

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

**特開2003 - 277398**

(P2003 - 277398A)

(43)公開日 平成15年10月2日(2003.10.2)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 16/46		C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 4
19/00		19/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 11数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 83212(P2002 - 83212)

(22)出願日 平成14年3月25日(2002.3.25)

(71)出願人 000226862

日水製薬株式会社

東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号

(72)発明者 赤羽 修一

茨城県結城市北南茂呂1075 - 2 日水製薬株式会社研究本部内

(72)発明者 浜野 明栄

茨城県結城市北南茂呂1075 - 2 日水製薬株式会社研究本部内

(74)代理人 100099139

弁理士 光来出 良彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トランスフェリンを含む免疫複合体に対する抗体、抗体の製造方法、ハイブリドーマ及び免疫測定方法

(57)【要約】

【課題】 アルコール中毒患者、肝疾患患者を同定することができる抗体、該抗体の製造方法、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いた簡便な免疫測定方法を提供する。

【解決手段】 提供する抗体は、免疫複合体に選択的に反応する抗体であって、該免疫複合体はトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体であり、該免疫複合体の体液中の量は、アルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定されることを特徴とする抗体である。トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に対する抗体を用いて、体液中の免疫複合体を測定するため、アルコール中毒患者或いは肝疾患患者を簡単な手法で、精度よく同定することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 免疫複合体に選択的に反応する抗体であって、

(2) 該免疫複合体はトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体であり、

(3) 該免疫複合体の体液中の量は、アルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定されることを特徴とする抗体。

【請求項2】 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項1記載の抗体。

【請求項3】 前記抗体がポリクローナル抗体である請求項1記載の抗体。

【請求項4】 前記免疫複合体を免疫原として動物に免疫することにより得られた請求項1乃至3の何れか1項記載の抗体。

【請求項5】 (1) トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体であって、該免疫複合体の体液中の量がアルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定される免疫複合体を、動物に免疫することにより動物の体内に該免疫複

体に対して選択的に反応する抗体を産生させ、  
(2) 該動物から該抗体を採取することを特徴とする抗体の製造方法。

【請求項6】 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項5記載の抗体の製造方法。

【請求項7】 前記抗体がポリクローナル抗体である請求項5記載の抗体の製造方法。

【請求項8】 請求項2記載のモノクローナル抗体を産生する能力を有するハイブリドーマ。

【請求項9】 体液に、請求項1乃至4の何れか1項記載の抗体を接触させ、該抗体に選択的に反応する免疫複合体を検出、又は定量化することを特徴とする免疫測定方法。

【請求項10】 体液に、トランスフェリン抗体と抗免疫グロブリン抗体を接触させ、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を検出、または定量化することを特徴とする免疫測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アルコール中毒患者及び/又は肝疾患患者を同定することができる抗体、該抗体の製造方法、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いた免疫測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】アルコール中毒は、アルコール中毒患者とかれらの関係者に多大の損害もたらすばかりか、アルコール中毒に関連する生産性の損失及び莫大な年間健康管理費用をもたらす。従って、アルコール中毒への早期認識と治療とが個人及び社会にとって最善且つ費用効果的である。このような状況下において、様々な集団にお

ける飲酒の併発症の危険にある個人を確認するために、高感度で特異的、しかも迅速で費用のかからない方法が必要である。重度の飲酒者を検出するために、多くの検査法がこの30年間に開発されている。

【0003】例えば、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)、平均血球容積(mean corpuscular volume)(MCV)、アスパラギン酸アミノトランスアミナーゼ(ALT)又はアラニンアミノトランスアミナーゼ(ALT)、 $\alpha$ -リボタンパク質及びフェリチンのような臨床検査項目が、アルコール乱用の生化学的マーカーとして多年にわたって用いられてきたが、これらの検査の診断的感度及び特異性は満足のいくものではなかった。また、アルコール摂取のレベル評価が、治療中におけるその効果を知る上で非常に重要でありながら、アルコール中毒患者自身からのアルコール消費量の報告は、信頼性の低いものであった。このような状況を鑑みて、長期間の過度のアルコール消費と相関性のある簡易な臨床検査法が望まれていた。

【0004】Stiblerらは、Acta Med Scan, 206, 275-281, (1979)で、トランスフェリンの高い等電点を持つイソ型(isoform)が1週間以上にわたって毎日60g以上のエタノールを摂取した者の81%で増加が認められ、10日以上にわたって禁酒する場合に高い等電点を持つイソ型が正常レベルに戻ることを報告している。

【0005】血清トランスフェリンは、79.5kDの分子量を有し、二つのN-連結の多糖鎖を有する一本のポリペプチド鎖から成る糖タンパクである。これらの多糖鎖は、分岐状であり、かつ末端シアル酸残基を有し、シアル化の異なるレベルに応じて、6つのトランスフェリンイソ型が存在する。Wongおよび Regoeczi は、Int. J. Peptide Res. 9, 241-248, (1977)において、ヒトトランスフェリンは天然では不均一であり、シアル化の異なるレベルに伴って種々のイソ型が存在すると述べている。事実、6種のこのようなイソ型、ペンタシアロ、テトラシアロ、トリシアロ、ジシアロ、モノシアロおよびアシアロトランスフェリンが存在する。

【0006】正常な健康個体においては、テトラシアロが支配するのに対して、アルコール中毒患者の血液中には、アシアロ、モノシアロ、ジシアロ、およびある程度まではトリシアロが上昇したレベルで存在することが見出されている(van Eijk et al, Clin Chim Acta 132, 167-171, (1983)、Stibler, Clin Chim, 37, 2029-2037, (1991)および Stibler et al, "Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum as a marker of high alcohol consumption", Advances in the Biosciences, (Ed Nordmann et al), Pergamon, 1988, Vol. 71, pages 353-357参照)。

【0007】アシアロ、モノシアロ、ジシアロおよびトリシアロイソ型は、糖鎖欠損トランスフェリン(略語: CDT)と呼ばれている。CDTは、アルコール消費、

特に慢性アルコール消費を検出およびモニターするための有効なマーカーであることが見出されている。CDTは、従来の試験（例えば - GTPまたはMCV）とは異なり、肝臓病を伴う患者における高アルコール摂取のスクリーニングのために使用できるので、CDTのための検査法がWO - 96 / 26444および Heil et al、Anaesthetist, 43, 447-453, (1994)等に記載されている。彼らの手法では、希釈血清サンプルをアニオン性イオン交換樹脂に通し、正常なトランスフェリンイソ型を樹脂に保持させる一方、CDT分画の通過を可能にし

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前記従来の検査手法の全ては、臨床検査の現場で普通に用いられる多くの臨床検査用自動分析装置に直接適用できず、また、その検査手法も、イオン交換樹脂或いは高速液体クロマト法を適用する等比較的複雑な手順に基づくもの

【0009】

一方、Makhloufらは、CDTのみを直接測定するために、CDTに対するモノクローナル抗体の作製を試みた。CDTを特異的に認識するモノクローナル抗体を取得する目的で、糖鎖の結合している413番目と611番目のアスパラギンを中心として前後6個のアミノ酸の合成ペプチドを免疫原として抗体を作製し、その抗体をCDT測定のための免疫測定法に応用することを考えた(WO93/06133)。これに対して、E R. Trimbleらは(Biochem Soc Trans, 26(1), S48(1998)

【0010】

本発明者らは係る状況を鑑みて、まったく新たな発想の下に、アルコール中毒患者或いは肝疾患患者を同定するための抗体、該抗体の製造方法、ハイブリドーマ及び該抗体を用いた簡便な免疫測定法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】アルコール性肝疾患患者或いはアルコール中毒者に、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体が多いことを本発明者らは初めて見いだした。このような報告は従来見当たらない。本発明者らはこの点に着目し、本発明を完成した。本発明者らは、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体量を測定することでアルコール中毒患者を同定できないかと考え、固相化抗トランスフェリン抗体と、酵素標識化抗免疫グロブリンG ( Ig G ) 抗体に

よるサンドイッチイムノアッセイで免疫複合体量を測定した。その結果は、正しく期待した通り、アルコール性疾患患者から健康固体とは有意な差異を持って多くの量のトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体が測定されたのみならず、肝炎ウイルス、例えば、B型、C型などによる肝疾患患者にも、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体が健康固体とは有意な差異を持って多くの量測定されることを本発明者らは確認した。

【0012】即ち、本発明の抗体は、(1)免疫複合体に選択的に反応する抗体であって、(2)該免疫複合体はトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体であり、(3)該免疫複合体の体液中の量は、アルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定されることを特徴とする抗体である。本明細書で、「有意な差異」とは、危険率(P)が0.05(5%)以下、好ましくは、0.01(1%)以下の確率で差異があることを示す。

【0013】トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体は、前記アルコール中毒患者のみならず、アルコール性肝疾患患者、肝炎ウイルス等による肝疾患患者等の体液中に健康固体とは有意な差異を持って多く産生される。本発明の抗体は、アルコール性肝疾患患者、肝炎ウイルス等による肝疾患患者等の体液中に産生されるトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に対しても選択的に反応する抗体である。したがって、本発明の抗体を用いて該免疫複合体を測定すれば、アルコール性疾患患者、アルコール中毒者、肝炎ウイルス等による肝疾患患者の同定が可能である。

【0014】本発明の抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよい。

【0015】本発明の抗体産生方法は、(1)トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体であって、該免疫複合体の体液中の量がアルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定される免疫複合体を、動物に免疫することにより動物の体内に該免疫複合体に対して選択的に反応する抗体を産生させ、(2)該動物から該抗体を採取することを特徴とする。

【0016】本発明のハイブリドーマは、前記した特徴を有する抗体がモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体を産生する能力を有するハイブリドーマである。

【0017】本発明の1番目の免疫測定方法は、前記した本発明の抗体を、体液に接触させ、該抗体に選択的に反応する免疫複合体を検出または、定量化することを特徴とする。即ち、前記した本発明の免疫測定方法に用いられる抗体には次の1) - 4)の態様が挙げられる。

1)免疫複合体に選択的に反応する抗体であって、該免疫複合体はトランスフェリンと免疫グロブリンから成る

免疫複合体であり、該免疫複合体の体液中の量は、アルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定されることを特徴とする抗体。

2) 前記1)の抗体がモノクローナル抗体である抗体；  
3) 前記1)の抗体がポリクローナル抗体である抗体；  
4) トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を免疫原として動物に免疫することにより得られた抗体。

【0018】前記1番目の免疫測定方法において、免疫複合体に対する抗体は、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体のみに反応することから、該免疫複合体を高精度に測定することができる。

【0019】本発明の2番目の免疫測定方法は、体液に、抗トランスフェリン抗体と抗免疫グロブリン抗体を接触させ、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を検出、または定量化することを特徴とする。

【0020】また、前記2番目の免疫測定方法においては、固相担体を用いる免疫測定方法を使用し、且つ固相化させる抗体としてトランスフェリン抗体を選択できるが、この場合には、トランスフェリンと免疫グロブリンとの複合体だけではなく、トランスフェリンも固相化抗体に捕捉されてしまうため、前記1番目の免疫測定方法に比べ、測定感度が低下する場合がある。

【0021】本発明の免疫測定方法は、アルコール中毒者及び/又はアルコール性肝疾患患者の同定を可能にし、アルコール消費の監視を可能にする。本発明の免疫測定方法は、アルコール中毒者及び/又はアルコール性肝疾患患者の同定或いはアルコール消費の監視に関して、従来技術の測定法より迅速かつ操作が簡易な免疫測定法である。また、本発明の免疫測定方法は、肝炎ウイルス等による肝疾患患者等の体液中に産生されるトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に対しても測定が可能である。

【0022】本発明において、免疫複合体を構成するトランスフェリンには、肝疾患患者及び/又はアルコール中毒者に産生される種々のトランスフェリンが含まれる。

【0023】

【発明の実施の形態】免疫測定方法

本発明の1番目及び2番目の免疫測定方法に適用可能な方法には、不均一系測定方法としては、放射性同位体元素標識免疫測定法、酵素標識免疫測定法、蛍光標識免疫測定法、免疫比濁法、ラテックススライド凝集法、ラテックス免疫比濁法、サンドイッチ法等が挙げられる。均一系としては蛍光消光法、蛍光増強法、エネルギートランスファー法、凝集法、比濁法等が挙げられる。本発明の免疫測定方法は如何なる反応形式で行われてもよく、均一系でも不均一系でも何れであってもよい。これらの免疫測定法は用手法あるいは自動化されてもよい。

【0024】前記免疫比濁法、ラテックススライド凝集法、ラテックス免疫比濁法に用いられる試薬において、体液中のトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の検出または定量化を可能にするために、抗原抗体反応に依存して形成される凝集に基づく濁度を肉眼あるいは、例えば免疫比濁法の場合340nm、ラテックス免疫比濁法では540nm付近の波長を利用して分光学的に測定されるものが望ましい。

【0025】標識物質

前記免疫測定方法において、放射性同位体元素標識免疫測定法、酵素標識免疫測定法、蛍光標識免疫測定法に用いられる試薬の一つは、体液中のトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の検出または定量化を可能にするために、標識される必要があるが、それらの標識物質については公知のものを使用してもよく、例えば、以下のものが挙げられる。

【0026】1) 酵素：アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等

2) 蛍光体：フルオレセインイソシアネート、ローダミン、テキサスレッド等 3) 放射性同位体元素： $I^{125}$ 、 $I^{131}$ 等

4) 生物発光体：ルシフェリン、エクオリン等

5) 化学発光体：イソルミノール、アクリジニウムエステル、オキサレートエステル等

所望の試薬へのこれらの標識体の結合は、公知の技術を用いて行うことができる。

【0027】固相担体

抗体の固相化に用いる担体の材質及び形状は、測定用途によって公知のものから選択できる。例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリルアミド、ガラス、アガロース、ニトロセルロース等が挙げられる。形状としては、マイクロタイタープレート、バイアル、ラテックスビーズ、ディップストリップ等が挙げられる。

【0028】体液

本発明の免疫測定方法の対象となる体液は、血清、血漿、唾液またはその他の体液であってもよいが、血清であることが好ましい。

【0029】1番目の免疫測定方法

1) 免疫原及び抗体の取得

アルコール性肝疾患患者及び/又はアルコール中毒者の体液から精製あるいは部分的に精製された少なくとも一種のイソ型トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を免疫原として用い、動物に免疫して、該動物からトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に選択的に反応する抗体を取得することができる。

【0030】例えば、免疫原はすべてのトランスフェリン

ンイソ型と反応する抗トランスフェリン抗体を使用するアフィニティークロマトグラフィーにより、アルコール性肝疾患患者及び/又はアルコール中毒者の血清から精製又は部分的に精製されたものでもよく、更に好ましくは、ゲルクロマトグラフィーにより、トランスフェリン単独分画より分子量の大きい分画、即ちトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体分画を免疫原としてもよい。

【0031】2) ポリクローナル抗体、ハイブリドーマ、及びモノクローナル抗体

ポリクローナル抗体は上記免疫原を動物に免疫し、該動物から採取される。動物を免疫する方法は公知の手法が適用でき、それに必要な免疫プロトコールは当業者にとって容易に決定し得る。例えば、本発明の抗体は、アジュバントと混合した免疫原を適当な宿主動物(ウサギ、ヤギ、ウマまたはその他の哺乳類)に注射することにより、作製し得る。免疫原の注射は、適当な力価の抗血清が得られるまで続けられる。抗血清は回収後、必要に応じてアフィニティークロマトやイオン交換クロマト法等の既知技術を用いて更に精製されることが好ましい。

【0032】また、本発明の抗体は、免疫された動物(例えば、ラット、ハムスター、マウスまたはその他の哺乳類)から得た細胞と不死化細胞とを融合することによって得られる融合細胞(ハイブリドーマ)から得ることができる。例えばマウスを使用することが可能である。この場合、免疫原を既知技術により免疫した後、免疫したマウスから回収した脾臓細胞とマウスミエローム細胞を用いてケーラーとミルシュタインの方法(ネイチャー256巻495頁1975年)により目的のハイブリドーマを得ることが可能である。目的とする抗体を産生するハイブリドーマの選択は、免疫原として用いたトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体、トランスフェリン、免疫グロブリンをそれぞれ固相化した酵素免疫測定法でなされ、トランスフェリンと免疫グロブリンには反応せず、免疫複合体のみに強く反応するものを選択する。最終的には限界希釈法にてクローニングを施し、目的とするハイブリドーマを得る。モノクローナル抗体は、得られたハイブリドーマから既知技術である培養系またはマウス腹腔内で作製し、前記ポリクローナル抗体の場合と同様に、アフィニティークロマト

【0033】本発明の免疫測定法に用いるのに適した抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよく、抗血清またはその精製分画、あるいは既知のイソタイプまたはサブクラスでもよい。更には、必要に応じて抗原と結合できる抗体フラグメントであってもよい。即ち、抗体に関する唯一の条件は、それが少なくともアルコール中毒患者に多く、非アルコール中毒患者に少ないことが有意な差異で測定される免疫複合体、

即ち、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に対して選択的に反応し得ることである。

【0034】3) 免疫複合体の検出方法

好ましい検出方法としては、サンドイッチ法が推奨される。この測定法において、例えば、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体と選択的に反応する抗体が固相化される。体液を該固相化抗体と反応せしめることにより、体液中に含まれる免疫複合体が固相化抗体に結合する。次いで未反応物を洗浄後、標識抗体が添加され、これが固定化抗体に既に結合した免疫複合体に結合する。この標識抗体は、抗トランスフェリン抗体のように全ての免疫複合体と反応する抗体であることが好ましい。結合した標識成分の量は体液中のトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体量に比例する。

【0035】本発明の免疫測定方法において、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に選択的に反応するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を捕捉抗体、即ち、固相に固定化するための固相化抗体として用いことが望ましい。

【0036】2番目の免疫測定方法

具体的には、固相化抗トランスフェリン抗体と、酵素標識化抗免疫グロブリンG(IgG)抗体、A(IgA)抗体またはM(IgM)抗体の組み合わせによるサンドイッチ免疫測定法;或いは、固相化抗免疫グロブリンG(IgG)抗体、A(IgA)抗体又はM(IgM)抗体と、酵素標識化抗トランスフェリン抗体の組み合わせによるサンドイッチ免疫測定法により、体液中に含まれるトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を検出、または定量化することが可能である。

【0037】本発明の2番目の免疫測定方法は、トランスフェリン或いは免疫グロブリンも固相化抗体に捕捉されてしまうために前記1番目の免疫測定方法に比べて、測定精度はやや落ちる。

【0038】

【実施例】以下に、本発明を実施例及び添付した図を参照して詳述する。

【0039】〔実施例1〕

健常者とアルコール性肝疾患患者の血清中におけるトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体量の比較

健常者96検体及びアルコール性肝疾患患者92検体のパネル血清中に存在する免疫複合体量を2種類の抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法(ELISA)により測定した。すなわち、96ウェルのマイクロプレートに10mMリン酸緩衝液pH7.2(略語:PBS)で10µg/mlに調製した抗ヒトトランスフェリンポリクローナル抗体を1ウェル当たりそれぞれ100µl加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄

し、0.5%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS(B-PBS)でブロッキングを行い、スクリーニング用のプレートとした。各血清をPBSで50倍に希釈した溶液100 $\mu$ lをウェルに加え、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体(シグマ社製)溶液100 $\mu$ lを加えて室温で1時間反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度(OD)を測定することにより、免疫複合体を検出した。

【0040】その結果を図1のグラフに示す。図1に示すように、アルコール性肝疾患患者においてトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の量が有意に多いことが明らかとなった。

#### 【0041】〔実施例2〕

##### 免疫原の調製

アルコール依存症患者由来のプール血清20mlを、抗トランスフェリンポリクローナル抗体を結合させた10mlのSephrose4B(ファルマシア社製)カラムに通し、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を含むと推定される血清中の全トランスフェリン分画を捕獲した。カラム体積の10倍量のPBSでカラムを洗浄後、酸(0.1Mグリシン-塩酸緩衝液pH2.3)で溶出した。PBSで一晩透析し、酸で分離した免疫複合体を再構築させ、さらに分子量の差を利用したゲルろ過カラム(ULTROGEL AcA34:商品名、BIOS EPR社製)クロマトグラフィーにより、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の分画と、トランスフェリンの分画を分離精製した。回収したトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の分画は限外ろ過により濃縮して免疫原とした。

【0042】図2に、血清中の全トランスフェリン分画をゲルろ過カラムにかけたときの溶出プロファイル(実線OD280nm)、及びトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の溶出分画(破線OD490nm)を示す。免疫複合体の検出は、固相化抗体に抗ヒトトランスフェリンポリクローナル抗体、標識抗体に抗ヒト免疫グロブリンG抗体を用いたサンドイッチELISAで行っているため、該免疫複合体の溶出分画は確かにトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体である。図2は、免疫複合体の分画が主要なトランスフェリンのピークよりも高分子領域に検出されることを示す。この結果は、該分画がトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体であることを示す。

【0043】図2における矢印で示す範囲は以下の実施例において使用した精製された抗原(トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体)の分画範囲を示す。

#### 【0044】〔実施例3〕

##### ハイブリドーマの調製

前記実施例2で得られた精製された抗原を用いて、抗原溶液(0.5mg/ml)を調製した。該抗原溶液500 $\mu$ lにフロインドの完全アジュバンド500 $\mu$ lを混和して乳化させ、5週令のBALB/cマウスの皮下に免疫した。追加免疫としてフロインドの完全アジュバンドをフロインドの不完全アジュバンドに変えたもので同様に調製したものを2週おきに3回繰り返した。その間免疫時に採血をして抗原に対する血中の抗体活性を測定した。最終免疫から14日後に500 $\mu$ lの抗原溶液を腹腔内に投与し、3日後、脾臓を摘出した。脾細胞はマウスミエローマ細胞(P3-NS1-Ag4-1(NS-1))とポリエチレングリコール4000(メルク社製)の存在下で2分間反応させることにより融合させた。融合後選択培地に懸濁して96ウェルの培養プレートに分注し、37 $^{\circ}$ CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。その後1週間に1度培養液の半量を交換することにより、ハイブリドーマを調製した。

#### 【0045】〔実施例4〕

免疫原に対する抗体産生ハイブリドーマの選抜(1次スクリーニング)

抗体産生ハイブリドーマの確認は、免疫原に用いた免疫複合体を固相化したELISAにより行った。すなわち96ウェルのマイクロプレートにPBSで10 $\mu$ g/mlに調製した抗原を1ウェル当たりそれぞれ100 $\mu$ lに加え、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、B-PBSでブロッキングを行いスクリーニング用のプレートとした。増殖の認められたウェルの培養上清をPBSで10倍に希釈した溶液100 $\mu$ lをウェルに加え、室温で1時間反応させた。引き続きPBSで洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリン(BIOSOURCE INTERNATIONAL)溶液100 $\mu$ lを加え、室温で1時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmのODを測定し、該免疫複合体に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選抜した。

#### 【0046】〔実施例5〕

トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に選択的に反応する抗体の選抜(2次スクリーニング)免疫原に対する抗体活性を持つモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、モノクローナル抗体の大量産生のためマウス腹腔内にて増殖させた。こうして得られたマウス腹水中のモノクローナル抗体は、プロテインAアガロース(Bio-Rad社製)を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。トランスフェリン及び免疫グロブリンに反応せず、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に選択的に反応する抗体の選抜は、ELISAにより行った。即ち96ウェルのマイクロプレートにPBSで10 $\mu$ g/mlに調製したトラン

スフェリン、免疫グロブリン、またはトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体溶液を1ウェル当たりそれぞれ100 $\mu$ l加え、4で一昼夜反応させた。その後、PBSで1回洗浄し、B-PBSでブロッキングを施したものをスクリーニング用プレートとした。これらのウェルに10 $\mu$ g/mlに調製したモノクローナル抗体溶液を100 $\mu$ l加え、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体溶液100 $\mu$ lを加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄後、アルカリホスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmのODを測定した。その結果を縦軸にODを採ったグラフとして図3に示す。

【0047】トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に対して高い反応を示したモノクローナル抗体産生株(CT861)をトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体に対する特異抗体(CT861抗体)産生ハイブリドーマとして選抜した。該モノクローナル抗体産生株(CT861)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FERM P-18762として寄託されている。

【0048】〔実施例6〕  
CT861抗体が血清中のトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を認識していることの確認  
前記実施例5で選抜したモノクローナル抗体産生株(CT861)の産生するCT861抗体が血中のトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体を認識していることを確かめるため、アルコール性肝疾患患者由来のプール血清をゲルろ過カラム(ULTROGEL AcA34 : 商品名: BIOSEPRAS社製)クロマトグラフィーにより分画し、CT861抗体を固相化したサンドイッチELISAで測定を行った。すなわち96ウェルのマイクロプレートにPBSで10 $\mu$ g/mlに調製したCT861抗体を1ウェル当たりそれぞれ100 $\mu$ l加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、B-PBSでブロッキングを行い測定用のプレートとした。これらのウェルに各分画を100 $\mu$ l加え、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトトランスフェリン抗体溶液100 $\mu$ lを加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄した後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmのODを測定した。その結果を縦軸にODを採ったグラフとして図4に示す。

【0049】図4は、血清をゲルろ過カラムにかけたときの溶出プロファイル(実線OD280nm)及びCT861の反応する分画(破線OD490nm)を示した図である。白抜き矢印はトランスフェリンの分子量域を、黒色矢印は免疫グロブリンの分子量域を、灰色矢印

はトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の分子量域を示している。図4に示すようにCT861抗体はトランスフェリン及び免疫グロブリンの分子量域には反応せず、トランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫複合体の分子量域にのみ反応することが示された。CT861抗体は免疫複合体にのみ反応し、トランスフェリン及び免疫グロブリンには反応しないことが確認できる。

【0050】〔実施例7〕

CT861抗体を用いた肝疾患患者の同定のための臨床試験

肝疾患患者の同定の根拠となる免疫複合体を検出するために、各種の肝疾患患者(アルコール性肝疾患患者50検体、B型肝炎ウイルス患者20検体、及びC型肝炎ウイルス患者20検体)の各パネル血清92検体及び健常者血清96検体を用いてCT861抗体を固相化したサンドイッチELISAで次のように測定を行った。

【0051】すなわち96ウェルのマイクロプレートにPBSで10 $\mu$ g/mlに調製したCT861抗体を1ウェル当たりそれぞれ100 $\mu$ l加え、4で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、B-PBSでブロッキングを行い測定用のプレートとした。これらのウェルにPBSで20倍希釈した血清を100 $\mu$ l加え、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトトランスフェリン抗体溶液100 $\mu$ lを加え、室温で1時間反応させた。引き続き洗浄した後、アルカリホスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmのODを測定した。

【0052】これらの測定値を用いて解析を行った結果を図5に示す。図5-1はアルコール性肝疾患患者と健常者の比較、図5-2はB型肝炎ウイルス患者と健常者との比較、図5-3はC型肝炎ウイルス患者と健常者との比較である。図5に示すようにCT861抗体は健常者に比べ肝疾患患者血清に対して有意に高い反応性を示すことが示され、本測定系が肝疾患患者と健常者を明確に区別することが可能な測定系であることが分かる。

【0053】〔実施例8〕

抗ヒトトランスフェリン抗体と抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いた肝疾患患者の同定のための臨床試験

肝疾患患者の同定の根拠となる免疫複合体を検出するために、各種の肝疾患患者(アルコール性肝疾患患者50検体、B型肝炎ウイルス患者20検体、C型肝炎ウイルス患者20検体)の各パネル血清及び健常者血清96検体を用いて免疫複合体を検出するサンドイッチELISAで次のように測定を行った。

【0054】すなわち、96ウェルのマイクロプレートに10mMリン酸緩衝液pH7.2(PBS)で10 $\mu$ g/mlに調製した抗ヒトトランスフェリンポリクローナル抗体溶液を1ウェル当たりそれぞれ100 $\mu$ l加

え、4 で一昼夜反応させた。その後PBSで1回洗浄し、0.5%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS(B-PBS)でブロッキングを行い、スクリーニング用のプレートとした。各血清をPBSで50倍に希釈した溶液100μlをウェルに加え、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体(シグマ社製)溶液100μlを加えて室温で1時間反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法にて発色させ、マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度(OD)を測定することにより、免疫複合体を検出した。これらの測定値を用いて解析を行った結果を図6に示す。図6-1はアルコール性肝疾患患者と健常者の比較、図6-2はB型肝炎ウイルス患者と健常者との比較、図6-3はC型肝炎ウイルス患者と健常者との比較である。図6によれば、本測定系が肝疾患患者と健常者を明確に区別することが可能な測定系であることが分かる。

【0055】〔実施例9〕

CT861抗体のアルコール中毒マーカーとしての有用\*20 【表1】

	γ-GTP陽性	γ-GTP陰性
CT861抗体陽性	34	21
CT861抗体陰性	0	14

【0058】表1の中で、γ-GTPが陰性で且つCT861抗体を用いたサンドイッチELISAが陽性を示す21検体について%CDTを測定した結果を、表2に陽性及び陰性の一致率で示す。表2に示すように、前記表1におけるγ-GTP陰性で且つCT861抗体陽性\*

	%CDT陽性	%CDT陰性
CT861抗体陽性	21	0

【0060】CT861抗体を用いたサンドイッチELISAの測定値と、%CDTの測定値を、表3に陽性及び陰性の一致率で示す。表3に示すように、%CDTが陽性の37検体についてはCT861抗体を用いたサン

	%CDT陽性	%CDT陰性
CT861抗体陽性	37	18
CT861抗体陰性	0	14

【0062】表3の中で、%CDTの測定値をが陰性で且つCT861抗体を用いたサンドイッチELISAが陽性を示す18検体についてγ-GTPを測定した結果を、表4に陽性及び陰性の一致率で示す。表4に示すよ

\*性

公知のアルコール中毒のマーカーとしてのγ-GTP及び糖鎖欠損トランスフェリン(CDT)の測定値と、CT861抗体を用いたサンドイッチELISAの測定値を、アルコール中毒患者血清55検体及び健常者血清14検体を用いて次のようにして比較した。

【0056】γ-GTPの測定は、γ-GTP測定用試薬(GTP-HAテストワコ、和光純薬社製)によりプロトコールに準じて血清中のγ-GTP活性を測定することで行った。CDTの測定は、CDT測定試薬(%CDT TIA Standard Version:商品名、Bio-Rad社製)によりプロトコールに準じて血清中の全トランスフェリンに占めるCDTの割合(%CDT)を測定することで行った。表1に、CT861抗体を用いたサンドイッチELISAの測定値と、γ-GTPの測定値を陽性及び陰性の一致率で示した。表1に示すように、γ-GTPが陽性の34検体についてはCT861抗体を用いたサンドイッチELISAは必ず陽性を示すことが分かる。

【0057】

\*の21検体については、全て%CDT陽性を示すアルコール中毒患者検体であった。

【0059】

【表2】

ドイッチELISAは必ず陽性を示すことが分かる。

【0061】

【表3】

うに、CT861抗体陽性の18検体についても全て、γ-GTP陽性のアルコール中毒患者検体であることが分かる。

【0063】

【表4】

	16	
	γ-GTP陽性	γ-GTP陰性
CT861抗体陽性	18	0

【0064】このように、γ-GTPと%CDTの両方  
 或いはどちらか一方が陽性の場合、CT861抗体を用  
 いたサンドイッチELISAは陽性を示し、γ-GTP  
 と%CDTの両方が陰性の場合、CT861抗体を用  
 いたサンドイッチELISAは陰性を示す結果が得られた  
 ことから、CT861抗体がアルコール中毒患者の診断  
 に有用であることが示された。

【0065】上記69検体を用いて各測定系についてR  
 OC曲線を描いた。図7-1は、γ-GTP測定系のR  
 OC曲線を示す。図7-2は、%CDTの測定系のR  
 OC曲線を示す。図7-3は、CT861抗体を用いたサ  
 ンドイッチELISAのROC曲線を示す。γ-GTP  
 では図7-1の曲線下の面積が0.791、%CDTで  
 は図7-2の曲線下の面積が0.901であるのに対  
 し、CT861抗体を用いたサンドイッチELISAで  
 は図7-3の曲線下の面積が0.998となり、CT8  
 61抗体を用いたサンドイッチELISAはアルコール  
 中毒患者の診断に優れた測定系であることが分かる。

【0066】

【発明の効果】本発明によれば、トランスフェリンと免  
 疫グロブリンから成る免疫複合体に対する抗体を提供で  
 けるので、アルコール中毒患者或いは肝疾患患者を簡単  
 な手法で、精度よく同定することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で示したサンドイッチELISA法に  
 より、血清中に存在するトランスフェリンと免疫グロ  
 ブリンから成る免疫複合体の量を、健常者とアルコール性

肝疾患患者の間で比較した結果を示す図である。

【図2】血清中の全トランスフェリン分画をゲルろ過カ  
 ラムにかけたときの溶出プロファイル(実線OD280  
 nm)、及びトランスフェリンと免疫グロブリンから成  
 る免疫複合体の溶出分画(破線OD490nm)を示  
 す。

【図3】実施例5で示したELISA法により、CT8  
 61がトランスフェリンと免疫グロブリンから成る免疫  
 複合体に特異性が高いことを示す図である。

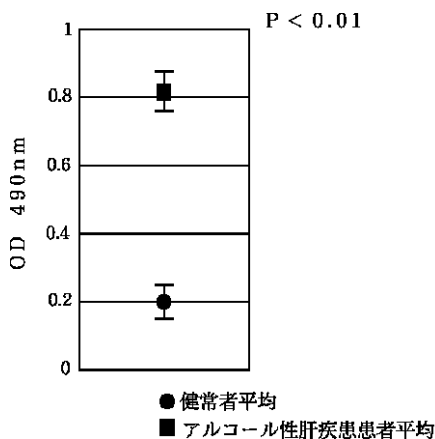
【図4】実施例6で示した血清をゲルろ過カラムにかけ  
 たときの溶出プロファイル(実線OD280nm)及び  
 CT861の反応する分画(破線OD490nm)を示  
 した図である。

【図5】実施例7で示すCT861を用いたサンドイ  
 ッチELISA法が健常者と肝疾患患者を明確に区別する  
 測定系であることを示した図である。

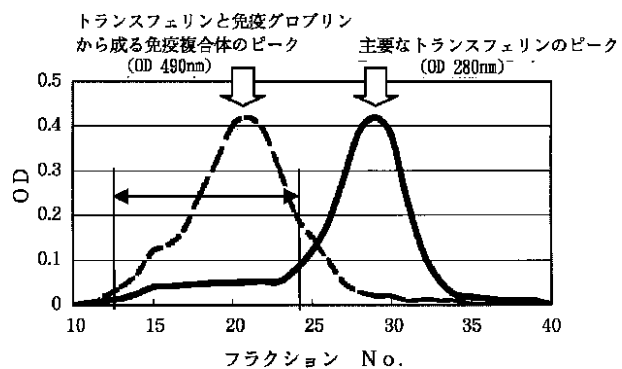
【図6】実施例8で示す抗ヒトトランスフェリン抗体を  
 固相化し標識抗体として抗ヒト免疫グロブリンG抗体を  
 用いたサンドイッチELISAが健常者と肝疾患患者を  
 明確に区別できる測定系であることを示した図である。

【図7】図7は、γ-GTP測定系(図7-1)、%C  
 D Tの測定系(図7-2)、CT861抗体を用いたサ  
 ンドイッチELISA(図7-3)の各ROC曲線を示  
 す図であり、CT861を用いたサンドイッチELIS  
 Aがアルコール中毒患者の診断に優れた測定系であ  
 ることを示す。

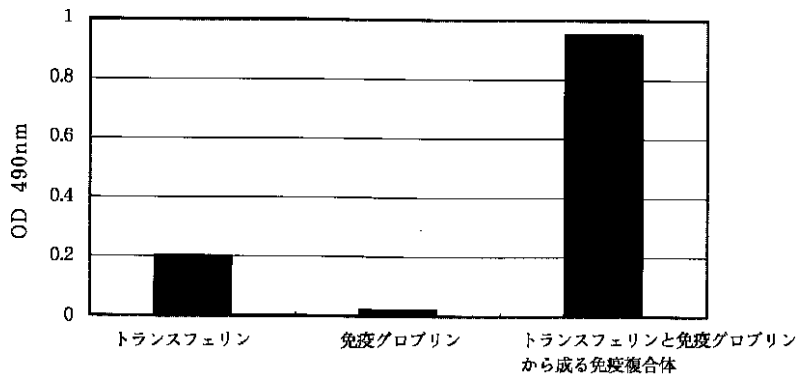
【図1】



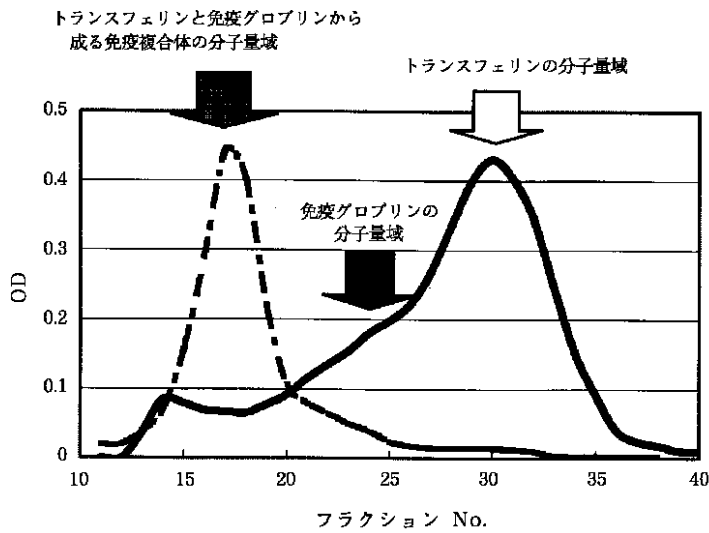
【図2】



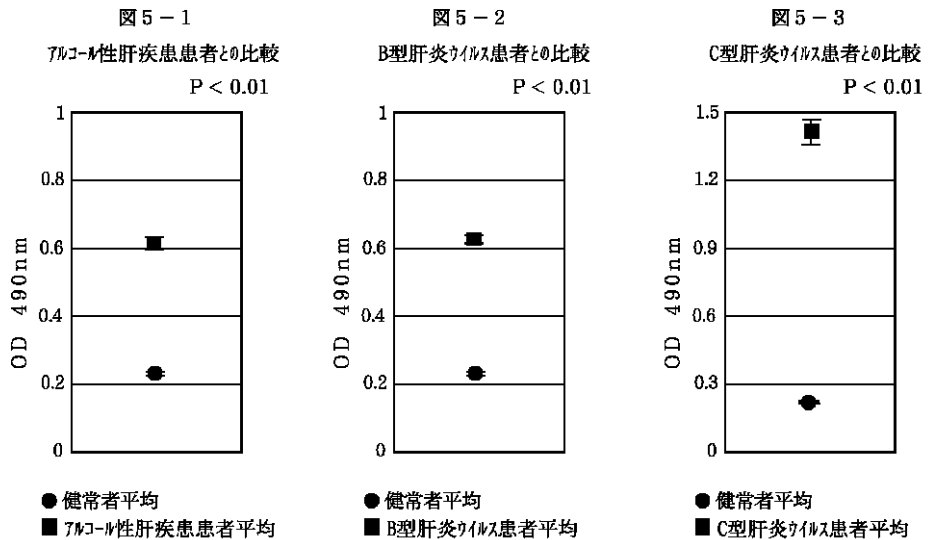
【図3】



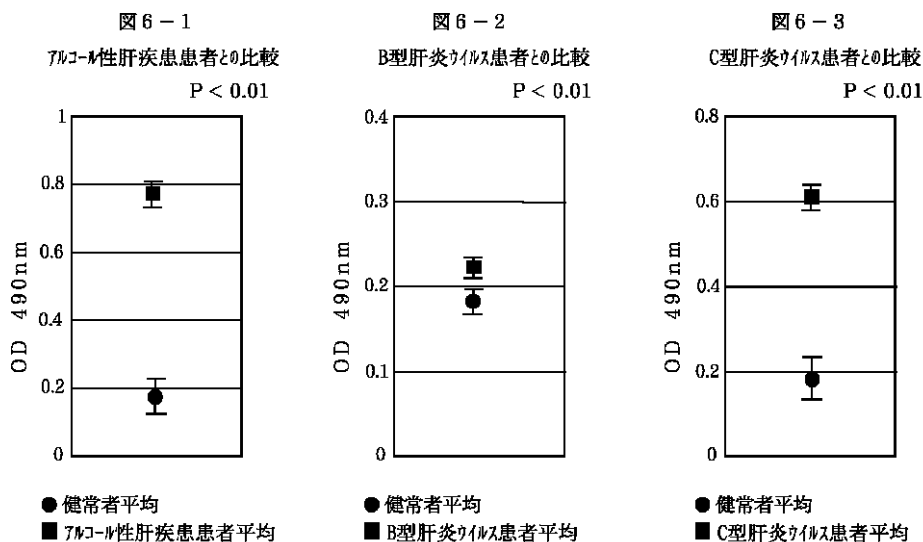
【図4】



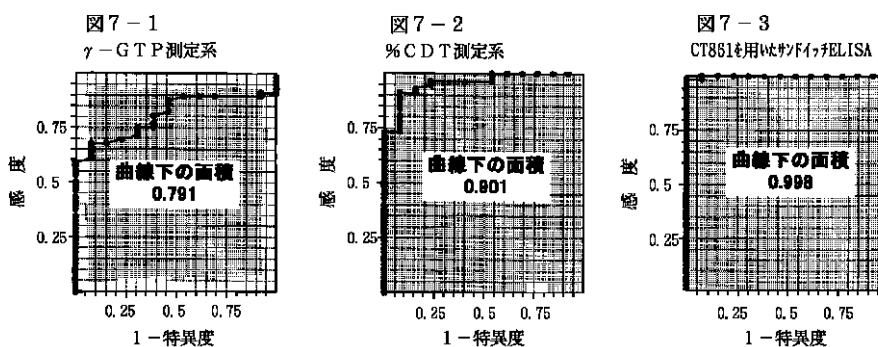
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/577		C 1 2 R 1:91	
//(C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:91)			

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24  
 DA13  
 4B065 AA92X AB05 AC14 BA08  
 CA25 CA46  
 4H045 AA11 CA42 CA43 DA75 DA76  
 EA50 FA72

专利名称(译)	抗免疫复合物的抗体包含转铁蛋白，产生抗体的方法，杂交瘤和免疫测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003277398A</a>	公开(公告)日	2003-10-02
申请号	JP2002083212	申请日	2002-03-25
申请(专利权)人(译)	日水制药有限公司		
[标]发明人	赤羽修一 浜野明栄		
发明人	赤羽 修一 浜野 明栄		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N5/10 C12N5/20 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/564 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/564 C07K16/2881 G01N2333/79		
FI分类号	C07K16/46 C07K19/00 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12R1/91 C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/CA42 4H045/CA43 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
其他公开文献	JP2003277398A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够识别酒精中毒患者和肝病患者的抗体，该抗体的制备方法，该抗体的杂交瘤以及使用该抗体的简单免疫测定方法。所提供的抗体是与免疫复合物选择性反应的抗体，其中该免疫复合物是由转铁蛋白和免疫球蛋白组成的免疫复合物，并且该免疫复合物在体液中的量为所述抗体的特征在于，通过显著差异来测量，所述酒精含量高且非酒精含量低。由于使用针对由运铁蛋白和免疫球蛋白组成的免疫复合物的抗体来测量体液中的免疫复合物，因此可以通过简单的方法来准确地识别酒精患者或肝病患者。

陰性で目づCT861抗体陽性\*

	%CDT陽性	%CDT陰性
CT861抗体陽性	21	0