

(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2005-104936

(P2005-104936A)

(43) 公開日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/24	C07K 16/24	4B024
A61K 39/395	A61K 39/395	4B064
A61P 17/00	A61P 17/00	4B065
A61P 37/08	A61P 37/08	4C085
C12N 5/10	GO1N 33/53	4H045
	審査請求 未請求 請求項の数 7 O L	(全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-343832 (P2003-343832)	(71) 出願人	591281220 日本全薬工業株式会社 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1
(22) 出願日	平成15年10月1日 (2003.10.1)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	前田 貞俊 東京都文京区千駄木5-30-8 メゾン 千駄木202
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌTARC抗体

(57) 【要約】

【課題】 イヌTARCに対する親和性に優れたモノクローナル抗体、該抗体を用いたイヌアトピー性皮膚炎の検出、イヌTARC治療剤並びにイヌTARC治療法の提供。

【解決手段】 高次構造を保持しているイヌTARCにのみ結合するモノクローナル抗体、および抗体とイヌ生体試料中のTARCを接触させることを含む、イヌTARCの免疫学的測定方法。

。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高次構造を保持しているイヌTARCにのみ結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

高次構造を保持しているイヌTARCが有するエピトープに結合する請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の抗体とイヌ生体試料中のTARCを接触させることを含む、イヌ TARCの免疫学的測定方法。 10

【請求項 5】

ELISAである請求項 4 記載のイヌTARCの免疫学的測定方法。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載の抗体を有効成分として含む、イヌのアトピー性皮膚炎治療剤。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載の抗体をイヌのアトピー性皮膚炎罹患部に適用することを含む、イヌアトピー性皮膚炎の治療法。

【発明の詳細な説明】 20

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗イヌTARC抗体を用いたイヌTARCの定量方法、イヌアトピー性皮膚炎の診断方法、イヌアトピー性皮膚炎の診断薬、イヌアトピー性皮膚炎の治療剤及び治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アトピー性皮膚炎は、しばしばアトピー素因を有し、慢性の湿疹性皮膚病変を長期にわたって繰り返す病気である。また、血液学的所見として、しばしば末梢血の好酸球数増多、血清IgE値の高値などの異常が認められる。アトピー性皮膚炎の主な要因として、免疫学的異常と非免疫学的異常が報告されている。近年、ヒトばかりではなくイヌ等の愛玩動物においてもアトピー性皮膚炎が増えており、その検出、治療法の確立が望まれている。 30

【0003】

アトピー性皮膚炎と関連している物質としてケモカインがある。マクロファージ由来のケモカインについて報告されている（特許文献 1 および特許文献 2 参照）。ケモカインは、分子量が約 8~14kDa の白血球に走化作用を有するサイトカインの総称で、炎症細胞間の連絡を担当するメディエーターとして、種々の炎症の発生、進展に中心的な役割を果たす。ケモカインは構造上 4 個のシステイン配列の違いにより C、CC、CXC、CX3C の 4 つに大別される。ケモカインにはそれぞれ受容体が存在し、Cケモカインには Cケモカイン受容体（XCR）、CCケモカインには CCケモカイン受容体（CCR）、CXCケモカインには CXCケモカイン受容体（CXCR）、CX3Cケモカインには CX3Cケモカイン受容体（CX3CR）とに大別され、ケモカインと受容体の相互作用により、それぞれのケモカインに対応した受容体をもつ細胞が遊走し病態の形成・維持に重要な役割を果たすと考えられている。このうち、ヘルパー T 細胞 Th2 特異的に発現される CCケモカイン受容体 4（CCR4）に結合するとされている TARC（Thymus Activation-Regulated Chemokine）が特にアトピー性皮膚炎と関連が深いと考えられている。例えば、アトピー性皮膚炎患者の罹患部に浸潤している CD4 陽性 T 細胞は、CCR4 陽性であり、末梢血中の CCR4 陽性メモリー T 細胞も、アトピー性皮膚炎の患者では健康人に比べ優位に増加しているという報告がある。さらに、末梢血中の CCR4 陽性細胞数と好酸球数、IgE 値、および臨床的な重症度が相関していることも報告されている。さらに、ヒトアトピー性皮膚炎患者において、血中 TARC 値が高値を示し、罹患部における TARC の 40 50

産生も亢進しているという報告もある（特許文献3および特許文献4参照）。

【0004】

これらの報告はTARCがアトピー性皮膚炎の疾患マーカーとなり得ること、TARCがアトピー性皮膚炎の治療標的となり得ることを示唆しているものの、TARCが健常部でも発現が認められるという報告もあり、TARCの有用性についての検討は未だ十分ではない。

【0005】

さらに、これまでの報告は、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた検討およびヒトを用いた検討であったが、アトピー性皮膚炎の発症機構が動物間で同じとは限らず、イヌに特異的な診断法、治療法の確立が望まれていた。

【0006】

イヌTARCについては、前田ら(J. Vet. Med. Sci. 63(9):1035-1038, 2001)がアミノ酸配列、mRNAのDNA配列を決定しているが、イヌTARC抗体については得られていなかった。一方、ヒト等の他種の抗TARC抗体は市販されていたが、イヌTARCとは反応しないという問題をかかえており、また、市販のTARC抗体はTARCとの親和性が不十分で、特に細胞組織の免疫染色時に染色像が明瞭に得られないなどの問題が指摘されていた(代表的な染色像、Vestergaardら; J. Invest. Dermatol. 115(4):640-646, 2000、Uchidaら; International Immunology. 14(12):1431-1438, 2002)。

【0007】

【特許文献1】特表2001-520002号公報

【特許文献2】特表平10-507646号公報

【特許文献3】EP1221618A1号公報

【特許文献4】WO 02/53758号公報

【非特許文献1】J. Vet. Med. Sci. 63(9):1035-1038, 2001

【非特許文献2】J. Invest. Dermatol. 115(4):640-646, 2000

【非特許文献3】Uchidaら; International Immunology. 14(12):1431-1438, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、イヌ等の愛玩動物におけるアトピー性皮膚炎の診断法、治療剤および治療法に関し、具体的にはケモカインの一種であるイヌTARCに対する親和性に優れたモノクローナル抗体を用いたイヌアトピー性皮膚炎の検出法、イヌTARC治療剤並びにイヌTARC治療法に関し、さらにイヌTARCを標的としたイヌTARCの治療剤および治療法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、イヌのアトピー性皮膚炎にもTARCが関与していると考え、既に知られているイヌTARC遺伝子配列をもとに作製されたりコンビナントイヌTARCを用い、抗イヌTARC抗体を作製し、イヌアトピー性皮膚炎の検出、治療について鋭意検討を行い、本発明を完成させるに至った。

【0010】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 高次構造を保持しているイヌTARCにのみ親和性を示すモノクローナル抗体、

[2] 高次構造を保持しているイヌTARCが有するエピトープに結合する[1]のモノクローナル抗体、

[3] [1]または[2]のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、

[4] [1]または[2]の抗体とイヌ生体試料中のTARCを接触させることを含む、イヌTARCの免疫学的測定方法、

[5] ELISAである[4]のイヌTARCの免疫学的測定方法、

[6] [1]または[2]の抗体を有効成分として含む、イヌのアトピー性皮膚炎治療剤、ならびに

[7] [1]または[2]に記載の抗体をイヌのアトピー性皮膚炎罹患部に適用することを含む

10

20

30

40

50

む、イヌアトピー性皮膚炎の治療法。

【発明の効果】

【0011】

本発明のイヌTARCモノクローナル抗体は、市販のTARCモノクローナル抗体がイヌTARCに反応しないという問題を解決する。さらに、イヌのTARCの高次構造を特異的に認識するため、既に知られているTARC抗体と比較し、細胞組織の免疫染色像が明瞭に得られ、また高感度のELISAが構築できるためにイヌアトピー性皮膚炎の診断に有効な手段を提供することが出来る。また、該モノクローナル抗体は、イヌのアトピー性皮膚炎治療のためにも有効である。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、前田(J. Vet. Med. Sci. 63(9):1035-1038, 2001)らの決定した塩基配列をもとに、組換えベクターを調製し、リコンビナントイヌTARCを発現させ、該タンパク質を精製後、マウスに免疫し細胞融合により、ハイブリドーマを作製した。作製されたハイブリドーマについて高次構造を認識しかつ親和性の高いクローンを選択することによりスクリーニングし、目的のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選択した。該モノクローナル抗体を用い、イヌTARC測定用のELISAを構築すると共に、組織免疫の染色像から高次構造を保持しているイヌTARCに対する親和性を確認した。

【0013】

20

1. 組換えベクター及び形質転換体の作製

(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターにイヌTARCの遺伝子を連結(挿入)することにより得ることができる。該遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられ、公知のものを用いることができる。

(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、上記組換えベクターを、公知の手法により目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。

(3) 抗原タンパク質の生産

30

抗原となるタンパク質は、前田らの報告しているイヌTARC遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するもの、または該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に前記変異が導入されたアミノ酸配列を有し、かつイヌTARC活性を有するものである。

【0014】

抗原となるイヌTARCタンパク質は、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

【0015】

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地として、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

40

【0016】

培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1~30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0017】

培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することによりイヌTARCタンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質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する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方

50

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み合わせる用いることにより、前記培養物中から本発明のタンパク質を単離精製することができる。

【0018】

2. モノクローナル抗体の作製

本発明のイヌTARCモノクローナル抗体は、1.(3)に記載した方法により作製された抗原を用い、哺乳動物を免疫するかあるいはインビトロ法により免疫したリンパ球細胞を、哺乳動物の骨髄腫細胞(ミエローマ)などと融合させ、ハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマ培養液について、高度に精製されたイヌTARCを抗原として用いて、高次構造を保持した状態のイヌTARCに反応し、2-メルカプトエタノールやジチオスレイトールのよ

10

【0019】

(1) ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマの作製にあたっては哺乳動物を使用する場合、どのような系も使用可能であるがマウスやラットなどの小動物を使用した例が一般的である。免疫は、イヌTARCを生理食塩水等により適当な濃度に希釈し、この溶液を静脈内や腹腔内に投与し、これに必要に応じて免疫アジュバントを併用投与し、動物に2-20日毎に2から5回投与する。このようにして免疫された動物を最終免疫後3日目に解剖し、脾臓を摘出し、脾臓細胞を免疫細胞として使用する。細胞腫細胞としては、例えばp3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, F0, P3 x 63 Ag 8. 653, S194などが例示できる。またラット由来の細胞としてはR-210などの細胞株を例示できる。免疫細胞と形質転換細胞株又はミエローマとの融合は公知の方法、例えばKoehlerとMilsteinらの方法(Koehler, G. et al. Nature vol.256, 495-497, 1975)が一般的であるが、電気パルスを使用した電気パルス法なども使用可能である。免疫細胞と形質転換細胞は通常行われている細胞数の比に混合し、通常用いられる細胞培養用培地(FCS不含)にポリエチレングリコールを添加して融合処理を行い、FCS添加HAT選択培地で培養を行い、融合細胞を選別する。

20

【0020】

(2) 抗体産生ハイブリドーマの選別

本発明のイヌTARCに対する抗体は、高次構造を保持したイヌTARCにのみ反応し、高次構造が失われたイヌTARCには全く反応しない。該抗体はイヌTARCが天然状態における完全な高次構造を保持しているときにのみ有しており、高次構造が失われたときに消失するエピトープを認識する。該エピトープは連続したまたは不連続のアミノ酸数個からなり、高次構造が保持されているときにTARC分子の外側に露出している。また、TARC分子から一部アミノ酸が欠失等したTARCの部分ペプチドであっても、高次構造の保持に關与するアミノ酸を有しているときには、完全な高次構造が保持されているときに有しているエピトープを有し得る。本発明の抗体は、このようにエピトープを認識し、結合する抗体も含む。

30

【0021】

高次構造を保持したイヌTARCにのみ反応し、高次構造が失われたイヌTARCには全く反応しない抗体産生ハイブリドーマを選別するにはELISA法、プラーク法、オクタロニー法、凝集法などとウエスタンブロッティング法との組合せが原理的に使用可能である。

40

【0022】

その中でも、ELISA法が簡便で、かつ精度が良いため一般的に良く用いられているが、通常の抗体検出に用いられる方法を採用するだけでは本発明の高次構造を保持したタンパク質のみを認識する抗体産生ハイブリドーマを選別することは困難で成功しない。従来技術において組織の免疫染色像などが明瞭に得られなかったのは、この細胞選別に問題があったからである。これは、TARCは高次構造が保持され、はじめて生物活性が発揮されるのに対し、適当な高次構造部位を認識する抗体が得られていなかったからである。また、生

50

物活性を発揮しているTARCのみを検出することによりイヌのアトピー性皮膚炎病態を反映した診断結果を得ることができる。

【0023】

そこで発明者らは、選抜方法を工夫し、2-メルカプトエタノールやジチオスレイトールのような還元剤処理により、S-Sが開裂され立体構造のみが破壊されたイヌTARCには反応せず、高次構造が保持されているイヌTARCに反応するハイブリドーマを選別した。すなわち、固相化した高次構造保持イヌTARCに反応し、2-メルカプトエタノールやジチオスレイトールのような還元剤処理により、S-Sが開裂され立体構造のみが破壊されたイヌTARCに反応しないようなハイブリドーマを選別した。

【0024】

本発明の改良された選抜方法は、ELISA法と還元処理を行ったイヌTARCのSDS-PAGEを用いたウエスタンブロットティング法との組み合わせによる選抜方法である。該選抜方法により選別に成功したハイブリドーマを本発明におけるELISAを用いながら、限界希釈法により3-5回クローニングし安定な抗体生産株として樹立する。このようにして樹立されたハイブリドーマは通常の培養方法により継代培養可能であり、必要に応じて凍結保存できる。ハイブリドーマは常法により培養するか、または哺乳動物の腹腔内に移植し、腹水として培養液を回収する。回収した培養液は塩析法、ゲル濾過法、プロテインAまたはGアフィニティークロマトグラフィーなどの通常の方法により精製できる。得られた抗体は高次構造を保持しているイヌTARCにのみ反応する抗体でイヌTARCの測定や精製に使用できる。イヌTARCの測定に使用する場合は、放射性アイソトープや酵素によりラベルすることにより、ラジオイムノアッセイ(RIA)やエンザイムイムノアッセイ(EIA)として知られている測定系においてイヌTARC定量用特異的抗体として使用することができる。

10

20

【0025】

本発明のイヌTARCモノクローナル抗体は、イヌのアトピー性皮膚炎の検出およびイヌのアトピー性皮膚炎の治療の両方に用いることができるが、治療剤として用いる場合は、イヌの体内に投与した場合に免疫反応を惹起しないものが望ましい。このような抗体として、抗体の定常領域をイヌの定常領域に置き換えたキメラ抗体、定常領域および超可変領域を除く全ての可変領域をイヌの配列に置き換えたイヌ化抗体等が挙げられる。

【0026】

本発明の組換えイヌTARCに対するモノクローナル抗体は、ネフロメトリー、競合法、サンドイッチ法等により、本発明の組換えイヌTARCの定量に使用できる。

30

【0027】

本発明の抗イヌTARC抗体を用いてイヌ生体試料中のTARCを免疫学的に検出することができる。ここで、イヌ生体試料とは、血清、血漿、尿、髄液、病変部組織等の体液または組織をいう。

【0028】

また、酵素免疫測定法(EIA)においては、抗イヌTARC抗体をマイクロプレート、樹脂ビーズ、磁性化ビーズ等の担体に物理吸着や化学結合により固相化する。固相化量は、特に限定されないが担体がマイクロプレートの場合、1ウエル当たり数ngから数十 μ gが望ましい。固相化は固相化すべき抗体を適切な緩衝液に溶解し、担体と接触させることにより行うことができる。例えば、マイクロタイターウエルを用いる場合、適当な濃度に調製した抗体溶液をマイクロタイタープレートのウエルに分注し一定時間置くことにより固相化することができる。抗体を固相化した後は、アッセイ中の非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン等を含んだブロッキング溶液を用いてブロッキングを行うのが好ましい。次いで、固相化担体と試料を反応させ、洗浄後、標識抗イヌTARC抗体を反応させる。標識は-D-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼやグルコースオキシダーゼ等の酵素を用いて行うことができる。例えば、酵素免疫測定法(EIA)においては、多数のウエル(例えば、96穴)を有するマイクロタイタープレートに抗体を固相化させ、ウエル中で抗原抗体反応を行わせることにより一度に大量測定が可能になる。また用いる抗体及び試料の

40

50

使用量を非常に少なくすることも可能である。さらに、全自動EIA測定装置などの自動測定機器を用いることも可能になる。

【0029】

本発明は、イヌ生体試料中のイヌTARCの検出を可能にするキットの提供をも目的とするが、該キットは少なくとも抗イヌTARC抗体を含む。該キットが酵素免疫測定法に基づく場合は、抗体を固相化した担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。また、該キットは適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

【0030】

本発明の抗体をアトピー性皮膚炎の治療に用いることも可能である。

10

本発明の抗体を含む製剤の投与形態は限定されず、経口、非経口、経粘膜（例えば舌下または口腔投与）、局所、経皮、直腸、吸入（例えば鼻または肺奥吸入）等により投与することができる。非経口投与として、静脈内、皮下、筋肉内注射等が挙げられる。局所または経皮製剤は粉末、エマルジョン、懸濁液、スプレー、クリーム、軟膏、ローションおよびペースト等の形態で用いられ、または薬用膏薬、パッチまたは膜の形で用いられる。さらにシャンプー、リンスに本発明の抗体を含有させてもよい。治療に用いるに必要な本発明の抗体の量は、治療する病状の性質、被験体の年齢と状態で変わり、最終的には担当獣医が決めることができる。例えば、軟膏等の局所適用形態では、抗体を、例えば0.1～99%の濃度で含有し、1日あたり0.05～2mgの抗体を投与すればよい。所定の投与量は一回の投与で与えてもよいし、1日当たり2回、3回、4回またはそれ以上の分割投与の適当な間隔で与えてもよい。

20

さらに、イヌTARCを分子標的とした治療剤も本発明の範囲に含まれる。

【実施例】

【0031】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【0032】

〔実施例1〕大腸菌による抗原用組換えイヌTARCタンパク質の作出

前田ら(J. Vet. Med. Sci. 63(9):1035-1038, 2001)が論文中で報告しているイヌTARCのタンパク質翻訳領域を全長を含むプラスミドDNAを鋳型とし、PCR法によりイヌTARCタンパクをコードするDNA断片を調製した。このDNA断片を大腸菌発現ベクターであるpGEX4T-1 (Amersham Bioscience社)に連結した。大腸菌の形質転換を行い、イヌTARC遺伝子が含まれる大腸菌クローンを選択しプラスミドDNAを精製した。得られたプラスミドDNAを大腸菌BL21株 (TaKaRa社)に形質転換した。形質転換された大腸菌をLB培地 (50 µg/mlアンピシリン含)で培養し、培養液に100mM IPTGを添加して発現を誘導し、37 °Cでさらに3時間培養した。培養液を遠心管に移し、4 °Cで6,000rpm、10分間遠心して集菌した。

30

【0033】

上清を除去し、沈殿を氷冷しておいたソニケーションバッファー (50mM Tris-HCl、50mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT; pH8.0)に懸濁し、超音波処理を行い、大腸菌を破壊した。冷却しておいた10% Triton X-100を終濃度1%になるように添加し、4 °Cで18,000rpm、30分間遠心した。上清をグルタチオンセファロース4Bカラム (Amersham Bioscience社)および、ゲル濾過カラムSuperrose12HR10/30 (Amersham Bioscience社)を用いたFPLCファルマシアFPLCシステムを用い、抗原として使用するイヌTARCタンパク質を精製した。

40

【0034】

〔実施例2〕ハイブリドーマの作製と選別

実施例1で得た精製イヌTARCを100 µg/100 µlの濃度に精製水に溶解し、この溶液を2週おきにBALB/cマウスの腹腔内に投与し免疫を行った。初回および2回目の免疫においては等容量のフロイントコンプリートアジュバントとのエマルジョンを投与した。最終の免疫から3日目に脾臓を摘出し、Bリンパ球を分離し、マウスミエローマ細胞とをKoehlerとMilsteinらの方法 (Koehler, G., et al. Nature vol. 256, 495-497, 1975) に従っ

50

て細胞融合させた。ついで融合細胞を選択するためにHAT培地で培養することによりセレクションを行った。

【0035】

次にセレクションした細胞の中から高次構造を保持しているイヌTARCにのみ反応し、高次構造が失われたイヌTARCには全く反応しない抗イヌTARC抗体を産生しているハイブリドーマを、ソリッドフェーズELISAと還元処理後のウエスタンブロッティングの組合わせにより選抜し取得した。

【0036】

即ち、固相抗原(イヌTARC)にハイブリドーマの培養液を直接反応させ、反応性を確認する通常のソリッドフェーズELISAで陽性となり、かつ、還元処理後のウエスタンブロッティングにおいて陰性を示すようなハイブリドーマを選択した。

【0037】

実施例1で得た精製イヌTARC 100 μ l (10 μ g/ml 0.1 M NaHCO₃)を96ウエルイムノプレート(Nunc社)に添加し、室温で一夜固相化した。固相化後、それぞれのウエルを1% BSA-PBS100 μ lで、37、1時間ブロックした。ウエルを0.05% Tween 20を含むPBS(洗浄バッファー)で3回洗浄した後、各ハイブリドーマの培養液について、その50 μ lづつをそれぞれイヌTARCを固相化したウエルに添加し37で1時間インキュベートした。1時間の反応後、各ウエルを洗浄バッファーで5回洗浄した。イヌTARC結合した抗体(マウスIgG)を検出するために、パーオキシダーゼ(POD)標識されたヤギ抗マウスIgG()ポリクローナル抗体(Zymet社)を1% BSA-PBSで2000倍に希釈し、その50 μ lを96-ウエルイムノプレートの各ウエルに添加し、37で1時間反応させた。各ウエルを洗浄バッファーで5回洗浄後、酵素基質溶液(ABTS液)50 μ lを各ウエルに添加、37、10分間反応させた。酵素反応は各ウエルに50 μ lの0.32%フッ化ナトリウム溶液を添加して停止させた。各ウエルの414 nmの吸光度をイムノリーダー(BioRad社)で測定した。ソリッドフェーズELISA各ハイブリドーマに対して行うことで、ハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマについて3回クローニングを行い、6つのハイブリドーマを樹立した。

【0038】

実施例1の精製TARCにメルタプトエタノールを含むLaemmliサンプルバッファー(BioRad社)で還元した後に、ポリアクリルアミドゲル(パジェル5-20%グラジエントゲル; ATTO社)を用いてSDS-PAGEを行った。得られたゲルをPVDFメンブランフィルター(Amersham Bioscience社製)に転写した。クローニングを終えたハイブリドーマクローンの培養上清を精製し、ピオチン標識したものをプローブとしてウエスタンブロッティングを行った。ECLプラスウエスタンブロッティングディテクションリジェント(Amersham Bioscience社)を加え、イヌTARCタンパク質と各ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体との反応性について調査した。その結果、上記6つのクローン中還元処理後のウエスタンブロッティングで陽性反応を示さない抗体産生ハイブリドーマを1クローン取得し、CTA-1と名づけた。

【0039】

以上のように、ソリッドフェーズELISAと還元処理後のウエスタンブロッティングを使用し、高次構造が保持されたイヌTARCにのみ親和性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択した結果、目的とする抗体を産生するハイブリドーマの出現率は約17%程度で、他はすべてウエスタンブロッティングにおいても反応し、高次構造の有無に関わらず抗体を認識するモノクローナル抗体を認識するハイブリドーマであった。

【0040】

〔実施例3〕モノクローナル抗体を用いた病変組織の免疫染色

アトピー性皮膚炎のイヌの患部組織から凍結切片を作製し、冷風ドライヤーにて風乾した。パップペンで切片の周りを囲み、4%パラフォルムアルデヒドを用いて15分間反応させ固定した。TBSTで5分間3回洗浄を行った後、ブロッキング用希釈正常馬血清を滴下して20分間室温にてブロッキングを行った。実施例2で得られたCTA-1の培養上清液を精製したモノクローナル抗体を一次抗体とし、ブロッキング液で適切に希釈し、一晚室温で反応

10

20

30

40

50

させた。TBSTで5分間3回洗浄を行い、ビオチン標識された二次抗体を滴下して30分間反応させた。TBSTで5分間3回洗浄した後に、ABC-AP試薬を滴下して30分間反応させ、TBSTで5分間3回洗浄後、暗所にてAP基質溶液を滴下して30分間反応させた。TBSTで5分間洗浄後、更に水道水で洗浄し、切片をヘマトキシリンで核染色した。流水で水が透明になるまで水洗した後、酢酸でリンスし、水道水で水洗し、アンモニア水でbluingし、水道水で水洗した後マウントして、観察した(図1)。その結果、既に知られているTARC抗体を用いた場合と比較して細胞組織の免疫染色像が明瞭に得られた。

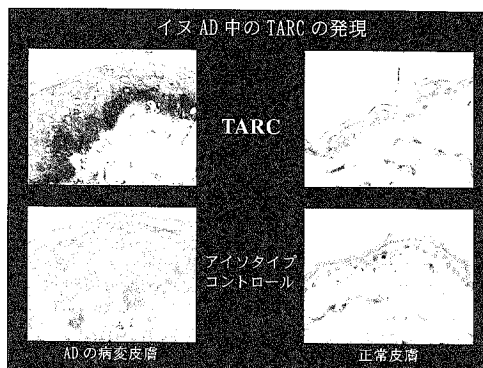
【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】モノクローナル抗体を用いた病変組織の免疫染色の結果を示す図である。

10

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 津久井 利広

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全薬工業株式会社内

(72)発明者 増田 健一

東京都文京区千駄木3-38-6 セブンスターハイツ千駄木303

(72)発明者 佐瀬 孝一

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全薬工業株式会社内

(72)発明者 平井 みゆき

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全薬工業株式会社内

(72)発明者 岩淵 成紘

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全薬工業株式会社内

(72)発明者 鈴田 靖幸

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全薬工業株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA03 DA06 EA04 GA03 GA11 HA15

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AB05 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 BB11 CC21 EE01 GG10

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA71 FA72 FA74

专利名称(译)	犬TARC抗体		
公开(公告)号	JP2005104936A	公开(公告)日	2005-04-21
申请号	JP2003343832	申请日	2003-10-01
申请(专利权)人(译)	Nihonzen'yakukogyo有限公司		
[标]发明人	前田 貞俊 津久井 利広 増田 健一 佐瀬 孝一 平井 みゆき 岩淵 成紘 鈴田 靖幸		
发明人	前田 貞俊 津久井 利広 増田 健一 佐瀬 孝一 平井 みゆき 岩淵 成紘 鈴田 靖幸		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P17/00 A61P37/08 C07K16/24 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/24 A61K39/395.N A61P17/00 A61P37/08 G01N33/53.Q G01N33/577.B C12N5/00.B C12N15/00.C C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供对犬TARC具有优异亲和力的单克隆抗体，使用该抗体检测犬特应性皮炎，狗TARC的治疗剂和犬TARC的治疗方法。种类代码：A1一种免疫学测定犬TARC的方法，包括使仅与保留高级结构的犬TARC结合的单克隆抗体和来自狗的生物样品中的TARC接触。【选择图】无

(43) 公開日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	ターマコード (参考)
C07K 16/24	C07K 16/24	4B024
A61K 39/395	A61K 39/395	4B064
A61P 17/00	A61P 17/00	4B065
A61P 37/08	A61P 37/08	4C085
C12N 5/10	G01N 33/53	4H045
	審査請求 未請求 請求項の数 7 OL (全 10 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-343832 (P2003-343832)	(71) 出願人	591281220 日本全業工業株式会社 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1
(22) 出願日	平成15年10月1日 (2003.10.1)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	前田 貞俊 東京都文京区千駄木5-30-8 メゾン