

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】令和 2 年 7 月 2 日 (2020.7.2)

【公表番号】特表 2018-503600 (P2018-503600A)

【公表日】平成 30 年 2 月 8 日 (2018.2.8)

【年通号数】公開・登録公報 2018-005

【出願番号】特願 2017-526592 (P2017-526592)

【国際特許分類】

C 07K 16/30 (2006.01)

C 12N 15/09 (2006.01)

C 07K 16/18 (2006.01)

C 07K 16/46 (2006.01)

C 12N 1/15 (2006.01)

C 12N 1/19 (2006.01)

C 12N 1/21 (2006.01)

C 12N 5/10 (2006.01)

C 12N 7/04 (2006.01)

C 12Q 1/04 (2006.01)

C 40B 40/10 (2006.01)

C 12Q 1/02 (2006.01)

A 61K 39/395 (2006.01)

A 61P 35/00 (2006.01)

A 61P 37/04 (2006.01)

A 61P 31/18 (2006.01)

A 61P 31/16 (2006.01)

A 61P 31/22 (2006.01)

A 61P 31/14 (2006.01)

A 61P 31/20 (2006.01)

A 61P 1/16 (2006.01)

A 61K 47/68 (2017.01)

A 61K 31/337 (2006.01)

A 61K 31/282 (2006.01)

A 61P 43/00 (2006.01)

A 61K 45/00 (2006.01)

G 01N 33/53 (2006.01)

G 01N 33/574 (2006.01)

G 01N 33/531 (2006.01)

C 12P 21/08 (2006.01)

【F I】

C 07K 16/30 Z N A

C 12N 15/00 A

C 07K 16/18

C 07K 16/46

C 12N 1/15

C 12N 1/19

C 12N 1/21

C 12N 5/10

C 12N 7/04

C 12Q 1/04

C 4 0 B	40/10	
C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 K	39/395	C
A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	31/16	
A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	1/16	
A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	31/337	
A 6 1 K	31/282	
A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00	
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/574	D
G 0 1 N	33/53	Y
G 0 1 N	33/531	A
C 1 2 P	21/08	

【誤訳訂正書】

【提出日】令和2年5月21日(2020.5.21)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含む C D R L 1 と、
 (b) 配列番号 1 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R L 2 と、
 (c) 配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R L 3 と、
 (d) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む C D R H 1 と、
 (e) 配列番号 8 4 のアミノ酸配列を含む C D R H 2 と、
 (f) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む C D R H 3 と、を含む抗体またはその抗体断片であって、

前記抗体またはその抗体断片が、シアリル化された T n 抗原 (S T n) に結合する、抗体またはその抗体断片。

【請求項 2】

配列番号 3 7 のアミノ酸配列と 9 5 % 以上同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (V H) と、

配列番号 3 8 のアミノ酸配列と 9 5 % 以上同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (V L) とを含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 3】

配列番号 37 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (VH) と、
配列番号 38 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (VL) とを含む、請求項 1 に記
載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 4】

モノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の
抗体またはその抗体断片。

【請求項 5】

I g G 1 アイソタイプまたは I g G 2 アイソタイプである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一
項に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 6】

前記抗体またはその抗体断片は N アセチルノイラミンシアリル T n 抗原 (AcSTn
) 及び N グリコリルノイラミンシアリル T n 抗原 (GcSTn) の少なくとも一方に特
異的に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 7】

前記抗原は 9 O アセチル基を含む、請求項 6 に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 8】

前記抗体またはその抗体断片は二重特異的抗体を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に
記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片と、治療剤または細胞傷
害剤とを含む、抗体薬物接合体。

【請求項 10】

前記細胞傷害剤は前記抗体またはその抗体断片に直接接合されている、請求項 9 に記載
の抗体薬物接合体。

【請求項 11】

前記細胞傷害剤はリンカーを介して前記抗体またはその抗体断片に接合されている、請
求項 9 に記載の抗体薬物接合体。

【請求項 12】

前記リンカーは切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーである、請求項 11 に
記載の抗体薬物接合体。

【請求項 13】

前記抗体薬物接合体は細胞傷害剤を含んでおり、前記細胞傷害剤は DNA 損傷剤または
細胞骨格阻害剤である、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体薬物接合体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗体断片、または、請求項 9 ~
13 のいずれか一項に記載の抗体薬物接合体を含む薬学組成物。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗体断片、または、請求項 9 ~
13 のいずれか一項に記載の抗体薬物接合体、及びこれの使用指針を含むキット。

【請求項 16】

腫瘍細胞を死滅させるための薬学組成物であって、
前記組成物の前記抗体が前記腫瘍細胞に接触させられる、請求項 14 に記載の薬学組成
物。

【請求項 17】

治療が必要な対象において癌を治療するための薬学組成物であって、
前記組成物が前記対象に投与される、請求項 14 に記載の薬学組成物。

【請求項 18】

前記癌は上皮癌を含む、請求項 17 に記載の薬学組成物。

【請求項 19】

前記癌は乳癌、大腸癌、肺癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌及び肝癌の少なくとも1つである、請求項17に記載の薬学組成物。

【請求項20】

対象で腫瘍容積を減少させるための薬学組成物であって、
前記組成物が前記対象に投与される、請求項14に記載の薬学組成物。

【請求項21】

抗腫瘍細胞免疫活性を増加させるための薬学組成物であって、
前記組成物の前記抗体が1つ以上の免疫耐性腫瘍細胞に接触させられる、請求項14に記載の薬学組成物。

【請求項22】

前記抗腫瘍細胞免疫活性は先天的免疫活性を含む、請求項21に記載の薬学組成物。

【請求項23】

前記先天的免疫活性はナチュラルキラー（NK）細胞の抗腫瘍細胞活性を含む、請求項22に記載の薬学組成物。

【請求項24】

前記抗腫瘍細胞免疫活性は後天的免疫活性を含む、請求項21に記載の薬学組成物。

【請求項25】

前記後天的免疫活性はB細胞の抗腫瘍細胞活性を含む、請求項24に記載の薬学組成物。

【請求項26】

前記後天的免疫活性は樹状細胞（DC）の抗腫瘍細胞活性を含む、請求項24に記載の薬学組成物。

【請求項27】

前記組成物はCD80、CD86、IL12、及びTNF からなる群から選ばれた1つ以上の因子のDC発現を増加させる、請求項26に記載の薬学組成物。

【請求項28】

治療が必要な対象で免疫耐性腫瘍を治療するための薬学組成物であって、
前記組成物が前記対象に投与される、請求項14に記載の薬学組成物。

【請求項29】

対象から癌幹細胞（CSC）を減少または取り除くための薬学組成物であって、前記組成物が前記対象に投与される、請求項14に記載の薬学組成物。

【請求項30】

前記CSCは乳房組織、卵巣組織、膵臓組織、膀胱組織、子宮頸組織、大腸組織、及び肺組織の少なくとも1つに存在する、請求項29に記載の薬学組成物。

【請求項31】

前記CSCはCD133及びCD44バイオマーカーの少なくとも一方を含む、請求項29または30に記載の薬学組成物。

【請求項32】

前記対象に1つ以上の化学療法剤がさらに投与される、請求項29～31のいずれか一項に記載の薬学組成物。

【請求項33】

前記1つ以上の化学療法剤はパクリタキセル及びカルボプラチンからなる群から選ばれる、請求項32に記載の薬学組成物。

【請求項34】

- (a) 配列番号108のアミノ酸配列を含むCDRL1と、
- (b) 配列番号123のアミノ酸配列を含むCDRL2と、
- (c) 配列番号135のアミノ酸配列を含むCDRL3と、
- (d) 配列番号81のアミノ酸配列を含むCDRH1と、
- (e) 配列番号84のアミノ酸配列を含むCDRH2と、
- (f) 配列番号96のアミノ酸配列を含むCDRH3と、を含む、可変ドメインを含む

むキメラ抗原受容体（CAR）であって、

前記可変ドメインが、シアリル化されたTn抗原（STn）に結合する、キメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項35】

前記可変ドメインは、配列番号37のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）と、配列番号38のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）とを含む、請求項34に記載のCAR。

【請求項36】

請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片をコードする構造体。

【請求項37】

請求項34または35に記載のCARをコードする構造体。

【請求項38】

請求項36または37に記載の構造体を含む単離細胞。

【請求項39】

請求項36または37に記載の構造体を含むウイルス。

【請求項40】

STnを発現する細胞及び組織の少なくとも一方を同定する方法であって、

請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片を、前記細胞及び組織の少なくとも一方に接触させることを含む、方法。

【請求項41】

組織または器官における癌性細胞を同定する試験管内方法であって、

請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片を、前記組織または器官の試料に接触させることを含む、方法。

【請求項42】

前記組織または器官は乳房、卵巣または脾臓である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

組織または器官における癌性細胞を同定するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片を含む、薬学組成物。

【請求項44】

前記組織または器官は乳房、卵巣または脾臓である、請求項43に記載の薬学組成物。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0015

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0015】

一部の具現例において、本発明の抗体は抗体 薬物接合体を含む。一部の抗体 薬物接合体は治療剤を含む。一部の抗体 薬物接合体は細胞傷害剤を含む。一部の場合、細胞傷害剤は抗体に直接接合される。一部の場合、細胞傷害剤はリンカー（linker）を介して抗体に接合される。このようなリンカーは切断可能なリンカー、または切断不可能なリンカーを含んでもよい。一部の場合、細胞傷害剤はDNA損傷剤である。一部の場合、細胞傷害剤は細胞骨格阻害剤である。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0039

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0039】

結合された：本願において用いられたように、用語「結合された」、「接合された」、「連結された」、「付着された」及び「束ねられた」は、2つ以上の部分構造に対して使

用される場合、部分構造が直接的にまたはリンカーとして作用する1つ以上の追加の部分構造を介して互いに物理的に結合または連結され、構造体を使用される条件、例えば生理学的な条件下部分構造が物理的に結合されたままで維持されるように十分に安定した構造を形成することを意味する。「結合」は直接的な共有化学結合を介した厳格なものである必要はない。これは、また「結合された」実体が物理的に結合された状態を維持するように十分に安定したイオン結合または水素結合または混成化ベース連結を示唆する。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0047

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0047】

細胞傷害性の：本願において用いられたように、用語「細胞傷害性の」は細胞（例えば、哺乳類の細胞（例えば、ヒト細胞））、バクテリア、ウイルス、菌類、原生動物、寄生虫、プリオンまたはこれらの組み合わせを死滅させるか、またはこれに有害、毒性、または致命的な影響を及ぼす製剤を称する。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0138

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0138】

高親和性抗体をコードするDNA配列は、親和性成熟（maturation）として公知された追加の選別段階で突然変異される。本願において用いられたように、用語「親和性成熟」は、抗体が、抗体または抗体断片コードcDNA配列の突然変異及び選別の連続的な段階を介して与えられた抗原に対する親和性を増加させることで、生産される方法を称する。一部の場合、このような方法は試験管内で行われる。これを達成するために、CDRコード配列の増幅は、非制限的に点突然変異、局地的突然変異、挿入突然変異及び欠失突然変異を含む、突然変異を含有する数百万個のコピーを生成するために、エラーが発生しやすいPCRを使用して行われる。本願において用いられたように、用語「点突然変異」は、ヌクレオチド配列内の1つのヌクレオチドが異なるヌクレオチドに変化された核酸突然変異を称する。本願において用いられたように、用語「局地的突然変異」は、2つ以上の連続的なヌクレオチドが異なるヌクレオチドに変化された核酸突然変異を称する。本願において用いられたように、用語「挿入突然変異」は、1つ以上のヌクレオチドがヌクレオチド配列内に挿入された核酸突然変異を称する。本願において使用されたように、用語「欠失突然変異」は1つ以上のヌクレオチドが核酸配列から取り除かれた核酸突然変異を称する。挿入または欠失突然変異は開始コドンの1つまたは2つのヌクレオチドを変更させることで全体コドンの完全な置換、または1つのコドン进行他のコドンに変化させることを含む。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0519

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0519】

【表 6 - 3】

57	Neu5Aca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
58	Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
59	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
60	Neu5Aca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
61	Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
62	Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
63	Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
64	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₃ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
65	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₃ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
66	Neu5Aca2,6(Neu5Aca2,3)Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
67	Neu5Aca2,6(Neu5Gca2,3)Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
68	Neu5Aca2,6(KDNα2,3)Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
69	Neu5Gca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
70	KDNα2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
71	Neu5Aca2,8Kdα2,6Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
72	Neu5Aca2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
73	Neu5Aca2,8Neu5Gca2,6Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
74	KDNα2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
75	Neu5Gca2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
76	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,6Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

15 ml の 2 M トリス緩衝液 (pH 8) を 0.9 ml の 16.6 M エタノールアミン及び 284.1 ml の精製水と組み合わせて 300 ml のエポキシブロッキング緩衝液を調製する。前記溶液を HCl を用いて最終 pH が 9.0 になるようにする。前記溶液を 0.2 μM のニトロセルロース膜を用いて濾過する。エポキシ緩衝溶液及び 1 L の精製水を 50 に事前に加温する。ガラススライドをスライドホルダーに配列して事前に加温したエポキシブロッキング緩衝液がある染色槽に迅速に浸漬させる。スライドをエポキシブロッキング緩衝液とともに 50 で 1 時間周期的に振盪しながらインキュベーションしてエポキシの結合部位を不活性化させる。次に、スライドをすすぎ、1% の OVA が含まれた PBS で 25 で 1 時間ブロッキングさせる。ポリクローナル抗体 (1:1000) または精製されたモノクローナル抗体 (1 μg/ml) が含まれた血清試料を 1% OVA が含まれた PBS で希釈して 25 で 1 時間グリカンアレイに添加する。広範囲に洗浄した後に、Cy3 接合された抗マウス IgG とともにグリカンマイクロアレイスライドで 1 時間インキュベーションして抗体結合を検出する (Jackson ImmunoResearch、ペンシルベニア州ウェストグロブ所在)。次にスライドを広範囲に洗浄して乾燥させ、Genepix 4000 B スキャナー (100% レーザー、350 で獲得、10

μ mピクセル)でスキャンする。スキャンイメージからのローデータをGenePixソフトウェアを使用して抽出してローデータ分析を行う。抗体は、これらがAcSTn及びGcSTnの両分子に結合するが、Tnまたはアレイ上の他のグリカンに結合しない場合AcSTn及びGcSTnに対して非常に特異的であるとみなされる。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0533

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0533】

【表9-2】

7D4 - 2A2 - 2F2	IgG2a,k	0.7	ND	14.1	ND	ND	ND	ND	ND
7D4 - 1H12 - 2B3	IgG2a,k	1.2	0.9	0.7	1.0	619	0.54	1.13	912
4G8 - 1E3	IgG2a,k	1.0	1.3	0.8	0.8	153	1.0	1.1	221
2C2 - 2C5	IgG3,k	1.1	2.0	1.0	1.1	141	1.08	1.05	342
10F4 - 2A9	IgG3,k	5.1	ND	1.9	ND	ND	ND	ND	ND

グリカンアレイの特性分析結果を以下の表に示した。グリカンアレイを分析する間に各抗体に対して獲得された一番高い水準の信号が示され、それぞれの抗体が結合されたグリカン及び各グリカンに対して獲得された信号強度に基づく結果の群及び特異性決定が示されている。実施例1の方法によって群を決定した。特異性決定はまたAc対Gc構造との結合強度を考慮する。

【誤訳訂正8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0561

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0561】

ヒト定常領域を有する完全にヒト化された抗体をコードする発現プラスミドを構築するために、哺乳類発現ベクターの上流サイトメガロウイルス極初期プロモーター/エンハンサー(CMV IE)及び免疫グロブリンシグナル配列と下流免疫グロブリン定常領域の遺伝子との間に、それぞれの可変領域のためのDNA配列を挿入する。哺乳類細胞への形質移入のためのDNA試料を調製する。

【誤訳訂正9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0567

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0567】

[実施例17: S3F抗体の製造]

3F1 IgG1可変ドメイン(SBH Biosciences、マサチューセッツ州ネイティック所在)をIgG2抗体の抗体定常ドメイン領域と結合させてS3F IgG2a抗体を製造した。3F1の重鎖及び軽鎖可変ドメインを配列分析して、IgG2発現ベクター、抗体重鎖に対するプラスミドH1206(LakePharma、カリフォルニア州ベルモント所在)及び抗体軽鎖に対するプラスミドL1206(LakePharma、カリフォルニア州ベルモント所在)、の上流に3F1可変ドメインをコードする

構造体を製作した。関連の配列を以下の表に示した。

【誤訳訂正 1 0】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 5 8 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 5 8 1】

C S C 下位分画で抗 S T n 抗体 S 3 F の影響を測定するために使用される後続検定を最適化するために、記述 (F r i e l など、C e l l c y c l e、2 0 0 8、7、2 4 2 2 4 9) されたように増殖検定を必ず行う。2 つの選択された卵巢癌腫細胞株それぞれからの可能な 8 つの分類された C S C 下位分画の組み合わせと 2 つの母系からの細胞とを 2 4 ウェル培養プレートに 3 重複で (5×10^3 細胞 / ウェルで開始して希釈) シーディングする。1、3、5、7、8、及び 9 日目、または必要な場合それ以上の日にトリパンブルー色素排除によって決定されるように、M T T 検定を介して血球計算板及びまたはプレートリーダーを使用して生存細胞を計数する。スチューデントの t 検定を用いて群を比較しており、0 . 0 5 以下の p 値を有する比較は有意であるとみなす。このような結果に基づいて、細胞傷害検定を行うための副次的なプロトコルを設ける。

【誤訳訂正 1 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 5 8 2

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 5 8 2】

細胞傷害検定を行って、S 3 F m A b のみ、S 3 F + バクリタキセル + カルボプラチン、または、これら化学療法剤混合物のみに対する、各細胞株からの 8 つの S T n + 及び S T n 分類された下位分画、及び母系からの細胞の感受性を評価する。S 3 F (対照群として、無関係のアイソタイプマッチングされた抗体とともに) を 0 . 1 μ M から開始していくつかの希釈で試験する。化学療法剤を 0 . 1、1 . 0、1 0、及び 1 0 0 n M で使用する。適切なピヒクル対照群もまた含み、検定は前述 (F r i e l など、C e l l c y c l e、2 0 0 8、7、2 4 2 2 4 9) のように必ず行う。分類された C S C 下位分画を 2 4 ウェル培養プレートに細胞増殖検定で決定された細胞の数で 3 重複でシーディングし、5 0 % のコンフルエンスに到達するようにする。次に、細胞に抑制剤を添加してから 2 4 時間飢餓状態にする。細胞生存能を前述のように 2、4 及び 5 日目及び必要な場合はそれ以上の日に測定する。スチューデントの t 検定を用いて群を比較して、0 . 0 5 以下の p 値を有する比較は有意であるとみなす。