

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6037043号
(P6037043)

(45) 発行日 平成28年11月30日(2016.11.30)

(24) 登録日 平成28年11月11日(2016.11.11)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40 Z N A
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 8 1
請求項の数 16 (全 20 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2015-544223 (P2015-544223)	(73) 特許権者	000003975
(86) (22) 出願日	平成27年8月7日(2015.8.7)		日東紡績株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/072468		福島県福島市郷野目字東1番地
(87) 国際公開番号	W02016/027697	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成28年2月25日(2016.2.25)		特許業務法人浅村特許事務所
審査請求日	平成27年9月4日(2015.9.4)	(72) 発明者	菊地 渉
(31) 優先権主張番号	特願2014-168934 (P2014-168934)		福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地
(32) 優先日	平成26年8月22日(2014.8.22)		日東紡績株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	笹川 久美子
			福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地
			日東紡績株式会社内
		(72) 発明者	野田 健太
			福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地
			日東紡績株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TRACP-5b (酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ5b) に特異的なタンパク定量法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

TRACP-5bの立体構造に依存したエピトープを認識し、その線状に並んだ一次構造から形成されるいかなるエピトープも認識せず、TRACP-5aに結合しないモノクローナル抗体。

【請求項2】

受託番号NITE BP-01866のハイブリドーマTrK-126。

【請求項3】

受託番号NITE BP-01867のハイブリドーマTrK-127。

【請求項4】

請求項2に記載のハイブリドーマが産生する請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】

請求項3に記載のハイブリドーマが産生する請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】

1つ又は複数の請求項1に記載のモノクローナル抗体を用いた免疫測定法により、検体中のTRACP-5bを検出するTRACP-5bの検出方法。

【請求項7】

請求項4及び5に記載のモノクローナル抗体を用いた免疫測定法により、検体中のTRACP-5bを検出する、請求項6に記載のTRACP-5bの検出方法。

【請求項8】

10

20

請求項 4 及び 5 に記載のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチアッセイ E L I S A により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、請求項 7 に記載の検出方法。

【請求項 9】

請求項 4 に記載のモノクローナル抗体及び請求項 5 に記載のモノクローナル抗体を用いた、化学発光酵素免疫測定法 (C L E I A 法) により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、請求項 7 に記載の検出方法。

【請求項 10】

請求項 4 に記載のモノクローナル抗体及び請求項 5 に記載のモノクローナル抗体を用いた、ラテックス凝集法 (比濁法) により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、請求項 7 に記載の検出方法。

10

【請求項 11】

骨吸収のマーカーとして骨疾患の臨床検査に用いる、請求項 6 から 10 までのいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 12】

1 つ又は複数の請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を構成成分として含む、 T R A C P - 5 b の検出に用いるためのキット。

【請求項 13】

請求項 4 に記載のモノクローナル抗体及び請求項 5 に記載のモノクローナル抗体を構成成分として含む、 T R A C P - 5 b の検出に用いるためのキット。

20

【請求項 14】

請求項 8 に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) 固相支持体；

(2) 請求項 4 に記載のモノクローナル抗体及び標識された請求項 5 に記載のモノクローナル抗体、あるいは請求項 5 に記載のモノクローナル抗体及び標識された請求項 4 に記載のモノクローナル抗体；及び

(3) 標識を検出するための成分；
を構成成分として含むキット。

【請求項 15】

請求項 9 に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) 磁気ビーズ；

(2) 請求項 4 に記載のモノクローナル抗体及び標識された請求項 5 に記載のモノクローナル抗体、あるいは請求項 5 に記載のモノクローナル抗体及び標識された請求項 4 に記載のモノクローナル抗体；及び

(3) 標識を検出するための成分；
を構成成分として含むキット。

30

【請求項 16】

請求項 10 に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) ラテックス粒子；及び

(2) 請求項 4 に記載のモノクローナル抗体及び請求項 5 に記載のモノクローナル抗体；
を構成成分として含むキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ 5 b (T R A C P - 5 b : 別名、破骨細胞由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ) に特異的なモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いた T R A C P - 5 b の検出方法、並びにこれに用いるキットに関する。

本発明のモノクローナル抗体によれば、骨吸収のマーカーとして骨疾患の医学的治療や臨床検査の分野において極めて有効である。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

血清中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (T R A C P : Tartrate Resistant acid Phosphatase EC3.1.3.2) はその大部分が破骨細胞由来の酸性ホスファターゼとされ、その測定は、破骨細胞の機能を評価する指標として有用とされており、骨吸収マーカーとして興味を持たれている (非特許文献 1)。一方、血清中の酸性ホスファターゼは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、原点より 0 ~ 5 の 6 つのバンドに分けられ、その中で 5 番目が酒石酸抵抗性であることから、 B a n d 5 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (T R A C P 5) と呼ばれている。これはさらに電気泳動により糖鎖へのシアル酸結合の多い 5 a と、ほとんどシアル酸結合のない 5 b に分けられる。そして、 5 a は血小板やその他のからの酵素であって血中値が変動しないのに対して、 5 b のみが骨吸収に伴い変動するため、 5 b が破骨細胞由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの本体であると考えられている (特許文献 1)。

10

なお、Clinical Chemistry誌 (非特許文献 2) でも破骨細胞由来の A C P を、 T R A C P - 5 b と略記することを勧めている。よって本明細書においても破骨細胞由来で骨吸収の指標となる A C P を意味するものは T R A C P - 5 b として、破骨細胞由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼと酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ 5 b を同義として T R A C P - 5 b と表記する。

【 0 0 0 3 】

破骨細胞の活性を表す酸性ホスファターゼの指標として T R A C P 活性を求める従来の活性測定法は、特異性、感度、測定の煩雑さおよび測定時間の点で問題を有している。

20

一般的に活性測定法による T R A C P - 5 b の測定は、酒石酸の存在下で合成基質としてリン酸エステルを用いて酵素反応により生ずる反応生成物 (アルコールやフェノール類) を比色定量することにより酵素活性を求めている。その際、酒石酸が前立腺由来酸性ホスファターゼを阻害し、残存した酸性ホスファターゼ活性を基質で測定することにより、 T R A C P 活性を T R A C P - 5 b 活性とみなして求めている。しかしながら、検体中に存在する破骨細胞由来以外の赤血球由来や血小板由来の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼも測定してしまうため、特異性の点で問題を有する。上記方法の改善法としては、血清を 5 倍に希釈した液を 3 7 ° C で 1 時間インキュベートする前処理をした後、残りの T R A C P 活性を、酒石酸存在下、基質として p - ニトロフェニルリン酸 (p N P P) を用いて測定する方法が知られている (非特許文献 3 及び非特許文献 4)。この方法は赤血球由来酸性ホスファターゼの影響は回避できるが、血小板由来酸性ホスファターゼの影響は除くことは出来ない。さらにより特異的な活性測定法として、本発明者らは、 T R A C P - 5 b と赤血球や血小板由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性がフッ素に対する感受性に差のあることを利用した T R A C P - 5 b 測定法を報告した (特許文献 2)。しかしながら、赤血球及び血小板由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの影響はないものの、 T R A C P - 5 a の影響を除くことができず、また T R A C P - 5 b 活性を総酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性からフッ素存在下で阻害されなかった活性を差し引きすることにより求めており、精度の点でさらなる改良が求められている。さらに上記フッ素を利用した方法に T R A C P - 5 a の阻害物質を組み合わせて用いることにより、より特異的に T R A C P - 5 b 活性を測定する方法が報告されている (特許文献 3)。しかしながら、フッ素のみを用いる方法より特異的ではあるものの、やはり差し引きで破骨細胞由来 T R A C P - 5 b 活性を求めているため同様に、精度の点で問題を残している。

30

40

【 0 0 0 4 】

ヒト T R A C P - 5 a と T R A C P - 5 b はともに 3 2 5 アミノ酸からなるヒト A C P 5 遺伝子 (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACP5>) 産物 (配列番号 1) 由来のイソフォームであり、 1 ~ 2 1 番目までの分泌シグナル配列が切除されて、 T R A C P - 5 a が形成されるのに対し、 T R A C P - 5 b はさらに、カテプシン K によって 1 6 2 ~ 1 8 1 番目までのペプチドが切除され、 1 6 1 番目のシステインと 2 1 9 番目のシステインが S S 結合を介して結合する約 1 6 k D a と約 2 3 k D a のサブユニット構造を有している。

50

【 0 0 0 5 】

免疫学的測定法による T R A C P - 5 b の測定方法として、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を用いた免疫測定法も知られている（非特許文献 5、非特許文献 6、非特許文献 7、非特許文献 8、非特許文献 9 及び非特許文献 10）。これらの方法は、T R A C P - 5 a および T R A C P - 5 b の両者を測定してしまうため、T R A C P - 5 a の影響を無視できない（非特許文献 11）。さらに、T R A C P - 5 b をより特異的に測定する免疫学的測定法が報告されている（特許文献 4）。この方法はより T R A C P - 5 b 活性に特異的であるが、測定に用いる抗体が T R A C P - 5 b に特異的ではなく、T R A C P - 5 a とともに反応するため、T R A C P - 5 a と T R A C P - 5 b の至適 pH の差を利用して活性測定で測定値を算出している。そのため、末期腎疾患などの T R A C P - 5 a が亢進している患者検体での影響が懸念され、また、健常者検体と骨吸収が亢進している患者検体での差が小さく、骨吸収マーカーとして感度は十分とは言えない（非特許文献 12）。

10

【 0 0 0 6 】

本願発明者らも、従前に T R A C P - 5 a と T R A C P - 5 b を識別できるモノクローナル抗体の作成を試みている（特許文献 6）。その結果一定の選択性を有する抗体の作成に成功しているもののその選択性については改良の余地があり、臨床試験に用いるためにはさらなる改良が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】特表 2002-510050 号公報

【特許文献 2】特開平 10 - 37198 号公報

【特許文献 3】特開 2001 - 231595 号公報

【特許文献 4】W099/50662 号公報

【特許文献 5】特表 2002-510050 号公報

【特許文献 6】特許第 4164804 号公報

【非特許文献】

【 0 0 0 8 】

【非特許文献 1】骨代謝マーカー，福永仁夫，中村利孝，松本俊夫編，メディカルレビュー社，1995

30

【非特許文献 2】Clin.Chem.47:1497.2001

【非特許文献 3】日大医誌.49:904-911.1990

【非特許文献 4】Clin.Chem.33:458-462.1987

【非特許文献 5】J Clin Endocrinol Metab.71:442-451.1990

【非特許文献 6】J Bone Miner Res.13:683-687.1998

【非特許文献 7】Immunol Lett.70:143-149.1999

【非特許文献 8】J Bone Miner Res.14:464-469.1999

【非特許文献 9】Clin Chem.45:2150-2157.1999

【非特許文献 10】Clin Chem.46:1751-1754.2000

40

【非特許文献 11】Calcif Tissue Int, on line 14, September, 2009

【非特許文献 12】Clin. Chim. Acta 301:147-158, 2000

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 9 】

かかる問題に鑑み、本発明は、骨吸収マーカーである破骨細胞由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（T R A C P - 5 b）に対して、さらに特異性と親和性の高いモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いた T R A C P - 5 b の検出方法およびそれに使用するキットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 1 0 】

上記糖鎖修飾の違いを含む T R A C P - 5 イソフォームを認識するという課題を解決するため、本願発明者らは、ヒト由来の T R A C P - 5 b ではなく、あえてヒトとは糖鎖修飾の異なるカイコにおいて絹糸腺中に産生させたりコンピナントヒト T R A C P - 5 b を用いて、特異性と親和性の高いモノクローナル抗体を取得し、その抗体について解析を行った。

【 0 0 1 1 】

即ち、本発明は本発明の構成は以下の [1] から [2 8] の通りである。

[1] T R A C P - 5 b の立体構造に依存したエピトープを認識し、その線状に並んだ一次構造から形成されるいかなるエピトープも認識しないモノクローナル抗体；

[2] 受託番号 N I T E B P - 0 1 8 6 6 のハイブリドーマ T r K - 1 2 6 ；

[3] 受託番号 N I T E B P - 0 1 8 6 7 のハイブリドーマ T r K - 1 2 7 ；

[4] [2] に記載のハイブリドーマが産生する [1] に記載のモノクローナル抗体；

[5] [3] に記載のハイブリドーマが産生する [1] に記載のモノクローナル抗体；

【 0 0 1 2 】

[6] 1 つ又は複数の [1] に記載のモノクローナル抗体を用いた免疫測定法により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する T R A C P - 5 b の検出方法；

[7] [4] 及び [5] に記載のモノクローナル抗体を用いた免疫測定法により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する [6] に記載の T R A C P - 5 b の検出方法；

[8] [4] に記載のモノクローナル抗体及び [5] に記載のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチアッセイ E L I S A により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、 [7] に記載の検出方法；

[9] [4] に記載のモノクローナル抗体及び [5] に記載のモノクローナル抗体を用いた、化学発光酵素免疫測定法 (C L E I A 法) により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、 [7] に記載の検出方法；

[1 0] [4] に記載のモノクローナル抗体及び [5] に記載のモノクローナル抗体を用いた、ラテックス凝集法 (比濁法) により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、 [7] に記載の検出方法；

[1 1] 骨吸収のマーカーとして骨疾患の臨床検査に用いる、 [6] から [1 0] のいずれかに記載の検出方法。

【 0 0 1 3 】

[1 2] 1 つ又は複数の [1] に記載のモノクローナル抗体を構成成分として含む、 T R A C P - 5 b の検出に用いるためのキット；

[1 3] [4] に記載のモノクローナル抗体及び [5] に記載のモノクローナル抗体を構成成分として含む、 T R A C P - 5 b の検出に用いるためのキット；

[1 4] [8] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) 固相支持体；

(2) [4] に記載のモノクローナル抗体及び標識された [5] に記載のモノクローナル抗体、あるいは [5] に記載のモノクローナル抗体及び標識された [4] に記載のモノクローナル抗体；及び

(3) 標識を検出するための成分；

を構成成分として含むキット；

[1 5] [9] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) 磁気ビーズ、

(2) [4] に記載のモノクローナル抗体及び標識された [5] に記載のモノクローナル抗体、あるいは [5] に記載のモノクローナル抗体及び標識された [4] に記載のモノクローナル抗体；及び

(3) 標識を検出するための成分；

を構成成分として含むキット；

[1 6] [1 0] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) ラテックス粒子 ; 及び

(2) [4] に記載のモノクローナル抗体及び [5] に記載のモノクローナル抗体 ;
を構成成分として含むキット。

【 0 0 1 4 】

[1 7] カイコ絹糸腺中に産生され、カイコ特異的な糖鎖修飾を受けたりコンビナントヒト T R A C P - 5 b を抗原とした抗体であって、T R A C P - 5 b の立体構造に依存したエピトープを認識し、その線状に並んだ一次構造から形成されるいかなるエピトープを認識しないモノクローナル抗体 ;

[1 8] [2] または [3] に記載のハイブリドーマが産生する、[1 7] に記載の抗体 ;

10

[1 9] 赤血球、血小板、好中球および前立腺由来の酸性ホスファターゼに対しては実質的に交差反応性を示さない、[1 7] または [1 8] のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【 0 0 1 5 】

[2 0] [1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いて免疫測定法により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する T R A C P - 5 b の検出方法 ;

[2 1] [1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチアッセイ E L I S A により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、[2 0] に記載の検出方法 ;

[2 2] [1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いた、化学発光酵素免疫測定法 (C L E I A 法) により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、[2 0] に記載の検出方法 ;

20

[2 3] [1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いた、ラテックス凝集法 (比濁法) により、検体中の T R A C P - 5 b を検出する、[2 0] に記載の検出方法 ;

[2 4] 骨吸収のマーカーとして骨疾患の臨床検査に用いる、[2 0] から [2 3] のいずれかに記載の検出方法。

【 0 0 1 6 】

[2 5] [1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体を構成成分として含む、T R A C P - 5 b の検出に用いるためのキット ;

30

[2 6] [2 1] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、固相支持体、[1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体、標識された他の別な T R A C P - 5 b に対する抗体、および標識を検出するための成分を構成成分として含むキット ;

[2 7] [2 2] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、磁気ビーズ、[1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体、及び標識された他の別な T R A C P - 5 b に対する抗体、および標識を検出するための成分を構成成分として含むキット ;

[2 8] [2 3] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、ラテックス粒子 ; 及び [1 7] から [1 9] のいずれかに記載のモノクローナル抗体を構成成分として含むキット。

40

【 発明の効果 】

【 0 0 1 7 】

本発明によって、生体試料中の T R A C P - 5 b を従来法より効率よく検出定量することが可能であり、様々な疾患の診断の一助とすることが出来る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 E L I S A 測定法による T R A C P - 5 b 測定

【 図 2 】 E L I S A 測定法における特異性検定

【 図 3 】 C L E I A 法による T R A C P - 5 b 測定

【 図 4 】 C L E I A 法における特異性検定

50

【図5】ラテックス凝集法によるTRACP-5b測定

【図6】ACP5 (TRACP-5) アミノ酸配列、及び各種修飾予想部位

【図7】<比較例>Trk-62とTrk-49のエピトープマッピング

【図8】<比較例>Trk-62とTrk-49のエピトープ部位

【図9】Trk-126とTrk-127のエピトープマッピング

【図10】Trk-126とTrk-127を用いたTRACP-5bのドットブロッキングとウェスタンブロッティング

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明のモノクローナル抗体は、組み換えヒトTRACP-5bを免疫原として使用することにより得ることができる。本明細書の以後に記載する実施例では遺伝子組み換えカイコから精製しているが、培養細胞、大腸菌など、ヒトTRACP-5bを発現できる宿主であれば、限定されない。

10

本発明のモノクローナル抗体は、例えば精製ヒトTRACP-5bを免疫原として動物を免疫し、その動物が産生する抗ヒトTRACP-5b抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞とを融合させることによって得られるハイブリドーマによって産生される。

【0020】

上記ハイブリドーマは以下の方法によって得ることができる。即ち、上述のようにして得たヒトTRACP-5bを、フロイントの完全、不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、百日咳アジュバント等の既に公知のものを用いて共に混和し、感作用アジュバント液を作製して数回に分けてマウス、ラット等の動物に1～3週間おきに腹腔内皮下、または尾静脈投与することによって免疫する。感作抗原量は1μg～100mgの間とされているが、一般的には50μg程度が好ましい。免疫回数は2～7回が一般的であるがさまざまな方法が知られている。次いで脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞（ミエローマ細胞）等の試験管内で増殖能力を有する細胞とを融合する。抗体産生細胞はマウス、ヌードマウス、ラットなどの脾臓等より得ることができる。

20

上記融合法としては、既にそれ自体公知であるケーラーとミルスタインの定法(Nature, 256,495,1975)によってポリエチレングリコール(PEG)を用いることで融合できる。センダイウィルス、電気融合法によっても融合を行うことができる。

【0021】

30

上記融合した細胞からヒトTRACP-5bを認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択する方法としては以下のようにして行うことができる。即ち、上記融合した細胞から限界希釈法によってHAT培地およびHT培地で生存している細胞により作られるコロニーからハイブリドーマを選択する。96穴ウェルなどにまかれた融合細胞からできたコロニー培養上清中にヒトTRACP-5bに対する抗体が含まれている場合には、ヒトTRACP-5bをプレート上に固定化したアッセイプレート上に上清をのせ、反応後に抗マウスイムノグロブリン-HRP標識抗体等の2次標識抗体を反応させるELISA法により、ヒトTRACP-5bに対するモノクローナル抗体産生クローンを選択できる。標識抗体の標識物質にはHRPの他、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素、蛍光物質、放射性物質等を用いることができる。またコントロールとしてブロッキング剤であるBSAのみを結合したアッセイプレートによるELISAを同時に行うことでヒトTRACP-5b特異的抗体のスクリーニングができる。つまりヒトTRACP-5bプレートで陽性であり、BSAによるELISAで陰性のクローンを選択できる。

40

【0022】

本発明のハイブリドーマとしては、ヒトTRACP-5bを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのうち、特にヒトTRACP-5bと反応し、かつ赤血球、血小板、好中球、前立腺由来の酸性ホスファターゼと交差反応しないモノクローナル抗体を産生するものが望ましい。

特に本発明のモノクローナル抗体としては、臨床検査に用いた時その検査結果が骨吸収をより明確に反映するために、検出系中でヒトTRACP-5aと結合せず、TRACP

50

- 5 bのみを認識結合するモノクローナル抗体が好ましい。

ここで「ヒトTRACP - 5 bに結合し、ヒトTRACP - 5 aに結合しない」とは、当該技術分野における検出系（たとえば、サンドイッチアッセイELISA）において、ヒトTRACP - 5 aよりもヒトTRACP - 5 bに対して検出系中で、約100倍以上、より好ましくは約500倍以上の反応性を示すものであることを示す。

【0023】

上記ハイブリドーマは通常細胞培養に用いられる培地、例えば α -MEM、RPMI 1640、ASF、S-cloneなどで培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を回収することができる。またハイブリドーマが由来する動物、ヌードマウスをあらかじめプリスタン処理しておき、その動物に細胞を腹腔内注射することによって腹水を貯留させ、その腹水からモノクローナル抗体を回収することもできる。

上記の上清、腹水よりモノクローナル抗体を回収する方法としては、通常の方法を用いることができる。たとえば硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析法やクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA、プロテインGなどによるアフィニティークロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0024】

本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫測定法によって検体中のTRACP - 5 bを高感度で且つ特異的に検出することができる。対象となる検体としては、検体から採取、単離された血液、血清、血漿、骨などの組織等が挙げられる。

本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫測定法による検出方法としては、サンドイッチアッセイELISA法、化学発光酵素免疫測定法（CLEIA法）、ラテックス凝集法（比濁法）、組織免疫染色法等が挙げられる。

【0025】

TRACP - 5 bの酵素活性の測定を利用した免疫測定法としては、例えば、検体、例えば血清中のTRACP - 5 bを、本発明のモノクローナル抗体に結合させ、結合したTRACP - 5 bに対して、TRACP - 5 bの酵素基質、例えばp-ニトロフェニルリン酸またはその塩を酵素反応させて、その酵素活性を測定することにより検体中のTRACP - 5 bを免疫測定できる方法が挙げられる。その方法においては、具体的には、TRACP - 5 bを以下のようにして測定できる。まず、固相支持体に吸着している本発明のモノクローナル抗体に、測定すべき検体を加え、検体中のTRACP - 5 bと抗体とを抗原抗体反応させてTRACP - 5 bを抗体に結合させる。次いで、その固相支持体を洗浄液で洗浄して、抗体に吸着しなかった検体由来の成分を除去した後、反応系にTRACP - 5 bの酵素基質、例えばp-ニトロフェニルリン酸またはその塩を加え、抗体に結合しているTRACP - 5 bと基質とを反応させる。反応停止液で酵素反応を停止した後、反応により生成したフェノール類、例えば、p-ニトロフェノールを、通常390nm~450nm、好ましくは400~430nmの波長で吸光度を測定する。その吸光度の大きさは、TRACP - 5 b酵素活性を反映するので、その値から、検体中のTRACP - 5 bを測定できる。

本発明では、上記した測定法から明らかな通り、抗体は固相支持体に結合させて用いるのが好ましく、固相支持体としては、通常、ELISA法等の固相免疫測定法に用いる固相支持体が用いられるが、特に限定されない。例えば、固相支持体の材料として、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネイト、ポリエチレン、ナイロン、メタアクリレートなどが挙げられる。固相支持体の形状としては、プレート、（磁気）ビーズ、ラテックス粒子等が挙げられる。

固相支持体に吸着している抗体を調製するには、直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーを利用して固相支持体にTRACP - 5 bに対する抗体を結合させる。感作抗体量は、1ng~100mg/mlの範囲であることが多い。

固相支持体としての（磁気）ビーズを用いて、化学発光酵素免疫測定法（CLEIA法）を行う場合は、通常化学発光酵素免疫測定法（CLEIA法）で用いられる試薬、キットなどを使用しうる。

10

20

30

40

50

固相支持体としてのラテックス粒子を用いて、ラテックス凝集法を行う場合は、通常のラテックス凝集法で用いられる試薬、キットなどを使用しうる。

【0026】

本発明の測定方法を実施するときは、TRACP-5bを免疫測定するためのキットであって、i) 固相支持体、ii) 本発明抗体を含むキットを用いて行える。

このキットにおいては、i) 固相支持体、ii) 本発明抗体に関しては、固相支持体と抗体溶液とを別々に作製しておき、TRACP-5bを測定する際、抗体を固相支持体に吸着させてもよく、あらかじめ、抗体を固相支持体に吸着させた状態で提供してもよい。このキットにおいては、検体中のTRACP-5bを抗体に結合させた後、固相支持体に吸着しなかった成分を除去するために、洗浄液を含むことが好ましい。洗浄液としては、例えば、界面活性剤を含むトリス緩衝液を使用することができる。

10

さらに、本発明のキットには、必要に応じ、検体希釈液を加えて含むこともできる。検体希釈液としては、例えば、トリス等の緩衝液を使用できる。その緩衝液には、必要に応じて、EDTA・2Na等のキレート剤、食塩等の無機塩を加えてもよい。

【0027】

本発明においては、本発明のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチアッセイELISA法により、TRACP-5bを測定することもできる。この場合、モノクローナル抗体として、本発明抗体以外に、他のTRACP-5bに対する別な抗体も用いて実施することができる。サンドイッチアッセイによるTRACP-5bを測定する方法の具体例は、以下の通りである。まず、一次抗体として本発明抗体を、固相支持体、例えば、プレートに吸着させ、検体、例えば、血清中のTRACP-5bと反応させ、固相支持体を洗浄し、次いで、吸着したTRACP-5bと、ビオチン化した2次抗体、例えばビオチン化した別なTRACP-5bに対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体とを反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、ペルオキシダーゼ酵素反応、次いで、発色反応を行うことにより、TRACP-5bを検出することができる。また、2次抗体を直接ペルオキシダーゼやアルカリ性ホスファターゼ等により酵素標識したものをを用いることにより、同様の測定をすることができる。また、2次標識抗体に結合させる物質は測定方法によって酵素に限られるものではなく、放射線同位元素、蛍光物質、磁性物質、コロイドなどでもよい。

20

【0028】

本発明において、本発明抗体を用いたサンドイッチアッセイELISAを行うときは、サンドイッチアッセイELISA用のキットを用いて実施することができる。

30

サンドイッチアッセイELISA法で本発明の測定方法を実施するときは、例えば、TRACP-5bを免疫測定するためのキットであって、i) 固相支持体、ii) 本発明抗体、iii) 標識された、別なTRACP-5bに対する抗体、及びiv) 標識を検出するための成分を含むキットを用いることによっても、TRACP-5bを測定することができる。

標識を検出するための成分とは、抗体が標識されたものを測定するための成分で、標識がビオチンの場合、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、テトラメチルベンジジンのペルオキシダーゼ酵素基質、及び過酸化水素を含む試薬であり、標識がアルカリホスファターゼの場合、p-ニトロフェニルリン酸を含む試薬である。このキットには、必要に応じて、洗浄液を含んでいてもよい。

40

本発明において、このキットを使用するときは、検体中のTRACP-5bを抗体に結合させた後、固相支持体に吸着しなかった成分を除去するために、洗浄液を含むことが好ましい。洗浄液としては、例えば、界面活性剤を含むトリス緩衝液を使用することができる。さらに、本発明のキットには、必要に応じ、検体希釈液を加えて含むこともできる。検体希釈液としては、例えば、トリス等の緩衝液を使用できる。その緩衝液には、必要に応じて、EDTA・2Na等のキレート剤、食塩等の無機塩を加えてもよい。

【0029】

更に本発明においては、検体中のTRACP-5bの存在を、本発明のモノクローナル

50

抗体を利用した組織免疫染色法によって検出することもできる。即ち、例えば、ヒトの破骨細胞組織などから通常の方法により、例えば凍結切片を調製し、これに本発明のモノクローナル抗体を反応させ、次いで例えば、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素で標識した二次抗体と反応させ、次いで発色させることにより、T R A C P - 5 b の存在を特異的に検出することができる。

このような、組織免疫染色法による検出は、i) 本発明のモノクローナル抗体、i i) 標識された二次抗体および i i i) 発色試薬を構成成分として含むキットを用いて実施できる。標識された二次抗体としては、例えばペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素で標識した、動物由来の抗 I g G 抗血清、抗 I g G ポリクローナル抗体などが挙げられ、発色試薬としては、標識に用いた酵素を発色するための通常用いられる発色基質などの試薬が用いられる。

10

【 0 0 3 0 】

本発明において、本発明抗体を用いた化学発光酵素免疫測定法 (C L E I A 法) やラテックス凝集法を行う場合は、公知の化学発光酵素免疫測定法 (C L E I A 法) 用キットやラテックス凝集法用のキットを用いて実施することができる。

【 0 0 3 1 】

エピトープ (epitope) とは、抗体が認識する抗原の一部分のことを指す。完全長 T R A C P - 5 自体は 3 2 5 アミノ酸から形成されるが、抗体はその全体を認識するわけではなく、抗原の比較的小さな一部分のみを認識して結合する。エピトープとして機能するためには少なくとも 1 0 アミノ酸残基、より好ましくは 5 アミノ酸残基の長さが必要である。この抗体結合部分を「エピトープ」又は「抗原決定基 (antigenic determinant)」とも呼ぶ。

20

「エピトープ」を認識するとは、そのエピトープを含む抗原が、立体構造を保持、または立体構造がほどこれたいずれかの条件下において、該エピトープ部分に対応する抗体が結合できることを言う。また「エピトープ」を認識しないとは、抗原が立体構造を保持した、および立体構造がほどこれたいずれの条件下においても、対応する抗体が実質的に結合しないことを意味する。

本発明における立体構造とは、アミノ酸配列を意味する一次構造、それが折りたたまれて形成されるヘリックスやβ—シートなどを含む二次構造、二次構造をもったポリペプチドがさらに折りたたまれた三次構造、および三次構造をもった複数のポリペプチド間で会合し空間的配置を形成することからなる四次構造のことを指し、好ましくは該抗原が通常存在すると考えられる生体内環境もしくはそれに類した環境において該抗原がとり得る構造を言う。

30

【実施例】

【 0 0 3 2 】

以下の実施例、比較例及び参考例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【 0 0 3 3 】

< 実施例 1 >

(1) モノクローナル抗体作製用抗原の選択と準備

40

抗ヒト T R A C P モノクローナル抗体作成のための抗原として、遺伝子組換えカイコ絹糸腺中に産生させたりコンビナント T R A C P - 5 b を準備した。リコンビナント T R A C P - 5 b の調製法は特許 5 1 7 7 4 3 1 号公報に記載される方法にて作製した。

ヒトリコンビナント T R A C P - 5 b を含む遺伝子組み換えカイコより絹糸腺を摘出し、3 0 0 g の絹糸腺を得た。絹糸腺を緩衝液 (5 0 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5) 5 6 0 0 m L 中に懸濁させ、ローターステーター型ホモジナイザーによってホモジナイズした。その後 1 0 , 0 0 0 r p m , 2 0 分遠心分離し、その上清を C M - S e p h a r o s e カラム (φ 4 0 m m × 4 0 c m) (G E ヘルスケア) にアプライし、吸着したタンパク質を N a C l を含む上記トリス緩衝液の直線濃度勾配 (0 - 1 . 0 M N a C l) で溶出した。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性は、基質パラニトロフェニルリン酸を用い

50

測定し、活性の高い部分をプールした。それを濃縮後、0.7 M NaClを含む20 mM トリス緩衝液 pH 7.2 に透析し、Superdex S200 カラム (ϕ 16 mm $\times$ 60 cm) (GEヘルスケア) にアプライし、同様に溶出したフラクションの酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性を測定し、活性部分をプールした。それを20 mM トリス緩衝液 pH 7.2 で2倍に希釈し、HiTrap Heparin HP カラム (5 mL) (GEヘルスケア) にアプライし、吸着したタンパク質をNaClを含む上記20 mM トリス緩衝液 pH 7.2 の直線濃度勾配 (0.35 M - 1 M NaCl) 塩濃度勾配にかけ溶出した。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ高活性フラクションをプールし、濃縮することにより、精製ヒトリコンピナント TRACP-5b を1.2 mg 得た。

なお、タンパク量はA₂₈₀により確認し、純度はSDS-PAGEを行い銀染色の結果、分子量35,000付近でシングルバンドであることにより確認した。単一バンドになった酵素は精製TRACP-5bとして免疫抗原とした。

【0034】

(2) 免疫

精製ヒト組換えTRACP-5bを1 mg/mlとなるように20 mM Tris-HCl, pH 7.2 で希釈し、50 μ g (50 μ l)をとってフロインド完全アジュバンド (WAKO) 50 μ l と乳化するまでよく混和した。調製した懸濁液をBalb/c 6週齢雌マウス (日本クレア) にジエチルエーテル麻酔下にて腹腔内投与した。2週間後には同量のTRACP-5b (50 μ g/ml) をフロインド不完全アジュバンド (WAKO) と混和してフロインド完全アジュバンドの時と全く同様の操作により乳化懸濁液とし、それぞれマウスに感作した。以降2週間後に同様の操作を行い、4回目には最終免疫としてTRACP-5b 50 μ g/mlを20 mM Tris-HCl, pH 7.2 で調製しマウス尾静脈注射により投与した。

【0035】

(3) ハイブリドーマの確立

最終免疫より3日後にTRACP-5bにより感作済みのマウスよりジエチルエーテル麻酔下に外科的摘出された脾臓を無菌的に分散し脾臓細胞を調製した。融合はケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495, 1975) に従って行われ、ポリエチレングリコール (PEG 4000) (MERK) を用いて脾細胞と骨髓腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) を融合した。その融合比率は脾臓細胞数 8×10^7 個に対して骨髓腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 2×10^7 個で、4:1であった。融合細胞は10% FCS (INVITROGEN) α -MEM (GIBCO) HAT (コスモバイオ) 培地に分散し48穴マイクロタイターカルチャープレート (住友ベークライト) に分注して37、5% CO₂ 条件にて培養した。以下の検討に用いたハイブリドーマ数は3000であった。

【0036】

(4) スクリーニング

約2週間後にコロニーの生育を確認してスクリーニングを実施した。スクリーニングの実施法を以下に述べる。

スクリーニング用プレートを作製するために上記(1)にて精製したTRACP-5bを20 mM Tris-HCl, pH 7.2 緩衝液中に溶解し、0.5 μ g/100 μ l/wellとなるように96穴ウエルプレート (Nunc) に分注した。プレートを4で2晩静置した後に0.05% Tween-20を含むトリス緩衝液で3回洗浄し、非特異的反応を抑えるために1.5% BSA溶液を200 μ l分注して、更に4で1晩静置した。完成したプレートを0.05% Tween-20を含むトリス緩衝液で3回洗浄した後に培養上清100 μ lを反応させ、更に洗浄を行った後に2次抗体であるHRP標識抗マウスIgMノグロブリン抗体 (INVITROGEN) を加えて反応させた。洗浄後にHRPの発色基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (TMB) (カイノス) を100 μ l加えて一定時間の発色後、1 N 硫酸を停止液として更に100 μ l添加し、測定波長450 nmにて吸光度を測定した。上記のようにして陽性になったクロー

10

20

30

40

50

ン（２９クローン）は限界希釈法によって再クローニングされ上清を再度チェックした。

【００３７】

（５）抗体の確認

ＥＬＩＳＡによって精製ＴＲＡＣＰ－５ｂとの反応性を確認すると、上記２９クローン中クローンＴｒＫ－１２６、ＴｒＫ－１２７ではアフィニティーに差があったが、プレートと感度よく反応した。その結果、クローンＴｒＫ－１２６、ＴｒＫ－１２７をＴＲＡＣＰ－５ｂを認識したものとして選択した。得られた抗体をモノクローナル抗体タイピングキット（ＲＯＣＨＥ）にて検定した結果、以下の表１のような結果であった。

【表１】

クローンの特性

クローン名	クラス	軽鎖
ＴｒＫ－１２６	ＩｇＧ１	κ
ＴｒＫ－１２７	ＩｇＧ１	κ

10

【００３８】

上記ハイブリドーマＴｒＫ－１２６及びＴｒＫ－１２７は、２０１４年６月６日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構内特許微生物寄託センターに対して受領番号ＮＩＴＥＡＢＰ－０１８６６（ＴｒＫ－１２６）及びＮＩＴＥＡＢＰ－０１８６７（ＴｒＫ－１２７）で受領され、２０１４年６月２３日生存確認後、受託番号ＮＩＴＥＢＰ－０１８６６（ＴｒＫ－１２６）及びＮＩＴＥＢＰ－０１８６７（ＴｒＫ－１２７）が付与された（受託証２０１４年６月３０日発行）。

20

以下に、寄託を特定する内容を記載する。

〔１〕寄託機関の名称・あて名

名称：独立行政法人 製品評価技術基盤機構産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター

あて名：日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８（郵便番号２９２－０８１８）

〔２〕寄託日：２０１４年６月６日

〔３〕受託番号 ＮＩＴＥ ＢＰ－０１８６６（ハイブリドーマＴｒＫ－１２６）
 ＮＩＴＥ ＢＰ－０１８６７（ハイブリドーマＴｒＫ－１２７）

30

【００３９】

（６）モノクローナル抗体の作製及び精製

上記（５）で得られたハイブリドーマＴｒＫ－１２６、ＴｒＫ－１２７ 1×10^7 細胞個をプリスタン（シグマ アルドリッチ）０．５ｍｌ投与後２週間の、１０週齢、Ｂａ１ｂ／ｃ雌マウス（日本クレア）に腹腔内投与し、約２週間後にマウス腹腔内に貯留した腹水をジエチルエーテル麻酔下にて外科的に採取した。上記（４）のスクリーニングで行ったＥＬＩＳＡ法により、腹水をサンプルとして段階希釈して確認すると高濃度のモノクローナル抗体が含まれていた。この腹水を硫酸４０％で処理し、ＰＢＳに透析した後、プロテインＧカラム（ＧＥヘルスケア）により精製してＳＤＳ－ＰＡＧＥにより確認した。するとＴｒＫ－１２６、ＴｒＫ－１２７ともに非還元では分子量約１５０，０００に単一の、メルカプトエタノール還元では分子量約５０，０００のバンドと２５，０００の２本のバンドが確認された。精製された抗体はＴｒＫ－１２６、ＴｒＫ－１２７ともにマウス１匹あたり約１０ｍｇまたはそれ以上であって工業的利用を行うには十分量であった。

40

【００４０】

（７）サンドイッチＥＬＩＳＡ測定法によるＴＲＡＣＰ－５ｂ測定と特異性検定

モノクローナル抗体ＴｒＫ－１２６、ＴｒＫ－１２７を使用して、サンドイッチＥＬＩＳＡ測定法によるＴＲＡＣＰ－５ｂ測定試薬を作製した。また、本測定法の特異性を調べるためにＮａｔｉｖｅ－ＴＲＡＣＰ－５ｂ、ＴＲＡＣＰ－５ａを用いて下記の実験を行い、公知のモノクローナル抗体ＴｒＫ－６２及びＴｒＫ－４９を用いたＴＲＡＣＰ－５ｂサンドイッチＥＬＩＳＡ測定法と比較した（日本特許第４１６４８０４号公報）。測定方法

50

は以下のとおりである。

固相プレート (Nunc) 上に Protein G を利用して精製したモノクローナル抗体 TrK - 126 を $2 \mu\text{g} / \text{well}$ になるように分注し、4 で2日間静置した。0.05% Tween 20を含む20mM Tris (pH 7.5) 洗浄液にて3回洗浄した後、1.5% BSA Tris (pH 7.5) を $200 \mu\text{L}$ 加えて4で一晩ブロッキングした。標識抗体は前出と同様の方法で精製したモノクローナル抗体 TrK - 127 を HRP Labeling Kit - NH2 (同仁化学) を用いて、ALP 標識した。ここで、標識抗体濃度は $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ とした。

【0041】

このようにして作製したプレートと標識抗体を使用し、サンドイッチ ELISA 測定法による TRACP - 5b 測定の有用性を評価した。具体的には、含有 TRACP - 5b を算出したヒト血清由来の TRACP - 5b 試料を $50 \mu\text{l}$ を抗体結合プレート上に加えた。室温で1時間反応させ、反応終了後、前出の洗浄液にて3回洗浄して $100 \mu\text{l}$ の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識した二次抗体を加えた。さらに室温で1時間反応させ、反応終了後、前出の洗浄液にて3回洗浄して $100 \mu\text{l}$ の3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (TMB) (カイノス) を $100 \mu\text{l}$ 加えて一定時間の発色後、1N 硫酸を停止液として更に $100 \mu\text{l}$ 添加し、測定波長 450nm にて吸光度を測定した。

【0042】

測定の結果、本発明で得られた抗体を用いた測定系において TRACP - 5b の濃度依存的に吸光度が上昇することを確認した (図1)。

【0043】

同様に、ヒト血清由来の TRACP - 5b のみ終濃度 $25 \text{ng} / \text{mL}$ にあわせた試料、あるいは TRACP - 5b 及び TRACP - 5a をそれぞれ終濃度 $25 \text{ng} / \text{mL}$ にあわせた試料 $50 \mu\text{l}$ を抗体結合プレート上に加えた。室温で1時間反応させ、反応終了後、前出の洗浄液にて3回洗浄して $100 \mu\text{l}$ の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識した二次抗体を加えた。さらに室温で1時間反応させ、反応終了後、前出の洗浄液にて3回洗浄して $100 \mu\text{l}$ の3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (TMB) (カイノス) を $100 \mu\text{l}$ 加えて一定時間の発色後、1N 硫酸を停止液として更に $100 \mu\text{l}$ 添加し、測定波長 450nm にて吸光度を測定した。

【0044】

測定の結果、公知の TRACP - 5b サンドイッチ ELISA 測定法 (特許第416804号公報) は Native - TRACP - 5b、TRACP - 5a 共に反応性を示したが TrK - 126, TrK - 127 によるサンドイッチ ELISA 測定法は TRACP - 5b 特異的に反応性を示すことが確認された (図2)。

【0045】

(8) 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA法) による TRACP - 5b 測定

モノクローナル抗体 TrK - 126, TrK - 127 を使用して、磁気ビーズを用いた TRACP - 5b 測定試薬を作製した。また、本測定法の特異性を調べるために公知の方法 (特許第416804号公報) に用いられている抗体を同様の測定試薬を作製し、Native - TRACP - 5b、TRACP - 5a に対する反応性を比較した。測定方法は以下のとおりである。

5mg の TrK - 126 または TrK - 62 を Dynabeads Antibody Coupling Kit (INVITROGEN) により磁気ビーズに感作させた。標識抗体として、 $200 \mu\text{g}$ の TrK - 127 または TrK - 49 を Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH2 (同仁化学) を用いて、ALP 標識した。ここで、標識抗体濃度は $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ とした。

【0046】

上記で作成した磁気ビーズと標識抗体を使用し、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA法) による TRACP - 5b 測定の有用性を評価した。具体的には、含有 TRACP - 5b を算出したヒト血清試料 $30 \mu\text{l}$ に $2 \mu\text{g}$ の抗体感作磁気ビーズに加え、約20分攪拌

10

20

30

40

50

した。磁石により磁気ビーズを集積させながら0.05% Tween 20を含む20 mM Tris (pH 7.5) 洗浄液にて3回洗浄した後、ALP標識抗体を1 µg含む0.05% Tween 20を含む20 mM Tris (pH 7.5)を加え約20分撪拌した。磁石により磁気ビーズを集積させながら0.05% Tween 20を含む20 mM Tris (pH 7.5) 洗浄液にて3回洗浄した後、ALPの基質であるAMP PD (和光純薬)を100 µl加えた。室温で約5分撪拌し、波長477 nmに発光極大を持つ光の発光量を測定した。

【0047】

測定の結果、本発明で得られた抗体を用いた測定系においてTRACP-5bの濃度依存的に発光カウントが上昇することを確認した(図3)。

10

【0048】

同様にヒト血清由来のTRACP-5bのみを終濃度25 ng/mLにあわせた試料、あるいはTRACP-5b及びTRACP-5aをそれぞれ終濃度25 ng/mLにあわせた試料30 µlに2 µgの抗体感作磁気ビーズに加え、約20分撪拌した。磁石により磁気ビーズを集積させながら0.05% Tween 20を含む20 mM Tris (pH 7.5) 洗浄液にて3回洗浄した後、ALP標識抗体を1 µg含む0.05% Tween 20を含む20 mM Tris (pH 7.5)を加え約20分撪拌した。磁石により磁気ビーズを集積させながら0.05% Tween 20を含む20 mM Tris (pH 7.5) 洗浄液にて3回洗浄した後、ALPの基質であるAMP PD (和光純薬)を100 µl加えた。室温で約5分撪拌し、波長477 nmに発光極大を持つ光の発光量を測定した。

20

【0049】

測定の結果、公知の測定法(日本特許登録番号416804)はNative-TRACP-5b、TRACP-5a共に反応性を示したがTrK-126, TrK-127によるサンドイッチELISA測定法はTRACP-5b特異的に反応性を示すことが確認された(図4)。

【0050】

(9) ラテックス凝集法によるTRACP-5b測定

モノクローナル抗体TrK-126, TrK-127を使用して、2種類のモノクローナル抗体をラテックスに感作し、ラテックス試薬を作製した。ラテックス試薬作製は下記のように行った。

30

1%ラテックス懸濁液2 mLと、0.1 mg/mL TrK-126及びTrK-127抗体溶液2 mLとを混合し、約1時間撪拌した。遠心後、沈殿を1%BSA溶液に懸濁し、再度約1時間撪拌した。再び遠心後、沈殿をPBS溶液中に懸濁し、ラテックス試薬を得た。

上記で調製したラテックス試薬を用いて、ラテックス免疫凝集測定(LATEX測定)によりヒト血清中のTRACP-5bを定量可能なことを確認した。

【0051】

具体的には、含有TRACP-5bを算出したヒト血清試料35 µlに対しTris緩衝液を含む第一試薬100 µl、作製したラテックス試薬を含む第二試薬100 µlを反応させ、日立7180型自動分析装置を用いて、主波長570 nm、副波長800 nmにて19-34測光ポイント間(第二試薬添加後約1分後から5分後に相当)において、2ポイントエンド法による吸光度変化量を測定した。結果として、図5に示すように、TRACP-5b濃度依存的な吸光度上昇が確認された。

40

【0052】

<比較例1>

TrK-62、TrK-49のエピトープの同定

(1) ペプチドスライドの作成(Replitope)

NCBIデータベースより取得したACP5 (TRACP-5) アミノ酸配列(配列番号1)及び文献にて報告されている各種修飾予想部位は図6の通りである。

50

20～325A．Aについて、JPT社ペプチドスライドサービス（Replitope，フナコシhttp://www.funakoshi.co.jp/news/071201spdf/071201s_p24.pdf）にて、10A．A．刻みのペプチドに分けてスポットを依頼した（表2；配列番号2～61）。

【表2】

作成したペプチド群

01) DGATPALRFV	03) AVGDWGGVPN	05) APFHTAREMA	07) NAKEIARTVQ	09) ILGADFILSL
02) ALRFVAVGDW	04) GGVNPAPFHT	06) AREMANAKEI	08) ARTVQILGAD	10) FILSLGDNFY
11) GDNFYFTGVQ	13) DINDKRFQET	15) FEDVFSRSL	17) RKVPWYVLG	19) NHDHLGNVSA
12) FTGVQDINDK	14) RFQETFEDVF	16) SDRSLRKVPW	18) YVLAGNHDHL	20) GNVSAQIAYS
21) QIAYSKISKR	23) WNFPSPFYRL	25) HFKIPQTNVS	27) VAIFMLDTVT	29) LCGNSDDFLS
22) KISKRWNFPS	24) PFYRLHFKIP	26) QTNVSVAIFM	28) LDTVTLGNS	30) DDFLSQQPER
31) QQPERPRDVK	33) LARTQLSWLK	35) KQLAAAREDY	37) VLVAGHYPVW	39) SIAEHGPTHG
32) PRDVKLARTQ	34) LSWLKKQLAA	36) AREDYVLVAG	38) HYPVWSIAEH	40) GPTHCLVKQL
41) LVKQLRPLLA	43) TYGVTAYLCG	45) HDHNLQYLQD	47) ENGVGYYVLSG	49) AGNFMDPSCR
42) RPLLATYGV	44) AYLCGHHDNL	46) QYLQDENGVG	48) YVLSGAGNFM	50) DPSKRHRQKV
51) HQRKVPNGYL	53) RFHYGTEDSL	55) GGFAYVEISS	57) KEMTVTYIEA	59) SGKSLFKTRL
52) PNGYLRHYG	54) TEDSLGGFAY	56) VEISSKEMTV	58) TYIEASGKSL	60) FKTRLPRRARP

【0053】

（2）ReplitopeによるTrK-62及びTrK-49のエピトープ解析

作成したペプチドスライドを、TrK-62，TrK-49を用いてエピトープマッピングを行い、発色法により解析した（図7）。

具体的には、前記ペプチドスライドをSuperBlock（PIERCE）を用いて室温で60分間ブロッキング処理を行った。その後一次抗体としてTrK-62またはTrK-49を1μg/mLの濃度にて、室温で60分間反応させた。PBS-Tにて3回洗浄後、ウサギ抗マウスIgG-HRP（DAKO）を0.5μg/mLの濃度にて、室温で60分間反応させた。再度PBS-Tにて3回洗浄後、HRPの発色基質である3，3'，5，5'-テトラメチルベンチジン（TMB）（カイノス）を加えた。一定時間のインキュベートの後、顕微鏡観察によりスポットの発色の程度を確認した。

解析の結果、TrK-62，TrK-49共に、TRACP-5bに特異的に存在する糖鎖の結合箇所付近にエピトープを有することが判り、これによりTRACP-5bへの反応特異性を高めていると考えられた（図8）。

【0054】

<実施例2>

TrK-126、TrK-127のエピトープ解析

(1) Repl it o p eによるTr K - 1 2 6及びTr K - 1 2 7のエピトープ解析

以上の結果をふまえ、Tr K - 1 2 6及びTr K - 1 2 7のエピトープ解析を発光法により行った。

具体的には、前記ペプチドスライドをSuper Block (PIERCE)を用いて室温で60分間ブロッキング処理を行った。その後一次抗体としてTr K - 1 2 6またはTr K - 1 2 7を1 μ g/mLの濃度にて、室温で60分間反応させた。PBS - Tにて3回洗浄後、Amersham ECL Prime (GEヘルスケア) 付属の二次抗体を添加し、室温で60分間反応させた。再度PBS - Tにて3回洗浄後、キット付属の検出試薬を加えた。一定時間のインキュベーションの後、Image Quant LAS 4000 (GEヘルスケア) により、スポットの発光の程度を確認した。

10

解析の結果、Tr K - 1 2 6及びTr K - 1 2 7ともに各配列ペプチドとの反応性を示さなかった(図9)。そこで次に、これらの2抗体を用いてドットプロット解析及びウェスタンプロット解析を行った。

【0055】

(2) ウェスタンプロット法、ドットプロット法による反応性確認

(2-1) ドットプロット法による反応性確認

精製したTRACP - 5 bを1.0 μ g PVDFメンブレン(ミリポア)へ滴下し、1時間ブロッキングを行った。次にTr K - 1 2 6及びTr K - 1 2 7(抗体濃度5 μ g/mL含むPBS - T)をそれぞれ転写したメンブレンに1時間反応させた。反応後、メンブレンをPBS - Tにて洗浄し、二次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体(Zymed)を、それぞれ30分間反応させた。PBS - Tにて洗浄後、メンブレン用TMB溶液(和光純薬工業)にて検出を行なった(図10)。

20

(2-2) ウェスタンプロット法による反応性確認

精製したTRACP - 5 bを1.0 μ g、2.0 μ g非還元下にてSDS - PAGEを行った。その後、PVDFメンブレン(ミリポア)へ転写し、1時間ブロッキングを行った。その後(2-1)に記載された同様の手法にて反応、検出を行った(図11)。

【0056】

解析の結果、Tr K - 1 2 6及びTr K - 1 2 7ともにドットプロット法によるTRACP - 5 bとの反応性が確認された一方、ウェスタンプロット法ではともに検出されなかった。これらの結果から、Tr K - 1 2 6及びTr K - 1 2 7はTRACP - 5 bのネイ

30

ティブな立体構造を認識し、そのエピトープは線状に並んだ一次構造から形成されるエピトープではなく、TRACP - 5 bの立体構造に依存したエピトープを認識する抗体であると考えられた。

【0057】

一次構造上相同性の高いTRACP - 5 aとTRACP - 5 bであるが、その立体構造は大きく異なる。それ故、TRACP - 5 bの立体構造に依存したエピトープを認識する抗体は、公知の測定法(日本特許登録番号416804)記載のTr K - 62, Tr K - 49(そのエピトープの一次構造はTRACP - 5 aにも存在する)に較べて、TRACP - 5 b特異的結合性が増していると考えられる。

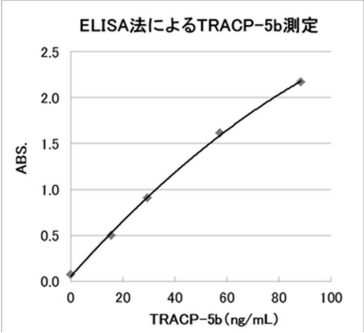
【産業上の利用可能性】

40

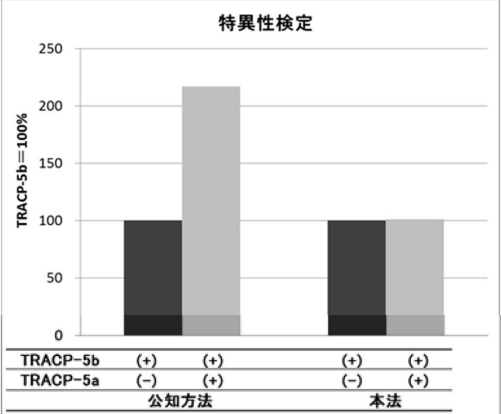
【0058】

以上に詳細に説明した通り、本発明の免疫測定法では、測定対象目的物質(TRACP - 5 b)に対して反応性及び選択性の高い抗体を組み合わせることで反応系中の競合物質の影響を除き、目的物質を特異的に精密測定することができる。

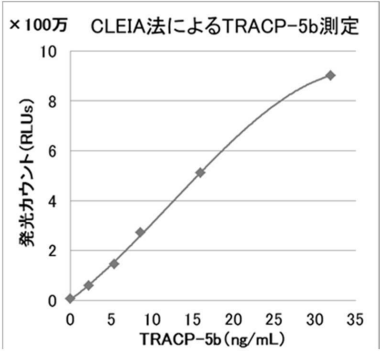
【図 1】



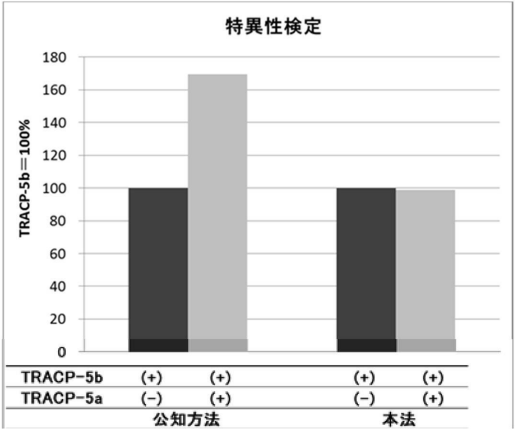
【図 2】



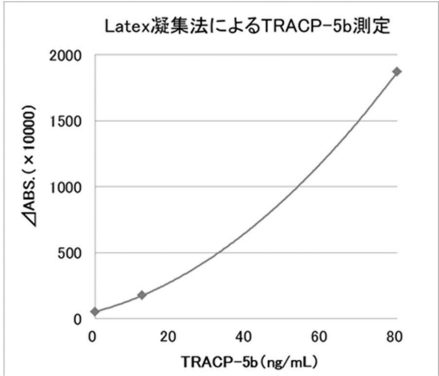
【図 3】



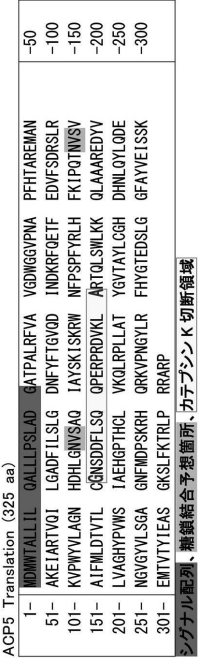
【図 4】



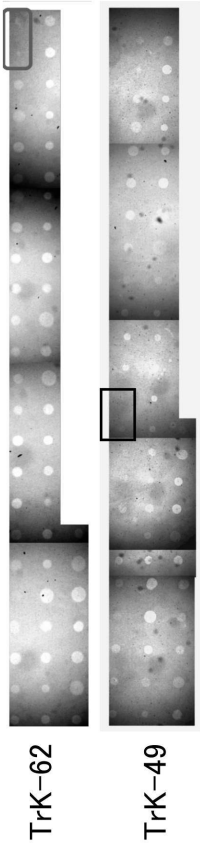
【図 5】



【図 6】



【 図 7 】



01), 02), 23), 24)
25), 26), 47), 48)
49), 50),59), 60)

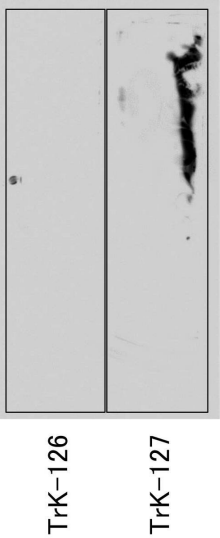
ペプチド配列
(2スライド共に)

【 図 8 】

1-	MDMTALLIL	QALLPLSLAD	GATPALRFVA	VGDWGGVPNA	PFHTAREMAN	-50
51-	AKEIARTVQI	LGADFILSLG	DNFYETGVOD	INDKRFQETF	EDVFSORSRLR	-100
101-	KVPWYVLGN	HDHLGNVSAQ	IATYSKISKRW	NFPSFEYRLH	FKIPQTNVSV	-150
151-	AIFMLDVTIL	CGNSDDFLSQ	OPERPRDVKL	ARTQLSWLKK	QLAAREDYV	-200
201-	LVAGHPVWS	IAEHGPTHCL	VKQLRPLLAT	YGVATAYLCGH	DHNLQYLQDE	-250
251-	NGGVVLSGA	GNFMDFSKRH	QRKVPNGYLR	FHYGTEDSLG	GFAYVEISSK	-300
301-	EMTVTYIEAS	GKSLFKTRLP	RRARP			

- ・ 糖鎖結合予想箇所、カテプシン K 切断領域
- ・ TrK-62 エピトープ、TrK-49 エピトープ

【 図 9 】



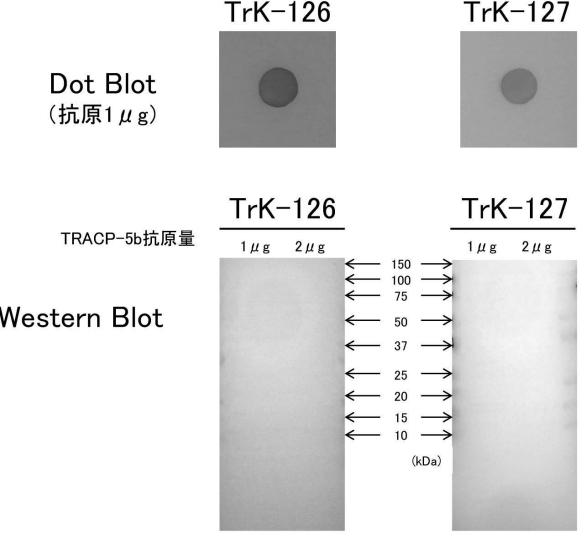
① ② ③

ペプチドブロック配置
(2スライド共に)

01), 02), 08), 09)
10), 11), 17), 18)
19), 20), 26), 27)
28), 29), 35), 36)
37), 38), 44), 45)
46), 47), 53), 54)
55), 56),59), 60)

ブロック内の配列
(①、②、③共通、配列番号は〇〇に対応)

【 図 1 0 】



【配列表】

0006037043000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 17/02	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
C 0 7 K 17/14	(2006.01)	C 0 7 K 17/02	
		C 0 7 K 17/14	

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 特許第4 1 6 4 8 0 4 (J P , B 2)
 特表2 0 0 2 - 5 1 0 0 5 0 (J P , A)
 特表2 0 1 1 - 5 2 4 7 4 1 (J P , A)
 特表2 0 1 3 - 5 2 7 8 3 6 (J P , A)
 国際公開第2 0 1 2 / 1 7 7 9 7 2 (W O , A 1)
 Silvia D. POTENZIANI PRADELLA , Applications and performance of monoclonal antibodies t
 o human tartrate resistant acid phosphatase , Journal of Immunological Methods , 2 0 1
 1 年 , Vol.372 , Pages 162-170

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 0 7 K 1 6 / 4 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	TRACP-5b特异性蛋白质定量方法 (抗酒石酸酸性磷酸酶5b)		
公开(公告)号	JP6037043B2	公开(公告)日	2016-11-30
申请号	JP2015544223	申请日	2015-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	菊地 涉 笹川 久美子 野田 健太		
发明人	菊地 涉 笹川 久美子 野田 健太		
IPC分类号	C07K16/40 C12N15/02 C12N5/00 G01N33/53 G01N33/543 C07K17/02 C07K17/14		
FI分类号	C07K16/40.ZNA C12N15/00.C C12N5/00 G01N33/53.D G01N33/543.581 G01N33/543.541.A C07K17/02 C07K17/14		
优先权	2014168934 2014-08-22 JP		
其他公开文献	JPWO2016027697A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本発明の目的は提供可用于特异性测定酒石酸抗性酸性磷酸酶5b (TRACP-5b) の単克隆抗体。产生针对TRACP-5bの単克隆抗体的杂交瘤，所述単克隆抗体显示出与TRACP-5b比与抗酒石酸酸性磷酸酶5a (TRACP-5a) 更高的反应性，因此对TRACP-5b具有特异性，通过使用细胞融合获得，作为抗原，从蚕丝腺中纯化的人重组TRACP-5b。通过使用该単克隆抗体，可以高度灵敏且特异性地检测样品中的TRACP-5b。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6037043号 (P6037043)
(45) 発行日 平成28年11月30日 (2016. 11. 30)	(24) 登録日 平成28年11月11日 (2016. 11. 11)	
(51) Int. Cl. C07K 16/40 (2006.01) C12N 15/02 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)	F I C07K 16/40 ZNA C12N 15/00 C C12N 5/00 G01N 33/53 D G01N 33/543 581 請求項の数 16 (全 20 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2015-544223 (P2015-544223) (86) (22) 出願日 平成27年8月7日 (2015. 8. 7) (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/072468 (87) 国際公開番号 W02016/027697 (87) 国際公開日 平成28年2月25日 (2016. 2. 25) 審査請求日 平成27年9月4日 (2015. 9. 4) (31) 優先権主張番号 特願2014-168934 (P2014-168934) (32) 優先日 平成26年8月22日 (2014. 8. 22) (33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(73) 特許権者 000003975 日東紡績株式会社 福島県福島市郷野目字東 1 番地 (74) 代理人 110000855 特許業務法人浅村特許事務所 (72) 発明者 菊地 涉 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社内 (72) 発明者 笹川 久美子 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社内 (72) 発明者 野田 健太 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社内 最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 T R A C P - 5 b (酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ5 b) に特異的なタンパク定量法		