

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-184981

(P2009-184981A)

(43) 公開日 平成21年8月20日(2009.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/44 (2006.01)	C07K 16/44	4B064
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 S	4B065
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543 551A	4H045
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2008-27650 (P2008-27650)
 (22) 出願日 平成20年2月7日(2008.2.7)

(71) 出願人 000001959
 株式会社資生堂
 東京都中央区銀座7丁目5番5号
 (71) 出願人 504145342
 国立大学法人九州大学
 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
 (74) 代理人 100080089
 弁理士 牛木 護
 (74) 代理人 100137800
 弁理士 吉田 正義
 (74) 代理人 100125081
 弁理士 小合 宗一
 (72) 発明者 財津 潔
 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 九州大
 学内

最終頁に続く

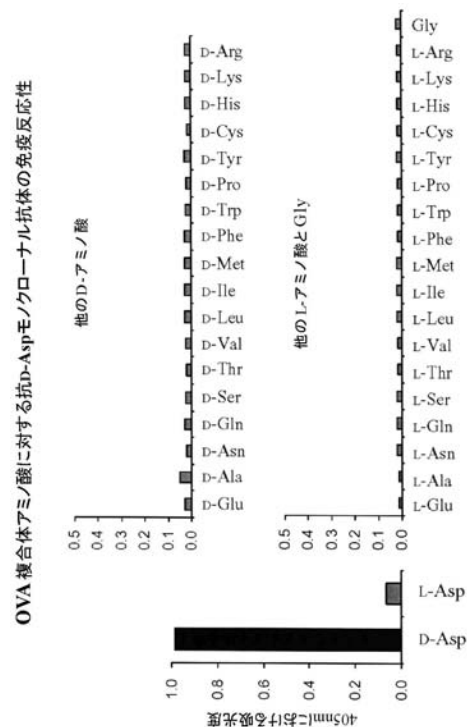
(54) 【発明の名称】 抗D-アミノ酸モノクローナル抗体及び、抗D-アミノ酸モノクローナル抗体を用いたD-アミノ酸の免疫学的分析方法

(57) 【要約】

【課題】 特定のD-アミノ酸に対する特異性が高く、かつ、他の類似構造を有する化合物に対する選択性も高いD-アミノ酸の分析方法であって、臨床検体等の多試料分析に適したD-アミノ酸の分析方法を開発すること。

【解決手段】 特定の1種類のD-アミノ酸のみと反応し、該D-アミノ酸に類似する他の化合物とは交差反応しない、抗D-アミノ酸モノクローナル抗体と、該モノクローナル抗体を用いるD-アミノ酸の免疫学的分析方法を提供する。前記D-アミノ酸の免疫学的分析方法には、競合ELISA法又は表面プラズモン共鳴法を利用する場合がある。

【選択図】 図7



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

特定の 1 種類の D - アミノ酸のみを抗原として認識し、他の化合物とは交差反応しないことを特徴とする抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記特定の 1 種類の D - アミノ酸は、D - アスパラギン酸又は D - ロイシンであることを特徴とする請求項 1 に記載の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を産生することを特徴とする細胞株。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を用いて D - アミノ酸を検出・定量することを特徴とする D - アミノ酸の免疫学的分析方法。

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 に記載の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体と、該モノクローナル抗体の抗原である D - アミノ酸が固定された固体支持体との反応を、試料中の前記 D - アミノ酸が競合阻害することを利用することを特徴とする D - アミノ酸の免疫学的分析方法。

【請求項 6】

前記抗原である D - アミノ酸はキャリア高分子と結合した D - アミノ酸複合体として固体支持体に固定されることを特徴とする請求項 5 に記載の D - アミノ酸の免疫学的分析方法。

【請求項 7】

(1) 前記抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体と、前記 D - アミノ酸複合体が固定された固体支持体と、前記試料とを用意するステップと、(2) 前記抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体と前記試料との混合溶液を調製するステップと、(3) 前記混合溶液を前記固体支持体に接触させるステップと、(4) 前記固体支持体に結合した抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を検出・定量するステップとを含むことを特徴とする請求項 6 に記載の D - アミノ酸の免疫学的分析方法。

【請求項 8】

前記固体支持体に結合した抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を検出・定量するステップは、ELISA 法、表面プラズモン共鳴法又はラテックス凝集法を利用することを特徴とする請求項 7 に記載の D - アミノ酸の免疫学的分析方法。

【請求項 9】

前記モノクローナル抗体の作成の際の免疫原は D - アミノ酸とキャリア高分子とが結合した D - アミノ酸複合体であり、該免疫原の D - アミノ酸複合体のキャリア高分子は、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体のキャリア高分子とは異なることを特徴とする請求項 6 ないし 8 のいずれかに記載の D - アミノ酸の免疫学的分析方法。

【請求項 10】

前記モノクローナル抗体の作成に用いた動物の免疫に用いた D - アミノ酸複合体のキャリア高分子はウシ血清アルブミンであり、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体のキャリア高分子は卵白アルブミンであることを特徴とする請求項 9 に記載の D - アミノ酸の免疫学的分析方法。

【請求項 11】

請求項 4 ないし 10 のいずれかに記載の D - アミノ酸の免疫学的分析方法を実行することを特徴とする D - アミノ酸の免疫学的分析装置。

【請求項 12】

(1) 請求項 1 又は 2 に記載の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体と、(2) 請求項 5 ないし 10 のいずれかに記載の免疫学的分析方法に用いる固体支持体と、請求項 6 ないし 10 のいずれかに記載の免疫学的分析方法に用いる固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体と、請求項 8 ないし 10 のいずれかに記載の免疫学的分析方法に用いる固体支持体

10

20

30

40

50

を含むELISA法用マルチウェルプレート、表面プラズモン共鳴法用センサーチップ又はラテックス凝集法用微粒子とのうち少なくとも1つとを含むことを特徴とするD-アミノ酸の分析用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗D-アミノ酸モノクローナル抗体と、該抗D-アミノ酸モノクローナル抗体を用いるD-アミノ酸の免疫学的分析方法及び分析用キットとに関する。

【背景技術】

【0002】

アミノ酸の多くは、位の不斉炭素原子についてD体とL体という2種類の立体異性体が存在する。通常の化学合成においてはL体とD体の等量混合物であるラセミ体を得られるが、タンパク質の構成単位をはじめとして自然界に存在するアミノ酸のほとんどが、L-アミノ酸である（非特許文献1参照）。しかし、近年かつて非天然型アミノ酸と呼ばれていたD-アミノ酸が、細菌だけでなく環形動物、昆虫、植物、及び脊椎動物体内に至るまで幅広く存在し、種々の重要な役割を有していることが明らかにされている（非特許文献2参照）。また、クロマトグラフィー法をはじめとする微量分析法及び光学分割法の目覚ましい技術革新により、ヒト、ラット、マウス等で遊離アミノ酸として、あるいは、ペプチド中に取り込まれたアミノ酸残基として、哺乳類体内に様々なD-アミノ酸が存在することが1980年代から明らかにされた。現在までに、D-セリン、D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-プロリン、D-ロイシン等が知られている。

【非特許文献1】J. J. Corrigan, D-Amino acids in animals, Science, 164, 142-149 (1969)

【非特許文献2】左右田健次：D-アミノ酸の生化学(I)、化学32, 517-526 (1977)

【0003】

D-セリンやD-アスパラギン酸はD体の割合が高いことから比較的研究が進んでいるD-アミノ酸である。D-セリンは脳、海馬に局在し、脳内のNMDA受容体の調節因子であることが明らかにされている。D-アスパラギン酸は精巣や松果体に局在が認められ、ホルモン分泌の制御に関与していることが示されている。その他にも、D-アラニンが下垂体前葉や膵臓の細胞に局在し、概日変動を示すこと、D-プロリンがD-アミノ酸オキシダーゼ欠損マウスの尿中に多量存在すること、D-ロイシンがマウス脳内の特定部位に局在すること等が報告されている（特許文献1参照）。さらに、一部D-アミノ酸と疾患との関連も報告されている。例えば、統合失調症やアルツハイマー病等の神経性疾患においてD-アミノ酸の血中含量や脳内含量変化が認められる。統合失調症患者にD-セリンを投与した結果、症状の改善が見られたとの報告もある。

【特許文献1】特開2005-3558号公報

【0004】

このように、D-アミノ酸は哺乳類体内において生理的役割や臨床診断上の意義を有していると考えられており、新たなD-アミノ酸の生理機能の解明が、D-アミノ酸をリード化合物とする新規薬効分子の探索を可能にし、新たな医薬品創生の基盤になることが期待されている。そこで、D-アミノ酸の詳細な機能解析のため様々な生理条件下や疾病下における試料分析が望まれている。

【0005】

従来のD-アミノ酸の分析法としては、酵素を用いる方法、キラルな試薬を用いるジアステレオマー法、キラル移動相法、ガスクロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法（特許文献2参照）、キャピラリー電気泳動法及びカラムスイッチングキラルHPLC法（非特許文献2及び3）等を利用する方法が知られている。特に、カラムスイッチングキラルHPLC法は、高感度かつ選択的で、生体内微量D-アミノ酸分析法の中で最も優れた分析法のひとつである。カラムスイッチングキラルHPLC法は、D-アラニン

10

20

30

40

50

、D - ロイシン及びD - プロリンがそれぞれ異なった組織分布を示すことを明らかにした。これらの高感度分析法の確立によって、極微量D - アミノ酸の定量が可能になり、生体内における種々のD - アミノ酸の生理機能の発見を始め、臓器局在、体内動態、疾病時の含量変化解析等が行われてきた。しかしこれらの方法は、単一のシステムで一度に1種類のアミノ酸しか分析できないため、1回の分析に長時間を要し、かつ複雑な装置を必要とする。そこで、従来技術では臨床検体等の多試料分析には限界がある。詳細なD - アミノ酸の生理機能や疾患との関連解明のために、迅速かつ簡便な分析法の開発が切望されている。

【特許文献2】特開2002 - 267649号公報

【非特許文献3】長田洋子：生体に存在するD - アミノ酸 哺乳類を中心として、札幌医誌、58, 271 - 278 (1989)

【0006】

現在、迅速性と簡便性を兼ね備えた測定法として、臨床検査の分野では主に免疫学的原理に基づく方法が利用されている。免疫学的測定法は、抗原抗体反応を利用するために特異性に優れ、目的物質の分離、精製、濃縮等の煩雑な操作を伴わず簡便であるという利点を有している。抗D - アミノ酸抗体を用いる免疫学的測定法の開発は多検体の迅速分析を可能とし、D - アミノ酸の生理機能解明に大きく貢献できると考えられる。D - アミノ酸に対する抗体はこれまでに多数報告され、市販もされているがほとんどがポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、複数のB細胞に由来する多数のイムノグロブリンを含有するために免疫動物の個体差を大きく反映し、一定品質の抗体を継続的に得ることは困難である。一方、モノクローナル抗体は半永久的に同質の抗体を得ることが可能であり、長期間にわたり同一性が求められる免疫測定法には適していると考えられる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかし、モノクローナル抗体が認識するエピトープ構造は特定の化学構造に必ずしも限定されない。例えば、あるD - アミノ酸に対して特異的に結合する抗D - アミノ酸モノクローナル抗体であっても、該D - アミノ酸の立体異性体であるL - アミノ酸その他の類似構造を有する他の化合物とも結合する場合がある。そこでD - アミノ酸の生理機能解明のためには、特定のD - アミノ酸に対する特異性が高く、かつ、類似構造を有する他の化合物に対する選択性も高いモノクローナル抗体を作成する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、特定の1種類のD - アミノ酸のみを抗原として認識し、他の化合物とは交差反応しない、抗D - アミノ酸モノクローナル抗体を提供する。本発明の抗D - アミノ酸モノクローナル抗体は、D - アスパラギン酸又はD - ロイシンのみと抗原として反応し、他の化合物とは交差反応しないモノクローナル抗体の場合がある。本発明は、本発明の抗D - アミノ酸モノクローナル抗体を産生する細胞株を提供する。

【0009】

本発明は、本発明の抗D - アミノ酸モノクローナル抗体を用いてD - アミノ酸を検出・定量する、D - アミノ酸の免疫学的分析方法を提供する。本発明のD - アミノ酸の免疫学的分析方法は、本発明の抗D - アミノ酸モノクローナル抗体と、該モノクローナル抗体の抗原であるD - アミノ酸が固定された固体支持体との反応を、D - アミノ酸含量を測定する試料中のD - アミノ酸が競合阻害することを利用する場合がある。本発明のD - アミノ酸の免疫学的分析方法においては、本発明の抗D - アミノ酸モノクローナル抗体と反応するD - アミノ酸が、キャリア高分子と結合したD - アミノ酸複合体として、固体支持体に固定される場合がある。

【0010】

本発明のD - アミノ酸の免疫学的分析方法は、(1)抗D - アミノ酸モノクローナル抗体と、D - アミノ酸複合体が固定された固体支持体と、試料とを用意するステップと、(

10

20

30

40

50

2) 前記抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体と前記試料との混合溶液を調製するステップと、(3)前記混合溶液を前記固体支持体に接触させるステップと、(4)前記固体支持体に結合した抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を検出・定量するステップとを含む場合がある。前記固体支持体に結合した抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を検出・定量するステップは、ELISA法、表面プラズモン共鳴法、ラテックス凝集法等を利用する場合がある。

【0011】

本発明の D - アミノ酸の免疫学的分析方法において、前記モノクローナル抗体の作成の際の免疫原は、D - アミノ酸とキャリア高分子とが結合した D - アミノ酸複合体である場合がある。その場合には、前記免疫原の D - アミノ酸複合体のキャリア高分子は、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体のキャリア高分子とは異なる場合がある。前記モノクローナル抗体の作成に用いた動物の免疫に用いた D - アミノ酸複合体のキャリア高分子はウシ血清アルブミンで、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体のキャリア高分子は卵白アルブミンの場合がある。

10

【0012】

本発明は、本発明の D - アミノ酸の免疫学的分析方法を実行する、D - アミノ酸の免疫学的分析装置を提供する。

【0013】

本発明は、(1)本発明の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体と、(2)該モノクローナル抗体の抗原の D - アミノ酸と、本発明の免疫学的分析方法に用いる固体支持体と、該固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体と、前記固体支持体を含む ELISA 法用マルチウェルプレート、表面プラズモン共鳴法用センサーチップ又は凝集法用微粒子とのうち少なくとも1つを含む、D - アミノ酸の分析用試薬キットを提供する。

20

【0014】

本発明におけるアミノ酸とは、不斉炭素を含まないグリシンのようなアミノ酸と、位に不斉炭素を含み、D - 体及び L - 体の立体異性体を有するアミノ酸と、位以外に不斉炭素を含むアミノ酸とを含む。本発明の L - アミノ酸は、L - アラニン、L - システイン、L - アスパラギン酸、L - グルタミン酸、L - フェニルアラニン、L - ヒスチジン、L - イソロイシン、L - リジン、L - ロイシン、L - メチオニン、L - アスパラギン、L - プロリン、L - グルタミン、L - アルギニン、L - セリン、L - スレオニン、L - バリン、L - トリプトファン及び L - チロシンからなる 19 種類の L - アミノ酸を含むがこれらに限定されない。本発明における D - アミノ酸は、D - アラニン、D - システイン、D - アスパラギン酸、D - グルタミン酸、D - フェニルアラニン、D - ヒスチジン、D - イソロイシン、D - リジン、D - ロイシン、D - メチオニン、D - アスパラギン、D - プロリン、D - グルタミン、D - アルギニン、D - セリン、D - スレオニン、D - バリン、D - トリプトファンの D - チロシンからなる 19 種類の D - アミノ酸を含むがこれらに限定されない。本発明の D - アミノ酸は、D - アスパラギン酸又は D - ロイシンの場合がある。

30

【0015】

本発明のモノクローナル抗体が交差反応しない「他の化合物」とは、本発明のモノクローナル抗体が反応する特定の 1 種類の D - アミノ酸以外の全ての化合物をいう。前記「他の化合物」には、前記特定の 1 種類の D - アミノ酸と類似する化合物が含まれる。ここで前記特定の 1 種類の D - アミノ酸と類似する化合物には、該特定の D - アミノ酸以外の D - アミノ酸と、生体の主要な構成要素であるグリシン及び前記 19 種類の L - アミノ酸とを含むが、これらに限られない。例えば、D - ロイシンと類似する化合物は、イソロイシンのエピマーである、L - アロイソロイシン (L - a l l o - I l e) 及び D - アロイソロイシン (D - a l l o - I l e) を含む。したがって本発明のモノクローナル抗体が D - ロイシンのみと反応する場合には、該モノクローナル抗体は、D - ロイシン以外の D - アミノ酸と、グリシン及び前記 19 種類の L - アミノ酸と反応しないばかりが、L - アロイソロイシン及び D - アロイソロイシンとも反応しない。

40

【0016】

50

本発明のD-アミノ酸は、キャリア高分子と結合した複合体として、本発明のモノクローナル抗体の作成、及び/又は、本発明のD-アミノ酸の免疫学的分析方法の実施に用いられる場合がある。本明細書では、D-アミノ酸又はL-アミノ酸とキャリア高分子との複合体を、それぞれ、(D-AA)-POL又はAA-POLと表す。単にアミノ酸-POLと表す場合には、いずれかのアミノ酸とキャリア高分子との複合体を意味する。ここでアミノ酸が特定のアミノ酸の場合には、AA又はD-AAの代わりに慣用の3文字表記で表される。例えば、D-アスパラギン酸とキャリア高分子とが結合した複合体は、(D-Asp)-POLと表される。また、複数のアミノ酸がハイフンで結ばれている場合には、左側のアミノ酸のカルボキシル基と右側のアミノ酸のアミノ基とがペプチド結合した化合物であることを表す。例えば、Gly-(D-Asp)は、グリシンのカルボキシル基とD-アスパラギン酸のアミノ基とがペプチド結合したジペプチドである。ここでキャリア高分子は、ハプテンに免疫原性を付与することのできるいずれかの高分子をいい、タンパク質、多糖類等の生体高分子でも、ポリリジン等の合成高分子でもかまわない。本発明の複合体のキャリア高分子に用いられるタンパク質は、ウシ血清アルブミン、ニワトリオバルブミン及びスカシ貝ヘモシアニンを含むがこれらに限られない。本発明の複合体にウシ血清アルブミン、ニワトリオバルブミン又はスカシ貝ヘモシアニンを用いるときには、本発明の複合体はそれぞれ(D-AA)-BSA、(D-AA)-OVA又は(D-AA)-KHLと表される。

10

【0017】

本発明の複合体におけるD-アミノ酸又はL-アミノ酸とキャリア高分子とは、アミノ酸のいかなる官能基とキャリア高分子との間で結合されてもかまわない。例えば、アミノ酸のアミノ基又はカルボキシル基とキャリア高分子のいずれかの側鎖との間を適当な架橋剤を介して共有結合する場合がある。前記架橋剤は、グルタルアルデヒド(GA)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)を含むがこれらに限られない。本発明のD-アミノ酸とキャリア高分子との複合体は、D-アミノ酸の免疫原性を高めるためにさまざまな保護、修飾等が行われる場合がある。また、前記架橋剤による架橋反応の後で、アミノ酸とキャリア高分子との連結部分の免疫原性を低下させることによりD-アミノ酸に対する免疫原性を高める場合もある。例えば、前記D-アミノ酸とキャリアタンパク質とのグルタルアルデヒドによる架橋反応では、第一級アミンとアルデヒド又はケトンとの縮合反応により生成する窒素と炭素との二重結合を含む化合物であるシッフ塩基を生じることが知られている。前記シッフ塩基の二重結合を還元せずに前記D-アミノ酸複合体で動物を免疫した場合、二重結合部位に対する非特異的な抗体が多く産生されることが知られている。したがって前記D-アミノ酸複合体は、前記D-アミノ酸と前記キャリアタンパク質との結合後に水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₃CN)等の還元剤で還元させ前記二重結合を単結合とし、D-アミノ酸以外の部分の免疫原性を低減させる場合がある。本発明のアミノ酸とキャリアタンパク質とがグルタルアルデヒドによって架橋され、その後架橋部分が水素化ホウ素ナトリウムにより還元された複合体は、(D-AA)-GA-BSA、(D-AA)-GA-OVA、(D-AA)-GA-KHL等と表される場合がある。

20

30

40

【0018】

本発明のモノクローナル抗体とは、動物の単一の抗体産生細胞クローンに由来する抗体をいう。発明のモノクローナル抗体は、D-アミノ酸とキャリア高分子との複合体を免疫原として免疫された動物の抗体産生細胞に由来する場合がある。前記動物には、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ等の哺乳動物が含まれるがこれらに限られない。前記抗体産生細胞は脾細胞の場合がある。本発明のモノクローナル抗体は、免疫された動物の抗体産生細胞と、同種又は異種の動物由来のミエローマ細胞との細胞融合の結果得られるハイブリドーマ細胞株から産生される場合がある。また本発明のモノクローナル抗体は、免疫された動物の抗体産生細胞から調製したcDNAライブラリから単離した抗体遺伝子cDNAの抗原結合部分に由来する組換え抗体の場合もある。前記組換え抗体は、D-アミノ酸とのみ

50

反応するものであれば、軽鎖又は重鎖のいずれかの抗原結合部分のみに由来する組換え抗体であってもよく、他の抗原に対する抗原結合部分との融合抗体であってもよい。したがって、本発明の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を産生する細胞株は、前記ハイブリドーマ細胞株と、抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体の組換え抗体を発現するように該組換え抗体遺伝子の形質転換又はトランスフェクションを施された細菌、酵母、菌類、植物又は動物の細胞とを含む。

【0019】

本発明のモノクローナル抗体が特定の 1 種類の D - アミノ酸を抗原として認識するとは、該 D - アミノ酸の試料中の濃度を競合 E L I S A 法で定量することができることをいう。すなわち、抗原の D - アミノ酸とキャリア高分子との複合体を吸着させた固相に前記モノクローナル抗体を接触させた後、洗浄し、固相の前記 D - アミノ酸と結合したモノクローナル抗体に、該モノクローナル抗体に対する酵素標識 2 次抗体を接触させ、酵素の発色反応の結果を吸光度で測定する際に、前記 D - アミノ酸が遊離状態で存在する試料を競合に用いると、0.1 mM ないし 10 mM、好ましくは 0.05 mM ないし 10 mM、最も好ましくは 0.016 mM ないし 16 mM の濃度範囲内で濃度依存的な吸光度の減少が認められ、これらの範囲内で試料中での前記 D - アミノ酸の濃度を定量することが可能であることをいう。

10

【0020】

また、本発明のモノクローナル抗体がある化合物と交差反応しないとは、前記 E L I S A 法を行う際に、抗原の D - アミノ酸とキャリア高分子との複合体を固相に吸着させた場合の吸光度が、当該化合物とキャリア高分子との複合体を固相に吸着させた場合の吸光度より少なくとも 10 倍、好ましくは 20 倍以上大きいこという。この交差反応の有無を判断するための E L I S A 法の実験は、前記 D - アミノ酸について 0.1 mM ないし 10 mM、好ましくは 0.05 mM ないし 10 mM、最も好ましくは 0.016 mM ないし 16 mM の濃度範囲内で濃度依存的な吸光度の減少が認められる条件で行われるものとする。

20

【0021】

本発明の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を用いて D - アミノ酸を検出・定量する、D - アミノ酸の免疫学的分析方法は、免疫組織化学的方法、光学顕微鏡又は電子顕微鏡による免疫細胞化学的方法、ウェスタンブロッティング法、E L I S A 法その他、微粒子又はナノ微粒子の凝集による比濁度の変化に基づく分析方法が含まれるが、これらに限られない。本発明の D - アミノ酸の免疫学的分析方法には、競合的な結合に基づく方法と非競合的な結合に基づく方法とが含まれる。D - アミノ酸を検出・定量するために、本発明の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体が、ビオチンのような低分子リガンド、酵素、放射性同位元素、色素等で標識される場合があり、前記モノクローナル抗体に対する 2 次抗体が、前記ビオチンのような低分子リガンドと特異的に結合するアビジンのような生体高分子かが、酵素、放射性同位元素、色素等で標識される場合がある。

30

【0022】

本発明 D - アミノ酸の免疫学的分析方法は、前記 D - アミノ酸複合体が固定された固体支持体を用いる場合がある。前記固体支持体は、前記 D - アミノ酸複合体の D - アミノ酸の免疫原性を失わず固定できるものであればよく、さまざまな材料又は形状の固体を利用することができる。前記固体支持体は、ポリマー材料、ガラス、セラミック、ゲル、膜、天然繊維、シリコン、金属およびこれらの複合材料を含むがこれらに限定されない材料から加工される場合がある。前記固体支持体は、マルチウェルプレート、マイクロタイタープレート、マルチアレイチップ、センサーチップ、ラテックス凝集法用微粒子又はナノ微粒子のような、自動診断システムによって取り扱うのに適する形状が含まれる。

40

【0023】

本発明の D - アミノ酸複合体は、静電気による吸着により前記固体支持体上に固定される場合のほか、前記 D - アミノ酸複合体のアミノ基と前記固体支持体のカルボキシル基とのアミド結合により前記固体支持体上に固定される場合がある。前記 D - アミノ酸複合体の前記固体支持体上への固定を促進するために、前記 D - アミノ酸複合体は、前記固体支

50

持体上への固定の前に予めアミノ基が導入される場合がある。アミノ基の導入のための1つの手法は、D-アミノ酸とキャリアタンパク質との架橋反応時にヒドラジン(NH₂NH₂)を共存させることによりアミノ基で修飾されたD-アミノ酸複合体を作製することである。前記アミノ基で修飾されたD-アミノ酸複合体は、アミノ基導入型D-アミノ酸複合体ともいい、(D-AA)-POL複合体(+NH₂)、(D-AA)-GA-POL複合体(+NH₂)、(D-AA)-GA-OVA複合体(+NH₂)、(D-Asp)-GA-OVA複合体(+NH₂)等と表される。

【0024】

本発明の競合的な結合を利用する方法の(1)前記固体支持体を用意するステップは、前記抗D-アミノ酸モノクローナル抗体と、前記D-アミノ酸キャリア高分子複合体が固定された固体支持体と、前記試料とが、手作業により、あるいは、自動的に用意される。

10

【0025】

本発明の競合的な結合を利用する方法の(2)D-アミノ酸を含む試料と前記抗D-アミノ酸モノクローナル抗体との混合溶液を調製するステップでは、試料中のD-アミノ酸と前記抗D-アミノ酸モノクローナル抗体とが抗原抗体反応を行う。したがって、ステップ(2)には、試料中のD-アミノ酸と前記抗D-アミノ酸モノクローナル抗体との間の抗原抗体反応が完了するのに十分な条件で前記混合溶液をインキュベーションすることを含む。

【0026】

本発明の競合的な結合を利用する方法の(3)前記混合溶液を前記固体支持体に接触させるステップでは、前記固体支持体に固定されたD-アミノ酸複合体のD-アミノ酸と、ステップ(2)で試料中のD-アミノ酸と反応しなかった抗D-アミノ酸モノクローナル抗体とが抗原抗体反応を行う。したがって、ステップ(3)には、前記固体支持体に固定されたD-アミノ酸複合体のD-アミノ酸と、試料中のD-アミノ酸と反応しなかった抗D-アミノ酸モノクローナル抗体との間の抗原抗体反応が完了するのに十分な条件で前記混合溶液をインキュベーションすることを含む。

20

【0027】

本発明の競合的な結合を利用する方法の(4)前記固体支持体に結合した抗D-アミノ酸モノクローナル抗体を検出・定量するステップは、前記固体支持体に結合しなかった抗D-アミノ酸モノクローナル抗体を洗浄により除去するステップを含む場合がある。また、前記抗D-アミノ酸モノクローナル抗体は、該モノクローナル抗体又は2次抗体等の標識により検出・定量される。定量するステップ(4)は、既知の濃度のD-アミノ酸を含む試料を用いて固体支持体のD-アミノ酸と反応した抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の量を数値化してプロットした検量線を作成するステップと、未知の濃度のD-アミノ酸を含む試料についてステップ(1)ないし(3)を行って、前記固体支持体に結合した前記抗D-アミノ酸モノクローナル抗体量から前記検量線を用いて試料中のD-アミノ酸濃度を算出するステップとを含む。

30

【0028】

本発明の検量線とは、試料中のD-アミノ酸濃度と、固体支持体のD-アミノ酸と反応した抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の量とを対応づけるグラフ又は関係式をいう。検量線の作成に用いる濃度既知のD-アミノ酸を含む試料は少なくとも2点あればよいが、定量精度確保の観点から3点又は4点以上であることが望ましい。

40

【0029】

前記固体支持体のD-アミノ酸と反応した抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の量を数値化する手法は特に限定されないが、以下に説明するELISA法及び表面プラズモン共鳴(SPR)法のほか、ラテックス凝集法が含まれる。

【0030】

ELISA法は、抗D-アミノ酸モノクローナル抗体に対する酵素標識2次抗体を前記モノクローナル抗体に結合させ、前記標識酵素の基質を添加し、酵素反応産物を検出することにより前記目的の抗体を検出・定量する手法である。2次抗体を用いる代わりに、前

50

記モノクローナル抗体にビオチンのような低分子リガンドを結合させておいて、該低分子リガンドと特異的に結合するアビジンのような生体高分子を用いる場合がある。前記標識に用いられる酵素標識には、ペルオキシダーゼ (P O D)、ベータガラクトシダーゼ (- g a l)、アルカリホスファターゼ (A L P) 等があり、適当な基質を用いる発色反応や化学発光反応によって検出される。

【 0 0 3 1 】

S P R 法は、表面プラズモン共鳴 (s u r f a c e p l a s m o n r e s o n a n c e、S P R) とよばれる光学現象を利用して、固体支持体上に固定化した分子と相互作用の相手となる分子との、固体支持体上における特異的相互作用を微細な質量変化として測定する手法である。この手法を適用することで、固体支持体に固定化された D - アミノ酸複合体に結合した抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体の量を、固体支持体の質量変化として数値化することができる。S P R 法を実施するためのシステムとしては、例えば B I A c o r e システム (B I A c o r e、ウプサラ、スウェーデン) が市販されている。

10

【 0 0 3 2 】

ラテックス凝集法では、固体支持体であるラテックス等の微粒子又はナノ微粒子に結合したモノクローナル抗体の量に応じた微粒子の凝集反応の程度を比濁度の変化として分光光度計で測定する。

【 0 0 3 3 】

ハプテン分子をキャリアタンパク質に結合させて免疫した場合、キャリアタンパク質に対する抗体も産生される。したがって本発明の競合的な結合を利用する方法では、キャリアタンパク質に反応する抗体の存在により D - アミノ酸の検出・定量の精度が低下する可能性を排除するために、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体を構成するキャリアタンパク質は、前記哺乳動物の免疫に用いる D - アミノ酸複合体を構成するキャリアタンパク質と異なる場合がある。好ましくは、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体を構成するキャリアタンパク質は卵白アルブミンであり、前記哺乳動物の免疫に用いる D - アミノ酸複合体を構成するキャリアタンパク質はウシ血清アルブミンである場合がある。

20

【 0 0 3 4 】

本発明は、前記のいずれかの D - アミノ酸の免疫学的分析方法を実施できるように構成される、D - アミノ酸の免疫学的分析装置を提供する。前記装置には、固体支持体に結合したモノクローナル抗体の量を検出・測定するための分光光度計、蛍光分光光度計、表面プラズモン共鳴測定器等の測定ユニット、試薬、洗浄液及び / 又は試料の注入及び又は除去のためのディスペンサユニット、E L I S A 用マルチウェルプレートや表面プラズモン共鳴用センサーチップのハンドリングのためのロボットアームユニット、これらの制御のための制御ユニット等が含まれる。

30

【 0 0 3 5 】

本発明は、本発明の抗 D - アミノ酸モノクローナル抗体を含む D - アミノ酸の分析用試薬キットも提供する。前記キットには、前記モノクローナル抗体のほか、該モノクローナル抗体の抗原 D - アミノ酸と、該 D - アミノ酸とキャリア高分子とが結合した D - アミノ酸複合体と、該 D - アミノ酸複合体が固定された固体支持体とのうち少なくとも 1 つを含む場合がある。前記 D - アミノ酸複合体が固定された固体支持体は、前記 D - アミノ酸複合体がコーティングされた基質を有する E L I S A 法用マルチウェルプレート、前記 D - アミノ酸複合体が固定された表面プラズモン共鳴法用センサーチップ及び / 又は前記 D - アミノ酸複合体が固定された凝集法用の微粒子又はナノ微粒子の場合がある。

40

【 0 0 3 6 】

キャリアタンパク質に反応する抗体の存在により D - アミノ酸の検出・定量の精度が低下する可能性を排除するために、前記分析用キットでは、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体を構成するキャリアタンパク質は、前記哺乳動物の免疫に用いる D - アミノ酸複合体を構成するキャリアタンパク質と異なる場合がある。さらに好ましくは前記分析用キットでは、前記固体支持体に固定される D - アミノ酸複合体を構成するキャリア

50

タンパク質は卵白アルブミンであり、前記哺乳動物の免疫に用いるD-アミノ酸複合体を構成するキャリアタンパク質はウシ血清アルブミンである場合がある。

【発明の効果】

【0037】

本発明の抗D-アミノ酸モノクローナル抗体は極めて特異性が高いだけでなく、抗原のD-アミノ酸以外の他の化合物との交差反応が非常に低いため、該抗D-アミノ酸モノクローナル抗体を用いるD-アミノ酸の免疫学的分析方法によれば、迅速かつ簡便に、また高精度でD-アミノ酸を分析することができ、多検体の分析も可能となる。前記免疫学的分析方法はELISA法、SPR法等さまざまな手法を適用して実施可能であり、完全自動化への応用も可能である。したがって本発明は、D-アミノ酸の生理的意義及び機能の解明を含むD-アミノ酸研究に大きく貢献することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

以下に具体的な実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの具体例により何ら制限されるものではない。

【0039】

実施例で使用する実験動物及び動物細胞は以下のように準備した。BALB/cマウス(SPF、メス)及びウイスターラット(SPF、オス)は、九動株式会社(熊本)より購入し、1週間以上九州大学薬学部内の動物舎において飼育した後で、実験に供した。飼育条件は明期7:00~19:00、暗期19:00~7:00とし、水及び食餌は自由摂取させた。食餌はNMFダイエット(オリエンタル酵母、東京)を使用した。なお、各動物実験は九州大学大学院薬学研究院等動物実験委員会の承諾を受けて遂行された。ミエローマ細胞は、理研バイオリソースセンター(つくば、日本)より供与されたsp2/0-Ag14株を使用した。

20

【実施例1】

【0040】

本実施例では、D-アミノ酸複合体、ハイブリドーマ細胞株及び抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の作製について示す。

【0041】

材料及び方法

30

1-1 D-アミノ酸複合体の作製及びマウスへの免疫

1-1-1 マウスの免疫に使用する(D-AA)-GA-BSA複合体の作製

種々のD-アミノ酸を用いた(D-AA)-GA-BSA複合体を以下のように作製した。20mL遮光硝子バイアルにBSA12mgを秤量し、62.5mM D-アミノ酸含有0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を1.6mL加え溶解させた。この溶液に2.5%グルタルアルデヒド(GA)水溶液0.4mLを加え、室温で2時間振盪撹拌した後、4mg/mLの水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)水溶液2.0mLを加え、室温で1時間振盪撹拌した。反応液を透析膜(WMCO 3,500、スペクトラムメディカルインダストリーズ、インク.、米国カリフォルニア州ランチョドミンゲズ)に入れ、PBSに対して4°C下一晩透析して(D-AA)-GA-BSA複合体溶液を得た。前記複合体溶液は分注して使用時まで-20°Cで保存した。一例として、図1に(D-Asp)-GA-BSA複合体の作製方法と、作製の際に起こる反応の模式図を示す。

40

【0042】

1-1-2 MALDI-TOF-MSによる(D-AA)-GA-BSA複合体の分子量の測定

1-1-1で調製した反応液を透析膜(WMCO 3,500、スペクトラムメディカルインダストリーズ、インク.)に入れ、ミリQ水で4°C下一晩透析した。得られた透析内液10μLをマトリックス溶液(飽和量のシナピン酸をCH₃CN/H₂O/TFA=50/50/0.1(v/v/v))に加え、1分間撹拌した後5000gで遠心分離し

50

て得られた上清) 40 μ L と混合して攪拌した後、1 μ L をMSプレートに塗布し、MALDI-TOF-MSで分析した。測定はレーザー強度2300で行った。

【0043】

1-1-3 マウスへの免疫

免疫は2週間間隔で計3回行った。1-1-1で調製した(D-AA)-GA-BSA複合体溶液0.7 mLにPBS 0.7 mL及びフロイント完全アジュバント(ACF) 1.4 mLを加え攪拌し、油中水滴型エマルジョンを得た。このエマルジョン200 μ Lを6週齢のBALB/cマウス(SPF、メス)にペントバルビタール(50 mg/kgを腹腔内投与)麻酔下で背部皮下に複数箇所に分けて投与した。2回目の免疫は、フロイント不完全アジュバント(FIA)を用いて、初回と同様の方法でエマルジョンを作製し、200 μ Lをマウス背部皮下に投与した。抗体の産生をELISA法により確認した後、3回目の免疫を行った。前記(D-AA)-GA-BSA複合体溶液50 μ L(無希釈)を無麻酔下で腹腔内投与した。

10

【0044】

1-1-4 ELISA法用アミノ酸-GA-OVA複合体の作製

ELISA法に供試するための、種々のアミノ酸を用いたアミノ酸-グルタルアルデヒド架橋-卵白アルブミン複合体(以下、「アミノ酸-GA-OVA複合体」という。)を以下のように作製した。OVA 6 mgを10 mLの遮光硝子バイアルに秤量し、62.5 mMアミノ酸含有0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 0.8 mL及び2.5% GA水溶液0.2 mLを加えて室温で2時間振盪攪拌した後、4 mg/mL NaBH₄水溶液1.0 mLを加えて1時間振盪攪拌し、アミノ酸-GA-OVA複合体溶液とした。なお、D-Cys、D-Tyrについては0.1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 10.0)を用いて31.25 mM溶液を調製し、この溶液0.8 mLにOVA 3 mg及び1.25% GA水溶液0.2 mLを加えて2時間振盪攪拌した後、2 mg/mL NaBH₄水溶液1.0 mLを加えて1時間振盪攪拌することにより作製した。

20

【0045】

1-2 抗体産生細胞株の樹立と抗体の特異性評価

1-2-1 細胞融合による抗体産生細胞株の樹立

図4に、抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の作製方法の概略図を示す。免疫後のマウスをエーテル麻酔下で断頭し、70%(v/v)エタノール水溶液に全身を浸して殺菌した後、クリーンベンチ内で脾臓を摘出した。脾臓は37°Cに加温したDMEM 5 mL(37°C)を入れたペトリ皿4枚中で順次脂肪片、組織片等を除去し洗浄した。5枚目のペトリ皿中でスライドガラスを用いて脾臓を磨りつぶし、脾細胞の懸濁液を得た。得られた懸濁液を15 mLの遠沈管に移し5分間静置することで大きな組織片等を沈殿させた後、上清を50 mL遠沈管に移した。1200 rpmで5分間遠心後上清を除去し、DMEM(37°C)を10 mL添加して懸濁し、再び5分間遠心(1200 rpm)した。この操作を3回繰り返して碑細胞を洗浄した後、上清を除去した。血球計測装置を用いて碑細胞数及び対数増殖期のミエローマ細胞(sp2/0-Ag14)数を測定し(各細胞の懸濁液0.1 mLをPBSで50倍して測定した。)、ミエローマ細胞懸濁液を碑細胞:ミエローマ細胞=4:1になるように加えた。さらにDMEM(37°C)を加えて全量10 mLとして懸濁し、5分間遠心(1200 rpm)後上清を除去した。ペレットを崩して層状にした後、遠沈管の壁を伝わらせながら1 mLの50%PEG 1500(75 mM HEPES(pH 8.0、(w/v)、ロシュ)を1分間かけて滴下した。遠沈管を1分間掌の中で静置した後、9 mLのDMEM(37°C)を5分間かけて滴下した。5分間遠心(1200 rpm)して上清を除去した後、15% FCS含有DMEM(v/v、37°C) 100 mLに懸濁させ、ピペットを用いて96穴培養プレートに各ウェル1滴(D-Leu)又は2滴(D-Asp)ずつ分注しCO₂インキュベーター(37°C、5% CO₂)で培養した。

30

40

【0046】

細胞融合の翌日、各ウェルに3倍濃度のHAT培地(10% FCS、300 μ M ヒボキ

50

サンチン、 $1.2 \mu\text{M}$ アミノプテリン、 $48 \mu\text{M}$ チミジン含有DMEM)を1滴ずつ(D-Asp)、1.5倍濃度HAT培地(10%FCS含有)2滴(D-Leu)ずつを加え、さらに培養した。融合から約2週間後に各ウェルから培養上清を採取し、ELISA法によりD-Asp又はD-Leuに対する抗体を産生する細胞のスクリーニングを行った。ELISA法は(D-Asp)-GA-OVA複合体又は(D-Leu)-GA-OVA複合体を固定化したプレートを用い、採取した培養上清中の抗体結合を1-2-5と同様の方法で評価した。発色が強いウェルを陽性とし、これら陽性ウェルの細胞培養液を96穴培養プレートから24穴培養プレートにスケールアップした(D-Asp:21ウェル、D-Leu:27ウェル)。数日培養した後、プレートに固定化された各種AA-GA-OVA複合体又は(D-AA)-GA-OVA複合体に対する交叉反応性をELISA法により検討した。さらに遊離体に対する抗体の反応性を検討するために、競合法による吸光度変化を測定した。測定の結果(D-Asp)-GA-OVA複合体又は(D-Leu)-GA-OVA複合体のみに特異的結合を認め、遊離体を認識すると示唆されたウェルを選択して限界希釈法による細胞のクローニングを行った。限界希釈は24穴プレートの培養液の5n倍(n=1-8)希釈系列を作製し、各希釈系列を96穴培養プレートにピペットを用いて1滴ずつ分注した。2週間培養後、(D-Asp)-GA-OVA複合体又は(D-Leu)-GA-OVA複合体に対する結合を指標とするスクリーニングをELISA法により行い、前記複合体に対して結合が認められるウェルの中で単コロニーからなるウェルを選択し、再度限外希釈法によりクローニングを行った。2回目のクローニングの際にHAT培地からHT培地(10%FCS、 $100 \mu\text{M}$ ヒポキサンチン、 $16 \mu\text{M}$ チミジン含有DMEM)に変更した。2週間培養した後、単コロニーからなるウェルを2mL、5mL、10mLの培養プレートに順次スケールアップし、モノクローナル抗体産生株を得た。なお、培地はスケールアップの際にDMEM(10%FCS含有)に変更した。

10

20

30

40

50

【0047】

1-2-2 抗体精製

1-2-1で得た細胞株を5%FCS含有DMEM(v/v)を用いて継代培養し、培養液量を約360mLとした。培地を無血清培地(細胞培養用培地添加剤RD-1(極東製薬工業、東京)をDMEM1Lに溶解; $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ インシュリン、 $35 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $20 \mu\text{M}$ エタノールアミン、 25nM セレン含有DMEM)に置換して7-10日間無継代培養した。得られた培養上清をフィルター(MF(商標)-メンブレンフィルター、 $0.45 \mu\text{m}$ HA、ミリポア、米国マサチューセッツ州ベッドフォード)濾過し、プロテインGカラム(ハイトラッププロテインG HPカラム、5mL、アマシャムバイオサイエンスコーポレーション、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ)を用いて 4°C でアフィニティー精製した。プロテインGカラムは 10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で安定化した後、濾過した培養上清を一晩かけて送液した。溶出液の吸光度(280nm)が0.05以下になるまで 10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)でカラムを洗浄し、その後 0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液(pH2.7)を用いて抗体を溶出した。溶出液は 1M トリス塩酸緩衝液(pH9.0)1.4mLを入れた遠沈管に5mLずつ分取し、分取した画分の吸光度(280nm)が、0.03以上の画分を限外濾過膜(50,000MWCO、ザルトリウス(東京))を用いて濃縮後、ミリQ水30mLで洗浄し、凍結乾燥させた。

【0048】

1-2-3 抗体量の定量

精製した抗体のタンパク質濃度は、プロテインアッセイCBB試薬(ナカライテスク、京都)を用いて、BSAを用いて作成した検量線を使用して定量した。抗体溶液又は、BSA溶液 $10 \mu\text{L}$ をELISAプレートに添加した後、水で5倍希釈したCBB試薬 $200 \mu\text{L}$ を加え、10分間攪拌した後の 595nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0049】

1 - 2 - 4 抗体アイソタイピング

抗体のアイソタイプはマウスタイパーサブアイソタイピングキット（バイオラッド、米国カリフォルニア州ハーキュルズ）を用いて決定した。15 mLの遠沈管にキット付属のアイソタイピングスティックを1本入れ、作製した抗体溶液（約1 µg/mL）とペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体溶液をキットの指示に従い混合し、そのうち3 mLを遠沈管に入れ、15分間室温で撹拌した。5 mLのT-PBSで2回撹拌洗浄した後、キット付属の基質溶液（4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素水との混合液）3 mLを加え、15分反応させた。5 mLの水で2回撹拌洗浄した後、アイソタイプを判定した。

【0050】

1 - 2 - 5 抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の特異性評価（アミノ酸-GA-OVA複合体に対する認識能評価）

図6に、抗D-Aspモノクローナル抗体の交叉反応性の評価のための直接ELISA法の手順を示す。1-1-4で作製したアミノ酸-GA-OVA複合体の50 mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.6）溶液（1.5 µg/mL）100 µLをELISAプレートに添加し、1時間静置することでプレート上に固定化した。T-PBSで3回洗浄した後、5%スキムミルクPBS溶液を300 µL加え、25°Cで1時間ブロッキングした。洗浄後、精製した抗体（1.0 µg/mL）のT-PBS溶液100 µLを添加した。1時間後洗浄し、T-PBSで1000倍希釈した、POD標識抗マウスIgG山羊抗体溶液を100 µLを添加し、25°Cで1時間静置した。洗浄後、基質溶液（0.1 Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）0.3 mg/mL ABTSと0.003% H₂O₂を含有）を添加し、15分後の吸光度（405 nm）をマイクロプレートリーダーにより測定した。

【0051】

1 - 2 - 6 抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の特異性評価（遊離アミノ酸に対する認識能評価）

1-1-4で作製したアミノ酸-GA-OVA複合体の50 mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.6）溶液（1.5 µg/mL）100 µLをELISAプレートに添加し、1時間静置することでプレート上に固定化した。T-PBSで3回洗浄した後、5%スキムミルクPBS溶液を300 µL加え、室温で1時間ブロッキングした。洗浄後、アミノ酸のT-PBS溶液（0.5 mM、20 µL）、精製した抗体（1.25 µg/mL）のT-PBS溶液80 µLを添加して撹拌した。1時間後洗浄し、T-PBSで1000倍希釈した、POD標識抗マウスIgG山羊抗体溶液を100 µLを添加し、1時間静置した。洗浄後、基質溶液（0.1 Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）0.3 mg/mL ABTSと0.003% H₂O₂を含有）を添加し、15分後の吸光度（405 nm）をマイクロプレートリーダーにより測定した。

【0052】

結果及び考察

1 - 3 抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の作製

1 - 3 - 1 (D-AA)-GA-BSA複合体の作製

D-Aspについての図1に示す方法を各種のアミノ酸に適用して、(D-AA)-GA-BSA複合体を作製した。D-アミノ酸のBSAへの結合は、MALDI-TOF-MSを用いて確認した。図2に示すようにGA-BSA複合体は75 kDa、(D-Asp)-GA-BSA複合体は77 kDaであり、約20個のD-Asp分子がBSAに結合していると考えられた。また、同様の方法により(D-Ser)-GA-BSA複合体は約60個、(D-Pro)-GA-BSA複合体は約50個、(D-Leu)-GA-BSA複合体は約60個（図3）のD-アミノ酸分子が各々BSAに結合していると考えられた。

【0053】

1 - 3 - 2 マウスへの免疫

マウスへの2回目の(D-AA)-GA-BSA複合体投与後、抗血清の各種アミノ酸

10

20

30

40

50

に対する結合性を、免疫原とは異なるキャリアタンパク質(OVA)と結合させたアミノ酸-GA-OVA複合体を抗原として用いたELISA法を用いて評価した。その結果、(D-Asp)-GA-BSA複合体を免疫原として投与したマウスでは、D-AspとL-Aspとを明確に識別し、他のアミノ酸に対してほとんど交叉反応性を示さない抗体を産生していると考えられた。D-LeuについてはD-Val、D-Ile等の構造類似アミノ酸と交叉反応性を有していたが、D-LeuとL-Leuとを明確に区別する抗体の産生が強く示唆された。一方D-Serに関しては、(D-Ser)-GA-BSA複合体と反応する抗体は認められたが、(D-Ser)-GA-OVA複合体と反応する抗体はほとんど産生されていなかった。またD-Proに関しては反応性が低いことに加え、D-Alaに対して強い交叉反応性を有していた。以上の結果より、十分な抗体産生が認められ、D体とL体とを明確に区別すると考えられるD-Asp及びD-Leuについてモノクローナル抗体の作製を試みた。

10

【0054】

1-3-3 抗体産生細胞株の樹立

細胞融合法による抗体産生細胞株の樹立を試みた。最終免疫から3日後にマウスから脾臓を摘出し、脾細胞とミエロマ細胞(sp2/0-Ag14)とを融合した。HAT選択培地を用いて培養した後、ELISA法を用いてスクリーニングを行い、目的の抗体を産生している細胞を選抜した。(D-Asp)-GA-OVA複合体又は(D-Leu)-GA-OVA複合体を固定化したプレートに培養上清を加え、各々約900個又は1400個のウェルについて抗体のプレートへの結合を評価した結果、D-Aspでは21個、D-Leuでは27個の陽性ウェルが認められた。さらに陽性ウェルについて、構造の類似するアミノ酸に対する認識能を同様のELISA法を用いて検討した。D-Aspについては、(D-Asp)-GA-OVA複合体と(L-Asp)-GA-OVA複合体とを明確に区別している7系統の細胞について評価した結果、1系統でD-Asnとの交叉反応性が認められたものの、6系統についてはほとんど交叉反応性を示さないことが明らかになった。D-Leuについては(D-Leu)-GA-OVA複合体と(L-Leu)-GA-OVA複合体とを明確に区別する抗体を産生していると考えられた6系統の細胞について、D-all-Ileを含む構造類似アミノ酸を抗原として選択性を評価した。

20

【0055】

これらのアミノ酸について交叉性を検討した結果、図5に示すように5系統ではD-all-Ileをはじめとする構造類似アミノ酸に対して交叉反応性を有していたが、1系統はほとんど交叉反応を示さなかった。交叉反応性を示さなかった細胞系統について遊離D-Asp又はD-Leuに対する認識能の評価を行った。(D-Asp)-GA-OVA複合体又は(D-Leu)-GA-OVA複合体を固定化したプレートを用い、競合ELISA法により遊離D-Asp及びD-Leuに対する反応性を検討した。その結果、D-Asp又はD-Leuの添加により、抗体のプレートへの結合阻害に基づく吸光度減少が観察されたことから、これらの細胞が遊離体を認識する抗体を産生していることが明らかになった。当該細胞について、39種のアミノ酸に対する交叉反応性を検討した後、2度のクローニングを行い抗遊離D-アミノ酸モノクローナル抗体産生細胞株を得た。抗体は、樹立した抗体産生細胞培養液からプロテインGアフィニティーカラムを用いて精製した。

30

40

【0056】

1-3-4 抗体アイソタイピング

アイソタイプをマウス・タイパー・サブアイソタイピング・キット(バイオ・ラッド、米国カリフォルニア州ハークルズ)を用いて決定した。その結果、抗D-Asp抗体、抗D-Leu抗体共に重鎖が1、軽鎖が2であった。

【0057】

1-4 抗D-アミノ酸モノクローナル抗体の特異性評価

1-4-1 抗D-Aspモノクローナル抗体

50

作製した抗D - アミノ酸モノクローナル抗体の特異性を、種々のアミノ酸を用いて作成したアミノ酸 - GA - OVA複合体を用いて図6に示す直接ELISA法により評価した。アミノ酸 - GA - OVA複合体を結合させたELISAプレートに精製した各抗体を添加し、抗体結合量を吸光度により評価した。その結果、図7に示すように抗D - Aspモノクローナル抗体は、(D - Asp) - GA - OVA複合体に対して高い発色が認められた一方で、L - Aspを始めとする他のアミノ酸によるアミノ酸 - GA - OVA複合体に対してはほとんど発色が認められなかった。このことから、本抗体はD - Aspのみを強く認識する特異性の高い抗体であると考えられた。さらに、競合ELISA法により39種の遊離型アミノ酸に対する反応性を検討した結果、本抗体は遊離D - Aspのみを特異的に認識することが明らかになった。本抗体を産生するハイブリドーマ細胞株(マウス - マウス ハイブリドーマ DASPZH - 0703)は2007年12月7日付けで独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託された(受託番号FERMP - 21460)。

10

【0058】

1 - 4 - 2 抗D - Leuモノクローナル抗体

抗D - Leuモノクローナル抗体についても同様に、アミノ酸 - GA - OVA複合体に対する認識能を検討した。その結果、図8に示すように(D - Leu) - GA - OVA複合体に高い発色を示した一方で、39種のアミノ酸にイソロイシンのエピマーであるallo - Ileを加えた41種に対してはほとんど発色が認められなかった。このことから、作製した抗D - Leuモノクローナル抗体は構造類似アミノ酸を始めとする他のアミノ酸に対してほとんど交叉反応性を有さない、極めて特異性の高い抗体であると考えられた。さらに遊離アミノ酸に対する認識能を検討した結果、本抗体は遊離D - Leuのみを特異的に認識していることが明らかになった。

20

【0059】

以上の様に、今回作製した抗D - Aspモノクローナル抗体及び抗D - Leuモノクローナル抗体は、他のアミノ酸に対する交叉反応性をほとんど有さず、特異性が高い抗体であることが明らかになった。これらの抗体は遊離体のD - アミノ酸も良好に認識することから、作製した抗体を用いるD - Asp及びD - Leuの免疫測定が可能であると考えられる。

30

【0060】

今回作製した抗D - アミノ酸モノクローナル抗体は、キャリアタンパク質に結合したD - アミノ酸と、遊離のD - アミノ酸を極めて特異的に認識する抗体であり、迅速分析法による多検体分析を始め、免疫染色による細胞局在解明へと応用可能であり、D - アミノ酸の生理機能を解明する上で極めて有用である。

【実施例2】

【0061】

本実施例では、ELISA法を利用するD - アミノ酸の免疫学的分析方法について示す。

【0062】

材料及び方法

40

2 - 1 遊離D - アミノ酸に対する競合ELISA法

図9に、遊離D - アミノ酸の一例としての遊離D - Aspの競合ELISA法の手順を示す。ELISAプレート上に1.5 µg/mLの(D - Asp) - GA - OVA複合体の50 mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6)溶液100 µLを添加し1時間インキュベートした。T - PBSで3回洗浄した後に、5%スキムミルク/PBS(w/v)300 µLを添加して1時間静置後、T - PBSで3回洗浄した。ラット血清20 µL及び抗D - Aspモノクローナル抗体T - PBS溶液(1.0 µg/mL)100 µLを添加し軽く攪拌した後1時間インキュベートした。T - PBSで3回洗浄した後1000倍希釈したPOD標識抗マウスIgG山羊抗体のT - PBS溶液100 µLを添加し1時間インキュベートした。T - PBSで3回洗浄した後、基質溶液(0.1 Mクエン酸ナトリウム

50

緩衝液 (pH 4.0) と、0.3 mg/mL ABTS と、0.003% H₂O₂ とを含む) を添加し、15分後の吸光度 (405 nm) をマイクロプレートリーダーにより測定した。

【0063】

2-2 ラット血中におけるD-アミノ酸動態解析

2-2-1 ラット血中へのD-アミノ酸投与

7週齢のウイスターラット (オス、SPF) をペントバルビタール 50 mg/kg 体重を腹腔内投与して麻酔した後、咽頭部より切開を行い左右頸動脈を露出させた。1 mL のシリンジ (26 G の注射針を使用) を用いて右頸静脈から 1 mmol/kg 体重 (1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)) の D-Asp を添加した。1、3、5、10、20、30分後に左頸静脈から 1 mL のシリンジ (26 G の注射針を使用) を用いて順次採血した。得られた血液を1時間室温で放置した後、4°C 下で10分、5000 g で遠心分離して血清を得た。血清は使用まで -20°C で保存した。

10

【0064】

2-2-2 OPA 蛍光誘導体化 HPLC による D-アミノ酸分析

2-2-1 で得た血清 20 µL に 400 µL の MeOH (HPLC グレード、和光純薬) を添加し、ボルテックスミキサーを用いて1分間攪拌した後、5000 g で5分間遠心分離した。上清 10 µL を 40°C で減圧乾固し、0.4 M のホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) を 40 µL 添加して再溶解させた。ここに OPA 試薬 (1% OPA、1% BOC-L-Cys のメタノール溶液 (w/w/v)) を 10 µL 添加して攪拌した後、室温で2分間反応させたもの 5 µL を次に示す HPLC で分析した。HPLC 条件は以下の通りである。カラム: TSK-gel ODS-80Ts QA (250 mm x 4.6 mm i.d.)、40°C、東ソー)、移動相: A; 9% (v/v) MeCN / 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)、B; 16% (v/v) MeCN / 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)、勾配: 時間; 0分~24.5分、A; 100%~30%、B; 0%~70%、流速: 1.4 mL/分、検出: 蛍光検出; 励起 344 nm、発光 443 nm。

20

【0065】

結果及び考察

2-3 遊離 D-アミノ酸に対する競合 ELISA 法

D-アミノ酸の迅速測定法の一例として、実施例1で作製した抗 D-Asp モノクローナル抗体を用いる ELISA 法について検討を行った。(D-Asp) - GA-OVA 複合体を結合させたプレートに試料と抗 D-Asp モノクローナル抗体とを加え、抗体の競合的なプレートへの結合を指標に D-Asp 定量を試みた。

30

【0066】

図9に示した手順に従い測定した結果、D-Asp の添加濃度依存的な抗体結合量減少が認められた。一方で L-Asp をはじめとするタンパク構成アミノ酸及びその D-体をを用いて同様の検討を行った結果、添加に伴う吸光度変化はほとんど認められなかった。

【0067】

また、D-Asp はタンパク質中にアミノ酸残基としても存在するため、生体試料中の D-Asp 分析に際しては抗体のタンパク中 D-Asp 残基に対する反応性の検討は重要であると考えられた。そこでモデルペプチドとして Gly-(D-Asp) を用い、遊離 D-Asp 測定に与える影響を競合 ELISA 法により検討した。その結果、Gly-(D-Asp) の添加に伴う吸光度変化はほとんど認められなかったことから、Gly-D-Asp は D-Asp 測定に影響を与えないことが示された。以上の結果から作製した抗 D-Asp モノクローナル抗体を用いる競合 ELISA 法により、遊離 D-Asp の選択的定量が可能であると考えられた。

40

【0068】

2-4 ラット血中におけるD-アミノ酸動態解析

2-4-1 血中 D-アミノ酸の定量可能性評価

50

次に生体試料中における本法の適用性を評価するため、ウイスター系ラット（オス、7週齢、S P F）から得た血清に濃度既知のD - A s pを添加し、検量線を作製した。その結果、図10（a）に示すように0.016 - 16 m Mの範囲においてD - A s p濃度依存的な吸光度減少が認められ、本範囲においてラット血中D - A s pの定量が可能であることが示された。

【0069】

また本測定法の再現性をD - A s p含有血清（1 m m o l / k g体重のD - A s pをラット静脈内に投与した後、30分後に得られた血清）を用いてプレート内、及びプレート間について評価した。その結果、プレート内誤差がR S Dにして4.8%（5ウェル）、プレート間誤差が4.5%（4プレート）であり、本測定法はラット血清中D - A s pを再現的に測定可能であることが明らかになった（図10（b））。

10

【0070】

次に、定量の正確性を当研究室で開発したO P A誘導体化蛍光H P L C法との比較により評価した。x軸にE L I S A法、y軸にH P L C法の定量値をプロットした結果、図11に示す様に回帰直線は $y = 1.09x + 0.44$ であり、相関係数 $r = 0.963$ の良好な相関関係が得られた。以上の結果より今回開発した競合E L I S A法は、ラット血清中D - A s pを正確かつ再現的に定量可能であることが示された。さらに、本法は得られた血清をそのまま用いることで煩雑な前処理を必要とせず、測定時間が約2時間半であることから、簡便性と迅速性を兼ね備えた分析法であると考えられる。

20

【0071】

2 - 4 - 2 ラット血中のD - アミノ酸動態解析

開発した競合E L I S A法を用いてD - A s p投与ラットにおける血中濃度の経時変化を解析した。ラットの右頸静脈へD - A s pを投与し、1、3、5、10、20、30分後にそれぞれ左頸動脈より血液を採取し、D - A s pの濃度を図9に示す競合E L I S A法により測定した。図12にD - A s p血中濃度の経時変化を示す。D - A s p濃度は投与1分後に最高値 $9.3 \pm 2.8 \mu\text{m o l} / \text{m L}$ （ $n = 3$ ）に達した後、二相性の減少過程を経て30分後に $1.7 \pm 0.27 \mu\text{m o l} / \text{m L}$ まで減少した。またH P L C法を用いて同試料を分析した結果、ほぼ同じ体内動態が得られたことから、開発したE L I S A法はラット血中D - A s p体内動態解析に十分適用可能であると考えられた。

30

【0072】

今回開発したE L I S A法は、ラット血清中D - A s pを0.016 - 16 m Mの範囲において正確かつ再現的に定量可能である。さらに試料の前処理を必要とせず、約2時間半で数百個の検体を処理可能であり、迅速性と簡便性を兼ね備えた方法であると考えられる。これらのことより、本法は様々な疾患や生理条件下における多試料解析に大きく貢献できると考えられる。

【実施例3】

【0073】

本実施例は、表面プラズモン共鳴（S P R）法を利用するD - アミノ酸の免疫学的分析方法について示す。

40

【0074】

材料及び方法

3 - 1 直接法による定量性検討

3 - 1 - 1 プレコンセンテーション条件の決定

プレコンセンテーション効果の測定は、未使用のS e n s o r c h i p C M 5（B I A c o r e、ウプサラ、スウェーデン、25°C）を用いて行った。S e n s o r c h i p C M 5をB I A c o r e X（B I A c o r e、ウプサラ、スウェーデン）に挿入し、抗D - A s pモノクローナル抗体の10 m M酢酸ナトリウム緩衝液（p H 6.0, 5.0, 4.0）溶液（20 $\mu\text{g} / \text{m L}$ ）各5 μL をインジェクトした時のセンサーグラム変化量をモニターした。なお、ランニング緩衝液はH B S - E P（0.01 M H E P E S、p H 7.4、0.15 M N a C l、3 m M E D T A、0.005%界面活性

50

剤 P 2 0) を用い、流速 5 μ L / 分で行った。

【 0 0 7 5 】

3 - 1 - 2 アミンカップリング法による抗体固定化

S e n s o r c h i p C M 5 への抗体の固定化はアミンカップリングキット (B I A c o r e 、 ウ プ サ ラ 、 ス ウ ェ ー デ ン) を用いて行った。固定化方法の概略を図 1 3 に示す。0 . 0 5 M N - ヒドロキシスクシニミド (N H S) 水溶液と 0 . 2 5 M 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (E D C) 水溶液の等量混合物 5 0 μ L を送液し、センサーチップ上のカルボキシル基を活性化した。次いで 1 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 0) に溶解した抗 D - A s p モノクローナル抗体 (1 0 0 μ g / m L) 5 0 μ L を送液し、センサーチップ上に固定した。残存活性化エステルは 1 M エタノールアミン - H C l 溶液 (p H 8 . 5) 5 0 μ L を添加することで不活性化した。対照セルにはピュアマウス I g G (I C N フ ェ ー マ ケ ミ カ ル ズ 、 米 国 オ ハ イ オ 州 オ ー ロ ラ) を同様の方法にて固定化した。

10

【 0 0 7 6 】

3 - 1 - 3 D - A s p の定量

3 - 1 - 2 で抗体を固定化したセンサーチップを用いて D - A s p の測定を行った。2 0 \times (1 / 2) ⁿ m M (n = 0 - 5) の D - A s p 又は L - A s p / H E P E S 溶液 (0 . 1 M H E P E S 、 p H 7 . 4 、 0 . 1 5 M N a C l 、 3 m M E D T A 、 0 . 0 0 5 % 界面活性剤 P 2 0) 2 0 μ L を添加した時のセンサーグラムの変化をモニターした。ランニング緩衝液は H B S - E P を用い、流速 2 0 μ L / 分、2 5 $^{\circ}$ C で測定した。なお、抗体の固定化量の差を補正して評価した。(対照セルの共鳴角変化値を固定化量の比 (1 8 : 5 / 1 2 . 4) で除した値で補正した。)

20

3 - 2 間接法による定量性検討

3 - 2 - 1 アミノ基導入型 D - アミノ酸複合体の調製

間接法による定量性検討に供試するためのアミノ基導入型 (D - アミノ酸) - グルタルアルデヒド架橋 - 卵白アルブミン複合体 (以下、「 (D - A A) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) 」という。) を以下のように作製した。作製方法の概略を図 1 6 に示す。2 0 m L の遮光硝子バイアルに O V A 1 2 m g を秤量し、6 2 . 5 m M D - A s p 含有 0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 0) 1 . 6 m L に溶解させた。5 0 m M ヒドラジン水溶液 0 . 2 m L 及び 2 . 5 % グルタルアルデヒド水溶液 0 . 2 m L を添加し、1 時間 30 攪拌した。次いで 1 6 m g / m L N a B H ₄ 水溶液 0 . 5 m L を添加して 1 時間攪拌した。反応液を透析膜 (W M C O 3 , 5 0 0) に入れて 4 $^{\circ}$ C で水に対して透析し、(D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) を得た。アミノ基導入型グルタルアルデヒド卵白アルブミン複合体 (以下、「 G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) 」という。) は、D - A s p 非含有緩衝液を用いて同様に調製した。

30

【 0 0 7 7 】

3 - 2 - 2 抗原濃度の測定

作製した (D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) 、 G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) の濃度は、プロテインアッセイ C B B 試薬 (ナカライテスク) を用いて、B S A を用いて作成した検量線を使用して定量した。前記複合体溶液又は B S A 溶液 1 0 μ L を E L I S A プレートに添加した後、水で 5 倍希釈した C B B 試薬 2 0 0 μ L を加え、1 0 分間攪拌した後の 5 9 5 n m における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、濃度を求めた。

40

【 0 0 7 8 】

3 - 2 - 3 プレコンセンタレーション条件の決定

未使用の S e n s o r C h i p C M 5 (2 5 $^{\circ}$ C) を B I A c o r e X に挿入し、(D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) の 1 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 6 . 0 、 5 . 0 、 4 . 5 、 4 . 0) 溶液 (2 0 μ g / m L) 各 5 μ L をインジェクトした時のセンサーグラム変化量をモニターした。なお、ランニング緩衝液は H B S - E P 、流速 5 μ L / 分で測定を行った。

50

【0079】

3-2-4 アミンカップリング法による抗原固定化

アミンカップリングキットを用いて3-2-1で作製した抗原の固定化を行った。0.05 M NHS水溶液と0.25 M EDC水溶液の等量混合物35 μ Lを送液し、センサーチップ上のカルボキシル基を活性化した。次いで10 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)に溶解したGA-OVA複合体(+NH₂)(20 μ g/mL)35 μ Lを送液し、センサーチップ上に固定した。残存活性化エステルは1 Mエタノールアミン-HCl溶液(pH 8.5)35 μ Lを添加して不活性化した。(D-Asp)-GA-OVA複合体(+NH₂)はGA-OVA複合体(+NH₂)の結合量と同等になるように固定化した。50 μ LのNHS/EDC溶液を送液しセンサーチップを活性化した後、20 μ g/mLの(D-Asp)-GA-OVA複合体(+NH₂)/10 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)を、センサーグラムをモニターしながら70 μ L送液した。次いでエタノールアミン溶液50 μ Lを添加して活性化エステルを不活性化した。なお、ランニング緩衝液はHBS-EPを用い、流速5 μ L/分、25°Cで行った。

10

【0080】

3-2-5 D-Aspの競合SPR測定

3-2-4で(D-Asp)-GA-OVA複合体(+NH₂)を固定化したセンサーチップを用いて競合法によるD-Aspの測定を行った。20 \times (1/2)ⁿ mM (n = 0-5)のD-Asp又はL-Asp/HEPES溶液(0.1 M HEPES、pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005%界面活性剤P20)と10 μ g/mL抗D-Aspモノクローナル抗体のHEPES溶液を1:1の割合で混合し、このうち20 μ Lを測定した。測定後、結合した抗体は10 mMグリシン-HCl緩衝液(pH 1.5)を10 μ L添加することにより解離させチップを再生した。なお、測定はランニング緩衝液HBS-EPを用い、流速20 μ L/分、25°Cで行った。

20

【0081】

結果及び考察

3-3 直接法による定量性検討

3-3-1 プレコンセンタレーション条件の決定

実施例1で作製した抗D-Aspモノクローナル抗体を用いて、直接法による遊離D-Aspの濃度測定を試みた。センサーチップへの抗体固定化に先立ち、抗D-Asp抗体のプレコンセンタレーション条件として、固定化時に使用する緩衝液のpHを決定した。本実験では、pH 6.0、5.0、4.0の10 mM酢酸塩緩衝液を用いて検討した。その結果、抗D-Aspモノクローナル抗体はpH 5.0と4.0で同様の濃縮効果が認められたことから、よりカップリング反応が進行しやすいpH 5.0を採用した。

30

【0082】

3-3-2 アミンカップリング法による抗体固定化

図14に抗D-Aspモノクローナル抗体及びマウスIgGの固定化にかかるセンサーグラムを示す。抗D-Aspモノクローナル抗体は12.4 ng/mm²の結合が認められ、対照であるマウスIgGは18.5 ng/mm²の結合が認められた(1000 RU = 1 ng/mm²)。

40

【0083】

3-3-3 直接法による遊離D-Aspの測定

抗D-Asp抗体を固定化させたチップを用いて、直接法によるD-Aspの定量性を検討した。HEPES緩衝液を用いて作製したD-Aspの希釈系列を順次インジェクトし、センサーグラムのレスポンスを測定した。但し、マウスIgGの固定化量は抗D-Asp抗体の1.5倍であることから(図14)、得られたレスポンスは固定化量で補正し、D-Aspに対する応答を評価した。図15はAsp溶液添加時に得られたレスポンス変化を示したものである。その結果、D-Asp、L-Asp共に添加濃度増加に伴うレスポンス上昇が認められた。抗体の固定化量及びD-Aspの分子量から算出した最大応答量は約11と推測されるが、本検討ではこれを遙かに超えるレスポンス変化が認められ

50

たことから、A s p がセンサーチップに対して非特異的に吸着する、チップ上でクラスター分子を形成している等、他の要因によるレスポンス上昇が生じていると考えられた。以上の結果より、直接法を用いる D - A s p 測定は困難であると考え間接法の適用を試みた。

【 0 0 8 4 】

3 - 4 間接法による定量性検討

3 - 4 - 1 アミノ基導入型 D - アミノ酸複合体の調製

図 1 6 に示すように G A 添加時にヒドラジン (N H ₂ N H ₂) を共存させて、(D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) を作製した。この修飾により抗原のアミンカップリング法によるセンサーチップへの固定が容易になると考えられる。(D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) と対照として作製した G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) との抗原性は E L I S A 法を用いて検討した。その結果、抗 D - A s p 抗体が (D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) のみに選択的に結合することを確認した。

10

【 0 0 8 5 】

3 - 4 - 2 プレコンセンション条件の決定

センサーチップへの固定化に先立ち、p H 6 . 0、5 . 0、4 . 5、4 . 0 の 1 0 m M 酢酸塩緩衝液を用いて (D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) のプレコンセンション条件として、固定時に使用する緩衝液の p H を決定した。その結果、p H の減少に伴う (D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) の濃縮量増加が認められ、最大の濃縮が認められた p H 4 . 0 を採用した。

20

【 0 0 8 6 】

3 - 4 - 3 アミンカップリング法による抗体固定化

図 1 7 に (D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) 及び G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) の固定化にかかるセンサーグラムを示す。(D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) の固定化量は 4 . 9 3 n g / m m ²、対照である G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) の固定化量は 4 . 9 8 n g / m m ² となり同程度の結合が認められた。

【 0 0 8 7 】

3 - 4 - 4 D - A s p の競合 S P R 測定

競合 S P R 測定のセンサーグラムのレスポンス変化を図 1 8 に示す。D - A s p の濃度上昇に伴いセンサーグラム上の応答減少が認められた。一方、L - A s p を用いて同様に検討した結果、センサーグラムの変化はほとんど認められなかった。試料添加前後のレスポンス変化量を、A s p 無添加時を 0 としてグラフ化した結果、図 1 9 に示すように D - A s p 添加濃度依存的なレスポンス変化が認められ、L - A s p を添加した場合においてはほとんど認められなかった。さらに G l y を用いて同様の検討を行った結果、L - A s p と同様に変化は認められなかった。レスポンス変化は D - A s p 濃度 0 . 0 2 - 5 m M の範囲において認められたことから、本範囲において D - A s p の定量が可能であると考えられる。さらに今回の測定時間は 2 分以内であることから、本法は迅速分析法として有用であると考えられる。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 8 】

40

【 図 1 】 実施例 1 における、(D - A A) - G A - B S A 複合体の作製方法を示すフローチャート。

【 図 2 】 実施例 1 において測定した、B S A、B S A - G A、(D - A s p) - G A - B S A 複合体のマス・スペクトルを示すグラフ。

【 図 3 】 実施例 1 において測定した、B S A、B S A - G A、(D - L e u) - G A - B S A 複合体のマス・スペクトルを示すグラフ。

【 図 4 】 実施例 1 における、抗 D - A s p モノクローナル抗体の作製方法を示す概略図。

【 図 5 】 実施例 1 における、構造類似アミノ酸に対する抗 D - L e u モノクローナル抗体産生細胞株 (6 系統) の選択性の評価を示すグラフ。

【 図 6 】 実施例 1 において作製した抗 D - A s p モノクローナル抗体の交叉反応性の評価

50

のための直接 E L I S A 法の手順を示すフローチャート。

【図 7】実施例 1 における、O V A 複合体アミノ酸に対する抗 D - A s p モノクローナル抗体の免疫反応性の評価を示すグラフ。

【図 8】実施例 1 における、O V A 複合体アミノ酸に対する抗 D - L e u モノクローナル抗体の免疫反応性の評価を示すグラフ。

【図 9】実施例 2 における、遊離 D - A s p の競合 E L I S A 法の手順を示すフローチャート。

【図 10】実施例 2 において測定した、ラット血清における遊離 D - A s p の競合 E L I S A 法の (a) キャリブレーションカーブを示すグラフ、及び (b) プレート間あるいはプレート内精度を表す表。

【図 11】実施例 2 における、ラット血清における競合 E L I S A 法と O P A 誘導体化蛍光 H P L C 法との相関関係を示すグラフ。

【図 12】実施例 2 における、D - A s p の静脈内投与後のラット血清における D - A s p 量の経時変化を示すグラフ。

【図 13】実施例 3 における、抗 D - A s p モノクローナル抗体の S P R 測定用センサーチップへの固定化方法を示すフローチャート。

【図 14】実施例 3 における、(a) 抗 D - A s p モノクローナル抗体及び (b) マウス純血 I g G 固定化のセンサーグラム。

【図 15】実施例 3 における、遊離 D - A s p 及び遊離 L - A s p の直接 S P R 測定を示すグラフ。

【図 16】実施例 3 における、S P R 測定のための (D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) の作製方法を示すフローチャート。

【図 17】実施例 3 における、(a) (D - A s p) - G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) 及び (b) G A - O V A 複合体 (+ N H ₂) 固定化のセンサーグラム。

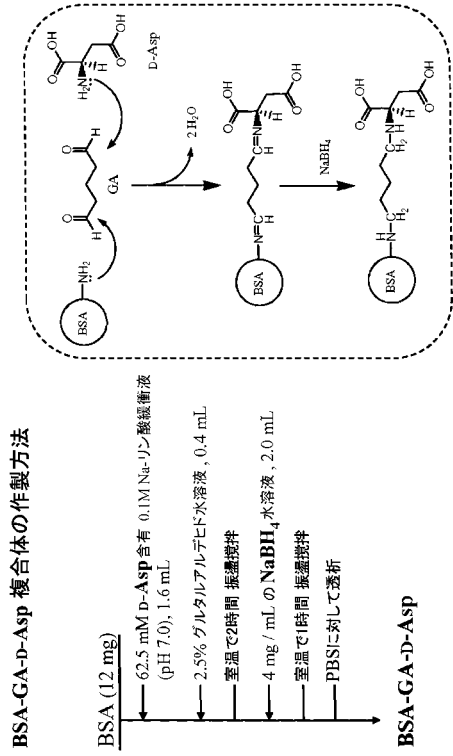
【図 18】実施例 3 における、競合 S P R 測定のレスポンス変化を示すセンサーグラム。

【図 19】実施例 3 における、遊離 D - A s p 及び遊離 L - A s p の競合 S P R 測定を示すグラフ。

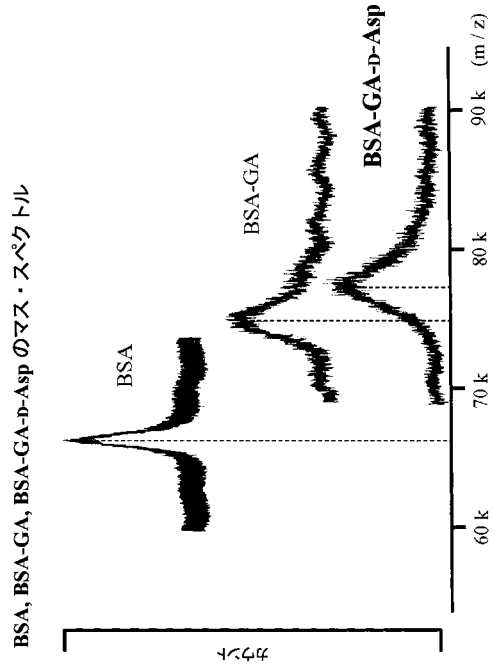
10

20

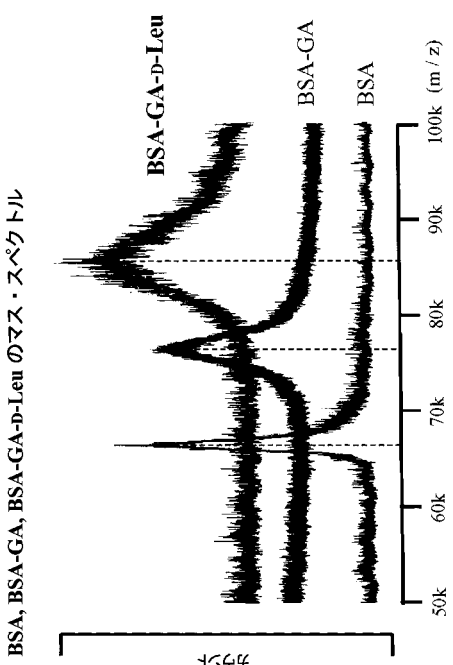
【 図 1 】



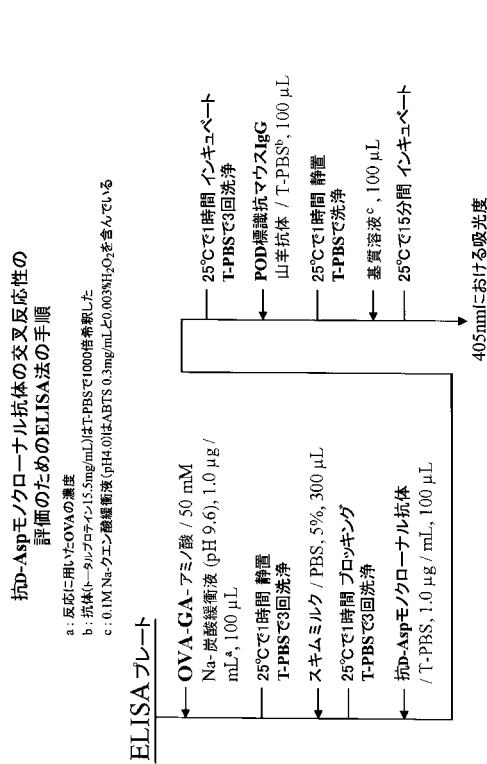
【 図 2 】



【 図 3 】



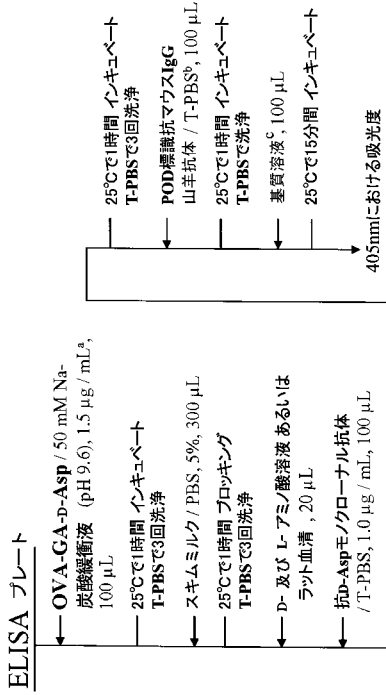
【 図 6 】



【 図 9 】

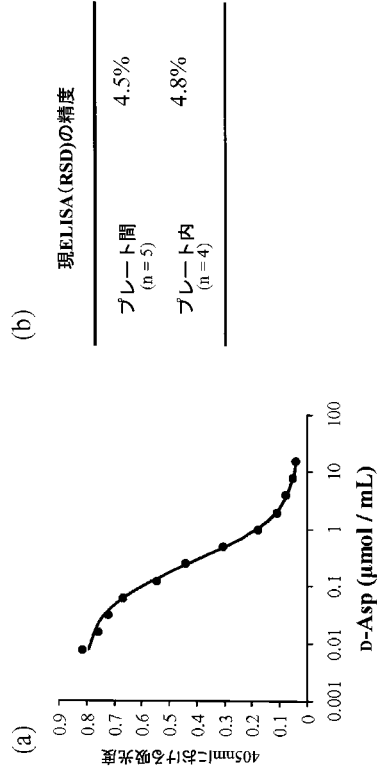
遊離D-Aspの競合ELISA法の手順

- a: 反応に用いたOVAの濃度
- b: 抗体(トータロプロテイン15.5mg/ml)はT-PBSで1000倍希釈した
- c: 0.1M Na-クエン酸緩衝液 (pH4.0)はABTS 0.3mg/mLと0.003% H_2O_2 を含んでいる



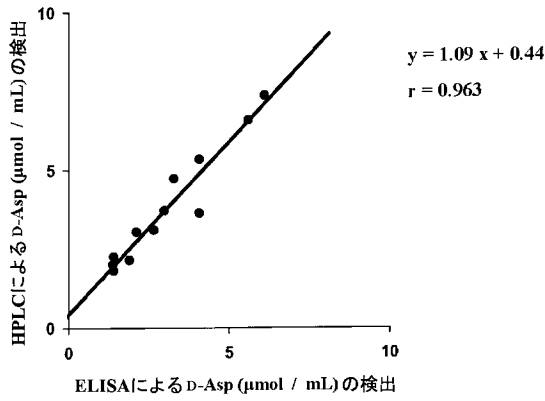
【 図 10 】

ラット血清における遊離D-Aspの競合ELISA法の(a)キャリブレーションカーブ及び
(b)プレート間あるいはプレート内精度



【 図 1 1 】

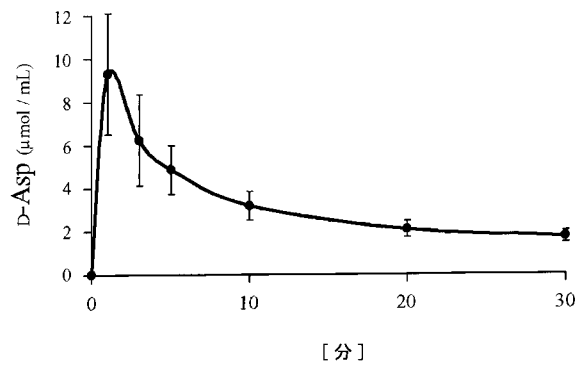
ラット血清における競合ELISA法と
先のHPLCとの相関関係



【 図 1 2 】

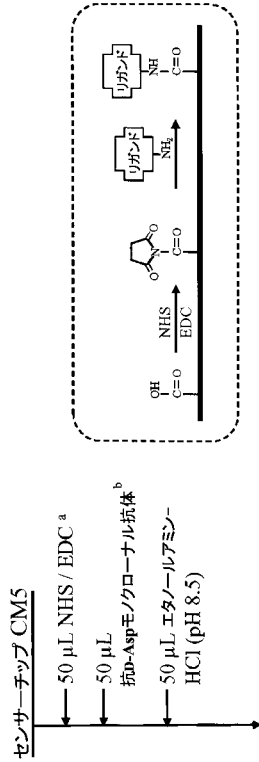
D-Aspの静脈内投与後のラット血清におけるD-Asp量の経時変化

値は3匹のラットの平均値±標準誤差を示す
ラット: 雄性, ウィスター, 7週齢



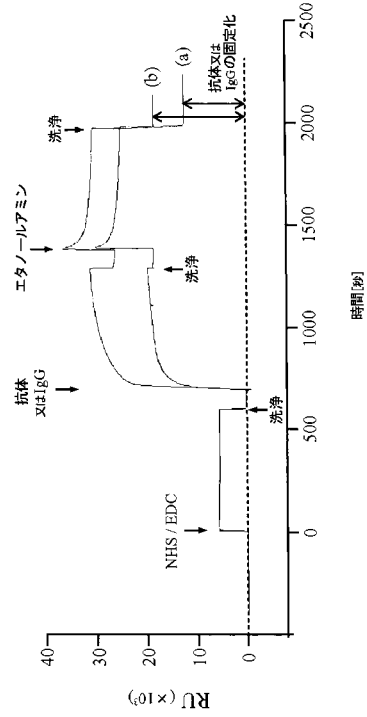
抗D-Aspモノクローナル抗体のSPR測定用センサーチップへの固定化方法

- a: 50mM NHS, 250mM EDC水溶液
 - b: 10mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)中に100 μ g/ml
- 流速: 5 μ L/分, 室温, 25 $^{\circ}$ C



【 図 1 3 】

(a) 抗D-Asp モノクローナル抗体
及び (b) マウス純血IgG固定化のセンサーグラム

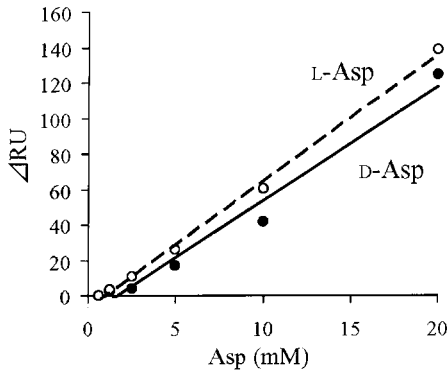


【 図 1 4 】

【 図 1 5 】

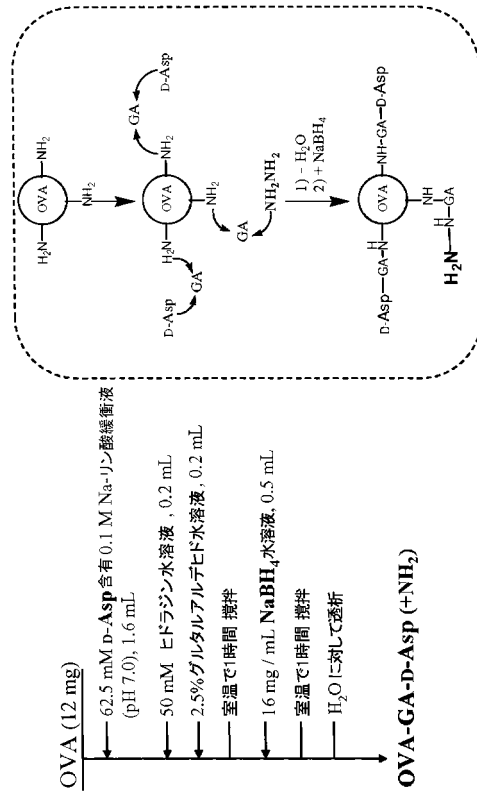
遊離D-Asp及び遊離L-Aspの直接SPR測定

リゾニンユニット変化量(Δ RU)は0.625mM Asp溶液の値がRU=0として測定されたときプロットされた全ての値は固定化された抗体量を用いて補正した



【 図 1 6 】

SPR測定のためのOVA-GA-D-Asp(+NH₂)の作製方法

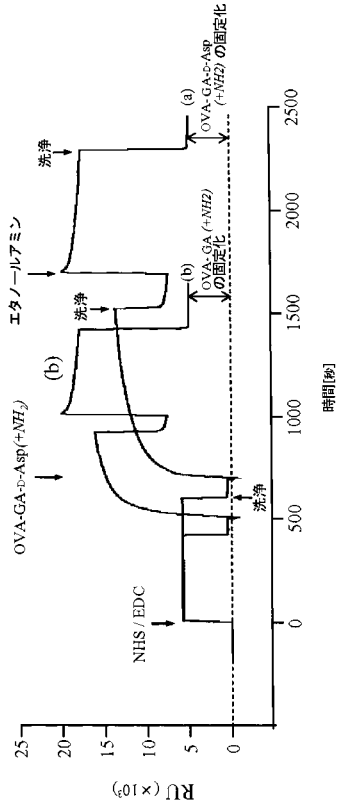


- OVA (12 mg)
- 62.5 mM D-Asp 含有 0.1 M Na-リン酸緩衝液 (pH 7.0), 1.6 mL
- 50 mM ヒドラジン水溶液, 0.2 mL
- 2.5%グルタルアルデヒド水溶液, 0.2 mL
- 室温で1時間 攪拌
- 16 mg / mL NaBH₄水溶液, 0.5 mL
- 室温で1時間 攪拌
- H₂O に対して透析

OVA-GA-D-Asp (+NH₂)

【 図 1 7 】

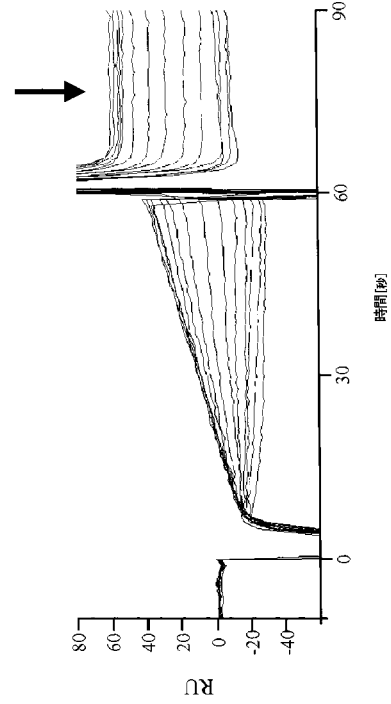
(a)OVA-GA-D-Asp(+NH₂)
及び(b)OVA-GA(+NH₂) 固定化のセンサーグラム



【 図 1 8 】

競合SPR測定 of センサーグラム

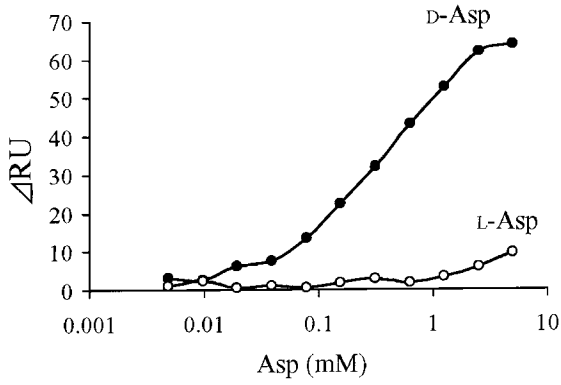
リゾナスユニット(RU)値は添加するD-Asp濃度が増えるに従って徐々に減少した(矢印)



【 図 1 9 】

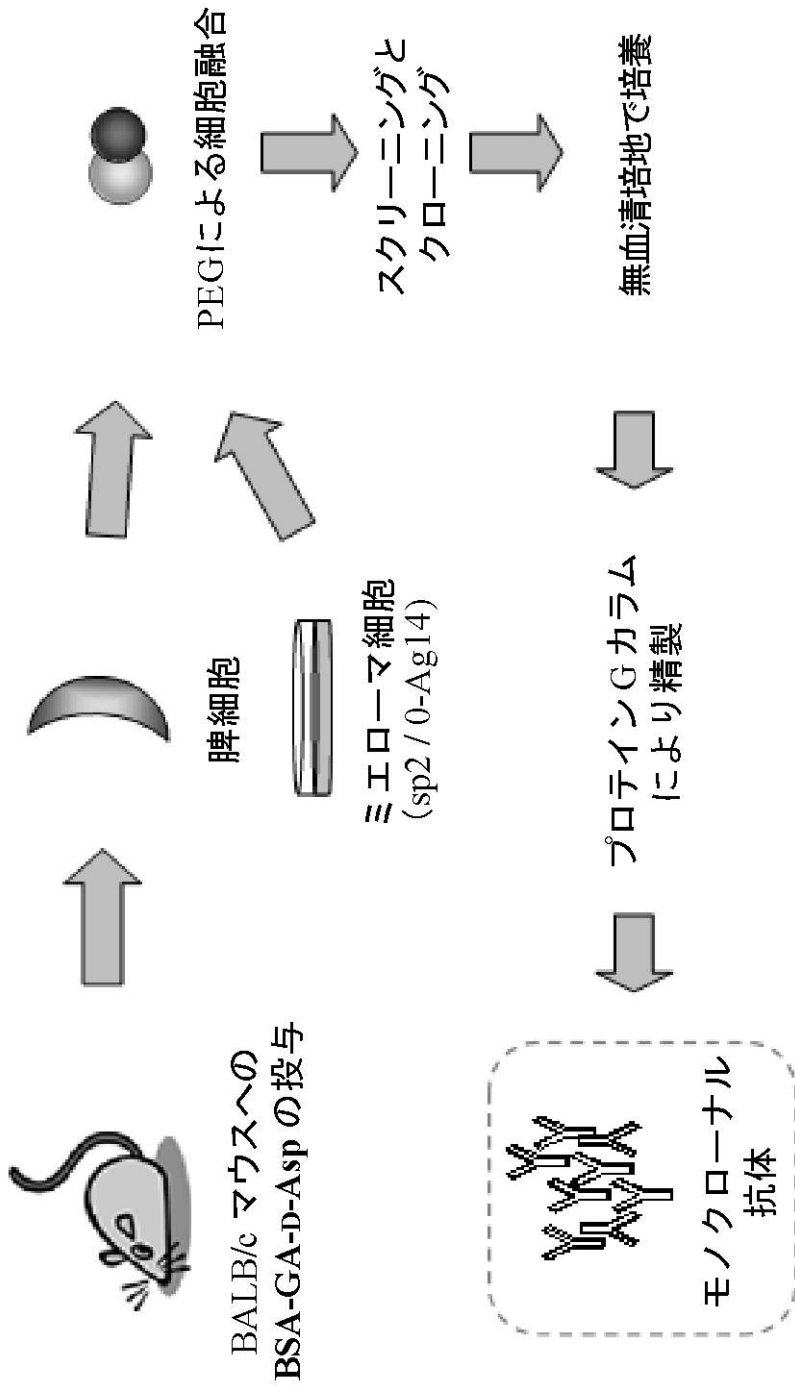
遊離D-Asp及び遊離L-Aspの競合SPR測定

リゾナスユニット変化量(ΔRU)は0mM溶液の値がRU=0として測定されたときプロットされた



【 図 4 】

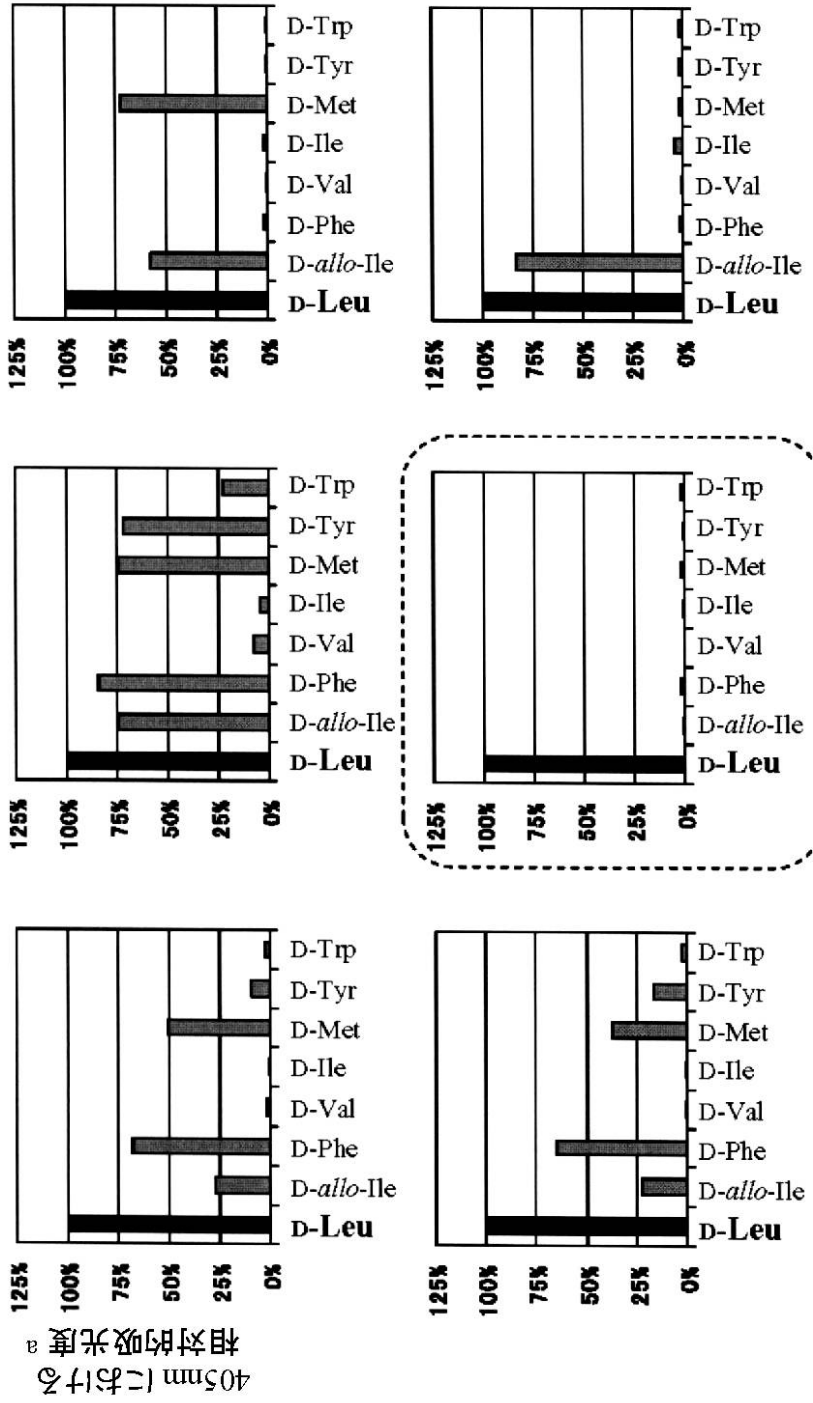
抗 D-Asp モノクローナル抗体の作製方法の概略図



【 図 5 】

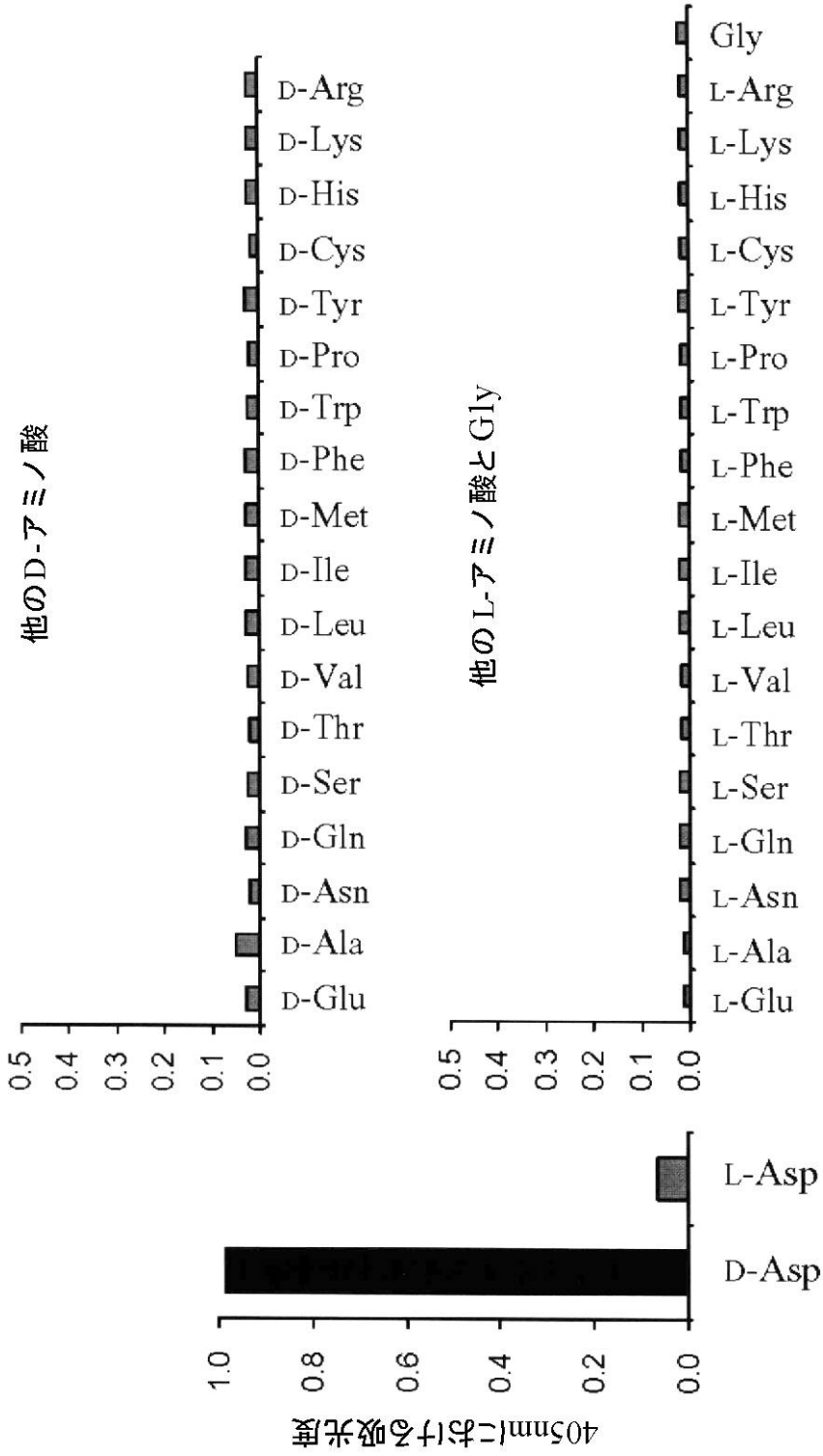
OVA 複合体アミノ酸に対する
 抗D-Leuモノクローナル抗体産生細胞株(6系統)の選択性

a : D-Leuを100%としたときの相対的吸光度



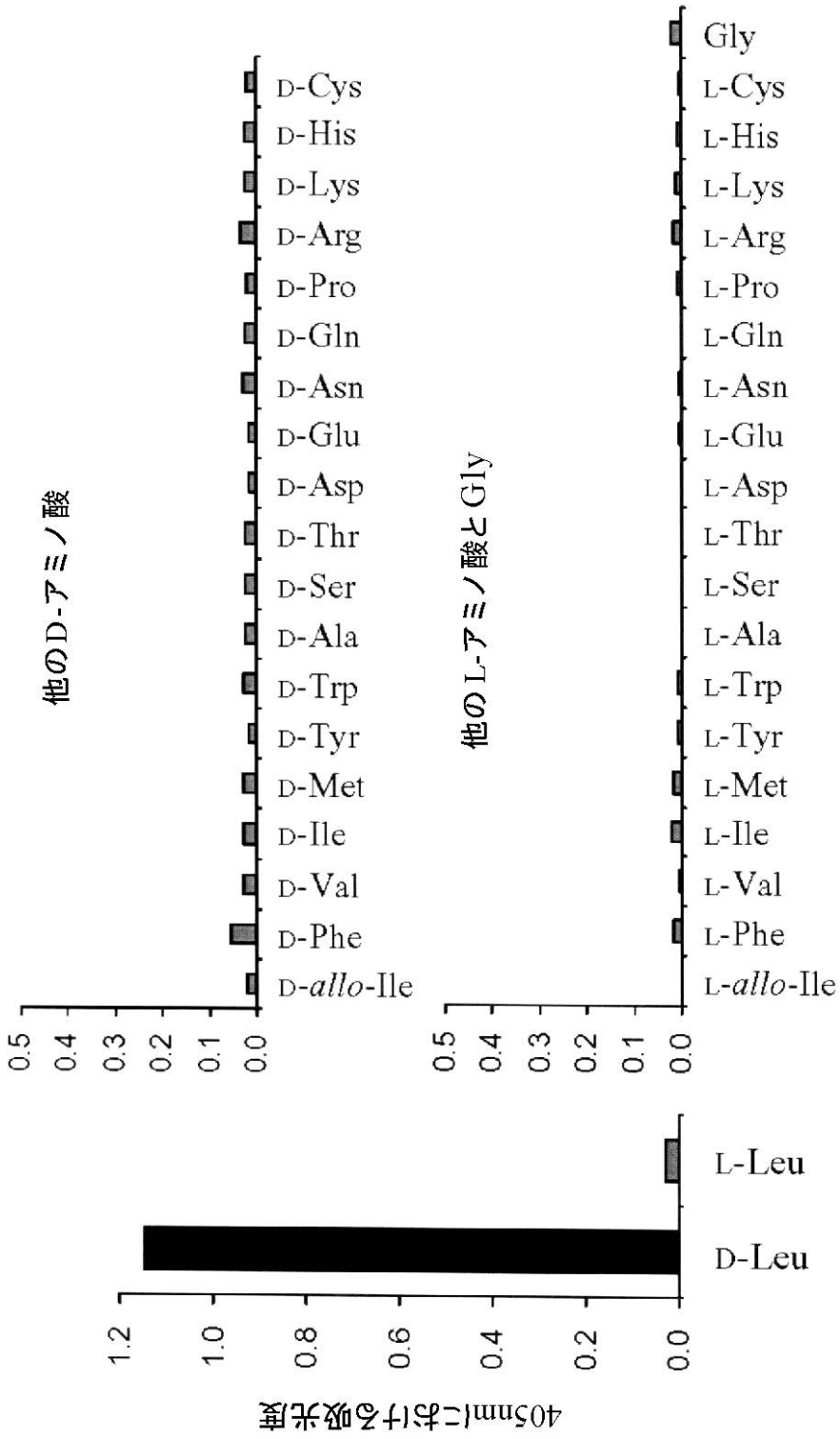
【 図 7 】

OVA 複合体アミノ酸に対する抗D-Aspモノクローナル抗体の免疫反応性



【 図 8 】

OVA 複合体アミノ酸に対する抗D-Leuモノクローナル抗体の免疫反応性



フロントページの続き

(72)発明者 浜瀬 健司

福岡県福岡市東区馬出3 - 1 - 1 九州大学内

(72)発明者 芦田 豊

神奈川県横浜市都筑区早渕2 - 2 - 1 株式会社資生堂リサーチセンター(新横浜)内

(72)発明者 三田 真史

東京都中央区銀座7 - 5 - 5 株式会社資生堂内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13

4B065 AA91X AA92X AB01 AB05 AC14 BA08 BA24 CA25 CA46

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 DA76 EA50 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	使用抗D-氨基酸单克隆抗体和抗D-氨基酸单克隆抗体免疫分析D-氨基酸的方法		
公开(公告)号	JP2009184981A	公开(公告)日	2009-08-20
申请号	JP2008027650	申请日	2008-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂 国立大学法人九州大学		
申请(专利权)人(译)	资生堂公司, 有限公司 国立大学法人九州大学		
[标]发明人	財津潔 浜瀬健司 芦田豊 三田真史		
发明人	財津 潔 浜瀬 健司 芦田 豊 三田 真史		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53 G01N33/543 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/6812 C07K16/44		
FI分类号	C07K16/44 G01N33/53.S G01N33/543.551.A C12N5/00.B C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	吉田 正义		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种分析对特定D-氨基酸具有高特异性的D-氨基酸的方法和对具有另一种类似结构的化合物的高选择性，其适用于临床标本的多样品分析等.D-开发氨基酸分析方法。抗D-氨基酸单克隆抗体，仅与一种特定类型的D-氨基酸反应，不与另一种类似于D-氨基酸和D-氨基酸单克隆抗体的化合物交叉反应从而提供免疫学分析方法。在D-氨基酸的免疫学分析方法中，可以使用竞争性ELISA方法或表面等离子体共振方法。点域7

