

(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2007-254428
(P2007-254428A)

(43) 公開日 平成19年10月4日(2007.10.4)

| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|--------------|-----------------|
| C07K 16/18 (2006.01) | C 07 K 16/18 | Z N A 4 B 0 2 4 |
| C07K 14/79 (2006.01) | C 07 K 14/79 | 4 B 0 6 4 |
| C12N 5/10 (2006.01) | C 12 N 5/00 | B 4 B 0 6 5 |
| C12P 21/08 (2006.01) | C 12 P 21/08 | 4 H 0 4 5 |
| G01N 33/53 (2006.01) | G 01 N 33/53 | D |

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

| | | |
|-----------|----------------------------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2006-84304 (P2006-84304) | (71) 出願人 000226862 |
| (22) 出願日 | 平成18年3月25日 (2006.3.25) | 日本製薬株式会社 東京都台東区上野三丁目23番9号 |
| | | (74) 代理人 100099139 弁理士 光来出 良彦 |
| | | (72) 発明者 猪井 俊敬 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水 製薬株式会社研究所内 |
| | | F ターム (参考) 4B024 AA11 BA41 CA01 CA11 DA02 GA01 HA01 HA14 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13 4B065 AA91X AA93Y AB02 AC14 BA08 CA25 CA46 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA74 GA26 |

(54) 【発明の名称】天然で未変性のCDTに対する抗体、抗体の製造方法、ハイブリドーマ、及び免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】アルコール中毒患者を同定することができる抗体、該抗体の製造方法、該抗体を產生するハイブリドーマ、該抗体を用いた簡易な免疫測定方法を提供する。

【解決手段】提供する抗体は、未変性で天然の炭水化物欠失トランスフェリン(CDT)に選択的に反応する抗体である。該抗体を用いることにより、体液を変性処理する必要がなく直接CDT濃度を測定することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

未変性で天然の CDT 抗原に選択的に反応し、グリコシダーゼ消化トランスフェリンに反応しない又は実質的に反応しない抗 CDT 抗体。

【請求項 2】

前記抗体が立体構造を認識する請求項 1 記載の抗 CDT 抗体。

【請求項 3】

未変性で天然の CDT 抗原を免疫原として動物に免疫し、該動物から採取された請求項 1 又は 2 記載の抗 CDT 抗体。

【請求項 4】

アルコール中毒患者の体液を用い、非変性条件下に CDT 抗原を精製又は部分的精製して得た、未変性で天然の CDT 抗原を免疫原として動物に免疫し、該動物から採取された請求項 1 又は 2 記載の抗 CDT 抗体。

【請求項 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 - 4 の何れか 1 項に記載の抗 CDT 抗体。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体がハイブリドーマ NCDT503 (FERM AP-20844) から產生される請求項 5 記載の抗 CDT 抗体。

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が次の P1 - P6 のペプチド領域に対して反応性を有しないか又は実質的に反応性を有しない請求項 5 又は 6 記載の抗 CDT 抗体。

P1 : VLAENYNKSDNCE

P2 : QHLFGSNVTDCSG

P3 : VVARSMGGKEDLIWELL

P4 : IAKIMNGEADAMSL

P5 : YEKYLGEEYVKAV

P6 : SKLSMGSGLNLSEPN

【請求項 8】

前記抗体がポリクローナル抗体である請求項 1 - 4 の何れか 1 項に記載の抗 CDT 抗体。

【請求項 9】

未変性で天然の CDT に選択的に反応し、グリコシダーゼ消化トランスフェリンに反応しない又は実質的に反応しないモノクローナル抗体を產生する能力を有するハイブリドーマ NCDT503 (FERM AP-20844)。

【請求項 10】

アルコール中毒患者の体液を用い、非変性条件下に CDT 抗原を精製又は部分的精製して、 CDT 抗原を取得することを特徴とする CDT 抗原の調製方法。

【請求項 11】

アルコール中毒患者の体液を鉄飽和溶液と接触させ、次いで、非変性条件下で夾雜タンパク質を除去し、次いで、非変性条件下で分画して CDT 抗原を取得することを特徴とする CDT 抗原の調製方法。

【請求項 12】

請求項 10 又は 11 記載の CDT 抗原の調製方法により得た CDT 抗原を免疫原として動物に免疫することにより、該動物の体内に、 CDT 抗原に対して選択的に反応し、 N-グリコシダーゼ消化トランスフェリンに反応しない又は実質的に反応しない抗 CDT 抗体を產生させ、

該動物から該抗 CDT 抗体を採取することを特徴とする抗 CDT 抗体の製造方法。

【請求項 13】

体液に、請求項 1 - 8 の何れか 1 項に記載の抗 CDT 抗体を接触させ、該抗体に選択的

10

20

40

50

に反応する CDT を検出、又は定量化することを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 14】

体液に、請求項 1 - 8 の何れか 1 項に記載の抗 CDT 抗体を接触させ、反応させてなる反応液の吸光度を計測することにより、該抗体に選択的に反応する CDT を検出又は定量化することを特徴とする免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はアルコール中毒患者を同定することができる抗体、該抗体の製造方法、該抗体を產生するハイブリドーマ、該抗体を用いた簡易な免疫測定方法に関する。該抗体は、未変性で天然の炭水化物欠失トランスフェリン (CDT) に選択的に反応する抗体であって、該抗体を用いて、体液を変性処理する必要がなく直接 CDT 濃度を測定することができる。

10

【背景技術】

【0002】

アルコール中毒は、アルコール中毒患者とかれらの関係者に多大の損害をもたらすばかりか、アルコール中毒に関連する生産性の損失及び莫大な年間健康管理費用をもたらす。従って、アルコール中毒への早期認識と治療とが個人及び社会にとって最善且つ費用効果的である。このような状況下において、高感度で特異的、しかも迅速で費用のかからない検査方法が必要である。

20

【0003】

例えば、 -GTP 、平均血球容積 (mean corpuscular volume) (MCV)、アスパラギン酸アミノトランスアミナーゼ (AST) 又はアラニンアミノトランスアミナーゼ (ALT)、 -リボタンパク質及びフェリチン のような臨床検査項目が、アルコール乱用の生化学的マーカーとして多年にわたって用いられてきたが、これらの検査の診断的感度及び特異性は満足のいくものではなかった。

【0004】

Stibler らは、トランスフェリンの中で高い等電点を持つアイソフォームが 1 週間以上にわたって毎日 60 g 以上のエタノールを摂取した者の 81 % で増加し、10 日以上にわたって禁酒する場合に高い等電点を持つアイソフォームが正常レベルに戻ることを報告している (Acta Med Scan, 206, 275-281, (1979) : 非特許文献 1)。

30

【0005】

血清トランスフェリンは、79.5 kD の分子量を有し、二つの N - 連結の多糖鎖を有する一本のポリペプチド鎖から成る糖タンパクである。これらの多糖鎖は、分岐状であり、かつ末端シアル酸残基を有している。Wong および Regoeczi は、Int.J.Peptide Res. 9, 241-248, (1977) (非特許文献 2) において、ヒトトランスフェリンは天然ではシアル化のレベルにより種々のアイソフォームが存在すると述べている。事実、6 種のアイソフォームとしてペンタシアロ、テトラシアロ、トリシアロ、ジシアロ、モノシアロおよびシアロトランスフェリンが存在する。

40

【0006】

正常な健康個体に比べて、アルコール中毒患者の血液中には、シアロ、モノシアロ、ジシアロトランスフェリンが上昇したレベルで存在することが見出されている (van Eijk et al, Clin Chim Acta 132, 167-171, (1983) : 非特許文献 3、Stibler, Clin Chem, 37, 2029-2037, (1991) : 非特許文献 4、および Stibler et al, "Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum as a marker of high alcohol consumption", Advances in the Biosciences, (Ed Nordmann et al), Pergamon, 1988, Vol.71, pages 353-357) : 非特許文献 5)。

【0007】

シアロ、モノシアロ及びジシアロトランスフェリンは、炭水化物 (糖鎖) 欠失トランスフェリン (略語: CDT) と呼ばれている。CDT は、アルコール消費、特に慢性アル

50

コール消費を検出およびモニターするための有効なマークーであることが見出されている。C D T の免疫学的検査法として WO 96 / 26444 (特許文献 1) および Heil et al., Anaesthetist, 43, 447-453, (1994) (非特許文献 6) 等が報告されている。これらの手法では、希釈血清サンプルをアニオン性イオン交換樹脂に通し、正常なトランスフェリンイソ型を樹脂に保持させる一方、C D T 分画の通過を可能にしている。この溶出液の C D T 含量は、免疫比濁法 (immunoturbidimetric assay) 等によって測定される。その他、高速液体クロマト法により C D T を定量する方法も WO 95 / 04932 (特許文献 2) により知られている。

【 0 0 0 8 】

前記アルコール中毒患者の従来の検査手法の全ては、イオン交換樹脂或いは高速液体クロマト法を適用する等比較的複雑な手順に基づくものであった。 10

【 0 0 0 9 】

一方、Makhlofらは、C D T のみを直接測定するために、C D T に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。彼らは、トランスフェリンの糖鎖が結合している 413 番目と 611 番目のアスパラギンを中心として前後 6 個のアミノ酸の合成ペプチドを免疫原として抗体を作製し、その抗体を C D T 測定のための免疫測定法に応用することを考えた (WO 93 / 06133 : 特許文献 3) 。

【 0 0 1 0 】

これに対して、ER.Timbleらは、Makhlofらの手法による、合成ペプチドを免疫原として作製したモノクローナル抗体は C D T には反応しなかったことからそのエピトープはトランスフェリン分子内に隠匿されており検出に応用できないと述べた (Biochem Soc Trans, 26(1), S48(1998) : 非特許文献 7) 。 20

【 0 0 1 1 】

一方、特開 2004 - 051633 (特許文献 4) には、C D T と水溶液中で選択的に結合し、C D T を固相に結合させる必要がない抗体に関して記載されている。該抗体は、遺伝子組み換え手法により得たリコンビナント非糖化トランスフェリンを免疫原に使用し、或いは、酵素による脱糖化反応して非糖化トランスフェリンとしたものを免疫原として使用して、得た抗体である。即ち、人為的に作製した C D T を免疫原に使用して得られた抗体である。 30

【特許文献 1 】 WO 96 / 26444

【特許文献 2 】 WO 95 / 04932

【特許文献 3 】 WO 93 / 06133

【特許文献 4 】 特開 2004 - 051633

【非特許文献 1 】 Acta Med Scan, 206, 275-281, (1979)

【非特許文献 2 】 Int.J.Peptide Res. 9, 241-248, (1977)

【非特許文献 3 】 Clin Chim Acta 132, 167-171, (1983)

【非特許文献 4 】 Clin Chem, 37, 2029-2037, (1991)

【非特許文献 5 】 Advances in the Biosciences, Pergamon, 1988, Vol.71, pages 353-357

【非特許文献 6 】 Anaesthetist, 43, 447-453, (1994)

【非特許文献 7 】 Biochem Soc Trans, 26(1), S48(1998)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 2 】

体液中の C D T を簡易に検出するために、体液中の C D T を前処理することなく測定できることが望ましく、そのためには天然の C D T の構造を認識する抗体を取得する必要がある。 40

【 0 0 1 3 】

一方、上述したように糖鎖欠失部位の近傍の領域は、ER.Timbleらの報告 (非特許文献 7) からも理解されるように、C D T 分子内に隠匿されている可能性があり、トランスフ

エリン分子内のジスルフィド結合数の多さからも強固な立体構造を形成しており、糖鎖欠失部位の近傍のエピトープを認識する抗体の取得は困難であると想定される。

【0014】

また、免疫抗原として人為的に作製したCDTは、天然のCDTとは大きく異なるという問題がある。例えば、前記特許文献4の遺伝子組換え体の場合、ジスルフィド結合を含むためタンパク質の立体構造が不完全になり易く、また、酵素による脱糖化物の場合、調製の際に変性処理が必要である。さらに遺伝子組換え体と脱糖化物はアミノ酸の置換を生じるという問題がある。

【0015】

また、体液中から天然のCDTを精製するための方法として、一般的には抗トランスフェリン抗体が結合したカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーが使用される。しかしながら、この方法はカラム中の抗トランスフェリン抗体にトランスフェリンを結合させた後に、この抗原抗体複合体を酸性条件で変性させることによりCDTを含むトランスフェリンを溶出させて精製する方法がある。しかしながら、該方法により得られるCDTは変性している可能性が高いので、免疫原としては好ましくない。

【0016】

本発明はかかる問題点を鑑みて、体液中のCDTに対して反応しないような抗体を生ずる恐れのある、人為的に作製したCDTを免疫原に使用することなく、天然のCDTと選択的に結合し、既存の方法で測定したCDT濃度と相関性が高いアルコール中毒患者を同定するための抗体、該抗体の製造方法、ハイブリドーマ及び該抗体を用いた簡便な免疫測定法を提供することを目的とする。

【0017】

さらに、前記した目的に加えて、本発明は、前記変性が行われることがない、未変性で天然のCDT調製法を構築し、未変性で天然のCDTの構造を認識する抗CDT抗体を取得することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者は鋭意研究の結果、変性が行われることがない、未変性で天然のCDT調製法を構築し、未変性で天然のCDTの構造を認識する抗CDT抗体を取得した。

【0019】

即ち、本発明の抗CDT抗体は、未変性で天然のCDTに選択的に反応し、グリコシダーゼ消化トランスフェリンに反応しない又は実質的に反応しない抗CDT抗体である。本発明の抗CDT抗体は、未変性で天然のCDTの一次構造を認識せず、立体構造を認識する抗体である。

【0020】

本明細書において使用する用語「天然」とは、合成ペプチド、遺伝子組換え体或いは酵素消化物という人工的に作製したCDTを免疫原に使用したものではないという意味で使用しており、また、「未変性」とは、天然（生体由来）の抗原も精製方法等で、pHの変動、熱、有機溶媒、界面活性剤（可溶化剤）等により変性させることも可能であることから、このような変性が無い意味で使用している。また、「非変性条件下」とは、未変性の状態を維持し変性させることのない条件下という意味で使用している。本明細書中に単に「天然のCDT」という場合は、未変性の生体由来のCDTを一般的に意味する。

【0021】

本発明の抗CDT抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよい。

【0022】

特に好ましいモノクローナル抗体は、特許生物寄託センター（IPOD）に寄託したハイブリドーマNCDT503（FERM A P - 20844）から産生される抗体である。

【0023】

10

20

30

40

50

本発明の抗 CDT モノクローナル抗体は次の P1 - P6 のペプチド領域に対して反応性を有しないか又は実質的に反応性を有しない。P1 及び P2 は、本発明者が作製したものであるが、特許文献3 (WO 93 / 06133 の請求項3) に示されたペプチド配列に含まれる抗体認識部位に対応する。P3 - P6 は、本発明者が作製したものであるが、特許文献4 (特開2004 - 051633 の請求項4) に示されたペプチド配列に含まれる抗体認識部位に対応する。P1 - P6 のペプチド配列において下線部は、特許文献3 又は特許文献4 の抗体認識部位を示す。

- P1: VLAENYNKSDNCE (配列番号1)
 P2: QHLFGSNVTDCSG (配列番号2)
 P3: VVARSMGGKEDLIWELL (配列番号3)
 P4: IAKIMNGEADAMSL (配列番号4)
 P5: YEKYLGEEYVKAV (配列番号5)
 P6: SKLSMGSGLNLSEPN (配列番号6)

10

本発明の抗体は、未変性で天然の CDT 抗原を免疫原として動物に免疫し、該動物から採取する方法により得ることができる。

【0024】

好ましくは、本発明の抗体は、アルコール中毒患者の体液を用い、非変性条件下に CDT 抗原を精製又は部分的精製して得た、未変性で天然の CDT 抗原を免疫原として動物に免疫し、該動物から採取して得ることができる。

【0025】

本発明の抗体生産方法に用いる免疫原は、例えば、非変性条件下でアルコール中毒患者等の血清等の体液から精製又は部分的に精製したものを用いることができ、好ましくは、体液を鉄飽和溶液と接触させ、その後、イオン交換クロマトグラフィー等の非変性条件下により調製した CDT を免疫原とすることができる。さらに好ましくは、体液を鉄飽和溶液と接触させ、その後、アルブミン、グロブリン等の夾雑タンパク質を除去し、次いで、イオン交換クロマトグラフィー等の非変性条件下により分画調製した CDT を免疫原とすることができる。前記アルブミンを除去するためにはブルーセファロースカラムを用いて除去することができ、前記グロブリンを除去するためには Protein G カラムを用いて除去することができる。これらの夾雫タンパク質除去の手段、及び分画調製手段は、CDT を非変性条件下で精製する手段として有用である。

30

【0026】

本発明のポリクローナル抗体、ハイブリドーマ、及びモノクローナル抗体は、上記免疫原を動物に免疫することにより、該動物から採取することができる。動物を免疫する方法は公知の手法が適用でき、それに必要な免疫プロトコールは当業者にとって容易に決定し得る。例えば、本発明の抗体は、アジュバントと混合した免疫原を適当な宿主動物（ウサギ、ヤギ、ウマまたはその他の哺乳類）に注射することにより、作製し得る。免疫原の注射は、適当な力価の抗血清が得られるまで続けられる。抗血清は回収後、必要に応じてアフィニティーコロマトやイオン交換クロマト法等の既知技術を用いて更に精製されが好ましい。

40

【0027】

また、本発明の抗体は、免疫された動物（例えば、ラット、ハムスター、マウスまたはその他の哺乳類）から得た細胞と不死化細胞とを融合することによって得られる融合細胞（ハイブリドーマ）から得ることができる。例えばマウスを使用することが可能である。この場合、免疫原を既知技術により免疫した後、免疫したマウスから回収した脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を用いてケーラーとミルシュタインの方法（ネイチャー 256 卷495 頁1975年）により目的のハイブリドーマを得ることが可能である。目的とする抗体を產生するハイブリドーマの選択は、免疫原として用いた CDT や CDT 以外のトランスフェリンを固相化した酵素免疫測定法或いは抗マウス IgG 抗体を固相化し、上記ハイブリドーマの培養上清を反応させ、更に溶液状態の CDT や CDT 以外のトランスフェリンを反応後、抗トランスフェリン抗体で検出するサンドイッチ E LISA でなされ、CD

50

T以外のトランスフェリンには反応せず、CDTのみに強く反応するものを選択する。最終的には限界希釈法にてクローニングを施し、目的とするハイブリドーマを得る。モノクローナル抗体は、得られたハイブリドーマから既知技術である培養系またはマウス腹腔内で作製し、前記抗血清の場合と同様に、アフィニティークロマトやイオン交換クロマト法等の既知技術により精製することができる。

【0028】

本発明はまた、体液に、前記した本発明の抗体を接触させ、該抗体に選択的に反応するCDTを検出、又は定量化することを特徴とする免疫測定方法である。例えば、体液に、抗CDT抗体と抗トランスフェリン抗体を接触させ、CDTを検出または、定量化する方法である。本発明のCDTを検出又は、定量化する方法において、体液に、認識部位の異なる複数の抗CDT抗体を接触させ、検体中に含まれるCDTを検出または、定量化してもよい。10

【0029】

本発明の免疫測定法に用いるのに適した抗CDT抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよく、抗血清またはその精製分画、あるいは既知のイソタイプまたはサブクラスでもよい。更には、必要に応じて抗原と結合できる抗体フラグメントであってもよい。即ち、抗体に関する唯一の条件は、それが少なくともアルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定されるCDTに対して選択的に反応し得ることである。

【0030】

本発明の免疫測定方法に適用可能な方法には、不均一系測定方法としては、放射性同位体元素標識免疫測定法、酵素標識免疫測定法、蛍光標識免疫測定法等が挙げられる。均一系としては蛍光消光法、蛍光増強法、エネルギーransfer法、凝集法、比濁法等が挙げられる。本発明の免疫測定方法は如何なる反応形式で行われてもよく、均一系でも不均一系でも何れであってもよい。これらの免疫測定法は用手法あるいは自動化されてもよい。20

【0031】

前記免疫測定方法において、放射性同位体元素標識免疫測定法、酵素標識免疫測定法、蛍光標識免疫測定法に用いられる試薬の一つは、体液中のCDTの検出または定量化を可能にするために、標識される必要があるが、それらの標識物質については公知のものを使用してもよく、例えば、以下のものが挙げられる。

【0032】

- 1) 酵素：アルカリリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等
 - 2) 蛍光体：フルオレセインイソシアネート、ローダミン、テキサスレッド等
 - 3) 放射性同位体元素：I¹²⁵、I¹³¹等
 - 4) 生物発光体：ルシフェリン、エクオリン等
 - 5) 化学発光体：イソルミノール、アクリジニウムエステル、オキサレートエステル等
- 所望の試薬へのこれらの標識体の結合は、公知の技術を用いて行うことができる。30

【0033】

前記免疫測定方法において、不均一系測定方法である放射性同位体元素標識免疫測定法、酵素標識免疫測定法、蛍光標識免疫測定法、ならびに均一系の中で担体を必要とする凝集法等に用いられる試薬の一つは、抗体を固相化する必要がある。抗体の固相化に用いる担体の材質及び形状は、測定用途によって公知のものから選択できる。例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリルアミド、ガラス、アガロース、ニトロセルロース等が挙げられる。形状としては、マイクロタイタープレート、バイアル、ラテックスビーズ、ディップストリップ等が挙げられる。40

【0034】

本発明の免疫測定方法の対象となる体液は、血清、血漿、唾液またはその他の体液であ50

ってもよいが、血清であることが好ましい。

【発明の効果】

【0035】

本発明によれば、未変性で天然のCDTに選択的に反応し、グリコシダーゼ消化トランスフェリンに反応しない又は実質的に反応しない抗CDT抗体を提供できるので、体液、特に、アルコール中毒患者から得られた、未変性で天然のCDTが含まれる体液に対して、簡単な手法で、精度よく検出又は定量することが可能となる。該抗体を用いることにより、体液を変性処理する必要がなく直接CDT濃度を測定することができる。

【実施例】

【0036】

以下に、本発明を実施例及び添付した図を参照して詳述する。

【0037】

[実施例1]：未変性で天然のCDT分画の調製

CDT高値ヒト血清10mlに鉄飽和溶液(0.5M NaHCO₃, 250μlと10mM FeCl₃, 180μl)を加え、4℃で一時間インキュベート後、脱脂溶液(100g/l デキストラン硫酸 100μlと1M CaCl₂, 500μl)を加えた溶液の上清を回収した。さらにブルーセファロースカラム(Blue Sepharose 6 Fast Flow:商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いてアルブミンを除去し、次いで、Protein Gカラム(Hi Trap Protein G HP:商品名:GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いてグロブリンを除去することにより、トランスフェリン以外のタンパク質を除去した後、陰イオン交換カラム(MonoQ HR 5/5:商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いて未変性のジシアロトランスフェリンとアシアロトランスフェリンを含むCDT分画を調製した。

【0038】

図1は陰イオン交換クロマトグラフィーによるCDT分画溶出プロファイルを示すグラフである。図1における矢印Aは波長280の吸光度曲線を示す。矢印Bは波長460の吸光度曲線を示す。図1の溶出プロファイルに示した各分画のSDS-PAGE(NuPAGE gel:商品名、インビトロジエン株式会社製)及び等電点電気泳動についての銀染色とウエスタンプロットの写真を図2に示す。図2に示すようにトランスフェリンの糖鎖の量に応じた5種のアイソフォームとしてテトラシアロ、トリシアロ、ジシアロ、モノシアロおよびアシアロトランスフェリンを未変性で高純度に調製することができたことがわかる。

【0039】

[実施例2]：変性条件下におけるグリコシダーゼ消化トランスフェリンの調製

ヒトトランスフェリン(PENTEX HUMAN TRANSFERRIN:商品名、MILES DIAGNOSTICS社製)20mgを10%ドデシル硫酸ナトリウム(略語:SDS)10μlと10mMリン酸緩衝食塩液(pH7.2)(略語:PBS)90μlを加え、37℃で1時間変性させた。この溶液に10%Tween20(TweenはICI Chemicals & Polymers社の登録商標、和光純薬工業株式会社製、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)を50μlと0.1M EDTA 10μlとPBS 900μlと10単位のグリコシダーゼ(N-グリコシダーゼF、リコンビナント:商品名、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製)を加えて37℃で24時間反応させた。反応後の溶液はトリクロロ酢酸とアセトンを用いたタンパク質の沈殿を行い、SDSを除去した後、レクチン(CoNA)アフィニティーコロマトカラム(CoNA-Agarose:商品名、株式会社ホーネンコーポレーション製)を通過させることにより、グリコシダーゼで未消化のトランスフェリンを吸着除去し、且つグリコシダーゼ消化トランスフェリン粗分画を得る。次いで、該分画に対して陰イオン交換カラム(MonoQ HR 5/5:商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いたクロマトグラフィーを実施することにより純度が高められたグリコシダーゼ消化トランスフェリンを調製した。

【0040】

10

20

30

40

50

また、グリコシダーゼを添加しない以外は同様にして対照となる変性トランスフェリンを調製した。

【0041】

図3はレクチン(ConA)アフィニティークロマトグラフィーにおけるグリコシダーゼ消化トランスフェリンの溶出プロファイルを示すグラフである。続いて実施した陰イオン交換カラム(MonoQ HR 5/5:商品名、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を用いたクロマトグラフィーで分離したプロファイルのグラフを図4に示す。得られた分画のSDS-PAGE及び等電点電気泳動の写真を図5に示す。図5に示したようにグリコシダーゼ消化によりトランスフェリンの糖鎖が除去されていることがわかる。

10

【0042】

[実施例3]:ハイブリドーマの調製

前記実施例1で得られたジシアロトランスフェリンとアシアロトランスフェリンを含む分画をCDT抗原として用いた。該抗原を濃度0.5mg/mlの抗原溶液に調製した。該抗原溶液500μlにアジュバンド500μl(TiterMax Gold:商品名、TiterMax Co.製)を混和して乳化させ、5週令のBALB/cマウスの皮下に免疫した。追加免疫として同様に調製したもの2週おきに3回繰り返した。その間免疫時に採血をして抗原に対する血中の抗体活性を測定した。最終免疫から14日後に100μlの抗原溶液を腹腔内に投与し、3日後、脾臓を摘出した。脾細胞はマウスミエローマ細胞(P3×63Ag8.653)とポリエチレングリコール4000(商品名、メルク社製)の存在下で2分間反応させることにより融合させた。融合後、HAT選択培地に懸濁して96ウェルの培養プレートに分注し、37°C CO₂インキュベーターで培養し、ハイブリドーマを調製した。また、比較のために前記実施例2で調製したグリコシダーゼ消化トランスフェリンを免疫抗原として用い、前記と同様にハイブリドーマを調製した。

20

【0043】

[実施例4]:CDT分画に対する抗体産生ハイブリドーマの選抜

前記実施例3で得られた各ハイブリドーマについて、本発明の抗体産生ハイブリドーマの選抜はサンドイッチELISAにより行った。96ウェルのマイクロプレートにPBSで10μg/mlに調製した抗マウス抗体を1ウェル当たりそれぞれ50μl加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、0.5%BSA-PBSでブロッキングを行いスクリーニング用のプレートとした。ハイブリドーマの増殖の認められたウェルの培養上清50μlをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液(0.05%Tween-PBS)で洗浄後、前記実施例1に記載したCDT分画を室温で1時間反応させ、同様に洗浄後、アルカリリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体50μlを加え、室温で1時間反応させた。なお、該アルカリリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体は、抗トランスフェリンポリクローナル抗体(株式会社シバヤギ製)にアルカリリフォスファターゼ(ロシュ社製)を過ヨウ素酸法で結合させることにより調製したものを使用した。再び洗浄後、アルカリリフォスファターゼ活性をKind-Kind法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定し、該CDT分画に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマNC DT 503を選抜した。比較のために実施したグリコーゼ消化トランスフェリンを免疫原として得られたハイブリドーマの中からモノクローナル抗体産生ハイブリドーマTFNG405を選抜した。

30

【0044】

[実施例5]:CDT分画に対する抗体産生ハイブリドーマのクローニング

前記実施例4で選抜した各ハイブリドーマを限界希釈法により、クローニングを二回実施し、樹立株を各々得た。得られたハイブリドーマNC DT 503は特許生物寄託センター(IPOD)に寄託した(受領日:平成18年3月14日、受領番号:FERM AP-20844)。比較のためにグリコシダーゼ消化トランスフェリンを免疫抗原として用

40

50

いて調製し、前記実施例 4 で選抜したハイブリドーマ T F N G 4 0 5 についても、同様にして樹立株を得た。

【 0 0 4 5 】

[実施例 6] : 抗体の調製

前記実施例 5 で得られた各樹立株について、 C D T 分画に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、モノクローナル抗体の大量産生のためマウス腹腔内にて増殖させた。こうして得られた各マウス腹水中のモノクローナル抗体は、プロテイン G カラム (G E 社製) を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。

【 0 0 4 6 】

[実施例 7] : 抗体のサブクラスの決定

前記実施例 6 で得られた各モノクローナル抗 C D T 抗体のサブクラスは I s o s t r i p (登録商標、ロシュ社製) を使用して決定した。

【 0 0 4 7 】

各抗体のサブクラスを下記の表 1 に示す。

【 0 0 4 8 】

【 表 1 】

| ハイブリドーマ (抗体) 番号 | サブクラス | 免 疫 抗 原 |
|--------------------|-----------------|--------------------------|
| N C D T 5 0 3 | I g G 1 (κ) | 未変性の天然 CDT 分画 |
| T F N G 4 0 5 | I g G 2 a (κ) | N - グリコシダーゼ F 消化トランスフェリン |

【 0 0 4 9 】

[実施例 8] : サンドイッチ E L I S A を用いた抗体の特異性の確認

前記実施例 6 で調製した各モノクローナル抗体 (ハイブリドーマ N C D T 5 0 3 產生抗体、ハイブリドーマ T F N G 4 0 5 產生抗体) についてサンドイッチ E L I S A を用いて、前記実施例 1 で調製したトランスフェリンアイソフォームに対する特異性の確認を行った。 9 6 ウェルのマイクロプレートに P B S で 1 0 μ g / m l に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 5 0 μ l 加え、 4 ℃ で一昼夜反応させた。その後 P B S で 1 回洗浄し、 0 . 5 % B S A - P B S でプロッキングを行った。その後、前記実施例 1 で調製したトランスフェリンアイソフォーム 5 0 μ l をウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液 (0 . 0 5 % T w e e n - P B S) で洗浄後、アルカリリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体 (前記実施例 4 で調製したものと同じ) 5 0 μ l を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリリフォスファターゼ活性を K i n d - K i n g 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 4 9 0 n m の吸光度を測定し、トランスフェリンアイソフォームに対する反応の強さを比較することで各抗体の特異性を確認した。その結果を下記の表 2 に示す。

【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

【表2】

| ハイブリドーマ (抗体)番号 | 490 nmのOD(吸光度) | | | |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---|
| | シアロ トランスフェリン (200 ng/ml) | ジシアロ トランスフェリン (200 ng/ml) | テトラシアロ トランスフェリン (200 ng/ml) | N-グリコシダ ーゼF消化トラン スフェリン (200 ng/ml) |
| NCDT503 | 2.124 | 1.946 | 0.034 | 0.052 |
| TFNG405 | 1.279 | 1.093 | 0.088 | 1.751 |

10

【0051】

表2に示すように本発明のモノクローナル抗体(ハイブリドーマNCDT503產生抗体)は溶液中の天然のCDT分画(シアロトランスフェリンとジシアロトランスフェリン)に対して特異的に反応したが、CDT以外のトランスフェリンであるテトラシアロトランスフェリンと人工的に作製したCDTであるグリコシダーゼF消化トランスフェリンに対して反応しなかった。一方、N-グリコシダーゼF消化トランスフェリンを免疫して得られた比較のためのハイブリドーマTFNG405產生抗体は、表2に示すように天然のCDT分画(シアロトランスフェリンとジシアロトランスフェリン)と人工的に作製したCDT(グリコシダーゼF消化トランスフェリン)の両方に反応した。

20

【0052】

[実施例9]：ウエスタンプロットを用いた抗体の特異性の確認

前記実施例6で調製したモノクローナル抗体(ハイブリドーマNCDT503產生抗体)について、ウエスタンプロットを用いて、前記実施例1で調製したトランスフェリンアイソフォームに対する特異性の確認を行った。等電点電気泳動用ゲル(Novex IEFゲル：商品名、インビトロジェン株式会社製、pH3-7)にCDT分画およびCDT以外のトランスフェリンを1レーンあたり各5 μgになるように専用のサンプルバッファーで希釈後に添加し、専用の泳動バッファーで泳動後、専用のバッファーでPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜はロックエース(商品名、大日本製薬株式会社製)でブロッキング後、PBSで10 μg/mlに調製した抗体と室温で1時間反応させた。さらにPBSで3回洗浄後、アルカリフィオスファターゼ標識抗マウスIgG抗体(Goat F(ab')Anti-Mouse Ig's, Alkaline Phosphatase Conjugate AMI4405:商品名、BIOSOURCE社製)と室温で1時間反応させた。再び洗浄後、BCIP/NBT試薬(商品名、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社製)で発色させた。その結果をウエスタンプロット法による抗体の特異性(トランスフェリンアイソフォームに対する反応の強さ)を示す写真として図6に示す。

30

【0053】

図6に示したように本発明のモノクローナル抗体(ハイブリドーマNCDT503產生抗体)はウエスタンプロットにおいて天然のCDT分画(シアロトランスフェリンとジシアロトランスフェリン)と特異的に反応したことがわかる。

40

【0054】

[実施例10]：抗トランスフェリンポリクローナル抗体と組み合わせたサンドイッチELISAを用いた相関性試験

前記実施例6で調製したモノクローナル抗体(ハイブリドーマNCDT503產生抗体)を用い、サンドイッチELISA法で、健常者とアルコール中毒患者の血清合計32検体を測定した。対照試験としてバイオラッド社製の試薬を用いて測定した。該対照試験は、カラムを用いたトランスフェリン中の%CDTを測定する方法であり、カラムでの分離前の総トランスフェリンの量と、分離後のCDTの量を測定し、検体中のCDT濃度と%CDT(総トランスフェリンに対するCDTの割合)を算出した。

【0055】

50

前記サンドイッチ E L I S A による測定は 96 ウェルのマイクロプレートに P B S で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 50 μl 加え、4 度で一昼夜反応させた。その後 P B S で 1 回洗浄し、0.5% B S A - P B S でブロッキングを行った。その後、健常者とアルコール中毒患者の各血清 50 μl をウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液 (0.05% Tween - P B S) で洗浄後、アルカリフェヌルオキシダーゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体（前記実施例 4 で調製したものと同じ）50 μl を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフェヌルオキシダーゼ活性を Kind - King 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定し、対照試験測定値との相関性を確認した。その結果を図 7 に示す。

【0056】

図 7 に示したように未変性で天然の C D T 分画を免疫原にして得られた本発明の抗体は対照試験 C D T 濃度と良好な相関を示した。一方、比較のために用いたグリコシダーゼ消化トランスフェリンを免疫原にして得られたモノクローナル抗体（ハイブリドーマ T F N G 405 產生抗体）は対照試験 C D T 濃度と良い相関を示さなかった。したがって、本発明のハイブリドーマ N C D T 503 產生抗体は、検体中の C D T 濃度に応じて吸光度が相関しているので、吸光度の値を測定することにより、検体中の C D T 濃度を定量することができる。

【0057】

[実施例 11] : 抗体の抗原認識部位の確認

前記実施例 6 で調製したモノクローナル抗体（ハイブリドーマ N C D T 503 產生抗体）の反応性を次のようにして調べた。下記の P 1 - P 6 に示す 6 種類のアミノ酸配列のペプチドを E L I S A プレートに結合させた後、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した抗体を 1 ウェル当たりそれぞれ 50 μl 加え、室温で 1 時間反応させた。引き続き洗浄液 (0.05% Tween - P B S) で洗浄後、アルカリフェヌルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体（Goat F(ab') Anti-Mouse Ig's, Alkaline Phosphatase Conjugate AMI4405: 商品名、BIOSOU RCE 社製）50 μl を加え、室温で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフェヌルオキシダーゼ活性を Kind - King 法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定した。

【0058】

P 1 - P 6 のペプチド配列において下線部は、特許文献 3 又は特許文献 4 の抗体認識部位を示す。その結果を下記の表 3 に示す。

| | | |
|-----|-----------------------------------|----------|
| P 1 | V L A E N Y N K S D N C E | (配列番号 1) |
| P 2 | Q H L F G S N V T D C S G | (配列番号 2) |
| P 3 | V V A R S M G G K E D L I W E L L | (配列番号 3) |
| P 4 | I A K I M N G E A D A M S L | (配列番号 4) |
| P 5 | Y E K Y L G E E Y V K A V | (配列番号 5) |
| P 6 | S K L S M G S G L N L S E P N | (配列番号 6) |

【0059】

【表 3】

| ハイブリドーマ (抗体) 番号 | 490 nm の O D (吸光度) | | | | | |
|--------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | P 1 | P 2 | P 3 | P 4 | P 5 | P 6 |
| N C D T 503 | 0.024 | 0.027 | 0.027 | 0.017 | 0.020 | 0.019 |

【0060】

表 3 によれば、モノクローナル抗体（ハイブリドーマ N C D T 503 產生抗体）は、P 1 - P 6 (特許文献 3 又は特許文献 4 の抗体の認識部位を含むペプチド) に対して認識し

ないことがわかる。

【0061】

次に前記実施例6で調製した抗体の抗原認識部位を調べるために、最初に抗原タンパク質の一次構造への反応性について次のようにして確認した。即ち、CDT抗原をELISAプレート（イモビライザーアミノ：商品名、ヌンク社製）に共有結合させた後、4M尿素による変性、0.1MDTTで還元処理を行ったウェルに10μg/mlに調製した抗体を1ウェル当たりそれぞれ50μl加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄液（0.05%Tween-PBS）で洗浄後、アルカリリフォスファターゼ標識抗トランスフェリンポリクローナル抗体（前記実施例4で調製したものと同じ）50μlを加え、室温で1時間反応させた。再び洗浄後、アルカリリフォスファターゼ活性をKing-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定し、タンパク質の一次構造を認識するかを確認した。その結果を下記の表4に示す。

【0062】

【表4】

| ハイブリドーマ (抗体)番号 | 490nmのOD(吸光度) | |
|-------------------|---------------|------------------|
| | 未処理 CDT抗原 | 尿素・還元処理 CDT抗原 |
| NCDT503 | 3.484 | 0.038 |
| TFNG405 | 3.988 | 2.241 |

【0063】

表4に示すように本発明の抗体（ハイブリドーマNCDT503産生抗体）は、グリコシダーゼ消化トランスフェリンを免疫して得られた抗体（ハイブリドーマTFNG405産生抗体）が認識するCDT抗原を変性・還元処理した一次構造に対して反応しないことがわかる。また、本発明の抗体はCDT抗原の一次構造を認識しておらず、立体構造を認識していることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0064】

本発明の抗CDT抗体は、体液を変性処理することなく直接CDT濃度を測定する方法に用いることができる。

【0065】

本発明の抗CDT抗体は、天然のCDTと選択的に結合し、既存の方法で測定したCDT濃度と相関性が高いアルコール中毒患者を同定するための簡便な免疫測定法に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるCDT分画溶出プロファイルを示すグラフである。

【図2】図1の溶出プロファイルに示した各分画のSDS-PAGE及び等電点電気泳動の写真を示す。

【図3】レクチン（ConA）アフィニティーカラムクロマトグラフィーにおけるN-グリコシダーゼF消化トランスフェリンの溶出プロファイルを示すグラフである。

【図4】レクチン（ConA）アフィニティーカラムクロマトグラフィー後の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで分離したプロファイルを示すグラフである。

【図5】図4で得られた分画のSDS-PAGE及び等電点電気泳動を示す写真である。

【図6】ウエスタンプロット法による抗体の特異性（トランスフェリンアイソフォームに

10

20

30

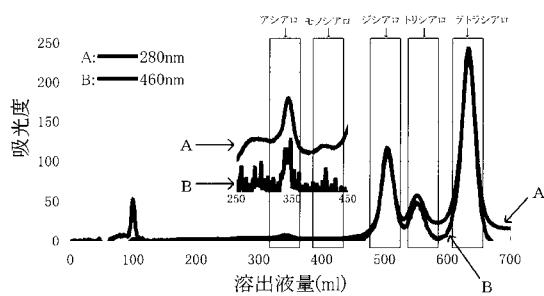
40

50

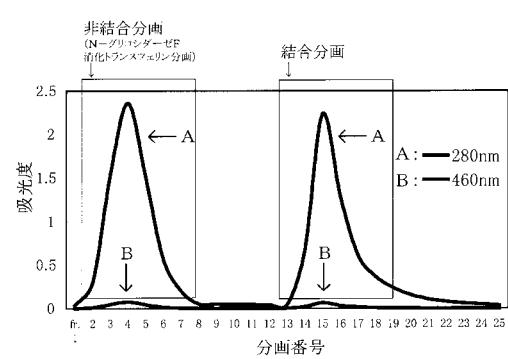
に対する反応の強さ)を示す写真である。

【図7】抗トランスフェリンポリクローナル抗体と組み合わせたサンドイッチELISAによる相関性試験を示すグラフである。

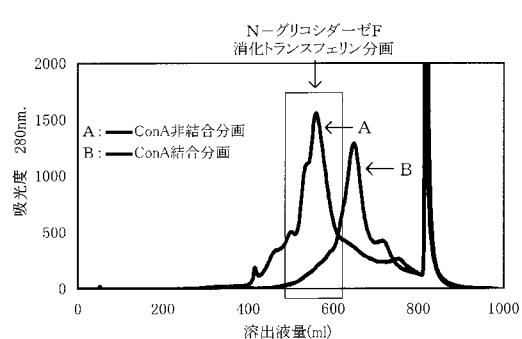
【図1】



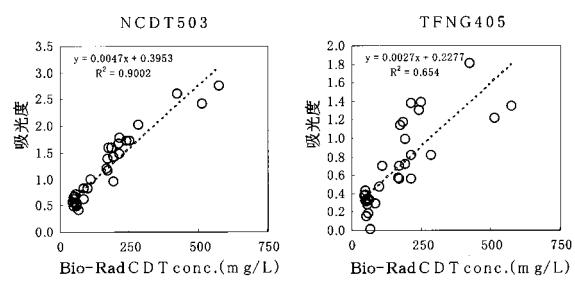
【図3】



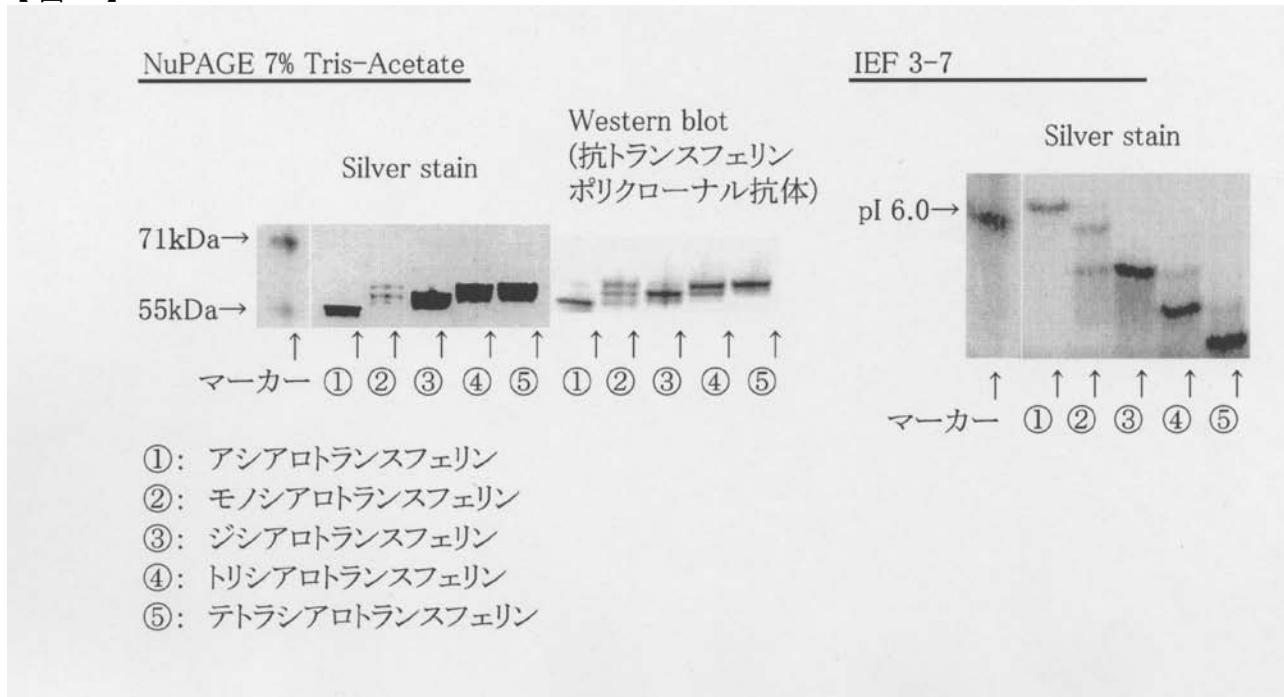
【図4】



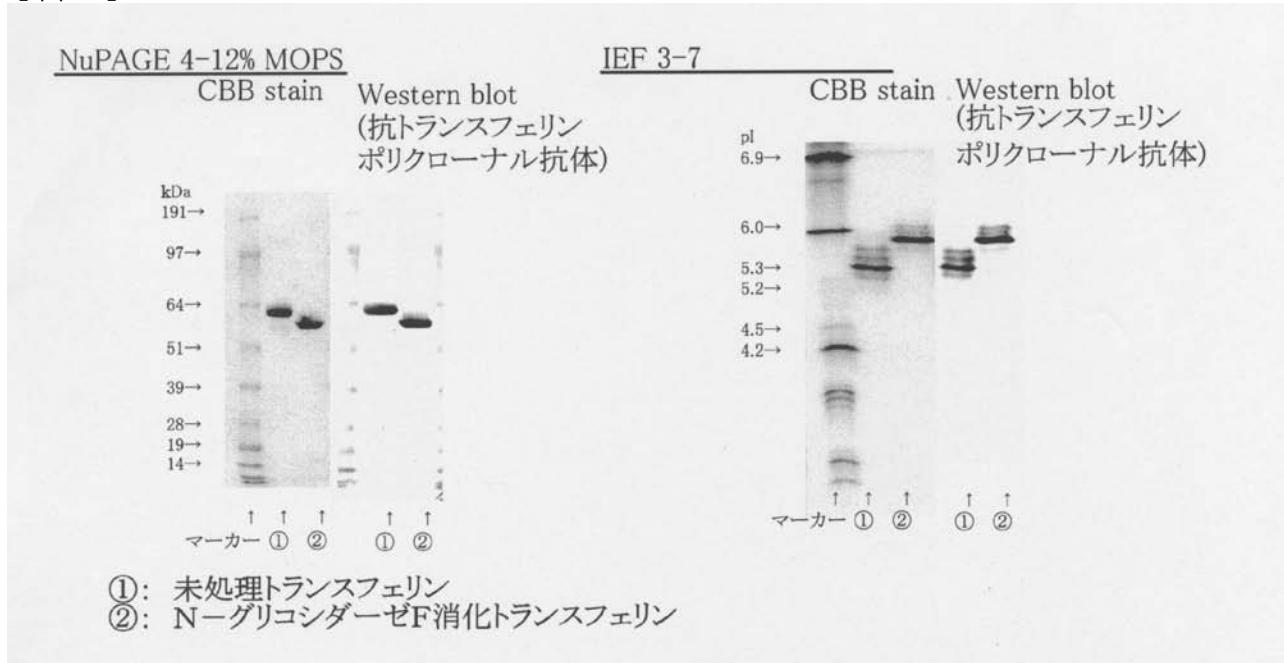
【図7】



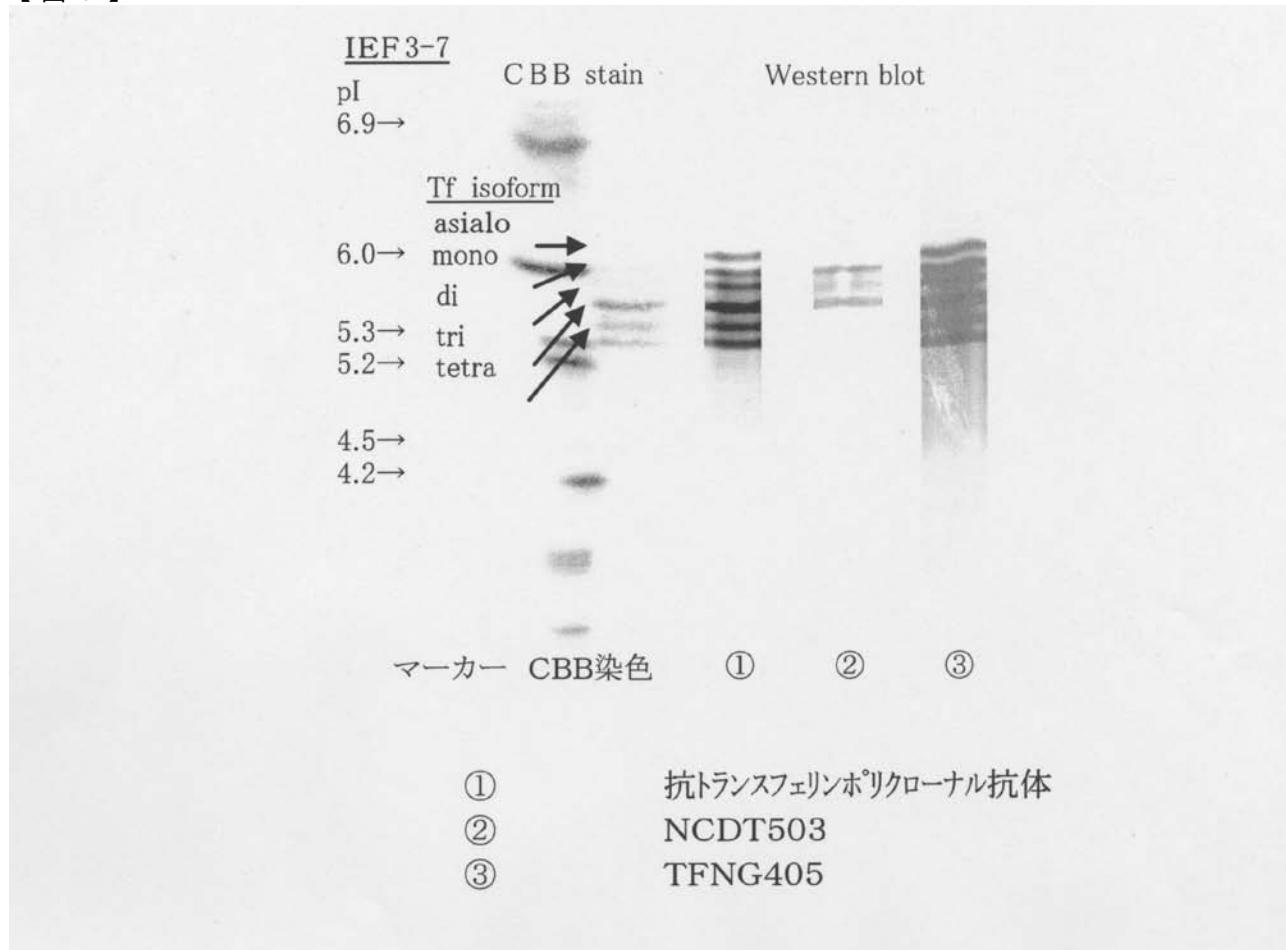
【図2】



【図5】



【図6】



【配列表】

2007254428000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年4月20日(2006.4.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

特に好ましいモノクローナル抗体は、特許生物寄託センター(IPOD)に寄託したハイブリドーマNCDT503(受託番号:FERMP-20844)から產生される抗体である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

[実施例5]: CDT分画に対する抗体產生ハイブリドーマのクローニング

前記実施例4で選抜した各ハイブリドーマを限界希釀法により、クローニングを二回実施し、樹立株を各々得た。得られたハイブリドーマNCDT503は特許生物寄託センター(IPOD)に寄託した(受託日:平成18年3月14日、受託番号:FERMP-20844)。比較のためにグリコシダーゼ消化トランスフェリンを免疫抗原として用い

て調製し、前記実施例4で選抜したハイブリドーマＴＦＮＧ４０５についても、同様にして樹立株を得た。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|----------------|------------|
| G 0 1 N 33/577 (2006.01) | G 0 1 N 33/577 | B |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | A |

| | | | |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 天然未修饰的cdt抗体，抗体的生产方法，杂交瘤和免疫测定方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2007254428A | 公开(公告)日 | 2007-10-04 |
| 申请号 | JP2006084304 | 申请日 | 2006-03-25 |
| 申请(专利权)人(译) | 日水制药有限公司 | | |
| [标]发明人 | 猪井俊敬 | | |
| 发明人 | 猪井 俊敬 | | |
| IPC分类号 | C07K16/18 C07K14/79 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577 C12N15/09 | | |
| F1分类号 | C07K16/18.ZNA C07K14/79 C12N5/00.B C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.A C12N5/00.102 C12N5/12 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/HA01 4B024 /HA14 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供能够鉴定酒精依赖性患者的抗体，产生抗体的方法，产生抗体的杂交瘤和使用该抗体的简单免疫测定方法。

ŽSOLUTION：抗体可以选择性地与未修饰的天然碳水化合物缺乏的转铁蛋白（CDT）反应。CDT浓度可以通过使用抗体直接测定，而不进行体液的变性处理。 Ž

| | | |
|---------|----------|---------------------|
| ハイブリーダー | サブクラス | 免疫抗原 |
| (抗体)番号 | | |
| NCDT503 | IgG1(κ) | 未変性の天然CDT分画 |
| TFNG405 | IgG2a(κ) | N-グリコシダーゼF消化トランスフェル |