

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5941615号
(P5941615)

(45) 発行日 平成28年6月29日(2016.6.29)

(24) 登録日 平成28年5月27日(2016.5.27)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	Z N A D	
CO 7 K 14/475	(2006.01)	CO 7 K	14/475		
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K	16/18		
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	

請求項の数 15 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2010-500582 (P2010-500582)	(73) 特許権者	000003159
(86) (22) 出願日	平成21年10月29日(2009.10.29)		東レ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/068587		東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02010/050554	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成22年5月6日(2010.5.6)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成24年10月15日(2012.10.15)	(74) 代理人	100118773
審査番号	不服2015-3837 (P2015-3837/J1)		弁理士 藤田 節
審査請求日	平成27年2月27日(2015.2.27)	(74) 代理人	100180954
(31) 優先権主張番号	特願2008-281908 (P2008-281908)		弁理士 漆山 誠一
(32) 優先日	平成20年10月31日(2008.10.31)	(72) 発明者	金森 智子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2009-39411 (P2009-39411)	(72) 発明者	鄭 基晩
(32) 優先日	平成21年2月23日(2009.2.23)		神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトCXCL1タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列である配列番号1~3で示されるアミノ酸配列のいずれか1つの配列領域を特異的に認識し、かつそれぞれ異なる配列領域を特異的に認識する2種類以上の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1又はその断片を測定することを特徴とする、ヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【請求項2】

配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1タンパク質又はその断片を測定することを特徴とする、請求項1に記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【請求項3】

配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片及び配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1タンパク質又はその断片を測定することを特徴とする、請求項1又は2に記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【請求項4】

配列番号2で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクロー

ーナル抗体又はその断片及び配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1タンパク質又はその断片を測定することを特徴とする、請求項1又は2に記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【請求項5】

前記試料が術後採取組織、血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、リンパ液、涙液又は精液である、請求項1～4のいずれかに記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【請求項6】

配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識し、
軽鎖において、

CDR1が配列番号4で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR2が配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR3が配列番号6で示されるアミノ酸配列を含み、

重鎖において、

CDR1が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR2が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR3が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、

抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項7】

軽鎖可変領域に配列番号10で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む、請求項6に記載の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項8】

配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識し、
軽鎖において、

CDR1が配列番号12で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR2が配列番号13で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR3が配列番号14で示されるアミノ酸配列を含み、

重鎖において、

CDR1が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR2が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR3が配列番号17で示されるアミノ酸配列を含む、

抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項9】

軽鎖可変領域に配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号19で示されるアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項10】

配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識し、
軽鎖において、

CDR1が配列番号20で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR2が配列番号21で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR3が配列番号22で示されるアミノ酸配列を含み、

重鎖において、

CDR1が配列番号23で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR2が配列番号24で示されるアミノ酸配列を含み、及び

CDR3が配列番号25で示されるアミノ酸配列を含む、

抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項11】

10

20

30

40

50

軽鎖可変領域に配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号 27 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の抗ヒト CXCL1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 12】

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識し、軽鎖において、

CDR1 が配列番号 28 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR2 が配列番号 29 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR3 が配列番号 30 で示されるアミノ酸配列を含み、

重鎖において、

CDR1 が配列番号 31 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR2 が配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR3 が配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を含む、

抗ヒト CXCL1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 13】

軽鎖可変領域に配列番号 34 で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号 35 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の抗ヒト CXCL1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 14】

配列番号 3 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識し、軽鎖において、

CDR1 が配列番号 36 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR2 が配列番号 37 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR3 が配列番号 38 で示されるアミノ酸配列を含み、

重鎖において、

CDR1 が配列番号 39 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR2 が配列番号 40 で示されるアミノ酸配列を含み、及び
CDR3、が配列番号 41 で示されるアミノ酸配列を含む、

抗ヒト CXCL1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 15】

軽鎖可変領域に配列番号 42 で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号 43 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の抗ヒト CXCL1 モノクローナル抗体又はその断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト CXCL1 タンパク質（以下、ヒト CXCL1 とする）を測定する方法に関する。より詳細には、ヒト CXCL1 を測定する方法であって、ヒト CXCL1 を構成するアミノ酸配列上の特定の 3 箇所の部分配列領域のいずれかに特異的に結合するモノクローナル抗体又はその断片を組み合わせた免疫学的測定方法に関する。また、本発明は前述のヒト CXCL1 タンパク質を測定する方法に用いることができる、ヒト CXCL1 に特異的に結合するモノクローナル抗体又はその断片にも関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト CXCL1 は、CXCL ファミリーに属するケモカインの一種である。このタンパク質は、血中では血小板に存在しており、他の CXCL ファミリーと同様に炎症反応時に過剰発現することが知られている。

【0003】

近年、このヒト CXCL1 が腫瘍関連因子として機能することが報告された。それ故、尿中から定量的に検出することにより尿路上皮癌のマーカーとなり得ることが期待されて

10

20

30

40

50

いる（非特許文献1、特許文献1）。さらに、ヒトCXCL1は、大腸癌や、卵巣癌、悪性黒色腫などその他の悪性腫瘍患者の組織や血中において、遺伝子レベル、タンパク質レベルで変動することが報告されており（非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4）、尿路上皮癌のみならず、これらの癌を極早期及び/又は早期に検出し得る潜在性を秘めている。

【0004】

ところが、既存の酵素免疫学的測定法を用いた測定法では、前記癌を検出するには必要な感度が不足している。例えば、特許文献1に記載のR&D SYSTEMS社（以下R&D SYSTEMS社）製のヒトCXCL1測定用キットは、その検出限界濃度が20pg/mL前後であるのに対し、健常人尿中のヒトCXCL1濃度はその検出限界に満たない。よって、より高感度なヒトCXCL1の測定法が望まれていた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】WO2007/026895

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Hiroaki Kawanishi et al, 2008, Clinical Cancer Research, vol. 14, No. 9, 2579 - 2587

20

【非特許文献2】Gong Yang et al, 2006, PNAS, vol 103巻, No. 44号, 16472 - 16477

【非特許文献3】Yu Wen et al, 2006, Clinical Cancer Research, vol. 12巻, No. 20, 5951 - 5959

【非特許文献4】Jing Luan et al, 1997, Journal of Leukocyte Biology, vol. 62, No. 5, 588 - 597

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで本発明の一の態様では、ヒトCXCL1をより高感度に検出する免疫学的測定法の提供を目的とする。より具体的には、ヒトCXCL1を構成するアミノ酸配列のうち、特定の3箇所の配列のいずれかに特異的に結合する抗体又は抗原認識部分を組み合わせた免疫学的測定法により、ヒトCXCL1をより高感度に検出する方法を実現することを目的とする。

30

【0008】

また、本発明のもう一つの態様は、ヒトCXCL1を特異的に認識するモノクローナル抗体又はその断片の提供も目的とする。より具体的には、前述のヒトCXCL1をより高感度に検出する方法に用いることが可能な、ヒトCXCL1を特異的に認識する新規なアミノ酸配列を含み、かつ従来の抗体より高親和性のモノクローナル抗体又はその断片の提供も目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ヒトCXCL1を構成するアミノ酸配列のうち、特定の3箇所の部分配列領域に特異的に結合するモノクローナル抗体又は抗原認識部分を組み合わせて免疫学的に測定することにより、従来よりも高感度にヒトCXCL1を検出できることを見出した。また、前述のヒトCXCL1上の3箇所の部分配列に特異的に結合する新規なアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体と、該抗体を産生するハイブリドーマの作製に成功した。さらに、該抗体を構成するアミノ酸配列をコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。これにより、組換え抗体とその組換え断片の作製が可能となった。本願発明は、上記知見に基づいて成されたもので

50

あり、すなわち以下を提供することである。

【0010】

(1) ヒトCXCL1タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列である配列番号1~3で示されるアミノ酸配列のいずれか1つの配列領域を特異的に認識し、かつそれぞれ異なる配列領域を特異的に認識する2種類以上の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1又はその断片を測定することを特徴とする、ヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【0011】

(2) 配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1タンパク質又はその断片を測定することを特徴とする、(1)に記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

10

【0012】

(3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片及び配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1タンパク質又はその断片を測定することを特徴とする、(1)又は(2)に記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【0013】

(4) 配列番号2で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片及び配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中のヒトCXCL1タンパク質又はその断片を測定することを特徴とする、(1)又は(2)に記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

20

【0014】

(5) 前記試料が術後採取組織、血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、リンパ液、涙液又は精液である(1)~(4)のいずれかに記載のヒトCXCL1タンパク質の免疫学的測定方法。

【0015】

(6) 配列番号3で示されるヒトCXCL1タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体又はその断片であって、その軽鎖において、CDR1が配列番号4で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号6で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖において、CDR1が配列番号7で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号8で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

30

【0016】

(7) 軽鎖可変領域に配列番号10で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む、(6)に記載の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

40

【0017】

(8) 配列番号1で示されるヒトCXCL1タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体又はその断片であって、その軽鎖において、CDR1が配列番号12で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号13で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号14で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖において、CDR1が配列番号15で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号16で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号17で示されるアミノ酸配列を含む、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【0018】

(9) 軽鎖可変領域に配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配

50

列番号 19 で示されるアミノ酸配列を含む、(8) に記載の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【0019】

(10) 配列番号3で示されるヒトCXCL1タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体又はその断片であって、その軽鎖において、CDR1が配列番号20で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号21で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号22で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖において、CDR1が配列番号23で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号24で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号25で示されるアミノ酸配列を含む、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

10

【0020】

(11) 軽鎖可変領域に配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号27で示されるアミノ酸配列を含む、(10) に記載の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【0021】

(12) 配列番号2で示されるヒトCXCL1タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体又はその断片であって、その軽鎖において、CDR1が配列番号28で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号29で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号30で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖において、CDR1が配列番号31で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号32で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号33で示されるアミノ酸配列を含む、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

20

【0022】

(13) 軽鎖可変領域に配列番号34で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号35で示されるアミノ酸配列を含む、(12) に記載の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【0023】

(14) 配列番号3で示されるヒトCXCL1タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体又はその断片であって、その軽鎖において、CDR1が配列番号36で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号37で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号38で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖において、CDR1が配列番号39で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR2が配列番号40で示されるアミノ酸配列を含み、及びCDR3が配列番号41で示されるアミノ酸配列を含む、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

30

【0024】

(15) 軽鎖可変領域に配列番号42で示されるアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域に配列番号43で示されるアミノ酸配列を含む、(14) に記載の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片。

【発明の効果】

【0025】

本発明によれば、ヒトCXCL1の濃度を従来よりも高感度に測定することができる。また、ヒトCXCL1を特異的に認識する高親和性の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその断片を提供することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】配列番号1~3で示されるアミノ酸配列のいずれかを特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法と、市販キットを用いた従来法での免疫学的測定。

【図2】標識抗体として配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA。

50

【図3】配列番号1、又は2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体と、配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた尿中ヒトCXCL1を検出するサンドイッチELISA。

【図4】配列番号2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識する市販抗体を固相化し、ビオチン標識した配列番号3で示されるアミノ酸配列を認識する本発明の抗体、又は市販のビオチン標識抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により、緩衝液中のヒトCXCL1を検出したグラフ。

【図5】本発明の5種類の抗体(IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1)、及び市販抗体を固相化し、ビオチン標識抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により、緩衝液中のヒトCXCL1を検出したグラフ。

10

【図6】本発明の5種類の抗体及び市販抗体を固相化し、ビオチン標識抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により、血漿中のヒトCXCL1を検出したグラフ。

【図7】本発明の5種類の抗体及び市販抗体を固相化し、ビオチン標識抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により、尿中のヒトCXCL1を検出したグラフ。

【図8】本発明の5種類の抗体及び市販抗体の膀胱癌細胞浸潤抑制能を示したグラフ(1)。

【図9】本発明の4種類の抗体及び市販抗体の膀胱癌細胞浸潤抑制能を示したグラフ(2)。

20

【発明を実施するための形態】

【0027】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

【0028】

1. 抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体及びその断片

本明細書で使用する用語「ヒトCXCL1」とは、Genbank NM_001511に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質又はその天然変異体を意味する。ここでいう「天然変異体」とは、自然界に存在する変異体であって、例えば、前記アミノ酸配列において1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたもの、前記アミノ酸配列と95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するものなどをいう。ここで「同一性」とは、二つのアミノ酸配列にギャップを導入して、又は導入しないで最も高い一致度となるように整列(アラインメント)させたときに、前記ギャップの数を含めた、一方のアミノ酸配列の全アミノ酸残基数に対する他方のアミノ酸配列の同一アミノ酸残基数の割合(%)をいう。また、「数個」とは、2~10の整数、例えば、2~7、2~5、2~4、2~3の整数をいう。天然変異体の具体例としては、SNP(一塩基多型)等の多型に基づく変異体やプライス変異体などが挙げられる。前記置換は、保存的アミノ酸置換であることが好ましい。保存的アミノ酸置換であれば、前記アミノ酸配列を有するヒトCXCL1と実質的に同等な構造又は性質を有しうるからである。保存的アミノ酸とは、互いに、非極性アミノ酸(グリシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、トリプトファン)及び極性アミノ酸(非極性アミノ酸以外のアミノ酸)、荷電アミノ酸(酸性アミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸)及び塩基性アミノ酸(アルギニン、ヒスチジン、リジン))及び非荷電アミノ酸(荷電アミノ酸以外のアミノ酸)、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン)、分岐状アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、バリン)、ならびに脂肪族アミノ酸(グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン)などが知られている。

30

40

【0029】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」とは、免疫グロブリン若しくはその断片に由来するフレームワーク領域(FR: Framework region)及び相補性

50

決定領域 (CDR: Complementarity determining region) を含み、抗原に特異的に結合し、かつそれを認識することのできるポリペプチドをいう。したがって、本発明の「抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体」とは、ヒトCXCL1若しくはその断片に特異的に結合し、かつヒトCXCL1若しくはその断片を認識できるポリペプチドをいう。「特異的に結合」とは、標的抗原(本発明においてはヒトCXCL1若しくはその断片)のみと結合することを意味する。

【0030】

典型的な免疫グロブリン分子は、重鎖及び軽鎖と呼ばれる2本のポリペプチド鎖の組がジスルフィド結合によって2組相互接続された四量体として構成される。重鎖は、N末側の重鎖可変領域(V_H)とC末側の重鎖定常領域(C_H)からなり、軽鎖は、N末側の軽鎖可変領域(V_L)とC末側の軽鎖定常領域(C_L)からなる。このうち、 V_H 及び V_L は、抗体の結合特異性に関与する点で特に重要である。この V_H 及び V_L は、いずれも約110個のアミノ酸残基から成り、その内部に抗原との結合特異性に直接関与する3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2、CDR3)と、可変領域の骨格構造として機能する4つのフレームワーク領域(FR1、FR2、FR3、FR4)を有している。相補性決定領域は、抗原分子と相補的な立体構造を形成し、抗体の特異性を決定することで知られている(E. A. Kabat et al, 1991, Sequences of proteins of immunological interest, Vol. 1, eds. 5, NIH publication)。定常領域のアミノ酸配列が種内抗体間ではほとんど不変なのに対して、相補性決定領域のアミノ酸配列は各抗体間において変異性が高く、それ故、超可変領域(Hyper variable region)とも呼ばれている。可変領域において、前記相補性決定領域とフレームワーク領域は、アミノ末端からカルボキシ末端方向にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配列されている。 V_L 及び V_H は、免疫グロブリン分子内において、相対して二量体を形成することによって抗原結合部位を形成している。免疫グロブリンには、IgG、IgM、IgA、IgE、及びIgDの各クラスが知られているが、本発明の抗体は、いずれのクラスであっても良い。好ましくはIgGである。

【0031】

本発明において有用な抗体は、鳥及び哺乳動物を含めたあらゆる動物源由来とすることができる。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、ニワトリ、又はヒトなどが挙げられる。また、本発明の「モノクローナル抗体」は、化学的に、又は組換えDNA法を用いることによって合成したものであっても良い。例えば、キメラ抗体、及びヒト化抗体のような組換え抗体も本発明に含まれる。

【0032】

キメラ抗体とは、ある抗体の定常領域を他の抗体の定常領域で置換した抗体である。例えば、抗ヒトCXCL1マウスモノクローナル抗体において、その定常領域をヒト抗体の定常領域と置き換えた抗体が該当する。より具体的な例として、 V_L がそれぞれ配列番号10、18、26、34、又は42のいずれかで示される抗ヒトCXCL1マウスモノクローナル抗体の V_L におけるアミノ酸配列を含み、かつ C_L が任意のヒト抗体の C_L におけるアミノ酸配列を含み、及び/又は V_H がそれぞれ配列番号11、19、27、35、又は43のいずれかで示される抗ヒトCXCL1マウスモノクローナル抗体の V_H におけるアミノ酸配列を含み、かつ C_H が任意のヒト抗体の C_H におけるアミノ酸配列を含む抗体が挙げられる。

【0033】

ヒト化抗体とは、ある抗体(通常、非ヒト抗体、例えば、マウス抗体)由来のCDR群をヒト抗体のFR及び定常領域とを人為的に組合せたモザイク抗体である。例えば、抗ヒトCXCL1マウスモノクローナル抗体の各CDRと任意のヒト抗体の各FRと定常領域とを組合せた抗体が該当する。抗体の抗原結合特異性は、主として可変領域中のCDR群が担っていることから、前記ある抗体と同様の結合特性を有する組換え抗体を作製する際には、ある抗体の全アミノ酸配列を得る必要はない。すなわち、既存の組換えDNA技術

10

20

30

40

50

を用いて、ある抗体由来の各CDRをコードするDNA配列を、それぞれヒト抗体由来の対応するCDRをコードするDNA配列と置き換えたモザイク抗体を調製し、それを発現させることにより、ある抗体の性質を模倣する組換え抗体を得ることができる。このような技術は、CDRグラフト抗体と呼ばれている。Nature、1986、Vol.321、522。なお、本発明の抗ヒトCXCL1抗体又はその断片は、ヒトCXCL1又はその断片の検出に使用する場合には、必ずしもヒト化抗体である必要はなく、このグラフト抗体技術を用いて、FR及び定常領域がヒト以外の任意の動物の抗体由来のものとすることもできる。

【0034】

さらに、本発明において「抗体」は、多重特異性抗体であってもよい。多重特異性抗体とは、多価抗体、すなわち抗原結合部位を一分子内に複数有する抗体において、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する抗体をいう。例えば、IgGのように2つの抗原結合部位を有する抗体において、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する二重特異性抗体(Bispecific抗体)が挙げられる。本発明においては、この多重特異性抗体は、それぞれの抗原結合部位がヒトCXCL1上に存在する異なるエピトープと結合できることが好ましい。これらの抗体は、組換えDNA技術を用いて、公知方法によりIgG等を人工的に改変することにより得ることができる。

【0035】

本明細書で使用する場合、「モノクローナル抗体又はその断片」における「その断片」とは、前記抗体の部分領域であって、該抗体が有する抗原特異的結合活性と実質的に同等の活性を有するポリペプチド鎖又はその複合体をいう。例えば、前述の抗原結合部位を少なくとも1つ包含する抗体部分、すなわち、少なくとも1つのV_Lと少なくとも1つのV_Hを有するポリペプチド鎖又はその複合体が該当する。具体例としては、免疫グロブリンを様々なペプチダーゼで切断することによって生じる多数の十分に特徴付けられた抗体断片等が挙げられる。より具体的な例としては、Fab、F(ab')₂、Fab'等が挙げられる。Fabは、パパインによりIgG分子がヒンジ部のジスルフィド結合よりもN末端側で切断されることによって生じる断片であって、V_H及びC_Hを構成する3つのドメイン(C_H1、C_H2、C_H3)のうちV_Hに隣接するC_H1からなるポリペプチドと、軽鎖から構成される。F(ab')₂は、ペプシンによりIgG分子がヒンジ部のジスルフィド結合よりもC末端側で切断されることによって生じるFab'の二量体である。Fab'は、Fabよりもヒンジ部を含む分だけH鎖が若干長いが実質的にはFabと同等の構造を有する(Fundamental Immunology、Paul ed.、3rd ed.、1993)。Fab'は、F(ab')₂をマイルドな条件下で還元し、ヒンジ領域のジスルフィド連結を切断することによって得ることができる。これらの抗体断片は、いずれも抗原結合部位を包含しており、抗原(すなわち本発明においてはヒトCXCL1又はその断片)と特異的に結合する能力を有している。

【0036】

本発明の前記「その断片」は、化学的に、又は組換えDNA法を用いることによって合成したものであってもよい。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体断片が挙げられる。具体的には、限定はしないが、本発明の抗体の一以上のV_L及び一以上のV_Hを適当な長さ及び配列を有するリンカーペプチド等を介して人工的に連結させた一量体ポリペプチド分子、又はその多量体ポリペプチドが該当する。このようなポリペプチドの例としては、一本鎖Fv(single chain Fragment of variable region)(Pierce catalog and Handbook、1994-1995、Pierce Chemical co.、Rockford、IL参照)、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)又はテトラボディ(tetrabody)等の合成抗体等が挙げられる。免疫グロブリン分子において、V_L及びV_Hは、通常別々のポリペプチド鎖(軽鎖と重鎖)上に位置する。一本鎖Fvは、これらの可変領域を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖に包含した構造を有する合成抗体断片である。一本鎖Fv内

10

20

30

40

50

において両可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。一本鎖Fvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてファージゲノムに組み込み、発現させることで得ることができる。ダイアボディは、一本鎖Fvの二量体構造を基本とした構造を有する分子である(Holliger et al, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448)。例えば、前記リンカーの長さが約12アミノ酸残基よりも短い場合、一本鎖Fv内の2つの可変部位は自己集合できないが、ダイアボディを形成させることにより、すなわち、2つの一本鎖Fvを相互作用させることにより、一方のFv鎖のV_Lが他方のFv鎖のV_Hと集合可能となり、2つの機能的な抗原結合部位を形成することができる(Marvin et al, 2005, Acta Pharmacol. Sin., 26:649-658)。さらに、一本鎖FvのC末端にシステイン残基を付加させることにより、2本のFv鎖同士のジスルフィド結合が可能となり、安定的なダイアボディを形成させることもできる(Olafsen et al, 2004, Prot. Engr. Des. Sel., 17:21-27)。このようにダイアボディは二価の抗体断片であるが、それぞれの抗原結合部位は、同一エピトープと結合する必要はなく、それぞれが異なるエピトープを認識し、特異的に結合する二重特異性を有していても構わない。例えば、一方の抗原結合部位が、配列番号36、37、38で示されるアミノ酸配列を含むCDR(それぞれ、CDR1、CDR2、CDR3に相当)を含むV_Lと配列番号39、40、41で示されるアミノ酸配列を含むCDR(それぞれ、CDR1、CDR2、CDR3に相当)を含むV_Hからなり、他方の抗原結合部位が、配列番号28、29、30で示されるアミノ酸配列を含むCDR(それぞれ、CDR1、CDR2、CDR3に相当)を含むV_Lと配列番号31、32、33で示されるアミノ酸配列を含むCDR(それぞれ、CDR1、CDR2、CDR3に相当)を含むV_Hからなっているもよい。トリアボディ、及びテトラボディは、ダイアボディと同様に一本鎖Fv構造を基本としたその三量体、及び四量体構造を有する。それぞれ、三価、及び四価の抗体断片であり、多重特異性抗体であってもよい。

【0037】

さらに、前記「その断片」は、ファージディスプレイライブラリーを用いて同定された抗体断片(例えば、McCafferty et al., 1990, Nature, Vol. 348, 522-554参照)であって、かつ抗原結合能力を有しているものが含まれる。その他、例えば、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., 1998, W. H. Freeman & Co., New York, も参照されたい。

【0038】

本発明は、ヒトCXCL1に対する望ましい結合活性を備えた可変領域、及びそのCDRを構成するアミノ酸配列を有する抗体又はその断片を提供する。すなわち、本発明は、配列番号4~43のいずれかに示すアミノ酸配列を含む免疫グロブリン可変領域を含む抗体又はその断片を提供する。

【0039】

本発明の抗体又はその断片は、その軽鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号4、5、6で示されるアミノ酸配列を含み、その重鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号7、8、9で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0040】

また、本発明の抗体又はその断片において、V_LとV_Hが、それぞれ配列番号10、配列番号11で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0041】

本発明の抗体又はその断片は、その軽鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号12、13、14で示されるアミノ酸配列を含み、その重鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号15、16、17で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0042】

10

20

30

40

50

また、本発明の抗体又はその断片において、 V_L と V_H が、それぞれ配列番号18、配列番号19で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0043】

本発明の抗体又はその断片は、その軽鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号20、21、22で示されるアミノ酸配列を含み、その重鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号23、24、25で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0044】

また、本発明の抗体又はその断片において、 V_L と V_H が、それぞれ配列番号26、配列番号27で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0045】

本発明の抗体又はその断片は、その軽鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号28、29、30で示されるアミノ酸配列を含み、その重鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号31、32、33で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0046】

また、本発明の抗体又はその断片において、 V_L と V_H が、それぞれ配列番号34、配列番号35で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0047】

本発明の抗体又はその断片は、その軽鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号36、37、38で示されるアミノ酸配列を含み、その重鎖において、CDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号39、40、41で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

20

【0048】

また、本発明の抗体又はその断片において、 V_L と V_H が、それぞれ配列番号42、配列番号43で示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0049】

本発明の抗体又はその断片は、修飾することができる。ここでいう「修飾」は、本発明の抗体又はその断片がヒトCXCL1との特異的結合活性を有する上で必要な機能上の修飾（例えば、グリコシル化）、及び本発明の抗体又はその断片を検出する上で必要な標識のいずれをも含む。前記抗体標識には、例えば、蛍光色素（FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5）、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジン）による標識が挙げられる。また、本発明の抗体のグリコシル化は、標的抗原に対する抗体の親和性を調整するために改変されていてもよい。このような改変は、例えば、抗体配列内の一以上のグリコシル化部位を変更することで達成できる。より具体的に説明すると、例えば、FR内の一以上のグリコシル化部位を構成するアミノ酸配列に一以上のアミノ酸置換を導入して該グリコシル化部位を除去することにより、その部位のグリコシル化を喪失させることができる。このような脱グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させる上で有効である（米国特許第5714350号、及び同第6350861号）。

30

40

【0050】

本発明の測定方法で使用されるモノクローナル抗体又はその断片は、ヒトCXCL1又はその断片に対する特異的な結合活性を確実にするため、使用前に予め他の抗原（タンパク質又はその断片）との交差反応性を検証しておくことが好ましい。本発明の抗体又はその断片において、交差性を確認すべき抗原は、CXCFファミリーに属するタンパク質、特に、ヒトCXCL1と構造的に類似するヒトCXCL2タンパク質、ヒトCXCL3タンパク質が挙げられる。また、前記タンパク質以外にも、部分構造がヒトCXCL1と共通する他のタンパク質についても本発明の測定方法で使用される抗体又はその断片の交差反応性を確認しておくことがより好ましい。交差反応の確認には、ヒトCXCL1を抗原と

50

したELISA法を使うことが可能である。反応特異性を試験すべき抗体、すなわち、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体、及びその断片とヒトCXCL1との反応の場に、交差性を確認すべき他の抗原タンパク質を共存させれば、両者の競合状態を観察することによって交差性の確認を行うことができる。競合阻害の原理を利用したこのような交差性の確認方法は、すべての抗原について反応系を調製する必要がないのでスクリーニングを迅速に行うことができる。

【0051】

2. モノクローナル抗体及びハイブリドーマ作製方法

本発明の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体又はその抗体を産生するハイブリドーマは、以下に記載する方法によって作製することができる。ただし、本方法に限定されるものではなく、当該分野で公知の他のあらゆる方法で作製することもできる。

【0052】

A. 抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体作製方法

ヒトCXCL1を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1~3のいずれかのアミノ酸部分配列領域と特異的に結合する抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体を作製するには、ヒトCXCL1の全長を免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、その後、配列番号1~3のいずれかのアミノ酸部分配列領域と特異的に結合する抗体をスクリーニングする方法と、予め配列番号1、2、又は3で示されるヒトCXCL1の部分配列を免疫原としてモノクローナル抗体を作製する方法がある。

【0053】

A1. ヒトCXCL1の調製

まず、免疫原(抗原)として用いるヒトCXCL1を調製する。ヒトCXCL1は、天然型、組換え型、又はペプチド合成のようにアミノ酸配列の全部又は一部を化学的に合成したヒトCXCL1のいずれであってもよい。

【0054】

天然型ヒトCXCL1は、血液若しくは尿のようなヒト体液をはじめとするヒト試料、又はヒト培養細胞の培養上清から公知のタンパク質分離・精製技術、例えばゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーを用いて回収することができる。

【0055】

組換え型ヒトCXCL1は、該タンパク質をコードするDNAを導入した微生物、昆虫細胞、又は動物細胞で発現させた後、当該細胞から公知のタンパク質分離・精製技術を用いて回収することができる。

【0056】

合成ヒトCXCL1は、例えば、公開ヒトCXCL1アミノ酸配列情報を利用して、当該技術分野で公知の手法、例えば固相ペプチド合成法などにより合成することができる。なお、ヒトCXCL1のcDNA配列は、GenBankにおいてアクセッション番号X12510として公開されている。この合成ヒトCXCL1には、KLH(スカシ貝ヘモシアニン)、OVA(卵白アルブミン)、BSA(ウシ血清アルブミン)などのキャリアータンパク質に連結させて使用してもよい。

【0057】

また、最初から配列番号1~3で示されるヒトCXCL1の部分配列を免疫原とする場合も、免疫原は全長配列を免疫する場合と同様に、天然型であっても、組換え型であっても、又は化学的に合成したものであってもよい。

【0058】

例えば、天然型ヒトCXCL1の部分配列を免疫原として用いる場合は、まず、精製したヒトCXCL1をトリプシンなどの適切なプロテアーゼで処理した後、逆相カラムでピークを分離分取する。分取した各ピークに含まれるペプチドのアミノ酸配列を質量分析器により決定し、配列番号1、2、又は3で示される部分配列又はその一部であるピークを免疫原として用いることが出来る。

10

20

30

40

50

【0059】

また、組換え型ヒトCXCL1のアミノ酸部分配列を免疫原として用いる場合は、前述したヒトCXCL1をコードするDNA配列のうち、配列番号1～3で示されるアミノ酸部分配列、又はさらにその一部をコードするDNA配列部分を、全長ヒトCXCL1を複製する場合と同様に発現用ベクターに挿入し、各種細胞に導入することで、配列番号1～3で示されるアミノ酸部分配列、又はその一部の組換え型ヒトCXCL1を得ることが出来る。

【0060】

以下では、配列番号1～3で示される組換え型ヒトCXCL1のアミノ酸部分配列（以下、ヒトCXCL1部分配列という。）の調製について詳述する。

10

【0061】

(a) 組換え型ヒトCXCL1部分配列をコードするポリヌクレオチドの調製
本ポリヌクレオチドの調製方法については、下記実施例1において詳述しているため、ここでは省略する。

【0062】

ヒトCXCL1部分配列の発現に用いるベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドを使用することができる。例えば、プラスミドとしては、大腸菌由来のプラスミド(pET16b、pGEX6p、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等)、枯草菌由来のプラスミド(pUB110、pTP5等)、酵母由来のプラスミド(YEp13、YEp24、YCP50等)などが挙げられる。またファージとしては、ファージ(gt11、ZAP等)が挙げられる。さらに、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターも用いることができる。

20

【0063】

上記ベクターにヒトCXCL1部分配列をコードするポリヌクレオチドを挿入するには、例えば、精製した該ポリヌクレオチドを適当な制限酵素で切断し、適当な制限酵素で切断したベクター内部にDNAリガーゼ等を用いて連結する方法がある。

【0064】

(b) ヒトCXCL1部分配列発現ベクターの宿主内への導入
得られたヒトCXCL1部分配列発現ベクターを、ヒトCXCL1タンパク質を発現し得る宿主中に導入して、ヒトCXCL1部分配列発現形質転換体を得る。使用する宿主については、使用したベクターに適する宿主であって、ヒトCXCL1を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌(大腸菌(例えば、エシェリヒア・コリ: *Escherichia coli*)、枯草菌(例えば、バチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)等)、酵母、昆虫細胞、動物細胞(COS細胞、CHO細胞(*Journal of immunology*, 1998, Vol. 160, 3393-3402)などが好適に用いられる。細菌への前記ベクターの導入方法は、細菌に該ベクターを導入する公知の方法であれば特に限定されない。例えば、ヒートショック法、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。これらの技術は、いずれも当該分野で公知であり、様々な文献に記載されている。例えば、Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたい。また、動物細胞の形質転換には、リポフェクション法(PNAS, 1989, Vol. 86, 6077)、(PNAS, 1987, Vol. 84, 7413)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(*Virology*, 1973, Vol. 52, 456-467)、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

30

40

【0065】

細菌を宿主とする場合は、ヒトCXCL1部分配列発現ベクターが該細菌中で自律複製

50

可能であると同時に、プロモーター配列、リボゾーム結合配列、ヒトCXC L 1部分配列をコードするDNA配列、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する調節因子をコードする遺伝子が含まれていてもよい。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で機能できるものであればいずれを用いてもよい。

【0066】

酵母、動物細胞、昆虫細胞などの真核細胞を宿主とする場合にも、同様に当技術分野で公知の手法に従ってヒトCXC L 1部分配列発現形質転換体を得ることができる。真核細胞において用いられるヒトCXC L 1部分配列発現ベクターには、プロモーター配列、ヒトCXC L 1部分配列をコードするDNA配列のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル（ドナー部位、アクセプター部位、ブランチポイント等）、ポリA付加シグナル、選択マーカー配列、リボゾーム結合配列（SD配列）などが連結されていてもよい。

【0067】

（c）形質転換体の培養及び組換え型ヒトCXC L 1部分配列の発現

続いて、上記作製した形質転換体を培養する。形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。例えば、微生物を宿主とする場合、培地は、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、かつ生育、増殖可能なものであれば、特に限定はしない。天然培地、合成培地のいずれを用いることもできる。より具体的な例としては、LB培地が挙げられるが、もちろんこれに限定はされない。また、形質転換体の培養を選択的に行うために、必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。培養は、通常、通気攪拌培養などの好気的条件下、37℃で6～24時間行う。培養期間中、pHは中性付近に保持することが好ましい。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。形質転換体がCHO細胞等の動物細胞である場合には、Gibco社製DMEM培地に 1×10^5 細胞/mLとなるように宿主細胞を接種し、37℃の5%CO₂インキュベータにて培養すればよい。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0068】

前記ヒトCXC L 1部分配列発現ベクターがタンパク質発現制御システム（例えば、宿主が微生物の場合、リプレッサー遺伝子及びオペレーター等が該当する）を含むタンパク質発現誘導型ベクターである場合には、前記形質転換体に所定の処理を行い、ヒトCXC L 1部分配列の発現を誘導させる必要がある。発現誘導の方法は、ベクターに含まれるタンパク質発現制御システムによって異なるため、そのシステムに適した誘導処理を行えばよい。例えば、細菌を宿主とするタンパク質発現誘導型ベクターにおいて最も一般的に利用されているタンパク質発現制御システムは、lacリプレッサー遺伝子及びlacオペレーターからなるシステムである。本システムは、IPTG（isopropyl-1-thio-β-D-galactoside）処理により発現を誘導することが可能である。このシステムを含むヒトCXC L 1発現ベクターを有する形質転換体において、目的とするヒトCXC L 1を発現させるためには、培地中に適量（例えば、終濃度1mM）のIPTGを添加すればよい。

【0069】

（d）組換え型ヒトCXC L 1部分配列の抽出及び/又は回収

培養後、ヒトCXC L 1部分配列が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を回収して破碎することによりタンパク質を抽出することができる。また、ヒトCXC L 1部分配列が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去し、上清を使用すればよい。その後、一般的なタンパク質の精製方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で、又は適宜組合せて用いることにより、前記培養物中からヒトCXC L 1を単離精製することができる。ヒトCXC L 1部分配列が得られたか否かは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等

により確認すればよい。

【0070】

A2. 抗ヒトCXCL1部分配列抗体の産生細胞の作製

A1で得られた免疫原を、緩衝液に溶解して免疫原溶液を調製する。この際、免疫を効果的に行うために、必要であればアジュバントを添加してもよい。アジュバントの例としては、市販の完全フロイントアジュバント(FCA)、不完全フロイントアジュバント(FIA)等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いてもよい。

【0071】

次に、前記調製した免疫原溶液を哺乳動物、例えばラット、マウス(例えば近交系マウスのBALB/c)、ウサギなどに投与し、免疫する。免疫原の投与方法としては、例えば、FIA又はFCAを用いた皮下注射、FIAを用いた腹腔内注射、又は0.15mol/L塩化ナトリウムを用いた静脈注射が挙げられるが、この限りでない。免疫原の1回の投与量は、免疫動物の種類、投与経路などにより適宜決定されるものであるが、動物1匹当たり約30~200µgである。また、免疫の間隔は特に限定されず、初回免疫後、数日から数週間間隔で、好ましくは1~4週間間隔で、2~6回、好ましくは3~4回追加免疫を行う。初回免疫より後に、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法等により行い、抗体価がプラトーに達すれば、免疫原を静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。そして、最終免疫の日から2~5日後、好ましくは3日後に、抗体産生細胞を採取する。

【0072】

B. 抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ作製方法

B1. 免疫動物からの抗体産生細胞の回収と細胞融合

免疫動物から得た抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行うことで、抗ヒトCXCL1部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することができる。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。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、一般に入手可能なマウスなど由来の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育できる性質を有するものが好ましい。また、株化細胞は、免疫動物と同種系の動物に由来するものが好ましい。ミエローマ細胞の具体例としては、BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ(HGPRT)欠損細胞株である、P3X62-Ag.8株(ATCCTIB9)、P3X63-Ag.8.U1株(JCRB9085)、P3/NSI/1-Ag4-1株(JCRB0009)、P3x63Ag8.653株(JCRB0028)又はSp2/0-Ag14株(JCRB0029)などが挙げられる。

【0073】

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には、血清を含まないDMEM、RPMI1640培地などの動物細胞培養用培地中で、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを約1:1~20:1の割合で混合し、細胞融合促進剤の存在下にて融合反応を行う。細胞融合促進剤としては、平均分子量1,500~4,000Daのポリエチレングリコール等を約10~80%の濃度で使用することができる。また、場合によっては、融合効率を高めるためにジメチルスルホキシドなどの補助剤を併用してもよい。さらに、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(Nature、1977、Vol.266、550-552)。

【0074】

B2. 目的とするハイブリドーマの選抜

細胞融合処理後の細胞から目的とする抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選別する方法としては、細胞懸濁液を、例えば、ウシ胎児血清

10

20

30

40

50

含有RPMI 1640培地などで適当に希釈後、96ウェルマイクロタイタープレート上に 2×10^6 個/ウェル程度まき、各ウェ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。培養温度は $20 \sim 40$ 、好ましくは約 37 である。ミエローマ細胞がHGPRト欠損株又はチミジンキナーゼ(TK)欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選択培地(HAT培地)を用いることにより、抗体産生細胞とミエローマ細胞のハイブリドーマのみを選択的に生育、増殖させることができるため、選択培地で培養開始後約10日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして選択することができる。

【0075】

HAT培地で選択されたハイブリドーマは、まず、天然型又は組換え型ヒトCXCL1、又は配列番号1~3で示されるアミノ酸配列に対する結合活性を指標としてスクリーニングを行う。次いでヒトCXCL1への結合活性を持つ抗体を産生するハイブリドーマについては、交差性の試験を行う。すなわち、他のCXCFファミリー等への結合活性を検証し、許容できるものを選択する。許容できる交差性とは、目的とする抗体の用途において、無視しうる程度の交差性を意味する。たとえば、免疫学的な測定に用いるためのモノクローナル抗体であれば、最終的な測定系において交差反応によるシグナル強度が、バックグラウンドレベルから特異的反応によるシグナル強度の1%未満に抑えられれば、事実上交差反応しないといえることができる。

10

【0076】

ヒトCXCL1への反応性や、他のCXCFファミリーとの交差反応性を確認するには、例えば、ELISA法を利用することができる。ELISA法では、抗原となるヒトCXCL1又はその断片を固相化したマイクロプレートを用意し、これに前記ハイブリドーマの培養上清を適当に希釈した試料を加えて反応させる。十分に反応させた後にウェルを洗浄し、免疫グロブリンに対する2次抗体の標識体を加えて更に反応させる。再度ウェルを洗浄し、最終的にウェルに結合した2次抗体の標識体を利用して測定すれば、培養上清中に存在する抗体の、抗原に対する結合活性を定量的に知ることができる。

20

【0077】

B3. ハイブリドーマを用いた抗体産生

本発明におけるハイブリドーマは、マウスを用いて腹水化することにより抗体生産に用いることができる。具体的には、ハイブリドーマを作製する際に用いた融合パートナーに用いた細胞の由来のマウスや、ヌードマウスの腹腔内にハイブリドーマを接種し、腹水を適宜採取することにより、抗体を含む腹水液を回収することができる。より具体的には、Sp/0細胞を融合パートナーとしたハイブリドーマを、プリスタン接種後10日間を経たBALB/cマウスの腹腔中に接種することにより、抗体を含む腹水液を回収できる。

30

【0078】

また、本発明におけるハイブリドーマは、適した培地を用いて培養を行うことにより抗体生産に用いることができる。具体的には、Gibco社製のハイブリドーマSFM培地中に 1×10^5 細胞/mLとなるようにハイブリドーマを接種し、 37 の5%CO₂インキュベータにてハイブリドーマが死滅するまで培養することにより抗体を含む培養液上清を得ることが出来るが、この限りではない。

40

【0079】

3. 組換え抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体の作製方法

本発明の抗体又はその断片は、本発明で開示されたヒトCXCL1部分配列を特異的に認識するモノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードするcDNA配列を利用して、組換えDNA操作によって得ることもできる。

【0080】

例えば、B2.の手法で取得した抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来の該抗体の可変領域をコードするアミノ酸配列をコードするDNA配列を用いて、V_H及びV_Lの塩基配列を任意のC_L、及びC_Hをコードする塩基配列にそれぞれ連結し、それぞれのポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に

50

導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させることもできる。また、CDRグラフト抗体技術を用いて、B2.の手法で取得した可変領域内のCDRのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと、任意の免疫グロブリンの各FRをコードするポリヌクレオチドを連結して適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させてもよい。各ポリヌクレオチドは、化学的に合成することもできるし、長鎖DNAの合成法として知られている藤本らの手法（藤本英也、合成遺伝子の作製法、植物細胞工学シリーズ7 植物PCR実験プロトコール、1997、秀潤社、p95-100）を採用することもできる。また、本発明で開示したCDRはもともとマウスのイムノグロブリンに由来するので、連結するC_L、C_H、及びFR領域の配列はマウス由来が好適であるが、ヒトなど他の任意の動物由来であってもよい。このとき重鎖と軽鎖とが同一宿主細胞内で発現し、重鎖/軽鎖からなる2量体として産生できるようにすると便利である。具体的には、例えば、軽鎖発現ベクター及び重鎖発現ベクターにより細胞を共形質転換し、この形質転換細胞から本発明による抗体を得ることもできる。又は、上記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをそのまま適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、免疫グロブリン分子の断片として発現させることもできる。あるいは、上述したように、前記アミノ酸配列を含むV_L及びV_H、又は軽鎖及び重鎖をそれぞれコードするポリヌクレオチドを適当なリンカーで連結してファージに組み込んだ一本鎖Fvとして、又はダイアボディ等の合成抗体断片として発現させてもよい。その他、近年開発された、遺伝子工学技術を活用して組換え抗体をファージ表面に発現させるファージディスプレイ抗体技術（Brinkmann et al, 1995, J Immunol Methods, 182, 41-50、国際公開WO97/13844号、同90-02809号）により、人工的に重鎖、軽鎖をコードする遺伝子をシャッフリングさせ多様化した一本鎖Fv抗体をファージ融合タンパクとして発現させ、特異抗体を得ることもできる。

【0081】

組換え抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドの調製、該ポリヌクレオチドを組み込んだベクター、該ベクターの宿主導入法については、上記「A.ヒトCXCL1抗体作製方法」に記載したような当該分野で公知の組換えDNA技術を用いて行えばよい。目的とする組換え抗ヒトCXCL1抗体又はその断片は、形質転換細胞の培養液中又は当該細胞内から得ることができる。

【0082】

免疫グロブリン発現ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージミド、コスミド、ウイルスベクター（例えば、SV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV basedベクター）等を用いることができるが、これらに限定されない。例えば、BPV basedベクターの1種であるBCMGs Neoベクターは、COS7細胞などに形質転換することによって外来遺伝子を効率良く発現する望ましいベクターである（烏山「ウシパピローマウイルスベクター」、村松正実及び岡山博人編、実験医学別冊：遺伝子工学ハンドブック、1991、羊土社（日本）、297-299）。

【0083】

前記ベクターは、抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドの他に、前記抗体又はその断片を発現する上で必要な制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、ポリアデニル化部位、スプライシング部位）、又は、必要であれば選択マーカーを含むことができる。

【0084】

形質転換の宿主としては、上記「A.抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体作製方法」に記載した宿主の他、Sp2/0（マウスミエローム）細胞（European Journal of Cancer Research Preview (1996) Vol. 5, 512-519; Cancer Research (1990) Vol. 50, 1495-1502）が好適に用いられる。

【0085】

本発明における、抗体又はその断片を発現するベクターを含有する宿主細胞は、常法に従って培養を行うことにより、その培養液上清又は宿主細胞内に抗体を産生させることができる。具体的には、CHO細胞を宿主とした場合にはGibco社製DMEM培地に 1×10^5 細胞/mLとなるように宿主細胞を接種し、37°Cの5%CO₂インキュベータにて培養することにより抗体を含む培養液上清を得ることが出来る。また、例えば宿主細胞を大腸菌とした場合には、LB培地など大腸菌の培養に用いられる一般的な培地に接種して培養し、タンパク質の発現を誘導することにより、培養液上清又は宿主細胞内に抗体を産生させることができる。

【0086】

なお、発現産物である抗体又はその断片が定常領域を含む場合には、プロテインAカラム、プロテインGカラム、抗イムノグロブリン抗体アフィニティーカラム等を用いて培養液上清や、細胞破碎液から精製・回収することができる。一方、可変領域のみで構成され、定常領域を含まない状態で発現させた場合には、前記精製方法は適用できないので、他の適当な精製方法を応用する。例えば、そのC末端にヒスチジンタグなどの精製に有利なタグ配列を融合させた構造として発現させれば、対応するリガンドを利用したアフィニティークロマトグラフィーによって精製することが可能である。タグ融合タンパク質ではない場合は、硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーといったタンパク質精製の常法に従って精製することができる。

【0087】

4. 得られた抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体が認識するヒトCXCL1上のエピトープの確認

得られた抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体が認識するヒトCXCL1上のエピトープは、次のような方法によって確認することもできる。

【0088】

まず、還元アルキル化したヒトCXCL1と、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体を反応させて抗原抗体複合体を形成させた後、トリプシンなどの適切なプロテアーゼを用いて分解処理を行う。分解処理を受けても、抗体はトリプシン消化されにくいため、ProteinGセファロス等を用いて抗原抗体複合体を回収することができる。この際、抗原はプロテアーゼ処理により、抗体と結合して保護された部分以外は消化されているため、回収された抗原抗体複合体を、LC-MSにより分析することで、抗体と結合して保護された部分、すなわち抗体が認識するヒトCXCL1上のエピトープを同定することができる。

【0089】

また、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体が認識するヒトCXCL1上のエピトープは、例えば、合成ペプチドを用いた競合法によっても確認することが出来る。まず、ヒトCXCL1を構成するアミノ酸配列のうち4~8アミノ酸ずつの固相合成法等により合成ペプチドを調製する。前述のELISA法を利用したヒトCXCL1に対する結合性を確認する実験において、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体を固相ヒトCXCL1と反応させる際にこの合成ペプチドを作用させ、抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体の結合が阻害されることが確認されれば、当該合成ペプチドのアミノ酸配列が抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体の認識するエピトープであると判断できる。

【0090】

5. ヒトCXCL1検出方法

本発明では、このようにして得られたモノクローナル抗体、あるいはその断片を用いることにより、ヒトCXCL1の免疫学的測定方法を実現できる。本発明の測定方法はヒトCXCL1に対する特異性に優れ、ヒトCXCL1の理想的な免疫学的測定方法を提供することができる。

【0091】

本発明の測定方法で使用する「試料」とは、ヒトCXC L 1を含み得る様々な試料をいう。例えば、ヒトCXC L 1をコードするDNA又はその断片を含む培養細胞、培養細胞破砕液、培養液上清、あるいはヒト試料である。ヒト試料とは、ヒトから採取される組織（例えば、術後採取組織）や、血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、リンパ液、涙液、精液等の体液等のあらゆるヒト由来の生体試料であり、好ましくは血液、血清、血漿又は尿である。また、本発明における試料は、液体試料のみならず固体試料であっても良い。たとえば、組織切片標本等を用いることができる。組織切片標本に本発明のヒトCXC L 1測定方法を行えば、*in situ*でヒトCXC L 1の有無や局在を観察することができるので便利である。

【0092】

本発明においては、ヒトCXC L 1を構成するアミノ酸配列の部分配列である配列番号1～3で示されるアミノ酸配列のいずれか1つの配列領域を特異的に認識し、かつそれぞれ互いに異なる配列領域を特異的に認識する2種類以上の、好ましくは2種類の前述の抗ヒトCXC L 1部分配列モノクローナル抗体又はその断片を組み合わせて、より好ましくは配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗ヒトCXC L 1モノクローナル抗体を含む組み合わせで使用することを特徴としている。それぞれがヒトCXC L 1の異なるアミノ酸配列領域を認識する抗ヒトCXC L 1部分配列モノクローナル抗体又はその断片を組合せることで、ヒトCXC L 1の検出感度の向上に寄与する。

【0093】

本発明の免疫学的測定は、ELISA法、EIA法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は蛍光免疫測定法等の標識抗体を用いた公知の免疫学的測定法、あるいは、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、水晶振動子マイクロバランス測定法（QCM法）により実施することができるが、標識抗体を用いた免疫学的測定法において好ましく適用される。

【0094】

ELISA法は、酵素免疫吸着分析法とも呼ばれ、試料中に含まれる微量の標的抗原を、酵素標識した抗体又は抗原を用いて、当該酵素の作用を利用して抗原抗体反応を発色濃度や蛍光強度として検出し、標的抗原を定量する方法である。すなわち、本発明の抗体若しくはその断片、又はヒトCXC L 1若しくはその断片を固相担体に固定して、当該抗体等及びヒトCXC L 1等との免疫学的反応を酵素的に検出する方法である。直接法、間接法、サンドイッチ法等の方法があり、本発明はサンドイッチ法に適用される。ELISA法の測定方法については、公知の方法（日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 -」、臨床病理刊行会、1983年、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」、第3版、医学書院、1987年、北川常廣ら編「タンパク質核酸酵素別冊No. 31酵素免疫測定法」、共立出版、1987年、入江實編「ラジオイムノアッセイ」、講談社サイエンティフィック、1974年、入江實編「続ラジオイムノアッセイ」、講談社サイエンティフィック、1979年）を参照されたい。前記固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック又は試験片等の形状の不溶性担体を用いることができる。本発明の抗体若しくはその断片又はヒトCXC L 1若しくはその断片の固相担体への固定は、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用する方法等、公知の方法に従って結合させることにより達成できる。

【0095】

前記標識物質としては、例えばELISA法の場合には、ペルオキシダーゼ（POD）、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ又はピオチン - アビジン複合体等を、蛍光免疫測定法の場合には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジンイソチオシアネート、Alexa480又はAlexaFluor488等を、そして放射免疫測

10

20

30

40

50

定法の場合には、トリチウム、ヨウ素 125 又はヨウ素 131 等を用いることができるが、この限りでない。

【0096】

また、発光免疫測定法は、 NADH-FMNH_2 -ルシフェラーゼ系、ルミノール-過酸化水素-POD系、アクリジニウムエステル系又はジオキセタン化合物系等を用いることができる。標識抗原と抗体との結合法は、ELISA法の場合にはグルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を、放射免疫測定法の場合にはクロラミンT法、ボルトンハンター法等の公知の方法を用いることができる。

【0097】

さらに、本発明の免疫学的測定方法は、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応又は粒子凝集反応等の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施することもできる。その場合には、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

【0098】

本発明の免疫学的測定方法では、前述の抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体又はその断片の3種類の中から2種類を選択して使用することが好ましい。具体的方法について、配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いる場合を例に挙げて述べるが、本発明の実施の態様はこの限りでない。

【0099】

例えば、ELISA法のサンドイッチ法に適用する場合は、まず配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を不溶性の担体に固相化する。固相化する抗体は、配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するものであれば、1種類であっても数種類であっても良い。次に、抗体の固相化表面に、ヒトCXCL1を含む試料を作用させ、固相化抗体とヒトCXCL1の複合体を担体の表面に形成させる。その後、洗浄液を用いて十分に洗浄することで、試料中に存在するヒトCXCL1以外の未結合の物質が除去される。さらに、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体の標識体を作製し、該標識抗体を、固相化抗体とヒトCXCL1の複合体が結合した担体に作用させ、洗浄液を用いて十分に洗浄した後、標識を利用して検出することで試料中に存在したヒトCXCL1を検出することができる。この際、標識抗体は配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体であれば、1種類であっても数種類であってもよいが、2種類以上使用することが好ましく、2種類使用することがより好ましい。また、配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体の由来する動物種が異なる場合は、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を標識しなくても、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識する抗体を認識する標識二次抗体を使用して、検出することもできる。

【0100】

配列番号2で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた場合についても上記と同様である。また、固相化に用いた抗体と標識に用いた抗体は、それぞれ逆に、標識と固相化に用いることも可能である。

【0101】

また、先に標識抗体とヒトCXCL1を含む試料を混合して抗原抗体複合体を形成した後、固相化抗体に作用させることもできる。固相化する抗体をビオチン標識すれば、ビオチン化固相化抗体、ヒトCXCL1を含む試料、ビオチン以外の標識を施した抗体を全て混合して抗原抗体複合体を形成した後、アビジンを固相化した担体に作用させることで、

10

20

30

40

50

ビオチン化以外の標識を利用して抗原抗体複合体を検出することができる。

【0102】

さらに、本発明の免疫学的測定方法は、免疫クロマト用テストストリップを用いることもできる。免疫クロマト用テストストリップとは、例えば、試料を吸収しやすい材料からなる試料受容部、標識した本発明の診断薬を含有する試薬部、試料と診断薬との反応物が移動する展開部、展開してきた反応物を捕捉して呈色する提示部などから構成される。市販の妊娠診断薬等がこれと同様の形態を有する。本測定方法の原理は、以下の通りである。まず、試料受容部に試料を与えると、試料受容部は、試料を吸収して試料を試薬部にまで到達させる。続いて、試薬部において試料中のヒトCXCL1と標識した前述の抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体又はその断片が抗原抗体反応し、形成された反応複合体が展開部を移動して提示部に到達する。提示部では、上記反応複合体と標識されたモノクローナル抗体とは別のCXCL1部分配列を認識するもう1種類の抗ヒトCXCL1部分配列モノクローナル抗体との反応が生じて捕捉され、反応複合体の標識による呈色が認められることになる。上記免疫クロマト用テストストリップは、侵襲性がきわめて低く、使用者に対し苦痛や試薬使用による危険性を一切与えないものであるため、家庭におけるモニターに使用することができ、その結果を各医療機関レベルで精査・治療（外科的切除等）し、転移・再発予防に結びつけることが可能となる。また現在、このテストストリップは、例えば特開平10-54830号公報に記載されるような製造方法により安価に大量生産できるものである。

10

【0103】

配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いる場合を例に挙げて説明すると、まず、試料受容部にヒトCXCL1を含む試料を与えると、試料受容部は該試料を吸収して該試料を試薬部にまで到達させる。続いて、試薬部において、試料中の尿路上皮癌細胞由来のヒトCXCL1と標識された本発明の配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体との反応が起こり、反応した複合体が展開部を移動して提示部に到達する。提示部においては、上記反応複合体と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体との反応が起こって、呈色が認められることになる。

20

【0104】

また、本発明の測定方法は、表面プラズモン共鳴法（SPR法）を用いることもできる。表面プラズモン共鳴現象とは、金属薄膜に特定の入射角度（共鳴角）でレーザー光を照射すると反射光強度が著しく減衰する現象をいう。SPR現象の原理を利用したSPRセンサは、金属薄膜表面上の吸着物を高感度に測定することができる。したがって、該金属薄膜表面上に予め抗体及び/又は標的抗原を固定化しておき、その金属薄膜表面上に試料を通過させることにより、抗原抗体反応の結果生じた試料通過前後の金属表面上の吸着物の差を検出することができる。置換法、間接競合法等が知られるが、いずれを用いてもよい。本技術は、当該分野において周知である。例えば、永田和弘、及び半田宏、生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法、シュプリング・フェアラク東京、東京、2000を参照されたい。

30

40

【0105】

さらに、本発明の測定方法は、水晶振動子マイクロバランス測定法（QCM法）を用いることもできる。この方法は、水晶振動子に取り付けた電極表面に物質が吸着するとその質量に応じて水晶振動子の共振周波数が減少する現象を利用するものである。該方法を用いたQCMセンサは、水共振周波数の変化量によって極微量な吸着物を定量的に捕らえる質量測定センサである。本技術は、当該分野において周知である。例えば、J. Christopher Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, 2005, Self-Assembled Monolayers of a Form of Nanotechnology, Chemical Review, 105: 1103 - 1169; 森泉豊榮、中本高道

50

、1997、センサ工学、昭晃堂、等を参照されたい。

【0106】

6. ヒトCXCL1検出キット

また、本発明は、これら免疫学的な測定方法を実施するためのキットとして使用することができる。すなわち、本発明による抗体やその断片をはじめとして、標識二次抗体、さらには標識の検出に必要な基質、陽性対照や陰性対照、あるいは試料の希釈や洗浄に用いる緩衝液等を組合せてキットとすることができる。

【実施例】

【0107】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら制限されるものではない。

【0108】

(実施例1) 大腸菌による組換え型ヒトCXCL1の調製

(ヒトCXCL1遺伝子の調製)

抗体の免疫原として用いる組換え型ヒトCXCL1を調製するために、まず、HEK293細胞より、ヒトCXCL1 mRNAの調製を行った。mRNAの調製は、Qiasprep lysis reagent及びRNeasy mini kit (Qiagen社製)を使用し、詳細は付属のプロトコールに従った。

【0109】

次に、逆転写酵素Superscript II (Invitrogen社製)を用いて、得られたトータルmRNAを鋳型にcDNAを合成し、ヒトcDNAライブラリーを作製した。逆転写反応は、前記酵素に付属のプロトコールに従った。

【0110】

続いて、得られたヒトcDNAライブラリーを鋳型に、配列番号44及び45に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いてPCRを行った。配列番号44で示した塩基配列は、ヒトCXCL1遺伝子の5'末端領域の一部とその上流側にNde I認識配列を含む。配列番号45で示した塩基配列は、ヒトCXCL1遺伝子の3'末端領域の一部とその下流側にBamHI認識配列を含む。PCRの反応液は、DNAポリメラーゼにKOD (東洋紡社製)を用いて、cDNAライブラリー10ngと各プライマー10pmolを含むようにKODに添付のプロトコールに従い調製した。反応条件は、94の温度で10分間加熱した後、94で30秒間、55で30秒間、72で1分間保つサイクルを30回繰り返した後、最後に72で4分間保温する条件で行った。増幅したDNA断片は、Quantum prep PCR Kleen Spin Columns (Bio-rad社製)を用いて精製した。この反応により全長約300bpのPCR産物を得た。

【0111】

得られたDNA断片をHincII切断及びBAP処理した開環pUC118 (タカラバイオ社製)内に組み込むためライゲーション反応を行った。DNAリガーゼにはLigation High (東洋紡社製)を使用し、反応は付属のプロトコールに従った。続いて、ライゲーション反応後の溶液を用いて、コンピテント細胞の形質転換を行った。コンピテント細胞は、大腸菌株DH5 (タカラバイオ社製)を用い、詳細は付属のプロトコールに従って行った。形質転換処理後の菌は、抗生物質アンピシリンを100µg/mLを含有するLBプレート上に塗布し、37で一晩培養した。得られた形質転換体を100µg/mLアンピシリンを含有するLB液体培地で37にて一晩培養し、ミニプレップによって目的とするpUC118__CXCL1を得た。

【0112】

次に、pUC118__CXCL1を、制限酵素Nde I及びBamHIを用いて切断し、反応溶液のアガロース電気泳動を行った。泳動後、紫外線照射によって確認した約300bpの断片をゲルから切り出し、DNA断片の抽出を行った。抽出はPCR GFCX Column (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて行った。抽出したDNA

10

20

30

40

50

断片を、Nde I / BamHIによる切断処理した発現ベクターpET16b (Novagen社製) (約6 kb断片) 内に組み込むため、ライゲーション反応を行った。続いて、ライゲーション反応後の溶液を用いたDH5⁺の形質転換、形質転換体の培養、及びミニプレップを行い、目的とするpET16b__CXCL1を得た。それぞれの工程は前述の方法に従った。

【0113】

(組換え型ヒトCXCL1の調製)

組換え型ヒトCXCL1を調製するために、pET16b__CXCL1を用いて、大腸菌株Rosetta-Gami 2 (Novagen社製)の形質転換を行った。得られた形質転換体を、アンピシリン及びクロラムフェニコールを含むLB培地30 mLで37 °Cにて一晩前培養を行った。次に、3 Lの同培地に前培養を接種し、37 °Cにて3時間培養し、終濃度1 mMのIPTGを添加して32 °Cにて6時間培養を行い、目的の組換え型ヒトCXCL1の発現を誘導させた後、遠心分離により菌体を回収した。

10

【0114】

得られた菌体をPBSにて洗浄した後、B-PER (PIERCE社製)を用いて不溶性画分を沈殿として調製した。詳細は付属のプロトコールに従った。次に不溶性画分をInclusion body solubilization Reagent (PIERCE社製)にて可溶化した後、TALON Metal Affinity Resin (CLONTECH社製)を用いてヒスチジンタグ融合ヒトCXCL1を吸着させた。タンパク質の吸着したレジンを、10 mMイミダゾールを含むPBSにて洗浄した後、1 Mイミダゾール溶液を用いて溶出した。

20

【0115】

次に得られた溶出画分から、タンパク質のリフォールディングを行った。まず、6 M Ureaを加えたPBS溶液に一晩透析した後、透析液中のUreaの終濃度が1 MになるまでPBSを透析液に段階的に添加して、希釈した。最後に新たに調製したPBS溶液に一晩透析し、得られたリフォールディング溶液についてアクリルアミドゲル電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルー染色により分子量約10,000 Daのヒスチジンタグ融合ヒトCXCL1の精製を確認した。

【0116】

(実施例2) ヒトCXCL1に対するマウスモノクローナル抗体の作製と選抜

30

(抗ヒトCXCL1抗体産生マウスの作製)

実施例1で得られた100 µLの0.3 mg/mLヒトCXCL1溶液を100 µLのMPL+TDM Emulsion (Corixa社製)と混合し、全量を7週齢のBALB/cマウスに腹腔投与した。2週間後、及び4週間後に同様に調製したヒトCXCL1溶液を同量投与した。続いて、マウス尾部静脈より血液を100 µL採取し、一晩清置した後、5000 × gで5分遠心して上清を血漿として回収した。

【0117】

96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに100 µLの1 µg/mLヒトCXCL1溶液を入れ、一晩固相化した。ウェル中のタンパク質溶液を廃棄後、4倍に希釈したBlock Ace溶液(大日本住友製薬社製)を200 µL注ぎ、1時間室温で静置した。その後、PBS-Tで洗浄し、ヒトCXCL1固相化プレートとした。上記で得られた血漿を100倍希釈し、前記ヒトCXCL1固相化プレートのウェルに100 µL入れ、室温で1時間静置した。その後、ウェル中の溶液を廃棄し、PBS-Tで洗浄した後、HRP標識抗マウスIgG溶液(Dako社製)を100 µL入れ、さらに室温で1時間静置した。ウェル中の溶液を廃棄し、PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100 µLを入れて15分反応させた。反応によって生じる発色を450 nmの吸光度で確認し、発色した血液試料中において、ヒトCXCL1に対する抗体が産生されていると判断した。

40

【0118】

(抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体の作製)

50

ヒトCXC L 1に対する抗体の産生が確認されたマウスについて、上記と同様に調製したヒトCXC L 1溶液を腹腔投与し、3日後に脾臓の摘出を行った。摘出した脾臓にシリンジで穴を開け、RPMI 1640培地(GIBCO社製)を注入して脾臓細胞を押し出し、脾臓細胞液を得た。得られた脾臓細胞液を1200rpmで7分間遠心した後に上清を除去し、RPMI 1640培地にて洗浄した。再びRPMI 1640培地に懸濁して細胞数をカウントし、脾臓細胞数の1/10量のSP2/0ミエローマ細胞液を調製した。両細胞液を混合し、2200rpmで10分遠心し、上清を廃棄した。細胞をタッピングしてほぐし、PEG(ROCHE社製)とHBSS(GIBCO社製)を5:1で混合した溶液を1mL添加して攪拌した。以降の作業では、特に断りがない限り、溶液や培地は全て37℃で保温したものをを用いた。

10

【0119】

PEGとHBSSを加えた細胞溶液に、RPMI 1640培地9mLを5分かけて添加し、ゆっくり混合した後、2200rpmで10分遠心し、上清を除去した。得られた沈殿細胞を、15%FCSとHAT(ROCHE社製)を添加したRPMI 1640培地に懸濁し、96ウェル細胞培養プレート(グライナー社製)に1ウェルあたり200μL注ぎ、37℃、5%CO₂下で1週間培養した。

【0120】

HAT添加条件下で生育したコロニーを脾臓細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマと判断し、コロニーの生育しているウェルの上清を5倍希釈して、前記ヒトCXC L 1固相化プレートのウェルに100μL添加し、前記と同様の方法で抗体産生の有無を確認した。抗体の産生が確認できたウェルを陽性とした。陽性ウェルのコロニーを15%FCSとHT(invitrogen社製)を含むRPMI培地に懸濁し、限界希釈法によって陽性クローンのクローニングを行った。クローニングの結果得られたハイブリドーマ75種類について、SFM培地(GIBCO社製)に馴化し、抗体の産生を行った。100%SFM培地60mLにハイブリドーマを1×10⁵細胞/mLになるように接種し、細胞が死滅するまで10日間培養を行った後、培養液を3000rpm、15分間遠心分離し、細胞を除去した。得られた培養上清について、MabTrapKit(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて含まれている抗体を精製した。

20

【0121】

(抗ヒトCXC L 1モノクローナル抗体の選抜)

30

前記75種類の精製抗体について、次のような手法でヒトCXC L 1と親和性の高い抗体を選抜した。まず、それぞれの精製抗体について10μg/mL溶液を調製し、それぞれ100μLずつ96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに入れ、一晚固相化した。ウェル内の精製抗体溶液を廃棄後、4倍に希釈したBlock Ace溶液(大日本住友製薬社製)を200μL注ぎ、1時間、室温で静置した。その後、溶液を廃棄し、PBSTにて洗浄したものを精製抗体固相化プレートとした。次に、組換え型ヒトCXC L 1を1000pg/mLから15pg/mLまで段階希釈した抗原溶液を前記精製抗体固相化プレートの各ウェルに100μLずつ添加し、1時間、室温で反応させた。続いて、抗原溶液を廃棄してPBSTで洗浄した後、100μLの50μg/mLビオチン標識抗ヒトCXC L 1ポリクローナル抗体(R&DSYSTEMS社製)をウェルに入れ、1時間、室温で反応させた。ウェル内の溶液を廃棄してPBSTで洗浄後、100μLのavidin-HRP溶液(R&DSYSTEMS社製)を30分間室温で反応させた。さらに、avidin-HRP溶液を廃棄し、PBSTにて洗浄後、TMB溶液100μLを入れて15分反応させた。反応の停止は、100μLの2N硫酸溶液の添加によって行った。発色は、450nmの吸光度の測定により確認した。発色反応が強かったウェルの精製抗体をヒトCXC L 1との親和性が高い抗体と判断した。この結果、IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1の5種類の抗体を選抜した。

40

【0122】

(ハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖cDNA配列とアミノ酸

50

配列の決定)

選抜した5種類の抗体について、軽鎖及び重鎖のcDNA配列とアミノ酸配列を決定した。まず、それぞれの抗体を産生するハイブリドーマを、15%FCSを添加したRPMI 1640培地を用いて、37℃、5%CO₂下で1×10⁶細胞/mLになるまで培養した。その後、培養液を1200rpm、5分間遠心分離し、細胞を回収した。回収したハイブリドーマよりmRNAを調製した。調製は、Qiashredder及びRNeasy mini kit (Qiagen社製)を使用し、詳細は付属のプロトコールに従った。次に、逆転写酵素Superscript II (Invitrogen社製)を用いて、得られたTotal mRNAを鋳型にOligo dTプライマーを用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリーを作製した。

10

【0123】

次に、各ハイブリドーマごとに得られたcDNAライブラリーを鋳型に、Mouse Ig Primer (Novagen社製)を用いてPCRを行い、増幅産物(マウス免疫グロブリン可変領域cDNA)をInvitrogen社の提供するZERO BLUNT PCR TOPO VectorのEcoRIサイトに挿入してライゲーションを行った。ライゲーションはLigation High (東洋紡社製)を使用し、付属のプロトコールに従った。ライゲーション反応液を用いて、コンピテント細胞の形質転換を行った。コンピテント細胞は、DH5 (タカラバイオ社製)を用い、詳細は付属のプロトコールに従って行った。形質転換処理後の菌は、100µg/mLのアンピシリンを含有するLBプレートに塗布し、37℃で一晩培養した。各増幅産物由来の形質転換体を4クローンずつ100µg/mLのアンピシリンを含有するLB液体培地に接種し、37℃で一晩培養した。各培養液からミニプレップによってベクターDNA溶液を調製した結果、モノクローナル抗体をコードするDNAを組み込んだベクター溶液を各増幅産物につき4種類ずつ得た。

20

【0124】

得られたベクター溶液について、M13プライマーを用いて、モノクローナル抗体をコードする領域のDNA配列解析を行った。解析は、3130x1ジェネティックアナライザ(Applied Biosystems社製)を用いて行った。挿入領域に停止コドンのないクローンを目的のモノクローナル抗体をコードするDNA配列として判断し、前記5つの抗体(IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1)の軽鎖、重鎖のDNA配列を決定した。決定されたDNA配列について、大腸菌のコドン使用頻度にしたがってコードするアミノ酸配列を決定し、配列番号4~43に示す配列を得ることができた。

30

【0125】

配列番号36~43に示されるアミノ酸配列は、IgG1-1をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号36、37、38はそれぞれIgG1-1の軽鎖CDR1、CDR2、CDR3をコードする。また、配列番号39、40、41はそれぞれ、同じIgG1-1の重鎖CDR1、CDR2、CDR3をコードする。また、配列番号42、43はそれぞれIgG1-1の軽鎖可変領域全長、重鎖可変領域全長をコードする。

40

【0126】

配列番号28~35に示されるアミノ酸配列は、IgG1-3をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号28~33は、順にIgG1-3の軽鎖CDR1~3、重鎖CDR1~3をコードする。また、配列番号34、35はそれぞれIgG1-3の軽鎖可変領域全長、重鎖可変領域全長をコードする。

【0127】

配列番号4~11に示されるアミノ酸配列は、IgG1-10をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号4~9は、順にIgG1-10の軽鎖CDR1~3、重鎖CDR1~3をコードする。配列番号10、11はそれぞれIgG1-10の軽鎖可変領域全長、重鎖可変領域全長をコードする。

50

【0128】

配列番号20～27に示されるアミノ酸配列は、IgG1-14をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号20～25は、順にIgG1-14の軽鎖CDR1～3、重鎖CDR1～3をコードする。配列番号26、27はそれぞれIgG1-14の軽鎖可変領域全長、重鎖可変領域全長をコードする。

【0129】

配列番号12～19に示されるアミノ酸配列は、IgG2b-1をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号12～17は、順にIgG2b-1の軽鎖CDR1～3、重鎖CDR1～3をコードする。配列番号18、19はそれぞれIgG2b-1の軽鎖可変領域全長、重鎖可変領域全長をコードする。

10

【0130】

(実施例3) 選抜した抗体が認識するヒトCXCL1部分配列の解析

実施例2にて選抜した5つの抗体について、認識するヒトCXCL1アミノ酸配列上のエピトープの解析を行った。

【0131】

まず、1μg/μLヒトCXCL1溶液100μLに、終濃度が10mMになるようにDTTを添加し、95℃、5分間反応させてCXCL1内のジスルフィド結合の還元を行い、次に、終濃度20mMのヨードアセトアミドを添加し、37℃、遮光条件下にて30分間チオール基のアルキル化反応を行った。得られた還元アルキル化ヒトCXCL12μgに、実施例2にて選抜した抗体をそれぞれ20μg添加し、100mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)100μLにメスアップして攪拌混合しながら室温で1時間反応させた。

20

【0132】

次に、トリプシン(プロメガ社製)、アミノペプチダーゼM(ROCHE社製)、カルボキシペプチダーゼY(ROCHE社製)を、それぞれ終濃度0.2μg、0.5μU、0.02μgとなるように添加し、37℃で2時間以上反応させた後、予め1%BSA-PBSでブロッキングしPBSで洗浄しておいたProteinA-ガラスビーズ(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)とNP-40緩衝液(100mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)、5mM EDTA、150mM NaCl、1%NP-40)中で混合し、4℃で30分間反応させた。

30

【0133】

反応液を25mM炭酸アンモニウム緩衝液(pH8.0)で洗浄した後、0.1%ギ酸100μLを用いて抗原抗体複合体を溶出し、溶出液についてQ-TOF Premier(Waters-MicroMass社製)を用いてLC-MS解析を行った。解析は機器に付属のプロトコールに従った。

【0134】

その結果、実施例2で得られた各抗体が認識するヒトCXCL1部分配列が判明したので表1に示す。

【0135】

(参考例1) 市販抗体が認識するヒトCXCL1部分配列の解析

40

市販のヒトCXCL1検出キットであるHuman CXCL1/GROα DuoSet(R&DSYSTEMS社製)に固相化用抗体として添付されているモノクローナル抗体について、実施例3と同様に認識するヒトCXCL1アミノ酸配列上のエピトープの解析を行った。

【0136】

その結果、市販抗体が認識するヒトCXCL1部分配列が判明したので表1に示す。

【表 1】

抗体名	配列	配列番号
IgG1-1(実施例 3)	NGRKACLNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN	3
IgG1-3(実施例 3)	SPGPHCAQTEVIATLK	2
IgG1-10(実施例 3)	NGRKACLNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN	3
IgG1-14(実施例 3)	NGRKACLNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN	3
IgG2b-1(実施例 3)	RCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVK	1
市販抗体(参考例 1)	SPGPHCAQTEVIATLK	2

10

【0137】

(実施例 4) モノクローナル抗体 IgG2b-1 とモノクローナル抗体 IgG1-10 を用いたサンドイッチ ELISA 法によるヒト CXCL1 の検出

実施例 3 より、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体 IgG2b-1 と、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体 IgG1-10 のビオチン標識体を用いたサンドイッチ ELISA 法によるヒト CXCL1 の測定を行った。IgG1-10 のビオチン化は Sulfo-NHS Biotin (PIERCE 社製) を用いて行い、詳細は付属のプロトコールに従った。まず、IgG2b-1 の 10 µg/mL の PBS 溶液を調製した後、96 ウェルポリスチレンプレート (グライナー社製) のウェルに 100 µL ずつ入れ、一晚固相化した。翌日、前記溶液を廃棄し、1% BSA PBS 溶液 (SIGMA 社製) を 200 µL 注ぎ 1 時間室温で静置した。その後、PBS-T にて洗浄し、精製抗体固相化プレートとした。次に組換え型ヒト CXCL1 を 500 pg/mL ~ 7.8 pg/mL まで 1% BSA PBS を用いて段階希釈した抗原溶液を各ウェルに 100 µL ずつ添加し、1 時間室温で反応させた。次に、ウェル内の抗原溶液を廃棄して PBS-T にて洗浄した後、1% BSA-PBS を用いて希釈した 1 µg/mL ビオチン標識 IgG1-10 100 µL を 1 時間室温で反応させた。洗浄後、avidin-HRP 溶液 (R&D SYSTEMS 社製) 100 µL を 30 分間室温で反応させた。Avidin-HRP の希釈も 1% BSA-PBS を用いて行った。PBS-T にて洗浄後、TMB 溶液 100 µL を入れて 15 分反応させた後、2N 硫酸溶液 100 µL を添加して反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。結果を図 1 に示す。

20

30

【0138】

(実施例 5) モノクローナル抗体 IgG2b-1 とモノクローナル抗体 IgG1-14 を用いたサンドイッチ ELISA 法によるヒト CXCL1 の検出

実施例 3 より、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明したモノクローナル抗体 IgG2b-1 と、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明したモノクローナル抗体 IgG1-14 のビオチン標識体を用いたサンドイッチ ELISA 法によるヒト CXCL1 の測定を行った。IgG1-14 のビオチン化及びサンドイッチ ELISA については実施例 4 と同様に実施した。結果を図 1 に示す。

40

【0139】

(実施例 6) モノクローナル抗体 IgG1-3 とモノクローナル抗体 IgG1-14 を用いたサンドイッチ ELISA 法によるヒト CXCL1 の検出

実施例 3 より、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体 IgG1-3 と、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体 IgG1-14 のビオチン標識体を用いたサンドイッチ ELISA 法によるヒト CXCL1 の測定を行った。IgG1-14 のビオチン化及びサンドイッチ ELISA については実施例 4 と同様に実施した。結果を図 1 に示す。

【0140】

50

(比較例1) 市販キットを用いたサンドイッチELISA法によるヒトCXCL1検出

市販のヒトCXCL1検出キットであるHuman CXCL1/GRO alpha DuoSet (R&D SYSTEMS社製)を用いて組換え型ヒトCXCL1の測定を行った。当該キットは、抗ヒトCXCL1マウスモノクローナル抗体(配列番号2で示されるアミノ酸配列を認識する。)を固相化し、検出はビオチン化標識ヤギポリクローナル抗体を用いるものである。固相化は、グライナー社製の96ウェルポリスチレンプレートに行い、詳細な実験操作は付属のプロトコールに従った。結果を図1、図4及び図5に示す。

【0141】

実施例4~6、比較例1より、従来法の市販のヒトCXCL1検出キットに比較して、本発明の免疫学的測定法では7.8pg/mLのヒトCXCL1を検出することが可能になっており、測定感度が上昇していることが判明した。

【0142】

(実施例7) モノクローナル抗体IgG2b-1と、モノクローナル抗体IgG1-10及びIgG1-14の混合液を用いたサンドイッチELISA法によるヒトCXCL1の検出

実施例3より、配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体IgG2b-1と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体IgG1-10のビオチン標識体、又はIgG-10とIgG1-14をそれぞれビオチン標識したビオチン標識体の混合液を用いたサンドイッチELISA法によるヒトCXCL1の測定を行った。抗体のビオチン化及びサンドイッチELISAについては実施例4と同様に実施した。その結果を図2に示す。

【0143】

同じ配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を標識抗体として2種類用いることで、同じ濃度の1種類の抗体よりも各濃度におけるシグナルが上昇しており、同じ配列を認識する標識抗体を1種類用いるよりも2種類用いた方がヒトCXCL1の測定感度が上昇することが判明した。

【0144】

(実施例8) モノクローナル抗体IgG2b-1と、モノクローナル抗体IgG1-10又はIgG1-14を用いたサンドイッチELISA法による尿中に添加したヒトCXCL1の検出

実施例3より、配列番号1で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体IgG2b-1と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体IgG1-10のビオチン標識体、又はIgG1-14のビオチン標識体を用いたサンドイッチELISA法による尿中に添加したヒトCXCL1の測定を行った。IgG1-10及びIgG1-14のビオチン化はSulfo-NHS Biotin (PIERCE社製)を用いて行い、詳細は付属のプロトコールに従った。まず、IgG2b-1の10µg/mLのPBS溶液を調製した後、96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに100µLずつ入れ、一晚固相化した。翌日、前記溶液を廃棄し、1%BSA-PBS溶液(SIGMA社製)を200µL注ぎ1時間室温で静置した。その後、PBS-Tにて洗浄し、精製抗体固相化プレートとした。次に組換え型ヒトCXCL1を当日採取したヒト尿に250pg/mLとなるように添加し、3.9pg/mLまで同ヒト尿を用いて段階希釈した抗原添加尿を各ウェルに100µLずつ添加し、1時間室温で反応させた。次に、ウェル内の抗原溶液を廃棄してPBS-Tにて洗浄した後、1%BSA-PBSを用いて希釈した1µg/mLビオチン標識IgG1-10 100µLを1時間室温で反応させた。洗浄後、avidin-HRP溶液(R&D SYSTEMS社製)100µLを30分間室温で反応させた。Avidin-HRPの希釈も1%BSA-PBSを用いて行った。PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100µLを入れて15分反応させた後、2N硫酸溶液100µLを添加して反応を停止させ、4

10

20

30

40

50

50 nmの吸光度を測定した。結果を図3に示す。

【0145】

(実施例9) モノクローナル抗体IgG1-3とモノクローナル抗体IgG1-14を用いたサンドイッチELISA法による尿中に添加したヒトCXCL1の検出

実施例3より、配列番号2で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体IgG1-3と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体IgG1-14のビオチン標識体を用いたサンドイッチELISA法による尿中に添加したヒトCXCL1の測定を行った。抗体のビオチン化及びサンドイッチELISAについては実施例8と同様に実施した。結果を図3に示す。

【0146】

(比較例2) 市販キットを用いたサンドイッチELISA法による尿中ヒトCXCL1の検出

市販のヒトCXCL1検出キットであるHuman CXCL1/GRO alpha DuoSet (R&D SYSTEMS社製)を用いて尿中に添加した組換え型ヒトCXCL1の測定を行った。詳細な実験操作は付属のプロトコールに従い、ヒト尿に添加したCXCL1溶液は実施例8と同様に調製した。結果を図3に示す。

【0147】

実施例8~9、比較例2より、従来法の市販のヒトCXCL1検出キットに比較して、本発明の免疫学的測定法では尿中でも31.25 pg/mLのヒトCXCL1を検出することが可能になっており、測定感度が上昇していることが判明した。

【0148】

(実施例10) 市販キットモノクローナル抗体とモノクローナル抗体IgG1-10を用いたサンドイッチELISA法によるCXCL1の検出

実施例3において配列番号2で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した市販キットHuman CXCL1/GRO alpha DuoSet (R&D SYSTEMS社製) 付属のマウスモノクローナル抗体と、配列番号3で示されるアミノ酸配列領域を特異的に認識することが判明した抗体IgG1-10のビオチン標識体を用いて、サンドイッチELISA法による緩衝液に添加したヒトCXCL1の測定を行った。IgG1-10のビオチン化はSulfo-NHS Biotin (PIERCE社製)を用いて行い、詳細は付属のプロトコールに従った。まず、市販キット付属のマウスモノクローナル抗体の4 µg/mLのPBS溶液を調製した後、96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに100 µLずつ入れ、一晚固相化した。翌日、前記溶液を廃棄し、1%BSA-PBS溶液(SIGMA社製)を200 µL注ぎ1時間室温で静置した。その後、PBS-Tにて洗浄し、精製抗体固相化プレートとした。次に組換え型ヒトCXCL1を500 pg/mL~7.8 pg/mLまで1%BSA-PBSを用いて段階希釈した抗原溶液を各ウェルに100 µLずつ添加し、1時間室温で反応させた。次に、ウェル内の抗原溶液を廃棄してPBS-Tにて洗浄した後、1%BSA-PBSを用いて希釈した1 µg/mLビオチン標識IgG1-10 100 µLを1時間室温で反応させた。洗浄後、avidin-HRP溶液(R&D SYSTEMS社製) 100 µLを30分間室温で反応させた。Avidin-HRPの希釈も1%BSA-PBSを用いて行った。PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100 µLを入れて15分反応させた後、2N硫酸溶液100 µLを添加して反応を停止させ、450 nmの吸光度を測定した。結果を図4に示す。

【0149】

配列番号2を認識する抗体として市販キット付属のモノクローナル抗体を用いた場合でも、配列番号3を認識する抗体と組み合わせたサンドイッチELISA法においては、7.8 pg/mLのヒトCXCL1を検出することが可能であることが判明した。また、市販キット付属のモノクローナル抗体と配列番号3を認識する抗体とを組み合わせたサンドイッチELISA法では、市販キットで測定した場合(比較例1)よりも測定感度が上昇していることが判明した。

10

20

30

40

50

【0150】

(実施例11) 取得した抗体を用いたELISA法によるヒトCXCL1の検出

実施例2にて選抜した5種類の抗体IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1について、それぞれ10 μ g/mLのPBS溶液を調製した後、96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに100 μ Lずつ入れ、一晚固相化した。翌日、前記溶液を廃棄し、1%BSA-PBS溶液(SIGMA社製)を200 μ L注ぎ1時間室温で静置した。その後、PBS-Tにて洗浄し、精製抗体固相化プレートとした。次に組換え型ヒトCXCL1タンパク質を125pg/mLから15pg/mLまで1%BSA-PBSを用いて段階希釈した抗原溶液を各ウェルに100 μ Lずつ添加し、1時間室温で反応させた。次に、ウェル内の抗原溶液を廃棄してPBS-Tにて洗浄した後、1%BSA-PBSを用いて希釈した50ng/mLビオチン標識抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体(R&D SYSTEMS社製)100 μ Lを1時間室温で反応させた。洗浄後、avidin HRP溶液(R&D SYSTEMS社製)100 μ Lを30分間室温で反応させた。Avidin HRPの希釈も1%BSA-PBSを用いて行った。PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100 μ Lを入れて15分反応させた後、2N硫酸溶液100 μ Lを添加して反応を停止させ、450nmの吸光度を測定した。結果を図5に示す。

10

【0151】

実施例10、11、及び比較例1より本発明の抗体IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1は、いずれも市販抗体に比較してシグナルが強く、ヒトCXCL1の検出能が高いことが判明した。

20

【0152】

(実施例12) 取得した抗体を用いた血漿中のヒトCXCL1の検出

実施例2にて選抜した5種類の抗体IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1を用いて、血漿に溶解したヒトCXCL1の検出を行った。

【0153】

まず、各抗体についてそれぞれ10 μ g/mLのPBS溶液を調製した後、96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに100 μ Lずつ入れて、一晚固相化した。翌日前記溶液を廃棄し、4倍に希釈した1%BSA-PBS溶液(SIGMA社製)を200 μ L注ぎ、1時間室温で静置した。その後、PBS-Tにて洗浄し、精製抗体固相化プレートとした。

30

【0154】

次に500pg/mLの組換え型ヒトCXCL1タンパク質の血漿溶液を調製し、125pg/mLまで同じ血漿で段階希釈した抗原血漿溶液の希釈系列を作製した。これを各ウェルに100 μ Lずつ添加して1時間室温で反応させた後、抗原溶液を廃棄してPBS-Tで洗浄した。

【0155】

続いて、1%BSA-PBSで希釈した50ng/mLビオチン標識抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体(R&D SYSTEMS社製)100 μ Lを添加し、1時間室温で反応させた。洗浄後、1%BSA-PBSで希釈したavidin HRP溶液(R&D SYSTEMS社製)100 μ Lを30分間室温で反応させた。PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100 μ Lを入れて15分反応させた後、2N硫酸溶液100 μ Lを添加して反応を停止させ、450nmの吸光度を測定した。結果を図6に示す。

40

【0156】

(比較例3) 市販抗体を用いた血漿中のヒトCXCL1の検出

市販の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体であるMAB275(R&D SYSTEMS社製)を用いて、血漿に溶解したヒトCXCL1の検出を行った。PBSで希釈した10 μ g/mLのMAB275溶液を調製し、それぞれ100 μ Lずつ96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに入れ、一晚固相化した。以降は実施例6と同

50

様の方法で行った。結果を図6に示す。

【0157】

実施例12、比較例3より、本発明の5種類の抗体が血漿に溶解したヒトCXCL1についても検出可能なことがわかった。

【0158】

(実施例13) 取得した抗体を用いた尿中のヒトCXCL1の検出

実施例2にて選抜した5種類の抗体IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1を用いて、尿に溶解したヒトCXCL1の検出を行った。

【0159】

まず、各抗体についてそれぞれ10 μ g/mLのPBS溶液を調製した後、96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに100 μ Lずつ入れて、一晚固相化した。翌日前記溶液を廃棄し、4倍に希釈した1%BSA-PBS溶液(SIGMA社製)を200 μ L注ぎ、1時間室温で静置した。その後、PBS-Tにて洗浄し、精製抗体固相化プレートとした。

【0160】

次に500 μ g/mLの組換え型ヒトCXCL1タンパク質の尿溶液を調製し、125 μ g/mLまで同じ尿で段階希釈した抗原尿溶液の希釈系列を作製した。これを各ウェルに100 μ Lずつ添加して1時間室温で反応させた後、抗原溶液を廃棄してPBS-Tにて洗浄した。

【0161】

続いて、1%BSA-PBSで希釈した50ng/mLビオチン標識抗ヒトCXCL1ポリクローナル抗体(R&DSYSTEMS社製)100 μ Lを添加し、1時間室温で反応させた。洗浄後、1%BSA-PBSを用いて希釈したavidin-HRP溶液(R&DSYSTEMS社製)100 μ Lを30分間室温で反応させた。PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100 μ Lを入れて15分反応させ、2N硫酸溶液100 μ Lを添加して反応を停止させて、450nmの吸収を測定した。結果を図7に示す。

【0162】

(比較例4) 市販抗体を用いた尿中のヒトCXCL1の検出

市販の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体であるMAB275(R&DSYSTEMS社製)を用いて、尿に溶解したヒトCXCL1の検出を行った。PBSで希釈した10 μ g/mLのMAB275溶液を調製し、それぞれ100 μ Lずつ96ウェルポリスチレンプレート(グライナー社製)のウェルに入れ、一晚固相化した。以降は実施例13と同様の方法で行った。結果を図7に示す。

【0163】

実施例13、比較例4より、本発明の5種類の抗体のうち、4種類の抗体が、尿に溶解したヒトCXCL1についても検出可能なことがわかった。

【0164】

(実施例14) モノクローナル抗体IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1を用いた膀胱癌細胞の浸潤能の中和活性測定実験

実施例2にて選抜した5種類の抗体IgG1-1、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1について、膀胱癌細胞の浸潤能を抑制する中和活性の測定を行った。

【0165】

まず、膀胱癌細胞であるT24細胞を10%FCS、12.5mM HEPESを添加したRPMI1640培地に1.0 \times 10⁵細胞/mLとなるように接種し、40時間前培養を行った。培養後細胞を回収し、各抗体と混合した細胞溶液について、マトリゲルインベーションチャンパー(BDファルコン)を用いて浸潤能を測定した。詳細は付属のプロトコルに従った。マトリゲルインベーションチャンパーには、2.0 \times 10⁵細胞/mLのPBS懸濁液を100 μ Lと終濃度が10 μ g/mLとなるように各抗体を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%二酸化炭素の下、5時間浸潤培養を行った。培養後、チャンパー下部をディ

10

20

30

40

50

フクウィック試薬（シスメックス社製）で染色し、チャンバー下部まで浸潤した膀胱癌細胞数を計測した。計測は顕微鏡で行い、 $0.8\text{ cm} \times 0.6\text{ cm}$ を1視野として、5視野計測して合計した。測定は $n = 2$ で行い、合計値を平均した結果を図8に示す。

【0166】

（比較例5）市販抗体を用いた膀胱癌細胞の浸潤能の中和活性測定実験

市販の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体であるMAB275（R&DSYSTEMS社製）について、膀胱癌細胞の浸潤能を抑制する中和活性の測定を行った。方法は実施例14と同様に行った。結果を図8に示す。

【0167】

実施例14及び比較例5より、本発明の5抗体は、市販抗体と同等または高い中和活性を示し、特にIgG1-1、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1は高い活性を示した。

【0168】

（実施例15）モノクローナル抗体IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1を用いた膀胱癌細胞の浸潤能の中和活性測定実験2

実施例2にて選抜した5種類の抗体のうち、IgG1-3、IgG1-10、IgG1-14、IgG2b-1の4種類について、膀胱癌細胞の浸潤能を抑制する中和活性の測定を行った。なお実施例14とは異なり、抗体を浸潤能測定の直前ではなく、前培養の段階から混合した。

【0169】

まず、膀胱癌細胞であるT24細胞を10% FCS、12.5 mM HEPESを添加したRPMI1640培地に 1.0×10^5 細胞/mLとなるように接種し、終濃度 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ となるように各抗体を添加した後、40時間培養を行った。培養後細胞を回収し、各抗体と混合した細胞溶液について、マトリゲルインベージョンチャンバー（BDファルコン）を用いて浸潤能を測定した。以降は実施例14と同様の実験を行い、浸潤培養時間のみ6.5時間に変更した。浸潤した細胞数の計測も実施例14と同様に行い、結果を図8に示す。

【0170】

（比較例6）市販抗体を用いた膀胱癌細胞の浸潤能の中和活性測定実験2

市販の抗ヒトCXCL1モノクローナル抗体であるMAB275（R&DSYSTEMS社製）について、膀胱癌細胞の浸潤能を抑制する中和活性の測定を行った。比較例5とは異なり、抗体を浸潤能測定の直前ではなく、前培養の段階から混合した。方法は実施例15と同様に行った。結果を図9に示す。

【0171】

実施例15、比較例6より、本発明に含まれる4抗体は全て、市販抗体より高い中和活性を示した。

【産業上の利用可能性】

【0172】

本発明によれば、ヒトCXCL1の濃度を従来よりも高感度に測定することができるため、尿路上皮癌等の癌の検出に利用することができる。

10

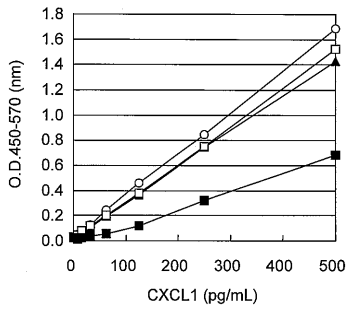
20

30

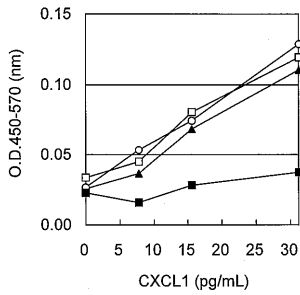
40

【 図 1 】

- (実施例4) 固相IgG2b-1 × 標識IgG1-10
- (実施例5) 固相IgG2b-1 × 標識IgG1-14
- ▲ (実施例6) 固相IgG1-14 × 標識IgG1-3
- (比較例1) R&DSYSTEMS社製市販キット

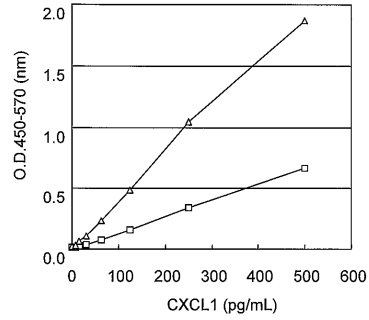


上グラフの低濃度域の拡大

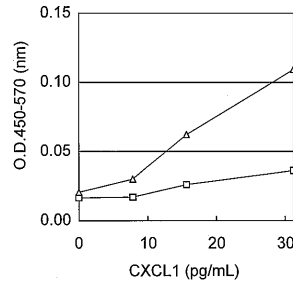


【 図 2 】

- 固相IgG2b-1 × 標識IgG1-10 (0.6 μg/mL)
- △ 固相IgG2b-1 × 標識IgG1-10 (0.3 μg/mL) + IgG1-14 (0.3 μg/mL)

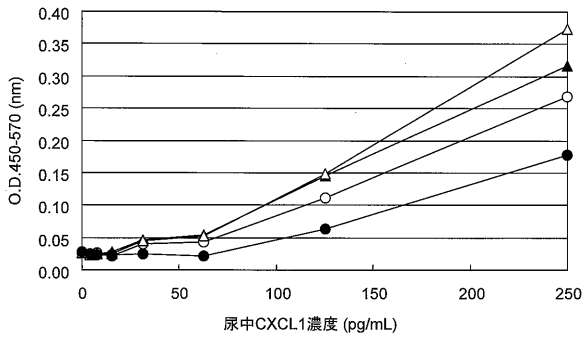


上グラフの低濃度域の拡大



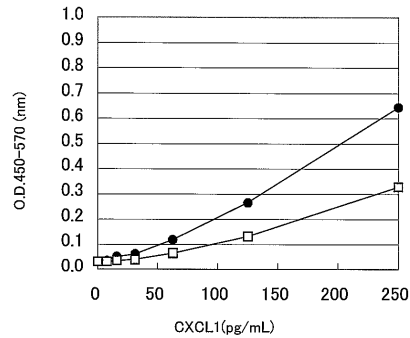
【 図 3 】

- ▲ (実施例9) 固相IgG1-3 × 標識IgG1-14
- (実施例8) 固相IgG2b-1 × 標識IgG1-10
- △ (実施例8) 固相IgG2b-1 × 標識IgG1-14
- (比較例2) R&DSYSTEMS社製市販キット

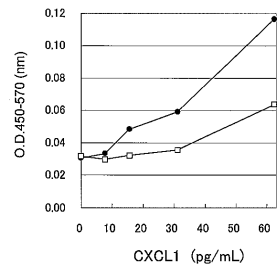


【 図 4 】

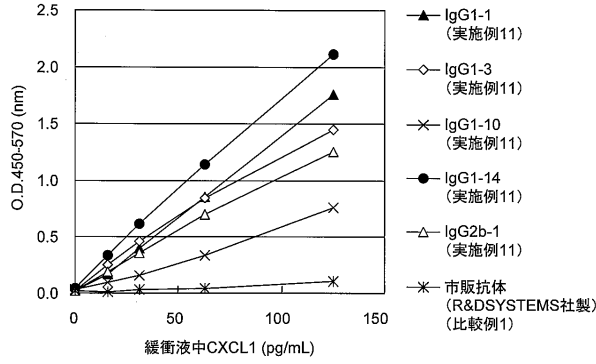
- (実施例10) 固相R&DSYSTEMS社製市販モノクローナル抗体 × 標識IgG1-10
- (比較例1) R&DSYSTEMS社製市販キット



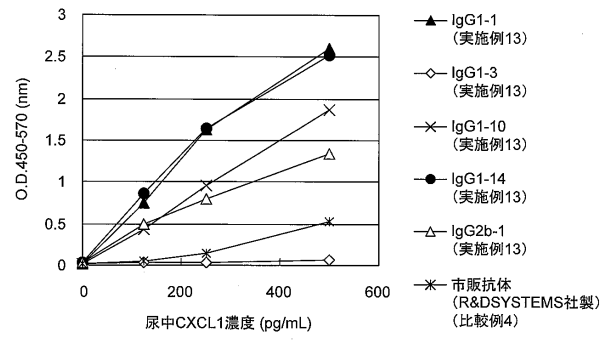
上グラフの低濃度域の拡大



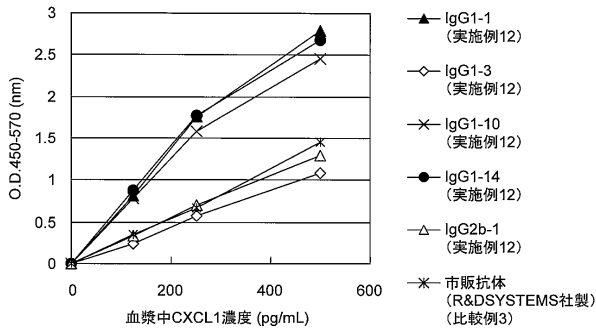
【 図 5 】



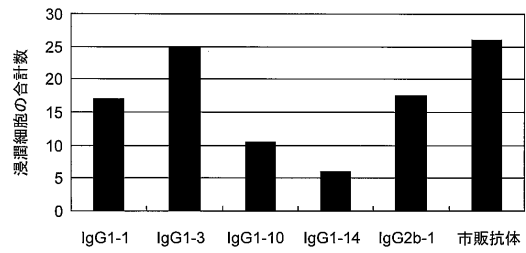
【 図 7 】



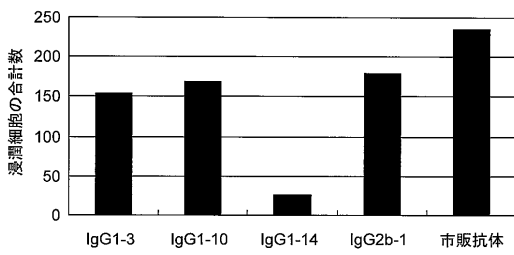
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

0005941615000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 祥徳
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内
- (72)発明者 高山 愛子
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内

合議体

- 審判長 中島 庸子
審判官 小堀 麻子
審判官 長井 啓子

- (56)参考文献 国際公開第2007/026895(WO,A1)
国際公開第2008/013257(WO,A1)
Kawanishi et al, Clin. Cancer. Res., 2008年 5月
1日, Vol. 14, No. 9, p. 2579-2587
Wen et al, Clin. Cancer. Res., 2006年10月15日, Vo
l. 12, No. 20, p. 5951-5959
Yang et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 2006年10月3
1日, Vol. 103, No. 44, p. 16472-16477

专利名称(译)	人CXCL1蛋白的免疫学测定方法		
公开(公告)号	JP5941615B2	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	JP2010500582	申请日	2009-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
[标]发明人	金森智子 鄭基晩 田中祥徳 高山愛子		
发明人	金森 智子 鄭 基晩 田中 祥徳 高山 愛子		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/475 C07K16/18 C12N15/09		
CPC分类号	C07K16/24 A61K2039/505 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/543 G01N33/6857 G01N33/6863 G01N2333/522		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K14/475 C07K16/18 C12N15/00.A		
优先权	2008281908 2008-10-31 JP 2009039411 2009-02-23 JP		
其他公开文献	JPWO2010050554A1 JPWO2010050554A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

任务是以高灵敏度检测人CXCL1蛋白。特异性识别SEQ ID NO : 1至3所示氨基酸序列的任一序列区域的两种类型，其是构成人CXCL1蛋白的氨基酸序列的部分序列，并且分别特异性识别不同的序列区域。免疫学测量人CXCL1蛋白的方法，其使用上述抗人CXCL1单克隆抗体或其片段以及SEQ ID NO : 1至3中所示的任何氨基酸序列测量样品中的人CXCL1或其片段提供了具有特异性识别一个序列区域的新氨基酸序列的单克隆抗体或其片段。

(21) 出願番号	特願2010-500582 (P2010-500582)	(73) 特許権者	000003159
(86) (22) 出願日	平成21年10月29日 (2009.10.29)		東レ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/068387		東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02010/050554	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成24年10月15日 (2012.10.15)	(74) 代理人	100118773
審判番号	不服2015-3837 (P2015-3837/J1)		弁理士 藤田 節
審判請求日	平成27年2月27日 (2015.2.27)	(74) 代理人	100180954
(31) 優先権主張番号	特願2008-281908 (P2008-281908)		弁理士 漆山 誠一
(32) 優先日	平成20年10月31日 (2008.10.31)	(72) 発明者	金森 智子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東 レ株式会社 基礎研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2009-39411 (P2009-39411)	(72) 発明者	鄭 基晩
(32) 優先日	平成21年2月23日 (2009.2.23)		神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東 レ株式会社 基礎研究所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		