

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**WO2008/075788**

発行日 平成22年4月15日(2010.4.15)

(43) 国際公開日 **平成20年6月26日(2008.6.26)**

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18 ZNA	4H045
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

出願番号	特願2008-550205 (P2008-550205)	(71) 出願人	000131474 株式会社シノテスト 東京都千代田区神田神保町一丁目56番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/075051	(72) 発明者	山田 晋吾 神奈川県相模原市大野台2丁目29番14号 株式会社シノテスト 相模原事業所内
(22) 国際出願日	平成19年12月19日(2007.12.19)	(72) 発明者	矢ヶ部 恵子 神奈川県相模原市大野台2丁目29番14号 株式会社シノテスト 相模原事業所内
(31) 優先権主張番号	特願2006-357368 (P2006-357368)	Fターム(参考)	4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA71 GA20
(32) 優先日	平成18年12月20日(2006.12.20)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトHMGB1と特異的に結合する鳥類由来の抗体、ヒトHMGB1の免疫学的測定方法及びヒトHMGB1の免疫学的測定試薬

**(57) 【要約】**

本発明の課題は、ヒト・ハイモビリティー・グループ・ボックス・プロテイン-1 (HMGB1) との結合能力が高い抗ヒトHMGB1抗体を、高い確率で提供することである。また、本発明は、このような抗ヒトHMGB1抗体を用いた試料中のヒトHMGB1の高感度な免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬を提供するものである。

具体的には、ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体並びに当該抗体を使用することを特徴とする、試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒトHMGB1の次式(I)：Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I)で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体よりなる、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

## 【請求項2】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式(I)：Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I)で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式(I)で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫して得たものである、請求の範囲第1項記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

## 【請求項3】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその生産性が高いものである、請求の範囲第1項又は請求の範囲第2項記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

## 【請求項4】

鳥類がニワトリである、請求の範囲第1項～請求の範囲第3項のいずれか1項に記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

## 【請求項5】

試料中のヒトHMGB1を当該ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体との抗原抗体反応を利用して測定を行う免疫学的測定方法において、ヒトHMGB1の次式(I)：Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I)で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体である鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体を使用することを特徴とする、試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

## 【請求項6】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式(I)：Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I)で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式(I)で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫して得たものである、請求の範囲第5項記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

## 【請求項7】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその生産性が高いものである、請求の範囲第5項又は請求の範囲第6項記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

## 【請求項8】

高感度にヒトHMGB1の測定を行うことができる高感度免疫学的測定方法であることを特徴とする、請求の範囲第5項～請求の範囲第7項のいずれか1項に記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

## 【請求項9】

鳥類がニワトリである、請求の範囲第5項～請求の範囲第8項のいずれか1項に記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

## 【請求項10】

試料中のヒトHMGB1を当該ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体との抗原抗体反応を利用して測定を行う免疫学的測定試薬において、ヒトHMGB1の次式(I)：Lys

Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys  
Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体である鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体を含むことを特徴とする、試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。

【請求項11】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫して得たものである、請求の範囲第10項記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。 10

【請求項12】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその生産性が高いものである、請求の範囲第10項又は請求の範囲第11項記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。

【請求項13】

高感度にヒトHMGB1の測定を行うことができる高感度免疫学的測定試薬であることを特徴とする、請求の範囲第10項～請求の範囲第12項のいずれか1項に記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。 20

【請求項14】

当該免疫学的測定試薬の生産性を向上させた免疫学的測定試薬であることを特徴とする、請求の範囲第10項～請求の範囲第13項のいずれか1項に記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。

【請求項15】

鳥類がニワトリである、請求の範囲第10項～請求の範囲第14項のいずれか1項に記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。

【請求項16】

ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫することを特徴とする、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。 30

【請求項17】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合することができるものである、請求の範囲第16項記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。 40

【請求項18】

鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその生産性が高いものである、請求の範囲第16項又は請求の範囲第17項記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。

【請求項19】

鳥類がニワトリである、請求の範囲第16項～請求の範囲第18項のいずれか1項に記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。

【請求項20】

ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表され 50

るアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫することを特徴とする、抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。

【請求項21】

抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合することができるものである、請求の範囲第20項記載の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。

10

【請求項22】

抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高いものである、請求の範囲第20項又は請求の範囲第21項記載の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。

【請求項23】

鳥類がニワトリである、請求の範囲第20項～請求の範囲第22項のいずれか1項に記載の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、敗血症等の疾患のマーカーとなりうるヒトHMGB1に特異的に結合する鳥類由来の抗体、当該抗体を使用する試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法、当該抗体を含む試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法、及び抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法に関するものである。

20

本発明は、臨床検査、臨床病理学、免疫学及び医学などの生命科学分野、並びに分析化学などの化学分野等において有用なものである。

【背景技術】

【0002】

HMGB (ハイ モビリティ グループ ボックス プロテイン; High Mobility Group Box Protein) は、以前、HMG (ハイ モビリティ グループ プロテイン; High Mobility Group Protein) と呼ばれていたが、これはクロマチン構造に含まれる大量の非ヒストンタンパク質として1964年に発見され、すべての高等動植物に普遍的に含まれるタンパク質であり、種族間で一次構造の保存性は極めて高い。

30

また、核内ばかりではなく、細胞質内にも豊富に存在することが分かっている。

生理作用ははっきりとは分かっていないが、HMGBはDNAと結合する際に二重らせん構造を緩めることから、転写反応の際にDNAの高次構造を最適構造に変化させて転写活性を高めるといふ、極めて広範囲の転写促進因子及びヌクレオソーム弛緩因子として機能すると考えられている。

HMGBには、いくつかの種類が存在する。

例えば、HMGB1 (ハイ モビリティ グループ ボックス プロテイン1)、HMGB2 (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン2)、HMGB3 (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン3)、HMGB8 (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン8)、HMGB17 (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン17)、HMGB I (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン I)、HMGB Y (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン Y)、HMGB I (Y) (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン I (Y))、HMGB I-C (ハイモビリティ グループ ボックス プロテイン I-C) 等を挙げることができる。

40

なお、本発明者らが、遺伝情報処理ソフトウェア「GENETYX」(SOFTWARE DEVELOPMENT社)を使用してアミノ酸配列の相同性の解析を行ったところ

50

、ヒトのHMGB1に対して、ウシHMGB1の相同性は98.6%であり、ブタHMGB1の相同性は99.1%であった。

また、同様に、ヒトのHMGB1に対して、ヒトのHMGB2の相同性は81.2%であり、ウシHMGB2との相同性は72.3%であり、ブタのHMGB2との相同性は79.4%であった。

ワング(Wang)らは1999年に、HMGB1自体を免疫原として調製したポリクローナル抗体を使用したウエスタンブロット法により、初めて血清中(血液中)のHMGB1の定量測定を行った。

その結果、ワングらは、HMGB1が敗血症のマーカーとなりうることを示した。

そして、敗血症の患者において、生き残る患者と、死に至る患者を判別することが、精密に血液中のHMGB1を測定することによって可能であることを示した(非特許文献1参照。)

なお、先に、HMGB1の測定に用いる抗体、即ちHMGB1に結合する抗体については、パーキネン(Parkkinen)らや、レップ(Lepp)らによって調製可能なことが示されていた(非特許文献2参照。非特許文献3参照。)

この抗体を用いてレップらはHMGB1に関して固相酵素免疫測定法(Solid-phase Enzyme Immunoassay)が可能であることを述べている。

また、カバート(Cabart)らにより、ヒトHMGB1及びヒトHMGB2の調製方法が示されていた(非特許文献4参照。)

また、HMGB1は、炎症でも誘導され、このことが各種サイトカインの大量分泌の原因と考えられるという文献も発表されている(非特許文献5参照。非特許文献6参照。非特許文献7参照。)

これらのことより、ただ単に血液中にHMGB1が存在するか否かを定性的に確認することよりも、正確かつ精密に、HMGB1を定量的に測定することの有用性は明らかである。

なお、本発明者らは、先に、ヒトHMGB1には結合するが、ヒトHMGB2には結合しない抗体、及びHMGB2を測り込むことなく、誤差を含まない正確な測定値を得ることができるヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法を開発した(特許文献1参照。)

【特許文献1】特開2003-96099号公報

【非特許文献1】H. Wangら, SCIENCE, 285巻, 9号, 248~251頁, 1999年発行

【非特許文献2】J. Parkkinenら, The Journal of Biological Chemistry, 268巻, 26号, 19726~19738頁, 1993年発行

【非特許文献3】W. A. Leppら, Journal of Immunoassay, 10巻, 4号, 449~465頁, 1989年発行

【非特許文献4】P. Cabartら, Cell Biochemistry and Function 13, 125~133頁, 1995年発行

【非特許文献5】Andersson, Uら, J. Exp. Med., 192巻, 565~570頁, 2000年発行

【非特許文献6】Scaffidiら, Nature, 418巻, 191~195頁, 2002年発行

【非特許文献7】Parkら, The Journal of Biological Chemistry, 279巻, 27号, 2004年発行

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

上述のように、試料中のヒトHMGB1を正確かつ精密に定量測定することが求められてきているが、しかしながら、この正確かつ精密なヒトHMGB1の定量測定に耐えうる

抗ヒトHMGB1抗体、すなわちヒトHMGB1との結合能力（力価）が高い抗体を得ることは容易なことではなかった。

この理由について、以下記載する。

測定を行おうとする測定対象物質に特異的に結合する抗体を調製する場合、通常、飼育し易い動物（ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス又はラット等）に、この測定対象物質の全部又は一部、或いはこれらに担体（キャリア）を結合したものを、前記動物に注射等をして免疫を行う。

また、この測定対象物質、又はこの測定対象物質と担体の結合物を、動物に免疫する際に、通常、測定対象物質との結合能力が高い抗体を誘導して取得する為に、アジュバントを前記測定対象物質等に混合するなど、種々の工夫がなされている。

ところで、本発明者らは、ウサギ、マウス又はウシ等の哺乳類動物に、ヒトHMGB1又はその一部を注射し免疫して、ヒトHMGB1と特異的に結合する抗ヒトHMGB1抗体を取得しようとしたが、ヒトHMGB1との結合能力が高い抗体はごく僅かしか得ることができなかった。

例えば、ウサギ4羽それぞれにヒトHMGB1を注射し免疫した場合、ヒトHMGB1との結合能力が高い抗ヒトHMGB1抗体を得ることはできず、これらのウサギ4羽から得られた抗体は、いずれも結合能力が低い、低力価のものであった。

また、例えば、ウサギ10羽それぞれにヒトHMGB1の一部を注射し免疫した場合、ヒトHMGB1との結合能力が高い抗ヒトHMGB1抗体が得られたのは、これらのウサギ10羽の内、わずか1羽だけであり、あとの9羽から得られた抗体は、いずれも結合能力が低い、低力価のものであった。

これらのことより、本発明者らは、通常、抗体の取得のために免疫動物として使用されるウサギ、マウス又はウシ等の哺乳類動物に、ヒトHMGB1の全部又は一部を免疫した場合、得られる抗体のほとんどは、ヒトHMGB1との結合能力が低い、低力価のものであり、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体が得られる確率は、非常に小さいものであることを確認するに至った。

そこで、本発明者らは、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体を、高い確率で取得すべく検討を重ねたところ、免疫動物として鳥類を用い、かつ特定のアミノ酸配列を含むペプチドを免疫原として用いることにより上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0004】

ウサギ、マウス又はウシ等の動物にヒトHMGB1の全部又は一部を免疫した場合、得られる抗体のほとんどがヒトHMGB1との結合能力が低い低力価のものであるのは何故なのか、更にヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体が得られる確率が非常に低いのは何故なのか、ということについて、本発明者らは継続的に検討した。

その結果、本発明者らは、ウサギ、マウス又はウシ等の動物に、ヒトHMGB1又はその一部を注射し免疫した場合、これらの動物の体内に当該動物のHMGB1が生成されることを見出した。

これは、ヒトHMGB1は、これを注射され免疫される動物にとっては異物であり、この異物を体内に入れられることは当該動物にとっては大きなストレスとなり、このストレスに対する反応として、当該動物の生体内に当該動物のHMGB1が反応物質として生成してくるものと推察される。

そして、通常、抗体の産生及び取得に用いられるウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス及びラット等の動物においては、これらの動物のHMGB1のアミノ酸配列（一次構造）が、ヒトのHMGB1のアミノ酸配列（一次構造）と、2～3のアミノ酸残基でしか相違しない。

よって、「ヒトHMGB1をこれらの動物に注射し免疫したことにより反応物質としてこれらの動物の体内に生成したこれらの動物のHMGB1」は、ヒトHMGB1との相同性が極めて高いため、「ヒトHMGB1をこれらの動物に注射し免疫することによりこれ

10

20

30

40

50

らの動物の体内に産生した抗ヒトHMGB1抗体」と、これらの動物の体内で結合してしまうことになる。

従い、これらの動物の体内に産生した抗ヒトHMGB1抗体は、これらの動物の体内において、これらの動物の体内で産生されたHMGB1と結合してしまっているため（又は結合してしまっているものが多いため）、更にヒトのHMGB1と結合することができず（又は結合できるものが少なく）、このため、この抗ヒトHMGB1抗体は、ヒトHMGB1との結合能力が低く低力価であり、更にヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体が得られる確率が非常に小さいものであると推察される。

上述の通り、ウサギ、マウス又はウシ等の動物に、ヒトHMGB1又はその一部を注射し免疫した場合に、これらの動物の体内に当該動物のHMGB1が生成されるということ  
10  
を、本発明者らが初めて見出し、そして、このため、この生成した当該動物のHMGB1が、産生された抗ヒトHMGB1抗体と当該動物の体内で結合してしまうことにより、得られた抗ヒトHMGB1抗体が低力価のものとなり、そして高力価の抗体が得られる確率が非常に小さいものとなることに、本発明者らが初めて想到するに至った。

この本発明者らが見出した知見を土台として、本発明者らは、HMGB1のアミノ酸配列（一次構造）がヒトとは相同性が高くない鳥類に注目し、免疫動物として鳥類を用い、かつ免疫原として鳥類のHMGB1のアミノ酸配列と相同性が低いヒトのHMGB1のアミノ酸配列の部分を含むペプチドを使用することにより、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体を、高い確率で取得することができることを初めて見出した。

すなわち、本発明は、以下の発明よりなる。  
20

(1) ヒトHMGB1の次式(I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体よりなる、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

(2) 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式(I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式(I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫して得たものである、  
30

前記(1)記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

(3) 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその生産性が高いものである、前記(1)又は(2)記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

(4) 鳥類がニワトリである、前記(1)～(3)のいずれかに記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体。

(5) 試料中のヒトHMGB1を当該ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体との抗原抗体反応を利用して測定を行う免疫学的測定方法において、ヒトHMGB1の次式(I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体である鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体を使用することを特徴とする、試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。  
40

(6) 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式(I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式(I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫して得たものである、前記(5)記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

(7) 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその  
50

生産性が高いものである、前記（５）又は（６）記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

（８） 高感度にヒトHMGB1の測定を行うことができる高感度免疫学的測定方法であることを特徴とする、前記（５）～（７）のいずれかに記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

（９） 鳥類がニワトリである、前記（５）～（８）のいずれかに記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法。

（１０） 試料中のヒトHMGB1を当該ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体との抗原抗体反応を利用して測定を行う免疫学的測定試薬において、ヒトHMGB1の次式（I）：  
Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体である鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体を含むことを特徴とする、試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。 10

（１１） 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式（I）：  
Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式（I）で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫して得たものである、前記（１０）記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。 20

（１２） 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその生産性が高いものである、前記（１０）又は（１１）記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。

（１３） 高感度にヒトHMGB1の測定を行うことができる高感度免疫学的測定試薬であることを特徴とする、前記（１０）～（１２）のいずれかに記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。

（１４） 当該免疫学的測定試薬の生産性を向上させた免疫学的測定試薬であることを特徴とする、前記（１０）～（１３）のいずれかに記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。

（１５） 鳥類がニワトリである、前記（１０）～（１４）のいずれかに記載の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬。 30

（１６） ヒトHMGB1の次式（I）：  
Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式（I）で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫することを特徴とする、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。

（１７） 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式（I）：  
Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合することができるものである、前記（１６）記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。 40

（１８） 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高くかつその生産性が高いものである、前記（１６）又は（１７）記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。

（１９） 鳥類がニワトリである、前記（１６）～（１８）のいずれかに記載の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法。

（２０） ヒトHMGB1の次式（I）：  
Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式（I）で表されるアミノ酸配列 50

に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫することを特徴とする、抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。

(21) 抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1の次式(I): Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合することができるものである、前記(20)記載の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。

(22) 抗ヒトHMGB1抗体が、ヒトHMGB1との結合能力が高いものである、前記(20)又は(21)記載の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。 10

(23) 鳥類がニワトリである、前記(20)～(22)のいずれかに記載の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法。

#### 【発明の効果】

##### 【0005】

本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体は、ヒトHMGB1との結合能力が高い、高力価の抗体である。

また、本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体は、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体を高い確率で取得し得る、その生産性が高いものである。

本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法は、試料中にごく微量に含まれるヒトHMGB1までも正確に測定することができる、高感度な免疫学的測定方法である。 20

本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬は、試料中にごく微量に含まれるヒトHMGB1までも正確に測定することができる、高感度な免疫学的測定試薬である。

また、本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬は、測定の感度が低い不合格品(不良品)を生産する可能性が小さく、当該免疫学的測定試薬の生産の歩留まりが良いものであり、当該免疫学的測定試薬の生産性を向上させた免疫学的測定試薬である。

本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法は、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗ヒトHMGB1抗体を取得することができる方法である。

また、本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法は、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗ヒトHMGB1抗体を高い確率で得ることができる、生産性が高い方法である。 30

本発明の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法は、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗ヒトHMGB1抗体を高い確率で得ることができる、抗ヒトHMGB1抗体の取得の生産性を向上させることができる方法である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0006】

図1は、本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の、ヒトHMGB1及びヒトHMGB2との反応性を確かめたウエスタンブロット法の結果を示した図である。

図2は、本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法により、ヒトHMGB1を含む試料を測定して作成した検量線を示した図である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】 40

##### 【0007】

#### 〔I〕 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体

##### (1) 本発明の抗体

本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、ヒトHMGB1の次式(I): Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体である。

この本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、鳥類由来であって、ヒトHMGB1の次式(I): Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配 50

列に特異的に結合することができる抗体であれば、いかなるものでもよい。

本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」においては、その由来が鳥類由来であればよい。

この鳥類としては、例えば、ニワトリ、ウズラ、キジ、ダチョウ又はアヒル等を挙げることができる。

この鳥類としては、キジ科の鳥が好ましく、特にニワトリが好ましい。

なお、本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体を含む抗血清、モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント (Fab、F(ab')<sub>2</sub> 又はFab' など) 等のいずれのものであってもよい。

## (2) 免疫原

10

本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を取得するために、鳥類に免疫する免疫原について、以下説明を行う。

本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を取得するための免疫原としては、ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を挙げることができる。

なお、前記の数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾における数個であるが、通常1~4個、好ましくは1~3個、更に好ましくは1~2個、特に好ましくは1個である。

20

この本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を取得するための免疫原としては、次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物が好ましく、特に前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物が好ましい。

免疫原として、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を用い、これを鳥類に免疫した場合、得られる「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合することができるものである。

30

この場合、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列は、鳥類のHMGB1のアミノ酸配列と相同性が低いヒトのHMGB1のアミノ酸配列の部分であるので、前記の免疫原を鳥類に免疫して得られる「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、次の2つの特徴を有するものである。

(a) ヒトのHMGB1と特異的に結合することができるものである。

(b) 前記免疫原の免疫により前記鳥類の体内に生成するHMGB1とは結合できないもの (又は結合し難いもの) であるので、この前記鳥類の体内に生成したHMGB1とは結合しておらず (又は結合するものが少なく)、このため、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体であって、かつこれが高い確率で得られるものである。

40

なお、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列は、ヒトのHMGB2のアミノ酸配列と相同性が低いヒトのHMGB1のアミノ酸配列の部分でもあるので、免疫原として、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を用いた場合、得られる「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、HMGB1に特異的に結合するが、HMGB2には結合しないという特徴も有するものである。

50

よって、この点においても、免疫原として、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に 1 ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を用いて、取得される「鳥類由来抗ヒト HMGB 1 抗体」は、ヒト HMGB 1 に特異的なものとして有用なものである。

### (3) 結合特異性及び生産性

本発明の「鳥類由来抗ヒト HMGB 1 抗体」は、上述の通り、ヒト HMGB 1 との結合能力が高い、高力価の抗体である。

更に、本発明の「鳥類由来抗ヒト HMGB 1 抗体」は、ヒト HMGB 1 との結合能力が高い高力価の抗体を高い確率で取得し得る、その生産性が高いものである。

10

### (4) 本発明の抗体の免疫原の取得方法

本発明の「鳥類由来抗ヒト HMGB 1 抗体」を取得するために、鳥類に免疫する免疫原の取得方法について、以下説明を行う。

前記の免疫原として、ヒト HMGB 1 の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に 1 ないし数個 (通常 1~4 個、好ましくは 1~3 個、更に好ましくは 1~2 個、特に好ましくは 1 個) のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を挙げることができるが、これはヒト又はヒトの HMGB 1 のアミノ酸配列と

20

相同性が高いヒト以外の哺乳類動物 (ブタ、ウシ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス又はラット等) の体液、細胞、組織又は臓器等より、公知の方法等により抽出、精製等して、取得することができる。

また、前記の免疫原は、液相法及び固相法等のペプチド合成の方法により合成することができ、更にペプチド自動合成装置を用いてもよい。

例えば、日本生化学会編「生化学実験講座 1 タンパク質の化学 IV」, 東京化学同人, 1975 年; 泉屋ら「ペプチド合成の基礎と実験」, 丸善, 1985 年; 又は日本生化学会編「続生化学実験講座 2 タンパク質の化学 下」, 東京化学同人, 1987 年等に記載された方法に従い合成することができる。

更に、前記の免疫原は、対応する核酸塩基配列を持つ DNA 又は RNA より遺伝子工学

30

技術を用いて調製してもよく、日本生化学会編「続生化学実験講座 1 遺伝子研究法 I」, 東京化学同人, 1986 年; 日本生化学会編「続生化学実験講座 1 遺伝子研究法 II」, 東京化学同人, 1986 年; 又は日本生化学会編「続生化学実験講座 1 遺伝子研究法 III」, 東京化学同人, 1987 年等を参照して調製すればよい。

例えば、ヒト HMGB 1 の前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列に対応する遺伝子をクローニングし、得られた遺伝子をプラスミド等の発現ベクターへ組み込む。

次に、この発現ベクターを大腸菌等の宿主細胞に導入し、得られた形質変換体を培養することにより前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドを発現させることができる。

40

なお、遺伝子の塩基配列をクローニングする方法としては、例えば、PCR 法、リコンビナント PCR 法、ライゲーション法、又はリンカーライゲーション法等を挙げることができる。

ところで、免疫原が低分子物質の場合には、免疫原に担体 (キャリア) を結合させたものを動物等に免疫するのが一般的ではあるが、アミノ酸数 5 のペプチドを免疫原としてこれに対する特異抗体を産生させたとの報告 (木山ら, 「日本薬学会第 112 回年会講演要旨集 3」, 122 頁, 1992 年発行) もあるので、担体を使用することは必須ではない。

なお、免疫原として、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に 1 ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペ

50

プチドと担体との結合物を用いる場合の担体としては、スカシガイのヘモシアニン (K L H)、ウシ血清アルブミン (B S A)、ヒト血清アルブミン (H S A)、ニワトリ血清アルブミン、ポリ-L-リシン、ポリアラニルリシン、ジパルミチルリシン、破傷風トキソイド又は多糖類等の担体として公知なものを用いることができる。

前記のペプチドと担体との結合法は、グルタルアルデヒド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド法、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、ビスジアゾ化ペンジジン法又はN-サクシミジル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオン酸法等の公知の結合法を用いることができる。

また、ニトロセルロース粒子、ポリビニルピロリドン又はリポソーム等の担体に前記のペプチドを吸着させたものも本発明の免疫原とすることができる。

10

(5) 本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体(ポリクローナル抗体)の取得方法

(イ) ポリクローナル抗体の血清からの取得

本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」において、ポリクローナル抗体又は抗血清は、以下の操作により、免疫原を免疫した鳥類の血清から取得することができる。

まず、前記の免疫原をニワトリ等の鳥類に免疫する。

この前記の免疫原を免疫する量は、免疫する鳥類の種類、又は免疫注射部位等により決められるものであるが、ニワトリの場合にはニワトリ一羽当たり一回につき10 $\mu$ g~1mgの前記免疫原を免疫注射することが好ましい。

なお、この前記の免疫原は、アジュバントと添加混合して免疫注射することが好ましい

20

。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知のものを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、2~3週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に、前記の免疫原を追加免疫注射する。

この場合も、前記の免疫原は、アジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

初回免疫の後、免疫した鳥類の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら全採血を行い、血清を分離して本発明の抗体を含む抗血清を得る。

30

この抗血清を、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過法若しくはアフィニティークロマトグラフィー等の方法、又はこれらの方法を組み合わせて抗体の精製を行い、ポリクローナル抗体を得る。

(ロ) ポリクローナル抗体の卵からの取得

本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」において、ポリクローナル抗体は、以下の操作により、免疫原を免疫した鳥類の卵から取得することができる。

まず、前記の免疫原をニワトリ等の鳥類のメスに免疫する。

この前記の免疫原を免疫する量は、免疫する鳥類の種類、免疫注射部位等により決められるものであるが、ニワトリの場合にはニワトリのメス一羽当たり一回につき10 $\mu$ g~1mgの前記免疫原を免疫注射することが好ましい。

40

なお、この前記の免疫原は、アジュバントと添加混合して免疫注射することが好ましい

。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日菌アジュバント等の公知のものを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、2~3週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に、前記の免疫原を追加免疫注射する。

この場合も、前記の免疫原は、アジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ま

50

しい。

初回免疫の後、免疫した鳥類が産卵した卵中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら、この時以降に産卵する卵より卵黄を得る。

この卵黄を、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過法若しくはアフィニティークロマトグラフィー等の方法、又はこれらの方法を組み合わせて抗体の精製を行い、ポリクローナル抗体を得る。

(ハ) 担体に対する抗体の吸収除去操作

免疫原として前記のペプチドと担体との結合物を用いて鳥類に免疫した場合には、得られた抗血清又はポリクローナル抗体中に、この担体に対する抗体（即ち、当該担体に結合する抗体）が存在するので、このような担体に対する抗体の吸収除去処理を行うことが好ましい。

10

この除去処理方法としては、担体を、得られたポリクローナル抗体又は抗血清の溶液中に添加して生成した凝集物を取り除くか、又は担体を不溶化固相に固定化してアフィニティークロマトグラフィーにより除去する方法等を用いることができる。

以上、前記（イ）、（ロ）、及び（ハ）に記載したようにして、本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」のポリクローナル抗体、即ちヒトHMGB1に特異的に結合する鳥類由来のポリクローナル抗体を単離して得ることができる。

(6) 本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体（モノクローナル抗体）の取得方法

本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」において、モノクローナル抗体は、以下の操作により取得することができる。

20

モノクローナル抗体は、ケラーらの細胞融合法（G. Koehlerら、Nature、256巻、495～497頁、1975年発行）によるハイブリドーマ、又はエプスタンバーウイルス等のウイルスによる腫瘍化細胞等の抗体産生細胞により得ることができる。

細胞融合法によるモノクローナル抗体の調製は、以下の操作により行うことができる。

まず、前記の免疫原をニワトリ等の鳥類に免疫する。

この前記の免疫原を免疫する量は、免疫する鳥類の種類、又は免疫注射部位等により決められるものであるが、ニワトリの場合にはニワトリ一羽当たり一回につき10 $\mu$ g～1mgの前記免疫原を免疫注射することが好ましい。

なお、前記の免疫原は、アジュバントを添加混合して免疫注射することが好ましい。

30

アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知なものを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、1～2週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に、前記の免疫原を追加免疫注射する。

この追加免疫注射の回数としては2～6回が一般的である。この場合も前記の免疫原は、アジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

初回免疫の後、免疫した鳥類の血清中又は産卵した卵中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら、前記の免疫原を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解したものを静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。

40

この最終免疫の3～5日後に、免疫した鳥類の脾細胞、リンパ節細胞又は末梢リンパ球等の抗体産生能を有する細胞を取得する。

この免疫した鳥類より得られた抗体産生能を有する細胞（脾細胞、リンパ節細胞又は末梢リンパ球等）と、鳥類又は哺乳動物等の骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）又はB細胞とを細胞融合させるのであるが、ミエローマ細胞としてはヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPR T）又はチミジンキナーゼ（TK）等の酵素を欠損した細胞株のものが好ましく、例えば、BALB/cマウス由来のHGPR T欠損細胞株である、P3-X63-Ag8株（ATCC TIB9）、P3-X63-Ag8-

50

U1株(癌研究リサーチソースバンク(JCRB)9085)、P3-NS1-1-Ag4-1株(JCRB0009)、P3-X63-Ag8・653株(JCRB0028)又はSP2/O-Ag-14株(JCRB0029)等を用いることができる。

細胞融合は、各種分子量のポリエチレングリコール(PEG)、リポソーム若しくはセンダイウイルス(HVJ)等の融合促進剤を用いて行うか、又は電気融合法等により行うことができる。

ミエローマ細胞がHGPR T欠損株又はTK欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選別用培地(HAT培地)を用いることにより、抗体産生能を有する細胞とミエローマ細胞の融合細胞(ハイブリドーマ)のみを選択的に培養し、増殖させることができる。

10

このようにして得られたハイブリドーマの培養上清を、前記の免疫原、又はヒトのHMGB1等を用いてELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法により測定することにより、ヒトHMGB1等に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

また、前記のハイブリドーマの培養上清を、ヒトのHMGB2等を用いてELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法により測定することにより、ヒトHMGB2等には結合しない抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

この2種類のハイブリドーマ選択方法と限界希釈法等の公知のクロニングの方法を組み合わせて行うことにより、本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」のモノクローナル抗体、即ちヒトHMGB1に特異的に結合する鳥類由来のモノクローナル抗体の産生細胞株を単離して得ることができる。

20

このモノクローナル抗体産生細胞株を適当な培地で培養して、その培養上清から本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」のモノクローナル抗体を得ることができるが、培地としては無血清培地又は低濃度血清培地等を用いてもよく、この場合は抗体の精製が容易となる点で好ましく、DMEM培地、RPMI1640培地又はASF培地103等の培地を用いることができる。

このようにして得られたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過法又はアフィニティークロマトグラフィーなどの方法、あるいはこれらの方法を組み合わせること等により、精製された本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」のモノクローナル抗体を得ることができる。

30

## 〔I I〕 試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法

### (1) 総論

本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法(以下「本発明の免疫学的測定方法」又は「本発明の測定方法」ということがある。)は、試料中のヒトHMGB1を当該ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体との抗原抗体反応を利用して測定を行う免疫学的測定方法において、「ヒトHMGB1の次式(I): Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I)で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体よりなる鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」(『鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体』)を使用することを特徴とするものである。

40

即ち、試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法において、測定対象物質であるヒトHMGB1に特異的に結合する抗体として、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を使用することを特徴とする免疫学的測定方法である。

本発明の免疫学的測定方法は、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」、即ちヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体を使用することにより、試料中にごく微量に含まれるヒトHMGB1までも正確に測定することができる、高感度な免疫学的測定方法である。

この「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、このような抗体であれば特に制限なく使用することができ、前記の効果を得ることができる。

50

なお、ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体として2つ又はそれ以上の抗体を使用する免疫学的測定方法においては、その2つ又はそれ以上の抗体のうち少なくとも1つが、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であればよい。

そして、他の抗体は「ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体」であれば如何なるものでもよい。

なお、2つ又はそれ以上の抗体が、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であってもよく、また、用いる全ての抗体が前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であってもよい。

例えば、酵素免疫測定法（ELISA法）、蛍光免疫測定法又は発光免疫測定法等のサンドイッチ法においては、酵素等により標識された抗体及び固相化抗体のいずれか一方又は両方が、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であればよく、また、両方の抗体とも前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であってもよい。

この「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、1種類のものだけではなく、複数種類のものを用いてもよい。

前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、その由来が鳥類由来であればよい。

この鳥類としては、例えば、ニワトリ、ウズラ、キジ、ダチョウ又はアヒル等を挙げる事ができる。キジ科の鳥が好ましく、特にニワトリが好ましい。

なお、この「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」の詳細については、前記の「〔I〕鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」の項等に記載した通りである。

## (2) 免疫学的測定方法

本発明の免疫学的測定方法は、試料中のヒトHMGB1を当該ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体との抗原抗体反応を利用して測定を行う免疫学的測定方法において、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を使用するものであれば、特にその測定原理は限定されるものではなく、所期の効果を奏するものである。

この免疫学的測定方法としては、例えば、酵素免疫測定法（ELISA、EIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、放射免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法（LIA）、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法、赤血球凝集反応法、粒子凝集反応法、特開平9-229936号公報及び特開平10-132819号公報などに記載された測定対象物質（被検物質）に対する特異的結合物質が固定され、これで被覆された面を有する担体、及び測定対象物質（被検物質）に対する特異的結合物質が固定された粒子を用いる測定法、又はDahlbeckらが示したELISA法（Enzyme-linked Ligandsorbent Assay）（Thromb. Haemost., 79巻, 767~772頁, 1998年発行; WO98/23963）等を挙げる事ができる。

そして、前記の免疫学的測定方法においては、サンドイッチ法、競合法又は均一系法（ホモジニアス系法）等のいずれの手法においても、本発明の免疫学的測定方法を適用することができる。

また、本発明の免疫学的測定方法における測定は、用手法により行ってもよいし、又は分析装置等の装置を用いて行ってもよい。

## (3) 試料

本発明の免疫学的測定方法における試料としては、ヒトの血液、血清、血漿、尿、精液、髄液、唾液、汗、涙、腹水若しくは羊水などの体液；大便；血管若しくは肝臓などの臓器；組織；細胞；又は大便、臓器、組織若しくは細胞などの抽出液等、ヒトのHMGB1が含まれる可能性のある生体試料等の試料であれば対象となる。

## (4) 標識抗体を用いた免疫学的測定方法

本発明の免疫学的測定方法を、標識物質を抗体（若しくは抗原）に結合した標識抗体（若しくは標識抗原）、及び抗体（若しくは抗原）を固相担体に固相化した固相化抗体（若しくは固相化抗原）を用いる、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の免疫学的測定方法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法等により行うことができるが、サンドイッチ法により実施することが好ましい。

本発明の免疫学的測定方法を、前記のサンドイッチ法により実施する時には、標識抗体及び固相化抗体のいずれか一方の抗体が前記の「鳥類由来抗ヒトHMG B 1抗体」であればよく、また、標識抗体及び固相化抗体の両方が前記の「鳥類由来抗ヒトHMG B 1抗体」であってもよい。

前記の免疫学的測定方法に用いる固相化抗体（若しくは固相化抗原）に使用する固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ラテックス、リポソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、セラミックス、金属又は磁性体等の材質よりなる、マイクロカプセル、ビーズ、マイクロプレート（マイクロタイタープレート）、試験管、スティック又は試験片等の形状の固相担体を使用することができる。

固相化抗体（若しくは固相化抗原）は、前記の「鳥類由来抗ヒトHMG B 1抗体」等の抗体と固相担体とを物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により吸着、結合させて調製することができる。

物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体（若しくは抗原）と固相担体を緩衝液などの溶液中で混合し接触させたり、又は緩衝液などに溶解した抗体（若しくは抗原）と固相担体を接触させること等により行うことができる。

また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のための免疫アッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質I V」、東京化学同人、1991年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体（若しくは抗原）と固相担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体（若しくは抗原）と固相担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基などと反応させること等により行うことができる。

また、更に非特異的反応や固相担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要がある場合は、抗体（若しくは抗原）を固相化させた固相担体の表面又は内壁面に、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチン若しくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、固相担体のブロッキング処理（マスキング処理）を行ってもよい。

標識物質としては、酵素免疫測定法の場合には、例えば、パーオキシダーゼ（POD）、アルカリホスファターゼ（ALP）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素又はアミラーゼ等を用いることができる。

また、蛍光免疫測定法の場合には、例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート又はジクロロトリアジンイソチオシアネート等を用いることができる。

そして、放射免疫測定法の場合には、例えば、トリチウム、ヨウ素125又はヨウ素131等を用いることができる。

また、発光免疫測定法においては、例えば、NADH-FMN<sub>2</sub> -ルシフェラーゼ反応系、ルミノール-過酸化水素-POD反応系、アクリジニウムエステル反応系、又はジオキセタン化合物反応系などの反応系に係わる物質等を用いることができる。

前記の「鳥類由来抗ヒトHMG B 1抗体」等の抗体（若しくは抗原）と酵素等の標識物質との結合法は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のための免疫アッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質I V」、東京化学同人、1991年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体（若しくは抗原）と標識物質をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体（若しくは抗原）と標識物質のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより結合を行うことができる。

前記の酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の免疫

学的測定方法における測定の操作法は公知の方法（日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のための免疫アッセイ技術と応用」，臨床病理刊行会，1983年発行；石川榮治ら編「酵素免疫測定法」，第3版，医学書院，1987年発行；北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」，共立出版，1987年発行）等により行うことができる。

例えば、固相化抗体（「固相担体-抗体」）と試料を反応させ、同時に標識抗体（「抗体-標識物質」）を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させることにより、「固相担体-抗体」＝「ヒトHMGB1」＝「抗体-標識物質」の複合体を形成させる。

そして、未結合の標識抗体を洗浄分離して、「固相担体-抗体」＝「ヒトHMGB1」＝「抗体-標識物質」の結合により固相担体に間接的に結合した標識抗体の量又は未結合の標識抗体の量を測ることにより試料中に含まれていたヒトHMGB1の量（濃度）を測定することができる。

具体的には、酵素免疫測定法の場合は、抗体に標識した酵素に、その至適条件下等で基質を反応させ、その酵素反応生成物の量を光学的方法等により測定する。

また、蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を測定する。

そして、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。

更に、発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定する。

#### （5）凝集反応法による免疫学的測定方法

本発明の免疫学的測定方法を、免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、又は目視的に測ることにより、試料中に含まれていたヒトHMGB1の量（濃度）を測定する、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫学的測定方法によっても実施することができる。

前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を固相担体に固相化させて用いる場合には、固相担体としては、例えば、ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸共重合体、ポリアクロレイン、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル（メタ）アクリル酸共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、赤血球、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、セラミックス、金属又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。

前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を固相担体に固相化させる方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により行うことができる。

物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体と固相担体を緩衝液等の溶液中で混合し接触させたり、又は緩衝液等に溶解した抗体と固相担体を接触させること等により行うことができる。

また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のための免疫アッセイ技術と応用」，臨床病理刊行会，1983年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」，東京化学同人，1991年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体と固相担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体と固相担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させること等により行うことができる。

また、更に非特異的反応や固相担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要がある場合は、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を固相化させた固相担体の表面又は内壁面に、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチン若しくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、固相担体のブロッキング処理（マスキング処理）を行ってもよい。

なお、ラテックス比濁法を測定原理とする場合、固相担体として用いるラテックス粒子

の粒径については、特に制限はないものの、ラテックス粒子が前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」及び測定対象物質（ヒトHMGB1）を介して結合し、凝集塊を生成する程度、及びこの生成した凝集塊の測定の容易さ等の理由より、ラテックス粒子の粒径は、その平均粒径が、 $0.04 \sim 1 \mu\text{m}$ であることが好ましい。

また、ラテックス比濁法を測定原理とする場合、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を固相化させたラテックス粒子を含ませる濃度については、試料中に含まれるヒトHMGB1の濃度、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」のラテックス粒子表面上での分布密度、ラテックス粒子の粒径、試料と測定試薬の混合比率等の各種条件により最適な濃度は異なるので一概に言うことはできない。

しかし、通常は、試料と測定試薬が混合され、ラテックス粒子に固相化された前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」と試料中に含まれていた「ヒトHMGB1」との抗原抗体反応が行われる測定反応時に、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を固相化させたラテックス粒子の濃度が、反応混合液中において $0.005 \sim 1\%$ （w/v）となるようにするのが一般的であり、この場合、反応混合液中においてこのような濃度になるような濃度の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体を固相化させたラテックス粒子」を測定試薬に含ませる。

また、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の間接凝集反応法を測定原理とする場合、固相担体として用いる粒子の粒径については、特に制限はないものの、その平均粒子径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲内にあることが好ましく、 $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲内にあることがより好ましい。

そして、これらの粒子の比重は、 $1 \sim 10$ の範囲内にあることが好ましく、 $1 \sim 2$ の範囲内にあることがより好ましい。

なお、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の間接凝集反応法を測定原理とする場合の測定に使用する容器としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリメタクリレートなどからなる、試験管、マイクロプレート（マイクロタイタープレート）又はトレイ等を挙げることができる。

これらの容器の溶液収容部分（マイクロプレートのウェル等）の底面は、U型、V型又はUV型等の底面中央から周辺にかけて傾斜を持つ形状であることが好ましい。

本発明の免疫学的測定方法を、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫学的測定方法により実施する場合には、溶媒として、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

前記の免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫学的測定方法における測定の操作法は、公知の方法等により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」、又は試料と固相担体に固相化させた前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光や散乱光を測定する。

また、目視的に測定する場合には、プレートやマイクロプレート等の前記容器中で、試料と固相担体に固相化させた前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。

なお、この目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

なお、本発明の免疫学的測定方法を前記の免疫複合体凝集物の生成を測定する方法により実施する場合、HMGB1に特異的に結合する抗体として前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を使用することは必須であるが、この抗体に加えて更に、他のHMGB1に特異的に結合する抗体を用いてもよい。

〔III〕 試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬

(1) 総論

本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬（以下「本発明の免疫学的測定試薬」又は「本発明の測定試薬」ということがある。）は、試料中のヒトHMGB1を当該ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体との抗原抗体反応を利用して測定を行う免疫学的測定試薬において、「ヒトHMGB1の次式（I）：Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser（I）で表されるアミノ酸配列に特異的に結合する鳥類由来の抗体よりなる鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」（『鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体』）を含むことを特徴とするものである。

即ち、試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬において、測定対象物質であるヒトHMGB1に特異的に結合する抗体として、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を使用し、これを当該免疫学的測定試薬に含むことを特徴とする免疫学的測定試薬である。 10

本発明の免疫学的測定試薬は、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」、即ちヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体を含むものであるため、試料中にごく微量に含まれるヒトHMGB1までも正確に測定することができる、高感度な免疫学的測定試薬である。

また、本発明の免疫学的測定試薬は、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」、即ちヒトHMGB1との結合能力が高い高力価のものが得られる確率が高い抗体を使用しこれを含むものであるため、測定の感度が低い不合格品（不良品）を生産する可能性が小さく、当該免疫学的測定試薬の生産の歩留まりが良いものであるため、当該免疫学的測定試薬の生産性を向上させた免疫学的測定試薬である。 20

この「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、このような抗体であれば特に制限なく使用することができ、前記の効果を得ることができる。

なお、ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体として2種類以上の抗体を含む免疫学的測定試薬においては、その2つ又はそれ以上の抗体のうち少なくとも1つが、この「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であればよい。

そして、他の抗体は「ヒトHMGB1に特異的に結合する抗体」であれば如何なるものでもよい。

なお、この2種類以上の抗体のうち、2つ又はそれ以上の抗体が「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であってもよく、また、用いる全ての抗体がこの「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であってもよい。 30

本発明の免疫学的測定試薬においては、その測定原理として、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法若しくは発光免疫測定法などの標識物質を用いる免疫学的測定方法（サンドイッチ法又は競合法等）のもの、又は免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法若しくは粒子凝集反応法などの免疫複合体凝集物の生成を測定する免疫学的測定方法のもの等、特に制限なく適用することができる。

例えば、酵素免疫測定法（ELISA法）、蛍光免疫測定法又は発光免疫測定法等におけるサンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定試薬においては、標識物質を抗体に結合した標識抗体、及び抗体を固相担体に固相化した固相化抗体のいずれか一方又は両方が、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であればよく、両方の抗体ともこの前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であってもよい。 40

例えば、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等を測定原理とする免疫学的測定試薬においては、ラテックス粒子等の固相担体に固相化させる抗体が前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」であればよく、また、免疫比濁法を測定原理とする測定試薬においては、抗体として前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を用いればよい。

前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、その由来が鳥類由来であればよい。

この鳥類としては、例えば、ニワトリ、ウズラ、キジ、ダチョウ又はアヒル等を挙げることができる。キジ科の鳥が好ましく、特にニワトリが好ましい。

なお、本発明の免疫学的測定試薬は、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を含むことを特徴とするものであるため、本発明の免疫学的測定試薬に含む「鳥類由来抗ヒトH 50

MGB 1抗体」の詳細は前記の「〔I〕鳥類由来抗ヒトHMGB 1抗体」の項等に記載した通りであり、また本発明の免疫学的測定試薬の測定原理などの詳細は前記の「〔I I〕試料中のヒトHMGB 1の免疫学的測定方法」の項等に記載した通りである。

(2) その他の試薬成分

本発明の免疫学的測定試薬において、溶媒としては、各種の水系溶媒を用いることができる。

この水系溶媒としては、例えば、精製水、生理食塩水、又は、トリス緩衝液、リン酸緩衝液若しくはリン酸緩衝生理食塩水などの各種緩衝液等を挙げることができる。

この緩衝液のpHについては、適宜適当なpHを選択して用いればよく、特に制限はないものの、通常は、pH 3~12の範囲内のpHを選択して用いることが一般的である。

また、本発明の免疫学的測定試薬には、前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB 1抗体」などの抗体を固相担体に固相化した「固相化抗体」、及び/又は前記の「鳥類由来抗ヒトHMGB 1抗体」などの抗体と酵素などの標識物質を結合させた「標識抗体」等の試薬成分の他に、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチン若しくはその塩などのタンパク質；各種塩類；各種糖類；脱脂粉乳；正常ウサギ血清などの各種動物血清；アジ化ナトリウム若しくは抗生物質などの各種防腐剤；活性化物質；反応促進物質；ポリエチレングリコールなどの感度増加物質；非特異的反応抑制物質；又は、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等の1種又は2種以上を適宜含有させてもよい。

そして、これらを測定試薬に含有させる際の濃度は特に限定されるものではないが、0.001~10% (W/V) が好ましく、特に0.01~5% (W/V) が好ましい。

なお、前記の界面活性剤としては、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、デカグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステロール、フィトスタノール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油、硬化ヒマシ油若しくはポリオキシエチレンラノリンなどの非イオン性界面活性剤；酢酸ベタインなどの両性界面活性剤；又は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩若しくはポリオキシエチレンアルキルエーテル酢酸塩などの陰イオン性界面活性剤等を挙げることができる。

(3) 測定試薬の構成

本発明の免疫学的測定試薬は、そのもの単独にて、試料中のヒトHMGB 1の測定に使用することができる。そして、そのもの単独にて、販売することができる。

また、本発明の免疫学的測定試薬は、他の試薬と組み合わせて、試料中のヒトHMGB 1の測定に使用することもできる。そして、他の試薬と組み合わせて、販売することもできる。

前記の他の試薬としては、例えば、緩衝液、試料希釈液、試薬希釈液、標識物質を含有する試薬、発色などのシグナルを生成する物質を含有する試薬、発色などのシグナルの生成に関与する物質を含有する試薬、校正(キャリブレーション)を行うための物質を含有する試薬、又は精度管理を行うための物質を含有する試薬等を挙げることができる。

そして、前記の他の試薬を第1試薬とし、本発明の免疫学的測定試薬を第2試薬としたり、又は本発明の免疫学的測定試薬を第1試薬とし、前記の他の試薬を第2試薬としたりして、適宜様々な組合せにて使用、及び販売を行うことができる。

〔I V〕鳥類由来抗ヒトHMGB 1抗体の取得方法

本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB 1抗体の取得方法は、鳥類由来の抗ヒトHMGB 1抗体の取得に当たり、ヒトHMGB 1の次式(I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式(I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との

結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫することを特徴とするものである。

なお、前記の数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾における数個であるが、これは通常は1～4個、好ましくは1～3個、更に好ましくは1～2個、特に好ましくは1個である。

免疫原として、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を用い、これを鳥類に免疫することを特徴とする本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法においては、これにより得られる「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列に特異的に結合することができるものである。

10

本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法において、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列は、鳥類のHMGB1のアミノ酸配列と相同性が低いヒトのHMGB1のアミノ酸配列の部分であるので、前記の免疫原を鳥類に免疫して得られる「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」は、次の2つの特徴を有するものである。

(a) ヒトのHMGB1と特異的に結合することができるものである。

(b) 前記免疫原の免疫により前記鳥類の体内に生成するHMGB1とは結合できないもの(又は結合し難いもの)であるので、この前記鳥類の体内に生成したHMGB1とは結合しておらず(又は結合するものが少なく)、このため、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体であって、かつこれが高い確率で得られるものである。

20

従って、本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法においては、得られる「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」はヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体であり、この鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体を高い確率で取得し得るものであり、よって、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の生産性が高いものである。

なお、この本発明の「鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」を取得するための免疫原としては、次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物が好ましく、特に前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物が好ましい。

30

本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法においては、前記の免疫原を免疫する動物は鳥類であればよい。

この鳥類としては、例えば、ニワトリ、ウズラ、キジ、ダチョウ又はアヒル等を挙げることができる。キジ科の鳥が好ましく、特にニワトリが好ましい。

なお、本発明の鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法において、鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体、その免疫原、及び鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体の取得方法などの詳細については、前記の「[I] 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」の項等に記載した通りである。

[V] 抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法

本発明の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法は、抗ヒトHMGB1抗体の取得に当たり、ヒトHMGB1の次式 (I) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式 (I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を免疫原とし、当該免疫原を鳥類に免疫することを特徴とするものである。

40

なお、前記の数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾における数個であるが、これは通常は1～4個、好ましくは1～3個、更に好ましくは1～2個、特に好ましくは1個である。

免疫原として、前記の式 (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式

50

(I) で表されるアミノ酸配列に1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるペプチド、あるいはこれらのペプチドと担体との結合物を用い、これを鳥類に免疫することを特徴とする本発明の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法においては、これにより得られる鳥類由来の「抗ヒトHMGB1抗体」は、前記の式(I)で表されるアミノ酸配列に特異的に結合することができるものである。

本発明の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法において、前記の式(I)で表されるアミノ酸配列は、鳥類のHMGB1のアミノ酸配列と相同性が低いヒトのHMGB1のアミノ酸配列の部分であるので、前記の免疫原を鳥類に免疫して得られる「抗ヒトHMGB1抗体」は、次の2つの特徴を有するものである。

- (a) ヒトのHMGB1と特異的に結合することができるものである。  
 (b) 前記免疫原の免疫により前記鳥類の体内に生成するHMGB1とは結合できないもの(又は結合し難いもの)であるので、この前記鳥類の体内に生成したHMGB1とは結合しておらず(又は結合するものが少なく)、このため、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体であって、かつこれが高い確率で得られるものである。

従って、本発明の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法においては、得られる鳥類由来の「抗ヒトHMGB1抗体」はヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体であり、この抗ヒトHMGB1抗体を高い確率で取得し得るものである。

すなわち、本発明においては、ヒトHMGB1との結合能力が低い低力価の抗ヒトHMGB1抗体が産生される可能性が極めて小さく、高力価の抗ヒトHMGB1抗体の生産の歩留まりを著しく向上させることができるものである。

なお、本発明における「抗ヒトHMGB1抗体」を取得するための免疫原としては、次式(I): Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser (I) で表されるアミノ酸配列よりなるペプチド、又はこの式(I)で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物が好ましく、特に前記の式(I)で表されるアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物が好ましい。

本発明の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法においては、前記の免疫原を免疫する動物は鳥類であればよい。

この鳥類としては、例えば、ニワトリ、ウズラ、キジ、ダチョウ又はアヒル等を挙げることができる。キジ科の鳥が好ましく、特にニワトリが好ましい。

なお、本発明の抗ヒトHMGB1抗体取得の生産性向上方法において、鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体、その免疫原、及び鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体の取得方法などの詳細については、前記の「[I] 鳥類由来抗ヒトHMGB1抗体」の項等に記載した通りである。

#### 【実施例】

#### 【0008】

以下、実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

〔実施例1〕(ニワトリのHMGB1のアミノ酸配列と相同性が低いヒトのHMGB1のアミノ酸配列の選択)

鳥類であるニワトリのHMGB1のアミノ酸配列と相同性の低いアミノ酸配列を、ヒトのHMGB1のアミノ酸配列より選択した。

(1) ウエンらによるヒトのHMGB1のアミノ酸配列[Wenら, Nucleic Acids Res., 17巻, 1197~1214頁, 1989年発行]と、コールドウェルら、リュウら、及びリーらによる鳥類であるニワトリのHMGB1のアミノ酸配列[Caldwellら, Genome Biol., 6巻, 1号, R5, 2005年発行; Luwら, Biochim. Biophys. Acta, 1493巻, 1~2号, 64~72頁, 2000年発行; Leeら, Gene, 225巻, 1~2号, 97~105頁, 1998年発行]を比較した。

10

20

30

40

50

(2) 前記の比較の結果、ニワトリのHMGB1のアミノ酸配列と相同性が低いヒトのHMGB1のアミノ酸配列として、ヒトのHMGB1のN末端から166番目のアミノ酸残基(リシン)から180番目のアミノ酸残基(セリン)までの、「Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」〔式(I)〕を選択した。なお、この式(I)のアミノ酸配列「Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」〔式(I)〕は、この箇所に相当するヒトのHMGB2のアミノ酸配列「Lys Ser Gly Ala Glu Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly」とは、計15個のアミノ酸残基の内、計9個のアミノ酸残基において相違していた。

10

〔実施例2〕(選択したアミノ酸配列の部分のペプチドの合成)

実施例1で選択したアミノ酸配列「Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」〔式(I)〕のN末端に、担体(キャリア)に結合させるためのシステインを結合させたアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」〔式(II)〕のペプチドを合成した。

まず、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems)のモデル430Aペプチド自動合成装置(Model 430A peptide synthesizer)により、取扱説明書に従って、t-ブトキシカルボニルアミノ酸固相法でアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」〔式(II)〕のペプチドの合成を行った。

20

副反応を抑制するためにスカベンジャーとして、ジメチルスルファイド、p-チオクレゾール、m-クレゾール及びアニソールの存在下でフッ化水素法により樹脂から合成したペプチドの脱離を行った。

その後、ジメチルエーテルによりスカベンジャーを抽出し、そして2N酢酸により合成したペプチドの抽出を行った。

陰イオン交換樹脂であるダウエックス1-X2(DOWEX 1-X2)により陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行い精製をして、オクタデシル(ODS)カラムでの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、メインピークのパターンの確認を行った。

30

そして、エバポレーターにより凍結乾燥をして濃縮を行った後、HPLCにより精製を行い分取した。

なお、このHPLC精製時の装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-D-ODS-5(20mm×300mm)を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエーターで0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中アセトニトリルの0%から70%のグラジエントを流速7.0mL/分で行い、日本分光工業社のUVIDEC-100V型検出器(210nm、1.28AUF S)で検出を行った。

40

ここで精製分取した合成ペプチドをエバポレーターで凍結乾燥して濃縮した。

次に、得られた合成ペプチドの純度をHPLCで分析した。

この分析に用いた装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-R-ODS-5(4.9mm×300mm)を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエーターで0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中アセトニトリルの0%から70%のグラジエントを流速1.0mL/分、25分間で行い、日本分光工業社のUVIDEC-100V型検出器(210nm、1.28AUF S)で検出を行った。

この分析の結果、得られた合成ペプチドの純度がほぼ100%であることが分かった。

〔実施例3〕(選択したアミノ酸配列よりなるペプチドと担体との結合物の調製)

50

実施例2で合成したアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」〔式(I I)〕のペプチドに、2種類の担体(キャリア)を各々結合させた、前記ペプチドと担体との結合物(2種類)をそれぞれ調製した。

(1) ウシ血清アルブミンを担体とする合成ペプチドとの結合物の調製

担体(キャリア)としてのウシ血清アルブミン(BSA)〔生化学工業社〕の10mgを10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、これにN,N-ジメチルホルムアミドに溶解している2.5%マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル(MBS)〔ピアース社〕溶液150 $\mu$ Lを加え室温で攪拌しながら30分間反応させた。

10

これを4 $^{\circ}$ C中においてある10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化しておいたゲルろ過カラムであるセファデックスG-25(Sephadex G-25)カラム〔ファルマシア-エルケービー社〕にかけ、280nmにおける吸光度でモニターして、MBS-担体結合成分を分取した。

このMBS-担体結合成分をリン酸三ナトリウムでpH7.0に調整し、これに実施例2で合成した式(I I)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドを添加混合して150分間反応させた。

反応後、水に対して3回透析した後、凍結乾燥を行って前記ペプチドと結合した担体よりなる、式(I I)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドと担体であるBSAとの結合物を得た。

20

(2) スカシガイのヘモシアニンを担体とする合成ペプチドとの結合物の調製

担体(キャリア)としてのスカシガイのヘモシアニン(KLH)〔カルビオケム社〕の10mgを10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、これにN,N-ジメチルホルムアミドに溶解している2.5%マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル(MBS)〔ピアース社〕溶液150 $\mu$ Lを加え室温で攪拌しながら30分間反応させた。

これを4 $^{\circ}$ C中においてある10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化しておいたゲルろ過カラムであるセファデックスG-25(Sephadex G-25)カラム〔ファルマシア-エルケービー社〕にかけ、280nmにおける吸光度でモニターして、MBS-担体結合成分を分取した。

30

このMBS-担体結合成分をリン酸三ナトリウムでpH7.0に調整し、これに実施例2で合成した式(I I)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドを添加混合して150分間反応させた。

反応後、水に対して3回透析した後、凍結乾燥を行って前記ペプチドと結合した担体よりなる、式(I I)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドと担体であるKLHとの結合物を得た。

40

〔実施例4〕(ヒトHMGB1の調製及びヒトHMGB2の調製)

ヒトのHMGB1及びHMGB2のそれぞれを、カバートらの方法〔P. Cabartら, Cell Biochemistry and Function 13, 125~133頁, 1995年〕に従い、HL60細胞より調製した。

(1) まず、HL60細胞を、10%の非動化したウシ胎児血清(FCS)〔ギブコ社〕を含むRPMI1640培地液〔ギブコ社〕の300mLにより、1週間培養した。

(2) 次に、培養したHL60細胞をかき集め、RPMI1640培地液にて洗浄した後、3LのPFHM-II無血清・無タンパク質培地(インビトロゲン社)にて、2週間培養を行った。

(3) その後、培養上清を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)により平衡化されたヘパ

50

リンーセファロースカラム（シグマ社）に通した。

次にPBSにより、よく洗浄した後、0.5Mの塩化ナトリウムを含むPBSを流して溶出を行った。

この溶出の状況を、280nmにおける吸光度の測定により追跡し、この280nmに吸収を持つ溶出画分を分取した。

(4) この280nmに吸収を持つ溶出画分、即ちタンパク質を含有する溶出画分を、0.2Mの塩化ナトリウムを含む5mMホウ酸緩衝液（pH9.0）により、よく透析を行った。

(5) 次に、これを、7.5mMホウ酸緩衝液（pH9.0）により平衡化されたCM-セファデックスG25カラム（ファルマシアーエルケービー社）に通した。 10

次に、7.5mMホウ酸緩衝液（pH9.0）により、よく洗浄した後、200mMの塩化ナトリウムを含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）を流して溶出をさせ、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。

(6) ここで溶出した各画分を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、その易動度よりヒトのHMGB1を含む溶出画分、及びヒトのHMGB2を含む溶出画分をそれぞれ同定した。

以上の操作により、ヒト細胞（HL60細胞）より、ヒトのHMGB1、及びヒトのHMGB2を、各々調製した。

〔実施例5〕（合成したペプチドと担体の結合物を免疫原とする鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体及び哺乳類由来の抗ヒトHMGB1抗体の調製） 20

実施例3で調製した「合成したペプチドと担体の結合物」を免疫原として、鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体を調製した。

また、対照として、実施例3で調製した「合成したペプチドと担体の結合物」を免疫原として、哺乳類由来の抗ヒトHMGB1抗体を調製した。

〔1〕鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体の調製

実施例3で調製した「合成したペプチドと担体の結合物」を免疫原として鳥類であるニワトリに免疫し、このニワトリより抗ヒトHMGB1抗体を取得した。

(1) 実施例3において調製した、式(II)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドと担体であるBSAとの結合物を、100μg/mLになるように生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解した。 30

次に、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合しエマルジョンとし、次にこれを免疫原として、10羽のメスのニワトリ（旭テクノグラス社）の羽の付け根に、それぞれ0.5mLを注射して免疫した。

(2) この初回免疫から2週間後に、前記の免疫原を100μg/mLになるように生理食塩水で溶解し、これをフロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その0.5mLにより追加免疫注射を行った。

この追加免疫注射は2週間おきに継続して行った。

(3) そして、免疫動物であるこれら10羽のニワトリが産んだ卵について、卵黄中の抗体の力価を、酵素免疫測定法（ELISA法）にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。 40

このELISA法の操作は、下記の(イ)～(ハ)の記載の通りに行った。

(イ) 実施例3において調製した、式(II)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドと担体であるKLHとの結合物を、1μg/mLになるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェルマイクロプレート（メンク社）に1ウェル当たり100μLずつ加え、37℃で2時間静置して、式(II)のアミノ酸配列のペプチドと担体であるKLHとの結合物をこのマイクロプレートのウェルに固相化した。

(ロ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液（0.05%ツイーン20（T 50

w e e n 2 0) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (5.59 mMリン酸水素二ナトリウム、1.47 mMリン酸二水素カリウム、137 mM塩化ナトリウム及び2.68 mM塩化カリウムを含む水溶液 (pH 7.2)) で洗浄した後、1% BSAを含む10 mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を1ウェル当り300  $\mu$ Lずつ加えて、37°Cで2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

(ハ) 次に、ヒトHMGB1に対する抗体の産生を検査すべき前記10羽のニワトリの卵について、その卵黄100  $\mu$ Lを生理食塩水900  $\mu$ Lに溶解し10倍希釈し、更にそれを生理食塩水で1,000倍、10,000倍、そして100,000倍にそれぞれ希釈した。

これらの卵黄の希釈液を各々、前記(ロ)のマイクロプレートのウェルに100  $\mu$ Lずつ加え、37°Cで2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。 10

(ニ) また、対照として、前記の卵黄の希釈液に替えて、1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水を100  $\mu$ Lずつ加え、37°Cで2時間静置し、その後洗浄液で洗浄した。

(ホ) パーオキシダーゼ (POD) を標識した抗ニワトリIgY抗体 (Up-Date社) を、3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で5,000倍に希釈した後、これを前記(ハ)及び前記(ニ)のマイクロプレートに1ウェル当り100  $\mu$ Lずつ加え、37°Cで2時間静置して反応を行わせた。

(ヘ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液 (3 mMの2,2'-アジノービス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) [ABTS] を含む50 mMリン酸水素二ナトリウム-24 mMクエン酸緩衝液の1 mLに対して2  $\mu$ Lの1.7%過酸化水素を使用直前に添加して調製したものを1ウェル当り100  $\mu$ Lずつ加え、室温で反応させた。 20

そして、15分後に1ウェル当たり150  $\mu$ Lの6 N硫酸を加えて反応を停止させた。

これをEIAプレートリーダー (バイオラッド社) にて415 nmにおける各ウェルの吸光度の測定を行った。

(4) 前記(3)における卵黄中の抗体の力価の測定の結果、初回免疫から1.5~2ヶ月後に抗体価がプラトーに達したと認められたので、免疫した10羽のニワトリそれぞれの卵の卵黄より抗体 (IgY) を得た。

(5) 卵黄の10 mLに、140 mM塩化ナトリウム及び0.01%アジ化ナトリウムを含む10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) の40 mLを加え、よく攪拌後、遠心分離を行い上清を得た。 30

(6) 次に、この上清に、1 M塩化カルシウムを含む前記(5)のトリス塩酸緩衝液の7.5 mL、及び10% (W/V) デキストラン硫酸を含む前記(5)のトリス塩酸緩衝液の3 mLを加え、30分間攪拌した後、遠心分離を行い上清と沈殿を得た。

上清はそのままにして、沈殿を再度前記(5)のトリス塩酸緩衝液にて再抽出し、遠心分離を行った。

この沈殿からの再抽出及び遠心分離により得られた上清を、沈殿再抽出前の上清と合わせ、前記(5)のトリス塩酸緩衝液により100 mLとした。

(7) これに無水硫酸ナトリウム20 gを添加し、30分間攪拌した後、遠心分離を行い沈殿をデカンテーションにより上清から分離し、この沈殿をリン酸緩衝生理食塩水の100 mLに溶解した。 40

次に、これをリン酸緩衝生理食塩水により透析を行い、その後濃縮を行ってグロブリン画分を得た。

(8) 次に、このグロブリン画分を、実施例2で合成したペプチドを固定化したカラムに通して、アフィニティークロマトグラフィーを行った。

このアフィニティークロマトグラフィーは、下記の(イ)~(ニ)の記載の通りに行った。

(イ) 実施例2において合成した、式(II)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドの10 mgに対して、2 gのCNBr-セファ 50

ロース（ファルマシアバイオテック社）を、その取扱説明書に従って反応させ、前記の合成ペプチドを固定化したアフィニティークロマトグラフィー用のカラムを調製した。

(ロ) このカラムをリン酸緩衝生理食塩水で平衡化しておき、その後、前記(7)にて得たグロブリン分画をこのカラムに通した。

(ハ) その後、このカラムにリン酸緩衝生理食塩水を充分に通して洗浄した後、0.1 M酢酸緩衝液(pH 3.0)を通した。

(ニ) これにより溶出した画分を集め、リン酸緩衝生理食塩水で透析を行い、その後、濃縮を行った。

以上のアフィニティークロマトグラフィーの操作により、免疫を行った計10羽のニワトリのそれぞれから、式(II)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドに結合する抗体(ポリクローナル抗体)を分取した。 10

(9) 前記(8)にて得た、計10羽のニワトリからの抗体(ポリクローナル抗体)のそれぞれについて、ヒトHMGB1と結合する能力、即ち抗体の力価の高さを確かめた。

この抗体の力価の測定は、ELISA法により、下記の(イ)～(ト)の記載の通りに行った。

(イ) 実施例4において取得したヒトのHMGB1を、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェルマイクロプレート(ヌンク社)に1ウェル当り100 $\mu\text{L}$ ずつ加え、37℃で2時間静置して、ヒトのHMGB1をこのマイクロプレートのウェルに固相化した。 20

(ロ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液(0.05%ツイーン20(Tween 20)を含むリン酸緩衝生理食塩水(5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液(pH 7.2)))で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH 7.2)を1ウェル当り300 $\mu\text{L}$ ずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

(ハ) 次に、前記(8)にて得た計10羽のニワトリからの抗体のそれぞれについて、その濃度が0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、そして1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように各々、リン酸緩衝生理食塩水により希釈した。

これらの抗体の希釈液を各々、前記(ロ)のマイクロプレートのウェルに100 $\mu\text{L}$ ずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。 30

(ニ) また、対照として、前記の抗体の希釈液に替えて、1%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水を100 $\mu\text{L}$ ずつ加え、37℃で2時間静置し、その後洗浄液で洗浄した。

(ホ) パーオキシダーゼ(POD)を標識した抗ニワトリIgY抗体(Update社)を、3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で5,000倍に希釈した後、これを前記(ハ)及び前記(ニ)のマイクロプレートに1ウェル当り100 $\mu\text{L}$ ずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。

(ヘ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液(3mMの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン[TMBZ]を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2 $\mu\text{L}$ の1.7%過酸化水素を使用直前に添加して調製したもの)を1ウェル当り100 $\mu\text{L}$ ずつ加え、室温で反応させた。 40

そして、15分後に1ウェル当たり150 $\mu\text{L}$ の6N硫酸を加えて反応を停止させた。

これをEIAプレートリーダー(バイオラッド社)にて450nmにおける各ウェルの吸光度の測定を行った。

(ト) この計10羽のニワトリから得た各々の抗体の測定結果(吸光度)を表1に示した。

抗体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	ニワトリ1	ニワトリ2	ニワトリ3	ニワトリ4	ニワトリ5	ニワトリ6	ニワトリ7	ニワトリ8	ニワトリ9	ニワトリ10
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.010	0.050	0.080	0.100	0.005	0.090	0.150	0.190	0.100	0.111	0.075
0.100	0.540	0.720	0.750	0.090	0.690	1.001	1.271	0.875	0.989	0.652
1.000	2.803	2.885	2.905	0.270	2.752	3.000	3.000	2.854	2.899	2.753

〔測定値は450nmにおける吸光度〕

この表1より、例えば測定を行った抗体の濃度が $1\mu\text{g/mL}$ の場合、これらの計10羽のニワトリから得た抗体の内、計9羽の抗体は、測定により得られた吸光度がいずれも2.7以上という大変高い吸光度が得られており、ヒトHMGB1と結合する能力が非常に高い抗体であることが分かる。

10

即ち、鳥類であるニワトリに免疫原を免疫して得た鳥類由来抗HMGB1抗体は、免疫したニワトリ計10羽中、計9羽という高い確率で、ヒトHMGB1と結合する能力が高い、高力価の抗体を取得できることが確かめられた。

## 〔2〕哺乳類由来の抗ヒトHMGB1抗体の調製

対照として、実施例3で調製した「合成したペプチドと担体の結合物」を免疫原として哺乳類であるウサギに免疫し、このウサギより抗ヒトHMGB1抗体を取得した。

(1) 実施例3において調製した、式(II)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドと担体であるBSAとの結合物を、 $100\mu\text{g/mL}$ になるように生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)に溶解した。

20

次に、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合しエマルジョンとし、次これを免疫原として、10羽のウサギの腹部皮下に、それぞれ0.5mLを注射して免疫した。

(2) この初回免疫から2週間後に、前記の免疫原を $100\mu\text{g/mL}$ となるように生理食塩水で溶解し、これをフロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その0.5mLにより追加免疫注射を行った。

この追加免疫注射は2週間おきに継続して行った。

(3) そして、免疫動物であるこれら10羽のウサギの血清中の抗体の力価を、酵素免疫測定法(ELISA法)にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。

30

このELISA法の操作は、下記の(イ)～(ハ)の記載の通りに行った。

(イ) 実施例3において調製した、式(II)のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドと担体であるKLHとの結合物を、 $1\mu\text{g/mL}$ になるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェルマイクロプレート(ヌンク社)に1ウェル当たり $100\mu\text{L}$ ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置して、式(II)のアミノ酸配列のペプチドと担体であるKLHとの結合物をこのマイクロプレートのウェルに固相化した。

(ロ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液(0.05%ツイーン20(Tween 20)を含むリン酸緩衝生理食塩水(5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液(pH7.2)))で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH7.2)を1ウェル当たり $300\mu\text{L}$ ずつ加えて、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

40

(ハ) 次に、HMGB1に対する抗体の産生を検査すべき前記10羽のウサギの血清について、その血清 $100\mu\text{L}$ を生理食塩水 $900\mu\text{L}$ に溶解し10倍希釈し、更にそれを生理食塩水で1,000倍、10,000倍、そして100,000倍にそれぞれ希釈した。

これらの血清の希釈液を各々、前記(ロ)のマイクロプレートのウェルに $100\mu\text{L}$ ず

50

つ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。

(ニ) また、対照として、前記の血清の希釈液に替えて、1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水を100  $\mu$ Lずつ加え、37℃で2時間静置し、その後洗浄液で洗浄した。

(ホ) パーオキシダーゼ (POD) を標識した抗ウサギ IgG 抗体 (ダコ社) を、3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で5,000倍に希釈した後、これを前記 (ハ) 及び前記 (ニ) のマイクロプレートに1ウェル当り100  $\mu$ Lずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。

(ヘ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液 (3mMの2,2'-アジノービス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) [ABTS] を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2  $\mu$ Lの1.7%過酸化水素を使用直前に添加して調製したもの) を1ウェル当り100  $\mu$ Lずつ加え、室温で反応させた。

そして、15分後に1ウェル当たり150  $\mu$ Lの6N硫酸を加えて反応を停止させた。

これをEIAプレートリーダー (バイオラッド社) にて415nmにおける各ウェルの吸光度の測定を行った。

(4) 前記 (3) における血清中の抗体の力価の測定の結果、初回免疫から1.5~2ヶ月後に抗体価がプラトーに達したと認められたので、免疫した10羽のウサギそれぞれより血清 (抗血清) を得た。

(5) このウサギの血清 (抗血清) の1mLを、22~25℃の温度に保ちながら、そして攪拌しつつ、0.18gの無水硫酸ナトリウムを添加した。

この無水硫酸ナトリウムが溶解してからも30分間、22~25℃での攪拌を継続した。

(6) 次に、これを、22~25℃において、7,000gで10分間、遠心分離した。

この遠心分離で得られた沈殿を、17.5mMリン酸緩衝液 (pH6.3) の1mLに溶解した。

次に、これを、17.5mMリン酸緩衝液 (pH6.3) にて十分に透析を行った後、濃縮した。

(7) その後、これを、17.5mMリン酸緩衝液 (pH6.3) で平衡化しておいたDEAE-セルロースカラムに通した。

280nmにおける吸光度を測定しておき、素通りした画分の内、280nmに吸収を持つ画分を、グロブリン画分として分取した。

(8) 次に、このグロブリン画分を、実施例2で合成したペプチドを固定化したカラムに通して、アフィニティークロマトグラフィーを行った。

このアフィニティークロマトグラフィーは、下記の (イ) ~ (ニ) の記載の通りに行った。

(イ) 実施例2において合成した、式 (II) のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser」のペプチドの10mgに対して、2gのCNBr-セファロース (ファルマシアバイオテック社) を、その取扱説明書に従って反応させ、前記の合成ペプチドを固定化したアフィニティークロマトグラフィー用のカラムを調製した。

(ロ) このカラムをリン酸緩衝生理食塩水で平衡化しておき、その後、前記 (7) にて得たグロブリン画分をこのカラムに通した。

(ハ) その後、このカラムにリン酸緩衝生理食塩水を充分に通して洗浄した後、0.1M酢酸緩衝液 (pH3.0) を通した。

(ニ) これにより溶出した画分を集め、リン酸緩衝生理食塩水で透析を行い、その後、濃縮を行った。

以上のアフィニティークロマトグラフィーの操作により、免疫を行った計10羽のウサギのそれぞれから、式 (II) のアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Ly

s Ser」のペプチドに結合する抗体（ポリクローナル抗体）を分取した。

(9) 前記(8)にて得た、計10羽のウサギからの抗体（ポリクローナル抗体）のそれぞれについて、ヒトHMGB1と結合する能力、即ち抗体の力価の高さを確かめた。

この抗体の力価の測定は、ELISA法により、下記の(イ)～(ト)の記載の通りに行った。

(イ) 実施例4において取得したヒトのHMGB1を、1μg/mLになるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェルマイクロプレート（ヌンク社）に1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置して、ヒトのHMGB1をこのマイクロプレートのウェルに固相化した。

(ロ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液（0.05%ツイーン20（T 10  
ween 20）を含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1  
.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリ  
ウムを含む水溶液（pH7.2））で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二  
水素カリウム－リン酸水素二カリウム緩衝液（pH7.2）を1ウェル当り300μLず  
つ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

(ハ) 次に、前記(8)にて得た計10羽のウサギからの抗体のそれぞれについて、そ  
の濃度が0.01μg/mL、0.1μg/mL、そして1μg/mLとなるように各々  
、リン酸緩衝生理食塩水により希釈した。

これらの抗体の希釈液を各々、前記(ロ)のマイクロプレートのウェルに100μLず  
つ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。 20

(ニ) また、対照として、前記の抗体の希釈液に替えて、1%BSAを含むリン酸緩衝  
生理食塩水を100μLずつ加え、37℃で2時間静置し、その後洗浄液で洗浄した。

(ホ) パーオキシダーゼ（POD）を標識した抗ウサギIgG抗体（ダコ社）を、3%  
BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で5,000倍に希釈した後、これを前記(ハ)及び  
前記(ニ)のマイクロプレートに1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置  
して反応を行わせた。

(ヘ) 次に、このマイクロプレートの各ウェルを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダー  
ゼ反応液（3mMの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン〔TMBZ〕を含む5  
0mMリン酸水素二ナトリウム－24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2μLの1.  
7%過酸化水素を使用直前に添加して調製したもの）を1ウェル当り100μLずつ加え 30  
、室温で反応させた。

そして、15分後に1ウェル当たり150μLの6N硫酸を加えて反応を停止させた。

これをEIAプレートリーダー（バイオラッド社）にて450nmにおける各ウェルの  
吸光度の測定を行った。

(ト) この計10羽のウサギから得た各々の抗体の測定結果（吸光度）を表2に示した  
。

抗体濃度 (μg/mL)	ウサギ1	ウサギ2	ウサギ3	ウサギ4	ウサギ5	ウサギ6	ウサギ7	ウサギ8	ウサギ9	ウサギ10
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.010	0.002	0.002	0.004	0.001	0.001	0.070	0.001	0.001	0.001	0.001
0.100	0.130	0.093	0.090	0.088	0.090	0.450	0.001	0.020	0.015	0.010
1.000	0.540	0.643	0.870	0.734	0.911	1.952	0.320	0.450	0.330	0.350

〔測定値は450nmにおける吸光度〕

この表2より、例えば測定を行った抗体の濃度が1μg/mLの場合、これらの計10  
羽のウサギから得た抗体の内、測定により得られた吸光度が1.952というものが一つ  
あるが、他の9羽の抗体はいずれも吸光度が0.32～0.911という低いものであり  
、先の1羽以外の計9羽の抗体は、ヒトHMGB1と結合する能力が低い抗体であること  
が分かる。

即ち、哺乳類であるウサギに免疫原を免疫して得た抗ヒトHMGB1抗体は、免疫した 50

ウサギ計10羽の内、計9羽までが、ヒトHMGB1と結合する能力が低い、低力価の抗体であった。

このことより、哺乳類であるウサギに免疫原を免疫して得た哺乳類由来抗HMGB1抗体においては、ヒトHMGB1と結合する能力が高い高力価の抗体を取得できる確率が、非常に低いものであることが確かめられた。

〔実施例6〕（鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体のヒトHMGB1及びヒトHMGB2との反応性の確認）

実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体の、ヒトHMGB1及びヒトHMGB2に対する反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

(1) 実施例4で調製したヒトHMGB1 (1mg/mL) 及びHMGB2 (1mg/mL) を等量混合し、更にこれを、4% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、20% (w/v) グリセリン及び適量のブロムフェノールブルーを含む125mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH 6.8) と等量混合した。 10

(2) 次に、これを、15% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。

そして、泳動緩衝液としてバルビタール緩衝液 (pH 8.8) を使用して、電流20mAで180分間通電して電気泳動を行った。

(3) 前記(2)の電気泳動の後の転写は、ノバ・ブロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット (ファルマシア-エルケービー社) を用いて、その使用説明書に従い、ドライ方式で行った。 20

まず、前記(2)において電気泳動を行ったゲルを転写用装置上に置いた。

次に、このゲルの上に、9cm×9cmのニトロセルロース膜 (バイオラッド社) を重ね、48mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、39mMグリシン、0.0357% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 及び20% (V/V) メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流60mAで2時間転写を行った。

(4) この転写を行ったニトロセルロース膜を、1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水 (5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液 (pH 7.2)) の20mLに4℃で1晩浸漬して、ブロッキングを行った。

次に、これを洗浄液 (0.05% ツイーン20 (Tween 20) を含むリン酸緩衝生理食塩水) の20mL中で10分間振とう洗浄を行った。 30

この洗浄操作を3回行った。

(5) 実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体の80μgを、1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水の20mLに溶解した。

この溶液に前記(4)の操作を行ったニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

次に、このニトロセルロース膜を、20mLの洗浄液中で10分間振とうし、洗浄を行った。

この洗浄操作を3回行った。

(6) 次に、パーオキシダーゼ (POD) で標識した抗ニワトリIgY抗体 (Up-Datta社) を、3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で500倍希釈をして、20mLの溶液を調製し、これに前記(5)のニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。 40

その後、このニトロセルロース膜を、20mLの洗浄液中で10分間振とうし、洗浄を行った。

この洗浄操作を3回行った。

(7) 次に、0.025%の3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び0.01%過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水の20mLに、前記(6)のニトロセルロース膜を室温で15分間浸漬して発色させた。

(8) 別に、前記(5)において、「実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1 50

抗体」に替え、ヒトHMGB1及びヒトHMGB2のいずれにも結合する「マウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体（モノクローナル抗体）」を使用すること、及び前記（6）において、「パーオキシダーゼ（POD）で標識した抗ニワトリIgY抗体」に替え、「パーオキシダーゼ（POD）で標識した抗マウスIgG抗体」（ダコ社）を使用すること以外は、前記（1）～（7）の記載の通りに操作を行ったものを陽性対照とした。

なお、前記のマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体（モノクローナル抗体）は、本発明者らが先に調製した抗体産生細胞（ハイブリドーマ）より産生されるものである。

この抗体産生細胞（ハイブリドーマ）は、MD78と命名され、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-18405として2001年7月4日付にて寄託されている。

そして、本発明者らによる前記の抗体産生細胞（ハイブリドーマ）及び前記のマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体（モノクローナル抗体）の調製方法は、特開2003-96099号公報（前記の特許文献1）に記載されている。

（9） また別に、前記（1）～（4）の操作を行い、次にパーオキシダーゼ（POD）で標識した抗ニワトリIgY抗体とパーオキシダーゼ（POD）で標識した抗マウスIgG抗体の等量混合物を用いて前記（6）の操作を行い、その次に前記（7）の操作を行って、前記の実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体も、前記のマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体（モノクローナル抗体）も、使用（接触）しなかったものを陰性対照とした。

（10） 以上の操作により、実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体のウエスタンブロット法の結果を得た。

このウエスタンブロット法の結果を図1に示した。

なお、この図において、「1」は陰性対照、「2」は実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体のもの、「3」は陽性対照である。

この図で、ヒトHMGB1及びヒトHMGB2のいずれにも結合するマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体（モノクローナル抗体）を用いた陽性対照の「3」においては、ヒトHMGB1及びヒトHMGB2それぞれの発色のバンドが現れている。

なお、この「3」の2本のバンドにおいて、上側のバンドはヒトHMGB1による発色のバンドであり、下側のバンドはヒトHMGB2による発色のバンドである。（これは、別途、ヒトHMGB1、ヒトHMGB2を別々に電気泳動し、ウエスタンブロット法を行い、得られたバンドの位置より確かめておいた。）

次に、実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体を用いた「2」では、ヒトHMGB1が泳動される位置に発色のバンドが見られるものの、ヒトHMGB2が泳動される位置には発色が見られないことが分かる。

このことより、実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体は、確かにヒトのHMGB1には結合するが、ヒトのHMGB2には結合しないことが、このウエスタンブロット法の結果より確認することができた。

なお、前記の実施例5で調製した鳥類由来の抗HMGB1抗体も、前記のマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体（モノクローナル抗体）も使用（接触）しなかった陰性対照の「1」においては、ヒトHMGB1が泳動される位置、及びヒトHMGB2が泳動される位置のいずれにおいても何ら発色は認められなかった。

このことより、前記の各ウエスタンブロット法においては、非特異的な発色が起きていないことが確かめられた。

〔実施例7〕（パーオキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体の調製）

ヒトのHMGB1及びヒトHMGB2のいずれにも結合する抗体（モノクローナル抗体）にパーオキシダーゼ（POD）を標識化して、パーオキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体を調製した。

（1）パーオキシダーゼへのマレイミド基の導入

パーオキシダーゼ（POD）〔西洋ワサビ由来〕の4mgを0.1Mリン酸緩衝液（p

H7.0)の0.3 mLに溶解後、N-サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸の1.0 mgをN,N'-ジメチルホルムアミドの60  $\mu$ Lに溶解したものを添加して、30°Cで60分間反応させた。

その後、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で一夜透析を行った。

以上の操作により、前記のパロキシダーゼに、マレイミド基を導入した。

#### (2) 抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体へのチオール基の導入

前記実施例6の(8)に記載した、本発明者らが調製したマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体(モノクローナル抗体)を10 mg/mLの濃度で含有する0.1 Mリン酸緩衝液溶液(pH 6.5)の0.5 mLに、S-アセチルメルカプト無水コハク酸の0.6 mgをN,N'-ジメチルホルムアミドの10  $\mu$ Lに溶解したものを添加して、室温で30分間反応させた。

その後これに、0.1 MのEDTAの20  $\mu$ L、0.1 Mのトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)の0.1 mL、及び1 Mのヒドロキシルアミン塩酸塩(pH 7.0)の0.1 mLをそれぞれ添加して、30°Cで5分間放置した。

次にこれを、5 mMのEDTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化しておいたセファデックスG-25のカラムに通し、単純ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、過剰のS-アセチルメルカプト無水コハク酸を取り除き、抗体画分を集めた。

以上の操作により、前記のマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体(モノクローナル抗体)に、チオール基を導入した。

#### (3) パロキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体の調製

前記(1)で調製したマレイミド基を導入したパロキシダーゼ、及び前記(2)で調製したチオール基を導入したマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体(モノクローナル抗体)を、等量ずつ混合し、30°Cで20時間反応させて、前記抗体へのパロキシダーゼの導入(標識化)を行った。

その後これを、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.5)で平衡化しておいたウルトラゲルAcA34のカラムに通し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

このゲルろ過クロマトグラフィーの各画分を、10%ポリアクリルアミド電気泳動にかけて確認を行い、未結合のパロキシダーゼが混入しないように、パロキシダーゼが結合した抗体の画分だけを集めた。

このパロキシダーゼが結合した抗体の画分を濃縮して、パロキシダーゼが結合したマウス由来抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体(モノクローナル抗体)、即ちパロキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体を得た。

そして、このパロキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体を含む溶液のタンパク質濃度を測定した。

#### [実施例8] (マイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体)

実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体(ポリクローナル抗体)を、マイクロプレートに固相化して、マイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体を調製した。

(1) 実施例5で調製した鳥類由来の抗HMGB1抗体(ポリクローナル抗体)を、リン酸緩衝生理食塩水(5.59 mMリン酸水素二ナトリウム、1.47 mMリン酸二水素カリウム、137 mM塩化ナトリウム、2.68 mM塩化カリウム(pH 7.2))により5  $\mu$ g/mLとした後、96ウェルマイクロプレート(ヌンク社)に1ウェル当たり100  $\mu$ Lずつ加え、37°Cで2時間静置して、前記抗体を前記マイクロプレートの各ウェルに吸着させ、固相化した。

(2) この抗体を固相化したマイクロプレートを、洗浄液(0.05%ツイーン20(Tween 20)を含むリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.2))で洗浄した後、1%BSAを含む10 mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH 7.2)を1ウェル当たり300  $\mu$ Lずつ加えて、37°Cで2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

以上の操作により、実施例5で調製した鳥類由来の抗ヒトHMGB1抗体(ポリクローナル抗体)をマイクロプレートに固相化した、マイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1

抗体を調製した。

〔実施例 9〕（試料中のヒト HMGB 1 の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法）

実施例 7 で調製したパーオキシダーゼ標識抗ヒト HMGB 1・HMGB 2 抗体、及び実施例 8 で調製したマイクロプレート固相化抗ヒト HMGB 1 抗体を、免疫学的測定試薬として使用し、実施例 4 で調製したヒト HMGB 1 を、酵素免疫測定法（サンドイッチ法）により測定した。

そして、この免疫学的測定方法における検量線を作成した。

#### 1. 測定試薬

(1) パーオキシダーゼ標識抗ヒト HMGB 1・HMGB 2 抗体

実施例 7 で調製したパーオキシダーゼ標識抗ヒト HMGB 1・HMGB 2 抗体を、酵素免疫測定法のサンドイッチ法における酵素標識抗体として使用した。 10

(2) マイクロプレート固相化抗ヒト HMGB 1 抗体

実施例 8 で調製したマイクロプレート固相化抗ヒト HMGB 1 抗体を、酵素免疫測定法のサンドイッチ法における固相化抗体として使用した。

(3) 洗浄液

0.05% ツイーン 20 (Tween 20) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) を調製し、洗浄液とした。

(4) パーオキシダーゼ基質液

3 mM の 3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン (TMBZ) を含む 50 mM リン酸水素二ナトリウム - 24 mM クエン酸緩衝液の 1 mL に対して 2  $\mu$  L の 1.7% 過酸化水素を使用直前に添加したものを調製して、標識としたパーオキシダーゼの基質、即ちパーオキシダーゼ基質液とした。 20

(5) 反応停止液

6 N 硫酸水溶液を調製して、反応停止液とした。

#### 2. 試料

(1) ヒト HMGB 1 を含む試料

実施例 4 において調製したヒト HMGB 1 を含む溶液を、0.01% アジ化ナトリウムを含む 50 mM リン酸二水素カリウム - リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.4) で十分に透析した。

この透析後の前記ヒト HMGB 1 を含む溶液のタンパク質濃度をプロテインアッセイ (30 バイオラッド社) で求めた。

そして、この前記ヒト HMGB 1 を含む溶液を、0.01% アジ化ナトリウムを含む 50 mM リン酸二水素カリウム - リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.4) で希釈して、前記ヒト HMGB 1 濃度が、80 ng/mL、及び 160 ng/mL の試料をそれぞれ調製した。

(2) 0 ng/mL の試料

前記の 0.01% アジ化ナトリウムを含む 50 mM リン酸二水素カリウム - リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.4) を、ヒト HMGB 1 を含まないヒト HMGB 1 濃度 0 ng/mL の試料とした。

#### 3. 酵素免疫測定法（サンドイッチ法）による測定 40

(1) 前記 2 で調製した、ヒト HMGB 1 を含む 2 種類の試料、及びヒト HMGB 1 を含まない 0 ng/mL の試料をそれぞれ、生理食塩水で 2 倍に希釈した。

(2) 前記 (1) で希釈した各試料を、前記 1 の (2) のマイクロプレート固相化抗ヒト HMGB 1 抗体のウェルに 100  $\mu$  L を添加して、37°C で 12 時間静置して、マイクロプレートに固相化した抗体と試料に含まれていたヒト HMGB 1 との抗原抗体反応を行わせた。

(3) 次に、前記のマイクロプレート固相化抗ヒト HMGB 1 抗体の各ウェルを前記 1 の (3) の洗浄液で洗浄した。

(4) 前記 1 の (1) のパーオキシダーゼ標識抗ヒト HMGB 1・HMGB 2 抗体を、3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水で 1,000 倍希釈した。 50

次にこれを、前記(3)の洗浄操作を行ったマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルに、100 $\mu$ Lずつ添加した後、37 $^{\circ}$ Cで2時間静置した。

これにより、マイクロプレートに固相化した抗ヒトHMGB1抗体に結合したヒトHMGB1に、パーオキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体を結合させる反応を行わせた。

(5) その後、前記(4)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルを前記1の(3)の洗浄液で洗浄した。

(6) 次に、前記(5)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルに、前記1の(4)のパーオキシダーゼ基質液を100 $\mu$ Lずつ添加した。

そして、室温で反応を行わせた。

10

(7) 前記(6)におけるパーオキシダーゼ基質液の添加15分後に、前記1の(5)の反応停止液を、前記のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルに100 $\mu$ Lずつ添加して、標識パーオキシダーゼの反応を停止させた。

(8) 次に、前記(7)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェル中の溶液の450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(バイオラッド社)により測定した。

(9) 以上の操作により得られた、前記のヒトHMGB1を含む試料、及び0ng/mLの試料の測定値、即ち検量線を、図2に示した。

なお、これらの図において、横軸は試料中に含まれるヒトHMGB1の濃度、縦軸は450nmにおける吸光度の測定値を表す。

20

但し、吸光度の測定値は、3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)の吸光度を盲検値(ブランク)として差し引いたものを表した。

#### 4. まとめ

図2より、前記のヒトHMGB1を含む試料においては、含まれるヒトHMGB1の濃度に比例して、得られる吸光度が増加しており、試料に含まれるヒトHMGB1濃度に比例した測定値が得られることが分かった。

これより、本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法により、試料中に含まれるヒトHMGB1濃度を正確かつ定量的に測定できることが確かめられた。

〔実施例10〕(本発明のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法による血清を含む試料の測定)

30

本発明のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法について、血清を含む試料に含まれるヒトHMGB1を測定して、血清を含む試料の測定時の正確性を確かめた。

#### 1. 測定試薬

実施例9の「1. 測定試薬」の「(1)パーオキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体」、「(2)マイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体」、「(3)洗浄液」、「(4)パーオキシダーゼ基質液」及び「(5)反応停止液」をそれぞれ使用した。

#### 2. 試料

40

(1) 実施例4において調製したヒトHMGB1を含む溶液を、0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)で十分に透析した。この透析後の前記ヒトHMGB1を含む溶液のタンパク質濃度をプロテインアッセイ(バイオラッド社製)で求めた。

そして、この前記ヒトHMGB1を含む溶液を、0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)で希釈して、ヒトHMGB1濃度が、80ng/mLの溶液、及び160ng/mLの溶液をそれぞれ調製した。

(2) 前記(1)で調製した2種類の溶液をそれぞれ生理食塩水で2倍に希釈した。

そして、ヒトHMGB1濃度が、40ng/mL、及び80ng/mLの血清を含まな

50

い試料をそれぞれ調製した。

(3) また、前記(1)で調製した2種類の溶液をそれぞれ、ヒトHMGB1濃度が $0\text{ ng/mL}$ であることが分かっているヒト血清で2倍に希釈した。

そして、ヒトHMGB1濃度が、 $40\text{ ng/mL}$ 、及び $80\text{ ng/mL}$ の血清を含む試料をそれぞれ調製した。

### 3. 酵素免疫測定法(サンドイッチ法)による測定

(1) 前記2で調製した各試料を、前記1の(2)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体のウェルに $100\text{ }\mu\text{L}$ 添加し、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ で12時間静置して、マイクロプレートに固相化した抗体と試料に含まれていたヒトHMGB1との抗原抗体反応を行わせた。

(2) 次に、前記(1)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルを前記1の(3)の洗浄液で洗浄した。

(3) 前記1の(1)のパーオキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体を、3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で1,000倍希釈した。

次にこれを、前記(2)の洗浄操作を行ったマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルに、 $100\text{ }\mu\text{L}$ ずつ添加した後、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ で2時間静置した。

これにより、マイクロプレートに固相化した抗体に結合したヒトHMGB1に、パーオキシダーゼ標識抗ヒトHMGB1・HMGB2抗体を結合させる反応を行わせた。

(4) その後、前記(3)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルを前記1の(3)の洗浄液で洗浄した。

(5) 次に、前記(4)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルに、前記1の(4)のパーオキシダーゼ基質液を $100\text{ }\mu\text{L}$ ずつ添加した。

そして、室温で反応させた。

(6) 前記(5)のパーオキシダーゼ基質液の添加15分後に、前記1の(5)の反応停止液を前記のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェルに $100\text{ }\mu\text{L}$ ずつ添加して、標識パーオキシダーゼの反応を停止させた。

(7) 次に、前記(6)のマイクロプレート固相化抗ヒトHMGB1抗体の各ウェル中の溶液の $450\text{ nm}$ における吸光度を、マイクロプレートリーダー(バイオラッド社)により測定した。

(8) 以上の操作により得られた、前記各試料の測定値(吸光度)、及び血清を含む試料の測定値(吸光度)[B]を血清を含まない試料の測定値(吸光度)[A]で除した比率[B/A](%)を、表3に示した。

なお、吸光度の測定値は、3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)の吸光度を盲検値(ブランク)として差し引いたものを表した。

ヒトHMGB1濃度 (ng/mL)	血清を含まない試料の 測定値(吸光度)[A]	血清を含む試料の 測定値(吸光度)[B]	比率[B/A](%)
40	0.510	0.506	99
80	1.100	1.050	96

### 4. まとめ

この表3より、血清を含む試料の測定値(吸光度)[B]を血清を含まない試料の測定値(吸光度)[A]で除した比率[B/A]は、ヒトHMGB1濃度が $40\text{ ng/mL}$ の試料においては99%であり、ヒトHMGB1濃度が $80\text{ ng/mL}$ の試料においては96%であったことが分かる。

つまり、血清を含む試料の測定値(吸光度)は、血清を含まない試料の測定値(吸光度)と、ほとんど同一である。

血清は種々の成分を含み複雑な組成(マトリックス)のものであるが、本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法は、このような血清を含む試料においても、ヒトHMGB1の濃度を正確に測定できるものであることが確かめられた。

即ち、本発明の試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法は、血清等の生体試料に含まれるヒトHMGB1の濃度を正確に測定できるものであることが確認できた。

[配列表]

## SEQUENCE LISTING

<110> Shino-test corporation

<120> A avian species-derived antibody specifically binding to  
human HMGB1, a immunological assay method for  
human HMGB1 and a immunological assay reagent for  
human HMGB1

10

<130> PCT06-04-219

<150> JP 2006-357368

<151> 2006-12-20

<160> 3

<210> 1

20

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser

1

5

10

15

30

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Cysteine bind to N-terminus of SEQ ID NO.1

<400> 2

Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser

1

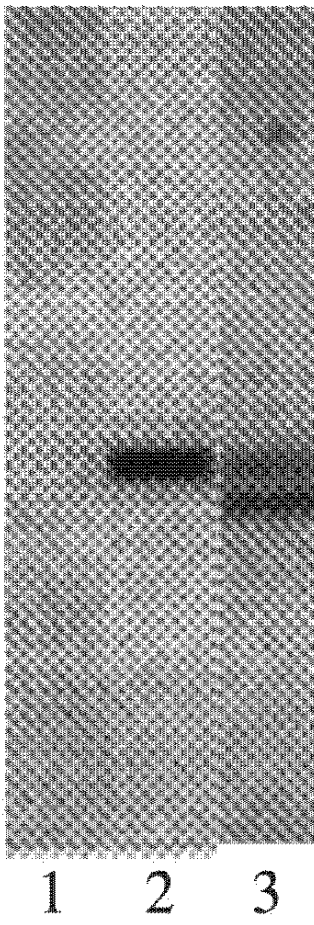
5

10

15



【図 1】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/075051
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/18, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2), UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/0099207 A1 (MEDIMMUNE, INC.), 11 May, 2006 (11.05.06), Claim 3; column 303, lines 1 to 7; Fig. 1 & WO 2007/001422 A	1-23
Y	Osamu KANEMITSU, Kotai Kogaku Nyumon, 1st edition, Chijinshokan Co., Ltd., 1994, pages 58, 59, 112	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 January, 2008 (22.01.08)		Date of mailing of the international search report 05 February, 2008 (05.02.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 7 5 0 5 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2), UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	US 2006/0099207 A1 (MEDIMMUNE, INC.) 2006.05.11, claim3, 第303欄第1-7行, Fig.1 & WO 2007/001422 A	1-23	
Y	金光修, 抗体工学入門, 初版, 株式会社地人書館, 1994, p.58, 59, 112	1-23	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 22.01.2008		国際調査報告の発送日 05.02.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4N 4045
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	禽类特异性结合人HMGB1的抗体，人HMGB1免疫学检测方法和人HMGB1免疫学检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2008075788A1</a>	公开(公告)日	2010-04-15
申请号	JP2008550205	申请日	2007-12-19
申请(专利权)人(译)	株式会社シノテスト		
[标]发明人	山田晋吾 矢ヶ部惠子		
发明人	山田 晋吾 矢ヶ部 惠子		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/24 C07K2317/11 C07K2317/23 C07K2319/61 G01N33/68 G01N2333/4703		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA20		
优先权	2006357368 2006-12-20 JP		
其他公开文献	JP5382570B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的目的是以高可能性提供对人高迁移率族盒蛋白-1 ( HMGB1 ) 具有高结合能力的抗人HMGB1抗体。本发明还提供了使用这种抗人HMGB1抗体的样品中的人HMGB1的高度灵敏的免疫测定方法和免疫测定试剂。具体而言，人HMGB1的以下式 ( I ) : Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser ( I ) 与鸟衍生的抗人HMGB1代表的氨基酸序列特异性结合。本发明提供用于对样品中的人HMGB1进行免疫学测定的抗体和方法以及以该抗体为特征的免疫学测定试剂。

【图 2】

