

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 243732

(P2002 - 243732A)

(43)公開日 平成14年8月28日(2002.8.28)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 4 S 4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 数)

(21)出願番号 特願2001 - 40485(P2001 - 40485)

(22)出願日 平成13年2月16日(2001.2.16)

(71)出願人 000135151

株式会社ニッピ

東京都足立区千住緑町1丁目1番地1

(72)発明者 飯嶋 克昌

東京都足立区千住緑町壱丁目壱番地壱 株
式会社ニッピバイオマトリックス研究所内

(72)発明者 入江 伸吉

東京都足立区千住緑町壱丁目壱番地壱 株
式会社ニッピバイオマトリックス研究所内

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な抗体及び該抗体を含む免疫試薬

(57)【要約】

【課題】 N-カルボキシメチルアルギニン (CMA) またはCMA残基を有するペプチド若しくはタンパク質を簡便に検出するための抗体、該抗体を含む免疫試薬を提供する。

【解決手段】 N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体。N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体を含む免疫試薬。CMAを含むタンパク質を免疫原として抗体を得る。得られた抗体分子を抗CMA抗体とするか、あるいは得られた抗体を酵素処理して得られる活性フラグメントを抗CMA抗体として、免疫試薬を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体。

【請求項2】 N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体を含む免疫試薬。

【請求項3】 N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体を含む免疫分析用試薬キット。

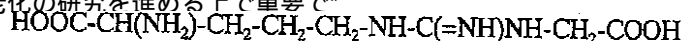
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、N-カルボキシメチルアルギニンに対する抗体、またはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体及び該抗体を含む免疫試薬、特に結合組織グリケーションマーカーであるN-カルボキシメチルアルギニンを検出する免疫試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】生体組織中のタンパク質は、グルコースなどの還元糖やアスコルビン酸、またはジカルボニル化合物などによって非酵素的に修飾を受ける。該反応はグリケーション（非酵素的糖化）またはメイラード反応と呼ばれ、高血糖状態、酸化ストレスの発生や老化に伴って生じ、その反応生成物が生体内に蓄積する。グリケーション反応生成物は、糖尿病合併症、腎不全、神経変性疾患などの高血糖状態や酸化ストレスの発生が誘発する病態や老化の進行に寄与している可能性が指摘されている。したがって、グリケーション反応生成物を測定する技術は、これらの病態や老化の研究を進める上で重要で*



【0006】を有するN-カルボキシメチルアルギニン（以下「CMA」と略することがある）について特許出願をした（平成11年特許願278824号）。しかし、現在のところ、CMAを特異的に認識する抗体に関する報告はなされていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は、CMAを特異的に認識する抗体を提供することにある。

【0008】また、本発明の目的は、CMAまたはCMA残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体を提供することにある。さらに、本発明の目的は、上記抗体を含む免疫試薬、特に結合組織グリケーションマーカーであるCMAを検出する免疫試薬を提供することにある。

【0009】さらにまた本発明の目的は、CMAまたはCMA残基を有するペプチドもしくはタンパク質を簡便に検出できる免疫分析用キットを提供することにある。

*ある。

【0003】また、臨床分野に於いてグリケーション反応生成物は、前述した疾患の発生、進行または治癒過程の評価指標（マーカー）としても有用である。カルボキシメチルリジン（以下「CML」と略することがある）またはカルボキシメチル化されたタンパク質もしくはペプチドを糖尿病もしくは糖尿病合併症用マーカーとして使用することが、特開平9-178740号公報に、そして、CMLまたはカルボキシメチル化されたタンパク質もしくはペプチドに対する抗体がCML等を測定できる免疫試薬として使用できることが特開平9-257792号公報に開示されている。

【0004】しかし、上記特許公報では、カルボキシメチル化を受けるアミノ酸をリジンと特定しており、これらの公報に記載の発明はCMLを検出する方法に関する発明である。さらに、CMLは組織特異性はなく生体中で普遍的に存在するためにグリケーションの起きている組織を特定するのは困難である。したがって、組織特異的なグリケーション生成物こそがグリケーションマーカーとして有用である。かかる観点から、本発明者等は、先に、代謝回転の遅い結合組織タンパク質、特にコラーゲンに特異的なグリケーション生成物、すなわち、コラーゲンまたはその変性物もしくは加水分解物の少なくとも一つのアルギニン残基のグアニジル基がカルボキシメチル化されたグリケーション生成物を見出した。当該知見に基づき、本出願人は、結合組織タンパク質に特異的なグリケーションのマーカーとして有用な新規化合物である下記式：

【0005】

【化1】

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を達成すべく鋭意検討した結果、CMAを含むタンパク質、例えばグルコースでグリケーションさせたコラーゲンやCMAを化学架橋剤で結合させたアルブミン等を免疫原として抗体を作製すれば、CMAを特異的に認識する抗体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明は、CMAまたはCMA残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体にある。さらに、本発明は、N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体を含む免疫試薬にある。

【0012】また、本発明は、N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質に対する抗体を含む免疫

分析用試薬キットにある。

【0013】本発明の抗体を調製するための抗原、すなわち免疫原は、その構造中にCMA残基を有する適当な分子量以上の大きさの物質（例えば、蛋白質、多糖体、脂質抗原等）であれば良い。例えば、CMAをヘモシアニン、アルブミン等の担体物質に結合させたものや、中性リン酸緩衝液中においてグルコースと共に37℃に保つことによってグリケーションを起こさせたコラーゲンなどを免疫原として挙げる事ができる。CMAの担体物質への結合には、通常、当業界で知られている方法が何ら制限なく用いられ、例えば、ビスイミドエステル架橋試薬やカルボジイミド架橋試薬を用いる結合方法などを好ましく挙げる事ができる。ここでCMAは、例えば、アセチルアルギニンをヨード酢酸等とNaOH存在下で反応させた後、同量のHClを添加して加熱し、保護基であるアセチル基を外すことによるか、アルギニン塩酸塩とグリオキサール溶液とをNaOH水溶液に溶解して反応させることによる等によって製造することができる。

【0014】上記で得られた免疫原を当業界で公知の抗体製造方法に従って動物に免疫することで、本発明の抗体を得ることができる。すなわち、免疫原を必要に応じてアジュバントと混合し、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ等、通常、抗体製造に用いられる動物の腹腔内等に投与する。免疫した動物から血液を採取し、血清を調製する。得られた抗血清を、CMAを固定化したビーズ等を用いたアフィニティークロマトグラフィーに付し、CMAを特異的に認識する抗体画分を精製する。あるいは、イオン交換クロマトグラフィー等によってイムノグロブリン画分を精製しても良い。また免疫した動物の、脾細胞やリンパ節細胞等の抗体産生細胞を採取し、常法によってミエローム細胞等と融合して作製したハイブリドーマから、CMAを特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることができる。上述の方法で得られた抗体をそのまま用いても、あるいはアフィニティークロマトグラフィー等で精製して用いてもよい。

【0015】上述のようにして得られる抗体は、該抗体分子自体を抗CMA抗体として用いることができ、或いはこれらの抗体を酵素処理して得られるFab、Fab'、F(ab')₂といった抗体の活性フラグメント（抗体の抗原認識部位を含む部分）を抗CMA抗体として使用しても良い。

【0016】上記で得られた抗CMA抗体は、N-カルボキシメチルアルギニンまたはN-カルボキシメチルアルギニン残基を有するペプチドもしくはタンパク質を検出・定量するための免疫試薬として使用できる。すなわち、本発明の免疫試薬を用いて、グリケーションさせたタンパク質あるいは生体組織や血液、尿またはこれらの分解物に対して、それ自体公知の通常用いられるイムノアッセイ、例えば抗体組織染色法、ウェスタンブロット法、サンドイッチ法、競合法等により反応せしめて、抗原-抗体反応の程度を検出し、試料中のCMAの存在または濃度

を測定することができる。

【0017】上記イムノアッセイに用いる抗体、あるいは抗原であるCMAおよびCMA残基を有するペプチド、タンパク質のいずれか一方を適当な標識物質により標識しても、固相に結合しても良い。ここで、標識物質としては、たとえばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、¹²⁵I等の放射性物質、フルオレセン等の蛍光性物質、アクリジニウム誘導体等の化学発光物質、ジゴキシン、ビオチン等が挙げられ、固相としては、例えばガラスビーズ等のガラス、プラスチックビーズ等のプラスチック、ラテックス粒子等が挙げられる。抗原-抗体反応の程度は、それ自体公知の通常用いられるラジオイムノアッセイ(RIA)、ラテックス粒子イムノアッセイ(LPIA)、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)、化学発光イムノアッセイ(CLIA)等で検出することができる。

【0018】また本発明によれば、上記免疫反応及び検出工程等を含むCMAの存在または濃度を測定するためのイムノアッセイに用いる免疫分析用試薬キットが提供される。この免疫分析用試薬キットは、本発明の抗体をキットの構成試薬の1つとして含有することを特徴とし、キットの他の試薬構成は採用した測定法によって異なることができる。例えば、本発明の抗体と、選択した測定法に適した試料希釈液、洗浄液、標識抗体または標識抗原、色素、標準CMA等とを組み合わせることができる。該免疫分析用試薬キットは、それ自体公知の通常用いられる方法により調製できる。

【0019】

【実施例】以下に本発明をより具体的に説明するために実施例を示すが、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。

【0020】（実施例1）抗CMA抗体の調製とコラーゲンのグリケーションに伴うCMA量の経時的変化の抗CMA抗体による測定

（1）抗原の調製

牛皮より抽出したコラーゲン10 mgを360 mgのグルコース（和光純薬社製）と共に、pH 7.4の0.15 Mの塩化ナトリウムを含む9.57 mMのリン酸緩衝液（以下PBSと略す）中で37℃に1ヶ月保持し、グリケーション反応を行った。得られたコラーゲングリケーション生成物を、ブタ腎臓由来アミノペプチダーゼ [Bensusan, H.B. 等, Biochim. Biophys. Acta, 251, 100 - 108, (1971)] を用いて加水分解させ、グリケーションを起こしているアミノ酸を分析したところN-カルボキシメチルアルギニン(CMA)であることが確認された。アミノ酸分析（日立、L-8500型アミノ酸分析機）によりCMA蓄積量を測定すると7.5モル/モルコラーゲンだった。前記のようにして得たグリケーションコラーゲンを以下のようにしてウサギに免疫した。

（2）抗原の免疫

常法により、10 mg/mlになるようにして調製した抗原溶液0.3 mlに、フロイントの完全アジュバント0.6 mlを加えて、ウサギの背中皮膚に注射した。その後、3週間おきに10 mg/ml抗原溶液0.3 mlにフロイントの不完全アジュバント0.6 mlを加えたものを追加免疫した。この間、目的の抗体が産生されたか否かを確認するために、免疫後2週間目毎にウサギの外縁耳静脈から部分採血した。9週間後、グリケーションコラーゲンおよびCMAに対する抗体が産生されたことを酵素免疫測定(ELISA)法で確認し、全採血した。

(3) IgG(イムノグロブリンG)画分の精製

アフィニティークロマトグラフィー抗体精製用キット(ファルマシア社製MAbTrap(登録商標) GII キット)を使用し、当該キットの所定の方法により上記で採血した血液の血清中のIgG画分を精製した。

(4) CMAの調製

アルギニン塩酸塩(和光純薬社製、試薬特級)525 mg(2.5ミリモル)と40%グリオキサール溶液(和光純薬社製、化学用)0.5 ml(4.5ミリモル)を25 mlの1N水酸化ナトリウムに溶解し、60分30分保持した。この反応で生成したCMAを陽イオン交換樹脂カラム(日立製作所社製、#2622SC充填カラム)に供し、ナトリウムイオン勾配により、目的のCMA画分を精製した。

(5) CMA-BSAの調製

上記方法により精製したCMA 1 mgとウシ血清アルブミン(フナコシ薬品社製)(以下BSAと略す)1 mgとを1 mlの水に溶解し、スベリミジン酸ジメチル(東京化成社製)10 mg/mlを0.05 ml添加して、室温で3時間攪拌することによりCMAをBSAに結合させた。得られたCMA-BSAをP*
作製したグリケーションモデルコラーゲン:

酸可溶性I型コラーゲン(ウシ、皮)	1mg
グルコース(和光純薬社製)	36mg
50mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)1ml	

37℃、0~34日間

【0022】上記グリケーションモデルコラーゲンを、インキュベート日数毎に、それぞれコラーゲン濃度が10 µg/mlになるように1N水酸化ナトリウムで溶解した後、96穴イムノプレート(ヌンク社製)に1ウェル当たり0.1 ml注ぎ、室温で1時間放置することによってイムノプレートに固定した。1時間後、溶液を除去し、1% BSAを含むブロッキング液を1ウェル当たり100 µl注ぎ、室温で1時間放置し、ブロッキングした。ブロッキング液は、0.2 Mの塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)(以下TBSと略す)で調製した。1時間後、該ブロッキング液を除去し、IgG濃度が1 µg/mlとなるように0.1%のTween20(和光純薬社製)を含むTBSで希釈した抗CMA抗体溶液を1ウェル当たり0.1 ml注ぎ、室温で1時間半放置した。その後、0.1%のTween20を含むTBSで3回洗浄し、1 µg/mlのペルオキシダーゼで標

*BSに対して透析し、未反応のスベリミジン酸ジメチルを除去した。

(6) アフィニティークロマトグラフィーの作成

1.6 mlのリガンド固定化用アフィニティークロマトグラフィー用担体(ファルマシア社製、EAH-セファロースゲル)に、上記CMA-BSAの水溶液(6 mg/ml)を2 ml加え、更に20 mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(同仁化学社製水溶性カルボジイミド:WSC)を添加して、室温で2時間緩やかに攪拌した。

10 該CMA-BSA固定化ゲルを5 ml容のカラムに詰め、0.5 Mの塩化ナトリウムを含む0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)を30 ml流し、次いで0.5 Mの塩化ナトリウムを含む0.1 Mのトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)を30 ml流して洗った。更に、PBSを80 ml流してカラムを平衡化した。

(7) 抗CMA抗体の調製

上記(3)で精製した免疫ウサギ血清のIgG画分0.5 mlを上記(6)で作成したアフィニティークロマトグラフィーカラムに供し、PBSを280 nmの吸光度が0になるまで流して洗浄した。続いて0.2 Mグリシン-塩酸緩衝液(pH 2.3)を流して結合している抗体を溶離させた。回収した抗体溶液は、ただちに1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 9.0)で中和した後、PBSに対して一晚透析した。このようにして抗CMA抗体溶液を調製した。

(8) CMA量の経時的変化の測定

上記(7)で調製した抗CMA抗体溶液を用いて、下記表1に示すグリケーションモデルコラーゲンにおけるCMA量の経時的変化をELISAにより測定した。

【0021】

【表1】

識された抗ウサギIgG抗体溶液(カッセル社製)を1ウェル当たり100 µl注ぎ、室温で1時間放置した。更に、0.1%のTween20を含むTBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ用発色基質キット(ペーリンガー・マンハイム社製A BTSキット)を用いて、当該キット所定の方法に従い基質溶液を調製した。得られた基質溶液を1ウェル当たり100 µl注いだ。室温で15分間放置した後、2%のシュウ酸溶液を1ウェル当たり50 µl加え、ペルオキシダーゼの反応を停止させ、415nmの吸光度を測定した。結果を下記表2に示す。別にアミノ酸分析機(日立社製、L-8500型)を用いて測定したCMA濃度を比較のため付記した。

【0023】

【表2】

インキュベート日数 (日)	抗体での測定値 (A415 nm)	アミノ酸分析機で測定したCMA濃度 (mol/mol collagen)
0	0.220	0.00
7	0.329	1.80
23	0.653	5.46
34	0.744	7.45

【0024】上記表2に示す結果より、グリケーションコラーゲンにおけるCMAの経時的蓄積量変化を本発明の抗体により測定できることが確認された。

(実施例2) CMAに対する特異性の確認

(1) N-カルボキシメチルリジン (CML) の調製

N- α -アセチルリジン (アルドリッチ社製) 0.2 g (1ミリモル) とグリオキシル酸一水和物 (和光純薬社製) 0.1 g (1ミリモル) とを10 mlの0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム (和光純薬社製) 0.1 gを加えて、一晩5℃に保持した。この反応で生成したCMLを陽イオン交換樹脂カラム (日立製作所社製、#2622SC充填カラム) に供し、ナトリウムイオン勾配により、目的のCML画分を精製した。

(2) CMAに対する抗体の抗原特異性の確認

抗CMA抗体溶液の抗原特異性を競合法ELISAにて確認した。

【0025】IgG濃度が1 μ g/mlとなるように0.1%のTween 20 (和光純薬社製) を含むTBSで希釈した抗CMA抗体溶液に、CMAをそれぞれ0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/mlとなるように添加した。得られた溶液を室温で1時間放置し、CMAで阻害された抗体溶液として使用した。

【0026】同様に、IgG濃度が1 μ g/mlとなるように0.1%のTween20 (和光純薬社製) を含むTBSで希釈した抗CMA抗体溶液に、CMLをそれぞれ0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/mlとなるように添加した。得られた溶液を室温で1時間放置し、CMLで阻害された抗体溶液として使用した。

【0027】競合法ELISAを行うにあたり、CMA-BSAまたはグリケーションコラーゲンを10 μ g/mlとなるように0.05 M炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で希釈し、希釈溶液を得た。次いで、得られた希釈溶液を96穴イムノプレート (NUNC社製) に1ウェル当たり0.1 ml注ぎ、室温で1時

*間放置し、CMA-BSAまたはグリケーションコラーゲンをイムノプレートに固定した。1時間後、溶液を除去し、実施例1で用いたブロッキング液を1ウェル当たり100 μ l注ぎ、室温で1時間放置し、ブロッキングした。1時間後、該ブロッキング液を除去し、0.1%のTween20を含むTBSで3回洗浄した後、上記濃度のCMAで阻害された抗体溶液、又は上記濃度のCMLで阻害された抗体溶液を1ウェル当たり100 μ l注ぎ、室温で1時間半放置した。その後、実施例1と同様に処理し、415 nmの吸光度を測定した。結果を図1に示す。図1から、本発明の抗体の抗原抗体反応が、CMLでは阻害されず、CMAのみにより阻害されたことがわかる。このことから、本発明の抗体は、CMLと交差反応せず、CMAに対して特異的な抗体であることが確認できた。

【0028】

【発明の効果】本発明によれば、CMAまたはCMA残基を有するペプチドもしくはタンパク質と特異的に反応し、CMLとは反応しない抗体が提供される。

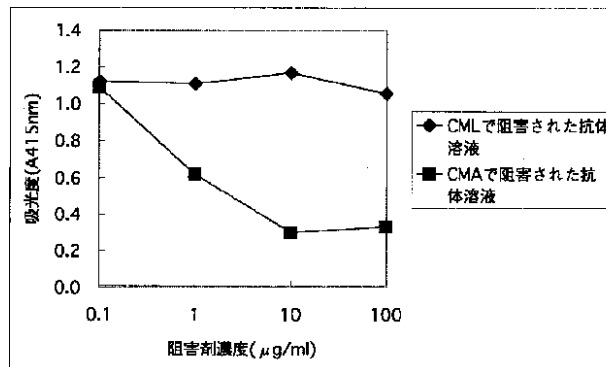
【0029】本発明の抗体は、代謝回転の遅い結合組織タンパク質のグリケーション生成物中に存在するCMAの検出に応用できる。CMAの簡便な測定は、様々な疾病の原因である可能性が示唆されているグリケーションの研究を進める上で有用である。

【0030】また結合組織特異的なグリケーションマーカーであるCMAを測定できる免疫試薬は、グリケーションの関与する糖尿病合併症等の疾病における、結合組織異常診断を行う等の臨床検査上有用な手段を提供するものであり、その工業的意義は大きい。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、調製した抗CMA抗体の抗原特異性を競合法ELISAにて調べた結果を示す図である。図中、縦軸は415 nmにおける吸光度、横軸は各阻害剤の添加量を示す。

【図1】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24
CE12 DA13
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA50
FA71 GA26

专利名称(译)	含有所述抗体的新型抗体和免疫试剂		
公开(公告)号	JP2002243732A	公开(公告)日	2002-08-28
申请号	JP2001040485	申请日	2001-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	日本飞行机株式会社		
申请(专利权)人(译)	株式会社ニッピ		
[标]发明人	飯嶋克昌 入江伸吉		
发明人	飯嶋 克昌 入江 伸吉		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12P21/08		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.S C07K16/44 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于方便地检测具有N-羧甲基精氨酸 (CMA) 或 CMA残基的肽或蛋白质的抗体，以及一种包含该抗体的免疫试剂。抗N-羧甲基精氨酸的抗体或具有N-羧甲基精氨酸残基的肽或蛋白质。一种免疫试剂，其包含针对N-羧甲基精氨酸的抗体或具有N-羧甲基精氨酸残基的肽或蛋白质。通过使用含有CMA作为免疫原的蛋白质来获得抗体。通过使用获得的抗体分子作为抗CMA抗体或通过使用通过用酶处理获得的抗体作为抗CMA抗体获得的活性片段来获得免疫试剂。

インキュベート日数 (日)	抗体での測定値 (A415 nm)	アミノ酸分析機で測定したCMA濃度 (mol/mol collagen)
0	0.220	0.00
7	0.329	1.80
23	0.653	5.46
34	0.744	7.45