

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3833183号
(P3833183)

(45) 発行日 平成18年10月11日(2006.10.11)

(24) 登録日 平成18年7月28日(2006.7.28)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 W
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 A
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B

請求項の数 9 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2003-96045 (P2003-96045)	(73) 特許権者	306008724 富士レビオ株式会社 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(22) 出願日	平成15年3月31日(2003.3.31)	(72) 発明者	内田 好昭 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
(62) 分割の表示	特願平10-314032の分割	(72) 発明者	倉野 義裕 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
原出願日	平成10年10月15日(1998.10.15)		
(65) 公開番号	特開2003-270247 (P2003-270247A)		
(43) 公開日	平成15年9月25日(2003.9.25)		
審査請求日	平成15年5月29日(2003.5.29)		
(31) 優先権主張番号	特願平9-299439		
(32) 優先日	平成9年10月15日(1997.10.15)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
		審査官	白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリドーマ、モノクローナル抗体、測定方法及び免疫測定試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血清又は血漿である検体を、非イオン性界面活性剤及びデオキシコール酸ナトリウムから選択される界面活性剤によるエピトープを露出させるための処理の後、該血清又は血漿と、実質的にアポB - 100とは反応せず、アポB - 48を特異的に認識するモノクローナル抗体とを反応させることを特徴とするアポB - 48及び/又はアポB - 48含有リポ蛋白の免疫測定方法。

【請求項2】

非イオン性界面活性剤が、トライトンX - 100 (登録商標)、トライトンX - 114 (登録商標)、ツィーン - 20 (登録商標)及びNP - 40 (登録商標)からなる群から

10

選択される界面活性剤である請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項3】

非イオン性界面活性剤が、トライトンX - 114 (登録商標)、ツィーン - 20 (登録商標)及びNP - 40 (登録商標)からなる群から選択される界面活性剤である請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項4】

モノクローナル抗体が、実質的にアポB - 100とは反応せず、アポB - 48を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ(寄託番号:FERM BP - 6473)から得られるモノクローナル抗体である請求項1~3のいずれかに記載の免疫測定方法。

20

【請求項 5】

測定方法が、E L I S A法である請求項 4 に記載の免疫測定方法。

【請求項 6】

非イオン性界面活性剤及び/又はデオキシコール酸ナトリウムを含有してなる血清又は血漿用処理液と、実質的にアポ B - 100 とは反応せず、アポ B - 48 を特異的に認識するモノクローナル抗体とを含む免疫測定試薬。

【請求項 7】

非イオン性界面活性剤が、トライトン X - 100 (登録商標)、トライトン X - 114 (登録商標)、ツィーン - 20 (登録商標)及びN P - 40 (登録商標)からなる群から選択される界面活性剤である請求項 6 に記載の免疫測定試薬。

10

【請求項 8】

非イオン性界面活性剤が、トライトン X - 114 (登録商標)、ツィーン - 20 (登録商標)及びN P - 40 (登録商標)からなる群から選択される界面活性剤である請求項 6 に記載の免疫測定試薬。

【請求項 9】

モノクローナル抗体を E L I S A用固相に結合させてなる請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の免疫測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

20

本発明は、アポ蛋白の1種であるアポ B - 48 (A p o B - 48) を特異的に認識するモノクローナル抗体、これを産生するハイブリドーマ、これを利用するアポ B - 48 及び/又はアポ B - 48 含有リポ蛋白の測定に関する。アポ B - 48 は、ヒト血中において高脂血症と密接に関連しているリポ蛋白の構成蛋白であり、その測定は、高脂血症や動脈硬化症の診断及び治療に有用である。

【0002】

【従来の技術】

動脈硬化症は、典型的な現代病の一つとして、その効果的な診断法及び治療法の確立が待望されている。動脈硬化症の病因の一つとして、体内を循環する血液中に存在するリポ蛋白のうち、血管内壁へのコレステロールの沈着を促進する種々のリポ蛋白が増加し、又は、当該コレステロールの沈着を防止する種々のリポ蛋白が減少することが挙げられている。そこで、これらのリポ蛋白の血中量を測定し、高脂血症や動脈硬化症の診断及び治療に役立てることが望まれている。

30

【0003】

高脂血症に關与する代表的なリポ蛋白としては、カイロミクロン (C M)、C Mの血中での中間代謝産物であるカイロミクロンレムナント (C Mレムナント)、超低比重リポ蛋白 (V L D L)、V L D Lの血中での中間代謝産物である超低比重リポ蛋白レムナント (V L D Lレムナント)、低比重リポ蛋白 (L D L)、高比重リポ蛋白 (H D L) 等が知られている。

【0004】

40

脂質代謝の面からは、例えば、C MレムナントやV L D Lレムナント〔これらはレムナント様リポ蛋白 (remnant-like particles; R L P) と呼ばれている〕、及び、L D L等は、コレステロールを血管壁に運び込むリポ蛋白であり、これらの血中濃度を減少させることが動脈硬化症の治療に直結することとなる。また、例えば、H D Lは、動脈硬化巣からコレステロールを引き抜く機能を有することから、その血中濃度を上昇させることが動脈硬化症の治療に役立つこととなる。

【0005】

これらのうち、R L Pは、食後高脂血症の動脈硬化病変発現に關与していることが指摘され、動脈硬化症の危険因子の一つとして重要と考えられ始めている。R L Pを構成する部分蛋白 (アポ蛋白) として、アポ C、アポ E、アポ A - I、アポ B - 100、アポ B - 4

50

8等が知られている。

【0006】

R L Pの血中濃度測定方法の一つとして、現在、R L P - C (r e m n a n t l i k e p a r t i c l e s c h o l e s t e r o l)測定法が知られている。このR L P - C法は、抗アポA - Iモノクローナル抗体と抗アポB - 100モノクローナル抗体とを固相化して混合ゲルを調製し、これと検体とを反応させ、これらの抗体に結合したりポ蛋白を遠心除去し、上清中に存在する結合しなかったリポ蛋白の量をコレステロールの量として測定するものである。

【0007】

アポA - Iは、C M、H D Lの主要なアポ蛋白として存在し、アポB - 100は、V L D L、V L D Lレムナント、L D Lの主要なアポ蛋白として存在するものである。従って、理論的には、A - Iモノクローナル抗体には、C MとH D Lとが結合し、抗アポB - 100モノクローナル抗体には、V L D LとV L D LレムナントとL D Lとが結合するので、上述したR L P - C測定法によれば、これらのリポ蛋白が結合されて除去される。

【0008】

R L P - C測定法に用いられる抗アポB - 100モノクローナル抗体は、アポB - 100の2291番目から2318番目のアミノ酸領域を特異的に認識し、アポB - 100の2152番目までのアミノ酸配列からなるアポB - 48を認識することがないので、アポB - 48をアポ蛋白として含有するがアポB - 100をアポ蛋白として含有しないリポ蛋白が、R L P - C測定法の対象となる。

【0009】

しかしながら、R L P - C測定法は、吸着除去操作が必須であり、作業が煩雑であると同時に、完全な吸着が行われる必要があり、測定状況により測定値にばらつきを生じる等の欠点があった。

【0010】

アポB - 48は、C M、C Mレムナントにアポ蛋白として含有されている。C Mは、食後速やかにリポ蛋白リパーゼによりC Mレムナントに変換され、C Mレムナントは、肝臓に存在するレムナントリセプターにより肝臓に取り込まれることとなる。従って、空腹時等においては、血中にC Mは存在しないこととなるので、アポB - 48を特異的に認識することができるモノクローナル抗体を得ることができれば、このような時期の血液を検体とすることにより、C Mレムナントのみの量を直接測定することができることとなる。このことにより、より確実な高脂血症の診断が可能となり、従って、動脈硬化症の診断及び治療に役立たせることができることとなる。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

上記の現状に鑑み、本発明は、アポB - 48を特異的に認識することができるモノクローナル抗体を取得し、これにより、正確かつ簡易に動脈硬化症の危険因子の量を測定し、診断及び治療方法を提供することを目的とするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究の結果、アポB - 48由来ペプチドを哺乳動物に免疫することにより得られるリンパ球と、ミエローム細胞とを、融合することによってハイブリドーマを樹立し、これを培養することによりアポB - 48を特異的に認識することができるモノクローナル抗体を取得することに成功し、本発明を完成した。以下に本発明を詳述する。

【0013】

本発明は、アポB - 48を特異的に認識することができるモノクローナル抗体を取得する方法を確立することにより初めて成立した発明である。当該方法は、本発明者らが抗アポB - 48モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを初めて樹立したことにより確立されたものである。

【0014】

アポB - 48は、アポB - 100のアミノ酸配列の一部と同一のアミノ酸配列を有するペプチドであり、アポB - 100のアミノ酸配列もアポB - 48のアミノ酸配列も、すでに公知である〔ネイチャー (Nature) 323巻、738頁、1986年10月〕。また、抗アポB - 48特異抗血清も、既に公知である〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.,)、265巻、15号、8358頁、1990年。ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.,)、267巻、2号、1175頁、1992年。クリニカル・サイエンス (Clinical Science)、85巻、521頁、1993年等〕。

【0015】

しかしながら、アポB - 48のみに特異的に反応するモノクローナル抗体については、これまで取得されたとの報告はなく、文献 (臨床検査。40巻、9号 (1996年)、1025頁、左欄下から8行) には、アポB - 48のみに特異的に反応する抗体の産生は理論上困難である旨が記載されている。本発明に係る抗アポB - 48モノクローナル抗体は、これらの従来の方を、根本から覆すものである。

10

【0016】

以下に本発明に係るハイブリドーマの樹立方法について説明する。本発明においては、まず、アポB - 48由来のペプチドを合成する。アポB - 48由来のペプチドは、好ましくはアポB - 48のC - 末端から20個のアミノ酸配列、より好ましくは10個のアミノ酸配列、更に好ましくは6個のアミノ酸配列を含むペプチドである。本発明においては、例えば、既に公知のアポB - 48のアミノ酸配列のうち、C - 末端から数えて4個のアミノ酸配列に相当するペプチドのN - 末端にシステインを結合させたCys Thr Tyr Met Ileを合成する (以下、本明細書において、このペプチドを「C4」という)。このようなアミノ酸配列の合成は、公知のペプチド合成装置を用いることにより極めて容易に行うことができる。

20

【0017】

同様にして、アポB - 48のアミノ酸配列のうち、C - 末端から数えて5個のアミノ酸配列、及び、6個のアミノ酸配列についても合成する (それぞれ、「C5」及び「C6」という)。これらのペプチドは、常法に従って精製することができる。その後、これらのペプチドとヘモシアニン等との複合体を合成する。

【0018】

一方、食後2時間を経過したヒトから採取した血液をプールし、このヒト血清を遠心分離操作することにより、VLDLフラクション、LDLフラクションを取得し、スクリーニング等の抗原とする。

30

【0019】

一方、抗アポB - 48モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、上記方法により合成したC4 - KLH、C5 - KLH及びC6 - KLH複合体を哺乳動物に免疫し、そのリンパ球とミエローマ細胞とを融合することにより樹立することができる。

【0020】

例えば、BALB/Cマウス等の哺乳動物に、フロイント完全アジュバントでエマルジョン化したC4 - KLH、C5 - KLH及びC6 - KLH複合体のアポB - 48由来ペプチドを免疫し、当該動物の血清の一部を用い、ウエスタンブロッティング (WB) 法にてネイティブアポB - 48に反応する抗体の確認を行う。WB法で最も濃いバンドが確認された免疫動物に、遊離の複合体を静脈内投与し、その3~4日後に当該動物から脾臓を取り出し脾細胞を調製する。

40

【0021】

別途、培地で培養していたミエローマ細胞と上記の脾細胞とを混合し、公知の手法により細胞融合を行う。融合した細胞は、例えば、培地に浮遊した後、培養プレート等に分注し、培養する。培養した細胞について、VLDLフラクションを抗原として、SDS - PAGE等を行った後、泳動した抗原をニトロセルロース膜に転写し、転写膜をブロッキングした後、短冊状に細く切り、これと培養プレートの一部を1グループとしてプールした培

50

養液を入れて反応させる。その後、洗浄用緩衝液で5分間の振盪洗浄を行った後、POD標識抗マウスIgG抗体を入れ、反応させ、アポB-48に相当する位置のバンドの確認を行う。

【0022】

バンドが見られた場合、抗体を産生しているウエルの選択を行う。目的の抗体を産生しているウエルの細胞は、限界希釈法によりクローニングを行いクローン化する。抗アポB-48モノクローナル抗体を産生する細胞は、大量に培養しマウス腹腔に投与し、抗アポB-48モノクローナル抗体を含む腹水を回収する。更にプロテインA-セファロース等を用い、腹水より抗体を精製しモノクローナル抗体を得る。

【0023】

後に実施例で詳述するように、上記の方法により、本発明者らは、抗アポB-48モノクローナル抗体を取得することに成功し、モノクローナル抗体B48-151と命名した。また、このモノクローナル抗体B48-151を産生する細胞をハイブリドーマB48-151と命名した。ハイブリドーマB48-151は、工業技術院生命工学工業技術研究所〔あて名；日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-0046）〕に、識別表示B48-151、受託番号FERMBP-6473（原寄託日；平成9年7月4日、ブダペスト条約に基づく寄託への移管請求；平成10年8月26日）として寄託した。

【0024】

得られた抗アポB-48モノクローナル抗体の反応特異性は、例えば、CM、VLDL及びLDLフラクションを抗原としたWB法で確認することができる。抗アポB-48モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから得られる抗アポB-48モノクローナル抗体は、アポB-48を特異的に認識することができ、かつ、アポB-100とは全く反応しないものであり、極めて良好に、検体中のアポB-48及び/又はアポB-48含有リポ蛋白を検出するのに利用することができる。上記アポB-48含有リポ蛋白とは、リポ蛋白であって、そのアポ蛋白のアミノ酸配列中にアポB-48と同一のアミノ酸配列を含有するものを意味し、このようなアポB-48含有リポ蛋白も、アポB-48と同様に、アポB-48を特異的に認識することができる本発明の抗アポB-48モノクローナル抗体により特異的に認識されうるものである。

【0025】

更にまた、上記抗アポB-48モノクローナル抗体の反応特異性は、ELISA測定法によっても確認することができる。抗アポB-48モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから得られる抗アポB-48モノクローナル抗体は、後の実施例で詳述するように、これを固相としたELISA測定法においてアポB-48を特異的に認識することができることが明らかであり、従来用いられていたWB法等の膜固定による測定方法ばかりでなく、固相ELISA法にも応用することができるものである。

【0026】

本発明の抗アポB-48モノクローナル抗体は、いわゆるサンドイッチアッセイ法にも適用することができる。例えば、サンドイッチELISAを行うため、ELISAプレートに希釈した抗アポB-48モノクローナル抗体を入れ、放置して吸着させた後、マスキングを行い、洗浄後に、適切に調製したアポB-48を抗原として入れて反応させる。

【0027】

反応特異性を確認するため、アポB-100を同様の方法にて抗原として測定する。洗浄後、標識抗ヒトアポB抗体を入れ、反応させた後、洗浄し、基質を入れて放置後、吸収波長を測定する等して反応量を測定することにより、アポB-48が特異的に認識されることを確認することができる。

【0028】

本発明の抗アポB-48モノクローナル抗体は、血清を直接検体とするアッセイ法に適用することもできる。例えば、上記したELISA法をヒト血清を検体として適用することによりアポB-48の測定を行うことができる。

10

20

30

40

50

【0029】

本発明のモノクローナル抗体を用いたアポB - 48及びノ又はアポB - 48含有リポ蛋白の測定は、本発明のモノクローナル抗体をヒト由来の種々の検体に適用することにより行うことができる。上記検体としては、ヒト由来の種々の体液を挙げることができ、例えば、血清及び血漿等を挙げるができる。これらの検体に対する測定方法もまた、本発明の一つである。

【0030】

上記検体は、アポB - 48のエピトープを露出させるような処理を行うことが好ましい。本発明のモノクローナル抗体のエピトープは、アポB - 48のC末端部分であるが、この部分は生体液中では露出していないので免疫反応を行った際モノクローナル抗体が結合しにくいと考えられるため、エピトープを露出させるような処理を行うことによって、モノクローナル抗体への結合を容易にする必要がある。上記エピトープを露出させる処理は、測定前に行ってもよく、又は、測定と同時に行ってもよい。

10

【0031】

上記エピトープを露出させるような処理としては、例えば、検体を界面活性剤で処理する方法や、凍結融解を繰り返す方法等を挙げるができる。検体を界面活性剤で処理する方法としては、第30回日本動脈硬化学会総会抄録集〔平成10年6月11日、12日開催、帝京大学内科、筑波記念病院内科、木下誠ら、133頁、「アポ蛋白B48含有リポ蛋白の測定法の開発」〕には、アポB - 48を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し、それを用いたELISAプレートに2%SDSを含むPBSで希釈した血清を添加して、アポB - 48を測定することが記載されている。しかし、本発明においては、2%SDS中では血清中のアポB - 48の測定を行うことはできず、SDSは界面活性剤として好ましくない。

20

【0032】

本発明において、上記界面活性剤は、非イオン性界面活性剤が好ましく、SDSでは逆に免疫反応を阻害するため好ましくない。より好ましくは、トライトンX - 100、トライトンX - 114、ツィーン - 20、NP - 40である。上記界面活性剤は、単独でも、混合しても用いることができる。実際の使用においては、エピトープ露出効果は高いが室温では溶けにくい界面活性剤（トライトンX - 114等）を用いる場合には、免疫反応を阻害せず溶けやすい界面活性剤（ツィーン - 20等）を混合して使用することが好ましい。

30

【0033】

本発明において、界面活性剤は、エピトープを露出させるために用いるものであるが、一般に界面活性剤は免疫反応を阻害するので、エピトープの露出効果と免疫反応の阻害作用とのバランスによって使用濃度を適宜選択することができる。上記界面活性剤は、検体とモノクローナル抗体との免疫反応を行う際の溶液に共存させることもでき、0.01~2%、好ましくは、0.02~0.5%の濃度で使用する。上記界面活性剤の処理溶液及び処理時間としては特に限定されず、例えば、通常免疫反応を行う際に用いる緩衝液中において、4~40分で5分~48時間行うことができる。

【0034】

本発明においては、検体を凍結融解を繰り返すことによって、リポ蛋白の構造を破壊し、エピトープを露出させることも可能である。上記凍結融解は、1回以上行えば、その効果が得られる。

40

【0035】

本発明のモノクローナル抗体を用いたアポB - 48及びノ又はアポB - 48含有リポ蛋白の測定方法を用いることにより、アポB - 48及びノ又はアポB - 48含有リポ蛋白を測定する免疫測定試薬を製造することができ、このような免疫測定試薬もまた、本発明の一つである。このような免疫測定試薬として、例えば、本発明のモノクローナル抗体を結合させたゼラチン粒子やラテックス粒子等を含む凝集免疫測定試薬は、通常の方法により製造することができる。また、同様にして、酵素免疫測定法（EIA）試薬、ELISA試薬、放射免疫測定法（RIA）試薬を、固相として、例えば、ポリスチレン

50

等のポリマー、ガラスビーズ、磁性粒子、マイクロプレート、イムノクロマトグラフィー用濾紙、グラスフィルター等を用いることにより、通常の公知の方法により製造することができる。

【0036】

【実施例】

以下に、実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらのみ限定されるものではない。

実施例1 アポB-48由来ペプチドの合成

アポB-48のC-末端から4残基のアミノ酸配列に相当する部分に、そのN-末端にシステインを結合したペプチドを合成した(以下、本明細書中では「C4」という。配列表の配列番号1に示す)。また、アポB-48のC-末端から5残基のアミノ酸配列に相当する部分に、そのN-末端にシステインを結合したペプチドを合成した(以下、本明細書中では「C5」という。配列表の配列番号2に示す)。更に、アポB-48のC-末端から6残基のアミノ酸配列に相当する部分に、そのN-末端にシステインを結合したペプチドを合成した(以下、本明細書中では「C6」という。配列表の配列番号3に示す)。

【0037】

合成には、島津製作所製多種品目同時固相法自動ペプチド合成装置PSSM-8を用いた。アミノ酸はすべてL-体を用い、-アミノ基は9-フルオレニルメトキシカルボニル基(Fmoc基)で保護し、システインの-スルフヒドリル基とグルタミンの-カルボキサミド基はトリチル基で保護し、スレオニンの-水酸基とチロシンのフェノール性水酸基はt-ブチル基で保護した。

【0038】

ペプチド合成を開始するための固相担体は、あらかじめC-末端イソロイシンが0.65 mmol/gの割合で導入されたHMPイソロイシンレジン(パーキンエルマー社製)30mgを用いた。縮合には、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェイト、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、及び、N,N-ジイソプロピルエチルアミンを用いた。Fmoc基の除去には30%ピペリジン/DMF溶液を用い、溶媒はDMFを用い、PSSM-8添付の標準的なプログラムを使用して3種類同時に合成を行った。

【0039】

合成終了後、得られた保護基を含むペプチド担体を塩化メチレンで洗い、乾燥した。収量は、C4が41.0mg、C5が48.4mg、C6が52.6mgであった。上記ペプチド担体を、それぞれ、添加物を含むトリフルオロ酢酸溶液(トリフルオロ酢酸1ml、水50 μ l、フェノール75mg、チオアニソール50 μ l、エタンジチオール50 μ l)で室温2時間処理し、遊離のペプチド鎖を取り出した。ペプチドをジエチルエーテルで沈殿させ、濾取し、水に溶解して凍結乾燥した。こうして得られた粗ペプチドの収量は、C4が12.23mg、C5が16.17mg、C6が17.04mgであった。

【0040】

次に、上記粗ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィで精製した。カラムはコスモシル5C18-AR-300 20mm I.D. x 150mm L.(ナカライテスク社製)を用い、0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル水溶液の18~28%直線濃度勾配で溶出した。凍結乾燥後得られた精製ペプチドの収量は、C4が7.12mg、C5が11.75mg、C6が10.71mgであった。これらのペプチドは、その一部をプロテインシーケンサ(パーキンエルマー社製、ProciSe 494)にかけて、その構造を確認した。

【0041】

実施例2 ペプチド-KLH複合体の合成

ヘモシアニン(KLH)(カルピオケム社製)5mgを400 μ lの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、DMF100 μ lに溶解したGMB5(同人化学研究所製)1mgを加え、室温で1時間攪拌した。反応液を1mMのEDTAを含む0.1Mリン酸

10

20

30

40

50

緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した PD-10 カラム (ファルマシア社製) に向け、同緩衝液で溶出した。はじめの 2.5 ml を棄て、続く 2.0 ml を集めた。

【0042】

これに、実施例 1 で合成した C4 約 1 mg を水 1 ml に溶解して加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液を透析チューブに移し、リン酸緩衝液 (PBS) に対して一夜透析した。同様の操作を C5 及び C6 についても行い、それぞれ約 5 ml の K L H 複合体溶液を得た。蛋白定量値は、C4 の K L H 複合体 (C4 - K L H) が 768 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、C5 の K L H 複合体 (C5 - K L H) が 861 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、C6 の K L H 複合体 (C6 - K L H) が 1140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0043】

実施例 3 ヒト血清からのリポ蛋白の調製

食後 2 時間のヒトプール血清 4 ml にトリスヒドロキシメチル・アミノメタン 1.21 g、塩化ナトリウム 9.0 g、EDTA 2 ナトリウム 0.372 g を蒸留水 1 l に溶かし pH を 7.4 に調整した溶液 (以下、「d = 1.006 溶液」という) を 4 ml 重層し、ベックマン超高速遠心機で 26000 $\times g$ にて 1 時間遠心した。上層部分をカイロミクロン (CM) フラクションとしてプールし、下層部は更に d = 1.006 溶液を重層し、114000 $\times g$ にて 20 時間遠心後、上層部分を VLDL フラクションとしてプールした。更に下層部分は臭化ナトリウム溶液により d = 1.063 に調整し 114000 $\times g$ にて 20 時間遠心し、その上清部分を LDL フラクションとしてプールした。それぞれのプール分画を濃縮して、免疫反応の抗原として用いた。

【0044】

実施例 4 抗アポ B - 48 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの樹立及び抗アポ B - 48 モノクローナル抗体の調製

抗アポ B - 48 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、実施例 2 で合成した C4 - K L H、C5 - K L H 及び C6 - K L H を B A L B / C マウスに免疫し、その脾臓リンパ球とミエローマ細胞を融合することにより樹立した。

【0045】

すなわち、B A L B / C マウスに、フロイント完全アジュバントでエマルジョン化した C4 - K L H、C5 - K L H 及び C6 - K L H をそれぞれ 25 ~ 100 μg / マウスで免疫し、2 ~ 3 週間後、フロイント不完全アジュバントでエマルジョン化した同複合体 25 ~ 100 μg / マウスで追加免疫を行った。マウス血清の一部を用い、ウエスタンブロッティング (WB) 法にてネイティブアポ B - 48 に反応する抗体の確認を行った。WB の測定方法は後に示すスクリーニング法と同様の方法にて行った。WB 法で最も濃いバンドが確認された C6 - K L H 免疫マウスに、遊離の C6 - K L H 25 ~ 100 μg を静脈内投与し、その 3 ~ 4 日後、マウスから脾臓を取り出し脾細胞を調製した。

【0046】

前もって R P M I - 1640 培地で培養していたマウスミエローマ細胞 (P3U1) と上記の脾細胞とを 1 : 2 ~ 1 : 5 の比率で混合し、PEG (ベーリンガー社製) を用い細胞融合を行った。融合した細胞は H A T 培地に浮遊した後、96 ウエル培養プレートに分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ 二酸化炭素インキュベーターで培養した。

【0047】

培養した細胞の培養上清を WB 法にてスクリーニングした。すなわち、実施例 3 で調製した VLDL フラクションを抗原として、3 ~ 15 % グラジエントの SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS - PAGE) を行った後、泳動した抗原をニトロセルロース膜に転写し WB 用転写膜を作製した。転写膜をスキムミルクでブロッキングした後、短冊状に細く切った。アキュトランインキュベートトレイ (Accutran Incubation Tray) (S & S 社製) の各溝に、短冊状の転写膜と 96 ウエル培養プレートの 6 ウエル分を 1 グループとしてプールした培養液を入れ、室温で 1 時間振盪し反応を行った。

【0048】

0.05 % ツィーン 20 を含む PBS (以下、「洗浄用緩衝液」という) で 5 分間の振盪

10

20

30

40

50

洗浄を3回行った後、各溝にPOD標識抗マウスイムノグロブリン抗体(ダコ社製)を入れ、更に室温で1時間反応させた。同様に、洗浄用緩衝液で4回洗浄後、基質4-クロロナフトール溶液を加え、アポB-48に相当する位置のバンドの確認を行った。

【0049】

バンドが見られた場合、6ウェルを更に1ウェルずつに分け同様の方法で目的の抗体を産生しているウェルの選択を行った。目的の抗体を産生しているウェルの細胞は、限界希釈法によりクローニングを行いクローン化した。抗アポB-48モノクローナル抗体を産生する細胞は、大量に培養しマウス腹腔に投与し、抗アポB-48モノクローナル抗体を含む腹水を回収した。更にプロテインA-セファロースを用い、腹水より抗体を精製しモノクローナル抗体を得た。この抗アポB-48モノクローナル抗体をモノクローナル抗体B48-151と命名し、このモノクローナル抗体B48-151を産生する細胞をハイブリドーマB48-151と命名した。

10

【0050】

実施例5 モノクローナル抗体B48-151の反応特異性の確認

モノクローナル抗体B48-151の反応特異性を、CM、VLDL及びLDLフラクションを抗原としたWB法で確認した。すなわち、実施例3で調製したそれぞれのフラクションを抗原として、3~15%グラジエントSDS-PAGEを行った後、泳動した抗原をニトロセルロース膜に転写しWB用転写膜を作製した。転写膜をスキムミルクでブロッキングした後、抗体との反応を行った。反応にはモノクローナル抗体B48-151、コントロールとして抗アポB-100モノクローナル抗体MAB014(ケミコン社製)及び抗アポB山羊抗血清(ケミコン社製)を用いた。更に反応特異性確認のため遊離の免疫ペプチドC6による抑制試験も行った。なお、WB用転写膜の一部は、CCB染色により蛋白質位置の確認を行った。

20

【0051】

抗体と各種抗原との反応は以下のとおりであった。それぞれの抗体を1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝液(1%BSA-PBS)(pH7.4)を用いて1 μ g/mlの濃度に調整し、抗原転写WB膜と室温で1時間振盪し反応を行った。洗浄用緩衝液で5分間の振盪洗浄を3回行った後、POD標識抗マウスイムノグロブリン抗体(ダコ社製)を加え、更に室温で1時間反応させた。同様に、洗浄用緩衝液で4回洗浄後、基質4-クロロナフトール溶液を加え、バンドの確認を行った。結果を図1に示す。抑制試験は、WB膜と抗体との反応時に5 μ g/mlのC6を共存させて行った。結果を図2に示す。

30

【0052】

図1に示すようにモノクローナル抗体B48-151は分子量20万強のアポB-48に相当する位置にのみバンドを生じ、分子量約55万のアポB-100相当位置にはバンドは見られなかった。また、図2に示すように、モノクローナル抗体B48-151のアポB-48に相当する位置のバンドは、C6の共存で消失した。この結果から、モノクローナル抗体B48-151は、アポB-48を特異的に認識するモノクローナル抗体であることが明白となった。なお、VLDLフラクションでアポB-48に相当するバンドが最も濃く出ているのは、VLDLフラクションにCMレムナントが含まれているからだと考えられる。

40

【0053】

実施例6 モノクローナル抗体B48-151固相ELISAによるアポB-48の測定 SDS-PAGEゲルより抽出調製したアポB-48を抗原としてサンドイッチELISAを行った。すなわち、実施例5と同様の方法により、SDS-PAGEゲルで泳動したVLDLフラクションのアポB-48バンド部分を切り取り、エレクトロエリユーター(バイオラッド社製)によりゲルから抽出して抗原を精製した。一方、ヌンク社製ELISAプレート(マキシソープ)に、PBS(pH7.4)で10 μ g/mlの濃度に希釈したモノクローナル抗体B48-151を1ウェルに75 μ lずつ入れ、4一晩放置して吸着させた後、1%BSA-PBS(pH7.4)を150 μ l/ウェルずつ入れ、37

50

で5時間放置してマスキングを行った。抗体吸着プレートを洗浄用緩衝液で3回洗浄後、1%BSA-PBSで5 μ g/mlから2n希釈した精製アポB-48を75 μ l/ウェルずつ入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。

【0054】

洗浄用緩衝液で3回洗浄後、POD標識抗ヒトアポB抗体(ケミコン社製)を75 μ l/ウェルずつ入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。洗浄用緩衝液で充分洗浄し、基質ABTSを75 μ l/ウェルずつ入れ室温で15分放置後、405nmの波長を測定した。反応特異性を確認するため、アポB-100(ケミコン社製)を40 μ g/mlから同様の希釈方法にて抗原として測定した。結果を図3に示す。図3に示すように、モノクローナル抗体B48-151を固相としたELISAでアポB-48が特異的に測定できることが確認された。

10

【0055】

実施例7 モノクローナル抗体B48-151固相ELISAによる血清アポB-48の測定

1%BSA-PBS(pH7.4)で20倍希釈した血清を検体として、実施例6と同様の方法でアポB-48の測定を行った。検体には、健常者の空腹時及び食後1時間の凍結保存血清の各8例(検体番号1~8)を用いた。結果を図4に示す。図4に示すように、どの検体も食後1時間でアポB-48が高値となり、CMの挙動と一致することが確認された。

【0056】

20

実施例8 新鮮血清の界面活性剤処理

固相抗体と新鮮血清との反応時の緩衝液に各種界面活性剤を添加し、モノクローナル抗体B48-151固相ELISAでの反応性を検討した。界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤としてSDS(ナカライテスク社製)、デオキシコール酸ナトリウム(和光純薬社製)、非イオン性界面活性剤としてトライトンX-100(ナカライテスク社製)、トライトンX-114(ナカライテスク社製)、ツィーン-20(ナカライテスク社製)、ツィーン-80(ナカライテスク社製)、NP-40(シグマ社製)、MEGA-8(同仁化学研究所製)、Brj-35(シグマ社製)を用いた。

【0057】

ヌンク社製ELISAプレート(マキシソープ)にPBS(pH7.4)で10 μ g/mlの濃度に希釈したモノクローナル抗体B48-151抗体を75 μ l/ウェルずつ入れ、4 $^{\circ}$ C一晩放置し吸着させた。次に1%BSA-PBS(pH7.4)を150 μ l/ウェルずつ入れ、37 $^{\circ}$ Cで5時間放置しマスキングを行った。抗体吸着プレートを洗浄用緩衝液で3回洗浄後、それぞれ2%、0.4%、0.08%、0.016%の濃度で各種界面活性剤を含むPBS(pH7.4)を用い、20倍希釈した血清を75 μ l/ウェルずつ入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。洗浄用緩衝液で3回洗浄後、ヨシタケらの方法でアルカリフォスファターゼ(以下、Alpともいう)標識した抗ヒトアポB-100モノクローナル抗体(B100-228;自家製)を75 μ l/ウェルずつ入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。洗浄用緩衝液で充分洗浄し、基質4-ニトロフェノールリン酸(以下、pNPPともいう)を75 μ l/ウェルずつ入れ37 $^{\circ}$ Cで30分放置後、405nmの波長を測定した。検体には、高脂血清及び空腹時血清を用いた。結果を図5、図6に示す。

30

40

【0058】

図5に示すように、界面活性剤を含まないPBS(pH7.4)で血清を希釈した場合は、全く発色が見られず、アポB48C末エピトープが露出されていないと判断した。界面活性剤を含むPBS(pH7.4)を用いた場合は、0.1%付近のトライトンX-100、ツィーン20、NP-40等の非イオン性界面活性剤で強い発色がみられた。これら界面活性剤処理では、アポB48C末エピトープが露出されたと判断した。これに対し、MEGA-8、Brj-35、SDS等の界面活性剤では、発色が弱いかまたはほとんど見られなかった。実施例9の結果も考慮すると、MEGA-8はアポB48C末エピトープ露出効果が弱く、SDS、特に0.1%以上のSDSは免疫反応を阻害し、Brj

50

- 35は両方に関与している可能性が考えられた。

【0059】

実施例9 界面活性剤の免疫反応への影響

固相化ペプチドC6とモノクローナル抗体B48-151との反応時に実施例8と同様の各種界面活性剤を添加し、反応性を検討した。ヌンク社製ELISAプレート(マキシソープ)にPBS(pH7.4)で1 μ g/mlの濃度に希釈したペプチドC6を75 μ l/ウェルづつ入れ、4℃で一晩放置し吸着させた。次に1%BSA-PBS(pH7.4)を150 μ l/ウェルづつ入れ、37℃で5時間放置しマスキングを行った。洗浄用緩衝液で3回洗浄後、それぞれ2%、0.4%、0.08%、0.016%の濃度で各種界面活性剤を含むPBS(pH7.4)を用い、2.5 μ g/mlに希釈したモノクローナル抗体B48-151を75 μ l/ウェルづつ入れ、37℃で1時間反応させた。洗浄用緩衝液で3回洗浄後、POD標識抗マウスイムノグロブリン抗体(ダコ社製)を75 μ l/ウェルづつ入れ、37℃で1時間反応させた。洗浄用緩衝液で充分洗浄し、基質ABTSを75 μ l/ウェルづつ入れ室温で15分放置後、405nmの波長を測定した。結果を図7に示す。

10

【0060】

図7に示すように、トライトンX-100、ツィーン20、NP-40等の非イオン性界面活性剤では、免疫反応に対する影響はみられなかった。これに対し、Brj-35、SDSでは、免疫反応に対する影響がみられた。特に、SDSは、0.1%以上では免疫反応は完全に阻害された。

20

【0061】

【発明の効果】

本発明は、上述の構成よりなり、抗アポB-48モノクローナル抗体を取得することが可能となったので、アポB-48を特異的に認識することにより、簡易で確実な動脈硬化症の診断及び治療が可能となった。

【0062】

【配列表】

〈110〉 富士レビオ株式会社 FUJIREBIO INC.

〈120〉 ハイブリドーマ、モノクローナル抗体、測定方法及び免疫測定試薬

〈130〉 FR37

〈150〉 JP 1997299439

10

〈151〉 1997-10-15

〈160〉 3

〈210〉 1

〈211〉 5

〈212〉 PRT

20

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 配列表フリーテキスト

アポB-48のC-末端から4残基のアミノ酸配列に相当する部分に、そのN-末端にシステインを結合したペプチド

30

〈400〉 1

Cys Thr Tyr Met Ile

1

5

〈210〉 2

〈211〉 6

40

〈212〉 PRT

<213> Artificial Sequence**<220>****<223> 配列表フリーテキスト**

アポB-48のC-末端から5残基のアミノ酸配列に相当する部分に、そのN-末端にシステインを結合したペプチド

10

<400> 2**Cys Gln Thr Tyr Met Ile**

1 5

<210> 3**<211> 7**

20

<212> PRT**<213> Artificial Sequence****<220>****<223> 配列表フリーテキスト**

アポB-48のC-末端から6残基のアミノ酸配列に相当する部分に、そのN-末端にシステインを結合したペプチド

30

<400> 3**Cys Leu Gln Thr Tyr Met Ile**

1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例5で行った本発明に係るB48-151モノクローナル抗体の各リポ蛋白フラクションに対する反応を示す図である。 40

【図2】実施例5で行った本発明に係るB48-151モノクローナル抗体の各リポ蛋白フラクションに対する反応の、C6ペプチドによる抑制を示す図である。

【図3】実施例6で行った本発明に係るB48-151モノクローナル抗体を固相としたELISA測定法による試験結果を示す図である。

【図4】実施例7で行った本発明に係るB48-151モノクローナル抗体を固相としたELISA測定法による試験結果を示す図である。

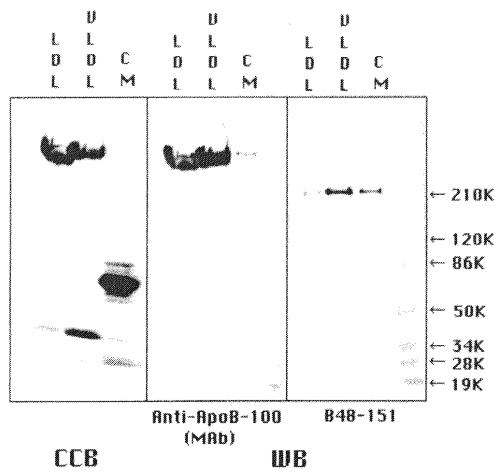
【図5】実施例8で行った、界面活性剤で処理した高脂血清を用いた場合の、本発明に係るB48-151モノクローナル抗体を固相としたELISA測定法による試験結果を示す図である。Tx-100はトライトンX-100、Tx-114はトライトンX-11 50

4、Tw-20はツィーン-20、Tw-80はツィーン-80、Deoxy-ch.はデオキシコール酸ナトリウムを表す。PBSは界面活性剤を添加せずに試験を行ったことを表す。

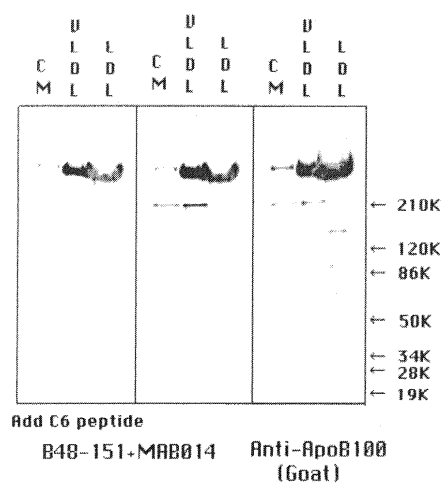
【図6】実施例8で行った、界面活性剤で処理した空腹時血清を用いた場合の、本発明に係るB48-151モノクローナル抗体を固相としたELISA測定法による試験結果を示す図である。

【図7】実施例9で行った本発明に係るB48-151モノクローナル抗体を固相としたELISA測定法に対する界面活性剤の影響の試験結果を示す図である。

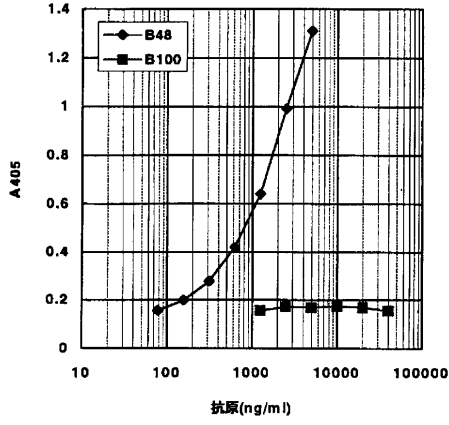
【図1】



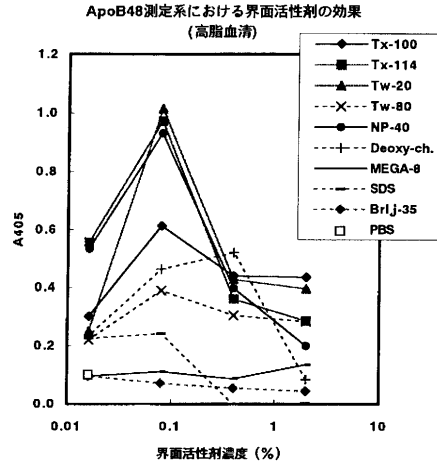
【図2】



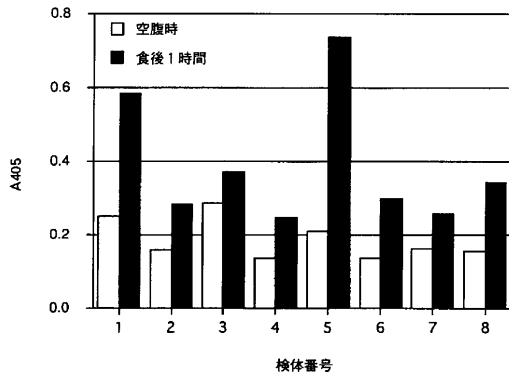
【 図 3 】



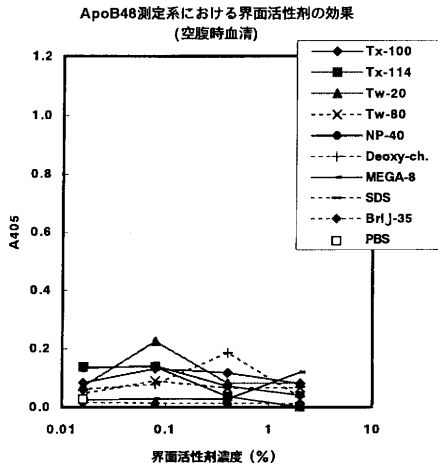
【 図 5 】



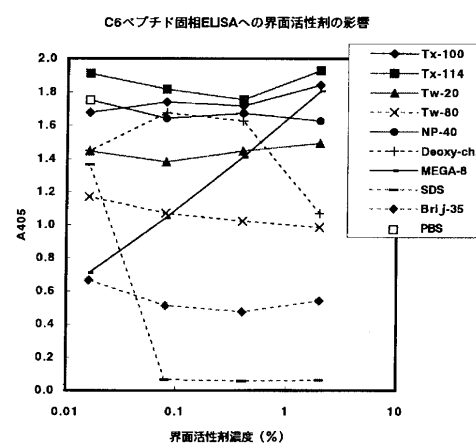
【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平09 - 096637 (JP, A)

特開昭63 - 085357 (JP, A)

Peel, A. S. et al., A novel antiserum specific to apolipoprotein B-48: application in the investigation of postprandial , Clinical Science, 1933年, Vol. 85, 521 - 524

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

G01N 33/48

CAplus(STN)

PubMed

专利名称(译)	杂交瘤，单克隆抗体，测定方法和免疫测定试剂		
公开(公告)号	JP3833183B2	公开(公告)日	2006-10-11
申请号	JP2003096045	申请日	2003-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
当前申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	内田好昭 倉野義裕		
发明人	内田 好昭 倉野 義裕		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.W G01N33/48.A G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/BA13 2G045/BB01 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB29 2G045/BB41 2G045/BB46 2G045/BB48 2G045/BB51 2G045/BB60 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA62 2G045/DA66 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB15 2G045/HA09		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	1997299439 1997-10-15 JP		
其他公开文献	JP2003270247A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得能够特异性识别apo B-48的单克隆抗体，从而准确且容易地测量动脉硬化的风险因子的量，并提供诊断和治疗方法。溶液：用选自脱氧胆酸钠作为非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂的表面活性剂处理样品，并暴露选自冻融处理的表位48和/或其前药，其包括使样品与基本上不与apo B-100反应并特异性识别apo B-48的单克隆抗体反应，或含有apo B-48的脂蛋白。

【 図 1 】

