

(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2019-64925

(P2019-64925A)

(43) 公開日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/26 (2006.01)	C O 7 K 16/26	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	A

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2017-188143 (P2017-188143)	(71) 出願人	000003300
(22) 出願日	平成29年9月28日 (2017. 9. 28)		東ソー株式会社
			山口県周南市開成町4560番地
		(72) 発明者	小林 龍司
			神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ
			ー株式会社 東京研究センター内
		Fターム(参考)	4H045 AA11 AA20 CA40 DA75 EA50
			FA71

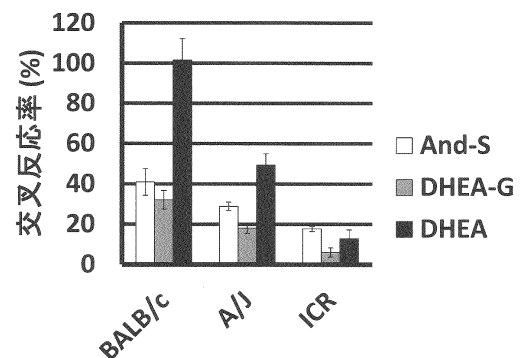
(54) 【発明の名称】 抗デヒドロエピアンドロステロンサルフェート抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 反応特異性の高い抗デヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHEA-S) 抗体の提供。

【解決手段】 デヒドロエピアンドロステロンサルフェート類似化合物との交叉反応性が20%以下であることを特徴とする抗デヒドロエピアンドロステロンサルフェート抗体であって、デヒドロエピアンドロステロンサルフェートを抗原としてICR系統のマウスへ免疫することにより抗DHHEA-S抗体を取得する。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デヒドロエピアンドロステロンサルフェート類似化合物との交叉反応性が 20% 以下であることを特徴とする抗デヒドロエピアンドロステロンサルフェート抗体。

【請求項 2】

デヒドロエピアンドロステロンサルフェート類似化合物がアンドロステロンサルフェート、デヒドロエピアンドロステロンサルフェートグルクロナイド、デヒドロエピアンドロステロンのいずれかであることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

デヒドロエピアンドロステロンサルフェートを抗原として ICR 系統のマウスへ免疫することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗デヒドロエピアンドロステロンサルフェート抗体に関するものである。

【背景技術】

【0002】

デヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHEA-S) は主に副腎皮質から分泌されるステロイドホルモン的一种として知られている。このホルモンは、副腎皮質に疾患があると異常な血中濃度を示すことが分かっている。そのため DHEA-S は、各種副腎皮質疾患の診断マーカーとして広く利用されている。

【0003】

DHEA-S の血中濃度測定では通常、抗 DHEA-S 抗体を用いた競合法が利用されている。この方法ではまず、固相化された抗 DHEA-S 抗体をアルカリホスファターゼなどの酵素で標識された DHEA-S (以下、標識 DHEA-S) と検体との混合物に加え反応させる。その後、これを洗浄し、固相に結合している標識 DHEA-S から出るシグナルを測定する。検体中の DHEA-S 濃度が低い時には多くの標識 DHEA-S が固相に結合して強いシグナルとなるが、血中 DHEA-S 濃度が高くなると固相に結合する標識 DHEA-S が減り、弱いシグナルとなる。このシグナル変化の割合を調べることで、血中の DHEA-S 濃度を求めることができる (図 1 参照)。

【0004】

血中には、DHEA-S と類似の構造をもつ化合物が多数存在しているため、これらの化合物が抗 DHEA-S 抗体へ誤って結合 (交叉反応) することがあり、正確な血中濃度を測定できなくなってしまうことがある。そのため、DHEA-S 測定系の構築では、この交叉反応の起こりにくい高性能な抗体が求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明が解決しようとする課題は、反応特異性の高い抗 DHEA-S 抗体を取得することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は上記課題に関し鋭意検討した結果、本発明に到達した。即ち本発明は以下のとおりである。

(1) デヒドロエピアンドロステロンサルフェート類似化合物との交叉反応性が 20% 以下であることを特徴とする抗デヒドロエピアンドロステロンサルフェート抗体。

(2) デヒドロエピアンドロステロンサルフェート類似化合物がアンドロステロンサルフェート、デヒドロエピアンドロステロンサルフェートグルクロナイド、デヒドロエピアンドロステロンのいずれかであることを特徴とする (1) に記載の抗体。

(3) デヒドロエピアンドロステロンサルフェートを抗原として ICR 系統のマウスへ免

10

20

30

40

50

疫することとを特徴とする（１）又は（２）に記載の抗体の製造方法。

【０００７】

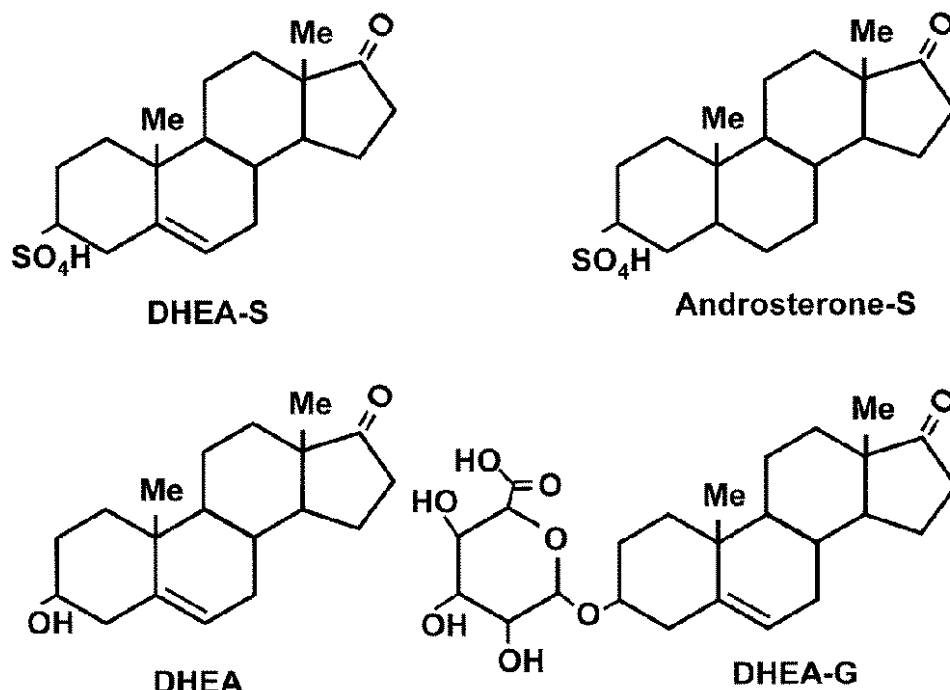
以下、本発明を詳細に説明する。

【０００８】

本発明は反応特異性の高い抗デヒドロエピアンドロステロンサルフェート抗体（抗 D H E A－S 抗体）に関するものであり、具体的には、D H E A－S 類似化合物との交叉反応性が 20 % 以下であることを特徴とする。D H E A－S 類似化合物としては、アンドロステロンサルフェート（A n d－S）やデヒドロエピアンドロステロンサルフェートグルコナイド（D H E A－G）、デヒドロエピアンドロステロン（D H E A）が挙げられる。

【０００９】

【化１】



【００１０】

次に、本発明の抗体を製造する方法について説明する。

【００１１】

本発明の抗体を製造するには、D H E A－S を抗原として I C R 系統のマウスへ免疫する。抗原として使用される D H E A－S はそれ単独で用いてもよいし、抗原性のあるキャリアタンパク質へ結合させた形で用いてもよい。キャリアタンパク質として使用されるタンパク質は抗原性さえあれば特にその種類が限定されるものではないが、アルブミンやブルーキャリアプロテイン（B C P）、キーホールリンペットヘモシアニン（K L H）、アビジンなどを用いることができる。また、キャリアタンパク質との結合のために D H E A－S へ導入されるリンカーに関しては特に限定されるものではないが、N－ヒドロキシエステルやイミドエステル、マレイミド、ピリジルジスルフィド、ヒドラジド、アルコキシアミンなどを用いることができる。また、これら以外のものでもキャリアタンパク質との反応性があれば特にその種類が限定されるわけではなく、ビオチンなどを用いることもできる。

【００１２】

免疫によって得られる抗体は D H E A－S との反応性を有していれば特にその種類やサブクラスが限定されるわけではなく、I g G 1 や I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、一本鎖抗体などを取得することができる。また、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体でもよく、これらの抗体の混合物であっても構わない。

【００１３】

このような免疫抗原を用いて I C R へ免疫した後、生成した抗 D H E A - S 抗体を回収することにより、反応特異性の高い抗体を得ることができる。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、反応特異性の高い抗 D H E A - S 抗体を取得することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】競合法による D H E A - S 測定の原理図である。

【図2】D H E A - S 類似化合物との交叉反応性を、各種マウスから得られた抗血清と比較した結果を示したものがある。

10

【実施例】

【0016】

以下、実施例によって本発明を具体的に示すが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【0017】

(1) 免疫抗原の調製

ウシ血清アルブミン（以下、B S A）を 1 0 0 m g 量り取り、1 0 m l の 5 0 m M ホウ酸緩衝液（p H 8 . 5）へ溶かした。次にリンカーが導入されている D H E A - S を 1 4 m g 量り取り、2 0 0 μ l のジメチルホルムアミドへ溶かした。その後、この D H E A - S 溶液を B S A 溶液へ加え、室温で 3 0 分反応させた。そして、この反応液を透析チューブの中へ入れてから P B S 溶液に対して透析し、未反応の D H E A - S を除去した。透析後は透析チューブの中から D H E A - S で標識された B S A を回収し、免疫用の抗原として利用した。

20

【0018】

(2) 実験動物への免疫

免疫動物として 3 系統（B A L B / c、A / J、I C R）のマウス（雌、4 週齢）を 7 匹ずつ用意した。次に 1 m g / m l の抗原溶液とフロイントコンプリートアジュバンドの 1 : 1 混合溶液を調製した。そして、この混合液を氷上で超音波にかけ、乳化させた。その後、この溶液を用意してあるマウスの腹腔へ 1 0 0 μ l ずつ注入し、免疫した。

初回の免疫を行った 1 週間後、下記の通り再度免疫を行った。まず、1 m g / m l の抗原溶液とフロイントインコンプリートアジュバンドの 1 : 1 混合溶液を調製した。そして、この混合液を氷上で超音波にかけ、乳化させた。その後、この溶液を用意してあるマウスの皮下へ 1 0 0 μ l ずつ注入し、免疫した。2 回目の免疫以降は、フロイントインコンプリートアジュバンドを用いたこの免疫作業を 1 週間おきに 3 か月間繰り返し行った。

30

【0019】

(3) 抗血清の性能評価

3 か月間の免疫後、免疫したマウスからそれぞれ少量採血した。そして、この血液から抗血清を調製し、D H E A - S と類似の構造をもつ化合物との交叉反応性をそれぞれ以下の通り評価した。

まず、調整した全ての抗血清についてそれぞれ以下の手順で検量線を作成した。初めに、アルカリホスファターゼ（以下、A L P）を標識した D H E A - S（以下、C J）を抗マウス I g G 抗体固定化粒子へ一定量加えて混ぜた。次に、D H E A - S 濃度が既知であるキャリブレーター溶液（C a l 1 ~ 6）を用意し、ここにそれぞれ一定量加えた。更に前述の抗血清の希釈液をここに一定量加え、1 0 分間インキュベーションした。その後、B / F 分離を行ってから A L P の基質を加え、固相に結合している C J から発せられるシグナルを検出した。そして、D H E A - S が全く含まれないキャリブレーター溶液（C a l 1）を加えた時のシグナル（B 0）を 1 0 0 % として、各キャリブレーター溶液（C a l 2 ~ 6）を加えた時のシグナル（B）をそれぞれ相対的な値 $[(B / B 0) \times 1 0 0]$ として算出した。D H E A - S 濃度を横軸（対数）、B / B 0（%）を縦軸にとり、各キャリブレーター溶液使用時の測定結果をプロットして検量線を作成した。なお、この一

40

50

連の操作は、東ソー社製 A I A - 6 0 0 I I を用いて 3 7 °C にて全自動で行った。

【 0 0 2 0 】

検量線作成後、C a l 1 に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう D H E A - S 類似化合物 (A n d - S、D H E A - G、D H E A) を加えた溶液 (C a l X、C a l Y、C a l Z とする) をそれぞれ作製した。そして、これらの溶液をそれぞれ C J と一緒に抗マウス I g G 抗体固定化粒子へ一定量加え、混ぜた。更に前述の抗血清の希釈液をここに一定量加え、1 0 分間インキュベーションした。その後 B / F 分離を行ってから A L P の基質を加え、固相に結合している C J から発せられるシグナルを検出した。そして、C a l 1 を加えた時のシグナル (B 0) を 1 0 0 % とし、C a l X、C a l Y、C a l Z を加えた時のシグナル (C r o s s B) を相対的な値 $[(C r o s s B / B 0) \times 100]$ として算出した。この値を先程作成した検量線上にそれぞれプロットし、各抗血清を使用した時に D H E A - S として誤って検出される濃度を求めた。そして、D H E A - S として誤って検出される D H E A - S 類似化合物量の割合 (交叉反応率) を計算した。なお、この一連の操作は、東ソー社製 A I A - 6 0 0 I I を用いて 3 7 °C にて全自動で行なった。

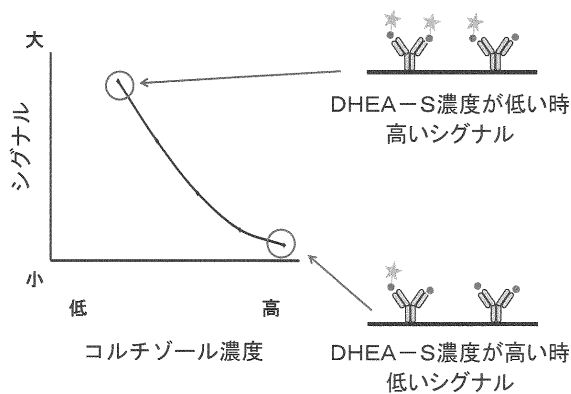
10

【 0 0 2 1 】

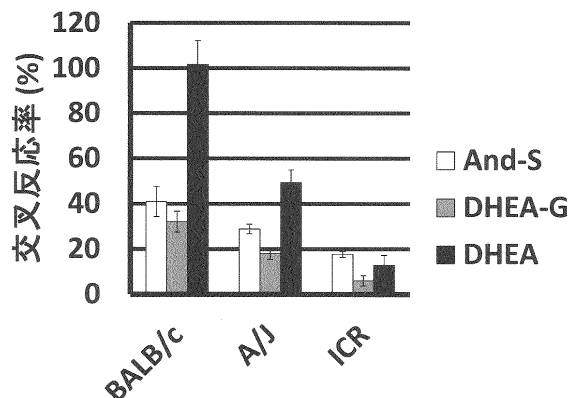
各種マウスから得られた抗血清を用い、上記の方法で D H E A - S 類似化合物 (A n d - S、D H E A - G、D H E A) との交叉反応率 (7 匹のマウスの平均値) を求めて比較した。実験の結果、I C R を免疫動物とすると、他の系統を用いた時と比較して、D H E A - S 類似化合物との交叉反応性の低い抗体が得られると分かった (図 2 参照)。以上の結果から、I C R を免疫動物として利用することにより、反応特異性の高い抗 D H E A - S 抗体を取得できることが明らかとなった。

20

【 図 1 】



【 図 2 】



专利名称(译)	抗脱氢表雄酮硫酸盐抗体		
公开(公告)号	JP2019064925A	公开(公告)日	2019-04-25
申请号	JP2017188143	申请日	2017-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	小林龍司		
发明人	小林 龍司		
IPC分类号	C07K16/26 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/26 G01N33/53.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供具有高反应特异性的抗脱氢表雄酮硫酸盐 (DHEA-S) 抗体。 抗脱氢表雄酮硫酸盐抗体的特征在于与脱氢表雄酮硫酸盐类似物化合物的交叉反应性为20%或更低，其中硫酸脱氢表雄酮用作ICR菌株中的抗原。通过免疫小鼠获得抗DHHEA-S抗体。 [选择图]图2

