

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/116659

発行日 平成23年7月21日 (2011. 7. 21)

(43) 国際公開日 **平成21年9月24日 (2009. 9. 24)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 A	4 C O 8 5
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 P	4 H O 4 5
CO 7 K 16/18 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Y	
CO 7 K 14/82 (2006. 01)	CO 7 K 16/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2010-503943 (P2010-503943)	(71) 出願人	504224153 国立大学法人 宮崎大学
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/055567		宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
(22) 国際出願日	平成21年3月16日 (2009. 3. 16)	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2008-68316 (P2008-68316)		東京都北区浮間5丁目5番1号
(32) 優先日	平成20年3月17日 (2008. 3. 17)	(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100106840 弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991 弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100119183 弁理士 松任谷 優子
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗グリピカン3抗体を用いる肝癌細胞の検出法

(57) 【要約】

本発明は、被験体における肝癌細胞の存在を検出するためのインビトロ免疫アッセイ方法に関する。本発明の方法では、肝癌組織におけるグリピカン3抗原の発現を検出する際に、熱誘導抗原賦活化法による抗原賦活化処理と、プロテアーゼ抗原賦活化法による抗原賦活化処理とを組み合わせることによって、グリピカン3抗原の発現量や発現態様の差異を免疫組織化学的染色法によって検出することができる。このことにより、従来のHIER法ではグリピカン3が高発現していると認定されていた検体を、グリピカン3の発現量に応じて段階的に類別することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における肝癌細胞の存在を検出するためのインビトロの免疫アッセイ方法であって、

(a) 前記被験体から調製された後に、パラフィンに包まれて透過性の支持体に取り付けられた、同一被験体より少なくとも二つの同視し得る一組の組織標品がパラフィン包埋切片として提供され、

(b) 前記一組の組織標品の脱パラフィン処理が実施され、

(c) 前記 (b) 処理が実施された同視し得る一組の組織標品の一方に対して熱誘導抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施され、他方に対してプロテアーゼ抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施され、

(d) 前記 (c) 処理が施された組織標品中に存するグリピカン 3 と抗グリピカン 3 抗体との複合体の形成に適切な条件下で、当該標品に対して抗グリピカン 3 抗体が接触され、

(e) 複合体の存在が検出され、ここで、複合体が存在する場合に被験体において肝癌細胞が存在すると判定される、

の各工程を含む方法。

【請求項 2】

前記熱誘導抗原賦活化法がマイクロ波による加熱である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記熱誘導抗原賦活化法がオートクレーブによる加熱である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プロテアーゼ抗原賦活化法に用いるプロテアーゼが、ペプシン、トリプシンおよびプロテアーゼ K からなる群より選択される、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

複合体を検出するための検出反応が酵素反応である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記抗グリピカン 3 抗体がグリピカン 3 の C 末端ポリペプチドに結合する抗体である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

グリピカン 3 の C 末端ポリペプチドが配列番号 1 に記載の 3 5 9 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、または、3 7 5 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸からなるポリペプチドである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗グリピカン 3 抗体が G C 3 3 抗体である請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗グリピカン 3 抗体が 1 G 1 2 抗体である請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0】

工程 (e) において、複合体の存在が数値化されて検出される、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1】

前記数値化が以下の式；

$$I R_{c,p} = P R + (S I - C p) + S P$$

[式中、

$I R_{c,p}$ は、グリピカン 3 の発現量スコアであり、

$P R$ は、検鏡下で前記複合体が検出される細胞の割合をスコア化した数値であり、

$S I - C p$ は、検鏡下で前記複合体が視野中細胞の細胞質において検出される染色強度をスコア化した数値であり、

$S P$ は、検鏡下での視野中細胞の細胞膜において完全な膜染色を示す細胞の割合をスコア化した数値である] にしたがって算出される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記数値化が以下の式；

$$I R_{c m} = P R + (S I - C m) + S P$$

[式中、

$I R_{c m}$ は、グリピカン 3 の膜局在スコアであり、

$P R$ は、検鏡下で前記複合体が検出される細胞の割合をスコア化した数値であり、

$S I - C m$ は、検鏡下で前記複合体が視野中細胞の細胞膜において検出される染色強度をスコア化した数値であり、

$S P$ は、検鏡下での視野中細胞の細胞膜において完全な膜染色を示す細胞の割合をスコア化した数値である]

にしたがって算出される、請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

請求項 1 1 および 1 2 に記載の方法により算出されたスコアに基づいて、被験体に存在する肝癌細胞を分類する方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 1 および 1 2 に記載の方法により算出されたスコアに基づいて、被験体に抗グリピカン 3 抗体を含む抗癌剤を投与するか否かを決定する方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 1 および 1 2 に記載の方法により算出されたスコアに基づいて、被験体に対する肝癌治療における抗グリピカン 3 抗体を含む抗癌剤の投与量を決定する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、被験体における肝癌細胞の存在を検出するためのインビトロ免疫アッセイ方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

グリピカン 3 は肝癌で頻繁に高発現していることから、肝癌におけるグリピカン 3 の発現プロファイルの解析は、グリピカン 3 の肝癌における機能の同定、肝癌の治療または診断および肝癌の予後予測に有用であろうと考えられている。一般にタンパク質の発現解析に際しては、免疫組織化学、とりわけ酵素抗体法が病理診断に広く用いられている。免疫組織化学は生体内の物質（抗原）の存在と分布を抗体や酵素等の生物学的試薬を用いて高感度、かつ特異的に検出する方法である。免疫組織化学の特徴として、1．手技的に簡便である、2．得られた生化学的情報を形態情報に適用することができる等の広範な応用が可能である、3．生物学的、病理学的に重要な情報を提供する、4．生物学的試薬を用いるので通常の方法とは異なった注意がある、等の特徴があげられる。また、免疫組織化学染色は新鮮凍結切片、細胞診検体、または、固定組織のパラフィン切片等広範囲な検体を用いて目的とする病理診断や形態学的観察に使用できるという長所も有している。

30

【0 0 0 3】

免疫組織化学の中でも、酵素抗体法による免疫染色は、通常の病理診断に用いられるホルマリン固定パラフィン包埋組織が使えるために、その応用範囲は非常に広い。しかし、ホルマリン固定組織であるために起こりうるアーチファクト（人為的所産）等に十分な注意を払わないと、染色に失敗するばかりか、ときにはホルマリン固定および包埋による抗原の変化や、抗体の浸透と反応性の変化をもたらす結果、偽陽性や偽陰性が生じる。こうした偽陽性や偽陰性は、染色結果に対する解釈の誤りに帰結することがある。

40

【0 0 0 4】

通常の組織学的検索に用いられるホルマリン固定は、形態の保持には有用であるが、抗体との結合性の保持という点からは理想的な固定液とはいえない。そこでホルマリン以外にもアルコールなどが固定液として用いられることもあるが、形態保持に優れ、すべての抗原の抗体との結合性を保存できるような固定法はまだ確立されていない。したがって、

50

ホルマリン固定は、抗体との結合性の保持に問題があるものの、広く用いられている現実的な固定法となっている。

【0005】

そこで、抗体との結合性の保持に対するホルマリン固定の影響を減弱するためのいくつかの方法が考えられてきている。第一に、ホルマリン固定の影響を受けないエピトープを認識する抗体を選択して免疫染色に使用するという方策が考えられる。同一の抗原を認識する抗体の中から、抗原中のホルマリン固定の影響を受けにくいエピトープを認識する抗体を免疫染色に使用することにより、偽陰性を減らすことが可能となる。しかしながら、グリピカン3は細胞表面に発現した後にプロテアーゼ等の翻訳後修飾を受けるため、抗体との結合が可能なエピトープが限定されることから、好適なエピトープを選択するためのエピトープの多様性がない。

10

【0006】

第二に、免疫染色の感度を高くして通常の方法では可視化できない抗原を検出する方法が挙げられる。最も簡便な方法は、発色時に通常免疫染色で使用されるDAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)に銅などの重金属を加える方法であるが、顕著な感度の上昇は期待できない。ABC(avidin-biotin-peroxidase complex)法やLSAB(labeled streptavidin biotinylated antibody)法などの、ビオチン化二次抗体とABCあるいは酵素標識アビジンを繰り返して切片と反応させることによって感度をあげるという方法も試みられたが、反応回数が増えるに従って背景の非特異染色も増強する傾向が認められた。さらに酵素標識デキストランポリマーを用いるEPOS(enhanced polymer one-step staining)法や、ビオチン化タイラミドとABC法を組み合わせたCSA(catalyzed signal amplification)法が利用できるようになって、染色の感度は飛躍的に向上した。しかしながら、ABC法等の従来の方法を用いてホルマリン固定組織における抗原を検出する際には、腫瘍組織は陽性と、正常または非腫瘍組織は陰性と判断され、そうした判断に基づいて腫瘍組織と非腫瘍組織の識別をすることが可能であったが、高感度法を用いると非腫瘍組織内の微量の抗原も検出されるため、抗原によってはこのような識別ができない場合もある。また、高感度法を用いる場合は高感度ゆえに背景染色も増強するといった問題も有していた。

20

30

【0007】

第三にホルマリン固定により抗体との反応性が減弱した抗原の反応性を賦活化するという方法がある。1970年代に導入されたプロテアーゼを用いた切片の消化による方法(Protease-induced epitope retrieval, 以下「PIER法」または「プロテアーゼ抗原賦活化法」と指称される)においては、トリプシン、ペプシンなどによる切片の消化が免疫染色の前に行われる。この方法では、切片自体が消化されることに起因する切片のガラスからの剥離や染色結果の不安定性等の問題があった。

【0008】

その後、熱誘導抗原賦活化法(Heat-induced epitope retrieval, 以下「HIER法」または「熱誘導抗原賦活化法」と指称される)が、1990年代に開発された。マイクロウェーブ、煮沸やオートクレーブを用いて加熱すると、高温処理により抗原が加水分解される結果、エピトープが抗体と結合可能になるといわれている。グリピカン3の肝癌における発現も、これまではHIER法によって検出されてきた(非特許文献1~5および特許文献1)。しかしながら、抗グリピカン3抗体が血管や肝類洞の上皮細胞と交叉反応性を示すため、正常肝細胞由来のタンパク質ライゼートとのブロック反応を予め施してこうした交叉結合を除外するような煩雑な処理が必要であり(非特許文献4)、元来細胞膜上に発現しているグリピカン3が細胞質性に発現しているように観察される等(非特許文献2)、従来用いられているHIER法では肝癌組織でのグリピカン3の発現が正確に検出できず、従来HIER法に替わる当該発現の正確

40

50

な検出方法の開発が求められていた。

【0009】

【非特許文献1】Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J., (2003) Gastroenterology 125(1), 89-97

【非特許文献2】Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi K, Midorikawa Y, Morishita Y, Niki T, Shibahara J, Mori M, Makuuchi M, Hippo Y, Kodama T, Iwanari H, Aburatani H, Fukayama M., (2005) Mod Pathol 18(12), 1591-8

【非特許文献3】Libbrecht L, Severi T, Cassiman D, Vander Borghst S, Pirenne J, Nevens F, Verslype C, van Pelt J, Roskams T., (2006) Am J Surg Pathol 30(11), 1405-11

【非特許文献4】Grozdanov PN, Yovchev MI, Dabeva MD., (2006) Lab Invest 86(12), 1272-84

【非特許文献5】Lloviet, J.M., Chen, Y., Wurmbach, E., Roayaie, S., Fiel, M.I., Schwartz, M., Thung, S.N., Khitrov, G., Zhang, W., Villanueva, A., Battiston, C., Mazzaferro, V., Bruix, J., Waxman, S., Friedman, S.L., (2006) Gastroenterology 131(6), 1758-1767

【特許文献1】WO2003100429

【特許文献2】WO2006006693

【特許文献3】WO2004022739

【発明の開示】

【0010】

[発明が解決しようとする課題]

本発明はこのような場合に鑑みて為されたものであり、その目的は、肝癌組織におけるグリピカン3の発現の態様を正確に検出することを可能とする方法を提供することにある。

【0011】

[課題を解決するための手段] 本発明者らは、肝癌組織におけるグリピカン3抗原の発現を検出する際に、熱誘導抗原賦活化法による抗原賦活化処理と、プロテアーゼ抗原賦活化法による抗原賦活化処理とを組み合わせることによって、グリピカン3抗原の発現量や発現態様の差異を免疫組織化学的染色法によって検出できることを見出して本発明を完成した。このことにより、従来 of HIER法ではグリピカン3が高発現していると認定されていた検体を、グリピカン3の発現量に応じて段階的に類別することが可能となった。

【0012】

すなわち、本願出願は以下の発明；

[1] 被験体における肝癌細胞の存在を検出するためのインビトロの免疫アッセイ方法であって、

(a) 前記被験体から調製された後に、パラフィンに包まれて透過性の支持体に取り付けられた、同一被験体より少なくとも二つの同視し得る一組の組織標品がパラフィン包埋切片として提供され、

(b) 前記一組の組織標品の脱パラフィン処理が実施され、

(c) 前記(b)処理が実施された同視し得る一組の組織標品の一方に対して熱誘導抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施され、他方に対してプロテアーゼ抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施され、

(d) 前記(c)処理が施された組織標品中に存するグリピカン3と抗グリピカン3抗体

との複合体の形成に適切な条件下で、当該標品に対して抗グリピカン 3 抗体が接触され、(e) 複合体の存在が検出され、ここで、複合体が存在する場合に被験体において肝癌細胞が存在すると判定される、

の各工程を含む方法；

[2] 前記熱誘導抗原賦活法がマイクロ波による加熱である [1] に記載の方法；

[3] 前記熱誘導抗原賦活法がオートクレーブによる加熱である [1] に記載の方法；

[4] 前記プロテアーゼ抗原賦活法に用いるプロテアーゼが、ペプシン、トリプシンおよびプロテアーゼ K からなる群より選択される、[1] から [3] のいずれかに記載の方法；

[5] 複合体を検出するための検出反応が酵素反応である、[1] から [4] のいずれかに記載の方法；

[6] 前記抗グリピカン 3 抗体がグリピカン 3 の C 末端ポリペプチドに結合する抗体である、[1] から [5] のいずれかに記載の方法；

[7] グリピカン 3 の C 末端ポリペプチドが配列番号 1 に記載の 359 番目のアミノ酸から 580 番目のアミノ酸からなるポリペプチド、または、375 番目のアミノ酸から 580 番目のアミノ酸からなるポリペプチドである [6] に記載の方法；

[8] 前記抗グリピカン 3 抗体が GC 33 抗体である [6] または [7] に記載の方法；

[9] 前記抗グリピカン 3 抗体が 1G12 抗体である [1] から [5] のいずれかに記載の方法；

[10] 工程 (e) において、複合体の存在が数値化されて検出される、[1] から [9] のいずれかに記載の方法；

[11] 前記数値化が以下の式；

$$I R_{c p} = P R + (S I - C p) + S P$$

[式中、

$I R_{c p}$ は、グリピカン 3 の発現量スコアであり、

$P R$ は、検鏡下で前記複合体が検出される細胞の割合をスコア化した数値であり、

$S I - C p$ は、検鏡下で前記複合体が視野中細胞の細胞質において検出される染色強度をスコア化した数値であり、 $S P$ は、検鏡下での視野中細胞の細胞膜において完全な膜染色を示す細胞の割合をスコア化した数値である]

にしたがって算出される、[10] に記載の方法；

[12] 前記数値化が以下の式；

$$I R_{c m} = P R + (S I - C m) + S P$$

[式中、

$I R_{c m}$ は、グリピカン 3 の膜局在スコアであり、

$P R$ は、検鏡下で前記複合体が検出される細胞の割合をスコア化した数値であり、

$S I - C m$ は、検鏡下で前記複合体が視野中細胞の細胞膜において検出される染色強度をスコア化した数値であり、

$S P$ は、検鏡下での視野中細胞の細胞膜において完全な膜染色を示す細胞の割合をスコア化した数値である]

にしたがって算出される、[10] に記載の方法；

[13] [11] および [12] に記載の方法により算出されたスコアに基づいて、被験体に存在する肝癌細胞を分類する方法；

[14] [11] および [12] に記載の方法により算出されたスコアに基づいて、被験体に抗グリピカン 3 抗体を含む抗癌剤を投与するか否かを決定する方法；

[15] [11] および [12] に記載の方法により算出されたスコアに基づいて、被験体に対する肝癌治療における抗グリピカン 3 抗体を含む抗癌剤の投与量を決定する方法；を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】 $S I$ のスコアの各グレードを表す図である。

10

20

30

40

50

【図2】SPのスコアの各グレードを表す図である。

【図3】HuH-7およびHePG2細胞移植モデルの標品の染色結果を示す図である。

【図4】ヒト肝癌の臨床検体から調製された標品の染色結果を示す図である。

【図5A】hGC33抗体のヒト肝癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を表す図である。

【図5B】hGC33抗体のヒト肝癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を表す図である。

【図5C】hGC33抗体のヒト肝癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を表す図である。

【図5D】hGC33抗体のヒト肝癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果を表す図である。

10

【0014】

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2008-068316号の明細書に記載された内容を包含する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

組織標品

本明細書中で使用される用語「組織標品」とは、個体、体液（例えば、血液、血清、血漿、および髄液）、組織培養物もしくは組織切片等から得られる任意の生物学的標品をいう。生物学的標品として用いられるものとして被験体標品が好適に挙げられる。好ましい被験体標品は、被験体から得られた組織であり、さらに好ましくは、被験体の肝組織である。肝組織を採取する方法としては公知の方法である生検（バイオプシー）が好適に用いられる。肝生検とは細く長い針が皮膚の表面から直接肝臓に刺され、肝臓の組織が採取される方法をいう。通常、針が穿刺される部位は右胸下部の肋間である。術前に超音波検査装置を用いて穿刺部の安全性が確認された上で、穿刺部が消毒される。更に皮膚から肝臓の表面までが麻酔の対象となり、穿刺部の皮膚が小切開された後に穿刺針が穿刺される。

20

【0016】

本発明においては、組織標品が顕微鏡下で透過光線によって観察されるために、組織標品が顕微鏡に使用される光線を十分に透過する程度に薄切される。薄切の前段階として組織標品が固定される。すなわち、組織・細胞の蛋白質に脱水や変性を起こさせて凝固させることによって、組織を構成する細胞が速やかに死滅し、その構造が安定化および不溶化される。まず、固定の対象とされる組織標品が、パラフィン包埋切片を作るのに適した大きさおよび形の断片として手術用メス等の刃物で切り取られる。次いで、固定を実施するために用いられる試薬である固定液中で当該断片が浸漬される。固定液としては、ホルマリン、更に好ましくは中性緩衝ホルマリンが好適に使用される。中性緩衝ホルマリンの濃度は組織標品の特性または物性に依りて適宜選択される。濃度は1～50%、好ましくは5～25%、更に好ましくは10～15%の間で適宜変更されて使用され得る。組織標品が浸漬された固定液が真空ポンプを用いて適宜脱気される。固定は組織標本を常圧および室温の条件下で固定液中に数時間放置することによって実施される。固定に要する時間は、1時間から7日間、好ましくは2時間から3日間、また好ましくは3時間から24時間、更に好ましくは4時間から16時間の範囲で適宜選択され得る。固定の後にリン酸緩衝液等に更に数時間（2時間から48時間、好ましくは3時間から24時間、更に好ましくは4時間から16時間の範囲で適宜選択され得る時間）、適宜浸漬される。

30

40

【0017】

次に、固定が適用された組織標品から、凍結切片法またはパラフィン切片法を用いて切片が好適に作製され得る。凍結切片法の好適な例としては、O.C.T.compound (Miles, Inc) 中に組織を投入して凍結させたものを、クリオスタット（凍結切片作製装置）を用いて薄切する方法が挙げられる。パラフィン切片法においては、固定が適用された組織標品が包埋剤に浸漬され固められることにより、均一かつ適切な硬度が付与される。包埋剤としては、パラフィンが好適に使用され得る。固定が適用された組織

50

標品はエタノールを用いて脱水される。具体的には、組織標品が70%エタノール、80%エタノール、100%エタノールに順次浸漬されることによって、当該組織標品が脱水される。浸漬に要する時間および回数は、1時間から数日および1回から3回の範囲で適宜選択され得る。また、室温または4℃においても浸漬され得るが、4℃において浸漬される場合には、浸漬時間は終夜等その時間が長いほうが好ましい。次いでその液相がキシレンに置換された後に、組織標品がパラフィンによって包埋される。その液相のキシレンへの置換に要する時間は1時間から数時間の範囲で適宜選択され得る。その際に、室温で置換され得るし、4℃においても置換され得るが、4℃において置換される場合には、置換の時間は、終夜等その時間が長いほうが好ましい。パラフィン包埋に要する時間および回数は、1時間から数時間および1回から4回の範囲で適宜選択され得る。その際に、室温で包埋され得るし、4℃においても包埋され得るが、4℃において包埋される場合には、包埋の時間は、終夜等その時間が長いほうが好ましい。また、パラフィン包埋反応が自動化処理されるパラフィン包埋装置（EG1160、Leica等）を用いることによって、組織標品が好適にパラフィン包埋され得る。

10

【0018】

上述のようにしてパラフィン包埋された組織標品を台木に接着することによって「ブロック」が作製され、このブロックがマイクロームによって1から20μmの厚さから選択される所望の厚さに薄切される。薄切された組織切片は透過性の支持体であるスライドグラス上に静置されることにより固着される。この場合において、組織切片の剥離を防止するためにスライドガラスに0.01%ポリ-L-リジン（Sigma）を塗布し乾燥させたスライドグラスも好適に使用され得る。固着された組織切片は数分から1時間の間から選択される適切な時間風乾される。

20

【0019】

本発明においては、上述のように調製され、透過性の支持体上に取り付けられた二つの組織標品が一組用意される。この当該組織標品は組織上同視され得る二つの組織標品であることが望ましい。「同視され得る」とは、相比較する二つの組織標品がその組織標品が由来する被験体標品中でほぼ同一の細胞または組織から構成されていることを意味する。例えば、隣接する切片として調製された二つの組織標品は同視され得る二つの組織標品である。本発明においても特段別に記載しない限り、「同視され得る二つの組織標品」とは隣接する切片として調製された二つの組織標品をいうが、これに加えて、隣接する切片として調製されていなくとも二つの組織標品を構成する細胞または組織の構成が当該二つの組織標品間で同視できるものであれば「同視され得る二つの組織標品」に該当する。細胞または組織の構成が当該二つの組織標品間で同視できる場合としては、例えば、(1)組織切片中の平面座標上で同一の位置に同一の細胞から由来する細胞の切片が存在する場合、(2)当該細胞の切片が当該平面座標上の同一の位置に存在する割合が少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、また好ましくは70%以上、更に好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上である場合、等が好適に例示される。

30

【0020】

抗原賦活化

本発明の方法においては、ホルマリン固定により抗体との反応性が減弱した抗原の反応性を賦活化する。本発明においては、二つの組織標品のうちの標品に対して、プロテアーゼ抗原賦活化法（PIER法）を適用し、他方の標品に対して、熱誘導抗原賦活化法（HIER法）を適用し、抗体と反応させたときの両者間の染色程度の相違を数値化する。

40

【0021】

熱誘導抗原賦活化法は、マイクロ波による加熱方法やオートクレーブによる加熱方法、または、煮沸処理による加熱方法等が適宜用いられる。液温が約98℃に保たれるように780Wの出力で煮沸処理する場合、処理等賦活化に要する時間は5分-60分の間から適宜選択され、例えば10分間である。抗原の賦活化処理は、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液の他、市販のTarget Retrieval Solution（Dako

50

Cytomation)等の中で行うことができる。下記の実施例においてはTarget Retrieval Solutionを使用する。賦活化処理の結果として抗グリピカン3抗体が認識する抗原中のエピトープが抗体との結合性を獲得して、後述する抗原と抗体の複合体の検出が可能となるものであれば、いずれの緩衝液、水溶液も好適に用いられる。

【0022】

プロテアーゼ抗原賦活化法において使用されるプロテアーゼは、その種類や由来について特に限定されるものでなく、一般的に入手可能なプロテアーゼを適宜選択して使用され得る。用いられるプロテアーゼの例として、0.01N塩酸中0.05%濃度のペプシン、または、pH7.6のTris緩衝液中0.01%濃度のCaCl₂を更に含有する0.1%濃度のトリプシン、10mMのEDTAおよび0.5%のSDSを含むpH7.8の10mM Tris塩酸緩衝液中1~50μg/ml濃度のプロテアーゼK等が好適に挙げられる。さらにプロテアーゼKを用いる場合、その反応液のpHは6.5から9.5の間で適宜選択され、SH試薬やトリプシン阻害剤やキモトリプシン阻害剤も適宜利用され得る。本明細書実施例中で記載されるヒストファインHER2キット(MONO)(ニチレイバイオサイエンス)に添付されるプロテアーゼもこうした好適なプロテアーゼの具体例として挙げられる。プロテアーゼ抗原賦活化は通常37にて行われるが、反応温度は25から50の範囲内において適宜変更され得る。プロテアーゼ抗原賦活化が37にて行われる場合には、反応時間は例えば1分から5時間の間で適宜選択され、例えば、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間等である。賦活化処理が終了した後、当該処理が施された組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS(Phosphate buffer saline)が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

【0023】

抗グリピカン3抗体

本発明の方法に用いられる抗グリピカン3抗体は、グリピカン3に結合する活性を有していればいずれの抗体も好適に使用され得る。特に好適な抗体の例は、下記の実施例において開示されるGC33抗体(特許文献2)や1G12抗体(特許文献1)である。また、これらの公知の抗体の他にも、グリピカン3を免疫抗原として使用して非ヒト動物を免疫することによって、本発明に好適に用いられる抗グリピカン3抗体を取得することができる。特許文献1、特許文献2にはこうした抗グリピカン3抗体の作製方法が記載されており、当業者であれば当該方法に基づいて適宜所望の抗グリピカン3抗体を取得することが可能である。

【0024】

抗グリピカン3抗体のグリピカン3への結合は当業者に公知の方法により好適に検出され得る。例えば、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。これらの方法は、一般的な教示書である「Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988」に記載されている。

【0025】

抗原を発現している細胞に対する抗体の結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual.(Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)中の359-420ページに記載されている方法が挙げられる。すなわち、細胞を抗原とするELISAやFACS(fluorescence activated cell sorting)の原理によって好適に評価され得る。ELISAフォーマットにおいては、細胞への抗体の結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、抗原を強制発現させた細胞

を固定化したELISAプレートに被験抗体を加え、被験抗体を認識する酵素標識抗体を利用して、細胞に結合した抗体が検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗体の希釈系列を作成し、抗原を強制発現させた細胞に対する抗体結合力価(titer)を決定することにより、細胞に対する結合活性が比較され得る。

【0026】

FACSフォーマットにより、ELISAプレート等の担体に結合していない、緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原と当該抗原に対する抗体との結合を測定することができる。このような測定に使用するフローサイトメーターとしては、例えば、FACSCanto™ II, FACSAria™, FACSAria™, FACSVantage™ SE, FACSCalibur™ (以上、BD Biosciences) や、EPICS ALTRA HyperSort, Cytomics FC500, EPICS XL-MCL ADC, EPICS XL ADC, Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (以上、Beckman Coulter) などが挙げられる。

10

【0027】

抗グリピカン3抗体の抗原に対する結合活性を測定する好適な方法の一例として、グリピカン3を発現する細胞と反応させた被検抗体を認識する二次抗体を用いる方法が挙げられる。グリピカン3を発現する細胞を被検抗体と反応させ、FITC標識した二次抗体で染色後、FACSCalibur (BD) により測定を行い、その蛍光強度をCELL QUEST Software (BD) を用いて解析する。本方法によれば、FACSCaliburにより測定を行った場合において、その蛍光強度をCELL QUEST Softwareを用いて解析する方法によって得られるGeometric Meanの値(被検Geo-Mean値)を、一次抗体として対照抗体を用いたときの対照Geo-Mean値と比較することによって、抗原に対する抗体の結合活性を判定することができる。Geo-Mean値(Geometric Mean)を求める計算式は、CELL QUEST Software User's Guide (BD biosciences社) に記載されている。

20

【0028】

組織標品と抗グリピカン3抗体との反応

熱誘導抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施された組織標品およびプロテアーゼ抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施された組織標品に対して、抗グリピカン3抗体を一次抗体として反応させる。当該反応は抗グリピカン3抗体が抗原中のエピトープを認識して抗原抗体複合体を形成するのに適切な条件下で実施される。通常、当該反応は4にて終夜、または37にて1時間実施されるが、反応条件は、抗体が抗原中のエピトープを認識して抗原抗体複合体を形成するのに適切な範囲で適宜変更され得る。例えば、反応温度は4から50の範囲内で変更され得るし、反応時間は1分から7日の間で変更され得る。低温での反応が実施される場合には長い時間反応させることが好ましい。一次抗体反応が終了した後、組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS (Phosphate buffer saline) が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

30

40

【0029】

次いで、一次抗体反応が施された組織標品に対して、一次抗体を認識する二次抗体を反応させる。通常、二次抗体を可視化するための標識物質によって予め標識された二次抗体が用いられる。標識物質としては、FITC (フルオレセインイソチオシアネート) やCy2 (Amersham)、Alexa488 (Molecular Probe) 等の蛍光色素、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素、または金コロイド等が好適に挙げられる。

【0030】

二次抗体との反応は、抗グリピカン3抗体と、当該抗グリピカン3抗体を認識する二次

50

抗体とが抗原抗体複合体を形成するのに適切な条件下で実施される。通常、当該反応は室温または37℃にて30分乃至1時間実施されるが、抗グリピカン3抗体と二次抗体とが抗原抗体複合体を形成するのに適切な範囲で適宜変更され得る。例えば、反応温度は4℃から50℃の範囲内で変更され得るし、反応時間は1分から7日の間で変更され得る。低温での反応が実施される場合には長い時間反応させることが好ましい。二次抗体反応が終了した後、組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS (Phosphate buffer saline) が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

【0031】

次に、二次抗体反応が施された組織標品に対して、標識物質を可視化する物質を反応させる。二次抗体の標識物質としてペルオキシダーゼを用いた場合には、0.02%過酸化水素水とpH7.2の0.1Mトリス塩酸緩衝液で0.1%濃度に調製されたDAB (ジアミノベンジジン) 溶液とをインキュベート直前に等量混合することによって得られる反応液で組織標品がインキュベートされる。DABの他には、DAB-NiやAEC+ (以上、DAKO) 等の発色基質が適宜選択され得る。インキュベートの過程において、時折顕微鏡下で発色の程度を観察し、適切な発色が確認された段階で組織標品をPBSに浸漬することによって可視化反応が止められる。

【0032】

二次抗体の標識物質として、アルカリフォスファターゼを用いた場合には、BCIP (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸) / NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) (Zymed) 基質溶液 (10mM濃度のMgCl₂および28mM濃度のNaClを含有するpH9.8の50mM炭酸ナトリウム緩衝液に、0.4mM濃度でNBTおよび0.38mM濃度でBCIPが溶解されたもの) で組織標品がインキュベートされる。また、BCIPおよびNBTの他には、Permanent Red、Fast Red、またはFuchsin+ (以上、DAKO) 等も適宜使用されうる。インキュベートに先立って、1mM濃度の内在性アルカリフォスファターゼの阻害剤である塩化レバミソール (ナカライテスク)、0.1M塩化ナトリウムおよび50mM塩化マグネシウムを含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH9.5) と、室温にて1分から数時間プレインキュベートしてもよい。インキュベートの過程において、時折顕微鏡下で観察し、反応最終産物である紫色のホルマザンの沈着が観察された段階で、組織標品を水洗または2%ポリビニルアルコールを含むTBSによる反応停止の後、TBST (0.1%のTween20を含むTBS) にて洗浄される。金コロイドが二次抗体の標識として使用される場合には、銀増感によって金粒子に金属銀が付着されることによって金コロイドが可視化される。銀増感の方法は当業者に公知である。

【0033】

FITC (フルオレセインイソチオシアネート) やCy2 (Amersham)、Alexa488 (Molecular Probe) 等の蛍光色素を二次抗体の標識物質として用いた場合には、可視化物質の反応工程は不要であり、当該蛍光物質の励起波長の光を照射して、放出される光が蛍光顕微鏡を用いることによって適宜検出され得る。

【0034】

肝癌組織の分類と治療効果の予測

グリピカン3は肝癌組織において消化を受けてそのN末端部分が血清中に遊離することが知られている (特許文献3)。したがって、本発明の方法において、そのような消化を受けて血清中に遊離するグリピカン3のN末端の部分ペプチドに結合する抗体を用いた場合には、当該抗体は消化を受けた後になお細胞表面上に係留するC末端の部分ポリペプチドには結合することができない。一方、本発明の方法において、C末端の部分ペプチドに結合する抗体を用いた場合には、当該抗体は消化を受けた後になお細胞表面上に係留するC末端の部分ポリペプチドに結合することができる。すなわち、本発明に使用される抗グリピカン3抗体を目的によって適宜選択することによって、消化を受けるか否かに関わら

10

20

30

40

50

ず細胞表面上に係留するグリピカン3の部分ポリペプチドを検出することも、消化されるまでは細胞表面に係留されるが消化を受けた後には血清中に遊離されるグリピカン3の部分ポリペプチドを検出することも可能である。

【0035】

肝癌の治療および予防に抗グリピカン3抗体が有用であることが見いだされている（特許文献3）。このような治療用抗グリピカン3抗体が奏する殺細胞活性は、主に、細胞表面上に係留されたC末端の部分ポリペプチドに結合した抗グリピカン3抗体のFc部分にエフェクター細胞や補体が結合することにより開始される抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）や補体依存性細胞傷害活性（CDC活性）によって発揮される。したがって、抗グリピカン3抗体が結合するエピトープの肝癌組織における存否の観点から治療用抗グリピカン3抗体による肝癌の治療効果を予測する場合には、本発明の方法において、C末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体が好適に使用され得る。

10

【0036】

グリピカン3が肝癌組織において消化を受ける部位は、配列番号1で表されるグリピカン3分子の358番目と359番目のアミノ酸、または、374番目と375番目のアミノ酸のポリペプチド結合であることが示唆されている（特許文献3）。したがって、本発明で好適に使用されるC末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体としては、配列番号1で表されるグリピカン3分子の359番目から580番目のアミノ酸からなるポリペプチド、または、375番目から580番目のアミノ酸からなるポリペプチドに結合する抗体が挙げられる。

20

【0037】

一方で、治療用抗グリピカン3抗体による治療効果をグリピカン3分子の成熟化の観点から予測する場合には、本発明の方法において、N末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体を用いることができる。この場合、N末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体によって認識されるグリピカン3分子はより成熟化していない治療標的分子として、そのようなグリピカン3分子を発現する肝癌細胞はより成熟化していない治療標的細胞として、それぞれ性格付けされ得る。グリピカン3分子のC末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体は、成熟化のいかんに関わらずグリピカン3分子を検出する。一方、グリピカン3分子のN末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体は成熟化前のグリピカン3分子を検出するが、成熟化後のグリピカン3分子は検出しない。すなわち、グリピカン3分子のC末端の部分ポリペプチドに結合する抗体と、N末端の部分ポリペプチドに結合する抗体との2種類の抗体を使用することによって、本発明の方法によって検出されるグリピカン3分子およびグリピカン3分子を発現する肝癌細胞を成熟化の度合いにより分類することが可能となる。

30

【0038】

この分類方法について、以下により具体的に記載する。一次抗体として、グリピカン3分子のC末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体と、グリピカン3分子のN末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体との2種類の抗体を用意する。同一被験者から2つの組織標品を調製し、その一方に対してはグリピカン3分子のN末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体が一次抗体として反応に供され、他方に対してはグリピカン3分子のC末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体が一次抗体として反応に供される。グリピカン3分子のN末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体を用いて検出されるグリピカン3分子は、その成熟化の程度という観点から、より成熟化されていない分子と評価されることが可能であり、そのようなグリピカン3分子を発現する肝癌細胞は、より成熟化されていない細胞と評価されることが可能である。また、グリピカン3分子のN末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体では検出されないが、グリピカン3分子のC末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン3抗体を用いて検出されるグリピカン3分子は、その成熟化の程度という観点から、より成熟化されている分子と評価されることが可能であり、そのようなグリピカン3分子を発現する肝癌細胞は、より成熟化されている細胞と評価されることが可能であ

40

50

る。

【 0 0 3 9 】

グリピカン 3 分子の N 末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン 3 抗体と、グリピカン 3 分子の C 末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン 3 抗体とが互いに異なる抗体のサブクラスに属する場合、あるいは異なる種類の動物で生成されたものである場合には、1 つの組織標品を用いて測定を行うことが可能である。この場合においては、N 末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン 3 抗体を認識する二次抗体と、C 末端の部分ポリペプチドに結合する抗グリピカン 3 抗体を認識する二次抗体とを、異なる種類の酵素または蛍光で標識することにより、1 つの組織標品上で 2 種類の抗グリピカン 3 抗体を用いる検出が可能となる。

10

【 0 0 4 0 】

抗グリピカン 3 抗体との反応性の数値化

本発明は抗原賦活化反応（すなわち、熱誘導抗原賦活化法およびプロテアーゼ抗原賦活化法）の相違に基づいて、グリピカン 3 と抗グリピカン 3 抗体とから形成される抗原抗体複合体の顕微鏡下での検出の程度および態様の相違を数値化する方法を提供する。

【 0 0 4 1 】

1 つの態様においては、数値化は以下の式（1）；

$$I R_{c p} = P R + (S I - C p) + S P$$

[式中、

$I R_{c p}$ は、グリピカン 3 の発現量スコアであり、

20

$P R$ は、検鏡下で前記複合体が検出される細胞の割合をスコア化した数値であり、

$S I - C p$ は、検鏡下で前記複合体が視野中細胞の細胞質において検出される染色強度をスコア化した数値であり、

$S P$ は、検鏡下での視野中細胞の細胞膜において完全な膜染色を示す細胞の割合をスコア化した数値である]

にしたがって行う。

$P R$ のスコアは、

(a) 4 倍または 1 0 倍の対物レンズを用いた検鏡下での視野中細胞のうち；

(i) 前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを 0、

(i i) 当該割合が 2 0 % 未満の検体のスコアを 1、

30

(i i i) 当該割合が 2 0 % 以上で 5 0 % 未満の検体のスコアを 2、

(i v) 当該割合が 5 0 % 以上の検体のスコアを 3 として算出し、

$S I - C p$ のスコアは、

(b) 検鏡下での視野中細胞の細胞質において、

(i) 前記顕鏡が 4 倍または 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを 0、

(i i) 前記顕鏡が 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に不明りょうであるがうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを 1、

(i i i) 4 倍の対物レンズでうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを 2、

40

(i v) 4 倍の対物レンズでも十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを 3、

(v) 4 倍の対物レンズで、明確に認識され強い陽性反応が認められる検体のスコアを 4 として算出し、

$S P$ のスコアは、

(c) 検鏡下での視野中細胞の細胞膜における前記複合体の検出において、

(i) 細胞膜における陽性反応が認められない検体のスコアを 0、

(i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 2 0 % 未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 1、

(i i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 2 0 % 以上で 5 0 % 未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 2、

50

(i v) 陽性反応が認められる細胞のうち 5 0 % 以上の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 3 として算出する。

【 0 0 4 2 】

別の態様においては、数値化は以下の式 (2) ;

$$I R_{c m} = P R + (S I - C m) + S P$$

[式中、

$I R_{c m}$ は、グリピカン 3 の膜局在スコアであり、

$P R$ は、検鏡下で前記複合体が検出される細胞の割合をスコア化した数値であり、

$S I - C m$ は、検鏡下で前記複合体が視野中細胞の細胞膜において検出される染色強度をスコア化した数値であり、

$S P$ は、検鏡下での視野中細胞の細胞膜において完全な膜染色を示す細胞の割合をスコア化した数値である]

にしたがって行う。

$P R$ のスコアは、

(a) 4 倍または 1 0 倍の対物レンズを用いた検鏡下での視野中細胞のうち ;

(i) 前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを 0 、

(i i) 当該割合が 2 0 % 未満の検体のスコアを 1 、

(i i i) 当該割合が 2 0 % 以上で 5 0 % 未満の検体のスコアを 2 、

(i v) 当該割合が 5 0 % 以上の検体のスコアを 3 として算出し、

$S I - C m$ のスコアは、

(b) 検鏡下での視野中細胞の細胞膜において、

(i) 前記顕鏡が 4 倍または 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを 0 、

(i i) 前記顕鏡が 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に不明りょうであるがうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを 1 、

(i i i) 4 倍の対物レンズで不明りょうであるが 1 0 倍の対物レンズで十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを 2 、

(i v) 4 倍の対物レンズでも十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを 3 、

(v) 4 倍の対物レンズで、明確に認識され強い陽性反応が認められる検体のスコアを 4 として算出し、

$S P$ のスコアは、

(c) 検鏡下での視野中細胞の細胞膜における前記複合体の検出において、

(i) 細胞膜における陽性反応が認められない検体のスコアを 0 、

(i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 2 0 % 未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 1 、

(i i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 2 0 % 以上で 5 0 % 未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 2 、

(i v) 陽性反応が認められる細胞のうち 5 0 % 以上の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 3 として算出する。

【 0 0 4 3 】

この場合において、熱誘導抗原賦活化法が施された組織標品と、プロテアーゼ抗原賦活化法が施された組織標品のそれぞれについて、上述の式 (1) および式 (2) に基づいて算出されるスコアが決定される。式 (1) に基づいて算出されるスコアはグリピカン 3 の発現量を反映したスコアであり、式 (2) に基づいて算出されるスコアはグリピカン 3 の細胞膜での発現の局在を反映したスコアである。本発明の数値化の方法に基づけば、被験体に存在する肝癌細胞をグリピカン 3 の発現量や発現の態様に基づいて分類することが可能となる。下記の実施例に示されるように、実際の肝癌患者から採取された組織標品を用いて分類が有効に実施されることが確認された。さらに、グリピカン 3 の発現量が決定されている肝癌細胞株である H u H - 7 または H e p G 2 を移植した肝癌動物モデルにおい

10

20

30

40

50

ても、当該分類が有効に実施されることが確認された。

【0044】

さらに本発明において、肝癌動物モデルに対して治療用抗グリピカン3抗体を投与した結果、本発明の方法にしたがって数値化により分類された肝癌におけるグリピカン3の発現量および発現態様の相違と、治療用抗グリピカン3抗体による肝癌の治療に対する効果の相違が互いに相関することが実証された。すなわち、本発明にしたがって数値化されたスコアの相違に基づいて、治療用抗グリピカン3抗体の治療効果の相違が判断されることが示された。本発明にしたがう数値化の方法に基づけば、抗グリピカン3抗体を有効成分として含む肝癌治療剤を用いた肝癌治療の効果を予測することが可能となる。また、本発明にしたがう数値化の方法に基づけば、抗グリピカン3抗体を用いた肝癌治療において所望の効果をj得るために必要な治療用抗グリピカン3抗体の必要投与量を決定することができる。

10

【実施例】

【0045】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0046】

(実施例1)

グリピカン3を発現するヒト肝癌細胞株のマウス腹部皮下への移植モデルを用いたグリピカン3の免疫染色

20

(1)細胞株

肝癌細胞株としてHuH-7細胞(ヒューマンサイエンス研究資源バンク)、HepG2細胞(ATCC)が用いられた。HuH-7は、10%FBS(BIONET)を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium培地(SIGMA)にて、HepG2は10%FBS、1mmol/L MEM Sodium Pyruvate(Invitrogen)、1mmol/L MEM Non-Essential Amino Acid(Invitrogen)を含むMinimum Essential Medium Eagle培地(SIGMA)にて、維持継代された。

【0047】

(2)GPC3発現量の測定

30

(2-1)測定方法

HuH-7細胞およびHepG2細胞におけるGPC3の発現量は、マウス抗ヒトGPC3モノクローナル抗体(クローン名:GC33、WO2006/006693に記載される。)を用いて、QIFI-Kit(DakoCytomation)により測定された。測定方法は付属の説明書に記載された方法が実施された。

【0048】

使用されたGC33抗体は室温にて溶解後、PBSにて1mg/mlに調製された。陰性対照として、凍結乾燥状態のmIgG2a(1バイアル分)が500μlの「日本薬局方注射用水 大塚蒸留水」に溶解されたものが用いられた。5×10⁵の各細胞が98μlの0.5w/v% BSA(Sigma-Aldrich)が添加されたCellWASH細胞洗浄溶液(ベクトン・ディッキンソン)(以下FACS-PBSと指称される。)に懸濁された。GC33およびmIgG2aがそれぞれ2μlおよび5μl添加された当該各懸濁液が4にて30分間静置された。その後、1mlのFACS-PBSが添加された当該各懸濁液が4において5000rpmにて1分間の遠心分離操作に供されることにより細胞が分画された。当該細胞は98μlのFACS-PBSに再び懸濁された。

40

【0049】

また前記の操作と並行して以下の操作も行われた。QIFIKITに付属しているキャリブレーションビーズおよびセットアップビーズ100μlに1mlのFACS-PBSが添加され、4において5000rpmにて1分間の遠心分離操作により洗浄された。

50

当該ビーズは98 μ lのFACS-PBSに懸濁された。前記の細胞およびビーズに対してQIFIKITに付属しているFITC標識ヤギ抗マウス抗体が各2 μ lずつ添加され、当該細胞およびビーズが4にて45分間の反応に供された。次に1mlのFACS-PBSが添加された前記の反応液が4において5000rpmにて1分間の遠心分離操作に供された。沈降された細胞およびビーズは1mlのFACS-PBSに懸濁された。全自動細胞解析装置EPICS-XL(Beckman Coulter)を用いて、標識されたセットアップビーズの測定により生じる2つのピークが測定画面内に入るよう出力が調整された。全自動細胞解析装置EPICS-XLを用いてGC33抗体が反応に供された細胞サンプル、mIgG2aが反応に供された細胞サンプル、およびキャリブレーションビーズが発する各蛍光のMean fluorescence Intensity(MFI)値が測定された。キャリブレーションビーズの5つのMFI値とAntibody-Binding Capacity(ABC)値を基礎としてMicrosoft Office Excel 2003 SP2(Microsoft Corporation)を用いて最適直線が作図された。当該直線の検量線に各細胞のMFI値を代入されてABC値が求められた。GC33抗体が反応に供されたサンプルのABC値からmIgG2aが反応に供されたサンプルのABC値を引いた値が抗体結合部位数とされた。

10

【0050】

その結果、HuH-7におけるグリピカン3の発現量は、細胞当たり 1.25×10^5 分子であった。HepG2におけるグリピカン3の発現量は、細胞当たり 9.67×10^5 分子であった。

20

【0051】

(3) ヒト肝癌細胞株のマウス腹部皮下への移植モデルの作製

HuH-7およびHepG2の各細胞が、(1)に記載されるその維持継代用の培地とMATRIGEL Matrix(BD Bioscience)を等量含む溶液にて1ml当たり 5×10^7 細胞になるように調製された。各細胞のマウスへの移植前日に、予め抗アシアロGM1抗体(和光純薬、1バイアルの内容物が1mlの蒸留水に溶解され更に4mlの生理食塩水によって希釈された。)100 μ lがオスで5週齢のSCIDマウス(日本クレア)の腹腔内へ投与された。当該抗アシアロGM1抗体(和光純薬)は、1バイアルの内容物が1mlの蒸留水に溶解され更に4mlの生理食塩水によって希釈されることによって調製された。その翌日、当該マウスの腹部皮下へ100 μ lの当該各細胞懸濁液(すなわち、マウス一匹当たり 5×10^6 細胞)が移植された。

30

【0052】

(4) 腫瘍組織切片の作製法の検討

(3)で作製したHepG2の移植モデルより採取された均一な移植組織片が手術用メスを用いて四等分された。その内の一断片が10%中性緩衝ホルマリンで24時間固定された。固定化された組織片はその後自動包埋装置ETP-150C(サクラファインテックジャパン)を用いてパラフィン包埋され、4にて保存された(A法)。

【0053】

次に、別の一断片は4%パラホルムアルデヒドを含有するPLP固定液(10mM濃度のNaIO₄、75mM濃度のリジン、37.5mM濃度のリン酸緩衝液、2%濃度のパラホルムアルデヒド)を用いて4において6時間固定された後にPBS(リン酸緩衝生理食塩水、10mM、pH7.4)にて4において洗浄された。次いで当該断片が4において終夜および室温において2時間アセトン中にて脱水された。さらに、当該断片は安息香酸メチルで一時間およびキシレンで一時間清浄化され、前記同様パラフィンに包埋され、4にて保存された(B法)。

40

【0054】

A法、および、B法で作製されたパラフィン包埋標品は免疫組織染色の適用直前にクリオスタットマイクロトーム上で薄切され、風乾された後に脱パラフィン処理され染色に供された。

50

【 0 0 5 5 】

次に、別の断片は P L P 固定液を用いて 4 において 6 から 8 時間浸漬された後に 4 において段階的シヨ糖濃度を有する P B S に順次浸潤された (1 0 % シヨ糖濃度の P B S で 4 時間、 1 5 % シヨ糖濃度の P B S で 4 時間、 および 2 0 % シヨ糖で終夜の期間)。次いで当該断片が T i s s u e - T e k O C T c o m p o u n d (S a k u r a F i n e t e c h n i c a l) 中に包埋されドライアイスアセトン浴中で凍結された。凍結されたブロックはクリオスタットマイクローム上で薄切され、薄切切片は風乾後 - 8 0 にて保存された (C 法)。

【 0 0 5 6 】

別の断片は T i s s u e - T e k O C T c o m p o u n d 中に 4 において包埋されドライアイスアセトン浴中で凍結された。凍結されたブロックはクリオスタットマイクローム上で複数の切片に薄切された後に、当該切片は風乾され下記の異なる方法で固定化された。その内の一切片は 4 において 4 % パラホルムアルデヒド中で 3 0 分固定された (D 法)。別の一切片は 4 においてアセトン中で 1 0 分固定された (E 法)。更に別の切片は室温において 1 0 % 中性緩衝ホルマリン中で 3 0 分固定された (F 法)。D 法、E 法および F 法による固定化切片はトリス緩衝生理食塩水 (T B S、 5 0 m M、 p H 7 . 4) を用いて 5 分間、 3 回洗浄された後に風乾され - 8 0 にて保存された。

【 0 0 5 7 】

前記のように調製された組織切片が以下に示す免疫組織化学的染色に用いられた。一次抗体として、 G C 3 3 抗体 (I g G 2 a) または 1 G 1 2 抗体 (B i o M o s a i c、 I g G 1) がそれぞれ 2 . 5 μ g / m l および 1 . 0 μ g / m l の濃度で使用された。染色に際して、染色に必要な試薬は L S A B - 2 k i t (D a k o C y t o m a t i o n) に同梱された試薬が使用された。染色方法はキット付属の説明書に記載の方法が実施された。固定化時間が短時間だったため抗原賦活化は実施されなかった。かかる免疫組織化学的染色過程において形成された抗原抗体複合体は、ペルオキシダーゼ - ジアミノベンジジン (D A B) 反応により可視化された。対比染色としてはヘマトキシリンが用いられた。なお、一次抗体の対照抗体として、 G C 3 3 の場合にはマウス I g G 2 および 1 G 1 2 の場合には I g G 1 が使用された。各方法当たり 3 例ずつが評価され、その結果が表 1 に示されている。

【 0 0 5 8 】

【表 1】

	PR								SI										SP					
	GC33				1G12				GC33					1G12					GC33			1G12		
	L	ML	MH	H	L	ML	MH	H	1+	2+	3+	4+	5+	1+	2+	3+	4+	5+	I	II	III	I	II	III
A	0	1	2	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	2	1	0	0	0	2	1	0	3	0	0
B	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	1	2	0	0	0	3	0	2	1
C	0	0	0	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
D	0	0	0	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
E	0	0	0	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
F	0	0	0	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0

A : 2 4 時間固定、抗原賦活化無処理

B : 2 4 時間固定、オートクレーブによる抗原賦活化処理

C : 2 4 時間固定、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理

D : 2 4 時間固定、プロテアーゼ処理による抗原賦活化処理

E : 7 日間固定、抗原賦活化無処理

F : 7 日間固定、オートクレーブによる抗原賦活化処理

【 0 0 5 9 】

10

20

30

50

免疫染色における染色性は、以下に示すようなパラメーターによってグレード化された。
すなわち；

P R (陽性細胞率) グレードについて；

4倍または10倍の対物レンズを用いた検鏡下での視野中細胞のうち；

(i) 前記複合体が検出される細胞の割合が50%以下の標品を「 L 」、

(i i) 前記複合体が検出される細胞の割合が50%以上70%未満の標品を「 M L 」、

(i i i) 前記複合体が検出される細胞の割合が70%以上で90%未満の標品を「 M H 」、

(i v) 前記複合体が検出される細胞の割合が90%以上の標品を「 H 」、

としてP Rのグレードが決定され、

S I (染色強度スコア) について；

(i) 軽微陽性の染色を示す標品を「 + 1 」、

(i i) 弱陽性の染色を示す標品を「 + 2 」、

(i i i) 中程度陽性または / および強陽性を伴う、弱陽性の染色を示す標品を「 + 3 」

、

(i v) 中程度陽性の染色を示す標品を「 + 4 」、

(v) 強陽性の染色を示す標品を「 + 5 」、

としてS Iのスコアが決定され、

S P (細胞膜染色性) について；

4倍または10倍の対物レンズを用いた検鏡下での視野中細胞のうち；

(i) 細胞が細胞膜の一部のみ染色される標品を「 I 」、

(i i) ほとんどの細胞の細胞膜の一部が染色され、一部の細胞の細胞膜が円周状に染色される標品を「 I I 」、

(i i i) ほとんどの細胞の細胞膜が円周状に染色される標品を「 I I I 」、

としてS Pのスコアが決定された。

【 0 0 6 0 】

S Iのスコアの各グレード(+ 1、 + 2、 + 4 および + 5)の標準染色像が図1に示される。AはS Iが + 1の標品を、BはS Iが + 2の標品を、CはS Iが + 4の標品を、DはS Iが + 5の標品をそれぞれ示す。また、S Pのスコアの各グレード(+ I、 + I I および + I I I)の染色像が図2に示される。AはS PがIの標品を、BはS IがI I Iの標品をそれぞれ示す。

【 0 0 6 1 】

C法からF法のいずれの方法で調製された標品のS IおよびS Pのグレードは共に低く、十分な染色像が得られていないことが示された。また、当該標品における形態的な構造も保存されていなかった。A法とB法との比較においては、B法で調製された標品のS IおよびS Pのグレードがいずれも高く(S Iが + 3 から + 5 で、S PがI I またはI I I)、P Rグレードも90%以上の細胞が陽性(H)と判定された。一方、A法ではS Iが + 3 から + 5 で、S PがI またはI I と判定され、P RグレードもL ないしM H と判定された。G C 3 3 抗体と1 G 1 2 抗体の相違という点では、G C 3 3 抗体はいずれも1 G 1 2 抗体よりもより強い染色像を与えた。

【 0 0 6 2 】

(5) 腫瘍組織切片の作製の際の固定化時間および抗原賦活化法の検討

(3) で作製したH e p G 2 の移植モデルより採取された均一な移植組織片の固定化時間が以下のように検討された。(4) で記載されたA法における10%中性緩衝ホルマリリンによる固定時間を24時間と7日間とした標品が調製された。また、それぞれの固定時間で調製された標品は、以下に記載されるオートクレーブ、マイクロウェーブ、プロテアーゼのうちのいずれかの賦活化法によりそれぞれ賦活化された。t a r g e t r e t r i e v a l s o l u t i o n , p H 6 (D A K O) が10倍希釈された溶液中で標品を121 において10分間のオートクレーブ処理することによって、オートクレーブにより賦活化された標品が調製された。同一溶液中において標品を4回、780Wにて5分間

10

20

30

40

50

加熱することによりマイクロウェーブにより賦活化された標品が調製された。Histofine Her2 kit (MONO) (ニチレイバイオサイエンス) に付属のAR試薬によって室温にて5分反応された標品もまた別に調製された。

【0063】

前記のように調製された組織切片が以下に示す免疫組織化学的染色に用いられた。一次抗体として、GC33抗体(IgG2a)または1G12抗体(BioMosaic、IgG1)がそれぞれ2.5µg/mlおよび1.0µg/mlの濃度で使用された。染色に際して、染色に必要な試薬はLSAB-2kitに同梱された試薬が使用された。染色方法はキット付属の説明書に記載の方法が実施された。固定化時間が短時間だったため抗原賦活化は実施されなかった。かかる免疫組織化学的染色過程において形成された抗原抗体複合体は、ペルオキシダーゼ-ジアミノベンジジン(DAB)反応により可視化された。対比染色としてはヘマトキシリンが用いられた。なお、一次抗体の対照抗体として、GC33の場合にはマウスIgG2および1G12の場合にはIgG1が使用された。各固定化時間および各賦活化反応が適用された標品当たり3例ずつが評価され、その結果が表2に示されている。抗原賦活法の比較において、マイクロウェーブ法はオートクレーブ法よりも若干優れたSIおよびSPグレードを示す結果を与えた。一方、プロテアーゼ法による抗原賦活化処理がされた標品は、そのPRグレードおよびSIスコアとともにSPスコアにおいてもその他の抗原賦活化処理がされた標品よりも優れた染色性を示した。

10

【0064】

【表2】

20

	PR								SI										SP					
	GC33				1G12				GC33					1G12					GC33			1G12		
	L	ML	MH	H	L	ML	MH	H	1+	2+	3+	4+	5+	1+	2+	3+	4+	5+	I	II	III	I	II	III
A	0	1	2	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	2	1	0	0	0	2	1	0	3	0	0
B	0	0	0	3	0	0	0	3	0	2	1	0	3	0	0	1	2	0	3	0	0	1	2	0
C	0	0	0	3	0	0	0	3	0	1	0	2	0	0	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0
D	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	3	0	0	0	1	2
E	2	1	0	0	1	2	0	0	1	2	0	0	0	2	0	1	0	0	3	0	0	3	0	0
F	1	0	0	2	0	0	0	3	2	0	1	0	0	0	2	0	1	0	3	0	0	2	1	0
G	0	0	1	2	0	0	0	3	0	2	0	1	0	0	0	2	1	0	2	1	0	2	1	0
H	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	2	1	0	0	0	3	0	0	2	1	0	3	0

- A: 24時間固定、抗原賦活化無処理
- B: 24時間固定、オートクレーブによる抗原賦活化処理
- C: 24時間固定、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理
- D: 24時間固定、プロテアーゼ処理による抗原賦活化処理
- E: 7日間固定、抗原賦活化無処理
- F: 7日間固定、オートクレーブによる抗原賦活化処理
- G: 7日間固定、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理
- H: 7日間固定、プロテアーゼ処理による抗原賦活化処理

【0065】

(6) 腫瘍組織切片の免疫組織化学染色

(6-1) 組織標品の作製および染色

(2) で作製した移植モデルより採取された移植組織片が10%中性緩衝ホルマリンに7日間浸漬することによって固定され、次いで常法に従い当該組織片のパラフィン包埋ブロック標本が作製された。このブロック標本より薄切された組織切片が以下に示す免疫組織化学的染色に用いられた。

【0066】

50

一次抗体として、GC33抗体(IgG2a)が使用された。染色に際して、染色に必要な試薬はヒストファイブHER2キット(MONO)(ニチレイバイオサイエンス)に同梱された試薬が使用された。一次抗体としてGC33抗体を使用した以外は、染色方法はキット付属の説明書に記載の方法が実施された。なお、抗原賦活化処理としては、プロテアーゼ処理(同キットに付属しているプロテアーゼを用いて室温にて5分間の反応に供する処理)または、10倍希釈したTarget Retrieval Solution(DakoCytomation)中で121にて10分間オートクレーブ処理が実施された。かかる免疫組織化学的染色過程において形成された抗原抗体複合体は、ペルオキシダーゼ-ジアミノベンジジン(DAB)反応により可視化された。対比染色としてはヘマトキシリンが用いられた。なお、一次抗体の対照抗体として、マウスIgG2が使用された。

10

【0067】

(6-2) 染色結果の評価

マウス抗ヒトグリピカン3抗体を用いた免疫染色による染色性が、下記に示される3つのパラメーター(陽性細胞率:PR、染色強度:SI、細胞膜染色パターン:SP)によって評価された。

【0068】

すなわち;

PR(陽性細胞率)値を;

4倍または10倍の対物レンズを用いた検鏡下での視野中細胞のうち;

20

(i)前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを0、

(ii)当該割合が20%未満の検体のスコアを1、

(iii)当該割合が20%以上で50%未満の検体のスコアを2、

(iv)当該割合が50%以上の検体のスコアを3としてPRのスコアを算出し、

細胞質の染色性を反映する(SI-Cp)(細胞質染色強度)値を;

検鏡下での視野中細胞の細胞質において、

(i)前記検鏡が4倍または10倍の対物レンズを用いられた場合に前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを0、

(ii)前記検鏡が10倍の対物レンズを用いられた場合に不明りょうであるがうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを1、

30

(iii)4倍の対物レンズでうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを2、

(iv)4倍の対物レンズでも十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを3、

(v)4倍の対物レンズで、明確に認識され強い陽性反応が認められる検体のスコアを4としてSI-Cpのスコアを算出し、

細胞膜の染色性を反映する(SI-Cm)(細胞膜の染色強度)値を;

検鏡下での視野中細胞の細胞膜において、

(i)前記検鏡が4倍または10倍の対物レンズを用いられた場合に前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを0、

(ii)前記検鏡が10倍の対物レンズを用いられた場合に不明りょうであるがうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを1、

40

(iii)4倍の対物レンズ不明りょうであるが10倍の対物レンズで十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを2、

(iv)4倍の対物レンズでも十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを3、

(v)4倍の対物レンズで、明確に認識され強い陽性反応が認められる検体のスコアを4としてSI-Cmのスコアを算出し、

SP(細胞膜染色パターン)値を;

検鏡下での視野中細胞の細胞膜における前記複合体の検出において、

(i)細胞膜における陽性反応が認められない検体のスコアを0、

50

(i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 20%未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 1、

(i i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 20%以上で 50%未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 2、

(i v) 陽性反応が認められる細胞のうち 50%以上の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 3として S P のスコアを算出する；

方法によって各パラメーターが数値化された。なお、S I - C m を用いて算出されるトータルスコアは I R c m、S I - C p を用いて算出されるトータルスコアは I R c p と表記された。

【 0 0 6 9 】

10

(6 - 3) 染色性の評価

H u H - 7 および H e p G 2 が移植された動物モデルから由来する組織標品がオートクレーブ処理された場合の染色像が図 3 に示される。A は H u H - 7 移植モデルから調製された切片にオートクレーブ処理による熱誘導抗原賦活化処理をした標品の染色像を、B は H u H - 7 移植モデルから調製された切片にプロテアーゼ抗原賦活化処理をした標品の染色像を、C は H e p G 2 移植モデルから調製された切片にオートクレーブ処理による熱誘導抗原賦活化処理をした標品の染色像を、D は H e p G 2 移植モデルから調製された切片にプロテアーゼ抗原賦活化処理をした標品の染色像を表す。

【 0 0 7 0 】

また、個別の染色パラメーターのスコアが表 3 に示されている。H u H - 7 および H e p G 2 が移植された動物モデルから由来する組織標品から算出される I R c p の値はいずれも 7 で、H u H - 7 と H e p G 2 間でその値の差は観察されなかった。また、それらの I R c m の値はいずれも 5 であり、両者間でその値の差はみられなかった。(表 3 および図 3)。

20

【 0 0 7 1 】

【表 3】

細胞株	細胞当たり発現量	陽性細胞率		細胞膜染色性のグレード	
		オートクレーブ	プロテアーゼ	オートクレーブ	プロテアーゼ
H u H - 7	1.25×10^5	90%<	50%>	1	2
H e p G 2	9.67×10^5	90%<	90%<	2	3

【 0 0 7 2 】

一方、H u H - 7 および H e p G 2 が移植された動物モデルから由来する組織標品に対してプロテアーゼ処理が施された場合の個別の染色パラメーターのスコアも表 3 に示されている。プロテアーゼ処理が施された組織標品から得られる S I - C m および S I - C p のスコアは、オートクレーブ処理された標品から得られるそれらの値と比べて高い傾向が観察された。個別の染色パラメーターから算出されるトータルスコアとしては、H u H - 7 および H e p G 2 が移植された組織標品から得られた I R c p の値は、それぞれ 4 および 8 であった。また、H u H - 7 および H e p G 2 が移植された組織標品から得られた I R c m の値は、それぞれ 4 および 9 であった(表 3 および図 3)。図 3 最下段の写真に示されるように、プロテアーゼ処理した組織標品が染色された場合にあっては、グリピカン 3 を発現していない細胞、グリピカン 3 を中等度に発現した細胞、グリピカン 3 を強く発現した細胞がそれぞれ明確に区別され得る。これに対して、オートクレーブ処理された組織標品を染色した場合にあっては、そのような定量性が得られなかった。更に、オートクレーブ処理された組織標品を染色した場合にあっては、炎症細胞等に対する非特異的反応が頻繁に認められた。

40

【 0 0 7 3 】

以上の結果から、オートクレーブ処理と比較してプロテアーゼ処理による抗原賦活化は、グリピカン 3 の発現量の違いがより正確に反映される方法であることが示された。また

50

、組織標品の細胞膜の染色性の観点からは、オートクレーブ処理と比較してプロテアーゼ処理が優れていることが明らかとされた。

【 0 0 7 4 】

(実施例 2)

ヒト肝細胞癌組織標品を用いた G P C 3 免疫染色におけるプロテアーゼによる抗原賦活化効果

(1) ヒト肝細胞癌サンプルにおける免疫組織化学染色

(1 - 1) 標本作製および染色方法

ヒト肝細胞癌サンプルが 1 0 % 中性緩衝ホルマリンに一定時間以上浸漬固定された。次に、常法に従いパラフィン包埋ブロック標本が作製された。上記ブロック標本より薄切された組織切片が免疫組織化学的染色に用いられた。免疫組織化学染色は実施例 1 と同様の手法により、実施された。

10

【 0 0 7 5 】

(1 - 2) 染色結果の評価方法

実施例 1 (6 - 2) の記載に基づいて、マウス抗ヒト G P C 3 抗体免疫染色による染色性が下記に示される 3 つのパラメーター (陽性細胞率 : P R 、染色強度 : S I 、細胞膜染色パターン : S P) によって評価された。

【 0 0 7 6 】

すなわち ;

P R (陽性細胞率) 値を ;

4 倍または 1 0 倍の対物レンズを用いた検鏡下での視野中細胞のうち ;

(i) 前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを 0 、

(i i) 当該割合が 2 0 % 未満の検体のスコアを 1 、

(i i i) 当該割合が 2 0 % 以上で 5 0 % 未満の検体のスコアを 2 、

(i v) 当該割合が 5 0 % 以上の検体のスコアを 3 として P R のスコアを算出し、

細胞質の染色性を反映する (S I - C p) (細胞質染色強度) 値を ;

検鏡下での視野中細胞の細胞質において、

(i) 前記検鏡が 4 倍または 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを 0 、

(i i) 前記検鏡が 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に不明りょうであるがうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを 1 、

(i i i) 4 倍の対物レンズでうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを 2 、

(i v) 4 倍の対物レンズでも十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを 3 、

(v) 4 倍の対物レンズで、明確に認識され強い陽性反応が認められる検体のスコアを 4 として S I のスコアを算出し、

細胞膜の染色性を反映する (S I - C m) (細胞膜の染色強度) 値を ;

検鏡下での視野中細胞の細胞膜において、

(i) 前記検鏡が 4 倍または 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に前記複合体が検出される細胞の割合がゼロの検体のスコアを 0 、

(i i) 前記検鏡が 1 0 倍の対物レンズを用いられた場合に不明りょうであるがうっすらと陽性反応が認められる検体のスコアを 1 、

(i i i) 4 倍の対物レンズで不明りょうであるが 1 0 倍の対物レンズで十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを 2 、

(i v) 4 倍の対物レンズでも十分認識可能である陽性反応が認められる検体のスコアを 3 、

(v) 4 倍の対物レンズで、明確に認識され強い陽性反応が認められる検体のスコアを 4 として S I のスコアを算出し、

S P (細胞膜染色パターン) 値を ;

検鏡下での視野中細胞の細胞膜における前記複合体の検出において、

20

30

40

50

- (i) 細胞膜における陽性反応が認められない検体のスコアを 0、
 (i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 20% 未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 1、
 (i i i) 陽性反応が認められる細胞のうち 20% 以上で 50% 未満の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 2、
 (i v) 陽性反応が認められる細胞のうち 50% 以上の細胞が完全な膜染色を示す検体のスコアを 3 として S P のスコアを算出する；
 方法によって各パラメーターが数値化された。

【 0 0 7 7 】

また、併せて、非特異的染色（バックグラウンド）の程度（炎症性細胞や間質の染色性から判断される）についても評価が行われた。

【 0 0 7 8 】

(1 - 3) 結果および結論

抗原賦活化処理をした標品の染色像が図 4 に示される。A は症例 A の検体から調製された切片にオートクレーブ処理による熱誘導抗原賦活化処理をした標品の染色像を、B は症例 A の検体から調製された切片にプロテアーゼ抗原賦活化処理をした標品の染色像を、C は症例 B の検体から調製された切片にオートクレーブ処理による熱誘導抗原賦活化処理をした標品の染色像を、D は症例 B の検体から調製された切片にプロテアーゼ抗原賦活化処理をした標品の染色像を、E は症例 C の検体から調製された切片にオートクレーブ処理による熱誘導抗原賦活化処理をした標品の染色像を、F は症例 C の検体から調製された切片にプロテアーゼ抗原賦活化処理をした標品の染色像をそれぞれ表す。

【 0 0 7 9 】

図 4 および表 4 に示されるように、オートクレーブ処理がされた組織標品においては、症例 A、B、C いずれも図中の肝細胞癌領域において、P R のスコアが 3（50% 以上の領域で陽性）であった。また、膜染色強度および膜染色パターンについては、症例 A および B では、膜局在がみられなかった（S I - C m = 0 および S P - C m = 0）のに対し、症例 C では、膜発現が認められ、スコアはそれぞれ S I - C m = 1、S P - C m = 2 であった。なお、いずれの症例でも、炎症性細胞や間質において、図 4 症例 B の写真に示されるような非特異的陽性反応が認められる傾向があった。

【 0 0 8 0 】

【表 4】

パラメーター	抗原賦活法	症例A	症例B	症例C
P R	オートクレーブ	3	3	3
	プロテアーゼ	1	2	3
S I - C P	オートクレーブ	3	3	3
	プロテアーゼ	1	2	3
S I - C M	オートクレーブ	0	0	1
	プロテアーゼ	1	3	4
S P	オートクレーブ	0	0	2
	プロテアーゼ	1	2	3

【 0 0 8 1 】

一方、プロテアーゼ処理がされた組織標品においては、P R のスコアが症例 A では、1（20% 未満の領域が陽性）、症例 B では 2（20 - 50% の領域で陽性）、症例 C では 3（50% 以上の領域で陽性）であった。また、膜染色強度および膜染色パターンについては、症例 A の各スコアは S I - C m = 1 および S P - C m = 1 であった。また症例 B の各スコアは、S I - C m = 3 および S P - C m = 2 であった。症例 C においては、明瞭な

膜発現が認められ、その各スコアはそれぞれ S I - C m = 4、S P - C m = 3であった。なお、オートクレーブ処理がされた組織標品とは異なり、プロテアーゼ処理がされた組織標品では、非特異的陽性反応はほとんど認められなかった。

【0082】

以上の結果から、オートクレーブと比較してプロテアーゼ処理による抗原賦活化法は、臨床肝細胞癌サンプルを用いた G P C 3 免疫染色において、G P C 3 の発現量の違いをより正確に反映する方法である可能性が示唆された。また、細胞膜染色性についても、プロテアーゼ処理が優れていることが明らかとなった。さらに、プロテアーゼ法では、非特異的陽性反応が最小限であることから、抗 G P C 3 抗体による特異的陽性反応をよりの確に捉えることが可能であることが示された。

10

【0083】

(実施例3)

G P C 3 発現ヒト肝癌細胞株移植マウスモデルに対する抗 G P C 3 抗体の薬効

(1) 細胞株

移植に供する細胞として H u H - 7 細胞および H e p G 2 細胞が用いられた。H u H - 7 細胞は 10% F B S (B I O N E T) を含む D u l b e c c o ' s M o d i f i d E a g l e ' s M e d i u m 培地 (S I G M A) 中で、H e p G 2 細胞は 10% F B S、1 m m o l / l M E M S o d i u m P y r u v a t e (I n v i t r o g e n)、1 m m o l / l M E M N o n - E s s e n t i a l A m i n o A c i d (I n v i t r o g e n) を含む M i n i m u m E s s e n t i a l M e d i u m E a g l e 培地 (S I G M A) 中で、それぞれ維持継代された。

20

【0084】

(2) ヒト肝癌細胞株移植マウスモデルの作製

各細胞が、上述の継代用培地と M a t r i g e l M a t r i x (B D B i o s c i e n c e) とをそれぞれ等量含む溶液を用いて 1 m l 当たり 5×10^7 個細胞になるように調製された。細胞の移植前日に、あらかじめ 100 μ l の抗アジアロ GM 1 抗体 (和光純薬、1 バイアルが 5 m l の P B S で溶解されたもの) がその腹腔内へ投与された S C I D マウス (オス、5 週齢、日本クレア) の腹部皮下へ、100 μ l の当該細胞懸濁液が移植された。すなわち、マウス一匹当たり 5×10^6 細胞が投与された。腫瘍体積は以下の式にて算出され、腫瘍体積の平均が 117 ~ 330 m m ³ になった時点でモデルが成立したものとした。

30

式1：腫瘍体積 = 長径 × 短径 × 短径 / 2

【0085】

(3) 投与抗体の調製

治療用抗体として、ヒト化抗ヒト G P C 3 モノクローナル抗体 (クローン名 : h G C 3 3、公開出願 W O 2 0 0 6 / 0 0 6 6 9 3 に記載されている。) が投与の当日に、濾過滅菌された P B S を用いて、0.5 m g / m l、0.1 m g / m l または 0.05 m g / m l になるように調製され、それぞれ 5 m g / k g 投与群、1 m g / k g 投与群、0.5 m g / k g 投与群に対する投与試料として用いられた。

【0086】

40

(4) 抗体投与

(2) で記載したように作製された H u H - 7 細胞移植マウスモデルに対してはその移植後 20 日目より、H e p G 2 細胞移植マウスモデルに対してはその移植後 26 日より、それぞれ週に 1 回ずつ、三週間の間にわたり、上記 (3) で調製された投与試料が 10 m l / k g の用量で尾静脈より投与された。陰性対照として、濾過滅菌した P B S (V e h i c l e) が前記と同様に週に 1 回ずつ、三週間の間にわたり、10 m l / k g の用量で尾静脈より投与された。いずれの群も、1 群当たり 5 ~ 6 匹のマウスから構成された。

【0087】

(5) 抗腫瘍効果の評価

h G C 3 3 抗体のヒト肝癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果が、腫瘍体積の継時変

50

化(図5A)および最終投与日より一週間後の腫瘍湿重量(図5B)で評価された。図5Aは、HepG2移植マウスモデルにおける腫瘍体積の経時変化を表す図である。菱形はベヒクルを投与した群、四角はhGC33抗体を1mg/kgで投与した群、丸はhGC33抗体を5mg/kgで投与した群の腫瘍体積の経時変化を表す。hGC33抗体を投与した時点を矢印で示す。図中*は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.05$ であることを表す。また、図中**は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.0001$ であることを表す。図5Bは、HuH-7移植マウスモデルにおける腫瘍体積の経時変化を表す図である。菱形はベヒクルを投与した群、四角はhGC33抗体を1mg/kgで投与した群、丸はhGC33抗体を5mg/kgで投与した群の腫瘍体積の経時変化を表す。hGC33抗体を投与した時点を矢印で示す。図中*は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.05$ であることを表す。また、図中**は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.0001$ であることを表す。図5Cは、HepG2移植マウスモデルにおける、最終投与日から一週間後の腫瘍湿重量を示す図である。図中*は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.05$ であることを表す。また、図中**は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.0001$ であることを表す。図5Dは、HuH-7移植マウスモデルにおける、最終投与日から一週間後の腫瘍湿重量を示す図である。図中*は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.05$ であることを表す。また、図中**は有意差検定による有意水準Pが $P < 0.0001$ であることを表す。

10

【0088】

統計解析に際してはSAS前臨床パッケージ(SAS Institute)が用いられた。最終測定日の腫瘍体積が用いられて、有意差検定がDunnett型多重比較法によって評価された。その結果、図5Aおよび図5Bに示すように、hGC33抗体投与群における腫瘍の増殖は、Vehicle投与群におけるそれと比較して有意に抑制されていることが認められた。また、抗体の薬効はHepG2細胞移植モデルにおいて比較的強く、HuH-7細胞移植モデルにおいては比較的弱いことが明らかとなった。

20

【0089】

以上より、プロテアーゼ抗原賦活化法によって調製された組織標本の免疫組織染色による解析結果から抗原の発現量が高く、細胞膜局在性の発現態様を示すと判定されるHepG2細胞が移植されたマウスモデルに対して高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。これに対して前記の解析結果から抗原の発現量が低いと診断されるHuH-7細胞が移植されたマウスモデルに対しては低い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。こうした相違は従来の熱誘導抗原賦活化法による解析では導き出すことができない結論であり、従来の熱誘導抗原賦活化法とプロテアーゼ抗原賦活化法を組み合わせることによってGPC3抗体の薬効を有効に判断できることが明らかとなった。

30

【0090】

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

[配列表]

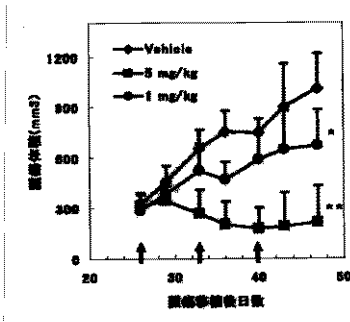
SEQUENCE LISTING

<110> University of Miyazaki; Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 <120> Detection of Molecules Specific to Hepatocarcinoma
 <130> PCG-9025WO
 <150> JP2008-068316
 <151> 2008-03-17
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 1
 Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Asp
 20 25 30
 Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 35 40 45
 Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 50 55 60
 Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
 85 90 95
 Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
 100 105 110
 Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
 115 120 125
 Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
 130 135 140
 Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
 165 170 175
 Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
 180 185 190
 Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
 195 200 205
 Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
 210 215 220
 Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
 225 230 235 240
 Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
 245 250 255
 Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
 260 265 270
 Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
 275 280 285
 Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 290 295 300
 Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
 325 330 335
 Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
 340 345 350
 Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
 355 360 365
 Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
 370 375 380
 Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
 385 390 395 400
 Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
 405 410 415
 Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
 420 425 430
 Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 435 440 445
 Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
 465 470 475 480
 Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
 485 490 495

Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
 500
 Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
 515
 Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
 530
 Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
 545
 Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
 565
 Phe Leu Val His
 580

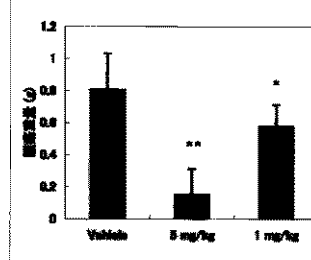
【 5 A 】

5 A



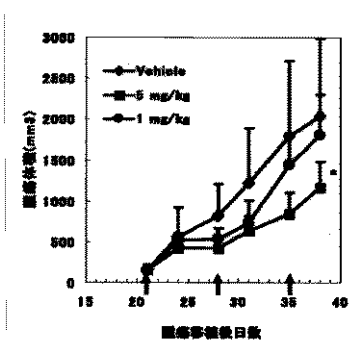
【 5 C 】

5 C



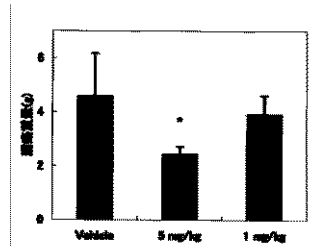
【 5 B 】

5 B



【 5 D 】

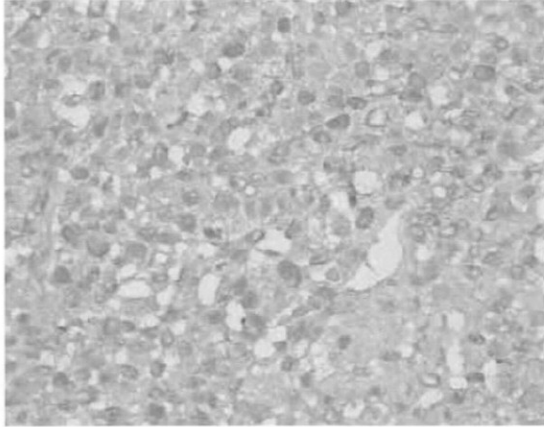
5 D



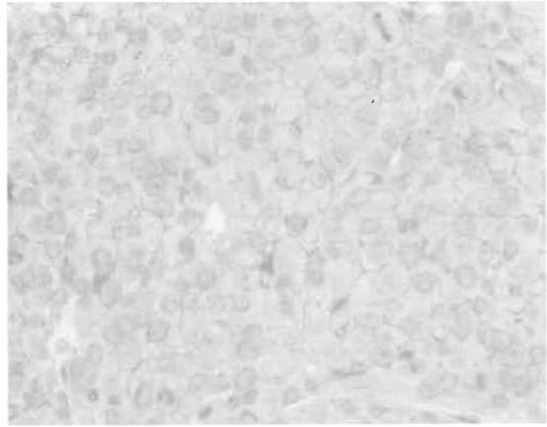
【図 1】

図 1

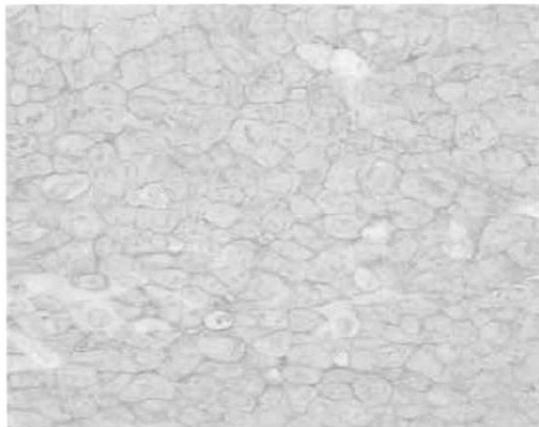
A



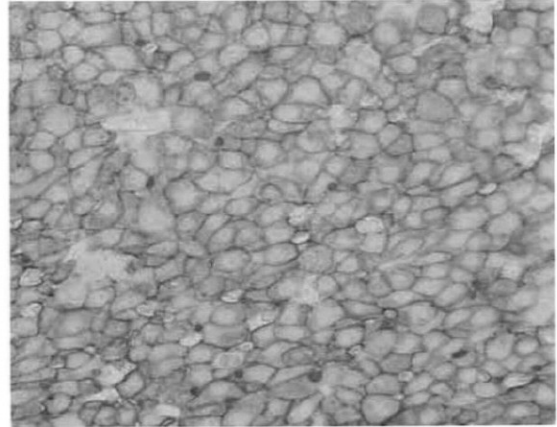
B



C



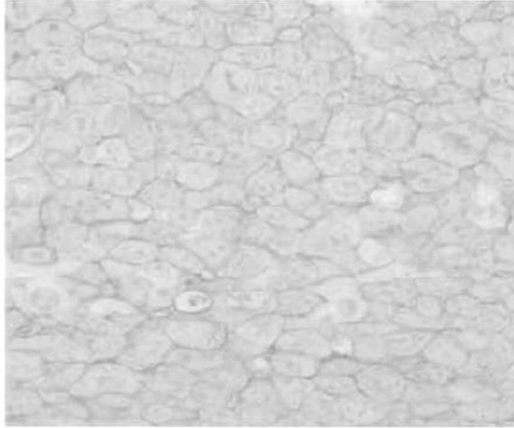
D



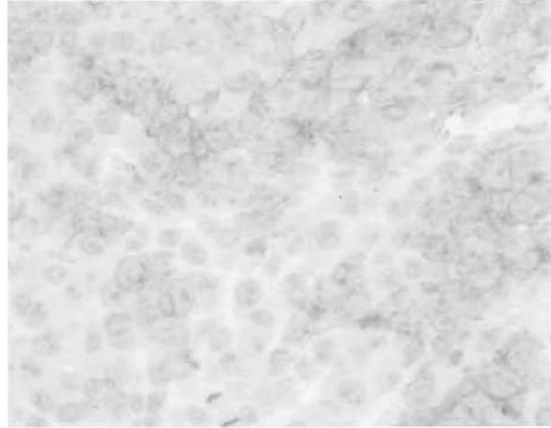
【 図 2 】

図 2

A



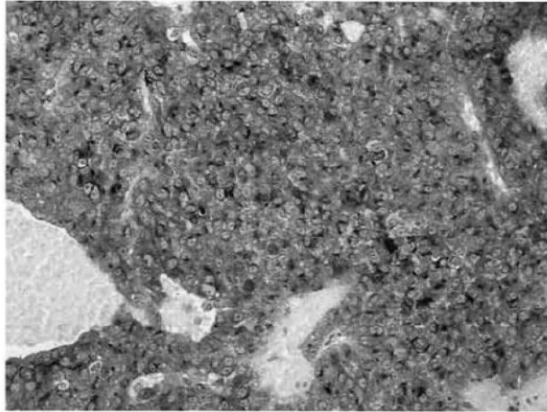
B



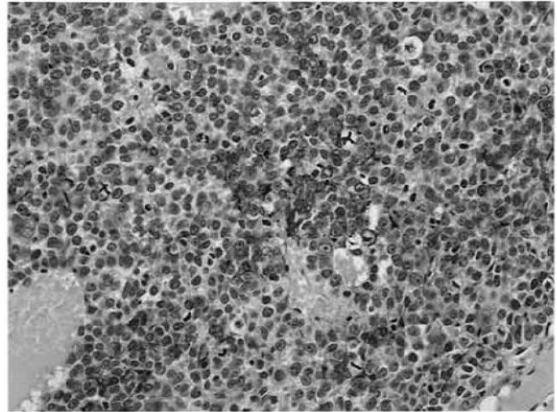
【 図 3 】

図 3

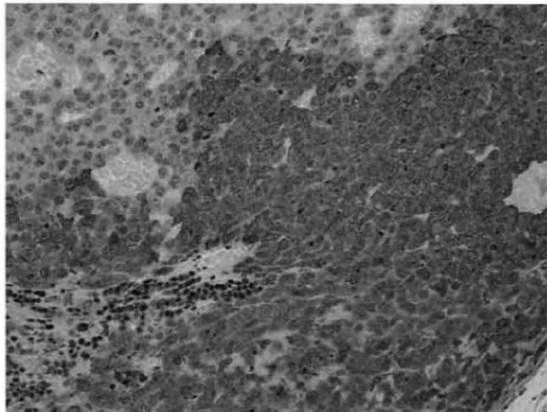
A



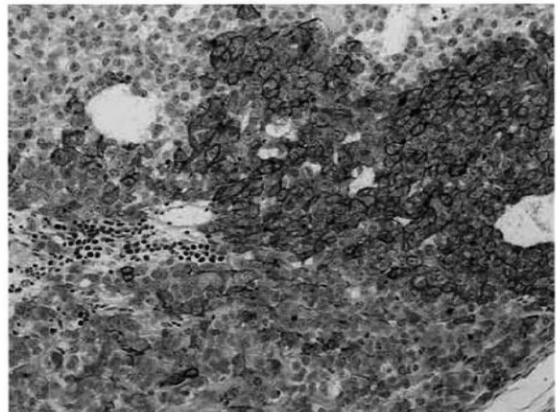
B



C



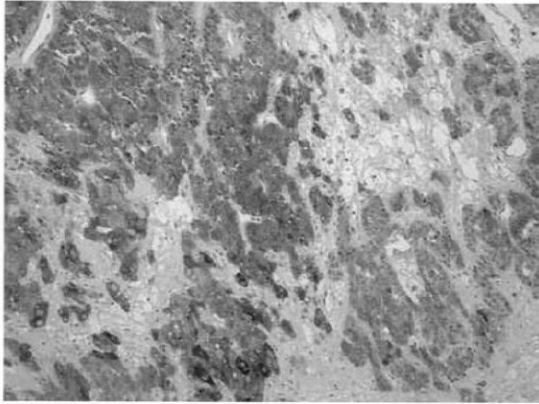
D



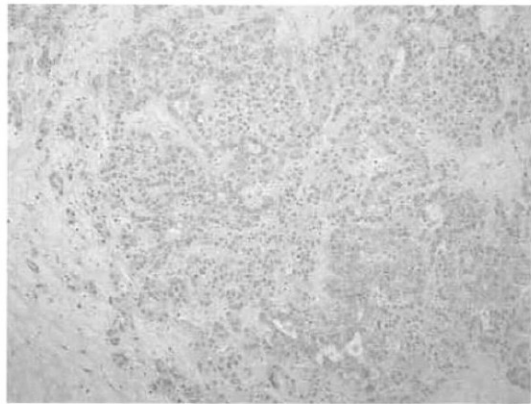
【 図 4 】

図 4

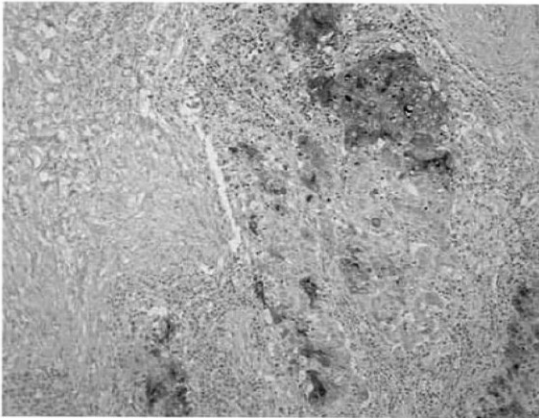
A



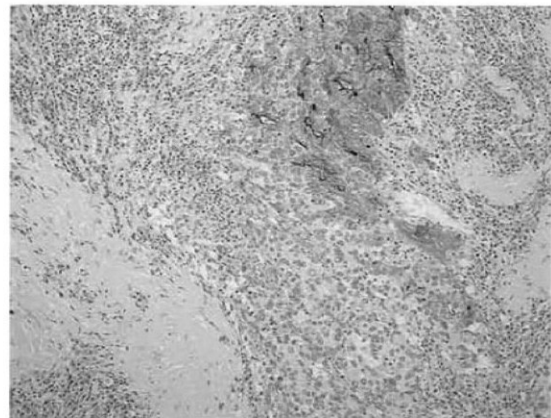
B



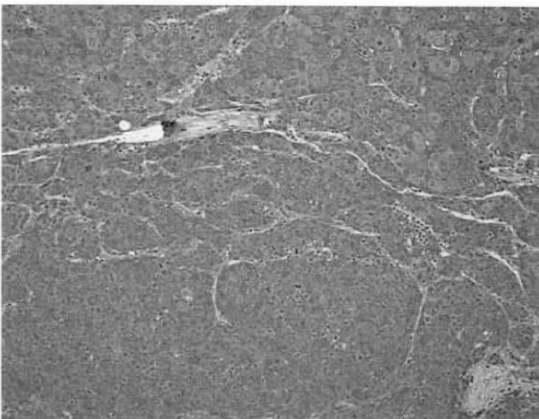
C



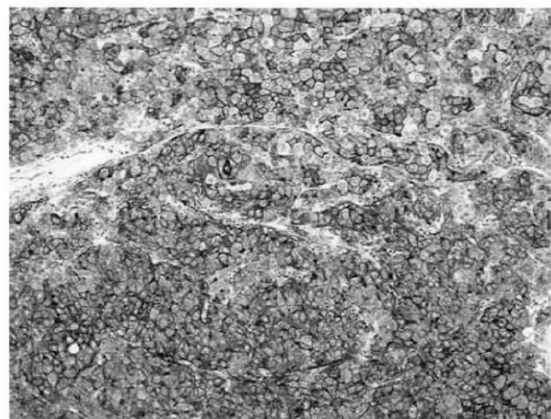
D



E



F



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/055567		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/574, G01N33/48, G01N33/543, C07K16/18 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMII), BIOSIS(STN), CAPLUS(STN), MEDLINE(STN)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	Josep M. Llovet, Yingbei Chen, Elisa Wurmbach, Sasan Roayaie, M. Isabel Fiel, Myron Schwartz, Swan N. Thung, Gregory Khitrov, Weijia Zhang, Augusto Villanueva, Carlo Battiston, Vincenzo Mazzaferro, Jordi Bruix, Samuel Waxman and Scott L. Friedman, A Molecular Signature to Discriminate Dysplastic Nodules From Early Hepatocellular Carcinoma in HCV Cirrhosis, Gastroenterology, 2006, Vol.131, No.6, Page. 1758-1767 Materials and Methods (Immunohistochemistry)	1-10		
Y	Minato IWAI, Kiyoshi MUKAI, "Parafin Seppen o Mochiita Men'eki Senshoku ni Okeru Kogen Fukatsuho", The Cell, 1997, Vol.29, No.9, pages 348 to 352	1-10		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "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 </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			"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
"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 16 April, 2009 (16.04.09)		Date of mailing of the international search report 12 May, 2009 (12.05.09)		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055567

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/006693 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 January, 2006 (19.01.06), Page 19 (Antibody) & JP 2007-300927 A & US 2007/0190599 A1 & EP 1674111 A1 & CA 2544692 A & NO 20063539 A & CN 1842540 A	8
Y	WO 2003/100429 A2 (SUNNYBROOK AND WOMEN'S COLLEGE HEALTHSCIENCES CENTRE), 04 December, 2003 (04.12.03), Page 20 (Immunohistochemistry); example 4 & JP 2005-526979 A & US 2005/0233392 A1 & EP 1506406 A & CA 2482881 A & NZ 536521 A & IL 164848 D & CN 1653336 A & RU 2319969 C	9
A	JP 2000-46827 A (Ventana Medical Systems, Inc.), 18 February, 2000 (18.02.00), Par. Nos. [0052], [0053] & US 5225325 A & US 5322771 A & US 5418138 A & EP 517818 A & EP 1030178 A1 & WO 1991/013336 A1 & DE 69133006 D & DE 69133006 T & DE 69133508 D & DE 69133508 T & CA 2077451 A & AT 217418 T & ES 2177521 T & AT 317978 T & DK 1030178 T & ES 2258422 T & CA 2077451 A1	1-15
A	Shinji HAMAKAWA, Seichiro SHIMIZU, "Byori Men'eki Senshoku ni Okeru Kogen Fukatsuho", Kensa to Gijutsu, 2002, Vol.30, No.7, pages 625 to 632, Kogen Fukatsu no Jissai	1-15
A	KAMOSHIDA S, SHIOGAMA K, MATSUOKA H, MATSUYAMA A, SHIMOMURA R, INADA K, MARUTA M, TSUTSUMI Y, Immunohistochemical Demonstration of Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Normal and Cancerous Tissues, Acta Histochem Cytochem, Vol.36, No.5, 2003, Page.471-479, Materials and Methods (Immunohistochemistry)	1-15
A	BUDWIT-NOVOTNY D A, MCCARTY K S, COX E B, SOPER J T, MUTCH D G, CREASMAN W T, FLOWERS J L, MCCARTY K S JR, Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody, Cancer Res, 1986, Vol.46, No.10, Page.5419-5425, Materials and Methods (Scoring of Assays)	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055567

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HASEGAWA T, YAMAMOTO S, MATSUNO Y, Quantitative immunohistochemical evaluation of MIB-1 labeling index in adult soft-tissue sarcomas by computer-assisted image analysis, Pathol Int, 2002, Vol.52, No.7, Page.433-437, Materials and Methods(Image analysis)	1-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/055567									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574, G01N33/48, G01N33/543, C07K16/18											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009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(JDreamII), BIOSIS(STN), CPlus(STN), MEDLINE(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	Josep M. Llovet, Yingbei Chen, Elisa Wurmbach, Sasan Roayaie, M. Isabel Fiel, Myron Schwartz, Swan N. Thung, Gregory Khitrov, Weijia Zhang, Augusto Villanueva, Carlo Battiston, Vincenzo Mazzaferro, Jordi Bruix, Samuel Waxman and Scott L. Friedman, A Molecular Signature to Discriminate Dysplastic Nodules From Early Hepatocellular Carcinoma in HCV Cirrhosis, Gastroenterology, 2006, Vol.131, No.6, Page.1758-1767 Materials and Methods(Immunohistochemistry)	1-10									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 16.04.2009	国際調査報告の発送日 12.05.2009										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 隆	2J	3312								
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252										

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 5 6 7
C (続き) . 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
Y	岩井みなど, 向井清, パラフィン切片を用いた免疫染色における抗原賦活法, 細胞, 1997, Vol. 29, No. 9, Page. 348-352	1-10
Y	WO 2006/006693 A1 (中外製薬株式会社) 2006.01.19, 19ページ (抗体) & JP 2007-300927 A & US 2007/0190599 A1 & EP 1674111 A1 & CA 2544692 A & NO 20063539 A & CN 1842540 A	8
Y	WO 2003/100429 A2 (SUNNYBROOK AND WOMEN'S COLLEGE HEALTH SCIENCES CENTRE) 2003.12.04, 20ページ (Immunohistochemistry), EXAMPLE4 & JP 2005-526979 A & US 2005/0233392 A1 & EP 1506406 A & CA 2482881 A & NZ 536521 A & IL 164848 D & CN 1653336 A & RU 2319969 C	9
A	JP 2000-46827 A (ペンタナ・メデイカル・システムズ・インコーポレーテッド) 2000.02.18, 【0052】【0053】 & US 5225325 A & US 5322771 A & US 5418138 A & EP 517818 A & EP 1030178 A1 & WO 1991/013336 A1 & DE 69133006 D & DE 69133006 T & DE 69133508 D & DE 69133508 T & CA 2077451 A & AT 217418 T & ES 2177521 T & AT 317978 T & DK 1030178 T & ES 2258422 T & CA 2077451 A1	1-15
A	濱川真治, 清水誠一郎, 病理 免疫染色における抗原賦活法, 検査と技術, 2002, Vol. 30, No. 7, Page. 625-632, 抗原賦活の実際	1-15
A	KAMOSHIDA S, SHIOGAMA K, MATSUOKA H, MATSUYAMA A, SHIMOMURA R, INADA K, MARUTA M, TSUTSUMI Y, Immunohistochemical Demonstration of Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Normal and Cancerous Tissues, Acta Histochem Cytochem, Vol.36, No.5, 2003, Page. 471-479, Materials and Methods(Immunohistochemistry)	1-15
A	BUDWIT-NOVOTNY D A, MCCARTY K S, COX E B, SOPER J T, MUTCH D G, CREASMAN W T, FLOWERS J L, MCCARTY K S JR, Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody, Cancer Res, 1986, Vol.46, No.10, Page. 5419-5425, Materials and Methods(Scoring of Assays)	1-15
A	HASEGAWA T, YAMAMOTO S, MATSUNO Y, Quantitative immunohistochemical evaluation of MIB-1 labeling index in adult soft-tissue sarcomas by computer-assisted image analysis, Pathol Int, 2002, Vol.52, No.7, Page. 433-437, Materials and Methods(Image analysis)	1-15

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 0 7 K 14/82		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T	
	A 6 1 P 35/00		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,S K,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW, BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,K E,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL ,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114465

弁理士 北野 健

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(72)発明者 片岡 寛章

宮崎県宮崎郡清武町大字木原5200 国立大学法人宮崎大学医学部内

(72)発明者 高居 宏武

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 加藤 淳彦

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 鈴木 雅実

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 杉本 正道

神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA14 BB24 CB01 DA36 DA78 FA16 FB01 FB03

FB07 FB12 GC12 JA01

4C085 AA14 DD88 EE01 GG02

4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 EA50 FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	使用抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体检测肝癌细胞		
公开(公告)号	JPWO2009116659A1	公开(公告)日	2011-07-21
申请号	JP2010503943	申请日	2009-03-16
申请(专利权)人(译)	国立大学法人宫崎 中外制药有限公司		
[标]发明人	片岡寛章 高居宏武 加藤淳彦 鈴木雅実 杉本正道		
发明人	片岡 寛章 高居 宏武 加藤 淳彦 鈴木 雅実 杉本 正道		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 C07K16/18 C07K14/82 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	G01N33/57438 A61K2039/505 C07K16/303		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.D G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y C07K16/18 C07K14/82 A61K39/395.T A61P35/00		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC12 2G045/JA01 4C085/AA14 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 松任谷裕子 北野 健		
优先权	2008068316 2008-03-17 JP		
其他公开文献	JP5619603B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测受试者中肝癌细胞存在的体外免疫测定方法。在本发明的方法中，可以将基于热诱导表位回收方法的抗原修复处理和基于蛋白酶诱导的表位修复方法的抗原修复处理相结合来检测肝癌组织中磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗原的表达，从而检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗原表达水平或表达模式的免疫组织化学染色方法的差异。这使得能够根据磷脂酰肌醇蛋白聚糖3的表达水平对通过常规HIER方法确定为高表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖3的样品进行分级。

		BR						SI										SP						
		GC33			1G12			GC33					1G12					GC33			1G12			
	L	ML	MH	H	L	ML	MH	H	1+	2+	3+	4+	5+	1+	2+	3+	4+	5+	I	II	I	II	I	II
A	0	1	2	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	2	1	0	0	0	2	1	0	3	0	0
B	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	1	2	0	0	0	0	3	0	2	1
C	0	0	0	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
D	0	0	0	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
E	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
F	0	0	0	3	0	0	0	2	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0