

(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2014-55773

(P2014-55773A)

(43) 公開日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(51) Int.Cl.
GO1N 33/53 (2006.01)F1
GO1N 33/53

テーマコード (参考)

V

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2010-273238 (P2010-273238)
(22) 出願日 平成22年12月8日 (2010.12.8)(71) 出願人 000001100
株式会社クレハ
東京都中央区日本橋浜町三丁目3番2号
(74) 代理人 100090251
弁理士 森田 憲一
(74) 代理人 100139594
弁理士 山口 健次郎
(72) 発明者 星 裕孝
東京都中央区日本橋浜町三丁目3番2号
株式会社クレハ内
(72) 発明者 齋藤 光
東京都中央区日本橋浜町三丁目3番2号
株式会社クレハ内
(72) 発明者 和田 勉
東京都中央区日本橋浜町三丁目3番2号
株式会社クレハ内

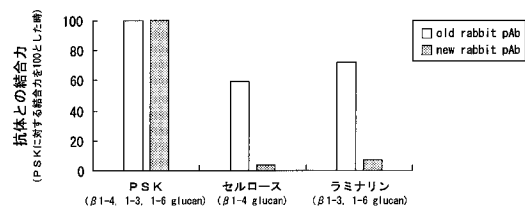
(54) 【発明の名称】 抗PSKポリクローナル抗体並びにそれを用いたPSKの免疫学的分析方法およびPSKの免疫学的分析用キット

(57) 【要約】

【課題】 PSKに特異的に反応するポリクローナル抗体、及びPSKを特異的に検出することのできるPSKの免疫学的分析方法を提供する。

【解決手段】 前記課題は、PSKに特異的に結合する抗PSKポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いることを特徴とするPSKの免疫学的分析方法、並びにPSKに特異的に結合する抗PSKポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片により解決することができる。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いることを特徴とする P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 2】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する抗 P S K ポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 3】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1, 3 グルカン及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に反応しない抗 P S K ポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 4】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体の P S K に対する結合力を 100 とした場合の、セルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、又はラミナリンの β 1, 3 グルカン、及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に対する結合力が 30 % 以下である、請求項 3 に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 5】

酵素免疫測定法、免疫組織染色法、表面プラズモン共鳴法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、ウエスタンブロット法、イムノクロマトグラフ法、磁気ビーズ凝集法、又は磁気ビーズ酵素免疫法を用いる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 6】

前記 P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片と、P S K と反応する第 2 の抗体又はその抗原結合性断片と、を使用する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 7】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片、又は前記第 2 の抗体若しくはその抗原結合性断片のいずれか一方の抗体若しくはその抗原結合性断片を固定化した固定化抗体を有する不溶性担体、P S K を含む可能性のある被検試料、残る一方の抗体若しくはその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体を接触させ、前記不溶性担体上に固定化抗体と P S K と標識抗体との複合体を形成する複合体形成工程と、前記複合体における標識からの信号を分析する分析工程と、を含む、請求項 6 に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 8】

前記複合体形成工程が、第 2 の抗体として抗 P S K モノクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片を固定化した不溶性担体と、P S K を含む可能性のある被検試料とを接触させ、そして前記抗 P S K ポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体を接触させる工程である、請求項 7 に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 9】

前記第 2 の抗体が、抗 P S K モノクローナル抗体である、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 10】

血中濃度の測定を行う、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の P S K の免疫学的分析方法。

【請求項 11】

P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 12】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグ

10

20

30

40

50

ルカン構造の少なくともいずれかを認識する請求項 11 に記載の抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 13】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1, 3 グルカン、及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に反応しない、請求項 11 に記載の抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 14】

前記抗原結合性断片が、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v 断片、ディアボディー、単一鎖抗体分子、及びマルチ特異性抗体からなる群から選択される、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗原結合性断片。

10

【請求項 15】

P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片、を含むことを特徴とする、P S K の免疫学的分析用キット。

【請求項 16】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する、請求項 15 に記載の P S K の免疫学的分析用キット。

【請求項 17】

前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1, 3 グルカン、及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に反応しない、請求項 15 に記載の P S K の免疫学的分析用キット。

20

【請求項 18】

抗 P S K モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を更に含む、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の P S K の免疫学的分析用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 P S K ポリクローナル抗体及びそれを用いた P S K の免疫学的分析方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

カワラタケから抽出される蛋白多糖体は、抗腫瘍活性などを示し、前記蛋白多糖体を有効成分とする抗腫瘍剤などが、例えば、特開昭 60 - 45533 号公報（特許文献 1）などに記載されている。このような蛋白多糖体のなかで、カワラタケ由来の前記蛋白多糖体の一種である P S K（登録商標）〔商品名「クレスチン」（登録商標）〕は、皮内投与や静脈内投与だけでなく、経口投与によっても抗腫瘍活性を示すことが特長であり、臨床的にも経口投与製剤として用いられている。

【0003】

P S K は、約 18 ~ 38 % の蛋白質を含む蛋白多糖体であり、5000 以上（ゲル濾過法）の分子量、例えば 5000 ~ 300000（ゲル濾過法）の分子量を有するものである。主要画分の糖部分は β - D - グルカンで、このグルカン部分の構造は、1 → 3、1 → 4 及び 1 → 6 結合を含む分枝構造である。

40

【0004】

この P S K に対する抗体としては、非特許文献 1 に、P S K に対するウサギポリクローナル抗体が開示されており、このポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により、P S K を検出できることが記載されている。しかしながら、このポリクローナル抗体は、P S K を免疫原として用いたものであるが、P S K 以外の多糖類にも結合する抗体であり、P S K に特異的な抗体ではなかった。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開昭60-45533号公報

【特許文献2】特開平8-208704号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】「インターナショナル・ジャーナル・オブ・イミュノファーマコロジー (International Journal of Immunopharmacology)」(オランダ)1988年、第10巻、p.103-109

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従来のPSKは、後述のように熱水又はアルカリ溶液(例えば、アルカリ金属の水酸化物、特に水酸化ナトリウムの水溶液)で抽出し、精製した後に乾燥して得られていた。具体的には、例えば特許文献2の実施例2に記載のように、カワラタケ菌CM101株を培養し、得られた乾燥菌糸体から、0.1M水酸化ナトリウムで抽出することにより得られていた。このような方法で製造されたPSKは、医薬品としては十分な効果を有するものであったが、このPSKを、抗体を取得するための免疫原として用いた場合、非特許文献1に記載のように、PSK以外の多糖類に結合するポリクローナル抗体しか得られず、PSKを特異的に測定することができなかった。

20

【0008】

従って、本発明の目的は、PSKに特異的に反応するポリクローナル抗体を提供すること、及びPSKを特異的に検出することのできるPSKの免疫学的分析方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、PSKに特異的に反応するポリクローナル抗体について、鋭意研究した結果、驚くべきことに、カワラタケの熱水・アルカリ抽出物を免疫することによって、セルロースの β 1,4グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1,3グルカン及び β 1,6グルカンのグルカン構造に反応せず、PSKに特異的に反応するポリクローナル抗体を得ることができることを見出した。

30

【0010】

従って、本発明は、PSKに特異的に結合する抗PSKポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いることを特徴とするPSKの免疫学的分析方法に関する。本発明のPSKの免疫学的分析方法によって、PSKの特異的な検出が可能である。

【0011】

本発明のPSKの免疫学的分析方法の好ましい態様においては、前記抗PSKポリクローナル抗体が、PSKのタンパク部分およびPSKに特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する抗PSKポリクローナル抗体である。

【0012】

40

本発明のPSKの免疫学的分析方法の好ましい態様においては、前記抗PSKポリクローナル抗体が、PSKに反応し、そしてセルロースの β 1,4グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1,3グルカン及び β 1,6グルカンのグルカン構造に反応しない抗PSKポリクローナル抗体である。特に、前記抗PSKポリクローナル抗体のPSKに対する結合力を100とした場合の、セルロースの β 1,4グルカンのグルカン構造、又はラミナリンの β 1,3グルカン、及び β 1,6グルカンのグルカン構造に対する結合力が30%以下である。

【0013】

本発明のPSKの免疫学的分析方法の別の好ましい態様においては、酵素免疫測定法、免疫組織染色法、表面プラズモン共鳴法、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定

50

法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、ウエスタンブロット法、イムノクロマトグラフ法、磁気ビーズ凝集法、又は磁気ビーズ酵素免疫法を用いる。これらの分析方法を用いることにより、多様な P S K の測定を行うことができる。

【 0 0 1 4 】

更に、本発明の P S K の免疫学的分析方法の好ましい態様においては、前記 P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片と、P S K と反応する第 2 の抗体又はその抗原結合性断片と、を使用する。

【 0 0 1 5 】

本発明の P S K の免疫学的分析方法の更に好ましい態様においては、前記抗 P S K ポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片、又は前記第 2 の抗体若しくはその抗原結合性断片のいずれか一方の抗体若しくはその抗原結合性断片を固定化した固定化抗体を有する不溶性担体、P S K を含む可能性のある被検試料、残る一方の抗体若しくはその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体を接触させ、前記不溶性担体上に固定化抗体と P S K と標識抗体との複合体を形成する複合体形成工程と、前記複合体における標識からの信号を分析する分析工程と、を含む。

10

【 0 0 1 6 】

更に好ましくは、前記複合体形成工程が、第 2 の抗体として抗 P S K モノクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片を固定化した不溶性担体と、P S K を含む可能性のある被検試料とを接触させ、そして前記抗 P S K ポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体を接触させる工程である。本態様における、具体的な態様の 1 つはサンドイッチ法である。本発明の P S K の免疫学的分析方法として、サンドイッチ法を用いることにより、P S K のダイナミックレンジの広い測定が可能である。

20

【 0 0 1 7 】

また、本発明の P S K の免疫学的分析方法の好ましい態様においては、前記第 2 の抗体が、抗 P S K モノクローナル抗体である。抗 P S K モノクローナル抗体を用いることにより、更に特異性の高い P S K の測定を行うことができる。

【 0 0 1 8 】

加えて、本発明の P S K の免疫学的分析方法の好ましい態様においては、血中濃度の測定を行うものである。血中濃度の測定を行うことにより、P S K の薬効の予測および P S K の投与至適濃度の測定を行うことができる。

30

【 0 0 1 9 】

また、本発明は、P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片に関する。本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、前記 P S K の免疫学的分析方法に用いた場合、P S K の特異的な測定をすることができる。

【 0 0 2 0 】

本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片の好ましい態様においては、前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する。

【 0 0 2 1 】

また、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片の別の好ましい態様においては、前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1, 3 グルカン、及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に反応しない。

40

【 0 0 2 2 】

また、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体の抗原結合性断片の好ましい態様においては、前記抗原結合性断片が、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v 断片、ディアボディー、単一鎖抗体分子、及びマルチ特異性抗体からなる群から選択される。このような抗原結合性断片をもちいることにより、F c 断片によって起こる非特異反応を除くことができる。

50

【 0 0 2 3 】

更に、本発明は、P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片、を含むことを特徴とする、P S K の免疫学的分析用キットに関する。本発明の P S K の免疫学的分析用キットによれば、P S K の特異的な測定を、より簡便に行うことが可能である。

【 0 0 2 4 】

本発明の P S K の免疫学的分析用キットの好ましい態様においては、前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する。

【 0 0 2 5 】

また、本発明の P S K の免疫学的分析用キットの別の好ましい態様においては、前記抗 P S K ポリクローナル抗体が、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1 , 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1 , 3 グルカン、及び β 1 , 6 グルカンのグルカン構造に反応しない。

【 0 0 2 6 】

また、本発明の P S K の免疫学的分析用キットの別の好ましい態様においては、抗 P S K モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を更に含む。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 7 】

本発明に係る P S K の免疫学的分析方法では、P S K に特異的な抗 P S K ポリクローナル抗体を用いる。特に、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いる。又は、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1 , 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1 , 3 グルカン及び β 1 , 6 グルカンのグルカン構造に反応しない抗 P S K ポリクローナル抗体を用いることもできる。また、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は P S K に対する特異性が高いため、本発明のポリクローナル抗体を用いることによって、P S K の特異的な検出が可能である。更には、分析方法における測定感度の上昇、及び使用する抗 P S K ポリクローナル抗体量を減らすことも可能である。また、抗 P S K ポリクローナル抗体をサンドイッチ法に用いた場合には、P S K のダイナミックレンジの広い測定が可能である。

【 0 0 2 8 】

すなわち、本発明に係る P S K の免疫学的分析方法は、医薬に含まれる P S K の量を正確に測定し、医薬の品質管理に用いることができる効果を奏する。また、生体に投与された P S K を測定することが可能であり、P S K の体内動態を調べることができる効果を奏する。

【 0 0 2 9 】

なお、本発明に係る P S K の免疫学的分析方法では、P S K の体内動態を調べることができるため、P S K の薬効の予測および P S K の投与至適濃度を把握するためのデータ測定にも利用することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体の力価を示したグラフである。

【 図 2 】 本発明の抗 P S K ウサギポリクローナル抗体の特異性を B i a c o r e により評価した結果を示すグラフである。

【 図 3 】 B a l b / c マウスに P S K を免疫し、血清中の抗体価を測定したグラフである。

【 図 4 】 精製された抗 P S K モノクローナル抗体の抗体価を示すグラフである。

【 図 5 】 抗 P S K マウスモノクローナル抗体の特異性を競合 E L I S A により評価したグラフである。

【 図 6 】 本発明の抗 P S K モノクローナル抗体と、2 G 9 抗体又は 5 G 5 抗体とを用いた

10

20

30

40

50

サンドイッチ E L I S A による P S K の検出を示したグラフである。

【図 7】2 G 9 抗体の重鎖可変領域ドメインのヌクレオチドの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図 8】2 G 9 抗体の軽鎖可変領域ドメインのヌクレオチドの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図 9】5 G 5 抗体の重鎖可変領域ドメインのヌクレオチドの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図 10】5 G 5 抗体の軽鎖可変領域ドメインのヌクレオチドの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0031】

[1] 抗 P S K ポリクローナル抗体

本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は、P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体である。また、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する抗 P S K ポリクローナル抗体であってもよく、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1, 3 グルカン及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に反応しない抗 P S K ポリクローナル抗体であってもよい。

【0032】

抗 P S K ポリクローナル抗体は、P S K を認識する。P S K は、カワラタケ菌 C M 1 0 1 株 [F E R M - P 2 4 1 2 (A T C C 2 0 5 4 7)] の菌系体を水系溶媒、例えば、熱水又はアルカリ溶液（例えば、アルカリ金属の水酸化物、特に水酸化ナトリウムの水溶液）で抽出し、精製した後に乾燥して得ることができる。主要画分の糖部分は β - D - グルカンで、このグルカン部分の構造は β 1 $\rightarrow$ 3、 β 1 $\rightarrow$ 4 及び β 1 $\rightarrow$ 6 結合を含む分枝構造であり、主な構成単糖はグルコースやマンノースであり、約 18 ~ 38 % のタンパク質を含む。タンパク質の構成アミノ酸は、アスパラギン酸やグルタミン酸等の酸性アミノ酸と、バリンやロイシン等の中性アミノ酸が多く、リジンやアルギニン等の塩基性アミノ酸は少ない。水に可溶であるが、メタノール、ピリジン、クロロホルム、ベンゼン又はヘキサンには殆ど溶けない。

20

【0033】

本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は、ラミナリンの β 1, 3 グルカンを認識しない。 β 1, 3 グルカンは、グルコースが β 1 - 3 型の結合で連なった多糖である。植物や菌類、細菌など自然界に広く分布する。例えば、 β 1, 3 グルカンは、ラミナリン又はイーストグルカンなどに存在するグルカンであるが、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は、ラミナリンに結合せず、従ってラミナリンの β 1, 3 グルカンを認識しないポリクローナル抗体である。

30

【0034】

本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は、セルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造を認識しない。 β 1, 4 グルカンは、セルロース、又はグリコーゲンに存在する。セルロースは、分子式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ で表される多糖類であり、植物細胞の細胞壁および繊維の主成分である。本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は、セルロースに結合せず、従ってセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造を認識しないポリクローナル抗体である。

40

【0035】

本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は、ラミナリンの β 1, 6 グルカンを認識しない。 β 1, 6 グルカンは、ラミナリン又はデキストランに存在する。デキストランは、グルコースのみからなる多糖類の一種である。本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体は、ラミナリンに結合せず、従ってラミナリンの β 1, 6 グルカンを認識しないポリクローナル抗体である。

50

【0036】

本明細書において、「P S Kに特異的に結合する」とは、P S Kに結合し、少なくともラミナリン及びセルロースのグルカンに実質的に結合しないことを意味する。また、ラミナリン及びセルロースのグルカンに実質的に結合しないとは、P S Kの分析方法に本発明の抗体を用いた場合、実用的なレベルで非特異的な反応が生じないことを意味する。具体的には、例えば、B i a c o r eを用い、固相化した抗P S Kポリクローナル抗体と、P S K又はラミナリン若しくはセルロースとの結合を調べることによって、判定することができる。より具体的には、抗P S Kポリクローナル抗体のP S Kに対する結合力を100とした場合の、セルロースの β 1, 4グルカンのグルカン構造、又はラミナリンの β 1, 3グルカン、及び β 1, 6グルカンのグルカン構造に対する結合力が30%以下であることが好ましく、20%以下であることが好ましく、10%以下であることが最も好ましい。

10

【0037】

(P S Kのタンパク部分)

本発明の抗ポリクローナル抗体が認識してもよいP S Kのタンパク部分は、P S Kの約18~38%のタンパク質を占め、タンパク質の構成アミノ酸は、アスパラギン酸やグルタミン酸等の酸性アミノ酸と、バリンやロイシン等の中性アミノ酸が多く、リジンやアルギニン等の塩基性アミノ酸は少ない。

【0038】

(P S Kに特異的なグルカン構造)

本発明抗ポリクローナル抗体が認識してもよいP S Kに特異的なグルカン構造は、 β 1 $\rightarrow$ 3、 β 1 $\rightarrow$ 4及び β 1 $\rightarrow$ 6結合を含む分枝構造であり、主な構成単糖はグルコースやマンノースである。前記P S Kに特異的なグルカン構造は、セルロースの β 1, 4グルカンのグルカン構造、又はラミナリンの β 1, 3グルカン及び β 1, 6グルカンのグルカン構造とは異なるものである。

20

【0039】

(カワラタケの熱水・アルカリ抽出物)

従来の、P S Kを免疫して得られる従来のポリクローナル抗体は、ラミナリンの β 1, 3グルカン及び β 1, 6グルカンのグルカン構造、並びにセルロースの β 1, 4グルカンのグルカン構造に結合する抗体を含んでいた。この理由は、従来免疫に用いられていたP S Kが、ラミナリンの β 1, 3グルカン及び β 1, 6グルカン、並びにセルロースの β 1, 4グルカンと同一又は構造の類似したグルカンを含んでいたためと考えられる。このようなグルカン構造を含むことは、特異性の高い抗体を取得するための免疫原としては、好ましくない。

30

【0040】

一方、本発明の抗P S Kポリクローナル抗体は、ラミナリンの β 1, 3グルカン及び β 1, 6グルカンのグルカン構造、並びにセルロースの β 1, 4グルカンのグルカン構造に結合する抗体を実質的に含まない。この理由は、免疫に用いたカワラタケの熱水・アルカリ抽出物が、ラミナリンの β 1, 3グルカン及び β 1, 6グルカン、並びにセルロースの β 1, 4グルカンと同一又は構造の類似したグルカンを実質的に含まないためであると考えられる。

40

【0041】

本発明の抗P S Kポリクローナル抗体を取得するために用いられるカワラタケの熱水・アルカリ抽出物は、例えば、以下のように製造することができる。

【0042】

カワラタケ菌を常法に従って、培地に接種し、培養する。得られた菌苔をホモジェナイズし、種菌を調整する。前記種菌を常法に従って培養し、培養後に乾燥させ、乾燥菌系体を得る。この乾燥菌系体から、熱水及びアルカリ溶液を用いて抽出を行う。得られた熱水抽出液とアルカリ抽出液とを混合し、希塩酸で中和し、更に濃縮する。塩析を行い、沈殿を回収する。得られた沈殿から、凍結乾燥体として、熱水・アルカリ抽出物を得ることができる。

50

【 0 0 4 3 】

熱水及びアルカリ溶液による抽出は、まず熱水による抽出を行い、遠心して得られた残渣からアルカリ水溶液による抽出を行う。得られた熱水抽出液とアルカリ水溶液抽出液とを混合し、塩析及び沈殿等の工程を経て熱水・アルカリ抽出物とする。

【 0 0 4 4 】

熱水の温度は、50 以上であれば、特に限定されないが、70 以上が好ましく、80 以上がより好ましく、95～99 が最も好ましい。また、熱水による抽出時間も、特に限定されるものではないが、10分～6時間が好ましく、1時間～3時間がより好ましく、30分～90分が最も好ましい。

【 0 0 4 5 】

アルカリ溶液は、特に限定されるものではないが、例えばアルカリ金属の水酸化物を用いることが可能であり、水酸化ナトリウム水溶液が好ましい。例えば水酸化ナトリウム水溶液を用いる場合、その濃度は、0.2 M 以上であれば特に限定されるものではないが、0.3 M～3 M が好ましく、0.5 M～1.5 M がより好ましく、0.7 M～1.3 M が最も好ましい。前記アルカリ溶液の温度は、4 以上であれば、特に限定されないが、25 以上が好ましく、50 以上がより好ましく、95～99 が最も好ましい。また、アルカリ溶液による抽出時間も、特に限定されるものではないが、10分～6時間が好ましく、1時間～3時間がより好ましく、30分～90分が最も好ましい。

【 0 0 4 6 】

従来の P S K の抽出方法は、例えば特許文献 2 の実施例に記載のように、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液のみで抽出するものである。このような抽出法において得られた P S K は、ラミナリンの β 1, 3 グルカン及び β 1, 6 グルカン、並びにセルロースの β 1, 4 グルカンと同一又は構造の類似したグルカンを含むものと考えられる。一方、本発明の抗ポリクローナル抗体を取得するために用いる熱水・アルカリ抽出物のように、水抽出及びアルカリ抽出を組み合わせることにより、ラミナリンの β 1, 3 グルカン及び β 1, 6 グルカン、並びにセルロースの β 1, 4 グルカンと同一又は構造の類似したグルカンを含まないものを得ることができると考えられる。

【 0 0 4 7 】

(抗原結合性断片)

本発明の抗原結合性断片は、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体の抗原結合部位を含み、P S K への結合性を有する限り、特に限定されるものではないが、例えば F a b、F a b'、F (a b')₂、F v 断片、ディアボディー、単一鎖抗体分子、及びマルチ特異性抗体を挙げることができる。これらの抗原結合性断片は、例えば、抗体を常法によりタンパク質分解酵素 (例えば、ペプシン又はパパイン等) によって消化し、続いて、常法のタンパク質の分離精製の方法により精製することにより、得ることができる。また、ディアボディー、単一鎖抗体分子、及び抗体断片から形成されたマルチ特異性抗体は、遺伝子組換えにより調製することができる。

【 0 0 4 8 】

[2] P S K の免疫学的分析方法

本発明の P S K の免疫学的分析方法は、P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いることを特徴とするものである。P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片としては、前記の「 [1] 抗 P S K ポリクローナル抗体」の項目に記載の抗体を用いることができる。例えば、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する抗 P S K ポリクローナル抗体を用いてもよく、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1, 3 グルカン及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に反応しない抗 P S K ポリクローナル抗体を用いてもよい。P S K の免疫学的分析方法を用いることにより、P S K を正確に分析することができる。

【 0 0 4 9 】

P S K を免疫学的に分析する方法としては、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体又は

10

20

30

40

50

その抗原結合性断片を用いて、P S Kを定量的又は半定量的に決定することができるか、あるいは、P S Kの存在の有無を判定することができる限り、特に限定されるものではない。例えば、酵素免疫測定法、免疫組織染色法、表面プラズモン共鳴法（S P R法：B i a c o r e法）、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、ウエスタンブロット法、イムノクロマトグラフ法、磁気ビーズ凝集法、又は磁気ビーズ酵素免疫法を挙げることができる。

【0050】

なお、本明細書における「分析」には、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」と、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」との両方の意味が含まれる。

10

【0051】

（被検試料）

P S Kの免疫学的分析方法に用いることのできる被検試料としては、P S Kを含有する可能性のある試料であれば特に限定されるものではないが、特に生理活性を有するP S Kを含有する可能性のある医薬品若しくは飲食物、又はP S Kが投与された患者の生体試料又は生体由来試料を挙げることができる。医薬品又は飲食物としては、具体的には、医薬組成物、若しくは医薬製剤、又はそれらの原料となる菌類由来の熱水・アルカリ抽出物、あるいは健康食品、若しくは機能性食品、又はそれらの原料となる菌類由来の熱水・アルカリ抽出物を挙げることができる。また、生体試料又は生体由来試料としては、例えば、尿、血液、血清、血漿、便、髄液、唾液、細胞、組織、若しくは器官、又はそれらの調整物（例えば、生検標本）等を挙げることができる。

20

【0052】

P S Kの免疫学的分析方法を用いることにより、医薬品や飲食物並びにP S Kを服用後の血液や組織などから、特定の熱水・アルカリ抽出物を定性的・定量的に検出できる。従って、生理活性を有するP S Kの摂取量（投与量）を把握できるために大変有用である。例えば、P S K投与後の血中濃度や腫瘍へのP S Kの到達度合を簡易かつ高精度に判別できるため、体内動態や薬効を簡易かつ高精度に評価できる。

【0053】

更に、本発明のP S Kの免疫学的分析方法により、血中濃度の測定を行うことにより、P S Kの薬効の予測およびP S Kの投与至適濃度を把握するためのデータ測定にも利用することができる。例えば、P S Kの薬効の予測を行う場合、P S K投与の一定時間後に、P S Kが投与された患者のP S Kの血中濃度を測定する。得られた血中濃度から、ある一定以上の血中濃度であれば、P S Kの薬効が高いことを予測可能であり、一定以下の血中濃度であれば、P S Kの薬効が低いことを予測可能である。また、患者によって、P S Kの投与至適濃度が異なることがある。

30

【0054】

従って、P S Kの投与至適濃度を把握することは、患者の治療において重要である。P S Kの投与至適濃度を把握するためには、P S Kの投与の一定時間後に、P S Kが投与された患者のP S Kの血中濃度を測定する。得られた血中濃度が低く薬効が期待できない場合は、P S Kの投与量を増加させ、逆に血中濃度が高い場合は、P S Kの投与量を減少させることができる。

40

【0055】

本発明のP S Kの免疫学的分析方法の好ましい1つの実施態様においては、P S Kに特異的に結合する抗P S Kポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片の1種類を用いて、P S Kを分析することができる。例えばこのような実施態様としては、免疫組織染色法、表面プラズモン共鳴法（S P R法：B i a c o r e法）、ラテックス凝集免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、又はウエスタンブロット法を挙げることができる。

【0056】

本発明のP S Kの免疫学的分析方法の別の好ましい1つの実施態様においては、P S K

50

に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片と、P S K と反応する第 2 の抗体又はその抗原結合性断片とを使用して、P S K を分析することができる。本実施態様で用いる抗 P S K ポリクローナル抗体は、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体である。本実施態様としては、具体的には、例えば抗 P S K ポリクローナル抗体及び第 2 の抗体を用いたサンドイッチ法を挙げることができる。更に、抗 P S K ポリクローナル抗体及び第 2 の抗体を混合して用いる免疫組織染色法、表面プラズモン共鳴法 (S P R 法 : B i a c o r e 法) 、ラテックス凝集免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、又はウエスタンブロット法を挙げることができる。また、本実施態様においては、2 種類以上の第 2 の抗体を用いることもできる。

【 0 0 5 7 】

第 2 の抗体は、P S K に結合することのできるものであれば、特に限定されないが、例えば、P S K を認識し、且つ他の多糖類の β 1 , 3 グルカン、 β 1 , 4 グルカン、及び β 1 , 6 グルカン を認識する非特許文献 1 に記載のポリクローナル抗体、又は P S K に特異的に結合する抗 P S K 抗体を挙げることができるが、P S K 特異的抗体が好ましい。

【 0 0 5 8 】

P S K 特異的な抗体としては、例えば、本発明の P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体 (例えば、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する抗 P S K ポリクローナル抗体、又は P S K に反応し、そしてセルロースの β 1 , 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1 , 3 グルカン及び β 1 , 6 グルカンのグルカン構造に反応しない抗 P S K ポリクローナル抗体) ; P S K を認識し、且つデキストラン、グリコーゲン、ラミナリン、及びセルロースの β 1 , 3 グルカン、 β 1 , 4 グルカン、及び β 1 , 6 グルカン を認識しないモノクローナル抗体 ; 又は P S K の生理活性部位を認識するモノクローナル抗体を挙げることができるが、最も好ましくは、P S K の生理活性部位を認識するモノクローナル抗体である。活性を有する P S K を正確に測定することができるからである。

【 0 0 5 9 】

第 2 の抗体は、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体を除いては、常法に従って調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、K o e h l e r と M i l s t e i n の方法 (N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 , 1 9 7 5) に従って、作製することができる。抗 P S K 抗体を取得するための免疫抗原は、カワラタケ菌 C M 1 0 1 株 [F E R M - P 2 4 1 2 (A T C C 2 0 5 4 7)] の菌系体を水系溶媒、例えば、熱水又はアルカリ溶液 (例えば、アルカリ金属の水酸化物、特に水酸化ナトリウムの水溶液) で抽出し、精製した後に乾燥して得たものであり、抗腫瘍活性を有するものであれば、特に限定せずに用いることができる。すなわち、免疫原として、P S K を用いること以外は、通常のモノクローナル抗体調製法に従って、調製することができる。しかしながら、第 2 の抗体を得る場合にも、免疫原として、前記のカワラタケの熱水・アルカリ抽出物を用いることが好ましい。

【 0 0 6 0 】

P S K の生理活性部位を認識するモノクローナル抗体としては、例えば以下の抗体を挙げることができる。

(モノクローナル抗体 (A))

モノクローナル抗体 (A) は、後述の参考例に記載の 2 G 9 抗体に代表されるものである。その重鎖可変領域ドメインは、好ましくは配列番号 6 で表されるアミノ酸配列 (S Y G M S) からなる H - C D R 1 のポリペプチド、配列番号 1 0 で表されるアミノ酸配列 (T I S S G G S Y T Y Y P D S V K G) からなる H - C D R 2 のポリペプチド、配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列 (R I T T V V A R S F Y F D Y) からなる H - C D R 3 のポリペプチドを含む。また、この抗体の軽鎖可変領域ドメインは、好ましくは配列番号 2 2 で表されるアミノ酸配列 (R A S K S V S T S G Y S Y M H) からなる L - C D R 1 のポリペプチド、配列番号 2 6 で表されるアミノ酸配列 (L V S N L E S) からなる L - C D R 2 のポリペプチド、配列番号 3 0 で表されるアミノ酸配列 (Q H I R E L T R S) が

10

20

30

40

50

らなる L - C D R 3 のポリペプチドを含む。

【 0 0 6 1 】

更に、モノクローナル抗体 (A) の重鎖可変領域ドメインは、より好ましくは、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなる H - C D R 1 のポリペプチド、配列番号 1 0 で表されるアミノ酸配列からなる H - C D R 2 のポリペプチド、配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列からなる H - C D R 3 のポリペプチド、並びに重鎖可変領域フレームワークのポリペプチドを含み、最も好ましくは、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域ドメインのポリペプチドである。また、この抗体の軽鎖可変領域ドメインは、より好ましくは配列番号 2 2 で表されるアミノ酸配列からなる L - C D R 1 のポリペプチド、配列番号 2 6 で表されるアミノ酸配列からなる L - C D R 2 のポリペプチド、配列番号 3 0 で表されるアミノ酸配列からなる L - C D R 3 のポリペプチド、並びに軽鎖可変領域フレームワークのポリペプチドを含み、最も好ましくは、配列番号 1 8 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域ドメインのポリペプチドである。

10

【 0 0 6 2 】

モノクローナル抗体 (A) は、例えば 2 G 9 抗体とエピトープへの結合が競合する抗体を含み、特に、2 G 9 抗体が結合する P S K のエピトープと同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。

【 0 0 6 3 】

2 G 9 抗体が結合する P S K のエピトープは、P S K の細胞障害活性を示す生理活性部位に存在するエピトープであるか、あるいはその近傍のエピトープである可能性が高く、2 G 9 抗体がそのエピトープに結合することにより、P S K の細胞障害活性を示す生理活性部位の活性を抑制させることができるエピトープである。また、2 G 9 抗体が結合する P S K のエピトープは、P S K の T G F - β 1 阻害活性を示す生理活性部位に存在するエピトープであるか、あるいはその近傍のエピトープである可能性が高く、2 G 9 抗体がそのエピトープに結合することにより、P S K の T G F - β 1 阻害活性を示す生理活性部位の活性を抑制させることができるエピトープである。

20

【 0 0 6 4 】

本明細書において、「エピトープへの結合が競合する抗体」とは、2 つの抗体を用いたエピトープの競合試験において、競合作用を示したすべての抗体を含む。2 つの抗体を用いたエピトープの競合試験において、競合率を計算することができ、「エピトープへの結合が競合する抗体」は、1 % ~ 1 0 0 % の競合率を示すことがあり、具体的には 1 0 % 以上、2 0 % 以上、3 0 % 以上、4 0 % 以上、5 0 % 以上、6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上又は 9 0 % 以上の競合率を示す抗体を含む。

30

【 0 0 6 5 】

また、「同一のエピトープに結合する」とは、抗体の抗原結合部位が結合するエピトープが同一であることを意味し、この抗体は 2 つの抗体を用いたエピトープの競合試験において、競合作用を示す。「同一のエピトープに結合する」抗体のエピトープの競合試験における競合率は特に限定されるものではない。これは、エピトープの競合試験における競合率は、2 つの抗体の力価、結合定数、解離定数、及び親和定数等により決定されるためである。従って、「同一のエピトープに結合する」抗体は、1 % ~ 1 0 0 % の競合率を示すことがあり、具体的には 1 0 % 以上、2 0 % 以上、3 0 % 以上、4 0 % 以上、5 0 % 以上、6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上又は 9 0 % 以上の競合率を示す抗体を含むことができる。

40

【 0 0 6 6 】

エピトープの競合試験は、以下の方法により行うことができる。P S K を 1 μ g / w e l l の濃度で、9 6 ウェルプレートに 4 で一晚コート後、1 % B S A でブロッキングして P S K を固相化したプレートを作製する。例えば、0 . 1 μ g / m L、0 . 5 μ g / m L、1 μ g / m L、又は 5 μ g / m L の第一の抗体を添加して、2 5 で 3 時間インキュベートする。T B S T で各ウェルを 3 回洗浄した後、0 . 5 μ g / m L 濃度に調製した H R P 標識した第二の抗体溶液を添加して、2 5 で 1 時間インキュベートする。T B S T

50

で各ウェルを3回洗浄した後、基質であるABSTを加え、15分間程度発色させた。Peroxidase Stop Solutionで発色反応を停止させた後、プレートリーダーを用いて、405nmの吸光度を測定し、競合率を計算する。

【0067】

(モノクローナル抗体(B))

モノクローナル抗体(B)は、後述の参考例に記載の5G5抗体に代表されるものである。その重鎖可変領域ドメインは、好ましくは配列番号38で表されるアミノ酸配列(GYTMN)からなるH-CDR1のポリペプチド、配列番号42で表されるアミノ酸配列(LINPYNGGTSYNQKFKG)からなるH-CDR2のポリペプチド、配列番号46で表されるアミノ酸配列(GGKFATGTSY)からなるH-CDR3のポリペプチドを含む。また、この抗体の軽鎖可変領域ドメインは、好ましくは配列番号54で表されるアミノ酸配列(RSSTGAVTTSNYAN)からなるL-CDR1のポリペプチド、配列番号58で表されるアミノ酸配列(GTNNRAP)からなるL-CDR2のポリペプチド、配列番号62で表されるアミノ酸配列(ALWYSNHV)からなるL-CDR3のポリペプチドを含む。

10

【0068】

更に、モノクローナル抗体(B)の重鎖可変領域ドメインは、より好ましくは、配列番号38で表されるアミノ酸配列からなるH-CDR1のポリペプチド、配列番号42で表されるアミノ酸配列からなるH-CDR2のポリペプチド、配列番号46で表されるアミノ酸配列からなるH-CDR3のポリペプチド、並びに重鎖可変領域フレームワークのポリペプチドを含み、最も好ましくは、配列番号34で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域ドメインのポリペプチドである。また、この抗体の軽鎖可変領域ドメインは、より好ましくは配列番号54で表されるアミノ酸配列からなるL-CDR1のポリペプチド、配列番号58で表されるアミノ酸配列からなるL-CDR2のポリペプチド、配列番号62で表されるアミノ酸配列からなるL-CDR3のポリペプチド、並びに軽鎖可変領域フレームワークのポリペプチドを含み、最も好ましくは、配列番号50で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域ドメインのポリペプチドである。

20

【0069】

モノクローナル抗体(B)は、例えば5G5抗体とエピトープへの結合が競合する抗体を含み、特に、5G5抗体が、結合するPSKのエピトープと同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。

30

【0070】

5G5抗体が結合するPSKのエピトープは、PSKの細胞障害活性を示す生理活性部位に存在するエピトープであるか、あるいはその近傍のエピトープである可能性が高く、5G5抗体がそのエピトープに結合することにより、PSKの細胞障害活性を示す生理活性部位の活性を抑制させることができるエピトープである。また、5G5抗体が結合するPSKのエピトープは、PSKのTGF- β 1阻害活性を示す生理活性部位に存在するエピトープであるか、あるいはその近傍のエピトープである可能性が高く、5G5抗体がそのエピトープに結合することにより、PSKのTGF- β 1阻害活性を示す生理活性部位の活性を抑制させることができるエピトープである。

40

【0071】

モノクローナル抗体(A)及びモノクローナル抗体(B)の、H-CDR1のポリペプチド、H-CDR2のポリペプチド、H-CDR3のポリペプチド、L-CDR1のポリペプチド、L-CDR2のポリペプチド、及びL-CDR3のポリペプチドは、それぞれ1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されてもよい。それらの欠失、置換、挿入又は付加されたポリペプチドを含む重鎖可変領域ドメイン及び軽鎖可変領域ドメインから形成される抗原結合部位が結合するエピトープは、2G9抗体又は5G5抗体が結合するエピトープと同一であり、その結合によりPSKの細胞障害活性を抑制することができる。

【0072】

50

また、モノクローナル抗体（Ａ）及びモノクローナル抗体（Ｂ）の、重鎖可変領域ドメイン又は軽鎖可変領域ドメインのポリペプチドも、それぞれ１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されてもよい。それらの欠失、置換、挿入又は付加されたポリペプチドを含む重鎖可変領域ドメイン及び軽鎖可変領域ドメインから形成される抗原結合部位が結合するエピトープは、２Ｇ９抗体又は５Ｇ５抗体が結合するエピトープと同一であり、その結合によりＰＳＫの細胞障害活性を抑制することができる。

【００７３】

より具体的には、アミノ酸の欠失、置換、挿入、又は付加は、それぞれのポリペプチドにおいて３個以下が好ましく、２個以下がより好ましく、１個が最も好ましい。またアミノ酸の置換の場合、限定されるものではないが、親水性のアミノ酸は親水性のアミノ酸と、疎水性のアミノ酸は親水性のアミノ酸と、塩基性のアミノ酸は塩基性のアミノ酸と、酸性アミノ酸は酸性のアミノ酸と、置換されることが好ましい。このような性質の似たアミノ酸の置換の場合、タンパク質の立体構造が維持されることが多く、従って抗ＰＳＫ抗体の抗原結合部位の立体構造も維持され、抗ＰＳＫ抗体は、ＰＳＫと結合することができる。

10

20

30

40

50

【００７４】

本発明のＰＳＫの免疫学的分析方法の好ましい実施態様として、サンドイッチ法を利用する場合、例えば、サンドイッチ法は、抗ＰＳＫポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片又は第２の抗体若しくはその抗原結合性断片のいずれか一方の抗体若しくはその抗原結合性断片を固定化した不溶性担体、ＰＳＫを含む可能性のある被検試料、残る一方の抗体若しくはその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体を接触させ、不溶性担体上に固定化抗体とＰＳＫと標識抗体との複合体を形成する工程（以下、複合体形成工程と称する）と、複合体における標識からの信号を分析する工程と、を含む。複合体形成工程において、抗体等が固相化された不溶性担体、ＰＳＫを含む可能性のある被検試料、及び標識抗体の接触の順番は、特に限定されるものではなく、不溶性担体及び被検試料を先に接触させ、次に標識抗体を接触させてもよく、標識抗体及び被検試料を接触させ、次に不溶性担体を接触させてもよく、不溶性担体、被検試料、及び標識抗体と一緒に接触させてもよい。

【００７５】

本明細書等における「第２の抗体」とは、ＰＳＫに結合することのできるものであれば、特に限定されないが、例えば、ＰＳＫを認識し、且つ他の多糖類のβ１，３グルカン、β１，４グルカン、及びβ１，６グルカンを認識する非特許文献１に記載のポリクローナル抗体、又はＰＳＫに特異的に結合する抗ＰＳＫ抗体を挙げることができるが、ＰＳＫに特異的に結合する抗ＰＳＫ抗体が好ましい。

【００７６】

より具体的には、本発明のＰＳＫに特異的に結合する抗ＰＳＫポリクローナル抗体（例えば、ＰＳＫのタンパク部分およびＰＳＫに特異的なグルカン構造の少なくともいずれかを認識する抗ＰＳＫポリクローナル抗体、又はＰＳＫに反応し、そしてセルロースのβ１，４グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンのβ１，３グルカン及びβ１，６グルカンのグルカン構造に反応しない抗ＰＳＫポリクローナル抗体）；ＰＳＫを認識し、且つデキストラン、グリコーゲン、ラミナリン、及びセルロースのβ１，３グルカン、β１，４グルカン、及びβ１，６グルカンを認識しないモノクローナル抗体；又はＰＳＫの生理活性部位を認識するモノクローナル抗体を挙げることができるが、最も好ましくは、ＰＳＫの生理活性部位を認識するモノクローナル抗体である。

【００７７】

サンドイッチ法を利用する本発明の免疫学的分析方法は、第２の抗体又はその抗原結合性断片を不溶性担体に固定化した後、ＰＳＫを含む可能性のある被検試料と接触させ、続いて、抗ＰＳＫポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体と接触させ、不溶性担体上に、固定化抗体とＰＳＫと標識抗体とからなるサンドイッチ状複合体を形成させ、抗ＰＳＫポリクローナル抗体の標識からの信号を検出することができ

る。

【0078】

なお、抗 P S K ポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片を不溶性担体に固定化し、この抗体固定化不溶性担体と P S K を含む可能性のある被検試料とを接触させ、続いて、第 2 の抗体又はその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体と接触させ、不溶性担体上に、固定化抗体と P S K と標識抗体とからなるサンドイッチ状複合体を形成させ、第 2 の抗体の標識の信号を検出してもよい。

【0079】

複合体形成工程は、抗 P S K モノクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片を固定化した不溶性担体と、P S K を含む可能性のある被検試料とを接触させ、そして抗 P S K ポリクローナル抗体若しくはその抗原結合性断片に標識を付した標識抗体を接触させる工程であることが好ましい。このとき、第 2 の抗体は抗 P S K モノクローナル抗体である。

【0080】

すなわち、抗 P S K モノクローナル抗体と P S K と標識抗体（抗 P S K ポリクローナル抗体）とからなるサンドイッチ状複合体を形成させ、抗 P S K ポリクローナル抗体の標識の信号を検出することが最も好ましい。

【0081】

なお、標識した第 2 の抗体又は抗 P S K ポリクローナル抗体に代えて、未標識の第 2 の抗体又は抗 P S K ポリクローナル抗体を用いてもよい。この場合、未標識の第 2 の抗体又は抗 P S K ポリクローナル抗体に結合する標識抗体を用いて信号を検出する。また、標識した第 2 の抗体又は抗 P S K ポリクローナル抗体に代えて、ビオチン標識した第 2 の抗体又は抗 P S K ポリクローナル抗体を用い、標識アビジンを用いて信号を検出することも可能である。

【0082】

本発明のサンドイッチ法による免疫学的分析方法に使用することのできる不溶性担体は特に限定されるものでなく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子、その他ニトロセルロース、紙、アガロース及びこれらの組み合わせ等を例示することができる。

【0083】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、又は発光物質を使用するのが有利である。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等、また、蛍光物質としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート等、また、発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステル、ルシフェリン等を使用することができる。

【0084】

[3] P S K の免疫学的分析用キット

本発明の P S K の免疫学的分析用キットは、P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗原結合性断片を含む。P S K に特異的に結合する抗 P S K ポリクローナル抗体は、P S K のタンパク部分および P S K に特異的なグルカン構造の少なくともいづれかを認識する抗 P S K ポリクローナル抗体であってもよく、また、P S K に反応し、そしてセルロースの β 1, 4 グルカンのグルカン構造、並びにラミナリンの β 1, 3 グルカン及び β 1, 6 グルカンのグルカン構造に反応しない抗 P S K ポリクローナル抗体であってもよい。

【0085】

本発明の P S K の免疫学的分析用キットは、更に、P S K と反応する第 2 の抗体又はその抗原結合性断片を含んでもよい。

【0086】

本実施形態の P S K の分析キットは、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体又はその抗体の抗原結合性断片を含む P S K の免疫学的分析用キットである。P S K の免疫学的分析

10

20

30

40

50

用キットは、本発明の P S K の免疫学的分析方法に用いることができる。従って、本発明の P S K の免疫学的分析用キットは、酵素免疫測定法、免疫組織染色法、表面プラズモン共鳴法 (S P R 法 : B i a c o r e 法) 、ラテックス凝集免疫測定法、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、免疫沈降法、ウエスタンブロット法、イムノクロマトグラフ法、磁気ビーズ凝集法、又は磁気ビーズ酵素免疫法等に用いるキットを含む。

【 0 0 8 7 】

P S K の免疫学的分析用キットが、酵素免疫測定法、例えばサンドイッチ法のキットの場合、抗 P S K ポリクローナル抗体若しくは第 2 の抗体、又はそれらの抗原結合性断片が表面に固相化された担体 (ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子、その他ニトロセルロース、紙、アガロース及びこれらの組み合わせ等) 、標識された第 1 抗 P S K ポリクローナル抗体若しくは第 2 の抗体、又はそれらの抗原結合性断片、酵素、その発色基質、及びその他の E L I S A 試薬 (例えば、洗浄液) など

10

を適宜組み合わせた構成にすることができる。

【 0 0 8 8 】

P S K の分析キットが、免疫組織染色法のキットの場合、例えばビオチン化標識した本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体、(H R P) 標識したストレプトアビジン、D A B 基質、あるいは、未標識の抗 P S K ポリクローナル抗体、H R P 標識した抗マウス I g G 抗体、基質などを含むことができる。

【 0 0 8 9 】

P S K の分析キットが、S P R 分析法のキットの場合、本発明の抗 P S K ポリクローナル抗体が固定化されたセンサーチップなどを含む。

20

【 0 0 9 0 】

従って、P S K の分析キットは、用いる免疫学的手法に応じて、所望の形態で抗 P S K ポリクローナル抗体、あるいはその抗原結合性断片を含む。例えば、標識物質の具体例としては、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β - D - ガラクトシダーゼ、又はグルコースオキシダーゼ等を、蛍光物質としてフルオレセインイソチアネート又は希土類金属キレート等を、放射性同位体として ^3H 、 ^{14}C 、又は ^{125}I 等を、その他、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質等を挙げることができる。酵素又は化学発光物質等の場合には、それ自体単独では測定可能なシグナルをもたらすことはできないことから、それぞれ対応する適当な基質等を選択して含むことが好ましい。

30

【 0 0 9 1 】

P S K の免疫学的分析用キットは、P S K を特異的に分析することができるものであり、そのことが記載された使用説明書などを含む。また、キットの包装などに P S K を特異的に分析することができることが記載されていてもよい。

【 0 0 9 2 】

本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。すなわち、請求項に示した範囲で適宜変更した技術的手段を組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【 実施例 】

40

【 0 0 9 3 】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 9 4 】

《 製造例 1 : カワラタケの熱水・アルカリ抽出物の製造 》

カワラタケ菌 C M 1 0 1 株 [F E R M - P 2 4 1 2 (A T C C 2 0 5 4 7)] を、グルコース 5 %、ペプトン 0 . 2 %、酵母エキス 0 . 3 %、 KH_2PO_4 0 . 1 % 及び $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の 0 . 1 % (いずれも重量 %) からなる培地に接種し、10日間培養し、培地表面に発育した菌苔を生理食塩水とともにホモジェナイズしたものを種菌とした。この種菌を上記と同一組成の培地 2 0 0 m L の入った 1 リットル容の培養用フラスコ 1 0

50

0本にそれぞれ接種し、25～27℃で25日間培養した後、乾燥器中で乾燥し、乾燥菌系体を得た。乾燥菌系体収量は培養器一本当たり2.0～4.5gであった。この菌系体100gに蒸留水1リットルを加え、97℃で1時間、撹拌しながら抽出した。次に、遠心残渣に対して、1規定の水酸化ナトリウム水溶液1リットルを加え、97℃で1時間、撹拌しながら抽出した。塩酸で中和後、両抽出液を混合した。混合液を室温にまで冷却し、濾紙濾過により、抽出液を回収した。次いで、希塩酸で中和し、エバポレーターで液を濃縮した。濃縮液1リットルに対し飽和溶液となるように硫酸アンモニウムを加え、塩析を行い、生じた沈殿を遠心分離により分取した。分取した沈殿は蒸留水に再溶解し、透析及び限外濾過処理し、分子量5000以下の低分子物質を除去した。次いで、凍結乾燥して、カワラタケの熱水・アルカリ抽出物粉末15gを得た。

10

【0095】

《実施例1：抗PSKウサギポリクローナル抗体の作製》

製造例1で得られたカワラタケの熱水・アルカリ抽出物粉末のPBS溶解液とFreund's Complete Adjuvant (Sigma-Aldrich, Tokyo)とを等量混合し、超音波発生器を用いて高粘性のエマルジョン液を作成した。前記エマルジョン液を雌性ニュージーランドホワイト・ウサギの後背部にPSKの量として、0.5mg/羽になるように皮下注射した。2週後に、PSK溶液とFreund's Incomplete Adjuvant (Sigma-Aldrich)とのエマルジョン液を、PSKの量として、0.5mg/羽になるように、ウサギ後背部に皮下注射した。この注射を2週間隔で8回繰り返した。最終免疫後1週間経過した時点で、ケタミン・キシラジン麻酔下、頸動脈より全採血を行った。採取した血液は室温にて1時間静置後、4℃で一昼夜保存し、3000rpm、10分間遠心分離し血清を得た。

20

【0096】

免疫血清の抗体価測定はELISA法によって測定した。すなわち、PSKを50ng/ウェルの濃度でコートさせた96ウェルのプレートに、得られた血清の1000～2187000倍希釈液を100μg/L分注し、室温で3時間反応させた後、0.05%Tween 80添加TBS（以下、「TBS-T」とする）で3回洗浄した。次に、プレートの各ウェルにHRP標識抗ウサギIgG抗体溶液を加え、室温で1時間反応させた後、TBS-Tで3回洗浄した。ABTS基質溶液を加えて5～15分間発色させた後、プレートリーダーを用いて405～630nmの吸光度を測定した。抗体価測定結果を図1に示す。以降の実験には、3個体中で最も力価が高かった個体No.2の抗血清を用いた。

30

【0097】

次に、PSK固相化カラムを用いたアフィニティークロマトにより、抗PSKポリクローナル抗体を精製した。定法に従い、ペプシン処理および還元処理を行い、その後にホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識を行った。得られたFab'-HRPが抗原認識能を維持していることは、前記のELISA法で確認した（表1）。

【0098】

【表1】

Fab'-HRPによるPSKの検出

40

	抗原	
	PSK	BSA
Ab s	0.634	0.002

【0099】

《比較製造例1：従来のPSKの製造》

従来のPSKの製造は、特許文献2の実施例2の方法に準じて行った。

カワラタケ菌CM101株〔FERM-P2412（ATCC20547）〕を、グル

50

コース 5 %、ペプトン 0.2 %、酵母エキス 0.3 %、 KH_2PO_4 0.1 % 及び $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の 0.1 % (いずれも重量%) からなる培地に接種し、10 日間培養し、培地表面に発育した菌苔を生理食塩水とともにホモジェナイズしたものを種菌とした。この種菌を上記と同一組成の培地 200 mL の入った 1 リットル容の培養用フラスコ 100 本にそれぞれ接種し、25 ~ 27 で 25 日間培養した後、乾燥器中で乾燥し、乾燥菌糸体を得た。乾燥菌糸体収量は培養器一本当たり 2.0 ~ 4.5 g であった。この菌糸体 100 g に 0.1 規定の水酸化ナトリウム水溶液 3 リットルを加え、97 で 1 時間、撹拌しながら抽出した。抽出終了後、室温にまで冷却し、濾紙濾過により、抽出液を回収した。次いで、希塩酸で中和し、エバポレーターで液を濃縮した。濃縮液 1 リットルに対し飽和溶液となるように硫酸アンモニウムを加え、塩析を行い、生じた沈殿を遠心分離により分取した。分取した沈殿は蒸留水に再溶解し、透析及び限外濾過処理し、分子量 5000 以下の低分子物質を除去した。次いで、凍結乾燥して、タンパク多糖体粉末 15 g を得た。

10

【0100】

《比較例 1：従来の抗 P S K ウサギポリクローナル抗体の作製》

製造例 1 で得られたカワラタケの熱水・アルカリ抽出物粉末に代えて、比較製造例 1 で得られたタンパク多糖体を用いたことを除いては、実施例 1 の操作を繰り返し、従来の抗 P S K ウサギポリクローナル抗体を得た。

【0101】

《実施例 2：抗 P S K ウサギポリクローナル抗体の特異性評価》

20

抗 P S K ウサギポリクローナル抗体の P S K に対する特異性評価は、B i a c o r e を用いて行った。まず、S e n s o r C h i p C M 5 センサー表面に抗ウサギ I g G 抗体をアミノカップリング法で固相化した。次に、センサーチップに対して、比較例 1 で作成した従来の抗 P S K ウサギポリクローナル抗体 (o l d r a b b i t a n t i - P S K p A b) 又は実施例 1 で作製した抗 P S K ウサギポリクローナル抗体 (n e w r a b b i t a n t i - P S K p A b) を一定量補足させた。これらのセンサーチップに対して $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ に調整した P S K、 $\beta 1 - 4 \text{ g l u c a n}$ 、又は $\beta 1 - 3$ 、 $1 - 6 \text{ g l u c a n}$ をアナライトに用いて結合解析を行った。なお、 $\beta 1 - 4 \text{ g l u c a n}$ としてはセルロースを用い、 $\beta 1 - 3$ 、 $1 - 6 \text{ g l u c a n}$ としては、ラミナリンを用いた。

30

【0102】

その結果、図 2 に示すように、従来の o l d r a b b i t a n t i - P S K p A b は、P S K 以外のグルカン類にも結合するのに対して、本発明の n e w r a b b i t a n t i - P S K p A b は、P S K に含まれる以外の $\beta 1$ 、3 グルカン、 $\beta 1$ 、4 グルカン、及び $\beta 1$ 、6 グルカン構造に結合せず、P S K に特異的に結合することが分かった。

【0103】

《参考例 1：抗 P S K モノクローナル抗体の作製》

抗体の作製は、(1) 抗原の免疫、(2) 抗血清の抗体価の測定、(3) 抗 P S K モノクローナル抗体の作製の順に行った。以下、順に手順の概要を説明する。

(1) 抗原の免疫：第 1 回免疫として、P S K のリン酸緩衝化生理食塩水 (p h o s p h a t e b u f f e r e d s a l i n e ; 以下、「P B S」とする。) 溶液と F r e u n d ' s C o m p l e t e A d j u v a n t (シグマ - アルドリッチ社製) とを等量混合し、超音波発生器を用いて高粘性のエマルジョン液を調製した。6 週齢の雌性 B a l b / c マウス (オリエンタル酵母株式会社) に、このエマルジョン液を P S K 量が $0.1 \text{ mg} / \text{匹}$ となるように、皮下注射した。1 週間後に第 2 回目の免疫を行った。P S K の P B S 溶液と F r e u n d ' s I n c o m p l e t e A d j u v a n t (シグマ - アルドリッチ社製) とを混合してエマルジョン液を調製した。P S K 量が $0.1 \text{ mg} / \text{匹}$ となるように腹腔内注射した。1 週間ごとに同じ手順で免疫を行い、第 8 回目の免疫後、尾静脈より採血して力価の測定を行った。抗体価の上昇が認められた個体について、P S K を腹腔内注射することによりブーストを行った後に、ハイブリドーマ取得のために細胞融合

40

50

を行った。

【0104】

(2) 抗血清の抗体価の測定：前記8回目の免疫後に、Balb/cマウスから得られたそれぞれの血清(抗血清)の抗体価測定を、ELISA法により行った。手順を以下に示す。96ウェルプレートに、PSK溶液を1μg/ウェルずつ分注し、4、一晚反応させてPSKを固相化した。1%BSAでブロッキング後、得られた血清の1,000倍希釈液を各ウェルに50μLずつ分注し、25で3時間反応させた。次に、TBS-Tで、各ウェルを3回洗浄した後、1μg/mL濃度に調製したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgM抗体溶液を50μL各ウェルに分注し、25で1時間反応させた。TBS-Tで各ウェルを3回洗浄した後、基質であるABST(KPL社)を加え、15分間発色させた。50μLのPeroxidase Stop Solution(KPL社)で発色反応を停止させた後、プレートリーダーを用いて、405nmの吸光度を測定した。図3に、ELISA法による抗体価測定の結果を示しており、グラフの横軸には血清の希釈倍率、縦軸には吸光度(力価)を表す。

10

【0105】

(3) 抗PSKモノクローナル抗体の作製：PSKの免疫により、抗体の力価の上昇が認められた個体については、定法にてモノクローナル抗体作製を進めた。すなわち、ブーストの7日後、マウスの脾臓を摘出し脾細胞をマウスミエロマ細胞株P3U1と細胞融合させた。HAT選択培養液の中で2~3週間培養し、ハイブリドーマコロニーを得た。これらの培養上清を回収して、前記(2)に記載のELISA法を用いて、ハイブリドーマのスクリーニングを行った。得られたPSK抗体を産生している陽性ハイブリドーマについては、同様のスクリーニングを2回繰り返し、抗体産生能や増殖性に優れたハイブリドーマを選抜した。その結果、約100個の陽性ハイブリドーマから、2G9抗体及び5G5抗体を産生する2つのハイブリドーマを選択した。なお、2G9抗体及び5G5抗体はIgM抗体であることを確認した。

20

【0106】

抗体の大量調製はマウス腹水で行った。具体的には500μLのプリスタンを雌性Balb/cマウスの腹腔内に投与して、7~10日後、マウス一匹あたり約10⁷個のハイブリドーマを移植した。1~2週間後、腹水が溜まってきたら随時回収し、精製まで-80で保存した。腹水からの抗体精製は以下のように行った。回収した腹水に最終濃度が25mMになるようにリン酸バッファー(pH7.5)を加え、0.45μmのフィルターに通過させた。これをProtein Gカラムにアプライしてフロースルーを回収した。その後、定法によりHiTrap IgMカラム(アマシャム)あるいはSepharose HPカラム(アマシャム)でIgM画分を回収した。更にそのIgM画分をSepharose 200pgカラムで分画し、5量体のIgMを精製した。得られた2G9抗体及び5G5抗体の力価を図4に示す。

30

【0107】

《参考例2：抗PSKマウスモノクローナル抗体の特異性評価》

抗PSKマウスモノクローナル抗体(2G9mAb、5G5mAb)のPSKに対する特異性評価は、以下の競合ELISA法で行った。炭酸緩衝液に溶解したPSKを1μg/g/ウェルで96ウェルプレートに固相化した。1μg/mLの抗PSK抗体と10μg/mLの各種グルカン類(PSK、cellulose、laminarin、glycogen、dextran)とを混和後、96ウェルプレートに添加して室温で1時間インキュベートした。検出は、HRP標識抗マウスIgMで行った。

40

なお、PSKはβ1,3グルカン、β1,4グルカン、及びβ1,6グルカンを有しており、celluloseはβ1,4グルカンを有しており、laminarinはβ1,3グルカン及びβ1,6グルカンを有しており、glycogenはβ1,4グルカンを有しており、dextranはβ1,6グルカンを有している。

【0108】

その結果、図5に示すように、2G9mAbと5G5mAbはPSKを特異的に認識し

50

、他の類似構造を持つグルカン類には結合しないことが分かった。

【 0 1 0 9 】

《参考例 3：2 G 9 抗体及び 5 G 5 抗体の可変領域の配列決定》

2 G 9 抗体又は 5 G 5 抗体を産生するハイブリドーマから、定法により t o t a l R N A を抽出し、オリゴ d T プライマーを用いて逆転写反を行い、c D N A を作製した。得られた c D N A から、可変領域遺伝子を増幅するために m o u s e I g p r i m e r s e t (N o v a g e n 社) を用いて、添付のプロトコールに従い P C R を行った。得られた抗体可変領域遺伝子は p C R 2 . 1 ベクターに T A クローニングしてシーケンスの決定を行った。2 G 9 抗体の重鎖可変領域ドメイン、及び軽鎖可変領域ドメインのヌクレオチドの塩基配列、及び 5 G 5 抗体の重鎖可変領域ドメイン、及び軽鎖可変領域ドメインのヌクレオチドの塩基配列を、それぞれ図 7 ~ 図 1 0 に示す。また、それぞれの抗体の H - F R 1、H - C D R 1、H - F R 2、H - C D R 2、H - F R 3、H - C D R 3、及び H - F R 4、並びに L - F R 1、L - C D R 1、L - F R 2、L - C D R 2、L - F R 3、L - C D R 3、及び L - F R 4 のアミノ酸配列を以下に示す。

10

【 0 1 1 0 】

2 G 9 抗体の重鎖可変領域ドメインのアミノ酸配列

H - F R 1 : GVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFS (配列番号 4)
H - C D R 1 : SYGMS (配列番号 6)
H - F R 2 : WVRQTPDKRLEWVA (配列番号 8)
H - C D R 2 : TISSGGSYTYYPDSVKG (配列番号 1 0)
H - F R 3 : RFTISRDNAKNTLYLQMSSSLKSEDTAMYYCAR (配列番号 1 2)
H - C D R 3 : RITTVVARSFYFDY (配列番号 1 4)
H - F R 4 : WGQG (配列番号 1 6)

20

【 0 1 1 1 】

2 G 9 抗体の軽鎖可変領域ドメインのアミノ酸配列

L - F R 1 : GSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISY (配列番号 2 0)
L - C D R 1 : RASKSVSTSGYSYMH (配列番号 2 2)
L - F R 2 : WNQQKPGQPRLLIY (配列番号 2 4)
L - C D R 2 : LVSNNLES (配列番号 2 6)
L - F R 3 : GVPARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYYC (配列番号 2 8)
L - C D R 3 : QHIRELTRS (配列番号 3 0)
L - F R 4 : EGGP (配列番号 3 2)

30

【 0 1 1 2 】

5 G 5 抗体の重鎖可変領域ドメインのアミノ酸配列

H - F R 1 : GVHSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT (配列番号 3 6)
H - C D R 1 : GYTMN (配列番号 3 8)
H - F R 2 : WKQSHGKNLEWIG (配列番号 4 0)
H - C D R 2 : LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号 4 2)
H - F R 3 : KATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR (配列番号 4 4)
H - C D R 3 : GGKFATGTSY (配列番号 4 6)
H - F R 4 : WGQG (配列番号 4 8)

40

【 0 1 1 3 】

5 G 5 抗体の軽鎖可変領域ドメインのアミノ酸配列

L - F R 1 : GAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTC (配列番号 5 2)
L - C D R 1 : RSSTGAVTTSNYAN (配列番号 5 4)
L - F R 2 : WQEKPDHLFTGLIG (配列番号 5 6)
L - C D R 2 : GTNNRAP (配列番号 5 8)
L - F R 3 : GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC (配列番号 6 0)
L - C D R 3 : ALWYSNHWV (配列番号 6 2)
L - F R 4 : FGCG (配列番号 6 4)

50

【 0 1 1 4 】

《実施例 3：サンドイッチ E L I S A 系の構築》

P S K の検出系はサンドイッチ E L I S A 法で行った。炭酸緩衝液に溶解した抗 P S K モノクローナル抗体（2 G 9 抗体及び 5 G 5 抗体）を 5 0 0 n g / ウェルで 9 6 ウェルプレートにコートした。1 % B S A 含有 P B S でブロッキング後、6 2 . 5 - 5 0 0 n g / m L の P S K 溶液を添加して、1 時間、室温でインキュベートした。T B S - T でプレートを洗浄後、H R P 標識抗 P S K F a b ' 抗体を添加して、更に 3 0 分間、室温でインキュベートした。T B S - T でプレートを洗浄後、A B T S 基質溶液を加えて 5 - 1 5 分間発色させた後、プレートリーダーを用いて 4 0 5 - 6 3 0 n m の吸光度を測定した。その結果、図 6 に示すように構築した E L I S A 系は、感度良く、更に高い特異性をもって P S K を検出することができた。

10

【 0 1 1 5 】

《実施例 4：サンドイッチ E L I S A による P S K のマウス血中濃度の測定》

B a l b / c マウス（雌、6 週齢）に P S K （5 0 m g / k g ）を単回、腹腔内投与した後、8 時間後に採血を行い、上記サンドイッチ E L I S A 法で血中濃度を測定した。その結果、血中に取り込まれた P S K を検出することが可能であった（表 2 ）。

【 0 1 1 6 】

【表 2】

P S K 投与後のマウス血中濃度

20

(μ g / m L)		
マウス	No. 1	2.6
	No. 2	3.2
	No. 3	2.5

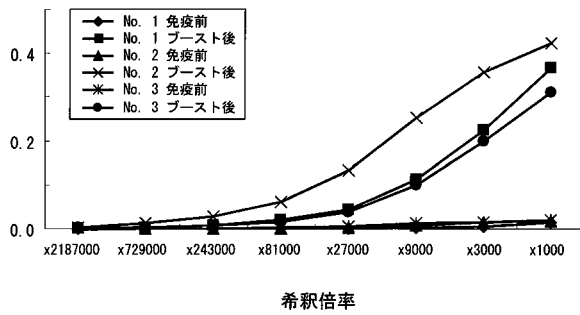
【産業上の利用可能性】

【 0 1 1 7 】

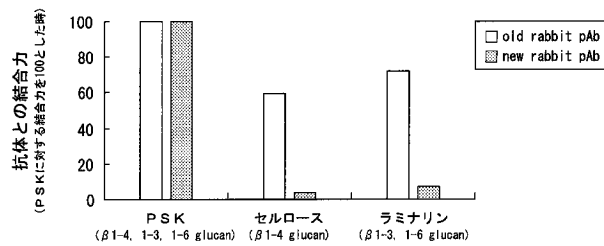
本発明の P S K の免疫学的分析方法は、医薬の品質管理に用いることができる。また、本発明の P S K の免疫学的分析方法は、P S K の体内動態の検査に用いることができる。

30

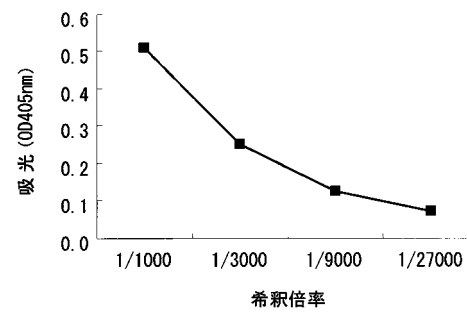
【図 1】



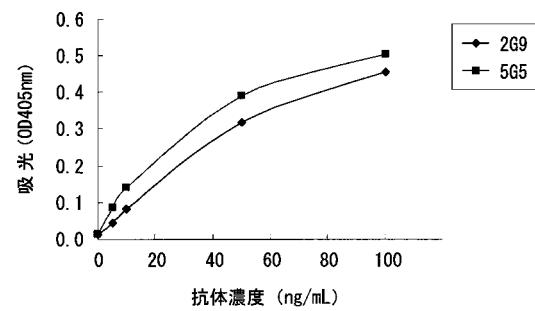
【図 2】



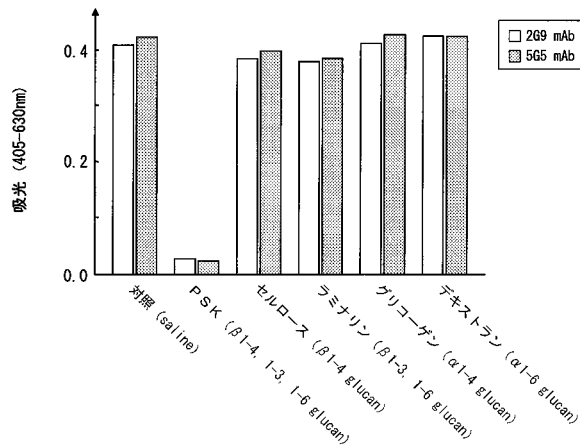
【図 3】



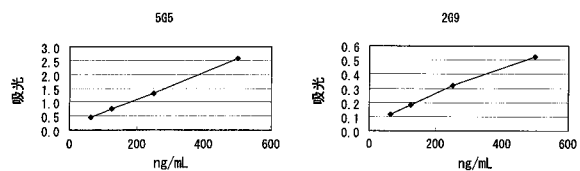
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

2G9 VH	
ggt gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tot ggg gga gac tta gtg	48
Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val	
1 5 10 15	
aag cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act	96
Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr	
20 25 30	
ttc agt agc tat ggc atg tot tgg gtt cgc cag act oca gac aag agg	144
Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg	
35 40 45	
ctg gag tgg gtc gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat	192
Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr	
50 55 60	
cca gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag	240
Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys	
65 70 75 80	
aac acc ctg tac ctg caa atg ago agt ctg aag tot gag gac aca gcc	288
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala	
85 90 95	
atg tat tac tgt gca aga cgg att act acg gta gta gcc cgg tgg ttc	336
Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ile Thr Thr Val Val Ala Arg Ser Phe	
100 105 110	
tac ttt gac tac tgg ggc caa ggc a	361
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
115 120	

【 図 8 】

2G9 VL	
ggg tcc act ggt gac att gtg ctg aca cag tot oot gct tcc tta gct	48
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala	
1 5 10 15	
gta tot ctg ggg cag agg gcc acc atc tca tac agg gcc agc aaa agt	96
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser	
20 25 30	
gtc agt aca tct ggc tat agt tat atg cac tgg aac caa cag aaa cca	144
Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro	
35 40 45	
gga cag cca ccc aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa tot	192
Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser	
50 55 60	
ggg gtc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc	240
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75 80	
ctc aac atc cat cct gtg gag gag gat gct gca acc tat tac tgt	288
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
cag cac att agg gag ctt aca cgt tgg gag ggg gga cca	327
Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro	
100 105	

【 図 9 】

5G5 VH	
ggg gtc cac tot gag gtc cag ctg caa cag tot gga oot gag ctg ggt	48
Gly Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val	
1 5 10 15	
aag oot gga gct tca atg aag ata tcc tgc aag gct tot ggt tac tca	96
Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser	
20 25 30	
ttc act ggc tac acc atg aac tgg gtg aag cag agc cat gga aag aac	144
Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn	
35 40 45	
ctt gag tgg att gga ctt att aat oot tac aat ggt ggt act agc tac	192
Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr	
50 55 60	
aac cag aag ttc aag ggc aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc	240
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser	
65 70 75 80	
agc aca gcc tac atg gag ctc ctc agt ctg aca tot gag gac tot gca	288
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala	
85 90 95	
gtc tat tac tgt gca aga gga ggg aaa ttt got acg ggg acc tot tac	336
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Lys Phe Ala Thr Gly Thr Ser Tyr	
100 105 110	
tgg ggc caa ggg	348
Trp Gly Gln Gly	
115	

【 図 10 】

5G5 VL	
ggg gcc att tcc cag gct gtt gtg act cag gaa tot gca ctc acc aca	48
Gly Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr	
1 5 10 15	
tca cct ggt gaa aca gtc aca ctc act tgt cgc tca agt act ggg gct	96
Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala	
20 25 30	
gtt aca act agt aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat	144
Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His	
35 40 45	
tta ttc act ggt cta ata ggt ggt acc aac aac cga gct cca ggt gtt	192
Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val	
50 55 60	
cct gcc aga ttc tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc	240
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
atc aca ggg gca cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt got cta	288
Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu	
85 90 95	
tgg tac agc aac cat tgg gtg ttc ggt gga gga	321
Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly	
100 105	

【配列表】

2014055773000001.app

专利名称(译)	抗-psk多克隆抗体，使用其的psk免疫分析方法和psk免疫分析试剂盒		
公开(公告)号	JP2014055773A	公开(公告)日	2014-03-27
申请号	JP2010273238	申请日	2010-12-08
申请(专利权)人(译)	株式会社吴羽		
[标]发明人	星裕孝 齋藤光 和田勉		
发明人	星 裕孝 齋藤 光 和田 勉		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/573 C07K16/14 C07K2317/565 C12Q1/485		
FI分类号	G01N33/53.V		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

问题是提供与PSK特异性反应的多克隆抗体和PSK免疫分析方法，利用该方法可以特异性地检测PSK。该问题可以通过提供：PSK免疫学分析方法来解决，其特征在于使用与PSK或其抗原结合片段特异性结合的抗PSK多克隆抗体；和抗PSK多克隆抗体，其特异性结合PSK或其抗原结合片段。

