

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5585587号

(P5585587)

(45) 発行日 平成26年9月10日(2014.9.10)

(24) 登録日 平成26年8月1日(2014.8.1)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 D
CO 7 K 16/36	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 D
		CO 7 K 16/36	Z NA

請求項の数 11 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2011-538339 (P2011-538339)	(73) 特許権者	000003975
(86) (22) 出願日	平成22年10月13日 (2010.10.13)		日東紡績株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/067956		福島県福島市郷野日字東1番地
(87) 国際公開番号	W02011/052380	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成23年5月5日 (2011.5.5)		特許業務法人浅村特許事務所
審査請求日	平成25年4月26日 (2013.4.26)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	特願2009-247332 (P2009-247332)		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成21年10月28日 (2009.10.28)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 5. 9 k D a ペプチドの免疫学的測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体中の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する分子量5,900のペプチド(5.9kDaペプチド)に、5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と、5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを接触させて、5.9kDaペプチドと該2つの抗体またはそれらの抗体断片との免疫複合体を生成させ、得られた免疫複合体を測定することを特徴とする、5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法。

【請求項2】

5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体が5.9kDaペプチドのN末端から1~39番目のアミノ酸領域に存在するいずれかのエピトープを認識する抗体であり、5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体が、5.9kDaペプチドのN末端から18~54番目のアミノ酸領域に存在しかつ前記N末端領域を認識する抗体が認識するエピトープよりもC末端側に位置するいずれかのエピトープを認識する抗体であって、これら2つの抗体が認識するエピトープは互いに重複せず、かつ、これら2つの抗体が互いに5.9kDaペプチドとの結合を妨げない、請求項1記載の免疫学的測定方法。

【請求項3】

5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体が、5.9kDaペプチドのN末端から1~17番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体である、請求項1または2に記載の免疫学的測定方法。

10

20

【請求項 4】

5.9 kDa ペプチドの C 末端領域を認識する抗体が、5.9 kDa ペプチドの N 末端から 40 ~ 54 番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

【請求項 5】

免疫複合体を、サンドイッチ ELISA 法により測定する、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

【請求項 6】

免疫複合体を、ラテックス免疫凝集測定法により測定する、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

10

【請求項 7】

検体が、全血、血清、血漿、尿、唾液、脳脊髄液、胸水、腹水、心嚢水、関節液、または、リンパ液であって、5.9 kDa ペプチドを含む可能性がある、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

【請求項 8】

5.9 kDa ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と 5.9 kDa ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを含む、5.9 kDa ペプチドの免疫学的測定用キット。

【請求項 9】

5.9 kDa ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と 5.9 kDa ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを含み、いずれか一方の抗体またはその抗体断片が標識された標識抗体または標識抗体断片であり、他方の抗体またはその抗体断片が固相に結合された固相结合抗体または固相结合抗体断片であって、サンドイッチ ELISA 法による 5.9 kDa ペプチドを測定するための請求項 8 に記載の免疫学的測定用キット。

20

【請求項 10】

不溶性担体粒子に感作した 5.9 kDa ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と、不溶性担体粒子に感作した 5.9 kDa ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを含み、ラテックス免疫凝集測定法による 5.9 kDa ペプチドを測定するための請求項 8 に記載の免疫学的測定用キット。

30

【請求項 11】

5.9 kDa ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と、5.9 kDa ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片の 2 つの抗体またはそれらの抗体断片の両方を 1 つの不溶性担体粒子に感作し得られた 1 種類の不溶性担体粒子；該 2 つの抗体またはその抗体断片をそれぞれ別の不溶性担体粒子に感作し得られた 2 種類の不溶性担体粒子；または、これら 3 種類の不溶性担体粒子の混合物を含む、請求項 10 に記載の免疫学的測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、プロテオーム解析によって肝臓疾患用ペプチドマーカーとして利用できることが見出された、ヒトフィブリノーゲン - E 鎖、または、ヒトフィブリノーゲン 鎖の分解産物であって、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する分子量 5,900 のペプチド（以下、5.9 kDa ペプチドという）を検体から検出、あるいは、検体中の 5.9 kDa ペプチド濃度を定量するための免疫学的測定方法、および、免疫学的測定用キットに関する。また、本発明は、5.9 kDa ペプチドの免疫学的測定方法に用いられる、5.9 kDa ペプチドの N 末端領域を認識する抗体および C 末端領域を認識する抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

50

近年、網羅的なプロテオーム解析が世界規模で進行しており、プロテオーム解析を用いた疾患マーカーの探索も広く行われている（特許文献1-2、非特許文献1-3）。プロテオーム解析では、一般的に、生体由来試料中に含まれるタンパク質またはその分解産物であるペプチドをそれぞれ分離し、分離されたタンパク質またはペプチドのアミノ酸配列を質量分析装置により解析し、得られたアミノ酸配列とデータベース中のアミノ酸配列とを照合することで、試料中に含まれるタンパク質またはペプチドが同定される。疾患の有無によって生体内で発現するタンパク質は異なるため、プロテオーム解析により疾患特異的に発現量が増減することが見出されたタンパク質またはペプチドは、その疾患マーカーとして利用できる可能性を有する。

プロテオーム解析を通じて、本発明者らは、断酒目的に入院したアルコール依存症患者において経時的に採取された血清検体から、習慣飲酒に伴って増減する新規の血清ペプチドの一つとして5.9kDaペプチドを同定し、これが肝臓疾患診断マーカーとして利用できることを見出した（特許文献1、非特許文献1-2）。

また、本発明者らは、54残基からなる5.9kDaペプチドの全長ペプチドを抗原として得られた二種類のモノクローナル抗体を用いて、単離された5.9kDaペプチドの免疫学的測定が可能であることを示した（特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第2004/058966号

【特許文献2】国際公開第2004/090550号

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Nomura, F. et al., Proteomics, 4, 1187-1194, 2004

【非特許文献2】Nomura, F. et al., J. Chromatogr. B., 855, 35-41, 2007

【非特許文献3】Hanash, S. M. et al., Nature, 452, 571-579, 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

今日までに、プロテオーム解析を用いて、臨床的に有用なペプチドが多数報告されている。しかし、本発明者らの知る限りにおいて、これらの疾患マーカー候補ペプチドが、臨床診断の分野で広く一般的に使用されている免疫学的な検出方法を用いて定量測定されている報告はほとんど見受けられない。この免疫学的測定方法の確立が困難な点が、プロテオーム解析により発見されたペプチドマーカーの普及を妨げてきた。

免疫学的測定方法の確立が困難である原因として、第一に、ペプチドに対する特異的抗体の作出が困難であることが挙げられる。第二に、プロテオーム解析により発見されているペプチドは、生体由来試料に存在しているマチュアなタンパク質の分解産物であることも多く、目的とするペプチドの配列を含む目的ペプチド以外の多くの分解産物が試料中に混在していることが挙げられる。このような場合、目的とするペプチドを免疫原として抗体を作出しても、混在した分解産物との非特異的な反応が生じ、目的ペプチドを正確に定量分析ができない。

【0006】

特に、本発明が測定対象とする5.9kDaペプチドを分解により産生するヒトフィブリノーゲンは、凝固・線溶系に関わるタンパク質であり、生体内にその分解物が多数存在する。具体的には、フィブリノーゲンは、凝固系においては、トロンピンによって分解され、フィブリンモノマーを生じる。線溶系においては、フィブリンモノマーから構成されるフィブリンポリマーがプラスミンにより複数の部位で分解されるため、必然的に、多数のフィブリノーゲン分解産物を生じる。

例えば、データベースPeptide Atlas (<http://www.peptideatlas.org/>)中のビルドHuman Plasma Peptide At

10

20

30

40

50

las 2009-05によれば、ヒトフィブリノーゲン - E鎖（データベース内タンパク質名：ENSPO0000306361）の分解産物として239種類のペプチドが観測されている。

本発明者らは、前述したように54残基からなる5.9kDaペプチドの全長ペプチドを抗原とした5.9kDaペプチドに対する二種類のモノクローナル抗体の作成、および、単離された5.9kDaペプチドの免疫学的測定には成功した（特許文献1）。しかし、これらのモノクローナル抗体を用いても、多数のヒトフィブリノーゲン分解産物を含む可能性のある検体中の5.9kDaペプチドの定量を十分に正確に測定するには更に改良の余地があるものである。

【0007】

この実状に鑑み、本発明の課題は、多数のヒトフィブリノーゲン - E鎖 / 鎖分解産物を含む可能性のある検体から、5.9kDaペプチドを特異的に検出し、定量する免疫学的測定方法を提供することにある。更には、本発明の課題は、該免疫学的測定方法に用いるためのキット並びに該免疫学的測定方法および該キットに用いる5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体およびC末端領域を認識する抗体を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

5.9kDaペプチドのアミノ酸配列を含むフィブリノーゲン鎖は、2種類が知られている。すなわち、ヒトフィブリノーゲン - E鎖（以下、F - E鎖ということもある）と、ヒトフィブリノーゲン鎖（以下、F鎖ということもある）である。F - E鎖とF鎖とは、5.9kDaペプチドの配列を基準にしてN末端側上流領域のアミノ酸配列は完全に一致しているが、C末端側下流領域のアミノ酸配列が異なる。F - E鎖とF鎖の分解産物は、前述したように5.9kDa以外にも血液試料中に少なくとも200種類以上の夾雑ペプチドが存在する。

そのため、本発明者らは、当初、F - E鎖とF鎖中のいくつかのアミノ酸配列を有する複数のペプチドを抗原とする複数の抗体を製造し、それらの中で5.9kDaペプチドの配列の最近傍領域を抗原とする抗体を夾雑ペプチド除去用抗体とし、残りを5.9kDaペプチド測定用抗体として用いて、5.9kDaペプチドを測定することを試みた。すなわち、複数の夾雑ペプチド除去用抗体を用いて夾雑ペプチドを除去する操作の後に、5.9kDaペプチド測定用抗体を用いて試料中の5.9kDaペプチドを測定することを試みた。

具体的には、夾雑ペプチド除去用抗体を作成するために用いる抗原ペプチドは、(a1) F - E鎖またはF鎖中の5.9kDaペプチドのN末端側上流領域7個のアミノ酸配列（アミノ酸配列E F P S R G K）、(a2) F - E鎖中の5.9kDaペプチド領域のC末端側下流領域の13個のアミノ酸配列（アミノ酸配列R D C D D V L Q T H P S G）を認識する抗体、および、(a3) F鎖中の5.9kDaペプチド領域のC末端側下流領域13個のアミノ酸配列（アミノ酸配列R G I H T S P L G K P S L）とした。また、5.9kDaペプチド測定用抗体として、最終的には、(b1) 5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体、(b2) 5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体、を用いることが良好であった。

【0009】

しかし、驚くべきことに、前述した夾雑ペプチドの除去操作を経ず、5.9kDaペプチドに5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体と5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体とを接触させて得られる、5.9kDaペプチドと二つの抗体との免疫複合体を免疫学的に測定するだけで、通常のウエスタンブロッティング法では検体中にこれら二つの抗体が結合する夾雑ペプチドが検出されるにもかかわらず、前述した夾雑ペプチド除去操作で除去されるべき夾雑ペプチドの影響を受けず、多数のヒトフィブリノーゲン - E鎖 / 鎖分解産物を含む可能性のある検体から実質的に5.9kDaペプチドのみを測定することが可能なことを本発明者らは見出し、本発明を完成させるに至った。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

従って、本発明は、以下に挙げる検体中の 5 . 9 k D a ペプチドの免疫学的測定方法、免疫学的測定用キットおよびそれらに用いる抗体に関する。

[1] . 検体中の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する分子量 5 , 9 0 0 のペプチド (5 . 9 k D a ペプチド) に、 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と、 5 . 9 k D a ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを接触させて、 5 . 9 k D a ペプチドと該 2 つの抗体またはそれらの抗体断片との免疫複合体を生成させ、得られた免疫複合体を測定することを特徴とする、 5 . 9 k D a ペプチドの免疫学的測定方法。

[2] . 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端領域を認識する抗体が 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端から 1 ~ 3 9 番目のアミノ酸領域に存在するいずれかのエピトープを認識する抗体であり、 5 . 9 k D a ペプチドの C 末端領域を認識する抗体が、 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端から 1 8 ~ 5 4 番目のアミノ酸領域に存在しかつ前記 N 末端領域を認識する抗体が認識するエピトープよりも C 末端側に位置するいずれかのエピトープを認識する抗体であって、これら 2 つの抗体が認識するエピトープは互いに重複せず、かつ、これら 2 つの抗体が互いに 5 . 9 k D a ペプチドとの結合を妨げない、上記 [1] 記載の免疫学的測定方法。

[3] . 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端領域を認識する抗体が、 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端から 1 ~ 1 7 番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体である、上記 [1] または [2] に記載の免疫学的測定方法。

[4] . 5 . 9 k D a ペプチドの C 末端領域を認識する抗体が、 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端から 4 0 ~ 5 4 番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体である、上記 [1] から [3] のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[5] . 免疫複合体を、サンドイッチ E L I S A 法により測定する、上記 [1] から [4] のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[6] . 免疫複合体を、ラテックス免疫凝集測定法により測定する、上記 [1] から [4] のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[7] . 検体が、全血、血清、血漿、尿、唾液、脳脊髄液、胸水、腹水、心嚢水、関節液、または、リンパ液であって、 5 . 9 k D a ペプチドを含む可能性がある、上記 [1] から [6] のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

[8] . 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と 5 . 9 k D a ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを含む、 5 . 9 k D a ペプチドの免疫学的測定用キット。

[9] . 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と 5 . 9 k D a ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを含み、いずれか一方の抗体またはその抗体断片が標識された標識抗体または標識抗体断片であり、他方の抗体またはその抗体断片が固相に結合された固相結合抗体または固相結合抗体断片であって、サンドイッチ E L I S A 法による 5 . 9 k D a ペプチドを測定するための上記 [8] に記載の免疫学的測定用キット。

[1 0] . 不溶性担体粒子に感作した 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と、不溶性担体粒子に感作した 5 . 9 k D a ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片とを含み、ラテックス免疫凝集測定法による 5 . 9 k D a ペプチドを測定するための上記 [8] に記載の免疫学的測定用キット。

[1 1] . 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片と、 5 . 9 k D a ペプチドの C 末端領域を認識する抗体またはその抗体断片の 2 つの抗体またはそれらの抗体断片の両方を 1 つの不溶性担体粒子に感作し得られた 1 種類の不溶性担体粒子；該 2 つの抗体またはそれらの抗体断片をそれぞれ別の不溶性担体粒子に感作し得られた 2 種類の不溶性担体粒子；または、これら 3 種類の不溶性担体粒子の混合物を含む、上記 [1 0] に記載の免疫学的測定用キット。

[1 2] . 5 . 9 k D a ペプチドの N 末端から 1 ~ 1 7 番目のアミノ酸領域に存在する

10

20

30

40

50

エピトープを認識する抗体またはその抗体断片。

[1 3] . 5 . 9 k D a ペプチドのN末端から40～54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体またはその抗体断片。

【発明の効果】

【0011】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法により、多数の夾雑ペプチドを含む可能性のある検体から、簡便かつ正確に5.9kDaペプチドを特異的に測定することが可能である。質量分析装置を用いた5.9kDaペプチドの定量測定も可能であるが、より簡便で同等の精度を有し、かつ、スループットの高い本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法を用いて、肝臓疾患診断用ペプチドマーカーである5.9kDaペプチドを定量することで、習慣飲酒者や問題飲酒者が肝臓疾患を発症する可能性や、飲酒以外が原因の肝臓疾患、例えば、肝炎、肝硬変、または、脂肪肝の診断を容易に行うことが可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】実施例2で作成された、一次抗体にanti-5.9Cを用い、二次抗体にanti-5.9Nを用いた本発明のサンドイッチELISA測定系と、比較例1で作成された、一次抗体にanti-5.9W1を用い、二次抗体にanti-5.9W2を用いたサンドイッチELISA測定系を用いて、血清中の5.9kDaペプチド濃度を測定したときの検量線を示した図である。縦軸が、波長450nmにおける吸光度を表し、横軸が、試料を1/333に希釈する前の5.9kDaペプチド濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を表している。

20

【図2】同一の血清試料中の5.9kDaペプチド濃度を、本発明のELISA測定で定量した結果とSI-MS法を用いて定量した結果との相関を示した図である。縦軸が、本発明のELISA測定により測定された5.9kDaペプチド濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)、横軸が、SI-MS法により算出された5.9kDaペプチド濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を表している。白丸は健常者から得られた血清8検体、黒丸はアルコール依存症患者から得られた血清8検体を表している。

【図3】同一の血清試料中の5.9kDaペプチド濃度を、本発明のラテックス免疫凝集測定(LATEX測定)で定量した結果と本発明のELISA測定で定量した結果との相関を示した図である。縦軸が、本発明のLATEX測定により測定された5.9kDaペプチド濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)、横軸が、本発明のELISA測定により測定された5.9kDaペプチド濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を表している。

30

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットにより測定される5.9kDaペプチドは、配列番号1に示される54アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有し、その理論分子量が5904.2であるペプチドである。該ペプチドは、ヒトフィブリノーゲン-E鎖およびヒトフィブリノーゲン鎖のN末端から576～629番目のアミノ酸領域に存在し、ヒトフィブリノーゲン-E鎖およびヒトフィブリノーゲン鎖が分解されることによって産生される。

40

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットにより測定される5.9kDaペプチドは、習慣飲酒などの要因に伴って生体由来試料からの検出量が減少する肝臓疾患診断用ペプチドマーカーである。

【0014】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法の対象となる検体としては、5.9kDaペプチドを含む可能性がある生体由来試料であれば特に制限されず、各種体液や細胞組織抽出液等が挙げられ、5.9kDaの臨床マーカーとしての機能および試料採取の簡便性の観点から、肝臓疾患が疑われる患者から採取された体液が好ましい。ここで、体液としては、全血、血清、血漿、尿、唾液、リンパ液、脳脊髄液、または、腹水・胸水・心

50

囊水・関節液を含む穿刺液などを挙げられ、中でも、凝固線溶系に関わるフィブリノーゲンおよびフィブリンと、これらから産生される5.9kDaペプチドを含む多種の分解産物とを含有する可能性の高い血液由来試料、つまり、全血、血漿、血清が特に好ましい。とりわけ、本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法により測定される検体としては、肝臓疾患が疑われる患者から採取された血清が好適である。

【0015】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体および5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体は、5.9kDaペプチド中に存在し得るいくつかのエピトープのうち、互いに重複しないエピトープを認識し、かつ、互いに5.9kDaペプチドとの結合を妨げない抗体である。ここで、本発明において用いられる5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体の認識するエピトープは、本発明において用いられる5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体の認識するエピトープよりもN末端側に存在する。

10

ここで、本発明の5.9kDaペプチド免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体および5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体は、5.9kDaペプチドに特異的な免疫学的測定が可能な限りにおいて、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。また、該抗体のアイソタイプは特に限定されず、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMのアイソタイプの抗体が挙げられ、抗体精製の容易さの観点からは、IgG型の抗体が好ましい。そして、該抗体を得るための製造方法・産生物についても特に限定されず、例えば、マウス由来ハイブリドーマ細胞株を用いた該抗体の製造が挙げられる。

20

【0016】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体および5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体に関して、エピトープとは、通常6~11個程度のアミノ酸残基からなる抗原の分子表面に存在するアミノ酸領域であって、抗体が認識して結合する抗原の特定の構造単位を指す。通常、1つの抗原は複数のエピトープを有する。

【0017】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体および5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体に関して、2つの抗体が互いに5.9kDaペプチドとの結合を妨げないとは、例えば、一方の抗体が5.9kDaペプチド中のエピトープを認識し結合した場合に、その抗体が他方の抗体が認識するエピトープの全部または一部を立体的に覆うことで他方の抗体のエピトープ認識を阻害する、あるいは、他方の抗体がエピトープを認識して結合する際に2つの抗体が接触するなどの態様で、一方の抗体の5.9kDaペプチドへの結合が他方の抗体の結合にとって障害となることがないことをいう。

30

ここで、抗原中の重複しないエピトープを認識する抗体が互いに一方の抗原との結合を妨げないために2つの重複しないエピトープが有すべき間隔は、抗原が取りうる立体構造に依存するが、好ましくは2つのエピトープ間に6残基以上のアミノ酸領域、より好ましくは20残基以上のアミノ酸領域が存在し、さらに好ましくは2つのエピトープ間のアミノ酸領域中にターン構造をとるアミノ酸領域が含まれる。2つのエピトープ間にある程度の間隔が存在することにより、2つの抗体が互いの立体障害になる可能性が減少する。さらに、4つのアミノ酸残基により形成されペプチド鎖が急激にターンするターン構造が重複しない2つのエピトープ間に存在することで、それぞれのエピトープを認識する抗体が互いに接触する可能性が減少する。

40

【0018】

実施例において詳述するが、配列番号1に示される5.9kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から1~17番目または40~54番目のアミノ酸領域にエピトープが存在す

50

ることが確認されたことから、本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる5.9 kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体は、好ましくは、配列番号1に示される5.9 kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から1~39番目のアミノ酸領域に存在するいずれかのエピトープを認識する抗体であり、より好ましくは、配列番号1に示される5.9 kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から1~17番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体である。

一方、本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる5.9 kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体は、好ましくは、配列番号1に示される5.9 kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から18~54番目のアミノ酸領域に存在するいずれかに存在し、かつ、前記5.9 kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体が認識するエピトープよりもC末端側に位置するエピトープを認識する抗体であり、より好ましくは、配列番号1に示される5.9 kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から40~54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体である。

【0019】

本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9 kDaペプチドのN末端から1~17番目または40~54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体としては、配列番号1に示される5.9 kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から1~17番目または40~54番目のアミノ酸配列を含むペプチド、または、該アミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入から選ばれる少なくとも1種の変異を有し、かつ、該アミノ酸配列の連続した90%以上を含むアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として得られる抗体、もしくは、該抗原とするペプチドと担体とを結合させて得られる複合体を免疫原として得られる抗体が挙げられる。

ここで、抗原とするペプチドは、例えば、公知のペプチド合成技術を用いて、化学合成して入手することができる。

また、上記担体としては、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)、ニワトリ血清アルブミン、ポリ-L-リジン、ポリアラニルリジン、ジバルミチルリジン、破傷風トキソイドまたは多糖類等の担体として公知なものをを用いることができる。ここで、担体と抗原とするペプチドを結合させる手法としては、例えば、抗原とするペプチドに含まれる、あるいは、抗原とするペプチドを人工的に導入したCys残基のSH基を利用して担体と抗原とするペプチドとを結合させるMBS(マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド)法を挙げることができる。

本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9 kDaペプチドのN末端から1~17番目および40~54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。

【0020】

本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9 kDaペプチドのN末端から1~17番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体として、好ましくは、配列番号1に示される5.9 kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から1~17番目のアミノ酸配列を含む抗原ペプチドのN末端またはC末端に、抗原ペプチドと上記担体とを結合させるために用いられるCys残基を導入したペプチドと上記担体との複合体を免疫原として得られる抗体、より好ましくは、その抗原ペプチドのC末端に、抗原ペプチドと担体との結合のために用いられるCys残基を導入したペプチド、すなわち配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するペプチドと、担体であるKLHとの複合体を免疫原として得られる抗体、特に好ましくは、本発明者らが樹立したハイブリドーマ5.9N-06(国際受託番号: NITE BP-797)により産生されるモノクローナル抗体が挙げられる。

【0021】

一方、本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キット

10

20

30

40

50

に用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端から40～54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体として、好ましくは、配列番号1に示される5.9kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から40～54番目のアミノ酸配列を含む抗原ペプチドのN末端またはC末端に、抗原ペプチドと上記担体とを結合させるために用いられるCys残基を導入したペプチドと上記担体との複合体を免疫原として得られる抗体、より好ましくは、その抗原ペプチドのN末端に、抗原ペプチドと担体との結合のために用いられるCys残基を導入したペプチド、すなわち配列番号3に示されるアミノ酸配列を有するペプチドと、担体であるKLHとの複合体を免疫原として得られる抗体、特に好ましくは、本発明者らが樹立したハイブリドーマ5.9C-02(国際受託番号: NITE BP-798)により産生されるモノクローナル抗体が挙げられる。

10

【0022】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットにおいては、5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体の抗体断片、および、5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体の抗体断片を、それぞれの抗体が認識するエピトープを認識する限りにおいて同様に用いることができる。また、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端から1～17番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体または5.9kDaペプチドのN末端から40～54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体についても、それぞれの抗体が認識するエピトープを認識する限りにおいて、それらの抗体断片も同様に提供される。

20

これらの抗体断片としては、特に限定されない。具体的には、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Diabody、dsFv、相補性決定領域(以下、CDRということもある)を含むペプチドが挙げられる。

Fabは、IgG型抗体をタンパク質分解酵素パピインで処理して得られる断片のうち、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド(S-S)結合で結合した分子量約5万Daの抗原に対する特異的結合能力を有する抗体断片である。本発明において、Fabは、例えば、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端から1～17番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体または5.9kDaペプチドのN末端から40～54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体をタンパク質分解酵素パピインで処理して得ることができる。

30

F(ab')₂は、IgG型抗体をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万Daの抗原に対する特異的結合能力を有する抗体断片である。本発明において、F(ab')₂は、例えば、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端から1～17番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体または5.9kDaペプチドのN末端から40～54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはS-S結合させ、作成することができる。

Fab'は、前記F(ab')₂のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万Daの抗原に対する特異的結合能力を有する抗体断片である。本発明において、F(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。

40

scFvは、1本のH鎖可変領域(VH)と1本のL鎖可変領域(VL)とを12残基以上の適当なペプチドリンカー(P)を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原に対する特異的結合能力を有する抗体断片である。

Diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対してscFvを上回る反応性を有する、もしくは、異なる抗原に対して同様の特異的結合能力を有する抗体断片である。

dsFvは、H鎖可変領域およびL鎖可変領域中のそれぞれ1アミノ酸残基をCys残基に置換したポリペプチドを該Cys残基間のS-S結合を介して結合させたものである。

50

C D Rを含むペプチドは、H鎖可変領域またはL鎖可変領域のC D Rの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のC D Rを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

【0023】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される種々の抗体は、それぞれの抗原、例えば、それぞれの抗体が認識するエピトープを含んだ5.9kDaペプチド断片、その変異体、5.9kDaペプチドの全長ペプチド、5.9kDaペプチドの全長ペプチドの変異体、もしくはこれらのペプチドと上記担体との複合体を免疫原として動物を免疫した後、ポリクローナル抗体に関しては、その動物の血清から公知の方法で調製可能であり、モノクローナル抗体に関しては、その動物の脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより得られるハイブリドーマから回収および精製を経て入手することができる。

ここで、免疫原とされるペプチドは、ヒト血液等の生体由来試料から精製して入手してもよいが、公知のペプチド合成技術を用い、化学合成して入手してもよい。これに限らずリコンビナントにより産生したペプチドも抗原として用いることができる。

【0024】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される種々の抗体を産生するハイブリドーマは、公知の方法、例えば、KohlerとMilsteinの方法(Kohler, G. & Milstein, C. Nature, 256, 495-497, 1975)により作成することができる。即ち、前記免疫原を公知のアジュバントと共に混和した後、作成したアジュバント液をマウス、ラット、ハムスター、ヤギ等の各種免疫動物に時間を空けて必要回数免疫し、抗体価の上昇を確認後、その動物の脾臓等に由来する抗体産生細胞とマウス、ラット等の哺乳動物の骨髄腫細胞とを細胞融合してハイブリドーマが作成される。

本発明者が作成し樹立した、前述した本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端から1~17番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体を産生するハイブリドーマ5.9N-06、および、前述した本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9kDaペプチドのC末端から40~54番目のアミノ酸領域に存在するエピトープを認識する抗体を産生するハイブリドーマ5.9C-02は、〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)特許微生物寄託センター(NPMD)に、2009年8月19日に国内寄託され、受託番号として、それぞれNITE P-797およびNITE P-798が付与されている。その後、これらの国内寄託は、2010年8月20日付でブダペスト条約に基づく国際寄託への移管請求がなされ、2010年9月13日付で国際受託番号として、それぞれNITE BP-797およびNITE BP-798が付与されている。

【0025】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される種々のモノクローナル抗体をハイブリドーマから得るためには、まず、作成されたハイブリドーマに対して選択培地を用いた選択を行い、選択されたハイブリドーマの培養上清をELISA法のような適当な免疫測定法で分析し、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する。次いで、選択したクローンを限界希釈法のような方法でクローニングを行い、モノクローナル化する。続いて、クローニングされたハイブリドーマを通常細胞培養に用いられる培地、例えばMEM、RPMI1640、ASF、Scloneなどで培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を回収することができる。ハイブリドーマが由来する動物、ヌードマウスをあらかじめプリスタン処理しておき、その動物に細胞を腹腔内注射することによって腹水を貯留させ、その腹水からモノクローナル抗体を回収することもできる。最後に、上清、腹水よりモノクローナル抗体を回収する方法としては、通常の方法を用いることができ

る。例えば、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析法やクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、一般的にプロテインGなどによるアフィニティークロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0026】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される種々の抗体またはその抗体断片は、これらをコードするDNA配列を公知の方法で解析した後、そのDNA配列を含む遺伝子組換えベクターを作成し、作成された遺伝子組換えベクターを適当な宿主、例えば、大腸菌や酵母、に導入し、得られた遺伝子組換え体から該抗体またはその抗体断片を回収し、精製することによっても入手することができる。

10

【0027】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法において生成する免疫複合体は、前述した本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端を認識する抗体またはその抗体断片および5.9kDaペプチドのC末端を認識する抗体またはその抗体断片がそれぞれ同時に5.9kDaペプチドに接触・結合することによって、あるいは、一方の抗体またはその抗体断片が5.9kDaペプチドに接触・結合して形成された5.9kDaペプチドと抗体またはその抗体断片との複合体にさらに他方の抗体またはその抗体断片が接触・結合することによって形成される、5.9kDaペプチドと2つの抗体またはそれらの抗体断片との複合体である。ここで、形成される複合体は、3量体であってもそれ以上の多量体であってもよい。

20

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法において生成する免疫複合体において、複合体を形成する前述した本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端を認識する抗体またはその抗体断片および5.9kDaペプチドのC末端を認識する抗体またはその抗体断片のうち一方が、その抗原認識能を維持する態様で、固相、即ち、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ナイロン、ポリメタクリレートなどを素材とする基材、例えば、プラスチックチューブやマイクロタイタープレートに、直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーなどを利用して結合していてもよい。また、上記固相に結合していないもう一方の抗体またはその抗体断片が、その抗原認識能を維持する態様で、標識物質、例えば、HRP等の標識酵素、金コロイド、ユーロピウム等の標識金属、FTTC、ローダミン、Texas Red、Alexa、GFP等の化学的、生物的各種蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{51}Cr 等の放射性物質などで標識されていてもよい。

30

あるいは、本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法において生成する免疫複合体において、前述した本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9kDaペプチドのN末端を認識する抗体またはその抗体断片および5.9kDaペプチドのC末端を認識する抗体またはその抗体断片の両方が、その抗原認識能を維持する態様で、不溶性担体粒子、例えば、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体のような有機高分子のラテックスやシリカ、アルミナのような無機酸化物等に直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーなどを利用して結合されていてもよい。

40

【0028】

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法において生成する免疫複合体を測定する手段としては、酵素免疫測定法(ELISA法)、免疫比濁測定法(TIA法)、ラテックス免疫凝集測定法(LATEX法)、電気化学発光法、蛍光法などを例示することができる。またイムノクロマト法、試験紙を利用した方法も有効である。

優れた感度および定量性を有する点からは、本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法において生成する免疫複合体を測定する手段としては、ELISA法が好ましく、サンドイッチELISA法がより好ましい。

50

また、測定が簡便かつ迅速である点からは、本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法において生成する免疫複合体を測定する手段としては、ラテックス免疫凝集測定法が好ましい。

【0029】

本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法において行われるサンドイッチELISA法による測定は、前述した本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9 kDaペプチドのN末端を認識する抗体またはその抗体断片および5.9 kDaペプチドのC末端を認識する抗体またはその抗体断片のうち一方が、その抗原認識能を維持する態様で、標識物質、例えば、HRP等の標識酵素、金コロイド、ユーロピウム等の標識金属、FTTC、ローダミン、Texas Red、Alexa、GFP等の化学的、生物的各種蛍光物質、³²P、⁵¹Cr等の放射性物質などで標識された標識抗体または標識抗体断片を用いる。さらに、本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法において行われるサンドイッチELISA法による測定は、上記標識抗体または標識抗体断片に用いられなかったもう一方の抗体またはその抗体断片が、その抗原認識能を維持する態様で、固相、即ち、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ナイロン、ポリメタクリレートなどを素材とする基材、例えば、プラスチックチューブやマイクロタイタープレートに、直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーなどを利用して結合された固相結合抗体または固相結合抗体断片を用いる。

10

本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法において行われるサンドイッチELISA法による測定は、前記標識抗体または標識抗体断片と固相結合抗体または固相結合抗体断片とを用いて、公知の方法で行うことができる。即ち、先ず、固相結合抗体または固相結合抗体断片に検体を加えて反応させ、一定時間反応させた後、固相を洗浄し、標識抗体または標識抗体断片を加えてさらに2次反応させる。次に、固相を再度洗浄し、発色基質などを加えて反応させる。ここで、発色基質としては、標識抗体または標識抗体断片の標識物質としてHRPを用いた場合、既知のDAB、TMBなどを用いることができる。

20

【0030】

本発明で提供されるサンドイッチELISA法による5.9 kDaペプチド免疫学的測定用キットは、前述した本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法において行われるサンドイッチELISA法による測定で用いられる標識抗体または標識抗体断片および固相結合抗体または固相結合抗体断片を具備する。さらに、本発明で提供されるサンドイッチELISA法による5.9 kDaペプチド免疫学的測定用キットは、基質、検体希釈液、洗浄液、陽性コントロール、陰性コントロール等を含んでもよい。ここで、多検体を簡便かつ迅速に測定するために、自動ELISA装置で測定可能な免疫学的測定キットとして構成することが好ましい。

30

【0031】

本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法において行われるラテックス免疫凝集測定法による測定は、不溶性担体粒子に感作した前述の本発明の5.9 kDaペプチドの免疫学的測定方法および免疫学的測定用キットに用いられる、もしくは、本発明で提供される5.9 kDaペプチドのN末端を認識する抗体またはその抗体断片と5.9 kDaペプチドのC末端を認識する抗体またはその抗体断片とを用いる。ここで、不溶性担体粒子への抗体またはその抗体断片の感作とは、その抗原認識能を維持する態様で、直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーなどを利用して不溶性担体粒子に抗体またはその抗体断片を結合させることをいう。不溶性担体粒子としては、例えば、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体のような有機高分子のラテックスやシリカ、アルミナのような無機酸化物などが挙げられる。

40

不溶性担体粒子に感作した前記2つの抗体またはそれらの抗体断片の使用態様としては、前記2つの抗体またはそれらの抗体断片の両方を1つの不溶性担体粒子に感作し得られた1種類の不溶性担体粒子のみを用いても、前記2つの抗体またはそれらの抗体断片をそ

50

れぞれ別の不溶性担体粒子に感作し得られた2種類の不溶性担体粒子を混合して用いても、これら3種類の不溶性担体粒子を混合して用いてもよい。

本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法において行われるラテックス免疫凝集測定法による測定は、前記2種類の不溶性担体粒子を用いて、公知の方法で行うことができる。即ち、検体に前記2種類の不溶性担体粒子を加えて反応させ、一定時間反応させた後、形成された凝集を測定する。

【0032】

本発明で提供されるラテックス免疫凝集測定法による5.9kDaペプチド免疫学的測定用キットは、前述した本発明の5.9kDaペプチドの免疫学的測定方法において行われるラテックス免疫凝集測定法による測定で用いられる不溶性担体粒子に感作した5.9kDaペプチドのN末端を認識する抗体またはその抗体断片と5.9kDaペプチドのC末端を認識する抗体またはその抗体断片とを具備する。さらに、本発明で提供されるラテックス免疫凝集測定法による5.9kDaペプチド免疫学的測定キットは、検体希釈液、陽性コントロール、陰性コントロール等を含んでもよい。ここで、多検体を簡便かつ迅速に測定するために、自動ラテックス免疫凝集測定装置で測定可能な免疫学的測定キットとして構成することが好ましい。

【0033】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0034】

5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体、および、5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体の作成およびその特性の同定

(1) 免疫原の作成

5.9kDaペプチドのN末端領域を認識する抗体、および、5.9kDaペプチドのC末端領域を認識する抗体を作成するために、5.9kDaペプチドのN末端またはC末端のアミノ酸配列を含むペプチドを含む免疫原を作成した。

具体的には、まず、配列番号1に示される5.9kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から1~17番目の17アミノ酸残基からなる抗原ペプチド(以下、5.9Nという)のC末端に、抗原ペプチドと担体とを結合するために用いられるCys残基を導入したペプチド、すなわち配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。また、5.9kDaペプチドのC末端からの15残基、すなわち、配列番号1に示される5.9kDaペプチドのアミノ酸配列のN末端から40~54番目の15アミノ酸残基からなる抗原ペプチド(以下、5.9Cという)のN末端に、抗原ペプチドと担体とを結合するために用いられるCys残基を導入したペプチド、すなわち配列番号3に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。

次に、これらのペプチドのN末端Cys残基またはC末端Cys残基に担体であるスカシ貝ヘモシアニン(KLH)を、MBS(マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド)法によりコンジュゲートし、免疫原として用いる複合体を作成した。

【0035】

(2) マウスへの免疫

上記(1)で得られた免疫原をマウスに投与し、免疫マウスを得た。

具体的には、まず、上記(1)で作成した5.9N、もしくは、5.9Cを含む免疫原をそれぞれ1mg/mlとなるようにPBSで溶解した。次に、50μl(50μg)を取ってフロインド完全アジュバンド(和光純薬工業)50μlと乳化するまでよく混和した。続いて、調製した懸濁液をBalb/c6週齢雌マウス(日本クレアー)にジエチルエーテル麻酔科にてそれぞれ腹腔内投与した。2週間後には同量の5.9N、もしくは、5.9Cを含む免疫原をフロインド不完全アジュバンド(和光純薬工業)と混和し、フロインド完全アジュバンドのときと全く同様の操作により乳化懸濁液とし、それぞれマウスに投与した。以降2週間毎に同様の操作を行ない、4回目には最終免疫として5.9N、

10

20

30

40

50

もしくは、5.9Cを含む免疫原50 μ l(50 μ g)をマウス尾静脈注射により投与した。

【0036】

(3) ハイブリドーマの確立

上記(2)で得られた免疫マウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞を融合してハイブリドーマを作成した。

具体的には、まず、5.9N、または、5.9Cを含む免疫原を最終免疫した3日後、それぞれのマウスよりジエチルエーテル麻酔下に外科的摘出された脾臓を無菌的に分散し、脾臓細胞を調製した。細胞融合はケーラーとミルスタインの方法(Kohler, G. & Milstein, C. Nature, 256, 495-497, 1975)に従って行われ、ポリエチレングリコール(PEG 4000)(メルク)を用いて脾臓細胞と骨髄腫細胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1)を融合した。融合比率は脾臓細胞数 8×10^7 個に対して骨髄腫細胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1) 2×10^7 個で、約4:1であった。融合細胞は10% FCS(INVITROGEN) - MEM(IRVINE) HAT(コスモバイオ)培地に分散し96穴マイクロタイターカルチャープレート(住友ベークライト)に分注して37、5%CO₂条件にて培養した。

【0037】

(4) コロニーのスクリーニング

上記(3)のハイブリドーマ確立の約2週間後にコロニーの生育を確認して、抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。

具体的には、まず、スクリーニング用プレートを作成するために上記(1)にて合成した5.9N、または、5.9CをPBS中に溶解させ、2 μ g/100 μ l/wellとなるように96穴マイクロタイタープレート(Nunc)に分注した。次に、プレートを4で2晩静置した後に0.05% Tween 20(PBS-T)(和光純薬工業)を含むPBSで3回洗浄し、非特異的応答を抑えるためにPBSにて4倍希釈したN-102(日本油脂)溶液を200 μ l分注して、更に4で1晩静置した。続いて、完成したプレートをPBS-Tで1回洗浄した後に、上記(3)で得られたハイブリドーマの培養上清100 μ lを反応させ、更に洗浄を行った後に二次抗体であるHRP標識抗マウスIgG抗体(Zymed)を加えて反応させた。洗浄後にHRPの発色基質である、TMB溶液(カイノス)を100 μ l加えて一定時間の発色後、1N硫酸(和光純薬工業)を停止液として更に100 μ l添加し、測定波長450nmにて吸光度を測定した。

前記スクリーニングにより、陽性と判定されたクローンについて、限界希釈法によって再クローニングを行い、上清を再度確認した。

結果として、5.9Nを感作したプレートと反応するハイブリドーマ5.9N-06、および、5.9Cを感作したプレートと反応するハイブリドーマ5.9C-02を得た。なお、得られたハイブリドーマの培養上清はコントロールのBSAプレートとは全く反応しなかった。

ハイブリドーマ5.9N-06および5.9C-02は、〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)特許微生物寄託センター(NPMD)に、2009年8月19日に国内寄託し、受託番号として、それぞれNITE P-797およびNITE P-798が付与された。その後、これらの国内寄託を、2010年8月20日付でブダペスト条約に基づく国際寄託への移管請求を行い、2010年9月13日付で国際受託番号として、それぞれNITE BP-797およびNITE BP-798が付与された。

【0038】

(5) 抗体のアイソタイプ同定

上記(4)で得られたハイブリドーマ5.9N-06、および、ハイブリドーマ5.9C-02がそれぞれ産生するモノクローナル抗体anti-5.9N、および、anti-5.9Cのアイソタイプを同定した。

具体的には、モノクローナル抗体タイピングキット（アマシャムファルマシア）を用いて、添付の使用説明書に従い、それぞれのハイブリドーマが産生する抗体のアイソタイプを検定した。

結果として、モノクローナル抗体 *a n t i - 5 . 9 N*、および、*a n t i - 5 . 9 C* は、表 1 に示すアイソタイプに属することを確認した。

【表 1】

モノクローナル抗体のアイソタイプ

モノクローナル抗体名	抗体クラス	抗体サブクラス	軽鎖タイプ
<i>a n t i - 5 . 9 N</i>	I g G	I g G 1	κ
<i>a n t i - 5 . 9 C</i>	I g G	I g G 1	κ

10

【0039】

(6) 抗体の精製

ハイブリドーマ 5.9N-06、および、ハイブリドーマ 5.9C-02 の培養上清を、Protein G Sepharose Fast Flow (GEヘルスケア) を用いて、添付の使用説明書に従い精製し、モノクローナル抗体 *a n t i - 5 . 9 N*、および、*a n t i - 5 . 9 C* を得た。

【実施例 2】

20

【0040】

E L I S A 法を用いた 5.9 k D a ペプチド測定系の構築と検体中の 5.9 k D a ペプチド測定

(1) ウエスタンブロッティング法による抗体の 5.9 k D a ペプチドとの反応性確認

ウエスタンブロッティング法を用いて、実施例 1 で作成した 2 種類の 5.9 k D a ペプチドの N 末端または C 末端に結合する抗体が、5.9 k D a ペプチドの全長ペプチドに結合することを、以下に具体的に記載する方法により確認した。

【0041】

(1-1) S D S - P A G E ・ブロッティング

合成した 5.9 k D a ペプチドを 0.5 μ g ずつ非還元下にて S D S - P A G E を行った。その後、P V D F メンブレン (ミリポア) へ転写し、1 時間ブロッキングを行った。

30

【0042】

(1-2) 一次抗体反応

実施例 1 の (6) で精製した 2 種の抗体 (*a n t i - 5 . 9 N* を 0.05 mg / ml 含む P B S - T、*a n t i - 5 . 9 C* を 0.005 mg / ml 含む P B S - T) をそれぞれ上記 (1-1) で作成した 5.9 k D a ペプチドを転写したメンブレンに 1 時間反応させた。

【0043】

(1-3) 二次抗体反応

メンブレンを P B S - T にて洗浄後、二次抗体として H R P 標識抗マウス IgG 抗体 (Z y m e d) を、それぞれ 30 分間反応させた。

40

【0044】

(1-4) 発色

P B S - T にて洗浄後、メンブレン用 T M B 溶液 (和光純薬工業) にて検出を行なった。

【0045】

(1-5) 結果

作成した 2 種類の抗体はいずれも 5.9 k D a ペプチドを認識することを確認した。

【0046】

(2) E L I S A 法を用いた 5.9 k D a ペプチド測定系の構築

50

実施例1で作成した抗体を用いたサンドイッチELISA測定系を作成し、作成されたELISA測定系で抗原抗体反応が濃度依存的に測定されることを、以下に具体的に記載する方法により確認した。

【0047】

(2-1) 抗体結合プレートの作成

実施例1の(6)で精製したモノクローナル抗体 anti-5.9C を $0.5 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l} / \text{well}$ の濃度でマキシソーププレート (Nunc) に一晩感作した。PBS で3回洗浄後、蒸留水で5倍希釈したN-102 (日本油脂) にてブロッキングを行なった。

【0048】

(2-2) HRP 標識抗体の作成

実施例1の(6)で精製したモノクローナル抗体 anti-5.9N に、Peroxidase Labeling Kit-NH₂ (Dojindo Molecular Technologies) を用いて、HRP 標識をした。ここで、標識抗体濃度は $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ とした。

【0049】

(2-3) ELISA 測定系の評価

上記(2-2)で作成したプレートと標識抗体を使用し、サンドイッチELISA測定系の有効性を評価した。

なお、試料として用いた血清はインフォームドコンセントを得た後、連結不可能匿名化し使用した。また、試料中の5.9 kDaペプチド濃度は以下に示すSI-MS法により算出した。

SI-MS法を用いて含有5.9 kDaペプチド濃度を算出した血清を試料として、サンドイッチ測定系を用いて測定したところ、5.9 kDaペプチドの濃度依存的に吸光度が上昇することを確認した。

【0050】

SI-MS法：

磁性ビーズとMALDI-TOF/TOF MSを組み合わせたClinProtTM システム (Bruker Daltonics) を用いて試料中の5.9 kDaペプチド濃度を算出した。

具体的には、まず、血清に5.9 kDaペプチドに対する安定同位体ペプチド (SI-5.9 kDa) を内部標準として一定量添加した。次に、陽イオン交換磁気ビーズ (WCX) (Bruker Daltonics) に結合させ溶出させた。続いて、溶出させた試料をそのままAnchorChip (Bruker Daltonics) に調整後、AutoFlex (登録商標) II (MALDI-TOF/TOF) により測定を行った。

ここで、解析はFlexAnalysisTM software 2.4 (Bruker Daltonics) を用いてベースライン補正とスムージング処理を行い、SI-5.9 kDaに対応するピーク強度と血清中の5.9 kDaペプチドに対応するピーク強度との比から、添加したSI-5.9 kDa量を基準に血清中の5.9 kDaペプチド濃度を算出した。

【0051】

(3) ヒト血清中の5.9 kDaペプチドの測定

上記(2)で作成したサンドイッチELISA測定系を用いて、ヒト血清中の5.9 kDaペプチドを測定し、抗原抗体反応が5.9 kDaペプチド濃度依存的に観測されることを、以下に具体的に記載する方法により確認した。

なお、用いた血清はインフォームドコンセントを得た後、連結不可能匿名化し使用した。

【0052】

(3-1) 一次抗体反応

10

20

30

40

50

S I - M S 法を用いて含有 5 . 9 k D a ペプチド濃度を算出したヒト血清を P B S にて希釈し、5 . 9 K D a ペプチド濃度が、それぞれ、0 μ g / m l、0 . 6 5 μ g / m l、1 . 3 0 μ g / m l、3 . 8 9 μ g / m l、7 . 1 2 μ g / m l、1 0 . 3 6 μ g / m l の試料を調製した。これらの試料を P B S で 1 / 3 3 3 に希釈し、1 0 0 μ l ずつ上記 (2 - 1) で作成した抗体結合プレートに 1 時間反応させた。

【 0 0 5 3 】

(3 - 2) 二次抗体反応

プレートを P B S - T にて 3 回洗浄した後、上記 (2 - 2) で作成した H R P 標識抗体 (P B S - T を用いて 1 / 4 0 0 0 に希釈したもの) を 3 0 分間反応させた。

【 0 0 5 4 】

(3 - 3) 発色

プレートの洗浄後に H R P の発色基質である、T M B 溶液 (カイノス) を 1 0 0 μ l 加えて一定時間の発色後、1 N 硫酸 (和光純薬工業) を停止液として更に 1 0 0 μ l 添加し、測定波長 4 5 0 n m にて吸光度を測定した。

【 0 0 5 5 】

(3 - 4) 測定

測定マイクロプレートリーダーにて波長 4 5 0 n m の吸光度測定を行なった。吸光度測定により得られた検量線を図 1 に示した。

図 1 に示すように、a n t i - 5 . 9 N、および、a n t i - 5 . 9 C を用いたサンドイッチ E L I S A 測定系は、血清中に含まれる 5 . 9 k D a ペプチドを高感度で検出し、5 . 9 k D a ペプチド濃度依存的な吸光度上昇が確認された。

【 0 0 5 6 】

比較例 1

5 . 9 k D a ペプチドの全長ペプチドを認識する抗体を用いた E L I S A 測定系によるヒト血清中の 5 . 9 k D a ペプチドの測定

実施例 2 の (2 - 1) において、a n t i - 5 . 9 C に代えて 5 . 9 k D a ペプチドの全長ペプチドを認識する抗体 a n t i - 5 . 9 W 1 (国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 8 9 6 6 号に記載のハイブリドーマ C N - 2 (受託番号 : I P O D F E R M B P - 0 8 5 6 5) より抽出精製) を、実施例 2 の (2 - 2) において a n t i - 5 . 9 N に代えて 5 . 9 k D a ペプチドの全長ペプチドを認識する抗体 a n t i - 5 . 9 W 2 (国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 8 9 6 6 号に記載のハイブリドーマ C N - 1 (受託番号 : I P O D F E R M B P - 0 8 5 6 4) より抽出精製) を用いて構築されたサンドイッチ E L I S A 測定系を用いて、実施例 2 の (3) と同様の測定を行った。測定により得られた検量線を図 1 に示した。

図 1 に示すように、一次抗体に a n t i - 5 . 9 W 1、2 次抗体に a n t i - 5 . 9 W 2 を用いたサンドイッチ E L I S A 測定系は、血清中に低濃度で含まれる 5 . 9 k D a ペプチド濃度依存的な吸光度上昇を示さなかった。

さらに、一次抗体に a n t i - 5 . 9 W 1、二次抗体に本発明のモノクローナル抗体 a n t i - 5 . 9 C を用いたサンドイッチ E L I S A 測定系、一次抗体に a n t i - 5 . 9 W 1、二次抗体に本発明のモノクローナル抗体 a n t i - 5 . 9 N を用いたサンドイッチ E L I S A 測定系、および、一次抗体に本発明のモノクローナル抗体 a n t i - 5 . 9 C、二次抗体に 5 . 9 W 2 を用いたサンドイッチ E L I S A 測定系においても同様の挙動が確認された。

【実施例 3】

【 0 0 5 7 】

S I - M S 法と E L I S A 測定の相関性の確認

S I - M S 法を用いた定量的測定法によるヒト血清中の 5 . 9 k D a ペプチド濃度測定結果と実施例 2 で作成した E L I S A 測定系を用いた場合の定量測定結果との相関性を確認し、E L I S A 測定系が血清中に多く含まれるフィブリノーゲン関連ペプチドの中で 5 . 9 k D a ペプチドの全長ペプチドを特異的に定量していることを確認した。

10

20

30

40

50

なお、用いた試料は、健常者から得られた血清 8 検体とアルコール依存症患者から得られた血清 8 検体であり、インフォームドコンセントを得た後、連結不可能匿名化し使用した。

具体的には、実施例 2 の (3) の測定結果をもとに作成した検量線に基づいて、実施例 2 の (3) で作成した E L I S A 測定系を用いて、S I - M S 法により含有 5 . 9 k D a ペプチド濃度を算出した血清 1 6 検体中の 5 . 9 k D a ペプチド濃度を定量した。

同一の試料に対する S I - M S 法に基づく 5 . 9 k D a ペプチド定量結果と E L I S A 測定に基づく定量結果を比較した結果を図 2 に示した。

図 2 に示すように、S I - M S 法による定量結果と E L I S A 測定による定量結果は明確な相関性を示した。この結果は、実施例 2 で作成したサンドイッチ E L I S A 系が、血清中に多数存在するペプチドの中で、5 . 9 k D a ペプチドを特異的に定量していることを示唆している。

健常者から得られた血清 8 検体とアルコール依存症患者から得られた血清 8 検体は、E L I S A 測定による 5 . 9 k D a ペプチド定量結果に対して、閾値 6 . 8 μ g / m l を適用することで完全に分離可能であった。また、健常者から得られた血清 8 検体からなる群とアルコール依存症患者から得られた血清 8 検体からなる群とは、E L I S A 測定による 5 . 9 k D a ペプチド定量結果に関して、分散分析による危険率 1 % 以下の有意差を示した。

【実施例 4】

【0058】

ラテックス粒子を用いた 5 . 9 k D a ペプチド測定系の構築と検体中の 5 . 9 k D a ペプチド測定

(1) 抗 5 . 9 k D a 抗体感作ラテックス粒子の調製

実施例 1 において作成した二種類のモノクローナル抗体 (a n t i - 5 . 9 N、および、a n t i - 5 . 9 C) がそれぞれ結合した二種類のラテックス粒子を作成し、これらを混合した抗 5 . 9 k D a 抗体感作ラテックス粒子を、以下に具体的に記載する方法により作成した。

なお、ここで用いられた試薬組成は以下の通りである。

B S A コート溶液；

HEPES 2 - 「 4 - (2 - ヒドロキシエチル)		
- 1 - ピペラジニル」エタンスルホン酸	2.5 mM	pH 7.5
塩化ナトリウム	150 mM	
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	1.0 mM	
アジ化ナトリウム	0.05 %	
ウシ血清アルブミン (B S A)	1.0 %	

希釈用緩衝液；

HEPES	2.5 mM	pH 7.5
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	1.0 mM	
アジ化ナトリウム	0.05 %	

分散用緩衝液；

HEPES	2.5 mM	pH 7.5
塩化ナトリウム	150 mM	
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	1.0 mM	
アジ化ナトリウム	0.05 %	

【0059】

(1 - 1) a n t i - 5 . 9 N 感作ラテックス粒子の調製

希釈用緩衝液で 1 % 濃度とした、粒径 120 nm のラテックス粒子溶液 100 ml に、a n t i - 5 . 9 N を希釈用緩衝液に 3 mg / ml となるように溶解した溶液 100 ml を加え室温にて 1 時間攪拌した。その後、20,000 rpm で 1 時間遠心分離を行い、上清を廃棄し沈殿物を回収した。この沈殿物に B S A コート溶液を 100 ml 加え沈殿物

10

20

30

40

50

を懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させた後、室温で1時間攪拌した。次いで遠心分離を行い得られた沈殿物に分散用緩衝液を500ml加えて懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させ0.2%濃度anti-5.9N感作ラテックス粒子を得た。

【0060】

(1-2) anti-5.9C感作ラテックス粒子の調製

希釈用緩衝液で1%濃度とした、粒径120nmのラテックス粒子溶液100mlに、anti-5.9Cを希釈用緩衝液に3mg/mlとなるように溶解した溶液100mlを加え室温にて1時間攪拌した。その後、20,000rpmで1時間遠心分離を行い、上清を廃棄し沈殿物を回収した。この沈殿物にBSAコート溶液を100ml加え沈殿物を懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させた後、室温で1時間攪拌した。次いで遠心分離を行い得られた沈殿物に分散用緩衝液を500ml加えて懸濁し、超音波処理を行い完全に分散させ0.2%濃度anti-5.9C感作ラテックス粒子を得た。

10

【0061】

(1-3) 抗5.9kDa抗体感作ラテックス粒子(LA試薬)の調製

上記(1-1)および(1-2)で調製されたラテックス粒子溶液を1:1の割合で混合したものを、ラテックス法の第二試薬として調製した。

なお、ラテックス法の第一試薬として分散用緩衝液を用いた。

【0062】

(2) ヒト血清中の5.9kDaペプチドの測定

上記(1-3)で調製したLA試薬を用いて、ラテックス免疫凝集測定(LATEX測定)によりヒト血清中の5.9kDaペプチドを定量可能なことを確認した。

20

具体的には、SI-MS法を用いて含有5.9kDaペプチド濃度を算出したヒト血清試料10μlに対し第一試薬100μl、第二試薬100μlを反応させ、日立7180型自動分析装置を用いて、主波長570nm、副波長800nmにて19-34測光ポイント間(第二試薬添加後約1分後から5分後に相当)において、2ポイントエンド法による吸光度変化量を測定した。

結果として、表2に示すように、5.9kDaペプチド濃度依存的な吸光度上昇が確認された。

【表2】

30

5.9 kDaペプチド濃度 (μg/ml)	吸光度
0.00	-0.0080
2.59	0.0112
5.18	0.0393
10.36	0.1582

40

【0063】

(3) ELISA測定とLATEX測定の相関性の確認

実施例3におけるSI-MS法との相関性より血清中の5.9kDaペプチドを特異的に検出することが示唆されたELISA測定とLATEX測定との相関性を確認し、LATEX測定が血清中の5.9kDaペプチドを特異的に検出することを確認した。

具体的には、上記(2)の測定結果をもとに作成された検量線に基づいて、血清中の5.9kDaペプチド濃度を定量した。同一の試料について、実施例3の(2-3)と同様にELISA測定により5.9kDaペプチド濃度を定量し、LATEX測定による定量結果との相関性を図3に示した。

結果として、図3に示すように、LATEX測定とELISA測定は高い相関性を示し

50

、L A T E X 測定によっても血清中の 5 . 9 k D a ペプチドを特異的に検出していることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0064】

本発明の 5 . 9 k D a ペプチドの免疫学的測定方法は、肝臓疾患診断用ペプチドマーカ-である 5 . 9 k D a ペプチドの簡便かつ正確な検体からの定量を可能にする。5 . 9 k D a ペプチドは、習慣飲酒者や問題飲酒者が肝臓疾患を発症する可能性の診断や、飲酒以外が原因の肝臓疾患、例えば、肝炎、肝硬変、脂肪肝などの肝臓疾患の診断に利用することが可能であり、本発明の 5 . 9 k D a ペプチドの免疫学的測定方法は、これらの疾患の臨床診断方法として、現在の肝疾患人口から考えても今後の予防医学的見地から意義が大きいものと考えられる。

10

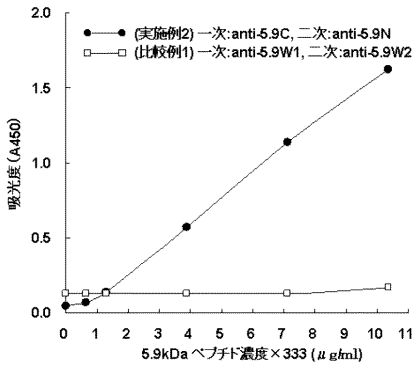
【配列表フリーテキスト】

【0065】

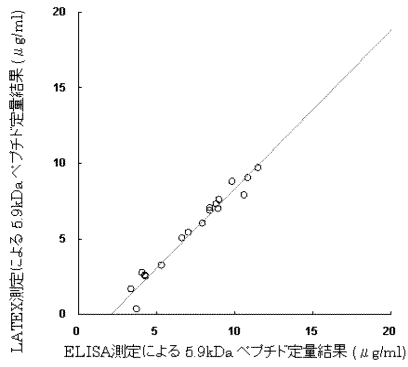
配列番号 2 - 人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号 3 - 人工配列の説明：合成ペプチド

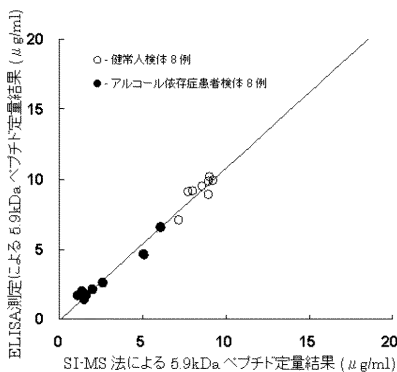
【図 1】



【図 3】



【図 2】



【配列表】

0005585587000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 菊地 渉
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーポーメディカル株式会社内
- (72)発明者 佐藤 百恵
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーポーメディカル株式会社内
- (72)発明者 野田 健太
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーポーメディカル株式会社内
- (72)発明者 清川 巖
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーポーメディカル株式会社内
- (72)発明者 三浦 俊英
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーポーメディカル株式会社内
- (72)発明者 小島 良
福島県郡山市富久山町福原塩島1 ニットーポーメディカル株式会社内
- (72)発明者 野村 文夫
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内
- (72)発明者 曾川 一幸
千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番地1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内

審査官 藤田 都志行

- (56)参考文献 国際公開第2009/088022(WO, A1)
国際公開第2008/105215(WO, A1)
国際公開第2004/058966(WO, A1)
中野 雅行, 「III. アルコール性肝障害(ASH) 3. 病態と病理診断」, 日本内科学会雑誌, 2006年 1月10日, Vol. 95, No. 1, p. 28-32
野村 文夫, 「疾患プロテオミクスの最前線 消化器領域の新しい疾患マーカー探索への応用」, 日本内科学会雑誌, 2008年 8月10日, Vol. 97, No. 8, p. 1888-1894
曾川 一幸, 他7名, 「質量分析装置を用いた問題飲酒者診断法の確立を目指して」, 日本臨床検査自動化学会会誌, 2009年 9月 1日, Vol. 34, No. 4, p. 796
Fumio Nomura et al., "Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry", Proteomics, 2004年 4月, Vol. 4, No. 4, p. 1187-1194

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53
G01N 33/543
C07K 16/36
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
BIOSIS(STN)
MEDLINE(STN)
Cinii

专利名称(译)	5.9kDa肽的免疫学测量方法		
公开(公告)号	JP5585587B2	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	JP2011538339	申请日	2010-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	菊地涉 佐藤百惠 野田健太 清川巖 三浦俊英 小島良 野村文夫 曾川一幸		
发明人	菊地 涉 佐藤 百惠 野田 健太 清川 巖 三浦 俊英 小島 良 野村 文夫 曾川 一幸		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K16/36		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K16/36 C07K2317/34 G01N33/5308 G01N2333/75 G01N2800/08		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.D G01N33/543.581.D C07K16/36.ZNA		
代理人(译)	池田幸		
优先权	2009247332 2009-10-28 JP		
其他公开文献	JPWO2011052380A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

肽标记的N-末端在用于肝病诊断的肽标记物中被识别，其具有5.9kDa的分子量，其是人纤维蛋白原 α -E链或 α 链的降解产物，怀疑存在于含有污染肽的生物样品中。使抗体与识别肽标记的C末端的抗体接触，以在肽标记物和两种抗体之间形成免疫复合物，并免疫学测量所获得的免疫缀合物，由此可以特异性地测量肽标记物。

モノクローナル抗体のアイソタイプ

モノクローナル抗体名	抗体クラス	抗体サブクラス	軽鎖タイプ
anti-5.9N	IgG	IgG1	κ
anti-5.9C	IgG	IgG1	κ