

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4942018号
(P4942018)

(45) 発行日 平成24年5月30日 (2012.5.30)

(24) 登録日 平成24年3月9日 (2012.3.9)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 S

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2006-127047 (P2006-127047)
 (22) 出願日 平成18年4月28日 (2006.4.28)
 (65) 公開番号 特開2007-297337 (P2007-297337A)
 (43) 公開日 平成19年11月15日 (2007.11.15)
 審査請求日 平成21年4月15日 (2009.4.15)

微生物の受託番号 FERM P-20824

微生物の受託番号 FERM P-20827

前置審査

(73) 特許権者 000195524
 生化学工業株式会社
 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
 (74) 代理人 100124512
 弁理士 堀口 努
 (72) 発明者 鈴木 喜義
 東京都東大和市立野三丁目1253 生化学工業株式会社中央研究所内
 (72) 発明者 石丸 剛
 東京都東大和市立野三丁目1253 生化学工業株式会社中央研究所内
 (72) 発明者 山本 浩二
 東京都東大和市立野三丁目1253 生化学工業株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗アカラン硫酸抗体とその応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにおける受託番号が F E R M
 P - 2 0 8 2 4 又は F E R M P - 2 0 8 2 7 であるハイブリドームにより産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 2】

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにおける受託番号が F E R M
 P - 2 0 8 2 4 又は F E R M P - 2 0 8 2 7 であるハイブリドーム。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体を試料に接触させる工程を少なくとも含むことを特徴とする、当該試料中に存在するアカラン硫酸の検出方法。

【請求項 4】

試料が、体液、細胞、組織、又は、細胞若しくは微生物の培養物から選択されるものに由来する、請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗体を少なくとも含む、試料中に存在するアカラン硫酸の検出キット。

【請求項 6】

試料が、体液、細胞、組織、又は、細胞若しくは微生物の培養物から選択されるものに由来する、請求項 5 に記載の検出キット。

【発明の詳細な説明】

10

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗アカラン硫酸抗体とその応用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

本出願書類中で使用する略号を以下に示す。

G A G : グリコサミノグリカン

H A : ヒアルロン酸

H E P : ヘパリン

H S : ヘパラン硫酸

10

E H S - H S : マウスのエンジェルプレス - ホーム - スワーン腫瘍組織 (E n g e l b r e t h - H o l m - S w a r m s a r c o m a) 由来の H S

B i - G A G : ビオチン標識 G A G

B i - H E P 誘導体 : ビオチン標識 H E P 誘導体

G l c N S : N - 硫酸化グルコサミン

G l c N A c : N - アセチルグルコサミン

I d o A : イズロン酸

I d o A (2 S) : 2 - O - 硫酸化イズロン酸

N A H : N - アセチルヘパロザン

20

A S : アカラン硫酸

B i - A S : ビオチン標識 A S

R A - A S : 還元アミノ化 A S

P D P - A S : 2 - ピリジルジスルフィドプロピオニル化 A S

S H - A S : チオプロピオニル化 A S

A C H : 2 - O - 脱硫酸化 A S

N H ₂ - H E P : N - 脱硫酸化 H E P

30

N A c - H E P : N - アセチル化 - H E P

2 D S H ; 2 - O - 脱硫酸化 H E P

N H ₂ - 6 S H : (2 - O · N) - 脱硫酸化 H E P

6 S H : (2 - O · N) - 脱硫酸化 · N - アセチル化 H E P

6 D S H : 6 - O - 脱硫酸化 H E P

N A c - 6 D S H : N - アセチル化 6 D S H

N S H : (2 - O · 6 - O) - 脱硫酸化 H E P

N A c - N S H ; N - アセチル化 N S H

40

N H ₂ - 2 S H : (6 - O · N) - 脱硫酸化 H E P

2 S H : (6 - O · N) - 脱硫酸化 · N - アセチル化 H E P

N H ₂ - C D S H : 完全脱硫酸化 H E P

C D S H : 完全脱硫酸化 · N - アセチル化 H E P

C h ; コンドロイチン

C S : コンドロイチン硫酸

C S - A (W) ; クジラ由来コンドロイチン硫酸 A

C S - A (S) ; サメ由来コンドロイチン硫酸 A

C S - B ; コンドロイチン硫酸 B

50

C S - C ;コンドロイチン硫酸 C
 C S - D ;コンドロイチン硫酸 D
 C S - E ;コンドロイチン硫酸 E

K S : ケラタン硫酸

H R P : ホースラディッシュペルオキシダーゼ

B S A : ウシ血清アルブミン

K L H : ヘモシアニン

P D P - K L H : 2 - ピリジルジスルフィドプロピオニル化 K L H

T M B : テトラメチルベンジジン

S P D P : N - スクシンイミジル - 3 - [2 - ピリジルジチオ] プロピオン酸

E D C : 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド

E L I S A 法 : 酵素標識抗体測定法

10

A S は、アフリカマイマイ(学名 : *Achatina fulica*)から単離された G A G の一種として知られている。A S は、N - アセチルグルコサミンと 2 - O - サルフォイズロン酸とからなる二糖 (- [I d o A (2 S) - G l c N A c] -) の繰り返し構造を基本糖鎖構造として有する多糖であり、H S 及び H E P と極めて類似した構造を有していることが知られている (非特許文献 1)。A S に反応する抗体としては、MW 3 G 3 が知られているが、A S に反応し、ウシ腎臓由来のヘパラン硫酸に対して反応しない抗体は知られていない (非特許文献 2)。

20

【 0 0 0 3 】

【非特許文献 1】ヨン S . キムら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、1996 年、271 巻、20 号、11750 - 11755 頁

【非特許文献 2】ジェディー B . テン ダン (Gerdy B. ten Dam) ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、(米国)、2004 年、第 279 巻、p . 38346 - 38352

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

本発明は、新規の抗 A S 抗体及びこれを産生するハイブリドーマ、並びに上記抗体を応用した検出方法及び検出キットを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

本発明者らは、上記課題を鑑み鋭意検討を重ねた結果、タンパク質と A S とを化学的に結合させてなる物質を抗原として用いることにより、A S に対して反応し、ウシ腎臓由来の H S に対して実質的に反応しない抗体を見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は以下の通りである。

40

(1) A S に対して反応し、ウシ腎臓由来の H S に対して実質的に反応しない抗体 (以下、「本発明抗体」という)。

(2) ブタ腸由来の H E P に対して実質的に反応しない、上記 (1) に記載の抗体。

(3) E H S - H S に対して実質的に反応しない、上記 (1) 又は (2) に記載の抗体。

(4) ウシ角膜由来のケラタン硫酸に対して実質的に反応しない、上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 つに記載の抗体。

(5) H A に対して実質的に反応しない、上記 (1) ~ (4) のいずれか 1 つに記載の抗体。

50

(6) N A H に対して実質的に反応しない、上記 (1) ~ (5) のいずれか 1 つに記載の抗体。

(7) モノクローナル抗体である、上記 (1) ~ (6) のいずれか 1 つに記載の抗体。

(8) タンパク質と A S とを化学的に結合させてなる物質を抗原として免疫した哺乳動物由来のリンパ球と、哺乳動物由来のミエローマ細胞との細胞融合により形成されるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、上記 (7) に記載の抗体。

(9) リンパ球及びミエローマ細胞がマウス由来である、上記 (8) に記載の抗体。

(1 0) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにおける受託番号が FERM P-20823、FERM P-20824、FERM P-20825、FERM P-20826 又は FERM P-20827 であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。

10

(1 1) タンパク質と A S とを化学的に結合させてなる物質であって、A S に対して反応する抗体を産生させ得る抗原性を有する物質 (以下、「本発明抗原」という) 。

(1 2) タンパク質と A S とを化学的に結合させてなる物質を抗原として免疫した哺乳動物由来のリンパ球と哺乳動物由来のミエローマ細胞との細胞融合により形成されるハイブリドーマ (以下、「本発明ハイブリドーマ」という) 。

(1 3) リンパ球及びミエローマ細胞がマウス由来である、上記 (1 2) に記載のハイブリドーマ。

(1 4) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにおける受託番号が、FERM P-20823、FERM P-20824、FERM P-20825、FERM P-20826 又は FERM P-20827 であるハイブリドーマ。

20

(1 5) 上記 (1) ~ (1 0) のいずれか 1 つに記載の抗体を試料に接触させる工程を少なくとも含むことを特徴とする、当該試料中に存在する A S の検出方法 (以下、「本発明 A S 検出方法」という) 。

(1 6) 試料が、体液、細胞、組織、又は、細胞若しくは微生物の培養物から選択されるものに由来する、上記 (1 5) に記載の検出方法。

(1 7) 上記 (1) ~ (1 0) のいずれか 1 つに記載の抗体を少なくとも含む、試料中に存在する A S の検出キット (以下、「本発明 A S 検出キット」という) 。

(1 8) 試料が、体液、細胞、組織、又は、細胞若しくは微生物の培養物から選択されるものに由来する、上記 (1 7) に記載の検出キット。

【発明の効果】

30

【 0 0 0 6 】

本発明抗体は、A S に対して反応するため、A S の検出に好適に用いることができる。また、本発明抗原及び本発明ハイブリドーマを用いることにより、本発明抗体を効率的に産生させることができる。また、本発明 A S 検出方法により、試料中に存在する A S を効率的に検出することができる。また、本発明 A S 検出キットを用いることにより、本発明 A S 検出方法による A S の検出をより効率的且つ簡便に行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 7 】

< 1 > 本発明抗体

本発明抗体は、A S に対して反応し、ウシ腎臓由来の H S に対して実質的に反応しない抗体である。

40

【 0 0 0 8 】

A S は、N - アセチルグルコサミンと 2 - O - サルフォイズロン酸とからなる二糖 (- [I d o A (2 S) - G l c N A c] -) の繰り返し構造を基本糖鎖構造として有する多糖である。A S は、例えば後述する実施例に記載の様に、アフリカマイマイ (学名: Achatina fulica) を原料とし、公知の方法により調製することができる。

【 0 0 0 9 】

また、上記において「反応」とは、免疫学的反応又は抗原抗体反応を意味し、この反応性は例えば、E L I S A 法、RIA 法、プラーク法、凝集反応法、フローサイトメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロッティング法などによって調べることができる。例えば、

50

一定濃度の抗体を用いてE L I S A法を行ったときに、抗原の濃度の増加に比例して反応シグナルが増強される場合に、該抗体は該抗原に反応するといえることができる。ただし本明細書に記載する、抗原に対する本発明抗体の反応性は、特に断りのない場合、後述する実施例5に記載の方法（抗原濃度：0.1 μg/ウェル）により測定される、本発明抗体のA Sに対する反応性を100%とした場合における、相対的な反応性を意味する。

【0010】

また、本明細書において、「実質的に反応しない」とは、抗体と抗原との反応性が、後述する実施例5に記載の方法（抗原濃度：0.1 μg/ウェル）で測定を行った場合、反応シグナルを与えないか、極めて弱い反応シグナルしか与えない程度であることを意味するが、本明細書においては、例えば5%程度以下の反応性がある場合についても、反応シグナルを与えない程度であると解されるものとする。

10

【0011】

本発明抗体は、A Sに対して反応し、ウシ腎臓由来のH Sに対して実質的に反応しない抗体である限りにおいて特に限定されないが、なかでも、ブタ腸由来のH E Pに対して実質的に反応しない抗体は好ましく、また、E H S - H Sに対して実質的に反応しない抗体も好ましく、ウシ角膜由来のK Sに対して実質的に反応しない抗体も好ましく、H Aに対して実質的に反応しない抗体も好ましく、N A Hに対して実質的に反応しない抗体も好ましい。なかでも、A Sに対して反応し、ウシ腎臓由来のH S及びブタ腸由来のH E Pに対して実質的に反応しない抗体はより好ましく、A Sに対して反応し、且つウシ腎臓由来のH S、ブタ腸由来のH E P、E H S - H S、ウシ角膜由来のK S、H A及びN A Hのいずれに対しても実質的に反応しない抗体はさらに好ましい。また、C S - A (W)、C S - A (S)、C S - B、C S - C、C S - D、C S - E及びC hに対して実質的に反応しない抗体も好ましい。

20

【0012】

また本発明抗体は、下記のH E P誘導体群から選択される1又は2以上のH E P誘導体に対して実質的に反応しないことが好ましい；

H E P誘導体群；6 D S H、N H₂ - 6 S H、6 S H、N H₂ - 2 S H、N S H、N A c - N S H、N H₂ - C D S H、C D S H。

【0013】

また本発明抗体のA C Hに対する反応性の好ましい例としては、実質的に反応しないことが挙げられ、また別の好ましい例としては50～60%であることが挙げられる。

30

【0014】

本発明抗体のその他のH E P誘導体に対する反応性は特に限定されないが、例えば下記の反応性が例示される。

【0015】

N A c - H E Pに対する反応性の好ましい例としては、5～10%であることが挙げられ、また別の好ましい例としては80～100%であることが挙げられる。

【0016】

N A c - H E Pに対する反応性の好ましい例としては、3～15%であることが挙げられ、また別の好ましい例としては80～100%であることが挙げられる。

40

【0017】

N A c - 6 D S Hに対する反応性の好ましい例としては、実質的に反応しないことが挙げられ、また別の好ましい例としては75～100%であることが挙げられる。

【0018】

N H₂ - 2 S Hに対する反応性の好ましい例としては、実質的に反応しないことが挙げられ、また別の好ましい例としては15～25%であることが挙げられる。

【0019】

2 S Hに対する反応性の好ましい例としては20～40%であることが挙げられ、また別の好ましい例としては70～80%であることが挙げられ、また別の好ましい例としては90～110%であることが挙げられ、また別の好ましい例としては150～200

50

0 %であることが挙げられる。

【0020】

C D S Hに対する反応性の好ましい例としては、実質的に反応しないことが挙げられ、また別の好ましい例としては15 ~ 25 %であることが挙げられる。

【0021】

なお、上記の各種G A G及び各種H E P誘導体は、後述する実施例に記載の方法により、入手又は調製することができる。

【0022】

本発明抗体のエピトープは特に限定されないが、N - アセチルグルコサミンと2 - O - サルフォイズロン酸とからなる二糖 (- [I d o A (2 S) - G l c N A c] -) により構成されることが好ましい。

10

【0023】

本発明抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることがより好ましい。また、モノクローナル抗体はそのフラグメントであってもよい。モノクローナル抗体のフラグメントとしては、例えば、F (a b ') 2化抗体、F a b 化抗体、短鎖抗体 (s c F v)、ダイアボディ (D i a b o d i e s) 及びミニボディ (M i n i b o d i e s) などが挙げられる。

【0024】

本発明抗体がモノクローナル抗体である場合、本発明抗体は、例えば、タンパク質とA Sとを化学的に結合させてなる物質を抗原として免疫した哺乳動物由来のリンパ球と、哺乳動物由来のミエローマ細胞との細胞融合により形成されるハイブリドーマにより產生させることができる。

20

【0025】

また本発明抗体がポリクローナル抗体である場合、本発明抗体は、例えば、タンパク質とA Sとを化学的に結合させてなる物質を抗原として免疫した哺乳動物の血清から得ることができる。

【0026】

タンパク質とA Sとを化学的に結合させてなる物質における「タンパク質」としては、例えばB S A及びK L Hが例示されるが、なかでもK L Hが好ましい。

【0027】

30

上記において、タンパク質とA Sとを化学的に結合させる方法としては、化学的な結合の様式は特に限定されないが、共有結合が好ましく、ジスルフィド結合 (以下、 「 - S S - 」 と表記することがある) がより好ましい。ジスルフィド結合により化学的に結合する方法としては、例えば以下の方法を採用することができる。すなわち、A Sを還元アミノ化し、これと5 m M S P D Pを反応させて、2 - ピリジルジチオプロピニル化A Sを得る。これをジチオスレイトール等の還元剤で還元し、チオール化A Sを得る。同様に、タンパク質とS P D Pを反応させ、2 - ピリジルジチオプロピニル化タンパク質を得る。次に、チオール化A S溶液と2 - ピリジルジチオプロピニル化タンパク質溶液を混合することによって、A Sとタンパク質との間にジスルフィド結合を生成させ、A S - S S - タンパク質を得る。

40

【0028】

また、上記のリンパ球及びミエローマ細胞の由来は、哺乳動物由来である限りにおいて特に限定されず、哺乳動物としては、例えばブタ、ウシ、マウス、ラット等が例示されるが、なかでもマウスが好ましい。

【0029】

また、上記において免疫は、例えば上記方法により調製した抗原を哺乳動物に皮下注射することにより行うことができる。注射方法はこれに限らず、腹腔内注射、静脈注射でも良い。通常、免疫は数回に分けて行うが、免疫はアジュバントと共に投与することが好ましい。アジュバントとしては、ミョウバン、結核死菌、核酸、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント等、アジュバント効果が期待できるものであれば良いが

50

、特に、T i t e r M A X G o l d (シグマ社製) が良い。

【 0 0 3 0 】

また、上記の細胞融合は、例えば、マウスを最終免疫した後に、当該マウスのリンパ節
或は脾臓から得られるリンパ球と、ミエローマ細胞等の腫瘍細胞株の細胞（通常、マウス
のBALB/c 由来のP3 -NS-1/1-Ag4-1、P3 -X63-Ag8-U1(P3 U1)、P3 -X63-Ag8-653、SP2/O-A
g14 等）を用いて、公知の方法により行うことができる。

【 0 0 3 1 】

また、上記のハイブリドーマは、例えば下記に例示する方法により選択と単クローン化
を行うことにより得ることができる。すなわち、ハイブリドーマの増殖の盛んな細胞培養
上清から種々の分析法（例えばR I A 法、ブランク法、凝集反応法、E L I S A 法、フロー
サイトメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロッティング法等）でA S に対して反
応する目的の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、次に、得られたハイブリドーマに
ついてクローニングを行う。クローニングの方法としてはFACS (Fluorescent Activated
Cell Sorter) もしくは、一般によく用いられる限界希釈法等が挙げられる。例えば、限
界希釈法では9 6 ウェルプレートの1 ウェルあたり細胞が1 個以下になるように行うこと
が好ましい。どの方法を用いてもクローニングは2 回繰返し行うことが好ましく、単ク
ローンとすることが好ましい。

【 0 0 3 2 】

このようにして得られた単クローンを、例えばin vitro で培養する方法、in vivo
で培養（腹水化）する方法等により培養することにより、モノクローナル抗体を産生さ
せることができる。また得られた培養液から、例えば塩析、イオン交換、ゲル濾過、アフィ
ニティークロマトグラフィー、電気泳動等、生化学的的一般的手法を適宜組み合わせること
により、上記抗体を分離、精製することができる。

【 0 0 3 3 】

本発明抗体の免疫グロブリンクラスおよびそのサブクラスは特に限定されないが、免疫
グロブリンクラスはI g M 又はI g G であることが好ましい。さらに免疫グロブリンクラ
スがI g G の場合、そのサブクラスはI g G 2 a 又はI g G 1 であることがより好ましい
。

【 0 0 3 4 】

なお、本発明抗体の具体例としては、例えば、独立行政法人産業技術総合研究所 特許
生物寄託センターにおける受託番号が、FERM P-20823、FERM P-20824、FERM P-20825、FE
RM P-20826又はFERM P-20827であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体
である、AS 1 7 抗体、AS 2 2 抗体、AS 2 5 抗体、AS 3 8 抗体、AS 4 8 抗体が挙げられる。
具体的には後述する実施例を参照されたい。

< 2 > 本発明抗原

本発明抗原は、タンパク質とA S とを化学的に結合させてなる物質であって、A S に対
して反応する抗体を産生させ得る抗原性を有する物質である。

【 0 0 3 5 】

上記の「タンパク質」、「A S 」なる用語、及びタンパク質とA S とを化学的に結合さ
せる方法に関する説明については、上記< 1 > 本発明抗体における説明を参照されたい。
また、上記の「反応」は、上記< 1 > 本発明抗体の場合と同様に、免疫学的反応又は抗原
抗体反応を意味する。具体的な説明は上記< 1 > 本発明抗体を参照されたい。

【 0 0 3 6 】

また、A S に対して反応する抗体を産生させ得る抗原性を有するか否かは、例えば上記
< 1 > 本発明抗体に記載の方法によりタンパク質とA S とを化学的に結合させてなる物質
を用いて哺乳動物の免疫化を行い、免疫後の哺乳動物に由来する血清等の試料中に抗体が
存在するか否かを、例えばRIA法、ブランク法、凝集反応法、E L I S A 法、フローサイ
トメトリー法、組織染色法、ウェスタンブロッティング法等の方法により確認すること
により、判断することができる。

【 0 0 3 7 】

上記の A S に対して反応する抗体は、本発明抗体であることが好ましい。したがって本発明抗原は、本発明抗体を生産する目的で使用するすることができる。このような場合、例えば < 1 > 本発明抗体に記載した免疫において用いる抗原として、本発明抗原を用いることができる。より具体的には、後述する実施例を参照されたい。

< 3 > 本発明ハイブリドーマ

本発明ハイブリドーマは、タンパク質と A S とを化学的に結合させてなる物質を抗原として免疫した哺乳動物由来のリンパ球と哺乳動物由来のミエローマ細胞との細胞融合により形成されるハイブリドーマである。

10

【 0 0 3 8 】

上記の「タンパク質」、「A S」なる用語、及びタンパク質と A S とを化学的に結合させる方法、「免疫」、「哺乳動物由来のリンパ球」、「哺乳動物由来のミエローマ細胞」、「細胞融合」、「ハイブリドーマ」に関する説明については、上記 < 1 > 本発明抗体における説明を参照されたい。

【 0 0 3 9 】

なお、上記のような本発明ハイブリドーマの一例としては、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにおける受託番号が、FERM P-20823、FERM P-20824、FERM P-20825、FERM P-20826又はFERM P-20827であるハイブリドーマが挙げられる。

【 0 0 4 0 】

20

本発明ハイブリドーマは、本発明抗体（好ましくは、モノクローナル抗体である本発明抗体）を生産する目的で使用するすることができる。ここで本発明抗体は、例えば本発明ハイブリドーマを、in vitro で培養する方法、in vivo で培養（腹水化）する方法等により培養することにより産生させることができる。より具体的には、後述する実施例を参照されたい。

< 4 > 本発明検出方法

以下、本発明検出方法について説明する。

【 0 0 4 1 】

本発明 A S 検出方法は、本発明抗体を試料に接触させる工程を少なくとも含むことを特徴とする、当該試料中に存在する A S の検出方法である。

30

【 0 0 4 2 】

上記の「試料」とは、A S を含むか、含む可能性を有する試料であれば特に限定されないが、試料の由来となるものとしては、例えば尿、血液、血漿、血清、関節液、髄等の体液、分泌物、動物細胞若しくは植物細胞等の細胞、組織、臓器、又は細胞若しくは微生物の培養物（例えば培養上清等を含む）等が例示される。上記において、試料の由来が動物細胞である場合、好ましい動物細胞の一例としてはプルキンエ細胞が例示される。また試料の由来が組織である場合、好ましい組織の一例としては小脳が例示される。また、上記「由来」とは、上記に例示したものに由来する精製物、抽出物、標本等であってもよく、そのもの自体であってもよいことを意味する。

40

【 0 0 4 3 】

本発明 A S 検出方法において、試料中に存在する A S の検出における具体的方法としては、例えば組織標本を試料として用いる場合は通常の免疫組織染色法などを用いることができ、例えば体液又は培養上清等を試料として用いる場合は E L I S A 法、R I A 法、サンドイッチ法、競合法、ブランク法、凝集反応法、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロッティング法などを用いることができる。

【 0 0 4 4 】

上記のサンドイッチ法においては、例えば本発明抗体をプレート等に例示される固相に固着させて 1 次抗体として用いても良く、また、本発明抗体を標識して 2 次抗体として用いても良い。

50

【 0 0 4 5 】

本発明 A S 検出方法によれば、本発明の抗体の反応性を利用することにより、試料中に存在する A S を好適に検出することができる。さらに本発明 A S 検出方法は、＜ 1 ＞本発明抗体で述べた本発明抗体の各種抗原に対する特異的な反応性を利用することにより、A S の特異的な検出に応用することができる。

【 0 0 4 6 】

なお、本発明 A S 検出方法における検出は、定量的な検出であってもよく、定性的な検出であってもよい。定量的な検出である場合、試料中に存在する A S 濃度は、例えば予め既知濃度の A S 標準液を用いて A S 濃度と検出結果との関係について検量線を作成し、A S 濃度が未知の試料についての検出結果と前記検量線とを照らし合わせるにより行うことができる。

10

【 0 0 4 7 】

また、本発明検出方法は、本発明抗体を試料に接触させる工程を少なくとも含むことを特徴とする、当該試料中に存在する本発明抗体が反応する物質の検出方法を提供する。

【 0 0 4 8 】

上記において、「試料」、検出における具体的方法、検出の種類等についての説明については、上記の本発明 A S 検出方法における説明を参照されたい。また、上記「反応」は、免疫学的反応又は抗原抗体反応を意味するが、より具体的な説明については＜ 1 ＞本発明抗体における説明を参照されたい。

20

< 5 > 本発明検出キット

以下、本発明検出キットについて説明する。

【 0 0 4 9 】

本発明 A S 検出キットは、本発明抗体を少なくとも含む、試料中に存在する A S の検出キットである。本発明の検出キットによれば、本発明検出方法をより効率的に、且つ簡便に行うことができる。上記において、「本発明抗体を少なくとも含むキット」としては、例えば本発明抗体そのもの（例えば溶液に溶解した本発明抗体等も含む）を構成成分として含むキット、本発明抗体を固着させた固相を構成成分として含むキット、酵素等により標識した本発明抗体を構成成分として含むキット等が例示される。また、上記の「試料」なる用語については、上記＜ 4 ＞本発明検出方法で説明した通りである。

30

【 0 0 5 0 】

また本発明 A S 検出キットの構成成分には、本発明抗体に加えて、例えば 1 次抗体、2 次抗体、反応バッファー、洗浄液、反応基質、A S 標準液などを含むものであってもよい。

【 0 0 5 1 】

また、本発明検出キットは、本発明抗体を少なくとも含む、試料中に存在する本発明抗体が反応する物質の検出キットを提供する。

【 0 0 5 2 】

上記において、「本発明抗体を少なくとも含むキット」に関する具体的説明は、上記本発明 A S 検出キットにおける説明を参照されたい。

40

【 0 0 5 3 】

以下、本発明を実施例により具体的に詳説する。

【実施例 1】

【 0 0 5 4 】

(参考例 1) A S 及び A C H の調製

A S はヨン S . キムらの方法（前記の非特許文献 1 に記載の方法）に従って、アフリカマイマイ（学名：A c h a t i n a f u l i c a ）から調製した。得られた A S を原料として、M . イシハラ（M . Ishihara）ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、1997 年、第 121 巻、第 2 号、p . 345 - 349 に記載の方法に従って A C H を調製した。

50

(参考例 2) P D P - K L H の調製

K L H への 2 - ピリジルジスルフィド構造の導入は、C a r l s s o n , J . らの方法 (B i o c h e m . J . , 173 , 723 (1978)) に従って行った。

【 0 0 5 5 】

すなわち、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.5)/0.1M NaClに、終濃度が2.5mg/mlになるように K L H (シグマ社製) 60mgを溶解した。この溶液に、終濃度が0.238mMになるように5mM S P D P (シグマ社製) エタノール溶液を添加・混合し、30分間室温に保持した。過剰の S P D P を除去するために蒸留水に対して透析した後に、混合液を凍結乾燥し、P D P - K L H 59.4mgを得た。

10

(参考例 3) ウロン酸を介した A S - B S A コンジュゲートの調製

A S 及び B S A (バイエル社製)を、それぞれ0.1M M E S 緩衝液 (pH5.5) に、終濃度が 10mg/ml になるように溶解し、A S 溶液及びBSA溶液を得た。A S 溶液 300 μ l とBSA溶液 150 μ l とを混合し、E D C (PIERCE社製) 400 μ g を添加した後、攪拌しながら20時間室温に保持した。得られた反応後の溶液は、蒸留水に対して一晩透析した後、凍結乾燥し、ウロン酸を介した A S -BSA コンジュゲート 3.5mgを得た。

(参考例 4) B i - G A G 及び B i - H E P 誘導体の調製

A S および、A C H は参考例 1 で調製したものを使用した。ブタ皮由来の H A (以下、単に「H A」と記載する)、C S - A (W)、C S - A (S)、C S - B、C S - C、C S - D、C S - E、ウシ腎臓由来の H S (以下、単に「H S」と記載する)、及びウシ角膜由来の K S (以下、単に「K S」と記載する)は、生化学工業株式会社製のものを使用した。N A H は特開2004-18840に記載の方法に従って、大腸菌K5の培養物から調製した。ブタ腸由来の H E P (以下、単に「H E P」と記載する)はサイエンティフィックプロテインラボラトリーズ社から購入した。また、E H S - H S は、特公平7 - 53756号公報に記載の方法により調製した。

20

【 0 0 5 6 】

また、各種 H E P 誘導体 (N H ₂ - H E P、N A c - H E P、6 D S H、N A c - 6 D S H、N H ₂ - 6 S H、6 S H、N H ₂ - 2 S H、2 S H、N S H、N A c - N S H、N H ₂ - C D S H、C D S H) は、図 1 に示す方法で、各種脱硫酸化反応及び/又は N - アセチル化反応を、単独で、又は組み合わせて用いることにより調製した。図中、H E P の 6 - O、2 - O、および N - 脱硫酸化はそれぞれ、高野ら、苅谷ら、A y o t t e , L . らの方法に従った (T a k a n o , R . e t a l . , J . C a r b o h y d r . C h e m . 14 , 885 (1995) , T a k a n o , R . e t a l . , C a r b o h y d r . L e t t . 3 , 71 (1998) , K a r i y a , Y . e t a l . , J . B i o c h e m . , 123 , 240 (1998) , A y o t t e , L . e t a l . , C a r b o h y d r . R e s . , 145 , 267 (1986)) 。

30

【 0 0 5 7 】

また、N - アセチル化は、D a n i s h e f s k y , I . らの方法に従った。(D a n i s h e f s k y , I . e t a l . , M e t h o d s C a r b o h y d r . R e s . , 5 , 407 (1965)) 。

40

【 0 0 5 8 】

高野らの方法に従って 6 - O - 脱硫酸化を実施すると、副反応として若干の N - 脱硫酸化も起きるので、得られた 6 D S H と N S H の一部は N - アセチル化を行い、N A c - 6 D S H と N A c - N S H を調製した。

【 0 0 5 9 】

上記の各種 G A G 及び各種 H E P 誘導体、並びに参考例 1 で調製した A S 及び A C H を、それぞれ終濃度が 10mg/ml になるように 0.1M M E S 緩衝液 (pH5.5) に溶解し、各種 G A G 溶液及び各種 H E P 誘導体溶液を得た。これらの各種 G A G 溶液及び各種 H E P 誘導

50

体溶液 各 1ml に対して、ジメチルスルホキシド（和光純薬工業社製）で 20 mM に調製したピオチン-LC-ヒドラジド（PIERCE社製）を、それぞれ 25 μ l ずつ添加した。続いて、0.1 M MES 緩衝液（pH 5.5）で 100 mg/ml に調製した EDC 溶液を 12.5 μ l 添加した。これをよく攪拌した後、室温（15 ~ 25）で 20 時間攪拌して反応させた。反応終了後の反応物を、透析膜として Cellu Sep H1（フナコシ社製、カットオフ；分子量 1,000 以下）を、透析液としてダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水（pH 7.2~7.5、カルシウムイオン等の 2価イオン不含；以下、「PBS（-）」という）をそれぞれ用いて透析に付し、遊離のピオチンを充分に除去し、各種 Bi-GAG 及び各種 Bi-HEP 誘導体を得た。透析終了後、Bi-GAG 濃度又は Bi-HEP 誘導体をそれぞれ 5 mg/ml に調整し、凍結保存した。

10

（参考例 5） ストレプトアビジン固相化マイクロプレートの作製

ストレプトアビジン（Vector社製）を PBS（-）で 20 μ g/ml に希釈し、マキシソープ（登録商標）96 ウェルマイクロプレート（ヌンク社製）の各ウェルに 50 μ l ずつ加えた。このプレートを 18 時間、4 で保存することにより、ストレプトアビジンをプレート上に均一に固相化した後、PBS（-）で 2 回洗浄した。続いて、ブロッキング剤として ApplieDuo（登録商標、生化学工業株式会社製）を用い、以下の方法によりストレプトアビジンでコーティングされていない部分をブロッキングした。すなわち、防腐剤として 0.05% プロクリン 300（登録商標、SUPELCO社製）を含むリン酸緩衝液（pH 7.2~7.5；以下、「PB」という）を用いて、ApplieDuo（登録商標）の 5 倍希釈液（以下、「ブロッキング液」という）を調製し、これを各ウェルに 250 μ l ずつ加え、室温で 2 時間静置した。静置後、ブロッキング液を充分に除去し、37 で 2 時間乾燥させることにより、所望するストレプトアビジン固相化マイクロプレートを得た。得られたプレートは乾燥剤とともにアルミラミネート袋に封入し、冷蔵保存した。

20

（参考例 6） 各種 GAG 固相化マイクロプレート及び各種 HEP 誘導体固相化マイクロプレートの作製

1) AS 固相化マイクロプレートの作製

参考例 3 で調製した AS-BSA（50 ng）を、マキシソープ（登録商標）96 ウェルマイクロプレートに添加し、18 時間、4 に保持した後、防腐剤として 0.05% プロクリン 300（登録商標）を含む PBS（-）で 4 倍希釈したブロックエース（登録商標、大日本製薬社製）を用いてブロッキングした。1 時間、室温で静置した後、所望の AS 固相化マイクロプレートを得た。この AS 固相化マイクロプレートは、後述する実施例 3 において血清中の抗体価の検証のために使用した。

30

2) 各種 Bi-GAG 固相化マイクロプレート及び各種 Bi-HEP 誘導体固相化マイクロプレートの作製

上記参考例 4 に記載の各種 Bi-GAG 及び各種 Bi-HEP 誘導体を、終濃度が 1 μ g/ml になるように、0.05% プロクリン 300（登録商標）を含む PBS（-）で 20 倍希釈した ApplieDuo（登録商標）溶液に溶解した（以下この溶液を、「各種 Bi-GAG 溶液」及び「各種 Bi-HEP 誘導体溶液」という）。参考例 5 で作製したストレプトアビジン固相化マイクロプレートの各ウェルを、300 μ l の 0.05% プロクリン 300（登録商標）及び 0.05% ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを含む PBS（-）（以下、「洗浄緩衝液」と言う）で 4 回洗浄した。各種 Bi-GAG 溶液及び各種 Bi-HEP 誘導体溶液をそれぞれ 100 μ l ずつ各ウェルに分注し、室温で 30 分間静置したのち、各ウェルを洗浄緩衝液で 4 回洗浄することにより、所望の各種 Bi-GAG 固相化マイクロプレート及び各種 Bi-HEP 誘導体固相化マイクロプレートを得た。これらのプレートは、後述する実施例 3 におけるクロージング、及び後述する実施例 5 における反応性試験において使用した。

40

【実施例 2】

50

【 0 0 6 0 】

A S 抗原の調製

1) R A - A S の調製

実施例 1 の参考例 1 で調製した A S 4 m g を、2 M 塩化アンモニウム水溶液 1 6 0 μ l に溶解した。この溶液に、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 1 2 m g を添加し、7 0 で 2 日間、還元アミノ化反応を行った。反応後の溶液に、シアノ水素ホウ素ナトリウム 5 m g を添加し、さらに 2 日間、上記と同一の条件で反応を行った。反応後の溶液を氷浴中で冷却した後、酢酸 3 2 μ l を添加して反応を完全に停止させた。2 倍量のエタノールを用いた溶媒沈殿法により、R A - A S を回収した。得られた沈殿を、エタノール洗浄した後に凍結乾燥し、R A - A S の凍結乾燥物 3 . 3 m g を得た。

10

2) P D P - A S の調製

上記 1) で調製した R A - A S 3 . 3 m g を、0 . 1 M 食塩 / 0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 5) 1 m l に溶解した。この溶液に 5 m M S P D P エタノール溶液 8 0 μ l を添加した後、室温にて一晩静置し、2 - ピリジルジスルフィドプロピオニル化反応 (P D P 反応) を行った。過剰の S P D P を除くために蒸留水を用いて透析を行った後、凍結乾燥し、P D P - A S の凍結乾燥物 3 . 8 m g を得た。

3) S H - A S の調製

上記 2) で調製した P D P - A S 2 . 0 m g を、0 . 1 M 食塩 / 0 . 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 4 . 5) 1 6 0 μ l に溶解した。この溶液に、終濃度が 2 5 m M になるようにジチオスレイトールを添加し、6 0 分間室温にて還元反応を行った。2 倍量のエタノールを用いた溶媒沈殿法で S H - A S を回収した。得られた沈殿を、エタノール洗浄した後に凍結乾燥し、S H - A S の凍結乾燥物 1 . 5 m g を得た。

20

4) ジスルフィド結合を介した A S - K L H コンジュゲートの調製

上記 3) で調製した S H - A S 1 . 5 m g 及び参考例 2 で調製した P D P - K L H 0 . 7 5 m g を、0 . 1 M 食塩 / 0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 5) 1 m l に溶解し、2 時間室温にてコンジュゲーション反応を行った。反応中に生成されるピリジル - 2 - チオンを除くため、上記反応後の溶液を、蒸留水に対して一晩透析した後、凍結乾燥し、A S - K L H コンジュゲートの凍結乾燥物 1 . 9 m g を得た。得られた凍結乾燥物は、後述する実施例 3 において、A S 抗原として用いた。

30

【 実施例 3 】

【 0 0 6 1 】

A S に対して反応する抗体を生産するハイブリドーマ細胞株の樹立

1) マウスの免疫化

少量の蒸留水に溶解した A S 抗原 1 m g と TiterMAX Gold (登録商標、シグマ社製) 2 m l とを混合し、抗原溶液を調製した。また、免疫する動物としては、4 匹の BALB / C マウス (6 週齢のメス、日本チャールズリバー社製) を用いた。上記の抗原溶液 1 0 0 μ l / 匹 を、2 週間毎に 2 又は 3 回皮下投与した。血清の抗体価が十分な値に達した時、最終免疫として、アジュバントを含まない A S 抗原溶液 1 0 0 μ l / 匹 を投与した。最終免疫から 3 日後、免疫したマウスを安楽死させ、脾臓を摘出した。

40

【 0 0 6 2 】

なお、上記において、血清中の抗体価の検証は、以下の方法により行った。すなわち、参考例 6 1) で作製した A S 固相化マイクロプレート及びアルカリホスファターゼ標識抗 - マウス I g G + M + A 抗体 (以下、「A L P - 抗マウス I g」という) を用い、E L I S A 法により血清中の抗体価を検証した。すなわち、P B S (-) で 1 0 0 0 倍希釈した血清 5 0 μ l を A S 固相化マイクロプレートに分注し、3 7 で 1 時間インキュベートした。続いて、P B S (-) で 4 回洗浄し、1 0 % ブロックエース (登録商標) / P B S (-) で 1 0 0 0 倍希釈した A L P - 抗マウス I g 溶液 5 0 μ l を各ウェルに分注した。さらに、P B S (-

50

）で4回洗浄した後、基質溶液(ALPローゼ, シノテスト社製) 50 µlを各ウェルに分注し、20分間、室温にて静置した。さらに、発色試薬(シノテスト社製) 50 µlを添加し、660nmをバックグラウンド補正として495nmの吸光度を測定した。

2) ハイブリドーマの創製

1) で摘出した脾臓から得られた免疫感作されたリンパ球と、マウスミエローマP3U1細胞(シマ研究所製)とを、4対1ないし5対1の混合比で混合した後、50%のポリエチレングリコール1500(ロシュ社製)中で共遠心分離することによって細胞融合を実施した。なお、上記の細胞融合に用いるミエローマ細胞には、細胞融合の1週間前より、8-アザグアニンを含んだHAT培地で生育させたものを用いた。細胞融合後、HAT培地中で細胞を生育させた細胞を、以下のクローンの選抜に用いた。

10

3) クローンの選抜及び評価

3-1) クローニング

クローニングには限界希釈法を採用した。すなわち、細胞数がウェル当り1以下になるようにHAT培地で細胞を希釈し、これを96ウェルマイクロプレートに播種した。これを常法に従って培養し、培養上清液を得た。培養上清液の抗体価の評価を、参考例6-2)で作製したBi-A S固相化マイクロプレートを用いたELISA法により行い、クローンを選抜した。以上のクローニングの工程は、少なくとも2回以上実行した。以上の結果として、6つのクローンを選抜し、取得した。

20

3-2) クローンの評価

上記3-1)で取得した各クローンの活性が維持されていることを確認するため、当該クローンを24ウェルプレートの培養スケールにて培養し、得られた培養上清液の抗体価の評価を、参考例6-2)で作製したBi-A S固相化マイクロプレート、及びHRP標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体(以下、「HRP抗マウスIg」と記載する、ダコ社製)を用いたELISA法により行った。以下に詳細を示す。

[クローンの抗体価の評価]

予め洗浄緩衝液によって4回洗浄した、Bi-A S固相化マイクロプレートに、培養上清液 100 µlを分注し、室温にて1時間静置した。さらに洗浄緩衝液で4回洗浄した後に、反応緩衝液(0.05%プロクリン300(登録商標)を含むPBS(-))で20倍に希釈したAppliedDuo(登録商標)溶液)で2000倍に希釈したHRP抗マウスIg 100 µlを、各ウェルに分注した。このプレートを室温にて1時間静置した後、洗浄緩衝液で4回洗浄し、TMB溶液(HRP基質溶液、BIOFX社製) 100 µlを各ウェルに加え、30分間、37℃で酵素反応を行った。反応終了後、発色試薬(BIOFX社製) 100 µlを各ウェルに添加し、630nmをバックグラウンド補正として、450nmの吸光度を測定した。なお、反応緩衝液をネガティブブランクとして用いた。その結果、各クローンが抗A S抗体を生産していることが確認された。樹立したハイブリドーマのクローン番号はA S 1 7、A S 2 2、A S 2 5、A S 3 8、A S 4 8であったことから、このハイブリドーマによって産生される抗体を、それぞれA S 1 7抗体、A S 2 2抗体、A S 2 5抗体、A S 3 8抗体及びA S 4 8抗体と名付けた。上記のハイブリドーマは、平成18年3月1日に、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、それぞれ受託番号として、FERM P-20823、FERM P-20824、FERM P-20825、FERM P-20826又はFERM P-20827が付与された。常法に従って抗体の免疫グロブリンクラスおよびそのサブクラスを調べた結果、A S 1 7抗体はIgG2aに分類され、A S 2 5抗体及びA S 3 8抗体はIgG1に分類され、A S 2 2抗体及びA S 4 8抗体はIgMに分類されることを確認した。

30

40

【実施例4】

【0063】

抗A Sモノクローナル抗体の調製

1) 抗A Sモノクローナル抗体の生産

50

目的の抗 A S モノクローナル抗体を生産する方法としては、マウス腹水法を採用した。すなわち、上記実施例 3 (3) で樹立した各ハイブリドーマ(A S 1 7、A S 2 2、A S 2 5、A S 3 8、A S 4 8) 5×10^6 個を、それぞれ予めプリスタン (2,6,10,14-Tetramethylpentadecane: 東京化成工業) 処理した 3 匹の BALB/C マウス (15 週齢の雌) の腹腔に注入した。注射後 10 ~ 20 日の間に、マウスの腹水を数回に分けて採取し、合計約 10 ml の腹水を得た。

2) 抗 A S モノクローナル抗体の精製

以下に、I g G タイプ抗体 (A S 1 7 抗体、A S 2 5 抗体及び A S 3 8 抗体) の精製方法を示す。すなわち、上記 1) により得られた腹水を、それぞれ吸着バッファ 1 (20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) に対して一晩透析した。透析内液をメンブランフィルタ (孔径: 0.45 μ m) によって濾過した後、濾過液を事前に吸着バッファ 1 で平衡化した HiTrap Protein G HP カラム (5 ml、アマシャム・バイオサイエンス社製) にアプライし、同バッファでカラムを洗浄した。通過液の 280 nm の吸収がほぼ 0 になった時、0.1 M グリシンバッファ (pH 2.7) をカラムに通過させ、A S 1 7 抗体、A S 2 5 抗体及び A S 3 8 抗体をそれぞれ溶出した。各抗体を含む溶液をそれぞれ回収し、P B S (-) に対して十分に透析した。透析内液は必要に応じて限外ろ過濃縮等で適切な濃度に適宜調整し、それらを精製抗体として使用した。精製した A S 1 7 抗体、A S 2 5 抗体及び A S 3 8 抗体の量はそれぞれ、30.8 mg、4.6 mg 及び 11.5 mg であった。

【0064】

以下に I g M タイプ抗体 (A S 2 2 抗体及び A S 4 8 抗体) の精製方法を示す。すなわち、上記 1) により得られた腹水を、それぞれ吸着バッファ 2 (0.5 M K_2SO_4 を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)) に対して一晩透析した。透析内液をメンブランフィルタ (孔径: 0.45 μ m) によって濾過した後、濾過液を事前に吸着バッファ 1 で平衡化した HiTrap IgY Purification HP カラム (5 ml、アマシャム・バイオサイエンス社製) にアプライし、同バッファでカラムを洗浄した。通過液の 280 nm の吸収がほぼ 0 になった時、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) をカラムに通過させ、A S 2 2 抗体及び A S 4 8 抗体をそれぞれ溶出した。溶出した A S 2 2 抗体及び A S 4 8 抗体は、塩析 (NH_4SO_4 : 50% の飽和) することによって回収した。沈澱物を P B S (-) に対して透析し、得られた透析内液を精製抗体として使用した。精製した A S 2 2 抗体及び A S 4 8 抗体の量はそれぞれ、2.7 及び 2.2 mg であった。

【実施例 5】

【0065】

各精製抗体の反応性試験

各精製抗体の各種 G A G 及び各種 H E P 誘導体に対する反応性を検証した。

1) 各精製抗体の反応性試験その 1 - A S に対する反応性試験

1) - 1 方法

B i - G A G の固相化量の異なるマイクロプレートを作製するために、B i - A S 溶液中の B i - A S の終濃度を、0.001, 0.004, 0.012, 0.037, 0.111, 0.333, 1.000 μ g/ml と変化させた溶液を用いて、参考例 6 (2) と同様の方法で B i - A S 固相化マイクロプレートを作製した後、それぞれ洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。その後各ウェルに、添加剤として ApplieDuo (登録商標。最終希釈率 20 倍、生化学工業株式会社製)、防腐剤として 0.05% プロクリン 300 を含む P B S (-) (以下、「反応液 A」という) を用いて、それぞれ、0.025 mg/ml (A S 1 7 抗体)、0.07 mg/ml (A S 2 2 抗体)、0.006 mg/ml (A S 2 5 抗体)、0.006 mg/ml (A S 3 8 抗体)、0.1 mg/ml (A S 4 8 抗体) に調製した各精製抗体からなる各試験溶液を 100 μ l ずつ加え、これを常温で 60 分間静置し、抗原抗体反応させた。反応終了後、各ウェルを洗浄緩衝液で 4 回洗浄し、二次抗体溶液として、反応液 A で 2000 倍希釈した H R P 抗マウス I g (ダコ社製) 溶液を 100 μ l ずつ加え、これを常温で 60 分間静置して抗原抗体反応させた。反応終了後、このプレートを洗浄緩衝液で 4 回洗浄し、ペルオキシダーゼの基質として T M B 溶液 (BIOFX 社製) を 100 μ l ずつ加え、常温で 30 分間反応させて発色させた。続いて、プレートに反

応停止液（BIOFX社製）を100 μ lずつ加えて反応を停止させた後、TMB分解によって増加する波長450nmの吸光度（対照波長630nm）をウェルリーダーSK-603（登録商標、生化学工業株式会社販売）で測定した。なお、抗体の反応性は、上記の各濃度のBi-GAGを用いて作製したBi-GAG固相化マイクロプレートを用いて上記測定を行った場合の吸光度から、Bi-GAG溶液の代わりにBi-GAGを含まない0.05%プロクリン300（登録商標）を含むPBS（-）で20倍希釈したApplieDuo（登録商標）溶液を用いることその他、参考例6（2）と同様の方法により作製したコントロール測定用マイクロプレートを用いて上記の測定方法に準じて測定を行った場合の吸光度（ブランク値）を減算した吸光度差（以下、単に「吸光度差」と記載する）（以下、単に「吸光度差」と記載する）によって評価した。

10

1) - 2 結果

結果を、図2に示す。ASに対するAS22抗体とAS48抗体の相対感度は、AS17抗体、AS25抗体及びAS38抗体のそれよりも100倍の強度があった。Bi-AS濃度が1.0 μ g/mL（0.1 μ g/ウェル）のとき、すべての抗体は強い反応性（吸光度差；1）を示した。

2) 各精製抗体の反応性試験その2 - 各種GAGに対する反応性試験

2) - 1 方法

用いる各種Bi-GAGの濃度を、1.0 μ g/mL（0.1 μ g/ウェル）に固定することその他、上記1) - 1と同様の方法により、各種GAGに対する各精製抗体の反応性を評価した。

20

2) - 2 結果

図3に各種GAGに対する各精製抗体の反応性の結果を示す。

【0066】

上記1)と同様に、各抗体はASに対して強く反応した。いずれの抗体についても、HS及びHEPに対して反応しないことを確認した。また、AS17抗体、AS22抗体、AS25抗体及びAS38抗体については、その他のGAG、すなわち、ACH、EHS-HS、KS、HA、NAH、CS-A(W)、CS-A(S)、CS-B、CS-C、CS-D、CS-E及びChのいずれに対しても実質的に反応しないことを確認した。一方AS48抗体は、EHS-HS、KS、HA、NAH、CS-A(W)、CS-A(S)、CS-B、CS-C、CS-D、CS-E及びChのいずれに対しても反応しなかったが、ACHに対しては約55%の反応性を有していることを確認した。

30

【0067】

これらの結果から、2-サルフォイズロン酸（IdoA(2S)）残基がこれらの抗体のエピトープに含まれていることが示唆された。さらに、各抗体が反応性を示さなかったHS及びHEPの分子中には、IdoA(2S)の α (1-4)結合が存在するが、その大部分はGlcnS又はO-硫酸化GlcnSと結合した二糖ユニットとして存在することから、グルコサミン残基の修飾も、これら抗体の反応にとって重要なマイナス要素であることが推察された。

40

3) 各精製抗体の反応性試験その3 - 各種HEP誘導体に対する反応性試験

エピトープ解析の一助とするために、実施例1の参考例6に記載の各種Bi-HEP誘導体固相化プレートを用いることその他、上記2) - 1に記載の方法に準じて反応性の評価を行うことにより、抗原のグルコサミン残基のN位の修飾状態が、各抗体の反応性にどのように影響するかを検証した。以下、グルコサミン残基のN位が「NH₂-」となっている状態を「未修飾」と記載する。

【0068】

結果を図4に示す。

50

【 0 0 6 9 】

いずれの抗体も 2 S H と反応した。A S 1 7 抗体、A S 2 2 抗体、A S 2 5 抗体、A S 3 8 抗体及び A S 4 8 抗体の反応性は、それぞれ 1 7 2 . 2 %、1 0 4 . 9 %、7 6 . 4 %、3 1 . 7 %、1 0 4 . 8 % であった。2 S H はグルクロン酸ユニット (- [G l c A - G l c N A c] -) と 2 - サルフォイズロン酸ユニット (- [I d o A (2 S) - G l c N A c] -) により構成されており、また、2 - サルフォイズロン酸ユニットの存在比が 6 0 % 以上と高いので、この結果は上記の 1) 及び 2) の結果と矛盾しない。

【 0 0 7 0 】

一方、A S 1 7 抗体、A S 2 5 抗体及び A S 3 8 抗体は、 NH_2 - 2 S H に反応しなかった。 NH_2 - 2 S H のグルコサミン残基の N 位の大部分は未修飾となっている。したがって、これらの抗体のエピトープには、N - アセチル化したグルコサミン残基が含まれていることが示唆された。

10

【 0 0 7 1 】

また、N A c - 6 D S H のグルコサミン残基の N 位の一部はアセチル化されているにもかかわらず、A S 1 7 抗体、A S 2 5 抗体及び A S 3 8 抗体は N A c - 6 D S H に実質的に反応せず、さらに、N A c - H E P のグルコサミン残基の N 位の大部分はアセチル化されているにもかかわらず、これらの抗体は N A c - H E P に実質的に反応しなかったことから、これら抗体の抗原に対する反応性は、グルコサミン残基の N - 硫酸化及び / 又は O - 硫酸化によって阻害されることが示唆された。

【 0 0 7 2 】

20

A S 2 2 抗体及び A S 4 8 抗体は、 NH_2 - H E P 及び 6 D S H に対して実質的に反応しなかったが、それらを N - アセチル化した N A c - H E P 及び N A c - 6 D S H に対しては A S と同程度の反応性を示した。 NH_2 - H E P のグルコサミン残基の N 位の大部分は未修飾となっている。また、6 D S H のグルコサミン残基の N 位の大部分は硫酸化されているが、その調製過程で一部に N - 脱硫酸化が起きるため、一部は未修飾となっている。したがって、上記の結果から、A S 2 2 抗体及び A S 4 8 抗体のエピトープには、N 位が何らかの形で修飾されたグルコサミン残基、特に N - アセチル化されたグルコサミン残基が含まれていることが示唆された。また、N A c - H E P 及び N A c - 6 D S H との反応性から、それぞれ、そのグルコサミン残基の O - 硫酸化や N - 硫酸化が抗体の反応性に実質的に影響しないことが示唆された。

30

【 実施例 6 】

【 0 0 7 3 】

組織染色

ラット小脳凍結切片を用いて免疫組織染色における染色性を検討した。

【 0 0 7 4 】

S D ラット (日本チャールスリバー社、8 週齢、雄) をジエチルエーテル (和光純薬工業社製) で麻酔し、腹部大動脈より放血、屠殺後、小脳を摘出した。摘出した小脳を O C T コンパウンド (三共マイルス社製) に包埋し、アセトン・ドライアイスで凍結させ、クリオスタット (ライカ社販売) にて厚さ 6 μm の切片を作製した。

【 0 0 7 5 】

40

作製した切片を 2 時間常温にて風乾後、冷アセトン (4) で固定を行い、さらに常温で 1 時間風乾した。この後、0 . 1 % B S A を含む P B S (-) で洗浄し、0 . 1 % アジ化ナトリウム (和光純薬工業社製) / 0 . 3 % 過酸化水素水 (和光純薬工業社製) を含む蒸留水中に常温で 1 0 分間浸漬し、内因性のペルオキシダーゼ活性を除去した後、0 . 1 % B S A を含む P B S (-) で洗浄し、0 . 1 % B S A 及び 0 . 1 % カゼイン (和光純薬工業社製) を含む P B S (-) でブロッキングを常温で 6 0 分間行った。

【 0 0 7 6 】

0 . 1 % B S A を含む P B S (-) で洗浄後、アビジン - ビオチンブロッキングキット (V E C T O R 社製) にて内因性のビオチンのブロッキングを行った。

この後 0 . 1 % B S A を含む P B S (-) で洗浄し、0 . 1 % B S A 及び 0 . 1 % カゼイ

50

ンを含むPBS(-)で1 µg/mLに希釈したAS25抗体を4 で一晩反応させた。0.1%BSAを含むPBS(-)で洗浄後、10%ラット血清を含むビオチン標識抗マウスIgG+IgM(JACKSON社製)をPBSで500倍に希釈し、常温で30分間反応させた。0.1%BSAを含むPBS(-)で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストربتアビジン(ニチレイ社製)を常温にて30分間反応させた。0.1%BSAを含むPBS(-)で洗浄後、DAB発色キット(Zymed社製)にて茶色の発色反応を行った。

【0077】

発色後、0.1%BSAを含むPBS(-)に浸漬し反応を停止させ、常水にて5分間洗浄した。この後対比染色を行うためヘマトキシリン(DAKO社製)にて核染色(青色)を行った。常水にて5分間洗浄後、常法に従い脱水、透徹操作を行い封入した。

10

【0078】

得られた染色像を図5に示す。分子層(a)に陽性反応が観察された。

【産業上の利用可能性】

【0079】

本発明抗体は、ASの検出に好適に用いることができることから極めて有用である。また、本発明抗原及び本発明ハイブリドーマは、本発明抗体の効率的な生産のために用いることができることから極めて有用である。また、本発明AS検出方法によれば、ASを好適に検出することができることから極めて有用である。また、本発明検出キットは、これを用いることにより、本発明検出方法をより効率的且つ簡便に行うことを可能にすることから極めて有用である。

20

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】各種HEP誘導体の製造方法の流れを示す図である。

【図2】AS17抗体、AS22抗体、AS25抗体、AS38抗体及びAS48抗体の、ASに対する反応性を示す図である。横軸のBi-AS(µg/ml)は、Bi-AS固相化プレートの作製において用いたBi-AS溶液におけるBi-ASの終濃度を示す。

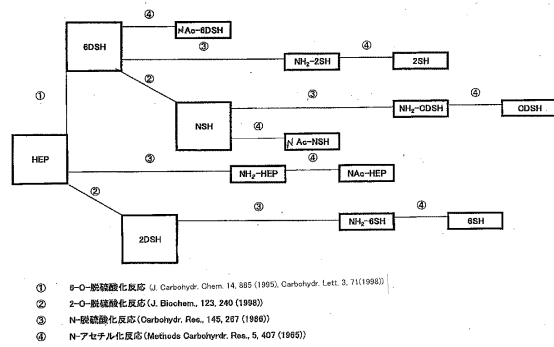
【図3】AS17抗体、AS22抗体、AS25抗体、AS38抗体及びAS48抗体の、各種GAGに対する反応性を示す図である。

【図4】AS17抗体、AS22抗体、AS25抗体、AS38抗体及びAS48抗体の、各種HEP誘導体等に対する反応性を示す図である。

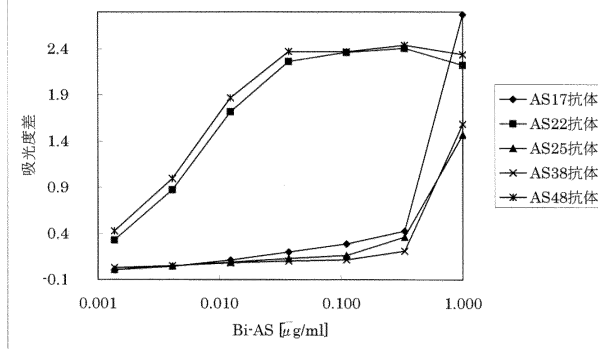
30

【図5】AS25抗体を用いたラット小脳の組織染色の結果を示す図である。

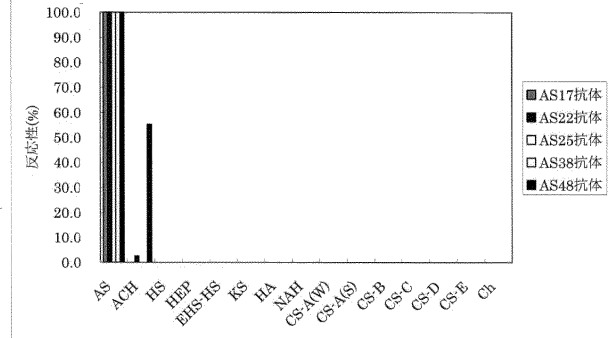
【図 1】



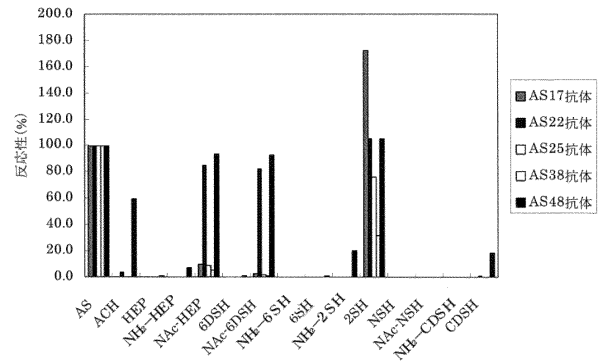
【図 2】



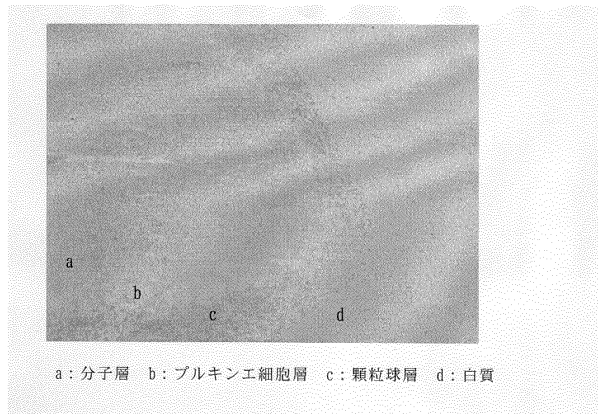
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(72)発明者 金 永植

大韓民国ソウル市ガンジン区ガンジャンドン 1 4 3 - 7 5 4 ヒュンダイアパートメント 8 0
1 - 6 0 4

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2 0 0 4 年, Vol.279, No.37, p.38346-38352

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1 9 9 6 年, Vol.271, No.20, p.11750-11755

Glycobiology, 2 0 0 5 年, Vol.15, No.1, p.1-9

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

W P I

C A / B I O S I S / M E D L I N E (S T N)

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)

专利名称(译)	抗阿坎酸硫酸盐抗体及其应用		
公开(公告)号	JP4942018B2	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	JP2006127047	申请日	2006-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
[标]发明人	鈴木喜義 石丸剛 山本浩二 金永植		
发明人	鈴木 喜義 石丸 剛 山本 浩二 金 永植		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/44 Y10S435/81		
FI分类号	C07K16/18 C12N5/00.102 G01N33/53.S C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/20 C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/BA43 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/GA23 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ67 4B063/QR48 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA42 4H045/CA40 4H045/DA70 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA50		
代理人(译)	堀口勉		
其他公开文献	JP2007297337A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供新的抗阿坎酸硫酸盐抗体，产生其的杂交瘤，以及应用上述抗体的检测方法和检测试剂盒。 解决方案：用与蛋白质化学结合的物质和硫酸阿哈拉作为抗原对新哺乳动物进行免疫，以产生新的抗阿坎酸硫酸盐抗体等。此外，它由国家先进工业科学与技术研究所，国家先进工业科学与技术研究所，FERM P-20823，FERM P-20824，FERM P-20825，FERM P-20826或FERM P-20827的杂交瘤产生。提供单克隆抗体等。The

【图2】

