

(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2011-184372

(P2011-184372A)

(43) 公開日 平成23年9月22日(2011.9.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/26 (2006.01)	C07K 16/26 ZNA	4B064
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 B	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1O2	4H045
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2010-52092 (P2010-52092)	(71) 出願人	306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号
(22) 出願日	平成22年3月9日 (2010.3.9)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	笠置 典之 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内
		(72) 発明者	渡辺 裕也 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内
		(72) 発明者	大原 智也 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内
		Fターム(参考)	4B064 AG27 CA20 DA13
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 犬TSH α 鎖ペプチドに対する抗体

(57) 【要約】

【課題】 犬TSH抗原を大量に入手することなく、犬TSH抗体を特異的に認識する抗体を提供すること。

【解決手段】 Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドを含むポリハプテンを抗原として免疫動物に投与することによって生成された抗体又はその断片。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドを含むポリハプテンを抗原として免疫動物に投与することによって生成された抗体又はその断片。

【請求項 2】

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドが、以下の何れかで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドである、請求項1に記載の抗体又はその断片。

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Gln-Gly-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Gln-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-(Xaa)_n

(式中、Pheはペプチド鎖のN末端アミノ酸を表し、Xaaは、アミノ酸残基またはリンカーを表し、nは0～3の整数を表し、nが2又は3である場合における2個又は3個のXaaで示される基はそれぞれ独立に同一でも異なるものでもよい。)

【請求項 3】

Xaaで表されるアミノ酸残基がCysである、請求項1又は2に記載の抗体又はその断片。

【請求項 4】

Xaaで表されるリンカーが、エチレングリコール単位を含むリンカーである、請求項1から3の何れか1項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 5】

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドをヘモシアニタンパク質(KLH)またはウシ血清アルブミン(BSA)に結合させたポリハプテンを、抗原として免疫動物に投与することによって生成された、請求項1から4の何れか1項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 6】

犬TSHに結合することを特徴とする、請求項1から5の何れか1項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 7】

犬TSHを用いたスクリーニングによって選別されたことを特徴とする請求項1から6の何れか1項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 8】

モノクローナル抗体である、請求項1から7の何れか1項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 9】

請求項1から8の何れか1項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 10】

請求項1から8の何れか1項に記載の抗体又はその断片を含む、免疫分析試薬。

【請求項 11】

色素または蛍光色素を含むラテックス粒子で標識した請求項1から8の何れか1項に記載の抗体又はその断片を含む、免疫分析試薬。

【請求項 12】

酵素で標識した請求項1から8の何れか1項に記載の抗体又はその断片を含む、免疫分析試薬。

【請求項 13】

犬TSH測定用であることを特徴とする請求項10から12の何れか1項に記載の免疫分析試薬。

【請求項 14】

請求項13に記載の犬TSH測定用免疫分析試薬に、試料を接触させることを含む、試料中

10

20

30

40

50

の犬TSHの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、犬TSH鎖ペプチドに対する抗体、上記抗体を産生するハイブリドーマ、並びに上記抗体を用いた試薬および測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ホルモンは、生体内において、血中に微量に存在し、種々の生理作用を司る物質である。甲状腺ホルモンの1種である甲状腺刺激ホルモン(TSH)は、甲状腺機能を判定・把握するために、しばしば臨床現場において測定が行われる。正常な状態においては、甲状腺刺激ホルモン(TSH)によって甲状腺が刺激され、サイロキシン(T₄)が分泌される。ところが、橋本病のような甲状腺機能が低下している場合、TSHが分泌されているにもかかわらず、T₄が分泌されないという事態が発生する。従って、TSHの血中濃度を測定することが、甲状腺機能の異常が疑われる場合に必要となってくる。

10

【0003】

ところが、TSH等のホルモンは、血中に微量にしか存在しないため、高感度に定量可能な試薬及び装置が必要である。抗原抗体反応を用いた免疫診断試薬において、標識反応を使用しない方法、即ち非標識法として、沈降反応を利用した免疫拡散法や免疫比濁法及び免疫比濁法(ネフェロメトリー)、凝集反応を利用した血球凝集法やラテックス法などがあり、標識反応を使用した方法としては、その標識する物質の種類や性質に応じて酵素免疫測定法(EIA法)や放射免疫測定法(RIA法)の他、蛍光免疫測定法(FIA法)、化学発光免疫測定法(CLIA法)、生物発光免疫測定法(BLIA法)などが、現在使用されている。TSHの測定方法としては、例えば、特許文献1には、ヒトTSHに対する市販の抗体を使用し、この抗TSH抗体を結合させた担体にTSHを接触させることによって生成する凝集を測定することを含むTSHの測定方法において、TSHの異なるエピトープを認識する複数種の抗TSH抗体を独立に個々の単体へ担持させ、各TSH抗体を担持させた担体をTSHを含む検体に対して時間差をつけて接触させることを特徴とするTSHの測定方法が記載されている。

20

【0004】

上記のようなTSHの免疫診断においては、TSH抗体が必要である。しかし、犬TSH抗原は、生体内に微量にしか存在しないため、犬TSH抗体を作製するための免疫原として十分な量を確保することが困難である。また、現在、犬cTSH抗体は市販されていない。さらに、組み換え犬TSHタンパク質の発現系の構築も困難であるため、犬TSHタンパク質は大量に入手することが困難である。上記の通り、犬TSHタンパク質を大量に入手できないため、通常の免疫感作はできず、抗犬TSH抗体の作製は困難であった。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2009-85703号公報

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明が解決しようとする課題は、犬TSH抗原を大量に入手することなく、犬TSH抗体を特異的に認識する抗体を提供することである。さらに本発明は、上記抗体を産生するハイブリドーマ、上記抗体を用いた免疫分析試薬、上記抗体を用いた犬TSHの測定方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、犬TSH抗原の一部である鎖N末端の11アミノ酸残基からなるペプチドを免疫原として利用して、免疫感作し、

50

抗犬TSH抗体を作製することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】

即ち、本発明によれば、Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドを含むポリハプテンを抗原として免疫動物に投与することによって生成された抗体又はその断片が提供される。

好ましくは、Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドは、以下の何れかで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドである。

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Gln-Gly-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Gln-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-(Xaa)_n

(式中、Pheはペプチド鎖のN末端アミノ酸を表し、Xaaは、アミノ酸残基またはリンカーを表し、nは0～3の整数を表し、nが2又は3である場合における2個又は3個のXaaで示される基はそれぞれ独立に同一でも異なるものでもよい。)

【0009】

好ましくは、Xaaで表されるアミノ酸残基はCysである。

好ましくは、Xaaで表されるリンカーは、エチレングリコール単位を含むリンカーである。

好ましくは、本発明の抗体又はその断片は、Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドをヘモシアニンタンパク質(KLH)またはウシ血清アルブミン(BSA)に結合させたポリハプテンを、抗原として免疫動物に投与することによって生成される。

【0010】

好ましくは、本発明の抗体又はその断片は、犬TSHに結合する。

好ましくは、本発明の抗体又はその断片は、犬TSHを用いたスクリーニングによって選別される。

好ましくは、本発明の抗体又はその断片は、モノクローナル抗体である。

【0011】

本発明によればさらに、上記した本発明の抗体を産生するハイブリドーマが提供される。

本発明によればさらに、上記した本発明の抗体又はその断片を含む、免疫分析試薬が提供される。

本発明によればさらに、色素または蛍光色素を含むラテックス粒子で標識した、上記した本発明の抗体又はその断片を含む、免疫分析試薬が提供される。

本発明によればさらに、酵素で標識した、上記した本発明の抗体又はその断片を含む、免疫分析試薬が提供される。

本発明の免疫分析試薬は、好ましくは、犬TSH測定用である。

本発明によればさらに、上記した本発明の犬TSH測定用免疫分析試薬に、試料を接触させることを含む、試料中の犬TSHの測定方法が提供される。

【発明の効果】

【0012】

本発明の抗体は、犬TSHを特異的に認識することができる。本発明の抗体は、犬TSH抗原の一部である鎖N末端の11アミノ酸残基からなるペプチドを免疫原として利用して製造されるため、犬TSH抗原を大量に入手することなく製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

【図2】図2は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 3】図 3 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

【図 4】図 4 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

【図 5】図 5 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

【図 6】図 6 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

【図 7】図 7 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

【図 8】図 8 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の一次スクリーニングの結果を示す。

【図 9】図 9 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の限界希釈後の二次スクリーニングの結果を示す。

【図 10】図 10 は、抗犬TSHモノクローナル抗体の限界希釈後の二次スクリーニングの結果を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明についてさらに具体的に説明する。

本発明の抗体は、Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドを含むポリハプテンを抗原として免疫動物に投与することによって生成された抗体又はその断片である。好ましくは、Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドをヘモシアニンタンパク質 (KLH) またはウシ血清アルブミン (BSA) に結合させたポリハプテンを用いることができる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体でもよいし、モノクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。なお、本発明で言う抗体とは、抗体分子全体を意味するのみならず、その断片 (例えば、Fab、F(ab')₂ 又は Fab' 断片) をも意味する。

20

【0015】

本発明で用いるポリハプテンを構成するポリペプチドのアミノ酸配列は、Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むものであればよく、犬TSH鎖ペプチドに由来するアミノ酸配列を含む限り、ポリペプチドの長さ (アミノ酸数) は特に限定されない。本発明で用いるポリハプテンを構成するポリペプチドの長さは好ましくは6アミノ酸以上20アミノ酸以下であり、より好ましくは6アミノ酸以上15アミノ酸以下である。

【0016】

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Pheで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドの好ましい例としては、以下の何れかで示されるアミノ酸配列をN末端側に含むポリペプチドを挙げることができる、

30

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Gln-Gly-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Gln-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-(Xaa)_n

Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-(Xaa)_n

上記において、Pheはペプチド鎖のN末端アミノ酸を表し、Xaaは、アミノ酸残基 (好ましくは、Cys) またはリンカー (好ましくは、エチレングリコール単位を含むリンカー) を表し、nは0~3の整数を表し、nが2又は3である場合における2個又は3個のXaaで示される基はそれぞれ独立に同一でも異なるものでもよい。

40

【0017】

上記においてリンカーとは、キャリアタンパク質 (例えば、KLH, BSA) からスペースを持たせる目的で、キャリアタンパク質とペプチド鎖の間に導入される基である。リンカーが、エチレングリコール単位を含むことが好ましい。また、リンカーとして好ましいのは、アミノ基とカルボキシル基を有する基、または、その脱水縮合体である。アミノ基とカルボキシル基の間に炭素原子を2個以上含むことがより好ましく、アミノ基とカルボキシル基の間にエチレングリコール単位を含むことが最も好ましい。

【0018】

ポリクローナル抗体を取得するためには、上記したハプテンを抗原として、これを哺乳

50

動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1~100mgであり、アジュバントを用いるときは1~100 μ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~5週間間隔で、1~10回、好ましくは2~5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6~60日後に、酵素免疫測定法(ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)又はEIA(enzyme immunoassay))、放射性免疫測定法(RIA; radioimmuno assay)等で抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得ることができる。抗血清から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。上記の方法により、本発明のポリクローナル抗体を取得することができる。

10

【0019】

モノクローナル抗体の取得は以下の方法で行うことができる。すなわち、抗原をアジュバントとともに数回腹腔等に注射して、脾臓細胞を取り出しポリエチレングリコール等を用いてマウスミエローマ細胞と融合させる。そして、この融合細胞の中から抗体産生細胞をクローニングし、モノクローン細胞として増殖させる。増殖細胞をさらにマウス腹腔内注射することにより、モノクローナル抗体を含む腹水及び血清を得ることができる。より具体的には以下の通り行うことができる。

20

【0020】

先ず、上記した抗原ペプチドを抗原として、哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1~100mgであり、アジュバントを用いるときは1~2000 μ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~5週間間隔で、1~10回、好ましくは2~5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1~60日後、好ましくは1~14日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

30

【0021】

細胞融合ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えばP3X63-Ag.8.U1(P3U1)、NS-1などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

40

【0022】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlの抗体産生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlのミエローマ細胞とを混合し(抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比5:1が好ましい)、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1000~6000ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0023】

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイタ

50

ープレート上に 3×10^5 個/well 程度まき、各ウエルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0024】

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウエルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法(ELISAなど)、放射性免疫測定法等によってスクリーニングすることができる。本発明において好ましくは、抗原として犬TSHを用いたスクリーニングによって抗体を選別することができる。好ましくは、本発明の抗体は、犬TSHに結合することを特徴とする。

10

【0025】

融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立することができる。

【0026】

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の方法又は腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の方法(例えば37℃、5% CO₂濃度)で7~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

20

【0027】

腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 1×10^7 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2週間後に腹水を採集する。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー(プロテインA-アガロース等)などの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0028】

抗体のサブクラスはIgG 1、IgG 2 a、IgG 2 b等が挙げられるが、本発明では、酵素-抗体複合体を調製する際に抗体の断片化効率の良いIgG 1である。得られたIgG 1は、活性化パパインやペプシン等のプロテアーゼでFc部位を除去したF(ab')₂として、さらにこれを還元してFab'フラグメントに誘導することができる。

30

【0029】

好ましい態様では、抗体としてFab'フラグメントを使用する。インタクトな抗体(IgG)にはFab(抗原結合部位)とFc(補体結合部位)が存在する。インタクトな抗体を酵素と結合して酵素標識抗体を使用する場合、試料が血液試料であると、血液中の補体成分がFc部分に結合して立体障害の原因となり酵素活性を阻害することになる。また血液試料でない場合でも、Fc部分は反応容器の器壁や免疫反応層などを構成する多孔性部材の孔(ポア)や内部空隙の表面等に非特異的吸着をするため、酵素標識抗体の活性が見かけ上低くなり測定時のノイズの原因となる。これらのノイズを除去するためには、Fc部位を含まないFab'、F(ab')₂或いはFabフラグメントを抗体として使用するのが望ましい。この中では、酵素との結合の便宜から遊離SH基を有するFab'フラグメントを抗体として使用するのがもっとも好ましい。

40

【0030】

上記した本発明の抗体、上記抗体又はその断片で標識したラテックス試薬、並びに酵素(例えば、枯草菌アミラーゼなど)で標識した上記抗体又はその断片は、免疫分析試薬(好ましくは犬TSH測定用免疫分析試薬)として用いることができる。

【0031】

標識として用いる酵素は、その後の酵素反応に使用する酵素基質との組合せを考慮して選ぶことができる。本発明では、酵素基質と反応する酵素に対する反応性を、酵素・抗体

50

・抗原のマトリックス様構造形成による立体障害により抑制するものであるから、酵素と基質との組合せはこのような立体障害による影響が検出し易い系を選ぶ方が好ましい。すなわち、酵素基質としては比較的高分子量のものが感度の点で好ましい。例えば分子量約2万以上であり、好ましくは分子量約10万以上の基質を使用する。このような基質としては、酵素アミラーゼに対する基質として澱粉；酵素セルラーゼに対する基質セルロース；プロテアーゼに対するゼラチン、ヘモシアニン等の蛋白質；リパーゼに対する各種油脂類を挙げることができる。上記の酵素と基質の選択に関する報告は、特開昭60-108756、60-171461、60-171460に詳しく開示されている。この中では、澱粉を基質とするアミラーゼが好ましい。またこれらの基質は水不溶性の基質である方が、酵素・抗体・抗原のマトリックス様構造による立体障害が顕著に現れることになり、これらを使用することが特に好ましい。

10

【0032】

アミラーゼとしては、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ等があり、検体中に実質的に含まれていないものがノイズ防止の観点から好ましい。アミラーゼの起源は動物（唾液、膵液等）、植物及び微生物と広範囲にわたる。従って、ヒトや動物などの体液、血液などを分析する場合には、これら高等動物由来のアミラーゼは使用しない方が好ましい。

【0033】

微生物や植物由来のアミラーゼには、コウジカビ(*Aspergillus*)、クモノスカビ(*Rhizopus*)、サッカロミセス酵母(*Saccharomyces*)属等由来のグルコアミラーゼ；オオムギ麦芽、コムギ、ダイズ等由来の α -アミラーゼ；枯草菌(*Bacillus Subtilis*)、ストレプトミセス・グリセウス(*Streptomyces griseus*)、シュードモナス・シュトゥツェリ(*Pseudomonas stutzeri*)、テルモアクチオミセス・ブルガリス(*Thermoactinomyces vulgaris*)等由来の α -アミラーゼ等が挙げられる。この中では液化力が強くまた熱安定性に優れている枯草菌(*Bacillus Subtilis*)由来の α -アミラーゼが最も好ましい。

20

【0034】

これらの酵素はいずれの検体中に存在する妨害因子で影響されないものが好ましく、また検体中には競合する同種の酵素がないことが好ましい。ただし、標識酵素と同種の酵素が検体中に含まれている場合には、この酵素阻害剤を用いてもよい。この酵素阻害剤は、検体中の酵素を阻害する程度が標識酵素の活性を阻害する程度より大きいものであればよい。酵素阻害剤は検体中の酵素を完全に失活させるが、標識酵素を全く阻害しないものが最も好ましい。しかし実用上は単に測定時においてブランク値を上昇させなければよく、測定後には酵素阻害剤が失活するなどして検体中の酵素活性が回復しても構わない。なお酵素阻害剤は、酵素標識抗体の酵素を阻害しないものであればよく、遊離状態の酵素を阻害することは構わない。この酵素阻害剤は、公知の酵素阻害剤から上記のような特異性を持つものを選んで用いればよい。或いは検体中の問題となる酵素に対する抗体を作って、これを酵素阻害剤として用いてもよい。

30

【0035】

酵素として α -アミラーゼを使用するときには、カルボキシメチル化澱粉、澱粉、アミロース、アミロペクチン等を基質として使用できる。特に水不溶性の澱粉等を使用すれば、酵素反応は基質粒子表面、すなわち固-液界面での反応となるため、抗体・抗原結合による立体障害の酵素活性に対する影響が大きく現れることになり、感度の点で好ましい。また水不溶性ダイ・スターチを使用して、酵素分解産物である可溶性アミロースについているダイ（色素）を検出するようにしてもよい。このような水不溶性青色澱粉ポリマーにはネオアミラーゼ（第一化学薬品製）等の市販のものを使用することができる。

40

【0036】

酵素と抗体との結合方法は、2つの物質の官能基（アミノ基、カルボキシル基、チオール基等）を利用して行うことができる。代表的な結合法としては、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、ピリジル・ジスルフィド法、マレイイミド・サクシイミド法等が挙げられる。結合方法はこれらの例に限られるものではなく、この他例えば「Method in Immuno

50

logy and Immunochemistry」 Vol.1, (C.A.Williams, M.W.Chase, Academic Press, 1967年) あるいは石川、河井、宮井 編「酵素免疫測定法」(医学書院、1978年発行)等の成書に記載されている方法の中から適宜選択して利用することができる。これらの結合方法の中では、抗体ヒンジ部のチオール基と酵素のアミノ基を架橋させるマレイミド-サクシイミド法が反応効率が高く、又抗体活性を保持できる点で優れている。

【0037】

マレイミド-サクシイミド法では、例えば以下のようにして酵素とFab'とを結合させる。まずマレイミド-サクシイミド試薬で酵素のアミノ基をマレイミド化する。これをゲル濾過で精製した後、チオール基を有する抗体(Fab')との複合化に付する。この時、エピトープの異なる2種類以上の抗体(Fab')を併用しても良く、その場合にそれらの抗体フラグメントは、一緒に結合反応に供される。この複合化反応は酵素1モルの対し、抗体3~7モルの範囲で行なうのが好ましい。抗体としてFab'(分子量約5万)を、酵素として-アマラーゼ(分子量約5万)を使用する場合には、全Fab'量に対して-アマラーゼ重量を1/3~1/7の範囲で結合反応を行うのが好ましい。この結合反応は通常4~室温で進行する。

10

【0038】

生成した酵素-抗体複合体(酵素標識抗体)はゲル濾過で精製し、必要により凍結乾燥法等により乾燥する。酵素と各抗体との結合比は1:1に限らず、目的に応じて任意の比率とすることができる。通常酵素は多数のアミノ基を持っているので、導入されるマレイミド基も複数となり、酵素1分子に導入される抗体分子は複数となる。酵素1分子に抗体が少なくとも1分子結合している必要があるから、複合体中の酵素に対する抗体のモル比は1以上であることが必要であり、検出感度を確実に高めるためには、モル比2~5の範囲とすることが好ましい。抗体としてFab'(分子量約5万)を、酵素として-アマラーゼ(分子量約5万)を使用する場合には、複合体の分子量は15万ダルトン以上で、好ましくは25~30万ダルトンの物質が検出感度が高い点で好ましい。

20

【0039】

次に、犬TSH測定方法(湿式法)を説明する。まず、検体に含まれる抗原と酵素-抗体複合体との結合物を溶液中で接触させる。その際、溶液の温度は20~45程度、pHは通常約4.0~約8.5の範囲内が適当である。pHを一定に保つために必要により、燐酸緩衝液、酢酸緩衝液などの緩衝液を用いてもよい。抗原と酵素-抗体複合体との接触時間は十分に反応しうる程度であればよく、例えば溶液の温度が37の場合には20~30分が適当である。その後、酵素基質を加え、酵素-抗体複合体の酵素活性を測定する。検体中に被検抗原が存在すれば酵素活性の抑制として検出することができる。予め既知量の被検抗原を含む溶液で検量線を描いておけば、検体中の被検抗原量を定量することができる。

30

【0040】

なお、抗原と酵素-抗体複合体との反応のみを溶液系で行い、反応後の反応液を乾式分析するようにしてもよい。すなわち、標識酵素の酵素基質を含有する基質層を備える乾式分析要素を用意し、これに免疫反応後の反応液を点着することにより酵素活性を測定するようにしてもよい。

【0041】

また、本発明の抗体は、乾式分析要素において用いることもできる。乾式分析要素の構成の具体例としては、特許第3151080号の図1及び図2と同様の構成を挙げることができる。即ち、一例としては、光透過性支持体の上に検出層(又は試薬層)、免疫反応層が積層されている。免疫反応層は、水浸透性層で構成され、本発明の酵素標識抗体と標識酵素の基質である非拡散性基質とを含有する。試薬層は、水浸透性層で構成され、免疫反応層から拡散・移行してきた酵素反応生成物(拡散性物質)を検出する試薬組成物を含む。酵素反応生成物が着色物質等のような直接検出できるものである場合には、検出層(又は試薬層)には検出用試薬組成物を含有させる必要がなく、この場合には検出層(又は試薬層)は検出層として機能する。

40

【0042】

50

要素の点着供給された液体試料中の検体（抗原）は、免疫反応層において酵素標識抗体と抗原抗体結合反応しマトリックス構造を作る。このため同じ反応免疫層に含有されている基質に対する酵素活性は抑制される。この結果試薬層（又は検出層）で検出される酵素反応生成物の量から、検体中の抗原量を知ることができる。

【0043】

また、別の例では、酵素標識抗体と酵素基質とは別の層に含有させてもよい。この場合には、試薬層（又は検出層）の上に酵素基質を含有する水浸透性の基質層を配し、さらにその上に酵素標識抗体を含有する免疫反応層を配する。この場合には、要素に点着供給された液体試料中の検体（抗原）は、免疫反応層において酵素標識抗体と抗原抗体結合反応しマトリックス構造を作り、実質的に不動になる。抗原と結合しなかった酵素標識抗体（或るいは層構造に捕捉されない程度に小さい構造のマトリックス構造のもの）は、次の基質層に移行する。

【0044】

上記の何れの態様でも、要素に液体試料を点着するだけで、要素内で酵素免疫反応を進行させることができる。

【0045】

本発明における犬TSH測定方法は、特に限定されないが、例えば、蛍光強度を検出することができる機器、具体的には、マイクロプレートリーダー、又は表面プラズモン励起による蛍光検出（SPF）を行うためのバイオセンサーなどを用いて蛍光強度を検出することができる。蛍光強度の検出は、通常、抗原抗体反応後一定時間、例えば、数分～数時間後に終了する。前記免疫複合体の形成の度合いを蛍光強度として検出することにより、蛍光強度と被検出物質の濃度の関係から、被検出物質の濃度を定量することができる。なお、蛍光の測定の形態は、プレートリーダー測定でもよいし、フロー測定でもよい。なお、表面プラズモン励起による蛍光検出法（SPF法）は、落射励起による蛍光検出法よりも高感度に測定することができる。

【0046】

上記の表面プラズモン蛍光（SPF）バイオセンサーとしては、例えば、特開2008-249361号公報に記載されているような、所定波長の励起光を透過させる材料から形成された光導波路と、この光導波路の一表面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、前記光ビームを光導波路に通し、該光導波路と金属膜との界面に対して表面プラズモンを発生させる入射角で入射させる光学系と、該表面プラズモンによって増強されたエバネッセント波によって励起されたことによって発生する蛍光を検出する蛍光検出手段とを備えたセンサーを用いることができる。

【0047】

本発明はさらに、上記した本発明の犬TSH測定用免疫分析試薬に、試料を接触させることを含む、試料中の犬TSHの測定方法に関する。試料の種類は特に限定されないが、例えば、血液（全血、血漿、血清）、リンパ液、尿などがあり、好ましくは血液（全血、血漿、血清）であり、更に好ましくは血清、血漿であり、特に好ましくは血清である。

【0048】

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0049】

実施例1：免疫

(1) 免疫原の調製

TSH抗原表面に提示されている配列で、種間の相同性の低い配列として、以下の配列をペプチド抗原として選択した。

犬TSH 鎖ペプチド由来：Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe-Thr-Met-Gln-Gly-Cys(FPDGEFTMQGC)
(N末端：11残基) (配列番号1)

上記配列は、通常のペプチド免疫で使用する配列に比べて短いので、以下の構造を有す

10

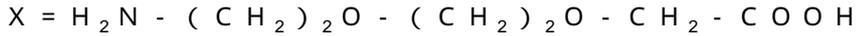
20

30

40

50

るPEGスパーサー(2つ導入)を介した配列(FPDGEFTMQGXXC)を設計した。



このFPDGEFTMQGXXCで示される配列を、Fmoc固相合成法で合成し、HPLCで精製した。

【0050】

次に、ペプチドKLHコンジュゲートを以下の通り作製した。

20mg KLHを2mLのミリQ水に溶解した。マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド(MBS:架橋剤)2.0mgを500 μ lのDMFに溶解した。上記KLH溶液を攪拌しながら、MBS溶液を400 μ l滴下した。その後、室温で60分間ゆっくりと攪拌した。50mMリン酸バッファ(pH7.4)で平衡化したゲルろ過カラム(Sephadex G-25)にアプライし、吸光度280nmを追跡してタンパク質成分を回収した。5mg/mLとなるように回収したKLH-MBSの濃度を調整し、ペプチドとの反応に適量を用いた。10mg/mLとなるようにペプチドをミリQ水又は1xPBSに溶解した。調製したKLH-MBS溶液とペプチド溶液を等量混合し、スターラーで攪拌しながら室温で2時間反応させた。その後、リン酸バッファ(1xPBS)を加え、濃度1mg/mLに調整した。

10

【0051】

(2) マウスの免疫感作

感作用抗原(peptide-KLH)10mgを使用した。

感作抗原をマウス背部皮下に免疫した。初回は完全アジュバント(FCA)と混合したエマルジョンを投与した。2~4回目は不完全アジュバント(FIA)と混合したエマルジョンを投与した。2週間隔で5回免疫を行い、3回目4回目免疫の翌週には採血し抗体価測定を実施した。採血血清の一部(100~200 μ L)をELISA測定に用いた。抗体価の上昇が認められた場合、5回目免疫を最終免疫とする。最終免疫は抗原AをPBS(-)で希釈し、腹腔内へ投与した。最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

20

(1) 動物: BALB/c マウス、7-9週齢(入荷時)

(2) 匹数: 3匹

(3) 免疫量: 100-200 μ g/匹/回

(4) 免疫箇所: 背部皮下

(5) 抗体価測定: ELISA

抗体価測定の結果、選定されたマウス(1~3匹)より脾臓を摘出し、細胞融合を行った。

30

【0052】

実施例2: ハイブリドーマの調製

免疫マウスより摘出した脾臓細胞をミエローマと混合して細胞融合を実施した。

融合方法: PEG法

使用細胞: 最終免疫3日後の脾臓細胞

ミエローマ: P3-X63-Ag8-U1

細胞比、脾臓細胞: ミエローマ=5-10:1

細胞播種: 脾臓細胞として $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/wellで96-well plateに播種

使用培地: RPMI-1640 + 10% FBS + HAT(場合によっては更にHCF or IL-6を添加)

40

【0053】

実施例3: モノクローナル抗体の一次スクリーニング(細胞融合後のスクリーニング)

測定用抗原を1 μ g/mLとなるようPBS(-)で希釈し固相化を行い、HAT培地による選択培養で増殖したハイブリドーマの培養上清をELISAによりスクリーニングした。2次抗体として抗マウスIgG HRP標識抗体を用いた。スクリーニング陽性ハイブリドーマを24ウェルプレートで培養し、培養上清を各1mL評価に使用した。SPRによる選択試験結果をもとに、クローニングウェルを選択した。

【0054】

犬TSH(cTSH; Whole)抗原を用いた一次スクリーニングの結果を図1から図8に示す。

【0055】

50

cTSH固定化Fcでのレスポンス (RU値) で、上位 11 ウェルの結果を以下に示す。

【 0 0 5 6 】

【 表 1 】

	ウェル名	ΔRU 値※
1	6B12	174
2	8H7	137
3	8H10	182
4	22E10	84
5	24H4	185
6	26G8	157
7	32D6	95
8	33F7	102
9	34G11	73
10	35G3	186
11	37D12	146

10

※ $\Delta RU = \Delta Ru (\text{cTSH 固定化Fc}) / \Delta Ru (\text{captureAb 固定化Fc}) * 100$

【 0 0 5 7 】

(条件詳細)

BiacoreT100

Chip: CM5

cTSH (Scripts社製) 固定化Fc: RU2000 (cTSHとの反応性を評価)

captureAb固定化Fc: RU2000 (上清中の抗体濃度を定量)

【 0 0 5 8 】

実施例 4 : モノクローナル抗体の二次スクリーニング (限界希釈後のスクリーニング)

モノクローナル抗体の二次スクリーニング (限界希釈後のスクリーニング) を実施例 3 の細胞融合後のスクリーニングと同様に行った。

【 0 0 5 9 】

モノクローナル抗体の二次スクリーニング (限界希釈後のスクリーニング) の結果を図 9 及び図 10 に示す。

26G8B6以外は、どれも高いシグナルが観察された。SPR評価だけでは、各親クローンの中での優劣がつかない。そこで、細胞の生育状況とサブクラスを確認して、最終クローンを選択を行うことにした。サブクラスの決定は、Isotyping kit (ロッシュ製) を用いて行った。結果を以下の表に示す。

【 0 0 6 0 】

20

30

【表 2】

表 2 : α 鎖ペプチド免疫最終クローン選定結果のまとめ

クローン名	株名	SPR シグナル	ELISA シグナル	サブクラス	細胞生育状況
8H10	8H10B1	147	2.492	IgG1	○
	8H10C1	153	2.667	IgG1	○
	8H10D1	176	1.178	IgG1	×
	8H10E1	192	2.651	IgG1	×
22E10	22E 10A3	278	2.383	IgM	△
	22E 10B3	233	2.315	IgM	△
6B12	6B12A4	104	2.610	IgG1	○
	6B12B4	108	2.768	IgG1	○
	6B12C4	105	2.751	IgG1	○
	6B12D4	109	3.172	IgG1	○
	6B12E4	109	3.128	IgG1	△
	6B12F4	106	3.000	IgG1	△
24H4	24H4A5	141	2.635	IgG1	○
	24H4C5	135	2.946	IgG1	○
	24H4D5	129	2.245	IgG1	○
26G8	26G8A6	260	2.571	IgG1	○
	26G8B6	4	1.441	IgM	×
32D6	32D6A7	56	1.992	IgG2b	○
	32D6B7	57	2.278	IgG2b	○
	32D6C7	55	2.358	IgG2b	○
33F7	33F7A8	103	1.955	IgG1	○
	33F7B8	104	2.412	IgG1	○
	33F7C8	102	2.499	IgG1	○
	33F7D8	100	2.607	IgG1	○
	33F7E8	176	2.558	IgG1	△
	33F7F8	117	2.518	IgG1	○
	33F7G8	112	2.547	IgG1	○
34G11	34G11A9	84	1.921	IgG1	○
	34G11B9	99	2.332	IgG1	○
	34G11C9	87	2.406	IgG1	○
	34G11E9	56	2.367	IgG1	△
	34G11F9	99	2.416	IgG1	○
	34G11G9	102	2.144	IgG1	○
	34G11H9	86	2.633	IgG1	○
35G3	35G3A10	167	1.883	IgG1	△
	35G3B10	160	2.156	IgG1	○
	35G3C10	195	2.441	IgG1	○
	35G3D10	161	2.664	IgG1	○
	35G3E10	164	2.503	IgG1	○
37D12	37D12A11	132	2.161	IgG1	△
	37D12B11	120	2.448	IgG1	△
	37D12C11	119	2.520	IgG1	×
	37D12D11	126	2.576	IgG1	○
	37D12E11	119	2.685	IgG1	○
	37D12F11	113	2.627	IgG1	×
	37D12G11	120	2.681	IgG1	△
	37D12H11	126	2.806	IgG1	△
	37D12A12	94	1.495	IgG1	○
	37D12B12	125	2.362	IgG1	○
	37D12C12	113	2.548	IgG1	○

10

20

30

40

【 0 0 6 1 】

各親クローンの中で、SPRシグナルの高い株、かつ細胞生育状況が良好な株を上位2つずつ選択した（合計10クローン18株）。IgMは1株であり、IgG2bは2株で、その他は全てIgG1であった。

50

【配列表】

2011184372000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB02 BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 DA86 EA50 FA71

专利名称(译)	针对犬TSH α 链肽的抗体		
公开(公告)号	JP2011184372A	公开(公告)日	2011-09-22
申请号	JP2010052092	申请日	2010-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	笠置典之 渡辺裕也 大原智也		
发明人	笠置 典之 渡辺 裕也 大原 智也		
IPC分类号	C07K16/26 G01N33/53 C12N5/10 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/26.ZNA G01N33/53.B C12N5/00.102 C12P21/08 C12N5/12		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA71		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性识别长期TSH抗体的抗体，而不需要大量获得TSH抗原。解决方案：提供了通过给予多聚蛋白产生的抗体，所述多肽含有在N末端侧由Phe-Pro-Asp-Gly-Glu-Phe表示的氨基酸序列的多肽，作为免疫动物的抗原，和片段抗体。Z

	ウェル名	Δ RU 値※
1	6B12	174
2	8H7	137
3	8H10	182
4	22E10	84
5	24H4	185
6	26G8	157
7	32D6	95
8	33F7	102
9	34G11	73
10	35G3	186
11	37D12	146