(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年2月15日(15.02.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/034580 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/028802

(22) 国際出願日： 2023年8月7日(07.08.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2022-126644 2022年8月8日(08.08.2022) JP

(71) 出願人: 株式会社先端生命科学研究所(**ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.**) [JP/JP]; 〒1920031 東京都八王子市小宮町５１番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 新井 修(**ARAI, Osamu**); 〒1920031 東京都八王子市小宮町５１番地 株式会社先端生命科学研究所内 Tokyo (JP). 八木 慎太郎(**YAGI, Shintaro**); 〒1920031 東京都八王子市小宮町５１番地 株式会社先端生命科学研究所内 Tokyo (JP). 青柳 克己(**AOYAGI, Katsumi**); 〒1920031 東京都八王子市小宮町５１番地 株式会社先端生命科学研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人酒井国際特許事務所(**SAKAI INTERNATIONAL PATENT OFFICE**); 〒1000013 東京都千代田区霞が関３丁目８番１号 虎の門三井ビルディング Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING CEACAM1

(54) 発明の名称： ＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法

(57) **Abstract:** The present invention provides a technology for detecting, with high sensitivity, a specific protein that can be used as a marker for cancer. More specifically, the present invention provides a method, etc. for detecting CEACAM1, the method including: (1) a step for denaturing CEACAM1 in a CEACAM1-containing sample to generate denatured CEACAM1; and (2) a step for detecting CEACAM1 by means of a sandwich assay in which both capture antibodies having the ability to recognize the denatured CEACAM1 and labelled antibodies are used.

(57) 要約：本発明は、がんのマーカーとして使用できる特定タンパク質を高感度に検出する技術を提供する。より具体的には、本発明は、ＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法であって、（１）ＣＥＡＣＡＭ１含有検体においてＣＥＡＣＡＭ１を変性させて、変性ＣＥＡＣＡＭ１を生成する工程、及び（２）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体及び標識抗体の双方を使用するサンドイッチアッセイにより、ＣＥＡＣＡＭ１を検出する工程、を含む、方法などを提供する。

WO 2024/034580 A1

明　細　書

発明の名称 ： ＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法

技術分野

[0001] 本発明は、ＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法などに関する。

背景技術

[0002] ＣＥＡＣＡＭ１は、癌胎児抗原（ＣＥＡ）ファミリーに属するタンパク質である。ＣＥＡＣＡＭ１には、１２個のアイソフォームが存在しており、そのうち３個は分泌型であり、血清等の体液中に存在することが知られている。また、分泌型ＣＥＡＣＡＭ１は、メラノーマ、膵臓がん、尿路上皮膀胱がん等のがんのマーカーとして使用できることが知られている。膵臓がんでは、ＣＥＡＣＡＭ１は、汎用癌マーカーであるＣＡ１９－９よりも高い診断感度及び診断特異性を示すことが確認されている。よって、ＣＥＡＣＡＭ１は、癌マーカーとして期待されている。

[0003] ＣＥＡＣＡＭ１については、幾つかの先行技術が公開されている。例えば、特許文献１は、ＣＥＡＣＡＭ１特異的なエピトープを認識する能力を有する抗体（必要に応じて、ＣＥＡＣＡＭタンパク質ファミリーの他のサブタイプに結合する能力を有する抗体）を開示している。特許文献２は、ＣＥＡＣＡＭ１に特異的に結合する能力を有する抗体を用いて、肝外胆管癌、肝内胆管癌、又は胆嚢癌の有無を診断する方法を開示している。特許文献３は、酸性条件下のヒト血清又は血漿を加熱して不要性物質を分離した後、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）をイムノアッセイで検出する方法を開示している。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表２０１５－５０２１３８号公報

特許文献2：特開２０１８－１７７２３号公報

特許文献3：特公平２－５０３７１６号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、がんのマーカーとして使用できる特定タンパク質を高感度に検出することである。

[0006] 本発明の別の目的は、がんのマーカーとして使用できる特定タンパク質を高感度かつ特異的に検出することである。

[0007] 本発明者らは、鋭意検討した結果、がんのマーカーとして使用できる特定タンパク質としてＣＥＡＣＡＭ１を選択しつつ、ＣＥＡＣＡＭ１の変性後に、変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体及び標識抗体の双方を使用するサンドイッチアッセイを用いることで、がんのマーカーとして使用できるＣＥＡＣＡＭ１を高感度（及び特異的）に検出できることなどを見出し、本発明を完成するに至った。先行技術は、ＣＥＡＣＡＭ１の変性後に、このようなサンドイッチアッセイを用いることを記載も示唆もしていない。

[0008] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔１〕ＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法であって、

（１）ＣＥＡＣＡＭ１含有検体においてＣＥＡＣＡＭ１を変性させて、変性ＣＥＡＣＡＭ１を生成する工程、及び

（２）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体及び標識抗体の双方を使用するサンドイッチアッセイにより、ＣＥＡＣＡＭ１を検出する工程、

を含む、方法。

〔２〕前記変性は、変性剤、及び加熱、並びにそれらの組み合わせからなる群より選ばれる、〔１〕の方法。

〔３〕前記変性剤は、アルカリ性物質、界面活性剤、及び還元剤、並びにそれらの２種以上の組み合わせからなる群から選ばれる、〔２〕の方法。

〔４〕前記捕捉抗体及び標識抗体の一方として、（ａ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＰＡＮＳＧＲＥＴＩＹ（配列番号１）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体を使用する、〔１〕～〔３〕のいずれ

か１つの方法。

〔５〕前記捕捉抗体及び標識抗体の一方として、（ｂ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＴＥＳＭＰ（配列番号２）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体をさらに使用する、〔４〕の方法。

〔６〕前記捕捉抗体及び標識抗体の他方として、（ｃ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＤＴＴＹＬＷＷＩＮＮ（配列番号３）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体を使用する、〔４〕又は〔５〕の方法。

〔７〕前記捕捉抗体及び標識抗体の他方として、（ｄ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＥＡＴＧＱＦＨＶＹＰ（配列番号４）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体を使用する、〔４〕又は〔５〕の方法。

〔８〕がんを検出する方法であって、

（１）〔１〕～〔７〕のいずれかの方法により、被験体から採取された検体中のＣＥＡＣＡＭ１量を測定する工程、及び

（２）測定されたＣＥＡＣＡＭ１量を基準値と比較する工程、

を含む、方法。

〔９〕前記がんは、大腸がん、肝臓がん、及び膵臓がん、並びにそれらの２種以上の組み合わせからなる群より選択される、〔８〕の方法。

〔１０〕がんの治療方法であって、

（１）〔１〕～〔７〕のいずれかの方法により、被験体から採取された検体中のＣＥＡＣＡＭ１量を測定する工程、

（２）測定されたＣＥＡＣＡＭ１量を基準値と比較する工程、

（３）基準値よりも高いＣＥＡＣＡＭ１量が測定された被験体を選択する工程、及び

（４）選択された被験体に抗がん剤を投与すること

を含む、方法。

〔１１〕ＣＥＡＣＡＭ１検出用キットであって、

（１）変性剤、

（２）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体、及び

（３）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する標識抗体、

を含む、キット。

発明の効果

[0009] 本発明のＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法は、例えば、ＣＥＡＣＡＭ１の高感度かつ特異的な検出に有用である。

本発明のがんを検出する方法は、がんのマーカーであるＣＥＡＣＡＭ１を高感度かつ特異的に測定できるため、高い診断感度及び高い診断特異度でのがんの検出に有用である。

本発明の治療療法は、抗癌剤による効果的な治療に有用である。

また、本発明のこれらの方法によれば、自己抗体の影響を低減又は回避することができる。

本発明のキットは、例えば、本発明の方法の簡便な実施に有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、発現タンパク質（ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄ、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１、及びｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄ）のアミノ酸配列を示す図である。

[図2]図２は、抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体の交差反応性を示す図である。

[図3]図３は、ＣＥＡＣＡＭファミリーのアミノ酸配列アラインメントを示す図である。ＵｎｉＰｒｏｔデータベースにより探索したＣＥＡＣＡＭファミリーのシグナル配列を含むＮドメインとＡ１ドメインまでのアミノ酸配列アラインメント。相同性の高いアミノ酸を黒の白抜きで示した。各抗体のエピトープをＣＥＡＣＡＭ１の配列の上に示し、各抗体エピトープのホットスポットと考えられるアミノ酸を黒枠で示した。

[図4]図４は、各種がん検体の血中濃度分布を示す図である。大腸がん検体（

Ｃｏｌｏｎ ｃａｎｃｅｒ，ｎ＝４２）、肝がん検体（Ｌｉｖｅｒ ｃａｎｃｅｒ，ｎ＝５０）、膵がん検体（Ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ ｃａｎｃｅｒ：ｎ＝４０）、健常人検体（Ｎｏｒｍａｌ，ｎ＝３６）。

[図5A]図５Ａは、大腸がん検体におけるＲＯＣ（Ｒｅｃｅｉｖｅｒ Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）解析を示す図である。

[図5B]図５Ｂは、肝がん検体におけるＲＯＣ解析を示す図である。

[図5C]図５Ｃは、膵がん検体におけるＲＯＣ解析を示す図である。

[図6]図６は、ＳＤＳ還元熱処理の有無による効果の差異を示す図である。変性処理（ＳＤＳ還元熱処理）なし、又はＳＤＳ還元熱処理条件のＣＥＡＣＡＭ１抗原（１μｇ／ｍＬ）をＡ３０５４とＡ３０７３の共固相プレートに反応させ、ＡＬＰ標識Ａ７００４抗体で検出した結果を示す。

[図7]図７は、アルカリ処理（ＮａＯＨ）による検体変性処理の効果（その１）を示す図である。

[図8]図８は、アルカリ処理（ＮａＯＨ）による検変性処理の効果（その２）を示す図である。

[図9]図９は、各種がん検体の血中濃度分布を示す図である。大腸がん検体（Ｃｏｌｏｎ ｃａｎｃｅｒ，ｎ＝４２）、肝がん検体（Ｌｉｖｅｒ ｃａｎｃｅｒ，ｎ＝５０）、膵がん検体（Ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ ｃａｎｃｅｒ：ｎ＝４０）、健常人検体（Ｎｏｒｍａｌ，ｎ＝３６）。

[図10A]図１０Ａは、大腸がん検体の健常人検体に対するＲＯＣ解析を示す図である。

[図10B]図１０Ｂは、肝がん検体の健常人検体に対するＲＯＣ解析を示す図である。

[図10C]図１０Ｃは、膵がん検体の健常人検体に対するＲＯＣ解析を示す図である。

[図11]図１１は、ＳＤＳ還元熱処理とアルカリ処理の相関を示す図である。

[図12]図１２は、自己抗体モデル検体に対する変性処理の効果を示す図である。Ａ）変性処理を含まない測定系、Ｂ）変性処理を含む測定系。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、ＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法であって、

（１）ＣＥＡＣＡＭ１含有検体においてＣＥＡＣＡＭ１を変性させて、変性ＣＥＡＣＡＭ１を生成する工程、及び

（２）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体及び標識抗体の双方を使用するサンドイッチアッセイにより、ＣＥＡＣＡＭ１を検出する工程、

を含む、方法を提供する。

[0012] 上記工程（１）では、ＣＥＡＣＡＭ１含有検体においてＣＥＡＣＡＭ１が変性され、これにより変性ＣＥＡＣＡＭ１が生成する。

[0013] 本発明では、変性は、抗体による認識を向上させるため、ネイティブ状態（すなわち、非変性状態）では露出し得ないＣＥＡＣＡＭ１のリニアエピトープが露出するように行われる。例えば、ＣＥＡＣＡＭ１が凝集状態にある場合、または多量体や複合体を形成している場合にはリニアエピトープが覆われてしまうことから、リニアエピトープが十分に露出することができないためである。

[0014] 変性は、変性剤、若しくは加熱、又はそれらの組み合わせにより行うことができる。変性剤としては、例えば、アルカリ性物質、界面活性剤、カオトロピック変性剤（例、尿素、グアニジン）、及び還元剤、並びにそれらの２種以上の組み合わせが挙げられる。

[0015] アルカリ性物質としては、例えば、無機物質（例、金属イオン）、及び有機物質が挙げられる。アルカリ性物質としては、多数の物質が存在しており、なかでも、アルカリ金属（例、ナトリウム、カリウム）又はアルカリ土類金属（例、マグネシウム、カルシウム）の水酸化物が汎用されている。したがって、このような水酸化物を好適に使用することができる。

[0016] アルカリ性物質の濃度は、ＣＥＡＣＡＭ１を変性できる限り特に限定されず、例えば、０．１Ｍ以上、好ましくは０．２Ｍ以上、より好ましくは０．３Ｍ以上、さらにより好ましくは０．３５Ｍ以上の濃度であってもよい。ア

ルカリ性物質の濃度はまた、５Ｍ以下、２Ｍ以下、又は１Ｍ以下の濃度であってもよい。

[0017] アルカリ性物質は、界面活性剤と共に使用してもよい。界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤が好ましい。特に非イオン性界面活性剤が好ましい。非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレン（２３）ラウリルエーテル（Ｂｒｉｊ３５）、ポリエチレングリコールヘキサデシルエーテル（Ｂｒｉｊ５８）等のエーテル型界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（Ｔｗｅｅｎ２０）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミタート（Ｔｗｅｅｎ４０）ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（Ｔｗｅｅｎ８０）等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（例えば、Ｔｗｅｅｎ（商品名・登録商標）シリーズ）、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル（例えば、Ｔｒｉｔｏｎ（商品名・登録商標）シリーズ）、Ｔｅｒｇｉｔｏｌ（登録商標）１５－Ｓ－７等の二級アルコールポリオキシエチレンエーテル（例えば、ＴＥＲＧＩＴＯＬ（商品名・登録商標）シリーズ）、ポリ(エチレングリコール）－ｂｌｏｃｋ－ポリ（プロピレングリコール）－ｂｌｏｃｋ－ポリ（エチレングリコール）（ＰｌｕｒｏｎｉｃＦ１０８）等エチレンオキサイドとプロピレンオキサイドの共重合体（例えば、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（商品名・登録商標）シリーズ）等が挙げられる。界面活性剤の濃度は、特に限定されず、適宜設定できる。

[0018] アルカリ性物質を含む変性処理液によって変性させる場合、変性処理後に、ｐＨを中和、または調整するために酸性化剤を含む中和液又は緩衝能を有する緩衝液を添加する工程を更に含んでもよい。酸性化剤としては塩酸、硫酸、酢酸等が挙げられる。また、中和液を添加する工程を含まない場合、例えば、下記の反応工程において、混合する緩衝液の緩衝能及びｐＨ等を調整することで、変性処理液のアルカリ性物質を中和し、反応工程における影響を緩和してもよい。反応工程におけるｐＨは、反応工程に含まれる成分によ

って適宜設定することができるが、例えば、ｐＨ５．５～９．５になるように反応工程の液中に含まれる酸性化剤又は緩衝液等の添加量を適宜設定することができる。

[0019] 界面活性剤としては、例えば、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤、及び非イオン性界面活性剤が挙げられる。界面活性剤としては、１種又は２種以上の界面活性剤を使用することができる。界面活性剤としては、陰イオン性界面

活性剤が単独で使用されてもよいし、また、陰イオン性界面活性剤と他の界面活性剤との組み合わせが使用されてもよい。陰イオン性界面活性剤としては、例えば、硫酸エステル型界面活性剤（例、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ））、カルボン酸型界面活性剤（例、Ｎ－デカノイルサルコシンナトリウム（ＮＤＳ）、Ｎ－ラウロイルサルコシンナトリウム水和物（ＮＬＳ））、スルホン酸型界面活性剤（例、１－ノナンスルホン酸ナトリウム（ＮＳＳ）、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＳＤＢＳ））、及びカルボン酸型－スルホン酸型界面活性剤（例、コンドロイチン硫酸ナトリウム（ＣＳＳＳ））が挙げられる。両イオン性界面活性剤としては、例えば、Ｃ１０ＡＰＳ（Ｎ－デシル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホネート）、Ｃ１２ＡＰＳ（Ｎ－ドデシル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホネート）、Ｃ１４ＡＰＳ（Ｎ－テトラデシル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホネート）、Ｃ１６ＡＰＳ（Ｎ－ヘキサデシル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホネート）等が挙げられる。陽イオン性界面活性剤としては、例えば、デシルトリメチルアンモニウムクロライド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド（Ｃ１６ＴＡＣ）、デシルトリメチルアンモニウムブロマイド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド（ＣＴＡＢ）、ラウリルピリジニウムクロライド

、テトラデシルピリジニウムクロライド、セチルピリジニウムクロライド等が挙げられる。

[0020] 界面活性剤の濃度は、ＣＥＡＣＡＭ１を変性できる限り特に限定されず、例えば、０．５重量％以上、好ましくは１重量％以上、より好ましくは２重量％以上、さらにより好ましくは５重量％以上の濃度であってもよい。界面活性剤の濃度はまた、２０重量％以下、又は１５重量％以下の濃度であってもよい。

[0021] 還元剤としては、ＣＥＡＣＡＭ１に存在するジスルフィド結合を切断できる試薬を用いることができる。このような還元剤としては、例えば、トリカルボキシルエチルホスフィン（ＴＣＥＰ）、システイン、ジチオトレイトール、還元型グルタチオン、β－メルカプトエタノールが挙げられる。プロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、Ｌｙｓ－Ｃ、Ａｓｐ－Ｎ、Ｇｌｕ－Ｃ、Ａｒｇ－Ｃ、アスパラギニルエンドペプチダーゼ、アルギニルエンドペプチダーゼ、及びＶ８プロテアーゼ等が挙げられる。

[0022] 還元剤の濃度は、例えば、ＣＥＡＣＡＭ１に存在するジスルフィド結合を切断できる限り特に限定されず、例えば、０．５ｍＭ以上、好ましくは１ｍＭ以上、より好ましくは２ｍＭ以上、さらにより好ましくは５ｍＭ以上の濃度であってもよい。還元剤の濃度はまた、１００ｍＭ以下、又は５０ｍＭ以下の濃度であってもよい。

[0023] なお、上記変性剤（アルカリ性物質、界面活性剤及び還元剤）の濃度の値は、変性剤を含む変性処理液の重量または体積を基準とした値である。変性処理液には、変性剤の他、溶媒または分散媒（例、水）及び必要に応じて添加剤が含まれる。添加剤としては、ＥＤＴＡなどのキレート剤が挙げられる。

[0024] 加熱は、例えば、３５℃以上、４０℃以上、４５℃以上、５０℃以上、５５℃以上、６０℃以上、６５℃以上、７０℃以上、７５℃以上、８０℃以上、８５℃以上、９０℃以上、９５℃以上、又は約１００℃（すなわち、煮沸）であってもよい。加熱はまた、１００℃以下であってもよい。

[0025] 特定の実施形態では、変性は、界面活性剤と還元剤とを組み合わせて行われてもよい。変性はまた、界面活性剤と還元剤と加熱とを組み合わせて行われてもよい（例、ＳＤＳ還元熱処理）。

[0026] ＣＥＡＣＡＭ１を変性させるための処理時間（例、検体への変性剤の添加後のインキュベート時間、加熱処理時間）は、例えば、変性処理の種類及びその程度（例、濃度、加熱温度）等の因子に応じて変動し、例えば１秒以上、５秒以上、１０秒以上、好ましくは３０秒以上、より好ましくは１分以上、さらにより好ましくは２分以上、３分以上、又は５分以上であってもよい。このような時間はまた、１時間以下、３０分以下、又は２０分以下であってもよい。

[0027] ＣＥＡＣＡＭ１含有検体は、ＣＥＡＣＡＭ１を含有する任意の検体である。好ましくは、ＣＥＡＣＡＭ１含有検体は、生物学的な液体検体である。ＣＥＡＣＡＭ１含有検体は、本発明の方法に用いられる前に、他の処理に付されてもよい。このような処理としては、例えば、遠心分離、抽出、ろ過、沈殿、加熱、凍結、冷蔵、及び攪拌が挙げられる。

[0028] 一実施形態では、ＣＥＡＣＡＭ１含有検体は、動物由来液体検体であってもよい。液体検体が由来する動物としては、例えば、哺乳動物（例、ヒト、サル等の霊長類；マウス、ラット、ウサギ等の齧歯類；ウシ、ブタ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の有蹄類；イヌ、ネコ等の食肉類；鳥類（例、ニワトリ））等の動物が挙げられる。好ましくは、動物は、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。動物由来液体検体は、上述したような動物に由来する体液検体であってもよい。体液検体としては、例えば、血液検体（例、全血、血清及び血漿）、尿、唾液、リンパ液、組織液、脳脊髄液、腹水、汗、精液、涙液、粘液、乳汁、胸腔液、気管支肺胞洗浄液及び羊水が挙げられる。好ましくは、体液は、血液検体、尿、又は唾液である。

[0029] 別の実施形態では、ＣＥＡＣＡＭ１含有検体は、培養上清検体であってもよい。培養上清検体は、細胞培養上清検体であっても組織培養上清検体であってもよい。培養される細胞又は組織が由来する動物の例及び好ましい例は

、上述のとおりである。

[0030] ＣＥＡＣＡＭ１は、それが由来する動物の種類により特定することができる。ＣＥＡＣＡＭ１が由来する動物の例及び好ましい例は、上述の動物と同様である。したがって、ＣＥＡＣＡＭ１は、哺乳動物ＣＥＡＣＡＭ１であり、好ましくはヒトＣＥＡＣＡＭ１である。ＣＥＡＣＡＭ１はまた、１２個のアイソフォームが存在しており、そのうち３個は分泌型（ＣＥＡＣＡＭ１－４Ｃ１、ＣＥＡＣＡＭ１－３、ＣＥＡＣＡＭ１－３Ｃ２）である。よって、体液検体が使用される場合、ＣＥＡＣＡＭ１は、このような分泌型ＣＥＡＣＡＭ１を含むものであってもよい。

[0031] 上記工程（１）の後、変性ＣＥＡＣＡＭ１を含む検体が溶液（例、緩衝液）により希釈されてもよい。これにより、上記工程（１）で得られた検体が高濃度の変性剤を含む場合、変性剤の濃度を希釈することができ、ひいては、上記工程（２）のサンドイッチアッセイを良好に行うことができる。

[0032] 上記工程（２）では、サンドイッチアッセイにより、ＣＥＡＣＡＭ１が検出される。サンドイッチアッセイでは、変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体及び標識抗体の双方が使用される。サンドイッチアッセイは、このような抗体を用いる任意の様式で行うことができる。このような様式としては、例えば、化学発光イムノアッセイ（ＣＬＩＡ）〔例、化学発光酵素免疫測定法（ＣＬＥＩＡ）〕、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、放射イムノアッセイ（ＲＩＡ）、蛍光イムノアッセイ（ＦＩＡ）、及びイムノクロマトグラフィー法が挙げられる。

[0033] 捕捉抗体は、固相に固相化されていてもよい。またＣＥＡＣＡＭ１に対する抗体は、反応工程において固相に固相化され得る抗体であってもよい。本明細書において、固相に固

相化された抗体、及び反応工程において固相に固相化され得る抗体を、単に固相化抗体ということがある。捕捉抗体は、目的抗原（本発明の場合、変性ＣＥＡＣＡＭ１）を固相に捕捉するための抗体である。固相としては、例えば、粒子（例、セファロースビーズ、アガロースビーズ、磁性粒子）、支持

体（例、メンブレン）、容器（例、プラスチックプレート等のプレート、チューブ、マイクロ流路）が挙げられる。抗体の固相への固定は、従前公知の方法を利用することができる。例えば、物理的吸着法、共有結合法、親和性物質（例、ビオチン、ストレプトアビジン）を利用する方法、及びイオン結合法により、共有結合的又は非共有結合的に行うことができる。捕捉抗体は、１種の捕捉抗体が１種の固相（例、磁性粒子等の粒子）に固定された抗体であってもよく、２種以上の捕捉抗体が１種の固相（例、磁性粒子等の粒子）に固定された抗体であってもよく、また、２種以上の捕捉抗体がそれぞれ２種以上の固相（例、磁性粒子等の粒子）に固定された抗体であってもよい。

[0034] 標識抗体は、標識物質で標識された抗体である。標識物質としては、例えば、酵素（例、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、βガラクトシダーゼ）、親和性物質（例、ストレプトアビジン、ビオチン）、蛍光物質又は蛍光タンパク質（例、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質）、発光又は吸光物質（例、ルシフェリン、アクリジニウム、ルテニウム）、放射性物質（例、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ）が挙げられる。抗体の標識物質による標識は、共有結合的又は非共有結合的に行うことができる。

[0035] 本発明では、抗体は、目的抗原に対する結合能を有する部分（例、可変領域又はそれに相当する部分）を含むタンパク質である。したがって、捕捉抗体及び標識抗体における抗体としては、例えば、全長抗体（例、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＹ）、及び抗体の抗原結合性断片（例、Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ）、単鎖抗体等の改変抗体が挙げられる。抗体はまた、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体であってもよい。

[0036] 本発明では、捕捉抗体及び標識抗体として、変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する抗体を使用することができる。変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識す

る能力を有する抗体は、変性ＣＥＡＣＡＭ１を特異的に認識する能力を有する抗体であっても、変性ＣＥＡＣＡＭ１を非特異的に認識する能力を有する抗体であってもよい。変性ＣＥＡＣＡＭ１を非特異的に認識する能力を有する抗体としては、例えば、（ｉ）変性ＣＥＡＣＡＭ１のみならず、ネイティブ（すなわち、非変性）ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する抗体、（ｉｉ）変性ＣＥＡＣＡＭ１のみならず、他のＣＥＡＣＡＭ１（例、ＣＥＡＣＡＭ３）を認識する能力を有する抗体、及び（ｉｉｉ）変性ＣＥＡＣＡＭ１のみならず、ネイティブ（すなわち、非変性）ＣＥＡＣＡＭ１及び他のＣＥＡＣＡＭ１（例、ＣＥＡＣＡＭ３）を認識する能力を有する抗体が挙げられる。捕捉抗体及び標識抗体のうち少なくとも１つは、変性ＣＥＡＣＡＭ１を特異的に認識する能力を有する抗体であることが好ましい。

[0037] 本発明では、上述のような捕捉抗体及び標識抗体として、（ａ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＰＡＮＳＧＲＥＴＩＹ（配列番号１）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体、（ｂ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＴＥＳＭＰ（配列番号２）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体、（ｃ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＤＴＴＹＬＷＷＩＮＮ（配列番号３）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体、又は（ｄ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＥＡＴＧＱＦＨＶＹＰ（配列番号４）を使用してもよい。これらのエピトープはいずれも、上述のような変性により特に露出するため、非変性ＣＥＡＣＡＭ１よりも変性ＣＥＡＣＡＭ１に対してよく反応するエピトープである。ＴＥＳＭＰ（配列番号２）のアミノ酸配列により表されるペプチドを用いた試験によれば、上記（ｂ）の抗体は、ＣＥＡＣＡＭ１のみならず、ＣＥＡＣＡＭ３、ＣＥＡＣＡＭ５、及び／又はＣＥＡＣＡＭ６にも交差反応するため、ＣＥＡＣＡＭ１特異的な抗体ではない（実施例及び図３を参照）。しかし、本発明者らは、上記（ｂ）の抗体を補助的に使用してサンドイッチアッセイすることで、ＣＥＡＣＡＭ１の検出感度が向上することを見出した。また、上記（ｂ）の抗体に加えて、ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する他の

抗体を併用することで、ＣＥＡＣＡＭ３、ＣＥＡＣＡＭ５、及び／又はＣＥＡＣＡＭ６の検出を回避できることが確認されている（実施例参照）。

[0038] 特定の実施形態では、捕捉抗体又は標識抗体の一方として、上記（ａ）の抗体、又は上記（ａ）の抗体と上記（ｂ）の抗体との組み合わせを使用し、他方として、上記（ｃ）の抗体、上記（ｄ）の抗体、又は上記（ｃ）の抗体と上記（ｄ）の抗体との組み合わせを使用してもよい。これにより、ＣＥＡＣＡＭ１を特異的かつ高感度に検出することができる。好ましくは、捕捉抗体として、上記（ａ）の抗体、又は上記（ａ）の抗体と上記（ｂ）の抗体との組み合わせを使用し、標識抗体として、上記（ｃ）の抗体、上記（ｄ）の抗体、又は上記（ｃ）の抗体と上記（ｄ）の抗体との組み合わせを使用してもよい。

[0039] 上記（ａ）の抗体と上記（ｂ）の抗体を組み合わせる場合の（ａ）：（ｂ）の重量比は、例えば、１：９～９：１、好ましくは２：８～８：２、より好ましくは３：７～７：３、さらに好ましくは４：６～６：４、最も好ましくは４．５：５．５～５．５：４．５であり得る。

[0040] 上記のようなエピトープを認識する能力を有する抗体は、ＣＥＡＣＡＭ１又はその部分タンパク質を抗原として利用することにより作製することができる。実際、上記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）の抗体を産生するハイブリドーマは、それぞれ、２／５００（０．４％）、４／５００（０．８％）、１／８００（０．１％）、及び１／１２０（０．８％）の確率で作製することに成功している。また、上記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）の抗体が認識するエピトープからなるペプチド、又はそれに富むポリペプチド（上記エピトープを複数含むポリペプチド）を抗原として利用することで（例、アルブミン等のキャリアタンパク質への融合）、上記エピトープを認識する能力を有する抗体を産生するハイブリドーマを効率良く作製することができる。あるいは、上記エピトープを認識する能力を有する抗体は、上記エピトープを用いて、抗体ライブラリーから選択することにより効率良く得ることができる。

[0041] 本発明はまた、がんを検出する方法であって、

（１）上述したＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法により、被験体から採取された検体中のＣＥＡＣＡＭ１量を測定する工程、及び

（２）測定されたＣＥＡＣＡＭ１量を基準値と比較する工程、

を含む、方法を提供する。

[0042] がんを検出する方法における上記（１）の工程は、上述したＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法と同様にして行うことができる。検体が採取される被験体としては、上述の動物と同様であり、哺乳動物が好ましく、ヒトがより好ましい。検体は、上述の動物由来液体検体(例、体液検体）と同様である。

[0043] がんを検出する方法における上記（２）の工程は、測定されたＣＥＡＣＡＭ１量が基準値と比較される。測定されたＣＥＡＣＡＭ１量が基準値よりも高い場合、被験体はがんに罹患している可能性がある指標として利用することができる。分泌型ＣＥＡＣＡＭ１等のＣＥＡＣＡＭ１は、メラノーマ、膵臓がん、尿路上皮膀胱がん、肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、前立腺癌、膀胱癌、黒色腫等の種々のがんのマーカーとして使用できることが知られている。したがって、本発明のがんの検出方法は、このような種々のがん（例えば、実施例で示されている大腸がん、肝臓がん、及び膵臓がん、並びにこれらの２種以上の組み

合わせを参照）の検出に有用である。

[0044] 本発明はさらに、がんの治療方法であって、

（１）上述したＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法により、被験体から採取された検体中のＣＥＡＣＡＭ１量を測定する工程、

（２）測定されたＣＥＡＣＡＭ１量を基準値と比較する工程、

（３）基準値よりも高いＣＥＡＣＡＭ１量が測定された被験体を選択する工程、及び

（４）選択された被験体に抗がん剤を投与すること

を含む、方法を提供する。

[0045] がんの治療方法における上記（１）及び（２）の工程は、がんを検出する

方法における上記（１）及び（２）の工程と同様にして行うことができる。

[0046] がんの治療方法における上記（３）の工程は、上記（２）の比較結果に基づき、基準値よりも高いＣＥＡＣＡＭ１量が測定された被験体を選択することにより行うことができる。

[0047] がんの治療方法における上記（４）の工程は、選択された被験体に抗がん剤が投与される。投与される抗がん剤は、がんの種類に応じて適宜決定することができる。また、放射線療法等の他の治療方法が併用されてもよい。

[0048] 本発明はさらに、ＣＥＡＣＡＭ１検出用キットであって、

（１）変性剤、

（２）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体、及び

（３）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する標識抗体、

を含む、キットを提供する。

[0049] 変性剤、変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体、及び変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する標識抗体は、上述したものと同様である。変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体、及び変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する標識抗体は、これらの抗体を使用するサンドイッチアッセイ用試薬の形態で提供されてもよい。本発明のキットは、例えば、本発明の方法の簡便かつ迅速な実施に有用である。

実施例

[0050] 以下の実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、後述する実施例における成分に付記された％は、重量％を意味する。

[0051] 実施例１：免疫抗原とスクリーニング用抗原の発現及び精製

（Ａ）抗原発現プラスミドの構築

免疫用抗原としてＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄとＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄ、スクリーニング用抗原としてＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ、ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１を調製するために抗原発現プラスミドの構築を行った。

ヒトＣＥＡＣＡＭ１に相当するｃＤＮＡを鋳型とし、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ発現プラスミドの構築では２つのプライマー　５‘－ＧＡＣＴＣＧＴＡＣＧＣＡＧＣＴＣＡＣＴＡＣＴＧＡＡＴＣＣＡＴＧ－３’（配列番号１６），５’－ＧＡＣＴＧＴＣＧＡＣＴＴＡＣＧＧＧＴＡＴＡＣＡＴＧＧＡＡＣＴＧＴＣＣ－３’（配列番号１７）、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄ発現プラスミドの構築では２つのプライマー（５’－ＧＡＣＴＣＧＴＡＣＧＣＡＧＣＴＣＡＣＴＡＣＴＧＡＡＴＣＣＡＴＧ－３’　（配列番号１８），５’－ＧＡＣＴＣＴＣＧＡＧＣＣＣＧＧＧＴＡＴＡＣＡＴＧＧＡＡＣＴＧＴＣＣ－３’（配列番号１９）、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１発現プラスミドの構築では２つのプライマー（５’－ＧＡＣＴＣＧＴＡＣＧＣＣＣＡＡＧＣＣＣＴＣＣＡＴＣＴＣＣＡＧＣ－３’　（配列番号２０），５’－ＧＡＣＴＧＴＣＧＡＣＴＴＡＡＴＴＣＡＡＧＧＴＧＡＣＴＧＧＧＴＣＡＣＴ－３’　（配列番号２１）、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄ発現プラスミドの構築では２つのプライマー　５’－ＧＡＣＴＣＧＴＡＣＧＣＣＣＡＡＧＣＣＣＴＣＣＡＴＣＴＣＣＡＧＣ－３’（配列番号２２），５’－ＧＡＣＴＣＴＣＧＡＧＣＣＡＴＴＣＡＡＧＧＴＧＡＣＴＧＧＧＴＣＡＣＴ－３’

（配列番号２３）を用いＰＣＲを行なった。ＰＣＲはＫＡＰＡ　ＴａｑＥＸｔｒａ（日本ジェネティクス社）のキットを用いＤＮＡ変性９５℃　１５秒、アニーリング５５℃

１５秒、ＤＮＡ合成７２℃　４５秒を２５サイクルの条件で行い、得られたＤＮＡ断片を１．２％アガロースゲル電気泳動により分離し、Ｆｒｅｅｚｅ　‘Ｎ　Ｓｑｕｅｅｚｅ™　ＤＮＡ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｓｐｉｎ　Ｃｏｌｕｍｎｓ（ＢＩＯ－ＲＡＤ社）で精製した。この増幅されたＣＥＡＣＡＭ１遺伝子断片０．５μｇを制限酵素反応液２０μｌ〔１００ｍＭ　ＮａＣｌ，５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１０ｍＭ　$MgCl_2$，１ｍＭ　ＤＴＴ，ｐＨ７．９〕にＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ又はＴｒ

ｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１の構築では１０単位のＢｓｉＷＩ及び１０単位のＳａｌＩ、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄ又はｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄの構築では１０単位のＢｓｉＷＩ及び１０単位のＸｈｏＩを加えた溶液中で、３７℃１時間消化し、その後１．２％アガロースゲル電気泳動を行い、ＣＥＡＣＡＭ１遺伝子のＢｓｉＷＩ－ＳａｌＩ断片又はＢｓｉＷＩ－ＸｈｏＩ断片を上述のＰＣＲ産物と同様の方法で精製した。

[0052] 次に、発現ベクターであるｐＡＴ－ｔｒｐＥ－Ｈｉｓ又はｐＡＴ－ｔｒｐＥ－Ｈｉｓ－ｍ３Ｃ３ｄのＤＮＡ １μｇを制限酵素反応液２０μｌ〔１００ｍＭ ＮａＣｌ，５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１０ｍＭ $MgCl_2$，１ｍＭ ＤＴＴ，ｐＨ７．９〕にｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ又はｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１の構築では１０単位のＢｓｉＷＩ及び１０単位のＳａｌＩ、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄ又はｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄの構築では１０単位のＢｓｉＷＩ及び１０単位のＸｈｏＩを加えた溶液中で、３７℃１時間消化し、その後１．２％アガロースゲル電気泳動を行い、ＢｓｉＷＩ－ＳａｌＩ又はＢｓｉＷＩ－ＸｈｏＩ処理ベクターをＦｒｅｅｚｅ ‘Ｎ Ｓｑｕｅｅｚｅ™ ＤＮＡ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎｓ（ＢＩＯ－ＲＡＤ社）で精製した。

[0053] 得られたＢｓｉＷＩ－ＳａｌＩ又はＢｓｉＷＩ－ＸｈｏＩ処理ベクターＤＮＡと上述の制限酵素処理したＣＥＡＣＡＭ１断片を同重量となるように混合したＤＮＡ溶液に等量のＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＜Ｍｉｇｈｔｙ Ｍｉｘ＞（タカラバイオ社）を添加し１６℃で３０分保温し、連結反応を行なった。発現プラスミドを得るために、この連結反応液を用いて大腸菌ＸＬ１－ｂｌｕｅ ＭＲＦ （Ｓｔｒａｔａｇｅｎ社）を形質転換した。

[0054] 形質転換に用いる感受性大腸菌株はＭｉｘ ＆ Ｇｏ Ｅ．ｃｏｌｉ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＆ Ｂｕｆｆｅｒ Ｓｅｔにより作

られる。形質転換大腸菌を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢプレート（１％トリプトン、０．５％ＮａＣｌ，１．５％寒天）上に塗布し、３７℃に一晩保温した。プレート上に生じた菌のコロニーを滅菌爪楊枝で取り、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む２ＹＴ培地に移し、一晩３７℃で培養した。

[0055] １．５ｍｌの菌培養液を遠心して集菌し、プラスミドＤＮＡのミニプレパレーションを

Ｗｉｚａｒｄ(R) Ｐｌｕｓ ＳＶ Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ ＤＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ （Ｐｒｏｍｅｇａ社）を用いて行なった。得られたプラスミドＤＮＡ １μｇを制限酵素反応液２０μｌ〔１００ｍＭ ＮａＣｌ，５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１０ｍＭ $MgCl_2$，１ｍＭ ＤＴＴ，ｐＨ７．９〕にＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ又はＡ１の構築では１０単位のＢｓｉＷＩ及び１０単位のＳａｌＩ、ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄ又はＡ１－ｍ３Ｃ３ｄの構築では１０単位のＢｓｉＷＩ及び１０単位のＸｈｏＩを加えた溶液中で、３７℃１時間消化し、その後１．２％アガロースゲル電気泳動を行い、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ又はｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄでは約４５０ｂｐ、ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１又はｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄでは約４００ｂｐの断片が生じる発現プラスミドを選別した。

[0056] （Ｂ）抗原の発現及び精製

ｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ又はｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄとｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１又はｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄで形質転換された大腸菌を１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬＢ培地で３７℃一夜培養した。これを１％濃度で１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＭ９－ＣＡに接種し３７℃一夜培養した。培養終了後、遠心により菌体を集め、５０ｍｌのＬｙｓｉｓ液［５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ

（ｐＨ８．５），３０ｍＭ　ＮａＣｌ，５ｍＭ　ＥＤＴＡ］に再懸濁し、１ｍｌのリゾチーム液（１０ｍｇ／ｍｌ　Ｌｙｓｏｚｙｍｅ）を加え、３７℃において１時間処理した。この懸濁液を超音波処理（１５０Ｗ、９０秒で２回）により細胞を破壊した。１５，０００ｒｐｍで、４℃において３０分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を５０ｍｌのＮＰ４０を１％含むＡ溶液［５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）］に再懸濁した。懸濁液を１５，０００ｒｐｍで、４℃において３０分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を５０ｍｌの２Ｍ尿素を含むＡ溶液に再懸濁した。懸濁液を１５０００ｒｐｍで、４℃において３０分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を５０ｍｌの６　Ｍ

尿素を含むＡ溶液に再懸濁した。懸濁液を１５，０００ｒｐｍで、４℃において３０分間遠心し可溶性分画を回収した。

[0057]　６Ｍ尿素を含む溶液で可溶化した抗原溶液から、Ｓセファーロースｈｐカラム（ＧＥヘルスケア社）を用いたイオン交換法とＨｉｓＴｒａｐ　ＨＰカラム（ＧＥヘルスケア社）を用いたＩＭＡＣ法により抗原タンパク質ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ、ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄ、ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１、ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄを精製した。

[0058] 実施例２：抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体の取得

（Ａ）免疫

前記方法により調製した抗原タンパク質ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄ又はＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄを６Ｍ尿素溶解後、０．１５Ｍ　ＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）（ＰＢＳ）に終濃度が１．０ｍｇ／ｍｌとなるように希釈し、等量のフロイントアジュバントと混和し、４～６週令のＢＡＬＢ／ｃマウスに５０－１００μｇ皮下投与した。２週間ごとに同様の追加免疫を行い、さらにＰＢＳに溶解した抗原タンパク質１００μｇを最終免疫として腹腔内に投与した。

[0059] （Ｂ）細胞融合

最終免疫後３日目にこのマウスより脾臓を無菌的に摘出し、ピンセット及びセルストレーナーを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、ＲＰＭＩ１６４０培地（血清無添加）に懸濁
させた。遠心分離（１０００ｒｐｍ，５ｍｉｎ，室温）により沈殿させた細胞を１ｍｌのＲｅｄ　Ｂｌｏｏｄ　Ｃｅｌｌ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＭＥＲＣＫ社）を用いてピペッティングし、室温で１分間静置した。この細胞に２０ｍＬのＲＰＭＩ１６４０培地（血清無添加）を添加し、良く懸濁した。遠心分離（１０００ｒｐｍ，５ｍｉｎ，室温）により沈殿させた細胞をＲＰＭＩ１６４０培地（血清無添加）で懸濁した。対数増殖期のミエローマ細胞（マウス骨髄腫細胞株Ｓｐ２／０　Ａｇ１４）を培養フラスコから回収し、遠心分離（１０００ｒｐｍ，５ｍｉｎ，室温）により沈殿させＲＰＭＩ１６４０培地（血清無添加）で懸濁した。ミエローマ細胞と脾臓細胞を１：１の細胞数比で混合し、合計細胞数が３．４ｘ１０^{7}となるように分注した。この細胞混合液を遠心分離（１０００ｒｐｍ，５ｍｉｎ，室温）後、上清を除去し、ＥＣＦバッファー（０．３Ｍマンニトール，０．１ｍＭ塩化カルシウム，０．１ｍＭ塩化マグネシウム溶液）で２回洗浄した。最終的に０．３５ｍｌのＥＣＦバッファーで懸濁した混合細胞液を細胞融合装置ＥＣＦＧ２１（ネッパジーン社）とＭＳスタンド型チャンバー白金電極ＣＵＹ４９７Ｐ２（０．８ｍＬ）を用いて、液量０．３５ｍｌ，交流電圧４０Ｖｒｍｓ，交流時間１０ｓｅｃ，ＤＣ電圧３５０Ｖ，パルス幅３０μｓｅｃ，パルス間隔０．５ｓｅｃ，パルス回数３回，減衰率１０％，極性切り替え＋（切替無），ポストフュージョン７ｓｅｃ，減衰正弦波ＯＮの条件で細胞融合させた。融合後直ちに血清を含むＲＰＭＩ１６４０培地へ懸濁し１０分間静置することで細胞膜を回復させた。その後、１０％ウシ胎児血清及びヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン（ＨＡＴ）を含むＲＰＭＩ－１６４０培地に懸濁し、９６ウェル細胞培養プレートに播種した。約１０日間培養してハイブリドーマのみを増殖させた後、培養上清を回収し後述のスクリーニング

に用いた。

[0060] （Ｃ）抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

目的の抗体を産生するハイブリドーマを上述の抗原タンパク質ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－ＮとＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１を用いたＥＬＩＳＡ法により検索した。リニアエピトープを認識する抗体を選択するために、１ｍＭ　ＴＣＥＰと６Ｍ尿素を含むＴＢＳで各種抗原を１μｇ／ｍＬとなるように希釈した。希釈した抗原をヌンク社のマルチモジュールプレートにウェルあたり５０μＬ添加し、４－８℃に一夜静置した。抗原希釈液を除いた後、ウェルあたり１００μＬのブロッキング液（０．１％カゼイン、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）を加え、室温に１時間静置し抗原をプレートに固定した。

[0061] 各ウェルに反応液（０．１％カゼイン、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）で希釈した培養上清を５０μＬ加え、室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、５０μＬのホースラディッシュパーオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識された抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異的抗体を加え、室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、ＴＭＢ溶液を各ウェルに５０μＬ添加して、発色誘導させた。その後、２Ｍ　H_2SO_4を各ウェルに添加し反応を停止させ、吸光度を４５０ｎｍの波長で測定した。

[0062] ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－ＮとＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１の両者に反応したハイブリドーマの培養上清はＴｒｐＥ－Ｈｉｓ配列又は大腸菌由来の夾雑タンパク質を認識していると考えられるため除外し、所望の反応特異性を有する抗体産生ハイブリドーマを得た。

[0063] 抗原タンパク質ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－ｍ３Ｃ３ｄを免疫したマウス脾臓から得られたハイブリドーマをＡ３０２９，Ａ３０４８，Ａ３０５４，Ａ３０５７，Ａ３０６７，Ａ３０７３，Ａ６０５６、抗原タンパク質ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ａ１－ｍ３Ｃ３ｄを免疫したマウス脾臓から得られたハイブリドーマをＡ７００４と命名した。

[0064] 得られたハイブリドーマが産生する抗体のエピトープについては実施例３に示すが、同一エピトープの抗体を産生するハイブリドーマＡ３０５４とＡ３０６７はハイブリドーマ陽性５００ウェルの中から得られた２クローン、同一エピトープの抗体を産生するハイブリドーマＡ３０２９、Ａ３０４８、Ａ３０５７、Ａ３０７３はハイブリドーマ陽性５００ウェルの中から得られた４クローン、Ａ７００４はハイブリドーマ陽性８００ウェルの中から得られた１クローン、Ａ６０５６はハイブリドーマ陽性１２０ウェルの中から得られた１クローンである。

[0065] （Ｄ）ハイブリドーマのクローニング

得られたハイブリドーマについて、限界希釈法により単一クローン化を行い、抗体産生ハイブリドーマを樹立した。

[0066] （Ｅ）抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体の調製

樹立したマウスハイブリドーマを、無血清培地（Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ、ＧＩＢＣＯ）で馴化培養した。Ｔ７５フラスコ５０ｍＬまで拡大培養し、細胞密度がおよそ５Ｅ５ｃｅｌｌｓ／ｍｌとなったときに５００ｍＬの無血清培地で満たした培養バッグ（ニプロ社）へ移植した。２－４週間培養し、培養上清を回収した。プロテインＧセファロース（ＧＥヘルスケア社）を充填したカラムに培養液をアプライし、結合した抗体をｐＨ３の緩衝液で溶出した。２Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８）を用いて溶出液を速やかに中和し、脱塩カラムを用いてＰＢＳへバッファー交換した。培養液５００ｍＬから５－２０ｍｇの抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体を取得することができた。

[0067] 実施例３：抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体のエピトープ解析

得られた抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体のエピトープを解析するために、ＣＥＡＣＡＭ１のＮドメインタンパク質又はＡ１ドメインタンパク質をＣ末端から１０又は２０アミノ酸ずつ削った欠失タンパク質とＮドメインタンパク質についてはＮ末端から３アミノ酸ずつ削った欠失タンパク質を大腸菌に発現させ、その大腸菌破砕液を用いたドットブロット法により解析した。

[0068] （Ａ）欠失タンパク質発現プラスミドの構築

欠失タンパク質発現プラスミドの構築はＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて行った。鋳型として、Ｎドメイン欠失タンパク質発現プラスミドの構築にはｐＡＴ－ＧＳＴ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ（Ｎｆｕｌｌ）を用い、Ａ１ドメイン欠失タンパク質発現プラスミドの構築にはｐＡＴ－ＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－ＣＥＡＣＡＭ１－Ｎ－Ａ１（Ａ１ｆｕｌｌ）を用いた。使用するプライマーは欠失させたい各領域の外側に設定した。各種欠失タンパク質に対応するアミノ酸配列を表１に示す。メーカーの使用説明書に従い、インバースＰＣＲ、ＤｐｎＩによる鋳型プラスミドの分解、ＰＣＲ産物のリン酸化と自己環状化を順に行った。この自己環状化されたＰＣＲ産物を用いて大腸菌ＸＬ１－ｂｌｕｅ　ＭＲＦ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎ社）を形質転換した。形質転換大腸菌を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢプレート（１％トリプトン、０．５％ＮａＣｌ，１．５％寒天）上に塗布し、３７℃に一晩保温した。プレート上に生じた菌のコロニーを滅菌爪楊枝で取り、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む２ＹＴ培地に移し、一晩３７℃で培養した。これを１％濃度で１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＭ９－ＣＡに接種し３７℃一夜培養した。培養終了後、遠心により菌体を集め、１ｘＳＤＳ－ＰＡＧＥサンプルバッファー（６２．５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１０％Ｇｌｙｃｅｒｏｌ、２％ＳＤＳ、２０ｍＭ　ＤＴＴ）で可溶化し、各欠失タンパク質の大腸菌破砕液を調製した。大腸菌破砕液のＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、クマシーブリリアントブルー染色と抗ヒスタグ抗体を用いたイムノブロットにより目的タンパク質の発現を確認した。

[0069]

[表1]

表１．各種欠失タンパク質に対応するアミノ酸配列

発現タンパク質名	アミノ酸配列
Nfull	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYP（配列番号２４）
N-98	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNE（配列番号２５）
N-88	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTL（配列番号２６）
N-68	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIY（配列番号２７）
N-58	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPG（配列番号２８）
N-48	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGY（配列番号２９）
N-28	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQL（配列番号３０）
N-18	QLTTESMPFNVAEGKEVL（配列番号３１）
N-8	QLTTESMP（配列番号３２）
N4-18	TESMPFNVAEGKEVL（配列番号３３）
N7-18	MPFNVAEGKEVL（配列番号３４）
N10-18	NVAEGKEVL（配列番号３５）
A1full	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLN（配列番号３６）
A1-68	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGP（配列番号３７）
A1-48	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQ（配列番号３８）
A1-38	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINN（配列番号３９）
A1-28	PKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQ（配列番号４０）

Ｎドメイン欠失タンパク質のＮ末端にはＧＳＴ－Ｈｉｓ、Ａ１ドメイン欠失タンパク質のＮ末端にはＴｒｐＥ－Ｈｉｓ－Ｎが付加されている。

[0070] （Ｂ）ドットブロット法

上述の各種大腸菌ライセートをニトロセルロース膜に１μＬずつドットし風乾させ、転写バッファー（２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ，１９２ｍＭ　Ｇｌｙｃｉｎｅ，２０％　ＭｅｔＯＨ）に室温で１０分間漬け込んだ後、反応液（０．１％カゼインナトリウム，１ｍＭ　ＥＤＴＡ，ＰＢＳ）を用いてブロッキングを行った。反応液で１μｇ／ｍＬとなるように希釈した各抗体を上記のドットしたニトロセルロース膜（ドット膜）に反応させ、室温で１時間静置した。洗浄液（０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０，ＰＢＳ）を用いてドット膜を洗

浄し、反応液で希釈したホースラディッシュパーオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識抗マウスＩｇＧ

Ｆｃ特異的抗体を反応させ、室温で１時間静置した。洗浄液を用いてドット膜を洗浄し、発光基質ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ（Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を反応させ、室温５分間静置した後、ＣＣＤイメージャーで化学発光を検出した。

[0071]（Ｃ）結果

ドットブロットによるエピトープ解析の結果、Ａ３０５４，Ａ３０６７抗体は、ＮドメインのＴＥＳＭＰ（配列番号２）のアミノ酸配列がエピトープであることが示された。Ａ３０２９，Ａ３０４８，Ａ３０５７，Ａ３０７３抗体は、ＮドメインのＰＡＮＳＧＲＥＴＩＹ（配列番号１）のアミノ酸配列がエピトープであることが示された。Ａ６０５６抗体は、ＮドメインのＥＡＴＧＱＦＨＶＹＰ（配列番号４）のアミノ酸配列がエピトープであることが示された。Ａ７００４抗体は、Ａ１ドメインのＤＴＴＹＬＷＷＩＮＮ（配列番号３）のアミノ酸配列がエピトープであることが示された。

[0072]実施例４：リコンビナント抗原を用いた交差反応性評価

市販のリコンビナント抗原ＣＥＡＣＡＭ１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＣＥＡＣＡＭ３（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＣＥＡＣＡＭ５（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＣＥＡＣＡＭ６（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いて、取得した抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体（エピトープが同じ抗体については一種類を選択）の交差反応性を評価した。

[0073]（Ａ）抗原固相ＥＬＩＳＡ

各種抗原を１μｇ／ｍＬとなるように１ｍＭ　ＴＣＥＰと６Ｍ尿素を含むＴＢＳで希釈した。希釈した抗原をヌンク社のマルチモジュールプレートにウェルあたり５０μＬ添加し、室温で一夜静置した。抗原希釈液を除きＰＢＳで洗浄した後、ウェルあたり１００μＬのブロッキング液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）を加え室温に１時間静置した。

[0074] ブロッキング液を除去し、各ウェルに反応液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）で希釈した各種抗体を５０μＬ加え室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、５０μＬのホースラディッシュパーオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識された抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異的抗体を加え室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、ＴＭＢ溶液を各ウェルに５０　μＬ添加して、発色誘導させた。その後、２Ｍ　H_2SO_4を各ウェルに添加し反応を停止させ、吸光度を４５０ｎｍの波長で測定した。

[0075] （Ｂ）結果

ＣＥＡＣＡＭ１抗体の交差反応性評価の結果を図２に示す。ＣＥＡＣＡＭ３、ＣＥＡＣＡＭ５とＣＥＡＣＡＭ６に対する反応性はＣＥＡＣＡＭ１に対する相対値で示した（相対結合率（％））。Ａ３０５４抗体はＣＥＡＣＡＭ５に対して１８％程度の交差反応性を示したがＣＥＡＣＡＭ３、ＣＥＡＣＡＭ６には５％未満の交差反応性であった。Ａ３０７３抗体はＣＥＡＣＡＭ３、ＣＥＡＣＡＭ５とＣＥＡＣＡＭ６のどちらに対しても交差反応性を示さず、最もＣＥＡＣＡＭ１特異性が高い。Ａ６０５６抗体はＣＥＡＣＡＭ５には交差反応性を示さなかったが、ＣＥＡＣＡＭ６に対して５０％程度、ＣＥＡＣＡＭ３に対して２５０％の交差反応性を示した。Ａ７００４抗体はＣＥＡＣＡＭ３、ＣＥＡＣＡＭ６に対して５％程度、ＣＥＡＣＡＭ５に対して１５０％の交差反応性を示した。

[0076] 実施例５：ＣＥＡＣＡＭファミリーとの配列比較

各抗体のエピトープとＣＥＡＣＡＭファミリーのアミノ酸配列アラインメント（図３）を比較すると、Ａ３０５４抗体とＡ３０７３抗体は、ＣＥＡＣＡＭ１固有のアミノ酸（それぞれＴＥＳＭＰ（配列番号２）におけるスレオニン残基（Ｔ）、及びＰＡＮＳＧＲＥＴＩＹ（配列番号１）におけるアスパラギン残基（Ｎ））を含む配列を認識していることが分かる（図３に黒枠で示す）。交差反応性の評価結果から、この二つの抗体はＣＥＡＣＡＭ５とＣ

ＥＡＣＡＭ６に対する交差反応性は低いため、これらのＣＥＡＣＡＭ１固有のアミノ酸がエピトープのホットスポットであると考えられる。Ａ６０５６抗体は、交差反応

性の評価結果ではＣＥＡＣＡＭ６に中程度の交差反応を示し、ＣＥＡＣＡＭ５に交差反応しなかったことから、ＥＡＴＧＱＦＨＶＹＰ（配列番号４）におけるヒスチジン残基（Ｈ）がエピトープのホットスポットであると考えられる（図３に黒枠で示す）。この配列はＣＥＡＣＡＭ３とＣＥＡＣＡＭ４にも存在するため、Ａ６０５６抗体はこれらと交差反応する可能性がある。Ａ７００４抗体は交差反応性の評価結果ではＣＥＡＣＡＭ５に強く交差反応しＣＥＡＣＡＭ６には反応しなかったことからＤＴＴＹＬＷＷＩＮＮ（配列番号３）におけるアスパラギン酸残基（Ｄ）がエピトープのホットスポットであると考えられる（図３に黒枠で示す）。この配列はＣＥＡＣＡＭ１とＣＥＡＣＡＭ５だけが持つため他のＣＥＡＣＡＭファミリーとは交差反応しないと考えられる。

[0077] 実施例６：ペプチドを用いた交差反応性評価

ＣＥＡＣＡＭ１特異的配列を認識すると考えられるＡ３０５４，Ａ３０６７抗体とＡ３０２９，Ａ３０４８，Ａ３０６７，Ａ３０７３抗体について、合成ペプチドを用いた交差反応性評価を行なった。

[0078] （Ａ）ペプチド固相ＥＬＩＳＡ

各種合成ペプチドを２０μｇ／ｍＬとなるように１ｍＭ　ＴＣＥＰと６Ｍ尿素を含むＴＢＳで希釈した。希釈した抗原をヌンク社のマルチモジュールプレートにウェルあたり５０μＬ添加し、室温で一夜静置した。抗原希釈液を除きＰＢＳで洗浄した後、ウェルあたり１００μＬのブロッキング液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）を加え室温に１時間静置した。

[0079] ブロッキング液を除去し、各ウェルに反応液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）で希釈した各種抗体を５０μＬ加え室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ

２０を含むＰＢＳで洗浄した後、５０μＬのホースラディッシュパーオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識された抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異的抗体を加え室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、ＴＭＢ溶液を各ウェルに５０μＬ添加して、発色誘導させた。その後、の２Ｍ　H_2SO_4を各ウェルに添加し反応を停止させ、吸光度を４５０ｎｍの波長で測定した。

[0080]（Ｂ）結果

表２、３に各抗体の交差反応性をＣＥＡＣＡＭ１の配列に対する比（％）で示した。Ａ３０５４，Ａ３０６７抗体はＣＥＡＣＡＭ３，ＣＥＡＣＡＭ５，ＣＥＡＣＡＭ６に対して交差反応性を示した。Ａ３０７３，Ａ３０２９，Ａ３０４８，Ａ３０５７はどのＣＥＡＣＡＭファミリーの配列に対しても交差反応性を示さず、高いＣＥＡＣＡＭ１特異性が示された。

[0081] [表2]

表２．Ａ３０５４及びＡ３０６７抗体の交差反応性

ペプチド名	アミノ酸配列	A3054	A3067
CEACAM1	QLTTESMPFN（配列番号４１）	100%	100%
CEACAM3	KLTIESMPLS（配列番号４２）	79%	81%
CEACAM4	QFTIEALPSS（配列番号４３）	0%	0%
CEACAM5,6	KLTIESTPFN（配列番号４４）	97%	103%
CEACAM7	QTNIDVVPFN（配列番号４５）	0%	0%
CEACAM8	QLTIEAVPSN（配列番号４６）	0%	0%

% CEACAM1

[0082]

[表3]

表３．Ａ３０２９，Ａ３０４８，Ａ３０５７及びＡ３０７３抗体の交差反応性

ペプチド名	アミノ酸配列	A3029	A3048	A3057	A3073
CEACAM1	QATPGPANSGRETIY（配列番号４７）	100%	100%	100%	100%
CEACAM3	QATPGAAYSGRETIY（配列番号４８）	0%	0%	0%	0%
CEACAM4	ANIPGAAYSGRETVY（配列番号４９）	0%	0%	0%	0%
CEACAM5	QATPGPAYSGREIIY（配列番号５０）	0%	0%	1%	0%
CEACAM6	QATPGPAYSGRETIY（配列番号５１）	0%	0%	0%	0%
CEACAM7	ENAPGPAHNGRETIY（配列番号５２）	0%	0%	0%	0%
CEACAM8	QITPGPAYSNRETIY（配列番号５３）	0%	0%	0%	0%

% CEACAM1

[0083] 実施例７：ＣＥＡＣＡＭ１サンドイッチ測定系の構築

（Ａ）ビオチン標識抗体の調製

脱塩カラムを用いて抗体溶液のバッファーをＰＢＳに置換し、抗体濃度を０．５ｍｇ／ｍＬに調製した。この抗体溶液にＳｕｌｆｏ－ＮＨＳ－ＬＣ－Ｂｉｏｔｉｎ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）を約７０μＭとなるように添加し室温で９０分間反応させた。ここに１／２０容量の１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７）を添加し反応を停止させ、ビオチン標識体とした。

[0084] （Ｂ）サンドイッチＥＬＩＳＡ抗体組み合わせ

各種抗体を５又は１０μｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳで希釈した。希釈した抗体をヌンク社のマルチモジュールプレートにウェルあたり５０μＬ添加し、４－８℃に一夜静置した。抗体希釈液を除きＰＢＳで洗浄した後、ウェルあたり１００μＬのブロッキング液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）を加え室温に１時間静置し抗体固相プレートを調製した。市販のＣＥＡＣＡＭ１抗原（Ｒ＆Ｄ

Ｓｙｓｔｅｍｓ社）をルミパルス（登録商標）検体希釈液（富士レビオ社）で１又は０

μｇ／ｍＬとなるように希釈した検体５０　μＬを５０　μＬの変性処理

液（１０％　ＳＤＳ、３．７５％　ＥＤＴＡ２Ｎａ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ）と混和し、１０００ｒｐｍの振とう、８０℃で１０分間加熱し変性処理検体を調製した。変性処理検体２０μＬを１００μＬの反応液（１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ　３Ｎａ、０．１％　ＰｒｏＣｌｉｎ　３００、２％　ＢＳＡ、ｐＨ７．５）と混合し、そのうちの５０μＬを上記のブロッキング液を除去した抗体固相プレートのウェルに添加し室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、標識体希釈液（５０ｍＭ　ＭＥＳ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．３ｍＭ　$ZnCl_2$、１ｍＭ　$MgCl_2$、２％　ＢＳＡ、０．１０％　NaN_3、ｐＨ６．８）で１μｇ／ｍＬとなるように希釈したビオチン標識抗体をウェルに添加し室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、標識体希釈液で希釈したアルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）標識ストレプトアビジンをウェルに添加し室温に３０分間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、ルミパルス基質液（富士レビオ社）を添加し酵素反応による化学発光量を測定した。

[0085]　サンドイッチＥＬＩＳＡの固相抗体と標識抗体組み合わせ検討の結果を表４に示す。Δ０カウント値はＣＥＡＣＡＭ１抗原１μｇ／ｍＬの測定値から０μｇ／ｍＬの測定値を引いた差である。ＣＥＡＣＡＭ１特異性が最も高いＡ３０７３抗体を固相に用い、Ａ７００４抗体又はＡ６０５６抗体を標識体として用いたときに高い反応性が示された。

[0086]

[表4]

表４．サンドイッチＥＬＩＳＡの固相抗体と標識抗体組み合わせ

⊿0カウント値		固相抗体			
		A3054	A3073	A7004	A6056
ビオチン標識抗体	A3054		78170	1010	560
	A3073	72890		26140	9550
	A7004	3870	145160		2550
	A6056	14520	161880	4320	

[0087] （Ｃ）固相抗体組み合わせ

固相抗体としてＡ３０５４抗体（又はＡ３０６７抗体）とＡ３０７３抗体（又はＡ３０２９、Ａ３０４８、Ａ３０５７）を組み合わせたときの効果を検討した。測定方法は上述「（Ｂ）サンドイッチＥＬＩＳＡ抗体組み合わせ」に従った。固相条件はＰＢＳを用いて、単独固相では５又は１０μｇ／ｍＬとなるように希釈し、共固相ではそれぞれが５μｇ／ｍＬとなるように混合した。市販のＣＥＡＣＡＭ１抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）をルミパルス検体希釈液（富士レビオ社）で１または０μｇ／ｍＬとなるように希釈した検体を測定した。

[0088] 固相抗体組み合わせの結果を表５に示す。Δ０カウント値はＣＥＡＣＡＭ１抗原１μｇ／ｍＬそれぞれの測定値から０μｇ／ｍＬの測定値を引いた差である。Ａ３０５４抗体（又はＡ３０６７抗体）とＡ３０７３抗体（又はＡ３０２９、Ａ３０４８、Ａ３０５７）それぞれの単独固相よりも共固相は高い反応性を示した。この値は単独固相それぞれの和よりも大いため、ＣＥＡＣＡＭ１結合力に相乗効果が表われたと考えられる。

[0089]

[表5]

表５．固相抗体の組み合わせ

固相抗体		固相濃度（μg/mL）	⊿0カウント値	
			A6056	A7004
A3054		5	380	670
		10	540	1760
A3067		5	270	2860
		10	270	4920
A3029		5	14695	46630
		10	19800	55705
A3048		5	18735	61915
		10	23710	78160
A3057		5	10710	42610
		10	14950	53110
A3073		5	11530	49640
		10	12990	57395
A3054 +	A3029	5+5	66713	173820
	A3048	5+5	55453	167410
	A3057	5+5	57167	168395
	A3073	5+5	34545	145560
A3067 +	A3029	5+5	42240	146645
	A3048	5+5	35333	143515
	A3057	5+5	36300	143410
	A3073	5+5	22005	121520

[0090] （Ｄ）サンドイッチ測定系での交差反応性評価

固相抗体としてＡ３０５４抗体（又はＡ３０６７抗体）とＡ３０７３抗体（又はＡ３０２９、Ａ３０４８、Ａ３０５７）を組み合わせたときの交差反応性を確認した。測定方法は上述「（Ｂ）サンドイッチＥＬＩＳＡ抗体組み合わせ」に従った。固相条件はＰＢＳを用いて、Ａ３０５４抗体（又はＡ３０６７抗体）とＡ３０７３抗体（又はＡ３０２９、Ａ３０４８、Ａ３０５７）それぞれが５μｇ／ｍＬとなるように混合した。市販のＣＥＡＣＡＭ１抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＣＥＡＣＡＭ３抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＣＥＡＣＡＭ５抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、ＣＥＡＣＡＭ６抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）をルミパルス検体希釈液（富士レビオ社）で１又は０μｇ／ｍＬとなるように希釈した検体を測定した。

[0091] サンドイッチ測定系での交差反応性評価の結果を表６に示す。Δ０カウン

ト値はＣＥＡＣＡＭ１抗原１μｇ／ｍＬの測定値から０μｇ／ｍＬの測定値を引いた差である。いずれの固相抗体組み合わせにおいても、ＣＥＡＣＡＭ３、ＣＥＡＣＡＭ５とＣＥＡＣＡＭ６に対して有意な交差反応は示さなかった。交差反応性をもつＡ３０５４抗体（又はＡ３０６７抗体）はＡ３０７３抗体（又はＡ３０２９、Ａ３０４８、Ａ３０５７）のＣＥＡＣＡＭ１特異性に影響しないことが示されている。

[0092] [表6]

表６.サンドイッチ測定系での交差反応性

標識抗体	固相抗体組み合わせ		⊿0カウント値				対CEACAM1(%)		
			CEACAM1	CEACAM3	CEACAM5	CEACAM6	CEACAM3	CEACAM5	CEACAM6
A6056	A3054	A3029	66713	183	113	483	0.3%	0.2%	0.7%
		A3048	55453	163	0	243	0.3%	0.0%	0.4%
		A3057	57167	87	217	737	0.2%	0.4%	1.3%
		A3073	34545	265	215	285	0.8%	0.6%	0.8%
	A3067	A3029	42240	580	0	760	1.4%	0.0%	1.8%
		A3048	35333	433	513	343	1.2%	1.5%	1.0%
		A3057	36300	170	0	160	0.5%	0.0%	0.4%
		A3073	22005	0	185	335	0.0%	0.8%	1.5%
A7004	A3054	A3029	173820	0	690	50	0.0%	0.4%	0.0%
		A3048	167410	0	360	0	0.0%	0.2%	0.0%
		A3057	168395	0	545	0	0.0%	0.3%	0.0%
		A3073	145560	0	320	0	0.0%	0.2%	0.0%
	A3067	A3029	146645	0	405	0	0.0%	0.3%	0.0%
		A3048	143515	0	295	0	0.0%	0.2%	0.0%
		A3057	143410	30	580	400	0.0%	0.4%	0.3%
		A3073	121520	30	670	300	0.0%	0.6%	0.2%

[0093] 実施例８：全自動化学発光酵素免疫測定システムを用いたＣＥＡＣＡＭ１測定系の評価

（Ａ）抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体結合フェライト粒子の調製

１０ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．０）中で磁性粒子に抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体（Ａ３０５４とＡ３０７３）を添加して、０．０４ｍｇ／ｍＬ　抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体（Ａ３０５４とＡ３０７３）及び５ｍｇ／ｍＬ磁性粒子を含む懸濁液を得た。この懸濁液をゆるやかに攪拌しながら２５℃で１時間インキュベートして抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体（Ａ３０５４とＡ３０７３）を磁性粒子に固相化した。その後、磁性粒子を磁石で集磁し、磁性粒子を洗浄液（５０ｍＭ　トリス緩衝液、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２．０％ＢＳＡ、ｐＨ７．２）にて洗浄し、抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体（Ａ３０５４とＡ３０７３）固相化

粒子を得た。

[0094] （Ｂ）アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）標識抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体の調製

脱塩処理したアルカリホスファターゼとＮ－（４－マレイミドブチリロキシ）－スクシンイミド（ＧＭＢＳ）（終濃度０．３ｍｇ／ｍＬ）を０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．０）中で混合し、３０℃、１時間静置してマレイミド化を行った。カップリングバッファーを用いて脱塩処理した後、Ｆａｂ’化した抗ＣＥＡＣＡＭ１モノクローナル抗体Ａ７００４とマレイミド化アルカリホスファターゼをモル比１：１の割合で混合し、２５℃にて３０分静置してカップリングを行った。反応させた抗体とＡＬＰの混合液を、濃縮し、ＡＬＰバッファー（１ｍＭ $MgCl_2$，０．１ｍＭ $ZnCl_2$，０．１％ NaN_3，０．１５Ｍ ＮａＣｌ，０．１Ｍ ＭＥＳ，ｐＨ６．８）を用いてゲルろ過精製を行い、ＡＬＰ標識抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体を得た。

[0095] （Ｃ）ＣＥＡＣＡＭ１測定方法

以下の方法に従い、全自動化学発光酵素免疫測定システムを用いたＣＥＡＣＡＭ１の測定を行った。検体５０μＬと変性処理液（１０％ ＳＤＳ、３．７５％ ＥＤＴＡ２Ｎａ、１０ｍＭ ＴＣＥＰ）５０μＬとを混和し、１０００ｒｐｍの振とう、８０℃で１０分間加熱し変性処理検体を調製した。このうち５０μＬを抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体Ａ３０５４とＡ３０７３を共結合した磁性粒子を含む磁性粒子液（１００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２００ｍＭ ＮａＣｌ、２０ｍＭ ＥＤＴＡ ３Ｎａ、０．１％ ＰｒｏＣｌｉｎ３００、２％ ＢＳＡ、ｐＨ７．５） ５０μＬと混合し、８分間反応させた。磁性粒子を集磁・洗浄して、磁性粒子に未結合の成分を除去し、標識体希釈液（５０ｍＭ ＭＥＳ、１００ｍＭ ＮａＣｌ、０．３ｍＭ $ZnCl_2$、１ｍＭ $MgCl_2$、２％ ＢＳＡ、０．１０％ ＮａＮ３、ｐＨ６．８）で０．２μｇ／ｍＬとなるように希釈したＡＬＰ標識Ａ７００４抗体を５０μＬ添加し、８分間反応させた。磁性粒子を集磁・洗浄して、磁性粒子に未結合の成分を除去し、ＡＭＰＤＤを含む基質液（ルミパルス基質液、富士レビオ社製） ２００μＬを添

加した。酵素反応による発光量をカウントし、検量線を用いて、前記カウントから検体中のＣＥＡＣＡＭ１値を算出した。検量線は、０、１．６、８、４０、２００、１０００ｎｇ／ｍＬのＣＥＡＣＡＭ１量に相当するＣＥＡＣＡＭ１（Ｒ＆Ｄ

Ｓｙｓｔｅｍｓ社）標準液を、検体と同様に測定し、各標準液について得られた発光量に基づいて作成した。本実施例の検体変性処理以降の工程は、すべて自動分析機器ルミパルスＬ２４００（登録商標、富士レビオ社製）を用いて行った。

[0096] （Ｄ）疾患検体測定

上記の全自動化学発光酵素免疫測定システムを用いたＣＥＡＣＡＭ１測定方法により大腸がん検体（ＴＲＩＮＡ　ＢＩＯＲＥＡＣＴＩＶＥＳ　ＡＧから購入）（ｎ＝４２）、肝がん検体（ＴＲＩＮＡ　ＢＩＯＲＥＡＣＴＩＶＥＳ　ＡＧから購入）（ｎ＝５０）、膵がん検体（ＴＲＩＮＡ　ＢＩＯＲＥＡＣＴＩＶＥＳ　ＡＧから購入）（ｎ＝４０）、健常人検体（ｎ＝３６）の測定を行った。図４にこれらの血中濃度分布図、図５にそれぞれのがん検体におけるＲＯＣ（Ｒｅｃｅｉｖｅｒ　Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）解析図を示す。健常人検体のＣＥＡＣＡＭ１濃度は、平均１２５．７±４９．４ｎｇ／ｍＬであり、比較的安定した値を示している。大腸がん検体、肝臓がん検体及び膵がん検体のＣＥＡＣＡＭ１平均濃度はそれぞれ２１６．１±１０８．４ｎｇ／ｍＬ、３９９．９±１１９．３ｎｇ／ｍＬ、４３０．９±２５９．４ｎｇ／ｍＬであり、健常人検体に比べ有意に高値であった。ＲＯＣ解析の結果、大腸がん検体では、曲線下面積０．８３６、カットオフ値１５４．４ｎｇ／ｍＬとしたときの特異度は０．７７８、感度は０．７６２であった。肝がん検体では曲線下面積０．９９６、カットオフ値を２０１．６ｎｇ／ｍＬとしたときの特異度は０．９９４、感度は１．０であった。膵がん検体では曲線下面積０．９６９、カットオフ値を１８１．９ｎｇ／ｍＬとしたときの特異度は０．９１７、感度は０．９２５であった。

[0097] （Ｅ）ＣＥＡ吸収によるＣＥＡＣＡＭ１特異性の評価

ＣＥＡＣＡＭ１測定系の特異性を評価するために、ルミパルスプレストＣＥＡ測定試薬（富士レビオ社製）の抗ＣＥＡモノクローナル抗体結合粒子液を用いてＣＥＡを吸収した検体［吸収（＋）］と未処理検体［吸収（－）］のＣＥＡＣＡＭ１測定値を比較し、共存するＣＥＡの影響を受けないことを確認した。

[0098] ２倍に濃縮した抗ＣＥＡモノクローナル抗体結合粒子液５０μＬと検体５０μＬを混合し、１０００ｒｐｍの振とう、３７℃で３０分間反応させた。磁性粒子を集磁し、上清を回収することでＣＥＡを吸収した検体［吸収（＋）］を調製した。また、粒子を含まない粒子希釈液５０μＬと検体５０μＬを混合し、１０００ｒｐｍの振とう、３７℃で３０分間反応させ未処理検体［吸収（－）］を調製した。これらの検体を用いてＣＥＡＣＡＭ１測定とＣＥＡ測定を行った。ＣＥＡＣＡＭ１測定は上述の全自動化学発光酵素免疫測定システムを用いたＣＥＡＣＡＭ１測定方法に従い、ＣＥＡ測定はルミパルスプレストＣＥＡ測定試薬（富士レビオ社製）の添付文書に従い、自動分析機器ルミパルスＬ２４００（富士レビオ社製）を用いて行った。

[0099] 表７にＣＥＡ吸収によるＣＥＡＣＡＭ１特異性の評価結果を示す。ＣＥＡ測定値が１００ｎｇ／ｍＬを超える検体１、検体２において、吸収（＋）はＣＥＡを約９０％の吸収できる条件であるにもかかわらず、ＣＥＡＣＡＭ１測定値にはほとんど変化がなかった。このことから、構築したＣＥＡＣＡＭ１測定系はＣＥＡの影響を受けることなく特異的にＣＥＡＣＡＭ１を検出していることが示された。

[0100]

[表7]

表７．ＣＥＡ吸収によるＣＥＡＣＡＭ１特異性の評価

	CEACAM1測定			CEA測定		
検体	吸収(+) ng/mL	吸収(-) ng/mL	吸収(+)/(-)	吸収(+) ng/mL	吸収(-) ng/mL	吸収(+)/(-)
1	80.4	81.8	0.98	36.4	371.5	0.10
2	145.3	138.9	1.05	18.6	137.7	0.14
3	58.3	63.0	0.93	0.2	0.5	0.43
4	37.4	37.1	1.01	0.3	0.7	0.41

[0101] 実施例９：抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体のエピトープ露出方法の検討

本発明で取得した抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体はリニアエピトープを認識するため、抗原抗体反応を高めるためには抗原の変性処理工程が必須である。上述までの実施例では抗原の変性処理方法としてＳＤＳ還元熱処理を用いた。図６に示すように、抗原をＳＤＳ還元熱処理することによりエピトープが露出され、ＣＥＡＣＡＭ１特異的シグナルは約１０００倍上昇する。これとは別の変性処理方法としてアルカリによる変性処理を検討した。

[0102] （Ａ）アルカリ処理の検討

Ａ３０５４とＡ３０７３をそれぞれ５μｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳで希釈した。希釈した抗体をヌンク社のマルチモジュールプレートにウェルあたり５０μＬ添加し、４－８℃に一夜静置した。ウェル内の抗体液を除き、ＰＢＳで洗浄した後、ウェルあたり１００μＬのブロッキング液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）を加え室温に１時間静置し抗体固相プレートを調製した。市販のＣＥＡＣＡＭ１抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）をルミパルス検体希釈液（富士レビオ社）で１０００又は０ｎｇ／ｍＬとなるように希釈した検体５０μＬを５０μＬの変性処理液（０－０．５Ｍ　ＮａＯＨ）と混和し、３７℃で７分間保温し変性処理検体を調製した。変性処理検体５０μＬを５０μＬの反応液（１．５Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ

３Ｎａ、０．１％　ＰｒｏＣｌｉｎ　３００、５％　ＢＳＡ、ｐＨ７．５）と混合し、そのうちの５０μＬを上記のブロッキング液を除去した抗体固相プレートのウェルに添加し室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、標識体希釈液（５０ｍＭ　ＭＥＳ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．３ｍＭ　$ZnCl_2$、１ｍＭ　$MgCl_2$、２％　ＢＳＡ、０．１０％　NaN_3、ｐＨ６．８）で１μｇ／ｍＬとなるように希釈したＡＬＰ標識Ａ７００４抗体をウェルに添加し室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、ルミパルス基質液（富士レビオ社）を添加し酵素反応による化学発光量を測定した。

[0103]　図７にアルカリによる変性処理の検討結果を示す。ＮａＯＨによるアルカリ処理では濃度依存的にＣＥＡＣＡＭ１特異的シグナルが上昇している。この結果からエピトープの露出にはＳＤＳ還元熱処理だけでなくアルカリ処理も有効であることが示された。

[0104]（Ｂ）アルカリ処理ＮａＯＨ濃度の最適化

上述の測定方法に従い、変性処理液のＮａＯＨ濃度を０－１Ｍで最適化した。結果を図

８に示す。ＮａＯＨ処理により濃度依存的にＣＥＡＣＡＭ１特異的シグナルが上昇し、変性処理時濃度０．２５Ｍ以上でアルカリ処理の効果がほぼプラトーに達することが示された。

[0105]実施例１０：アルカリ変性処理によるＣＥＡＣＡＭ１の測定

（Ａ）全自動化学発光酵素免疫測定システムを用いたＣＥＡＣＡＭ１の測定

検体２５μＬと変性処理液（０．８Ｍ　ＮａＯＨ、０．５％　Ｂｒｉｊ３５（ポリオキシエチレン２３ラウリルエーテル））２５μＬとを混和し、３７℃で６．５分間の変性処理を行った。ここに５０μＬの中和液（１．５Ｍ　Ｔｒｉｓ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ　３Ｎａ、２％　ＢＳＡ、０．１％　ＰｒｏＣｌｉｎ　３００、ｐＨ７．５）を加え中和した後、抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体Ａ３０５４とＡ３０７３を共結合した磁性粒子を含む磁性粒子液（１．５

Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０ｍＭ ＥＤＴＡ ３Ｎａ、０．１％ ＰｒｏＣｌｉｎ ３００、２％ ＢＳＡ、ｐＨ７．５） ５０μＬと混合し、８分間反応させた。磁性粒子を集磁・洗浄して、磁性粒子に未結合の成分を除去し、標識体希釈液（５０ｍＭ ＭＥＳ、１００ｍＭ ＮａＣｌ、０．３ｍＭ $ZnCl_2$、１ｍＭ $MgCl_2$、２％ ＢＳＡ、０．１０％ ＮａＮ３、ｐＨ６．８）で０．２μｇ／ｍＬとなるように希釈したＡＬＰ標識Ａ７００４抗体を５０ μＬ添加し、８分間反応させた。磁性粒子を集磁・洗浄して、磁性粒子に未結合の成分を除去し、ＡＭＰＤＤを含む基質液（ルミパルス基質液、富士レビオ社製） ２００μＬを添加した。酵素反応による発光量をカウントし、検量線を用いて、前記カウントから検体中のＣＥＡＣＡＭ１値を算出した。検量線は、０、８、４０、２００、１０００ｎｇ／ｍＬのＣＥＡＣＡＭ１量に相当するＣＥＡＣＡＭ１（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社）標準液を、検体と同様に測定し、各標準液について得られた発光量に基づいて作成した。本実施例の工程はすべて自動分析機器ルミパルスＬ２４００（富士レビオ社製）を用いて行った。

[0106] （Ｂ）疾患検体測定

上記の全自動化学発光酵素免疫測定システムを用いたＣＥＡＣＡＭ１測定方法により大腸がん検体（ＴＲＩＮＡ ＢＩＯＲＥＡＣＴＩＶＥＳ ＡＧから購入）（ｎ＝４２）、肝がん検体（ＴＲＩＮＡ ＢＩＯＲＥＡＣＴＩＶＥＳ ＡＧから購入）（ｎ＝５０）、膵がん検体（ＴＲＩＮＡ ＢＩＯＲＥＡＣＴＩＶＥＳ ＡＧから購入）（ｎ＝４１）、健常人検体（ｎ＝３６）の測定を行った。図９にこれらの血中濃度分布図、図１０にそれぞれのがん検体におけるＲＯＣ（Ｒｅｃｅｉｖｅｒ Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）解析図を示す。健常人検体のＣＥＡＣＡＭ１濃度は、平均１６６．３±６４．９ｎｇ／ｍＬであり、比較的安定した値を示している。大腸がん検体、肝臓がん検体及び膵がん検体のＣＥＡＣＡＭ１平均濃度はそれぞれ２７６．７±１２４．７ｎｇ／ｍＬ、４５８．７１６±１１１．２ｎｇ／ｍＬ、４２４．３±２３７．７ｎｇ／ｍＬであり、健常人検体に比べ有

意に高値であった。ＲＯＣ解析の結果、大腸がん検体では、曲線下面積０．８３８、カットオフ値を１６６．２としたときの特異度は０．５８３、感度は０．９５２であった。肝がん検体では曲線下面積０．９９４、カットオフ値を２６２．９としたときの特異度は０．９４４、感度は１．０であった。膵がん検体では曲線下面積０．９４４、カットオフ値を２６２．２としたときの特異度は０．９４４、感度は０．７５６であった。

[0107] （Ｃ）ＳＤＳ還元熱処理との比較

ヒト由来血液検体１６８例を用いて、オフボードＳＤＳ還元熱処理（Ｘ軸）とオンボードアルカリ処理（Ｙ軸）におけるＣＥＡＣＡＭ１濃度を比較した（図１１）。Ｐｅａｒｓｏｎ　の相関係数は、ｒ＝０．９６７と高い正の相関性が認められた。Ｐａｓｓｉｎｇ－Ｂａｂｌｏｋ　法の回帰による傾きは１．０４であった。

[0108] ＳＤＳ還元熱処理は高温（８０℃）での検体変性処理が必要であるため、変性処理工程

を自動化することができず操作が煩雑であった。高温処理を必要としないアルカリ処理を導入することにより変性処理を含むすべての工程を自動化し、より簡便なＣＥＡＣＡＭ１測定方法の提供が可能である。

[0109] 実施例１１：自己抗体モデル検体を用いた変性処理の効果

本発明の変性処理を含むＣＥＡＣＡＭ１測定系の有用性を示すために、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社のＥＬＩＳＡキットで使用されている抗体を用いて、変性処理を含まない測定系を構築し自己抗体モデル検体に対する反応性を比較した。

[0110] （Ａ）ＲＤ社抗体を用いたＣＥＡＣＡＭ１の測定

検体１０μＬと抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体２８３３２４（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を結合した磁性粒子を含む磁性粒子液（１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ

３Ｎａ、０．１％　ＰｒｏＣｌｉｎ　３００、２％　ＢＳＡ、ｐＨ７．５）　５０μＬと混合し、８分間反応させた。磁性粒子を集磁・洗浄して、磁

性粒子に未結合の成分を除去し、標識体希釈液（５０ｍＭ　ＭＥＳ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．３ｍＭ　$ZnCl_2$、１ｍＭ　$MgCl_2$、２％　ＢＳＡ、０．１０％　ＮａＮ３、ｐＨ６．８）で希釈した０．１μｇ／ｍＬビオチン標識抗ＣＥＡＣＡＭ１抗体ＢＡＦ２２４４（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）と０．２μｇ／ｍＬアルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）標識ストレプトアビジンの混合液を５０μＬ添加し、８分間反応させた。磁性粒子を集磁・洗浄して、磁性粒子に未結合の成分を除去し、ＡＭＰＤＤを含む基質液（ルミパルス基質液、富士レビオ社製）　２００μＬを添加した。酵素反応による発光量をカウントし、検量線を用いて、前記カウントから検体中のＣＥＡＣＡＭ１値を算出した。検量線は、０、８、４０、２００、１０００ｎｇ／ｍＬのＣＥＡＣＡＭ１量に相当するＣＥＡＣＡＭ１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）標準液を、検体と同様に測定し、各標準液について得られた発光量に基づいて作成した。本実施例の工程はすべて自動分析機器ルミパルスＬ２４００（富士レビオ社製）を用いて行った。

[0111] （Ｂ）ＣＥＡＣＡＭ１ポリクローナル抗体の競合性評価

市販のリコンビナント抗原ＣＥＡＣＡＭ１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を１μｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳで希釈した。希釈した抗原をヌンク社のマルチモジュールプレートにウェルあたり５０μＬ添加し、室温で一夜静置した。抗原希釈液を除きＰＢＳで洗浄した後、ウェルあたり１００μＬのブロッキング液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）を加え室温に１時間静置した。

[0112] ブロッキング液を除去し、各ウェルに反応液（０．１％カゼインナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ＰＢＳ）で０．１μｇ／ｍＬとなるよう希釈した各種抗体溶液又は０．１μｇ／ｍＬとなるよう希釈した各種抗体に１０μｇ／ｍＬのＣＥＡＣＡＭ１ポリクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社，ＡＦ２２４４）を加えた溶液をそれぞれ５０　μＬ加え室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、５０μＬのアルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）標識された

抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異的抗体又はＡＬＰ標識ストレプトアビジンを加え室温に１時間静置した。ウェルを０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで洗浄した後、ＡＭＰＤＤ溶液を各ウェルに５０μＬ添加して、化学発光量を測定した。

[0113]　表８に抗ＣＥＡＣＡＭ１ポリクローナル抗体添加による各種抗体の結合率を示す。Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社抗体のＢＡＦ２２４４と２８３３２４は結合率が低下、本発明の抗体Ａ３０５４はわずかに結合率が上昇したが、Ａ３０７３とＡ７００４は結合率が低下した。この結果からＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社抗体を用いた測定系と本発明の抗体を用いた測定系はどちらも抗ＣＥＡＣＡＭ１ポリクローナル抗体により阻害を受けることが示された。

[0114] [表8]

表８.抗ＣＥＡＣＡＭ１ポリクローナル抗体添加による結合率

BAF2244	283324	A3054	A3073	A7004
44.8%	41.0%	113.9%	87.9%	55.3%

[0115]　（Ｃ）自己抗体モデル検体を用いた測定系の比較

ＣＥＡＣＡＭ１高値のがん検体に抗ＣＥＡＣＡＭ１ポリクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社，ＡＦ２２４４）を３０μｇ／ｍＬとなるように添加し、自己抗体モデル検体を調製した。抗ＣＥＡＣＡＭ１ポリクローナル抗体　無添加（－）、添加（＋）の検体について「変性処理ナシ」又は「変性処理アリ」のＣＥＡＣＡＭ１測定を行った。「変性処理アリ」は上述のアルカリ変性処理によるＣＥＡＣＡＭ１測定、「変性処理ナシ」は上述のＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社抗体を用いたＣＥＡＣＡＭ１の測定の方法に従った。結果を図１２に示す。変性処理ナシのＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社抗体組み合わせではポリクローナル抗体無添加（－）と比較して添加（＋）は約３％まで定量値が低下した。一方、本発明の変性処理アリ測定系では大きな影響は受けず、添加（＋）検体においても約９０％の定量値を示した。

[0116]　ＣＥＡに対する自己抗体に関する報告はいくつかあり、がん患者での出現頻度が高い（参考文献１，２）。ＣＥＡＣＡＭ１はＣＥＡ　ｆａｍｉｌｉｙ

に属するため、自己抗体が出現する可能性が高いと考えられる。また、ＣＥＡＣＡＭ１を含むＣＥＡ　ｆａｍｉｌｙは配列、構造的にも相同性が高いため、ＣＥＡに対する自己抗体がＣＥＡＣＡＭ１測定系に影響を与える可能性もある。こういった観点から、本発明の変性処理を含む　ＣＥＡＣＡＭ１測定系は自己抗体のような妨害物質の影響を回避できるため、精度の高い診断測定が可能となる。

[0117]（参考文献）

１．Ｋ　Ａｌｂａｎｏｐｏｕｌｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ　Ｊ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．２０００，Ａｐｒ；９５（４）：１０５６－６１，ＰＭＩＤ：１０７６３９５９，ＤＯＩ：１０．１１１１／ｊ．１５７２－０２４１．２０００．０１９８２．ｘ

２．Ｄ　Ｈａｉｄｏｐｏｕｌｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ　Ｊ　Ｓｕｒｇ　Ｏｎｃｏｌ．２０００，Ｄｅｃ；２６（８）：７４２－６，ＰＭＩＤ：１１０８７６３８，ＤＯＩ：１０．１０５３／ｅｊｓｏ．２０００．０９９６

請求の範囲

[請求項1] ＣＥＡＣＡＭ１を検出する方法であって、

（１）ＣＥＡＣＡＭ１含有検体においてＣＥＡＣＡＭ１を変性させて、変性ＣＥＡＣＡＭ１を生成する工程、及び

（２）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体及び標識抗体の双方を使用するサンドイッチアッセイにより、ＣＥＡＣＡＭ１を検出する工程、

を含む、方法。

[請求項2] 前記変性は、変性剤、及び加熱、並びにそれらの組み合わせからなる群より選ばれる、請求項１記載の方法。

[請求項3] 前記変性剤は、アルカリ性物質、界面活性剤、及び還元剤、並びにそれらの２種以上の組み合わせからなる群から選ばれる、請求項２記載の方法。

[請求項4] 前記捕捉抗体及び標識抗体の一方として、（ａ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＰＡＮＳＧＲＥＴＩＹ（配列番号１）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体を使用する、請求項１記載の方法。

[請求項5] 前記捕捉抗体及び標識抗体の一方として、（ｂ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＴＥＳＭＰ（配列番号２）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体をさらに使用する、請求項４記載の方法。

[請求項6] 前記捕捉抗体及び標識抗体の他方として、（ｃ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＤＴＴＹＬＷＷＩＮＮ（配列番号３）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体を使用する、請求項４記載の方法。

[請求項7] 前記捕捉抗体及び標識抗体の他方として、（ｄ）ＣＥＡＣＡＭ１におけるＥＡＴＧＱＦＨＶＹＰ（配列番号４）のアミノ酸配列により表されるエピトープを認識する能力を有する抗体を使用する、請求項４

記載の方法。

[請求項8] がんを検出する方法であって、

（１）請求項１～７のいずれか一項記載の方法により、被験体から採取された検体中のＣＥＡＣＡＭ１量を測定する工程、及び

（２）測定されたＣＥＡＣＡＭ１量を基準値と比較する工程、

を含む、方法。

[請求項9] 前記がんは、大腸がん、肝臓がん、及び膵臓がん、並びにそれらの２種以上の組み合わせからなる群より選択される、請求項８記載の方法。

[請求項10] がんの治療方法であって、

（１）請求項１～７のいずれか一項記載の方法により、被験体から採取された検体中のＣＥＡＣＡＭ１量を測定する工程、

（２）測定されたＣＥＡＣＡＭ１量を基準値と比較する工程、

（３）基準値よりも高いＣＥＡＣＡＭ１量が測定された被験体を選択する工程、及び

（４）選択された被験体に抗がん剤を投与すること

を含む、方法。

[請求項11] ＣＥＡＣＡＭ１検出用キットであって、

（１）変性剤、

（２）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する捕捉抗体、及び

（３）変性ＣＥＡＣＡＭ１を認識する能力を有する標識抗体、

を含む、キット。

[図1]

（１）pAT-TrpE-His-CEACAM1-N

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTQLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDG
NRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYP（
配列番号５）

（２）pAT-TrpE-His-CEACAM1-N-m3C3d

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTQLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDG
NRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPGSS
GRGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYAGSGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYASGRGKFLN
TAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYAGSG（配列番号６）

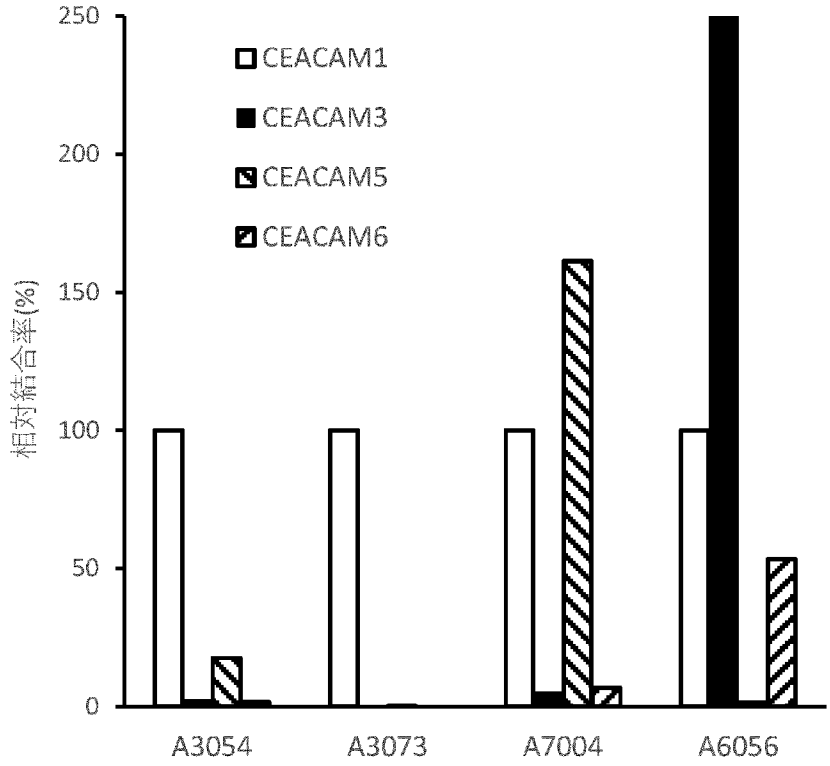
（３）pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSL
PVSPRLQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLN（配列番号７）

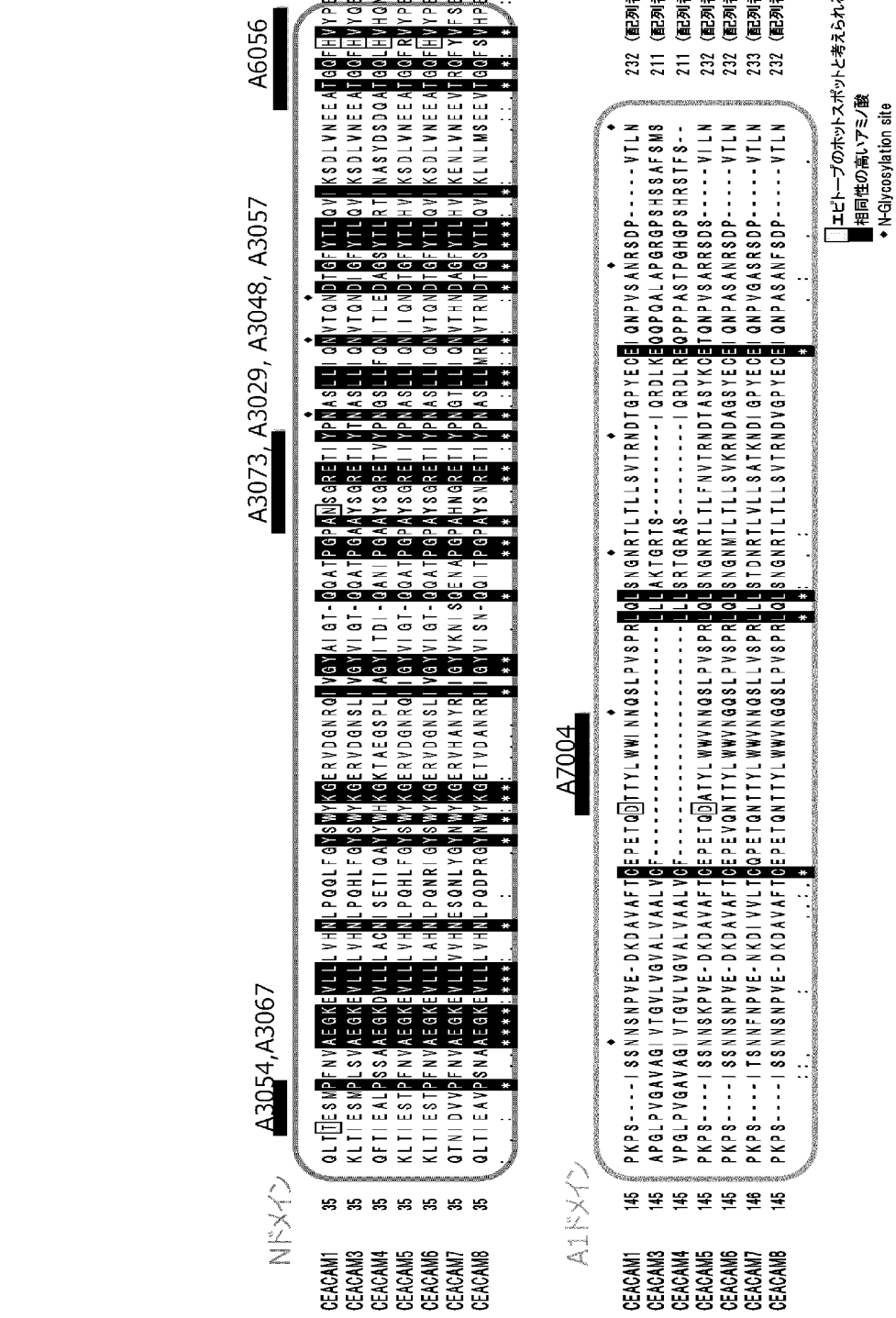
（４）pAT-TrpE-His-CEACAM1-A1-m3C3d

MKAIFVLKGSLDRDPELDHHHHHHIEFGRTPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSL
PVSPRLQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNGSSGRGKFLNTAKDRNRWEEPDQ
QLYNVEATSYAGSGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEATSYASGRGKFLNTAKDRNRWEEPDQQLYNVEA
TSYAGSG（配列番号８）

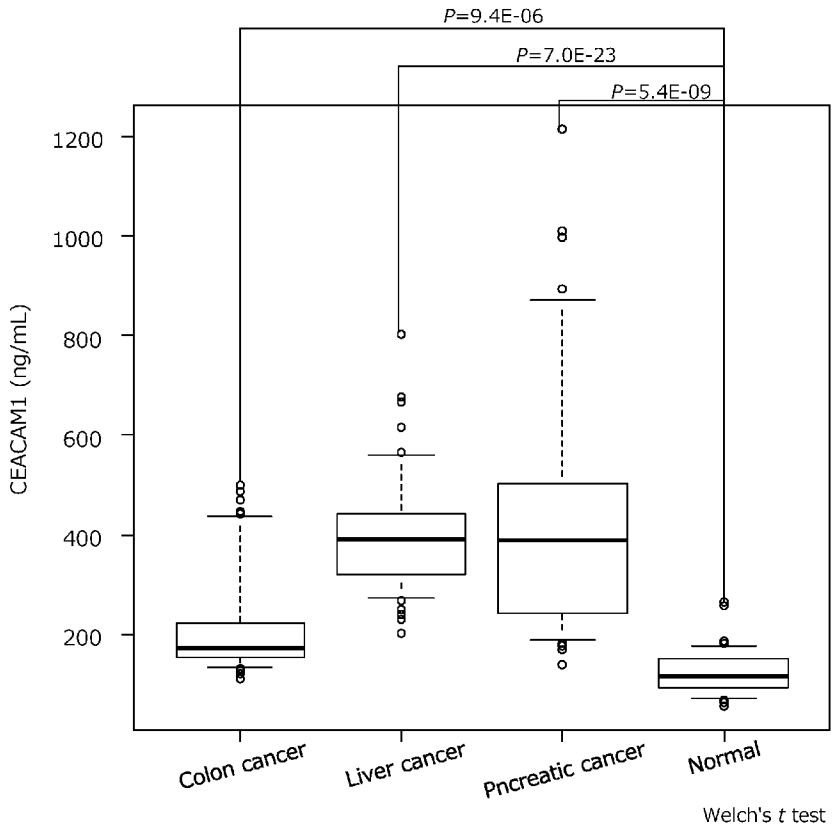
[図2]


250
200
150
100
50
0
相対結合率(%)
CEACAM1
CEACAM3
CEACAM5
CEACAM6
A3054
A3073
A7004
A6056

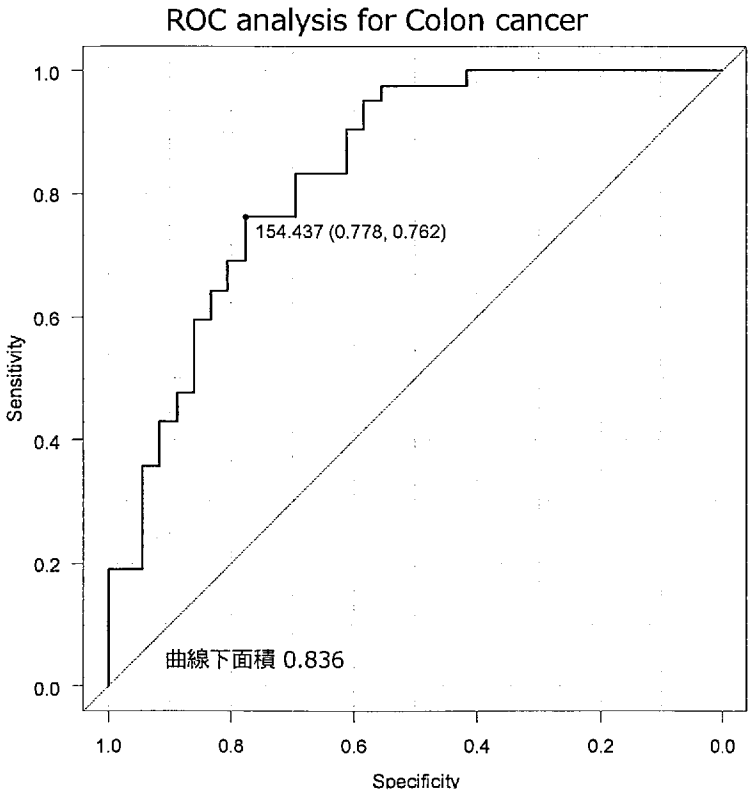
[図3]


A3054,A3067
A3073, A3029, A3048, A3057
A6056
A7004
N末端
A1末端
CEACAM1
CEACAM3
CEACAM4
CEACAM5
CEACAM6
CEACAM7
CEACAM8
(配列番号9)
(配列番号10)
(配列番号11)
(配列番号12)
(配列番号13)
(配列番号14)
(配列番号15)
エピトープのホットスポットと考えられるアミノ酸
相同性の高いアミノ酸
N-Glycosylation site

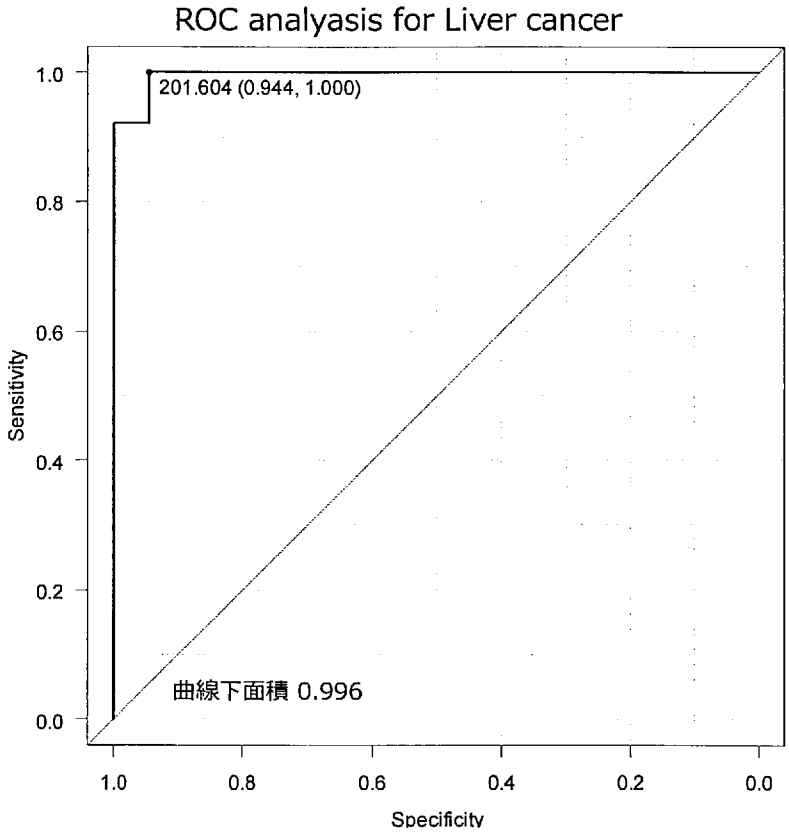
[図4]


P=9.4E-06
P=7.0E-23
P=5.4E-09
1200
1000
800
600
400
200
CEACAM1 (ng/mL)
Colon cancer
Liver cancer
Pncreatic cancer
Normal
Welch's t test

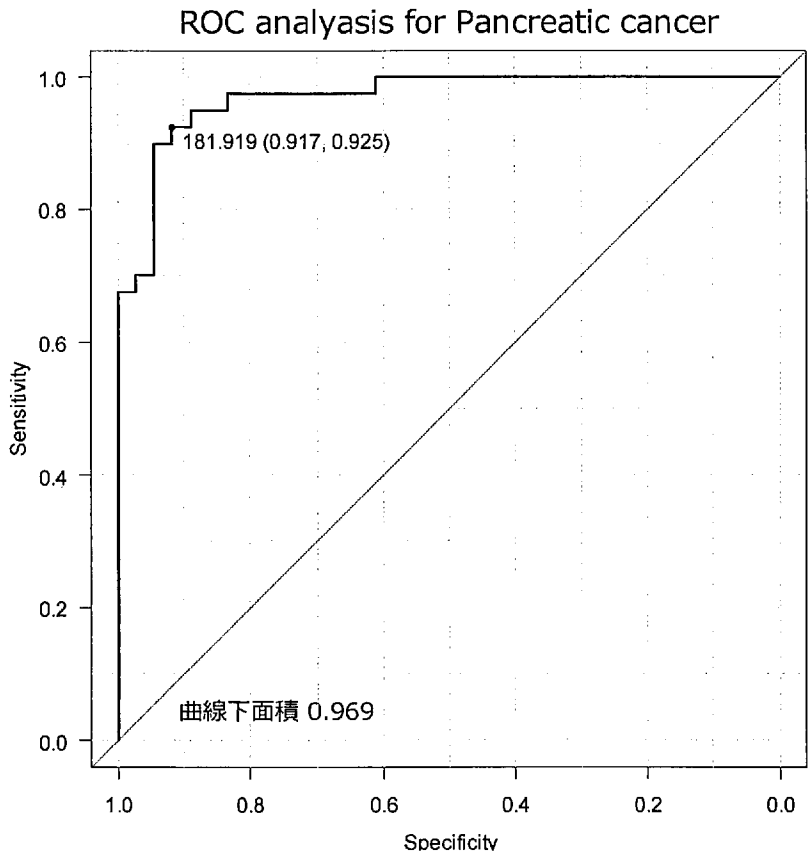
[図5A]


ROC analysis for Colon cancer
Sensitivity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
154.437 (0.778, 0.762)
曲線下面積 0.836
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Specificity

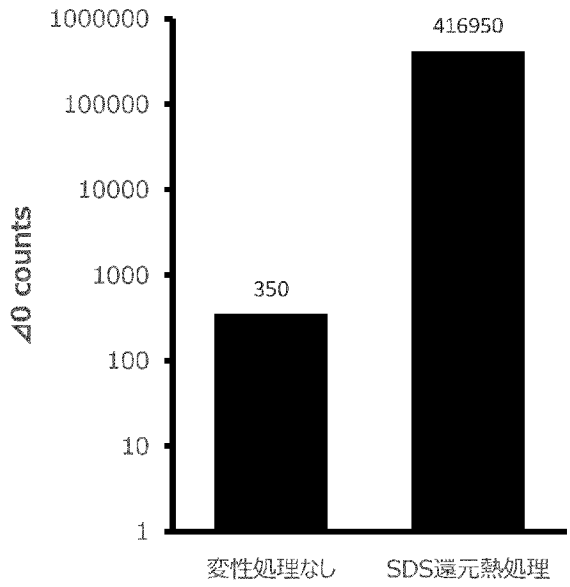
[図5B]


ROC analyasis for Liver cancer
201.604 (0.944, 1.000)
曲線下面積 0.996
Sensitivity
Specificity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

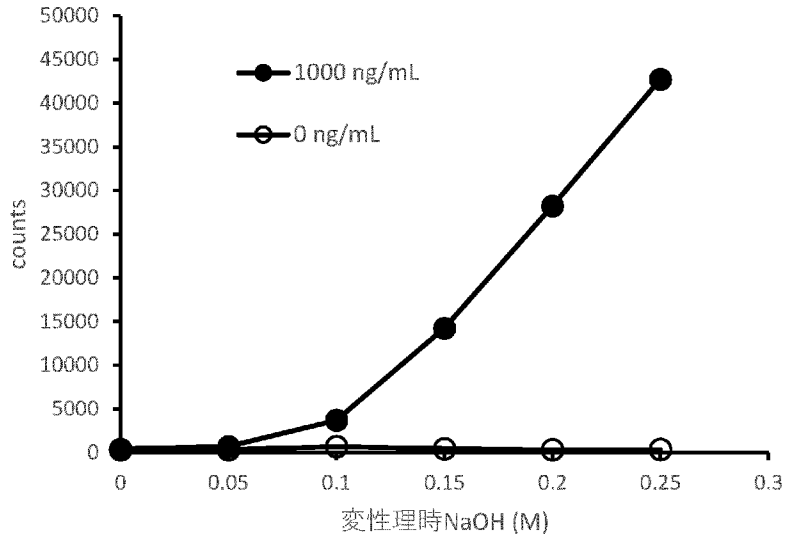
[図5C]


ROC analysis for Pancreatic cancer
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Sensitivity
181.919 (0.917, 0.925)
曲線下面積 0.969
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Specificity

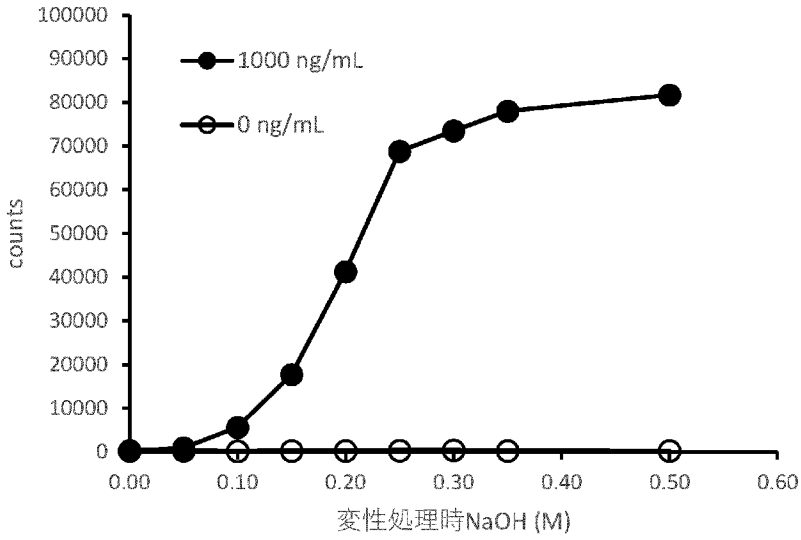
[図6]


1000000
100000
10000
1000
100
10
1
40 counts
350
416950
変性処理なし
SDS還元熱処理

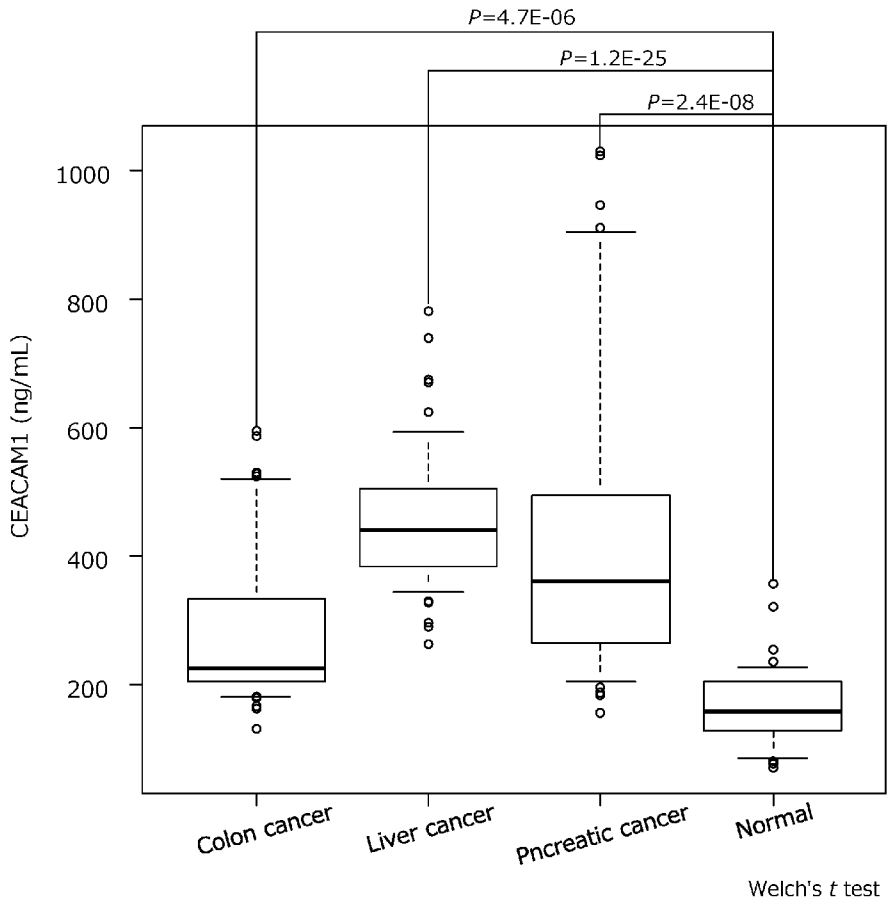
[図7]


50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
counts
1000 ng/mL
0 ng/mL
0
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
変性理時NaOH (M)

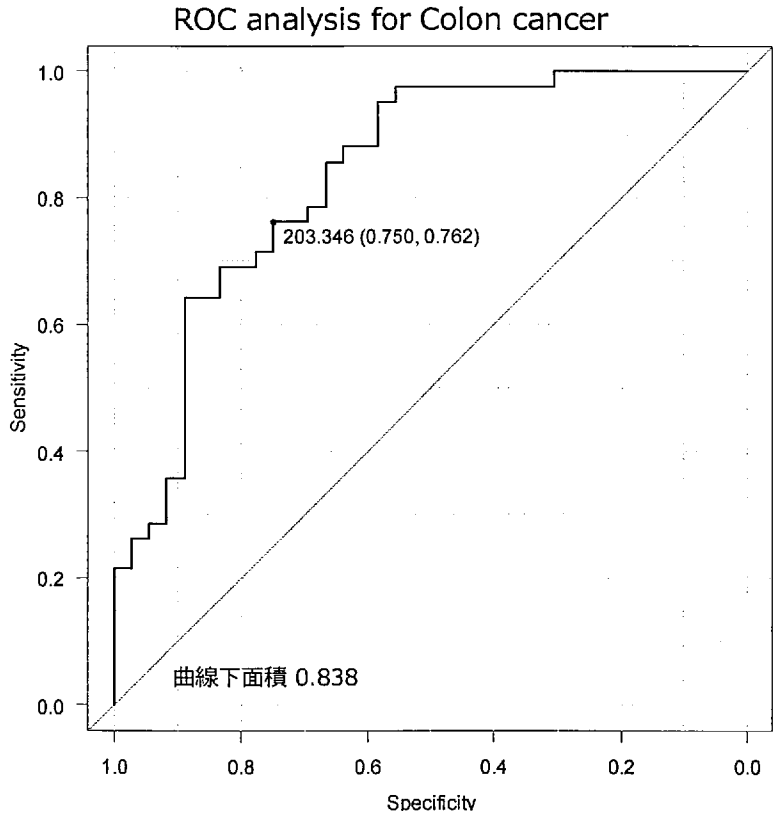
[図8]


100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
counts
1000 ng/mL
0 ng/mL
0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
変性処理時NaOH (M)

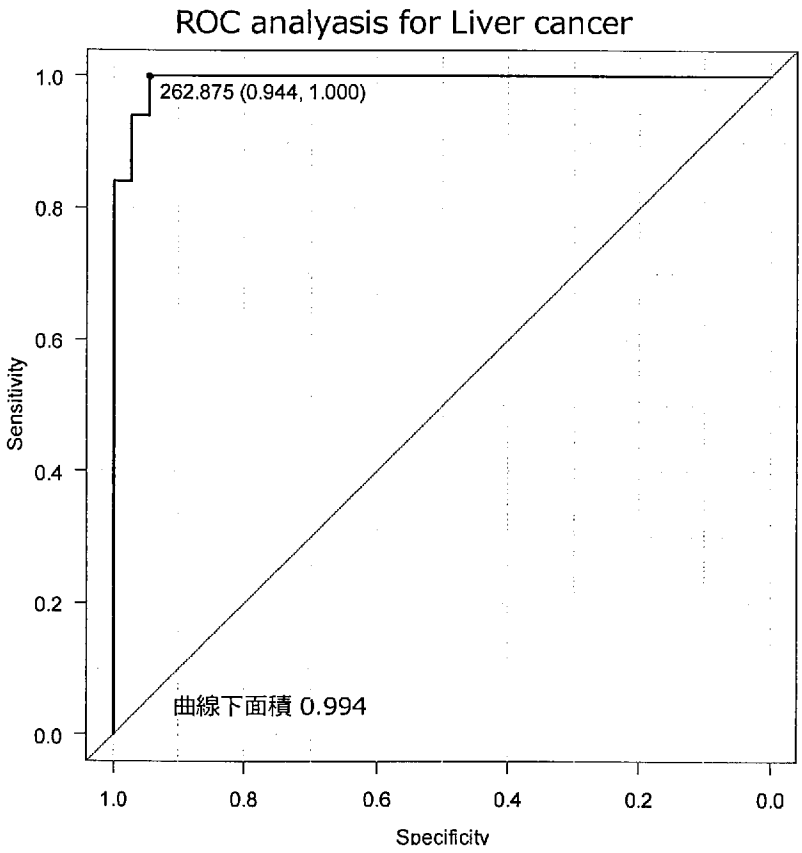
[図9]


P=4.7E-06
P=1.2E-25
P=2.4E-08
1000
800
600
400
200
CEACAM1 (ng/mL)
Colon cancer
Liver cancer
Pncreatic cancer
Normal
Welch's t test

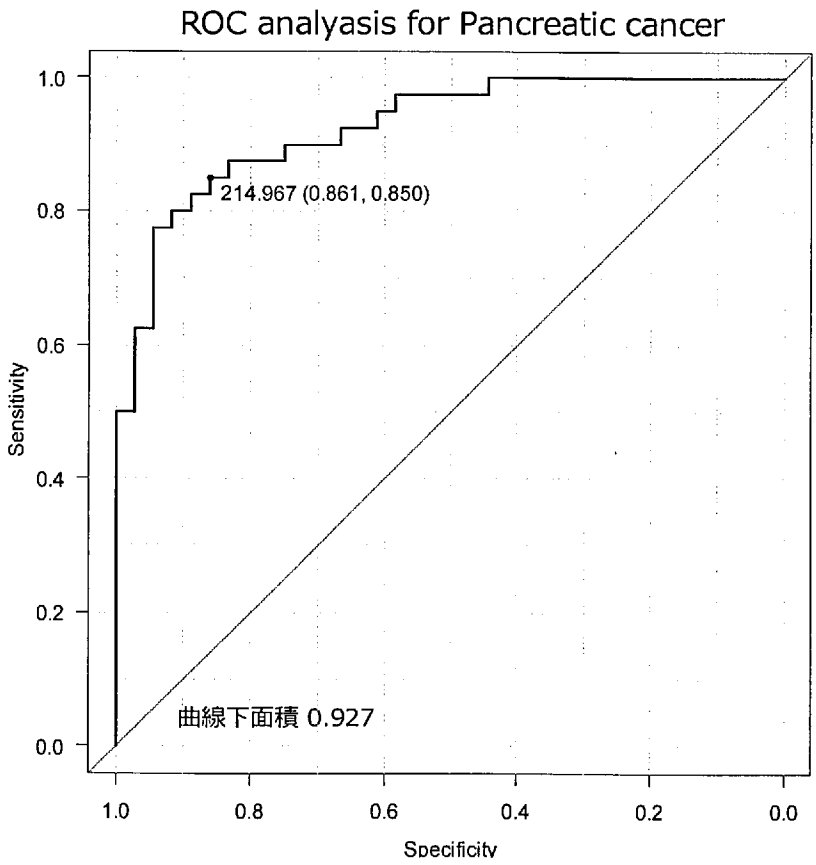
[図10A]


ROC analysis for Colon cancer
Sensitivity
Specificity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
203.346 (0.750, 0.762)
曲線下面積 0.838

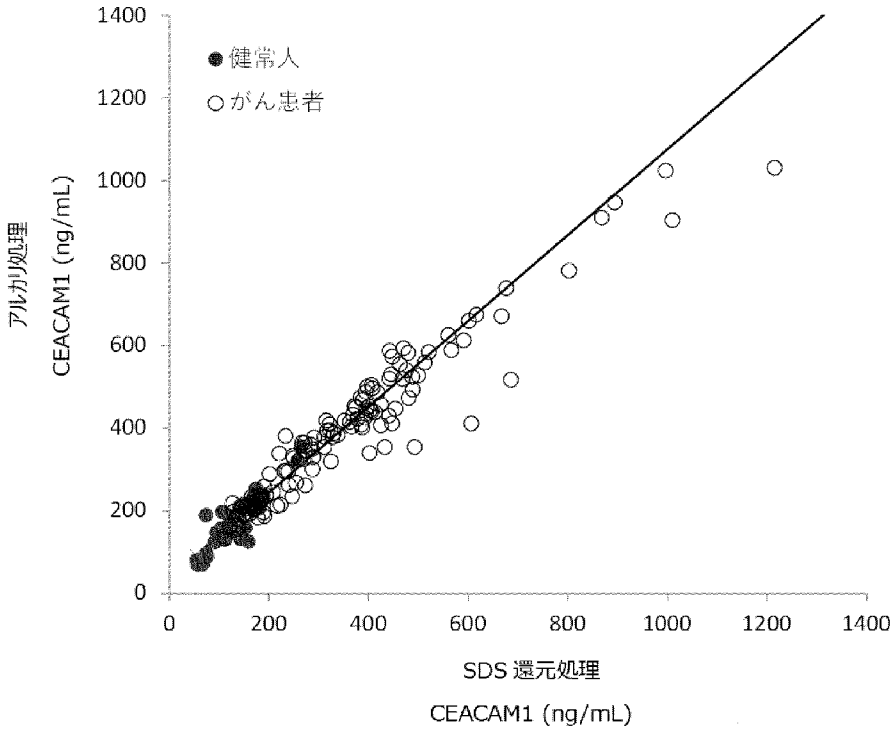
[図10B]


ROC analysis for Liver cancer
262.875 (0.944, 1.000)
曲線下面積 0.994
Sensitivity
Specificity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

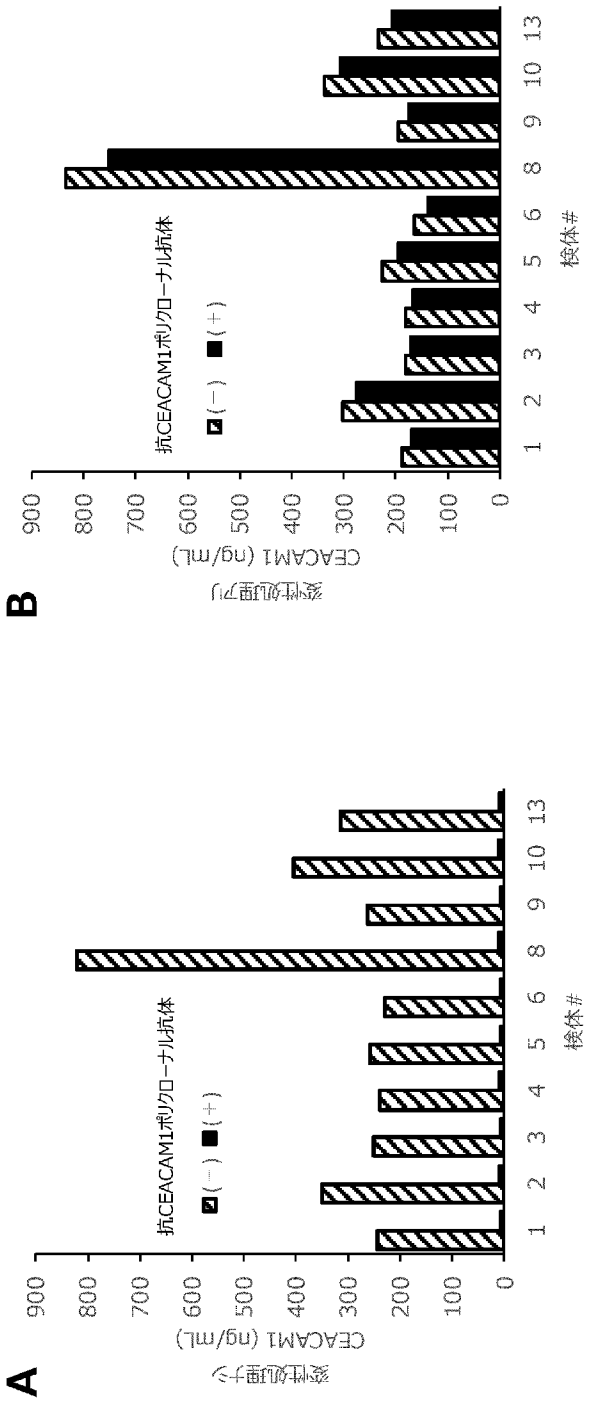
[図10C]


ROC analysis for Pancreatic cancer
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Sensitivity
214.967 (0.861, 0.850)
曲線下面積 0.927
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Specificity

[図11]


1400
1200
1000
800
600
400
200
0
健常人
がん患者
アルカリ処理
CEACAM1 (ng/mL)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
SDS 還元処理
CEACAM1 (ng/mL)

[図12]


A
B
CEACAM1 (ng/mL)
検体#
抗CEACAM1ポリクローナル抗体
(−)
(+)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1
2
3
4
5
6
8
9
10
13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/028802

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/53(2006.01)i; ***A61K 45/00***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***C07K 16/28***(2006.01)i; ***C12N 15/13***(2006.01)i; ***C12P 21/08***(2006.01)i; ***G01N 33/543***(2006.01)i; ***G01N 33/574***(2006.01)i
FI: G01N33/53 D ZNA; G01N33/574 A; A61K45/00; A61P35/00; C07K16/28; G01N33/543 545A; C12N15/13; C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/53; A61K45/00; A61P35/00; C07K16/28; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/543; G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2018-17723 A (SHIZUOKA PREFECTURE) 01 February 2018 (2018-02-01) abstract, paragraphs [0014], [0042]	1-11
A	JP 2015-502138 A (TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.) 22 January 2015 (2015-01-22) abstract, paragraphs [0002], [0065]	1-11
A	US 2012/0122122 A1 (MARKEL GAL) 17 May 2012 (2012-05-17) paragraph [0059]	1-11
A	JP 2703116 B2 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 26 January 1998 (1998-01-26) claims	1-11
A	JP 9-178752 A (LION CORP.) 11 July 1997 (1997-07-11) paragraph [0009]	1-11
A	JP 9-166594 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) 24 June 1997 (1997-06-24) paragraphs [0006], [0008], [0009]	1-11

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 October 2023	**17 October 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-251789 A (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 20 December 2012 (2012-12-20) paragraphs [0003]-[0007]	1-11
A	JP 2019-196917 A (TOYOBO CO., LTD.) 14 November 2019 (2019-11-14) paragraphs [0008]-[0010], [0019]	1-11
A	JP 2000-241429 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORP.) 08 September 2000 (2000-09-08) paragraphs [0003], [0004], [0006], [0010]	1-11
A	大江知行. 物理化学,分析化学,放射線学. 同じ抗体で挟むエストロゲンのサンドウィッチ風EIA. ファルマシア. 01 December 1999, vol. 35, no.12, pp. 1257, 1258, (Farumashia), non-official translation (OE, Tomoyuki. Physical Chemistry, Analytical Chemistry, Radiology. Estrogen Sandwich-Style EIA Sandwiched by Same Antibody.) entire text, all drawings	1-11
A	JP 2-503716 A (IMMUNOMEDICS, INC.) 01 November 1990 (1990-11-01) claims	1-11
A	CN 103060361 A (FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF KUNMING MEDICAL UNIVERSITY) 24 April 2013 (2013-04-24) entire text, all drawings	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/028802

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"Annex C/ST.25 text file format" should be read as "ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/028802

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-17723 A	01 February 2018	EP 3276353 A1 abstract, paragraphs [0014], [0044] JP 6255556 B1 US 2018/0080935 A1 WO 2018/020530 A1 KR 10-2018-0011725 A CA 3029926 A	
JP 2015-502138 A	22 January 2015	WO 2013/054331 A1 abstract, p. 1, lines 12-18, p. 9, lines 22, 23 US 2014/0271618 A1 US 2017/0355781 A1 US 2021/0070884 A1 WO 2013/054320 A1 EP 2744829 A1 EP 3360899 A1 KR 10-2014-0069206 A CN 103987729 A	
US 2012/0122122 A1	17 May 2012	WO 2011/010309 A1 EP 2457089 A1	
JP 2703116 B2	26 January 1998	WO 1995/004282 A1 claims WO 1994/003813 A1 EP 659276 A1 EP 711415 A1 DE 4225038 A1	
JP 9-178752 A	11 July 1997	(Family: none)	
JP 9-166594 A	24 June 1997	EP 779513 A1 p. 2, lines 49-52, p. 3, lines 6-31 US 6027907 A	
JP 2012-251789 A	20 December 2012	(Family: none)	
JP 2019-196917 A	14 November 2019	(Family: none)	
JP 2000-241429 A	08 September 2000	EP 1103814 A1 paragraphs [0003], [0004], [0006], [0010] US 6607891 B1 WO 2000/007021 A1	
JP 2-503716 A	01 November 1990	WO 1988/009934 A1 claims US 4900684 A EP 433274 A1	
CN 103060361 A	24 April 2013	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/028802

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/53(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i
FI: G01N33/53 D ZNA; G01N33/574 A; A61K45/00; A61P35/00; C07K16/28; G01N33/543 545A; C12N15/13; C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/53; A61K45/00; A61P35/00; C07K16/28; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/543; G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2018-17723 A (静岡県) 01.02.2018 (2018-02-01) [要約][0014][0042]	1-11
A	JP 2015-502138 A (テル ハショメール メディカル リサーチ インフラストラクチャー アンド サービシズ リミテッド) 22.01.2015 (2015-01-22) [要約][0002][0065]	1-11
A	US 2012/0122122 A1 (MARKEL GAL) 17.05.2012 (2012-05-17) [0059]	1-11
A	JP 2703116 B2 (ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー) 26.01.1998 (1998-01-26) 特許請求の範囲	1-11
A	JP 9-178752 A (ライオン株式会社) 11.07.1997 (1997-07-11) [0009]	1-11
A	JP 9-166594 A (富士写真フイルム株式会社) 24.06.1997 (1997-06-24) [0006][0008][0009]	1-11

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
04.10.2023	17.10.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
三木　隆 2J 3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2012-251789 A (積水メディカル株式会社) 20.12.2012 (2012-12-20) [0003]-[0007]	1-11
A	JP 2019-196917 A (東洋紡株式会社) 14.11.2019 (2019-11-14) [0008]-[0010][0019]	1-11
A	JP 2000-241429 A (三菱化学株式会社) 08.09.2000 (2000-09-08) [0003][0004][0006][0010]	1-11
A	大江知行, 物理化学,分析化学,放射線学 同じ抗体で挟むエストロゲンのサンドウィッチ風EIA , ファルマシア, 1999.12.01, Vol.35 No.12, Page.1257-1258 全文・全図	1-11
A	JP 2-503716 A (イムノメディックス・インコーポレイテッド) 01.11.1990 (1990-11-01) 請求の範囲	1-11
A	CN 103060361 A (FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF KUNMING MEDICAL UNIVERSITY) 24.04.2013 (2013-04-24) 全文・全図	1-11

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/028802

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/028802

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-17723 A	01.02.2018	EP 3276353 A1 Abstract, [0014], [0044] JP 6255556 B1 US 2018/0080935 A1 WO 2018/020530 A1 KR 10-2018-0011725 A CA 3029926 A	
JP 2015-502138 A	22.01.2015	WO 2013/054331 A1 Abstract, 1ページ12行-18行, 9ページ22行-23行 US 2014/0271618 A1 US 2017/0355781 A1 US 2021/0070884 A1 WO 2013/054320 A1 EP 2744829 A1 EP 3360899 A1 KR 10-2014-0069206 A CN 103987729 A	
US 2012/0122122 A1	17.05.2012	WO 2011/010309 A1 EP 2457089 A1	
JP 2703116 B2	26.01.1998	WO 1995/004282 A1 Claims WO 1994/003813 A1 EP 659276 A1 EP 711415 A1 DE 4225038 A1	
JP 9-178752 A	11.07.1997	（ファミリーなし）	
JP 9-166594 A	24.06.1997	EP 779513 A1 2ページ49行-52行, 3ページ6行-31行 US 6027907 A	
JP 2012-251789 A	20.12.2012	（ファミリーなし）	
JP 2019-196917 A	14.11.2019	（ファミリーなし）	
JP 2000-241429 A	08.09.2000	EP 1103814 A1 [0003][0004][0006][0010] US 6607891 B1 WO 2000/007021 A1	
JP 2-503716 A	01.11.1990	WO 1988/009934 A1 Claims US 4900684 A EP 433274 A1	
CN 103060361 A	24.04.2013	（ファミリーなし）	