(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2018-102211
(P2018-102211A)
(43)公開日　平成30年7月5日(2018.7.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		

審査請求 未請求　請求項の数 15　ＯＬ　（全 34 頁）　最終頁に続く

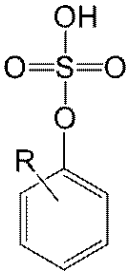
(21)出願番号　特願2016-252157 (P2016-252157)
(22)出願日　平成28年12月27日 (2016.12.27)

(71)出願人　504157024
国立大学法人東北大学
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(74)代理人　100102255
弁理士　小澤　誠次
(74)代理人　100096482
弁理士　東海　裕作
(74)代理人　100188352
弁理士　松田　一弘
(74)代理人　100131093
弁理士　堀内　真
(74)代理人　100150902
弁理士　山内　正子

最終頁に続く

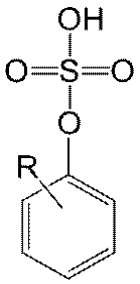
(54)【発明の名称】抗硫酸フェニル誘導体抗体

(57)【要約】　（修正有）
【課題】抗硫酸フェニル誘導体抗体、抗硫酸フェニル誘導体抗体をコードする抗体遺伝子、かかる抗体遺伝子を含むベクター、かかるベクターが導入された宿主細胞、抗硫酸フェニル誘導体抗体を産生するハイブリドーマ、生体試料中の硫酸フェニル誘導体を特異的に検出する方法、及び生体試料中の硫酸フェニル誘導体を特異的に検出するためのキットの提供。
【解決手段】硫酸フェニルをハプテンとして結合させた物質を非ヒト動物に免疫して得られる、以下の一般式で表される化合物に特異的に結合する抗体およびその遺伝子。

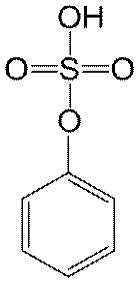


（ＲはＨ、ハロゲン原子、Ｃ１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基）
【選択図】なし

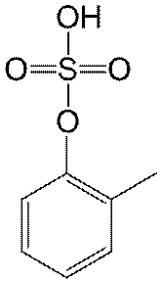
【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記一般式で表される化合物又はその医薬的に許容される塩若しくはエステルに特異的に結合することを特徴とする抗体。
【化１】



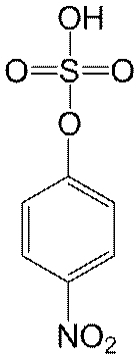
（式中、Ｒは、水素原子、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基を表す）
【請求項２】
化合物が、以下の１又は２種以上の化合物であることを特徴とする請求項１に記載の抗体。
【化２】



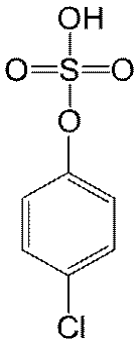
【化３】



【化４】



【化５】



【請求項３】

配列番号１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか、或いは

配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含む

ことを特徴とする請求項１又は２に記載の抗体。

【請求項４】

配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか、或いは

配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む

ことを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の抗体。

【請求項５】

配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか、或いは

配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む

ことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の抗体。

【請求項６】

請求項１～５のいずれかに記載の抗体をコードすることを特徴とする抗体遺伝子。

【請求項７】

プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されていることを特徴とする請求項６に記載の抗体遺伝子とを含むベクター。

【請求項８】

請求項７に記載のベクターが導入されていることを特徴とする宿主細胞。

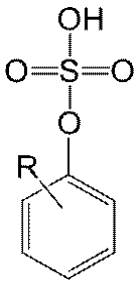
【請求項９】

請求項１～５のいずれかに記載の抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項１０】

請求項１～５のいずれかに記載の抗体を用いて、生体試料中の下記一般式で表される化合物又はその医薬的に許容される塩若しくはエステルを検出することを特徴とする前記化合物の検出方法。

【化６】



（式中、Ｒは、水素原子、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基を表す）

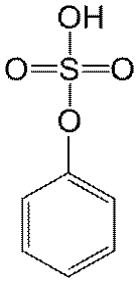
【請求項１１】

生体試料が、血液、尿、又は組織であることを特徴とする請求項１０に記載の検出方法。

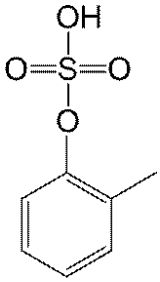
【請求項１２】

化合物が、以下の１又は２種以上の化合物であることを特徴とする請求項１０又は１１に記載の検出方法。

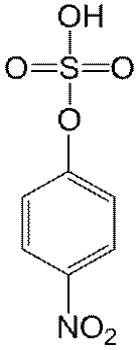
【化７】



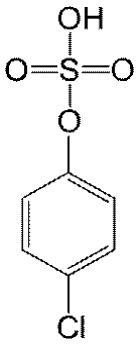
【化８】



【化９】



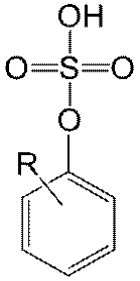
【化１０】



【請求項１３】

請求項１～５のいずれかに記載の抗体、又はその標識物を含むことを特徴とする、生体試料中の下記一般式で表される化合物又はその医薬的に許容される塩若しくはエステルの検出用キット。

【化１１】



（式中、Ｒは、水素原子、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基を表す）

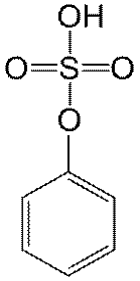
【請求項１４】

生体試料が、血液、尿、又は組織であることを特徴とする請求項１３に記載の検出用キット。

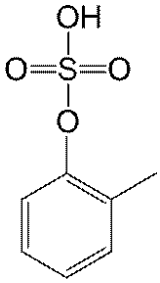
【請求項１５】

化合物が、以下の１又は２種以上の化合物であることを特徴とする請求項１３又は１４に記載の検出用キット。

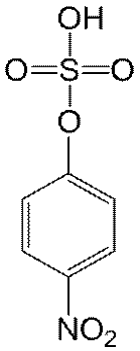
【化１２】



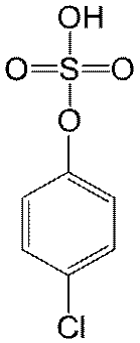
【化１３】



【化１４】



【化１５】



【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、硫酸フェニル誘導体に特異的に結合する抗体（抗硫酸フェニル誘導体抗体）、抗硫酸フェニル誘導体抗体をコードする抗体遺伝子、かかる抗体遺伝子を含むベクター、かかるベクターが導入された宿主細胞、抗硫酸フェニル誘導体抗体を産生するハイブリドーマ、抗硫酸フェニル誘導体抗体を用いて、生体試料中の硫酸フェニル誘導体を検出する方法、及び抗硫酸フェニル誘導体抗体を含む、生体試料中の硫酸フェニル誘導体を検出するためのキットに関する。

【背景技術】

【０００２】

腎臓は、体内の恒常性（バランス）を調節する臓器である。腎機能の１つとして、血液中の老廃物や毒素（尿毒症物質）を取り込み、尿中に送り出して体外に排泄する作用がある。かかる腎機能が低下すると、本来腎臓で排泄されるべき尿毒症物質は、体内に蓄積されやすくなり、吐き気や食欲低下等の症状の他、腎臓における細胞が傷害され腎機能のさらなる低下を引き起こす。また、腎機能が低下した者は、健常者と較べ、脳卒中や心筋梗塞に罹患するリスクが高いことも知られている。したがって、このような尿毒症物質の蓄積により引き起こされる症状や疾患（尿毒症）を予防又は治療することは、吐き気や食欲低下等の症状や、腎障害の悪化を治療するだけでなく、脳卒中や心臓病を予防する観点からも必要となる。

【０００３】

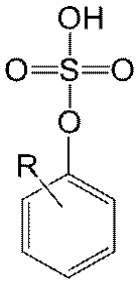
硫酸フェニル（フェニルサルフェート）や硫酸インドキシル等の低分子の尿毒症物質を検出する場合、通常、液体クロマトグラフ質量分析計やガスクロマトグラフ質量分析計等の質量分析計が用いられる。最近では、硫酸インドキシルに対する抗体が作製され、かかる抗体を用いたＥＩＡ法により、尿中や血中の硫酸インドキシルをより簡便に検出する方法が報告されている（特許文献１、２）。一方、硫酸フェニルに対する抗体や、かかる抗体を用いて血中の硫酸フェニルを検出する方法はこれまで知られていなかった。

【先行技術文献】

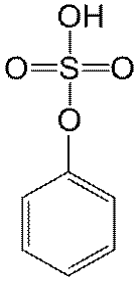
【特許文献】

【０００４】

【特許文献１】特開平１０－２６５４５７号公報
【特許文献２】国際公開２０１４／１２６２３０号パンフレット
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明の課題は、抗硫酸フェニル誘導体抗体、抗硫酸フェニル誘導体抗体をコードする抗体遺伝子、かかる抗体遺伝子を含むベクター、かかるベクターが導入された宿主細胞、抗硫酸フェニル誘導体抗体を産生するハイブリドーマ、生体試料中の硫酸フェニル誘導体を特異的に検出する方法、及び生体試料中の硫酸フェニル誘導体を特異的に検出するためのキットを提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を続けている。その過程において、硫酸フェニル誘導体の１つである硫酸フェニル（ＰＳ）をハプテンとし、かかる硫酸フェニルと、キャリアタンパク質の１つであるＫＬＨ（Keyhole Limpet Hemocyanin）とを、リンカーの１つであるＫＭＵＳ（N-(11-Maleimidoundecanoyloxy)succinimide）を介して結合させた物質（ＫＬＨ－ＫＭＵＳ－ＰＳ）を、抗原として用いたところ、硫酸フェニルに対する抗体を得ることができ、かかる抗体を詳細に解析したところ、硫酸フェニル誘導体に対して特異的に結合することを見いだし、本発明を完成するに至った。
【０００７】
すなわち、本発明は以下のとおりである。
〔１〕下記一般式で表される化合物又はその医薬的に許容される塩若しくはエステル（以下、「本件硫酸フェニル誘導体」ということがある）に特異的に結合することを特徴とする抗体（以下、「本件抗体」ということがある）。
【化１】

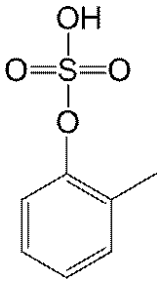


（式中、Ｒは、水素原子、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基を表す）
〔２〕化合物が、以下の１）～４）から選択される１又は２種以上の化合物であることを特徴とする上記〔１〕に記載の抗体。
１）硫酸フェニル（phenyl sulfate）
【化２】



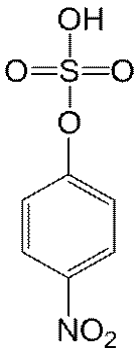
２）硫酸ｏ－クレゾール（o-cresol sulfate）

【化３】



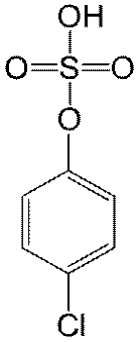
３）硫酸ｐ－ニトロフェノール（p-nitrophenol sulfate）

【化４】



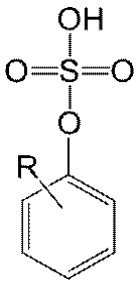
４）硫酸ｐ－クロロフェノール（p-chlorophenol sulfate）

【化５】

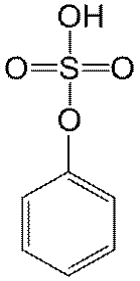


〔３〕配列番号１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか、或いは
配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含む
ことを特徴とする上記〔１〕又は〔２〕に記載の抗体。
〔４〕配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか、或いは配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミ

ノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む
ことを特徴とする上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の抗体。
〔５〕配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか、或いは
配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む
ことを特徴とする上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の抗体。
〔６〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の抗体をコードすることを特徴とする抗体遺伝子（以下、「本件抗体遺伝子」ということがある）。
〔７〕プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されていることを特徴とする上記〔６〕に記載の抗体遺伝子とを含むベクター（以下、「本件ベクター」ということがある）。
〔８〕上記〔７〕に記載のベクターが導入されていることを特徴とする宿主細胞（以下、「本件宿主細胞」ということがある）。
〔９〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ（以下、「本件ハイブリドーマ」ということがある）。
〔１０〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の抗体を用いて、生体試料中の下記一般式で表される化合物又はその医薬的に許容される塩若しくはエステルを検出することを特徴とする前記化合物の検出方法（以下、「本件検出方法」ということがある）。
【化６】

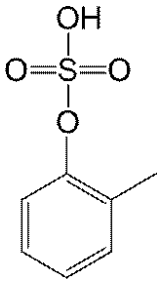


（式中、Ｒは、水素原子、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基を表す）
〔１１〕生体試料が、血液、尿、又は組織であることを特徴とする上記〔１０〕に記載の検出方法。
〔１２〕化合物が、以下の１）～４）から選択される１又は２種以上の化合物であることを特徴とする上記〔１０〕又は〔１１〕に記載の検出方法。
１）硫酸フェニル（phenyl sulfate）
【化７】



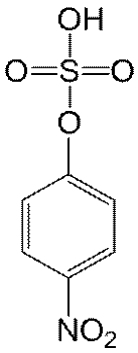
２）硫酸ｏ－クレゾール（o-cresol sulfate）

【化８】



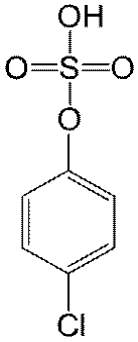
３）硫酸ｐ－ニトロフェノール（p-nitrophenol sulfate）

【化９】



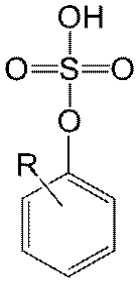
４）硫酸ｐ－クロロフェノール（p-chlorophenol sulfate）

【化１０】



〔１３〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の抗体、又はその標識物を含むことを特徴とする、生体試料中の下記一般式で表される化合物又はその医薬的に許容される塩若しくはエステルの検出用キット（以下、「本件検出用キット」ということがある）。

【化１１】



（式中、Ｒは、水素原子、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基を表す）

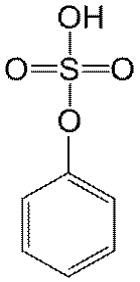
〔１４〕生体試料が、血液、尿、又は組織であることを特徴とする上記〔１３〕に記載の検出用キット。

〔１５〕化合物が、以下の１）～４）から選択される１又は２種以上の化合物であること

を特徴とする上記〔１３〕又は〔１４〕に記載の検出用キット。

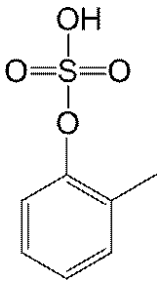
１）硫酸フェニル（phenyl sulfate）

【化１２】



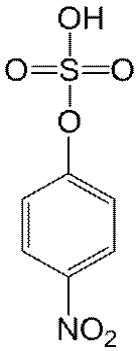
２）硫酸ｏ－クレゾール（o-cresol sulfate）

【化１３】



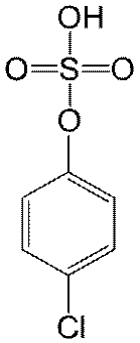
３）硫酸ｐ－ニトロフェノール（p-nitrophenol sulfate）

【化１４】



４）硫酸ｐ－クロロフェノール（p-chlorophenol sulfate）

【化１５】



【０００８】

本発明の実施の他の形態として、生体試料中の本件化合物の検出に使用するための本件抗体や、本件硫酸フェニル誘導体をハプテンとし、当該ハプテンを、リンカーを介してキャリアタンパク質に結合させた物質（抗原）を、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット）

に免疫する工程を備えた、本件硫酸フェニル誘導体に特異的に結合する抗体の製造方法を挙げることができる。かかる製造方法としては、細胞融合技術を用いて、本件硫酸フェニル誘導体に対する抗体を産生する細胞クローンを調製する工程や、上記抗原を固相化したプレートを用いたＥＬＩＳＡ法（好ましくは、本件硫酸フェニル誘導体をコンペティターとして用いたＥＬＩＳＡの阻害アッセイ［阻害ＥＬＩＳＡ法］）によるスクリーニングする工程を、さらに備えたものが好ましい。

【発明の効果】

【０００９】

本件抗体は、生体試料中の本件硫酸フェニル誘導体に特異的に結合する抗体である。かかる本件抗体を用いると、生体試料中の本件硫酸フェニル誘導体を特異的に検出することができ、特に、血液や尿中の、尿毒症物質の１つである硫酸フェニルを、質量分析計を用いて検出する従来法と比べ、時間帯効果及び費用対効果の面で優れている。このため、硫酸フェニル等の尿毒症物質に起因する症状又は疾患（尿毒症）の早期発見及び早期治療や予防が可能となり、ＱＯＬ（Quality of Life）の向上や医療費削減等の効果が期待される。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】硫酸フェニル抗原（ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ）固相化プレート、本件抗体（ＹＫＳ１９．２由来抗体［図１Ａ］及びＹＫ３３．１由来抗体［図１Ｂ］）を含むハイブリドーマ培養上清、ＨＲＰ（Horseradish Peroxidase）標識した抗マウスＩｇＧ（本件抗体検出用２次抗体）、及び各種濃度（０、１、１０、５０、１００、５００、１０００、及び３０００μｇ／ｍＬ）の硫酸フェニル（コンペティター）（図の横軸）を用いたＥＬＩＳＡの阻害アッセイ（阻害ＥＬＩＳＡ法）を行った結果を示す図である（平均値±標準偏差、ｎ＝３）。

【図２】硫酸フェニル抗原（ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ）固相化プレート、ビオチン化標識した本件抗体（ＹＫＳ１９．２由来抗体）、及び各種濃度（０、１、１０、及び１００μｇ／ｍＬ）のコンペティター８種（硫酸フェニル［phenyl sulfate］［図２Ａ］、硫酸ｏ－クレゾール［o-cresol sulfate］［図２Ｂ］、硫酸ｐ－ニトロフェノール［p-nitrophenol sulfate］［図２Ｃ］、硫酸キノリノール［quinolinol sulfate］［図２Ｄ］、硫酸１－ナフトール［1-naphthol sulfate］［図２Ｅ］、硫酸２－ナフトール［2-naphthol sulfate］［図２Ｆ］、硫酸４－メチルウンベリフェリル［4-methylumbelliferyl sulfate］［図２Ｇ］、及び硫酸インドキシル［Indoxyl sulfate］［図２Ｈ］）を含む血漿を用いて、阻害ＥＬＩＳＡ法を行った結果を示す図である（平均値、ｎ＝３）。縦軸の「Ｂ／Ｂｏ（％）」は、各種コンペティターについて、コンペティター非存在下（０μｇ／ｍＬ）における$ＯＤ_{450}$の値を１００としたときの、コンペティター存在下（１、１０、及び１００μｇ／ｍＬ）（図中の横軸）における$ＯＤ_{450}$の値（相対値）を示す。

【図３】硫酸フェニル抗原（ＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳ）固相化プレート、ビオチン化標識した本件抗体（ＹＫＳ１９．２由来抗体）、及び各種濃度（０、１、１０、及び１００μｇ／ｍＬ）のコンペティター５種（硫酸フェニル［図３Ａ］、硫酸ｏ－クレゾール［図３Ｂ］、硫酸ｐ－ニトロフェノール［図３Ｃ］、硫酸１－ナフトール［図３Ｄ］、及び硫酸インドキシル［図３Ｅ］）を含む血漿を用いて、阻害ＥＬＩＳＡ法を行った結果を示す図である（平均値、ｎ＝２）。縦軸の「Ｂ／Ｂｏ（％）」は、各種コンペティターについて、コンペティター非存在下（０μｇ／ｍＬ）における$ＯＤ_{450}$の値を１００としたときの、コンペティター存在下（１、１０、及び１００μｇ／ｍＬ）（図中の横軸）における$ＯＤ_{450}$の値（相対値）を示す。

【図４】硫酸フェニル抗原（ＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳ）固相化プレート、ビオチン化標識した本件抗体（ＹＫＳ１９．２由来抗体）、及び各種濃度（０、１、１０、及び１００μｇ／ｍＬ）のコンペティター５種（硫酸フェニル［図４Ａ］、硫酸ｏ－クレゾール［図４Ｂ］、硫酸ｐ－ニトロフェノール［図４Ｃ］、硫酸１－ナフトール［図４Ｄ］、及び硫酸インドキシル［図４Ｅ］）を含む血清を用いて、阻害ＥＬＩＳＡ法を行った結果を示す図

である（平均値、ｎ＝２）。縦軸の「Ｂ／Ｂｏ（％）」は、各種コンペティターについて、コンペティター非存在下（０μｇ／ｍＬ）におけるＯＤ$_{450}$の値を１００としたときの、コンペティター存在下（１、１０、及び１００μｇ／ｍＬ）（図中の横軸）におけるＯＤ$_{450}$の値（相対値）を示す。

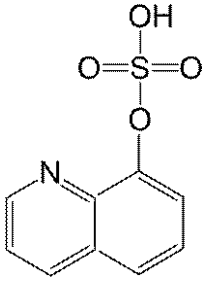
【発明を実施するための形態】

【００１１】

本件抗体は、本件硫酸フェニル誘導体に特異的に結合する抗体であり、ここで「本件硫酸フェニル誘導体に特異的に結合する」とは、抗原－抗体間の特異性の高い認識機構によって、本件硫酸フェニル誘導体（好ましくは、血液又は尿中の本件硫酸フェニル誘導体）を認識し結合する抗体を意味する。したがって、本件抗体は、本件硫酸フェニル誘導体以外の化合物（好ましくは、血液又は尿中の本件硫酸フェニル誘導体以外の化合物）、例えば、以下に示す５種類の化合物（硫酸キノリノール、硫酸１－ナフトール、硫酸２－ナフトール、硫酸４－メチルウンベリフェリル、及び硫酸インドキシル）に対して特異的に結合するものではない。

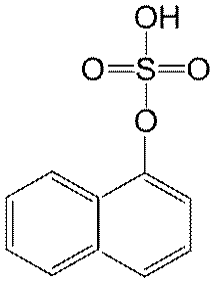
硫酸キノリノール（quinolinol sulfate）

【化１６】



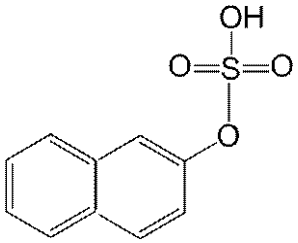
硫酸１－ナフトール（1-naphthol sulfate）

【化１７】



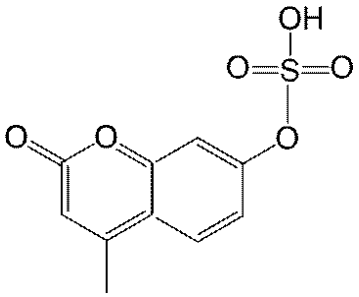
硫酸２－ナフトール（2-naphthol sulfate）

【化１８】



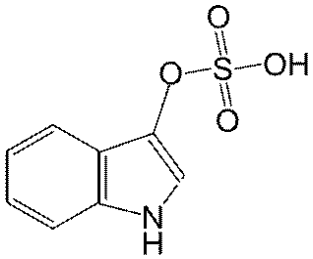
硫酸４－メチルウンベリフェリル（4-methylumbelliferyl sulfate）

【化１９】



硫酸インドキシル（Indoxyl sulfate）

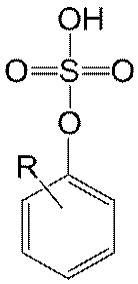
【化２０】



【００１２】

本件抗体は、下記一般式で表される本件硫酸フェニル誘導体に特異的に結合する。

【化２１】



（式中、Ｒは、水素原子、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルキル基、ニトロ基、又はアミノ基を表す）

【００１３】

本発明において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子を意味する。

【００１４】

本発明において、炭素数１～４のアルキル基とは、１～４の炭素原子を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキル基を意味し、場合によりハロゲン原子、水酸基、カルボシキル基、アセチル基、アミノ基及びニトロ基のうち１つ以上の基によって置換されていてもよい。かかる炭素数１～４のアルキル基として、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、イソブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシメチル基、２－ヒドロキシメチル基、アミノメチル基、カルボキシルメチル基、２－カルボキシルエチル基、が例示される。

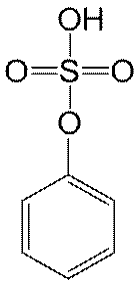
【００１５】

上記一般式に含まれる化合物として、例えば、硫酸フェニル（phenyl sulfate）、硫酸ｏ－クレゾール（o-cresol sulfate）、硫酸ｍ－クレゾール（m-cresol sulfate）、硫酸ｐ－クレゾール（p-cresol sulfate）、硫酸ｏ－ニトロフェノール（o-nitrophenol sulfate）、硫酸ｍ－ニトロフェノール（m-nitrophenol sulfate）、硫酸ｐ－ニトロフェノール（p-nitrophenol sulfate）、硫酸ｏ－クロロフェノール（o-chlorophenol sulfate）、硫酸ｍ－クロロフェノール（m-chlorophenol sulfate）、硫酸ｐ－クロロフェノール（

p-chlorophenol sulfate）等を挙げることができる。これらの化合物のうち、硫酸フェニル、硫酸ｏ－クレゾール、硫酸ｐ－ニトロフェノール、及び硫酸ｐ－クロロフェノールの構造式を以下に示す。

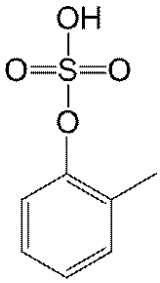
１）硫酸フェニル（phenyl sulfate）

【化２２】



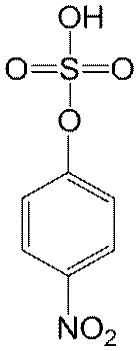
２）硫酸ｏ－クレゾール（o-cresol sulfate）

【化２３】



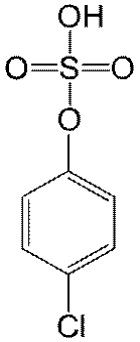
３）硫酸ｐ－ニトロフェノール（p-nitrophenol sulfate）

【化２４】



４）硫酸ｐ－クロロフェノール（p-chlorophenol sulfate）

【化２５】



【００１６】

本件抗体の由来、種類、クラス、形態等は特に制限されず、例えば本件抗体には、ヒト

由来の抗体；マウス、ラット等の非ヒト動物由来の抗体；ポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体（数種～数十種の抗体の混合物）、モノクローナル抗体；抗体の一部領域（例えば、定常領域）を異なる生物種由来の領域に置換したキメラ抗体又はヒト化抗体、モノクローナル抗体をペプシンで消化して得られるＦ（ａｂ′）$_2$抗体フラグメント、Ｆ（ａｂ′）$_2$抗体フラグメントを還元して得られるＦａｂ′抗体フラグメント、モノクローナル抗体をパパインで消化して得られるＦａｂ等の抗体フラグメント、抗体重（Ｈ）鎖可変領域と抗体軽（Ｈ）鎖可変領域とを、アミノ酸架橋によって連結させたｓｃＦｖ（１本鎖抗体）；などが含まれる。

【００１７】

本件抗体は、分離されているものが好ましい。ここで「分離されている」とは、人為的操作によって、抗体を、本来存在する環境から取り出したり、抗体が本来存在する環境とは別の環境下で発現させる等して、抗体が本来存在している状態とは異なった状態で存在していることを意味する。すなわち、「分離されている抗体」には、ある個体由来の抗体であって、かつ外的操作（人為的操作）が施されずに、当該個体の体内中又は体内由来の組織若しくは体液（血液、血漿、血清等）中に含まれる状態の抗体は含まれない。また、本件抗体は、人為的操作によって作製した生物又は細胞から産生される抗体（例えば、ハイブリドーマから産生される抗体）が好ましい。かかる「人為的操作によって作製した生物又は細胞から産生される抗体」には、（人為的操作の施されていない）天然に存在する生物又はＢ細胞から産生される抗体は含まれない。

【００１８】

本件抗体は、通常、Ｈ鎖補性決定領域（ＣＤＲ）１、Ｈ鎖ＣＤＲ２、及びＨ鎖ＣＤＲ３、並びにＬ鎖ＣＤＲ１、Ｌ鎖ＣＤＲ２、及びＬ鎖ＣＤＲ３を有し、通常これらＣＤＲ１～３の各領域のアミノ（Ｎ）末端及びカルボキシル（Ｃ）末端には、フレームワーク領域（ＦＲ）が連結されている。これらＣＤＲとしては、本件抗体のＨ鎖及びＬ鎖が立体構造を形成したときに、各ＣＤＲが相互に近接することにより、本件硫酸フェニル誘導体に対する特異性が生じるものであればよく、具体的なＣＤＲ１～３の組合せとしては、

（ＨＣ１－１）配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１、又は（ＨＣ１－１’）配列番号１に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１、

（ＨＣ２－１）配列番号２に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２、又は（ＨＣ２－１’）配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２、及び

（ＨＣ３－１）配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３、又は（ＨＣ３－１’）配列番号３に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３と、

（ＬＣ１－１）配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１、又は（ＬＣ１－１’）配列番号４に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１、

（ＬＣ２－１）配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２、又は（ＬＣ２－１’）配列番号５に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２、及び

（ＬＣ３－１）配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３、又は（ＬＣ３－１’）配列番号６に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３と

の組合せや、

（ＨＣ１－２）配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１、又は（ＨＣ１－２’）配列番号１１に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１、

（ＨＣ２－２）配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２、又は（ＨＣ２－２’）配列番号１２に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸

が置換されたアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２、及び
（ＨＣ３－２）配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３、又は（ＨＣ３－２’）配列番号１３に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３と、
（ＬＣ１－２）配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１、又は（ＬＣ１－２’）配列番号１４に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１、
（ＬＣ２－２）配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２、又は（ＬＣ２－２’）配列番号１５に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２、及び
（ＬＣ３－２）配列番号１６に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３、又は（ＬＣ３－２’）配列番号１６に示されるアミノ酸配列において、１、２、又は３個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３と
の組合せを挙げることができ、これらの中でも、（ＨＣ１－１）のＨ鎖ＣＤＲ１、（ＨＣ２－１）のＨ鎖ＣＤＲ２、及び（ＨＣ３－１）のＨ鎖ＣＤＲ３と、（ＬＣ１－１）のＬ鎖ＣＤＲ１、（ＬＣ２－１）のＬ鎖ＣＤＲ２、及び（ＬＣ３－１）のＬ鎖ＣＤＲ３との組合せや、（ＨＣ１－２）のＨ鎖ＣＤＲ１、（ＨＣ２－２）のＨ鎖ＣＤＲ２、及び（ＨＣ３－２）のＨ鎖ＣＤＲ３と、（ＬＣ１－２）のＬ鎖ＣＤＲ１、（ＬＣ２－２）のＬ鎖ＣＤＲ２、及び（ＬＣ３－２）のＬ鎖ＣＤＲ３との組合せが好ましい。

【００１９】

上記ＦＲのうちＨ鎖ＦＲとしては、Ｈ鎖ＣＤＲ１のＮ末端に連結されているＨ鎖ＦＲ１や、Ｈ鎖ＣＤＲ１のＣ末端（Ｈ鎖ＣＤＲ２のＮ末端）に連結されているＨ鎖ＦＲ２や、Ｈ鎖ＣＤＲ２のＣ末端（Ｈ鎖ＣＤＲ３のＮ末端）に連結されているＨ鎖ＦＲ３や、Ｈ鎖ＣＤＲ３のＣ末端に連結されているＨ鎖ＦＲ４を挙げることができる。また、上記ＦＲのうちＬ鎖ＦＲとしては、Ｌ鎖ＣＤＲ１のＮ末端に連結されているＬ鎖ＦＲ１や、Ｌ鎖ＣＤＲ１のＣ末端（Ｌ鎖ＣＤＲ２のＮ末端）に連結されているＬ鎖ＦＲ２や、Ｌ鎖ＣＤＲ２のＣ末端（Ｌ鎖ＣＤＲ３のＮ末端）に連結されているＬ鎖ＦＲ３や、Ｌ鎖ＣＤＲ３のＣ末端に連結されているＬ鎖ＦＲ４を挙げることができる。

【００２０】

上記Ｈ鎖ＦＲ１としては、具体的には、（ＨＦ１）配列番号７で示されるアミノ酸配列の１～２１番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１７で示されるアミノ酸配列の１～２５番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＨＦ１’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記Ｈ鎖ＦＲ２としては、具体的には、（ＨＦ２）配列番号７で示されるアミノ酸配列の２９～４７番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１７で示されるアミノ酸配列の３３～５１番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＨＦ２’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記Ｈ鎖ＦＲ３としては、具体的には、（ＨＦ３）配列番号７で示されるアミノ酸配列の５４～９４番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１７で示されるアミノ酸配列の５８～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＨＦ３’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記Ｈ鎖ＦＲ４としては、具体的には、（ＨＦ４）配列番号７で示されるアミノ酸配列の１０２～１１２番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１７で示されるアミノ酸配列の１０７～１１７番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＨＦ４’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

【００２１】

上記Ｌ鎖ＦＲ１としては、具体的には、（ＬＦ１）配列番号８で示されるアミノ酸配列の１～２２番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１８で示されるアミノ酸配列の１～２２番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＬＦ１’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記Ｌ鎖ＦＲ２としては、具体的には、（ＬＦ２）配列番号８で示されるアミノ酸配列の３４～４８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１８で示されるアミノ酸配列の３４～４８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＬＦ２’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記Ｌ鎖ＦＲ３としては、具体的には、（ＬＦ３）配列番号８で示されるアミノ酸配列の５６～８７番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１８で示されるアミノ酸配列の５６～８７番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＬＦ３’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記Ｌ鎖ＦＲ４としては、具体的には、（ＬＦ４）配列番号８で示されるアミノ酸配列の９７～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は配列番号１８で示されるアミノ酸配列の９７～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、或いは（ＬＦ４’）これらポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

【００２２】

本件抗体におけるＨ鎖ＣＤＲ１は、通常、Chothiaによる番号付けでＨ２６～３２の位置に存在する。また、本件抗体におけるＨ鎖ＣＤＲ２は、通常、Chothiaによる番号付け（文献「Chothia and Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901-917」参照）で、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、及びＨ５３～５６の位置に存在する。また、本件抗体におけるＨ鎖ＣＤＲ３は、通常、Chothiaによる番号付けで、Ｈ９５～９９、Ｈ１０１、及びＨ１０２の位置に存在する。また、本件抗体におけるＬ鎖ＣＤＲ１は、通常、Chothiaによる番号付けでＬ２４～３４の位置に存在する。本件抗体におけるＬ鎖ＣＤＲ２は、通常、Chothiaによる番号付けでＬ５０～５６の位置に存在する。また、本件抗体におけるＬ鎖ＣＤＲ３は、通常、Chothiaによる番号付けでＬ８９～９７の位置に存在する。

【００２３】

本件抗体としては、配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域と、配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域とを含むものや、配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域と、配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域とを含むものを挙げることができ、特に、配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖と、配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖とを含むものや、配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖と、配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖とを含むものを具体的に例示することができる。

【００２４】

本件抗体遺伝子としては、本件抗体をコードする抗体遺伝子であれば特に制限されず、例えば、
（ＨＣ１－１）配列番号２１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体、

（ＨＣ２－１）配列番号２２に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（配列番号２に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体、及び
（ＨＣ３－１）配列番号２３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体と、
（ＬＣ１－１）配列番号２４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体、
（ＬＣ２－１）配列番号２５に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体、及び
（ＬＣ３－１）配列番号２６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体とを含むものや、
（ＨＣ１－２）配列番号３１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体、
（ＨＣ２－２）配列番号３２に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体、及び
（ＨＣ３－２）配列番号３３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体と、
（ＬＣ１－２）配列番号３４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体、
（ＬＣ２－２）配列番号３５に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体、及び
（ＬＣ３－２）配列番号３６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（配列番号１６に示されるアミノ酸配列からなるＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体とを含むものを挙げることができる。

【００２５】

さらに本件抗体遺伝子としては、
配列番号２７に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号２８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、
配列番号３７に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号３８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものを具体的に例示することができる。

【００２６】

特に本件抗体遺伝子としては、
配列番号２９に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、
配列番号３０に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、
配列番号３９に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号４０に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものを具体的に例示することができる。

【００２７】

本明細書において、「少なくとも８０％以上の同一性」とは、同一性が８０％以上であることを意味し、好ましくは８５％以上、より好ましくは８８％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらにより好ましくは９３％以上、特に好ましくは９５％以上、特により好ましくは９８％以上、最も好ましくは１００％の同一性を意味する。

【００２８】

本件ベクターにおけるプロモーターとしては、プロモーターの下流に位置する本件抗体遺伝子がコードするｍＲＮＡの転写を開始させる領域であればよく、プロモーターには、通常転写開始点（ＴＳＳ）が含まれる。

【００２９】

本件ベクターにおけるプロモーターや本件ベクターは、導入する宿主細胞（又は宿主生物）の種類に応じて適宜選択することができる。

【００３０】

宿主細胞として酵母（例えば、Saccharomyces Cerevisiae、Schizosaccharomyces Pombe等）を用いる場合、本件ベクターとしては、例えば、ＹＥＰ１３（ＡＴＣＣ３７１１５）、ＹＥｐ２４（ＡＴＣＣ３７０５１）、ＹＣｐ５０（ＡＴＣＣ３７４１９）等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーター、ｇａｌ１プロモーター、ｇａｌ１０プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、ＭＦα１プロモーター、ＣＵＰ１プロモーターなどを挙げることができる。

【００３１】

また、宿主細胞として哺乳動物細胞（例えば、ヒト由来のナマルバ［Namalwa］細胞、サル由来のＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来のＣＨＯ細胞等）を用いる場合、本件ベクターとしては、例えば、ｐcDNAＩ、ｐｃＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７（特開平３－２２９７９号公報；Cytotechnology,3,133,(1990)）、ｐＡＳ３－３（特開平２－２２７０７５号公報）、ｐＣＤＭ８（Nature,329,840,(1987)）、ｐcDNAＩ／Ａｍｐ（Invitrogen社製）、ｐＲＥＰ４（Invitrogen社製）、ｐＡＧＥ１０３（J.Biochemistry,101,1307（1987））、ｐＡＧＥ２１０等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のＩＥ（immediate early）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター等を挙げることができる。

【００３２】

また、宿主細胞として昆虫細胞（例えば、Spodopterafrugiperdaの卵巣細胞であるＳｆ

９細胞、Ｓｆ２１細胞、Trichoplusianiの卵巣細胞であるＨｉｇｈ５細胞等）を用いる場合、本件ベクターとしては、例えば、組換えバキュロウイルス作製法において用いられるトランスファーベクター、具体的には、ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３、ｐＢｌｕｅＢａｃＩＩＩ（ともにInvitorogen社製）等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、ポリヘドリンプロモーター、ｐ１０プロモーター等を挙げることができる。

【００３３】

また、宿主細胞として植物細胞（例えば、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等）を用いる場合、発現ベクターとしては、例えば、Ｔｉプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）の３５Ｓプロモーター、イネアクチン１プロモーター等を挙げることができる。

【００３４】

本件ベクターとしては、遺伝子発現効率をさらに高めるために、エンハンサー領域やリボソーム結合領域（ＲＢＳ；ribosome binding site）の塩基配列をさらに含むものや、本件宿主細胞のスクリーニングのために、宿主細胞の種類に応じた薬剤耐性遺伝子（例えば、スペクチノマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ジェネティシン耐性遺伝子等）をさらに含むものが好ましい。エンハンサー領域は、通常プロモーターの上流に配置され、ＲＢＳは、通常プロモーターと本件遺伝子の間に配置される。本件ベクターに組み込む本件抗体遺伝子のヌクレオチド配列は、発現させる宿主細胞に合わせてコドン配列の最適化がされていてもよい。本件ベクターは、遺伝子組み換え技術を用いて公知の方法により作製することができる。

【００３５】

本件宿主細胞の生物種としては、本件抗体遺伝子のｍＲＮＡが転写され、本件抗体タンパク質が発現されるものであればよく、例えば、酵母（例えば、Saccharomyces Cerevisiae、Schizosaccharomyces Pombe等）、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、サル等）、昆虫（例えば、Spodopterafrugiperda、Trichoplusiani等）を挙げることができる。

【００３６】

本件ハイブリドーマとしては、本件抗体を産生する、２又は３以上の細胞（好ましくは哺乳動物細胞）が融合して得られた細胞（融合細胞）であればよく、本件抗体を産生するＢ細胞と、増殖能を有する細胞（例えば、ミエローマ細胞）との融合細胞が好ましい。

【００３７】

本件宿主細胞は、本件ベクターを、宿主細胞の種類に応じた方法により、宿主細胞へ導入（トランスフェクション）することにより得ることができる。

【００３８】

宿主細胞として上記酵母を用いる場合、本件ベクターの酵母への導入方法としては、酵母にＤＮＡを導入する方法であればよく、例えば、エレクトロポレーション法（Methods. Enzymol.,194,182(1990)）、スフェロプラスト法（Proc.Natl.Acad.Sci.U. S. A,84,1929(1978)）、酢酸リチウム法（J.Bacteriology,153,163(1983)）等の方法を挙げることができる。

【００３９】

また、宿主細胞として上記哺乳動物細胞を用いる場合、本件ベクターの哺乳動物細胞への導入方法としては、哺乳動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればよく、例えば、エレクトロポレーション法（Cytotechnology,3,133(1990)）、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５号公報）、リポフェクション法（Proc.Natl.Acad.Sci.U. S.A.,84,7413(1987)）等の方法を挙げることができる。

【００４０】
また、宿主細胞として上記昆虫細胞を用いる場合、本件ベクターの昆虫細胞への導入方法としては、例えば「Current Protocols in Molecular Biology」、「Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H.Freeman and Company, New York（１９９２）」、「Bio/Technology,6,47(1988)」等に記載の方法にしたがって、本件ベクター（トランスファーベクター）と、バキュロウイルス由来のゲノムＤＮＡとを上記昆虫細胞にコトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを作製する方法を挙げることができる。かかるコトランスフェクションの方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５号公報）、リポフェクション法（Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,84,7413(1987)等の方法を挙げることができる。

【００４１】
また、宿主細胞として上記植物細胞を用いる場合、本件ベクターの植物細胞への導入方法としては、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を用いる方法（特開昭５９－１４０８８５号公報、特開昭６０－７００８０号公報）、エレクトロポレーション法（特開昭６０－２５１８８７号公報）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第２６０６８５６号公報、日本特許第２５１７８１３号公報）等の方法を挙げることができる。

【００４２】
本件抗体は、上述の方法で得られた本件宿主細胞を、宿主細胞に応じた培養液中で培養することにより得ることができる。特に、キメラ抗体は、特開２００５－２４５３３７号公報に記載の技術に基づいて作製することができる。

【００４３】
また、トランスジェニック動物作製技術を用いて本件抗体遺伝子（本件ベクター）が組み込まれたマウス、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ブタ等のトランスジェニック動物を作製し、かかるトランスジェニック動物の血液、ミルク中などから本件抗体遺伝子に由来する抗体を大量に産生することもできる。

【００４４】
さらに、本件硫酸フェニル誘導体をハプテンとし、当該ハプテンを、リンカーを介してキャリアタンパク質に結合させた物質（抗原）を、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット）に免疫し、細胞融合技術を用いて、本件硫酸フェニル誘導体に対する抗体を産生する細胞クローンを調製し、上記抗原を固相化したプレートを用いたＥＬＩＳＡ法（好ましくは、本件硫酸フェニル誘導体をコンペティターとして用いたＥＬＩＳＡの阻害アッセイ［阻害ＥＬＩＳＡ法］）によるスクリーニングにより、本件ハイブリドーマや、本件抗体を含む培養上清を得ることができる。本件抗体は、かかる培養上清から公知の抗体精製技術を用いて分離し、精製することができる。

【００４５】
上記キャリアタンパク質としては、通常抗原の作製にあたり慣用される天然又は合成の高分子タンパク質を広く使用することができる。例えば、keyhole limpet hemocyanin（ＫＬＨ）、牛血清アルブミン（ＢＳＡ）、オボアルブミン（ＯＶＡ）、馬血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ヒツジ血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン等の動物アルブミン類、牛血清グロブリン、馬血清グロブリン、ヒト血清グロブリン、ヒツジ血清グロブリン、ウサギ血清グロブリン、卵グロブリン等の動物のグロブリン類、牛チログロブリン、馬チログロブリン、ヒトチログロブリン、ヒツジチログロブリン、ウサギチログロブリン等の動物のチログロブリン類、牛ヘモグロビン、馬ヘモグロビン、ヒトヘモグロビン、ヒツジヘモグロビン、ウサギヘモグロビン等の動物のヘモグロビン類、動物のヘモシアニン類、ポリリジン、ポリグルタミン酸、リジン－グルタミン酸共重合体等を挙げることができる。

【００４６】
上記ハプテン（本件硫酸フェニル誘導体）と、キャリアタンパク質とを結合させる場合に用いるリンカーとしては、タンパク質又はペプチド同士の連結に通常使用されるもので

あれば特に限定されない。このうち、ＳＨ基とアミノ基を架橋するヘテロ二価反応試薬が好ましく、具体的には、－（４－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミド（N-(11-Maleimidoundecanoyloxy)succinimide：ＫＭＵＳ）、Ｎ－（４－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミド（N-(4-Maleimidobutyryloxy) succineimide：ＧＭＢＳ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（succinimidyl-4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate：ＳＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＭＢＳ）、Ｎ－（６－マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミド（ＥＭＣＳ）、Ｎ－（８－マレイミドカプリルオキシ）スクシンイミド（ＨＭＣＳ）、Ｎ－（（４－（２－マレイミドエトキシ）スクシニル）オキシ）スクシンイミド（ＭＥＳＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド（ｓｕｌｆｏ－ＭＢＳ）、Ｎ－（４－マレイミドブチリルオキシ）スルホスクシンイミド（ｓｕｌｆｏ－ＧＭＢＳ）、Ｎ－（６－マレイミドカプロイルオキシ）スルホスクシンイミド（ｓｕｌｆｏ－ＥＭＣＳ）、Ｎ－（８－マレイミドカプリルオキシ）スルホスクシンイミド（ｓｕｌｆｏ－ＨＭＣＳ）、Ｎ－（１１－マレイミドウンデカノイルオキシ）スルホスクシンイミド（ｓｕｌｆｏ－ＫＭＵＳ）、スルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ）等を挙げることができる。

【００４７】

本件検出方法としては、本件抗体を用いて、生体試料中の本件硫酸フェニル誘導体を検出する工程を備えた方法であればよく、具体的な検出方法としては、本件抗体を用いた免疫組織化学染色法；ＥＬＩＳＡ（Emzyme-linked immunosorbent assay）法、阻害ＥＬＩＳＡ法等のＥＩＡ（Enzyme immunoassay）法；ＲＩＡ（Radioimmunoassay）法；などを挙げることができる。

【００４８】

本件検出用キットとしては、「生体試料中の本件硫酸フェニル誘導体を検出するため」という用途に限定された、本件抗体又はその標識物を含むキットであり、かかるキットには、一般にこの種のキットに用いられる成分、例えば担体、ｐＨ緩衝剤、安定剤の他、取扱説明書、生体試料中の本件硫酸フェニル誘導体を検出するための説明書等の添付文書が通常含まれる。

【００４９】

上記本件抗体の標識物における標識物質としては、例えば、ペルオキシダーゼ（例えば、horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescence Protein；ＧＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（Cyan Fluorescence Protein；ＣＦＰ）、青色蛍光タンパク質（Blue Fluorescence Protein；ＢＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（Yellow Fluorescence Protein；ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（Red Fluorescence Protein；ＲＦＰ）、ルシフェラーゼ（luciferase）等の蛍光タンパク質、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ若しくは^{131}Ｉ等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質を挙げることができる。

【００５０】

上記生体試料としては、本件硫酸フェニル誘導体が含まれる、被験者等の生体由来の試料であればよく、組織、細胞、器官等の非液性試料や、血液、尿、唾液等の液性試料を挙げることができ、これらの中でも血液（血漿、血清）、尿、又は組織が好ましい。

【００５１】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、本実施例で使用した試薬のメーカーや品番を表１

に示す。

【実施例１】

【００５２】

１．抗原の合成方法

１－１　４－メルカプトフェニルサルフェートカリウム塩の合成

ビス（４－ヒドロキシフェニル）ジスルフィド（４ｍｍｏｌ）とＳＯ$_3$・ピリジン（１２ｍｍｏｌ）をピリジン（８ｍＬ）中に混合し、４５℃で２時間撹拌した。反応後、氷冷下にて水酸化カリウム水溶液（１Ｍ、２０ｍＬ）をゆっくり滴下し、イソプロパノールを約１００ｍＬ加えて冷蔵庫に終夜静置した。沈殿物をろ取し、エタノール：水＝３：１の溶液を１６０ｍＬ加え、超音波照射にて溶解させたのち、冷蔵庫に終夜静置した。沈殿物をろ取することにより中間体のジスルフィドジサルフェート体が得られた。得られた化合物は、^{1}Ｈ－ＮＭＲ、高分解能質量分析計（ＨＲＭＳ）により同定した（文献「Edwards, D. R.; Lohman, D. C.; Wolfenden, R. Journal of the American Chemical Society 2012, 134, 525.」参照）。

【００５３】

次いで、中間体のジスルフィドジサルフェート体とポリスチレンビーズ担持トリフェニルホスフィン（２．３９ｍｍｏｌ／ｇ）をメタノール－水（１：１）中に混合し、１２０℃で終夜撹拌する。反応後、ビーズをろ過することで目的物の４－メルカプトフェニルサルフェートカリウム塩を得た。生成物はＨＲＭＳにより確認した。

【００５４】

１－２　フェニルサルフェート（ＰＳ）-スカシガイのヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin；ＫＬＨ）複合体の作製

ＫＬＨ（１０ｍｇ）を１×ＰＢＳ溶液（１ｍＬ）にて懸濁させ、室温下、２０，４００×ｇにて５分間の遠心後その上清を分取した。ＤＭＳＯにて２０ｍｇ／ｍＬに調製したN-(11-Maleimidoundecanoyloxy)succinimide（以下、「ＫＭＵＳ」という）（ＤＯＪＩＮＤＯ社製）を２５μＬ添加し（モル比１：４００）、室温にて３０分間混合した。４℃条件下２０，４００×ｇにて５分間の遠心を行い、その上清を１×ＰＢＳ溶液で平衡化したＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥヘルスケア社製）にて分離させ、フラクションコレクターによって分取した。ブラッドフォード法にてタンパク質濃度が高い分画溶液を回収して約３ｍＬの溶液を得た。この溶液１．５ｍＬに対して、上記「１－１」で合成した４－メルカプトフェニルサルフェートカリウム塩１５μｍｏｌ（ＫＬＨとの推定モル比１：１０，０００）を加えて、室温にて終夜混合した。セルロース膜内に封入し、１×ＰＢＳ溶液中で透析処理を行い、０．２２μｍフィルターにてろ過滅菌処理したものを抗原として使用した。この抗原をＫＬＨ－ＫＭＵＳ－ＰＳと称する。

【００５５】

１－３　フェニルサルフェート－各種アルブミン複合体の作製

ウシ血清アルブミン（Bovine serum albumin, ＢＳＡ）３ｍｇ及びオボアルブミン（Ov albumin；ＯＶＡ）１０ｍｇに対して、それぞれＫＭＵＳをモル比１：１４７，１：４０の量を用いて上記「１－２」と同様の方法を行い、それぞれの複合体を作製し、ＥＬＩＳＡ用の固相抗原として用いた。この抗原をそれぞれＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ、及びＯＶＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳと称する。

ＢＳＡについては、１０ｍｇに対して、リンカーとしてN-(4-Maleimidobutyryloxy) succineimide（以下、ＧＭＢＳ）（ＤＯＪＩＮＤＯ社製）、又はsuccinimidyl-4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate（以下、「ＳＭＣＣ」という）（Thermo Fisher Scientific社製）をそれぞれモル比１：１００の量を用いて上記「１－２」と同様の方法を行い、各々の複合体を作製し、ＥＬＩＳＡ用の固相抗原として用いた。この抗原をそれぞれＢＳＡ－ＧＭＢＳ－ＰＳ、ＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳと称する。

【００５６】

１－４　類似化合物の購入先情報や合成プロトコル

フェノール誘導体（１０ｍｍｏｌ）とＳＯ$_3$・ピリジン（１２ｍｍｏｌ）をピリジン（

１０ｍＬ）中に混合し、４５℃で２時間撹拌した。反応後、氷冷下にて水酸化カリウム水溶液（１Ｍ、５０ｍＬ）をゆっくり滴下し、イソプロパノールを約２００ｍＬ加えて冷蔵庫に終夜静置した。沈殿物をろ取し、加温しながらメタノールに溶解させた。不溶物を除き、メタノール溶解液を加温・濃縮して再結晶することにより目的物のサルフェート体が得られた。得られた化合物は、^{1}Ｈ－ＮＭＲ、^{13}Ｃ－ＮＭＲ、ＨＲＭＳにより同定し、単一化合物であることを確認した。元素分析による測定精度は±０．３以内であった（文献「Edwards, D. R.; Lohman, D. C.; Wolfenden, R. Journal of the American Chemical Society 2012, 134, 525.」参照）。

【００５７】

【表１】

試薬名	メーカー（品番）
Bis(4-hydroxyphenyl) Disulfide	TCI(B3827)
Pyridine - Sulfur Trioxide Complex	TCI(P0998)
Pyridine (JIS GR)	nacalai tesque(29509-25)
Triphenylphosphine, polymer-bound	SIGMA(93093-5G)
KLH	MPB(151233)
BSA	Wako(017-23294)
OVA	Sigma(A5503)
KMUS	DOJINDO(K214)
SMCC	Thermo Fisher Scientific(22360)
GMBS	DOJINDO(343-05043)
Imject Freund's Complete Adjuvant	Thermo Fisher Scientific(77140)
Imject Freund's Incomplete Adjuvant	Thermo Fisher Scientific(77145)
polyethylene glycol 1500	Roche(10783641001)
o-Cresol	TCI(C0402)
p-Nitrophenol	Wako(143-02242)
p-Chlorophenol	Wako(031-02772)
8-Quinolinol	TCI(H0305)
1-Naphthol	TCI(N0026)
2-Naphthol	TCI(N0027)
4-Methylumbelliferone	TCI(M0453)
Indoxyl sulfate potassium Salt	nacalai tesque(19208-04)
p-Cresol sulfate potassium Salt	TCI(C0400)
1 x TMB	eBioscience(00-4201-56)
HRP streptavidin	BioLegend(405210)

【実施例２】

【００５８】

２．本件抗体の作製

２－１　方法
［抗原感作したマウス由来の脾臓細胞の調製］
以下の手順［１］～［４］にしたがって、抗原感作したマウス由来の脾臓細胞を調製した。
［１］免疫用の抗原（ＫＬＨ－ＫＭＵＳ－ＰＳ）１００μｇを、ＰＢＳ溶液に溶解し、アジュバンド（Inject Freund's Complete Adjuvant［Thermo Fisher Scientific社製］）を混合して免疫用抗原（１００μｇ／２００μＬ）を調製し、ＢＡＬＢ／Ｃマウス（８週齢、雌）１匹又は２匹の腹腔内に免疫した。
［２］初回免疫４週間後、ＫＬＨ－ＫＭＵＳ－ＰＳ １００μｇと、Inject Freund's Complete Adjuvantとの混合液２００μＬを調製し、初回免疫同様に、腹腔内に追加免疫した。
［３］追加免疫１６日又は９日後、ＫＬＨ－ＫＭＵＳ－ＰＳ １００μｇを、ＰＢＳ溶液に溶解して免疫用抗原（１００μｇ／２００μＬ）を調製し、腹腔内に最終免疫した。
［４］最終免疫３日後、ＢＡＬＢ／Ｃマウスから脾臓を摘出し、赤血球を溶血処理した後、細胞融合に用いる脾臓細胞を定法にしたがって調製した。
【００５９】
［ハイブリドーマの調製］
以下の手順［１］～［８］にしたがって、脾臓細胞からハイブリドーマの調製を行った。なお、細胞の培養は、CO_2インキュベーター（５％CO_2／２０％O_2、湿度９５％、３７℃）内で行った。
［１］上記［抗原感作したマウス由来の脾臓細胞の調製］の項目に記載の方法にしたがって調製した脾臓細胞と、ＳＰ２／０－Ａｇ１４ミエローマ細胞（約１×10^8個）とを、５０ｍＬ遠沈管に回収し、ＲＰＭＩ１６４０液体培地で２回洗浄した。
［２］３７℃に加温したポリエチレングリコール１５００（ＰＥＧ１５００）(Roche社製)１ｍＬをゆっくり加えて撹拌した後、３７℃のウォーターバス中で１分間穏やかに撹拌し、さらに１分間静置した。
［３］３７℃に加温したＰＥＧ１５００を１ｍＬ、１０ｍＬの順にゆっくり加えた後、５０ｍＬとなるようにＲＰＭＩ１６４０液体培地を加えた。
［４］上記［２］及び［３］の操作による細胞融合処理後、遠心処理し、上清（ＰＥＧ１５００を含むＲＰＭＩ１６４０液体培地）を除去した後、細胞を、１０％ ＦＢＳ、１００unit／ｍＬ ペニシリン、１００μｇ／ｍＬ ストレプトマイシン、及び５０μＭ ２－メルカプトエタノールを含むＲＰＭＩ１６４０液体培地（以下、「ＲＰＭＩ１６４０培養液」という）８０ｍＬに懸濁し、８枚の９６ウェルマイクロプレートに１００μＬ／ウェルとなるように播種した。
［５］１日間培養後、２×ＨＡＴ（２００μＭ ヒポキサンチンナトリウム塩、０．８μＭアミノプテリン、３２μＭ チミジン）を含むＲＰＭＩ１６４０培養液（以下、「ＨＡＴ培養液」という） １００μＬ／ウェルを添加し、約１週間培養することにより、融合細胞の選択を行った。
［６］ＨＡＴ培養液を一部回収し、硫酸フェニルに対する反応性を解析するために、ＥＬＩＳＡ用固相抗原４種（ＢＳＡ、ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ、ＯＶＡ、及びＯＶＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ）を用いたＥＬＩＳＡ法を行った。
［７］硫酸フェニルを含むＥＬＩＳＡ用固相抗原２種（ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ、及びＯＶＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ）に、反応性（陽性）を示すハイブリドーマを選択し、マウス胸腺細胞とともに１×ＨＴ（１００μＭ ヒポキサンチンナトリウム塩、１６μＭ チミジン）を含むＲＰＭＩ１６４０培養液（以下、「ＨＴ培養液」という）に懸濁した後、１細胞／ウェルとなるように９６ウェルマイクロプレートに播種し、１週間程度培養することによりシングルクローン化を行った。
［８］シングルクローン化したハイブリドーマの中から、硫酸フェニルを含む抗原３種（ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ、ＢＳＡ－ＧＭＢＳ－ＰＳ、及びＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳ）に陽性を示すクローンを選別した後、ＰＢＳにて１０倍希釈したハイブリドーマ培養上清と

、ＨＲＰ標識した抗マウスＩｇＧ（本件抗体検出用２次抗体）と、硫酸フェニル（コンペティター）とを用いた阻害ＥＬＩＳＡ法によりスクリーニングを行い、硫酸フェニルに結合する抗体を産生するハイブリドーマクローン２種（ＹＫＳ１９．２及びＹＫ３３．１）を取得した（図１参照）。なお、阻害ＥＬＩＳＡ法は、以下の［阻害ＥＬＩＳＡ法］の項目に記載の方法において、ビオチン化処理した抗体に代えて、１０倍希釈したハイブリドーマ培養上清を用い、ＨＲＰ標識したストレプトアビジンに代えて、ＨＲＰ標識した抗マウスＩｇＧを用いて行った。

【００６０】

［阻害ＥＬＩＳＡ法］

以下の手順［１］～［１０］にしたがって、阻害ＥＬＩＳＡ法を行った。なお、抗体量が抗原量に対して過剰量にならない条件を選択するために、あらかじめタイトレーション（濃度検定）を行った。

［１］ハイブリドーマＹＫＳ１９．２及びＹＫ３３．１の培養上清を、定法にしたがってアフィニティー精製し、抗体精製物を調製した後、ＹＫＳ１９．２由来抗体及びＹＫ３３．１由来抗体を、定法にしたがってビオチン化処理した。

［２］０．５μｇ／ｍＬの硫酸フェニルを含む抗原２種（ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ、及びＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳ）を、Nunc Maxisorp 96-well microplate (Thermo Fisher Scientific社製)の各ウェルに５０μＬずつ分注し、４℃で２４時間インキュベートすることにより、固相化処理を行った。

［３］抗原溶液を除去した後、１×ＰＢＳ溶液１５０μＬにて各ウェルを４回ずつ洗浄した。

［４］１％ＢＳＡ／１×ＰＢＳ溶液を各ウェルに２００μＬずつ添加し、４℃で２時間以上インキュベートすることにより、ブロッキング処理を行った。

［５］ブロッキング溶液を除去した後、１×ＰＢＳ溶液２００μＬにて各ウェルを１回ずつ洗浄し、固相化プレート２種（ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ固相化プレート及びＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳ固相化プレート）を調製した。

［６］各種濃度（０、１、１０、１００μｇ／ｍＬ）のコンペティター９種（硫酸フェニル、硫酸ｏ－クレゾール、硫酸ｐ－ニトロフェノール、硫酸ｐ－クロロフェノール、硫酸キノリノール、硫酸１－ナフトール、硫酸２－ナフトール、硫酸４－メチルウンベリフェリル、及び硫酸インドキシル）を含む血漿（ヒトプール血漿［Biopredic社製］）又は血清（ヒトプール血清［日水製薬社製］）を調製し、ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ固相化プレート及びＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳ固相化プレートの各ウェルに２５μＬずつ分注した。

［７］ビオチン化処理した抗体２種（ＹＫＳ１９．２由来抗体及びＹＫ３３．１由来抗体）（１μｇ／ｍＬ）２５μＬを、固相プレートの各ウェルに添加し、攪拌した後、４℃で１時間インキュベートすることにより、抗原（ＢＳＡ－ＫＭＵＳ－ＰＳ、又はＢＳＡ－ＳＭＣＣ－ＰＳ）と、抗体（ＹＫＳ１９．２由来抗体、又はＹＫ３３．１由来抗体）の結合を競合的に阻害した。

［８］各ウェルを、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０／１×ＰＢＳ溶液１７０μＬにて５回ずつ洗浄し、ＨＲＰ標識したストレプトアビジン（BioLegend社製）の２０００倍希釈溶液を５０μＬずつ添加し、４℃で１時間インキュベートすることにより、２次抗体反応を行った。

［９］各ウェルを、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０／１×ＰＢＳ溶液１５０μＬにて５回ずつ洗浄し、ＨＲＰの基質溶液である１×ＴＭＢ（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）（eBiosience社製）を５０μＬずつ添加し、室温で１５～６０分間インキュベートした。

［１０］１ｍｏｌ／Ｌのリン酸溶液を５０μＬずつ加えることにより、ＨＲＰとＴＭＢの反応を停止させた。反応が完全に停止したことを目視で確認し、４５０ｎｍにおける吸光度（OD_{450}）（図１の縦軸）をプレートリーダーにて測定した。

【００６１】

２－２　結果

［本件抗体を産生するハイブリドーマの単離］

硫酸フェニルを含む抗原（ＫＬＨ－ＫＭＵＳ－ＰＳ）をマウスに免疫した結果、硫酸フェニルに結合する抗体を産生するハイブリドーマクローン２種（ＹＫＳ１９．２及びＹＫ３３．１）が得られた（図１参照）。また、阻害ＥＬＩＳＡ法による解析を行った結果、かかるハイブリドーマクローンから精製された抗体（ＹＫＳ１９．２由来抗体）は、血漿又は血清中の本件硫酸フェニル誘導体（硫酸フェニル、硫酸ｏ－クレゾール、硫酸ｐ－ニトロフェノール、及び硫酸ｐ－クロロフェノール）に結合することが示された（図２～４参照）。一方、血漿又は血清中の本件硫酸フェニル誘導体以外の化合物（硫酸キノリノール、硫酸１－ナフトール、硫酸２－ナフトール、硫酸４－メチルウンベリフェリル、及び硫酸インドキシル）に対しては、結合性を示さなかった（図２～４参照）。

これらの結果は、本件抗体は、血液試料（血清、血漿）等の生体試料中の本件硫酸フェニル誘導体（硫酸フェニル、硫酸ｏ－クレゾール、硫酸ｐ－ニトロフェノール、及び硫酸ｐ－クロロフェノール）に対して特異的に結合する抗体であることが示された。

【００６２】

［本件抗体遺伝子の同定］

ハイブリドーマクローン２種（ＹＫＳ１９．２及びＹＫ３３．１）を基に、定法にしたがって同定した本件抗体（ＹＫＳ１９．２由来抗体及びＹＫ３３．１由来抗体）遺伝子のヌクレオチド配列と、それらがコードするアミノ酸配列を表２及び３に示す。また、抗体Ｈ鎖ＣＤＲ１は、Chothiaによる番号付けでＨ２６～３２の位置に存在し、抗体Ｈ鎖ＣＤＲ２は、Chothiaによる番号付けで、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、及びＨ５３～５６の位置に存在し、抗体Ｈ鎖ＣＤＲ３は、Chothiaによる番号付けで、Ｈ９５～９９、Ｈ１０１、及びＨ１０２の位置に存在することが知られている。また、抗体Ｌ鎖ＣＤＲ１は、Chothiaによる番号付けでＬ２４～３４の位置に存在し、抗体Ｌ鎖ＣＤＲ２は、Chothiaによる番号付けでＬ５０～５６の位置に存在し、抗体Ｌ鎖ＣＤＲ３は、Chothiaによる番号付けでＬ８９～９７の位置に存在することが知られている。かかる点を考慮して、同定した本件抗体遺伝子のヌクレオチド配列情報と、それらがコードするアミノ酸配列情報を基に、ＣＤＲ１～３のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を、Chothiaによる番号付けで特定した（表２及び３参照）。

【００６３】

【表２】
ＹＫＳ１９．２由来抗体

Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子	配列番号２１のヌクレオチド配列
Ｈ鎖ＣＤＲ１	配列番号１のアミノ酸配列
Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子	配列番号２２のヌクレオチド配列
Ｈ鎖ＣＤＲ２	配列番号２のアミノ酸配列
Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子	配列番号２３のヌクレオチド配列
Ｈ鎖ＣＤＲ３	配列番号３のアミノ酸配列
Ｈ鎖Ｖ領域遺伝子	配列番号２７のヌクレオチド配列
Ｈ鎖Ｖ領域	配列番号７のアミノ酸配列
Ｈ鎖遺伝子	配列番号２９のヌクレオチド配列
Ｈ鎖	配列番号９のアミノ酸配列
Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子	配列番号２４のヌクレオチド配列
Ｌ鎖ＣＤＲ１	配列番号４のアミノ酸配列
Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子	配列番号２５のヌクレオチド配列
Ｌ鎖ＣＤＲ２	配列番号５のアミノ酸配列
Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子	配列番号２６のヌクレオチド配列
Ｌ鎖ＣＤＲ３	配列番号６のアミノ酸配列
Ｌ鎖Ｖ領域遺伝子	配列番号２８のヌクレオチド配列
Ｌ鎖Ｖ領域	配列番号８のアミノ酸配列
Ｌ鎖遺伝子	配列番号３０のヌクレオチド配列
Ｌ鎖	配列番号１０のアミノ酸配列

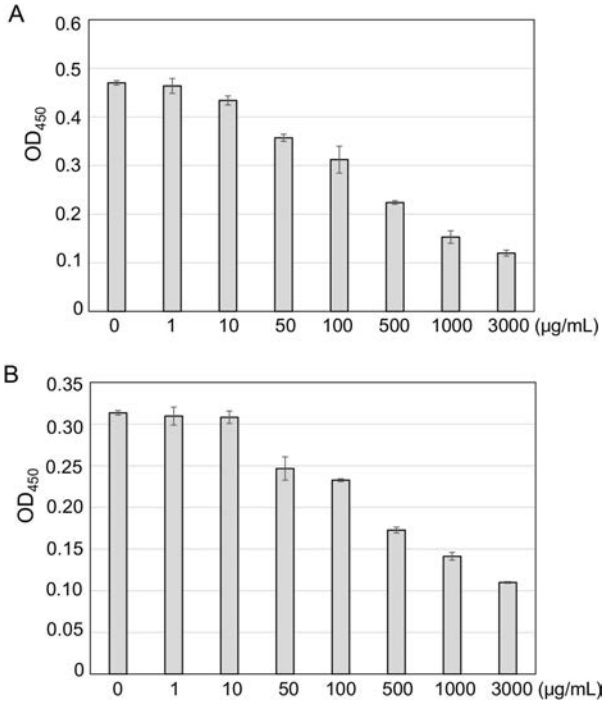
【００６４】

【表３】
ＹＫ３３．１由来抗体

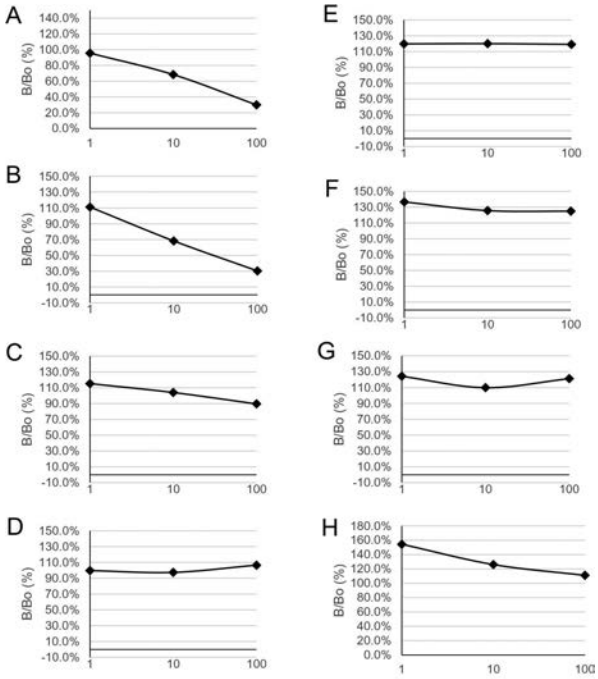
Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子	配列番号３１のヌクレオチド配列
Ｈ鎖ＣＤＲ１	配列番号１１のアミノ酸配列
Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子	配列番号３２のヌクレオチド配列
Ｈ鎖ＣＤＲ２	配列番号１２のアミノ酸配列
Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子	配列番号３３のヌクレオチド配列
Ｈ鎖ＣＤＲ３	配列番号１３のアミノ酸配列
Ｈ鎖Ｖ領域遺伝子	配列番号３７のヌクレオチド配列
Ｈ鎖Ｖ領域	配列番号１７のアミノ酸配列
Ｈ鎖遺伝子	配列番号３９のヌクレオチド配列
Ｈ鎖	配列番号１９のアミノ酸配列
Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子	配列番号３４のヌクレオチド配列
Ｌ鎖ＣＤＲ１	配列番号１４のアミノ酸配列
Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子	配列番号３５のヌクレオチド配列
Ｌ鎖ＣＤＲ２	配列番号１５のアミノ酸配列
Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子	配列番号３６のヌクレオチド配列
Ｌ鎖ＣＤＲ３	配列番号１６のアミノ酸配列
Ｌ鎖Ｖ領域遺伝子	配列番号３８のヌクレオチド配列
Ｌ鎖Ｖ領域	配列番号１８のアミノ酸配列
Ｌ鎖遺伝子	配列番号４０のヌクレオチド配列
Ｌ鎖	配列番号２０のアミノ酸配列

【産業上の利用可能性】
【００６５】
本発明は、硫酸フェニル等の尿毒症物質に起因する症状又は疾患（尿毒症）の早期発見及び早期治療や予防の他、ＱＯＬ向上や医療費削減等に資するものである。

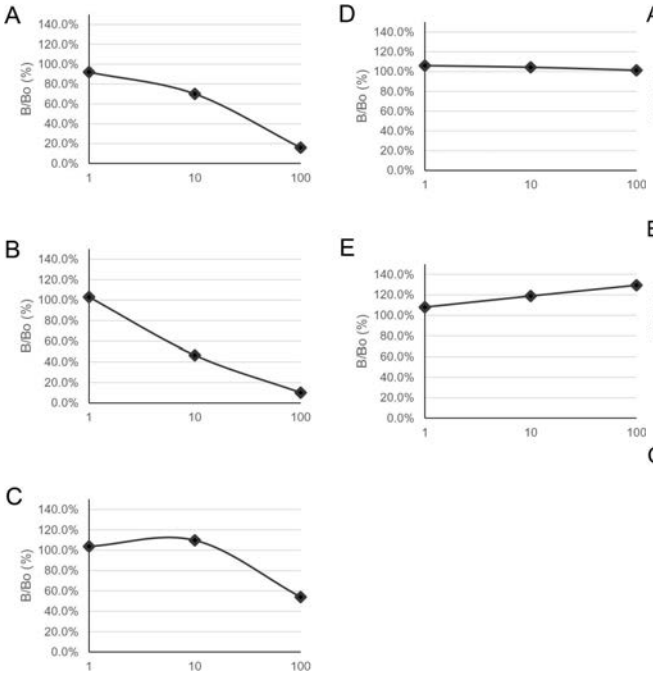
【図１】


A
OD450
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 1 10 50 100 500 1000 3000 (μg/mL)
B
OD450
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
0 1 10 50 100 500 1000 3000 (μg/mL)

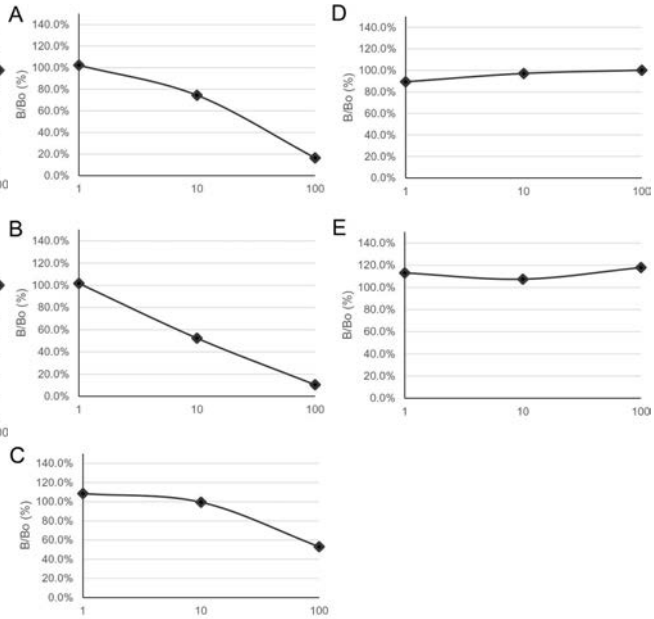
【図２】


A
B
C
D
E
F
G
H
B/Bo (%)
1
10
100

【図３】


A
B
C
D
E
B/Bo (%)
1
10
100

【図４】


A
B
C
D
E
B/Bo (%)
1
10
100

【配列表】
2018102211000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　5/12	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/12		
Ｇ０１Ｎ　33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｓ	

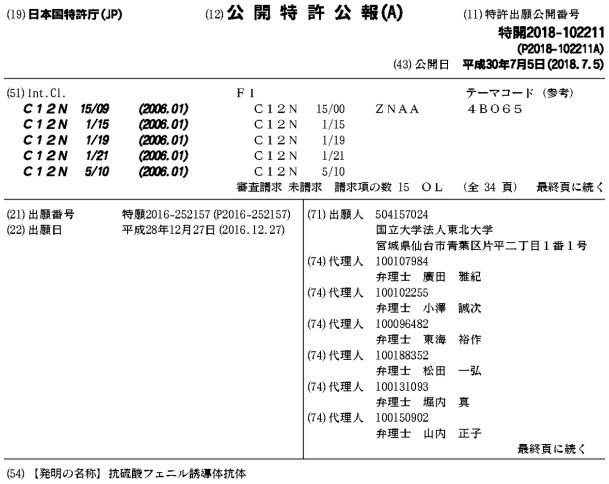
(74)代理人　100141391
弁理士　園元　修一
(74)代理人　100198074
弁理士　山村　昭裕
(74)代理人　100145920
弁理士　森川　聡
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(72)発明者　富岡　佳久
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内
(72)発明者　塚本　宏樹
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内
(72)発明者　金光　祥臣
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内
(72)発明者　松本　洋太郎
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内
(72)発明者　根東　義則
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内
(72)発明者　阿部　高明
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内

Ｆターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44

专利名称(译)	抗硫酸苯基衍生物抗体		
公开(公告)号	JP2018102211A	公开(公告)日	2018-07-05
申请号	JP2016252157	申请日	2016-12-27
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东北大学		
[标]发明人	富岡佳久 塚本宏樹 金光祥臣 松本洋太郎 根東義則 阿部高明		
发明人	富岡 佳久 塚本 宏樹 金光 祥臣 松本 洋太郎 根東 義則 阿部 高明		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/12 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/12 G01N33/53.S C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44		
代理人(译)	堀内申 马萨科·亚莫 Enmoto修一 森川智		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：为了提供抗苯基硫酸盐衍生物抗体，编码该抗苯基硫酸盐衍生物抗体的抗体基因，包含该抗体基因的载体，引入该载体的宿主细胞，产生抗苯基硫酸盐衍生物抗体的杂交瘤以及生物样品中的生物样品。 提供了一种特异性检测生物样品中苯硫酸盐衍生物的方法和试剂盒。 通过与结合有硫酸苯的物质作为半抗原免疫非人类动物而获得的，与下述通式所示的化合物特异性结合的抗体及其基因。 （R是H，卤素原子，C 1-4烷基，硝基或氨基） [选择图]无



(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2018-102211 (P2018-102211A)

(43) 公開日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B065
C12N	1/15	(2006.01)	C12N	1/15		
C12N	1/19	(2006.01)	C12N	1/19		
C12N	1/21	(2006.01)	C12N	1/21		
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/10		

審査請求 未請求　請求項の数 15　ＯＬ　（全 34 頁）　最終頁に続く

(21) 出願番号　特願2016-252157 (P2016-252157)
(22) 出願日　平成28年12月27日 (2016.12.27)

(71) 出願人　504157024
国立大学法人東北大学
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号
(74) 代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(74) 代理人　100102255
弁理士　小澤　誠次
(74) 代理人　100096482
弁理士　東海　裕作
(74) 代理人　100188352
弁理士　松田　一弘
(74) 代理人　100131093
弁理士　堀内　真
(74) 代理人　100150902
弁理士　山内　正子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗硫酸フェニル誘導体抗体