

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年4月15日(15.04.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/041349 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/068920
- (22) 国際出願日: 2008年10月10日(10.10.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人放射線医学総合研究所(National Institute of Radiological Sciences) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 今井 高志 (IMAI, Takashi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 岩川 眞由美 (IWAKAWA, Mayumi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 加藤 真吾 (KATO, Shingo) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 大野 達也 (OHNO, Tatsuya) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, KE, 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.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))



WO 2010/041349 A1

(54) Title: MARKER FOR ESTIMATING THE PROGNOSIS OF CERVICAL ADENOCARCINOMA OR FOR ESTIMATING THE PROGNOSIS OF CERVICAL CANCER

(54) 発明の名称: 子宮頸部腺癌の診断又は子宮頸癌の予後の診断のためのマーカー

(57) Abstract: To provide a novel biomarker for estimating the prognosis of cervical adenocarcinoma or for estimating the prognosis of cervical cancer. An antibody against Villin 1 is employed as a biomarker.

(57) 要約: 子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための新たなバイオマーカーの提供。Villin 1に対する抗体をバイオマーカーとして使用する。

明 細 書

子宮頸部腺癌の診断又は子宮頸癌の予後の診断のためのマーカー
技術分野

[0001] 本発明は、子宮頸部腺癌の診断又は子宮頸癌の予後の診断のためのマーカーとしてのVillin1に対する抗体の使用に関する。

背景技術

[0002] 子宮頸癌は、子宮癌の1種であり、女性の悪性腫瘍の中で2番目に多い疾患である(非特許文献1)。子宮頸癌は、子宮頸部扁平上皮癌と、子宮頸部腺癌に分類され、子宮頸部腺癌は、腺様分化を伴う子宮頸部癌であり、腺上皮を母細胞とする純粋な腺癌の他、腺扁平上皮癌を含み、総てのタイプの上皮に由来し得る(非特許文献1)。子宮頸部腺扁平上皮癌は、腺上皮を母細胞とする癌細胞と扁平上皮を母細胞とする癌細胞から成る子宮頸部腺癌であり、全子宮頸癌の5～10%を占める(非特許文献2)。

[0003] 子宮頸癌は、2000年の全世界での患者数は470,600人であり、233,400人が死に至っている(非特許文献3)。子宮頸癌全体の罹患率及び死亡率は過去30年に亘り大幅に下降しているが、この罹患率の減少は近年停滞傾向を示しており、子宮頸部腺癌の患者数がゆっくりと増加してきている(非特許文献4)。

[0004] 子宮頸癌の診断のための検査としては、細胞診検査、各種腫瘍マーカーについての血液検査、組織生検、画像検査等が行われており、中でも、パパニコロー染色によるスメアスクリーニングと、ヒトパピローマウイルス検査が広く行われている(例えば、非特許文献5及び6～15参照)。

[0005] パパニコロー染色によるスメアスクリーニング検査は子宮頸部扁平上皮癌では非常に有効である。しかし、子宮頸部腺癌では偽陰性となり、子宮頸部腺癌の指標とはならない(例えば、非特許文献5参照)。このため、子宮頸部腺癌の検査には不適切である。

[0006] また、子宮頸部の腺癌は、初期の子宮内膜腺癌と組織学的外観が類似しており、子宮頸部腺癌の多くのサブタイプは子宮内膜分化を示す。この類似の組織学的外

観のために、従来の組織生検では、腫瘍の原発組織が不明瞭な場合には子宮内膜腺癌と子宮頸部腺癌を区別することは困難であった(非特許文献1参照)。

- [0007] 免疫組織化学染色を用いた子宮頸部腺癌を含む癌のバイオマーカーの候補として、MIB1、bcl-2、p16^{INK4a}、CEA、ER、vimentin及びp53が検討されている(例えば、非特許文献6～11参照)。
- [0008] p16^{INK4a}については、局所的な子宮頸部腺癌や侵襲的な子宮頸部腺癌で染まるが、扁平上皮の異形成や扁平上皮癌などでも染まり、子宮頸部腺癌に対する特異性について疑問がある、とする報告がある(非特許文献8)。実際、後述する通り、本発明者の検討結果によれば、p16^{INK4a}は、子宮頸部扁平上皮癌に対しては特異性が高いものの、子宮頸部腺癌に対しては、特異性は不十分である。なお、p16^{INK4a}の免疫組織化学染色はHPV感染の間接的な解析にも使われている(非特許文献10)。
- [0009] SCC 抗原、CYFRA21-1及びCA125などは、临床上、婦人科腫瘍一般の治療後の経過をモニターするためのマーカーとして血清検査で用いられているが、治療前の子宮頸部腺癌の診断マーカーとしては用いられていない(非特許文献11)。
- [0010] 癌性ヒトパピローマウイルス(HPV)の感染は子宮頸癌の原因と考えられており、6型、11型、16型、18型、52型及び58型を含む多くの型で子宮頸癌との関連性を示す報告がある(非特許文献12等)。また、子宮頸部扁平上皮癌は、子宮頸部腺癌と比べ、癌性HPVのタイプに明らかな違いが見られ、欧米諸国では、タイプ16と18のHPVが、ウイルス誘発性子宮頸部腺癌の92%で感染し、特にタイプ18のHPVの感染が多く見られたとの報告がなされている(非特許文献1)。HPVのタイプを決定する点での有用性から、最近では、HPVの遺伝子型を同定する24-plex PathogenMip(非特許文献13)や多数のHPVのタイプを同定できるHPVリニアアレイ法(非特許文献14)がハイスループットの解析方法として開発されている。
- もともと、後述する本発明者の検討結果によれば、HPV感染は、子宮頸部扁平上皮癌に比べ子宮頸部腺癌との相関性は低く、HPV感染検査は、子宮頸部腺癌のスクリーニング方法として、特異性の点で十分ではない。
- [0011] 上記治療前診断に加え、子宮頸癌、特に子宮頸部腺癌では、癌病変の予後を予測する診断方法に対する要求がある(非特許文献1)。

これに関し、幾つかの研究では初期の子宮頸部腺癌が子宮頸部扁平上皮癌よりも予後が不良であることを提案している(非特許文献16)。また、組織学的分類が、子宮頸癌患者の生存率と関連しており、子宮頸癌患者の予後診断と成り得るとする報告がある(非特許文献17)。また、HPV感染が、子宮頸癌の重症度に関する重要な指標に成り得るとする報告(非特許文献18)や、子宮頸癌の患者の中でも、HPV感染陰性患者の方が、HPV感染陽性患者より、優位に生存期間が短いという報告もある(非特許文献19)。更に、純粋な子宮頸部腺癌よりも子宮頸部腺扁平上皮癌の方が予後は不良であるとの報告もある(非特許文献20、21)。一方、組織学的分類が子宮頸癌患者の予後に影響を及ぼすことを実証する証明は見出されなかった、とする報告もある(非特許文献4)。

非特許文献1: Herzog TJ, Monk BJ. Reducing the burden of glandular carcinomas of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Dec;197(6):566-71.

非特許文献2: Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, et al. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma of the cervix? *Cancer* 1995;76:1948-55.

非特許文献3: Thomas G. Cervical cancer: treatment challenges in the developing world. *Radiother Oncol.* 2006 May;79(2):139-41.

非特許文献4: dos Reis R, Frumovitz M, Milam MR, Capp E, Sun CC, Coleman RL, Ramirez PT. Adenosquamous carcinoma versus adenocarcinoma in early-stage cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy: an outcomes analysis. *Gynecol Oncol.* 2007 Dec;107(3):458-63.

非特許文献5: Pak SC, Martens M, Bekkers R, Crandon AJ, Land R, Nicklin JL, Perrin LC, Obermair A. Pap smear screening history of women with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2007 Dec;47(6):504-7.

非特許文献6: Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16I NK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations.

Am J Surg Pathol. 2003 Feb;27(2):187-93.

非特許文献7: Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, Ashfaq R. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. Am J Obstet Gynecol. 2004 Mar;190(3):668-73.

非特許文献8: Liang J, Mittal KR, Wei JJ, Yee H, Chiriboga L, Shukla P. Utility of p16INK4a, CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silverberg scoring system for endocervical glandular lesions. Int J Gynecol Pathol. 2007 Jan;26(1):71-5.

非特許文献9: McCluggage WG, Sumathi VP, McBride HA, Patterson A. A panel of immunohistochemical stains, including carcinoembryonic antigen, vimentin, and estrogen receptor, aids the distinction between primary endometrial and endocervical adenocarcinomas. Int J Gynecol Pathol. 2002 Jan;21(1):11-5

非特許文献10: Reid-Nicholson M, Iyengar P, Hummer AJ, Linkov I, Asher M, Soslow RA. Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis. Mod Pathol. 2006 Aug;19(8):1091-100.

非特許文献11: Gadducci A, Tana R, Fanucchi A, Genazzani AR. Biochemical prognostic factors and risk of relapses in patients with cervical cancer. Gynecol Oncol. 2007 Oct;107(1 Suppl 1):S23-6.

非特許文献12: Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

非特許文献13: Akhras MS, Thiyagarajan S, Villablanca AC, Davis RW, Nyren P, Pourmand N. PathogenMip assay: a multiplex pathogen detection assay. PLoS ONE. 2007 Feb 21;2(2):e223.

非特許文献14: Woo YL, Damay I, Stanley M, Crawford R, Sterling J. The use of HPV Linear Array Assay for multiple HPV typing on archival frozen tissue and DNA specimens. J Virol Methods. 2007 Jun;142(1-2):226-30.

非特許文献15:Malinowski DP. Molecular diagnostic assays for cervical neoplasia: emerging markers for the detection of high-grade cervical disease. *Biotechniques*. 2005 Apr;Suppl:17-23.

非特許文献16:Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States—a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol*. 2000 Aug;78(2):97-105.

非特許文献17:Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Yamada H, Fujimoto S. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002 Dec;81(12):1144-51.

非特許文献18:Spandidos DA, Dokianakis DN, Kallergi G, Aggelakis E. Molecular basis of gynecological cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;900:56-64.

非特許文献19:Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Bogum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 15;14(2):366-9.

非特許文献20:Lea JS, Coleman RL, Garner EO, Duska LR, Miller DS, Schorge JO. Adenosquamous histology predicts poor outcome in low-risk stage IB1 cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2003; 91:558-62.

非特許文献21:Look KY, Brunetto VL, Clarke-Pearson DL, et al. An analysis of cell type in patients with surgically staged stage IB carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1996;63:304-11.

非特許文献22:Iwakawa M, Ohno T, Imadome K, Nakawatari M, Ishikawa K, Sakai M, Katoh S, Ishikawa H, Tsujii H, Imai T. The radiation-induced cell-death signaling pathway is activated by concurrent use of cisplatin in sequential biopsy specimens from patients with cervical cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007 Jun;6(6):905-11.

非特許文献23: Ohno T, Nakano T, Niibe Y, Tsujii H, Oka K. Bax protein expression correlates with radiation-induced apoptosis in radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer*. 1998 Jul 1;83(1):103-10.

発明の開示

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者は、上記の本願の出願当時における技術水準において、Villin1 (以下、VIL1と略記する) に対する抗体に着目し、子宮頸癌患者の生検試料を使って鋭意検討を重ねた結果、当該抗体が、子宮頸部腺癌の診断又は子宮頸癌の予後の診断マーカーとして有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0013] すなわち、本発明の一の実施形態によれば、患者から採取した試料を、VIL1に対する抗体と接触させる工程を含む、子宮頸部腺癌又は子宮頸部腺癌の予後の検査方法、或いは、患者の子宮頸部から採取した細胞を、VIL1に対する抗体と接触させ、当該細胞のVIL1の発現量に基づき、子宮頸部腺癌の存在又は予後を判断する工程を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸部腺癌の予後を診断する方法が提供される。
- [0014] 本発明の方法では、試料は、好ましくは患者の子宮頸部から採取した組織である。また、本発明の方法は、他の診断方法と組合せることでより効果的に子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸部腺癌の予後を診断することができる。例えば、パパニコロー染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性の患者、ヒトパピローマウイルス感染が陰性の患者、又はp16^{INK4a}が陰性の患者を対象とすることが有益である。また、本発明の方法は、p53癌抑制遺伝子に変異を検出する方法と組合せて子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸部腺癌の予後を診断することも有益である。
- [0015] 本発明の他の実施形態によれば、VIL1に対する抗体を含む子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための組成物が提供される。
- [0016] 本発明の更に他の実施形態によれば、VIL1に対する抗体を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸部腺癌の予後を診断するためのキットが提供される。また、本発明の更に他の実施形態によれば、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸部腺癌の予後を診断するためのマーカーとしてのVIL1に対する抗体のインビトロでの使用が提供され

る。

[0017] 本発明の更に他の実施形態によれば、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸部腺癌の予後を診断するための組成物を調製するためのVIL1に対する抗体の使用が提供される。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、子宮頸癌患者82人のKaplan-Meier生存曲線の図である。無病生存率の値が小さくなるほど予後が悪いことを示す。図1Aは、VIL1染色陽性及び陰性の2群における生存曲線である。図1Bは、VIL1染色陽性、HPV感染陰性、且つp16^{INK4a}染色陰性の群と、その他の2群における生存曲線である。図1Cは、VIL1染色陽性、HPV感染陰性、p16^{INK4a}染色陰性、且つp53に変異がある群と、その他の2群における生存曲線である。

[図2]図2は、子宮頸癌患者93症例のゲノムDNAにおけるVIL1遺伝子の定量PCRの結果より、コピー数相対値を病理組織分類別に2群比較した図である。SCCは扁平上皮癌であり、ADは腺癌、及び、腺扁平上皮癌の症例群である。

[図3]図3は、本発明の一の実施形態によるアビジン-ビオチン系免疫組織化学染色の結果であり、褐色に染色されている部分が、VIL1存在が認められた部分である。図3Aは、対照としたヒト小腸正常組織像であり、図3Bは、正常ヒト子宮体部の組織像であり、図3Cは、正常ヒト子宮頸部の組織像であり、図3Dは、子宮頸部腺癌の組織像であり、図3Eは、子宮頸部扁平上皮癌の組織像である。

発明を実施するための最良の形態

[0019] 上記の通り、本発明は、VIL1に対する抗体の、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための使用に関するものである。以下、具体的に説明する。

[0020] 1. VIL1

VIL1は、カルシウム制御性のアクチン結合タンパクで、ビリン/ゲルソリンファミリーに属するタンパクである。VIL1は、小腸の吸収細胞や近位尿細管の上皮細胞に特異的に発現し、刷毛縁を形成する細胞骨格タンパクである。VIL1は、大きなコアとなるドメインを中心に、N末端側、C末端側、および小さなヘッドピースからなる。

[0021] ヒトVIL1遺伝子は、2q35に位置し、ヒトVIL1のアミノ酸配列及びそれをコードするc

DNAの核酸配列は、NCBI Sequence Viewer v2.0から入手又は推測可能である。

[0022] VIL1は、アフィニティークロマトグラフィー等の慣用技術を用いてタンパク抽出することによって、腫瘍組織から単離することができる。また、その配列決定方法も当業者に周知である。

[0023] 2. 抗体

本発明で用いられる一次抗体は、VIL1に対して結合するものであればよく、ポリクロナール抗体でもモノクロナール抗体でもよい。

[0024] 本発明で用いることができる抗体は、下記表に表されるように多数、販売されているので、市販品を用いるのが便利である。

[0025] [表1-1]

輸入元	メーカー	品名	抗原/物質名	種由来	由来詳細	免疫動物	抗体クラス	精製度
コスモ・バイオ株式会社	Abcam	Villin antibody [1D2C3]	VIL, Villin1	Chicken	Full length native protein (purified) (Chicken).	Mouse Mono	IgG1?	Ig fraction-Protein G
コスモ・バイオ株式会社	Abcam	Villin antibody [CWWB1]	VIL, Villin1	Human	Full length protein (Human).	Mouse Mono	IgG1	Protein G purified
	Abcam	Villin antibody [SPM226], prediluted	VIL, Villin1	Human	Full length protein (Human)	Mouse Mono	IgG1?	Protein G purified
	Abcam	Villin antibody	VIL, Villin1	Rabbit	Synthetic peptide corresponding to C-terminal of human villin.	Rabbit Poly	IgG	Protein A purified
	Abcam	Villin antibody, prediluted	VIL, Villin1	Rabbit	Synthetic peptide corresponding to C-terminal of human villin.	Rabbit Poly	IgG	Immunogen affinity purified
	abD serotec	MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN	VILLIN	Chicken		Mouse Mono	IgG1	Purified IgG prepared by affinity chromatography on Protein A
フナコシ	Abnova Corporation	VIL1 MaxPab(R) polyclonal antibody (B01)	VIL1 (-, 1 a.a. ~ 421 a.a) full-length human protein.	Human	Mouse polyclonal antibody raised against a full-length human VIL1 protein	Mouse Poly		
フナコシ	Abnova Corporation	VIL1 monoclonal antibody (M02), clone 3G6	VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag.	Human	Mouse monoclonal antibody raised against a partial recombinant VIL1.	Mouse Mono	IgG2b	
フナコシ	Abnova Corporation	VIL1 polyclonal antibody (A01)	VIL1 (NP_009058, 1 a.a. ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag.	Human	Mouse polyclonal antibody raised against a partial recombinant VIL1.	Mouse Poly		
	ABR-Affinity Bioreagents	Villin	Villin	Human	Full length protein (Human)	Mouse Mono	IgG1	Protein G purified
	ABR-Affinity Bioreagents	Villin	Synthetic peptide corresponding to human Villin.	Human		Mouse Mono		affinity purified IgG

[表1-2]

	ABR-Affinity Bioreagents	Villin	Purified chicken villin	Chicken		Mouse Mono	IgG1	
	ABR-Affinity Bioreagents	Villin	Human villin protein	Human		Rabbit Poly	IgG	epitope affinity purified IgG
	Acris Antibodies GmbH	Monoclonal Antibody to Human Villin	Human Villin Protein	Human		Mouse Mono	IgG1	Protein G chromatography
	Acris Antibodies GmbH	Monoclonal Antibody to Villin	Purified chicken Villin	Chicken		Mouse Mono	IgG1	Protein A affinity chromatography
	Ana Spec	Anti-Villin	human Villin protein	Human		Mouse Mono	IgG1 ?	purified from ascites fluid by Protein G
シグマアルドリッチ	Atlas Antibodies	Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab1	Villin-1 recombinant protein epitope signature tag (PrEST)	Human		Rabbit Poly	IgG	Affinity purified using the PrEST-antigen as affinity ligand.
シグマアルドリッチ	Atlas Antibodies	Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab2	Villin-1 recombinant protein epitope signature tag (PrEST)	Human		Rabbit Poly	IgG	Affinity purified using the PrEST-antigen as affinity ligand.
	BD Biosciences	BD Transduction Laboratories™ Villin	Cow Villin aa. 1-827	Cow		Mouse Mono	IgG1	purified from tissue culture supernatant or ascites by affinity chromatography.
	BECKMAN COULTER	VILLIN	villin	Human		Monoclonal		
	BIOCARB MEDICAL	Villin, Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody	Villin			Mouse Mono	IgG1 ?	
	CELL MARQUEE	Villin(CWW B1)	Villin			Mouse	IgG1	

[表1-3]

GSTジャパン株式会社	Cell Signaling Technology	Villin-1 (R814) Antibody	villin-1	Human	Polyclonal antibodies are produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to the carboxy terminus of human villin-1.	Rabbit Poly	IgG, HRP-linked Antibody	purified using protein A and peptide affinity chromatography.
GSTジャパン株式会社	Cell Signaling Technology	Villin-1 Antibody	villin-1	Human	Polyclonal antibodies are produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to human villin-1.	Rabbit Poly	IgG, HRP-linked Antibody	purified using protein A and peptide affinity chromatography.
フナコシ	GeneTex	VIL1 [3G6] antibody	VIL1 (NP_009058, 1 a.a ~ 78 a.a) partial recombinant protein	Human		Mouse Mono	IgG2b	Protein A affinity purified
	GeneTex	VIL1 antibody	VIL1 (NP_009058, 1 a.a ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag.			Mouse Poly		Unpurified
	GenWay Biotech, Inc.	MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN Antibody, Mouse IgG Monoclonal Antibody	Purified chicken villin	Chicken		Mouse Mono	IgG1	Purified IgG prepared by affinity chromatography on Protein A
コスモバイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse Monoclonal Antibody	Native protein(Villin (VIL1))		Native protein	Mouse Mono	IgG1	Protein A column
コスモバイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse anti-Human Monoclonal Antibody	Human Villin protein(VIL1)	Human		Mouse Mono	IgG1	Affinity Purified

[表1-4]

コスモ・バイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody	Purified chicken villin(VIL1)	Chicken	Purified protein	Mouse Mono	IgG1 ?	Purified
コスモ・バイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody	Purified chicken villin.(VIL1)	Chicken	Purified protein	Mouse Mono	IgG1	Affinity Purified
	MILLIPORE	Anti-Villin, clone 12	Villin purified from chicken intestine.(VIL1)	Chicken		Mouse Mono	IgG1	
	MILLIPORE	Anti-Villin, clone ID2C3	Purified chicken villin(VIL1)	Chicken		Mouse Mono	IgG1	
フナコシ	Novus Biologicals	VIL1 antibody, Mouse Monoclonal anti-VIL1 (3G6)	VIL1 (NP_009058, 1 a.a ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag.	Human		Mouse Mono	IgG2b ?	IgG purified
フナコシ	Novus Biologicals	VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1	VIL1 (NP_009058, 1 a.a ~ 78 a.a) partial recombinant protein with GST tag.	Human		Mouse Poly		
フナコシ	Novus Biologicals	VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1 - villin 1, MaxPab Antibody	VIL1 (-, 1 a.a ~ 421 a.a) full-length human protein.	Human		Mouse Poly		
フナコシ	RayBiotech,inc.	MOUSE ANTI VILLIN, With HRP-conjugated secondary antibody	Villin	Birds		Mouse Mono		
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (ID2C3) Antibody	Vill	Chicken	purified full length native Villin of chicken origin.	Mouse Mono		

[表1-5]

	Santa Cruz Biotechnology	Villin (C-19) Antibody	villin	Human	C-terminus	Goat Poly	IgG	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (CWWB1) Antibody	VIL1	Human	full length Villin of human origin.	Mouse Mono	IgG1	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (BDID2C3) Antibody	VIL1	Chicken	purified full length native Villin of chicken origin.	Mouse Mono	IgG1	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (H-60) Antibody	VIL1	Human	raised against amino acids 721-780 mapping near the C-terminus of Villin of human origin.		IgG	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (K-11) Antibody	VIL1	Human	raised against a peptide mapping at the C-terminus of Villin of human origin.	Goat Poly	IgG	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (SPM226) Antibody	VIL1	Human	raised against recombinant Villin of human origin.	Mouse Mono	IgG1	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (V-20) Antibody	VIL1	Human	raised against a peptide mapping near the N-terminus of Villin of human origin.	Goat Poly	IgG	
	SPRING BIOSCIENCE	Anti Villin	Villin	Human		Mouse	IgG1?	
	SPRING BIOSCIENCE	Anti Villin	Villin	Human		Rabbit		
	Thermo SCIENTIFIC	Villin Ab-1 (Clone CWWB1)	Human Villin protein	Human		Mouse Mono	IgG1	
	USBiological	Villin 1 Pab Rb xHu	villin-1	Human	Synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to the carboxy terminus of human villin-1.	Rabbit Poly	IgG	Purified by Protein A and immunofluorescence chromatography.
	USBiological	Villin Mab Mo xHu	Human Villin protein	Human		Mouse Mono	IgG1	Purified by Protein G affinity chromatography.

[表1-6]

	YLEM S.R.L	Anti Villin	Villin			Mouse	IgG1	
	Abnova Corporation	VIL1 Recombinant Protein (P01)	VIL1(AAH17303, 1 a.a. - 422 a.a.) full-length recombinant protein with GST.		Length with Tag 653 aa with GST Tag			
	Abnova Corporation	VIL1 Recombinant Protein (Q01)	VIL1(NP_009058, 1 a.a. - 78 a.a.) partial recombinant protein with GST.		Length with Tag 311 aa with GST Tag			
	Novus Biologicals	VIL1 Partial Recombinant Protein, VIL1 Partial Recombinant Protein (Q01)	VIL1(NP_009058, 1 a.a. - 78 a.a.) partial recombinant protein with GST.					
	Novus Biologicals	VIL1 Recombinant Protein	VIL1(AAH17303, 1 a.a. - 422 a.a.) full-length recombinant protein with GST.					

[0026] [表2-1]

輸入元	メーカー	品名	クローン	交差する動物種	標識物	適用	保存温度	
コスモ・バイオ株式会社	Abcam	Villin antibody [1D2C3]	1D2C3	Human, Chicken	Unlabeled	IHC paraffin embedding section, IHC frozen section	4°C	Villin is a very specific marker for gastrointestinal tumors and adenocarcinomas of the pancreas. Other subsets of tumors stained with Villin are Merkel cell, lung (with rootlets), ovarian and kidney. It does not stain breast cancer.
コスモ・バイオ株式会社	Abcam	Villin antibody [CWWB1]	CWWB1	Human	Unlabeled	IHC(Paraffin)	4°C	
	Abcam	Villin antibody [SPM226], prediluted	SPM226	Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	Abcam	Villin antibody		Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	Abcam	Villin antibody, prediluted		Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	abD serotec	MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN	ID2C3	Human, Chicken, Pig		Immunohistology - Frozen, Western Blotting		
フナコシ	Abnova Corporation	VIL1 MaxPab(R) polyclonal antibody (B01)		Human	Unlabeled	WB	-20°C or lower	
フナコシ	Abnova Corporation	VIL1 monoclonal antibody (M02), clone 3G6	3G6	Human	Unlabeled	ELISA	-20°C	
フナコシ	Abnova Corporation	VIL1 polyclonal antibody (A01)		Human, Other species not tested.	Unlabeled	ELISA, WB(Recombinant protein)	-20°C or lower	
	ABR-Affinity Bioreagents	Villin	CWWB1	Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	ABR-Affinity Bioreagents	Villin	SPM226	Human		IHC(Paraffin), Immunoprecipitation	4°C	

[表2-2]

	ABR-Affinity Bioreagents	Villin	ID2C3	Human, Chicken, Porcine		IHC(frozen),WB	4°C	
	ABR-Affinity Bioreagents	Villin		Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	Acris Antibodies GmbH	Monoclonal Antibody to Human Villin	CWWB1	Human		IHC(Paraffin)	2-8°C, -20°C	
	Acris Antibodies GmbH	Monoclonal Antibody to Villin	ID2C3	Human, Chicken, Porcine		IHC(frozen),WB	2-8°C, -20°C	
	Ana Spec	Anti-Villin		Human		IHC	2-8°C	
シグマアルドリッチ	Atlas Antibodies	Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab1		Human, Other species not tested.		IHC(formalin-fixed, paraffin-embedded sections), Immunoblotting, Protein array	-20°C	
シグマアルドリッチ	Atlas Antibodies	Anti-VIL1 antibody produced in rabbit Ab2		Human, Other species not tested.		IHC(formalin-fixed, paraffin-embedded sections), Immunoblotting, Protein array	-20°C	
	BD Biosciences	BD Transduction Laboratories™ Villin	12	Human		IHC, IF, WB	-20°C	
	BECKMAN COULTER	VILLIN	ID2C3	Human		Flow Cytometry		
	BIOCARRE MEDICAL	Villin, Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody	ID2C3	Human		IHC(Paraffin)	2-8°C	Villin can be very useful in differentiating colon adenocarcinoma from breast carcinoma and from lung adenocarcinoma.
	CELL MARQUE	Villin(CWWB1)	CWWB1	Human		IHC paraffin embedding section, IHC frozen section	4°C	

[表2-3]

GSTジャパン株式会社	Cell Signaling Technology	Villin-1 (R814) Antibody		Human, Mouse, Rat		WB, Immunofluorescence(IF-IC)	-20°C	
GSTジャパン株式会社	Cell Signaling Technology	Villin-1 Antibody		Human		WB	-20°C	
フナコシ	GeneTex	VIL1 [3G6] antibody	3G6	Human, Other species not tested.		ELISA	-20°C or lower	
	GeneTex	VIL1 antibody		Human, Other species not tested.		ELISA, WB		
	GenWay Biotech, Inc.	MOUSE ANTI CHICKEN VILLIN Antibody, Mouse IgG Monoclonal Antibody	ID2C3	Human, Birds, Pig, ChickenN.B.		IHC(frozen),WB	4°C or -20°C	
コスモバイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse Monoclonal Antibody		Human, Chicken, Pig		IHC, WB, Flow Cytometry	4°C or -20°C	
コスモバイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse anti-Human Monoclonal Antibody		Human		IHC, IHC paraffin embedding section		
コスモバイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody		Human, Chicken, Porcine		IHC		
コスモバイオ株式会社、フナコシ	LIFESPAN BIOSCIENCES INC.	Villin (VIL1) Mouse anti-Chicken Monoclonal Antibody		Human, Chicken, Porcine		IHC, WB, IHC frozen section		
	MILLIPORE	Anti-Villin, clone 12	12	Human, Chicken		WB, Immunocytochemistry		
	MILLIPORE	Anti-Villin, clone ID2C3	ID2C3	Human, Chicken, Pig		IHC		

[表2-4]

フナコシ	Novus Biologics	VIL1 antibody, Mouse Monoclonal anti-VIL1 (3G6)	3G6	Human, Other species not tested.	Unconjugated	ELISA(Antibody reactive against recombinant protein)	-20°C or -80°C	
フナコシ	Novus Biologics	VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1		Human, Other species not tested.	Unconjugated	ELISA, WB(The quality control of this antibody is limited to Western blot on the immunizing protein.)	-20°C or -80°C	
フナコシ	Novus Biologics	VIL1 antibody, Mouse Polyclonal anti-VIL1 - villin 1, MaxPab Antibody		Human	Unconjugated	ELISA, WB(Antibody Reactive Against Tissue Lysate and Transfected Lysate.)	-20°C or -80°C	
フナコシ	RayBiotech, inc.	MOUSE ANTI VILLIN, With HRP-conjugated secondary antibody			Unlabeled			
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (1D2C3) Antibody	1D2C3	Human, Chicken		WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA	4°C	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (C-19) Antibody	C-19	Human, Mouse, Rat, Cow		WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA	4°C	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (CWWB1) Antibody	CWWB1	Human		WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA	4°C or freeze	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (BDID2C3) Antibody	BDID2C3	Human, Chicken, Mouse		WB, IP, IF, IHC(Paraffin), ELISA	4°C	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (H-60) Antibody	H-60	Human, Mouse, Rat		WB, IP, IF, solid phase ELISA	4°C	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (K-11) Antibody	K-11	Human, Mouse, Rat		WB, IF, solid phase ELISA	4°C	

[表2-5]

	Santa Cruz Biotechnology	Villin (SPM226) Antibody	SPM226	Human		IF, IHC(Paraffin)	4°C or freeze	
	Santa Cruz Biotechnology	Villin (V-20) Antibody	V-20	Human, Mouse, Rat		WB, IF, solid phase ELISA	4°C	
	SPRING BIOSCIENCE	Anti Villin	SPM226	Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	SPRING BIOSCIENCE	Anti Villin		Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	Thermo SCIENTIFIC	Villin Ab-1 (Clone CWWB1)	CWWB1	Human		IHC(formalin-fixed, paraffin-embedded sections)	2-8°C	
	USBiological	Villin 1 Pab Rb xHu		Human		IHC, IF, WB	4°C or -20°C	
	USBiological	Villin Mab Mo xHu	3F392	Human		IHC	4°C or -20°C	
	YLEM S.R.L.	Anti Villin	CWWB1	Human		IHC(Paraffin)	4°C	
	Abnova Corporation	VIL1 Recombinant Protein (P01)				ELISA, WB(Recombinant protein), Antibody Production, Array	-80°C	
	Abnova Corporation	VIL1 Recombinant Protein (Q01)				ELISA, WB(Recombinant protein), Antibody Production, Array	-80°C	
	Novus Biologics	VIL1 Partial Recombinant Protein, VIL1 Partial Recombinant Protein (Q01)				ELISA, WB. Other unit sizes are available.	-20°C or -80°C	
	Novus Biologics	VIL1 Recombinant Protein				ELISA, WB. Other unit sizes are available.	-80°C	

[0027] ポリクロナール抗体及びモノクロナール抗体の調製は、製品の添付書類、販売元のホームページ該当サイト等に従って行えばよい。

[0028] 本発明の方法は例えば間接法により実施することができる。この方法による場合、通常本発明のVIL1に対する抗体を一次抗体として用い、一次抗体に対する抗体を

二次抗体として用いる。

- [0029] 試料は、例えば、0.1M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行い、0.5%過酸化水素水にて、内因性ペルオキシダーゼの除去を行ったのち、再度、0.1M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行い、次いで、二次抗体を得た動物種と同種の血清を用いて、例えば、2-10%正常血清を含む0.1M リン酸バッファー液と、30-60分間インキュベートを行い、バックグラウンド染色の原因となる非特異的反応を抑制しておくといふ。次いで、抗体希釈液、例えば、0.1M リン酸バッファー液で適切な濃度に調整しておいた一次抗体を試料に加え、例えば、24-76時間インキュベートする。なお、このまま、直接的に抗体反応として検出する方法、例えば、蛍光物質を直接結合する方法もあるが、間接法の方が応用範囲の広く、高感度の検出が可能となる。
- [0030] 間接法では、次いで、二次抗体を試料に加えてVIL1を可視化する。可視化する方法としては、二次抗体に蛍光標識を用いる方法、二次抗体に酵素を結合させ、発色基質を沈着させる酵素法、ビオチン化二次抗体を用いて、そこに標識済みのアビジン-ビオチン複合体を検出させるABC法などがある。これらの標識化の技術は当業者に周知であり、例えば、製品の添付書類、販売元のホームページ該当サイト等に詳細に記載されている。ABC法は、一次抗体で、インキュベートした後、例えば、0.1 M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行い、ビオチン化二次抗体で、更に2-24時間インキュベートする。これを、再度0.1M リン酸バッファー液にて、10分間3回洗浄を行ったのち、アビジン-ビオチン複合体で1-2時間インキュベートする。それをDAB(ジアミノベンジジン)反応液で発色させる。DAB反応液は、例えば、トリスバッファー液で調整し、過酸化水素水を加えて用いる。また、アンモニウムニッケルサルフェートを加える事もある。
- [0031] 3. 診断対象疾患
- 本発明においては、VIL1に対する抗体を、子宮頸癌の存在又は予後の診断に用いる。特に、本発明で用いられるVIL1に対する抗体は、子宮頸部腺癌に対して特異性が高く、子宮頸癌の予後と特に高い相関性を有するため、これらの診断で特に有益である。
- [0032] また、本発明のVIL1に対する抗体を用いる診断方法は、他の特定の診断方法と組

合せることでより効果的に子宮頸部腺癌の存在又は子宮頸部腺癌の予後を診断することができる。

例えば、パパニコロ染色による子宮頸部癌の細胞診は、子宮頸部扁平上皮癌では有効であるが、子宮頸部腺癌では偽陰性となる(非特許文献1)。このため、パパニコロ染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性と判断された患者を対象として本発明の方法を実施することは、効率的に子宮頸部腺癌を検出する上で有益である。

[0033] また、欧米諸国では、16型及び18型等のヒトパピローマウイルスの感染は、そのウイルスの型(タイプ)により、子宮頸部腺癌を推定診断できるとの報告があるが、本発明者の検討結果によれば、日本人子宮頸部扁平上皮癌の患者では高い感染頻度を示したものの、日本人子宮頸部腺癌では、その感染頻度は低く、関連性を示さなかった。そのため、日本人子宮頸部腺癌に対しては、ヒトパピローマウイルスタイピングが、補助診断とならない危険性がある。よって、これらヒトパピローマウイルス感染のない患者を対象として本発明の方法を実施することは、子宮頸部腺癌を検出する効率的な検査法となる。

[0034] また、欧米諸国においては、今後、パピローマウイルスワクチンの使用が予定されており、その効果により、ヒトパピローマウイルスの感染が原因の子宮頸部腺癌は激減すると期待されている。よって、今後は、ヒトパピローマウイルスの感染が原因でない子宮頸部腺癌が、大きな問題となることが予測される(非特許文献1)。

例えば、ヒトパピローマウイルスは、6型、11型、16型、18型52型及び58型を含む多くの型が子宮頸部腺癌の原因と考えられており、これらヒトパピローマウイルスの診断で陰性の患者に対して、本発明の方法を実施することで、上記問題に対応することが可能とする。

[0035] 同様に、本発明の方法で検出される子宮頸部腺癌の中には、 $p16^{INK4a}$ の検査で陰性と判断された患者も含まれており、汎用される、 $p16^{INK4a}$ の検査で陰性と診断された患者に、本発明の方法を実施することで、子宮頸部腺癌の検出率を向上させることができる。

[0036] 更に本発明者は、今回、子宮頸癌の予後に関し、VIL1を、HPV及び/又は $p16^{INK4a}$ と組み合わせることが有用であることを見出した。具体的には、VIL1のみをマーカー

として用い、VIL1が陽性とされた患者の健存率と、VIL1とHPV及び／又はp16^{INK4a}とを組み合わせてマーカーとして用い、VIL1が陽性で、HPV感染が陰性及び／又はp16^{INK4a}が陰性の患者の健存率を比較したところ、前者に比べ後方で健存率がより悪化していることを見出した(図1A及びB)。また、VIL1が陽性で、HPV感染及びp16^{INK4a}が陰性で、且つp53に変異が見られる患者では、VIL1が陽性で、且つHPV感染及びp16^{INK4a}が陰性の患者よりさらに健存率は悪化していた(図1C)。

[0037] このため、HPV、p16^{INK4a}、及びp53の少なくとも1つ、好ましくは2つ、より好ましくはHPV及びp16^{INK4a}、特に好ましくはHPV、p16^{INK4a}、及びp53を、VIL1と組み合わせることで、子宮頸癌の予後を正確に予測する上で有益である。

[0038] 4. 分析及び診断手法

本発明の診断方法は、患者の子宮頸部から採取した細胞のVIL1発現量に基づき、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸部腺癌の予後を診断する方法であり、本発明では、患者の子宮頸部から採取した細胞をVIL1に対する抗体と接触させ、抗体に結合したVIL1の量を測定する工程を含む。

[0039] 抗体に結合したVIL1の量、即ち患者の子宮頸部から採取した細胞のVIL1発現量は、例えば、上記で説明した標識の組織化学的染色における発色の有無及び程度に基づき決定することができる。また、例えば、ELISA方法、フローサイトメトリーによる自動分析、ウェスタンブロット法等によって実施することもできる。

[0040] また、本発明の方法による子宮頸部腺癌の診断及び子宮頸部腺癌の予後の診断は、用いる分析法に応じて行えばよい。組織化学的染色方法では、例えば、以下の基準によって上記診断を行うことができる。

[0041] 0: 染まらない。

1: 腫瘍細胞のごく一部の細胞膜が染まる。

2: 細胞質と細胞膜の両方、又は細胞質若しくは細胞膜のどちらかが、いくつもの腫瘍細胞で染まっている。

総合判定: 0は陰性、1及び2が陽性。

実施例

[0042] 以下、本発明を実施例に基づき更に詳細に説明する。但し、以下の実施例は本発

明の技術的範囲に何らの影響を及ぼすものではない。

[0043] 1. 試料

放射線医学総合研究所で子宮頸部、子宮体部又は膣を発生部位とする子宮癌患者と診断され治療を行っている日本人の患者の中から、機関の審査委員会による同意書に同意し、臨床記録と生検組織の研究使用許可へのインフォームドコンセントを行った患者122人を対象とした。患者の平均年齢は60歳である。全症例中、子宮頸部扁平上皮癌は74例、子宮頸部腺癌は31例、子宮体部腺癌は5例であった。

[0044] 122人のうち、44人(子宮頸部扁平上皮癌は31例、子宮頸部腺癌は11例、子宮体部腺癌は2例)は全骨盤に30.6Gyの放射線療法を受け、更に、¹⁹²Ir高線量率腔内近接照射とともに中央遮蔽での骨盤照射を50.6Gyで実施した患者である。他の54症例(子宮頸部扁平上皮癌は33例、子宮頸部腺癌は12例、子宮体部腺癌は1例、その他の症例は8例)は、同様の放射線療法を受け、更に、1週間隔で40mg/m² のシスプラチンを5回に分けて投与した患者である。他の24症例(子宮頸部扁平上皮癌は6例、子宮頸部腺癌は15例、子宮体部腺癌は2例、その他の症例は1例)は71.2 GyEの炭素線療法を受けた患者である。

[0045] 全対象患者うち、110人は2年以上、腫瘍の再発転移について追跡した。

23人は遠隔転移を認め(M1)、6人は大きな腫瘍で侵襲的な局所腫瘍(T4)であったので、予後解析対象から除外した。除外した患者の内訳は、子宮頸部扁平上皮癌は19例、子宮頸部腺癌は5例、子宮体部腺癌は0例、その他の症例は3例である。1例は遠隔転移を認め(M1)、且つ大きな侵襲的腫瘍(T4)である。

[0046] すべての生検試料は放射線療法前に子宮頸部より採取されたものである。生検試料は10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋を行った。ゲノムDNAはRNAlaterに浸けた生検試料より抽出した(非特許文献22参照)。

[0047] 2. 統計解析方法

フィッシャーの正確確率検定を、VIL1免疫組織化学法の発現、HPV感染、病理分類、p53変異、及びp16^{INK4a}免疫組織化学法の発現のそれぞれの検討因子間における相関関係を解析するのに用いた。P値が0.05よりも小さければ、有意の差が「ある」とした。予後検定は、二年間の追跡調査中の再発、転移及び腫瘍死を評価項目とし、

再発転移のない無病生存について、経時的に、Kaplan-Meier法にて生存曲線を描き、ログランク検定で有意差を計算した。

[0048] 3. 定量PCR法

3-1. 操作手順

VIL1遺伝子をプライマーとして用い、腫瘍DNAと参照DNAについてPCRを行った。93症例の子宮頸癌患者のゲノムDNAをRNAlater中の生検サンプルからGenomic-tip (100/G) (QIAGEN) にて抽出精製した。参照DNAとして市販のHuman genomic DNA from females (Promega) を使用した。PCR反応液には30ngのゲノムDNAを用いた。プライマーはProbeFinder Software (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) でデザインし、ハイブリダイゼーションプローブはUniversal Probe Library (Roche) から適当なものを選択した。用いたプライマーの塩基配列は、下記の表に記載の通りである。

[0049] [表2]

． プライマー配列

遺伝子名	方向*	プライマー配列 (5' > 3')	プローブ†	生産物の大きさ (bp)
VIL1	F	ggtgaagcagggacacga	#72	78
	R	ttggtgttactccacttgaagg		

略語:

F: フォワード

R: リバース

*: プライマー配列の方向

†: Universal Probe Library のプローブID番号

[0050] PCR試薬はLightCycler480 Probes Master (Roche) を使用し、定量PCR装置はLightCycler480 (Roche) を使用した。PCR反応条件は95°Cで10分間1本鎖に変性させた後、95°Cで20秒、55又は60°Cで30秒、72°Cで30秒温度を変化させるサイクルを40~45回行って目的の遺伝子を増幅させた。

[0051] 3-2. 結果

ゲノムDNAのVIL1コピー数を参照DNAのVIL1コピー数で除し、相対値を求めた。VIL1コピー数相対値解析では扁平上皮癌と腺癌症例の間で、VIL1のコピー数に有意差を認めた(P=0.049) (図2)。

[0052] 4. 免疫組織化学染色

4-1. 染色手順及び判断基準

VIL1及びp16^{INK4a}について、自動染色機Ventana Discovery System (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)を使用し、ストレプトアビジン-ビオチン免疫ペルオキシダーゼ染色を行った(非特許文献23参照)。一次抗体であるVIL1マウスモノクローナル抗体(CELL MARQUE, CA)と抗ヒトp16^{INK4a}マウスモノクローナル抗体(Thermo Fisher Scientific, IPR, UK)はantibody dilution buffer (Ventana)で100倍希釈にして使用した。二次抗体には、VIL1、p16^{INK4a}とも、Discovery Universal Secondary Antibody (Ventana)を用いた。陰性コントロールには、一次抗体を加えない希釈液のみを使用した。

[0053] 免疫組織化学染色による評価は、VIL1、及びp16^{INK4a}の各染色パターンによりそれぞれ以下の基準により行った。

[0054] 1) VIL1

0: 染まらない

1: 腫瘍細胞のごく一部の細胞膜が染まる

2: 細胞質及び細胞膜の両方が、又は細胞質若しくは細胞膜どちらかが幾つもの腫瘍細胞で染まっている

総合判定: 0は陰性、1と2を陽性とした。

[0055] 2) p16^{INK4a}

0: 細胞核と細胞質が染まっているものが1%に満たない

1: 細胞核と細胞質が染まっているものが1~10%で、染まりは弱く、散在している

2: 染まっているものが10~30%で染まりが強い

3: 染まっているものが30%よりも多く、標本のいくつもの領域で存在し、染まりも強い。

総合判定: スコア0、1、2は陰性で3を陽性とした。

[0056] 4-2. 結果

1) VIL1

上記免疫組織化学染色では、VIL1は正常な小腸上皮(図3A)に見られ、正常な子宮体部や子宮頸部では、その発現が観察されなかった(図3B及び図3C)。122症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本について免疫組織化学染色を実施した。子宮頸部腺癌(図3D)の症例(13/31)においてVIL1染色陽性となり、総ての扁平上皮癌症例(81/81)においてVIL1染色陰性となった(図3E)。VIL1免疫染色陽性試料において子宮頸部扁平上皮癌と子宮頸部腺癌との間で有意差が見られた($P < 0.0001$)。VIL1陽性腫瘍は総て子宮頸部腺癌であった。子宮頸部腺癌の診断マーカーとしての検出感度は41%であり、選択性は100%であった。

[0057] 2) p16^{INK4a}

p16^{INK4a}の染色では、評価可能な114例中97例(85%)が陽性であった。子宮頸部扁平上皮癌では、ほとんどの症例(95%)でp16^{INK4a}は陽性であり、対照的に、子宮頸部腺癌では52%の症例でp16^{INK4a}は陰性であった。

[0058] 5. ヒトパピローマウイルス(HPV) 遺伝子型タイピング

5-1. HPV linear array assayによるHPV感染の検出

Linear Array HPV Genotyping test (LA HPV GT, Roche) のビオチン化PGMYオリゴヌクレオチドプローブでHPV遺伝子の標的DNAをPCRにて増幅した。ビオチン化された増幅産物を用いて、Linear Array Detection Kit (LA DK, Roche) を使用し、発色同定により検出した。発色同定はメンブレン上に固相化した37種類のHPV型特異的プローブとビオチン化増幅産物のハイブリダイゼーションを行い、メンブレン上にビオチン化増幅産物を固相化し、続いてストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼを添加してビオチンと反応させた後、さらに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(3,3',5,5'-TMB)を添加し、青色の発色反応を行った。

[0059] 5-2. 結果

122人の女性のうち95人(78%)でHPV陽性の癌であった。HPVタイプ16が最も高い頻度で検出された。子宮頸部扁平上皮癌患者79人のうち72人がHPV陽性症例であるのに対して、子宮頸部腺癌患者37人のうち19人がHPV陽性症例であり、子宮頸部腺癌患者よりも子宮頸部扁平上皮癌患者でHPV陽性症例が極めて多かった($P < 0.0001$)。

0001)。VIL1免疫染色陽性サンプル14症例のうち9例(64%)はHPV陰性であり、HPV感染陰性とVIL1染色陽性の間に相関関係が認められた(P=0.0002)。

[0060] 6. p53変異

6-1. 高精度融解分析法による癌抑制遺伝子p53の変異検出

高精度融解分析法を用いて122症例のDNA試料におけるp53遺伝子のエクソン5～8の変異検出スクリーニングを行った。p53遺伝子のエクソン5～8はPCRにて増幅した。鋳型DNAは対象試料中のDNAのみのもので、これを等量の参照DNAと混ぜたものを用いた。20ulのPCR反応液には1xLightCycler480 High Resolution Melting Master (Roche)、それぞれ2.5mMエクソン5、2.5mMエクソン8、3.0mMエクソン6及び3.0mMエクソン7のMgCl₂水溶液、0.2uMのforwardプライマー(配列は表2参照)、0.2uMのreverseプライマー(配列は表2参照)、10ngの鋳型DNAが含まれている。PCR反応装置は、LightCycler 480 thermal cycler (Roche)を使用した。反応条件は95°Cで5分間変性させた後、95°Cで10秒、60又は63°Cで15秒、72°Cで10秒の3ステップを45サイクル行い、続けて4.8°C/sの割合で、65°Cから95°Cの融解解離曲線解析を行った。融解曲線のデータはLightCycler 480 Gene Scanning software (Roche)により、解析を行った。

[0061] 6-2. 結果

122症例のうち15例でp53癌抑制遺伝子に変異があった。VIL1免疫染色陽性試料では、高い頻度すなわち35%が、p53変異をもち(P=0.0147)、p53に変異をもつVIL1陽性症例は総てHPV感染陰性であった。従って、子宮頸部腺癌の一部に、VIL1陽性で、HPV感染陰性、かつp53に変異を持つ、特殊な発癌機構を持つサブタイプがあることが想定された。

[0062] 7. VIL1の予後診断マーカーとしての評価

治療後2年以上、経過観察が可能であった82人の子宮頸癌患者(子宮頸部扁平上皮癌患者は50例、子宮頸部腺癌患者は25例)について、治療前に生検試料を採取して免疫組織化学染色を実施し、治療後最長で約5年に亘って予後を観察してVIL1の予後診断マーカーとしての評価を行ったところ、VIL1が予後関連因子として有用であることが解った(P=0.0122)。図1A-Cに示すKaplan-Meier生存曲線から解る

ように、VIL1染色陽性腫瘍であると2年健存率は悪く(P = 0.033)(図1A)、子宮頸癌の予後とVIL1が関連することが解った。また、VIL1染色陽性でHPV感染陰性、p16^{INK}_{4a}陰性腫瘍では、さらに2年健存率は悪く(P = 0.005)(図1B)、VIL1染色陽性でHPV感染陰性、p16^{INK4a}陰性、p53に変異が見られる腫瘍では、よりさらに2年健存率は悪かった(P = 0.0023)(図1C)。

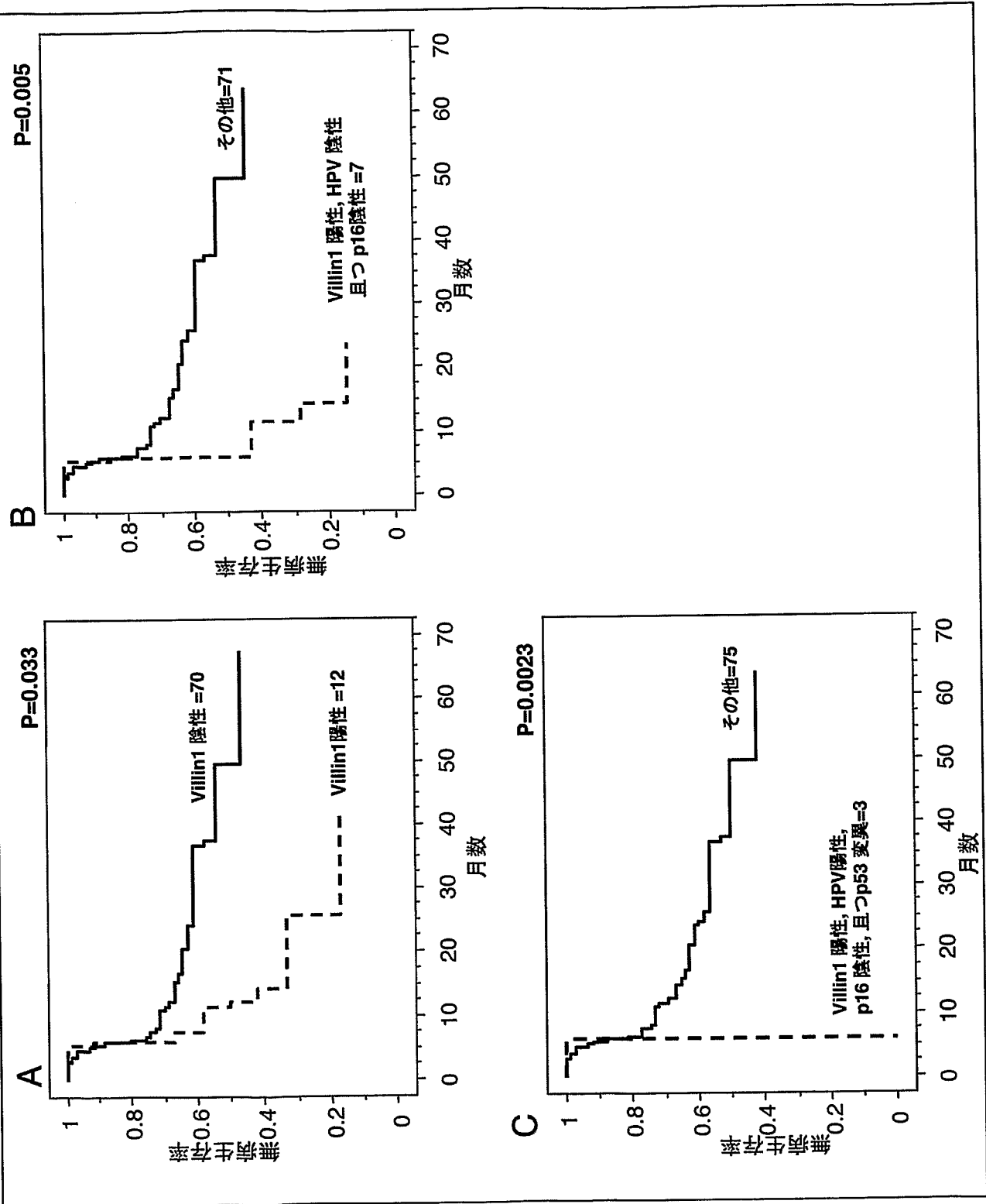
[0063] 以上の結果は、VIL1の子宮頸癌の予後診断因子としての有用性を実証すると共に、HPV感染の有無、p16^{INK4a}の免疫染色法による発現の有無、及びp53の変異の有無の少なくとも1つをVIL1と組み合わせることで、子宮頸癌の予後診断の精度が向上することを実証する。

請求の範囲

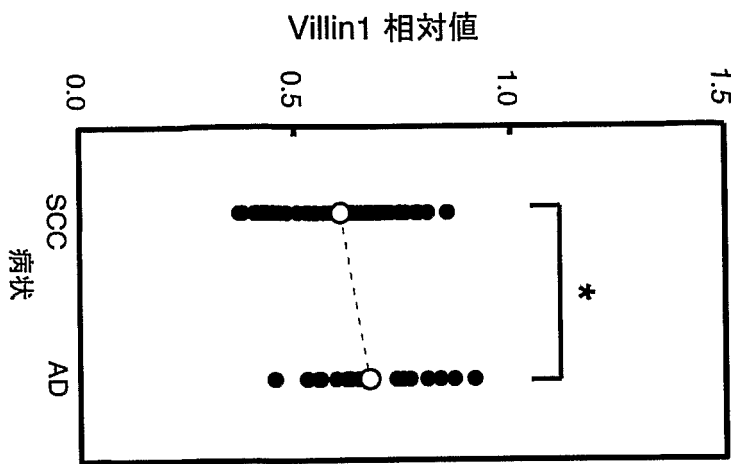
- [1] Villin1に対する抗体を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための組成物。
- [2] 前記診断が、パパニコロー染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性の患者を対象とする、請求項1に記載の組成物。
- [3] 前記診断が、ヒトパピローマウイルス感染が陰性の患者を対象とする、請求項1又は2に記載の組成物。
- [4] 前記ヒトパピローマウイルスが、6型、11型、16型、18型、52型及び58型の何れかである、請求項3に記載の組成物。
- [5] 前記ヒトパピローマウイルスが、16型である、請求項4に記載の組成物。
- [6] 前記診断が、p16^{INK4a}が陰性の患者を対象とする、請求項1から5の何れか一項に記載の組成物。
- [7] p53癌抑制遺伝子に変異を検査する方法と組み合わせて子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するための請求項1から6の何れか一項に記載の組成物。
- [8] ヒトパピローマウイルス感染検査及びp16^{INK4a}検査と組み合わせて子宮頸癌の予後を診断するための請求項1から6の何れか一項に記載の組成物。
- [9] ヒトパピローマウイルス感染検査、p16^{INK4a}検査、及びp53癌抑制遺伝子検査と組み合わせて、子宮頸癌の予後を診断するための請求項1から6の何れか一項に記載の組成物。
- [10] 前記Villin1に対する抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1から11の何れか一項に記載の組成物。
- [11] 前記抗体が検出可能な標識を含む、請求項1から6の何れか一項に記載の組成物。
- [12] Villin1に対する抗体を含む、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断するためのキット。
- [13] 患者の子宮頸部から採取した細胞を、Villin1に対する抗体と接触させ、
該抗体と結合したVillin1を検出する工程を含む、子宮頸部腺癌又は子宮頸癌の予後の検査方法。

- [14] 前記細胞が、パパニコロー染色による子宮頸部癌の細胞診で陰性の患者から採取された細胞である、請求項13に記載の方法。
- [15] 前記細胞が、ヒトパピローマウイルス感染が陰性の患者から採取された細胞である、請求項13又は14に記載の方法。
- [16] 前記ヒトパピローマウイルスが、6型、11型、16型、18型、52型及び58型の何れかである、請求項13から15の何れか1項に記載の方法。
- [17] 前記ヒトパピローマウイルスが、16型である、請求項16に記載の方法。
- [18] 前記細胞が、p16^{INK4a}が陰性の患者から採取された細胞である、請求項13から17の何れか1項に記載の方法。
- [19] 請求項13から18の何れか1項に記載の方法を、p53癌抑制遺伝子の変異を検査する方法と組み合わせて、子宮頸部腺癌を診断又は子宮頸癌の予後を診断する方法。
- [20] 請求項13から18の何れか1項に記載の方法を、ヒトパピローマウイルス感染検査及びp16^{INK4a}検査と組み合わせる、子宮頸癌の予後を診断する方法。
- [21] 請求項13から18の何れか1項に記載の方法を、ヒトパピローマウイルス感染検査、p16^{INK4a}検査、及びp53癌抑制遺伝子検査と組み合わせる、子宮頸癌の予後を診断する方法。

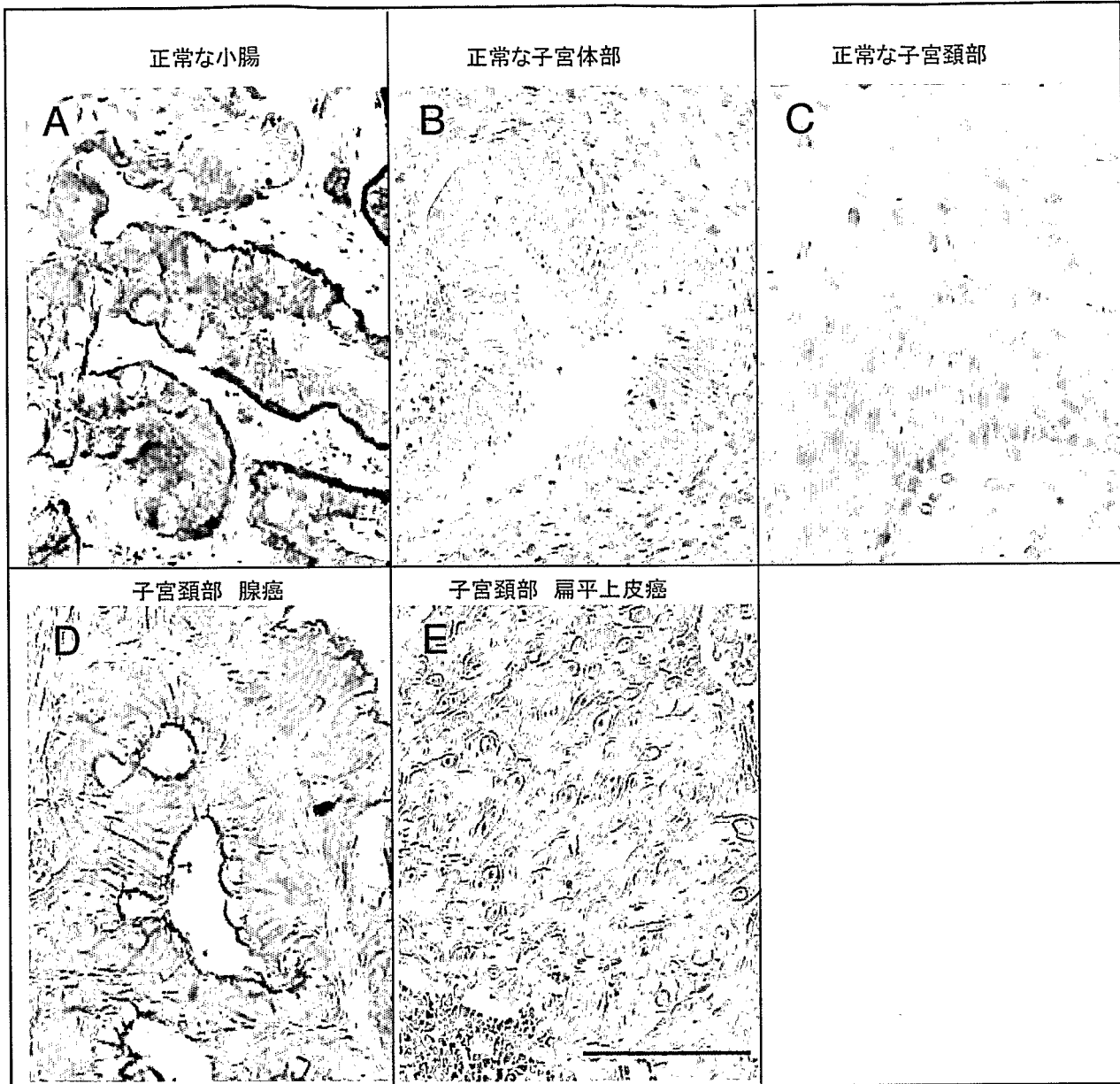
【 図 1 】



【 図 2 】



【図 3】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/068920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574 (2006.01) i

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

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	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

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

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), JSTPLUS (JDreamII), JMEDPLUS (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S Robine, C Huet, R Moll, C Sahuquillo-Merino, E Coudrier, A Zweibaum, and D Louvard, Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?, Proc Natl Acad Sci USA, 1985, Vol.82, No.24, Page.8488-8492, full text	1-18
A	Seiichi SHINSHI, Takashi TAJIRI, Nobutaka TANAKA, Kiyonori FURUKAWA, Hideyuki SUZUKI, Tomoko SETANI, Hayato SUGA, Hiroyuki TSURUTA, Satoshi MATSUMOTO, Nobuo TERANISHI, Kazumitsu CHO, Toshiyuki ISHIWATARI, Yoshinari NAITO, "Daicho Tei Bunka Sengan ni Okeru CK20/CK7/Villin no Hatsugen, Dai 64 Kai Annual Meeting of the Japan Cancer Association, 2005, page 397, full text	1-18

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 November, 2008 (13.11.08)Date of mailing of the international search report
25 November, 2008 (25.11.08)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/068920

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hayato INOUE, Yoshio MATSUI, Hideki AMANO, Hidenori HARA, Hirokuni YOSHIMURA, Jiang SHIXU, Shin'ichiro RYUGE, Masato KATAGIRI, Noriyuki MASUDA, "Hai Gan Kanja Kesseichu ni Mitomerareta villinl ni Taisuru Jiko Kotai no Yuyosei ni Tsuite", Dai 48 Kai The Japan Lung Cancer Society Sokai, 2007, page 532, full text	1-18
A	Takeshi MARUO, Shigeki YOSHIDA, "Shikyukeigan to Shuyo Marker", Obstetrical and Gynecological Therapy, 1999, Vol.79, No.6, page 653 to 660, full text	1-18
A	Mitsunari ISHIKAWA, Takuma FUJII, Takeshi FUKUCHI, Kaneyuki KUFUSHIRO, Katsumi TSUKASAKI, Makio MUKAI, Shiro NOZAWA, "HPV Kansen o Shihyo to shita Shikyu Keibu Sengan ni Okeru p16INK4a Tanpakushitsu no Kajo Hatsugen ni Kansuru Kento", Dai 61 Kai The Japanese Cancer Association Sokai, 2002, pages 383 to 384, full text	1-18
A	Akiko NOSUE, Ken NISHIDE, Yuko ARAI, Kazumi YAMADA, Sohei MIYAKAWA, "3. Saiboshin Insei de atta Shinjunsei Shikyu Keibu Sengan no Shorei", Dai 22 Kai Ibaragi Igakukai Sanfujinka Bunkakai, Dai 128 Kai Nichisanpu Gakkai Ibaragi Chiho Bukai Reikai, 2001, page 86, full text	1-18
A	JP 2007-537197 A (Ganymed Pharmaceuticals AG.), 20 December, 2007 (20.12.07), Par. Nos. [0224] to [0229] & EP 1759013 A & WO 2005/110338 A2 & DE 102004023187 A & CA 2563671 A	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/068920

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 19-21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 19 to 21 pertain to a diagnostic method to be practiced on a human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

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

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

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008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)

BIOSIS(STN), CPlus(STN), MEDLINE(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

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 請求の範囲の番号
A	S Robine, C Huet, R Moll, C Sahuquillo-Merino, E Coudrier, A Zweibaum, and D Louvard, Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?, Proc Natl Acad Sci USA, 1985, Vol. 82, No. 24, Page. 8488-8492, 全文	1-18
A	進士誠一, 田尻孝, 田中宣威, 古川清憲, 鈴木英之, 瀬谷知子, 菅隼人, 鶴田宏之, 松本智司, 寺西宣央, 張一光, 石渡俊行, 内藤善哉, 大腸低分化腺癌におけるCK20/CK7/Villinの発現, 第64回日本癌学会学術総会, 2005, Page. 397, 全文	1-18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 11. 2008

国際調査報告の発送日

25. 11. 2008

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 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

2 J

3 3 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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 請求の範囲の番号
A	井上準人, 松井啓夫, 天野英樹, 原英則, 吉村博邦, 蔣世旭, 龍華慎一郎, 片桐真人, 益田典幸, 肺癌患者血清中に認められた villin1 に対する自己抗体の有用性について, 第 48 回日本肺癌学会総会, 2007, Page. 532, 全文	1-18
A	丸尾猛, 吉田茂樹, 子宮頸がんと腫瘍マーカー, 産婦人科治療, 1999, Vol. 79, No. 6, Page. 653-660, 全文	1-18
A	石川光也, 藤井多久磨, 福地剛, 久布白兼行, 塚崎克己, 向井万起男, 野沢志朗, HPV 感染を指標とした子宮頸部腺癌における p16INK4a 蛋白質の過剰発現に関する検討, 第 61 回日本癌学会総会, 2002, Page. 383-384, 全文	1-18
A	野末彰子, 西出健, 新井ゆう子, 山田和美, 宮川創平, 3. 細胞診陰性であった浸潤性子宮頸部腺癌の症例, 第 22 回茨城医学会産婦人科分科会、第 128 回日産婦学会茨城地方部会例会, 2001, Page. 86, 全文	1-18
A	JP 2007-537197 A (ガニユメート・ファーマシューティカルズ・アクチェンゲゼルシャフト) 2007. 12. 20, 【0224】～【0229】& EP 1759013 A & WO 2005/110338 A2 & DE 102004023187 A & CA 2563671 A	1-18

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 19-21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲19-21は人体の診断方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。