

(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2016-8194

(P2016-8194A)

(43) 公開日 平成28年1月18日(2016.1.18)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 0 7 K	16/18 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P	21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/00 1 0 2	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N	33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 26 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2014-129623 (P2014-129623)	(71) 出願人	314005768
(22) 出願日	平成26年6月24日 (2014. 6. 24)		パナソニックヘルスケアホールディングス株式会社
			東京都港区西新橋2-38-5
		(74) 代理人	100100158
			弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(72) 発明者	高橋 三枝
			愛媛県東温市南方2131番地1 パナソニックヘルスケア株式会社内
		Fターム(参考)	4B024 AA11 BA44 DA02 GA05
			4B064 AG27 CA20 CC24 CE12 DA13
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、その製法、ハイブリドーマ、ヒト心筋トロポニンTの測定方法及びヒト心筋トロポニンTの測定キット

(57) 【要約】

【課題】 ヒト心筋トロポニンTを精度良く測定することができる、抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いるヒト心筋トロポニンTの測定方法及びヒト心筋トロポニンTの測定キットを提供する。

【解決手段】 A l a - L e u - S e r - A s n - M e t を含むアミノ酸配列をエピトープとする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A l a－L e u－S e r－A s n－M e t（配列番号：32）を含むアミノ酸配列をエピトープとする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体。

【請求項 2】

独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターにおける受託番号がN I T E P－01862のハイブリドーマより産生される請求項1に記載の抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体。

【請求項 3】

独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターにおける受託番号がN I T E P－01862であるハイブリドーマ。

10

【請求項 4】

請求項3に記載のハイブリドーマを培養することを特徴とする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 5】

免疫測定方法であって、A l a－L e u－S e r－A s n－M e t（配列番号：32）を含むアミノ酸配列をエピトープとする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体を用いることを特徴とする抗ヒト心筋トロポニンTの測定方法。

【請求項 6】

前記抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターにおける受託番号がN I T E P－01862のハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体である請求項5に記載の抗ヒト心筋トロポニンTの測定方法。

20

【請求項 7】

A l a－L e u－S e r－A s n－M e t（配列番号：32）を含むアミノ酸配列をエピトープとする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体を含むヒト心筋トロポニンT測定キット。

【請求項 8】

前記抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターにおける受託番号がN I T E P－01862のハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体である請求項7に記載の抗ヒト心筋トロポニンT測定キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、その製法、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いるヒト心筋トロポニンTの測定方法及びヒト心筋トロポニンTの測定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

40

ヒト心筋トロポニンT（Human Cardiac Troponin T；以下、「TnT」と略する。）は、心筋の筋原繊維を構成するタンパク質の1つであって、心筋梗塞の発症に伴い血液中のTnT濃度が上昇する。そのため、血液中のTnT濃度は、心筋梗塞の診断指標として用いられている。

従来、TnTは、免疫測定法によってその濃度が測定されている。例えば、特許文献1には、免疫測定法に用いられる抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体についての開示がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

50

【特許文献1】特開平03-7597号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上述した従来の技術では、より精度良くTnTを測定できる技術が求められていた。本願の限定的ではない例示的な実施形態は、TnTを精度良く測定することができる、抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、その製法、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いるTnTの測定方法及びTnTの測定キットを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターにおける受託番号がNITE P-01862のハイブリドーマより産生される抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体である。

【発明の効果】

【0006】

本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、その製法、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いるTnTの測定方法及びTnTの測定キットによれば、TnTを精度良く測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】TnT-F23抗体のTnTに対する結合能の測定結果の一例を示す図である。

【図2】TnT-F23抗体のエピトープの特定に用いられた29種類のペプチドのアミノ酸配列（配列番号：1～29）を示す図である。

【図3】TnT-F23抗体のエピトープの特定に用いられた29種類のペプチドそれぞれに対する結合能の測定結果の一例を示す図である。

【図4】TnT（野生型）のアミノ酸配列（配列番号：30）を示す図である。

【図5】TnT（アイソフォーム3）のアミノ酸配列（配列番号：31）を示す図である。

【図6】TnT-F23抗体を用いた免疫測定結果の一例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

TnTには、少なくとも6種類のアイソフォーム（Isoform）が存在することが知られており、TnTの多様な変化の一因とされている（例えば、J. Biol. Chem. 2002；277：35341-35349を参照。）。

TnT（野生型）は分子量が約39,000であって、そのアミノ酸配列は図4（配列番号：30）に示す通りである。一方、TnT（アイソフォーム）は、TnT（野生型）のN末端側から1-40番目の領域で特有の変化を示し、成人においてはアイソフォーム3がメジャーとされている。アイソフォーム3は、分子量が約37,000であって、そのアミノ酸配列は図5（配列番号：31）に示す通りである。アイソフォーム3は、TnT（野生型）のN末端側から24-33番目のアミノ酸が欠失している点がTnT（野生型）とは異なる。

【0009】

一方、TnTの構造は、急性心筋梗塞患者の血液中において、心筋梗塞の発症からの時間に依存してその動態が変化することが報告されている（例えば、Clinical Biochemistry 2007；40：851-855を参照。）。具体的には、血液中のTnT濃度は、心筋梗塞等による心筋の損傷に伴いその濃度が迅速に上昇するが、心筋梗塞の発症からの経過時間に依存して、血液中のTnTが分解し、細分化される。例えば、心筋梗塞の発症から12時間経過後の患者における血液中には、分子量が約37,000の状態のTnT（アイソフォーム3）はほとんど存在せず、細分化されて分子量が約25,000のフラグメントとその他のフラグメントとで存在する。細分化された分子

10

20

30

40

50

量約25,000のフラグメントは、TnT（アイソフォーム3）のアミノ酸配列のN末端側から1-200番目の領域に対応することが確認されている。

【0010】

本願発明者は、これらのことから血液中のTnTを精度良く測定するためには、TnTの安定な構造部位のアミノ酸配列に特異的に結合する抗体を用いる必要があると考えた。具体的には、アイソフォーム3でいうと、N末端側から41-200番目の領域部分内のアミノ酸配列に対して特異的に結合する抗体である。

【0011】

そこで本願発明者は、安定な構造部位のアミノ酸配列に特異的に結合する抗体について、鋭意検討を行い、抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、その製法、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いるTnTの測定方法及びTnTの測定キットに関する発明を完成するに至った。本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、その製法、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いるTnTの測定方法及びTnTの測定キットは、以下の通りである。

【0012】

本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、Ala-Leu-Ser-Asn-Met（配列番号：32）を含むアミノ酸配列をエピトープとする。

【0013】

本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、TnTを精度良く測定することができる。なぜなら、係る抗体は、アイソフォーム3でいうとN末端側から177-181番目のアミノ酸配列、野生型でいうとN末端側から187-191番目を含むアミノ酸配列に対する抗原認識部位を有する抗体であるため、分子量が約25,000のフラグメントであっても結合することができ、アイソフォームに依存しないため、TnTの多様な変化に対応することができるからである。

【0014】

また、本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体の抗原認識部位は、遅筋型及び速筋型のいずれの骨格筋トロポニンT（Skeletal Troponin T）も認識しない。なぜなら、遅筋型及び速筋型のいずれの骨格筋トロポニンTも、Ala-Leu-Ser-Asn-Met（配列番号：32）に対応するアミノ酸配列を有さないからである。そのため、本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、TnTを精度良く測定することができる。

【0015】

なお、本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体はIgGであるが、当該IgGそのものだけでなく、その結合特性を保持した機能断片も含まれる（例えば、F(ab)やF(ab')₂）。当該結合特性の典型例としては、Ala-Leu-Ser-Asn-Met（配列番号：32）を含むアミノ酸配列をエピトープとすることが挙げられる。

【0016】

さらに、本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、上記IgG抗体の変異体も含まれる。かかる変異体は、上記IgG抗体のアミノ酸配列において、1個～数個、あるいは1個～数十個のアミノ酸が置換、欠失、付加されているものであってもよい。かかる変異体は、哺乳動物の抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であってもよい。かかる変異体もまた、上記IgG抗体の結合特性を保持している。

【0017】

本願の一態様に係るハイブリドーマ（12P-2 No. 23）は、前述の抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体を産生するものであって、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定に従って、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され、2014年6月17日付けで受託番号NITE P-01862を付与された。

【0018】

したがって、本願の一形態に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、上記ハイブリドーマにより産生される抗体であってもよい。関連する態様において、本発明は、上記ハイブリドーマを培養することを特徴とする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体の製造方法を提供する。

【0019】

本願の一態様に係るTnTの測定方法は、免疫測定方法であって、Ala-Leu-Ser-Asn-Met（配列番号：32）を含むアミノ酸配列をエピトープとする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体を用いることを特徴とする。

【0020】

本願の一態様に係るTnTの測定方法は、例えば、酵素結合免疫吸着法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay；以下、「ELISA法」と略する。）に代表される酵素免疫測定法（Enzyme Immunoassay；以下、「EIA法」と略する。）、放射免疫アッセイ（Radio Immunoassay；以下、「RIA法」と略する。）又は蛍光抗体法（Fluorescent Antibody Technique）のいずれを用いてもよい。また、化学発光法（Chemiluminescence Assay）や電気化学発光法（Electrochemiluminescence Assay）を用いてもよい。

【0021】

また、測定形式としては、代表的なものとしては直接吸着法、サンドイッチ法及び競合法が挙げられるが、いずれを用いてもよい。

【0022】

本願の一態様に係るTnTの測定キットは、Ala-Leu-Ser-Asn-Met（配列番号：32）を含むアミノ酸配列をエピトープとする抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体を含む。通常は、取り扱い説明書をキットに添付する。

【0023】

なお、本願において、アミノ酸を略号で表示する場合、以下の通りとする。また、アミノ酸に関して光学異性体があり得る場合には、特に明示しない限りL-体を示すものとする。

- | | | | |
|------|--------|-----------------------------|----|
| (1) | A, Ala | : アラニン (Alanine) | |
| (2) | R, Arg | : アルギニン (Arginine) | 30 |
| (3) | N, Asn | : アスパラギン (Asparagine) | |
| (4) | D, Asp | : アスパラギン酸 (Asparagine Acid) | |
| (5) | C, Cys | : システイン (Cysteine) | |
| (6) | Q, Gln | : グルタミン (Glutamine) | |
| (7) | E, Glu | : グルタミン酸 (Glutamic Acid) | |
| (8) | G, Gly | : グリシン (Glycine) | |
| (9) | H, His | : ヒスチジン (Histidine) | |
| (10) | I, Ile | : イソロイシン (Isoleucine) | |
| (11) | L, Leu | : ロイシン (Leucine) | |
| (12) | K, Lys | : リジン (Lysine) | 40 |
| (13) | M, Met | : メチオニン (Methionine) | |
| (14) | F, Phe | : フェニルアラニン (Phenylalanine) | |
| (15) | P, Pro | : プロリン (Proline) | |
| (16) | S, Ser | : セリン (Serine) | |
| (17) | T, Thr | : トレオニン (Threonine) | |
| (18) | W, Trp | : トリプトファン (Tryptophan) | |
| (19) | Y, Tyr | : チロシン (Tyrosine) | |
| (20) | V, Val | : バリン (Valine) | |

【0024】

以下に、実施例を示して、本願の実施の形態の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いる T n T の測定方法及び T n T の測定キットについて、図面とともに詳細に説明する。ただし、実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものと解してはならない。

【実施例 1】

【0025】

実施例 1 抗ヒト心筋トロポニン T モノクローナル抗体及びハイブリドーマの調製

本願発明者は、本願の実施の形態の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニン T モノクローナル抗体及びハイブリドーマを以下の通りにして得た。

【0026】

1. 哺乳動物への免疫

哺乳動物を T n T で免疫し、免疫した哺乳動物の体内で抗体産生細胞を産生させた。

免疫の対象となる哺乳動物としては、マウス、ラット、ウシ、ウサギ、ヤギ等を用いることができるが、本願発明者はマウスを用いた。また、免疫するマウスの系等には、例えば、A/J 系統、BALB/C 系統、DBA/2 系統、C57BL/6 系統、C3H/He 系統、SJL 系統、NZB 系統、CBA/JNCrj 系統が挙げられる。BALB/C 系統のマウスは、免疫後の血清に高い抗体力価 (Titer of Antibody) を示すことが知られており、T n T との親和性が高いモノクローナル抗体が得られることが期待されることと、細胞株 (Cell Line) の確立後に腹水による抗体大量作製において一般的に用いられていることから、本願発明者はこの系統のマウスを用いることとした。

【0027】

免疫するマウスの齢は、特に限定されるものではないが、一般的には生後 4 ~ 12 週齢のものが用いられるが、好ましくは生後 6 ~ 10 週齢であり、より好ましくは生後 7 週齢である。なお、本願発明者は、生後 7 週齢の雌の BALB/C 系統のマウスを用いた。

【0028】

免疫に用いられる抗原は、T n T そのもの又はそのフラグメントを用いることができる。また、T n T は、天然のものを用いることが好ましく、ヒト血清から精製したものをを用いてもよいし、市販されているものを用いてもよい。免疫に用いられる T n T は、総タンパク質に対する純度が通常 80 % 以上のものが用いられるが、好ましくは 90 % 以上であり、より好ましくは 95 % 以上であり、更に好ましくは 98 % 以上のものである。

【0029】

免疫に用いられる T n T は、アジュバント (Adjuvant) と混合したものをを用いることが好ましい。なぜなら、T n T とアジュバントとを混合させたものをを用いることで、哺乳動物の抗原に対する免疫応答の増強を期待できるからである。

【0030】

アジュバントの例としては、油中水型乳剤 (例えば、不完全フロイントアジュバント)、水中油中水型乳剤、水中油型乳剤、リポソーム、水酸化アルミニウムゲル、シリカアジュバント、粉末ベントナイト及びタピオカアジュバントが挙げられる。また、BCG、Propionibacterium acnes 等の菌体、細胞壁及びトレハロースダイコレート (TDM) 等の菌体成分、グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖体 (LPS)、リピド A 画分、 β -グルカン (多糖体)、ムラミルジペプチド (MDP)、ベスタチン、レバミゾール等の合成化合物、胸腺ホルモン、胸腺ホルモン液性因子及びタフトシン等の生体成分由来のタンパク質又はペプチド性物質をアジュバントとして用いることもできる。更に、これらの混合物 (例えば、完全フロイントアジュバント) をアジュバントして用いてもよい。

【0031】

これらアジュバントは、哺乳動物に対する投与経路、投与量、投与時期等に依存して免疫応答の増強又は抑制を図ることができる。更にアジュバントの種類によっては、抗原に対する抗体産生、細胞性免疫の誘導及び免疫グロブリンのクラスに差が認められる。それ故、目的とする免疫応答に応じて、適切なアジュバントを選択する必要がある。本願発明

10

20

30

40

50

者は、完全フロイントアジュバントを用いた。

【0032】

哺乳動物への免疫は、例えば、哺乳動物の皮下、皮内、静脈又は腹腔内にTnTを注射することで行われる。免疫応答は、対象となる哺乳動物の種類及び系統によって異なるので、免疫スケジュールは使用する哺乳動物に応じて適宜設定する必要がある。また、哺乳動物への最初の免疫後には、複数回にわたって追加の免疫が行われる。

【0033】

《試薬》

以下(a)及び(b)の試薬を調製した。

(a) 生理食塩水リン酸緩衝液(Phosphate Buffer Saline; 以下、「PBS」と略する。) 10

NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 を最終濃度がそれぞれ137mM、2.7mM、8.1mM、1.47mMとなるように水に溶解させ、PBSを調製した。

【0034】

(b) 第1の抗原溶液

PBSに最終濃度が1mg/mlとなるようにTnT(Fitzgerald製、30C-CP3037)を溶解させ、第1の抗原溶液を調製した。

【0035】

《手順》

以下の(1)～(4)の手順により、BALB/C系統のマウスに免疫を行った。 20

(1) 第1の抗原溶液に、アジュバントとして同体積量のヒト結核死菌含有完全フロイントアジュバント(和光純薬製、H37Rv)を加え、ホモジナイザにより十分に乳化させ(ホモジナイザの回転数は1000rpm)、アジュバントエマルジョン(Adjuvant Emulsions)を調製した。

(2) 生後7週齢のBALB/C系統の雌マウス5匹それぞれに対し、調製したアジュバントエマルジョン50μlを腹腔内に注射した。

(3) アジュバントエマルジョンを最初に注射してから2週間後に、これら5匹のマウスそれぞれにアジュバントエマルジョン50μlを腹腔内に注射した。

(4) その後、同様に最初の注射から4週間後、6週間後及び8週間後に、これら5匹のマウスそれぞれに対してアジュバントエマルジョン50μlを腹腔内に注射した。 30

【0036】

2. マウス生体内における抗体産生の確認

哺乳動物への免疫後、生体内に抗ヒト心筋トロポニンT抗体が産生されていることを確認した。具体的には、免疫した哺乳動物から血液を採取し、得られた血液を用いてTnTの結合活性(Binding Activity)を測定することで、哺乳動物の体内に抗ヒト心筋トロポニンT抗体が産生されていることを確認した。また、免疫末期には、IgMからIgGへのクラススイッチ(Immunoglobulin Class Switching)が起こっていることを確認した。本願発明者は、これら評価をBALB/C系統のマウスへの2回目の注射から1週間後と、4回目の注射から1週間後とで行った。 40

【0037】

結合活性の測定は、例えば、ELISA法、RIA法又は蛍光抗体法により確認することができる。本願発明者は、TnTの結合活性の測定にELISA法を採用した。

【0038】

《試薬》

以下(c)～(h)の試薬を新たに調製した。

(c) PBS-Az溶液

PBSに最終濃度が0.04重量%となるようにアジ化ナトリウムを加え、PBS-Az溶液を調製した。 50

(d) T n T 溶液

P B S - A z 溶液に最終濃度が $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように T n T (F i t z g e r a l d 製、3 0 C - C P 3 0 3 7) を溶解させ、T n T 溶液を調製した。

(e) ブロッキング溶液

P B S - A z 溶液にスキムミルクを 5 重量%となるように加え、ブロッキング溶液を調製した。

(f) P B S T 溶液

P B S に最終濃度が 0.05 体積%となるように T w e e n 2 0 (和光純薬製、1 6 7 - 1 1 5 1 5) を加え、P B S T 溶液を調製した。

(g) B S A 溶液

P B S - A z 溶液に最終濃度が 1 重量%となるようにウシ血清アルブミン (B o v i n e S e r u m A l b u m i n ; 以下、「B S A」と略する。)(シグマ製、A 7 8 8 8) を加え、B S A 溶液を調製した。

(h) 標識抗体溶液

B S A 溶液に最終濃度が $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにペルオキシダーゼ標識ヤギ由来抗マウス I g G 抗体 (S o u t h e r n B i o t e c h 社製、1 0 3 4 - 0 5) を溶解させ、標識抗体溶液を調製した。

【0039】

《手順》

＜マウスの血液を用いた T n T の結合活性の測定＞

以下の (1) ~ (11) の手順により、免疫したマウスの血液を用いて T n T の結合活性を測定した。

(1) マウスへの 2 回目の注射から 1 週間後と、4 回目の注射から 1 週間後のマウス (5 匹分) それぞれから血液を採取し、当該血液から血清を得た。

(2) マイクロプレート (N u n c 製、イムノプレートマキシソープ丸底 U 9 6、4 4 9 8 2 4) に T n T 溶液を 1 ウェルに対して $100 \mu\text{l}$ ずつ注入し、室温にて飽和水蒸気中で一晩保存した。

(3) 一晩保存したマイクロプレート中の T n T 溶液をアスピレータで除去し、各ウェルについて 1 ウェルに対してブロッキング溶液を $200 \mu\text{l}$ ずつ注入し、室温にて 60 分間放置した。

(4) マイクロプレート中のブロッキング溶液を捨て、各ウェルを P B S T 溶液で 3 回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存する P B S T 溶液を除去した。

(5) 各ウェルについて 1 ウェルに対して取得した血清を $50 \mu\text{l}$ ずつ注入し、常温にて 90 分間放置した。

(6) マイクロプレート中の血清を捨て、各ウェルを P B S T 溶液で 3 回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存する P B S T 溶液を除去した。

(7) 各ウェルについて 1 ウェルに対して標識抗体溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ注入し、常温にて 30 分間放置した。

(8) マイクロプレート中の標識抗体溶液を捨て、P B S T 溶液で 3 回洗浄し、アスピレータで各ウェルに残存する P B S T 溶液を除去した。

(9) 各ウェルについて 1 ウェルに対して発色反応試薬 (T h e r m o 製 T M B E L I S A、1 S T E P U l t r a) を $50 \mu\text{l}$ ずつ注入し、室温にて 5 分間反応させた。

(10) 5 分間反応後、各ウェルについて 1 ウェルに対して 4 N 硫酸を $50 \mu\text{l}$ ずつ注入し、発色反応を停止させた。

(11) 発色反応を停止させた後、各ウェルの溶液についてマイクロプレートリーダー (T E C A N 製、I n f i n i t e 2 0 0) を用いて吸光度 (450nm の波長) の測定を行った。

【0040】

＜I g G へのクラススイッチの確認＞

I g G へのクラススイッチは、前述により得たマウスへの 4 回目の注射から 1 週間後の

10

20

30

40

50

マウスから得た血清に対し、抗マウスIgG抗体（Southern Biotech社製、1034-05）への結合反応性により確認した。

【0041】

《結果》

＜マウスの血液を用いたTnTの結合活性の測定＞

得られた血液のTnTの結合活性は、ウェル中の溶液の吸光度（450nmの波長）が、明確な発色が認められるか否かで評価した。すなわち、明確な発色が認められれば、得られた血液に対応するBALB/C系統の雌マウスの生体内で抗体産生が行われているということである。

【0042】

結果、免疫を行った5匹全てのマウスについて、抗ヒト心筋トロポニンT抗体の産生が認められた。特に3匹のマウスについては、力価が高かったため、後述の実験においてはこの3匹を用いることとした。

【0043】

＜IgGへのクラススイッチの確認＞

前述により得たマウスへの4回目の注射から1週間後のマウスから得た血清に対し、抗マウスIgG抗体（Southern Biotech社製、1034-05）への結合反応性を確認した結果、いずれのマウスの血液においてもIgGへのクラススイッチが起きていることを確認した。

【0044】

3. 免疫原の追加注射

前述のTnTの結合活性の測定により、生体内に抗ヒト心筋トロポニンT抗体が産生されていることを確認した後、当該マウスに対して免疫原を追加注射（以下、「ブースト」と称する。）を行うことで、マウスの脾臓を肥大させた。

【0045】

ブーストには、通常、TnTとアジュバントとが乳化したエマルジョンが用いられるが、最終免疫（後述のハイブリドーマ作成による細胞融合数日前に行う追加注射）においてはアジュバントを用いず、TnTのみを用いることが好ましい。また、マウスへのTnTの投与経路としては、皮下、皮内、静脈、又は腹腔内それぞれによって、TnTに対して異なった部位を認識する抗体が得られる可能性がある。

【0046】

《試薬》

以下（i）の試薬を新たに調製した。

（i）第2の抗原溶液

PBSに最終濃度が0.5mg/mlとなるようにTnT（Fitzgerald製、30C-CP3037）を溶解させ、第2の抗原溶液を調製した。

【0047】

《手順》

3匹のマウスそれぞれについて、最初の免疫から3ヶ月後に第2の抗原溶液100μlをマウスの腹腔内に注射することで、免疫原の追加注射を行った。

【0048】

4. ハイブリドーマ（Hybridoma）の作製

マウスへの最終免疫を行った後、マウスから脾臓細胞を摘出し、摘出した脾臓細胞と骨髓腫由来の細胞株とを細胞融合させ、ハイブリドーマを得た。

ハイブリドーマの増殖能力は、細胞融合時に用いられる骨髓腫由来の細胞株の種類に依存するので、増殖能力が優れた骨髓腫由来の細胞株を選択する必要がある。また、骨髓腫由来の細胞株は、融合する脾臓細胞の由来との適合性を勘案する必要がある。マウスの骨髓腫由来の細胞株としては、例えば、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14、FO・1、S194/5.XX0BU.1、P3/NS1/1-Ag4-1が挙げられる。本願発明者は、骨髓腫由来の細胞株として、ハイブリドーマの増殖能力が優れてい

10

20

30

40

50

ることが知られている P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 を選択した。

【0049】

脾臓細胞と骨髓腫由来の細胞株とを細胞融合する手法としては、例えば、ポリエチレングリコール法、センダイウイルスを用いた方法、電流を利用する方法が挙げられる。本願発明者は、細胞毒性も少なく、融合操作も容易であり、再現性の高いポリエチレングリコール法を採用した。

【0050】

《手順》

以下の(1)～(4)の手順により、ハイブリドーマを作製した。

(1) 最終免疫を行ってから3日後に対象となるマウスの脾臓細胞を摘出した。

10

(2) ポリエチレングリコール (Poly ethylene glycol) (MERCK社製、807489、平均分子量1,500)を用いて脾臓細胞とP3X63-Ag8.653とを融合させ、ハイブリドーマを作成した。

(3) ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum: 以下、「FCS」と略する。)が15重量%含有するイシコフ培地で調製したヒポキサンチン (Hypoxanthine) / アミノプテリン (Aminopterin) / チミジン (Thymidine) 培地 (以下、「HAT培地」と称する。)にハイブリドーマを浮遊させた。

(4) マイクロプレートにハイブリドーマを分注後、CO₂ インキュベータ (三洋電機製、MCO-40AIC) 内で、1週間培養を行った。この際、ハイブリドーマの培養開始時の成長因子であるフィーダー細胞として、同じマウス固体の脾臓細胞を用いた。なお、ハイブリドーマの培養条件は、CO₂ 濃度が5体積%、温度37℃、湿度95%である。以下の実験において、ハイブリドーマの培養は特に明示しない限り、この条件で培養を行っている。

20

【0051】

5. 細胞選別及びクローニング

作成したハイブリドーマから産生された抗体のTnTに対する結合能を評価することで、目的の特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、選別したハイブリドーマのクローニングを行った。

【0052】

結合能の評価は、ELISA法、RIA法、蛍光抗体法により確認することができるが、本願発明者は、ELISA法を採用した。

30

TnTの測定に用いられる抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、TnTに対して高い結合能を有する必要がある。一方、TnTの測定に用いられる抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、骨格筋トロポニンTに対して結合能を有さないか、若しくは低い結合能を有する必要がある。したがって、本願発明者は、得られたそれぞれのハイブリドーマから産生された抗体について、TnTに対する結合能及び骨格筋トロポニンに対する結合能のそれぞれを評価し、目的の特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマを選別した。

【0053】

なお、本願でいう「TnTに対して高い結合能を有する抗体」とは、後述の実験手順で示すELISA法 (詳細には「インヒビションELISA法」。)において、TnTとの抗原抗体反応においてインヒビションがかかり、算出されたインヒビションの半値が 1.0×10^{-9} M以下であることを意味する。

40

また、本願でいう「インヒビションがかかる」とは、固相に固定されたTnTに結合する抗体の量が、競合物質 (Inhibitor) の存在下で、競合物質の不存在下と比較して減少することをいう。一方、「インヒビションがかからない」とは、固相に固定されたTnTに結合する抗体の量が、競合物質の存在下及び不存在下で同等 (実質的に同等である場合も含む。)であることをいう。

本願でいう「インヒビションの半値」とは、競合物質の不存在下における吸光度 (抗体結合量を反映する) の半分の吸光度が測定されるインヒビターの濃度をいう。

50

【0054】

ハイブリドーマの選別は、例えば、限界希釈法や軟寒天法により行うことができる。本願発明者は、操作が容易で再現性の高い限界希釈法により、ハイブリドーマのクローニングを行った。なお、細胞融合により得られた多くのハイブリドーマの中から、効率よく有用な細胞を選択するために、クローニングの初期の段階から細胞選別を行うことが好ましい。最終的に選別されたハイブリドーマは、液体窒素中で半永久的に保存することができる。

【0055】

《試薬》

以下（j）の試薬を新たに調製した。

（j）細胞保存液

FCS 10 体積部とジメチルスルフォキシド 90 体積部とを混合させ、細胞保存液を調製した。

【0056】

《手順》

以下の手順により、細胞選別及びクローニングを行った。

＜第1段階の選別＞

（1）ハイブリドーマの培養から1週間後、マイクロプレートの各ウェル中における培養上清を100 μ l 採取した。一方、各ウェルに残存する培養液を24ウェルプレートに継代し、各ウェルにFCSが15重量%含有するヒポキサンチン／チミジン（HT）培地を1 ml ずつ加えた。

（2）24ウェルプレートにハイブリドーマを継代して4日後、その培養上清を1ウェルに対し150 μ l ずつ採取した。ハイブリドーマの培養から1週間後と継代して4日後の培養上清は、以下の（3）～（12）に示すELISA法によりTnTに対する結合能の測定に用いられた。

（3）マイクロプレート（Nunc製、イムノプレートマキシソープ丸底U96、449824）にTnT溶液を1ウェルに対して100 μ l ずつ注入し、室温にて飽和水蒸気中で一晩保存した。

（4）一晩保存したマイクロプレート中のTnT溶液をアスピレータで除去し、各ウェルについて1ウェルに対してブロッキング溶液を200 μ l ずつ注入し、室温にて60分間放置した。

（5）マイクロプレート中のブロッキング溶液を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

（6）各ウェルについて1ウェルに対して取得した血清を50 μ l ずつ注入し、常温にて90分間放置した。

（7）マイクロプレート中の血清を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

（8）各ウェルについて1ウェルに対して標識抗体溶液を50 μ l ずつ注入し、常温にて30分間放置した。

（9）マイクロプレート中の標識抗体溶液を捨て、PBST溶液で3回洗浄し、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

（10）各ウェルについて1ウェルに対して発色反応試薬（Thermo製 TMB ELISA、1STEP Ultra）を50 μ l ずつ注入し、室温にて5分間反応させた。

（11）5分間反応後、各ウェルについて1ウェルに対して4N硫酸を50 μ l ずつ注入し、発色反応を停止させた。

（12）発色反応を停止させた後、各ウェルの溶液についてマイクロプレートリーダー（TECAN製、Infinite 200）を用いて吸光度（450nmの波長）の測定を行った。

（13）吸光度の測定結果に基づき、TnTに対して高い結合能を有し、増殖状態の良い

10

20

30

40

50

ウェルを選別した。

(14) 選別したウェル中のハイブリドーマを6ウェルプレートに継代し、各ウェルにFCSが15重量%含有するヒポキサンチン/チミジン(HT)培地を4mlずつ加え、2日間培養した。

【0057】

<第2段階の選別>

(1) 6ウェルプレートにハイブリドーマを継代して2日後、その培養上清を1ウェルに対し150μlずつ採取した。この培養上清は、以下の(2)～(12)に示すインヒビションELISA法によるTnTに対する結合能の測定に用いられた。

(2) マイクロプレート(Nunc製、イムノプレートマキシソープ丸底U96、449824)にTnT溶液を1ウェルに対して100μlずつ注入し、室温にて飽和水蒸気中で一晩保存した。

(3) 一晩保存したマイクロプレート中のTnT溶液をアスピレータで除去し、各ウェルについて1ウェルに対してブロッキング溶液を200μlずつ注入し、室温にて60分間放置した。

(4) マイクロプレート中のブロッキング溶液を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

(5) 各ウェルについて1ウェルに対して取得した血清を50μlずつ注入し、常温にて90分間放置した。

(6) マイクロプレート中の血清を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

(7) 各ウェルについて1ウェルに対してインヒビターとしてTnT溶液を25μlずつ注入し、更に標識抗体溶液を25μlずつ注入し、常温にて1時間放置した。

(8) マイクロプレート中の標識抗体溶液を捨て、PBST溶液で3回洗浄し、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

(9) 各ウェルについて1ウェルに対して発色反応試薬(Thermo製 TMB ELISA、1STEP Ultra)を50μlずつ注入し、室温にて5分間反応させた。

(10) 5分間反応後、各ウェルについて1ウェルに対して4N硫酸を50μlずつ注入し、発色反応を停止させた。

(11) 発色反応を停止させた後、各ウェルの溶液についてマイクロプレートリーダー(TECAN製、Infinite 200)を用いて吸光度(450nmの波長)の測定を行った。

(12) 吸光度の測定結果に基づき、インヒビションのかかったウェルを選別した。

(13) 選別された各ウェルの細胞について、それぞれ中フラスコ(50ml)に継代した。培地は、FCSが15重量%含有するHT培地を45mlずつ加え、3日間培養した。

【0058】

<TnT及び骨格筋トロポニンTに対する結合能の測定>

TnTに対する結合能の測定については、前述の第2段階の選別で行ったインヒビションELISA法と同様であるので、説明を省略する。また、骨格筋トロポニンTに対する結合能の測定については、マイクロプレート中に固定化する抗原及びインヒビターを、TnTから骨格筋トロポニンTに変えただけであるので、説明を省略する。

【0059】

<限界希釈法によるハイブリドーマの単離及び選定>

(1) 選別した各ウェルに含まれるハイブリドーマについて、FCSが15重量%含有のHT培地を用いて、1ウェルあたり2ケの細胞が含まれる濃度に限界希釈し、各希釈液を96ウェルマイクロプレートの各ウェルに分注した。

(2) フィーダー細胞として、生後4週齢のBALB/C系統の雌マウスの胸線細胞を用いて、ハイブリドーマの初期増殖を促進させた。

(3) 各ウェル中のハイブリドーマについて、適宜、継代培養を繰り返すことで、培養ス

ケールを上げ、継代の都度、前述の「第1段階の選別」で行ったT n Tに対する結合能の測定（E L I S A法）を行うことでスクリーニングを繰り返した。

（4）継代培養を繰り返すことでスクリーニングを行い、最終的に200mlの培地中におけるハイブリドーマが約 5.0×10^5 cell/mlとなるまで増殖させた。

（5）スクリーニングを繰り返すことで、目的の機能を有するハイブリドーマを選定した。

【0060】

＜ハイブリドーマの保存＞

（1）選定したハイブリドーマは、遠心分離（1600rpm、5分）し、その培養上清を取り除いた。

（2）遠心分離により培養上清が取り除かれたハイブリドーマに対し、ハイブリドーマが約 1.0×10^7 cell/mlとなるように細胞保存液に浮遊させた。なお、ハイブリドーマの1mlあたりのcell数の調整は、血球計算盤により単位面積当たりの細胞数をカウントすることにより行われた。

（3）細胞保存液に浮遊されたハイブリドーマは、 -80°C で予備凍結し、その後、液体窒素中に保存した。

【0061】

《結果》

＜第1段階の選別＞

2回採取した培養上清のうち、定性的な判断でT n Tに対して高い結合能を有し、増殖状態の良かった53ウェル中のハイブリドーマを第2段階の選別に用いることとした。

【0062】

＜第2段階の選別＞

培養上清中にT n Tに結合する抗体が存在するウェルには、インヒビターとして添加されたT n Tと結合し、マイクロプレートに固定化されたT n Tへの結合が阻害されるため、E L I S A法の発色反応による発色が抑制される。従って、インヒビションE L I S A法によりインヒビションがかかった15ウェルを選別し、T n T及び骨格筋トロポニンTに対する結合能の測定に用いることとした。

【0063】

＜T n T及び骨格筋トロポニンTに対する結合能の測定＞

第2段階の選別により選別された15ウェル中のハイブリドーマについて、T n T及び骨格筋トロポニンTに対する結合能の測定を行い、T n Tでのみインヒビションがかかり、骨格筋トロポニンTでインヒビションがかからなかった11ウェルを選別し、限界希釈法によるハイブリドーマの単離に用いることとした。

【0064】

＜限界希釈法によるハイブリドーマの単離及び選定＞

最終的にT n Tに対して高い結合能を有し、かつ、骨格筋トロポニンTに対して結合能を有さないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを1株選定した。

この選定したハイブリドーマを、12P-2 No. 23と命名し、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され、平成26年（2014年）6月17日に受託番号N I T E P-01862を付与された。なお、以後の説明においては、12P-2 No. 23が産生するモノクローナル抗体のことをT n T-F 23抗体と称することとする。

【0065】

6. 抗体の精製

前述の細胞選別及びクローニングにより得られたハイブリドーマを大量培養し、大量培養されたハイブリドーマから産生される抗心筋トロポニンTモノクローナル抗体を精製した。

【0066】

ハイブリドーマの大量培養法としては、インビボ（In vivo）及びインビトロ（

10

20

30

40

50

in vitro) により行う方法がある。インビボでの大量培養法の例としては、マウスの腹腔内にハイブリドーマを注射して、マウス腹水中にハイブリドーマを増殖させる方法が挙げられる。これにより、マウス腹水中に抗心筋トロポニンTモノクローナル抗体を大量に産生させることができる。一方、インビトロの培養では、ハイブリドーマを無血清培地（味の素社製、ASF培地）中で培養する方法が挙げられる。これにより、培養液中に抗心筋トロポニンTモノクローナル抗体を大量に産生させることができる。本願発明者は、インビボにより大量培養を行った。

【0067】

得られた腹水を用いて抗心筋トロポニンTモノクローナル抗体を精製した。抗体の精製法としては、DEAE（「Dietylamino Ethyl」の略である。）陰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（Affinity Chromatography）、硫酸分画法（Ammonium Sulfate Fractionation）、ポリエチレングリコール（Polyethylene Glycol；以下「PEG」と略する。）分画法（PEG Fractionation）、エタノール分画法（Ethanol Fractionation）等が挙げられる。また、これら精製法を適宜組み合わせることもできる。本願発明者は、アフィニティークロマトグラフィーにより抗心筋トロポニンTモノクローナル抗体の精製を行った。

【0068】

抗体の精製においては、総タンパク質に対する抗心筋トロポニンTモノクローナル抗体の純度が、90%以上であることが好ましく、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の純度であることが好ましい。

【0069】

《試薬》

以下（k）及び（l）の試薬を新たに調製した。

（k）結合緩衝液

グリシン、NaClの最終濃度がそれぞれ1.5M、3Mとなるように水に溶解させ、pH8.9に調整することで、結合緩衝液を調製した。

（l）溶出緩衝液

クエン酸を最終濃度が100mMとなるように水に溶解させ、pH4.0に調整することで、溶出緩衝液を調製した。

【0070】

《手順》

以下の（1）～（8）の手順により、抗体の精製を行った。

（1）ハイブリドーマ12P-2 No. 23を7週齢のBALB/C系統の雌マウスの腹腔内に注射した。

（2）腹腔内への注射後、腹水の貯留状態を確認しながら、生存しているマウスから順次、蓄積した腹水を採取した。

（3）プロテインA結合ゲル（GEヘルスケア製、プロテインAセファロース4FF）を充填したカラムを、結合緩衝液で平衡化した。

（4）採取した腹水を結合緩衝液で3倍に希釈し、平衡化したカラムにアプライした。

（5）カラムからの溶出液を280nmの波長における吸光度でモニターし、不純物の溶出が終了するまでカラムを結合緩衝液で洗浄した。

（6）カラムの洗浄後、溶出緩衝液をカラムにアプライ（線流速が20cm/hour）し、IgG含有溶出液を回収した。

（7）回収したIgG含有溶出液の精製分画それぞれについて、280nmの波長における吸光度を測定し、測定された吸光度を吸光係数で換算することにより、抗体濃度を算出した。

（8）回収したIgG含有溶出液の精製分画それぞれについて、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、標準タンパク質（タンパク質マーカー）との比較を行った。

【0071】

《結果》

S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、T n T - F 2 3 抗体の各精製分画はいずれも分子量が約 5 0 , 0 0 0 の H 鎖と約 2 5 , 0 0 0 の L 鎖からなる I g G であることを確認した。

【実施例 2】

【0072】

実施例 2 抗体の評価

精製により得られた T n T - F 2 3 抗体の T n T に対する結合能を測定した。

《手順》

前述の「細胞選別及びクローニング」における「第 2 段階の選別」で行ったインヒビション E L I S A 法と同様であるため、説明を省略する。

【0073】

《結果》

図 1 は、T n T - F 2 3 抗体の T n T に対する結合能の測定結果を示すグラフである。図 1 に示すグラフは、縦軸が 4 5 0 n m の波長における吸光度（図 1 中には「O D 4 5 0」と記載している。）であり、横軸は T n T 濃度（M）の対数値を示している。

【0074】

図 1 の結果に基づき T n T - F 2 3 抗体のインヒビションの半値を算出した結果、T n T - F 2 3 抗体のインヒビションの半値は 1.0×10^{-9} であった。前述で説明した通り、インヒビションの半値が 1.0×10^{-9} 以下の抗体は、T n T に対する結合能が高い抗体であるので、T n T - F 2 3 抗体は、T n T に対して高い結合能を有することが分かる。

【0075】

8. エピトープの特定

T n T - F 2 3 抗体のエピトープの特定を行った。まず、T n T のアミノ酸配列に含まれる 1 0 ~ 2 0 程度のアミノ酸からなるペプチドを複数準備し、これらペプチドを用いて E L I S A 法によりエピトープの特定を行った。エピトープの特定には、図 2 に示す 2 9 種類のペプチドが用いられた。

【0076】

《試薬》

以下（m）及び（n）の試薬を新たに調製した。

（m）ペプチド溶液

2 9 種類のペプチドについて、P B S - A z 溶液に図 2 に示した 2 9 種類のペプチドそれぞれについて、最終濃度が $0.1 \mu M$ となるように加え、ペプチド溶液（2 9 種類）を調製した。

（n）T n T - F 2 3 抗体溶液

P B S 溶液に、最終濃度が $0.1 \mu M$ となるように T n T - F 2 3 抗体を加え、T n T - F 2 3 抗体溶液を調製した。

【0077】

《手順》

以下の（1）～（10）の手順により、T n T - F 2 3 抗体のエピトープの特定を行った。

（1）マイクロプレート（N u n c 製、イムノプレートマキシソープ丸底 U 9 6、4 4 9 8 2 4）に 2 9 種類のペプチド溶液それぞれを 1 ウェルに対して $100 \mu l$ ずつ注入し、室温にて飽和水蒸気中で一晩保存した。

（2）一晩保存したマイクロプレート中のペプチド溶液をアスピレータで除去し、各ウェルについて 1 ウェルに対してブロッキング溶液を $200 \mu l$ ずつ注入し、室温にて 6 0 分間放置した。

（3）マイクロプレート中のブロッキング溶液を捨て、各ウェルを P B S T 溶液で 3 回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存する P B S T 溶液を除去した。

10

20

30

40

50

(4) 各ウェルについて1ウェルに対してTnT-F23抗体溶液を50μlずつ注入し、常温にて90分間放置した。

(5) マイクロプレート中の抗体溶液を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

(6) 各ウェルについて1ウェルに対して標識抗体溶液を50μlずつ注入し、常温にて30分間放置した。

(7) マイクロプレート中の標識抗体溶液を捨て、PBST溶液で3回洗浄し、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

(8) 各ウェルについて1ウェルに対して発色反応試薬(Thermo製 TMB ELISA、1STEP Ultra)を50μlずつ注入し、室温にて5分間反応させた。

(9) 5分間反応後、各ウェルについて1ウェルに対して4N硫酸を50μlずつ注入し、発色反応を停止させた。

(10) 発色反応を停止させた後、各ウェルの溶液についてマイクロプレートリーダー(TECAN製、Infinite 200)を用いて吸光度(450nmの波長)の測定を行った。

【0078】

《結果》

図3は、TnT-F23抗体の29種類のペプチドそれぞれに対する結合能の測定結果を示すグラフである。図3に示すグラフは、縦軸が450nmの波長における吸光度であり、横軸は29種類のペプチドのペプチドナンバーである。図3の横軸のペプチドナンバーは、図2のペプチドナンバーに対応している。また、横軸のTnTはコントロールである。

【0079】

図3の結果から明らかなように、TnT-F23抗体は、ペプチドナンバー19のペプチドに対して結合能を有する一方、それ以外のペプチドについては結合能を有さなかった。

ペプチドナンバー19のペプチドは、アイソフォーム3でいうとN末端側から172-186番目のアミノ酸配列に対応する。一方、ペプチドナンバー18及び20のペプチドは、アイソフォーム3でいうとそれぞれN末端側から162-176番目、182-196番目のアミノ酸配列に対応する。

【0080】

ペプチドナンバー18とペプチドナンバー19とのペプチドでは、アイソフォーム3でいうとN末端側から172-176番目のアミノ酸配列で重複し、ペプチドナンバー20とペプチドナンバー19のペプチドでは、アイソフォーム3でいうとN末端側から182-186番目のアミノ酸配列で重複する。図3の結果より、TnT-F23抗体が、ペプチドナンバー18及びペプチドナンバー20のペプチドに対する結合能を有さなかったことから、TnT-F23抗体は、TnT中のAla-Leu-Ser-Asn-Met(配列番号:32)を含むアミノ酸配列をエпитープとするものと考えられる。すなわち、TnT-F23抗体のエピトープは、アイソフォーム3でいうとN末端側から177-181番目のアミノ酸配列、野生型でいうとN末端側から187-191番目を含むアミノ酸配列に対応する。

【0081】

これらのことから、TnT-F23抗体は、TnTの経時変化に伴い細分化された分子量が約25,000のフラグメントであっても結合することができ、アイソフォームに依存しないため、TnTの多様な変化に対応することができ、TnT-F23抗体を用いることで、TnTを精度良く測定することができるといえる。

【0082】

また、TnT-F23抗体は、遅筋型及び速筋型のいずれの骨格筋トロポニンTにも特異的に結合しない。なぜなら、遅筋型及び速筋型のいずれの骨格筋トロポニンTにも、Ala-Leu-Ser-Asn-Metに対応するアミノ酸配列を有さず、前述の「細胞

選別及びクローニング」において骨格筋トロポニンTに対する結合能を有さなかったことから示されているからである。

【0083】

なお、本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体はIgGであるが、IgGそのものだけでなく、その結合特性を保持した機能断片も含まれる（例えば、F(ab)、F(ab')₂）。また、本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体は、その結合特性を保持した変異抗体も包含する。

【実施例3】

【0084】

実施例3 TnT-F23抗体によるTnTの測定

本願発明者は、TnT-F23抗体を用い、EIA法によりTnTの測定を行った。本発実施例で行ったEIA法とは、具体的には、ELISA法（比色測定、サンドイッチ法）である。

【0085】

《試薬》

以下の試薬を新たに調製した。

（m）固相抗体溶液

サンドイッチ反応用の固相抗体として、PBSに最終濃度が0.1μMとなるようにトロポニンT抗体（Fitzgerald製、品番10-T85A）を加え、固相抗体溶液を調製した。

（n）液相抗体溶液

サンドイッチ反応用の液相抗体として、本発明のTnT-F23抗体を次の手順にてビオチン化を行った。まず、PBSにて2μMに調製したTnT-F23抗体溶液1mlに対して、最終濃度20mMになるようPBS溶液にて調製したNHS-Biotin（Pierce製、21425）を2μL添加し、30分間室温にて転倒混和した後、ブロッキングBuffer（0.5Mグリシン／0.5M NaCl pH8.3）を1mlを加え、30分間室温にて転倒混和したものをビオチン化抗体とした。（グリシン：和光純薬製、077-00735、NaCl：和光純薬製、品番191-01665）

このビオチン化抗体をPBSに加え、最終濃度が0.1μMとなるよう調製したものを、液相抗体溶液として用いた。

（o）反応用抗原溶液

抗原溶液として、BSA溶液に最終濃度が、0.0001、0.0003、0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30nMとなるようにTnT（Fitzgerald製、品番30C-CP3037）を溶解させ、12種類の濃度のTnT溶液を調製した。

【0086】

《手順》

以下の（1）～（12）の手順により、TnTの測定を行った。

（1）マイクロプレート（Nunc製、イムノプレートマキシソープ丸底U96、449824）に固相抗体溶液を1ウェルに対して50μlずつ注入し、室温にて飽和水蒸気中で一晚保存した。

（2）一晚保存したマイクロプレート中の抗体溶液をアスピレータで除去し、各ウェルについて1ウェルに対してブロッキング溶液を200μlずつ注入し、室温にて60分間放置した。

（3）マイクロプレート中のブロッキング溶液を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

（4）各ウェルについて1ウェルに対して12種類の反応用抗原溶液をそれぞれ50μlずつ注入し、常温にて30分間放置した。

（5）マイクロプレート中の抗原溶液を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

10

20

30

40

50

(6) 各ウェルについて、1ウェルに対して液相抗体溶液を50 μ l ずつ注入し、常温にて30分間放置した。

(7) マイクロプレート中の抗体溶液を捨て、各ウェルをPBST溶液で3回洗浄し、その後、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

(8) 各ウェルについて1ウェルに対してストレプトアビジン標識抗体溶液を50 μ l ずつ注入し、常温にて30分間放置した。

(9) マイクロプレート中のストレプトアビジン標識抗体溶液を捨て、PBST溶液で3回洗浄し、アスピレータで各ウェルに残存するPBST溶液を除去した。

(10) 各ウェルについて1ウェルに対して発色反応試薬(Thermo製 TMB ELISA、1STEP Ultra)を50 μ l ずつ注入し、室温にて5分間反応させた。

(11) 5分間反応後、各ウェルについて1ウェルに対して4N硫酸を50 μ l ずつ注入し、発色反応を停止させた。

(12) 発色反応を停止させた後、各ウェルの溶液についてマイクロプレートリーダー(TECAN製、品番 Infinite 200)を用いて吸光度(450nmの波長)の測定を行った。

【0087】

《結果》

図6は、TnT-F23抗体を用いたサンドイッチ反応の測定結果を示すグラフである。図6に示すグラフは、縦軸が450nmの波長における吸光度(図6中には「OD450」と記載している。)であり、横軸はTnT濃度(nM)の対数値を示している。

【0088】

図6の結果から、本発明のTnT-F23抗体と今回用いた市販トロポニンT抗体(Fitzgerald製、品番 10-T85A)とのサンドイッチ反応によって、0.001nMからのトロポニンTの検出が可能であること、図6により得られた検量線を用いれば、未知の濃度のトロポニンTを含む溶液中のトロポニンT濃度の定量が可能であることがわかる。

【0089】

以上のように、本発明の抗体を用いる事で、トロポニンTの検出及び定量が可能であることが理解される。

【0090】

なお、本実施例では、TnT-F23抗体を用いたTnTの測定として、ELISA法(比色測定、サンドイッチ法)により行ったが、本願はこれに限定されるものではない。

シグナル検出手法としては、本実施例で示した酵素による比色反応を用いた系だけでなく、その他、例えば、RIA法、蛍光抗体法、化学発光法及び電気化学発光法が挙げられる。

また、測定形式としては、本実施例ではサンドイッチ法によるものを示したが、本願はこれに限定されるものではなく、例えば、測定検体を固相に吸着させて測定する直接吸着法や競合法を用いてもよい。

【0091】

さらに、TnT-F23抗体は、本実施例で示したように固相に固定化された抗体に結合したTnTに対する抗原抗体反応に用いたが、本願はこれに限定されるものではなく、例えば、TnT-F23抗体を固相に固定した状態で用いてもよい。

さらにまた、TnT-F23抗体は、本実施例でビオチン標識したものを用いているが、他の方法にてTnT-F23抗体を標識化してもよい。TnT-F23抗体に標識されるものとしては、例えば、ペルオキシダーゼ等の酵素、化学発光物質や電気化学発光物質等のシグナル物質が挙げられる。

【産業上の利用可能性】

【0092】

本願の一態様に係る抗ヒト心筋トロポニンTモノクローナル抗体、ハイブリドーマ、T

10

20

30

40

50

n T の測定方法及び T n T の測定キットによれば、T n T を精度良く測定することができる。

【受託番号】

【0093】

N I T E P - 0 1 8 6 2

【配列表フリーテキスト】

【0094】

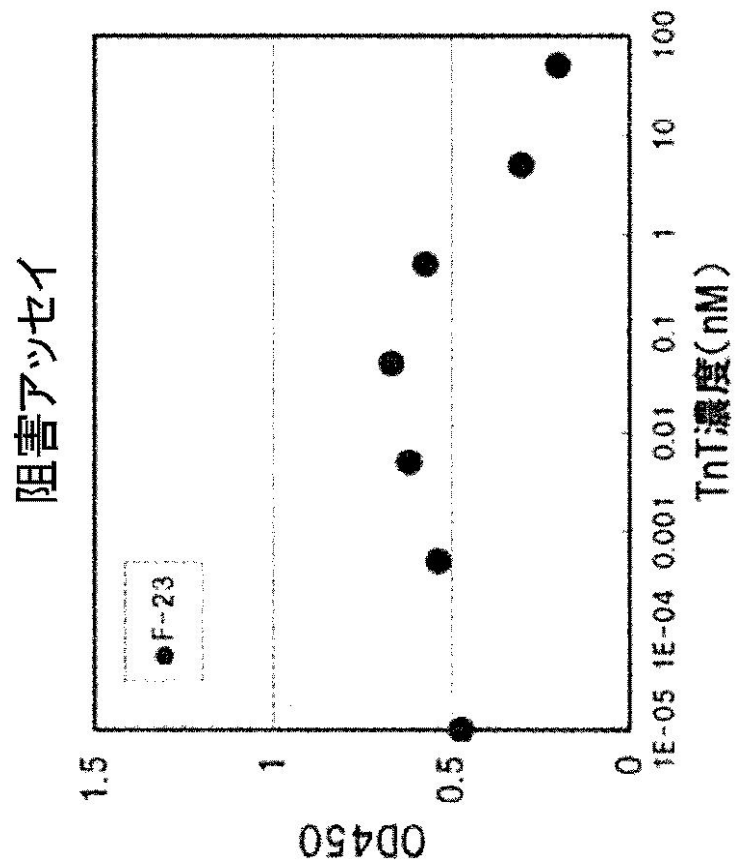
配列番号：1～29はT n T - F 2 3 抗体のエピトープの特定に用いられたペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：30はT n T（野生型）のアミノ酸配列である。

配列番号：31はT n T（アイソフォーム3）のアミノ酸配列である。

配列番号：32はT n T - F 2 3 抗体のエピトープに含まれるアミノ酸配列である。

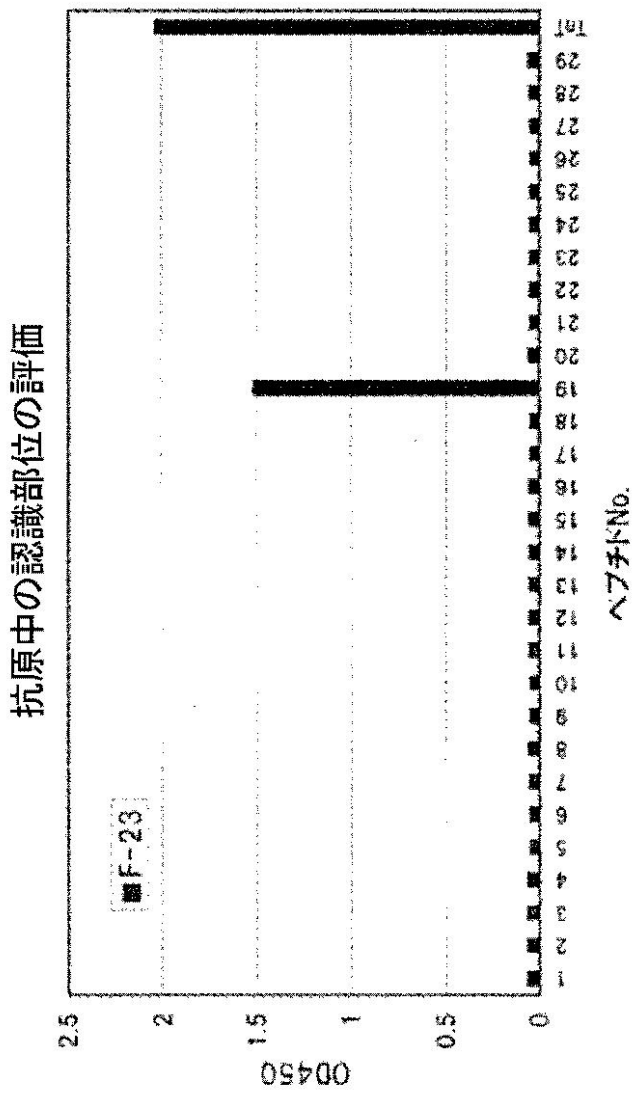
【図 1】



【図 2】

ペプチド ナンバー	アミノ酸配列	備考
1	SDIEEVVEEYEEEEQ	アイソフォーム 3 の 2 ～ 16 番目のアミノ酸配列に対応
2	EEEEQEEAAVEEEED	オリジナルの 12 ～ 26 番目のアミノ酸配列に対応
3	EEEDWREDEDEQEE	オリジナルの 22 ～ 36 番目のアミノ酸配列に対応
4	DEQEEAAEEDAEAEA	オリジナルの 32 ～ 46 番目のアミノ酸配列に対応
5	AEAEAEETEETRAEED	アイソフォーム 3 の 32 ～ 46 番目のアミノ酸配列に対応
6	RAEEDEEEEEAKEAE	アイソフォーム 3 の 42 ～ 56 番目のアミノ酸配列に対応
7	AKEAEDGPMESKPK	アイソフォーム 3 の 52 ～ 66 番目のアミノ酸配列に対応
8	ESKPKPRSFMPNLVP	アイソフォーム 3 の 62 ～ 75 番目のアミノ酸配列に対応
9	PNLVPPKIPDGERVD	アイソフォーム 3 の 72 ～ 86 番目のアミノ酸配列に対応
10	GERVDFDDIHRKRME	アイソフォーム 3 の 82 ～ 96 番目のアミノ酸配列に対応
11	RKRMEKDLNELQALI	アイソフォーム 3 の 92 ～ 106 番目のアミノ酸配列に対応
12	LQALIEAHFENRKKE	アイソフォーム 3 の 102 ～ 116 番目のアミノ酸配列に対応
13	NRKKEEEEELVSLKDR	アイソフォーム 3 の 112 ～ 126 番目のアミノ酸配列に対応
14	SLKDRIERRRAERA	アイソフォーム 3 の 122 ～ 136 番目のアミノ酸配列に対応
15	AERAEQQRIRNEREK	アイソフォーム 3 の 132 ～ 146 番目のアミノ酸配列に対応
16	NEREKERQNRLAEEER	アイソフォーム 3 の 142 ～ 156 番目のアミノ酸配列に対応
17	LAERARREEEENRR	アイソフォーム 3 の 152 ～ 166 番目のアミノ酸配列に対応
18	EENRRKAEDEARKKK	アイソフォーム 3 の 162 ～ 176 番目のアミノ酸配列に対応
19	ARKKKALSNMMHFGG	アイソフォーム 3 の 172 ～ 186 番目のアミノ酸配列に対応
20	MHFGGYIQKQAQTER	アイソフォーム 3 の 182 ～ 196 番目のアミノ酸配列に対応
21	AQTERKSGKRQTERE	アイソフォーム 3 の 192 ～ 206 番目のアミノ酸配列に対応
22	QTEREKKKKILAERR	アイソフォーム 3 の 202 ～ 216 番目のアミノ酸配列に対応
23	LAERRKVLAIIDLNE	アイソフォーム 3 の 212 ～ 226 番目のアミノ酸配列に対応
24	DHLNEDQLREKAKEL	アイソフォーム 3 の 222 ～ 236 番目のアミノ酸配列に対応
25	KAKELWQSIYNLEAE	アイソフォーム 3 の 232 ～ 246 番目のアミノ酸配列に対応
26	NLEAEKFDLQEKFKQ	アイソフォーム 3 の 242 ～ 256 番目のアミノ酸配列に対応
27	EKFKQQKYEINVLRN	アイソフォーム 3 の 252 ～ 266 番目のアミノ酸配列に対応
28	NVLNRINDNQKVSK	アイソフォーム 3 の 262 ～ 276 番目のアミノ酸配列に対応
29	QKVSKTRGKAKVTGRWK	アイソフォーム 3 の 272 ～ 288 番目のアミノ酸配列に対応

【図 3】

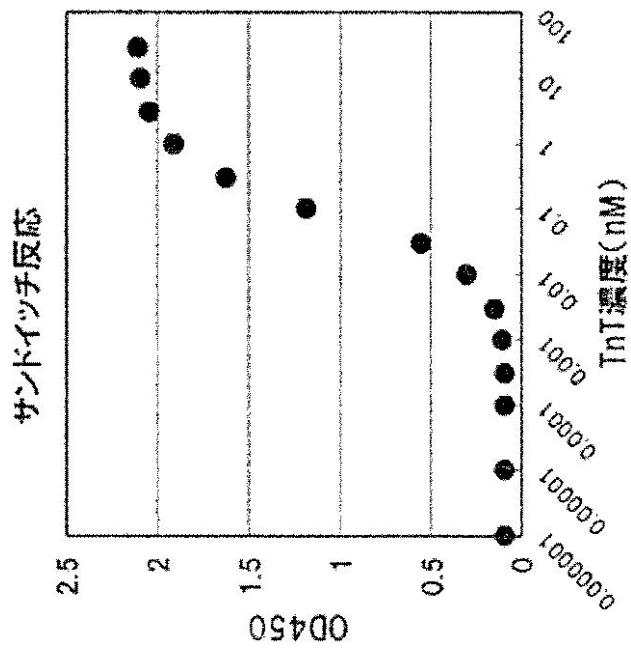


MSDIEEVVEE	YEEEEQEEAA	VEEEEDWRED	EDEQEAAEE	DAEAEAETEE	(50)
TRAEEDEEEE	EAKAEDGPM	EESKPKPRSF	MPNLVPPKIP	DGERVDFDDI	(100)
HRKRMEKDLN	ELQALIEAHF	ENRKEEEEL	VSLKDRIERR	RAERAEQQRI	(150)
RNEREKERQN	RLAEERARRE	EEENRRKAED	EARKKKALSN	MMHFGGYIQK	(200)
QAQTERKSGK	RQTEREKKKK	ILAERRKVLA	IDHLNEDQLR	EKAKELWQSI	(250)
YNLEAEKFDL	QEKFKQQKYE	INVLNRIND	NQKVSCTRKG	AKVTGRWK	(298)

【 図 5 】

MSDIEEVVEE	YEEEEQEEAA	VEEQEEAAEE	DAEAEAETEE	TRAEDEEEEE	(5 0)
EAKAEDGPM	EESKPKPRSF	MPNLVPPKIP	DGERVDFDDI	HRKRMEKDLN	(1 0 0)
ELQALIEAHF	ENRKKEEEEL	VSLKDRIERR	RAERAEQQRI	RNEREKERQN	(1 5 0)
RLAEERARRE	EEENRRKAED	EARKKKALSN	MMHFGGYIQK	QAQTERKSGK	(2 0 0)
RQTEREKKKK	ILAERRKVLA	IDHLNEDQLR	EKAKELWQSI	YNLEAEKFIDL	(2 5 0)
QEKFKQQKYE	INVLRNRIND	NQKVSKTRGK	AKVTGRWK	(2 8 8)	

【図 6】



【配列表】

2016008194000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	

F ターム (参考) 4B065 AA92X AA92Y AC14 BA08 BB25 BD14 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	抗人心肌肌钙蛋白T单克隆抗体，其制备方法，杂交瘤，测定人心肌肌钙蛋白T的方法，以及测定人心肌肌钙蛋白T的试剂盒		
公开(公告)号	JP2016008194A	公开(公告)日	2016-01-18
申请号	JP2014129623	申请日	2014-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	松下寿电子工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	松下医疗控股公司		
[标]发明人	高橋三枝		
发明人	高橋 三枝		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12N15/02 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.102 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/06 C12N15/13 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/DA02 4B024/GA05 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BB25 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 富田健二		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号 (22) 出願日	特願2014-129623 (P2014-129623) 平成26年6月24日 (2014. 6. 24)	(71) 出願人 314005768 パナソニックヘルスケアホールディングス株式会社 東京都港区西新橋2-38-5 (74) 代理人 100100158 弁理士 鯨島 睦 (74) 代理人 100081422 弁理士 田中 光雄 (74) 代理人 100122301 弁理士 富田 憲史 (72) 発明者 高橋 三枝 愛媛県東温市南方2131番地1 パナソニックヘルスケア株式会社内 Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 DA02 GA05 4B064 AG27 CA20 CC24 CE12 DA13 最終頁に続く
-------	-----------------------	--	---

能够准确地测量人心脏肌钙蛋白T的抗人心脏肌钙蛋白T单克隆抗体，产生该抗体的杂交瘤，使用该抗体测量人心脏肌钙蛋白T的方法以及用于测量人心脏肌钙蛋白T的试剂盒。提供。一种抗人心脏肌钙蛋白T单克隆抗体，其氨基酸序列包含Ala-Leu-Ser-Asn-Met作为表位。[选择图]无