細胞株CHO

組織染色で陽性を示した癌種：腎臓癌

尚、これまでにCD147抗原との関連性について特別の報告のない腎臓癌においてもCD147の特異的な発現が認められた。

【０３１３】

１２．IgG型抗体への変換

12-1　IgG型抗体遺伝子の構築

抗体医薬としての有効性を探るため、一部の抗体をIgG型へ変換した。

まず、scFVcp3型抗体のVH、VL遺伝子を用い、それをIgG1のFc領域と遺伝子の塩基配列内にクローニングする際必要な制限酵素サイトが無いことを確認した。抗体遺伝子を鋳型とし、H鎖とL鎖増幅用プライマーを用い、PCRを行った。増幅産物をIgG1 construction vectorのCMVプロモーター下流へライゲーションし、IgG型抗体遺伝子を含むプラスミドDNAを得た。

【０３１４】

12-2　IgG型抗体の発現

プラスミドDNAのCHO-K1細胞へのトランスフェクションにはGenePORTER Reagent（ Gene Therapy Systems社：T201007）を使用した。まず、60mm培養皿にCHO-K1細胞が2×10^4cells/mlになるように、トランスフェクションの前日から準備しておいた（培地はα-MEM(Invitrogen:12561-056)に10%FCS(エキテック社:268-1)添加したものを使用）。

プラスミドDNA 8μgを250μLの血清非含有培地（Serum Free Medium、以下SFMと略す-(Invtrogen:12052-098 CHO-S-SFMII)に溶かし、0.22μmのフィルターにかけた。GenePORTER Reagent 40μLを250μLのSFMに加えた。

SFMに溶かしたプラスミドDNAとGenePORTER Reagentをすばやく混ぜ、室温30min静置した。

細胞をSFM 2mlで2回洗い、プラスミドDNA-GenePORTER mixture (Transfection Medium)を細胞の入ったプレートにゆっくり加え、インキュベーター内、37℃、5時間培養した。

トランスフェクション用培地を吸引し、αMEM 10%FCSで2回洗った後、αMEM 10%FCSを5ml加え、インキュベーター内、37℃、48時間培養した。

αMEM 10%FCS＋700μg/ml G418（Sigma:G7034）の培地10mLに置き換え、セレクションを開始した(以後のmediumはαMEM 10%FCS＋700μg/mL G418を使用)。37℃、48時間培養後、細胞をPBS 10mLにて洗浄し、0.25%Trypsin-EDTA（Sigma T4049）750μLにて処理後、αMEM 5mL加えプレートより剥離、回収し細胞数を測定した。その結果を元に限界希釈を10cells/200μL/ウェル（96ウェルプレート２枚）の条件で行った。14日間培養後、各wellの培養上清を用いてELISAを行い、IgG型抗体の発現を確認した。

【０３１５】

12-3　培養上清からの発現タンパク(IgG)の精製

Protein G Sepharose 4 Fast Flow(amersham pharmacia biotech:17-0618-01) 1mLをカラムにつめ、5mLのPBSで平衡化した。培養上清をアプライ、流速1滴/2秒で送液し、発現タンパク(IgG)をカラムに結合させた。10mLのPBSを流速1滴/2秒で送液し、非吸着成分を洗浄後、6mLの溶出バッファー（0.2M グリシン-HCl,pH3）を流速1滴/秒で送液、溶出液を1mLずつ1.5mlチューブに回収した。回収チューブにはあらかじめ中和バッファー（3M Tris-HCl）400μLを添加、回収と同時に中和した。溶出液をまとめ750μLまで濃縮、溶液置換（PBS、complete、0.01%NaN_3）を行い、SDS－PAGEによって抗体タンパクの濃度を算出した。

【０３１６】

１３．取得に成功した抗HER1抗体（048-006抗体）によるEGF結合阻害実験

13-1　実験手順

A431細胞を15φ培養皿で培養し（培地：10% FBS及び1% PS含有DMEM）、90%コンフルエント時に細胞をcell dissociation buffer(GIBCO社:13151-014)で剥がして回収した。1.0% BSA及び0.05% NaN_3含有PBSを2ml加え懸濁した。4℃で30分間静置した後、96ウェルV底プレートの各ウェルへ100μl（約2.5×10^5 cells）ずつ分注した。遠心（650G）2分間で細胞を沈殿させ上清を除く。1.0% BSA含有PBSを用いて調製した各抗体溶液（HR1-007[10μg/ml], 48-006[10μg/ml, 5μg/ml, 1μg/ml], 59-152[10μg/ml, 5μg/ml, 1μg/ml]）200μlを加え、細胞を懸濁した。4℃で1時間静置した後、ビオチン・ラベルしたEGF（ビオチン化EGF：50μg/ml）を終濃度1μg/mlになるように各ウェルに添加し、細胞を懸濁した。尚、ビオチン化EGFは以下の方法で作製した。まず、EGF（PBS(-)で1mg/mlに調製；AUSTRAL Biologicals社:GF-010-5）50μlへ、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin（PBS(-)で2mg/mlに調製;PIERCE社:21335）を25μl加える。室温で30分間静置した後、1Mグリシン(pH=

7.0～8.0)を10μl加える。室温で30分間静置した後、PBS(-)を15μl加え4℃で保存した（終濃度500μg/ml）。これを1.0% BSA含有PBSで10倍希釈して実験に使用した。

4℃で１時間静置した後、遠心（650G）を2分間行い、上清を除く。1.0% BSA含有PBSを180μl加えた後、遠心（650G）を2分間行い、上清を除く。HRP標識ストレプトアビジン（0.2μg/ml（1.0%BSA含有PBS）;PIERCE社:21126）を100μl加え、細胞を懸濁した。4℃で１時間後、遠心（650G）を2分間行い、上清を除く。1.0% BSA含有PBSを180μl加えた後、遠心（650G）を2分間行い、上清を除く。この操作を再度行う。OPD（Wako社:154-01673）発色溶液を100μl加え、細胞を懸濁した。室温で4分後、発色停止溶液（2N H_2SO_4）を100μl加える。遠心（650G）を2分間行い、上清を平底プレートへ移す。プレートリーダーで492nmの吸光度（A492）を測定し、数値化した。

【０３１７】

13-2　結果

結果を図２４に示す。コントロールのHR1-007は、EGFの結合に何の影響も及ぼさないが、048-006抗体と059-152抗体はEGFの結合を阻害している。但し、048-006抗体がEGFの結合をほぼ完全に阻害できるのに対し、059-152抗体は濃度を上げても、完全な阻害効果は得られなかった。尚、048-006抗体は0.02μg/ml程度の低濃度でも阻害効果を示す（図２４Ｃ）。

本結果は、各抗体（048-006抗体、059-152抗体）のEGFとの拮抗活性が、抗腫瘍性などの薬理作用の一部となる可能性を示唆した。

【０３１８】

１４．取得に成功した抗HER1抗体（048-006抗体）のHER1のリン酸化シグナル阻害実験

リン酸化抗体を用い、取得に成功した抗HER1抗体（048-006抗体）がHER1のリン酸化シグナルを阻害するか検討した。具体的には、3種類細胞（腎細胞癌（CCF-RC1、Caki-1）及び類上皮がん（A431））を用い、048-006抗体及び059-152抗体の阻害効果とエルビタックスの阻害効果を比較した。

【０３１９】

14-1　実験手順

各細胞を6ウェル培養皿で培養し、60%コンフルエント時に培地（10% FBS及び1% PS含有DMEM）をDMEMへ置換した。16時間後、各抗体（HR1-007, 048-006, 059-152（PBS(-)で2mg/mlに調製））とエルビタックスをそれぞれ終濃度10μg/mlまたは1μg/mlになるように各ウェルへ添加した。30分後、EGF（PBS(-)で20μg/mlに調製）を終濃度1μg/mlになるように各wellへ添加した。30分後、各ウェルをPBS(-)で洗い、液体窒素で培養皿ごと急速凍結した。各ウェルへlysis buffer（50mM Tris(pH7.4), 150mM NaCl, 1mM Na3VO4, 10mM NaF, 1% TritonX100, complete(Roche社:11836145001)）を加え、細胞を懸濁して遠心チューブへ移した。10分間の遠心処理（10000G）によって細胞屑を沈殿させ、上清の一部をSDS-PAGEに供した。メンブレンに転写し、一次抗体に抗リン酸化チロシン抗体（1μg/ml;upstate社:05-321）又は抗β-actin抗体（1μg/ml;abcam社:ab25139）、二次抗体に２次抗体反応：HRP標識抗マウスIgG）を用いてウエスタンブロットを行った。露光は、A431細胞の際は、感光1-2秒、CCF-RC1細胞の際は感光10秒、Caki-1の際は感光1分を要した（元々EGFによる外部刺激に対する細胞感受性に大きな違いがあった）。

【０３２０】

14-2　結果

結果を図２５（Ａ及びＢ：A431細胞を用いたウエスタンブロットの結果、Ｃ～Ｅ：取得に成功した抗体とエルビタックスのHER1リン酸化シグナル阻害効果の比較）に示す。CCF-RC1及びA-431細胞の系では、コントロールのHR1-007は、HER1のリン酸化シグナルに何の影響も及ぼさないが、048-006抗体と059-152抗体は濃度依存的にシグナルを阻害している。048-006抗体はEGFの結合をほぼ完全に阻害し、HER1の自己リン酸化もほぼ完全に阻害した。059-152抗体はEGFの結合を半分程度阻害した。また、048-006抗体よりも弱いながらもHER1の自己リン酸化も阻害した。048-006抗体と059-152抗体の阻害能はともに、エルビタックスを凌駕するものであり、特に048-006抗体の阻害能は際立っている。

尚、EGFによる外部刺激に対する感受性は細胞種によって異なる。そのため、Caki-1の様にEGFによる外部刺激にほとんど感受性の無い細胞を使用した場合、抗体によるシグナル阻害効果の差が認められない結果となった。

本結果により、各抗体（048-006抗体及び059-152抗体）がEGFに対するHER1の感受性細胞に対して、HER1のチロシンキナーゼ回路を抑制する活性を有し、増殖阻害や抗腫瘍作用などの薬理作用を発揮する可能性が示唆された。

【０３２１】

１５．BIAcoreによる結合定数の測定

取得に成功した抗体048-006、059-152に関して、発現Her1との解離定数を測定した。

15-1　実験手順

（１）Her1部分配列の強制発現

HER1のシグナル以降の領域から膜貫通領域の直前までの配列（発現部位26位～645位の621アミノ酸（配列番号：９４３）をクローニングした。クローニング並びに発現にはpSecTagIIベクター（インビトロジェン）を使用した。本ベクターに挿入することによってmyc及びhisタグが付加される。

【０３２２】

（２）発現細胞の回収

293T細胞を培養した15φ培養皿(80％コンフルエント)１枚用意し、細胞が剥離しないように注意しながら培地交換した後、培養に供した。これによって90-100％コンフルエントで細胞が凝集している状態を形成させた。細胞回収の前日、最後の培地交換を行った。溶液Ａとして、D-MEM(無血清)1.9mlにDNA 75μｌを添加し、タッピング調整した。また、溶液Ｂとして、D-MEM(無血清)1.9mlにLipo 75μｌを添加し、タッピング（50mlファルコン）調整した。

溶液Ｂの作製から１分後、溶液Ｂを5mlピペットで溶液Ａに添加し、すぐさまピペッティングし、室温で20分間インキュベートした。50ml培養容器（ファルコン）にD-MEM(無血清)22.5mlを計りとり、血清2.5mlを添加した後、37℃で15分間インキュベートし、D-MEM(血清入り)とした。

293T細胞が凝集した状態の15φ培養皿から培地を除き、細胞が剥離しないように注意しながら壁伝いにD-MEM(無血清)25mlを加えた。添加したD-MEM(無血清)をアスピレーターで吸い出し、D-MEM(血清入り)25mlを加えた。

D-MEM(血清入り)の作製から20分後に溶液Ａと溶液Ｂの混合液3.8mlを25mlのピペットで細胞に添加し、細胞を剥離した。ピペッティング操作で細胞をほぐした後、CO_2インキュベーター内で2日間静置した。2日後、上清を回収し、タンパク精製に供した。

【０３２３】

（３）分泌タンパク精製(Ni-NTA)

Ni-NTAアガロースゲル(QIAGEN)2ml(ベッドボリューム1ml)をカラムに充填し、PBSにて平衡化した後、（２）で回収した上清をカラムに供した。フロースルー液を再度カラムに供した。PBS 5mlで洗浄し、吸光度(280nm)<0.005になるまで20，50，100，250，500 mMイミダゾール/PBS各5mlで段階溶出した。さらに0.5M EDTA/PBS 10mlで溶出した。透析により溶液置換し、BIAcore固定化サンプルとした。

【０３２４】

（４）BIAcore測定

抗体クローンと発現したHer1との相互作用を調べ、KD（解離定数；kd／ka）を決定した。解析には、BIAcore1000バイオセンサー装置を使用した。

カルボキシメチルデキストラン（Sensor Chip CM5）、Research grade、BIACORE）センサーチップを用いた。CM5マトリックスへの静電吸着、及びCM5上のリシル基と活性化したカルボキシル基との共有結合により、抗原（Her1）をチップに固定した。EDC／NHSカップリング化学反応によって、カルボキシル基を活性化した。

流速5μL／分、HBS－EP（BIACORE）の条件下、EDC／NHS（アミンカップリングキット、BIACOREをEDC、NHSを当量混合）を用い、CM5上のリシル基の活性化後（コンタクトタイム

2.4分）に、HBS－EP（BIACORE）でチップを洗浄した。続いてHer1（20μg/mL：Sigma製、0.6mgタンパク質/mlを10mM酢酸（ｐＨ４．０）で希釈）をチップに加えた。チップをHBS－EP洗浄した後、続いて、1Mのエタノールアミン(pH8.5)を加え、残存する活性化カルボキシル基を不活性化した。その後、50mMのNaOHで洗浄し、共有結合していないHer1を全て除去した。尚、すべての解析実験は、HBS－EP流速35μl/分 HBS－EP（BIACORE）、25℃の条件下で実施し、再生は50mMのNaOHを用いて行った（1分間）。

059-152抗体又は048-006抗体を図中の各濃度でHBS－EP流速35μl/分で反応させ、結合定数を解析した。

【０３２５】

15-2　結果

結果を図２６に示す。048-006抗体は、各測定点においてKD=10^{-11}（M）を越える非常に強い結合力を示した。なお、各検出値に基づいたGlobalフィッティングの実際の値は4.8×10^{-13}（M）であったがこれはBIAcoreの信頼出来る測定限界を越えていた。059-152抗体については、結合解離曲線を検出するに至らなかった。これは本抗体が人工的に作製された強制発現体の高次構造を認識出来ていない事に起因すると考えられる。換言すれば、複合体の高次構造、或いはインタクトな膜上タンパクでしか取り得ない高次構造を本抗体が認識していることが示唆された。

【０３２６】

１６．抗HER1抗体、抗HER2抗体、抗ITGA3抗体、抗ALCAM抗体、抗ICAM抗体の細胞傷害性試験（ADCC活性測定）

抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC：Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity）は、ウイルス感染細胞など人体にとって有害な細胞を殺傷、攻撃する免疫反応であり、膜表面に広く抗体が結合した細胞を標的と見なし、ナチュラルキラー細胞や単球を主とする「エフェクター細胞」が攻撃する機構である。ADCCによる細胞傷害性は、細胞膜表面抗原に特異的に結合する抗体、およびエフェクター細胞の組み合わせに依存して起きる。

腫瘍表面抗原に特異的に結合する抗体のうちのいくつかは抗腫瘍効果、がん治療効果が示され、抗体医薬として販売されているが、これら抗体の主要な作用機序はADCCであるという報告がなされている。そこで、本発明者らが単離に成功したがん抗原特異的抗体に抗腫瘍効果があるか、即ちがん治療用抗体として有望であるかを評価するための方法として、ADCCの検出を試みた。以下に示す実験では標的細胞に対象抗原を認識するヒトIgG型抗体クローンを反応させてエフェクター細胞に提示するという方法を用いた。ADCCの検出は、エフェクター細胞により攻撃された標的がん細胞から培地中へ漏出する乳酸デヒドロゲナーゼの酵素活性を、試薬の発色で検出する原理の細胞傷害性検出キットを用い、傷害の度合いを算出した。

【０３２７】

16-1　ADCCの誘導１(ITGA3抗体である015-003抗体の場合：scFVcp3型抗体を使用）

ITGA3抗体である015-003抗体についてはscFVcp3型抗体を使用し、anti-M13 pIII rabbit antibodyを組み合わせたアッセイ系によってADCC活性を検討した。また、使用した標的対象培養細胞は肝がんHLF細胞である。操作手順は以下の通りとした。

(1)以下の手順でボランティアより末梢血を採取し単核球を分離する。まず、ボランティアから採血したヘパリン添加末梢血30 mlをPBSで80 mlに希釈し、遠心チューブ4本に10 mlのリンパ球単離試薬Ficoll Paque Plus（Amersham Bioscience 社製）を分注しておいたものに静かに重層し、遠心分離（400 x g、20℃、40分）した。単核球画分（リンパ球と単球を含む）を回収して冷PBSにて80 mlに希釈し、遠心分離（200 x g、4℃、15分）により沈殿させた。

(2)最終密度が5.0 x 10^{6} cells/mlになるように冷細胞傷害性試験培地（Cytotoxic Medium、以下CTMと略す。RPMI-1640 培地、1% (v/v) ウシ胎児血清、1% (v/v) Penicillin - Streptomycin Solution、1% (v/v) 1 M HEPES buffer (pH7.0)：Invitrogen 社製） 培地にけん濁し、エフェクター細胞とする。

(3)直径150mmの培養皿上で液体培地 1（Minimum Essntial Medium Alpha Medium：Invitr

ogen 社製、10% (v/v) ウシ胎児血清：Equitic-Bio 社製、1% (v/v) Penicillin - Streptomycin Solution：Sigma-Aldrich 社製）にて標的対象培養細胞を成育させた。液体培地を除去し、細胞をPBS 10 mlで2回洗浄し溶液を除去した後、4 % (w/v)コラゲナーゼType IV（Invitrogen 社製）を5 ml加え37℃で10分保温させることにより細胞を培養皿から剥離させた。さらに5 mlの液体培地2（RPMI-1640、10% (v/v) ウシ胎児血清、1% (v/v) Penicillin - Streptomycin Solution：Sigma-Aldrich 社製）（RPMI-1640：Sigma-Aldrich 社製、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシン溶液）を加えてコラゲナーゼ反応を停止させ、浮遊した細胞を回収し、細胞懸濁液を得た。
(4)(3)の細胞懸濁液の細胞密度を測定した後、遠心分離して上清を除き、最終密度 1.5 x 10^5 cells/mlになるように冷CTM培地にけん濁する。
(5)氷上のV底96wellマルチプレートに標的細胞を100 μlずつ分注する。
(6)2 μg/mlのscFv-pIIIファージ抗体-CTM溶液を100 μlずつ分注し、60分間氷上で反応させる。
(7)遠心分離（Swing rotor: 500 x g, 4 ℃, 10 min.）した後上清を除く。
(8)細胞ペレットを5 μg/mlの抗M13 pIIIウサギポリクローナル抗体-CTM溶液（それぞれ150 μl ずつ）にけん濁した後、100 μl分をU底96wellマルチプレートへ移す。
(9)(2)のエフェクター細胞（または2% Triton X-100-CTM溶液）を加え、遠心分離（Swing rotor: 50 x g, 4 ℃, 5 min.）する。
(10)5% CO_2、37 ℃ で 4 時間反応させる。
(11)反応後、遠心分離（Swing rotor: 500 x g, 4 ℃, 10 min.）して上清100 μlを平底96wellマルチプレートへ移す。
(12)LDH活性測定試薬（Roche）100 μlを加え、室温で30 min.反応させる。
(13)マイクロプレート吸光光度計でOD490、OD690を測定する。

【０３２８】

16-2 ADCCの誘導２（HER1抗体である048-006抗体、HER2抗体である015-126抗体、ALCAM抗体である066-174抗体及び035-234抗体及び041-118抗体、ICAM抗体である053-051抗体、053-059抗体及び053-085抗体、EPCAM抗体である067-153抗体、HGFR抗体である067-133抗体の場合：IgG型抗体を使用）

HER1抗体である048-006抗体についてはIgG型抗体を使用してADCC活性を検討した。使用した標的対象培養細胞はA-431、A549（以上、類上皮腫）、ACHN、CCF-RC-1（以上、腎癌）、NCI-H1373（肺がん）、SK-OV-3（卵巣がん）である。

HER2抗体である015-126抗体についてもIgG型抗体を使用したADCC活性を検討した。使用した標的対象培養細胞は乳がんBT-474である。

ALCAM抗体である066-174抗体及び035-234抗体についてはIgG型抗体を使用してADCC活性を検討した。使用した標的対象培養細胞はNCI-H1373（肺腺癌）、CW2（大腸癌）、又はNCI-H441（肺癌）である。

ICAM抗体である053-051抗体、053-059抗体及び053-085抗体についてはIgG型抗体を使用してADCC活性を検討した。使用した標的対象培養細胞はHepG2（肝細胞癌）、NCI-H441（肺癌）である。

また、HER1抗体である048-006抗体又は059-152抗体のCCF-RC-1（腎癌）、NCI-H1373（肺がん）及びA-431（類上皮がん）に対する作用に関して、ADCC活性の抗体用量依存性をIgG型抗体最終濃度0.01-10μg/mlの範囲で検討した。

ALCAM抗体である041-118抗体についてはIgG型抗体を使用し、ADCC活性の抗体用量依存性を検討した。使用した標的対象培養細胞はNCI-H1373（肺腺癌）である。

EPCAM抗体である067-153抗体についてはIgG型抗体を使用し、ADCC活性の抗体用量依存性を検討した。使用した標的対象培養細胞はMKN-45（胃充実型腺癌)、HT-29（結腸腺癌）、NCI-H1373（肺がん）である。

HGFR抗体である067-133抗体についてはIgG型抗体を使用し、ADCC活性の抗体用量依存性を検討した。使用した標的対象培養細胞はNCI-H1373（肺がん）である。

ADCC活性の抗体用量依存性に関しては基本的にE/T Ratio（エフェクター細胞と標的細

胞の比率）80:1で溶液中の最終抗体濃度抗体濃度0.01μg/mlから10μg/ml或いは10^{-6}μg/mlから10μg/mlの測定点で測定した。

それぞれの測定点につき、標的細胞に抗体とエフェクター細胞添加し、4時間後にADCC活性を測定した。NCI-H1373についてはE/T Ratio 100:1でADCC活性を測定した。

操作手順は16-1に記載した手順に準じたが、反応の詳細は以下のとおりとした。即ち、U底96ウェルマルチプレート（Becton Dickinson 社製）に1ウェルあたり66μlの標的細胞（2 x 10^4 cells）を入れ、IgG型抗体（3 μg/ml）66μlを加えたのち、66μlの末梢血単核球懸濁液（7.5 x 10^5 cells）を加えた。E/T ratio（エフェクター細胞と標的細胞の比率）は20とした。細胞同士の会合を促すため遠心分離（60 x g、4℃、5分）を行い細胞を底部へ沈めたのち、37℃、5 % CO_2の条件に設定した培養装置で240分保温してADCC反応を誘導した。各抗体サンプルはCTM溶液として調製した。また、それぞれのサンプルについて陰性コントロールとしてCTMを用い、乳酸デヒドロゲナーゼの最大遊離量コントロールとして、標的細胞に100μlの2% Triton X-100 - CTM溶液を加えたものを用いた（Triton X-100によりあらかじめ細胞を破壊）。また、それぞれの実験群につき3つのウェルを使用した。

【０３２９】

16-3　ADCC活性の測定

cFVcp3型抗体を用いたアッセイ、IgG型抗体を用いたアッセイのいずれについても、ADCC活性は発色の程度、すなわち培養上清中に遊離した乳酸デヒドロゲナーゼの濃度に比例し、標的細胞のダメージの指標となる。発色開始から30分後、分光光度計により吸光度（OD490 - OD620（バックグラウンド吸光度））を測定し、各実験群につき3つのウェルの吸光度を平均し細胞傷害性指数（Cytotoxic Index）を算出した。あらかじめ培地のみの吸光度を引き算し、以下の計算式のように行った。

【０３３０】

[数１]

相対LDH活性＝OD490 － OD690

細胞由来LDH活性＝実験値 －（溶液のみコントロール）

細胞傷害性（%）＝（実験値 － エフェクター細胞コントロール － 標的細胞コントロール）／（細胞 ＋ Triton X-100コントロール － 標的細胞コントロール）×100

尚、抗体に細胞傷害活性がない場合、生体成分を使用した実験系であるが故の測定誤差に起因して、この算出方法で求めた細胞傷害性がマイナスの値を示すことがある。

【０３３１】

16-4　測定結果

ADCC活性の測定結果を図２７（ITGA3抗体を使用、標的培養細胞はHLF）、図２８（HER1抗体を使用、標的培養細胞はA-431）、図２９（HER1抗体を使用、標的培養細胞はA549）、図３０（HER1抗体を使用、標的培養細胞はACHN）、図３１（HER1抗体を使用、標的培養細胞はCCF-RC-1）、図３２（HER1抗体を使用、標的培養細胞はNCI-H1373）、図３３（HER1抗体を使用、標的培養細胞はSK-OV-3）、図３４（HER2抗体を使用、標的培養細胞はBT-474）、図３５（ALCAM抗体である066-174を使用、標的培養細胞はNCI-H1373、CW2、又はNCI-H441）、図３６（ALCAM抗体である035-234を使用、標的培養細胞はCW2、又はNCI-H441）、図３７（ICAM抗体である053-051を使用、標的培養細胞はNCI-H441、HepG2）、図３８（ICAM抗体である053-059を使用、標的培養細胞はNCI-H441、HepG2）、及び図３９（ICAM抗体である053-085を使用、標的培養細胞はNCI-H441、HepG2）に示す。

また、ADCC活性の抗体用量依存性の測定結果を図４０（HER1抗体の048-006又は059-152抗体を使用、標的培養細胞はCCF-RC-1）、図４１（HER1抗体の048-006又は059-152抗体抗体を使用、標的培養細胞はNCI-H1373）、図４２（HER1抗体の048-006又は059-152抗体抗体を使用、標的培養細胞はA-431）、図４３（ALCAM抗体である041-118抗体を使用、標的培養細胞はNCI-H1373）、図４４（EPCAM抗体である067-153抗体を使用、標的培養細胞はMKN-45）、図４５（EPCAM抗体である067-153抗体を使用、標的培養細胞はHT-29）、図４６（EPCAM抗体である067-153抗体を使用、標的培養細胞はNCI-H1373）図４７（HGFR抗体で

ある067-133抗体を使用、標的培養細胞はNCI-H1373）に示す。

【０３３２】

ITGA3抗体（015-003）、HER1抗体（048-006）及びHER2抗体（015-126）のいずれについても、エフェクター細胞を加えた実験群において有意に細胞傷害性が上昇していた。即ち、これらいずれの抗体についても、標的細胞に特異的に結合した抗体をエフェクター細胞が認識し、そして標的細胞を攻撃することによる細胞傷害活性が認められた。

尚、表面抗原に関連しない抗ハブ毒抗体（対照抗体）HR1-007や抗体クローンを加えない実験群では細胞傷害性の上昇は見られなかった。

ALCAM抗体（066-174及び035-234）、ICAM抗体（053-051、053-059及び053-085）のいずれについても、抗ハブ毒抗体（対照抗体）HR1-007実験群より有意に細胞傷害性が上昇していた。以上、抗体依存性細胞性細胞傷害は有意な差をもって対照抗体（HR1-007）のそれより高い事が見事に証明されている。

以上の結果から、HER1、HER2、ITGA3、ALCAM、ICAM、EPCAM及びHGFRのそれぞれについて、それを介して癌細胞を特異的に認識し、そしてADCC活性による傷害効果を発揮する抗体の取得に成功したことが確認された。換言すれば、それぞれの癌細胞を標的とする抗体医薬として有望な抗体を取得することに成功した。

抗体用量依存性試験の結果では、HER1抗体（048-006）に関しては0.01μg/mlでも顕著な効果が確認でき、低用量でもその効果が期待できることが判明した。

048-006抗体及び059-152抗体については、HER1が発現している細胞株において強いADCC活性を示す傾向を認めた。しかしながら、使用する抗体濃度領域や細胞株の種類においてその活性に差違を示した。A431細胞に対しては、0.001μg/mlで活性の違いが観察された。概して、低濃度領域においては059-152抗体の活性は048-006抗体のそれよりも優位であった。

また、EPCAM抗体の067-153抗体は0.01μg/ml以上の濃度においてMKN-45(胃充実型腺癌)細胞株に対して優れたADCC活性を示し、HT-29(結腸腺癌)細胞株に対しては10pg/ml以上の濃度において優れたADCC活性を示すとともに1μg/ml付近での活性は80%以上という驚異的なスコアが得られた。NCI-H1373(肺腺癌)細胞株に対するADCC活性は0.01μg/ml以上の濃度で50%以上という驚異的なスコアを示した。

また、ALCAM抗体の041-118抗体はNCI-H1373(肺腺癌)細胞株に対し、0.01μg/ml以上の濃度で顕著な効果を認め、低用量でもその効果が期待できることが判明した。

また、HGFR抗体である067-133抗体はNCI-H1373(肺腺癌)細胞株に対して0.01μg/ml以上の濃度で顕著な効果を認め、10μg/mlの濃度領域においての活性は40%以上という強い活性を示した。

以上の結果より、低用量（低濃度）であっても十分なADCC活性を示す、有望な抗体群の取得に成功したことが確認された。尚、複数のヒト由来のリンパ球画分を用いた同様の実験によっても、以上の結果と同様の結果が得られ、再現性の高さを確認した。

【０３３３】

１７．癌細胞増殖阻害試験

一部の抗体医薬はADCC作用ではなく（又はADCC作用に加えて）、癌の増殖阻害作用によってその薬効を奏する。そこで、抗体医薬としての有効性をさらに検証すべく、今回単離に成功した抗体の癌増殖阻害活性を以下の手順で検討した。

17-1　試験方法

(1)培養皿内で生育させた標的培養細胞を4% Collagenase で剥離し、用いた培地でけん濁する。

(2)細胞密度を測定した後、遠心分離して上清を除き、最終密度1.0 x 10^4 cells/mlになるようにRPMI-1640(10% FBS, 1% Penicillin - Streptomycin)培地にけん濁する。

(3)平底96wellマルチプレートに標的細胞を100μlずつ分注する。

(4)20μg/mlのヒトIgGモノクローナル抗体溶液を100μlずつ分注する。

(5)5% CO_2、37℃で5日間反応させる。

(6)培地を除き、生細胞測定試薬（XTT: Roche）を各wellに150 μl分注する。

(7)5% CO_2、37℃で4時間反応させる。
(8)反応後、マイクロプレート吸光光度計でOD490、OD690を測定し、以下の計算式に基づいて生細胞数を算出する。
【０３３４】
[数２]
XTT還元量（発色の度合い）＝OD490－OD690
細胞由来XTT還元活性＝（実験値）－（溶液のみのコントロール）
尚、細胞由来XTT還元活性は生細胞数に比例する。
【０３３５】
17-2　結果
結果を図４８（HER1抗体（048-006）を使用、標的対象培養細胞はA-431）、図４９（HER1抗体（048-006）を使用、標的対象培養細胞はACHN）、図５０（HER1抗体（048-006）を使用、標的対象培養細胞はNCI-H1373）図５１（HER1抗体（048-006）を使用、標的対象培養細胞はSK-OV-3）、図５２（HER2抗体（015-126）を使用、標的対象培養細胞はBT-474）に示す。
これらの図からわかるように、癌細胞増殖阻害性を有する抗体の取得に成功したことが確認された。即ち、これらの抗体は、癌細胞の増殖を押さえる抗体医薬としても有効である可能性が示された。
【０３３６】
１８．マウスを用いた抗腫瘍実験
次に、癌細胞移植マウスを用いて、単離に成功した抗体がin vivoで抗腫瘍活性を示すか否かを確認した。
18-1　使用した動物及び細胞株
4週齢の雌BALB/cヌードマウス（日本チャールス・リバー（株））を１週間馴化飼育したのちに実験に用いた。飼育はSPF環境下でおこない、滅菌した水と飼料を与えた。
ヒト肺癌細胞H1373或いは類上皮腫A-431は37℃、5%CO_2存在下、10%FBS含有RPMI培地にて培養維持継代したものを用いた。
【０３３７】
18-2　抗腫瘍実験の方法
ヌードマウス側背部皮下にヒト肺癌細胞H1373細胞を1×10^7個移植して腫瘍を作製し、腫瘍体積が１cm^3になった時点で腫瘍を3mm角に細切し、準備したヌードマウス背部皮下に継代移植した。移植後、推定腫瘍体積が200mm^3になったところで、抗体の投与を開始した。腫瘍径および体重は週２回計測し、推定腫瘍体積を$W=a\times b^2/2$（W：推定腫瘍体積(mm^3)、ａ：長径(mm)、ｂ：短径(mm)）の式より求めた。実験群は、コントロール群（PBS投与）と048-006 IgG投与群（0.5mg/個体）の２群とし、投与経路は腹腔内投与とした。週２回のペースで8回投与し、その抗腫瘍効果を検討した。
【０３３８】
また、ERBITUX（エルビタックス：セツキシマブ,ブリストルマイヤーズスクイブ社）を比較群或いはその相加性検討群として用いた。ERBITUXを単独で用いる場合は投与量を0.25mg/個体とした。ERBITUXを併用する場合はERBITUXの投与量を0.25mg/個体、048-006 IgGの投与量を0.25mg/個体とした。投与後、経過を観察した。
【０３３９】
類上皮腫A-431を用いる場合は5週齢の雌BALB/cヌードマウスヌードマウス側背部皮下に類上皮腫A-431を同様に5×10^6個移植して腫瘍を作製し、推定腫瘍体積が200mm^3になったところで、抗体の投与を開始した。投与経路は腹腔内投与とした。048-006のIgG型抗体は、週2回のペースで6回投与し、その抗腫瘍効果を検討した。059-152のIgG型抗体投与群（0.25mgまたは1.00mgの抗体量を0.5ｍｌのPBSに希釈したもの/個体）は、週2回のペースで6回投与し、その抗腫瘍効果を継続して経過も観察した。
【０３４０】
18-3　結果

抗体（048-006のIgG型抗体）投与群は、コントロール群（PBS投与）に比較し有意に推定腫瘍体積が小さくなり、明らかな抗腫瘍効果が認められ、ERBITUXに匹敵する効果を確認した（図５３～５６）。一方、抗体（059-152のIgG型抗体）投与群は、コントロール群（PBS投与）に比較し有意に推定腫瘍体積が小さくなり、明らかな抗腫瘍効果が確認され、その効果はERBITUXより優れていた（図５６）。059-152抗体の方が、048-006抗体や市販のERBITUXよりも強い腫瘍抑制効果を示した。このように、取得に成功した抗体はin vivoモデルでも抗腫瘍効果を発揮することが確認された。即ち、抗体医薬として非常に有望であることが示されたといえる。

【０３４１】

１９．三次元ELISAによる解析

(1)スクリーニングされたクローン群の培養による抗体発現と、抗体混合物の調製

１．～５．に記載した方法でスクリーニングされたクローン（約4000クローン）のファージ感染大腸菌を1クローン／wellとなるように41枚の96wellプレートに移し、100μl/wellのYTGA培地（YT培地＋1% Glucose＋200μg/ml Ampicillin）で30℃、一晩振とう培養した。次に、プレート毎、第1列～第6列の全wellの培養液を10μlずつ混合することでグループ化し（但し、第28プレートについては第1列～第7列を一つのグループとした）、合計41のプレート混合抗体を得た。7～12列についても同様にグループ化し（但し、第28プレート及び第35プレートを除く）、合計39のプレート混合抗体を得た。また、プレートを7グループ（1グループに3、6又は7枚）に分けた後、グループ毎、各行の全wellの培養液を10μlずつ混合することでグループ化し、合計56の行混合抗体を得た。最後に、プレートを5グループ（1グループに3、9又は10枚）に分けた後、グループ毎、各列の全wellの培養液を10μlずつ混合することでグループ化し、合計54の列混合抗体（一部については２列を一つのグループとした）を得た。

各混合抗体に100mlのYT0.05GA培地（YT培地＋0.05% Glucose＋200μg/ml Ampicillin）を加え、30℃でOD600nm=0.3～0.5程度になるまで振とう培養した後、終濃度が0.5mMになるようにIPTGを加え、更に30℃で一晩振とう培養した。4℃10000rpm15分間の遠心を行って培養上清を回収、硫酸アンモニウム29.1gをゆっくり加え混ぜた後、4℃10000rpm20分間の遠心を行って沈さを回収し、これを5mlのPBS/NaN3/completeに懸濁した。懸濁液を4℃、10000rpm、20分間の条件で遠心して上清を回収し、20倍濃縮の混合抗体（190種類）を得た。

【０３４２】

(2)三次元ELISAによる測定

得られた20倍濃縮の混合抗体（190種類）を用いて三次元ELISAを行った。まず、PBSにて20μg/mlの濃度に調製した抗原をMaxisorp(Nunc)に50μl/well加え、37℃にて2時間反応させ感作した。各well内の液を除去した後、5%スキムミルク/PBSを200μl/well加え、37℃にて2時間反応させブロッキングした。各well内の液を除去した後、PBSで洗浄し、20倍濃縮の混合抗体を100μl/well加え、37℃にて1時間反応させた。PBSで洗浄し、0.05%Tween/PBSで5000倍希釈したウサギ抗cp3抗体（MBL製）を100μl/well加え、37℃にて1時間反応させた。PBSで洗浄し、0.05%Tween/PBSで2000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（MBL）を100μl/well加え、37℃にて1時間反応させた。PBSで洗浄し、基質溶液を100μl/well加えた。基質溶液は以下のように作製した。即ち、12mlの0.1Mクエン酸－リン酸水素2ナトリウム（pH5.1）に終濃度が0.01%になるようにH_2O_2を加え、さらにOPD錠（和光純薬）を1錠加えた。

2N硫酸を100μl/well加えて反応を停止し、プレートリーダー（和光純薬　サンライズリモート）にて492nmの吸光度を測定した。

測定結果を図６０～６２（CD147を抗原としたELISA）及び図６３～６５（HER1を抗原としたELISA）に示す。

以上の三次元ELISAの結果を基に陽性クローンを選抜した。即ち、陽性の結果を与えたプレート、行、列の情報より交点を探索し、交点に存在する抗体クローンを選抜した。選抜した抗体クローンを75μl/wellのYTGA培地で30℃、一晩振とう培養した。200μl/well

のYT0.05GA培地に培養液を植菌し、37℃で4時間静置培養した後、終濃度が1mMになるようにIPTGを加え、30℃で一晩振とう培養した。4℃、3000rpm、10分間の条件で遠心を行い、培養上清を回収した。

【０３４３】

(3)選抜した抗体クローンの反応性

PBSにて10μg/mlの濃度に調製した抗原（CD147又はHER1）をMaxisorp(Nunc)に50μl/well加え、37℃にて2時間反応させ感作した。各well内の液を除去した後、5%スキムミルク/PBSを200μl/well加え、37℃にて2時間反応させブロッキングした。各well内の液を除去した後、PBSで洗浄し、選抜されたクローンの培養上清を100μl/well加え、37℃にて1時間反応させた。PBSで洗浄し、0.05%Tween/PBSで5000倍希釈したウサギ抗cp3抗体（MBL製）を100μl/well加え、37℃にて1時間反応させた。PBSで洗浄し、0.05%Tween/PBSで2000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（MBL）を100μl/well加え、37℃にて1時間反応させた。PBSで洗浄し、基質溶液を100μl/well加えた。2N硫酸を100μl/well加え反応を停止し、プレートリーダー（和光純薬　サンライズリモート）にて492nmの吸光度を測定した。HER1を抗原としたELISAの結果を図６６に示した。図６６のグラフからわかるように、HER1に対するモノクローナル抗体が多数得られている。

【０３４４】

２０．新たに取得された抗体

本発明の分類法及び同定法を利用することによって以下の抗体を取得することに成功した。

(1)C1qRに対する抗体

070-016抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：４５１(VH)；配列番号：(VH CDR1)４５２；配列番号：４５３(VH CDR2)；配列番号：４５４(VH CDR3)、配列番号：４５５(VL)；配列番号：(VL CDR1)４５６；配列番号：４５７(VL CDR2)；配列番号：４５８(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８４３(VH)；配列番号：８４４(VL)

【０３４５】

(2)CD44に対する抗体

064-003抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：４５９(VH)；配列番号：４６０(VH CDR1)；配列番号：４６１(VH CDR2)；配列番号：４６２(VH CDR3)；配列番号：４６３(VL)；配列番号：４６４(VL CDR1)；配列番号：４６５(VL CDR2)；配列番号：４６６(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８４５(VH)；配列番号：８４６(VL)

【０３４６】

(3)CD73に対する抗体

067-213抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：４６７(VH)；配列番号：４６８(VH CDR1)；配列番号：４６９(VH CDR2)；配列番号：４７０(VH CDR3)；配列番号：４７１(VL)；配列番号：４７２(VL CDR1)；配列番号：４７３(VL CDR2)；配列番号：４７４(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８４７VH)；配列番号：８４８(VL)

【０３４７】

(4)EpCAMに対する抗体

067-153抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：４７５(VH)；配列番号：４７６(VH CDR1)；配列番号：４７７(VH CDR2)；配列番号：４７８(VH CDR3)；配列番号：４７９(VL)；配列番号：４８０(VL CDR1)；配列番号：４８１(VL CDR2)；配列番号：４８２(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８４９(VH)；配列番号：８５０(VL)

【０３４８】

(5)HER1に対する抗体

048-040抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：４８３(VH)；配列番号：４８４(VH CDR1)；配列番号：４８５(VH CDR2)；配列番号：４８６(VH CDR3)；配列番号：４８７(VL)；配列番号：４８８(VL CDR1)；配列番号：４８９(VL CDR2)；配列番号：４９０(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８５１(VH)；配列番号：８５２(VL)

【０３４９】

054-101抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：４９１(VH)；配列番号：４９２(VH CDR1)；配列番号：４９３(VH CDR2)；配列番号：４９４(VH CDR3)；配列番号：４９５(VL)；配列番号：４９６(VL CDR1)；配列番号：４９７(VL CDR2)；配列番号：４９８(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８５３(VH)；配列番号：８５４(VL)

【０３５０】

055-147抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：４９９(VH)；配列番号：５００(VH CDR1)；配列番号：５０１(VH CDR2)；配列番号：５０２(VH CDR3)；配列番号：５０３(VL)；配列番号：５０４(VL CDR1)；配列番号：５０５(VL CDR2)；配列番号：５０６(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８５５(VH)；配列番号：８５６(VL)

【０３５１】

059-173抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：５０７(VH)；配列番号：５０８(VH CDR1)；配列番号：５０９(VH CDR2)；配列番号：５１０(VH CDR3)；配列番号：５１１(VL)；配列番号：５１２(VL CDR1)；配列番号：５１３(VL CDR2)；配列番号：５１４(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８５７(VH)；配列番号：８５８(VL)

【０３５２】

067-149抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：５１５(VH)；配列番号：５１６(VH CDR1)；配列番号：５１７(VH CDR2)；配列番号：５１８(VH CDR3)；配列番号：５１９(VL)；配列番号：５２０(VL CDR1)；配列番号：５２１(VL CDR2)；配列番号：５２２(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８５９(VH)；配列番号：８６０(VL)

【０３５３】

067-176抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：５２３(VH)；配列番号：５２４(VH CDR1)；配列番号：５２５(VH CDR2)；配

列番号：５２６(VH CDR3)；配列番号：５２７(VL)；配列番号：５２８(VL CDR1)；配列番号：５２９(VL CDR2)；配列番号：５３０(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８６１(VH)；配列番号：８６２(VL)
【０３５４】
(6)HER2に対する抗体
015-044抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５３１(VH)；配列番号：５３２(VH CDR1)；配列番号：５３３(VH CDR2)；配列番号：５３４(VH CDR3)；配列番号：５３５(VL)；配列番号：５３６(VL CDR1)；配列番号：５３７(VL CDR2)；配列番号：５３８(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８６３(VH)；配列番号：８６４(VL)
【０３５５】
015-102抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５３９(VH)；配列番号：５４０(VH CDR1)；配列番号：５４１(VH CDR2)；配列番号：５４２(VH CDR3)；配列番号：５４３(VL)；配列番号：５４４(VL CDR1)；配列番号：５４５(VL CDR2)；配列番号：５４６(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８６５(VH)；配列番号：８６６(VL)
【０３５６】
015-136抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５４７(VH)；配列番号：５４８(VH CDR1)；配列番号：５４９(VH CDR2)；配列番号：５５０(VH CDR3)；配列番号：５５１(VL)；配列番号：５５２(VL CDR1)；配列番号：５５３(VL CDR2)；配列番号：５５４(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８６７(VH)；配列番号：８６８(VL)
【０３５７】
015-143抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５５５(VH)；配列番号：５５６(VH CDR1)；配列番号：５５７(VH CDR2)；配列番号：５５８(VH CDR3)；配列番号：５５９(VL)；配列番号：５６０(VL CDR1)；配列番号：５６１(VL CDR2)；配列番号：５６２(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８６９(VH)；配列番号：８７０(VL)
【０３５８】
015-209抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５６３(VH)；配列番号：５６４(VH CDR1)；配列番号：５６５(VH CDR2)；配列番号：５６６(VH CDR3)；配列番号：５６７(VL)；配列番号：５６８(VL CDR1)；配列番号：５６９(VL CDR2)；配列番号：５７０(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８７１(VH)；配列番号：８７２(VL)
【０３５９】
039-016抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５７１(VH)；配列番号：５７２(VH CDR1)；配列番号：５７３(VH CDR2)；配列番号：５７４(VH CDR3)；配列番号：５７５(VL)；配列番号：５７６(VL CDR1)；配列番

号：５７７(VL CDR2)；配列番号：５７８(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８７３(VH)；配列番号：８７４(VL)
【０３６０】
053-216抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５７９(VH)；配列番号：５８０(VH CDR1)；配列番号：５８１(VH CDR2)；配列番号：５８２(VH CDR3)；配列番号：５８３(VL)；配列番号：５８４(VL CDR1)；配列番号：５８５(VL CDR2)；配列番号：５８６(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８７５(VH)；配列番号：８７６(VL)
【０３６１】
075-024抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５８７(VH)；配列番号：５８８(VH CDR1)；配列番号：５８９(VH CDR2)；配列番号：５９０(VH CDR3)；配列番号：５９１(VL)；配列番号：５９２(VL CDR1)；配列番号：５９３(VL CDR2)；配列番号：５９４(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８７７(VH)；配列番号：８７８(VL)
【０３６２】
075-110抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：５９５(VH)；配列番号：５９６(VH CDR1)；配列番号：５９７(VH CDR2)；配列番号：５９８(VH CDR3)；配列番号：５９９(VL)；配列番号：６００(VL CDR1)；配列番号：６０１(VL CDR2)；配列番号：６０２(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８７９(VH)；配列番号：８８０(VL)
【０３６３】
086-032抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：６０３(VH)；配列番号：６０４(VH CDR1)；配列番号：６０５(VH CDR2)；配列番号：６０６(VH CDR3)；配列番号：６０７(VL)；配列番号：６０８(VL CDR1)；配列番号：６０９(VL CDR2)；配列番号：６１０(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８８１(VH)；配列番号：８８２(VL)
【０３６４】
086-035抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：６１１(VH)；配列番号：６１２(VH CDR1)；配列番号：６１３(VH CDR2)；配列番号：６１４(VH CDR3)；配列番号：６１５(VL)；配列番号：６１６(VL CDR1)；配列番号：６１７(VL CDR2)；配列番号：６１８(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８８３(VH)；配列番号：８８４(VL)
【０３６５】
086-036抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：６１９(VH)；配列番号：６２０(VH CDR1)；配列番号：６２１(VH CDR2)；配列番号：６２２(VH CDR3)；配列番号：６２３(VL)；配列番号：６２４(VL CDR1)；配列番号：６２５(VL CDR2)；配列番号：６２６(VL CDR3)
(b)塩基配列

配列番号：８８５(VH)；配列番号：８８６(VL)

【０３６６】

086-061抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：６２７(VH)；配列番号：６２８(VH CDR1)；配列番号：６２９(VH CDR2)；配列番号：６３０(VH CDR3)；配列番号：６３１(VL)；配列番号：６３２(VL CDR1)；配列番号：６３３(VL CDR2)；配列番号：６３４(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８８７(VH)；配列番号：８８８(VL)

【０３６７】

086-138抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：６３５(VH)；配列番号：６３６(VH CDR1)；配列番号：６３７(VH CDR2)；配列番号：６３８(VH CDR3)；配列番号：６３９(VL)；配列番号：６４０(VL CDR1)；配列番号：６４１(VL CDR2)；配列番号：６４２(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８８９(VH)；配列番号：８９０(VL)

【０３６８】

086-182抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：６４３(VH)；配列番号：６４４(VH CDR1)；配列番号：６４５(VH CDR2)；配列番号：６４６(VH CDR3)；配列番号：６４７(VL)；配列番号：６４８(VL CDR1)；配列番号：６４９(VL CDR2)；配列番号：６５０(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８９１(VH)；配列番号：８９２(VL)

【０３６９】

(7)HGFRに対する抗体

067-126抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：６５１(VH)；配列番号：６５２(VH CDR1)；配列番号：６５３(VH CDR2)；配列番号：６５４(VH CDR3)；配列番号：６５５(VL)；配列番号：６５６(VL CDR1)；配列番号：６５７(VL CDR2)；配列番号：６５８(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８９３(VH)；配列番号：８９４(VL)

【０３７０】

067-133抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：６５９(VH)；配列番号：６６０(VH CDR1)；配列番号：６６１(VH CDR2)；配列番号：６６２(VH CDR3)；配列番号：６６３(VL)；配列番号：６６４(VL CDR1)；配列番号：６６５(VL CDR2)；配列番号：６６６(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８９５(VH)；配列番号：８９６(VL)

【０３７１】

067-287抗体

(a)アミノ酸配列

配列番号：６６７(VH)；配列番号：６６８(VH CDR1)；配列番号：６６９(VH CDR2)；配列番号：６７０(VH CDR3)；配列番号：６７１(VL)；配列番号：６７２(VL CDR1)；配列番号：６７３(VL CDR2)；配列番号：６７４(VL CDR3)

(b)塩基配列

配列番号：８９７(VH)；配列番号：８９８(VL)

【０３７２】
(8)ITGA3に対する抗体
064-002抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：６７５(VH)；配列番号：６７６(VH CDR1)；配列番号：６７７(VH CDR2)；配列番号：６７８(VH CDR3)；配列番号：６７９(VL)；配列番号：６８０(VL CDR1)；配列番号：６８１(VL CDR2)；配列番号：６８２(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：８９９(VH)；配列番号：９００(VL)
【０３７３】
064-006抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：６８３(VH)；配列番号：６８４(VH CDR1)；配列番号：６８５(VH CDR2)；配列番号：６８６(VH CDR3)；配列番号：６８７(VL)；配列番号：６８８(VL CDR1)；配列番号：６８９(VL CDR2)；配列番号：６９０(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９０１(VH)；配列番号：９０２(VL)
【０３７４】
064-012a抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：６９１(VH)；配列番号：６９２(VH CDR1)；配列番号：６９３(VH CDR2)；配列番号：６９４(VH CDR3)；配列番号：６９５(VL)；配列番号：６９６(VL CDR1)；配列番号：６９７(VL CDR2)；配列番号：６９８(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９０３(VH)；配列番号：９０４(VL)
【０３７５】
064-012b抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：６９９(VH)；配列番号：７００(VH CDR1)；配列番号：７０１(VH CDR2)；配列番号：７０２(VH CDR3)；配列番号：７０３(VL)；配列番号：７０４(VL CDR1)；配列番号：７０５(VL CDR2)；配列番号：７０６(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９０５(VH)；配列番号：９０６(VL)
【０３７６】
064-014抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７０７(VH)；配列番号：７０８(VH CDR1)；配列番号：７０９(VH CDR2)；配列番号：７１０(VH CDR3)；配列番号：７１１(VL)；配列番号：７１２(VL CDR1)；配列番号：７１３(VL CDR2)；配列番号：７１４(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９０７(VH)；配列番号：９０８(VL)
【０３７７】
064-054抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７１５(VH)；配列番号：７１６(VH CDR1)；配列番号：７１７(VH CDR2)；配列番号：７１８(VH CDR3)；配列番号：７１９(VL)；配列番号：７２０(VL CDR1)；配列番号：７２１(VL CDR2)；配列番号：７２２(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９０９(VH)；配列番号：９１０(VL)
【０３７８】

064-085抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７２３(VH)；配列番号：７２４(VH CDR1)；配列番号：７２５(VH CDR2)；配列番号：７２６(VH CDR3)；配列番号：７２７(VL)；配列番号：７２８(VL CDR1)；配列番号：７２９(VL CDR2)；配列番号：７３０(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９１１(VH)；配列番号：９１２(VL)
【０３７９】
064-093抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７３１(VH)；配列番号：７３２(VH CDR1)；配列番号：７３３(VH CDR2)；配列番号：７３４(VH CDR3)；配列番号：７３５(VL)；配列番号：７３６(VL CDR1)；配列番号：７３７(VL CDR2)；配列番号：７３８(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９１３(VH)；配列番号：９１４(VL)
【０３８０】
064-116抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７３９(VH)；配列番号：７４０(VH CDR1)；配列番号：７４１(VH CDR2)；配列番号：７４２(VH CDR3)；配列番号：７４３(VL)；配列番号：７４４(VL CDR1)；配列番号：７４５(VL CDR2)；配列番号：７４６(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９１５(VH)；配列番号：９１６(VL)
【０３８１】
065-183抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７４７(VH)；配列番号：７４８(VH CDR1)；配列番号：７４９(VH CDR2)；配列番号：７５０(VH CDR3)；配列番号：７５１(VL)；配列番号：７５２(VL CDR1)；配列番号：７５３(VL CDR2)；配列番号：７５４(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９１７(VH)；配列番号：９１８(VL)
【０３８２】
067-142抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７６３(VH)；配列番号：７６４(VH CDR1)；配列番号：７６５(VH CDR2)；配列番号：７６６(VH CDR3)；配列番号：７６７(VL)；配列番号：７６８(VL CDR1)；配列番号：７６９(VL CDR2)；配列番号：７７０(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９２１(VH)；配列番号：９２２(VL)
【０３８３】
068-007抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７７１(VH)；配列番号：７７２(VH CDR1)；配列番号：７７３(VH CDR2)；配列番号：７７４(VH CDR3)；配列番号：７７５(VL)；配列番号：７７６(VL CDR1)；配列番号：７７７(VL CDR2)；配列番号：７７８(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９２３(VH)；配列番号：９２４(VL)
【０３８４】
(9)ALCAMに対する抗体
029-143抗体

(a)アミノ酸配列
配列番号：７７９(VH)；配列番号：７８０(VH CDR1)；配列番号：７８１(VH CDR2)；配列番号７８２(VH CDR3)；配列番号：７８３(VL)；配列番号：７８４(VL CDR1)；配列番号：７８５(VL CDR2)；配列番号：７８６(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９２５(VH)；配列番号：９２６(VL)
【０３８５】
045-134抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７８７(VH)；配列番号：７８８(VH CDR1)；配列番号：７８９(VH CDR2)；配列番号：７９０(VH CDR3)；配列番号：７９１(VL)；配列番号：７９２(VL CDR1)；配列番号：７９３(VL CDR2)；配列番号：７９４(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９２７(VH)；配列番号：９２８(VL)
【０３８６】
062-101抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７９５(VH)；配列番号：７９６(VH CDR1)；配列番号：７９７(VH CDR2)；配列番号：７９８(VH CDR3)；配列番号：７９９(VL)；配列番号：８００(VL CDR1)；配列番号：８０１(VL CDR2)；配列番号：８０２(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９２９(VH)；配列番号：９３０(VL)
【０３８７】
062-109抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：８０３(VH)；配列番号：８０４(VH CDR1)；配列番号：８０５(VH CDR2)；配列番号：８０６(VH CDR3)；配列番号：８０７(VL)；配列番号：８０８(VL CDR1)；配列番号：８０９(VL CDR2)；配列番号：８１０(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９３１(VH)；配列番号：９３２(VL)
【０３８８】
084-103抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：８１１(VH)；配列番号：８１２(VH CDR1)；配列番号：８１３(VH CDR2)；配列番号：８１４(VH CDR3)；配列番号：８１５(VL)；配列番号：８１６(VL CDR1)；配列番号：８１７(VL CDR2)；配列番号：８１８(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９３３(VH)；配列番号：９３４(VL)
【０３８９】
052-274抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：８１９(VH)；配列番号：８２０(VH CDR1)；配列番号：８２１(VH CDR2)；配列番号：８２２(VH CDR3)；配列番号：８２３(VL)；配列番号：８２４(VL CDR1)；配列番号：８２５(VL CDR2)；配列番号：８２６(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９３５(VH)；配列番号：９３６(VL)
【０３９０】
029-067抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：８２７(VH)；配列番号：８２８(VH CDR1)；配列番号：８２９(VH CDR2)；配

列番号：８３０(VH CDR3)；配列番号：８３１(VL)；配列番号：８３２(VL CDR1)；配列番号：８３３(VL CDR2)；配列番号：８３４(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９３７(VH)；配列番号：９３８(VL)
【０３９１】
083-131抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：８３５(VH)；配列番号：８３６(VH CDR1)；配列番号：８３７(VH CDR2)；配列番号：８３８(VH CDR3)；配列番号：８３９(VL)；配列番号：８４０(VL CDR1)；配列番号：８４１(VL CDR2)；配列番号：８４２(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９３９(VH)；配列番号：９４０(VL)
【０３９２】
(10)CD46に対する抗体
066-069抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：７５５(VH)；配列番号：７５６(VH CDR1)；配列番号：７５７(VH CDR2)；配列番号：７５８(VH CDR3)；配列番号：７５９(VL)；配列番号：７６０(VL CDR1)；配列番号：７６１(VL CDR2)；配列番号：７６２(VL CDR3)
(b)塩基配列
配列番号：９１９(VH)；配列番号：９２０(VL)
【０３９３】
(11)LARに対する抗体
064-044抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：９４４(VH)；配列番号：９４５(VL)
(b)塩基配列
配列番号：９５６(VH)；配列番号：９５７(VL)
【０３９４】
065-030抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：９４６(VH)；配列番号：９４７(VL)
(b)塩基配列
配列番号：９５８(VH)；配列番号：９５９(VL)
【０３９５】
065-358抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：９４８(VH)；配列番号：９４９(VL)
(b)塩基配列
配列番号：９６０(VH)；配列番号：９６１(VL)
【０３９６】
066-019抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：９５０(VH)；配列番号：９５１(VL)
(b)塩基配列
配列番号：９６２(VH)；配列番号：９６３(VL)
【０３９７】
079-085抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：９５２(VH)；配列番号：９５３(VL)

(b)塩基配列
配列番号：９６４(VH)；配列番号：９６５(VL)
【０３９８】
(12)BCAMに対する抗体
067-024抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：９５４(VH)；配列番号：９５５(VL)
(b)塩基配列
配列番号：９６６(VH)；配列番号：９６７(VL)
(13)IgSF4に対する抗体
076-048抗体
(a)アミノ酸配列
配列番号：９６８(VH)；配列番号：９６９(VL)
(b)塩基配列
配列番号：９７０(VH)；配列番号：９７１(VL)
【０３９９】
２１．ITGA3抗体であることの確認実験
免疫沈降－マススペクトル解析の結果より、一部の抗体群について、それに含まれる抗体はVLA complexを認識していることがわかっていたが、抗原がITGA3なのかITGB1なのか、それともCD151などの複合体を形成する他の分子なのかを厳密な意味で決定できていなかった。そこで、抗体クローン（015-003，064-002，064-006，064-012，064-014，064-054，064-085，064-091，064-093，064-116，065-183，067-142，068-007）についてRNAiを用いてその抗原を検証することにした。
【０４００】
21-1　実験手順
Invitrogen社より購入したITGA3 stealth oligo RNA 400pmolとInvitrogen社製lipofect RNAi MAX 100μlをGIBCO-BRL社製Opti-MEMI 8mlと混ぜ、室温にて10分間静置した後、これにのSKOv-3細胞液4ml（2x10^6cells）とRPMI1640-10%FBS 28mlを入れ、10cm培養皿4枚に播種した後、CO_2培養器内で2日間培養した。培養後の細胞に1% トリプシン溶液を作用させて細胞を遊離し、5%BSA/PBS液にて回収し、最終的に1mlの細胞浮遊液とした。実験はITGB1についても同様にして行った。RNAiなしの群（コントロール群）については、stealth oligoを作用させない以外、同様の条件とした。
回収した細胞50μlに2.5μlの正常ヤギ血清を加えた後、１次抗体液を加え、5%BSA/PBSにて終量を100μlとした。１次抗体（抗ITGA3抗体又は抗ITGB1抗体(CHEMICON社製マウスモノクローナル抗体)）の使用量は1μlとし、検討対象のサンプル（例えば015-003 cp3型抗体）については10倍濃縮上清を7μl使用することにした。
次に、室温にて10分間静置した後、遠心処理に供した。上清を廃棄した後、5%BSA/PBS 200μlを加えて洗浄した。続いて、サンプル015-003cp3型抗体については、抗cp3マウスモノクローナル抗体（MBL社特製）を5μg/mlの濃度になるよう5%BSA/PBSで希釈したものを100μl添加した後、室温にて10分間静置した。遠心処理後、上清を廃棄した。5%BSA/PBS 200μlを加えて洗浄した後、5%BSA/PBSにて1000倍希釈したALEXA488標識抗マウスIgGヤギ抗体100μlを反応させた。室温にて10分間静置した後、遠心処理して上清を廃棄し、5%BSA/PBS 200μlを加えて洗浄した。このようにして得られた細胞をOptilyseB（ベックマンコールター社製）50μlに懸濁した。10分間静置した後、PBS 600μlを加えて希釈した。続いてCell-Strainer（BD Falcon社製）で処理した後、FACS Caliber（ベックマンコールター社製）を用いた測定に供した。
【０４０１】
21-2　結果
以上のRNAi実験の結果を図６７に示す。A（抗ITGA3抗体を用いたFCMの結果）とB（抗ITGB1抗体を用いたFCMの結果）ではピークパターンが相違することがわかる。サンプル（

015-003，064-002，064-006，064-012，064-014，064-054，064-085，064-091，064-093，064-116，065-183，067-142，068-007）については、いずれもＡと同様のピークパターン（Ｃ）を示した。この結果より、これらの抗体クローンの認識抗原はITGA3であることが確認された。

尚、抗HER1抗体、抗HER2抗体、抗HGFR抗体、抗IgSF4抗体、抗EpCAM抗体、抗CD147抗体、抗CD166抗体、又は抗MCP抗体として取得された各抗体について同様のRNAi実験を行った結果、抗原に誤りはなく、本発明の方法（パネルを用いた方法や三次元ELISA方）の有用性が確認された。

【０４０２】

２２．各抗体クローンの癌組織特異性

取得に成功した抗体クローンの臨床癌検体に対する免疫染色性を、上記１１．の欄に記載した方法と同様の方法で検討したところ、図６８に示す結果が得られた。これらの抗体クローンは、対応する癌の研究や診断に有用である。

また、いくつかの癌について、ステージの異なる臨床検体を用意し、それに対する抗体クローンの免疫染色性を調べた。その結果、いくつかの抗体クローンは癌腫特異的な染色性に加え、ステージ特異的な染色性も示した（図６９）。このように実際の臨床組織では、同一の癌腫、同一の悪性度であったとしても各抗体クローンに対する反応性に差を認めた。本結果は、本発明が提供する抗体セットを利用することで癌における新たなテーラメーメイド型診断を行うことができ、今までの診断基準よりも更に詳細な診断、換言すれば癌のステージ及び病態の再分類化が可能になることを示している。一方、抗体セットによる癌のステージ及び病態の細分類化は同時に治療方針の決定にも役立つ。また、特異的な反応性が認められた抗体は、治療用抗体としても有用であると同時にドラッグスクリーニングにおけるツールとしても有用である。このように、本発明が提供する抗体セットは、癌のテーラーメイド診断を可能にするだけでなく、癌のテーラーメイド型治療をも実現し得るという、非常に大きな価値、意義をもつ。

【産業上の利用可能性】

【０４０３】

本発明によれば、細胞表面抗原に対する複数の抗体を迅速に分類する手段が提供される。また、分類された抗体の抗原を迅速に同定する手段も提供される。これらの手段を利用することによって癌の治療や診断、或いは癌の発症機構の研究等に有用な抗体を効率的に取得することが可能となる。また、本発明の分類法及び抗原の同定法を利用すれば、有用な抗体セットとそれらの特性を表示したパネルを提供することができ、テーラーメイド型医療への多大な貢献が期待される。

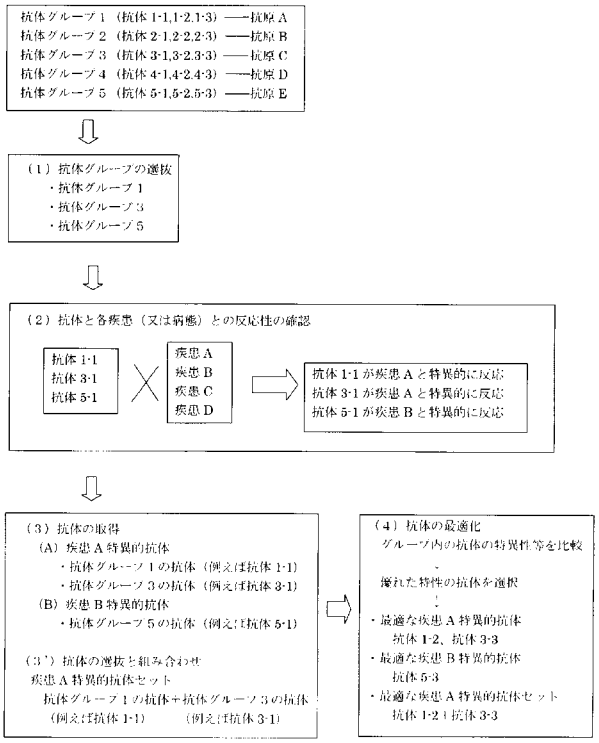
一方、本発明では、癌特異的に発現する抗原を認識する抗体が提供される。これらの抗体は、それが認識する癌表面膜蛋白を特異的に発現する癌細胞を標的とした治療用抗体、診断用抗体、研究用抗体等として利用されることが期待される。

【０４０４】

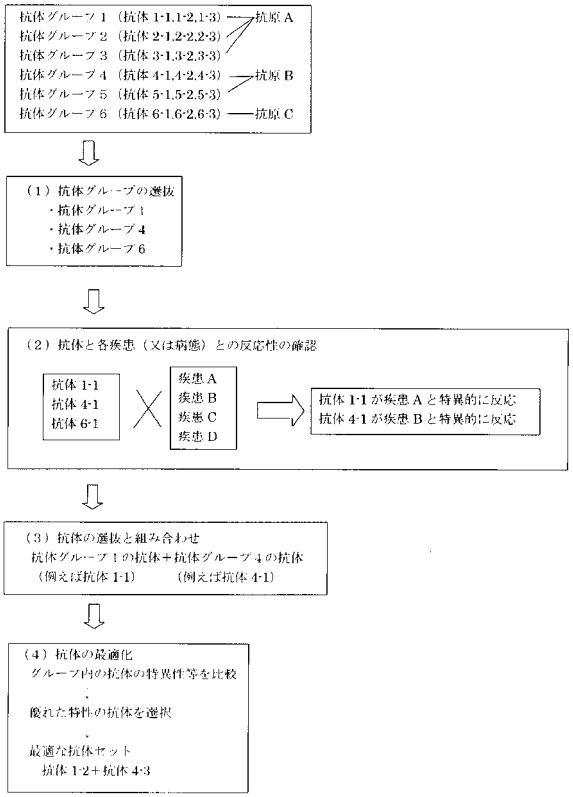
この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

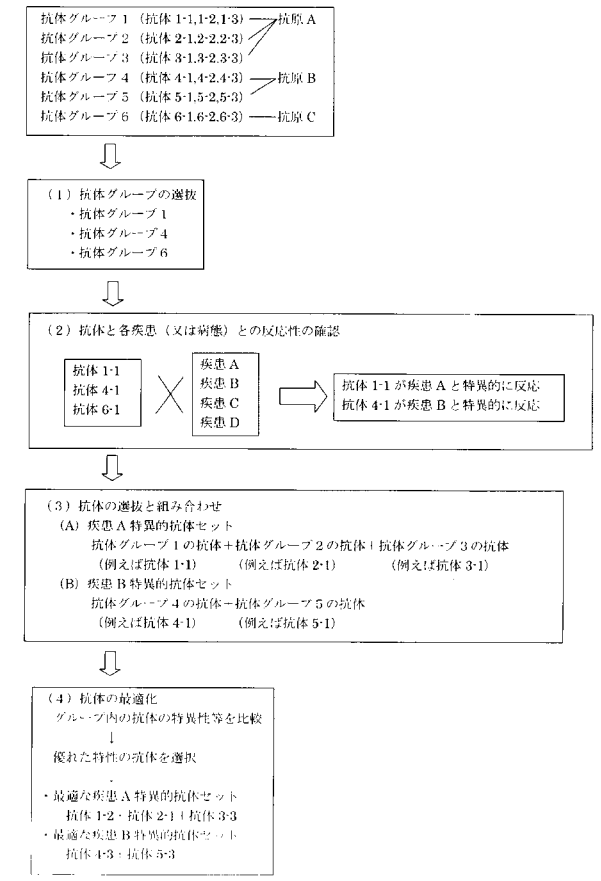
【図１】


抗体グループ１（抗体 1-1,1-2,1-3）――抗原 A
抗体グループ２（抗体 2-1,2-2,2-3）――抗原 B
抗体グループ３（抗体 3-1,3-2,3-3）――抗原 C
抗体グループ４（抗体 4-1,4-2,4-3）――抗原 D
抗体グループ５（抗体 5-1,5-2,5-3）――抗原 E
（１）抗体グループの選抜
・抗体グループ１
・抗体グループ３
・抗体グループ５
（２）抗体と各疾患（又は病態）との反応性の確認
抗体 1-1
抗体 3-1
抗体 5-1
疾患 A
疾患 B
疾患 C
疾患 D
抗体 1-1 が疾患 A と特異的に反応
抗体 3-1 が疾患 A と特異的に反応
抗体 5-1 が疾患 B と特異的に反応
（３）抗体の取得
（A）疾患 A 特異的抗体
・抗体グループ１の抗体（例えば抗体 1-1）
・抗体グループ３の抗体（例えば抗体 3-1）
（B）疾患 B 特異的抗体
・抗体グループ５の抗体（例えば抗体 5-1）
（３'）抗体の選抜と組み合わせ
疾患 A 特異的抗体セット
抗体グループ１の抗体＋抗体グループ３の抗体
（例えば抗体 1-1）　（例えば抗体 3-1）
（４）抗体の最適化
グループ内の抗体の特異性等を比較
↓
優れた特性の抗体を選択
↓
・最適な疾患 A 特異的抗体
抗体 1-2、抗体 3-3
・最適な疾患 B 特異的抗体
抗体 5-3
・最適な疾患 A 特異的抗体セット
抗体 1-2＋抗体 3-3

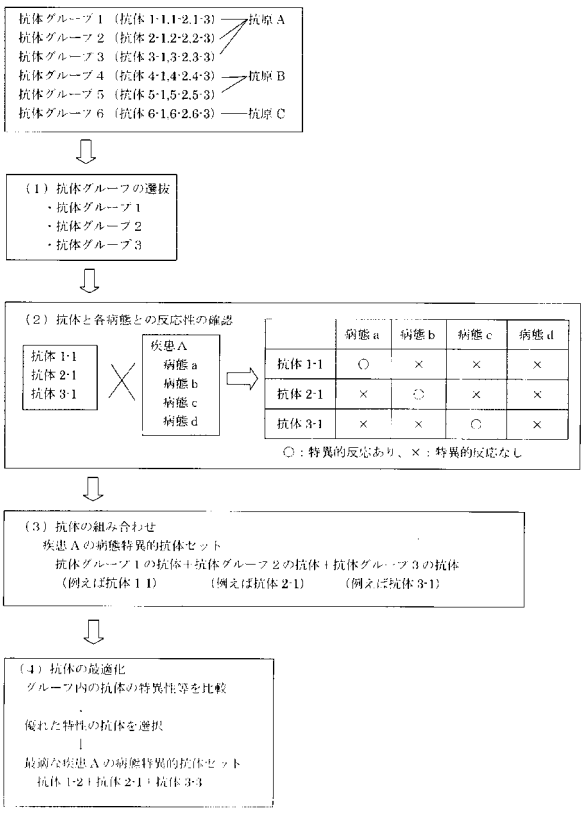
【図２】


抗体グループ１（抗体 1-1,1-2,1-3）
抗体グループ２（抗体 2-1,2-2,2-3）
抗体グループ３（抗体 3-1,3-2,3-3）
抗体グループ４（抗体 4-1,4-2,4-3）
抗体グループ５（抗体 5-1,5-2,5-3）
抗体グループ６（抗体 6-1,6-2,6-3）
抗原 A
抗原 B
抗原 C
（１）抗体グループの選抜
・抗体グループ１
・抗体グループ４
・抗体グループ６
（２）抗体と各疾患（又は病態）との反応性の確認
抗体 1-1
抗体 4-1
抗体 6-1
疾患 A
疾患 B
疾患 C
疾患 D
抗体 1-1 が疾患 A と特異的に反応
抗体 4-1 が疾患 B と特異的に反応
（３）抗体の選抜と組み合わせ
抗体グループ１の抗体＋抗体グループ４の抗体
（例えば抗体 1-1）　（例えば抗体 4-1）
（４）抗体の最適化
グループ内の抗体の特異性等を比較
↓
優れた特性の抗体を選択
↓
最適な抗体セット
抗体 1-2＋抗体 4-3

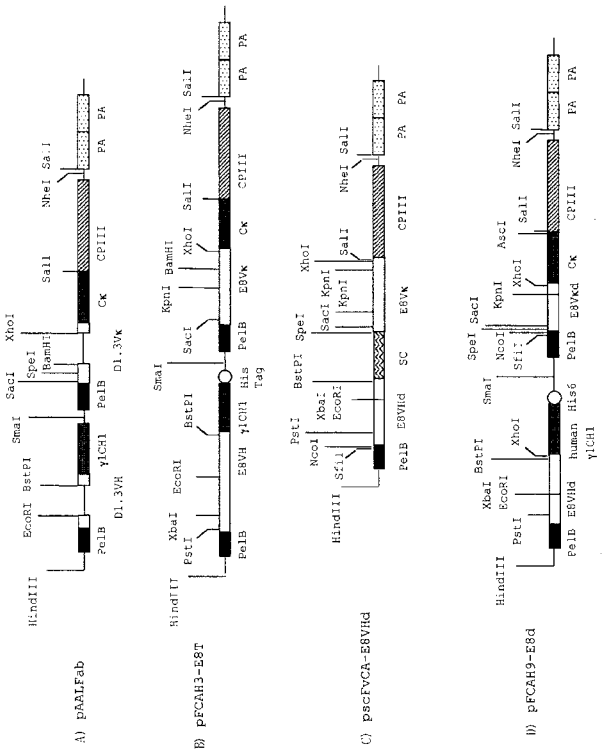
【図３】


抗体グループ１（抗体 1-1,1-2,1-3）――抗原 A
抗体グループ２（抗体 2-1,2-2,2-3）
抗体グループ３（抗体 3-1,3-2,3-3）
抗体グループ４（抗体 4-1,4-2,4-3）――抗原 B
抗体グループ５（抗体 5-1,5-2,5-3）
抗体グループ６（抗体 6-1,6-2,6-3）――抗原 C
（１）抗体グループの選抜
・抗体グループ１
・抗体グループ４
・抗体グループ６
（２）抗体と各疾患（又は病態）との反応性の確認
抗体 1-1
抗体 4-1
抗体 6-1
疾患 A
疾患 B
疾患 C
疾患 D
抗体 1-1 が疾患 A と特異的に反応
抗体 4-1 が疾患 B と特異的に反応
（３）抗体の選抜と組み合わせ
（A）疾患 A 特異的抗体セット
抗体グループ１の抗体＋抗体グループ２の抗体＋抗体グループ３の抗体
（例えば抗体 1-1）　（例えば抗体 2-1）　（例えば抗体 3-1）
（B）疾患 B 特異的抗体セット
抗体グループ４の抗体－抗体グループ５の抗体
（例えば抗体 4-1）　（例えば抗体 5-1）
（４）抗体の最適化
グループ内の抗体の特異性等を比較
↓
優れた特性の抗体を選択
・最適な疾患 A 特異的抗体セット
抗体 1-2・抗体 2-1＋抗体 3-3
・最適な疾患 B 特異的抗体セット
抗体 4-3・抗体 5-3

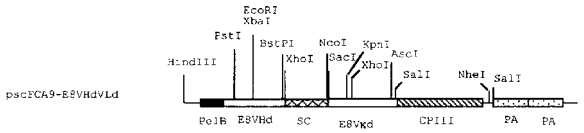
【図４】


抗体グループ１（抗体 1-1,1-2,1-3）
抗体グループ２（抗体 2-1,2-2,2-3）
抗体グループ３（抗体 3-1,3-2,3-3）
抗体グループ４（抗体 4-1,4-2,4-3）
抗体グループ５（抗体 5-1,5-2,5-3）
抗体グループ６（抗体 6-1,6-2,6-3）
抗原 A
抗原 B
抗原 C
（１）抗体グループの選抜
・抗体グループ１
・抗体グループ２
・抗体グループ３
（２）抗体と各病態との反応性の確認
抗体 1-1
抗体 2-1
抗体 3-1
疾患 A
病態 a
病態 b
病態 c
病態 d
病態 a　病態 b　病態 c　病態 d
抗体 1-1　○　×　×　×
抗体 2-1　×　○　×　×
抗体 3-1　×　×　○　×
○：特異的反応あり、×：特異的反応なし
（３）抗体の組み合わせ
疾患 A の病態特異的抗体セット
抗体グループ１の抗体＋抗体グループ２の抗体＋抗体グループ３の抗体
（例えば抗体 1-1）　（例えば抗体 2-1）　（例えば抗体 3-1）
（４）抗体の最適化
グループ内の抗体の特異性等を比較
↓
優れた特性の抗体を選択
↓
最適な疾患 A の病態特異的抗体セット
抗体 1-2＋抗体 2-1＋抗体 3-3

【図５】



【図６】



【図７－１】

pscFvCA9-E8VHdVLd

```
                                                M  K  Y  L  L  P  T  A  A  A  G
AAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
Hind III

L  L  L  L  A  A  Q  P  A  M  A  Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V  K
TTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCGATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG
                                          Pst I

P  G  A  S  V  K  L  S  C  T  A  S  G  F  N  I  K  D  T  Y  M  H  W  V
CCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG

K  Q  R  P  E  K  G  ---------  L  T  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  G  Y
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA
                    Xba I  EcoR I

D  Y  G  N  F  D  Y  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  R  G  G  G  G  S  G
TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCGAGGGCGGTGGCGGATCAGG
                                        BstP I    Xho I

G  G  G  S  G  G  G  G  S  M  A
TGGGGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCCATGGCC
                    Nco I

D  I  E  L  T  Q  S  P  A  S  L  S  A  S  V  G  E  T  V  T  I  T
GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCAC
   Sac I

C  R  A  S  G  N  I  H  N  Y  L  A  -------  K  L  E  I  K  R  A  D  A  A
ATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTACCAAGCTCGAGATCAAACGGGCTGATGCTG
                                        Kpn I    Xho I

P  T  V  S  I  F  P  P  S  S  E  Q  L  T  S  G  G  A  S  V  V  C  F  L
CACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCT

N  S  F  Y  P  K  D  I  N  V  K  W  K  I  D  G  S  E  R  Q  N  G  V  L
TGAACAGCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCC

N  S  W  T  D  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  M  S  S  T  L  T  L  T  K  D
TGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGG

E  Y  E  R  H  N  S  Y  T  C  E  A  T  H  K  T  S  T  S  P  I  V  K  S
ACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGA
```

【図７－２】

```
F  N  R  N  E  C  S  A  R  Q  S  T  P  F  V  C  E  Y  Q  G  Q  S  S  D
GCTTCAACAGGAATGAGTGTTCGGCGCGCCAGTCGACTCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTG
                      Asc I     Sal I

L  P  Q  P  P  V  N  A  G  G  G  S  G  G  G  S  G  G  G  S  E  G  G  G
ACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTG

S  E  G  G  G  S  E  G  G  G  S  E  G  G  G  S  G  G  G  S  G  S  G  D
GCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTG

F  D  Y  E  K  M  A  N  A  N  K  G  A  M  T  E  N  A  D  E  N  A  L  Q
ATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTAC

S  D  A  K  G  K  L  D  S  V  A  T  D  Y  G  A  A  I  D  G  F  I  G  D
AGTCAGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTG

V  S  G  L  A  N  G  N  G  A  T  G  D  F  A  G  S  N  S  Q  M  A  Q  V
ACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAG

G  D  G  D  N  S  P  L  M  N  N  F  R  Q  Y  L  P  S  L  P  Q  S  V  E
TCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTG

C  R  P  F  V  F  G  A  G  K  P  Y  E  F  S  I  D  C  D  K  I  N  L  F
AATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTAT

R  G  V  F  A  F  L  L  Y  V  A  T  F  M  Y  V  F  S  T  F  A  N  I  L
TCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATAC

R  N  K  E  S  *                                S  T  A  Q  H  D  E  A
TGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTGCTAGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCC
                                              Nhe I    Sal I

V  D  N  K  F  N  K  E  Q  Q  N  A  F  Y  E  I  L  H  L  P  N  L  N  E
GTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAA

E  Q  R  N  A  F  I  Q  S  L  K  D  D  P  S  Q  S  A  N  L  L  A  E  A
GAACAACGAAACGCGTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCT

K  K  L  N  D  A  Q  A  P  K  V  D  N  K  F  N  K  E  Q  Q  N  A  F  Y
AAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTAT

E  I  L  H  L  P  N  L  N  E  E  Q  R  N  A  F  I  Q  S  L  K  D  D  P
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCA

S  Q  S  A  N  L  L  A  E  A  K  K  L  N  D  A  Q  A  P  K  V  D  A  N
AGCCAAAGCGGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAAT

*
TAGCTGGGAATTAATTC
```

【図８－１】

pscFvCA-E8VHd

```
                                                M  K  Y  L  L  P  T  A  A  A  G
AAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
Hind III

L  L  L  L  A  A  Q  P  A  M  A  Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V  K
TTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG
                Sfi I          Nco I          Pst I

P  G  A  S  V  K  L  S  C  T  A  S  G  F  N  I  K  D  T  Y  M  H  W  V
CCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTG

K  Q  R  P  E  K  G  ----------  L  T  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  G  Y
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA
                Xba I  Eco RI

D  Y  G  N  F  D  Y  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  G  G  G  G  S  G
TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGCGGATCAGG
                                Bst PI

G  G  G  S  G  G  G  G  S  T  S  D  I  E  L  T  Q  S  P  A  S  L  S  A
TGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCTACTAGTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGC
                Spe I          Sac I

S  V  G  E  T  V  T  I  T  C  R  A  S  G  N  I  H  N  Y  L  A  W  Y  Q
GTCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTACCA
                                                Kpn I

Q  K  P  G  K  S  P  Q  L  L  V  Y  N  A  K  T  L  A  D  G  V  P  S  R
GCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG

F  S  G  S  G  S  G  T  Q  Y  S  L  K  I  N  S  L  Q  P  E  D  F  G  S
GTTCAGTGGCAGTGGATCCGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAG
                Bam HI

Y  Y  C  Q  H  F  W  S  T  P  W  T  F  G  G  G  T  K  I  E  S  T  P  F
TTATTACTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGTACCAAGCTCGAGTCGACTCCATT
                                Kpn I      Xho I  Sal I

V  C  E  Y  Q  G  Q  S  S  D  L  P  Q  P  P  V  N  A  G  G  G  S  G  G
CGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGG
```

【図８－２】

```
G  S  G  G  G  S  E  G  G  G  S  E  G  G  G  S  E  G  G  G  S  E  G  G
TGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGG

G  S  G  G  G  S  G  S  G  D  F  D  Y  E  K  M  A  N  A  N  K  G  A  M
CGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTAT

T  E  N  A  D  E  N  A  L  Q  S  D  A  K  G  K  L  D  S  V  A  T  D  Y
GACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCAGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTA

G  A  A  I  D  G  F  I  G  D  V  S  G  L  A  N  G  N  G  A  T  G  D  F
CGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTT

A  G  S  N  S  Q  M  A  Q  V  G  D  G  D  N  S  P  L  M  N  N  F  R  Q
TGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCA

Y  L  P  S  L  P  Q  S  V  E  C  R  P  F  V  F  G  A  G  K  P  Y  E  F
ATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATT

S  I  D  C  D  K  I  N  L  F  R  G  V  F  A  F  L  L  Y  V  A  T  F  M
TTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTAT

Y  V  F  S  T  F  A  N  I  L  R  N  K  E  S  *
GTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTGCT
                                                Nhe I
    S  T  A  Q  H  D  E  A  V  D  N  K  F  N  K  E  Q  Q  N  A  F  Y  E
AGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCCGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATG
  Sal I

I  L  H  L  P  N  L  N  E  E  Q  R  N  A  F  I  Q  S  L  K  D  D  P  S
AGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAA

Q  S  A  N  L  L  A  E  A  K  K  L  N  D  A  Q  A  P  K  V  D  N  K  F
GCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAAT

N  K  E  Q  Q  N  A  F  Y  E  I  L  H  L  P  N  L  N  E  E  Q  R  N  A
TCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACG

F  I  Q  S  L  K  D  D  P  S  Q  S  A  N  L  L  A  E  A  K  K  L  N  D
CCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATG

A  Q  A  P  K  V  D  A  N  *
ATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTAGCTGGGAATTAATTC
```

【図９】

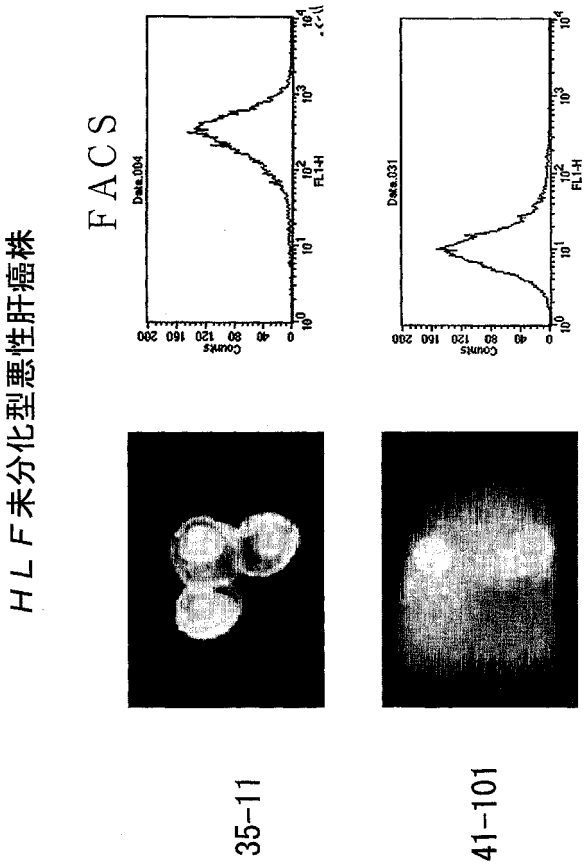
（A）HepG2スクリーニング

	インプットファージ(cfu)	アウトプットファージ(cfu)	回収率
1stスクリーニング	$1x10^{13}$	$6.4x10^{6}$	$1/1.6x10^{6}$
2ndスクリーニング	$1x10^{10}$	$3.9x10^{4}$	$1/2.6x10^{6}$
3rdスクリーニング	$1x10^{9}$	$5.0x10^{6}$	$1/2.0x10^{2}$

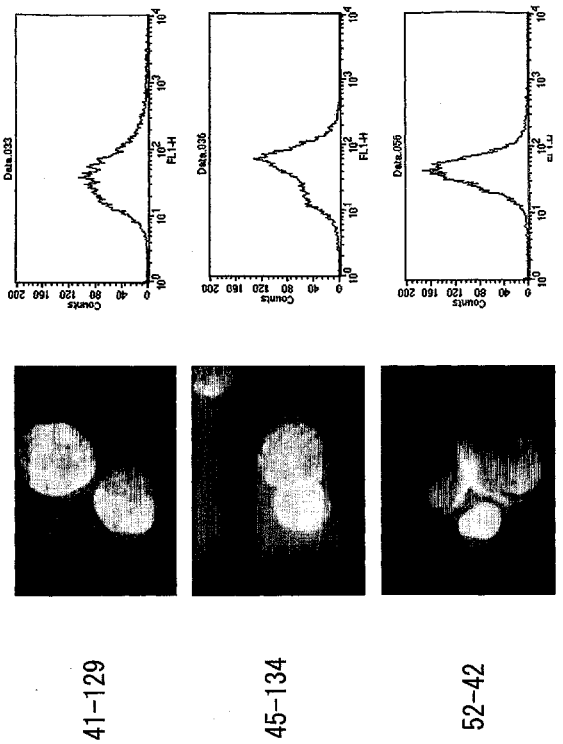
（B）Nuk-1スクリーニング

	インプットファージ(cfu)	アウトプットファージ(cfu)	回収率
1stスクリーニング	$1x10^{13}$	$8.7x10^{7}$	$1/1.1x10^{5}$
2ndスクリーニング	$2x10^{10}$	$2.1x10^{6}$	$1/9.5x10^{3}$
3rdスクリーニング	$1x10^{9}$	$2.5x10^{6}$	$1/4.6x10^{2}$

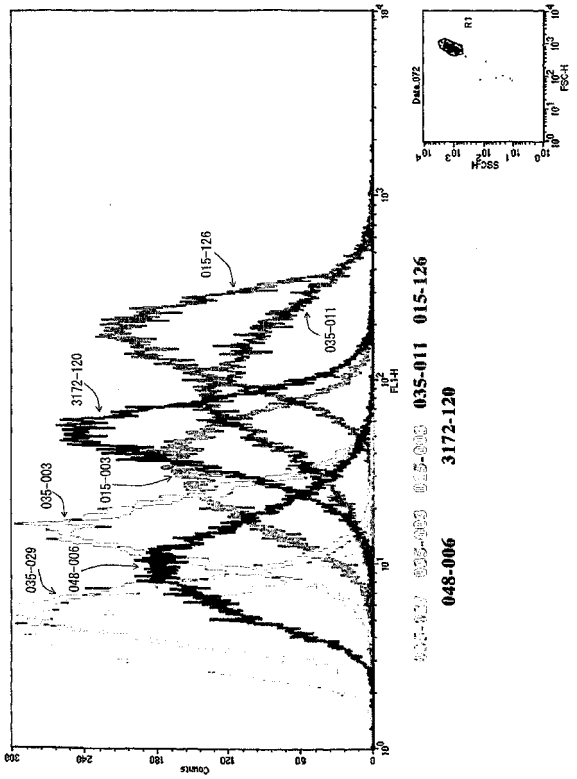
【図１０】



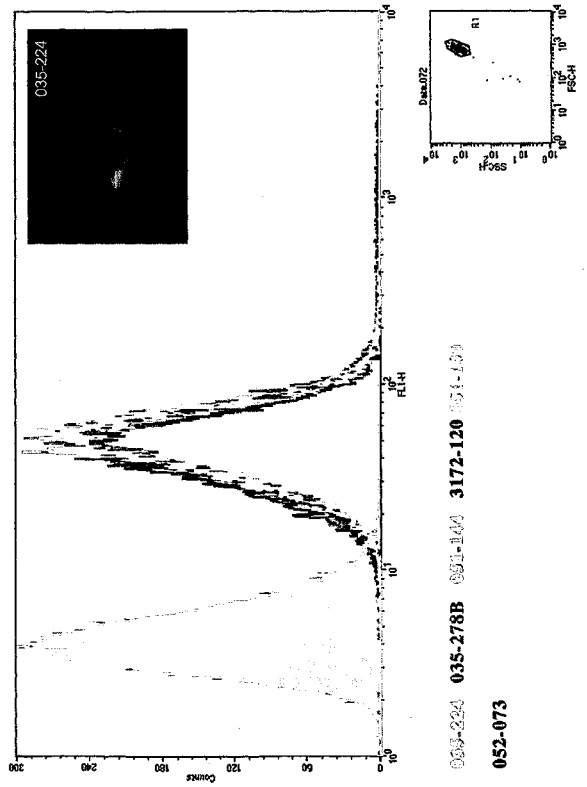
【図１１】



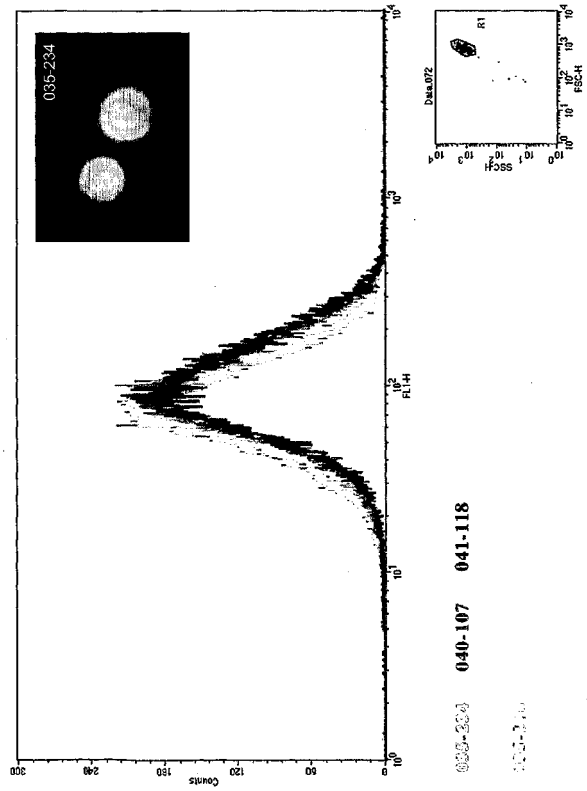
【図１２】



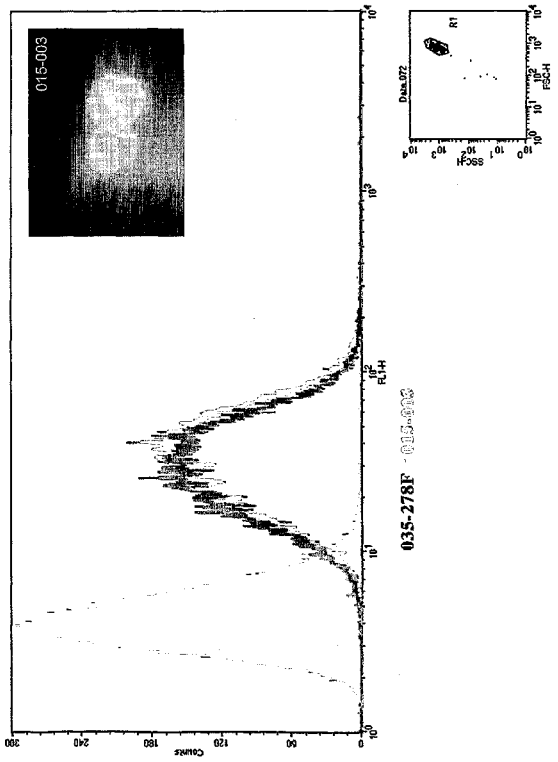
【図１３】



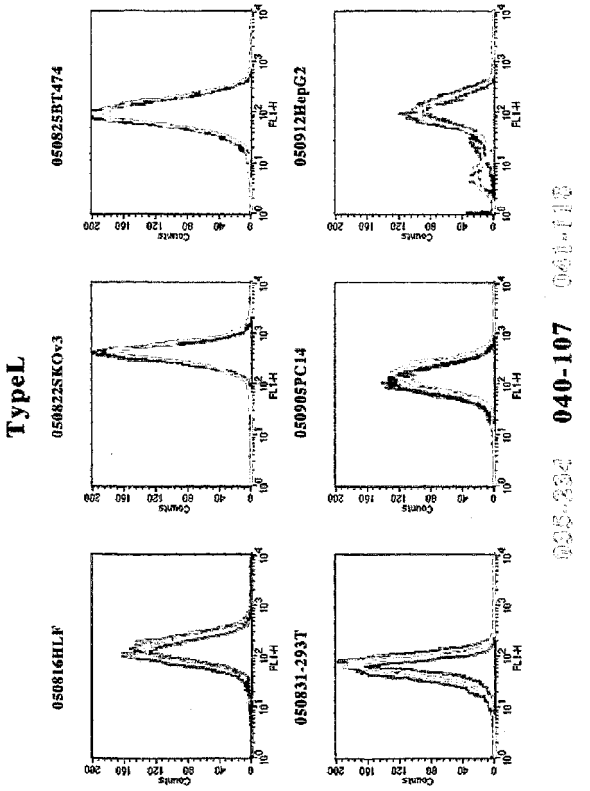
【図１４】



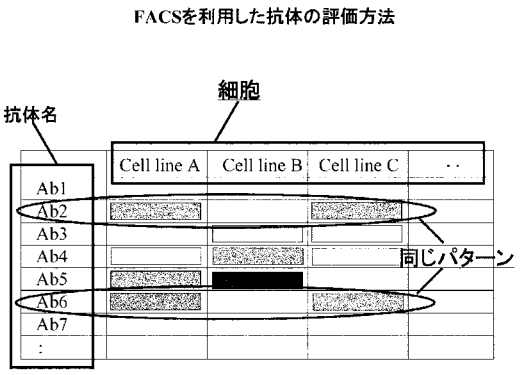
【図１５】



【図１６】



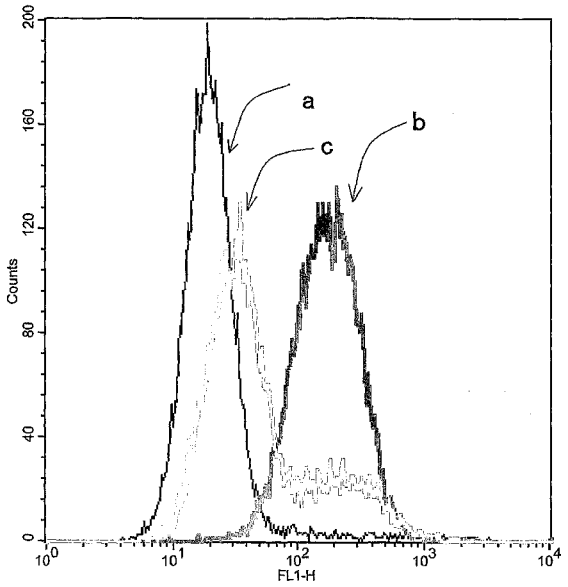
【図１７】



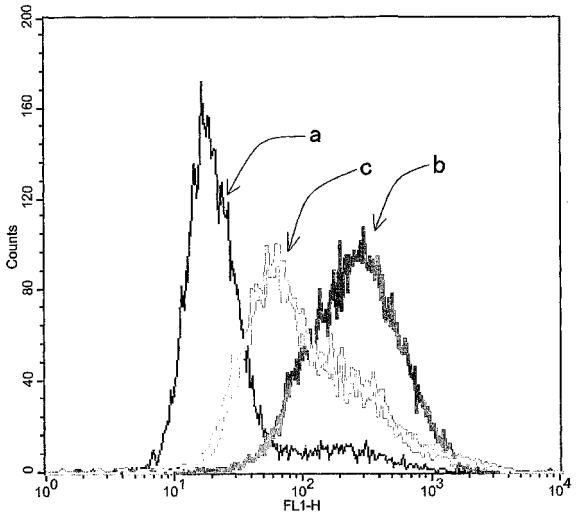
【図１８】

抗原	抗体	HLF	SKOv3	BT474	293T	PC-14	HepG2	ACHN	Caki-1	COF-RC1	040520IT	CHOK1SV	EBC-1	A431	NCI-H1373
HER1	048-006	◎	◎	×	△	◎	△	◎	△	◎	○	×	◎	◎	◎
HER1	057-091	△	△	／	／	△	／	◎	×	◎	△	×	△	○	△
HER1	059-152	◎	○	／	／	○	／	／	／	◎	○	×	○	◎	○
HER2	015-126	×	◎	◎	×	×	△	×	×	×	×	×	／	／	／
CD46	035-224	○	◎	○	○	○	◎	○	○	○	△	×	／	／	／
CD46	045-011	○	◎	△	△	△	◎	○	○	○	△	×	／	／	／
CD46	051-144	○	◎	○	○	○	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
CD46	052-053	／	○	△	○	△	○	／	／	／	／	／	／	／	／
CD46	052-073	○	◎	○	○	○	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
CD46	053-049	◎	◎	○	○	○	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
ITGA3	015-003	◎	◎	△	×	△	×	◎	◎	○	◎	×	／	／	／
ICAM1	052-033	×	×	×	×	△	◎	×	×	×	○	×	／	／	／
ICAM1	053-042	×	×	×	×	△	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
ICAM1	053-051	×	×	×	×	△	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
ICAM1	053-059	×	×	×	×	△	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
ICAM1	053-085	×	×	×	×	△	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
ALCAM	035-234	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	／	／	／
ALCAM	040-107	◎	◎	◎	○	◎	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
ALCAM	041-118	◎	◎	◎	○	◎	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
ALCAM	066-174	○	◎	／	／	△	／	／	／	／	／	／	△	×	○
ALCAM	083-040	／	／	／	／	／	／	／	／	／	／	／	／	／	／
CD147	059-053	／	／	／	／	△	／	○	○	◎	○	×	／	／	／
IgSF4	035-029	△	×	×	△	×	○	×	×	×	×	×	／	／	／
IgSF4	035-130	○	×	×	△	×	○	×	×	×	×	×	／	／	／
IgSF4	035-169	○	×	×	△	×	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
IgSF4	035-212	○	×	×	△	×	◎	△	×	×	×	×	／	／	／
IgSF4	035-215	○	×	×	△	×	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
IgSF4	035-273	◎	×	×	△	×	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
IgSF4	035-283	○	△	×	△	×	◎	／	／	／	／	／	／	／	／
IgSF4	040-131	◎	×	×	○	×	◎	○	×	×	×	×	／	／	／
IgSF4	051-054	△	×	×	△	×	○	／	／	／	／	／	／	／	／
IgSF4	051-181	◎	×	×	○	×	◎	／	／	／	／	／	／	／	／

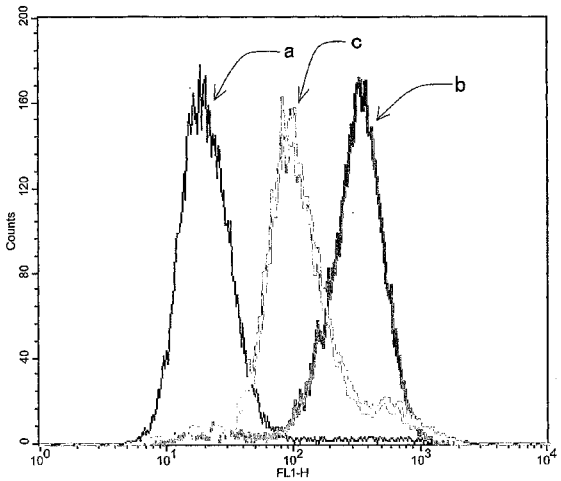
【図１９】



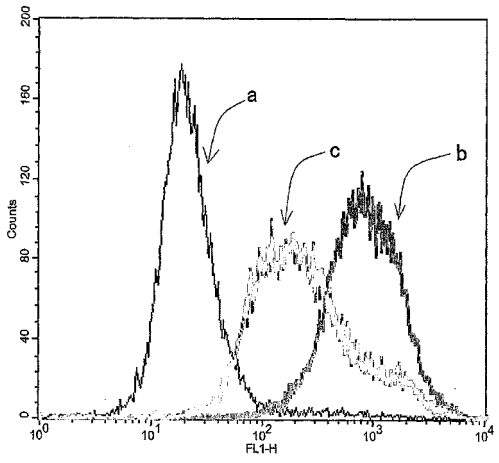
【図２０】



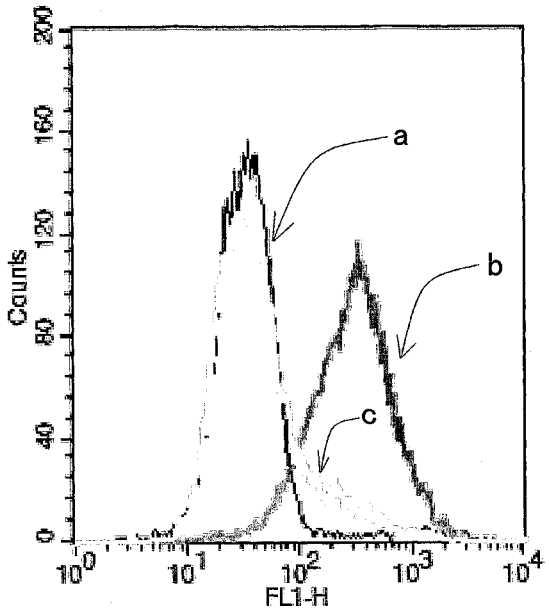
【図２１】



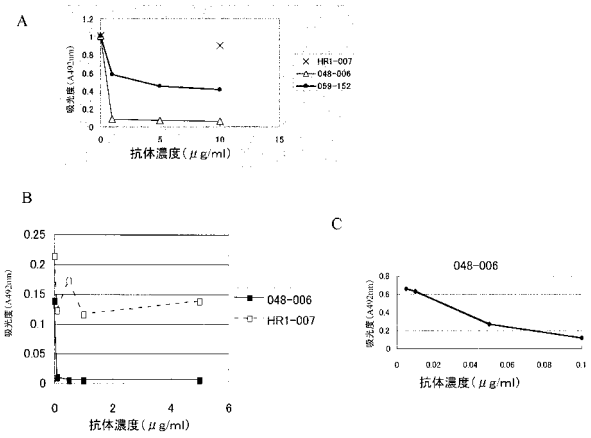
【図２２】



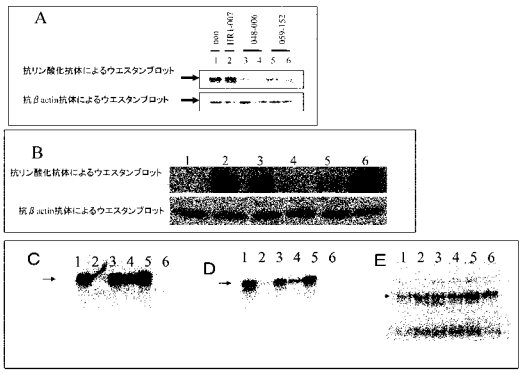
【図２３】



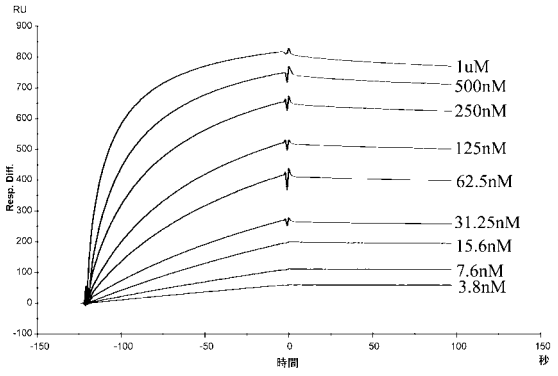
【図２４】



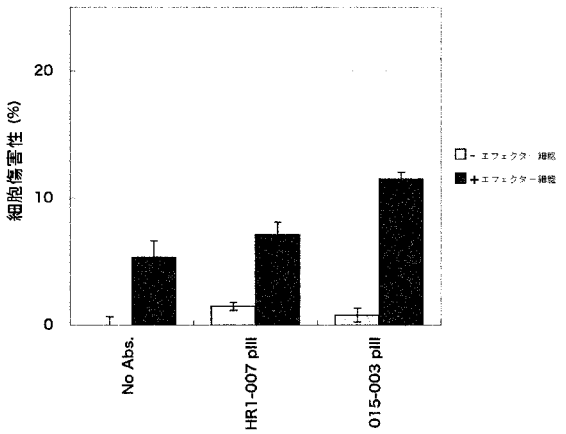
【図２５】



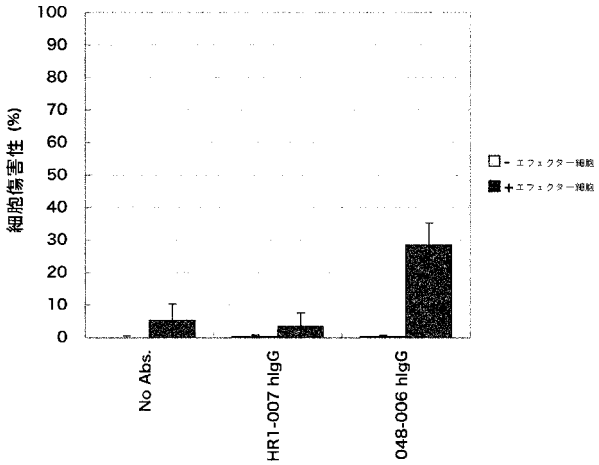
【図２６】



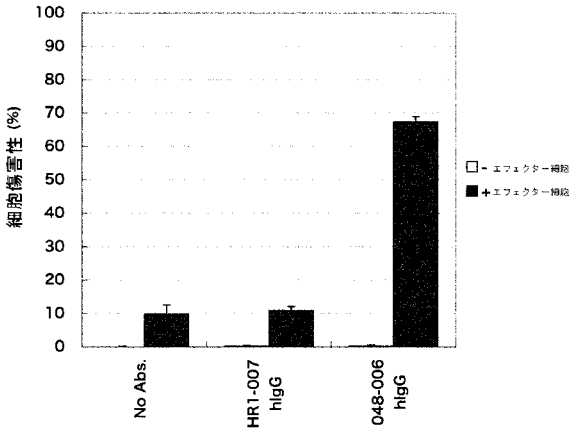
【図２７】



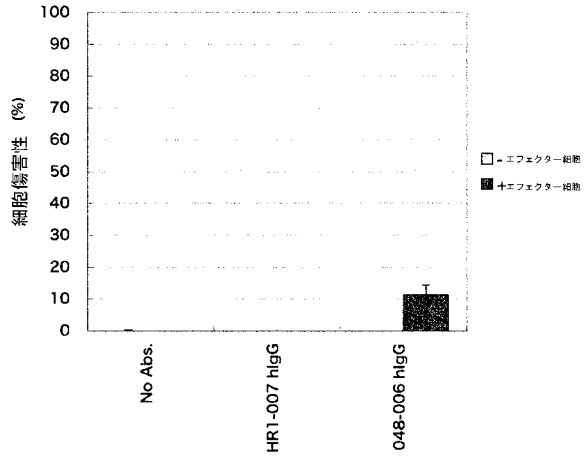
【図２８】



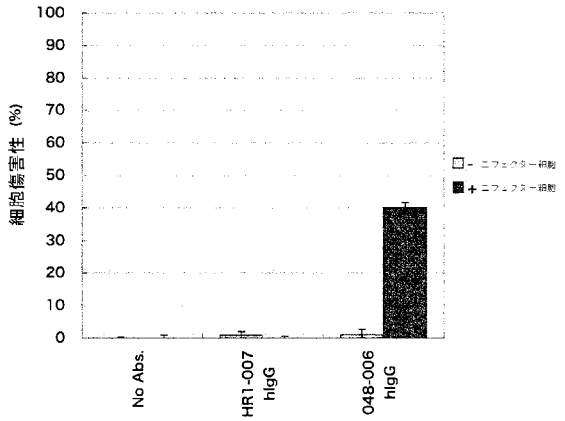
【図２９】



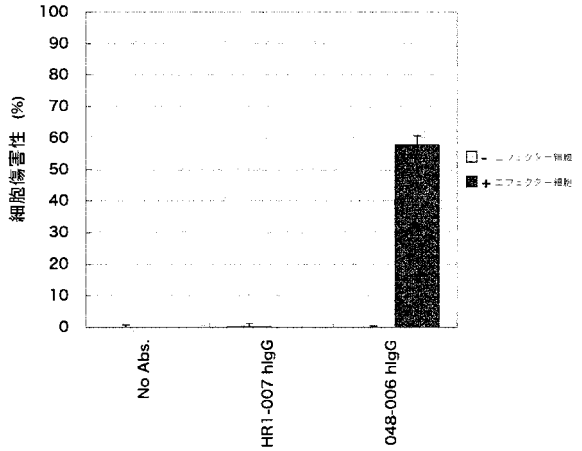
【図３０】



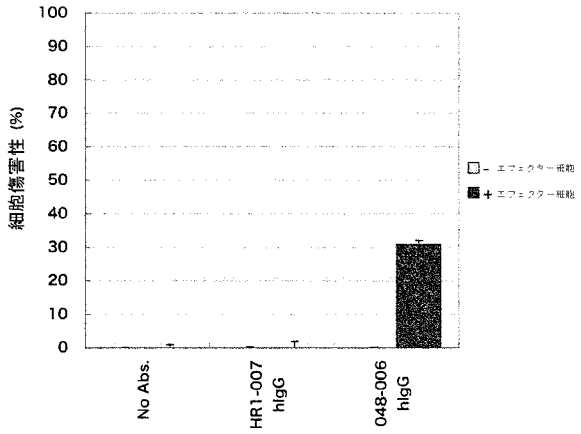
【図３１】



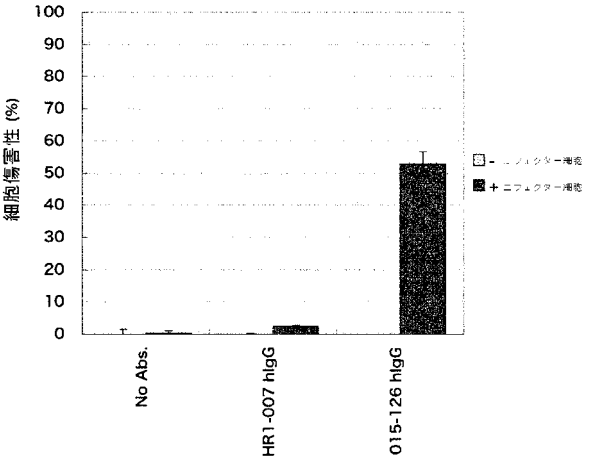
【図３２】



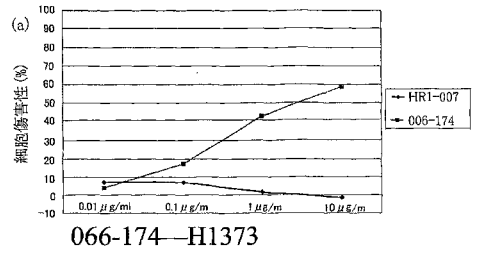
【図３３】



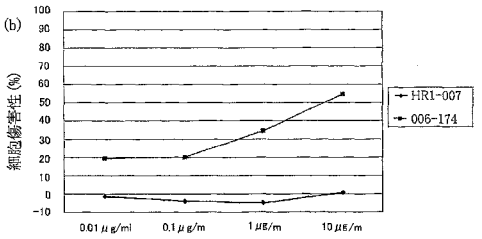
【図３４】



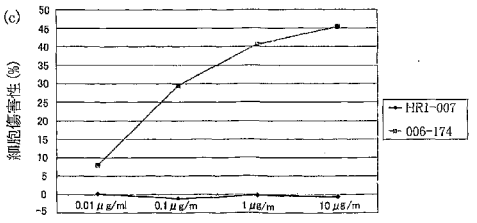
【図３５】



066-174—H1373

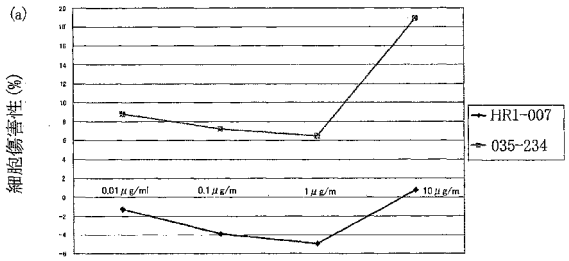


066-174—CW2

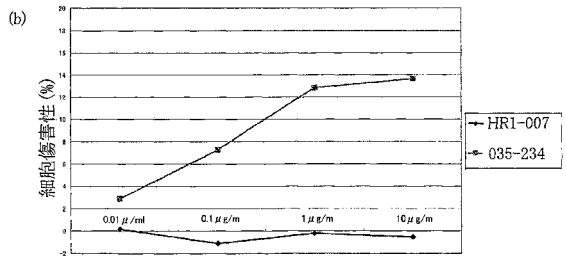


066-174—H441

【図３６】

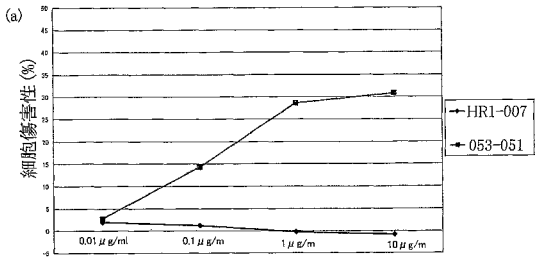


035-234—CW2

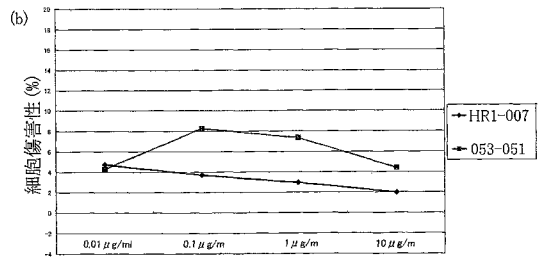


035-234—H441

【図３７】

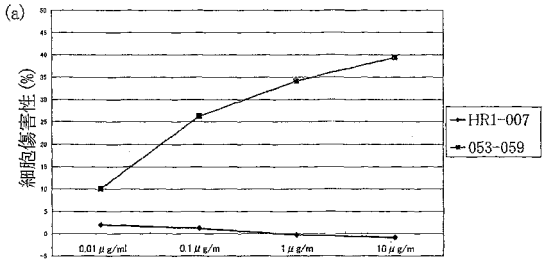


053-051—H441

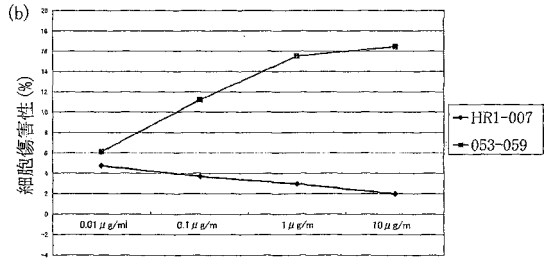


053-051—HepG2

【図３８】

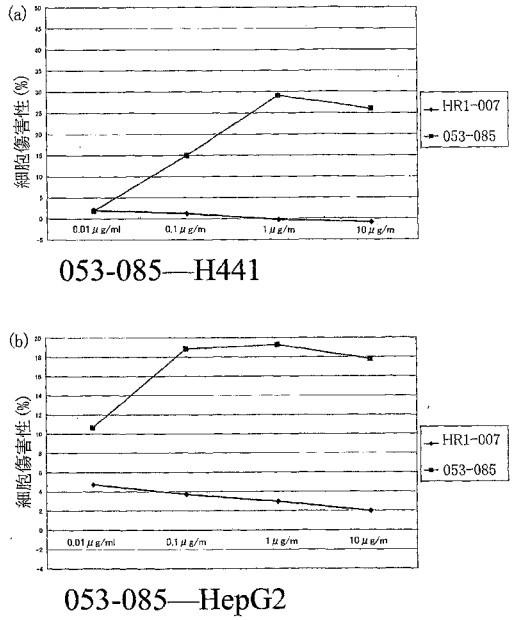


053-059—H441

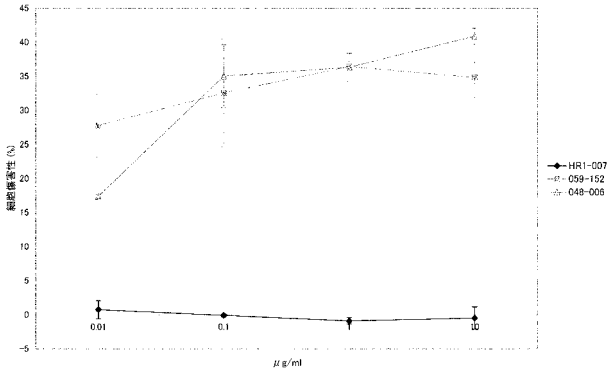


053-059—HepG2

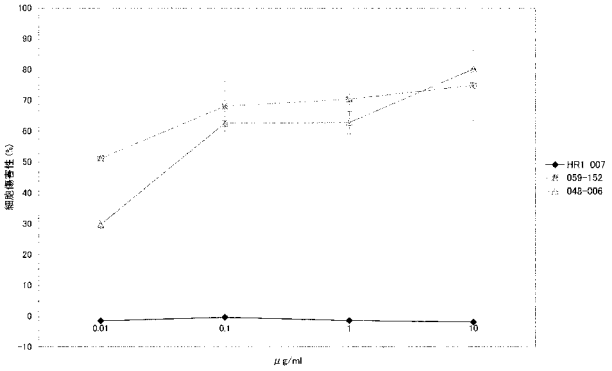
【図３９】



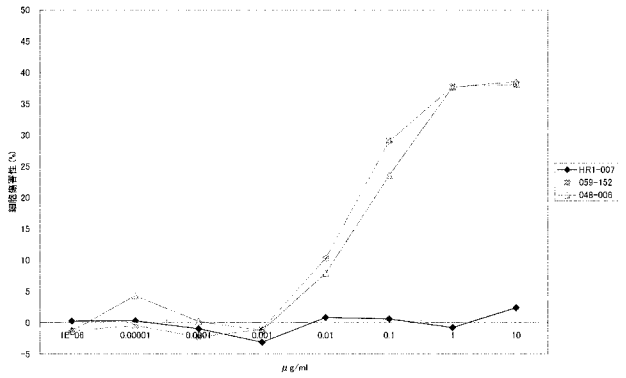
【図４０】



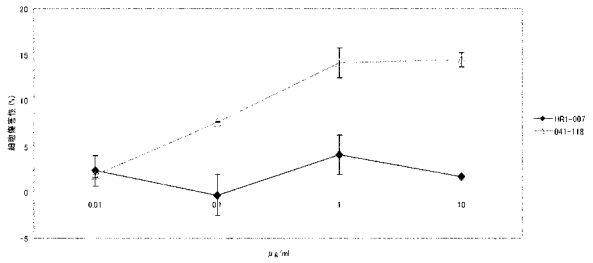
【図４１】



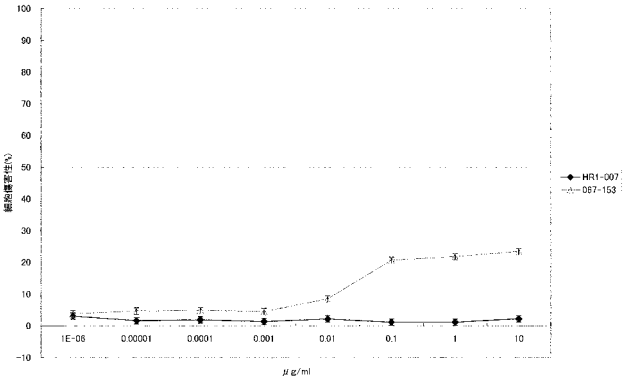
【図４２】



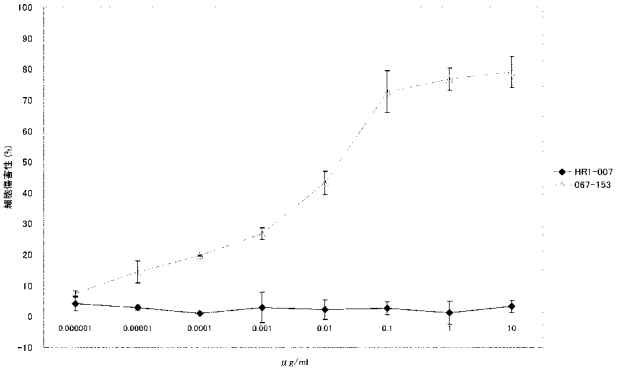
【図４３】



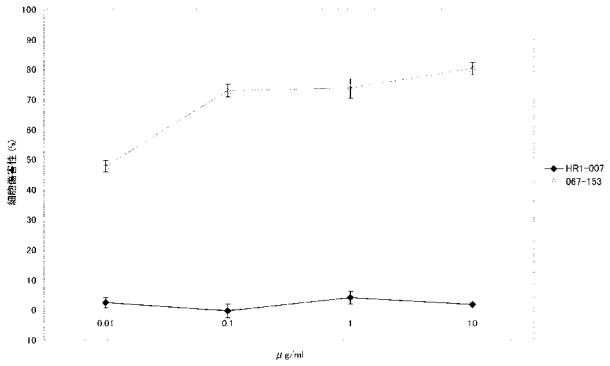
【図４４】



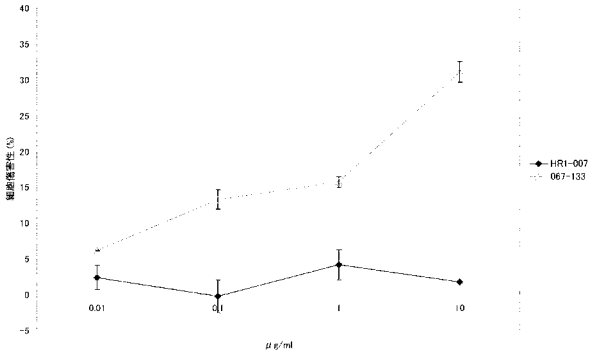
【図４５】



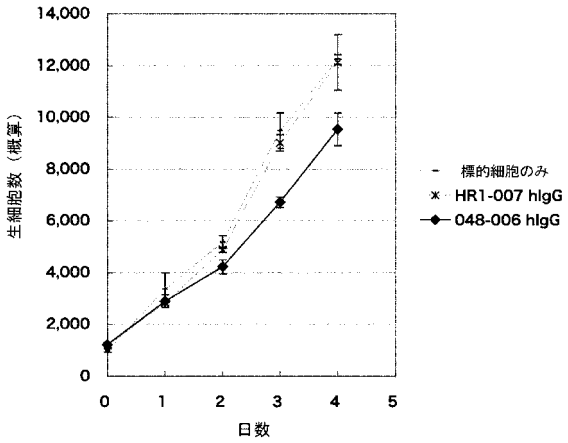
【図４６】



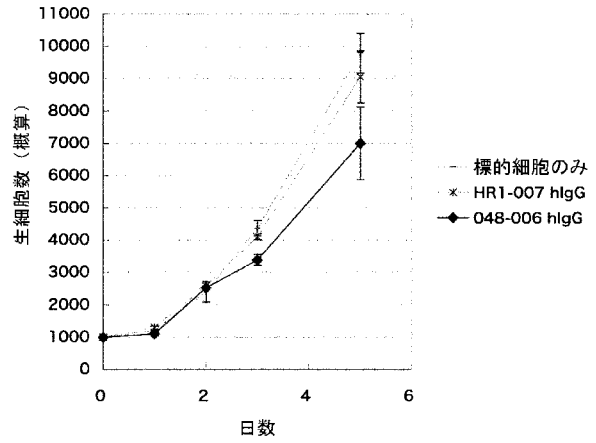
【図４７】



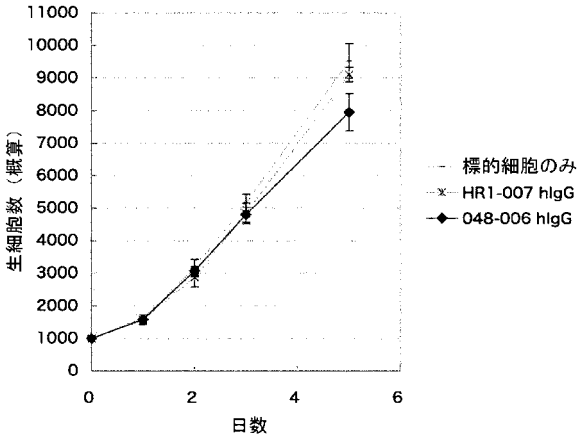
【図４８】



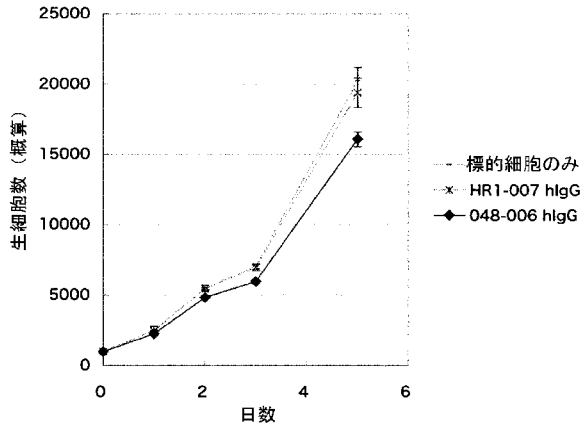
【図４９】



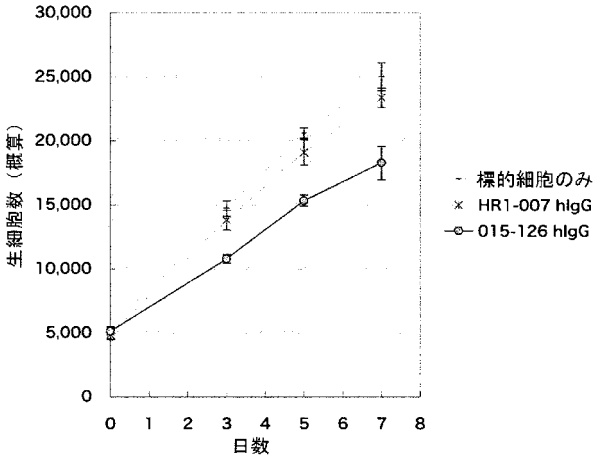
【図５０】



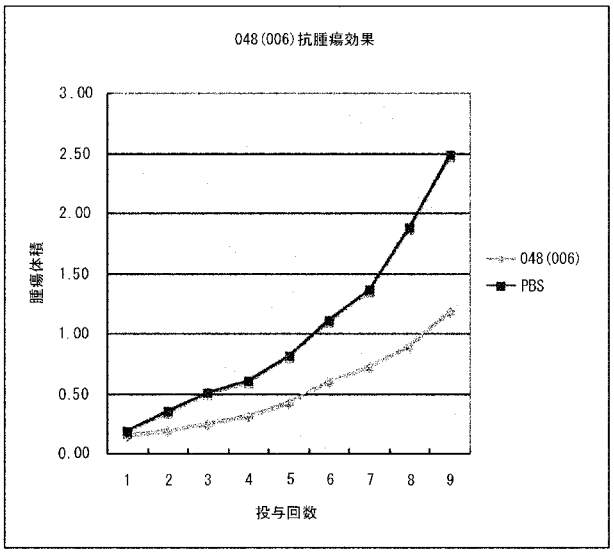
【図５１】



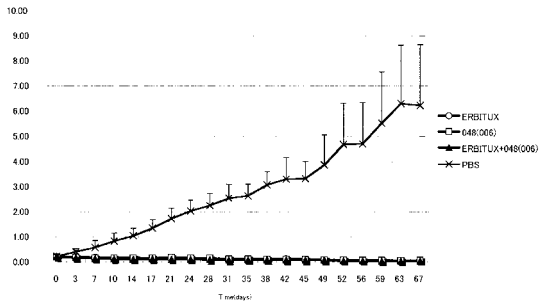
【図５２】



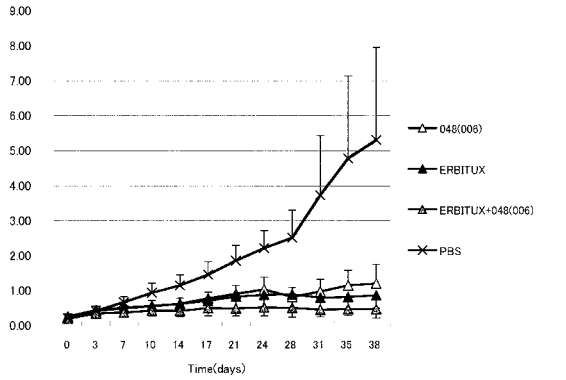
【図５３】



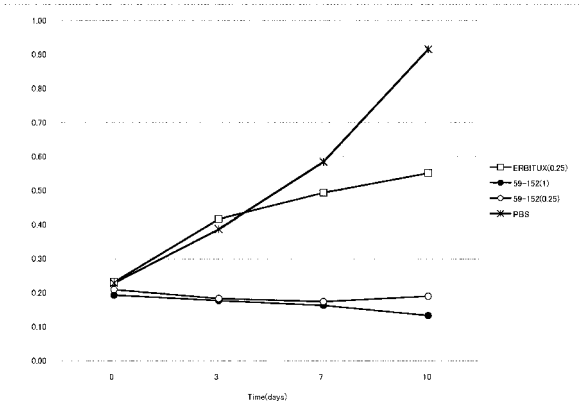
【図５４】



【図５５】



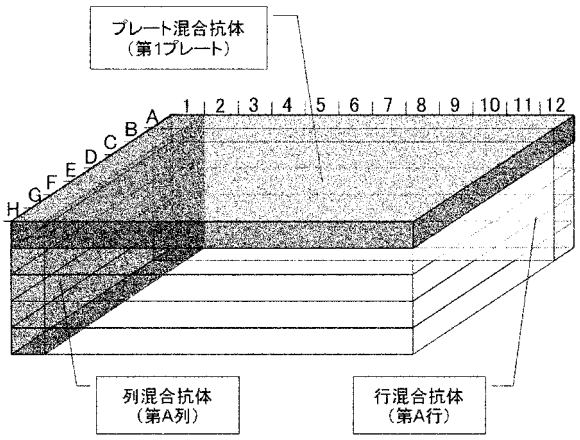
【図５６】



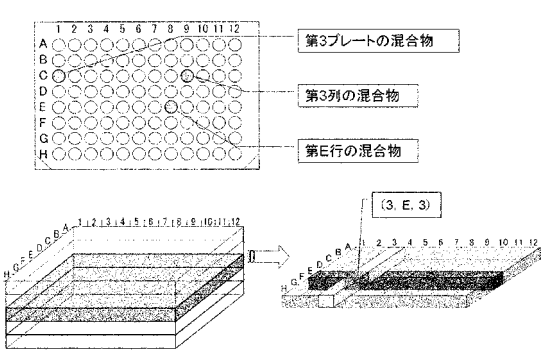
【図５７】

由来調整		細胞株名	由来	培地	剥代方法
肝臓	HCV+	HepG2		DMEM+10%FBS+NEAA or GIT	0.25%Trypsin
		Nuk-1		Williams+10%FBS	
		OCTH-16	低分化型肝細胞癌	Williams+10%FBS	
	HBV+	HT17		EMEM+2mM L-glutamine+10%FBS (or Williams+10%FBS)	
		Hep3B		EMEM+2mM L-glutamine+10%FBS (or Williams+10%FBS)	
	不死化肝細胞	THLE-3	肝左葉	特殊培地	
		HLE	未分化型肝細胞癌	DMEM+10%FBS+100μg/mL Kanamycin	0.25%Trypsin+0.02%EDTA
		RBE		RPMI1640+10%FCS	0.25%Trypsin
腎臓	淡明細胞癌	CCF-RC1		RPMI1640	Trypsin-EDTA
		CCF-RC2		10%FBS	Trypsin-EDTA
		Caki-1		1%Pn-SM	Trypsin-EDTA
		Caki-2	胸水より樹立		0.25%Trypsin
	腺癌	ACHN		MEM+10%FCS+NEAA	EDTA solution
	正常	293		DMEM-F12+10%FBS+1%Pn-SM	
		0450201T			
膵臓		MIA-PaCa2		DMEM(含4mM L-glutamin+1.5g/L sodium bicarbonate+4.5g/L glucose)	0.25% trypsin, 0.53 mM EDTA solution
		PANC-1		+10%FBS+2.5%horse serum	0.02%EDTA-PBS
		A549		RPMI1640+10%FCS or Eagle's MEM+10%FBS	0.25%Trypsin
肺癌	腺癌	PC-14	肺由来低分化型	DMEM+10%FBS	Dilution
		NCI-N441		RPMI1640+10%FBS	
				RPMI1640	
			乳頭状腺癌	(2mM L-glutamine+1.5g/L NaHCO3+4.5g/L glucose+10mM HEPES+1.0mMSodiumPyruvate)	0.25%Trypsin+0.02%EDTA
		Calu-3	胸水	+10%FBS	
				EMEM	
				(2mM L-glutamine+1.5g/L NaHCO3+4.5g/L glucose+10mM HEPES+1.0mMSodiumPyruvate)	0.25%Trypsin +0.53mM EDTA
				+10%FBS	
		EBC-1		MEM+10% FBS or RPMI1640+10% FBS	0.25%Trypsin
		RERF-LC-AI		MEM+10%FBS	0.25%Trypsin
胃癌	腺癌	MKN-45	充実型腺癌	RPMI1640+10%FBS	0.25%Trypsin+0.02%EDTA
		SNU-5	低分化型腺癌	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (with 4mM L-glutamine+1.5g/L NaHCO3)+20%FBS	遠心後Dilution
		NCI-N87	高分化型	RPMI1640	
			肝転移巣より	(2mM L-glutamine+1.5g/L NaHCO3+4.5g/L glucose+10mM HEPES+1.0mMSodiumPyruvate)	0.25% Trypsin+0.53mM EDTA
				+10%FBS	
腺癌		SKOv3	腹水	McCoy's 5a medium(with 1.5mM L-glutamine)	0.25%Trypsin+0.53mMEDTA
		KF28		+10%FBS	
腎臓癌	腎臓中腎腺癌	RMG-1		Ham'sF12+10%FBS	
	腎臓中腎腺癌	RMG-2			0.25% trypsin-0.02% EDTA
大腸	腺癌	CACO-2		MEM+20%FCS+NEAA	0.05%Trypsin+0.02%EDTA
		CW-2		RPMI1640+10%FCS	0.25%Trypsin

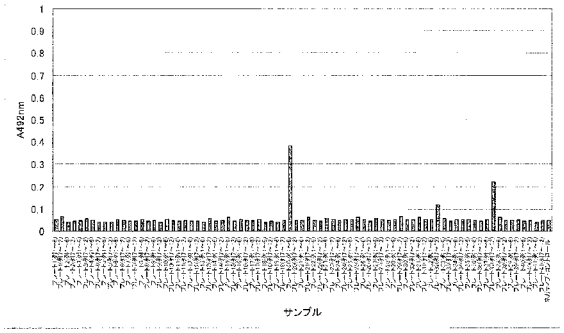
【図５８】



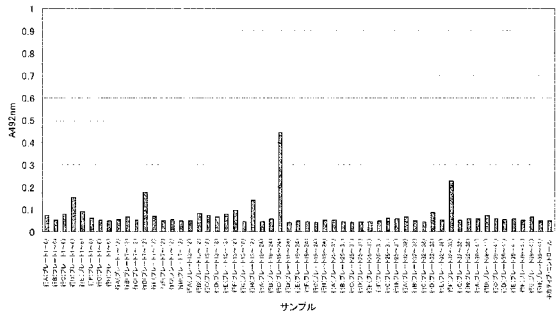
【図５９】



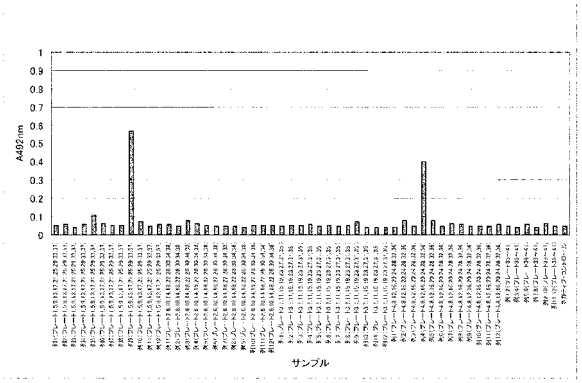
【図６０】



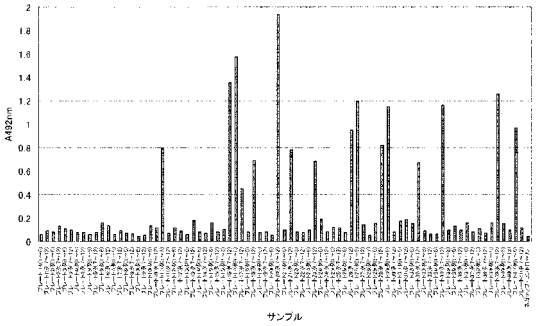
【図６１】



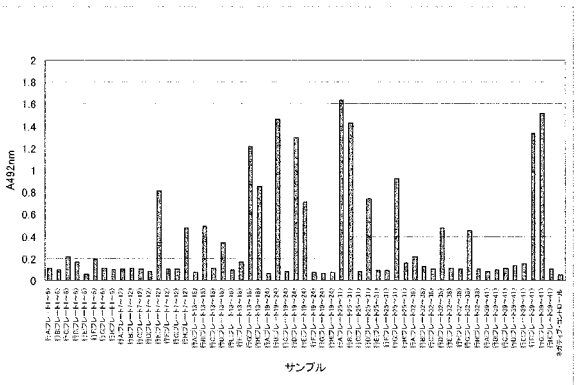
【図６２】



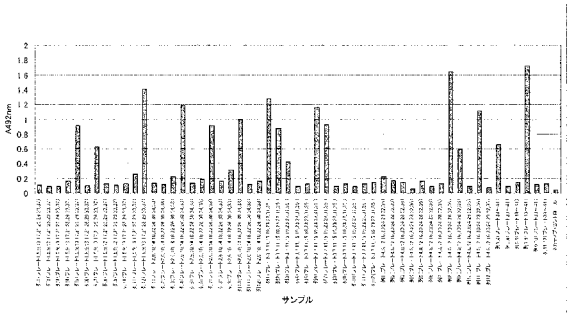
【図６３】



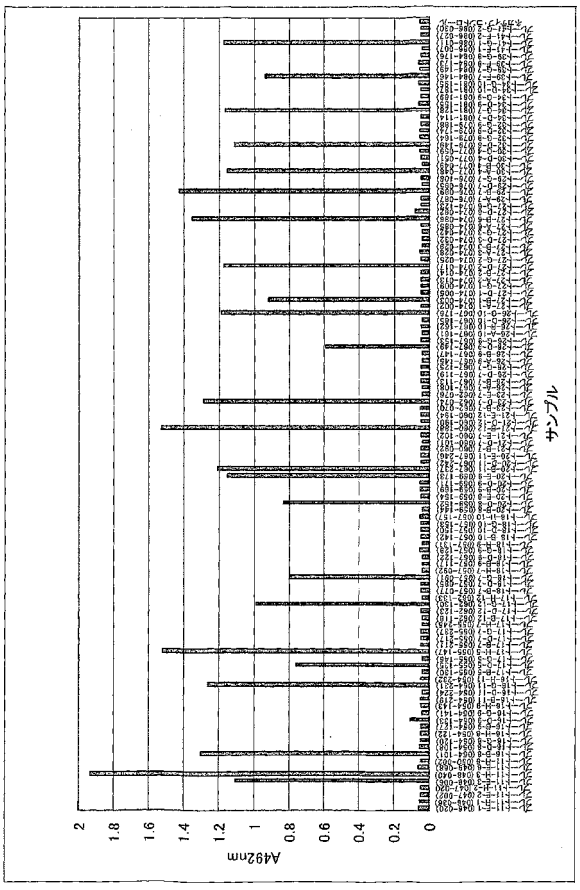
【図６４】



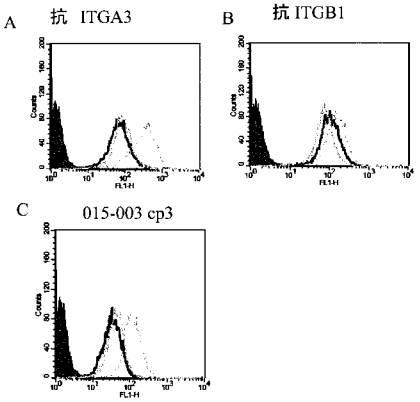
【図６５】



【図６６】



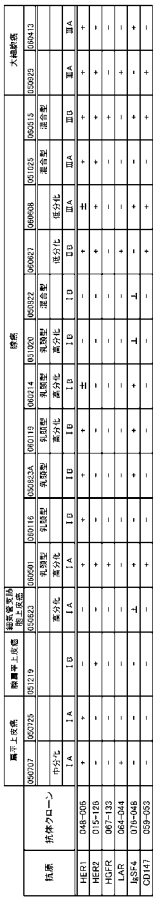
【図６７】



【図６８】

対象抗原	クローン名	免疫染色で癌特異的と判定されたがん組織(臨床検体)
HER1	048-006	腎臓、肝臓、肺、膵臓、胃
	057-091	腎臓
	059-152	腎臓
HER2	015-126	肺
HGFR	067-126	肺
	067-133	肺
	067-287	肺
LAR	064-044	腎臓、肝臓、肺
	065-030	肺
	065-358	肺
	066-019	肺
	079-085	腎臓、肺
IGSF4	035-029	肝臓
	035-130	肝臓
	035-169	肝臓
	035-212	肝臓
	035-215	肝臓
	035-273	肝臓
	035-283	肝臓
	040-131	肝臓
	051-054	肝臓
	051-181	肝臓
ALCAM	035-234	腎臓、肝臓、肺、大腸
	041-118	腎臓、肝臓、肺、胃、大腸
	040-107	肝臓、肺
ICAM1	052-033	肝臓、肺
	053-042	肝臓
	053-051	肝臓、肺
	053-059	肝臓
	053-085	肝臓、肺
BCAM	067-024	肺
CD147	059-053	腎臓
ITGA3	015-003	肝臓、肺
	064-002	肺
	064-006	腎臓、肺、膵臓、
	064-012	腎臓、肺、膵臓、
	064-014	肺
	064-054	肺
	064-085	肺
	064-093	肺
	064-116	肺
	065-183	肺
	067-142	肺
	068-007	肺
CD44	064-003	肺
EpCAM	067-153	肺、胃、大腸
CD46	035-224	肝臓、肺、胃、大腸
	045-011	肝臓、肺、大腸
	051-144	腎臓、肝臓、肺、胃
	052-053	肝臓
	052-073	肝臓
	053-049	肝臓
	3172-120	肝臓、肺、膵臓、胃
	066-069	肺
CD73	067-213	肺

【図６９】



【配列表】
2017012181000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08		
C40B	*40/06*	*(2006.01)*	C40B	40/06		
G01N	*33/574*	*(2006.01)*	G01N	33/574	A	
C07K	*14/705*	*(2006.01)*	C07K	14/705		

(72)発明者　黒澤　良和
愛知県名古屋市名東区藤巻町３－２－１２７１

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA19 DA01 DA14
4B065 AA90X AC20 CA44 CA46
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA22 EA51 FA74