(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5896568号
(P5896568)

(45)発行日　平成28年3月30日(2016.3.30)　(24)登録日　平成28年3月11日(2016.3.11)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	C
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61P 9/10	(2006.01)	A61K	39/395	N
A61P 13/12	(2006.01)	A61K	39/395	L
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	49/00	A

請求項の数 12　(全 57 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-542994 (P2012-542994)
(86)(22)出願日　平成23年11月8日 (2011.11.8)
(86)国際出願番号　PCT/JP2011/076132
(87)国際公開番号　WO2012/063955
(87)国際公開日　平成24年5月18日 (2012.5.18)
審査請求日　平成26年3月27日 (2014.3.27)
(31)優先権主張番号　特願2011-153862 (P2011-153862)
(32)優先日　平成23年7月12日 (2011.7.12)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2010-249876 (P2010-249876)
(32)優先日　平成22年11月8日 (2010.11.8)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　504258527
国立大学法人　鹿児島大学
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(72)発明者　鄭　忠和
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号
国立大学法人鹿児島大学内
(72)発明者　宮田　昌明
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号
国立大学法人鹿児島大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤、及び動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

葉酸受容体β（FRβ）に特異的に結合する抗体と細胞毒素又は細胞毒性剤とをコンジュゲートした複合体若しくは当該抗体を有効成分として含む、不安定プラークを有する活動性のある動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤。

【請求項２】

前記動脈硬化は、アテローム性粥状動脈硬化である、請求項１記載の治療剤。

【請求項３】

前記動脈硬化性疾患は、脳梗塞、脳出血、虚血性心疾患、大動脈瘤、大動脈解離、腎硬化症、腎不全及び閉塞性動脈硬化症からなる群から選ばれる一種であることを特徴とする請求項１記載の治療剤。

【請求項４】

前記複合体は、リコンビナントイムノトキシンである、請求項１記載の治療剤。

【請求項５】

前記抗体は、葉酸受容体αに結合しない、請求項１記載の治療剤。

【請求項６】

前記抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項１記載の治療剤。

【請求項７】

前記細胞毒素は、緑膿菌外毒素（Pseudomonas aeruginosa exotoxin）リシンＡ鎖(ricin A chain)、脱糖鎖リシンＡ鎖(deglycosylated ricin A chain)、リボゾーム不活性化タ

ンパク質(a ribosome inactivating protein)、アルファサルシン(alpha-sarcin)、ゲロニン(gelonin)、アスペルギリン(aspergillin)、リストリクトシン(restrictocin)、リボヌクレアーゼ(ribonuclease)、エポドフィロトキシン(epidophyllotoxin)、ジフテリアトキシン(diphtheria toxin)からなる群から選択されるものである、請求項１記載の治療剤。

【請求項８】

葉酸受容体β（FRβ）に特異的に結合する抗体を有効成分として含む、不安定プラークを有する活動性のある動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬。

【請求項９】

前記動脈硬化としてアテローム性粥状動脈硬化を診断することを特徴とする、請求項８記載の診断薬。

【請求項１０】

前記動脈硬化性疾患として脳梗塞、脳出血、虚血性心疾患、大動脈瘤、大動脈解離、腎硬化症、腎不全及び閉塞性動脈硬化症からなる群から選ばれる一種を診断することを特徴とする請求項８記載の診断薬。

【請求項１１】

前記抗体は、葉酸受容体αに結合しない、請求項８記載の診断薬。

【請求項１２】

前記抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項８記載の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、特に、アテロームプラーク（粥状硬化斑）に起因する動脈硬化の症状を改善する動脈硬化の治療剤及び動脈硬化に起因する各種疾患・症状（動脈硬化性疾患）を改善する動脈硬化性疾患の治療剤に関する。

【背景技術】

【０００２】

動脈硬化とは、動脈が肥厚し硬化した状態を意味しアテローム性粥状動脈硬化、細動脈硬化及び中膜硬化等に分類される。なかでもアテローム性粥状動脈硬化は、動脈の内壁に粥状（アテローム性）の隆起（プラーク）が発生することで、動脈が肥厚し硬化した状態を意味する。また、動脈硬化性疾患は、動脈硬化に起因する各種疾患を包含する。動脈硬化性疾患には、脳動脈における動脈硬化に起因する脳梗塞や脳出血、冠動脈における動脈硬化に起因する心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患、大動脈における動脈硬化に起因する大動脈瘤や大動脈解離、腎動脈における動脈硬化に起因する腎硬化症やそれによる腎不全並びに末梢動脈における動脈硬化に起因する閉塞性動脈硬化症等を挙げることができる。

現在のところ、動脈硬化や動脈硬化性疾患の治療に際して、粥状硬化斑を縮小或いは安定化させるといった薬効を有する治療薬はなく、危険因子（高脂血症、高血圧症、肥満、糖尿病）を改善することが優先される。また、動脈硬化の治療には、例えばカテーテルと呼ばれる細い管状の器具を血管から挿入して行う「カテーテル手術」、動脈硬化を生じた血管の迂廻路を作る「バイパス手術」等の外科的な方法も採用される。

また、動脈硬化の形成過程としては、血管内膜に侵入したＬＤＬが酸化変性を受け、マクロファージがスカベンジャー受容体を介して酸化ＬＤＬを取り込んで泡沫細胞化し、この泡沫細胞化したマクロファージの蓄積によりアテローム性のプラークが発生すると考えられている。

ところで、特許文献１には、がんの増殖や転移に関与する炎症反応において中心的な役割を担う「がん組織に局在するがん関連マクロファージ」を標的とした固形がん治療剤が開示されている。また、特許文献１には、固形がん治療剤の一例として葉酸受容体β（ＦＲβ）に結合する抗体と細胞毒素又は細胞毒性剤とをコンジュゲートした複合体を使用することが開示されている。これは、がん組織に局在するがん関連マクロファージにＦＲβ

が発現しており、正常部位にはＦＲβが殆ど発現していないという知見に基づいている。
また、特許文献２、非特許文献１、２及び３には、抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体の抗原認識部位遺伝子と遺伝子改変型の緑膿菌外毒素（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ ｅｘｏｔｏｘｉｎ）遺伝子とを融合させたリコンビナントタイプイムノトキシンを作製し、ＳＣＩＤマウス－関節リウマチ滑膜移植モデルにおいて、該イムノトキシンによるＦＲβ発現マクロファージの選択除去が、関節リウマチの治療に有効であることや、関節リウマチに見られるマクロファージから破骨細胞への分化や血管新生を抑制することが報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００３】

【特許文献１】特開２０１０－０７７０２６号公報

【特許文献２】国際公開第ＷＯ ２００５／１０３２５０

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Ｎａｋａｓｈｉｍａ－Ｍａｔｓｕｓｈｉｔａ Ｎ, Ｈｏｍｍａ Ｔ, Ｙｕ Ｓ, Ｍａｔｓｕｄａ Ｔ, Ｓｕｎａｈａｒａ Ｎ, Ｎａｋａｍｕｒａ Ｔ, Ｔｓｕｋａｎｏ Ｍ, Ｒａｔｎａｍ Ｍ, Ｍａｔｓｕｙａｍａ Ｔ. Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｆｏｌａｔｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｂｅｔａ ａｎｄ ｉｔｓ ｐｏｓｓｉｂｌｅ ｒｏｌｅ ｉｎ ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ ｔｒａｎｓｐｏｒｔ ｉｎ ｓｙｎｏｖｉａｌ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ ｆｒｏｍ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ. Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ. １９９９ Ａｕｇ；４２（８）：１６０９－１６.

【非特許文献２】Ｎａｇａｙｏｓｈｉ Ｒ, Ｎａｇａｉ Ｔ, Ｍａｔｓｕｓｈｉｔａ Ｋ, Ｓａｔｏ Ｋ, Ｓｕｎａｈａｒａ Ｎ, Ｍａｔｓｕｄａ Ｔ, Ｎａｋａｍｕｒａ Ｔ, Ｋｏｍｉｙａ Ｓ, Ｏｎｄａ Ｍ, Ｍａｔｓｕｙａｍａ Ｔ. Ｅｆｆｅｃｔｉｖｅｎｅｓｓ ｏｆ ａｎｔｉ－ｆｏｌａｔｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｂｅｔａ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｔｒｕｎｃａｔｅｄ Ｐｓｕｅｄｏｍｏｎａｓ ｅｘｏｔｏｘｉｎ ｉｎ ｔｈｅ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ｓｙｎｏｖｉａｌ ｍａｃｒｏｐａｈｇｅｓ. Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ. ２００５ Ｓｅｐ；５２（９）：２６６６－７５.

【非特許文献３】Ｎａｇａｉ Ｔ, Ｔａｎａｋａ Ｍ, Ｔｓｕｎｅｙｏｓｈｉ Ｙ, Ｍａｔｓｕｓｈｉｔａ Ｋ, Ｓｕｎａｈａｒａ Ｎ, Ｍａｔｓｕｄａ Ｔ, Ｙｏｓｈｉｄａ Ｈ, Ｋｏｍｉｙａ Ｓ, Ｏｎｄａ Ｍ, Ｍａｔｓｕｙａｍａ Ｔ. Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｏｆ ａ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｉｍｍｕｎｏｔｏｘｉｎ ａｇａｉｎｓｔ ｆｏｌａｔｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｂｅｔａ ｏｎ ｔｈｅ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ａｎｄ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ｓｙｎｏｖｉａｌ ｃｅｌｌｓ. Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ. ２００６ Ｏｃｔ；５４（１０）：３１２６－３４.

【発明の概要】

【０００５】

そこで、本発明は、上述したような実情に鑑み、動脈硬化巣を縮小するような薬理メカニズムによって動脈硬化や動脈硬化症を改善することができる、動脈硬化の治療剤及び動脈硬化症の治療剤を提供することを目的とする。また、本発明は、葉酸受容体β（ＦＲβ）を指標として動脈硬化巣を検出する動脈硬化又は動脈硬化症の診断薬剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージにＦＲβが発現していること及び活性化マクロファージを標的することで動脈硬化巣を縮小或いは安定化できることを見いだし、本発明を完成するに至った。

本発明は以下を包含する。

（１）葉酸受容体β（ＦＲβ）に結合する抗体と細胞毒素又は細胞毒性剤とをコンジュゲートした複合体若しくは当該抗体を有効成分として含む、動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤。
（２）葉酸受容体β（ＦＲβ）に結合する抗体を有効成分として含む、動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬。
本発明において前記動脈硬化としてはアテローム性粥状動脈硬化を挙げることができる。また、本発明において前記動脈硬化性疾患としては、脳梗塞、脳出血、虚血性心疾患、大動脈瘤、大動脈解離、腎硬化症、腎不全及び閉塞性動脈硬化症からなる群から選ばれる一種を挙げることができる。
本発明に係る治療剤において、前記複合体はリコンビナントイムノトキシンとすることができる。本発明に係る治療剤において、前記細胞毒素は、緑膿菌外毒素（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ　ｅｘｏｔｏｘｉｎ）リシンA鎖（ｒｉｃｉｎ　Ａ　ｃｈａｉｎ）、脱糖鎖リシンA鎖（ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ　ｒｉｃｉｎ　Ａ　ｃｈａｉｎ）、リボゾーム不活性化タンパク質（ａ　ｒｉｂｏｓｏｍｅ　ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）、アルファサルシン（ａｌｐｈａ－ｓａｒｃｉｎ）、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、アスペルギリン（ａｓｐｅｒｇｉｌｌｉｎ）、リストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、リボヌクレアーゼ（ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ）、エポドフィロトキシン（ｅｐｉｄｏｐｈｙｌｌｏｔｏｘｉｎ）、ジフテリアトキシン（ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ　ｔｏｘｉｎ）からなる群から選択されるものとすることができる。
本発明において前記抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体とすることができる。本発明において前記抗体は、葉酸受容体αに結合しないことが好ましい。より具体的に、前記抗体は、配列番号１又は２に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号１又は２に示すアミノ酸配列の７以上の連続アミノ酸からなるその部分ペプチド、に対して誘起されたものであることが好ましい。なお、前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、それらの抗体フラグメント、又は組換え抗体のいずれであっても良い。より具体的に、前記抗体は、抗ヒト葉酸受容体βマウスモノクローナル抗体又は抗マウス葉酸受容体βラットモノクローナル抗体のいずれかの重鎖（Ｈ鎖）可変領域及び／又は軽鎖（Ｌ鎖）可変領域の各アミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むことが好ましい。
例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。
（ａ）配列番号３に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号３に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号３に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号３に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。
（ａ）配列番号４に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号４に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号４に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｄ）配列番号４に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。

（ａ）配列番号５に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号５に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）配列番号５に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｄ）配列番号５に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。

（ａ）配列番号６に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号６に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）配列番号６に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｄ）配列番号６に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。

（ａ）配列番号７に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号７に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）配列番号７に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｄ）配列番号７に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。

（ａ）配列番号８に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号８に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）配列番号８に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｄ）配列番号８に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレ

オチド。
例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。
（ａ）配列番号９に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号９に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号９に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号９に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
例えば、前記抗体は、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含むものを挙げることができる。
（ａ）配列番号１０に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号１０に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号１０に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号１０に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
例えば、前記抗体は、配列番号１１に示すポリペプチドからなるＨ鎖と、配列番号１２に示すポリペプチドからなるＬ鎖との一本鎖又は二本鎖抗体とすることができる。
例えば、前記抗体は、配列番号１３に示すポリペプチドからなるＨ鎖と、配列番号１４に示すポリペプチドからなるＬ鎖との一本鎖又は二本鎖抗体とすることができる。
本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願２０１０－２４９８７６号、２０１１－１５３８６２号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。
【図面の簡単な説明】
【０００６】
図１は、ＡｐｏＥノックアウトマウス免疫化学染色の結果を示す写真であり、（ａ）は抗マウスＦＲβマウスモノクローナル抗体により染色した結果を示し、（ｂ）は抗マウスマクロファージマーカーモノクローナル抗体により染色した結果を示している。
図２は、免疫化学染色の結果を示す写真であり、（ａ）はイムノトキシン投与群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果であり、（ｂ）はコントロール群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果であり、（ｃ）は偽薬投与群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果であり、（ｄ）は抗体投与群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果である。
図３は、イムノトキシン投与群、コントロール群、偽薬投与群及び抗体投与群について動脈硬化病変を定量した結果を示す特性図である。
図４は、イムノトキシン投与群、コントロール群、偽薬投与群及び抗体投与群について末梢血単核球を測定した結果を示す特性図である。
図５は、イムノトキシン投与群、コントロール群、偽薬投与群及び抗体投与群について血中総コレステロール値を測定した結果を示す特性図である。
図６－１は、イムノトキシン投与群、コントロール群、偽薬投与群及び抗体投与群について、投与終了後２８日目に得たマウスにおける動脈硬化病変の免疫染色結果を示す写真であり、（ａ）はコントロール群の免疫染色結果であり、（ｂ）はイムノトキシン投与群

の免疫染色結果である。

図６－２は、イムノトキシン投与群、コントロール群、偽薬投与群及び抗体投与群について、投与終了後２８日目に得たマウスにおける動脈硬化病変の免疫染色結果を示す写真であり、（ｃ）は偽薬投与群の免疫染色結果であり、（ｄ）は抗体投与群の免疫染色結果である。

図７は、イムノトキシン投与群、コントロール群、偽薬投与群及び抗体投与群について、投与終了後２８日目に得たマウスにおける大動脈弁基部の動脈硬化病変巣のＦＲβ発現細胞数を計測した結果を示す特性図である。

図８は、ヒト頸動脈組織の免疫化学染色の結果を示す写真である。

図９は、蛍光標識を用いた分子イメージングにより、動脈硬化巣（動脈硬化病変部位）を検出した結果を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【０００７】

以下、本発明に係る動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤及び診断薬について詳細に説明する。

本発明の治療剤は、葉酸受容体β（ＦＲβ）に結合する抗体と細胞毒素又は細胞毒性剤とをコンジュゲートした複合体若しくは当該抗体を有効成分として含むことに特徴がある。すなわち、本発明の治療剤は、上記複合体及び上記抗体のいずれか一方又は両方を有効成分として含んでいる。また、本発明の診断薬は、葉酸受容体β（ＦＲβ）に結合する抗体を有効成分として含むことに特徴がある。本明細書で使用される「葉酸受容体β」又は「ＦＲβ」は、哺乳動物の動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージの細胞表面に発現される受容体タンパク質を意味する。哺乳動物には、ヒトを含む霊長類、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジなどの家畜動物、イヌ、ネコなどのペット動物などが含まれる。好ましい哺乳動物はヒトである。

本明細書で使用される「葉酸受容体β（ＦＲβ）に結合する抗体」は、ＦＲβタンパク質を認識して該タンパク質に結合することができる抗体であり、以下に述べるように、該抗体は、無傷の抗体であってもよいし、あるいは、活性化マクロファージとの結合親和性を有する限り、抗体フラグメントや合成抗体（例えば組換え抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体など）であってもよい。これらの抗体はまた、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージ以外の細胞の表面にＦＲβを発現するような場合には、活性化マクロファージ及び当該細胞の両方に結合することを可能にする。抗体をヒトに対して使用する場合、好ましい抗体はヒト抗体又はヒト化抗体である。

本明細書で使用する「細胞毒素」又は「細胞毒性剤」は、活性化マクロファージを死滅させる又は障害する能力をもつ任意の物質を指す。

１　抗体

本発明において、上記抗体は、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージのＦＲβに特異的に結合するものである。ここで、「特異的」とは、上記抗体が上記マクロファージのＦＲβと免疫学的反応により結合するが、ＦＲβ又はそれと８０％以上の配列同一性をもつタンパク質以外のタンパク質とは実質的に結合しないことを意味する。この点で、上記抗体は、ＦＲのアイソフォームの１つであるＦＲα（例えばヒトＦＲαはヒトＦＲβとの間に約７０％のアミノ酸配列同一性がある（特表２００８－５００００２５））と結合しないことが望ましい。

本発明で使用可能な抗体は、抗原であるＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドに結合可能な抗体分子全体又はそのフラグメントである。部分ペプチドは、５以上、好ましくは７以上、より好ましくは８以上の連続アミノ酸を有する。一般に、抗原性エピトープ又は抗原決定基は、約５～約１０アミノ酸からなり、かつ連続的アミノ酸配列又は不連続的アミノ酸配列を有する。

本発明の抗体は、ＦＲβと結合する、好ましくは特異的に結合する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、それらの抗体フラグメントのいずれであってもよい。

本発明の抗体はまた、いずれの免疫グロブリン（ＩｇＧ）クラス（ＩｇＡ，ＩｇＧ，ＩｇＥ，ＩｇＤ，ＩｇＭなど）及びサブクラス（ＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，ＩｇＧ４，ＩｇＡ１，ＩｇＡ２など）のものであってもよい。また、免疫グロブリンの軽鎖は、κ又はλのいずれであってもよい。

本発明の抗体フラグメントは、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）$_2$、Ｆｖ、重鎖モノマー又はダイマー、軽鎖モノマー又はダイマー、１つの重鎖と１つの軽鎖からなるダイマーなどを含む。このようなフラグメントの作製方法は当該技術分野で公知であり、例えばパパイン、ペプシン等のプロテアーゼによる抗体分子の消化、或いは公知の遺伝子工学的手法により得ることができる。

本発明の抗体はまた、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などであってもよい。組換え抗体には、例えば一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、二重特異性抗体などが含まれる。二重特異性抗体は、２つの異なる結合特異性を有する抗体を指し、例えばｄｉａｂｏｄｙ、ＳｃＤｂ（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｄｉａｂｏｄｙ），ｄｓＦｖ－ｄｓＦｖなどが含まれる（浅野竜太郎，生化学７７（１２）１４９７－１５００，２００５参照）。

以下、本発明において使用するための抗体の作製方法について詳述する。

本発明において使用可能な抗体を作製するにあたり、最初に免疫原（抗原）として使用するタンパク質、すなわちＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを調製する。ここで部分ペプチドは、５以上、好ましくは７以上の連続アミノ酸からなる配列を有するものである。免疫原として使用することができるＦＲβタンパク質の由来は、標的とするＦＲβと特異的に結合することができる抗体を誘起できるものであるものであれば特に限定されず、例えばヒト、マウス等の哺乳動物に由来するＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを免疫原として使用する。本発明では、免疫原として、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるヒトＦＲβタンパク質又はその部分ペプチド、あるいは配列番号２に示すアミノ酸配列からなるマウスＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを使用することができる。免疫原として、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるヒトＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを使用することが特に好ましい。

かかるＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドは、ＦＲβのアミノ酸配列情報（例えば配列番号１など）に基づき、当該技術分野で公知の手法、例えば固相ペプチド合成法などにより調製することができる。ヒトを含む他の哺乳動物由来のＦＲβの配列情報は、例えばＧｅｎＢａｎｋ（ＮＣＢＩ、米国）、ＥＭＢＬ（ＥＢＩ、欧州）などから入手可能である。

あるいは、遺伝子組換え手法を利用して、ＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを生産することも可能である。簡単に説明すると、ＦＲβタンパク質をコードするＤＮＡの配列を適当なタンパク質産生用ベクターに連結し、標的ＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドが発現し得るように宿主中に導入し、該宿主中でＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを生産することができる。この手法は当業者に周知であり、この場合に採用するベクター、宿主細胞、形質転換方法、培養方法、標的タンパク質の精製方法は、当業者が適宜選択することができる。遺伝子組換え手法については、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ａｕｓｕｂｅｌら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（１９９８）などを参照することができる。

上記のようにして調製したＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを免疫原として、本発明の抗体を製造することができる。あるいは、標的ＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドをコードするＤＮＡを組み込んだ発現ベクター、或いは該タンパク質又はその部分ペプチドを発現する哺乳動物細胞を免疫原として使用して、本発明の抗体を製造してもよい。

本発明のポリクローナル抗体は、上記のようにして作製した免疫原を、哺乳動物、例えばウサギ、ラット、マウスなどに免疫して、抗血清を得ることによって製造することがで

きる。具体的には、上記免疫原を、必要に応じて免疫原性を高めるためのアジュバントと共に、哺乳動物に静脈内、皮下又は腹腔内投与する。アジュバントとしては、市販の完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム、ミョウバン（Ａｌｕｍ）、ムラミルペプチド（細菌細胞壁関連ペプチドの一種）等を使用することができる。その後、数日から数週間の間隔で、１～７回の免疫を行い、最後の免疫日から１～７日後に、ＥＬＩＳＡ等の酵素免疫測定法などによって抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血して抗血清を得る。このようにして取得した抗血清は、そのまま使用してもよいし、ＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを固定化したカラムで１回又は数回精製処理を行った後に使用してもよい。

本発明で使用可能なモノクローナル抗体は、以下のようにして作製することができる。すなわち、上記のようにして免疫感作した哺乳動物から得た抗体産生細胞（例えば脾臓由来リンパ球細胞、リンパ系細胞など）と自己抗体産生能のないミエローマ細胞からハイブリドーマを調製し、ハイブリドーマをクローン化し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造することができる。かかるハイブリドーマの製造方法は当該技術分野で周知であり、例えばＫｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎら（Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６：４９５－９６）の方法に準じて行うことができる。

本発明のモノクローナル抗体の例として、ヒトＦＲ－β発現細胞により免疫されたマウスの脾細胞と、マウスミエローマ細胞とを融合させることにより得られたマウス－マウスハイブリドーマクローン３６ｂ又はクローン９４ｂが産生するモノクローナル抗体等を挙げることができる。

また本発明のモノクローナル抗体の他の例として、マウスＦＲ－β発現細胞により免疫されたラットの脾細胞と、ラットミエローマ細胞とを融合させることにより得られたラット－ラットハイブリドーマクローンＣＬ５又はクローンＣＬ１０が産生するモノクローナル抗体等を挙げることができる。

本発明は、上記のようにして作製したハイブリドーマが有する核酸であって、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のＨ鎖又はＬ鎖を含む抗体をコードする遺伝子を包含する。これらの核酸はハイブリドーマから通常の遺伝子工学的手法により得ることができ、またその塩基配列も公知の塩基配列決定法により決定することができる。例として、マウス－マウスハイブリドーマクローン３６ｂ細胞が産生するモノクローナル抗体のＨ鎖可変領域遺伝子及びＬ鎖可変領域遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列番号３及び４に、マウス－マウスハイブリドーマクローン９４ｂ細胞が産生するモノクローナル抗体のＨ鎖可変領域遺伝子及びＬ鎖可変領域遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列番号５及び６に示す。また他の例として、ラット－ラットハイブリドーマクローンＣＬ５が産生するモノクローナル抗体のＨ鎖可変領域遺伝子及びＬ鎖可変領域遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列番号７及び８に、ラット－ラットハイブリドーマクローンＣＬ１０が産生するモノクローナル抗体のＨ鎖可変領域遺伝子及びＬ鎖可変領域遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列番号９及び１０に示す。

本発明は、上記のようにして作製したハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のＨ鎖可変領域遺伝子（例えば配列番号３、５、７、９）、Ｌ鎖可変領域遺伝子（例えば配列番号４、６、８、１０）に制限されず、これらの遺伝子の変異体を包含する。かかる変異体としては例えば以下のものを挙げることができる。

（ｉ）上記Ｈ鎖又はＬ鎖可変領域遺伝子において、１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を有し、かつＦＲβに結合する同等もしくは同質の生物学的活性を有するタンパク質をコードする変異体；（ｉｉ）上記Ｈ鎖可変領域コード核酸又はＬ鎖可変領域コード核酸と実質的に同一の塩基配列を有し、かつＦＲβに結合する同等もしくは同質の生物学的活性を有するタンパク質をコードする変異体；及び（ｉｉｉ）上記Ｈ鎖可変領域コード核酸又はＬ鎖可変領域コード核酸の相補的配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する同等もしくは同質の生物学的活性を有するタンパク質をコードする変異体。

本発明のＨ鎖及びＬ鎖可変領域遺伝子の関連で使用する「数個」という用語は、１～２０個、好ましくは１～１５個、より好ましくは１～１０個を指す。

本発明のＨ鎖及びＬ鎖可変領域遺伝子の関連で使用する「実質的に同一」とは、上記のようにして作製したハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のＨ鎖可変領域遺伝子（例えば配列番号３、５、７、９）、Ｌ鎖可変領域遺伝子（例えば配列番号４、６、８、１０）と、少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の同一性を有することを意味する。なお、２つの配列間の同一性％は、配列が共有する同一な位置の数の関数である（すなわち、同一性％＝同一な位置の数／位置（例えば、一部重複する位置）の総数ｘ１００）。

２つの配列間の同一性％の決定は、例えばカーリン（Ｋａｒｌｉｎ）及びアルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ）（１９９３）（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：５８７３－５８７７）において改変されたカーリン及びアルトシュール（１９９０）（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：２２６４）のアルゴリズムを用いて行うことができる。この種のアルゴリズムは、アルトシュールら（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３のＮＢＬＡＳＴ及びＸＢＬＡＳＴプログラムに組み込まれている。また、比較用のギャップが入ったアライメントを得るためには、アルトシュールら（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９に記載されたＧａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを用いるとよい。または、分子間の遠隔的な関連を検出する反復検索を行うためにＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを用いることもできる。ＢＬＡＳＴ、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ及びＰＳＩ－ＢＬＡＳＴプログラムを用いる際には、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴ及びＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメーターを使用することができる（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ．参照）。配列比較のために使用できるアルゴリズムのその他の好ましい例として、例えばマイヤーズ（Ｍｙｅｒｓ）及びミラー（Ｍｉｌｌｅｒ）（１９８８）、ＣＡＢＩＯＳ ４：１１－１７のアルゴリズムである。この種のアルゴリズムは、ＧＣＧ配列整列化ソフトウェアパッケージの一部であるＡＬＩＧＮプログラム（ｖｅｒｓｉｏｎ２．０）に組み込まれている。

本明細書において使用する「ストリンジェントな条件」とは、これに限定されるものではないが、例えば３０℃～５０℃で、３～４×ＳＳＣ（１５０ｍＭ塩化ナトリウム、１５ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ７．２）、０．１～０．５％ＳＤＳ中で１～２４時間のハイブリダイゼーション、より好ましくは４０℃～４５℃で、３．４×ＳＳＣ、０．３％ＳＤＳ中で１～２４時間のハイブリダイゼーション、そしてその後の洗浄を含む。洗浄条件としては、例えば、２×ＳＳＣと０．１％ＳＤＳを含む溶液、および１×ＳＳＣ溶液、０．２×ＳＳＣ溶液による室温での連続した洗浄などの条件を挙げることができる。ただし、上記条件の組み合わせは例示であり、当業者であればハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記の又は他の要素（例えば、ハイブリダーゼーションプローブの濃度、長さ及びＧＣ含量、ハイブリダイゼーションの反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

本明細書において「同等」とは、例えばＦＲβ抗原に対する結合特異性、結合親和性といった生物学的な活性が実質的に同一であることを指す。またこの用語は、実質的に同質の活性を有する場合を含んでもよく、ここでいう「同質」の活性とは、ＦＲβ抗原に対する特異的結合性といった活性の性質が同一であること、或いは生理的性質、薬理的性質、又は生物学的性質が同一であることをいう。

これらのハイブリダイゼーションにおける「ストリンジェントな条件」の他の例については、例えばＳａｍｂｒｏｏｋら（上記）、Ａｕｓｕｂｅｌら（上記）などに記載されており、これらの条件を本発明に使用してもよい。

上記変異体は、天然に生じたものであってもよいし、人為的に変異を導入したものであってもよい。人為的な変異の導入は、例えば部位特異的変異導入法（Ｓｉｔｅｓｐｅｃｉｆｉｃ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）を用いて常法により導入することができる（Ｐｒｏｃ

Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ.，１９８４ ８１：５６６２；Ｓａｍｂｒｏｏｋら（上記））。

本発明では、上記のように作製したハイブリドーマに基づき、遺伝子組換え技術を用いて組換え抗体を作製することもできる。具体的には、作製したハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞といった宿主に導入して、宿主において組換え抗体を生産させることができる（Ｐ．Ｊ．Ｄｅｌｖｅｓ．，ＡＮＴＩＢＯＤＹ ＰＲＯＤＵＣＴＩＯＮ ＥＳＳＥＮＴＩＡＬ ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ．，１９９７ ＷＩＬＥＹ、Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ ａｎｄ Ｃ．Ｄｅａｎ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．，２００ ＯＸＦＯＲＤ ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ ＰＲＥＳＳ，Ｊ．Ｗ．Ｇｏｄｉｎｇ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ．，１９９３ ＡＣＡＤＥＭＩＣ ＰＲＥＳＳ）。

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなマウス、ウシ、ヤギ、ヒツジ又はブタを作製し、ＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドを抗原として免疫したのち、そのトランスジェニック動物の血液、ミルク中などからその抗体遺伝子に由来する抗体を大量に取得することも可能である。また、上記トランスジェニック動物のなかには、内因性抗体遺伝子を欠失したかつヒト抗体遺伝子を保有するマウスやウシなどのヒト抗体産生動物も知られているので、このような動物を利用する場合には、ヒトＦＲβに結合する完全ヒト抗体を得ることができる（例えば国際公開ＷＯ ９６／９６３４０９６、ＷＯ ９６／３３７３５、ＷＯ９８／２４８９３など）。さらにまた、当該動物の抗体産生細胞（例えばＢ細胞）とミエローマ細胞から作製したハイブリドーマをｉｎ ｖｉｔｒｏで培養する場合には、上記のような手法で、モノクローナル抗体を産生することもできる。このとき、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々の条件に応じて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地又は既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

産生されたモノクローナル抗体は、当該技術分野において周知の方法、例えばプロテインＡあるいはプロテインＧカラムによるクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、硫安塩析法、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより精製することができる。

本発明で使用可能な抗体はまた、キメラ抗体であることができる。本発明のキメラ抗体は、例えばＭｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８１：６８５１－６８５５；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｎａｔｕｒｅ，３１２：６０４－６０８；Ｔａｋｅｄａ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ，３１４：４５２－４５４に記載される技術を用いて製造することができる。これらの技術では、適当な抗原特異性を有するマウス抗体分子からの遺伝子を適当な生物学的活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子と共にスプライシングする。キメラ抗体は、異なる動物種に由来する異なる部分が存在する分子である。キメラ抗体として、例えば、抗ＦＲβマウス又はラットモノクローナル抗体のＨ鎖及び／又はＬ鎖可変領域と他の哺乳動物由来の免疫グロブリン定常領域とを有する抗体を挙げることができる。

本発明においてはまた、例えばマウス又はラットｍＡｂ由来の可変領域又は超可変領域を含む可変領域の一部と、ヒト免疫グロブリンの定常領域、又はヒト免疫グロブリンの可変領域の一部及び定常領域、とを有する抗体、例えば「ヒト化抗体」を挙げることができる。ヒト化抗体の場合、マウス由来の抗体領域部分は約１０％未満が望ましい。

上記ヒト化抗体は、例えば抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体（又は抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体）のＨ鎖可変領域及び／又はＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、２及び３）を含むアミノ酸配列を含むことができる。さらに具体的には、以下の抗体を例示することができる。

（１）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号３に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号３に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号３に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号３に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（２）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号４に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号４に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号４に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号４に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（３）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号５に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号５に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号５に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号５に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（４）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号６に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号６に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号６に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号６に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（５）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含

むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号７に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号７に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号７に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号７に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（６）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号８に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号８に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号８に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号８に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（７）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＨ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号９に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号９に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号９に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号９に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（８）以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）に示すポリヌクレオチドによりコードされるＬ鎖可変領域のアミノ酸配列中の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を含む抗体：
（ａ）配列番号１０に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号１０に示す塩基配列において１個～数個の塩基の欠失、置換、付加又は挿入を含み、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号１０に示す塩基配列と少なくとも９０％の配列同一性を有し、かつＦＲβに結合するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
（ｄ）配列番号１０に示す塩基配列の相補的配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＦＲβに結合する生物学的活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

上記マウスドナー配列に適するヒトアクセプター抗体配列は、マウス可変領域のアミノ酸配列の既知のヒト抗体のＨ鎖又はＬ鎖の配列とのコンピュータ比較によって同定されうる。そのフレームワーク配列がマウスＬ鎖可変領域及びＨ鎖可変領域のフレームワーク領域と高い配列同一性を表すヒト抗体からの可変ドメインは、マウスフレームワーク配列を

用いてＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴ（米国）を利用するＫａｂａｔデータベースに照会することによって同定することができる。このとき、マウスドナー配列と８０％以上、好ましくは９０％以上の配列の同一性を共有するアクセプター配列を選択することができる。ラットドナー配列についても同様に、それに適するヒトアクセプター抗体配列を同定することができる。

このようにして同定されたヒトアクセプター抗体Ｈ鎖及びＬ鎖配列をコードする塩基配列をベースにして、その可変領域の一部をマウス抗体のものと置換するように組換えを行う。得られたヒト／マウスキメラＨ鎖及びＬ鎖をコードするＤＮＡを発現ベクターに組込み、適当な宿主細胞に形質転換することによって、ヒト化抗体をクローン化、産生することができる。

上記のようなキメラ抗体、ヒト化抗体は、ヒトへの適用に際し、抗原性を低減できるという利点を有する。

本発明の抗体はまた、例えば米国特許第４，９４６，７７８号；Ｂｉｒｄ，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６；Ｈｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：５８７９－５８８３；Ｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ　３３４：５４４－５４６に記載される技術を用いて作製した、ＦＲβタンパク質又はその部分ペプチドに対する一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）であってもよい。本発明の一本鎖抗体は、例えば本発明のモノクローナル抗体のＨ鎖可変領域（例えば配列番号３、５、７、９）及びＬ鎖可変領域遺伝子（例えば配列番号４、６、８、１０）の配列情報に基づき、常法に従ってそれぞれＨ鎖フラグメントとＬ鎖フラグメントを調製し、アミノ酸架橋によってＦｖ領域のＨ鎖フラグメントとＬ鎖フラグメントとを連結し、一本鎖のポリペプチドを得ることにより形成することができる。

２．複合体

本発明の治療剤の有効成分としての複合体は、上記１．に説明した、活性化マクロファージの表面に発現する分子標的としてのＦＲβと結合する抗体と、該マクロファージ（及び場合により、その他の細胞）の細胞死を引き起こす細胞毒素又は細胞毒性剤とから基本的に構成される。

ここで、細胞死は、細胞の死滅、殺傷又は障害を意味し、細胞毒素又は細胞毒性剤によって引き起こされる。細胞毒素は、いわゆるトキシンとも呼ばれるタンパク質であるのに対して、細胞毒性剤は、低分子量の化学療法剤であり、前者には、微生物、特に細菌由来のトキシンが含まれ、一方、後者には、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、分子標的薬、植物アルカロイド、ホルモン剤などが含まれる。

本発明の複合体が上記抗体と細胞毒素からなるとき、これらの成分は融合タンパク質の形態をとることができる。この場合、細胞毒素は、好ましくは抗体タンパク質のＣ末端に、必要に応じてリンカー（例えばペプチド）を介して、結合することができる。一方、本発明の複合体が上記抗体と細胞毒性剤からなるとき、これらの成分は、結合のための官能基を介して共有結合又は非共有結合によって結合することができる。

本発明によれば、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージを認識し、当該活性化マクロファージに対して細胞死を誘発することができ、その結果として、動脈硬化巣を退縮することができる。

２．１　細胞毒素又は細胞毒性剤

本発明に使用することができる細胞毒は、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージの細胞死を誘導する目的で使用することができる任意の細胞毒素であり、例えば緑膿菌外毒素（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ　ｅｘｏｔｏｘｉｎ）、リシンＡ鎖（ｒｉｃｉｎ　Ａ　ｃｈａｉｎ）、脱糖鎖リシンＡ鎖（ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ　ｒｉｃｉｎ　Ａ　ｃｈａｉｎ）、リボゾーム不活性化タンパク質（ａ　ｒｉｂｏｓｏｍｅ　ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）、アルファサルシン（ａｌｐｈａ－ｓａｒｃｉｎ）、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、アスペルギリン（ａｓｐｅｒｇｉｌｌｉｎ）、リストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、リボヌクレアーゼ（ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ）、エポドフィロトキシン（ｅｐｉｄｏｐｈｙｌｌｏｔｏｘｉｎ）、ジフテ

リアトキシン（ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ　ｔｏｘｉｎ）などを挙げることができる。本発明においては、特に、緑膿菌外毒素を使用することが好ましい。

あるいは、本発明に使用することができる細胞毒性剤は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、分子標的薬、植物アルカロイド、ホルモン剤などから適宜選択可能である。

２．２　リコンビナントイムノトキシンなどの複合体

本発明の複合体の１つであるリコンビナントイムノトキシンを作製するために、上記のようにして作製された本発明の抗体又はその部分ペプチドは細胞毒素とコンジュゲートされる。すなわち、本発明に係るリコンビナントイムノトキシンとは、標的（すなわちＦＲβタンパク質）に結合する本発明の上記抗体が、細胞毒素又はそのサブユニットにコンジュゲートされたキメラ分子である。本発明においては、植物や細菌等に由来する細胞毒素、ヒト起源の細胞毒素、合成の細胞毒素を使用することができる。

本発明の抗体と細胞毒素とのコンジュゲートは、以下のようにして行うことができる。すなわち、抗体分子中の反応性基（例えばアミノ基、カルボキシル基、水酸基等）を利用し、該反応性基と反応しうる官能基をもつ細胞毒と該抗体とを接触させることによって、本発明のリコンビナントイムノトキシンを得ることができる。あるいは、本発明の抗体のＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号３、５、７、９）及びＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号４、６、８、１０）の配列情報に基づき、遺伝子工学的手法により、Ｈ鎖フラグメント又はＬ鎖フラグメントのいずれかを細胞毒素との融合タンパク質として作製し、細胞毒素と融合していない他方のフラグメントと一緒に、ＳＨ結合を介して一本鎖抗体又は二本鎖抗体を形成させることによって、本発明のリコンビナントタンパク質を作製してもよい。ＳＨ結合を介したＨ鎖フラグメントとＬ鎖フラグメントの結合は、βメルカプトエタノールやジチオスレイトールなどの還元剤などによってメルカプト基（－ＳＨ基）を露出後、両者を混和することによって達成することができる。

本発明のリコンビナントイムノトキシンの一例として、それぞれ上記マウス－マウスハイブリドーマクローン３６ｂ細胞又はクローン９４ｂが産生するモノクローナル抗体と緑膿菌外毒素とのリコンビナントイムノトキシンであるリコンビナントイムノトキシンが挙げられる。マウス－マウスハイブリドーマクローン３６ｂと緑膿菌害毒外のリコンビナントイムノトキシンは、例えば配列番号１１に示すポリペプチドからなるＨ鎖と、配列番号１２に示すポリペプチドからなるＬ鎖との一本鎖又は二本鎖抗体である。またマウス－マウスハイブリドーマクローン９４ｂが産生するモノクローナル抗体と緑膿菌外毒素とのリコンビナントイムノトキシンは、例えば配列番号１３に示すポリペプチドからなるＨ鎖と、配列番号１４に示すポリペプチドからなるＬ鎖との一本鎖又は二本鎖抗体である。

本発明の複合体のもう１つの例は、上記のＦＲβに結合する抗体と細胞毒性剤との結合体である。一般に、抗体の定常領域、好ましくはＣ末端側に細胞毒性剤を結合することができる。結合は、抗体蛋白質のＮＨ２基、ＳＨ基、ＯＨ基、ＣＯＯＨ基などを利用し、これと反応性の官能基をもつ細胞毒性剤とを、場合により例えば炭化水素リンカーを介して、化学的に結合することによって実施できる。

３　治療剤

以上で説明した本発明の抗体若しくは本発明の複合体は、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージに特異的に高発現しているＦＲβを標的とし、当該マクロファージの細胞死を誘導することができる。このように、本発明の抗体若しくは本発明のリコンビナントイムノトキシン等の複合体は、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージを有意に減少させることで、動脈硬化巣を退縮することができる。より具体的には、本発明の抗体若しくは本発明のリコンビナントイムノトキシン等の複合体を動脈硬化巣に作用させることで、アテローム性プラークを退縮させる動脈の肥厚及び硬化を正常な状態に近づけることができる。

本発明の抗体若しくは本発明の複合体は、これを有効成分として含む動脈硬化の治療剤若しくは動脈硬化性疾患の治療剤として製剤化される。すなわち、本発明に係る治療剤は、治療上有効量の複合体若しくは本発明の抗体を含むものである。ここで、「治療上有効量」とは、所与の症状や用法について治療効果を与え得る量を指し、動脈硬化及び／又は

動脈硬化性疾患の治療対象の性別、年齢、体重、疾患の重篤度、投与経路など様々な要因に応じて変化する。例えば、所与の用法に従って、６０ｋｇの成人に、本発明の複合体が１日当たり３０μｇ以上、好ましくは４０μｇ以上の量で投与される量を治療上有効量として含むことができる。

本発明に係る治療剤は、本発明の抗体若しくは本発明の複合体に加えて、生理学的に許容し得る製薬上の添加物、例えば希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、酸化防止剤、等張化剤、賦形剤及び担体などの１種以上を含むことができる。また、動脈硬化や動脈硬化性疾患の治療に効果的な公知の他の薬剤との混合物としてよい。かかる薬剤としては、特に限定されないが、血中コレステロールを低下させる薬剤：プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン等のＨＭＧ－ＣｏＡ還元酵素阻害薬；プロブコール等のプロブコール製剤；コレスチラミン、コレスチミド等の陰イオン交換樹脂剤；クリノフィブラート、ベザフィブラート、フェノフィブラート等のフィブラート系製剤等を挙げることができる。また、かかる薬剤としては、血中コレステロールを低下させる薬剤以外にも、例えば、抗血小板薬や、高血圧、糖尿病、高尿酸血症に対する薬剤を挙げることもできる。

本発明に係る治療剤は、経口投与、或いは注射、例えばボーラス注射又は連続注入による非経口投与（すなわち静脈内又は筋肉内投与）用に製剤化することができる。また、本発明に係る治療剤は、動脈注射として製剤化してもよい。注射用製剤は、保存剤を添加して、例えばアンプル又は複数回投与容器中の単位投与剤形として提供することができる。あるいは、本発明の治療剤は、好適なビヒクル、例えば発熱物質不含の滅菌水などで使用前に再構成するための凍結乾燥粉剤としてもよい。

投与経路は、経口経路、並びに静脈内、筋肉内、動脈内、皮下及び腹腔内の注射などが考えられる。あるいは、患者の動脈硬化巣が存在する動脈に動脈注射により投与することによって、直接本発明の治療剤を動脈硬化巣に接触させてもよい。

本発明の治療剤による治療は、動脈硬化及び動脈硬化性疾患を挙げることができる。ここで、動脈硬化性疾患としては、動脈硬化に起因するに疾患・症状であれば何ら限定されず、如何なる疾患・症状を挙げることができる。例えば、動脈硬化性疾患としては、脳梗塞、脳出血、虚血性心疾患、大動脈瘤、大動脈解離、腎硬化症、腎不全及び閉塞性動脈硬化症などを挙げることができる。

本発明の治療剤を適用する対象は特に限定されず、健常者、動脈硬化に罹患している患者、動脈硬化性疾患に罹患している患者、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患を治療している患者、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患の予防を検討している健常者等のいずれであってもよい。またその対象はヒトに限らず、ヒト以外の哺乳動物であってもよい。例えば、ヒト以外の哺乳動物として、ヒト、マウス、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ネコなどを例として挙げることができる。

４．診断薬

本発明の診断薬は、上記１．に説明した、活性化マクロファージの表面に発現する分子標的としてのＦＲβと結合する抗体を有効成分としている。すなわち、上記１．に説明した抗体を、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患の診断に使用することができる。具体的に、上記１．に説明した抗体、すなわち活性化マクロファージのＦＲβに特異的に結合する抗体により、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患を診断することができる。ここで、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患を診断するとは、より具体的に、動脈硬化巣（動脈硬化病変部位）を検出することを含む意味である。

更に具体的には、上記１．に説明した抗体を放射線物質に結合させてシンチグラムで可視化したり、核磁気共鳴装置（ＭＲＩ）の造影剤や超音波診断装置のマイクロバブル造影剤に上記１．に説明した抗体を結合させて可視化する分子イメージングを適用することで、動脈硬化巣（動脈硬化病変部位）を検出することができる。特に、ＦＲβを発現する活性化マクロファージは、脂質成分を多く含む不安定な活動性のある動脈硬化病変（不安定プラークとも称する）に存在する。したがって、上記１．に説明した抗体を使用することにより、この不安定プラークを有する活動性のある動脈硬化病変を検出することができる

。なお、動脈硬化巣には、不安定プラークと安定プラークの２種類が存在することが知られている（Ｌｉｂｂｙ Ｐ ｅｔ ａｌ：Ｎａｔ Ｍｅｄ ８；１２５７－１２６２，２００２）。そして臨床上、脳梗塞や心筋梗塞を起こすプラークの破裂に伴う血栓形成は、不安定プラークに起こると考えられている。したがって、この不安定プラークを安定プラークから区別して検出できれば、プラークの破裂に伴う血栓形成の高リスク部位を診断することができる。

なお、本発明に係る診断薬は、上記１．に説明した抗体を有効成分として含む診断薬として製剤化される。すなわち、本発明に係る診断薬は、診断上有効量の上記抗体を含むものである。ここで、「診断上有効量」とは、所与の症状や用法について診断可能な量を指し、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患の診断対象の性別、年齢、体重、疾患の重篤度、投与経路など様々な要因に応じて変化する。例えば、所与の用法に従って、６０ｋｇの成人に、本発明の複合体が１日当たり３０μｇ以上、好ましくは４０μｇ以上の量で投与される量を診断上有効量として含むことができる。

本発明に係る診断薬は、上記１．に説明した抗体に加えて、生理学的に許容し得る製薬上の添加物、例えば希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、酸化防止剤、等張化剤、賦形剤及び担体などの１種以上を含むことができる。

本発明に係る診断薬は、経口投与、或いは注射、例えばボーラス注射又は連続注入による非経口投与（すなわち静脈内又は筋肉内投与）用に製剤化することができる。また、本発明に係る診断薬は、動脈注射として製剤化してもよい。注射用製剤は、保存剤を添加して、例えばアンプル又は複数回投与容器中の単位投与剤形として提供することができる。あるいは、本発明の診断剤は、好適なビヒクル、例えば発熱物質不含の滅菌水などで使用前に再構成するための凍結乾燥粉剤としてもよい。

投与経路は、経口経路、並びに静脈内、筋肉内、動脈内、皮下及び腹腔内の注射などが考えられる。あるいは、患者の動脈硬化巣が存在する動脈に動脈注射により投与することによって、直接本発明の診断薬を動脈硬化巣に接触させてもよい。

本発明の診断薬による診断は、動脈硬化及び動脈硬化性疾患を挙げることができる。ここで、動脈硬化性疾患としては、動脈硬化に起因するに疾患・症状であれば何ら限定されず、如何なる疾患・症状を挙げることができる。例えば、動脈硬化性疾患としては、脳梗塞、脳出血、虚血性心疾患、大動脈瘤、大動脈解離、腎硬化症、腎不全及び閉塞性動脈硬化症などを挙げることができる。

本発明の診断薬を適用する対象は特に限定されず、健常者、動脈硬化に罹患している患者、動脈硬化性疾患に罹患している患者、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患を治療している患者、動脈硬化及び／又は動脈硬化性疾患の予防を検討している健常者等のいずれであってもよい。またその対象はヒトに限らず、ヒト以外の哺乳動物であってもよい。例えば、ヒト以外の哺乳動物として、ヒト、マウス、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ネコなどを例として挙げることができる。

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれに限定されるものではない。

【実施例１】

【０００８】

抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体及び抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体の製造

［抗原であるＦＲβ発現細胞の調製］

関節リウマチ滑膜またはＢａｌｂ／ｃマウス肝臓からＴｒｉｚｏｌ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、ｃＤＮＡ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にて添付説明書に従って全ＲＮＡを抽出後、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にて添付説明書に従ってｃＤＮＡを合成した。次に、１μｌのリウマチ滑膜、またはＢａｌｂ／ｃマウス肝臓ｃＤＮＡをそれぞれ別個にＢｉｏｎｅｅｒ ＰＣＲ ｐｒｅｍｉｘ（Ｂｉｏｎｅｅｒ）に加え、１０ピコモル量に調整したセンス（ヒトリウマチ滑膜：ａｇａａａｇａｃａｔｇｇｇｔｃｔｇｇａａａｔｇｇａｔｇ（配列番号１５

）；マウス肝臓：ｔｃｔａｇａａａｇａｃａｔｇｇｃｃｔｇｇａａａｃａｇ（配列番号１６））およびアンチセンスプライマー（ヒトリウマチ滑膜：ｇａｃｔｇａａｃｔｃａｇｃｃａａｇｇａｇｃｃａｇａｇｔｔ（配列番号１７）；マウス肝臓：ｃｃｃａａｃａｔｇｇａｔｃａｇｇａａｃｔ（配列番号１８））を加え、９４℃２０秒、５８℃３０秒、７２℃６０秒で３０サイクルＰＣＲを行い、その後７２℃５分で反応させることにより、ヒトあるいはマウスＦＲβを増幅した。増幅したＦＲβ遺伝子のＰＣＲ産物をプラスミドＰＣＲ２．１－ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にライゲーションを行った。すなわちＰＣＲ産物２．５μｌにＮａＣｌ溶液を１μＬ、滅菌蒸留水１．５μＬ、ベクタープラスミド（ＰＣＲ２．１－ＴＯＰＯ）１μＬを加えて室温で５分間インキュベートし、その内の２μＬを大腸菌（ＴＯＰ１０Ｆ'）に加えて氷中で３０分反応後、４２℃３０秒の熱処理し、氷中で２分間静置し、２５０μＬのＳＯＣ培地を加えた後、３７℃で１時間シェーカー内で培養した。培養終了後、ＬＢ培地に捲き、３７℃で一晩培養した。

大腸菌培養の為、プレート上より採取した白いコロニーをアンピシリン（５０μｇ／ｍＬ）を含むＬＢ液体培地に加えて３７℃一晩培養した。プラスミドの精製はＱｉａｇｅｎプラスミド精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）にて行った。組み込まれたＦＲβ遺伝子は、制限酵素ＥｃｏＲＩによる処理後、アガロース電気泳動に展開し、約０．８ｋｂ（７８２ｂｐ）のＦＲβ遺伝子産物を確認後、その部位を切り出し遺伝子産物の抽出をＱｕｉａｇｅｎ ＰＣＲ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｑｕｉａｇｅｎ）にて精製した。次にあらかじめＥｃｏＲＩ処理を行った哺乳細胞発現用ベクターｐＥＲ－ＢＯＳ（Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ ｅｔ ａｌ．ｐＥＦ－ＢＯＳ，ａ ｐｏｗｅｒｆｕｌ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９９０；１８（１７）：５３２２）と混和し、Ｔ４ ｌｉｇａｓｅ（Ｒｏｃｈｅ）を用いてライゲーションを行った。ライゲーション産物の大腸菌（ＴＯＰ１０Ｆ'）への遺伝子導入ならびに、ＦＲβ遺伝子の確認は上記と同様の手法で行った。

ｐＥＦ－ＢＯＳに組み込まれたＦＲβ遺伝子を確認後、ヒトＦＲβを含むベクターはマウスＢ３００－１９細胞に、マウスＦＲβを含むベクターはラットＲＢＬ２Ｈ３細胞にそれぞれ遺伝子導入を行った。すなわち、あらかじめ１ｘ１０^{5}個に調整した各細胞に、２０μＬのリポフェクタミン（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）と混和したＦＲβベクター１μｇを加えて遺伝子導入を行った。遺伝子導入されたＢ３００－１９マウス細胞およびラットＲＢＬ２Ｈ３細胞は抗生物質Ｇ４１８耐性を獲得するため、１ｍｇ／ｍＬの濃度のＧ４１８を含む培地にて遺伝子導入された細胞を選択培養した。遺伝子導入された細胞のＦＲβ遺伝子導入の確認はＰＣＲ法にて行った。すなわち、１ｘ１０^{7}個に調整した各細胞をｃＤＮＡ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にてｃＤＮＡを合成し、１０ピコモル量に調整したセンス（ヒトリウマチ滑膜：ａｇａａａｇａｃａｔｇｇｇｔｃｔｇｇａａａｔｇｇａｔｇ（配列番号１５）；マウス肝臓：ｔｃｔａｇａａａｇａｃａｔｇｇｃｃｔｇｇａａａｃａｇ（配列番号１６））およびアンチセンスプライマー（ヒトリウマチ滑膜：ｇａｃｔｇａａｃｔｃａｇｃｃａａｇｇａｇｃｃａｇａｇｔｔ（配列番号１７）；マウス肝臓：ｃｃｃａａｃａｔｇｇａｔｃａｇｇａａｃｔ（配列番号１８））をＢｉｏｎｅｅｒ ＰＣＲ ｐｒｅｍｉｘ（Ｂｉｏｎｅｅｒ）に加え、９４℃２０秒、５８℃３０秒、７２℃６０秒で３０サイクルＰＣＲを行い、その後７２℃５分で反応させることにより、ヒトあるいはマウスＦＲβを増幅した。増幅後アガロース電気泳動を行い、ＦＲβが示すバンド０．８ｋｂを確認した。

［抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体および抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体の作製］

ＦＲβ発現マウスＢ３００－１９細胞あるいはラットＲＢＬ２Ｈ３細胞を１ｘ１０^{7}個に調整し、フロインド完全アジュバンドと混合し、Ｂａｌｂ／Ｃマウス（抗ヒトＦＲβモノクローナル抗体用）あるいはＷｈｉｓｔｅｒ Ｋｙｏｔｏラット（抗マウスＦＲβモノクローナル抗体用）の尾部に３ヵ所、腹腔内に免疫した。この免疫を２～４回繰り返した。

モノクローナル抗体の作成はＫｏｌｅｒの方法（Ｋｏｈｌｅｒ ＆ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ

，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６：４９５－９６）に従って行った。すなわち、脾臓あるいは腸骨リンパ節を取りだし、単一細胞に解離させた。解離した細胞を骨髄腫由来の細胞（ＮＳ－１）と細胞融合させてハイブリドーマを作製し、ＨＡＴ選択培地にて培養し、培養上清中に分泌された抗体を、先のＦＲβ発現細胞との反応性で選別を行った。

得られたハイブリドーマのクローン化は、９６穴プレートの各穴あたり１細胞となるように調整した限界希釈培養にて行った。クローン化細胞の選別は、ＦＲβ発現細胞との反応性で行った。

クローン化したハイブリドーマを1×10^7個に調整し、ヌードマウス腹腔内に投与して腹水を調整し、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｇカラム（ＧＥバイオサイエンス）にてモノクローナル抗体を精製した。精製したマウスおよびラットモノクローナル抗体のアイソタイプは、アイソタイピングＥＬＩＳＡキット（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いて決定した。その結果、抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体はＩｇＧ２ａタイプのクローン３６ｂとＩｇＧ１タイプの９４ｂの二つが得られ、抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体は、ＩｇＧ２ａタイプのＣＬ５とＣＬ１０の二つが得られた。これら各抗体の抗原に対する反応性はフローサイトメトリーにて解析した。

［抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体および抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体の重鎖遺伝子可変領域（ＶＨ）および軽鎖遺伝子可変領域（ＶＬ）遺伝子の決定］

マウスハイブリドーマクローン３６ｂ、９４ｂを1×10^7個にそれぞれ調整し、ｃＤＮＡ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にてｃＤＮＡを合成した。３６ｂおよび９４ｂはＩｇ－Ｐｒｉｍｅ Ｋｉｔを用いてＶＨおよびＶＬの遺伝子をＰＣＲにて決定した。ＰＣＲ条件は添付の説明書に従って行った。すなわち、９４℃６０秒、５０℃６０秒、７２℃１２０秒で３０サイクルＰＣＲを行い、その後７２℃５分で反応させ、ＶＨおよびＶＬの遺伝子を増幅した。増幅したＶＨおよびＶＬのＰＣＲ産物をプラスミドＰＣＲ２．１－ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にライゲーションし、大腸菌（ＴＯＰ１０Ｆ'）に遺伝子導入した。遺伝子導入した大腸菌よりプラスミドを精製し、３６ｂ、９４ｂのＶＨおよびＶＬの塩基配列を決定した。塩基配列はＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｏｒ Ｖ３．１ ｃｙｃｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｋｉｔ（ＡＢＩ）を用いてＰＣＲを行い、ＰＣＲ産物をＡＢＩ ３１０ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅｒにて解析した。

ラットハイブリドーマクローンＣＬ５、ＣＬ１０を1×10^7個にそれぞれ調整し、ｃＤＮＡ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にてｃＤＮＡを合成した。次に、Ｉｇ－Ｐｒｉｍｅ ＫｉｔおよびラットＶＨ増幅用にデザインしたプライマー（ｃａｃｃａｔｇｇａｇｔｔａｃｔｔｔｔｇａｇ（配列番号１９））を用い、ＶＨおよびＶＬの遺伝子をＰＣＲに増幅させた。増幅したＶＨおよびＶＬのＰＣＲ産物をプラスミドＰＣＲ２．１－ＴＯＰＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にライゲーションし、大腸菌（ＴＯＰ１０Ｆ'）に遺伝子導入した。次に、大腸菌よりプラスミドを精製し、ＶＨおよびＶＬの塩基配列を決定した。塩基配列はＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｏｒ Ｖ３．１ ｃｙｃｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｋｉｔ（ＡＢＩ）を用いてＰＣＲを行い、ＡＢＩ ３１０ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅｒにて解析した。

【実施例２】

【０００９】

抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体の動脈硬化に対する集積性動脈硬化マウスモデルにおけるＦＲβ発現性マクロファージの免疫組織学的検出

［マウス動脈硬化組織の免疫組織化学的染色］

（動脈硬化モデルの作成）

本実施例では、３５週齢のａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｅ（ＡｐｏＥ）ノックアウトマウス（ＡｐｏＥ－／－）５匹（ジャクソン社）を用いた。この動脈硬化マウス５匹の大動脈硬化巣におけるマクロファージを免疫組織化学的染色により評価した。

具体的には、ジエチルエーテルで吸入麻酔後、ネンブタール原液を生理食塩水で１０倍に薄めたものを動脈硬化マウスの腹腔内に１５０μｇ投与し安楽死させた。マウスを７０

％エタノールで消毒後、胸骨正中切開により開胸し、心臓ならびに大動脈を露出させ、心臓から上行大動脈までを一塊として摘出した。

摘出した組織はＯＣＴコンパウンドに包埋し、凍結組織ブロックにした。凍結ブロックをクライオスタットにて５μｍに薄切し、連続凍結組織標本を作製した。作製後、室温で十分に乾燥させた後、アセトンにて固定した。固定後、組織をリン酸緩衝液（ＰＢＳ：ｐＨ７．３　０．１５Ｍ　Ｎａｃｌ）にて洗浄しコンパウンドを除去した後、０．１５％過酸化水素を含むＰＢＳを用いて内因性のペルオキシダーゼを消化し、さらにＰＢＳで洗浄を行った。洗浄後、３％カゼインを含むＰＢＳを組織上に滴下し、室温で３０分間培養した。培養後、２００倍に希釈した抗マウスＦＲβマウスモノクローナル抗体ならびに４００倍に希釈した抗マウスマクロファージマーカーモノクローナル抗体（ＣＤ６８，ＡｂＤ　ｓｅｒｏＴｅｃ）を滴下し、室温で６０分間静置した。ＰＢＳ洗浄後ヒストファインＭＡＸ－ＰＯ（ニチレイ）にて二次抗体を滴下し、室温で３０分間反応させた。反応終了後、過剰量のＰＢＳにて洗浄を行い、ＮＯＶＡ　ＲＥＤ（Ｖｅｃｔｏｒ）にて、ＦＲβおよびＣＤ６８陽性細胞の検出を行った。この切片をＰＢＳで洗浄し、マイヤーヘマトキシリン液（Ｍｕｔｏ　Ｐｕｒｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）で１分間核染色をした。その後、流水で約５分間水洗し、封入した。

［結果］

染色結果を図１に示す。図１（ａ）は抗マウスＦＲβマウスモノクローナル抗体により染色した結果を示し、図１（ｂ）は抗マウスマクロファージマーカーモノクローナル抗体により染色した結果を示している。これら図１（ａ）及び（ｂ）から明らかな通り、ＣＤ６８を標的としたマクロファージマーカーの局在とＦＲβの局在の大部分が重複しており、マウス動脈硬化モデルにおける動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージの多くがＦＲβを高発現していることが明らかとなった。この結果から、ＦＲβ発現性マクロファージを選択的に除去できれば、動脈硬化の治療、特に、活動性のある不安定な動脈硬化病変の治療に有効である可能性が示唆された。

【実施例３】

【００１０】

リコンビナントイムノトキシンの製造

［免疫グロブリン重鎖遺伝子可変領域（ＶＨ）にシステインの変異を導入］

抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体９４ｂの免疫グロブリン重鎖遺伝子可変領域（ＶＨ）の６３番目のアミノ酸グリシン（塩基配列ｇｇｃ）をシステイン（塩基配列ｔｇｔ）に変異させるようにデザインしたプライマーを作製し（センス：ｃａｇａｇｇｃｃｔｇａａｃａｔｔｇｔｃｔｇｇａｇｔｇｇａｔｔｇｇａａｇ（配列番号２０）、アンチセンス：ｃｔｔｃｃａａｔｃｃａｃｔｃｃａｇａｃａｃｔｇｔｔｃａｇｇｃｃｔｃｔｇ（配列番号２１））、Ｑｕｉｃｋ　ｃｈａｎｇｅｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて実施例１で得た９４ｂのＶＨを含むプラスミドｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ　９４ｂＶＨに変異誘発処理を行った。このＰＣＲは、反応液を９５℃３０秒、５５℃６０秒、６８℃４分のサイクルを１２回連続して行った。抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体ＣＬ１０の免疫グロブリン重鎖遺伝子可変領域（ＶＨ）へのシステイン導入も上記と同様の方法にてプライマーをデザインして行った（センス：ｇｔｃｃｇｃｃａｇｇｃｔｃｃａａｃｇａａｇｔｇｔｃｔｇｇａｇｔｇｇｇｔｃｇｃ（配列番号２２）、アンチセンス：ｇｃｇａｃｃｃａｃｔｃｃａｇａｃａｃｔｔｃｇｔｔｇｇａｇｃｃｔｇｇｃｇｇａｃ（配列番号２３））。

次に、反応後のＤＮＡを大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅに遺伝子導入し、０．１ｍｇ／ｍＬのアンピシリンを含むＬＢ培地で選択培養した。選択した形質転換体のプラスミドをＱＩＡｐｒｅｐｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ＫＩＴ（Ｑｉａｇｅｎ）により精製した。さらに塩基配列をＢｉｇ　Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　ｖ３．１　ｃｙｃｌｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｋｉｔ（ＡＢＩ）とＡＢＩ３１０シーケンサーにて決定し、６３番目のグリシンがシステイン（塩基配列ｔｇｔ）に変異したことを確認した。

［ｐＲＫ７９ＰＥ３８ベクターに変異を導入したＶＨを挿入］

次に、ＰＥ３８遺伝子を含むｐＲＫ７９ベクターｐＲＫ７９ＰＥ３８に、９４ｂＶＨおよびＣＬ１０ＶＨの変異を導入したＶＨの挿入を以下の方法にて行った。

変異を導入した９４ｂの５'末端部と３'末端部のアニーリングプライマーとしてｔａａｇａａｇｇａｇａｔａｔａｃａｔａｔｇｇａｇｇｔｔｃａｇｃｔｇｃａｇｃａｇｔｃ（配列番号２４）とｇｃｃｃｔｃｇｇｇａｃｃｔｃｃｇｇａａｇｃｔｔｔｔｇａｇｇａｇａｃｔｇｔｇａｇａｇｔｇｇ（配列番号２５）を、ＣＬ１０の５'末端部と３'末端部のアニーリングプライマーとしてａｔａｃａｔａｔｇｇａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｇａｇｔｃｔｇｇｇｇ（配列番号２６）とｔｃｃｇｇａａｇｃｔｔｔｔｇａｇｇａｇａｃａｇｔｇａｃｔｇａａｇｃ（配列番号２７）をそれぞれデザインした。アニーリングプライマーにはそれぞれ制限酵素であるＮｄｅＩの認識部位があり、この部位でのクローニングにより、ａｔｇを開始コドンとしたタンパク質の発現が可能である。また、もう片方のアニーリングプライマーにはＨｉｎｄＩＩＩの認識部位が挿入されており、この部位でのクローニングにより、ＶＨとＰＥ遺伝子が結合した融合タンパク質の発現が可能である。

これらのプライマーの組み合わせとｐｆｕ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使って変異を導入したｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ－９４ｂＶＨおよびｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ－ＣＬ１０ＶＨプラスミドのＰＣＲを行った。この反応は９４℃２０秒、５５℃３０秒、７２℃６０秒で３０サイクルＰＣＲを行い、その後７２℃５分で反応させた。次に、ＰＣＲ産物を精製し、精製産物に制限酵素ＮｄｅＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）とＨｉｎｄＩＩＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を加えて反応後、電気泳動に展開し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ ｇｅｌ ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてゲルから目的の大きさのＤＮＡを回収した。回収したＤＮＡに、制限酵素処理した変異導入ＶＨと同様の制限酵素で処理したｐＲＫ７９ＰＥ３８を添加し、さらにＬｉｇａｔｉｏｎ Ｈｉｇｈ（Ｔｏｙｏｂｏ）を用いてＶＨとｐＲＫ７９ＰＥ３８のライゲーション反応を行った。ライゲーション反応終了、大腸菌ＴＯＰ１０Ｆ'（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に遺伝子導入し、０．１ｍｇ／ｍＬのアンピシリンを含むＬＢ培地にて形質転換体を選択した。選択した形質転換体のプラスミドｐＲＫ７９－ＶＨＰＥをＱＩＡｐｒｅｐ ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ ＫＩＴ（Ｑｉａｇｅｎ）により精製した。さらに塩基配列をＢｉｇ Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｖ３．１ ｃｙｃｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｋｉｔ（ＡＢＩ）とＡＢＩ３１０シーケンサーにて決定し、変異導入ＶＨの塩基配列がｐＲＫ７９ベクターのＰＥ３８塩基配列と連結していることを確認した。

［免疫グロブリン軽鎖遺伝子可変領域にシステイン変異を導入］

抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体９４ｂの免疫グロブリン軽鎖遺伝子可変領域（ＶＬ）の１２５番目のアミノ酸をシステイン（塩基配列ｔｇｔ）に変異させるようにデザインしたプライマーを作製した（センス：ｔａａｇａａｇｇａｇａｔａｔａｃａｔａｔｇｇａｃａｔｔｇｔｇａｔｇｔｃａｃａａｔｃ（配列番号２８）（このプライマーには制限酵素ＮｄｅＩ切断可能な塩基ｃａｔａｔｇを含むため、この部位でクローニングすることにより、ａｔｇを開始コドンとしたタンパク質の発現が可能である）アンチセンス：ｇｃｔｔｔｇｔｔａｇｃａｇｃｃｇａａｔｔｃｃｔａｔｔｔｇａｔｔｔｃｃａｇｃｔｔｇｇｔｇｃｃａｃａａｃｃｇａａｃｇｔ（配列番号２９）（このプライマーは１２５番目のアミノ酸をシステイン（ｔｇｔ）に変異させ、終始コドンｔａｇに続いて制限酵素ＥｃｏＲＩ切断可能な塩基ｇａａｔｔｃが位置するようにデザインしてある）。同様に抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体ＣＬ１０の免疫グロブリン軽鎖遺伝子可変領域（ＶＬ）の１２５番目のアミノ酸をシステイン（塩基配列ｔｇｔ）に変異させるようにデザインしたプライマーを作製した（ａｔａｃａｔａｔｇｇａｃａｔｔｇｔｇａｔｇｃｃｃａａｔｃｔｃｃａｔｃｃ（配列番号３０）およびｇｃｔｔｔｇｔｔａｇｃａｇｃｃｇａａｔｔｃｃｃａｔｔｔｇａｔｔｔｃｃａｇｃｔｔｇｇｔｇｃｃａｃａａｃｃｇａａｃｇｔ（配列番号３１））。

これらのプライマーの組み合わせとｐｆｕ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使ってｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ－９４ｂＶＬプラスミドのＰＣＲを行っ

た。この反応は９４℃２０秒、５５℃３０秒、７２℃６０秒で３０サイクルＰＣＲを行い、その後７２℃５分で反応させた。次に、ＰＣＲ産物を精製し、精製産物に制限酵素ＮｄｅＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）とＥｃｏＲＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を加えて反応後、電気泳動に展開し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ ｇｅｌ ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてゲルから目的の大きさのＤＮＡを回収した。回収したＤＮＡに、制限酵素処理した変異導入ＶＬと同様の制限酵素で処理したｐＲＫ７９ＰＥ３８を添加し、さらにＬｉｇａｔｉｏｎ Ｈｉｇｈ（Ｔｏｙｏｂｏ）を用いてＶＨとｐＲＫ７９ＰＥ３８のライゲーション反応を行った。ライゲーション反応終了、大腸菌ＴＯＰ１０Ｆ'（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に遺伝子導入し、０．１ｍｇ／ｍＬのアンピシリンを含むＬＢ培地にて形質転換体を選択した。選択した形質転換体のプラスミドｐＲＫ７９－ＶＬＰＥをＱＩＡｐｒｅｐ ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ ＫＩＴ（Ｑｉａｇｅｎ）により精製した。さらに塩基配列をＢｉｇ Ｄｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｖ３．１ ｃｙｃｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｋｉｔ（ＡＢＩ）とＡＢＩ３１０シーケンサーにて決定し、変異導入ＶＬの１２５アミノ酸がシステインに変異していることや、終始コドンｔａｇが配置されていることを確認した。

［リコンビナントタンパク質封入体の調製］

上記の変異導入ＶＨを組み込んだプラスミドｐＲＫ７９－９４ｂＶＨＰＥ、ｐＲＫ７９－ＣＬ１０ＶＨＰＥ、変異導入ＶＬを組み込んだプラスミドｐＲＫ７９－ＶＬ９４ｂ、ｐＲＫ７９－ＶＬＣＬ１０を５０ｎｇ調整し、タンパク質発現用大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に遺伝子導入した。遺伝子が導入された大腸菌の選抜は０．１ｍｇ／ｍＬのアンピシリンを含むＬＢ培地にて３７℃で１５～１８時間の培養で行った。

選択終了後の大腸菌は１０００ｍＬのスーパーブロース培地で３７℃の条件で培養し、可視吸光度６００ｎｍで１．０－１．５に到達するまで培養した。培養後、ＩＰＴＧ（ｉｓｏｐｒｏｐｙｌ－ｂｅｔａ－Ｄ－ｔｈｉｏ－ｇａｌａｃｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ）を終濃度１ｍＭになるように培地に添加し、さらに９０分間３７℃で培養した。培養終了後、遠心分離にて大腸菌を回収後、５０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．４、２０ｍＭ ＥＤＴＡを含む）を用いて２００ｍＬとなるまで懸濁した。懸濁終了後、卵白リゾチームを最終濃度０．２ｍｇ／ｍＬとなるように加え、室温で１時間反応させて大腸菌の破壊を行った。破壊後、２０，０００ｘｇで遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿物はさらに５０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．４、２．５％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００、０．５Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭ ＥＤＴＡを含む）で２００ｍＬとなるまで懸濁し、卵白リゾチームを最終濃度０．２ｍｇ／ｍＬとなるように加え、室温で１時間反応させた。反応終了後、２０，０００ｘｇで遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿はさらに５０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．４、２．５％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００、０．５Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭ ＥＤＴＡを含む）で２００ｍＬとなるまで懸濁し、十分混和させた後、２０，０００ｘｇで遠心分離を行い、沈殿を回収した。この操作を５回繰り返した後の沈殿物をリコンビナントイムノトキシン封入体とし、さらに０．１Ｍトリス緩衝液（ｐＨ８．０、６Ｍグアニジン塩酸塩、１ｍＭ ＥＤＴＡを含む）で溶解させ、最終濃度１０ｍｇ／ｍＬとなるように調節した。

［リコンビナント二重鎖Ｆｖ抗ＦＲβイムノトキシンの作製］

上記で調製した９４ｂ－ＶＨＰＥと９４ｂ－ＶＬ、ＣＬ１０－ＶＨＰＥとＣＬ１０－ＶＬを混和させ、リコンビナント二重鎖Ｆｖ抗ＦＲβイムノトキシンを作製した。

まず、０．５ｍＬのＶＨＰＥ、０．２５ｍＬのＶＬを混和し、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）を最終濃度１０ｍｇ／ｍＬとなるように加え、室温で４時間の還元処理を行った。処理後、７５ｍＬの０．１Ｍトリス緩衝液（ｐＨ８．０、０．５Ｍアルギニン、０．９ｍＭ酸化型グルタチオン、２ｍＭ ＥＤＴＡを含む）に溶解させた。この溶液を１０℃で４０時間放置することによって、ＶＨとＶＬを結合させた。結合終了後、分子量１０，０００カットの遠心濃縮器（Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ １０、Ａｍｉｃｏｎ）で５ｍＬまで濃縮し、さらに５０ｍＬのトリス緩衝液（ｐＨ７．４、０．１Ｍ尿素、１ｍＭ ＥＤＴＡを含む）で希釈した。この希釈液をリコンビナントイムノトキシン精製の出発物質とした。

次に、トリス緩衝液（ｐＨ７．４、１ｍＭ　ＥＤＴＡを含む）で平衡化したイオン交換カラムＨｉ－Ｔｒａｐ　Ｑ（ＧＥ）に、３０ｍＬ／時間の流速で、上記出発物質を吸着させた後、トリス緩衝液（ｐＨ７．４、１ｍＭ　ＥＤＴＡを含む）で洗浄した。洗浄後、吸着したリコンビナントタイプイムノトキシンの溶出をトリス緩衝液（ｐＨ７．４、０．３Ｍ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡを含む）で行った。溶出サンプルはトリス緩衝液（ｐＨ７．４、１ｍＭ　ＥＤＴＡを含む）で透析した後、イオン交換カラムＰＯＲＯＳ　ＨＱ（ＰＯＲＯＳ）でさらに精製した。すなわち、透析した精製物質を１０ｍＬ／分の流速で吸着させ、トリス緩衝液（ｐＨ７．４、１ｍＭ　ＥＤＴＡを含む）で洗浄後、上記緩衝液に０Ｍから１．０ＭのＮａＣｌ勾配を設定することにより、リコンビナントタイプイムノトキシンの溶出を行った。精製リコンビナントタイプイムノトキシンの最終調製はＴＳＫ３００ＳＷ（Ｔｏｓｏｈ）ゲル濾過クロマトグラフィーにて行った。まず、７５％の消毒用エタノールで４８時間洗浄することによってＴＳＫ３００ＳＷカラム中のエンドトキシン除去を行った。次に日本薬局方注射用蒸留水で洗浄し、その後日本薬局方生理食塩水でＴＳＫ３００ＳＷカラムの平衡化を行った。平衡化終了後、リコンビナントタイプイムノトキシンを投与し、流速０．２５ｍＬ／分でカラムからの溶出液を採取した。採取後、０．２２μｍの濾過滅菌機で処理し、純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥにて確認後、－８０℃で保存した。

［ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる純度検定］

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミド電気泳動）は０．１％のドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を含む１２％ポリアクリルアミドの平板ゲルを用い、移動相には終濃度０．１％のＳＤＳ、１３０ｍＭグリシン、２５ｍＭトリスを含む水溶液を用いた。各サンプルは終濃度０．１％のＳＤＳを含む１００ｍＭトリス緩衝液ｐＨ６．５で調整し、５分間の煮沸処理を行った。煮沸終了後、平板ゲルにサンプルを投与し、３０ｍＡの定電流で電気泳動を展開させた。展開後、０．０５％のクマシーブリリアントブルーＲ溶液（ナカライテスク）でリコンビナントタイプイムノトキシンの染色を行った。

【実施例４】

【００１１】

抗ヒトＦＲβ抗体及びリコンビナントイムノトキシンによる動脈硬化の治療効果の検証

動物モデルとして、１５週齢のａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅ（ＡｐｏＥ）ノックアウトマウス（ＡｐｏＥ－／－）を使用した。本実施例においては、実施例３で調製したリコンビナントイムノトキシンを使用し（イムノトキシン投与群）、実施例１で調整した抗体（抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体）を使用し（抗体投与群）、また対照として、ＦＲβとの結合性が欠損している偽薬（ＰＥ３８と抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体９４ｂのＶＨとの融合タンパク質）を使用した（偽薬投与群）と生理食塩水を用いた（コントロール群）。イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群及びコントロール群にはそれぞれ５個体のマウスを割り当てた。１５週齢より１７週齢までの間、三日間隔で計５回、２．５μｇ相当のリコンビナントイムノトキシンあるいは偽薬を生理食塩水０．１ｍｌで希釈して尾静脈より静注した。抗体投与群には、１個体あたり０．３ｍｇの抗体を生理食塩水０．１ｍｌで希釈して尾静脈より静注した。コントロール群には０．１ｍｌの生理食塩水を尾静脈より静注した。

〔免疫組織化学的解析〕

投与後２８日目にマウスを安楽死させ、心臓ならびに上行大動脈を切除して凍結組織標本を作製し、上記実施例２と同様にして免疫組織化学的解析を行った。

大動脈洞の動脈硬化性病変は、大動脈弁基部の動脈硬化病変が最初に現れる部位から５０μｍおきに１５箇所で調べられ、Ｏｉｌ　ｒｅｄ－Ｏで染色した。大動脈病変を定量化するために、顕微鏡下の各々のイメージは、デジタル化されて、Ｓｉｏｎ　Ｉｍａｇｅソフトウェアを用いて分析した。Ｏｉｌ　ｒｅｄ－Ｏ陽性の領域は、全体の横断面の血管壁域と比較分析した。各々の動物の１５箇所の平均値を測定した。

イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群及びコントロール群の動脈硬化病変の

Ｏｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果の一例を図２に示す。なお、図２（ａ）はイムノトキシン投与群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果であり、図２（ｂ）はコントロール群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果であり、図２（ｃ）は偽薬投与群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果であり、図２（ｄ）は抗体投与群の動脈硬化病変のＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色結果である。また、大動脈病変を定量した結果を図３に示す。

図２及び図３に示すように、イムノトキシン投与群及び抗体投与群では、動脈硬化巣が有意に退縮していることが明らかとなった。特に、本実施例では、図３に示すように、イムノトキシン投与群における動脈硬化が３１％、抗体投与群における動脈硬化が４３％抑制された。このようにＯｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色で示される脂質成分を多く含む不安定な活動性のある動脈硬化病変を縮小させたことより、このイムノトキシン及び抗体は、それぞれ活動性のある不安定な動脈硬化病変の治療に使用できることが示唆された。

〔末梢血単核球の測定〕

上述した免疫組織化学的解析において、イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群、及びコントロール群のマウス群を安楽死させた際、１０００Ｕ／ｍｌのヘパリンでコートした注射針で心臓より全血を採血し、単級数を血球測定板により測定した。

測定結果を図４に示す。図４に示すように、イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群、およびコントロール群において末梢血単球数に有意差は認められなかった。

〔血中脂質レベルの測定〕

また、血中総コレステロールを飽食時にＴ－ＣＨＯカイノス（カイノス社）を用いて測定した。測定結果を図５に示す。図５に示すように、イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群、およびコントロール群において血中総コレステロール値に有意差は認められなかった。

〔動脈硬化巣のＦＲβ発現性マクロファージ数の測定〕

さらに、イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群及びコントロール群について、投与終了後２８日目に得たマウスの心臓ならびに上行大動脈から凍結組織標本を作製し、免疫組織化学的解析を行った。顕微鏡下の各々のイメージは、デジタル化されて（ＤＳ－Ｆｉｌ，Ｎｉｋｏｎ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）、イメージソフトウェア（ＮＩＳ－Ｅｌｅｍｅｎｔｓ，Ｎｉｋｏｎ）を用いて分析した。大動脈弁基部の動脈硬化病変巣においてＦＲβ発現細胞数を算定し、ＦＲβ発現細胞数をイムノトキシン群、抗体投与群、偽薬投与群及びコントロール群で比較検討した。

イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群及びコントロール群の免疫染色結果を図６－１及び６－２に示す。なお、図６－１（ａ）はコントロール群の動脈硬化病変の免疫染色結果であり、図６－１（ｂ）はイムノトキシン投与群の動脈硬化病変の免疫染色結果であり、図６－２（ｃ）は偽薬投与群の動脈硬化病変の免疫染色結果であり、図６－２（ｄ）は抗体投与群の動脈硬化病変の免疫染色結果である。また、動脈硬化病変マクロファージ数の計測結果を、イムノトキシン投与群、抗体投与群、偽薬投与群及びコントロール群について比較した結果を図７に示す。

図６－１、６－２及び図７に示すように、イムノトキシン投与群及び抗体投与群ではＦＲβ発現性マクロファージが除去され、さらに動脈硬化巣が抑制されていることが分かる。

以上の結果から、実施例３で調製したリコンビナントイムノトキシン及び実施例１で調整した抗体は、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージを細胞死に至らしめ、その結果、動脈硬化巣、特に活動性のある不安定な動脈硬化巣を退縮させる薬理作用を有することが明らかとなった。そして、これらの結果から、動脈硬化巣に存在するＦＲβ発現性マクロファージを選択的に除去することで、動脈硬化の治療、特に活動性のある不安定な動脈硬化病変の治療、及び動脈硬化性疾患の治療に効果的であることが示された。

また、ＦＲβ発現マクロファージは、Ｏｉｌ　Ｒｅｄ　Ｏ染色で示される脂質成分を多く含む不安定な活動性のある動脈硬化病変に存在することが示された。この結果より、不安定プラークを有する活動性のある動脈硬化病変を、ＦＲβを指標として検出することができる。すなわち、実施例２で作製したような抗マウスＦＲβラットモノクローナル抗体

等の抗ＦＲβ抗体を用いることで、不安定プラークを有する活動性のある動脈硬化病変を特定することができる。

【実施例５】

【００１２】

抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体によるヒト頚動脈組織における免疫組織染色

〔パラフィン包埋標本〕

本実施例では、以下のようにしてヒト頸動脈組織のパラフィン包埋標本を作製した。高度の内頚動脈狭窄症をきたした患者の頸動脈内膜剥離術により得られた組織をホルマリン固定した。その後パラフィン包埋後に５μｍのパラフィン切片を作成した。

〔免疫組織化学的解析〕

上記の標本を脱パラフィン処理したのち、Ｄｉｖａ　Ｄｅｃｌｏａｋｅｒを用いてオートクレーブ法による抗原回復を行った。０．３％過酸化水素水で１０分間組織をインキュベーションし、内因性ペルオキシダーゼ反応を除去した。その後、１０％正常ヤギ血清を室温で３０分間インキュベーションした。

実施例１で作製した抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体を４℃、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔで反応させた。ＰＢＳで洗浄したのち、二次抗体としてシンプルステインＭａｘ－ＰＯを用い、室温で３０分インキュベーションした。ＰＢＳ洗浄した後、ノバレッドで発色させ、ベクタマウントで封入した。

［結果］

染色結果を図８に示す。図８から明らかな通り、ヒト頸動脈組織においても動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージの多くがＦＲβを高発現していることが明らかとなった。この結果及び実施例４の結果から、実施例３で調製したリコンビナントイムノトキシン及び実施例１で調整した抗ヒトＦＲβ抗体を使用することで、ヒト動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージを細胞死に至らしめ、その結果、動脈硬化巣、特に活動性のある不安定な動脈硬化巣を退縮させるといったヒトに対する薬理作用が強く示唆された。

【実施例６】

【００１３】

抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体を用いた分子イメージングによる動脈硬化巣の検出

［分子イメージング］

本実施例では、３５週齢のａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅ（ＡｐｏＥ）ノックアウトマウス（ＡｐｏＥ－／－）（ジャクソン社）を用いた。実施例１で作製した抗ヒトＦＲβマウスモノクローナル抗体をＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）で標識し、これを一匹あたり１００マイクログラムとなるようにマウスの尾静脈から静脈注射投与した。

静脈注射投与から２時間後、実施例２と同様な手法によりマウスを屠殺し、定法に従って大動脈全体を摘出した。摘出した大動脈をＭａｅｓｔｒｏ™ ｉｎ－ｖｉｖｏ ｉｍａｇｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ（ＣＲｉ社製）にて４８８ｎｍで励起し、５２０ｎｍで撮影を行なった。

［結果］

撮像した結果を図９に示す。図９に示すように、蛍光標識を用いた分子イメージングにより、動脈硬化巣（動脈硬化病変部位）を検出できることが明らかとなった。この結果から、脂質成分を多く含む不安定な活動性のある動脈硬化病変（不安定プラーク）の破裂に伴う血栓形成の高リスク部位を、画像診断できることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【００１４】

本発明の動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤は、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージの細胞死又は細胞傷害を選択的に誘導し、これによって、動脈硬化巣の退縮を引き起こすことを可能にする。また、本発明の動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬は、動脈硬化巣に存在する活性化マクロファージを検出することで動脈硬化巣を特定することが

できる。

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

［配列表］

SEQUENCE LISTING

<110> Kagoshima University

<120> Agent for treating arteriosclerosis, and Agent for treating arteriosclerotic disease

<130> PH-5010-PCT

<150> JP 2010-249876
<151> 2010-11-8

<150> JP 2011-153862
<150> 2011-07-12

<160> 31

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 208
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His His Lys
1 5 10 15

Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Asp Gln Cys Ser Pro Trp
20 25 30

Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu Leu His Lys
35 40 45

Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys Gly Lys Met
50 55 60

```
Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asn Gln Thr Trp
                85                  90                  95

Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Gln
            100                 105                 110

Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His Thr Cys Lys Ser Asn Trp
        115                 120                 125

His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val Asn Lys Cys Pro Ala Gly
    130                 135                 140

Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro Ala Ala Leu
145                 150                 155                 160

Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg
                165                 170                 175

Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala Gln Gly Asn
            180                 185                 190

Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met His Val Asn
        195                 200                 205
```

<210> 2
<211> 206
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His His Lys
1 5 10 15

Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Asp Gln Cys Ser Pro Trp
20 25 30

Lys Lys Asn Ala Cys Cys Ser Val Asn Thr Ser Gln Glu Leu His Lys
35 40 45

Ala Asp Ser Arg Leu Tyr Phe Asn Trp Asp His Cys Gly Lys Met Glu
50 55 60

Pro Ala Cys Lys Ser His Phe Ile Gln Asp Ser Cys Leu Tyr Glu Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg
85 90 95

Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys His Gln
100 105 110

Trp Trp Glu Ala Cys Arg Thr Ser Phe Thr Cys Lys Arg Asp Trp His
115 120 125

Lys Gly Trp Asp Trp Ser Ser Gly Ile Asn Lys Cys Pro Asn Thr Ala
130 135 140

Pro Cys His Thr Phe Glu Tyr Tyr Phe Pro Thr Pro Ala Ser Leu Cys
145 150 155 160

Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly

165 170 175

Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Ser Thr Gln Gly Asn Pro
180 185 190

Asn Glu Asp Val Val Lys Phe Tyr Ala Ser Phe Met Thr Ser
195 200 205

<210> 3
<211> 375
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc actgaagata 60

tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg 120

cctggacatg gccttcagtg gattggagaa attttgcctg gaagtggtag ttctaactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac 240

atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagacggggc 300

agctcgggct cttactttgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360

tcataggaat tcggc 375

<210> 4
<211> 328
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 4
gacatccaga tgacacaatc ttcatcctcc ttttctgtat ctctaggaga cagagtcacc 60

attacttgca aggcaagtga ggacatatat aatcggttag cctggtatca gcagaaacca 120

ggaaatgctc ctaggctctt aatatctggt gcaaccagtt tggaaactgg ggttccttta 180

agattcagtg gcagtggatc tggaaaggat tacactctca gcattaccag tcttcagact 240

gaagatattg ctacttatta ctgtcaacag tattggagta ctccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa aaaagctt 328

<210> 5
<211> 447
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 5
atggaatgga cctgggtcat tctcttcctg atggcagtgg ttacaggggt caattcagag 60

gttcagctgc agcagtctgg ggcagaactt gtgaagccag gggcctcagt caggttgtcc 120

tgcacagctt ctggcttcaa cattaaagac acctacatgt actgggtgaa acagaggcct 180

gaacagggcc tggagtggat tggaaggctt gatcctgcga atggtaatac tagatatgac 240

ccgaagttcc agggcaaggc cactataaca tcagacacat cctccaacac agcctacctg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgcggg ggactacccg 360

ataattgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagccaa aacgacaccc 420

ccacccgtct atccactggc ccctgga 447

<210> 6
<211> 450
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 6
atggttctca tcttgctgct gctatgggta tctggtgaga aatttaaagg tacctgtggg 60

gacattgtga tgtcacaatc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagac ctacttggct 180

tggtatcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagagtt cactctcacc 300

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420

tccatcttcc cgccatccag taagctggga 450

<210> 7
<211> 539
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 7
atgaagttcg ggttcagctt ggttttcctt gtcctttca taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct caggattcac tttcagtaac tatgacatgg cctgggtccg ccaggctcca 180

acgaagggtc tggagtgggt cgcatccatt agtcctagtg gtggtatccc ttactatcga 240

gactccgtga agggccgatt cactgtctcc agagataatg caaaaagcac cctatacctg 300

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaag acatgggcct 360

acggaggccc ccgatgttat ggatgcctgg ggtcaaggag cttcagtcac tgtctcctca 420

gctgaaacaa cagccccatc tgtctatcca ctggctcctg gaactgctct caaaagtaac 480

tccatggtga aatgggatcc gtctagatcg acgggcaaca gcaactggcg aacaggcaa 539

<210> 8
<211> 671
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 8
atggtcctca tatccttgct gttctggatt tctgggacat tgtgacccaa tctccatcct 60

ctctggctgt gtcagcagga gagacggtca ctataaactg caagtccagt cagagtcttt 120

tatacagtgg aaaccaaaag aactacttgg cctggtacca gcagaaacca gggcagtctc 180

ctaaactgct gatctactgg gcatctacta ggcaatctgg tgtccctgat cgcttcatag 240

gcagtggatc tgggacagac ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggca gaagatctgg 300

caatttatta ctgtcagcag tattatgata ctccgctcac gttcggttgt ggcaccaagc 360

tggaaatcaa agctggagat caaacgggct gatgctgcac caacttatct atcttcccac 420

catccacgga acagttagca actggaggtg cctcagtcgt gtgcctcatg aacaacttct 480

atcccagaga catcagtgtc aagtggaaga ttgatggcac tgaacgacga gatggtgtcc 540

tggacagtgt tactgatcag gacagcaaag acagcacgta cagcatgagc agcaccctct 600

cgttgaccaa ggctgactat gaaagtcata acctctatac ctgtgaggtt gttcataaga 660

catcatccta a 671

<210> 9
<211> 490
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 9
atgaagttcg ggttcagctt ggttttcctt gtcctttca taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct caggattcac tttcagtaac tatgacatgg cctgggtccg ccaggctcca 180

gatacgaagt gtctggagtg ggtcgcatcc attagtccta gtggtgatat cacttactat 240

cgagactccg tgaagggccg attcactgtc tccagagata atacaaaaag cacctattc 300

ctgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtgc aagacatggg 360

cctacggagg cccccgatat tatggatgcc tggggtcaag gagcttcagt cactgtctcc 420

tcagctgaaa caacagcccc atctgtctat ccactggctc ctggaactgc tctcaaaagt 480

aacatggtga 490

<210> 10
<211> 661
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 10
atggtcctca tatccttgct gttctggatt tctgggacat tgtgatgacc caatctccat 60

cctctctggc tgtgtcagca ggagagacgg tcactataaa ctgcaagtcc agtcagagtc 120

ttttatacag tggaaaccaa aagaactact tggcctggta ccagcagaaa ccagggcagt 180

ctcctaaact gctgatccac tgggcatcta ctaggcaatc tggtgtccct gatcgcttca 240

taggcagtgg atctgggaca gacttcactc tgaccatcag cagtgtgcag gcagaagatc 300

tggcaattta ttactgtcag cagtattatg atagtccgct cacgttcggt tctgggacca 360

agctggagat caaacgggct gatgctgcac caacttatct atcttcccac catccacgga 420

acagttagca actggaggtg cctcagtcgt gtgcctcatg aacaacttct atcccagaga 480

catcagtgtc aagtggaaga ttgatggcac tgaacgacga gatggtgtcc tggacagtgt 540

tactgatcag gacagcaaag acagcacgta cagcatgagc agcaccctct cgttgaccaa 600

ggctgactat gaaagtcata acctctatac ctgtgaggtt gttcataaga catcatccta 660

a 661

<210> 11

<211> 468
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Immunotoxin

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Asp Tyr Gly Ile Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala
115 120 125

Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr

130 135 140

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp
165 170 175

Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser
180 185 190

Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg
195 200 205

Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln
210 215 220

Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser
225 230 235 240

Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Val Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu
245 250 255

Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp
260 265 270

Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Val
275 280 285

Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser
290 295 300

Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile
305 310 315 320

Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr
325 330 335

Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala
340 345 350

Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg
355 360 365

Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg
370 375 380

Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro
385 390 395 400

Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala
405 410 415

Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn
420 425 430

Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala
435 440 445

Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg
450 455 460

Glu Asp Leu Lys

465

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 473
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Immunotoxin

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Gln Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Pro Glu
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro
130 135 140

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
145 150 155 160

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala
165 170 175

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu
180 185 190

Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln
195 200 205

Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu
210 215 220

Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn
225 230 235 240

Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Val Pro Thr
245 250 255

Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg
260 265 270

Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
275 280 285

Leu Glu Glu Arg Val Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
290 295 300

Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
305 310 315 320

Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
325 330 335

Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg
340 345 350

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
355 360 365

Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
370 375 380

Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
385 390 395 400

Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
405 410 415

Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro
420 425 430

Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
435 440 445

Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
450 455 460

Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
465 470

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mus musculus

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Leu Ser Leu Gln
65 70 75 80

Thr Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro
85 90 95

Trp Thr Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 15
agaaagacat gggtctggaa atggatg 27

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 16
tctagaaaga catggcctgg aaacag 26

<210> 17
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 17
gactgaactc agccaaggag ccagagtt 28

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 18
cccaacatgg atcaggaact 20

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 19
caccatggag ttacttttga g 21

<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 20
cagaggcctg aacattgtct ggagtggatt ggaag 35

<210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 21
cttccaatcc actccagaca ctgttcaggc ctctg 35

<210> 22
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 22
gtccgccagg ctccaacgaa gtgtctggag tgggtcgc 38

<210> 23
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 23
gcgacccact ccagacactt cgttggagcc tggcggac 38

<210> 24
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 24
taagaaggag atatacatat ggaggttcag ctgcagcagt c 41

<210> 25
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 25
gccctcggga cctccggaag cttttgagga gactgtgaga gtgg 44

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 26
atacatatgg aggtgcagct ggtggagtct ggg 33

<210> 27
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 27
tccggaagct tttgaggaga cagtgactga agc 33

<210> 28
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 28
taagaaggag atatacatat ggacattgtg atgtcacaat c 41

<210> 29
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 29
gctttgttag cagccgaatt cctatttgat ttccagcttg gtgccacaac cgaacgt 57

<210> 30
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 30
atacatatgg acattgtgat gcccaatctc catcc 35

<210> 31
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

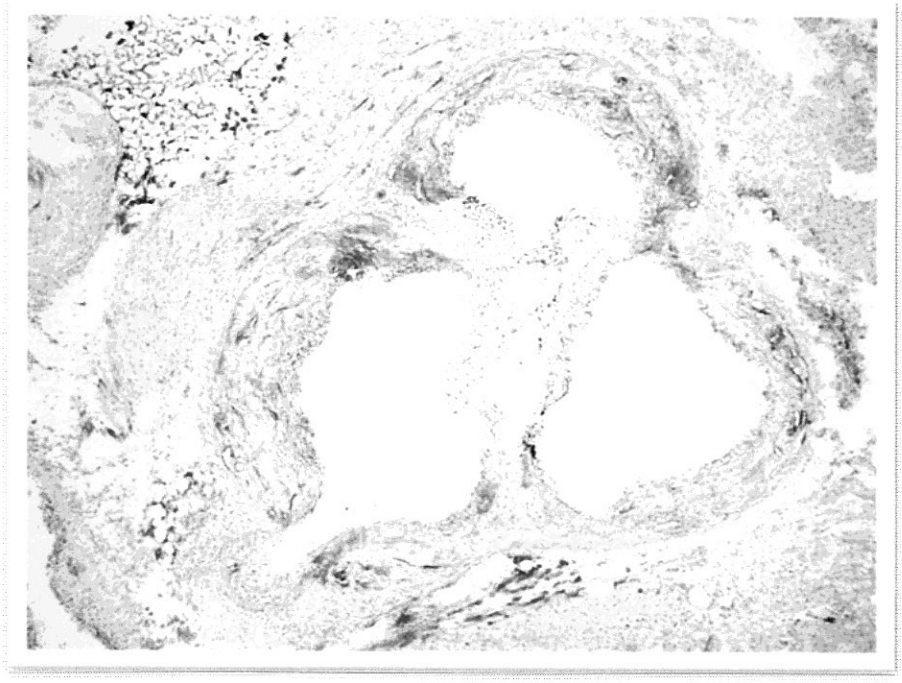
<220>
<223> primer

<400> 31
gctttgttag cagccgaatt cctatttgat ttccagcttg gtgccacaac cgaacgt 57

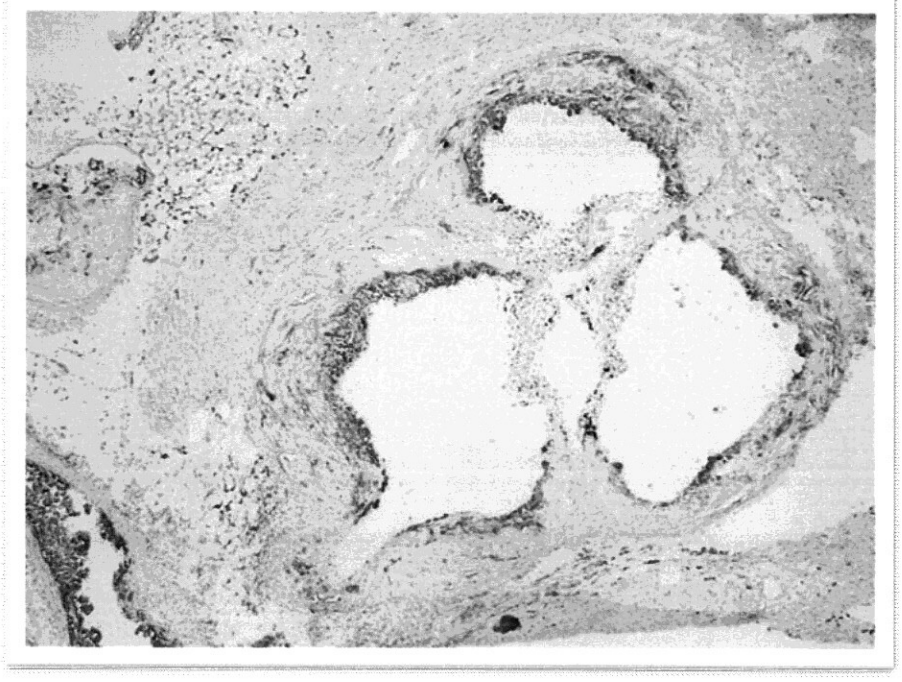
【図１】

図１

(a)

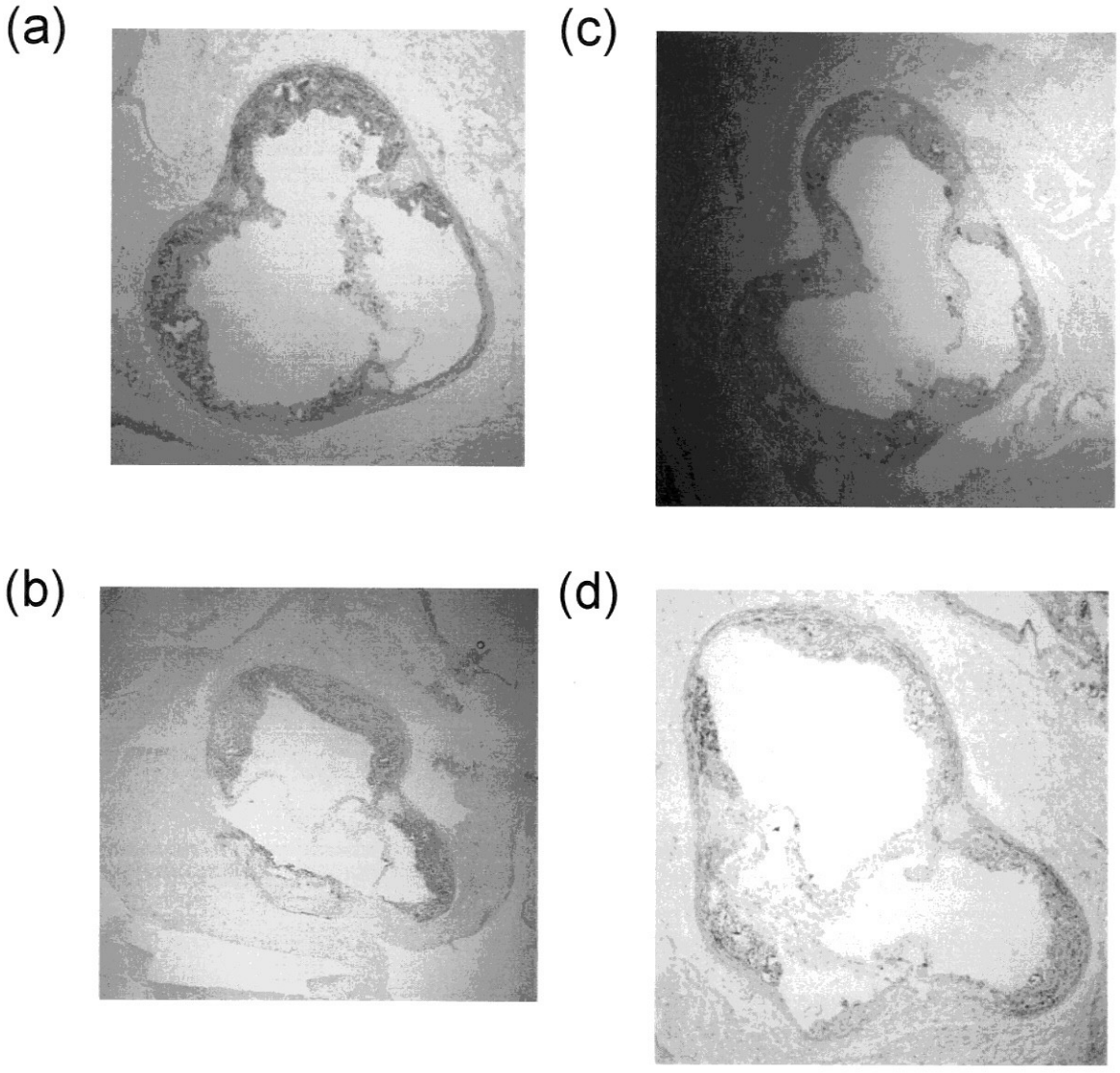


(b)



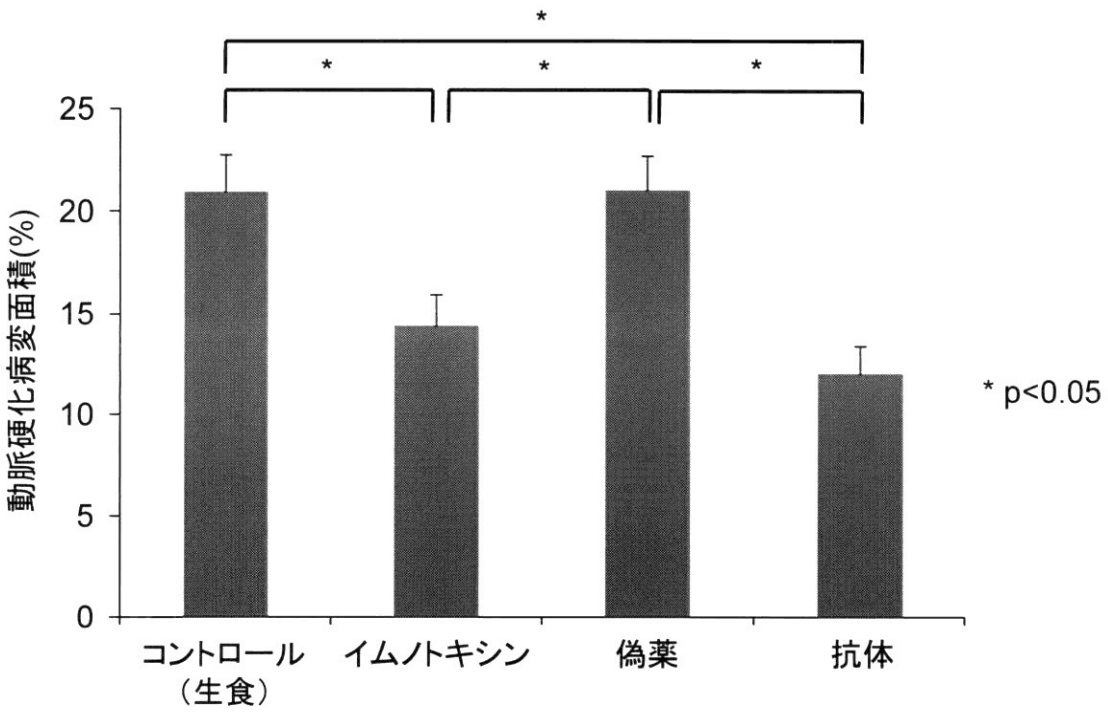
【図２】

図２



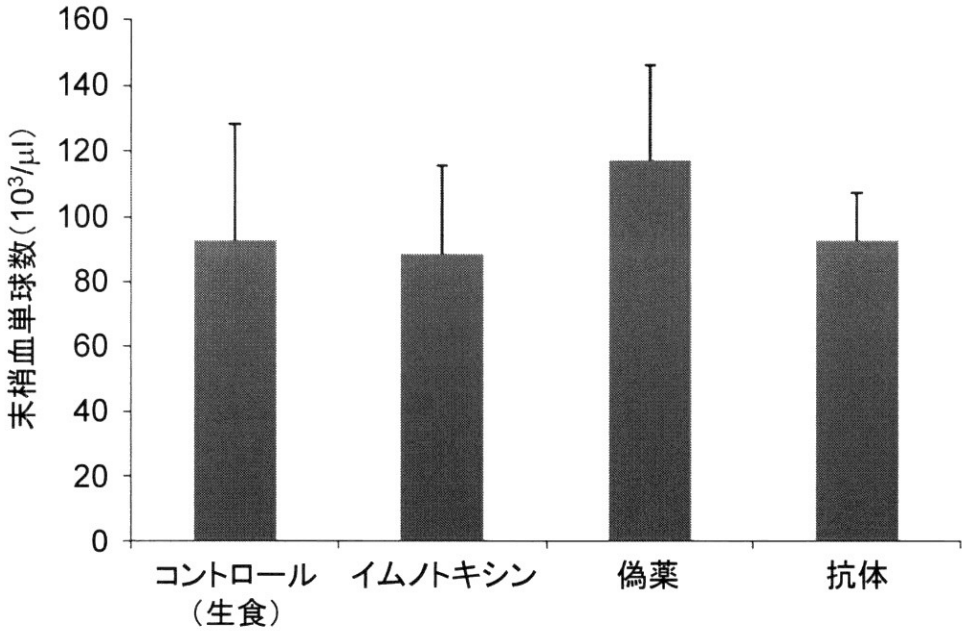
【図３】

図３



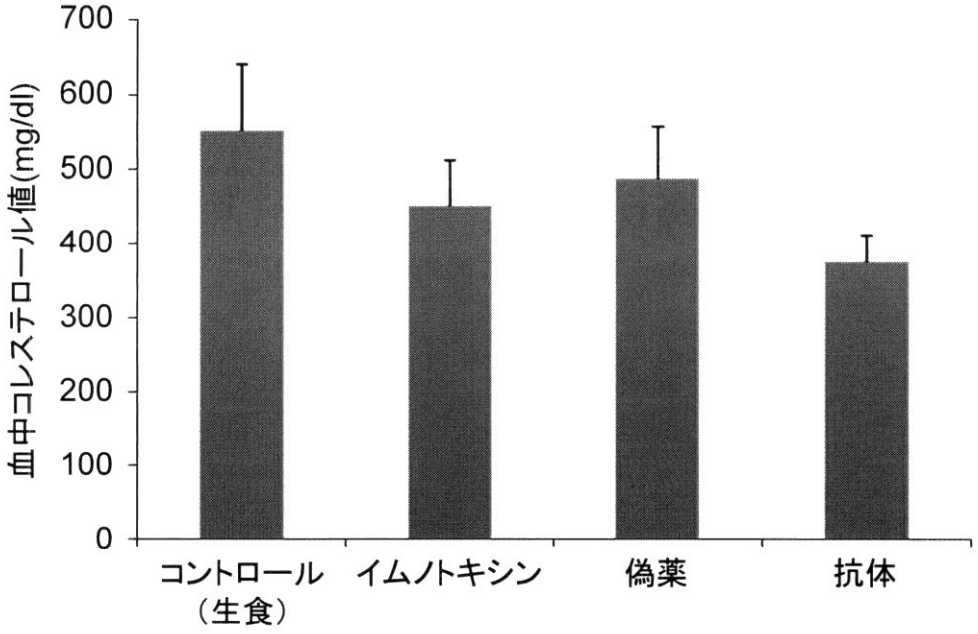
【図４】

図４


末梢血単球数（10³/μl）
160
140
120
100
80
60
40
20
0
コントロール（生食）
イムノトキシン
偽薬
抗体

【図５】

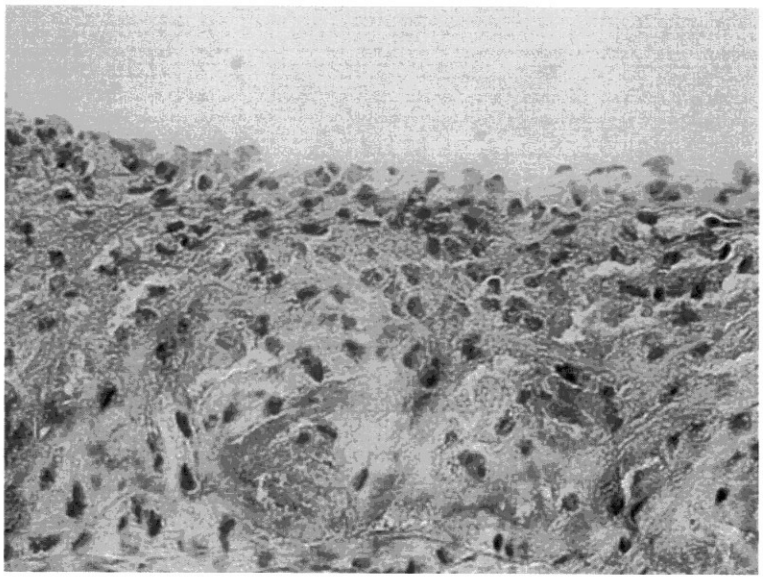
図５


血中コレステロール値(mg/dl)
700
600
500
400
300
200
100
0
コントロール（生食）
イムノトキシン
偽薬
抗体

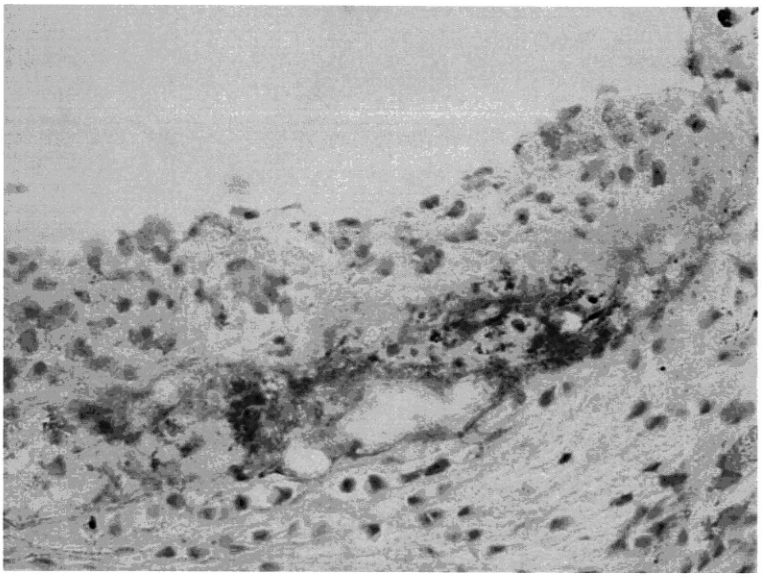
【図６－１】

図６－１

(a)



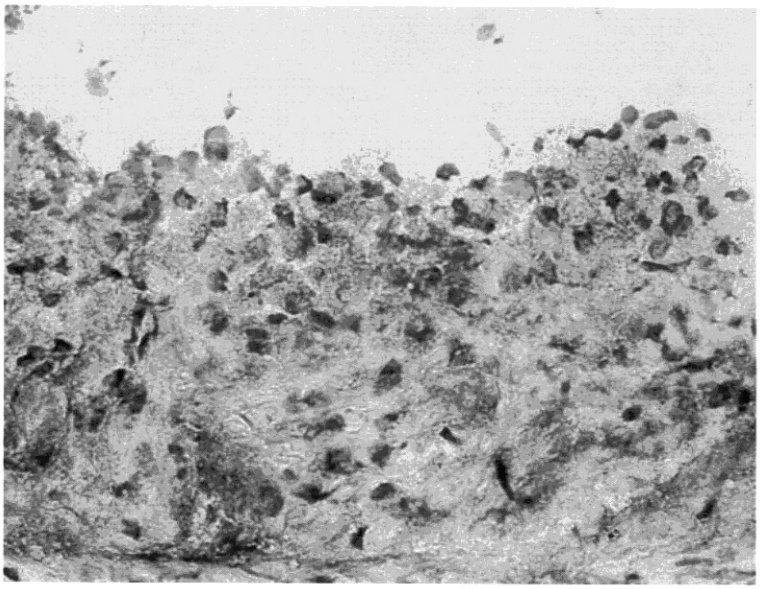
(b)



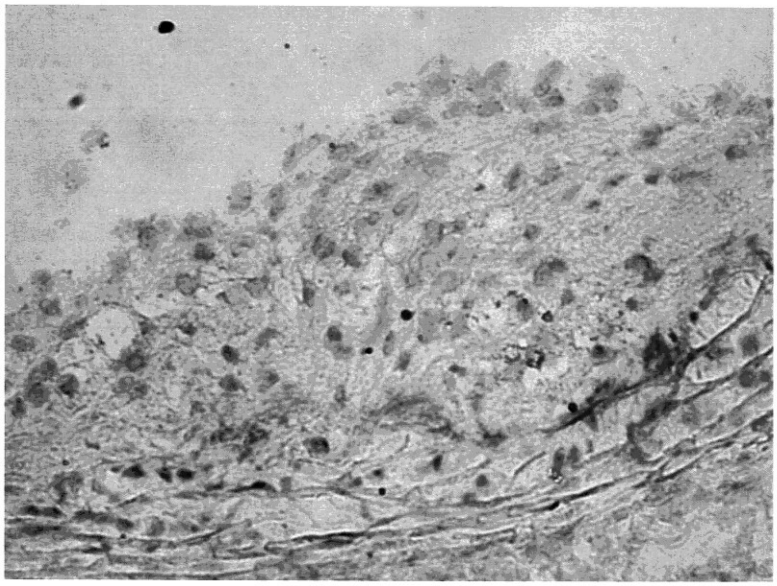
【図６－２】

図６－２

(c)

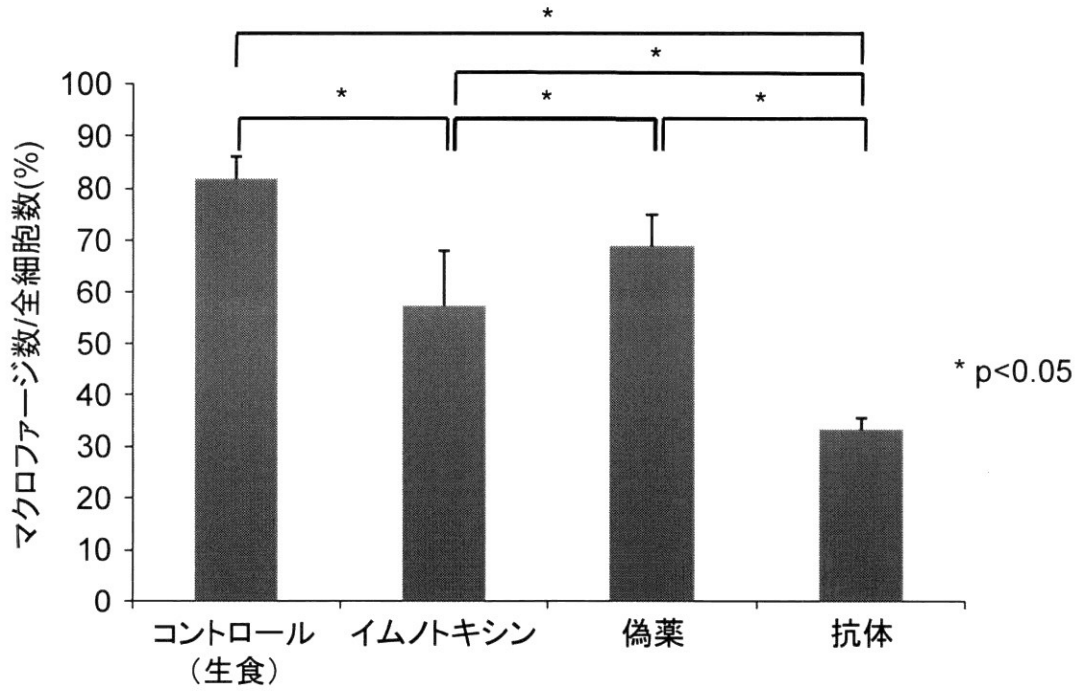


(d)



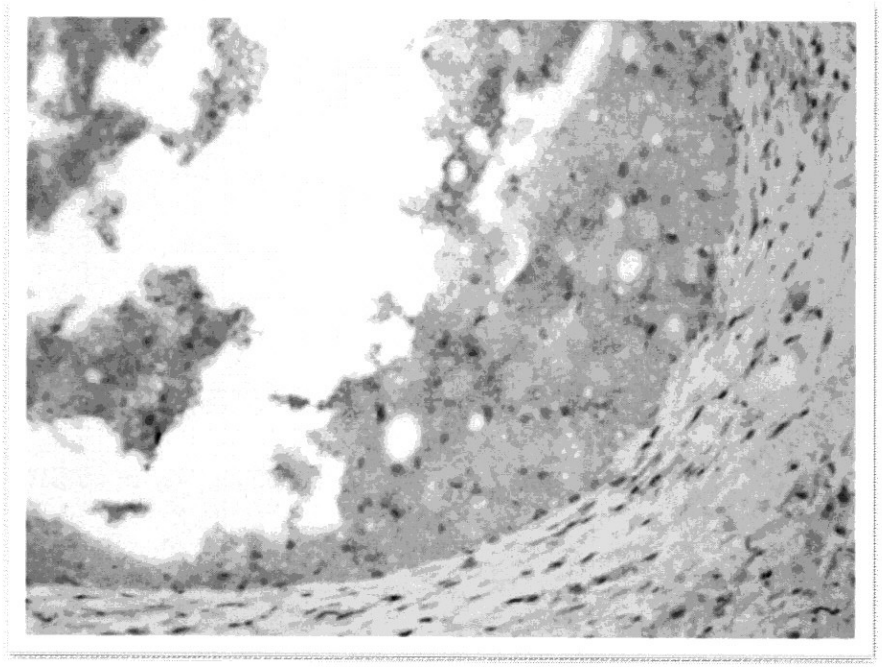
【図７】

図７


マクロファージ数/全細胞数(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
*
*
コントロール
（生食）
イムノトキシン
偽薬
抗体
* p<0.05

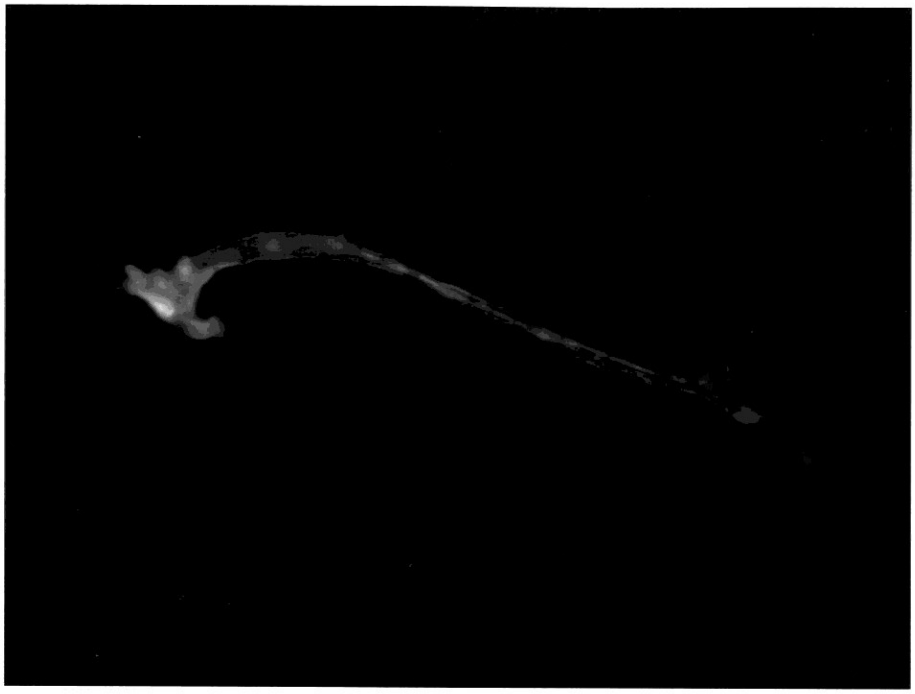
【図８】

図８



【図９】

図９



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
Ａ６１Ｋ	45/00	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	9/10	１０１
Ｃ１２Ｎ	15/09	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	9/10	
Ｃ０７Ｋ	16/28	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ｃ０７Ｋ	16/46	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	37/02	
			Ａ６１Ｋ	45/00	
			Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ
			Ｃ０７Ｋ	16/28	
			Ｃ０７Ｋ	16/46	

(72)発明者　古庄　優子
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号　国立大学法人鹿児島大学内
(72)発明者　松山　隆美
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号　国立大学法人鹿児島大学内
(72)発明者　永井　拓
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号　国立大学法人鹿児島大学内

審査官　深草　亜子

(56)参考文献　特表２００６－５２６６４２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／１０３２５０（WO，Ａ１）
国際公開第２０１０／０９８５０３（WO，Ａ１）
特開２０１０－０７７０２６（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５３０６７８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５１８１１２（ＪＰ，Ａ）
European Journal of Medical Research，２０１０年１０月１３日，Vol.15，Suppl.1，p.217
J.Nucl.Med.，２０１０年　５月，Vol.51，p.768-774
Cell.Tissue Res.，２００５年，Vol.320，p.277-285
Blood，２００９年，Vol.113，p.438-446
Arthritis and Rheumatism，２００５年，Vol.52，p.2666-2675

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　　３９／３９５
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）