(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2024-106693
(P2024-106693A)
(43)公開日　令和6年8月8日(2024.8.8)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA	4C085
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00		4H045
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	E	
G01N 33/574	*(2006.01)*	A61K	39/395	T	
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/574	B	

審査請求　未請求　請求項の数　6　ＯＬ　（全34頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-11092(P2023-11092)
(22)出願日　令和5年1月27日(2023.1.27)
（出願人による申告）令和２年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業）」委託研究、産業技術力強化法第１７条の適用を受ける特許出願

(71)出願人　502285457
学校法人順天堂
東京都文京区本郷２－１－１
(71)出願人　301021533
国立研究開発法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関１－３－１
(74)代理人　110000084
弁理士法人アルガ特許事務所
(72)発明者　入村 達郎
東京都文京区本郷２－１－１ 順天堂大学内
(72)発明者　永井（伝田） 香里
東京都文京区本郷２－１－１ 順天堂大学内
(72)発明者　野地 美樹
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体

(57)【要約】　（修正有）
【課題】シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体を作製し、その機能を明らかにすること。
【解決手段】ＭＵＣ１タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体又はその機能的断片。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＭＵＣ１タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体又はその機能的断片。
【請求項２】
ＭＵＣ１タンデムリピートのアミノ酸配列が、ＡＨＧＶＴＳＡＰＤＴＲＰＡＰＧＳＴＡＰＰＡＨＧＶ（配列番号１）である、請求項１記載の抗体又はその機能的断片。
【請求項３】
次の（ａ）～（ｆ）から選ばれるものである、請求項１又は２記載の抗体又はその機能性断片。
（ａ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＹＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＹＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。
（ｂ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号７に示されるアミノ酸配列、又は配列番号７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号１０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号１１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。
（ｃ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号１２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号１３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号１４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、

若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号１５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号１６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

（ｄ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号１７に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号１８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号１９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号２０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号２１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであるモノクローナル抗体又は機能的断片。

（ｅ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号２３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号２４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号２５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号２６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

（ｆ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２７に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号２８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号２９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号３０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３０に示されるアミノ酸

配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＳＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＳＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号３１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

【請求項４】

請求項１～３のいずれか１項記載の抗体又はその機能的断片を含有するがん細胞又はがん組織検出用試薬。

【請求項５】

請求項１～３のいずれか１項記載の抗体又はその機能的断片を含有するがん予防又は治療薬。

【請求項６】

請求項１～３のいずれか１項記載の抗体又はその機能性断片を用いて、生体試料中のＭＵＣ１タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を検出する工程を有する、がん細胞又はがん組織の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体及びその利用に関する。

【背景技術】

【０００２】

ムチンはＯ－結合型糖鎖を多数付加している上皮の表層側に発現する糖タンパク質で、セリン及び／又はスレオニンを多数含むアミノ酸配列の繰り返し（タンデムリピート）を持つ。ムチンのコアポリペプチドの遺伝子はヒトでは約２０種知られている。膜貫通ドメインを持つ膜型と分泌型がある。基本的な機能は上皮表面の保護と潤滑である。

このうち、ムチン１（ＭＵＣ１）は膜型ムチンでタンデムリピートドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインを持つ。細胞質ドメインは、シグナル伝達、アポトーシスの抑制などに関わる。ＭＵＣ１はがん細胞で発現が亢進し、糖鎖付加状態や糖鎖構造が異なることから、それ自身がワクチンとして、抗ＭＵＣ１抗体は、ＡＤＣ、ＣＡＲ－Ｔ、などとして利用できる可能性があり、開発が進められている。

【０００３】

１９８０年代に、がん細胞に対する結合性がその由来する正常上皮細胞に比べて高いことを指標に世界各地の多くの研究室で得られたモノクローナル抗体が結合する相手（抗原）が、ＭＵＣ１として同定された。抗ＭＵＣ１抗体には、そのＭＵＣ１への結合が糖鎖付加によって影響を受けるものがあることが判明していたが、特異性や結合性の正体は不明であった。

【０００４】

乳がんにおいては、がん細胞はＭＵＣ１の産生量が高いだけでなく、糖鎖付加数が少なく、糖鎖が短小である場合が多く、このことが抗体の結合性の違いと関係する（抗体ががん特異性を持つ）との報告が多く見られた（非特許文献１）。臨床現場では、抗ＭＵＣ１抗体（ＤＦ３と１１５Ｄ８の組み合わせ）が乳がんの負荷状態（ｔｕｍｏｒ　ｂｕｒｄｅｎ）を示す血清マーカーであるＣＡ１５－３の検出に広く用いられて来た（非特許文献２）。

また、本発明者らは、ＭＵＣ１に種々の糖鎖を付加したポリペプチドを認識する抗ＭＵＣ１抗体を作製し、その特異性を報告した（非特許文献３－５）。

【先行技術文献】

【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ．Ｊ．１７：６４９－６５８，２０００
【非特許文献２】Ｄｉｓ．Ｍａｒｋｅｒｓ．２０１８：９８６３０９２，２０１８
【非特許文献３】Ｊｐｎ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．８７（５）：４８８－４９６，１９９６
【非特許文献４】Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ．２７０（２）：１９９－２０９，２００２
【非特許文献５】Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．９（１）：１６６４１，２０１９
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
　しかしながら、シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体は作製されておらず、当該抗体がどのような機能を示すのかは知られていなかった。
　従って、本発明の課題は、シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体を作製し、その機能を明らかにすることにある。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
　そこで本発明者は、ＭＵＣ１タンデムリピートの種々の位置にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体を作製し、その結合特異性を検討したところ、ＭＵＣ１タンデムリピートの特定の位置にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１又はその機能的断片が、これらのシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１に対する特異性が高く、また種々のがん細胞に特異的に結合することから、がんの診断やがんの予防又は治療剤として有用であることを見出し、本発明を完成した。
【０００８】
　すなわち、本発明は、次の発明［１］～［９］を提供するものである。
［１］ＭＵＣ１タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体又はその機能的断片。
［２］ＭＵＣ１タンデムリピートのアミノ酸配列が、ＡＨＧＶＴＳＡＰＤＴＲＰＡＰＧＳＴＡＰＰＡＨＧＶ（配列番号１）である、［１］記載の抗体又はその機能的断片。
［３］次の（ａ）～（ｆ）から選ばれるものである、［１］又は［２］記載の抗体又はその機能性断片。
（ａ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＹＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＹＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。
（ｂ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号７に示されるアミノ酸配列、又は配列

番号７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号１０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号１１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

（ｃ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号１２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号１３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号１４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号１５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号１６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

（ｄ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号１７に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号１８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号１９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号２０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号２１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであるモノクローナル抗体又は機能的断片。

（ｅ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２

が配列番号２３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号２４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号２５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号２６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

（ｆ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２７に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号２８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号２９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号３０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＳＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＳＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号３１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

［４］［１］～［３］のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を含有するがん細胞又はがん組織検出用試薬。

［５］［１］～［３］のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を含有するがん予防又は治療薬。

［６］［１］～［３］のいずれかに記載の抗体又はその機能性断片を用いて、生体試料中のＭＵＣ１タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を検出する工程を有する、がん細胞又はがん組織の検出方法。

［７］がんの予防又は治療薬製造のための、［１］～［３］のいずれかに記載の抗体又はその機能性断片の使用。

［８］がんを予防又は治療するための、［１］～［３］のいずれかに記載の抗体又はその機能性断片。

［９］［１］～［３］のいずれかに記載の抗体又はその機能性断片を投与することを特徴とするがんの予防又は治療方法。

【発明の効果】

【０００９】

本発明の抗体は、シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１に特異的であり、種々のがん細胞に特異的に結合することから、がんの診断や癌の予防又は治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】免疫原としての糖ペプチドの製造ステップと製造ステップ毎のＨＰＬＣチャートを示す。
【図２】免疫原として合成した各種糖ペプチドの構造とマウスへの免疫操作を示す。
【図３】免疫原として合成した各種糖ペプチドを投与して得られたマウス抗血清と抗原との反応性（ＥＬＩＳＡ）を示す。
【図４】免疫原として合成した各種糖ペプチドを投与して得られたマウス抗血清の細胞染色結果（ハイコンテントＡｎａｌｙｓｉｓ）を示す。
【図５】ハイブリドーマＭ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４の細胞染色像を示す。
【図６】Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体のウエスタンブロッティング結果を示す。
【図７】Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体の組織免疫染色マクロ像を示す。
【図８】Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体のがん細胞免疫染色結果を示す。
【図９】ＳＴｎ－ＭＵＣ１－ＩｇＧタンパク質のウエスタンブロッティング結果を示す。
【図１０】２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体のがん細胞への結合性（フローサイトメトリー）を示す（１）。
【図１１】２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体のがん細胞への結合性（フローサイトメトリー）を示す（２）。
【図１２】２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体のエピトープ解析結果を示す。
【図１３】２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４抗体のエピトープ解析結果を示す。
【図１４】Ｍ３Ｓ－４、Ｍ５Ｓ－１０抗体のエピトープ解析結果を示す。
【図１５】２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体のＶＨ鎖とＶＬ鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３のアミノ酸配列を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
本発明の一態様は、ＭＵＣ１タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体又はその機能的断片である。
前述のように、ＭＵＣ１は膜型ムチンでタンデムリピートドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインを持つ。細胞質ドメインは、シグナル伝達、アポトーシスの抑制などに関わる。ＭＵＣ１はがん細胞で発現が亢進し、糖鎖付加状態や糖鎖構造が異なることから、それ自身がワクチンとして、また抗ＭＵＣ１抗体は、ＡＤＣ、ＣＡＲ－Ｔ、などとして利用できる可能性があり、開発が進められている。しかし、本発明のようなシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体は知られていない。
【００１２】
本発明において、ＭＵＣ１タンデムリピートのアミノ酸配列は、ＡＨＧＶＴＳＡＰＤＴＲＰＡＰＧＳＴＡＰＰＡＨＧＶ（配列番号１）である。
当該タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基には、種々の糖鎖が結合していることが知られているが、本発明では、これらのアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を認識する抗体を作製することとした。従って、本発明の抗体が認識するＭＵＣ１としては、例えば、次の下線部のアミノ酸残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１が挙げられる。
【００１３】

【表１】

AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ａ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｂ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｃ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｄ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｅ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｆ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｇ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｈ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｉ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｊ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｋ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｌ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｍ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｎ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｏ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｐ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｑ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｒ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｓ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｔ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｕ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｖ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｗ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｘ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｙ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ｚ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１α）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１β）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１γ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１Δ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１θ）
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV（１ε）

【００１４】
これらのシアリルＧａｌＮＡｃ結合ＭＵＣ１のうち、可能性の高い生合成経路の観点から、Ｔ５又はＴ１７にシアリルＧａｌＮＡｃを持つものに結合性を有するものがより好ましく、Ｔ１０にシアリルＧａｌＮＡｃを持つものに結合性を有するものがさらに好ましい。また、同じ位置に異なる（シアリルＧａｌＮＡｃ以外の）糖鎖（シアリルＧａｌ－ＧａｌＮＡｃ、Ｇａｌ－ＧａｌＮＡｃ、ＧａｌＮＡｃなど）を有するＭＵＣ１あるいは糖鎖を有しないＭＵＣ１に交差結合性がないものが最も好ましい。
【００１５】
本発明の抗体としては、重鎖及び軽鎖のＣＤＲのアミノ酸配列が次のものである抗体が

好ましい。
（ａ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＹＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＹＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。
（ｂ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号７に示されるアミノ酸配列、又は配列番号７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号１０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号１１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。
（ｃ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号１２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号１３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号１４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号１５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号１６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。
（ｄ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号１７に示されるアミノ酸配列、又は配

列番号１７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号１８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号１９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号１９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号２０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号２１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであるモノクローナル抗体又は機能的断片。

（ｅ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２２に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２２に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号２３に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２３に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号２４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２４に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号２５に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２５に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＤＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＤＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号２６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２６に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

（ｆ）免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ１が配列番号２７に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２７に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ２が配列番号２８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２８に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＨ鎖のＣＤＲ３が配列番号２９に示されるアミノ酸配列、又は配列番号２９に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ１が配列番号３０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３０に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ２がＳＴＳで示されるアミノ酸配列、又はＳＴＳで示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、免疫グロブリンＶＬ鎖のＣＤＲ３が配列番号３１に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３１に示されるアミノ酸配列において１～数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである抗体又は機能的断片。

【００１６】

前記抗体のうち、有用性の観点から、ｐＨ感受性が低いものが好ましい。また安定性の高いものがより好ましい。

【００１７】
前記配列番号２～３１に示されるアミノ酸配列における、１～数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列としては、配列番号２～３１において１～１０個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列が好ましく、１～８個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列がより好ましく、１～５個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列がさらに好ましく、さらに１～２個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列がさらに好ましい。また、配列番号２～３７に示されるアミノ酸配列と、配列番号２～３１に示されるアミノ酸配列の１～数個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列の同一性は、８０％以上が好ましく、８５％以上がより好ましく、９０％以上がさらに好ましく、９５％以上がよりさらに好ましく、９８％以上がよりさらに好ましい。

【００１８】
本発明の好ましい抗体は、前記（ａ）～（ｆ）の各ＣＤＲの配列を有するものであって、これらの領域以外の領域のアミノ酸配列は特に制限されない。従って、本発明の抗体は、ヒト抗体のようなラット以外の哺乳動物抗体でもよく、ヒト化抗体でもよい。より具体的には、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなるキメラ抗体であっても良く、この様な抗体はラット抗体の可変領域をコードするＤＮＡをヒト抗体の定常領域をコードするＤＮＡと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、再構成（ｒｅｓｈａｐｅｄ）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体のＣＤＲをヒト抗体のＣＤＲへ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体例として、マウス抗体のＣＤＲとヒト抗体のフレームワーク領域（ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　ｒｅｇｉｏｎ；ＦＲ）を連結するように設計したＤＮＡ配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからＰＣＲ法により合成する。得られたＤＮＡを、ヒト抗体定常領域をコードするＤＮＡと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号ＥＰ２３９４００、国際特許出願公開番号ＷＯ９６／０２５７６参照）。ＣＤＲを介して連結されるヒト抗体のＦＲは、ＣＤＲが良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体のＣＤＲが適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のＦＲのアミノ酸を置換してもよい（Ｓａｔｏ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ，１９９３，５３，８５１－８５６．）。

【００１９】
また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をｉｎ　ｖｉｔｒｏで所望の抗原又は所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばＵ２６６と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平１－５９８７８参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（ＷＯ９３／１２２２７，ＷＯ９２／０３９１８，ＷＯ９４／０２６０２，ＷＯ９４／２５５８５，ＷＯ９６／３４０９６，ＷＯ９６／３３７３５参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするＤＮＡ配列を決定することができる。抗原に結合するｓｃＦｖのＤＮＡ配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、ＷＯ９２／０１０４７，ＷＯ９２／２０７９１，ＷＯ９３／０６２１３，ＷＯ９３／１１２３６，ＷＯ９３／１９１７２，ＷＯ９５／０１４３８，ＷＯ９５／１５３８８を参考にすることができる。

【００２０】
抗体のクラスは特に限定されず、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤあるいはＩｇＥ等の

いずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。精製の容易性等を考慮すると好ましくはＩｇＧである。

【００２１】

機能的断片としては、抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体や抗体の修飾物が挙げられる。抗体断片の具体例としては、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｄｉａｂｏｄｙなどを挙げることができる。

【００２２】

本発明の抗体は、例えば、前記ＭＵＣ１タンデムリピートのＴ５、Ｓ６、Ｔ１０、Ｓ１６及びＴ１７から選ばれるアミノ酸残基の１残基～５残基にシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を合成し、これを免疫原としてマウスなどの動物に免疫する。免疫動物の脾細胞と動物ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得る。得られたハイブリドーマから、例えば、ヒト乳がん細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４６８とＭＤＡ－ＭＢ－４６８にシアリルＧａｌＮＡｃを合成する酵素遺伝子Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１を導入したトランスフェクタントを用いたハイコンテントＡｎａｌｙｓｉｓ（ＨＣＡ）により、目的とする抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすればよい。

また、シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１タンパク質を免疫原としてマウスなどの動物に免疫する。免疫動物の脾細胞と動物ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得る。得られたハイブリドーマから、ヒト乳がん細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４６８とＭＤＡ－ＭＢ－４６８－Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１トランスフェクタント及びマウス大腸がん細胞株ＳＬ４、ＳＬ４にＳｔ６ｇａｌｎａｃ１を導入したＳＬ４－Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１トランスフェクタント、ＭＵＣ１遺伝子を導入したＳＬ４－ＭＵＣ１トランスフェクタント、ＳＬ４にＭＵＣ１遺伝子とＳｔ６ｇａｌｎａｃ１を導入したＳＬ４－ＭＵＣ１－Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１トランスフェクタントを用いたＦＡＣＳによるスクリーニングにより、目的とする抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすればよい。

【００２３】

本発明の抗体は、後記実施例に示すように、種々のがん細胞に特異的に結合することから、がん細胞又はがん組織検出用試薬、或いはがん予防又は治療薬として有用である。

すなわち本発明の一態様は、前記本発明の抗体又はその機能的断片を含有するがん細胞又はがん組織検出用試薬である。

また、本発明の別の一態様は、前記本発明の抗体又はその機能的断片を含有するがん予防又は治療薬である。

ここで、本発明において、検出対象又は予防治療対象となるがんとしては、糖付加ＭＵＣ１を発現しているがんであればよく、乳がん、大腸がん、肺扁平上皮がん、肺腺がん、食道がん、すい臓がん、卵巣がんがより好ましい。

【００２４】

前記がん細胞又はがん組織検出用試薬は、任意の生体試料に前記本発明の抗体若しくはその機能的断片又はそれらの標識体を反応させて、生体試料中のシアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１を検出することにより行われる。

シアリルＧａｌＮＡｃが結合したＭＵＣ１の検出手段としては、液体クロマトグラフィー質量分析法、免疫学的法、特異的結合能を有する低／中分子や核酸あるいは核酸誘導体を用いた方法等が挙げられるが、簡便かつ測定感度が高い免疫学的方法が好ましい。

免疫学的方法としては、イムノクロマト法、酵素標識免疫学的測定法（ＥＩＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、凝集法、比濁法、フローサイトメトリー法、組織免疫染色法、ウエスタンブロット等のイムノブロット法等のいずれも用いることができる。ここでイムノブロット法は、ポリペプチドをメンブレンに転写し、メンブレン上のポリペプチドを抗体で検出する方法である。抗体の検出には、酵素標識、蛍光標識等が用いられる。

【００２５】

本発明のがん予防又は治療薬は、前記の抗体を含有すればよいが、薬学的に許容しうる担体とともに、混合、溶解、乳化、カプセル封入、凍結乾燥等により、製剤化して医薬組

成物として製造することができる。
本発明のがん予防又は治療薬の投与経路としては、注射剤が好ましい。注射用の処方においては、本発明の抗体を水性溶液、好ましくはハンクス溶液、リンゲル溶液、又は生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中に溶解することができる。さらに、本発明の医薬は、油性又は水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、又は乳濁液等の形状をとることができる。あるいは、本発明抗体を粉体の形態で製造し、使用前に滅菌水等を用いて水溶液又は懸濁液を調製してもよい。

【００２６】

また本発明の抗体を用いれば、新たながん予防又は治療薬をスクリーニングすることもできる。すなわち、例えば、本発明の抗体と拮抗する薬物をスクリーニングすれば、その薬物はがん予防又は治療薬として有用である可能性がある。

【実施例】

【００２７】

次に実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【００２８】

実施例１（糖ペプチド免疫による抗シアリルＧａｌＮＡｃ（以下、ＳＴｎと略することもある）－ＭＵＣ１抗体の作製）

【００２９】

（糖ペプチドの作製）

ＭＵＣ１糖ペプチド（ＳＴｎ－ＭＵＣ１）は、ＭＵＣ１の中のＯ結合型糖鎖修飾が起こるセリン（Ｓｅｒ、Ｓ），スレオニン（Ｔｈｒ、Ｔ）に富んだ繰り返し配列を利用した。実験には、図１に示す２７アミノ酸を用い、免疫抗原にはＮ末端にシステイン（Ｃｙｓ、Ｃ）を追加した。このＮ末端にシステインが結合したペプチドのアミノ酸配列を配列番号３８に示す。また、Ｎ末端にシステインが結合していないペプチドのアミノ酸配列を配列番号３９に示す。以下の実施例では、糖鎖修飾位置は、この配列番号３９に示すアミノ酸配列中のシステイン残基及びスレオニン残基の番号を記載する。従って、実施例中のアミノ酸残基の番号と配列番号１基準のアミノ酸残基の番号とは、３相違する。

アミノ酸配列中には、５箇所のＯ結合型糖鎖修飾が起こる可能性のあるＳ／Ｔが存在し（Ｔ８，Ｓ９，Ｔ１３，Ｓ１９，Ｔ２０）、５箇所全てにＳＴｎが結合した糖ペプチドをＭＵＣ１＿５ＳＴｎ、Ｔ８，Ｓ１９，Ｔ２０の３箇所にＳＴｎが結合した糖ペプチドをＭＵＣ１＿３ＳＴｎとした。

【００３０】

抗原に用いたＭＵＣ１＿５ＳＴｎ、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎ糖ペプチドは、ペプチド合成装置で化学合成したＧａｌＮＡｃペプチドを基質に、糖転移酵素ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１を用いてシアル酸を転移して作製した。糖ペプチドの化学合成と糖転移酵素による修飾については非特許文献３記載の方法に基づいて実施した。

【００３１】

ＭＵＣ１＿３ＳＴｎの合成については、反応液（１７０ｕＬ：ＭＯＰＳ　１００ｍＭ、塩化マンガン　１０ｍＭ、合成糖ペプチド　０．４１ｍＭ，ＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃ　４．９ｍＭ，ＰＭＳＦ　１ｍＭ，ｃＯｍｐｌｅｔｅ™（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）、Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ　１．５Ｕ、ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１　４５ｕＬ）を３７℃でインキュベーションした。反応開始約２４時間後にＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳ及びＨＰＬＣにより反応の進行を確認後、ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１（５０ｕＬ）、ＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃ（１００ｍＭ溶液５ｕＬ）、塩化マンガン（１００ｍＭ溶液５ｕＬ）、ＭＯＰＳ（１０００ｍＭ溶液５ｕＬ）、Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（２ｕＬ，１Ｕ）、ｃＯｍｐｌｅｔｅ™（２５Ｘ溶液、３ｕＬ）を酵素反応液に追加し再び３７℃でインキュベーションした。反応開始後４８、７２時間の時点でも反応の進行状況をＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ及びＨＰＬＣで確認し、ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１（７０ｕＬ）、ＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃ（１００ｍＭ溶液４ｕＬ）、Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａ

ｔａｓｅ（２ｕＬ，１Ｕ）、ｃＯｍｐｌｅｔｅ™（２５Ｘ溶液、２ｕＬ）をそれぞれの時点で添加した。反応開始約９０時間後、反応液を減圧乾固し、残渣を１４０ｕＬの水に溶かした後、フィルター濾過しＨＰＬＣによる精製を行い、２５．１ｎｍｏｌ（収率３６％，溶出時間１３．０ｍｉｎ）の３ＳＴｎ体を得た（図１（ａ））。なおＨＰＬＣは、カラムとしてＩｎｅｒｔＳｕｓｔａｉｎＡＱ－Ｃ１８（５ｕｍ，４．６ｘ２５０ｍｍ、ジーエルサイエンス社製）を用い、溶媒Ａ（１０ｍＭ　トリエチルアミン酢酸水溶液（ＴＥＡＡ）と溶媒Ｂ（１０ｍＭ　ＴＥＡＡ　ｉｎ　アセトニトリル）を９：１で混合した溶媒で平衡化し、２０分間で８：２まで直線的に上昇させることで溶出を行った。

【００３２】

ＭＵＣ１＿５ＳＴｎの合成については、反応液（１７８ｕＬ：ＭＯＰＳ　１００ｍＭ，塩化マンガン　１０ｍＭ，基質　０．３９ｍＭ，ＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃ　９．４ｍＭ，ＰＭＳＦ　１ｍＭ，ｃＯｍｐｌｅｔｅ™，Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ　１．５Ｕ，ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１　４５ｕＬ）を３７℃でインキュベーションした。反応開始約２４時間後にＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ及びＨＰＬＣにより反応の進行を確認後、ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１（５０ｕＬ）、ＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃ（１００ｍＭ溶液１０ｕＬ）、塩化マンガン（１００ｍＭ溶液５ｕＬ）、ＭＯＰＳ（１０００ｍＭ溶液５ｕＬ）、Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（２ｕＬ，１Ｕ）、ｃＯｍｐｌｅｔｅ™（２５Ｘ溶液、３ｕＬ）を酵素反応液に追加し再び３７℃でインキュベーションした。反応開始後４８、７２時間の時点でも反応の進行状況をＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ及びＨＰＬＣで確認し、ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１（７０ｕＬ）、ＣＭＰ－Ｎｅｕ５Ａｃ（１００ｍＭ溶液９ｕＬ）、Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（２ｕＬ，１Ｕ）、ｃＯｍｐｌｅｔｅ™（２５Ｘ溶液、２ｕＬ）をそれぞれの時点で添加した。反応開始約９０時間後、反応液を減圧乾固し、残渣を１４０ｕＬの水に溶かした後、フィルター濾過しＨＰＬＣによる精製を行い、３２．５ｎｍｏｌ（収率４６％，溶出時間１１．８ｍｉｎ）の５ＳＴｎ体を得た（図１（ｂ））。

【００３３】

（糖ペプチド抗原のマウスへの免疫）

ＭＵＣ１＿５ＳＴｎ、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎ糖ペプチド（図２（ａ））のＮ末端には予めシステイン残基が導入してあり、このシステイン残基をキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）とのコンジュゲーションに利用した。各種抗原ペプチド　０．２ｍｇ分を、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、Ｉｍｊｅｃｔ　Ｍａｌｅｉｍｉｄｅ　Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｍｃＫＬＨ　Ｓｐｉｎ　Ｋｉｔ（＃７７６６６）を使用して、ＫＬＨに結合（コンジュゲート）させた。生理食塩水に溶解した各種ＫＬＨコンジュゲート・ペプチドをＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、Ｉｍｊｅｃｔ　Ａｌｕｍ　Ａｄｊｕｖａｎｔと混合し、これをＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスあるいは、ＲＯＲγＴｇマウスへ接種した。ＭＵＣ１＿５ＳＴｎ糖ペプチドは３匹のＲＯＲγＴｇマウスと２匹のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスへ、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎ糖ペプチドは２匹のＲＯＲγＴｇマウスへ免疫を行った。免疫スケジュールを図２（ｂ）に示す。初日（Ｄａｙ０）に１０μｇ分、Ｄａｙ４に１０μｇ分、Ｄａｙ１１に１０μｇ分を腹腔内注射した。マウスの眼窩採血を定期的に行い、血清中の抗原に対する抗体価の上昇をモニタリングしながら免疫を行った。また、抗体価の上昇が期待できることから、血清及び免疫Ｂ細胞の回収を行う３日前に腹腔内への糖ペプチド抗原投与（２μｇ）によるブーストを行った。ブーストの３日後に免疫を終了し、抗体産生細胞を採取した。

【００３４】

上述のようにして免疫されたマウスから得られた、各種抗原に対する抗血清（免疫原に対する抗体が含まれている）を使用して、糖ペプチドに対する反応性（結合性）について、ＥＬＩＳＡ測定系による検出を行った。免疫に使用したＭＵＣ１＿５ＳＴｎ、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎ糖ペプチドに加え、コントロールとして糖鎖のないＭＵＣ１ペプチド抗原（ＭＵＣ１＿０ＳＴｎ）をそれぞれＥＬＩＳＡプレートに固相化し、検出側には抗血清と市販の二次抗体を用いてＥＬＩＳＡ測定系での検討を行った。

【００３５】
各種糖ペプチド（ＭＵＣ１＿５ＳＴｎ、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎ、ＭＵＣ１＿０ＳＴｎ）をＰＢＳで０．５μｇ／ｍＬとなるように希釈し、ＥＬＩＳＡ用マイクロプレート（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｃｈｅｒ社　Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｒ　Ａｍｉｎｏ）に１００ｕＬ／ウェルずつ添加しアミノ基を介して共有結合させた。４℃で一晩各抗体をプレートに吸着（固相化）させた後、溶液を廃棄して、ウェルをＰＢＳ－Ｔ（ＰＢＳ，０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０）で洗浄した。次に、抗血清の希釈系列溶液１００μＬを各ウェルに添加した。３７℃で２時間反応させた後、ウェル中の溶液を廃棄し、ＰＢＳ－Ｔにて洗浄した後、４０００倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識抗マウスＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ社、１１５－０３５－０６２）を室温で１時間反応させた。その後、反応液を廃棄、洗浄した後、１ＳｔｅｐＵｌｔｒａ　ＴＭＢ基質液（Ｐｉｅｒｃｅ社）による発色を４５０ｎｍの吸光度で測定した。

【００３６】
ｄａｙ２１（１２５００倍希釈）とｄａｙ３６（１２５００倍、６２５００倍希釈）の血清の結果を図３に示す。それぞれのマウス血清は、ＭＵＣ１＿５ＳＴｎ，ＭＵＣ１＿３ＳＴｎ，ＭＵＣ１＿０ＳＴｎ糖ペプチドに対して反応性を示したが、抗原反応性は異なっていた。特に、ｄａｙ３６（６２５００倍希釈）では、マウス２を除き、糖鎖のないＭＵＣ１＿０ＳＴｎに比べて、糖鎖の結合しているＭＵＣ１＿５ＳＴｎ、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎに対して有意に高い反応性を示した。ＲＯＲγＴｇマウスとＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスとの比較では、ＭＵＣ１＿５ＳＴｎを免疫した群において、ｄａｙ２１ではＲＯＲγＴｇマウスの抗体価が高い傾向が見られたが、ｄａｙ３６においては顕著な差は見られなかった。

【００３７】
続いて、マウス血清を用いて細胞の染色を行った。染色には、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞（以下ＭＭ４６８と略す）とそれを親株に用いてＳｔ６ｇａｌｎａｃ１遺伝子を発現させた細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８＋Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１、以下ＭＭ４６８＋ＳＴ６と略す）を用いた。ＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞はヒト乳がん由来の培養細胞株で、ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓにＭＵＣ１が発現している。この細胞にＳＴｎ合成酵素であるＳｔ６ｇａｌｎａｃ１遺伝子を発現させることにより、ＳＴｎが結合したＭＵＣ１を発現するようになる。２種類の細胞を９６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｎｕｎｃ　ＭｉｃｒｏＷｅｌｌ　９６－Ｗｅｌｌ　Ｏｐｔｉｃａｌ－Ｂｏｔｔｏｍ　Ｐｌａｔｅｓ　ｗｉｔｈ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｂａｓｅ　（Ｂｌａｃｋ　Ｐｌａｔｅ），Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）に播種し、５％CO_2濃度、３７℃で２日間培養した。培地を取り除き、ＰＢＳで洗浄した後、４％パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。ＰＢＳで洗浄した後に、ＰＢＳで１０００倍希釈した抗血清を１００μＬ／ｗｅｌｌで加え、室温で２時間インキュベーションし、血清中の抗体を反応させた。反応液を取り除き、ＰＢＳで洗浄した後に２０００倍希釈したＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｃｈｅｒ社）を１００μＬ／ｗｅｌｌで加え、室温で１時間インキュベーションした。細胞染色画像はＣｅｌｌ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　ＣＸ５（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて取得した。

【００３８】
染色の結果を図４に示す。縦軸に染色強度、横軸に細胞の種類と濃度を記す。ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８）とＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８＋ＳＴ６）を１ｗｅｌｌあたり2.0×10^4，1.0×10^4，0.5×10^4の３種類の濃度で、２ｗｅｌｌずつ播種し染色を行った。すべてのマウス血清は、ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８）よりもＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８＋ＳＴ６）をより強く染色することが確認された。

以上の結果から、ＭＵＣ１＿５／３ＳＴｎペプチドを免疫したマウスの血清には、ＳＴｎ－ＭＵＣ１を認識して、細胞染色が可能な抗体が含まれている可能性が示唆された。

【００３９】
（ハイブリドーマの作製）

ＳＴｎ－ＭＵＣ１糖ペプチドを免疫したマウスの血清を用いた解析の結果、目的とする抗体が含まれている可能性が確認できたので、抗体産生細胞と骨髄腫（ミエローマ）細胞（Ｐ３Ｕ１細胞、ＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞）との細胞融合を行うことでハイブリドーマを作製し、ＳＴｎ－ＭＵＣ１を認識するモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。脾細胞は免疫マウス由来脾臓組織からダウンス型ホモジナイザーを用いて分離した。免疫マウス由来脾細胞とマウス骨髄腫細胞の細胞をそれぞれＲＰＭＩ培地（無血清）で洗浄した後に５：１の比で混合し、細胞融合促進剤（ＧｅｎｏｍＯＮＥ－ＣＦ　Ｋｉｔ，コスモバイオ）による細胞融合作業（氷上５分、３７℃、１５分）を行った。

細胞融合後、２０％　Ｓ－ｃｌｏｎｅ　ｍｅｄｉｕｍ（積水メディカル）と１０％　牛胎児血清（ＦＢＳ）を含むＲＰＭＩ　１６４０（＋ペニシリン、＋ストレプトマイシン）に懸濁し、９６－ｗｅｌｌプレートに5×10^{4}細胞／ｗｅｌｌで播種した。選択培地としてＨＡＴ培地（ＲＰＭＩ１６４０培地に１００単位／ｍＬペニシリン、１００μｇ／ｍＬストレプトマイシン及び１０％牛胎児血清（ＦＢＳ）、10^{-4}Ｍヒポキサンチン、1.5×10^{-5}Ｍチミジン及び4×10^{-7}Ｍアミノプテリンを加えた培地）を用いて培養を行い、融合細胞のみが生存するように選択的な培養を行った。選択培地で培養開始後約１０日以降に生育してくる細胞をハイブリドーマとして選択するため、次に限界希釈法によって、モノクローンの細胞を得た。具体的には、９６－ｗｅｌｌプレートに細胞溶液を濃いものから薄いものへと希釈系列を作製するようにして播種し、数の限定された細胞由来のハイブリドーマ細胞群を選択するとともに、後述のスクリーニングによってＳＴｎ－ＭＵＣ１に反応する抗体を産生するクローンを選択した。

【００４０】

（ハイブリドーマのスクリーニング）

増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗ＨＢｓ抗原モノクローナル抗体が含まれる否かを上述の様にＨｉｇｈ　Ｃｏｎｔｅｎｔ　Ａｎａｌｙｓｉｓ法（Ｃｅｌｌ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　ＣＸ５）によりスクリーニングした。ＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８＋ＳＴ６）を９６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｎｕｎｃ　ＭｉｃｒｏＷｅｌｌ　９６－Ｗｅｌｌ　Ｏｐｔｉｃａｌ－Ｂｏｔｔｏｍ　Ｐｌａｔｅｓ　ｗｉｔｈ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｂａｓｅ（Ｂｌａｃｋ　Ｐｌａｔｅ），Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）に5×10^{3}細胞／ｗｅｌｌで播種し、染色前に４％パラホルムアルデヒドで固定し、ＰＢＳで洗浄した後に１％ヤギ血清でブロッキングした。ハイブリドーマを培養したウェル中に含まれる培養上清１００μＬを採取し、固定したＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８＋ＳＴ６）の各ウェルに加え、室温で２時間インキュベーションした。二次抗体には２０００倍希釈したＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　４８８　ｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧとＨｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（０．５ｕｇ／ｍＬ）の混合液を用い、室温で１時間インキュベーションした。Ｃｅｌｌ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　ＣＸ５を用いて核染色と細胞染色を最適の露光で４視野／ウェルで画像を取得した。二次抗体のみの染色を基準として陽性ウェルを選定し、画像を確認し細胞膜が染色されているウェルを候補とした。次に、ＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８＋ＳＴ６）とＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８）の染め分けを行い、ＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８＋ＳＴ６）に陽性でＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８）に陰性のウェルを最終候補とした。

【００４１】

スクリーニングの結果、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４の４つのハイブリドーマ細胞株が得られた。Ｍ５Ｓ－１とＭ５Ｓ－１０は、ＭＵＣ１－５ＳＴｎ糖ペプチドをＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスに免疫したマウス脾細胞とＰ３Ｕ１細胞との融合により得られた。Ｍ５Ｓ－８は、ＭＵＣ１－５ＳＴｎ糖ペプチドをＲＯＲγＴｇマウスに免疫したマウス脾細胞とＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞との融合により得られた。Ｍ３Ｓ－４は、ＭＵＣ１－３ＳＴｎ糖ペプチドをＲＯＲγＴｇマウスに免疫したマウス脾細胞とＰ３Ｕ１細胞との融合により得られた。４つのハイブリドーマ細胞株の培養上清を用いた細胞染色では、それぞれＭＵＣ１を発現するＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８）には陰性であったが、ＳＴｎ－ＭＵＣ１を発現するＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞（ＭＭ４６８＋ＳＴ６）には陽

性であった（図５）。
【００４２】
（ウエスタンブロットによる抗体の性状解析）
　ＳＴｎ－ＭＵＣ１に対する４種類の抗体の性状解析のためウエスタンブロット法を行った。以下に記す６種類の細胞からＲＩＰＡ　Ｂｕｆｆｅｒ（ナカライテスク社製、０８７１４－０４）で抽出した細胞ライセート中のタンパク質３０μｇを５－２０％　ＸＶ　ＰＡＮＴＥＲ　ＧＥＬ（ＤＲＣ社製、ＮＸＶ－２７５ＨＰ２０）で展開した。細胞は、（レーン１）ＳＬ４－Ｐ４６：マウス大腸がん細胞Ｃｏｌｏｎ３８の高肝転移性バリアントＳＬ４株のｍｏｃｋトランスフェクタント、（レーン２）ＳＬ４－Ｐ４６－２Ｆ５：ＳＬ４－Ｐ４６株のＳｔ６ｇａｌｎａｃ１トランスフェクタント、（レーン３）ＳＬ４－Ｍ８：ＳＬ４株のＭＵＣ１トランスフェクタント、（レーン４）ＳＬ４－Ｍ８－２Ａ４：ＳＬ４－Ｍ８株のＳｔ６ｇａｌｎａｃ１トランスフェクタント、（レーン５）ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、（レーン６）ＭＤＡ－ＭＢ－４６８－Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１を用いた。
　細胞ライセートに含まれるタンパク質は、電気泳動で展開した後のゲルからＨｙｂｏｎｄ－Ｐメンブレン（アマシャム社製）に転写され、５％スキムミルク（ベクトン・ディッキンソン社製）含有中ＰＢＳ－Ｔ（０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（富士フイルム和光純薬、１６６－２１１１５）を含むＰＢＳ）中で室温、６０分間ブロッキング反応を行った。その後、ハイブリドーマ培養上清を１％スキムミルク含有ＰＢＳ－Ｔで１００倍に希釈し、メンブレン上に添加し、室温で６０分間反応させた。反応液を取り除き、メンブレンをＰＢＳ－Ｔで２回洗浄した後、１％スキムミルク含有ＰＢＳＴで５０００倍に希釈したマウスＩｇＧ－ＨＲＰ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，＃Ａ２８１７７）をメンブレン上に添加し、室温で６０分間反応した。反応液を取り除き、ＰＢＳＴで洗浄後、Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ　Ｆｏｒｔｅ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製，ＷＢＬＵＦ０５００）を用いてシグナルを増幅し、ＬｕｍｉｎｏＧｒａｐｈ（ＡＴＴＯ社製、ＷＳＥ－６１００）で検出した。コントロールとして、抗ＭＵＣ１抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社製、ＭＡＢ６２９８、５００倍希釈で使用）とＭＵＣ１上のシアリルＴを認識するＭＹ.１Ｅ１２抗体（順天堂大学、２０００倍希釈で使用）のウエスタンブロットも行った。
【００４３】
　ウエスタンブロットの結果を図６に示す。コントロールのＭＵＣ１抗体を用いた場合、ＭＵＣ１が発現する細胞でシグナルが検出された（レーン３，４，５，６）。それぞれでサイズやパターンが異なることから、糖鎖の付き方や切断のされ方に違いがあることが考えられる。ＭＹ.１Ｅ１２抗体の場合も同様に、ＭＵＣ１が発現する細胞でシグナルが検出されたが、ＭＵＣ１抗体で検出されたシグナルより高分子量のサイズにバンドが検出された。Ｍ５Ｓ－１，Ｍ５Ｓ－８，Ｍ５Ｓ－１０は、レーン４とレーン６にシグナルが検出された。どちらもＭＵＣ１とＳｔ６ｇａｌｎａｃ１の両方が発現する細胞であり、Ｍ５Ｓ－１，ＭＭ５Ｓ－８，Ｍ５Ｓ－１０のエピトープにはＭＵＣ１とＳｔ６ｇａｌｎａｃ１の両方が必要であることが確認された。一方、Ｍ３Ｓ－４の場合はレーン４にはバンドが検出されず、レーン６のみにバンドが検出された。このことから、Ｍ３Ｓ－４のエピトープにもＭＵＣ１とＳｔ６ｇａｌｎａｃ１の両方が必要であることがわかる。レーン４とレーン６はともにＭＵＣ１とＳｔ６ｇａｌｎａｃ１の両方が発現するが、ホスト細胞の由来が異なる（レーン４：マウス大腸がん、レーン６：ヒト乳がん）ため、反応性の違いは由来細胞の違いよるものかもしれない。また、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４が検出するバンドのサイズは、ＭＹ.１Ｅ１２の場合と同様にＭＵＣ１抗体のシグナルに比べて高分子量のバンドが確認された。糖鎖の結合したＭＵＣ１は種々のプロテアーゼによる分解を受けにくくなるため、その結果、高分子量にのみバンドが検出されるのかもしれない。
【００４４】
（ＳＴｎ－ＭＵＣ１抗体を用いた各種癌組織パネルの免疫染色）
　ＳＴｎ－ＭＵＣ１は、各種がん細胞において発現が上昇することが期待されたため、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４ハイブリドーマ細胞株の培養上清用い

て、がん組織の免疫染色を行った。がん組織は市販の組織パネル（Ｈｕｍａｎ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｏｒｇａｎｓ　Ｔｕｍｏｒ　ａｎｄ　Ｎｏｒｍａｌ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ　ＢＣ００１１３４ｂ、Ｂｉｏｍａｘ社製）を用いた。組織パネルを連続切片で５枚購入し（ＢＣ００１１３４ｂ－０７７，－０７８，－０７９，－０８０，－０８１）、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４培養上清とコントロールとしてＭＵＣ１上のＳＴを認識するＭＹ.１Ｅ１２抗体（順天堂大学製）で染色した。組織パネルは、キシレンとエタノールで脱パラフィン処理した後、Ｄａｋｏ　Ｔａｒｇｅｔ　ｒｅｔｒｉｅｖａｌ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ，ｐＨ６．０（Ｄａｋｏ社製、Ｓ１６９９）中で１１０℃、１０分間オートクレーブ処理し、抗原の賦活化を行った。溶液から取り出し、ＰＢＳで洗浄の後、０．３％過酸化水素（３０％過酸化水素水をメタノールで希釈）処理を室温で２０分間行い、内在性のペルオキシダーゼをブロックした。反応液を取り除き、ＰＢＳで洗浄した後、Ｄａｋｏ　Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ　Ｂｉｏｔｉｎ　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｄａｋｏ社製、Ｘ０５９０）を用いて内在性のビオチンをブロックした。続いて、２％ウマ血清（Ｎｏｒｍａｌ　Ｈｏｒｓｅ　Ｓｅｒｕｍ、Ｖｅｃｔｏｒ社製、Ｓ－２０００）（ＰＢＳで希釈）で室温、３０分間、ブロッキング処理を行った。１次抗体のＭ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０、Ｍ３Ｓ－４ハイブリドーマ培養上清は原液のまま使用した。ＭＹ.１Ｅ１２抗体は２％ウマ血清で１０００倍に希釈して使用した。１次抗体溶液をパネル上に添加し、４℃で一晩反応した。ＰＢＳで洗浄後、２次抗体としてウマ血清で２００倍に希釈したＨｏｒｓｅ　Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｅｄ（Ｖｅｃｔｏｒ社製、ＢＡ－２０００）を添加し、室温で３０分間反応した。ＰＢＳで洗浄後、ＶＥＣＴＡＳＴＡＩＮ　Ｅｌｉｔｅ　ＡＢＣ　Ｋｉｔ（Ｖｅｃｔｏｒ社製、ＰＫ－６１０１）を用いて、シグナルを増幅し、ＩｍｍＰＡＣＴ　ＤＡＢ　ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　Ｋｉｔ，Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（Ｖｅｃｔｏｒ社製、ＳＫ－４１０５）を用いて発色した。核染色はマイヤーヘマトキシリン溶液（富士フイルム和光純薬、１３１－０９６６５）を用いた。脱水、透徹、封入の後、Ｋｅｙｅｎｃｅ社製　ＢＩＯＲＥＶＯ　ＢＺ－Ｘ７１０を用いて組織像を観察した。

【００４５】

使用した組織パネルに含まれている組織情報を表２～表５に示す。

【００４６】

【表２】

Position	No.	Age	Sex	Organ/Anatomic Site	Pathology diagnosis	TNM	Grade	Stage	Type	Tissue ID.
A1	1	47	F	Cerebrum	Glioblastoma of left temporal lobe	T2N0M0	4	IB	Malignant	Nct020127
A2	2	43	M	Cerebrum	Glioblastoma of brain	T1N0M0	4	IA	Malignant	Nct030209
A3	3	43	M	Cerebrum	Glioblastoma of occipital lobe	T1N0M0	4	IA	Malignant	Nct030339
A4	4	53	M	Cerebrum	Astrocytoma of great foramen	-	1	-	Malignant	Nct020201
A5	5	30	M	Cerebrum	Astrocytoma of right temporal lobe	-	1	-	Malignant	Nct010041
A6	6	41	M	Cerebrum	Astrocytoma of left frontal lobe	-	2	-	Malignant	Nct010045
A7	7	29	M	Cerebrum	Oligodendroglioma of left temporal lobe	T1N0M0	1	IA	Malignant	Nct020029
A8	8	52	M	Cerebrum	Oligodendroglioma of brain	T2N0M0	2	IB	Malignant	Nct020087
A9	9	30	F	Cerebrum	Oligodendroglioma of brain	T1N0M0	2	IA	Malignant	Nct030173
A10	10	3	M	Cerebellum	Medulloblastoma of cauda cerebelli	T1M0	-	IA	Malignant	Nct020238
A11	11	32	F	Cerebellum	Medulloblastoma of cerebellum	T1M0	-	IA	Malignant	Ncb050040
A12	12	7	M	Cerebellum	Medulloblastoma of cerebellum	T2M0	-	IB	Malignant	Ncb060010
A13	13	46	F	Thyroid	Papillary carcinoma	T4N0M0	-	III	Malignant	Etg010040
A14	14	45	F	Thyroid	Papillary carcinoma	T2N0M0	-	II	Malignant	Etg010131
A15	15	40	M	Thyroid	Papillary carcinoma	T4N1M0	-	III	Malignant	Etg010133
B1	16	65	F	Thyroid	Follicular carcinoma	T2N0M0	-	II	Malignant	Etg020085
B2	17	26	F	Thyroid	Follicular carcinoma	T2N0M0	-	II	Malignant	Etg020197
B3	18	75	F	Thyroid	Follicular carcinoma	T3N0M0	-	II	Malignant	Etg020568
B4	19	52	F	Lung	Squamous cell carcinoma	T2N1M0	2—3	II	Malignant	Rln060056
B5	20	48	M	Lung	Squamous cell carcinoma	T2N0M0	3	I	Malignant	Rln060071
B6	21	28	M	Lung	Squamous cell carcinoma	T2N0M0	3	I	Malignant	Rln060087
B7	22	42	M	Lung	Adenocarcinoma	T2NxM0	2	-	Malignant	Rln050355
B8	23	56	M	Lung	Adenocarcinoma	T2N0M0	2	I	Malignant	Rln050315
B9	24	51	M	Lung	Adenocarcinoma	TxNxMx	-	-	Malignant	Rln050417
B10	25	54	M	Lung	Small cell carcinoma	T2N1M0	-	II	Malignant	Rln030078
B11	26	65	F	Lung	Small cell carcinoma	T2N0M0	-	I	Malignant	Rln030185
B12	27	73	M	Lung	Small cell carcinoma	T3N1M0	-	IIIA	Malignant	Rln030108
B13	28	64	M	Lung	Large cell carcinoma	T2N0M0	-	I	Malignant	Rln020367
B14	29	70	M	Lung	Large cell carcinoma	T2N0M0	-	I	Malignant	Rln020676
B15	30	61	M	Lung	Large cell carcinoma	T4N0M0	-	IIIB	Malignant	Rln020364
C1	31	65	F	Esophagus	Squamous cell carcinoma	T2N0M0	2	IIA	Malignant	Des020765
C2	32	50	F	Esophagus	Squamous cell carcinoma	T2N0M0	2	IIA	Malignant	Des020766
C3	33	60	F	Esophagus	Squamous cell carcinoma	T3N0M0	3	IIA	Malignant	Des020771
C4	34	63	M	Esophagus	Adenocarcinoma	T3N0M0	2—3	IIA	Malignant	Des010320
C5	35	33	F	Esophagus	Adenocarcinoma	T4NxM0	3	III	Malignant	Des023682
C6	36	65	M	Esophagus	Adenocarcinoma	TxNxMx	3	-	Malignant	Des020806
C7	37	55	F	Stomach	Adenocarcinoma	T3N3M0	3—4	-	Malignant	Dst010001
C8	38	72	M	Stomach	Adenocarcinoma	T3N1M0	-	IIIA	Malignant	Dst010865

【００４７】

【表３】

Position	No.	Age	Sex	Organ/Anatomic Site	Pathology diagnosis	TNM	Grade	Stage	Type	Tissue ID.
C9	39	72	M	Stomach	Adenocarcinoma	T3N1M0	3	IIIA	Malignant	Dst010121
C10	40	69	M	Colon	Mucinous adenocarcinoma	T4N2M0	1	III	Malignant	Dco060501
C11	41	34	F	Colon	Adenocarcinoma	T4N0M0	1	II	Malignant	Dco051843
C12	42	51	M	Colon	Adenocarcinoma	T4N2M0	3	III	Malignant	Dco060057
C13	43	67	M	Rectum	Adenocarcinoma	T3N0M0	-	-	Malignant	Dre010033
C14	44	60	F	Rectum	Adenocarcinoma	T3N0M0	1	-	Malignant	Dre010034
C15	45	59	F	Rectum	Adenocarcinoma	T3N0M0	1—2	-	Malignant	Dre010384
D1	46	44	F	Breast	Invasive ductal carcinoma	T2N1M0	1—2	IIB	Malignant	Fmg060163
D2	47	41	F	Breast	Invasive ductal carcinoma	T2N0M0	1—2	IIA	Malignant	Fmg060088
D3	48	52	F	Breast	Invasive ductal carcinoma	T3N0M0	1	IIB	Malignant	Fmg060002
D4	49	53	M	Larynx	Squamous cell carcinoma	T4N1M0	2	IV	Malignant	Rla020258
D5	50	65	M	Larynx	Squamous cell carcinoma	T1N0M0	2	I	Malignant	Rla010001
D6	51	75	M	Larynx	Squamous cell carcinoma	T3N0M0	2	III	Malignant	Rla020063
D7	52	57	F	Ovary	Serous papillary adenocarcinoma	T1cN0M0	2	IC	Malignant	Fov010012
D8	53	54	F	Ovary	Serous papillary adenocarcinoma	T3cN1M0	2	IIIC	Malignant	Fov010137
D9	54	38	F	Ovary	Serous papillary adenocarcinoma	T3bN1M0	2—3	IIIC	Malignant	Fov010742
D10	55	67	F	Ovary	Mucinous adenocarcinoma	T3bN0M0	-	IIIB	Malignant	Fov021134
D11	56	49	F	Ovary	Mucinous adenocarcinoma	TxN0M0	1		Malignant	Fov020104
D12	57	51	F	Ovary	Mucinous adenocarcinoma	T1bN0M0	1	IB	Malignant	Fov021141
D13	58	66	F	Ovary	Granular cell tumor	-	-	-	Malignant	Fov021505
D14	59	53	F	Ovary	Granular cell tumor	-	-	-	Malignant	Fov021637
D15	60	49	F	Ovary	Granular cell tumor	-	-	-	Malignant	Fov040005
E1	61	60	M	Kidney	Clear cell carcinoma	T2N0M0	1	II	Malignant	Ukn010091
E2	62	60	M	Kidney	Clear cell carcinoma	T1N0M0	1	I	Malignant	Ukn020044
E3	63	52	M	Kidney	Clear cell carcinoma	T1N0M0	-	I	Malignant	Ukn010122
E4	64	4	F	Kidney	Clear cell carcinoma	T4N0M0	2—3	IV	Malignant	Ukn020070
E5	65	4	F	Kidney	Clear cell carcinoma	T1N0M0	-	I	Malignant	Ukn010047
E6	66	4	M	Kidney	Clear cell carcinoma	T1N0M0	1—2	I	Malignant	Ukn010126
E7	67	47	M	Kidney	Nephroblastoma	T1N0M0	-	I	Malignant	Ukn050143
E8	68	61	F	Kidney	Nephroblastoma	T2N0M0	-	II	Malignant	Ukn010118
E9	69	33	F	Kidney	Nephroblastoma	T1N0M0	-	I	Malignant	Ukn010133
E10	70	71	F	Kidney	Carcinoma sarcomatodes	T2N0M0	-	II	Malignant	Ukn020093
E11	71	49	F	Kidney	Carcinoma sarcomatodes	T3N0M0	-	III	Malignant	Ukn020214
E12	72	49	F	Kidney	Carcinoma sarcomatodes	T2N0M0	-	II	Malignant	Ukn020274
E13	73	69	M	Prostate	Adenocarcinoma	T3NxM0	-	-	Malignant	Mpr030166
E14	74	81	M	Prostate	Adenocarcinoma	T3NxM0	2—3	-	Malignant	Mpr020317
E15	75	51	M	Prostate	Adenocarcinoma	T2N0M0	2—3	-	Malignant	Mpr050073

【００４８】

【表４】

Position	No.	Age	Sex	Organ/Anatomic Site	Pathology diagnosis	TNM	Grade	Stage	Type	Tissue ID.
F1	76	53	M	Liver	Hepatocellular carcinoma	T2N0M0	1—2	II	Malignant	Dlv022116
F2	77	48	M	Liver	Hepatocellular carcinoma	T3N0M0	2	III	Malignant	Dlv022151
F3	78	45	M	Liver	Hepatocellular carcinoma	T3N0M0	2	III	Malignant	Dlv022149
F4	79	48	M	Liver	Cholangiocellular carcinoma	T2N0M0	1—2	II	Malignant	Dlv051205
F5	80	67	M	Liver	Cholangiocellular carcinoma	T3N0M1	2	IVb	Malignant	Dlv051265
F6	81	62	F	Liver	Cholangiocellular carcinoma	T2N0M0	2	II	Malignant	Dlv030843
F7	82	67	M	Pancreas	Adenocarcinoma	T4N0M0	3	-	Malignant	Dpa010580
F8	83	57	F	Pancreas	Adenocarcinoma	T2N0M0	3	I	Malignant	Dpa030841
F9	84	76	M	Pancreas	Duct adenocarcinoma	T3N0M0	2	II	Malignant	Dpa041448
F10	85	15	F	Pancreas	Islet cell carcinoma	T2N0M0	-	I	Malignant	Dpa021231
F11	86	49	F	Pancreas	Islet cell carcinoma	T2N0M0	-	-	Malignant	Aac060257
F12	87	12	F	Pancreas	Islet cell carcinoma	-	-	-	Malignant	Dpa010125
F13	88	41	F	Pancreas	Mucinous adenocarcinoma	T3N0M0	1—2	II	Malignant	Dpa051570
F14	89	62	F	Pancreas	Mucinous adenocarcinoma	T4N0M0	1—2	-	Malignant	Dpa041068
F15	90	48	F	Pancreas	Mucinous adenocarcinoma	T2N0M0	1—2	I	Malignant	Dpa061403
G1	91	90	F	Skin	Squamous cell carcinoma of face	T2N0M0	2	I	Malignant	Kin020053
G2	92	66	F	Skin	Squamous cell carcinoma of left thigh	-	1—2	-	Malignant	Kin020107
G3	93	79	F	Skin	Squamous cell carcinoma of thigh	T2N0M0	1—2	I	Malignant	Kin020127
G4	94	62	F	Skin	Malignant melanoma of right sole of foot	T4NxM0	-	-	Malignant	Kin020031
G5	95	25	M	Skin	Malignant melanoma of right sole of foot	T4N0M0	-	II	Malignant	Kin020083
G6	96	52	M	Skin	Malignant melanoma of left heel	T4N1M1	-	IV	Malignant	Kin020059
G7	97	30	M	Testis	Seminoma	T1N0M0	-	I	Malignant	Mtt020124
G8	98	36	M	Testis	Seminoma	T1N0M0	-	I	Malignant	Mtt020102
G9	99	38	M	Testis	Seminoma	T1N0M0	-	I	Malignant	Mtt020151
G10	100	13	F	Bone	Osteosarcoma of left femur	T2N0M0	-	IB	Malignant	Lbn020034
G11	101	7	F	Bone	Osteosarcoma of left femur	T2N0M0	-	IB	Malignant	Lbn020013
G12	102	23	F	Bone	Osteosarcoma of left knee	T2N0M0	-	IB	Malignant	Lbn020015
G13	103	17	M	Bone	Chondrosarcoma of right tibia	T2N0M0	-	IB	Malignant	Lbn040124
G14	104	14	M	Bone	Chondrosarcoma of right tibia	T2N0M0	-	IB	Malignant	Lbn060006
G15	105	13	F	Bone	Chondrosarcoma of left tibia	T2N0M0	-	IB	Malignant	Lbn030093
H1	106	51	F	Abdominal cavity	Leiomyosarcoma	T1N0M0	-	IA	Malignant	Aac020020
H2	107	78	F	Retroperitoneum	Leiomyosarcoma	T2N0M0	-	IB	Malignant	Apo040170
H3	108	54	F	Retroperitoneum	Leiomyosarcoma	T2N0M0	-	IB	Malignant	Apo040214
H4	109	20	M	Bone	Embryonal rhabdomyosarcoma of thoracic vertebrae	T1N0M0	-	IA	Malignant	Lbn020026
H5	110	40	F	Abdominal cavity	Embryonal rhabdomyosarcoma	T2N0M0	-	IB	Malignant	Aac040131
H6	111	21	M	Retroperitoneum	Embryonal rhabdomyosarcoma	T1N0M0	-	IA	Malignant	Apo040019
H7	112	28	M	Eye	Retinoblastoma of eyeball	T3cN0M0	-	IIC	Malignant	Vey020014
H8	113	4	F	Eye	Retinoblastoma	TxN0M0	-	-	Malignant	Vey030015

【００４９】

【表５】

Position	No.	Age	Sex	Organ/Anatomic Site	Pathology diagnosis	TNM	Grade	Stage	Type	Tissue ID.
H9	114	60	M	Eye	Retinoblastoma	TxN0M0	-	-	Malignant	Vey040013
H10	115	65	F	Soft tissue	Angiosarcoma of pelvic cavity	T2bN0M0	-	-	Malignant	Ffb040685
H11	116	37	M	Bone	Angiosarcoma of right tibia	T1bN0M0	-	IA	Malignant	Lbn050106
H12	117	40	F	Soft tissue	Angiosarcoma of pericardium	T1N0M0	-	IA	Malignant	Sss050062
H13	118	73	F	Lymph node	Hodgkin ‘s lymphoma of right neck	-	-	-	Malignant	Lly020068
H14	119	27	M	Lymph node	Hodgkin ‘s lymphoma of neck	-	-	-	Malignant	Lly040505
H15	120	43	M	Lymph node	Hodgkin ‘s lymphoma of neck	-	-	-	Malignant	Lly060322
I1	121	10	M	Lymph node	Diffuse small B-cell lymphoma of left neck	-	-	-	Malignant	Lly020121
I2	122	57	F	Lymph node	Diffuse small B-cell lymphoma of right neck	-	-	-	Malignant	Lly010062
I3	123	69	M	Lymph node	Diffuse small B-cell lymphoma of right armpit	-	-	-	Malignant	Lly020240
I4	124	13	F	Lymph node	T-cell lymphoma of left groin	-	-	-	Malignant	Lly010046
I5	125	37	M	Lymph node	T-cell lymphoma of right armpit	-	-	-	Malignant	Lly060093
I6	126	40	F	Thyroid	T-cell lymphoma	-	-	-	Malignant	Etg060002
I7	127	46	F	Bone	Myeloma of costal bone	-	-	-	Malignant	Ibm060024
I8	128	39	M	Bone	Myeloma of seventh costal bone	-	-	-	Malignant	Lbn050004
I9	129	64	M	Bone	Myeloma	-	-	-	Malignant	Lbn040065
I10	130	62	F	Uterus	Endometrioid adenocarcinoma	T1N0M0	1	I	Malignant	Fur010571
I11	131	55	F	Uterus	Endometrioid adenocarcinoma	T2aN0M0	-	IIA	Malignant	Fur010475
I12	132	62	F	Uterus	Endometrioid adenocarcinoma	T1cN1M0	2	IIIC	Malignant	Fur010387
I13	133	47	F	Bladder	Urothelial carcinoma	TxN0M0	-	-	Malignant	Ubd010021
I14	134	63	M	Bladder	Urothelial carcinoma	T2aN0M0	2	II	Malignant	Ubd010065
I15	135	54	F	Bladder	Urothelial carcinoma	T3NxM1	1—2	IV	Malignant	Ubd010097
J1	136	33	M	Colon	Colon tissue	-	-	-	Normal	Dco07N026
J2	137	35	M	Colon	Colon tissue	-	-	-	Normal	Dco05N006
J3	138	21	F	Colon	Colon tissue	-	-	-	Normal	Dco06N022
J4	139	18	F	Uterus	Endometrium tissue	-	-	-	Normal	Fur06N010
J5	140	21	F	Uterus	Endometrium tissue	-	-	-	Normal	Fur05N001
J6	141	15	F	Uterus	Endometrium tissue	-	-	-	Normal	Fur06N002
J7	142	47	M	Kidney	Cancer adjacent kidney tissue	-	-	-	Adjacent tissue	Ukn060207
J8	143	47	M	Kidney	Kidney tissue	-	-	-	Normal	Ukn06N005
J9	144	61	M	Kidney	Adjacent normal kidney tissue	-	-	-	Adjacent tissue	Ukn020457
J10	145	49	F	Skin	Adjacent normal skin tissue of breast	-	-	-	Adjacent tissue	Fmg050437
J11	146	45	F	Skin	Adjacent normal skin tissue of breast	-	-	-	Adjacent tissue	Fmg050331
J12	147	43	F	Skin	Adjacent normal skin tissue of breast	-	-	-	Adjacent tissue	Fmg050441
J13	148	58	M	Lymph node	Adjacent normal lymph node	-	-	-	Adjacent tissue	Dca051628
J14	149	53	F	Lymph node	Adjacent normal lymph node	-	-	-	Adjacent tissue	Dca061401
J15	150	74	M	Lymph node	Adjacent normal lymph node	-	-	-	Adjacent tissue	Dca051074
M	M	42	M	Adrenal gland	Pheochromocytoma (tissue marker)					

【００５０】

また、各抗体を用いて染色した結果のマクロ像（対物レンズ：４倍レンズ使用）を図７に示す。ヘマトキシリン・エオジン染色像は、Ｂｉｏｍｅｄ社のｗｅｂ　ｓｉｔｅから引用した。比較するコントロールとして、ＭＵＣ１上のＳＴ構造を認識するモノクローナル抗体ＭＹ.１Ｅ１２（順天堂大学）で染色を行った。

【００５１】

その結果、今回作製したモノクローナル抗体は、様々ながん種でがん部位を染色することが確認できた（図８）。組織によって抗体間の反応の違いはあるが、特にＭ５Ｓ－１０は多くのがん種（肺扁平上皮がん、肺腺がん、食道がん、膵臓がん、卵巣がん）でＭＹ.

１Ｅ１２と同様にがん部位を染色した。
【００５２】
実施例２（ＳＴｎ－Ｍｕｃ１タンパク質を免疫原とした抗ＳＴｎ－ＭＵＣ１抗体の作製）
【００５３】
（ＳＴｎ－ＭＵＣ１－ＩｇＧタンパク質の調製）
Ｏ－結合型糖鎖合成不全株ＣＨＯ－ｌｄｌｄＤ細胞（Ｋｉｎｇｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ，４４（５），７４９－７５９（１９８６）．“Ｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ Ｄｅｆｅｃｔｓ ｉｎ Ｏ－ｌｉｎｋｅｄ ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ ａｎｄ ＬＤＬ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ａ ＵＤＰ－Ｇａｌ／ＵＤＰ－ＧａｌＮＡｃ ４－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ ｍｕｔａｎｔ”）に、ＭＵＣ１細胞外ドメイン（タンデムリピート配列１６回分を含む）とマウスＩｇＧ２ａ Ｆｃ領域のキメラタンパク質を遺伝子導入したＣＨＯ－ｌｄｌＤ－ＭＵＣ１細胞（Ｔａｒｐ ｅｔ ａｌ．Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，１７（２），１９７－２０９（２００７）．“Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｎｏｖｅｌ ｃａｎｃｅｒ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｍｍｕｎｏｄｏｍｉｎａｎｔ ｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄｅ ｅｐｉｔｏｐｅ ｉｎ ｔｈｅ ＭＵＣ１ ｔａｎｄｅｍ ｒｅｐｅｓｔ”）に、シアル酸転移酵素ＳＴ６ＧａｌＮＡｃ１の遺伝子を含むプラスミドベクターｐｃＤＮＡ３．１／Ｚｅｏ－Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ：Ｌ３０００００１）を用いて遺伝子導入を行い、Ｚｅｏｃｉｎ （ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ：６１４８３－２６）８００μｇ／ｍＬによりセレクションを行った。遺伝子導入細胞の培地中に最終濃度１ｍＭとなるようにＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）（ＳＩＧＭＡ：Ａ２７９５）を添加し３日間培養を行ったあと、細胞表面でのＳＴｎの発現を、抗ＳＴｎ抗体ＴＫＨ２（Ｋｊｅｌｄｓｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，４８（８）：２２１４－２２２０（１９８８）．“Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｔｏ ｔｈｅ ｔｕｍｏｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｏ－ｌｉｎｋｅｄ ｓｉａｌｏｓｙｌ－２－＞６ａｌｐｈａ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｙｌ（ｓｉａｌｏｓｙｌ－Ｔｎ）ｅｐｉｔｏｐｅ”）によりフローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ：ＦＡＣＳ Ｖｅｒｓｅ）で検出した。また、ＡｕｔｏＭＡＣＳ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ：ａｕｔｏＭＡＣＳ Ｐｒｏ Ｓｅｐａｒａｔｏｒ）によりＴＫＨ２高結合細胞を選別することを２回繰り返した後、限界希釈法によりクローニングし、再度ＡｕｔｏＭＡＣＳによりＴＫＨ２高結合細胞を選別し、ＣＨＯ－ｌｄｌＤ－ＭＵＣ１－Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１細胞を樹立した。
【００５４】
ＣＨＯ－ｌｄｌＤ－ＭＵＣ１－Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１細胞を、ＨＴ－ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ：１１０６７０３０）、Ｌ－ｇｌｕｔａｍｉｎｅ、Ｇ４１８（ナカライテスク：０９３８０－４４）及びＺｅｏｃｉｎを添加したＰｒｏＣＨＯ４培地（Ｌｏｎｚａ：１２－０２９Ｑ）に馴化させた後、高密度の細胞培養を可能にし、高濃度で分泌タンパク質を回収可能な浮遊細胞用ＣＥＬＬｉｎｅ ３５０（ＷＨＥＡＴＯＮ：ＷＣＬ－０３５０）を使用して、１ｍＭ ＧａｌＮＡｃ添加培地中で培養し、１週間毎に培養上清を取得した。回収した培養液３．５ｍＬに対して１ｍＬスラリーのｎＰｒｏｔｅｉｎ Ａ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ：１７－５２８０－０４）を加え、４℃で一晩（約１６時間）回転しながらインキュベートした。ムロマックカラムにパックし、１０倍量のＰＢＳで洗浄した。１００ｍＭ Ｇｌｙｃｉｎｅ－ＨＣｌ（ｐＨ２．７）で溶出し、１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．０）で中和した。Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ－０．５，Ｕｌｔｒａｃｅｌ ５０ｋＤａ（Ｍｅｒｃｋ：ＵＦＣ５０５００８）で脱塩・濃縮を行った。２５０ｎｇ／レーンでＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、銀染色、抗マウスＩｇＧ抗体、ビオチン化抗ＭＵＣ１抗体ＨＭＰＶ、ビオチン化抗ＳＴｎ抗体ＴＫＨ２によりウエスタンブロッティングを行った。その結果、精製されたＭＵＣ１タンパク質にＳＴｎが付加されていることが確認された（図９）。

【００５５】
（ＳＴｎ－ＭＵＣ１タンパク質のマウスへの免疫とハイブリドーマの作製）
Ｓｔ６ｇａｌｎａｃ１：：２ダブルノックアウトマウス（オス、６～２４週齢）のフットパッドに１０μｇのＳＴｎ－ＭＵＣ１タンパク質とアジュバントとして１μｇ ＬＰＳを混合して投与した。２週間おきに２回投与、または２回免疫後の４ヶ月後に３回目の投与を行った。免疫前、免疫１週間後に採血を行い、血清中の抗体価をＳＴｎ－ＭＵＣ１－ＩｇＧタンパク質に対する結合性をＥＬＩＳＡ及びＳＴｎ－ＭＵＣ１発現細胞への結合性をフローサイトメトリーにより評価した。ＳＴｎ－ＭＵＣ１に対して抗体価が上昇したと考えられるマウスに、３０μｇのＳＴｎ－ＭＵＣ１－ＩｇＧタンパク質を尾静脈投与によりブーストをかけ、その３日後にマウスを犠牲死させ、無菌的に脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。なお、遺伝子組換え動物の使用については、順天堂大学医学部ＤＮＡ実験安全委員会及び動物実験委員会での審査・承認を得て行った。
【００５６】
脾細胞とマウスミエローマ細胞ＰＡＩ（Ｓｔｏｃｋｅｒ．Ｊ．Ｗ． Ｒｅｓ． Ｄｉｓｃｌｏｓｕｒｅ ２１７，１５５（１９８２）“Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｗｏ ｎｅｗ ｍｏｕｓｅ ｍｙｅｌｏｍａ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅｓ ‘ＰＡＩ’ ａｎｄ ‘ＰＡＩ－Ｏ’ ｆｏｒ ｈｙｂｒｉｄｏｍａ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ”）の細胞融合は、一般的なＰＥＧ法により行った（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ．ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２０１４）。具体的には、脾細胞とミエローマ細胞を５：１の比率で混合し、遠心後に上清を完全に除き、タッピングにより細胞をほぐしたあと、チューブを穏やかに回転させながら５０％ ＰＥＧ（ＳＩＧＭＡ：Ｐ７１８１）１ｍＬを１分かけてゆっくり加え、さらに２分穏やかにふりまぜながら反応させた。血清不含ＤＭＥＭ培地（ナカライ：０８４５８－４５）４．５ｍＬを３分かけてゆっくり加えた後、さらに４．５ｍＬを２分かけて加えたあと、牛胎児血清を２ｍＬゆっくり加え、遠心し、上清を取り除いた。タッピングによりほぐした融合細胞にＨＡＴ培地（ＧＩＴ（富士フイルム和光純薬：６３７－２５７１５）－１０％（Ｖ／Ｖ）牛胎児血清－１０％ＢＭ Ｃｏｎｄｉｍｅｄ Ｈ１（Ｒｏｃｈｅ：１１０８８９４７００１）－ＨＡＴ（ＫＡＣ：ＩＣ１６８０８４９）－５％（Ｖ／Ｖ）ＮＣＴＣ－１０９（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ：２１３４００３９）－ＭＥＭ Ｎｏｎ－Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ：１１１４００５０）－Ｌ－ｇｌｕｔａｍｉｎｅ－Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ：１５１４０１２２））２０ｍＬを加えて２回洗浄した後、ＨＡＴ培地に懸濁し、脾細胞で換算して１ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで９６ｗｅｌｌ Ｆｌａｔ－Ｐｌａｔｅに播種し、融合から７日後にＨＡＴ培地を追加し、融合細胞のみを選択した。融合から９日後以降に十分なコロニーの成長を確認できたウェルから上清を回収してスクリーニングを行った。培養上清回収時及び３回継代するまでは、ＨＴ培地（ＧＩＴ－１０％ ＦＢＳ－１０％（Ｖ／Ｖ）ＢＭ－ｃｏｎｄｉｍｅｄ Ｈ１－ＨＴ－５％（Ｖ／Ｖ）ＮＣＴＣ１０９－ＮＥＡＡ－Ｌ－ｇｌｕｔａｍｉｎｅ－ＰＮ／ＳＴ）を使用し、それ以後はＧＩＴ培地（ＧＩＴ－５％ ＮＣＴＣ１０９－ＮＥＡＡ－Ｌ－ｇｌｕｔａｍｉｎｅ－ＰＮ／ＳＴ）を使用した。スクリーニングは、ＭＵＣ１陽性かつＳＴｎ陽性のＭＭ４６８＋ＳＴ６細胞への結合性をフローサイトメーター（ＢＤ ＦＡＣＳＶｅｒｅｓｅ）または蛍光プレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ ＳｙｎｅｒｇｙＬＸ Ｍｕｌｔｉ－Ｍｏｄｅ Ｒｅａｄｅｒ）により測定し、結合性のあったウェルを選択した。選択されたウェルのハイブリドーマを、限界希釈法によるクローニングを２回行って得られたクローンについて、ＥＬＩＳＡ法により免疫に使用したＳＴｎ－ＭＵＣ１タンパク質への結合性及びフローサイトメトリー、ウエスタンブロット法によりＭＵＣ１陽性かつＳＴｎ陽性の細胞への結合性を確認して、２つのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローン２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ７及び７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４を樹立した。

【００５７】
実施例３（フローサイトメトリーによる抗体の結合特異性の解析）
ヒト乳癌細胞株ＭＭ４６８細胞（ＭＵＣ１陽性、ＳＴｎ陰性）及びＳｔ６ｇａｌｎａｃ１を強制発現させたＭＭ４６８＋ＳＴ６細胞（ＭＵＣ１陽性、ＳＴｎ陽性）、マウス大腸がん細胞株にｐＤＫＯＦベクターを導入したＳＬ４－Ｐ４６（ＭＵＣ１陰性、ＳＴｎ陰性、以下Ｐ４６）及びＳｔ６ｇａｌｎａｃ１を強制発現させたＳＬ４－Ｐ４６－２Ｆ５（以下Ｐ４６＋ＳＴ６）、マウス大腸がん細胞株にＭＵＣ１を強制発現させたＳＬ４－Ｍ８（ＭＵＣ１陽性、ＳＴｎ陰性、以下Ｍ８）及びＳｔ６ｇａｌｎａｃ１を強制発現させたＳＬ４－Ｍ８－２Ａ４（ＭＵＣ１陽性、ＳＴｎ陽性、以下Ｍ８＋ＳＴ６）細胞に対する結合性をフローサイトメトリーにより解析した。
【００５８】
ヒト乳癌細胞株は２．５ｇ／Ｌトリプシンー１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ溶液（ナカライテスク、３２７７７－１５）、マウス大腸がん細胞株は０．５ｇ／Ｌトリプシンー０．５３ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ溶液（ナカライテスク、３２７７８－３４）で細胞を培養ディッシュから剥離し、細胞数をカウントし（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、ＴＣ２０全自動セルカウンター）、3×10^{5}個の細胞をＦＡＣＳ解析に用いた。細胞を９６ウェルＵ底プレートに入れ、２００μＬの０．１％（ｗ／ｖ）のＢＳＡと０．１％（ｗ／ｖ）のNaN_3を含むＰＢＳ（ＦＡＣＳバッファー）で２回洗浄後、ハイブリドーマ培養上清を原液またはＦＡＣＳバッファーで２倍希釈して各々１００μＬずつ細胞に添加し、氷上で約３０分間インキュベートした。その後、細胞を２００μＬのＦＡＣＳバッファーで２回洗浄後、終濃度７．５μｇ／ｍＬになるようにＦＡＣＳバッファー中に懸濁したＦＩＴＣ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ，１１５－０９５－００３）溶液を１００μＬずつ細胞に添加し、氷上で約３０分間インキュベートした。その後、細胞を２００μＬのＦＡＣＳバッファーで２回洗浄後、終濃度１μｇ／ｍＬになるようにＦＡＣＳバッファー中に懸濁したＤＡＰＩ（Ｒｏｃｈｅ，１０２３６２７６００１）溶液を１００μＬずつ細胞に添加し、ナイロンメッシュ（Ｎ－Ｎｏ．３５５Ｔ）を通して２００μＬのＦＡＣＳバッファーに注入し、その細胞懸濁液をフローサイトメーター（ＢＤ　ＦＡＣＳＶｅｒｅｓｅ）にて測定した。測定結果はＦｌｏｗＪｏ（ＢＤ）にて解析した。
【００５９】
その結果、樹立した抗体はすべてＳＴｎ－ＭＵＣ１を発現する細胞に結合した（図１０及び図１１）。２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８、Ｍ３Ｓ－４、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ－１０は、ＭＵＣ１陰性でＳＴｎのみを発現する細胞には結合しなかった。フローサイトメトリー解析の結果は、（実施例３）のウエスタンブロットの結果をサポートするものであった。一方、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４及びＭ５Ｓ－１は、ＭＵＣ１の発現に関わらず、ＳＴｎ陽性の細胞に結合した。この結果より、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４及びＭ５Ｓ－１はＳＴｎ糖鎖のみでも認識する抗体である可能性が考えられた。また、Ｍ８＋ＳＴ６細胞とＭＭ４６８＋ＳＴ６細胞に対する反応パターンを見ると、Ｍ５Ｓ－１とＭ５Ｓ－８の反応性、Ｍ５Ｓ－１０とＭ３Ｓ－４の反応性がそれぞれ似ていることがわかった。
【００６０】
実施例４（ＭＵＣ１　２７ｍｅｒ－糖ペプチドに対する抗体の結合特異性の解析（ＥＬＩＳＡ法））
免疫に用いた糖ペプチドＭＵＣ１＿５ＳＴｎ、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎは、それぞれＭＵＣ１繰り返し配列ペプチドのＴ８，Ｓ９，Ｔ１３，Ｓ１９，Ｔ２０の５箇所全てにＳＴｎが結合したものとＴ８，Ｓ１９，Ｔ２０の３箇所にＳＴｎが結合したものである。またＳＴｎ－ＭＵＣ１タンパク質もＭＵＣ１繰り返し配列中の任意のＳｅｒまたはＴｈｒにＳＴｎが付加している。抗体が認識するエピトープは、この中のいずれかのＳ／Ｔに結合したＳＴｎである可能性が考えられるため、抗体の結合特異性を、ＭＵＣ１ペプチド配列中のセリンまたはスレオニンに１つ、３つ、５つの糖鎖が結合した糖ペプチドを用いてＥＬＩＳＡ法により解析した。ＥＬＩＳＡは、（非特許文献５）に記載の方法を、一部変更して行った。

【００６１】
ＭＵＣ１糖ペプチドをＰＢＳに１μｇ／ｍＬとなるように希釈し、１００μＬを９６ウェルＥＬＩＳＡプレートＩｍｍｏｂｉｌｉｚｅｒ Ａｍｉｎｏ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ：４３６０１３）に加え、一晩４℃でインキュベートして固相化した。プレートを０．０５％（ｖ／ｖ） Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）で室温にて３回洗浄後、３００μＬのＴＢＳ（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ，ｐＨ８．０－０．１５Ｍ ＮａＣｌ－０．１％（Ｗ／Ｖ）NaN_3）で４℃で一晩ブロッキングした。プレートをＰＢＳＴで２回洗浄後、精製抗体は０．２５μｇ／ｍＬとなるように１％（Ｗ／Ｖ）ＢＳＡ／ＰＢＳで希釈し、あるいはハイブリドーマ培養上清は原液で５０μＬを加え、室温にて２時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄後、１％（Ｗ／Ｖ）ＢＳＡ／ＰＢＳで２５００倍希釈したＨＲＰ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ：１１５－０３５－１４６）を１００μＬ加え、室温にて１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳＴで５回洗浄後、Ｓｕｐｅｒ ＡｑｕａＢｌｕｅ ＥＬＩＳＡ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ：００－４２０３－５６）を１００μＬ加え、室温にてインキュベートした。４０５／４９２ｎｍの吸光度を、Ｍｕｌｔｉｓｃａｎ ＦＣ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にて測定した。実験はデュプリケートで行った。

【００６２】
その結果、ＳＴｎが付加されたペプチドへの結合性から６種類の抗体は、３つのカテゴリーに分かれた（図１２）。
第一のカテゴリーは、２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８及びＭ３Ｓ－４の２クローンであり、ＭＵＣ１タンデムリピート配列中のセリンまたはスレオニンに１ヶ所だけＳＴｎが結合した糖ペプチドに特異的に結合し、それぞれＳＴｎ－Ｔ８、ＳＴｎ－Ｓ１９に特異的であった。
第二のカテゴリーは、７Ｇ９－１Ａ４－１Ｈ４、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８の３クローンであり、ＭＵＣ１タンデムリピート配列中のセリンまたはスレオニンに１ヶ所だけＳＴｎが結合した糖ペプチドには結合性を示さず、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎまたはＭＵＣ１＿５ＳＴｎに結合性を示した。特にＭ５Ｓ－８は、ＭＵＣ１＿５ＳＴｎのみに特異的に結合した。
第三のカテゴリーは、Ｍ５Ｓ－１０の１クローンであり、ＳＴｎ付加の有無によらず、検討したすべてのＭＵＣ１ペプチド及び糖ペプチドに結合性を示した。

【００６３】
２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８抗体は、ＭＵＣ１糖ペプチドＳＴｎ－Ｔ８をエピトープとする可能性が考えられたが、エピトープが糖鎖構造に依存するのかを調べるため、Ｔ８上の糖鎖構造が異なるＭＵＣ１糖ペプチドを合成し、反応性を検証した。その結果、２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８はＭＵＣ１ペプチドのＴ８にＧａｌＮＡｃ残基（以下Ｔｎ）、Ｇａｌβ１－３ＧａｌＮＡｃ残基（以下Ｔ）、ＮｅｕＡｃα２－３Ｇａｌβ１－３ＧａｌＮＡｃ残基（以下ＳＴ）が結合した糖ペプチドに結合せず、ＳＴｎが結合した糖ペプチドにのみ結合した（図１３（ａ））。このことから、２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８のエピトープは、ＭＵＣ１繰り返し配列中のＴ８にＳＴｎが結合したものであることが確認された。

【００６４】
７Ｇ９－１Ａ４－１Ｈ４抗体は、１ヶ所だけＳＴｎが結合したＭＵＣ１糖ペプチドには結合性を示さずＭＵＣ１＿３ＳＴｎまたはＭＵＣ１＿５ＳＴｎに結合性を示したが、この反応性が糖鎖構造に依存するのかを調べるため、ＭＵＣ１＿３ＴｎまたはＭＵＣ１＿５Ｔｎとの反応性を検証した。その結果、７Ｇ９－１Ａ４－１Ｈ４は、ＭＵＣ１＿３ＴｎまたはＭＵＣ１＿５Ｔｎには結合せず、ＭＵＣ１＿３ＳＴｎまたはＭＵＣ１＿５ＳＴｎとのみ結合した（図１３（ｂ））。このことから、７Ｇ９－１Ａ４－１Ｈ４のエピトープにはＳＴｎが必須であることが確認された。

【００６５】
Ｍ３Ｓ－４抗体は、ＭＵＣ１糖ペプチドＳＴｎ－Ｓ１９をエピトープとする可能性が考

えられたが、エピトープが糖鎖構造に依存するのかを調べるため、Ｓ１９上の糖鎖構造が異なるＭＵＣ１糖ペプチドを合成し、反応性を検証した。

図１４（ａ）に示すように、Ｓ１９上にＧａｌＮＡｃ残基（以下Ｔｎ）、ＮｅｕＡｃα２－６ＧａｌＮＡｃ残基（以下ＳＴｎ）、Ｇａｌβ１－３ＧａｌＮＡｃ残基（以下Ｔ）、ＮｅｕＡｃα２－３Ｇａｌβ１－３ＧａｌＮＡｃ残基（以下ＳＴ）が結合した４種類の糖ペプチドを合成し、ＥＬＡＳＡプレートに固相化した後、Ｍ３Ｓ－４を反応させた。その結果、Ｍ３Ｓ－４はＴｎ－Ｓ１９とＳＴｎ－Ｓ１９に反応し、特に、ＳＴｎ－Ｓ１９に良く反応した。一方で糖鎖なしのペプチド、Ｔ－Ｓ１９やＳＴ－Ｓ１９には反応しなかった図１４（ｃ）。この結果から、Ｍ３Ｓ－４のエピトープはＭＵＣ１繰り返し配列中のＳ１９にＳＴｎが結合したもので最良であることが確認された。

【００６６】

続いて、Ｍ５Ｓ－１０に関して、エピトープ解析を行った。Ｍ５Ｓ－１０は、糖鎖がないＭＵＣ１ペプチドに反応したことから、糖ペプチド上の糖鎖構造は抗原エピトープに関与しないことが予想されたが、Ｓ９部位の糖鎖にフォーカスしたＥＬＩＳＡ解析の結果、エピトープは糖鎖に関係がないことが確認された（図１４（ｂ，ｄ））。しかしながら、ウエスタンブロットやＦＡＣＳ解析においては、ＭＵＣ１の発現だけでは十分ではなく、ＭＵＣ１とＳｔ６ｇａｌｎａｃ１の共発現が抗体の反応性に必須である。ＭＵＣ１タンパク質の場合はＳＴｎが結合することで、立体構造に影響を与えて、エピトープを顕在化させている可能性が考えられた。しかしながら、ウエスタンブロットやＦＡＣＳ解析においては、ＭＵＣ１の発現だけでは十分ではなく、ＭＵＣ１とＳｔ６ｇａｌｎａｃ１の共発現が抗体の反応性に必須である。ＭＵＣ１タンパク質の場合はＳＴｎが結合することで、立体構造に影響を与えて、エピトープを顕在化させている可能性が考えられた。

【００６７】

実施例５（ＳＴｎ－ＭＵＣ１抗体の大量発現）

ハイブリドーマ細胞株は、ＲＰＭＩ１６４０に１０％ＦＢＳを添加した培地を用いて５％CO_2、３７℃で拡大培養した。得られたハイブリドーマ細胞の培養上清（１００ｍＬ～１Ｌ程度、必要量に応じて適宜）から抗体を精製した。ＳＴｎ－ＭＵＣ１モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能であり、抗体の精製が必要な場合には、イオン交換クロマトグラフィー法、プロテインＡ又はプロテインＧ等によるアフィニティークロマトグラフィー法、ゲルクロマトグラフィー法、硫酸アンモニウム塩析法等、公知の方法を用いて精製した。

【００６８】

実施例６（ＳＴｎ－ＭＵＣ１抗体ｃＤＮＡのクローニングと発現）

約$1x10^3$のハイブリドーマ細胞を回収した。それぞれの細胞のＲＮＡを調製し、抗体遺伝子（ＩｇＧ、重鎖と軽鎖）特異的なプライマーを用いてｒｅｖｅｒｓｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）を行い、可変領域を含むｃＤＮＡを増幅し調製した（Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｍｅｄ．（２００９）１５：１０８８－１０９２．））。定常領域の相同な配列を含むプラスミドＤＮＡを導入して大腸菌を形質転換し、抗体産生プラスミドを作製した。得られた抗体産生プラスミドをＨＥＫ２９３Ｔ細胞などにトランスフェクションし、抗体を含む培養上清を用いて再度抗原との反応性を確認した。抗原反応性を有するプラスミドＤＮＡについてのみ配列を確認し、それぞれの確定抗体ｃＤＮＡとした。各抗体ｃＤＮＡの配列決定は、ＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｖ３．１（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）とＣＭＶプロモーター用プライマーを用いサーマルサイクラー（ＢｉｏＲａｄ）にて反応、未反応試薬をＦａｓｔＧｅｎｅ Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｒｅｍｏｖａｌ Ｋｉｔ（日本ジェネティクス）で除去した後に、キャピラリーシーケンサー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で行った。得られたｃＤＮＡ配列はホモロジー検索を行い既存の既知の抗体遺伝子配列との比較を行った。

【００６９】

２Ｆ７－１Ｂ１－１Ｆ８、７Ｇ９－１Ｅ８－２Ｈ４、Ｍ５Ｓ－１、Ｍ５Ｓ－８、Ｍ５Ｓ

－１０、Ｍ３Ｓ－４抗体のＶＨ鎖とＶＬ鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３のアミノ酸配列を図１５及び表６に示す。配列は、ＤＮＡ配列解析の結果得られた核酸配列をアミノ酸に変換したものである。

【００７０】

【表６】

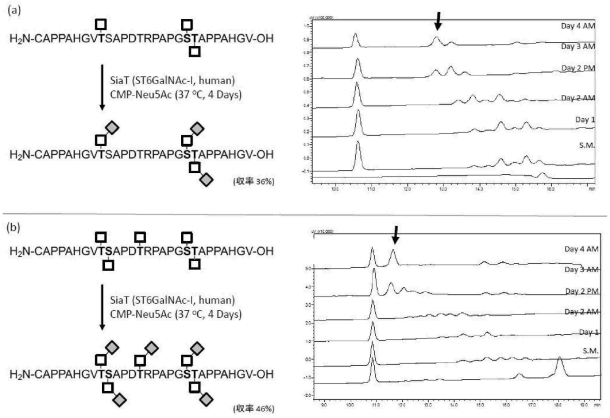
		CDR1	CDR2	CDR3
2F7-1B1-1F8	VH 鎖	GFTFSNHW(配列番号２)	IRLKSDNFAT(配列番号３)	TGPLNWENY(配列番号４)
	VL 鎖	QGISNY(配列番号５)	YTS	QQYSKLPYT(配列番号６)
7G9-1E8-2H4	VH 鎖	GFSLTNYG(配列番号７)	IWGDGST(配列番号８)	AKGGSY(配列番号９)
	VL 鎖	SSVSY(配列番号１０)	DTS	QQWSSNPPMLT(配列番号１１)
M5S-1	VH 鎖	GLSLTSYG(配列番号１２)	IWGDGST(配列番号１３)	AKLGRGDY(配列番号１４)
	VL 鎖	SSVSY(配列番号１５)	DTS	QQWTSNPPTLT(配列番号１６)
M5S-8	VH 鎖	GFSLTNYG(配列番号１７)	IWGGGST(配列番号１８)	AKRGRDGNSWYFDV(配列番号１９)
	VL 鎖	SSVSY(配列番号２０)	DTS	QQWRSNPPT(配列番号２１)
M5S-10	VH 鎖	GFSLNSYG(配列番号２２)	IWTGGGT(配列番号２３)	AMYTNYVFAY(配列番号２４)
	VL 鎖	SSVNY(配列番号２５)	DTS	QQWNSNPPT(配列番号２６)
M3S-4	VH 鎖	GYTFTDHT(配列番号２７)	IYPRDDST(配列番号２８)	ARSRGYKFDY(配列番号２９)
	VL 鎖	SSVSSSS(配列番号３０)	STS	HQYHRSPPT(配列番号３１)

【００７１】

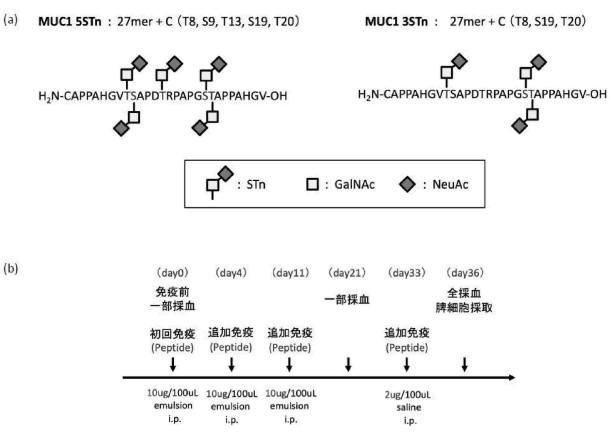
発現ベクターに組み込まれた抗体ｃＤＮＡ（重鎖（Ｇ）と軽鎖（Ｋ））は、ＧｅｎＥｌｕｔｅ™ ＨＰ Ｅｎｄｏｔｏｘｉｎ－Ｆｒｅｅ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｍａｘｉｐｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で調製し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＬＴＸ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いてＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクションした。タンパク質フリーの培地に交換して３日後の培養液から抗体を精製した。マウスＩｇＧ抗体はＰｒｏＧビーズを用いて回収し、０．１Ｍ グリシン（ｐＨ２．５）にて溶出し、３Ｍ Ｔｒｉｓ－Ｃｌ（ｐＨ８．５）で中和後にＰＢＳにバッファー交換した。精製した抗体は、１２．５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで展開し銀染色法あるいはＨＲＰラベル化抗マウスＩｇＧ抗体を用いたウエスタンブロット法にて確認した。

【図面】

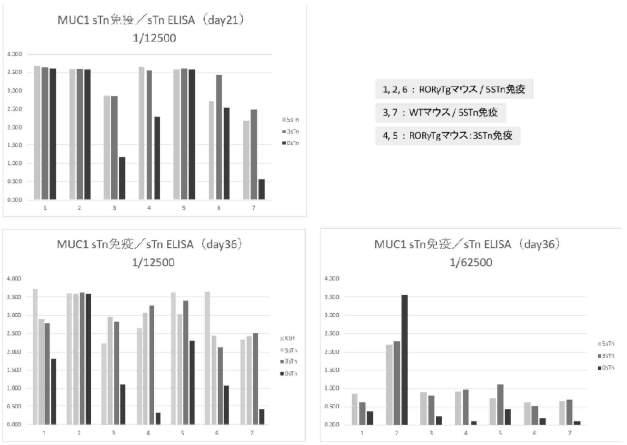
【図１】



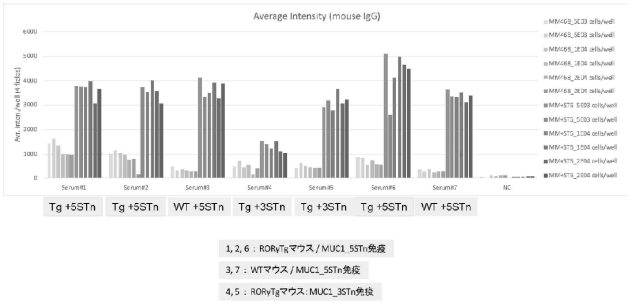
【図２】



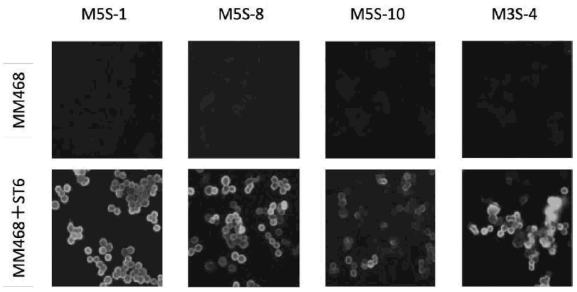
【図３】


MUC1 sTn免疫／sTn ELISA（day21）
1/12500
1, 2, 6：RORγTgマウス／5STn免疫
3, 7：WTマウス／5STn免疫
4, 5：RORγTgマウス：3STn免疫
MUC1 sTn免疫／sTn ELISA（day36）
1/12500
MUC1 sTn免疫／sTn ELISA（day36）
1/62500

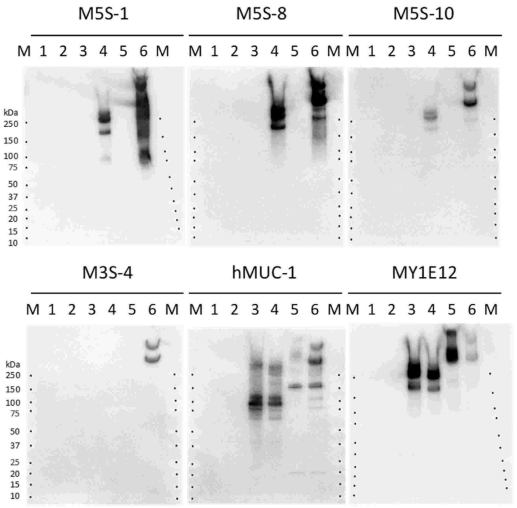
【図４】


Average Intensity (mouse IgG)
Tg +5STn
Tg +5STn
WT +5STn
Tg +3STn
Tg +3STn
Tg +5STn
WT +5STn
1, 2, 6：RORγTgマウス／MUC1_5STn免疫
3, 7：WTマウス／MUC1_5STn免疫
4, 5：RORγTgマウス：MUC1_3STn免疫

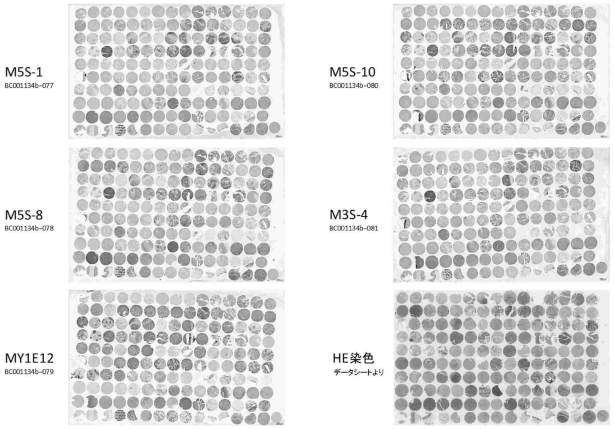
【図５】


M5S-1
M5S-8
M5S-10
M3S-4
MM468
MM468＋ST6

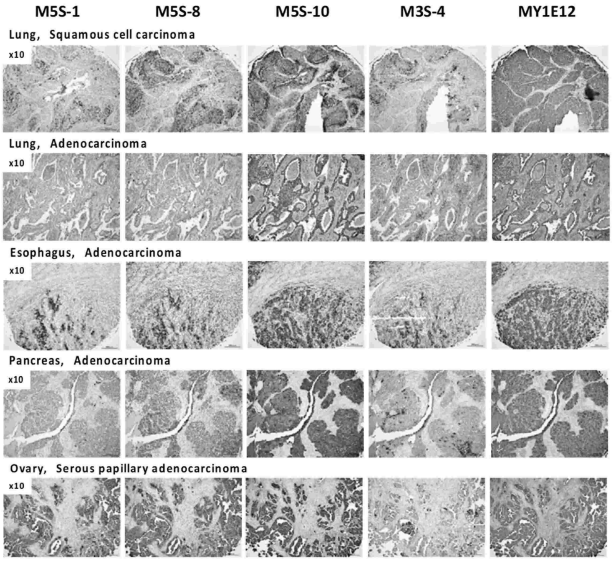
【図６】


M5S-1
M5S-8
M5S-10
M3S-4
hMUC-1
MY1E12
M 1 2 3 4 5 6 M
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

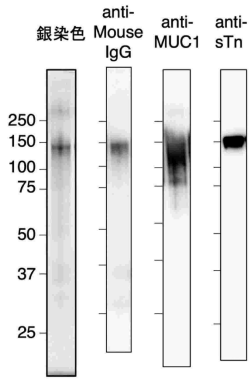
【図７】


M5S-1
BC001134b-077
M5S-10
BC001134b-080
M5S-8
BC001134b-078
M3S-4
BC001134b-081
MY1E12
BC001134b-079
HE染色
データシートより

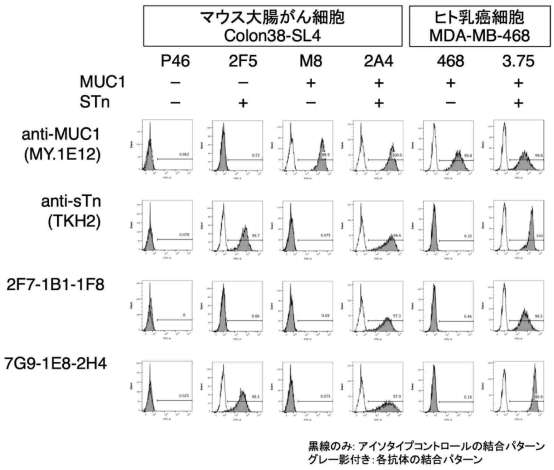
【図８】


M5S-1
M5S-8
M5S-10
M3S-4
MY1E12
Lung, Squamous cell carcinoma
Lung, Adenocarcinoma
Esophagus, Adenocarcinoma
Pancreas, Adenocarcinoma
Ovary, Serous papillary adenocarcinoma
x10

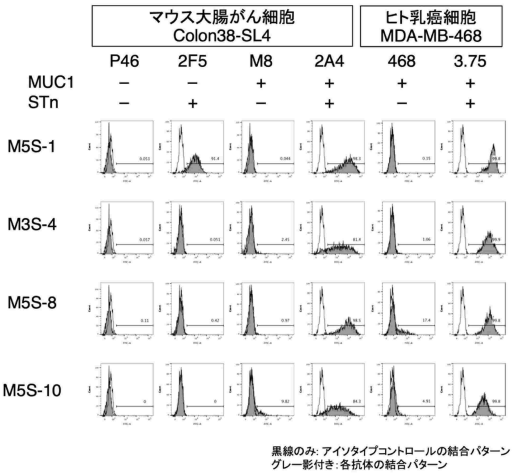
【図９】


銀染色
anti-Mouse IgG
anti-MUC1
anti-sTn
250
150
100
75
50
37
25

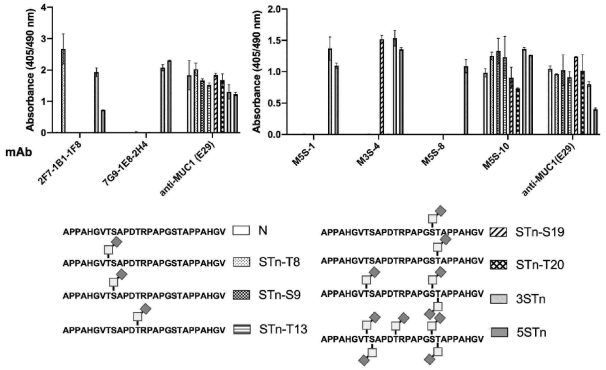
【図１０】


マウス大腸がん細胞 Colon38-SL4
ヒト乳癌細胞 MDA-MB-468
P46
2F5
M8
2A4
468
3.75
MUC1
STn
anti-MUC1 (MY.1E12)
anti-sTn (TKH2)
2F7-1B1-1F8
7G9-1E8-2H4
黒線のみ: アイソタイプコントロールの結合パターン
グレー影付き: 各抗体の結合パターン

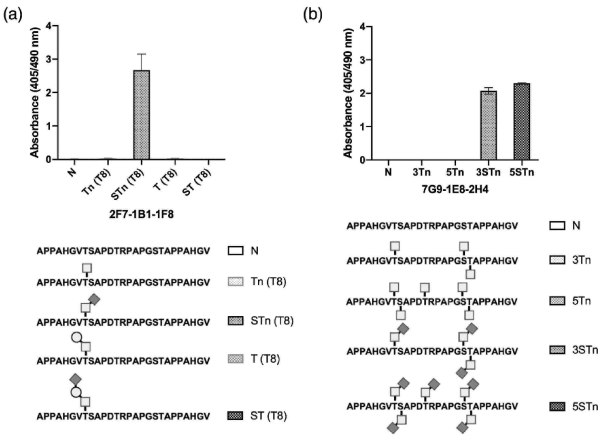
【図１１】



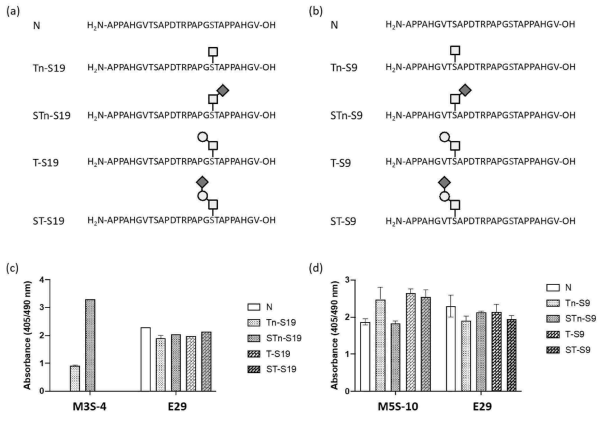
【図１２】



【図１３】



【図１４】



【図１５】

		CDR1	CDR2	CDR3
2F7-1B1-1F8	VH鎖	GFTFSNHW	IRLKSDNFAT	TGPLNWENY
	VL鎖	QGISNY	YTS	QQYSKLPYT
7G9-1E8-2H4	VH鎖	GFSLTNYG	IWGDGST	AKGGSY
	VL鎖	SSVSY	DTS	QQWSSNPPMLT
M5S-1	VH鎖	GLSLTSYG	IWGDGST	AKLGRGDY
	VL鎖	SSVSY	DTS	QQWTSNPPTLT
M5S-8	VH鎖	GFSLTNYG	IWGGGST	AKRGRDGNSWYFDV
	VL鎖	SSVSY	DTS	QQWRSNPPT
M5S-10	VH鎖	GFSLNSYG	IWTGGGT	AMYTNYVFAY
	VL鎖	SSVNY	DTS	QQWNSNPPT
M3S-4	VH鎖	GYTFTDHT	IYPRDDST	ARSRGYKFDY
	VL鎖	SSVSSSS	STS	HQYHRSPPT

【配列表】

２０２４１０６６９３０００００１．ｘｍｌ

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/13　(2006.01)		Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｖ	
		Ｃ１２Ｎ	15/13		

東京都文京区本郷２－１－１　順天堂大学内
(72)発明者　千葉　靖典
茨城県つくば市梅園１－１－１　中央第１　国立研究開発法人産業技術総合研究所内
(72)発明者　佐藤　隆
茨城県つくば市梅園１－１－１　中央第１　国立研究開発法人産業技術総合研究所内
(72)発明者　清水　弘樹
茨城県つくば市梅園１－１－１　中央第１　国立研究開発法人産業技術総合研究所内
(72)発明者　安型　清彦
茨城県つくば市梅園１－１－１　中央第１　国立研究開発法人産業技術総合研究所内

Ｆターム（参考）　4C085　AA13 BB11 CC21 EE01
4H045　AA11 AA30 DA76 EA28 EA51 FA74