

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5963900号  
(P5963900)

(45) 発行日 平成28年8月3日(2016.8.3)

(24) 登録日 平成28年7月8日(2016.7.8)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34

請求項の数 11 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-41714 (P2015-41714)	(73) 特許権者	504137912
(22) 出願日	平成27年3月3日(2015.3.3)		国立大学法人 東京大学
(62) 分割の表示	特願2013-134351 (P2013-134351)		東京都文京区本郷七丁目3番1号
原出願日	平成19年8月2日(2007.8.2)	(73) 特許権者	000003300
(65) 公開番号	特開2015-111154 (P2015-111154A)		東ソー株式会社
(43) 公開日	平成27年6月18日(2015.6.18)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成27年3月3日(2015.3.3)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	特願2006-212275 (P2006-212275)	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成18年8月3日(2006.8.3)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	特願2007-92412 (P2007-92412)		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成19年3月30日(2007.3.30)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オートタキシン測定による悪性リンパ腫の検査方法および検査薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト検体中のオートタキシン濃度を測定し、その値が健常人測定値からなる正常値に対し有意差をもって高値を示した場合に悪性リンパ腫と診断することを補助することを特徴とし、ここで当該悪性リンパ腫が濾胞性リンパ腫であることを特徴とする悪性リンパ腫の診断の補助方法。

【請求項2】

オートタキシンが完全長のオートタキシン、部分的に切断を受けたオートタキシン、一部遺伝子の変異を受けたオートタキシンであることを特徴とする請求項1記載の診断の補助方法。

【請求項3】

検体が、全血、血球、血清、血漿などのヒト血液成分あるいはヒト細胞、組織の抽出液であることを特徴とする請求項1又は2記載の診断の補助方法。

【請求項4】

抗体を用いた免疫化学的測定方法によってオートタキシンの濃度を測定することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載された悪性リンパ腫の診断の補助方法。

【請求項5】

前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項4に記載された悪性リンパ腫の診断の補助方法。

【請求項6】

前記抗体を検体と接触させ、検体に結合あるいは結合しなかった抗体を検出することにより検体中のオートタキシン濃度の測定を行なうことを特徴とする請求項4又は5に記載された悪性リンパ腫の診断の補助方法。

【請求項7】

前記抗体を検体と接触させ、抗体に結合あるいは結合しなかったオートタキシンを検出することにより検体中のオートタキシン濃度の測定を行なうことを特徴とする請求項4又は5に記載された悪性リンパ腫の診断の補助方法。

【請求項8】

前記免疫化学的測定方法が酵素標識、アイソトープ標識、蛍光標識を利用した競合法、サンドイッチ法あるいは蛍光偏光法を利用したホモジニアス測定法、表面プラズモン共鳴分析法を利用した結合測定であることを特徴とする請求項4～7のいずれか1項に記載された悪性リンパ腫の診断の補助方法。

10

【請求項9】

抗ヒトオートタキシン抗体を含有し、免疫化学的方法により測定することを特徴とする濾胞性リンパ腫である悪性リンパ腫検査薬。

【請求項10】

請求項1～3のいずれか1項記載の方法がオートタキシンの有するリゾホスホリパーゼD活性の測定であり、その値が健常人測定値からなる正常値に対し有意差をもって高値を示した場合に悪性リンパ腫と診断することを補助することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載の悪性リンパ腫の診断の補助方法。

20

【請求項11】

リゾホスファチジルコリンを含有し、リゾホスホリパーゼD活性を測定することを特徴とする濾胞性リンパ腫である悪性リンパ腫検査薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、天然形態ヒトオートタキシンを特異的に認識、結合する抗体及びそのスクリーニング方法、並びにヒト検体中のオートタキシン濃度の測定による慢性肝疾患の検査方法および検査薬に関する。

【背景技術】

30

【0002】

ヒトオートタキシンは、1992年M. L. StrackeらによってA2058ヒト黒色腫細胞培養培地から細胞運動性を惹起する物質として単離された分子量約125kDaの糖蛋白質である(J. Biol. Chem., 256, 2524, 1992)。その後、1994年にJ. MurataらによるcDNAクローニングにより構造解析が進められアミノ末端側で単一膜貫通部分を有すること、細胞ガイドメインに2つのソマトメジンB領域、I型ホスホジエステラーゼ活性VおよびEFハンドのループ領域を含み、ホスホジエステラーゼ活性を有することなどが明らかとなった(J. Biol. Chem., 269, 30479, 1994)。しかし、オートタキシンが細胞運動性を惹起する機能に関しての明確な証拠は得られぬままであった。2002年、新規リゾホスホリパーゼDの同定がヒト(A. Tokumura et al., J. Biol. Chem., 277, 39436, 2002)およびウシ血清(M. Umezū-Goto et al., J. Cell Biol., 158, 227, 2002)からなされ、本酵素活性により生成されるリゾホスファチジン酸が細胞運動性を惹起することがはじめて明らかとなった。

40

【0003】

オートタキシンの運動性惹起機能から推測し、Strackeらはヒト癌の浸潤性能力に対するマーカーとしてのオートタキシンの使用を米国特許第5,449,753号(1995年)に記載している。また、Strackeらは、毒素と結合された抗オートタキシン抗体の投与による癌治療に関しても米国特許第5,731,167号(1998年)

50

に示唆している。この様にヒトオートタキシンを特異的に認識する抗体が切望されているが、オートタキシンは動物血清中に様々な形態で比較的少量に含まれているため、血清中に通常存在する変性を受けていないオートタキシン（天然形態のオートタキシン）に対し特異性かつ強い結合力を有する抗体取得は非常に困難なことが予想される。実際、オートタキシン自体の定量法はなく、オートタキシンが有するリゾホスホリパーゼD活性の評価により間接的にその定量が行われているのが現状である。かかる活性測定は手法が煩雑であり、また酵素活性発揮させるために通常数時間にも及ぶ基質とのインキュベーション時間を要する。また、ヒト検体中にはオートタキシンとは異なるリゾホスホリパーゼD活性を有する酵素が存在することが予想されること、酵素活性測定におけるリゾホスファチジルコリン基質分解により生じるリゾホスファチジン酸およびコリンがヒト検体中に内  
10  
在する、などといった妨害因子が存在する。酵素活性測定におけるこれら内在性因子はヒトオートタキシンの特異的定量に少なからず影響を及ぼし、精度の高いヒトオートタキシン定量法ではない。実際、ヒト精漿中には数十mM程度の濃度のコリンが含まれており、コリン除去の前処理なしには、リゾホスファチジルコリンを基質としたコリン生成量による精漿の活性測定は困難である。

#### 【0004】

我々を含めいくつかのグループによりヒトオートタキシンの合成部分ペプチドや部分配列を大腸菌により発現させた可溶性ヒトオートタキシンを免疫することにより多数のモノクローナル抗体が樹立されている（Journal of Biological Chemistry 269, 30479 - 30484, 1994, FEBS letter  
20  
571, 197 - 204, 2004）。しかし、これら抗体を利用し、ウェスタンブロッティングによりヒトオートタキシンを検出することはできるが、これらの抗体はヒト検体中の天然形態なヒトオートタキシンとの反応性は示さない、あるいはきわめて低い反応性しか示さない。よって、ヒト検体を対象としたELISA測定法などの免疫学的測定方法への適用は非常に困難であり、実用には至っていない。

#### 【0005】

本発明によれば、ヒト検体中の天然形態ヒトオートタキシンと特異的に反応するモノクローナル抗体を非常に効率よく樹立可能である。すなわち、抗原免疫、細胞融合によりモノクローナル抗体を作製する際のスクリーニング方法において、溶液中に存在する天然形態の抗原との反応性を指標に抗体を選択することにより、ELISA法などの汎用的なヒト  
30  
オートタキシン定量測定系を確立することができる。また、本手法で取得した抗体は、血液などに含まれるヒトオートタキシンを効率よく結合捕捉できることより、サンプルからの抗原の除去はもとより、抗原精製も可能な高性能な抗体である。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

オートタキシンのヒト組織あるいは体液中の存在濃度が様々な疾病により変動することを示唆する報告がなされているが、これまでその定量方法がないことより、その詳細な解析が行なわれていない。還元剤存在下など変性条件下でのオートタキシンの有無や存在比などの定性的な解析はなされてきたが、構造、機能を維持した状態で通常生体内に存在する天然形態のヒトオートタキシンを効率よく認識、結合可能な抗体がなかったことより、  
40  
汎用可能なヒトオートタキシンの定量法は確立されていなかった。また、オートタキシンが有するリゾホスホリパーゼD活性を指標に、酵素活性測定によりリゾホスホリパーゼD活性の変動と疾病との因果関係の解析が行なわれているが、本酵素活性測定ではヒト検体中に含まれるオートタキシン以外の他のリゾホスホリパーゼD活性を含んだ測定値が得られてしまうこと、活性測定の際に用いるリゾホスファチジルコリン基質や活性測定の際に生じるコリンが検体中に内在的に含まれること、などのため、真のオートタキシン特異的定量方法としては信頼性が十分でない。

#### 【0007】

我々は、天然形態のヒトオートタキシンに対する抗体を効率よく取得する手法を見出し、その方法により取得した天然形態のヒトオートタキシンに対する抗体を用いることによ  
50

り、活性測定時に問題となる内在性物質の影響を受けることなく、また、検体を還元処理、グアニジン塩酸塩、尿素などの蛋白変性剤などにより変性させるなどの前処理を必要とすることなくヒトオートタキシンを精度よく定量可能な測定方法ならびに定量試薬の提供に成功した。

【 0 0 0 8 】

詳しくは、本願は下記の発明を包含する：

( 1 ) 変性を受けることなく生体内での存在状態にある天然形態のヒトオートタキシンを特異的に認識する抗体のスクリーニング方法であって、以下の段階：

当該抗体の候補抗体を補足可能な結合因子を固相に結合させ；

当該結合因子に当該抗体の候補抗体を結合させ；

当該候補抗体を作用させた系に天然形態ヒトオートタキシンを作用させ；次いで

当該天然形態ヒトオートタキシンの前記抗体に対する結合力を指標に、当該天然形態ヒトオートタキシンを特異的に認識する抗体を選定する；

を含んでなる方法。

( 2 ) 前記結合因子が抗体である、( 1 ) の方法。

( 3 ) 前記天然形態ヒトオートタキシンがポリヒスチジンタグを有する組換えヒトオートタキシン抗原である、( 1 ) 又は( 2 ) の方法。

( 4 ) 前記ポリヒスチジンタグを有する組換えヒトオートタキシン抗原に対し特異的に結合する標識された抗ポリヒスチジン抗体を利用し、前記天然形態ヒトオートタキシンの前記抗体に対する結合力を測定する、( 3 ) の方法。

( 5 ) 前記標識された抗ポリヒスチジン抗体が酵素標識化抗ポリヒスチジン抗体である、( 4 ) の方法。

( 6 ) 変性を受けることなく生体内での存在状態にある天然形態のヒトオートタキシンを特異的に認識する抗体であって、以下の段階：

当該抗体の候補抗体を補足可能な結合因子を固相に結合させ；

当該結合因子に当該抗体の候補抗体を結合させ；

当該候補抗体を作用させた系に天然形態ヒトオートタキシンを作用させ；次いで

当該天然形態ヒトオートタキシンの前記抗体に対する結合力を指標に、当該天然形態ヒトオートタキシンを特異的に認識する抗体を選定する；

を含んでなる方法により獲得可能な抗体。

( 7 ) 前記結合因子が抗体である、( 6 ) の抗体。

( 8 ) 前記天然形態ヒトオートタキシンがポリヒスチジンタグを有する組換えヒトオートタキシン抗原である、( 6 ) 又は( 7 ) の抗体。

( 9 ) 前記ポリヒスチジンタグを有する組換えヒトオートタキシン抗原に対し特異的に結合する標識された抗ポリヒスチジン抗体を利用し、前記天然形態ヒトオートタキシンの前記抗体に対する結合力を測定する、( 8 ) の抗体。

( 1 0 ) 前記標識された抗ポリヒスチジン抗体が酵素標識化抗ポリヒスチジン抗体である、( 9 ) の抗体。

【 0 0 0 9 】

上記発明によれば、天然形態のヒトオートタキシンを特異的に認識結合可能なモノクローナル抗体が効率よく取得可能であり、本抗体を用いたヒト検体中のオートタキシンを前処理などする必要なく定量可能な測定方法を構築可能である。上記発明により得られた天然形態ヒトオートタキシン測定試薬を用い、ヒト血清を測定することにより癌の診断、あるいは慢性肝疾患の診断が可能である。また、上記方法によればリゾホスフォリパーゼD酵素活性によるオートタキシン量の推察において問題であった内在性の測定妨害因子や競合酵素の影響を受けることなく、かつ短時間でヒトオートタキシンを定量可能な方法、試薬を提供することが可能である。

【 0 0 1 0 】

さらに、本発明者は、ヒト検体中の天然形態ヒトオートタキシンと特異的に反応するモノクローナル抗体を使用したE L I S A法などの汎用的なヒトオートタキシン定量測定系

10

20

30

40

50

を用いることにより簡便かつ短時間で血液などに含まれるヒトオートタキシンを定量することが可能であることを見出した。そして、本測定系を使用し鋭意検討を行なったところ、リンパ腫、特に濾胞性リンパ腫患者において血清中のオートタキシン濃度が高値を示すことが明らかとなった。悪性リンパ腫には、大きく分けてホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫の2つがあり、日本では約90%が非ホジキンリンパ腫に分類される。非ホジキンリンパ腫は形態学的特徴（病理学的分類）、細胞系質の特徴（“B細胞性、T細胞性、NK細胞性”）、染色体・遺伝子情報などをもとに分類され、WHO分類において非常に多様な分類がなされており、その一分類である濾胞性リンパ腫は日本において悪性リンパ腫の10~15%との報告があり、年々増加傾向がある。悪性リンパ腫の診断は、リンパ節生検や胸部X線検査、コンピュータ断層撮影（CT）、核磁気共鳴検査（MRI）、ガリウム（Ga）シンチグラフィ、ポジトロン・エミッション・トモグラフィ（PET）などによる病気の進行度などの検査がなされる。血液検査としては乳酸脱水素酵素（LDH）、C反応性蛋白（CRP）、可溶性インターロイキン 2（IL-2）受容体などがあるが、いずれも悪性リンパ腫特異的な診断マーカーではなく、悪性リンパ腫の診断マーカーが切望されている。

10

#### 【0011】

オートタキシンのヒト組織あるいは体液中の存在濃度が様々な疾病により変動することを示唆する報告がなされているが、これまでその定量方法がないことより様々な疾病との因果関係の解析がなされてこなかった。本発明によれば、血清などのヒト検体中のオートタキシン濃度を簡便、短時間、かつ信頼性高く定量可能となった。本測定方法、測定試薬を用いることによりこれまで明らかにされていなかった様々な疾患とオートタキシン濃度の関係を明らかにすることが可能となった。さらに、本測定系を用い鋭意検討を重ねた結果、これまで血清マーカーがなかったことより診断が煩雑、困難であった悪性リンパ腫、特に濾胞性リンパ腫の検査が可能となった。

20

#### 【0012】

本発明者はヒトオートタキシンに対する抗体を用いた免疫化学的測定方法を構築したことにより、活性測定時に問題となる内在性物質の影響を受けることなく、また、検体について前処理を必要とすることなくヒトオートタキシンを精度よく定量可能となった。本測定試薬を用い鋭意検討を重ねた結果、悪性リンパ腫、特に濾胞性リンパ腫患者において血清中のオートタキシン濃度が高値を示すことを見出し、濾胞性リンパ腫の検査あるいは検査補助が可能な検査試薬の提供が可能となった。また、煩雑さや精度は劣るもののオートタキシンが有するリゾホスフォリパーゼD酵素活性測定によっても濾胞性リンパ腫の検査あるいは検査補助が可能である。

30

#### 【0013】

従って、本願は下記の発明をも包含する：

(11) ヒト検体中のオートタキシン濃度を測定し、その値が健常人測定値からなる正常値に対し有意差をもって高値を示した場合に悪性リンパ腫と判断することを特徴とする悪性リンパ腫の検査方法。

(12) (11)の悪性リンパ腫が濾胞性リンパ腫であることを特徴とする検査方法。

(13) (11)のオートタキシンが完全長のオートタキシン、部分的に切断を受けたオートタキシン、一部遺伝子の変異を受けたオートタキシンであることを特徴とする(11)又は(12)の検査方法。

40

(14) (11)の検体が、全血、血球、血清、血漿などのヒト血液成分あるいはヒト細胞、組織の抽出液であることを特徴とする(11)~(13)のいずれかに記載の検査方法。

(15) (11)のオートタキシン濃度測定方法が、抗体を用いた免疫化学的測定方法である(11)~(14)のいずれかに記載の検査方法。

(16) (15)の抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする(11)~(15)のいずれかに記載の検査方法。

(17) (15)の抗体を検体と接触させ、検体に結合あるいは結合しなかった抗体を検

50

出することにより検体中のオートタキシン濃度の測定を行なうこと特徴とする(11)~(16)のいずれかに記載の検査方法。

(18)(14)の抗体を検体と接触させ、抗体に結合あるいは結合しなかったオートタキシンを検出することにより検体中のオートタキシン濃度の測定を行なうことを特徴とする(11)~(16)のいずれかに記載の検査方法。

(19)(15)~(18)のいずれかに記載の方法が酵素標識、アイソトープ標識、蛍光標識などを利用した競合法、サンドイッチ法あるいは蛍光偏光法等を利用したホモジニアス測定法、表面プラズモン共鳴分析法を利用した結合測定等であることを特徴とする(11)~(18)のいずれかに記載の検査方法。

(20)(11)~(19)のいずれかに記載の測定方法を原理とすることを特徴とする悪性リンパ腫検査薬。

10

(21)(11)~(14)のいずれかに記載の方法がオートタキシンの有するリゾホスフォリパーゼD活性の測定であり、その値が健常人測定値からなる正常値に対し有意差をもって高値を示した場合に悪性リンパ腫と判断することを特徴とする検査方法。

(22)(21)の測定方法を原理とすることを特徴とする悪性リンパ腫検査薬検体中のオートタキシンを測定することによるリンパ腫の検査方法。

#### 【0014】

上記発明によれば、ヒト検体中のオートタキシンを前処理などする必要なくヒトオートタキシン特異的モノクローナル抗体を用いた定量試薬を使用しヒト検体中のオートタキシン濃度を定量することにより悪性リンパ腫、特に濾胞性リンパ腫の検査が可能である。本免疫学的定量試薬を用いれば検体中に含まれる内在性の測定妨害因子や競合酵素の影響を受けることなく、かつ短時間でヒトオートタキシンを定量可能な検査薬を提供することが可能である。また、上記発明によればリゾホスフォリパーゼD酵素活性測定によっても前記免疫化学的定量方法に煩雑さ、精度は劣るものの悪性リンパ腫の判断が可能であり、その検査薬の提供も可能である。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1】図1は、ポリヒスチジンタグ標識ヒトオートタキシン精製品のSDS-PAGEおよび、抗オートタキシンペプチド抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。

30

【図2】図2は、ヒトオートタキシンをイムノプレートに直接結合させた際の抗体の反応性を示す。

【図3】図3は、抗ラットIgG抗体を介してイムノプレートに結合させた抗ヒトオートタキシン抗体の溶液中に存在するヒトオートタキシンとの反応性を示す。

【図4】図4は、抗体による血清中ヒトオートタキシンのリゾホスフォリパーゼD活性の吸収性能を示す。

【図5】図5は、抗体による動物血清中オートタキシンのリゾホスフォリパーゼD活性の吸収性能を示す。

【図6】図6は、全長ヒトオートタキシン精製品のSDS-PAGEおよび、抗オートタキシンペプチド抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す。

40

【図7】図7は、抗ヒトオートタキシンモノクローナル抗体による2抗体サンドイッチ法によるヒトオートタキシンとの反応性を示す。

【図8】図8は、取得した抗ヒトオートタキシン抗体群を用いた組み合わせ評価によるサンドイッチELISA測定系での反応性を示した。

【図9】図9は、2抗体2ステップサンドイッチELISA法を用い、6濃度(0, 0.34, 0.675, 1.35, 2.70, 5.40 μg/mL)のヒトオートタキシン既知濃度標準品を測定した際のオートタキシン濃度と450nmの吸光度の関係を示したグラフである。

【図10】図10は、ヒト血清42検体の2抗体2ステップサンドイッチELISA法によるヒトオートタキシン濃度とリゾホスフォリパーゼD活性の相関性を示す。

50

【図11】図11は、2抗体1ステップサンドイッチELISA法を用い、6濃度(0, 0.34, 0.675, 1.35, 2.70, 5.40 μg/mL)のヒトオートタキシン既知濃度標準品を測定した際のオートタキシン濃度と450nmの吸光度の関係を示したグラフである。

【図12】図12は、ヒト血清42検体の2抗体1ステップサンドイッチELISA法によるヒトオートタキシン濃度とリゾホスホリパーゼD活性の相関性を示す。

【図13】図13は、2抗体1ステップサンドイッチELISA法を用いPSA、CA19-9、CA153、CA125測定値がカットオフを超える検体を用い、健常人に対するオートタキシン濃度を検証した結果を示す。いずれの検体群においても健常人に対し有意差  $p < 0.001$  を示した。

【図14】図14は、2抗体1ステップサンドイッチELISA法を用い慢性肝疾患患者および健常人の血清中のヒトオートタキシン濃度を測定した結果を示す。

【図15】図15は、精漿中のリゾホスホリパーゼD活性測定の結果を示す。

【図16】図16は、6濃度標準品を用いた際の検量線を示す。回帰式は  $\text{Log}(\text{Rate}) = a \text{Log}(\text{Conc})^3 + b \text{Log}(\text{Conc})^2 + c \text{Log}(\text{Conc}) + d$  で示され、表示している検量線の各定数は、 $a = -0.12278770$ 、 $b = -0.30068255$ 、 $c = 1.26861618$ 、 $d = 1.56201600$  である。Rateは単位時間当たりの4-メチルウンベリフェロンの生成量 (nmol/L・sec) を示す。

【図17】図17は、男性血清のオートタキシン濃度を測定し、白血病、悪性リンパ腫ごとに分類した結果を示す。縦軸はオートタキシン(ATX)濃度、横軸は各病態分類を示し、健常人(NHS)、AL(急性白血病)、CL(慢性白血病)、HD(ホジキンリンパ腫)、NHL(非ホジキンリンパ腫)、その他白血病、リンパ腫(others)を示す。

【図18】図18は、女性血清のオートタキシン濃度を測定し、白血病、悪性リンパ腫ごとに分類した結果を示す。縦軸はオートタキシン(ATX)濃度、横軸は各病態分類を示し、健常人(NHS)、AL(急性白血病)、CL(慢性白血病)、HD(ホジキンリンパ腫)、NHL(非ホジキンリンパ腫)、その他白血病、リンパ腫(others)を示す。

【図19】図19は、男性血清のオートタキシン濃度を測定し、非ホジキンリンパ種ごとに分類した結果を示す。縦軸はオートタキシン(ATX)濃度、横軸は各病態分類を示し、健常人(NHS)、Burkitt(バーキットリンパ腫)、LBL(リンパ芽球性リンパ腫)、NHL(MCL)(マンテル細胞リンパ腫)、NHL(DLBCL)(びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)、NHL(FL)(濾胞性リンパ腫)を示す。

【図20】図20は、女性血清のオートタキシン濃度を測定し、非ホジキンリンパ種ごとに分類した結果を示す。縦軸はオートタキシン(ATX)濃度、横軸は各病態分類を示し、健常人(NHS)、NHL(DLBCL)(びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)、NHL(FL)(濾胞性リンパ腫)を示す。

【図21】図21は、オートタキシン(ATX)濃度とリゾホスファチジン酸(LPA)濃度の相関性試験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

免疫抗原の調製のためのヒトオートタキシン遺伝子をコードする核酸分子は、ヒトオートタキシンの遺伝子情報をもとにしたポリヌクレオチドプローブを使用して、cDNAライブラリーあるいはゲノムライブラリーよりスクリーニングすることにより得られる。cDNAライブラリーは、公知の方法を利用して組織からRNAを単離することにより容易に調製可能であり、また市販のものを利用してかまわない。得られたヒトオートタキシンcDNAを用い、発現用ベクターに組換えることにより、種々の発現系での抗原発現を行なうことができる。また、以降の抗原精製操作を簡便にするためにポリヒスチンタグやMycタグ等の汎用されているマーカータグをヒトオートタキシン遺伝子の末端に導入することも有効である。蛋白質発現系は大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などいずれでもかまわないが、大量発現が可能であり、かつ糖鎖付加など天然形態なヒトオートタキシ

10

20

30

40

50

ンに近い構造を有する蛋白質発現が可能である昆虫細胞 - バキュロウイルス系が好ましい。ポリヒスチジンタグを有するオートタキシンを発現させた場合は、金属キレートカラムなどにより容易に精製可能である。また、c - m y c タグなどは抗c - m y c 抗体アフィニティーカラムによる精製が可能である。これらの方法は標準的であり充分技術確立されている。

#### 【0017】

本発明に用いる抗原免疫は技術確立されていれば手法を選ばず、例えば精製抗原を動物に免疫することにより抗体の産生は可能である。使用する動物は抗体産生能を有するものであれば特に制限されるものではなく、マウス、ラット、ウサギなどの通常用いられる哺乳動物でもかまわないし、ニワトリ等を用いることも可能である。たとえば、マウスを用いる場合、精製ヒトオートタキシン抗原とフロイント完全アジュバントのエマルジョンを皮下、足底球 ( f o o t p a d )、あるいは腹腔などに投与することにより免疫を行う。必要に応じ精製抗原とフロイント不完全アジュバントによる繰り返し追加免疫を行なうことにより抗体価の上昇が望める場合もある。細胞融合の数日前に最終免疫として、アジュバントとエマルジョン化することなく抗原のみを動物に投与する。投与する抗原量は動物体重あたり約 0 . 4  $\mu$  g / g - 体重程度を目安に行えば良いが、抗原過少、過多による免疫寛容を受けない抗原量であれば問題ない。

#### 【0018】

本発明に用いるハイブリドーマ細胞作製は技術確立されていれば手法を選ばず、電気的融合、ポリエチレングリコールなどの試薬を用いた融合手段を選ばない。例えば免疫を行なった動物のB細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコール存在下細胞融合を行い、H A T 培地により抗体産生細胞の選択を行うことにより得ることが可能である。選択したハイブリドーマ細胞は限界希釈法によりモノクローン化を行なうことによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として樹立可能である。

#### 【0019】

本発明に用いるハイブリドーマ選択方法は、通常のE L I S A 方法で行なわれるような免疫抗原を固相に結合させ、固相表面に結合した抗原に対する反応性による選択を行わないことを特徴とする。その理由は、抗原を固相に結合させたE L I S A 法によるスクリーニング方法では、反応性を有する多くの抗体を取得可能であるものの、これら抗体のほとんどが血清中に存在するヒトオートタキシンを効率よく捕捉できないためである。本発明に用いる抗体スクリーニング方法においては、ハイブリドーマ細胞培養上清に含まれる抗体を捕捉可能な1次抗体、又はその他の抗体結合性因子、例えばプロテインA、プロテインCなどをイムノプレートに結合させる。例えば、ラット抗体取得を目的とする場合、抗ラットイムノグロブリン抗体をイムノプレートに結合させる。非特異的結合を防ぐため、1次抗体などを結合させたイムノプレート表面をウシ血清アルブミンなどでブロック処理を行った後、細胞融合により得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をイムノプレートに添加し、1次抗体などに捕捉させる。未反応物質を除去するため、P B S (リン酸緩衝液)などの緩衝液によりイムノプレートを洗浄後、ポリヒスチジン - タグを有する組換ヒトオートタキシン抗原 (ポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシン) を添加する。ポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシンは、リゾホスホリパーゼD活性を有することを確認したものが好ましい。一定時間の反応によりハイブリドーマ培養上清中の抗体によりポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシンを捕捉させる。この際、捕捉されるポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシンは生体中と同様に溶液中においても天然形態を維持した状態を反映しているものと推測でき、本反応によりポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシンを捕捉可能なハイブリドーマ培養上清中の抗体がヒト検体中のオートタキシンを捕捉可能なことが期待できる。続いて捕捉されたポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシンのポリヒスチジンタグに対し、酵素標識抗ポリヒスチジン抗体や酵素標識プローブであるH i s P r o b e - H R P ( P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , I n c . , C a t . N o . 1 5 1 6 5 ) 等により、抗体により捕捉されたポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシンの検出を行なう。最終的な検出は酵素に対する発色、蛍光、化

10

20

30

40

50

学発光基質等を用い行なうことが可能であり、例えばペルオキシダーゼの基質である T M B (テトラメチルベンジジン) などにより波長 4 5 0 nm の吸光度の発色検出が可能である。本方法で取得した抗体群のほとんどが、ヒトオートタキシンを直接イムノプレートに結合させた通常の E L I S A 法では反応性を示さず、さらに直接結合抗原に反応性を示した抗体を用いての 2 抗体サンドイッチ免疫測定系構築は不可能であった。すなわち、直接イムノプレートに結合させた通常の E L I S A 法では天然形態のヒトオートタキシンを有効に捕捉可能な抗体取得は非常に困難であることが示唆される。

#### 【 0 0 2 0 】

本発明に使用する抗体の精製方法は、技術確立されている手法であればその手法は問わない。例えば目的の抗体産生ハイブリドーマの選択後、限界希釈によりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立し、細胞の培養上清を回収する。必要に応じ硫酸アンモニウム沈殿による抗体濃縮後、プロテイン A やプロテイン G 固相化担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりモノクローナル抗体の精製を行うことが可能である。また、精製した抗体はビオチン標識あるいはアルカリ性ホスファターゼ等の酵素により標識を施すことによりヒトオートタキシン 2 抗体サンドイッチ免疫測定系構築の検証に使用することが可能である。これらの方法は標準的であり充分技術確立されている。

10

#### 【 0 0 2 1 】

本発明において開示される天然形態ヒトオートタキシン測定方法は、天然形態ヒトオートタキシンを特異的に捕捉し、その結果精製した抗体 - 天然形態ヒトオートタキシン複合体を検出可能な方法であれば手法を選ばない。好ましくはイムノアッセイで汎用されている標識抗原と検体中の天然形態ヒトオートタキシンの抗体に対する競合を利用した競合法、エピトープの異なる 2 抗体を用い天然形態ヒトオートタキシンとの 3 者の複合体を形成させるサンドイッチ法が簡便かつ汎用しやすい。抗体を担体に結合させる場合、担体としてはイムノプレート、ラテックス粒子、磁性微粒子、ニトロセルロース膜、P V D F 膜などイムノアッセイで使用されるものであれば特に担体を選ばない。担体を用いる場合、担体に固定化した抗体により捕捉したヒトオートタキシンの酵素活性を検出する方法、あるいは抗体を固定化したチップに検体を接触させて天然形態ヒトオートタキシン結合依存的なシグナルを検出する表面プラズモン共鳴などの方法でヒトオートタキシンの検出が可能である。また、蛍光標識した抗体が天然形態ヒトオートタキシンと結合することによる蛍光偏光を検出するようなホモジニアス測定方法においてもヒトオートタキシンの定量は可能である。これら試薬、装置は充分技術確立されている。

20

30

#### 【 0 0 2 2 】

前記の測定方法において特異性、感度、汎用性などの点からエピトープの異なる 2 抗体サンドイッチ免疫測定方法が優れている。本測定系が構築可能な抗ヒトオートタキシンモノクローナル抗体の組み合わせの選択は、精製した抗体群と標識抗体群を用い、組換えヒトオートタキシンをサンプルとしてサンドイッチ測定系が構築可能であるかの検証により行なう。具体的には、精製した未標識の抗天然形態ヒトオートタキシンモノクローナル抗体をイムノプレートに結合させ、ウシ血清アルブミンなどでイムノプレート表面のブロック処理を行う。続いて、組換えヒトオートタキシンをイムノプレートに添加し、固相抗体に捕捉させる。未反応物質を除去するため P B S などの緩衝液でイムノプレートを洗浄後、標識を施した天然形態ヒトオートタキシンに対する抗体を反応させ 2 種類の抗体での天然形態ヒトオートタキシンのサンドイッチ複合体を形成させる。未反応物質を除去するため P B S などの緩衝液でイムノプレートを洗浄後、抗体標識に酵素標識を行った場合は基質の添加を行い、ビオチン標識などさらに反応が必要な場合は酵素により標識ストレプトアビジンなどを反応させる。標識酵素に対する発色、蛍光、化学発光基質等を用い 2 種の天然形態ヒトオートタキシン抗体により捕捉された組換えヒトオートタキシンの検出を行なう。以上の実験を組換えヒトオートタキシンを含まない緩衝液で同様に行いバックグラウンド値として用いる。組換えヒトオートタキシンを用いた測定値がバックグラウンド低値でありかつ測定値に対し有意に高い組み合わせをヒトオートタキシン免疫測定系候補とする。

40

50

## 【0023】

前記の通りに選択したヒトオートタキシン2抗体サンドイッチ免疫測定系候補の信頼性を検証するため、組換ヒトオートタキシンおよびヒト血清の希釈系列サンプルを準備し、希釈倍率依存的に反応性が認められるか検証を行う。依存性が認められた抗体の組み合わせにおいては、さらにリゾホスホリパーゼD酵素活性既知のヒト血清検体を使用し、ヒトオートタキシン定量を実施し検証を行う。すなわちリゾホスホリパーゼD酵素活性に対するヒトオートタキシン濃度の相関性を検証し、リゾホスホリパーゼD酵素活性とヒトオートタキシン濃度に相関性が認められる免疫測定系を選択することにより天然形態ヒトオートタキシン測定法として選択する。

## 【0024】

選択した2種の抗体組み合わせを用い、天然形態ヒトオートタキシン測定試薬の調製を行う。2ステップサンドイッチ測定試薬の場合、2種の抗体の一方をイムノプレート、磁性粒子などB/F分離可能な担体に結合させる。結合方法は、疎水結合を利用した物理的結合、2物質間を架橋可能なリンカー試薬などを用いた化学的結合、いずれでもかまわない。非特異的結合を避けるため担体表面を牛血清アルブミン、スキムミルクあるいは市販のイムノアッセイ用ブロッキング剤などでブロッキング処理を行ない1次試薬とする。2次試薬として標識を施した、異なるエピトープを認識するもう一方の抗体を含む溶液を準備する。抗体標識はペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素、蛍光物質、化学発光物質、ラジオアイソトープなどの検出可能な物質、ビオチン、アビジンなどの特異的結合パートナーが存在する物質などでの標識が好ましい。また、2次試薬溶液は抗原抗体反応が良好に行える緩衝液、例えばリン酸緩衝液、Tris-HCl緩衝液などが好ましい。実検体の測定は、1次試薬と実検体を一定時間、一定温度のもと接触させる。反応条件は4~40の温度で5分~3時間の反応が好ましい。未反応物質をB/F分離により除去し、続いて2次試薬と一定時間、一定温度のもと接触させサンドイッチ複合体を形成させる。反応条件に関しては4~40の温度で5分~3時間の反応が好ましい。未反応物質をB/F分離により除去し、標識抗体の標識物質を定量し、既知濃度ヒトオートタキシンを標準とし作成した検量線により、実検体中のヒトオートタキシン濃度を定量する。1ステップサンドイッチ測定試薬の場合、2ステップサンドイッチ測定試薬と同様、担体に抗体を結合させブロッキング処理を行ったものを準備する。本抗体固相化担体に標識抗体を含む緩衝液を添加し試薬とする。必要に応じ、試薬を凍結乾燥品とすることも可能である。1ステップ試薬では抗原-抗体の使用量バランスにより抗原あるいは抗体の過不足が生じ測定系構築が困難であることが多い。本発明ではELISA法の場合、担体に結合させる抗体量を96穴イムノプレート1ウェルあたり5~500ng、好ましくは100ng、標識抗体1~100ng、好ましくは10ngを使用することにより良好な結果が得られる。測定に用いるヒト検体は、血清、血漿、尿、精漿、脳脊髄液などがあるが、用いる検体の希釈倍率は無希釈~100倍希釈での使用が好ましく、特に血清、血漿においては5倍希釈検体を100μL、精漿においては無希釈検体を100μL用いることにより良好な結果が得られる。

## 【0025】

本発明による測定試薬により定量した検体中のヒトオートタキシン濃度はオートタキシンの有するリゾホスホリパーゼD活性と良好な相関性を示す。

## 【0026】

本発明による測定試薬を用い、癌患者血清中のヒトオートタキシンを測定することによる癌の診断が可能である。前立腺癌マーカーPSA、消化器癌マーカーCA19-9、乳癌マーカーCA153、卵巣癌マーカーCA125測定値がカットオフを超える検体のオートタキシン濃度と、特に臨床症状を有しない健常人のオートタキシン濃度とを比較すると、いずれの癌患者検体においても健常人群に対し有意差 $p < 0.001$ を示し、癌の診断あるいは診断補助が可能である結果を示した。特に、乳癌、卵巣癌、においては健常人に比較し顕著に高値を示し、本測定試薬を用いた癌の診断あるいは診断補助に有効な測定試薬である結果が得られた。

10

20

30

40

50

## 【0027】

特に、本測定試薬を用い、患者検体中のヒトオートタキシンを測定することにより悪性リンパ腫、特に濾胞性リンパ腫の検査が可能である。白血病、悪性リンパ腫と判断された患者検体中のオートタキシン濃度と、特に臨床症状を有しない健常人のオートタキシン濃度とを比較すると、非ホジキンリンパ腫患者において有意差をもって高値を示した。また、特に濾胞性リンパ腫において顕著に高値を示し、本測定試薬を用いた悪性リンパ腫、特に非ホジキンリンパ腫、さらには濾胞性リンパ腫の検査あるいは検査補助に有効な測定試薬である結果が得られた。

## 【0028】

本発明による測定試薬を用い、慢性肝疾患患者血清中のヒトオートタキシンを測定することによる慢性肝疾患の診断が可能である。慢性肝疾患患者ならびに健常人検体中のヒトオートタキシン濃度を測定した結果、有意差  $p < 0.0001$  にて慢性肝疾患患者血清中のオートタキシン濃度が高い結果が得られ、慢性肝疾患診断あるいは診断補助に有用である結果が示された。さらに、他の慢性肝疾患マーカーとヒトオートタキシン濃度の相関性を検証した結果、ヒアルロン酸濃度、血清アルブミン濃度、総ビリルビン濃度、血小板数、プロトロンビン時間とヒトオートタキシン濃度の間に相関性が認められ慢性肝疾患の程度を反映しており血清ヒトオートタキシン濃度測定が慢性肝疾患診断に非常に有効であることが示された。

## 【実施例】

## 【0029】

以下に実施例を示すが、本発明は実施例に記載された例に限られるものではない。

## 実施例1：組換えヒトオートタキシンの発現

Autotaxin-t (Genbank accession number L46720) の塩基番号 1-2589 (配列番号1) をヒト肝臓 cDNA ライブラリーより RT-PCR を用い常法に従いクローニングした。本 cDNA をバキュロウイルス用トランスファクター pFASTBac-1 (インビトロジェン) に導入し、Bac-to-Bac システム (インビトロジェン) を用い、全長ヒトオートタキシン発現用バキュロウイルスをプロトコールに従い調製した。クローニングした全長ヒトオートタキシン cDNA から停止コドン (TAA 塩基配列 2590-2592) を除去しヒスチジン 6 残基を追加し、ポリヒスチジンを有するポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシン発現用バキュロウイルスをプロトコールに従い調製した。本バキュロウイルスを用い、常法に従い、sf9 あるいは sf21 などに感染させることにより全長ヒトオートタキシンおよびポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシンを含む発現培養上清を調製することができる。

## 【0030】

## 実施例2：ポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシンの精製

ポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシン発現用バキュロウイルスを昆虫細胞 sf21 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) 1 L に感染させ、28℃ にて4日間培養した。培養終了後、遠心分離 (3000 rpm にて10分間) により細胞を分離し、さらに  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルターにより細胞破砕物などの沈殿物を除去した。回収した培養上清を TBS (Tris buffer saline; 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) により透析後、BD-TALON Metal Affinity Resin (BD Biosciences, Cat. NO. 63501) 金属キレートカラムを用い添付マニュアルに従い精製を行った。具体的には 5 mL 容量のレジンをカラムに充填する。本カラムに 50 mM の  $\text{CoCl}_2$  溶液を 50 mL 添加し、コバルトを結合させた。300 mM の NaCl を含む水溶液によりカラムを洗浄後、50 mM リン酸ナトリウム、300 mM の NaCl、pH 7.7 の水溶液 (洗浄緩衝液) によりカラムを平衡化した。ポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシンを含むサンプル 50 mL を添加した。100 mL の洗浄緩衝液により未結合物質を洗浄し、カラム通過溶液の 280 nm の吸光度が 0.01 以下になったことを確認した。10 mM のイミダゾールを含む洗浄緩衝液約 15 ml、続いて 100 mM のイミダゾールを含む洗浄緩衝液により目的物をカラムから溶出し

10

20

30

40

50

た。溶出サンプルは1 mLごとに回収し、各画分中のポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシンの純度をSDS-PAGEにより検証した。初期画分は不純物を多く含むため回収せず、目的ポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシンを主に含む画分を回収混合し、精製ポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシン抗原として用いた。図1はポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシン精製品のSDS-PAGE像および、抗オートタキシンペプチド抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果を示す。レーンMは分子量マーカーを示す。レーン1は1 μg/レーンにて精製抗原を還元条件下SDS-PAGEを行い、CBBにより染色した像を示す。レーン2~5はウェスタンブロットティング像を示す。0.25 μg/レーンにて精製抗原を還元条件下SDS-PAGEを行った後、PVDF膜に転写しPVDF膜は3%スキムミルクを含むTBSにより一昼夜ブロッキング処理を行った。TBSにより洗浄後、1%ブロックエース(大日本製薬社製)および0.05% Tween 20を含むTBSに浸透させた。レーン2は1 μg/mLのラット抗オートタキシンペプチドモノクローナル抗体(アミノ酸配列49-59(配列番号2)を認識)、レーン4は1 μg/mLのウサギ抗オートタキシンペプチドポリクローナル抗体(アミノ酸配列671-686(配列番号3)を認識)を加え2時間反応させた(レーン3, 5のサンプルには抗体を加えない)。0.05% Tween 20を含むTBS(TBST)による洗浄後、レーン2および3のサンプルには0.3 μg/mLのアルカリ性ホスファターゼ標識抗ラットIgG抗体(American Qualex社製; Cat. No. A103AT)および1%ブロックエースを含むTBSTを添加し、レーン4および5のサンプルには0.3 μg/mLのアルカリ性ホスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体(Zymed社製)および1%ブロックエースを含むTBSTを添加した。2時間反応後、TBSTにより十分洗浄し、CDP-STAR(Perkin Elmer社製)を用いた化学発光を感光フィルムにより検出した。レーン1に示すとおりCBB染色像においては単一バンドとして確認された。また、抗ペプチド抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果では、アミノ酸配列49-59(配列番号2)、ならびにアミノ酸配列652-666(配列番号3)を認識する2種の抗体により検出されることより、本精製抗原が目的であるポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシンであることを確認した。ウェスタンブロットティングでは2本のバンドが検出されており糖鎖の差、あるいは培養、精製過程での分解を示唆する結果が得られた。

#### 【0031】

##### 実施例3:モノクローナル抗体作製

ウイスター・ルイス・ラット7週令メスに対し、抗原250 μgをフロイントの完全アジュバントと共に後足にエーテル麻酔下により免疫を行なった。1カ月後、ラットより鼠頸リンパ節ならびに腸骨リンパ節を採取し、B細胞を回収した。マウスミエローマ細胞株PA1とポリエチレングリコール存在下、細胞融合を常法に従い行い、約10日間のHAT培地による選択を行ない、実施例4に従い抗体産生細胞ハイブリドーマのスクリーニングにより目的抗体の選択を行った。スクリーニング陽性ウエル中の細胞を限界希釈法によりモノクローナル化を行いハイブリドーマとして樹立した。この際、HT培地により約10日間の培養を行った後、最終的にハイブリドーマ用培地により培養を続け、抗体回収のために培養上清を回収した。GIT培地(大日本住友製薬)500 mLに対し、NCTC-109培地(インビトロジェン)27.5 mL、不必須アミノ酸(インビトロジェン)5.5 mL、ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン酸(インビトロジェン)5.5 mLをろ過滅菌し添加したものをハイブリドーマ細胞培養用培地とした。本培地にHAT(Sigma-Aldrich Co., HYBRYMAX, Cat. No. H0262)を添加したものをHAT培地として、HT(Sigma-Aldrich Co., HYBRYMAX, Cat. No. H0137)を添加したものをHT培地として用いた。

#### 【0032】

##### 実施例4:ハイブリドーマスクリーニング

抗ラットイムノグロブリン抗体(American Qualex, Cat. No. A

10

20

30

40

50

103 UT) を96穴イムノプレート (MaxiSorp; Nalge NUNC International, Cat. No. 430341) に250 ng / ウェルにてコーティングした。具体的には、抗ラットイムノグロブリン抗体をTBSにより希釈し、5  $\mu$ g / mL 溶液を調製した。本溶液を50  $\mu$ L / ウェルにてイムノプレートに添加し、4にて一昼夜保存した。続いてTBSにより3回の洗浄後、3% - ウシ血清アルブミン (BSA; bovine serum albumin) を含むTBS溶液を250  $\mu$ L / ウェルにて各ウェルに添加し、室温で2時間放置した。TBSにより3回洗浄を行い、ハイブリドーマ細胞の培養上清を50  $\mu$ L / ウェルにて添加し、室温で2時間放置した。TBSTにより6回洗浄を行なった後、0.6  $\mu$ g / mL のポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシン、0.1% Tween - 20、1% BSAを含むTBSを50  $\mu$ L / ウェルにて添加し、室温で2時間放置した。TBSTにより6回洗浄を行ない、続いて1  $\mu$ g / mL のHis Probe - HRP (Pierce Biotechnology, Inc., Cat. No. 15165)、0.1% Tween - 20、1% BSAを含むTBSを50  $\mu$ L / ウェルにて添加し室温30分放置した。TBSTにより6回洗浄を行ない、TMB基質 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Cat. No. 50-76-00) を50  $\mu$ L / ウェルで添加し室温30分放置した。1N - リン酸にて反応を停止しOD450の吸光度を測定した。この際、ポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシンを含まず、それ以外の操作を同時に行なったものを対照データとして取得しバックグラウンドとした。対照データに対しポリヒスチジン - タグ付ヒトオートタキシン存在下で反応性を示したものを陽性クローンとして選択し、限界希釈によりモノクローナル抗体産生細胞株の樹立を行った。

10

20

#### 【0033】

##### 実施例5：抗体精製とビオチン標識

モノクローン化した抗体産生細胞の培養上清を回収し、HiTrap Protein G HP (GEヘルスケア バイオサイエンス(株), Cat. No. 17-0405-01) により抗体の精製を行った。PBS (phosphate buffer saline; 10 mM リン酸、150 mM NaCl, pH7.4) で緩衝液置換した上記カラムに対し、培養上清を流速20 mL / minにて通過させた。カラム容量の5倍以上のPBSにより十分カラムを洗浄し、未結合蛋白質の除去を行った。この際、カラムを通過した緩衝液のOD280による吸光度が0.01以下になったことを確認することにより、未結合蛋白質が残っていないことの確認が可能である。カラム洗浄後、100 mM グリシン、pH2.5 溶出液により結合抗体を溶出させた。溶出抗体は速やかに1/10容量の1M Tris、pH8を添加し、中性にするとともにTBSにより速やかに透析を行った。精製抗体の一部は抗体評価用にEZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-biotin (Pierce Biotechnology, Inc., Cat. No. 21338) によりビオチンによる標識を行った。

30

#### 【0034】

##### 実施例6：モノクローナル抗体のヒトオートタキシンに対する反応性評価

実施例5により精製を行ったモノクローナル抗体のヒトオートタキシンに対する反応性を直接イムノプレートにヒトオートタキシンをコーティングした際の反応性と溶液中に存在するヒトオートタキシンへの反応性の2通りの方法で検証した。はじめにイムノプレートにヒトオートタキシンをコーティングした実施例を示す。精製した組換え全長ヒトオートタキシンを50 ng / ウェル (1  $\mu$ g / mL 溶液を50  $\mu$ L / ウェル) にて96穴イムノプレート (maxiSorp; Nalge NUNC International, Cat. No. 430341) に添加し、4にて一昼夜保存しコーティングを行った。続いてTBSにより3回の洗浄後、3% - BSAを含むTBS溶液を250  $\mu$ L / ウェルにて各ウェルに添加し、室温で2時間放置しブロッキングを行った。TBSにより3回洗浄を行い、1  $\mu$ g / mL の精製抗体および1% BSAを含むTBSTを50  $\mu$ L / ウェルにて添加し、室温で2時間放置した。TBSTにより6回洗浄を行なった後、0.3  $\mu$ g / mL のHRP標識ヤギ抗ラットIgG抗体、1% BSAを含むTBSTを50  $\mu$ L /

40

50

ウェルにて添加し、室温で2時間放置した。TBS Tにより6回洗浄を行ない、TMB基質を50 $\mu$ L/ウェルで添加し室温30分放置した。1N-リン酸により反応を停止しOD450の吸光度を測定した結果を図2に示す。縦軸にモノクローナル抗体の種類を、横軸に450nmの吸光度を示す。

#### 【0035】

続いて、溶液中のヒトオートタキシンに対する反応性を実施例4にならぬ検証した結果を示す。抗ラットイムノグロブリン抗体を96穴イムノプレート(MaxiSorp)に250ng/ウェルにてコーティングした。TBSにより3回の洗浄後、3%-BSAを含むTBS溶液を250 $\mu$ L/ウェルにて各ウェルに添加し、室温で2時間放置しブロッキングした。TBSにより3回洗浄を行い、10 $\mu$ g/mL濃度の精製抗体を50 $\mu$ L/ウェルにて添加し、室温で2時間放置した。TBS Tにより6回洗浄を行なった後、0.6 $\mu$ g/mLのポリヒスチジン-タグ付ヒトオートタキシン、0.1% Tween-20、1% BSAを含むTBSを50 $\mu$ L/ウェルにて添加し、室温で2時間放置した。TBS Tにより6回洗浄を行ない、続いて1 $\mu$ g/mLのHisProbe-HRP、0.1% Tween-20、1% BSAを含むTBSを50 $\mu$ L/ウェルにて添加し、室温で30分放置した。TBS Tにより6回洗浄を行ない、TMB基質を50 $\mu$ L/ウェルで添加し、室温で30分放置した。1N-リン酸により反応を停止しOD450の吸光度を測定した結果を図3に示す。縦軸にモノクローナル抗体の種類を、横軸に450nmの吸光度を示す。また、バックグラウンドは抗ヒトオートタキシン抗体を含まぬ緩衝液での反応性を示す。

#### 【0036】

図2, 3の結果は通常モノクローナル抗体作製時のスクリーニング方法である抗原を結合させたELISA方法においては、今回得られた血清中に存在するよう天然形態のヒトオートタキシンを効率よく捕捉可能な抗体群の取得が非常に困難であることを示している。

#### 【0037】

実施例7：モノクローナル抗体による血清中のリゾホスホリパーゼD活性の吸収

抗体による血清中ヒトオートタキシンの吸収を血清リゾホスホリパーゼD活性の吸収により検証した。抗ラットIgG抗体が固定化された磁性微粒子BioMag Goat Anti-Rat IgG Fc(QIAGEN, Cat. No. 310144)50 $\mu$ L(50%サスペンション溶液)に対し精製抗ヒトオートタキシン抗体10 $\mu$ gを添加し、抗ヒトオートタキシン固定化磁性微粒子を準備した。未反応の抗体をTBS Tにより洗浄後、TBS Tにより4倍希釈したヒト血清200 $\mu$ Lを添加し、2時間反応させた。反応後、磁石により磁性微粒子を除去し上清中のリゾホスホリパーゼD活性を測定した。抗ヒトオートタキシン抗体未添加の抗ラットIgG抗体が固定化磁性微粒子により処理を行ったヒト血清のリゾホスホリパーゼD活性に対する活性の阻害率を検証した結果を図4に示す。縦軸にモノクローナル抗体の種類を、横軸に活性阻害率(吸収率)を示す。活性吸収率は抗ヒトオートタキシン抗体を含まぬ緩衝液での残存活性に対する阻害活性を示す。リゾホスホリパーゼD活性測定はFEBS letters 571, 197-204, 2004を若干変更し行った。具体的には、サンプル20 $\mu$ Lと2mMのリゾホスファチジルコリン(14:0-リゾホスファチジルコリン)、100mM Tris-HCl、500mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% Triton X-100(pH9.0)を含む基質溶液20 $\mu$ Lを混合し、37 $^{\circ}$ Cにて6時間から一昼夜反応させた。続いて本酵素反応により生成したコリンを定量するため、0.5mM TOOS(N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン)、10Unit/mL西洋ワサビペルオキシダーゼ、0.01% Triton X-100、100mM Tris-HCl(pH8.0)からなるR1溶液150 $\mu$ Lを加え5分間放置した後、1mM 4-アミノアンチピリン、10Unit/mLコリンオキシダーゼ、0.01% Triton X-100、100mM Tris-HCl(pH8.0)からなるR2溶液50 $\mu$ Lを加えた。30分後、既知濃度塩化コリンを対象に55

0 nmの吸光度を測定し活性値とした。抗体R10.30およびR10.31を除く抗体では吸収性能を発揮しており、実施例6におけるHisProbeを用いた溶液中の天然形態のヒトオートタキシンの結合性能を反映した結果を示しており、抗原を直接イムノプレートに結合させた結果を反映しない。抗体R10.30およびR10.31において血清から吸収性能とHisProbe-HRPを用いた測定での差は組換えヒトオートタキシンと血清中に存在するヒトオートタキシンの構造あるいは存在状態に差がありこれら抗体が血清中のヒトオートタキシンを認識できないことが推測される。

【0038】

実施例8：モノクローナル抗体の他動物種オートタキシンへの反応性確認

実施例5により精製した代表的な抗体による動物血清中オートタキシンへの反応性を血清リゾホスホリパーゼD活性の吸収により検証した。ストレプトアビジンが固定化された磁性微粒子BioMagストレプトアビジン(QIAGEN, Cat. No. 311711) 20 μL (50%サスペンション溶液) に対し実施例5で作製したビオチン標識抗ヒトオートタキシン抗体10 μgを添加し、抗ヒトオートタキシン固定化磁性微粒子を準備した。未反応の抗体をTBSTにより洗浄後、TBSTにより2.5倍希釈した動物血清125 μLを添加し、2時間反応させた。反応後、磁石により磁性微粒子を除去し、上清中のリゾホスホリパーゼD活性を測定した。抗ヒトオートタキシン抗体未添加のストレプトアビジン固定化磁性微粒子により処理を行った動物血清のリゾホスホリパーゼD活性に対する活性の阻害率を検証した結果を図5および表1に示す。縦軸に動物血清の種類を、横軸に活性阻害率(吸収率)を示す。活性吸収率は抗ヒトオートタキシン抗体を含まない緩衝液中の残存活性に対する阻害活性を示す。R10.23に代表されるようにヒトオートタキシンに特異的な抗体から、何種かの動物オートタキシンと交差反応性を示すものまで多様性に富んだ抗体群が取得できた。エピトープ位置の詳細な解析を、オートタキシン断片を大腸菌発現させた抗原を用いて試みたが、ほとんど全ての抗体が可溶性オートタキシン断片と反応性を示さず、エピトープの特定に至らなかった。しかし、取得したモノクローナル抗体はヒトオートタキシン上の異なるエピトープを認識する抗体群で構成されていることが予想され2抗体を用いたサンドイッチイムノアッセイ構築が可能性を示唆する結果を得た。

【0039】

【表1】

表1

抗体による動物血清中オートタキシンのリゾホスホリパーゼD活性の吸収性能を示す。

10%未満を一、10~50%を+、50%以上を++で示した。

	R10.1	R10.7	R10.8	R10.16	R10.17	R10.20	R10.21	R10.23	R10.30	R10.48	R10.49
ヒト	++	++	+	+	++	++	+	++	+	++	++
ウマ	++	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
ウサギ	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
ラット	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-
マウス	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【0040】

実施例9：ヒトオートタキシン標準品の調製

実施例5で精製した抗体を用い抗体固定化担体を作製し、抗原の精製ならびにヒト血清から抗原の除去を行なったヒトオートタキシンゼロ血清の調製を行った。これらを材料と

して用いヒトオートタキシン免疫測定に用いる標準品（ヒトオートタキシン既知濃度サンプル）の調製を行った。具体的には実施例5に従い精製を行ったモノクローナル抗体R10.23をHiTrap NHS-活性化5mLカラム（GEヘルスケア バイオサイエンス（株），Cat. No. 17-0717-01）に対し25mgの抗体をマニュアルに従い結合させた。本R10.23結合カラムを用い、0.8μmのフィルターにより不純物を除去したヒト血清200mLを1mL/minの流速で送液しカラム素通り画分を回収した。本素通り画分中のヒトオートタキシンは実施例6記載のELISA測定法において反応性を示さないことを確認した。本品を標準品作製のベース血清としさらに、ゼロ濃度標準品とした。精製抗原の調製は昆虫細胞・バキュロウイルス系で発現させた全長ヒトオートタキシンを材料に行った。培養上清1LをR10.23結合カラムに流速1mL/minの流速にて送液し、続いてPBSにより未結合蛋白質の洗浄を行った。カラムを通過したPBSの280nmの吸光度が0.01以下になったことを確認し、続いて100mMグリシン緩衝液pH3.5を用い結合蛋白質を溶出させた。溶出液は1/10容量の1M-Tris pH8.0を添加することにより中性に戻した後、TBSにより速やかに透析処理を行なった。図6は全長ヒトオートタキシン精製品のSDS-PAGE像および、抗オートタキシンペプチド抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果を示す。図中レーンMは分子量マーカを示す。レーン1は1μg/レーンにて精製抗原を還元条件下SDS-PAGEを行い、CBBにより染色した像を示す。レーン2~5はウェスタンブロットティング像を示す。すなわち0.25μg/レーンにて精製抗原を還元条件下SDS-PAGEを行った後、PVDF膜に転写した。ブロッキング処理後、レーン2はラット抗オートタキシンペプチドモノクローナル抗体（アミノ酸配列49-59を認識（配列番号2）、レーン4はウサギ抗オートタキシンペプチドポリクローナル抗体（アミノ酸配列671-686（配列番号2）を認識）、レーン3,5は抗ヒトオートタキシンを含まない非特異的結合検出のためのバックグラウンドとして検出を行った。精製抗原はCBB染色像においては2本バンドとして確認され、抗ペプチド抗体を用いたウェスタンブロットティングにおいては実施例2同様分子量105kDa付近に2本以上のバンドが検出されており糖鎖の差、あるいは培養、精製過程での分解を示唆する結果が得られた。本精製全長ヒトオートタキシンをBCA蛋白定量キット（Pierce Biotechnology, Inc., Cat. No. 23225）により濃度測定し、ヒトオートタキシン濃度とした。本精製ヒトオートタキシン抗原を上記ヒトオートタキシン除去ヒト血清に添加し既知濃度標準品を調製した。

#### 【0041】

実施例10：サンドイッチELISA測定系用抗体組み合わせの選択

精製抗体ならびにビオチン標識抗体を用い、サンドイッチELISA測定系が構築可能な抗体の組み合わせ評価を行なった。96穴イムノプレート（NUNC）に、精製抗体2μg/mLを含むTBS溶液を50μL/ウェルにて添加し、一昼夜、4℃にて抗体プレートに結合させる。TBSにより3回洗浄後、実施例9により精製した組換え全長ヒトオートタキシンをELISAアッセイ緩衝液（3% BSA、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Tween 20を含むTBS）にて精製ヒトオートタキシン100ng/mLになるよう希釈し、50μL/ウェルにて添加した。室温で2時間放置後、TBS-Tにより4回洗浄し、0.8μg/mLのビオチン標識抗体を含むELISAアッセイ緩衝液を50μL/ウェルにて添加した。室温で2時間放置後、TBS-Tにより4回洗浄し、1000倍希釈したHRP標識ストレプトアビジン（Zymed社製）を含むELISAアッセイ緩衝液を50μL/ウェルにて添加した。1時間室温で放置後、TBS-Tにより6回洗浄し、TMB基質を50μL/ウェルで添加した。室温10分後、1N-リン酸により反応を停止しOD450の吸光度を測定した。図7に代表的な結果を示す。R10.21およびR10.23に関してそれぞれをイムノプレートに1次抗体としてコーティングし、ヒトオートタキシンと反応させた後、他の抗体群を用いて2抗体サンドイッチELISAにより反応性を検出した結果を上段（左図R10.21、右図R10.23をプレートコートした際の結果）を示す。また、同様に取得抗体群をイムノプレートに1次抗体としてコ

10

20

30

40

50

ーティングし、R10.21およびR10.23を2次抗体として用い反応性を検出した結果を下段（左図R10.21、右図R10.23を検出用2次抗体とした際の結果）に示す。横軸は使用した抗体（上段：2次抗体、下段：1次抗体）、縦軸は450nmの吸光度による反応性を示す。グラフ上段、下段の比較より同じ抗体の組み合わせにおいても1次抗体、2次抗体の用い方により反応性を示す場合、示さない場合が確認された。図8に取得した抗ヒトオートタキシンモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAでの反応性の一覧を示した。本結果で反応性を示さないものは、サンドイッチELISA構築が不可能である組み合わせを示しており、反応性を示した組み合わせは構築可能なことを示唆している。横方向にイムノプレートに結合させた1次抗体を、縦方向に2次抗体の名称を示している。また、表中の数値は450nmの吸光度を示しており、-は吸光度0.5以下を示している。組み合わせ評価全529通りのうち0.5以上の反応性を示した組み合わせは、16通りであり、全体の約3%であった。また、実施例6との関連で図2に示したヒトオートタキシンを直接イムノプレートに結合させたELISAに反応性を示したR10.16、R10.48、R10.49の3種のモノクローナル抗体を用いた組み合わせではサンドイッチELISAを構築できなかった。すなわち、ヒトオートタキシンを直接イムノプレートに結合させた通常のスクリーニング方法により取得した抗体ではサンドイッチELISAを構築できない、あるいは構築することが非常に困難であることを示唆しており、本発明の手法による抗体スクリーニング方法は非常に効果的な手法であることを示している。

#### 【0042】

実施例11：2ステップサンドイッチELISA測定法によるヒトオートタキシンの定量  
 実施例9で反応性を示した抗ヒトオートタキシン抗体の組み合わせを用い、2ステップ2抗体サンドイッチELISAによる血清中のヒトオートタキシン測定系を構築した。固相用抗体としてR10.23を用い、2次抗体としてR10.21を用い測定系の検証を行った。固相用抗体R10.23はペプシン消化によりF(ab)<sub>2</sub>化し使用した。実施例9と同様にR10.23を96穴イムノプレート（NUNC社製）に2μg/mL濃度で50μL/ウェルにて添加し、一昼夜、4にてプレートに結合させた。TBSにより3回洗浄後、3% BSAを含むTBSを250μL/ウェルで添加し2時間ブロッキング処理を行った。TBSにより3回洗浄後、実施例10で作製した標準品ならびに濃度未知のヒト血清をELISAアッセイ緩衝液で1/5に希釈し50μL/ウェルにて添加した。室温で2時間反応後、TBS-Tにより4回洗浄し、0.8μg/mLのビオチン標識R10.21を含むELISAアッセイ緩衝液を50μL/ウェル添加した。室温で2時間放置後、TBS-Tにより4回洗浄し、1000倍希釈したHRP標識ストレプトアビジン（Zymed社製）を含むELISA緩衝液を50μL/ウェル添加した。1時間室温放置後、TBS-Tにより6回洗浄し、TMB基質を50μL/ウェルで添加した。室温30分後、1N-リン酸により反応を停止し450nmの吸光度を測定した。図9にヒトオートタキシン既知濃度の標準品6濃度（0, 0.34, 0.675, 1.35, 2.70, 5.40μg/mL）による検量線を示す。検量線の回帰は3次回帰により行った。ヒトオートタキシン濃度依存的に450nmの吸光度上昇が確認された。本検量線を用い未知濃度のヒト血清で得られた450nmの吸光度より検体中のヒトオートタキシンの濃度を算出した。また、測定に用いたヒト血清中のリゾホスホリパーゼD活性を実施例7に従い決定し、ヒトオートタキシン濃度との相関性を検証した。図10はヒト血清42検体の結果を示しており、横軸にリゾホスホリパーゼD活性を、縦軸にヒトオートタキシン濃度を示す。血清中のヒトオートタキシン濃度とリゾホスホリパーゼD酵素活性は相関係数r = 0.8934と良好な相関関係を示しており、本サンドイッチELISA法により血清中のオートタキシン濃度定量が可能なが示された。

#### 【0043】

実施例12：1ステップサンドイッチELISA測定法によるヒトオートタキシンの定量  
 実施例10で反応性を示した抗ヒトオートタキシン抗体の組み合わせを用い、2抗体1ステップサンドイッチELISAによる血清中のヒトオートタキシン測定系を構築した。

固相用抗体としてR10.23を用い、2次抗体としてR10.21を用い測定系の検証を行った。固相用抗体R10.23はF(ab)<sub>2</sub>化し使用した。2次抗体となるR10.21はアルカリ性ホスファターゼとSulfo-SMCCを用い酵素標識を行なった。実施例9と同様にR10.23を96穴イムノプレート(NUNC社製)に2μg/mLで添加し、一昼夜、4℃にてプレートに結合させた。TBSにより3回洗浄後、3%BSAを含むTBSを250μL/ウェルで添加し2時間ブロッキング処理を行った。0.57μg/mLのアルカリ性ホスファターゼ標識R10.21を含むELISAアッセイ緩衝液をTBS 50μL/ウェルで添加し、速やかに-40℃にて凍結した。一昼夜をかけて減圧下凍結乾燥品とし、1ステップサンドイッチELISA測定試薬を作製した。測定は、実施例10で作製した標準品ならびに濃度未知のヒト血清を0.125% Tween 20水溶液により1/5倍希釈し50μL/ウェルにて添加した。室温で2時間反応後、TBS-Tにより4回洗浄し、TMB基質を50μL/ウェルで添加した。室温30分後、1N-リン酸により反応を停止し450nmの吸光度を測定した。図11にヒトオートタキシン既知濃度の標準品6濃度(0, 0.34, 0.675, 1.35, 2.70, 5.40μg/mL)による検量線を示す。検量線の回帰は3次回帰により行った。ヒトオートタキシン濃度依存的に450nmの吸光度上昇が確認された。本検量線を用い未知濃度のヒト血清で得られた450nmの吸光度より検体中のヒトオートタキシンの濃度を算出した。また、測定に用いたヒト血清中のリゾホスホリパーゼD活性を実施例7に従い決定し、ヒトオートタキシン濃度との相関性を検証した。図12は横軸にリゾホスホリパーゼD活性を、縦軸にヒトオートタキシン濃度を示す。血清中のヒトオートタキシン濃度とリゾホスホリパーゼD酵素活性は相関係数 $r = 0.9185$ と良好な相関関係を示しており、本サンドイッチELISA法により血清中のオートタキシン濃度定量が可能なが示された。

10

20

#### 【0044】

実施例13：1ステップサンドイッチELISA測定法による癌患者検体のヒトオートタキシンの定量と診断

健常人検体および癌患者血清検体のヒトオートタキシン濃度の定量を行い、健常人に対する有意差を検証した。癌患者血清としては、前立腺癌マーカーPSA(Prostate Specific Antigen)、消化器癌マーカーCA19-9、乳癌マーカーCA153、卵巣癌マーカーCA125がカットオフを超える検体を用い、実施例12に従い1ステップサンドイッチELISAを実施した。それぞれの癌マーカーは全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-600II(Tosoh Corporation)、ならびに体外診断薬として製造承認を得ている各マーカー測定試薬を用い実施した。癌患者血清の陽性判断は、PSA(>10ng/mL)、CA19-9(>38ng/mL)、CA153(>23ng/mL)、CA125(>32ng/mL)とした。図13および表2に結果を示す。健常人血清中オートタキシン濃度に対し、いずれの癌検体群も有意( $p < 0.001$ )に高値を示した。本結果より、血清中のオートタキシン濃度定量は癌の診断に有効であることが示された。

30

#### 【0045】

## 【表 2】

表 2

2抗体1ステップサンドイッチELISA法を用いPSA、CA19-9、CA153、CA125測定値がカットオフ値を超える検体を用い、健常人に対するオートタキシン濃度を検証した結果を示す。各検体群の測定数、測定値平均、標準偏差を表に示した。

	健常人	PSA	CA199	CA153	CA125
数	40	21	25	17	25
平均	0.73	1.01	0.97	1.68	1.75
SD	0.13	0.20	0.18	0.49	0.83

10

## 【0046】

実施例14：1ステップサンドイッチELISA測定法による慢性肝疾患患者検体のヒトオートタキシンの定量と診断

健常人検体146検体および慢性肝疾患（CLD：Chronic liver disease）患者血清検体29検体のヒトオートタキシン濃度の定量を行い、健常人に対する有意差を検証した。実施例12に従い1ステップサンドイッチELISAを実施した。図14に結果を示す。健常人（149検体）及び慢性肝疾患群（27検体）の測定値平均±標準偏差はそれぞれ、 $0.756 \pm 0.045$ 、 $0.1866 \pm 1.244$  ng/mL であり、有意差  $p < 0.0001$  を示した。また、表3に慢性肝疾患患者検体17例を用い既存肝疾患マーカーであるヒアルロン酸、血清アルブミン、総ビリルビン濃度、血小板数、プロトロンビン時間を測定値とオートタキシン濃度との関係を示した。いずれの既存マーカーに対してもヒトオートタキシン濃度は相関性を示した。本結果より、血清中のオートタキシン濃度定量は慢性肝疾患の診断あるいは診断補助に有効であり、かつその疾患の程度を反映することが示された。

20

## 【0047】

## 【表 3】

表 3

慢性肝疾患17例に対し、ヒアルロン酸濃度、血清アルブミン濃度、総ビリルビン濃度、血小板数、プロトロンビン時間の測定を行い、各検体のヒトオートタキシン濃度と比較した結果を一覧で示す。

項目	直線回帰		Spearman rank	
	相関係数 (r)	信頼性 (p)	相関係数 ( $\rho$ )	信頼性 (p)
ヒアルロン酸	0.764	0.0004	0.362	0.1539
アルブミン	-0.776	0.0003	-0.718	0.0012
総ビリルビン	0.821	0.0001	0.657	0.0042
血小板数	-0.661	0.0039	-0.582	0.0143
プロトロンビン時間	-0.727	0.0010	-0.715	0.0013

30

40

## 【0048】

実施例15：ヒト精漿の測定

健常人精漿中のオートタキシンの定量とリゾホスホリパーゼD活性測定を行った。オートタキシンの定量は、全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-600II（承認番号13B3X90002000003）を用いて行った。2抗体1ステップサンドイッチ測定試薬は、実施例12同様、固相用抗体としてF(ab)<sub>2</sub>化R10.23を1.2 μg、2次抗体としてアルカリ性ホスファターゼ標識R10.21を0.57 μg用い、5%ゼラチン、10 mM MgCl<sub>2</sub>を含むELISAアッセイ緩衝液50 μLを測定カッ

50

プに分注し、一昼夜凍結乾燥を行った。本測定試薬を用い、自動化装置により測定を行った。測定条件は、20  $\mu$ Lの検体と130  $\mu$ Lの0.1% Triton X-100溶液を測定カップに分注し、37  $^{\circ}$ Cにて10分間反応を行った。反応後コハク酸緩衝液により洗浄後、4-メチルウンベリフェリルリン酸塩を添加し、アルカリ性ホスファターゼにより分解、生成した4-メチルウンベリフェロンの単位時間当たりの生成濃度を測定することにより定量を行った。ヒトオートタキシン既知濃度の標準品6濃度(0, 0.34, 0.675, 1.35, 2.70, 5.40  $\mu$ g/mL)による検量線を用いた際の、健常人オートタキシン濃度は0.164  $\mu$ g/mLであった。一方、実施例7に従い、精漿中のリゾホスホリパーゼD活性を測定した結果、図15左に示すとおり、基質であるリゾホスファチジルコリン存在、非存在下においてコリン生成量に大きな差が認められず、10倍希釈した精漿においても非常に高値を示した。基質非存在下で高値を示すことより、内在性のコリンを測定していることが推測され、その測定値から健常人精漿中のコリン濃度は、約40 mMと非常に高濃度であり、実施例7によるリゾホスホリパーゼD活性測定時の基質濃度が2 mMであることより、本コリン濃度を排除した測定を行うためには、精漿検体を1000倍程度希釈する必要がある。本希釈操作によりオートタキシンも同時に希釈されるため、酵素活性測定には長時間が必要であることが予測される。精漿中のリゾホスホリパーゼD高値活性が内在性コリンによるものであることを確認するため、精漿検体を8時間TBSにて充分透析し低分子物質を除去した後のリゾホスホリパーゼD活性を図15中央に示す。透析により、高値を示していたリゾホスホリパーゼD活性であるコリン生成量は1/100程度まで低下した。また、透析後の精漿のリゾホスホリパーゼD活性を測定した結果、図15右に示すとおり、基質非存在下に対し基質存在下で酵素活性を確認できた。基質非存在下では、反応温度4  $^{\circ}$ Cでの酵素反応を停止制御した際の測定値と同等であった。これら、結果より、精漿中には非常に高濃度のコリンが存在し、コリン生成度を指標としたリゾホスホリパーゼD活性測定は困難であり、本発明による免疫測定方法によりはじめて定量可能なことを示す結果である。

#### 【0049】

##### 実施例16：オートタキシン測定試薬の調製

水不溶性担体(内部にフェライトを練り込んだ粒子径約1.5mmのエチレンビニルアルコール性)に抗ヒトオートタキシンモノクローナル抗体(R10.23)を100 ng/担体になるように37  $^{\circ}$ Cにて一昼夜物理的に吸着させ、その後1% BSAを含む100 mMトリス緩衝液(pH 8.0)にて40  $^{\circ}$ C、4時間ブロッキングを行ない抗体固定化担体とした。標識抗体は抗ヒトオートタキシンモノクローナル抗体(R10.21)をペプシン処理によりF(ab)2化した後、SPDP(N-スクシニミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート)を用いアルカリ性ホスファターゼと結合させ酵素標識抗体とした。磁力透過性の容器(容量1.2 mL)に12個の抗体固定化担体を入れた後、1  $\mu$ g/mLの標識抗体を含む緩衝液(3% BSAを含むトリス緩衝液、pH 8.0)50  $\mu$ Lを容器に添加し凍結乾燥を施しオートタキシン測定試薬とした。オートタキシン測定試薬は窒素充填下密閉封印シールを施し測定まで4  $^{\circ}$ Cにて保管した。

#### 【0050】

##### 実施例17：ヒトオートタキシン標準品の調製

抗ヒトオートタキシンモノクローナル抗体(R10.23)を用い抗体固定化担体を作製し、抗原の精製ならびにヒト血清から抗原の除去を行なったヒトオートタキシンゼロ血清の調製を行った。これらを材料として用いヒトオートタキシン免疫測定に用いる標準品(ヒトオートタキシン既知濃度サンプル)の調製を行った。具体的にはR10.23をHiTrap NHS-活性化5 mLカラム(GEヘルスサイエンス, Cat. No. 17-0717-01)に対し25 mgの抗体をマニュアルに従い結合させた。本R10.23結合カラムを用い、0.8  $\mu$ mのフィルターにより不純物を除去したヒト血清200 mLを1 mL/minの流速で送液しカラム素通り画分を回収した。本素通り画分中のヒトオートタキシンは実施例16記載の測定試薬にて反応性を示さないことを確認した。本品を標準品作製のベース血清としさらに、ゼロ濃度標準品とした。精製抗原の調製は昆虫細胞・バキュ

10

20

30

40

50

ロウイルス系で発現させた全長ヒトオートタキシンを材料に行った。培養上清 1 L を R 1 0 . 2 3 結合カラムに流速 1 mL / min の流速にて送液し、続いて P B S により未結合蛋白質の洗浄を行った。カラムを通過した P B S の 2 8 0 nm の吸光度が 0 . 0 1 以下になったことを確認し、続いて 1 0 0 mM グリシン緩衝液 pH 3 . 5 を用い結合蛋白質を溶出させた。溶出液は 1 / 1 0 容量の 1 M - T r i s pH 8 . 0 を添加することにより中性に戻した後、T B S により速やかに透析処理を行なった。精製全長ヒトオートタキシンを B C A 蛋白定量キット ( P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , I n c . , C a t . N o . 2 3 2 2 5 ) により濃度測定し、ヒトオートタキシン濃度とした。本精製ヒトオートタキシン抗原を上記ヒトオートタキシン除去ヒト血清に添加し既知濃度標準品を調製した。

10

## 【 0 0 5 1 】

## 実施例 1 8 : オートタキシン測定試薬の評価

実施例 1 6 にて作製したオートタキシン測定試薬を用い実施例 1 7 で作製した標準品を用い試薬性能評価を実施した。評価用装置として全自動エンザイムイムノアッセイ装置 AIA-1800 ( 東ソー株式会社製 : 製造販売届出番号 1 3 B 3 X 9 0 0 0 2 0 0 0 0 2 ) を用いた。標準品濃度は 0 , 0 . 3 1 3 , 0 . 6 2 5 , 1 . 2 5 , 2 . 5 及び 5 . 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 6 濃度標準品を使用した。全自動エンザイムイムノアッセイ装置 AIA-1800 の測定原理は標準品あるいはヒト血清検体 2 0  $\mu\text{L}$  と界面活性剤を含む希釈液 1 3 0  $\mu\text{L}$  を実施例 1 6 で作製したオートタキシン測定試薬容器に自動で分注される。3 7 恒温下 1 0 分間の抗原抗体反応を経て、界面活性剤を含む緩衝液にて 8 回の洗浄が行われた後、4 - メチルウンベリフェリリン酸塩を添加し単位時間当たりの 4 - メチルウンベリフェロン生成濃度をもって測定値 (  $\text{n mol} / \text{L} \cdot \text{sec}$  ) とする。標準品測定時の測定値を表 4 に、そしてそれを用いた検量線を図 1 6 に示す。また、本検量線およびゼロ濃度標準品の ( 平均値 + 2  $\times$  標準偏差 ) より算出した最小検出感度は 1 1 0  $\text{ng} / \text{mL}$  であった。

20

## 【 0 0 5 2 】

## 【表 4】

表 4

測定値 ( $\text{nM}/\text{s}$ )	標準品濃度					
	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0. 313 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0. 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2. 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5. 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	0. 038	7. 444	19. 937	49. 888	101. 739	190. 031
2	0. 041	7. 473	19. 026	45. 471	107. 094	177. 043
3	0. 040	6. 942	19. 241	47. 992	103. 751	175. 219
4	0. 040	6. 325	19. 850	50. 465	101. 417	186. 175
5	0. 039	8. 248	20. 577	46. 465	97. 992	182. 891
平均	0. 040	7. 286	19. 726	48. 056	102. 399	182. 272
%CV	2. 879	9. 770	3. 114	4. 460	3. 264	3. 392

30

## 【 0 0 5 3 】

## 実施例 1 9 : オートタキシン測定試薬の再現性試験

オートタキシン測定試薬で得られる結果の再現性を検証するため、実施例 1 8 で作成した検量線を用いてコントロール検体 3 例にて再現性試験を実施した。同時再現性として検体を 1 0 重測定し変動係数 ( % C V : coefficient variation = 標準偏差 / 平均値  $\times$  1 0 0 ) を算出し、表 5 に示す。また、数日おきに検体を測定し 0 日目測定値からの変動ならびに全測定値の変動係数を算出し、その結果を表 6 に示す。

40

## 【 0 0 5 4 】

【表 5】

表 5

同時再現性試験結果 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

	コントロール血清L	コントロール血清M	コントロール血清H
測定値1	0.589	1.223	4.058
測定値2	0.619	1.261	4.18
測定値3	0.594	1.276	3.997
測定値4	0.592	1.204	4.08
測定値5	0.581	1.244	4.156
測定値6	0.574	1.211	4.083
測定値7	0.557	1.289	4.166
測定値8	0.588	1.204	4.09
測定値9	0.567	1.258	4.137
測定値10	0.596	1.232	4.029
測定値11	0.556	1.259	4.124
測定値12	0.596	1.271	4.269
測定値13	0.589	1.297	4.053
測定値14	0.577	1.264	4.186
測定値15	0.614	1.231	4.082
測定値16	0.59	1.313	4.25
測定値17	0.571	1.255	3.928
測定値18	0.588	1.313	4.049
測定値19	0.583	1.234	4.385
測定値20	0.613	1.25	4.059
平均値	0.59	1.25	4.12
標準偏差	0.02	0.03	0.10
%CV	2.91	2.61	2.51

10

20

30

【 0 0 5 5 】

【表 6】

表 6

日差再現性試験結果 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4重測定 of 平均値)

	コントロール血清L	コントロール血清M	コントロール血清H
0日目	0.779	0.804	0.975
3日目	0.972	0.882	1.057
6日目	0.885	0.812	1.018
13日目	1.186	0.908	1.052
17日目	1.033	0.938	1.071
25日目	1.017	0.904	1.077
平均値	0.98	0.87	1.04
標準偏差	0.14	0.05	0.04
%CV	14.16	6.27	3.70

40

【 0 0 5 6 】

いずれの変動係数も10%以下を示しておりオートタキシン測定試薬にて得られる結果は信頼しうることが証明された。

50

## 【 0 0 5 7 】

実施例 2 0 : 白血病、悪性リンパ腫検体の測定

全自動エンザイムイムノアッセイ装置 A I A - 6 0 0 I I を使用し、健常人 1 2 0 例、白血病、悪性リンパ腫 2 1 5 例の血清検体をオートタキシン測定試薬にて測定した。その結果を表 7 に示す。

## 【 0 0 5 8 】

【表 7】

表 7

	NHS	AL	CL	HD	NHL	others
男性	74	19	21	4	47	9
女性	45	33	7	4	20	6

NHS : 健常人

AL : 急性白血病

CL : 慢性白血病

HD : ホジキンリンパ腫

NHL : 非ホジキンリンパ腫

others : その他白血病、悪性リンパ腫

10

## 【 0 0 5 9 】

男性健常人 7 4 例の測定値は平均値  $0.656 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、標準偏差  $0.121 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、最小値  $0.401 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大値  $1.088 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、女性健常人 4 6 例の測定値は平均値  $0.852 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、標準偏差  $0.184 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、最小値  $0.621 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大値  $1.590 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。白血病および悪性リンパ腫 2 1 5 例の測定を実施した。対象検体は健常人、急性白血病（急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病）、慢性白血病（慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、前駆リンパ球性白血病）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫）、その他白血病、悪性リンパ腫（慢性活動性EBV感染症、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫）であり、それぞれの検体数も表 7 に示す。測定結果は図 1 7 及び 1 8 に示すとおり、非ホジキンリンパ腫において男性、女性いずれも有意差  $p < 0.01$  をもって高値を示した。

## 【 0 0 6 0 】

実施例 2 1 : 非ホジキンリンパ腫の詳細な評価

実施例 2 0 で測定した非ホジキンリンパ腫をさらに詳細に分類し、評価を実施した。その結果を表 8、並びに図 1 9、2 0 に示す。濾胞性リンパ腫において男性、女性それぞれにおいて有意差  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  をもって高値を示した。

## 【 0 0 6 1 】

20

30

## 【表 8】

表 8

	NHS	Burkitt	LBL	MCL	DLBCL	FL
男性	74	7	1	3	23	13
女性	45	0	0	0	6	14

NHS : 健常人

Burkitt : バーキットリンパ腫

LBL : リンパ芽球性リンパ腫

MCL : マントル細胞リンパ腫

DLBCL : びまん性大細胞型B細胞リンパ腫

FL : 濾胞性リンパ腫

10

## 【 0 0 6 2 】

実施例 2 2 : オートタキシン濃度とリゾホスファチジン酸濃度の相関性試験

オートタキシンは生理活性脂質であるリゾホスファジン酸 ( L P A ) 産生を介して、癌の浸潤及び転移と係わっていることが明らかとなっている。そこで、血清中のオートタキシン濃度を測定し、 L P A 濃度との相関性を検討した。 L P A 測定は Clin . Chim . Acta 333, 59 - 67, 2003 に従い行った。具体的には、測定試薬として以下の組成を含む 100 mM H E P E S 緩衝液 ( p H 7 . 6 ) を準備した。

20

## 【 0 0 6 3 】

( 測定試薬組成 )

20 k U / L リゾホスフォリパーゼ ( E C . 3 . 1 . 1 . 5 )

1 . 3 k U / L ペルオキシダーゼ

100 k U / L グリセロール 3 リン酸オキシダーゼ ( G 3 P O ; E C 1 . 1 . 3 . 2 1 )

10 k U / L グリセロール 3 リン酸脱水素酵素 ( G 3 P D H ; E C 1 . 1 . 1 . 8 )

10 k U / L - ヒドロキシステロイド脱水素酵素 ( H S D ; E C 1 . 1 . 1 . 5 0 )

30

10 μ M ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド ( N A D H )

1 m M コール酸 ( c h o l i c a c i d )

0 . 5 m M T O O S

1 m M 4 - アミノアンチピリン

0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0

測定は 9 μ L の血清および L P A 濃度既知の標準品を上記測定試薬 240 μ L と混合後、37 にてインキュベートし 7 分後および 9 分後での 570 nm の吸光度を測定した。7 分から 9 分までの測定値の増加量 ( r a t e 値 = 吸光度 / 分 ) を算出し、標準品測定値より作成した検量線を用い血清検体中の L P A 濃度を算出した。測定検体中のオートタキシン抗原濃度と L P A 濃度の相関性を検証した結果、図 2 1 に示す通り、相関係数  $r = 0 . 6 2 1$  と良好な相関が認められた ( なお、一般的に  $r = 0 . 5$  以上であればかなり高い相関性があると判断できる ) 。

40

## 【 0 0 6 4 】

従来 L P A 濃度の測定は L P A 自身が不安定であり、かつ、採血後血清中に自然に生成されることから臨床での測定が困難であったが、本発明によるオートタキシン測定は容易であり、かつ、 L P A 濃度と良好な相関性が得られた。

## 【産業上の利用可能性】

## 【 0 0 6 5 】

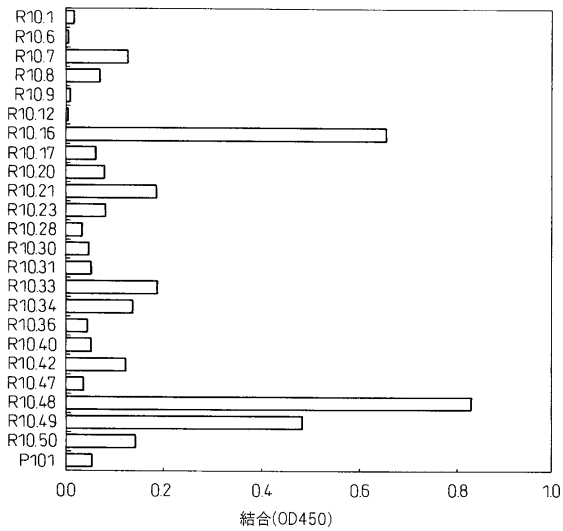
本発明は、ヒト検体中に含まれる天然形態のヒトオートタキシンに対する抗体、ならび

50

にそれを用いたヒトオートタキシンの定量方法ならびに定量試薬に関する。これらを用いることにより癌の診断方法および肝臓疾患の診断方法が可能となる。さらに、本発明は、ヒト検体中に含まれるヒトオートタキシンを免疫学的に定量する方法によって濃度を測定することにより、これまで明確な血清診断マーカーがなかった悪性リンパ腫、特に日本人の大多数を占める非ホジキンリンパ腫、さらには濾胞性リンパ腫の検査、あるいは検査補助が可能となる。

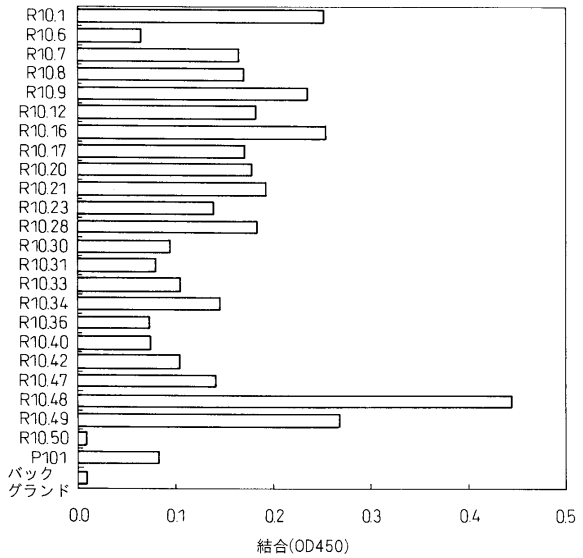
【 図 2 】

図2

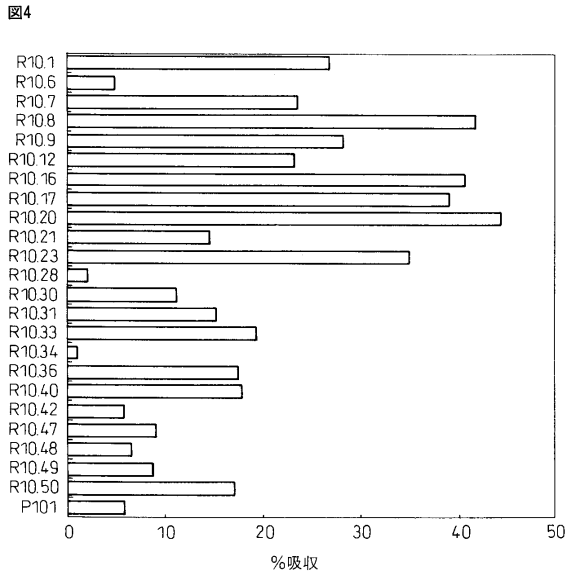


【 図 3 】

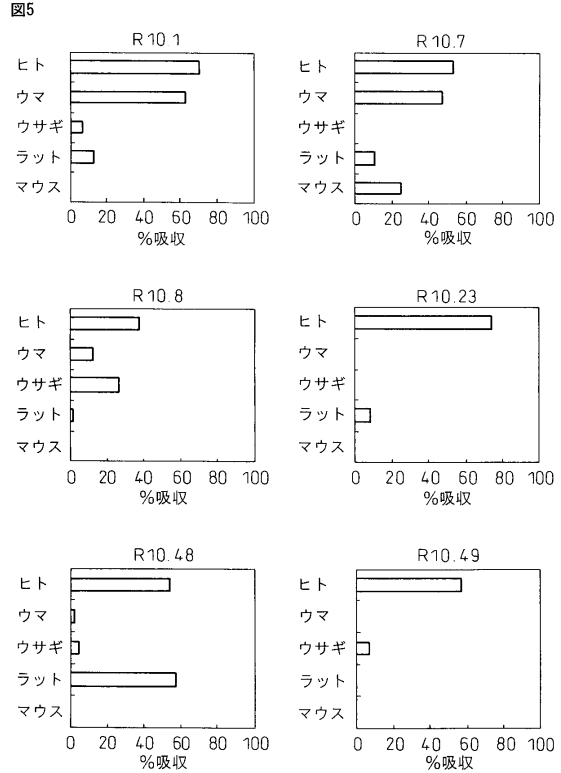
図3



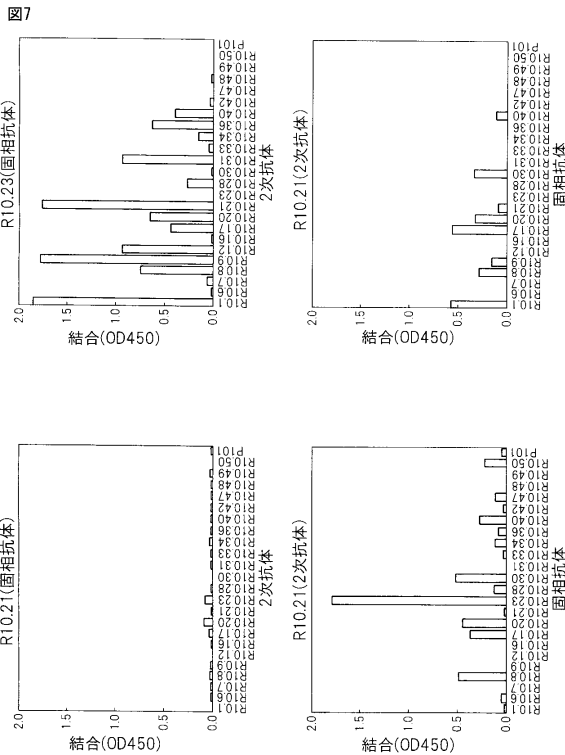
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 7 】



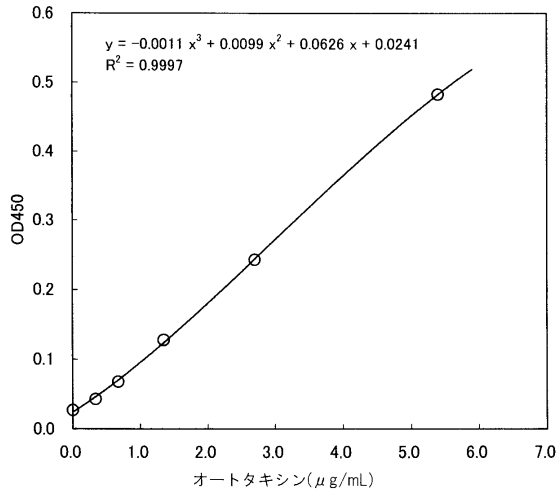
【 図 8 】

図8

抗体	ヒト	ウマ	ウサギ	ラット	マウス
R10.1	0.77				
R10.6					
R10.7					
R10.8					
R10.9					
R10.12					
R10.15					
R10.17					
R10.20					
R10.21					
R10.23	1.78				
R10.28					
R10.30					
R10.31					
R10.33					
R10.34					
R10.36					
R10.40					
R10.42					
R10.44					
R10.47					
R10.48					
R10.49					
R10.50					
P101					

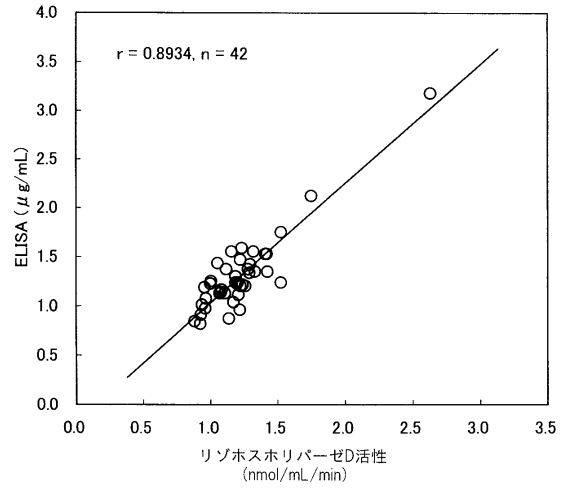
【 図 9 】

図9



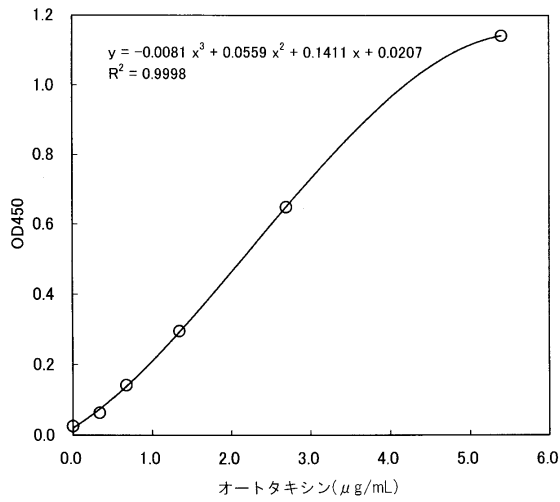
【 図 10 】

図10



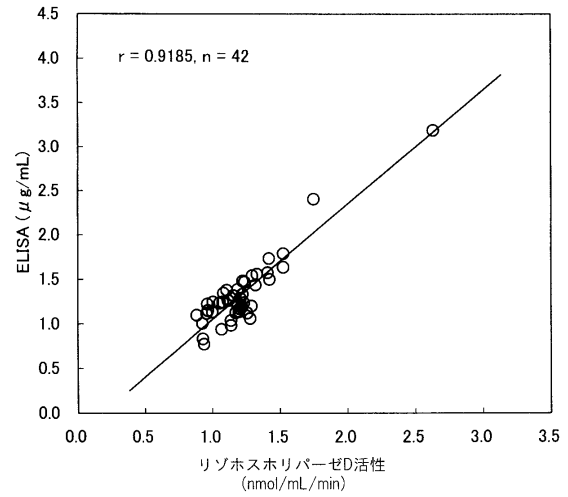
【 図 11 】

図11



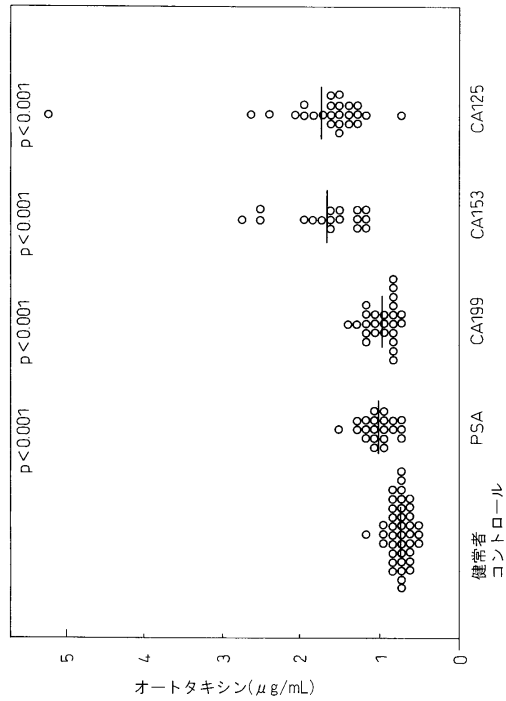
【 図 12 】

図12



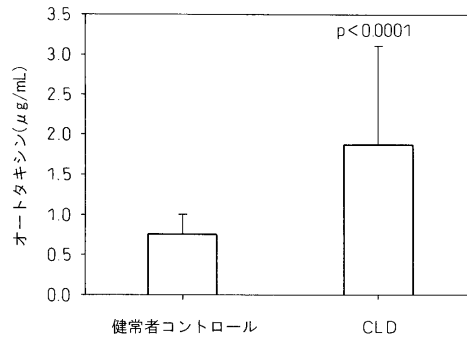
【 図 1 3 】

図13



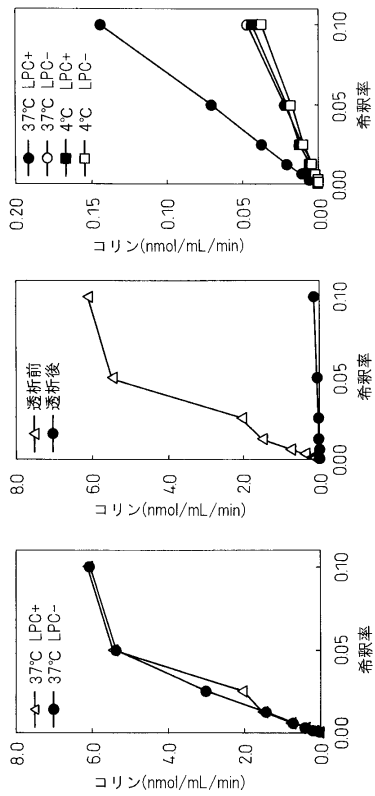
【 図 1 4 】

図14



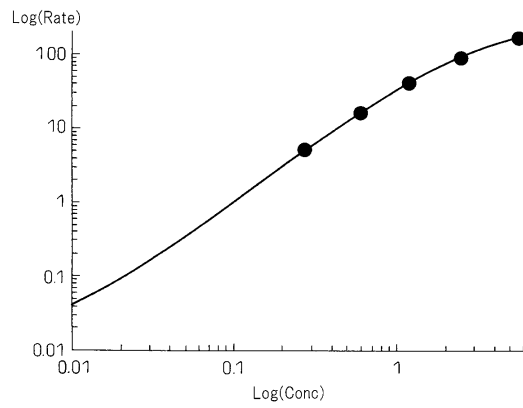
【 図 1 5 】

図15

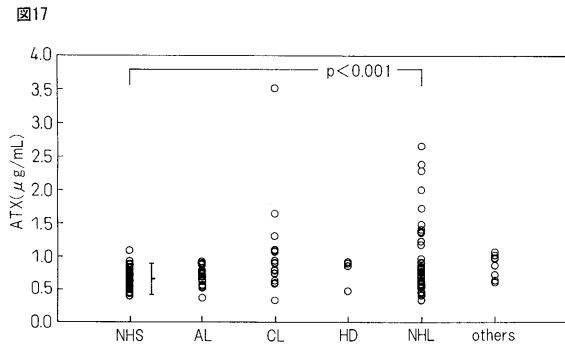


【 図 1 6 】

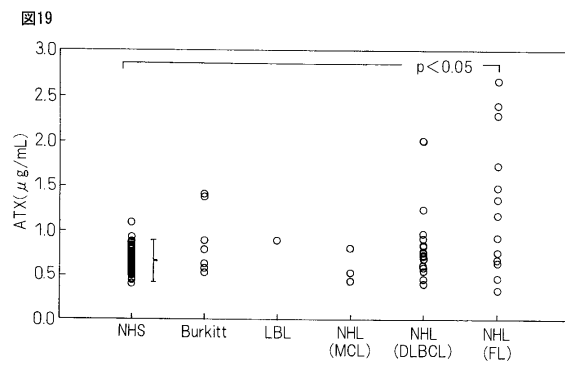
図16



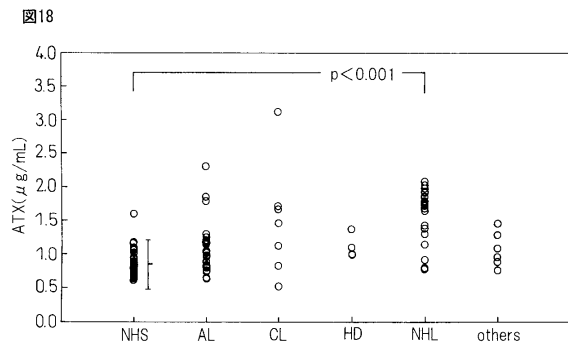
【 17 】



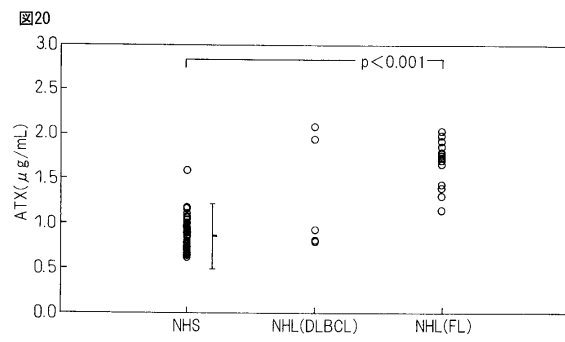
【 19 】



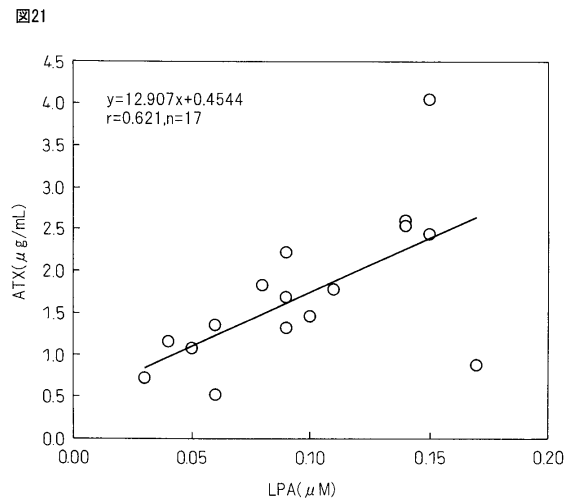
【 18 】



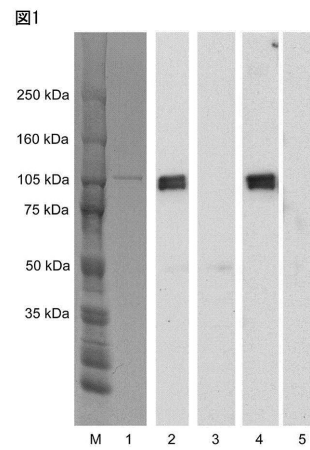
【 20 】



【 21 】

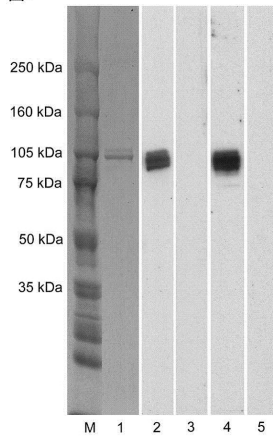


【 1 】



【 図 6 】

図6



【 配列表 】

0005963900000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A C
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(72)発明者 青木 淳賢

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 新井 洋由

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 矢富 裕

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 池田 均

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 中村 和宏

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 五十嵐 浩二

神奈川県川崎市麻生区高石4-11-14-104

(72)発明者 井手 和史

神奈川県川崎市多摩区宿河原2-11-15-406

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0171096 (U.S., A1)

特開2004-159531 (JP, A)

Karl R. N. Baumforth et al., Induction of Autotaxin by the Epstein-Barr Virus Promotes the Growth and Survival of Hodgkin Lymphoma Cells, Blood, American Society of Hematology, 2005年6月2日, Vol.106 / No.6, pp.2138-2146

五十嵐浩二 他, Quantitative Immunoassay for Autotaxin Using Monoclonal Antibodies Specific to Conformation-dependent Epitope, BMB2007講演要旨集, 日本, BMB2007, 2007年11月25日, 3P-1179

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	通过自动紫杉烷测量和测试药物测试恶性淋巴瘤的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5963900B2</a>	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	JP2015041714	申请日	2015-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学 东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	东京大学 Tosoh公司		
当前申请(专利权)人(译)	东京大学 Tosoh公司		
[标]发明人	青木淳賢 新井洋由 矢富裕 池田均 中村和宏 五十嵐浩二 井手和史		
发明人	青木 淳賢 新井 洋由 矢富 裕 池田 均 中村 和宏 五十嵐 浩二 井手 和史		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543 C12Q1/34 C12N15/02 C12N15/09 C07K16/18 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/564 C07K16/28 C07K16/40 C07K2317/34 C07K2317/76 G01N33/573 G01N2333/916		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.V G01N33/577.B G01N33/543.501.A C12Q1/34 C12N15/00.ZNA.C C12N15/00.A C07K16/18 C12P21/08 C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA20 4B024/EA10 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ32 4B063/QR12 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS12 4B063/QS15 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE09 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/GA20		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一		
优先权	2006212275 2006-08-03 JP 2007092412 2007-03-30 JP		
其他公开文献	JP2015111154A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

