

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-227396
(P2014-227396A)

(43) 公開日 平成26年12月8日(2014.12.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/415 (2006.01)	C07K 14/415	2G045
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B024
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4B064
A61P 43/00 (2006.01)	A61K 39/395 N	4C037
G01N 33/53 (2006.01)	A61P 43/00 111	4C085

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-109694 (P2013-109694)
(22) 出願日 平成25年5月24日 (2013.5.24)

(71) 出願人 501061319
学校法人 東洋大学
東京都文京区白山5-28-20
(74) 代理人 100083806
弁理士 三好 秀和
(74) 代理人 100101247
弁理士 高橋 俊一
(72) 発明者 矢野 友啓
群馬県邑楽郡板倉町泉野1-1-1 東洋
大学食環境科学部内
(72) 発明者 矢野 善久
京都府亀岡市首我部町南条大谷1-1 京
都学園大学 バイオ環境学部内
Fターム(参考) 2G045 AA13 AA26 CA26 CB20 DA36
FB01 FB03 FB07 FB15
最終頁に続く

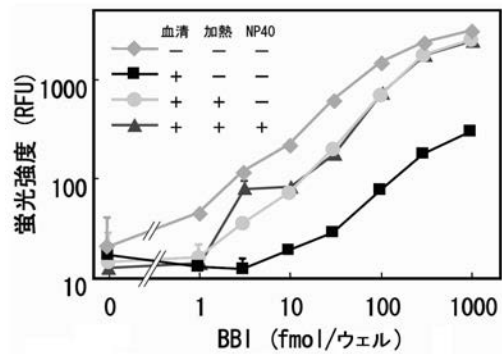
(54) 【発明の名称】 B B I に対する抗体作成のための免疫原調製法

(57) 【要約】

【課題】 特異性、定量性、および検出感度において優れた抗BB1タンパク質抗体を提供する。

【解決手段】 架橋剤によりBB1タンパク質同士を架橋させてホモ複合体を調製し、これを免疫原として抗体を作成する。

【選択図】 図8



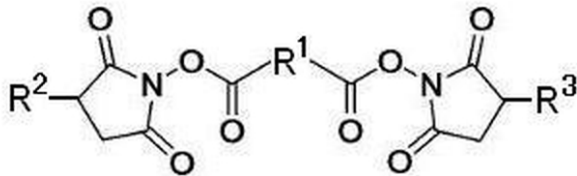
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

BBIタンパク質に対する抗体を作成するための免疫原の調製方法であって、

(a) 下記の式で表される架橋剤を用いてBBIタンパク質同士を架橋させる工程を含み

【化 1】



10

式中、

R^1 は、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-$ 、 $-(CHOH)_2-$ 、および $-O-(CH_2)_2-SO_2-(CH_2)_2-O-$ からなる群から選択される基であり、 n は1~10の整数であり、

R^2 および R^3 は、各々、 $-H$ または $-SO_3^-Na^+$ である

方法。

【請求項 2】

20

BBIタンパク質に対する抗体を作成する方法であって、

(b) 請求項1に記載の方法により調製された免疫原を、ヒト以外の哺乳類および鳥類からなる群から選択される宿主動物に投与する工程

を含む方法。

【請求項 3】

前記抗体がポリクローナル抗体であり、

(c) 前記宿主動物から、前記抗体を含む血清を採取する工程

をさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体がモノクローナル抗体であり、前記宿主動物がマウスであり、

30

(d) 前記宿主動物から脾細胞を採取する工程、

(e) 前記脾細胞をミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマを作成する工程、および

(f) BBIタンパク質に結合する抗体を産生するハイブリドーマのクローンを単離する工程

をさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

サンドイッチELISA法により試料中のBBIタンパク質を検出または定量化する方法であって、

請求項2に記載の方法により作成された抗体をキャプチャー抗体として反応槽に固定する工程、

40

前記試料を反応槽に入れる工程、

請求項2に記載の方法により作成されたもう1つの抗体であって、前記キャプチャー抗体とは異なる種の宿主動物により作成された抗体を、一次抗体として反応槽に入れる工程、反応槽を洗浄する工程、および

反応槽中の前記一次抗体の量を測定する工程

を含む方法。

【請求項 6】

前記キャプチャー抗体が、請求項4に記載の方法により作成されたモノクローナル抗体であり、

50

前記一次抗体が、請求項3に記載の方法により作成されたポリクローナル抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記試料が血清である、請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】

前記試料を、反応槽に入れる前に60～100 で加熱処理する工程をさらに含む、請求項5～7のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、抗体を作成するための免疫原を調製する方法に関し、さらに、その免疫原を用いて作成された抗体の使用に関する。より具体的には、本発明は、Bowman-Birk Protease Inhibitor（ボウマン・パーク プロテアーゼインヒビター。BBIと略される。）に対する抗体を作成するための免疫原を調製する方法に関し、さらに、その免疫原を用いて作成された抗体、およびその抗体を使用したBBIタンパク質の定量的アッセイ方法に関する。

【背景技術】

【0002】

大豆製品の積極的な摂取が低い発癌率および低い癌死亡率と関連していることが疫学的研究により示されており、実際、実験的研究から、いくつかの大豆由来成分が癌予防成分として有用であることが報告されている。特に、大豆に多く含まれているBBIは、毒性がほとんど認められない経口摂取量において癌の抑制効果が期待できると考えられている（非特許文献1）。

20

【0003】

BBIは71個のアミノ酸から構成される分子量約7～8 kDaの低分子量タンパク質である。BBIは、この低分子量にも関わらず、分子内に7個ものジスルフィド結合を持ち、コンパクトに凝縮した特徴的な構造を有している。この特徴的な構造が物理的安定性につながり、その結果として、経口摂取したBBIの大部分が腸まで到達すると推測されている（非特許文献2）。腸に達したBBIの40%程度が腸上皮細胞に取り込まれ、その10%程度が血液中出现し、最終的に脳を除く各臓器に総量で1%程度のBBIが分布すると報告されている（非特許文献3）。

30

【0004】

従ってBBIは、安全で、経口摂取による抗癌作用が期待でき、かつ、生体内で非常に安定であって各臓器において抗癌作用を発揮することが期待できる、数少ない食品由来抗癌成分であると言える。しかし、摂取されたBBIの吸収過程や生体内動態については不明な点が多く、この側面についての理解を進めることが課題となっている。

【0005】

BBIの生体内動態については、放射性標識されたBBIを用いた動物実験による研究例があるが、例えば人体においてそのような試験を行うことは現実的ではなく、BBIをより簡便に検出・定量化する手段が求められている。

40

【0006】

タンパク質を検出または定量化する手段として最も一般的なのは、特異的な抗体を使用することである。しかしながら、低分子量のタンパク質は一般に免疫原性が乏しいため、そのまま動物に投与することによって抗体を得ることが困難である場合が多い。キャリア分子に結合させたり、抗原分子同士を連結させたりすることにより、分子量を大きくして免疫原性を高める方法も知られているものの、そのような構造改変を経た抗原に対して生じる抗体は、多くの場合、特異性や力価が低く、本来の構造の低分子量タンパク質を適切に認識することができないという問題がある。

【0007】

分子量が小さく、かつ上記のような特徴的な構造を有するBBIは、質の良い特異的抗体

50

を得にくいという問題が特に顕著である。初期の研究では、BBIをグルタルアルデヒドで架橋したものを免疫原として抗体を作成した例があるが（非特許文献4）、特許文献1に言及されているように、この抗体は検出限界約0.1 mg/mlという非常に感度の悪いものであった。特許文献1は、精製されたBBIを単独で免疫原として抗体を作成したところ、未変性BBIに特異的に結合するモノクローナル抗体が得られたことを記載している（特許文献1）。従って特許文献1は、BBIの分子量の小ささは免疫原性を確保する上で決定的な障害にはならないことを示している。しかしながら、このモノクローナル抗体は尿中のBBI代謝物を検出できないことが報告されており（特許文献2）、インビボにおけるBBIの検出・定量には不適であることが示唆されている。特許文献2は、化学的に修飾したBBIを免疫原としてモノクローナル抗体を作成したことを記載しており、この抗体を用いて血清中のBBI濃度を測定した研究では、BBI摂取量に依存してBBI検出シグナルの平均値が上昇したことが報告されている（非特許文献5）。しかしながらこの抗体は、BBI未摂取の検体の血清においても100 ng/ml前後に相当する高いバックグラウンドシグナルを検出しており、偽陽性反応により定量化の精度が著しく低くなっていると考えられる。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第5053327号

【特許文献2】米国特許第5616492号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Am. J. Clin. Nutr. (1998) 68:1406S-1412S

【非特許文献2】Pharmacol. Rev. (1998) 78:167-209

【非特許文献3】Nutr. Cancer (1994) 21:113-131

【非特許文献4】Biochim. Biophys. Acta (1977) 495:369-382

【非特許文献5】Nutr. Cancer (2002) 43:167-173

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、BBIに対する高い特異性を示し、血清のような生体試料中において微量のBBIを検出することができ、かつBBIの定量的解析を可能とするアッセイ方法を提供すること、およびそのようなアッセイに使用できる抗体を作成する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

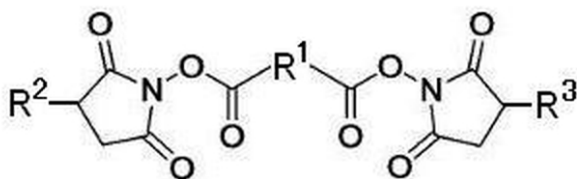
【0011】

すなわち、本発明は以下の側面を含む。

1. BBIタンパク質に対する抗体を作成するための免疫原の調製方法であって、

(a) 下記の式で表される架橋剤を用いてBBIタンパク質同士を架橋させる工程を含み、

【化1】



式中、

R¹は、-(CH₂)_n-、-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-、-(CHOH)₂-、および-O-(CH₂)₂-SO₂-(CH₂)₂-O-

からなる群から選択される基であり、 n は1～10の整数であり、

R^2 および R^3 は、各々、 $-H$ または $-SO_3^-Na^+$ である

方法。

2. BBIタンパク質に対する抗体を作成する方法であって、

(b) 上記1に記載の方法により調製された免疫原を、ヒト以外の哺乳類および鳥類からなる群から選択される宿主動物に投与する工程を含む方法。

3. 前記抗体がポリクローナル抗体であり、

(c) 前記宿主動物から、前記抗体を含む血清を採取する工程をさらに含む、前記2に記載の方法。

4. 前記抗体がモノクローナル抗体であり、前記宿主動物がマウスであり、

(d) 前記宿主動物から脾細胞を採取する工程、

(e) 前記脾細胞をミエローム細胞と融合させ、ハイブリドーマを作成する工程、および

(f) BBIタンパク質に結合する抗体を産生するハイブリドーマのクローンを単離する工程

をさらに含む、前記2に記載の方法。

5. サンドイッチELISA法により試料中のBBIタンパク質を検出または定量化する方法であって、

前記2に記載の方法により作成された抗体をキャプチャー抗体として反応槽に固定する工程、

前記試料を反応槽に入れる工程、

前記2に記載の方法により作成されたもう1つの抗体であって、前記キャプチャー抗体とは異なる種の宿主動物により作成された抗体を、一次抗体として反応槽に入れる工程、反応槽を洗浄する工程、および

反応槽中の前記一次抗体の量を測定する工程

を含む方法。

6. 前記キャプチャー抗体が、前記4に記載の方法により作成されたモノクローナル抗体であり、

前記一次抗体が、前記3に記載の方法により作成されたポリクローナル抗体である、

前記5に記載の方法。

7. 前記試料が血清である、前記5または6に記載の方法。

8. 前記試料を、反応槽に入れる前に60～100℃で加熱処理する工程をさらに含む、前記5～7のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、非常に簡易な工程により、高性能な抗BBI抗体を得るための免疫原を調製することができる。この方法により調製された免疫原を用いて作成された抗体は、ウェスタンブロット等においてBBIタンパク質に対する高い特異性を示し、血清中において f mol(フェムトモル)単位の微量のBBIタンパク質を検出することができ、そのような微量域において信頼性の高い定量的解析を可能とする。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、本発明の抗体を使用したELISA法の典型的な態様の模式図である。

【図2】図2は、SDS-PAGE法により、架橋前および架橋後のBBIタンパク質を解析した結果を示す。

【図3】図3は、本発明の免疫原を用いて作成したウサギ抗BBIポリクローナル抗体およびマウス抗BBIモノクローナル抗体を使用し、大豆抽出物および精製BBIタンパク質をサンプルとして行ったウェスタンブロット解析の結果を示す。

【図4】図4は、本発明のELISA法によるBBIタンパク質の定量化の例を示しており、捕獲

10

20

30

40

50

抗体の固相化を異なる抗体濃度を用いて行った場合を比較している。

【図5】図5は、本発明のELISA法によるBBIタンパク質の定量化の例を示しており、捕獲抗体の固相化を異なる種類の緩衝液中で行った場合を比較している。

【図6】図6は、本発明のELISA法によるBBIタンパク質の定量化の例を示しており、異なるブロッキング液を使用した場合を比較している。

【図7】図7は、本発明のELISA法により、異なる大豆品種におけるBBIタンパク質の含量を測定した結果を示す。

【図8】図8は、本発明のELISA法により、ヒト血清中のBBIタンパク質を定量化した実験の結果を示す。1ウェルあたり100 μ Lの試料溶液を使用している。

【発明を実施するための形態】

【0014】

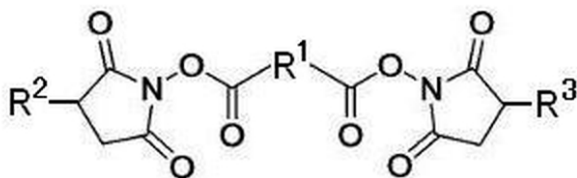
[免疫原の調製]

BBIは、大豆種子中に存在し、哺乳類のプロテアーゼ（トリプシン、キモトリプシン等）に対する阻害能を有するタンパク質として、当業者にはよく知られている。BBIタンパク質を大豆から抽出・精製する方法は当業者には知られており、シグマアルドリッチ社等から市販されているものを使用することもできる。本発明の免疫原調製方法において使用されるBBIは、天然の各種大豆から抽出したものであってもよいし、遺伝子組み換えがなされた植物や細胞から得られたものであってもよい。抽出され精製されたそのままの形態のBBIタンパク質を本発明の方法による免疫原調製に使用することができる。

【0015】

本発明の免疫原調製方法では、架橋剤を用いてBBIタンパク質同士を架橋する。本発明の免疫原調製方法で使用される架橋剤としては、スペーサー構造の両端にそれぞれN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステルが形成された化合物が好ましく、例えば以下の構造を有するものが含まれる。

【化2】

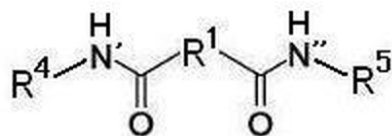


式中、 R^1 は $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-$ 、 $-(CHOH)_2-$ 、および $-O-(CH_2)_2-SO_2-(CH_2)_2-O-$ からなる群から選択される基であり、 R^2 および R^3 は、各々、 $-H$ または $-SO_3^-Na^+$ であり、 n は1~10の整数を表し、好ましくは3~8の整数であり、より好ましくは5~7の整数である。もっとも好ましくは n は6である。

【0016】

上記の架橋剤は、各々アミノ基を有する2つの分子を、NHSエステルの反応を通じて架橋する、いわゆるホモバイファンクショナル架橋剤である。従って、本発明の方法により調製された免疫原は、以下に示される構造を含むものとなり、

【化3】



ここで、 R^1 は上記で定義される基であり、 R^4 は架橋されたBBIタンパク質分子であり、 R^5 は架橋されたもう1つのBBIタンパク質分子であり、 N' および N'' はそれぞれ R^4 および R^5 で表されるBBIタンパク質分子のアミノ基に由来する窒素原子である。

10

20

30

40

50

【0017】

好ましい架橋剤の具体例としては、スベリン酸ジスクシンイミジル（DSS）、グルタル酸ジスクシンイミジル（DSG）、3,3'-ジチオビス（プロピオン酸スクシンイミジル）（DSP）、酒石酸ジスクシンイミジル（DST）、および（ビス-[2-(スクシンイミジルオキシカルボニルオキシ)-エチル]スルホン）（BSOCOES）が挙げられる。最も好ましい架橋剤はスベリン酸ジスクシンイミジル（DSS）である。DSP、DST、およびBSOCOESは、事後的な架橋の切断を可能とするための基をスペーサー中に含むものであるが、架橋の機構はDSSおよびDSGと同一である。これらの架橋剤は、例えばPIERCE社により市販されているものを使用してもよい。

【0018】

本発明の免疫原調製方法では、BBIタンパク質同士を架橋させてホモ複合体を生成し、これを免疫原とする。本発明の免疫原調製方法では、いわゆるキャリアタンパク質を使用しない。従って、上記架橋剤と反応させるタンパク質は、実質的にBBIタンパク質のみである。すなわち、架橋反応溶液中のタンパク質総重量の95%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは100%が、BBIタンパク質により占められる。

【0019】

反応溶液中のBBIタンパク質の濃度は、当業者が適宜調節することができるが、例えば0.5~25 mg/ml、より好ましくは1~20 mg/ml、さらに好ましくは3~10 mg/ml、もっとも好ましくは4~6 mg/mlである。反応溶液中の架橋剤の濃度も、同様に当業者が適宜調節することができるが、例えば0.25~20 mM、より好ましくは0.5~15 mM、さらに好ましくは1~10 mM、もっとも好ましくは4~6 mMである。一般に、反応溶液中では、BBIタンパク質のモル数に対して架橋剤のモル数が過剰であることが好ましく、例えば2倍、5倍、10倍、20倍、または50倍の過剰であってもよい。

【0020】

上記反応溶液は水溶液であることが好ましく、緩衝剤を含ませて緩衝液としてもよい。緩衝剤の種類および濃度は当業者が適宜選択することができるが、第一級アミンを有する緩衝剤（例えばTrisやグリシン）は使用すべきでない。好ましい緩衝液の例としては、炭酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、HEPES緩衝液等が挙げられる。適切な緩衝剤の濃度は、緩衝剤の種類に応じて当業者が適宜調節でき、例えば1~500 mM、好ましくは10~200 mM、より好ましくは20~150 mMである。反応液のpHは7~9が好ましい。

【0021】

上記架橋反応を行う反応温度は、通常は室温であり、例えば18~30 °Cであるが、当業者の通常の知識に基づいて適宜反応温度を変更することもできる。適切な反応時間は、反応温度によっても変り得るが、例えば室温ならば20~40分間、あるいは氷上ならば1~3時間が好ましい。所望の反応時間経過後、反応を停止させることが好ましい。反応を停止させるためには、終濃度20~50 mM程度のグリシン、リシン、またはTris等を反応液に添加すればよい。上記反応停止操作後（あるいは上記反応停止操作に代えて）、アセトン等による沈殿法、透析、またはゲル濾過等の当業者に知られた手法を適用することにより、BBIと反応しなかった架橋剤を除去することが好ましい。以上の操作により得られる、互いに架橋されたBBIタンパク質のホモ複合体が、本発明の免疫原である。

【0022】

本発明の免疫原調製法により調製された免疫原は、優れた特異性および定量性を有する抗BBI抗体を、高い再現性で製造することを可能とする。本発明の免疫原調製法はまた、BBI以外にも、有用な抗体を得ることが難しい様々な他の低分子量タンパク質にも応用できると考えられる。

【0023】

[抗体の作成]

上記方法により調製されたBBIタンパク質のホモ複合体を免疫原とし、適切な宿主動物に投与して免疫反応を誘発して、抗体を含む体液または細胞を当該宿主動物から採取することにより、BBIタンパク質に対する抗体を得ることができる。上記のように免疫原を調

10

20

30

40

50

製した後の、免疫工程以降の手順に関しては、当業者に知られた標準的なものを適宜使用することができる。本発明の免疫原を用いた抗体作成において使用できる手順を以下に一般的に記述するが、当業者の通常の知識の範囲内で様々な変更や調整を加えることが可能であることは言うまでもない。

【0024】

動物の免疫は、免疫原を皮下注射または皮内注射により投与することによって行うことができる。注射に先立って、免疫原の溶液を適切なアジュバント（例えばフロイントアジュバント）と混合する。適切な宿主動物はヒト以外の哺乳類または鳥類であり、例としてウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ロバ、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、サル、ニワトリ等が挙げられる。モノクローナル抗体を作成するためには、マウスを使用することがもっとも好ましい。1回の免疫に使用する免疫原の量は、宿主動物の種類によっても異なるが、ウサギの場合なら1羽について1回の免疫あたり例えば100~500 μ gの免疫原を注射することでき、マウスの場合ならば1匹について1回の免疫あたり例えば10~50 μ gの免疫原を注射することができる。通常は、2週間程度の間隔を置いて複数回の投与を行う。最終回を静脈投与としてもよい。

10

【0025】

免疫を終えた動物から血液を採取し、血清を分離することにより、ポリクローナル抗体を得ることができる。例えばプロテインAクロマトグラフィーや抗原に対するアフィニティークロマトグラフィー等の手法により、ポリクローナル抗体を血清からさらに精製する方法も当業者にはよく知られている。しかしながら、後述する実施例で示されるように、未精製の抗血清の状態でも十分に高い特異性を提供することができる。

20

【0026】

モノクローナル抗体を得るためには、免疫を終えた動物の脾臓からB細胞を採取し、ポリエチレングリコール法等によりこのB細胞をミエローマ細胞と融合してハイブリドーマ細胞を作成し、ハイブリドーマ細胞をクローン化するとともに、BBIを認識する抗体を産出するクローンをELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 法等により同定し、単離する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマの培養上清中に含まれている。このように単離した細胞クローンを宿主動物の腹腔に投与した後に腹水を採取することにより、上記クローンが産出するモノクローナル抗体を高濃度で得ることも可能である。培養上清や腹水からモノクローナル抗体をさらに精製する方法も当業者にはよく知られている。

30

【0027】

上記のように作成された本発明のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、本来の構造のBBIタンパク質、すなわち上記架橋剤による分子間架橋がされていないBBIタンパク質を認識することができる。また、例えばウェスタンブロットにおける交差反応の不在で示されるように、BBIタンパク質に対する高い特異性を有する。また、後述するELISA法への応用例で示されるように、BBI抗原量の増加に応じて直線的に結合量が増加する性質、すなわち定量性を提供することができ、fmol/ml単位の微量域においても、また、生体試料の複雑な分子環境中においても優れた定量性を示し得る。従って、本発明のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、ELISA法に限らず、多種多様な免疫学的検定において使用することができる。

40

【0028】

[サンドイッチELISA法の確立]

本発明者らは、本発明の免疫原を用いて作成したモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を使用して、BBIタンパク質を高感度・高精度で検出および定量化できるELISA法を確立した。本発明のELISA法は、BBIタンパク質の検出および定量化に特化した、いわゆるサンドイッチELISA法であり、本発明の抗体をキャプチャー抗体および一次抗体として使用することを最大の特徴とする。

【0029】

すなわち、本発明のELISA法は、アッセイプレートのウェル（反応槽）に、キャプチャー抗体（捕獲抗体、捕捉抗体ともいう）として、上記により得た本発明の抗BBI抗体（例

50

えば、マウスモノクローナル抗体)を固定し、次に、アッセイ対象となる試料をウェルに添加して抗体抗原反応に付し、その後、一次抗体として、本発明の抗BBI抗体であって上記キャプチャー抗体とは異なるもの(例えば、ウサギポリクローナル抗体)を反応させ、続いて適切な標識(アルカリホスファターゼ酵素等)を具えた二次抗体を反応させ、上記標識に由来するシグナルを測定することにより実施できる(図1)。

【0030】

本発明のELISA法においては、市販されている各種アッセイプレートを使用することができ、Greiner社655001プレートまたはNunc社442404プレートが特に好ましい。これらは96ウェルのマイクロプレートであり、以下、96ウェルプレートを使用する場合について記述する。キャプチャー抗体(本発明の抗BBI抗体)をウェルに固定して固相化する際の抗体溶液の濃度は、例えば1~50 µg/mlの間で適宜選択できるが、30 µg/mlが特に好ましく、これを各ウェルあたり50~200 µl添加してインキュベートすることにより固相化を行うことができる。抗体はpH 7.5のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)の溶液として使用することが好ましいが、他の緩衝液(例えばTris緩衝生理食塩水(TBS)または炭酸緩衝液)や他のpH(例えばpH 6.5~9.6)に適宜変更してもよい。抗体溶液および洗浄液その他の溶液は、例えばTween(登録商標)20のような界面活性剤等の添加剤を必要に応じて含むことができる。

10

【0031】

キャプチャー抗体を固相化した後に、ゼラチン、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、スキムミルク等でウェルをブロッキングすることが好ましい。1%ゼラチン溶液によってブロッキングすることがもっとも好ましい。ブロッキング後、アッセイ対象となる試料、一次抗体(本発明の抗BBI抗体であって、キャプチャー抗体とは異なるもの)、および二次抗体を順番にウェルに添加してそれぞれインキュベートし、反応させる。通常は、これらブロッキング溶液、試料、抗体等をそれぞれ添加する前後にウェルを洗浄する。「ウェルを洗浄する」とは、一つ前の工程の溶液をウェルから除去して、TBS等の洗浄液でウェルを満たして、この洗浄液をさらに除去する操作を意味し、通常はこの操作を数回繰り返す。

20

【0032】

二次抗体は、一次抗体に特異的に結合する抗体である。従って、二次抗体の種類は、一次抗体を作成した宿主動物種に依存して選択される。一次抗体とキャプチャー抗体とは異なる宿主動物種由来であることが好ましい。二次抗体はさらに、検出・定量化に適した標識分子が結合したものであることが好ましい。適切な標識分子の例としては、ホースラデッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリ・ホスファターゼ(ALP)等の酵素が挙げられる。これらの酵素の作用により発色したり発光したりする基質は当業者に多数知られている。また、それらの発色や発光を測定する手段も当業者には多数知られている。二次抗体を反応させた後にウェルを洗浄し、これら適切な基質を加え、発色や発光を適切な測定機器(例えば、プレートリーダー)を用いて測定することにより、ウェル中で結合している一次抗体の量を測定・定量化することができ、これはすなわち、試料中に含まれていたBBIタンパク質を測定・定量化することを意味する。各種標識を具えた動物種特異的二次抗体、および適切な基質は、数多く市販されており、当業者が適宜選択することができる。なお、ここでは二次抗体が共有結合を介して標識されている態様について記述したが、一次抗体が直接標識されている態様や、抗体がビオチン-アビジン結合を介して標識される態様なども可能である。

30

40

【0033】

本発明のELISA法は、検出限界約10 fmol/mlという高感度でBBIタンパク質を検出および定量化することができる。血清中に含まれるBBIをアッセイする場合には、検出限界がやや悪化し、約300 fmol/mlとなるが、それでもこれは、血清中BBIの検出感度としては先行技術で示されているものよりもはるかに優れていると見られる。さらに、血清試料を加熱処理することにより、検出限界が約30 fmol/mlとなるまで感度を改善できることを本発明者らは発見した。この加熱処理の条件は、当業者であれば容易に最適なものを決定するこ

50

とができるが、加熱温度は例えば60~100、好ましくは65~90、より好ましくは70~85、最も好ましくは80である。加熱時間は例えば2分間~3分間、好ましくは5分間~1時間、より好ましくは10分間~30分間、最も好ましくは15分間であり得る。血清中30 fmol/mlという検出感度は、類似のタンパク質や生理活性ペプチドについて通常見られる数字に近く、本発明の抗体およびELISA法により、生体試料中のBBIを十分な精度で検出および定量化できることを示している。

【実施例】

【0034】

[実施例1：抗BBI抗体を作成するための免疫原の調製]

BBIはSigma社(#T-9777)より購入し、不純物を以前の報告(Protein J. (2005) 24:275-282)に従って除去した。100 mM 炭酸緩衝液(pH 8.0)に精製BBIタンパク質を溶解することにより5 mg/mlのBBI溶液を調製し、これに最終濃度が5 mMになるように架橋剤DSS(PIE RCE社)を加えることによって反応液とし、25℃でインキュベートして架橋反応を行った。30分後に終濃度50 mMのグリシンを加え、架橋反応を停止させた。この反応液に3容量の冷アセトンを加えることによって架橋化BBIを沈殿させ、この沈殿を上清から分離することにより架橋化BBIを回収した。BBIの架橋化の結果を、17.5%のアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE法で調べた(図2)。

【0035】

架橋反応後のサンプルでは、架橋反応前と比べて電気泳動距離が高分子量側にシフトしたバンドが表れており、BBIタンパク質同士の架橋反応が効率よく達成されたことが示された。

【0036】

[実施例2：ポリクローナル抗体の作成]

実施例1で得られた架橋化BBIを免疫原として、常法に従って9週齢の雌のウサギ(New Zealand White種)に投与した。初回免疫では0.5 mg/羽、追加免疫(3回)ではそれぞれ0.25 mg/羽の免疫原を使用した。最終投与の1週間後、ウサギをチオペンタール麻酔処置し、頸動脈より全採血を行って抗血清を得た。得られたポリクローナル抗体のBBIに対する反応性を、大豆抽出物を試料とするウェスタンブロット法により調べた(図3左)。なお、大豆抽出物は、粉末大豆100 mgに抽出用緩衝液(1% SDS、5% グリセロール、60 mM Tris-HCl (pH 6.8)、1% 2-メルカプトエタノール)5 mLを加え65℃で15分間加温した後、4℃で8,000×g、10分間の遠心分離を行い、上清を回収することによって調製した。

【0037】

当該ポリクローナル抗体は、大豆抽出物を試料としたウェスタンブロットにおいてBBIに相当するバンドを明確に検出する一方で、他のタンパク質との交差反応は示しておらず、BBIタンパク質に対する高い特異性を有することがわかる。また、ウェスタンブロットに用いた試料は天然のBBIを含有するものであるから、当該抗体は、架橋剤で架橋したBBIを免疫原として作成されたにも関わらず、BBIタンパク質の本来の構造を認識する能力を有することがわかる。なお、丹波黒(黒大豆)抽出物においてはやや幅をもったバンドが検出されているが(レーンB)、これは後述のモノクローナル抗体でも同様に検出されるものであり、また、精製BBIもSDS-PAGEにおいて二重バンドとして現れることがあり(図2)、さらに、BBIには多型の存在が知られていることから(J. Agric. Food. Chem. 33, 389-393 (1985))、この幅をもったバンドは交差反応ではなくBBI特有の構造に起因する現象だと考えられる。

【0038】

[実施例3：モノクローナル抗体の作成]

[3.1] マウスの免疫

実施例1で得られた架橋化BBIを免疫原とし、アジュバントとしてフロイントアジュバントを用いて、以下に示す手順でマウス(BALB/C、雌)を免疫した。

【0039】

上記免疫原を、1回50 µgの投与量で、背中皮肉に皮下注射し、これを2週間毎に計4回行

10

20

30

40

50

った。3回目投与終了の1週間後には試験採血を行い、精製BBIを標準物質としたELISA法で抗BBI抗体の産出を確認した。皮下注射による最終投与の1週間後に、上記免疫原を20 µgの投与量で静脈注射し、投与後4日目に脾臓を摘出し、細胞融合用のB細胞を調製した。

【0040】

[3.2] 細胞融合およびハイブリドーマ選定

ミエローマ細胞 (P3U1) と抗体産出B細胞とを、ポリエチレングリコール (PEG) を使用した常法により細胞融合させた。融合処理後のこれら細胞を、96ウェルプレート中でHAT培地を用いて培養した。培養上清の抗体価をELISA法で評価して陽性ウェル (BBIを認識する抗体を産生しているハイブリドーマに対応するウェル) を選定した。陽性ウェル中のハイブリドーマ細胞を24ウェルプレート中で拡大培養し、培養上清を再度評価し、クローニングに移行させるウェルを選定した。

10

【0041】

[3.3] クローニングおよび樹立クローン細胞の拡大培養

選定した陽性株を限界希釈法で選定し、クローン化し、各シングルコロニーを拡大培養した。各培養上清の抗体価の評価、およびイムノグロブリンのサブクラス判定をELISA法で行い、腹水作成に用いるクローンを最終的に選定した。腹水作成のために樹立したクローン細胞の拡大培養を行い、腹水作成に用いた。

【0042】

[3.4] マウス腹水作成および精製

樹立した上記クローン細胞の懸濁液 (HBSSに懸濁) (0.5 ml/匹) を、BALB/C系雌マウス (5匹) の腹腔に投与し、投与3週間後に腹水を採取した。この腹水サンプルから遠心分離により不溶物を除いた後、カプリル酸を添加してIgG以外のタンパク質を沈殿させて除去した。PBSによる透析を行った後、サンプルを0.45 µmのフィルターに通し、精製されたモノクローナル抗体を得た。最終的に抗体の特異性等をウエスタンブロットで確認した (図3右)。実施例2のポリクローナル抗体と同様、BBIに対する高い特異性が確認された。

20

【0043】

[実施例4: BBI定量化のためのELISA法]

PBSまたはTBS中に希釈したキャプチャー抗体 (実施例3の抗BBIモノクローナル抗体、クローン番号MG-044) を、96ウェルプレートの各ウェルに100 µlずつ滴下した。なお、希釈後のキャプチャー抗体の濃度については、3~30 µg/mlの範囲で異なる濃度を試験した。上記96ウェルプレートを4で一晩放置することにより、キャプチャー抗体を固相化させた。固相化されなかった剰余抗体を含むキャプチャー抗体溶液をウェルから除去した後、洗浄液 (TBST: Tween (登録商標) 20を含むTBS) で2回ウェルを洗浄した。ブロッキング液を各ウェルに200 µlずつ滴下し、室温で1時間放置することにより、ウェルのブロッキングを行った。ブロッキング液を除去し、洗浄液で2回ウェルを洗浄した。なお、ブロッキング液としては、PBS中1%のゼラチン溶液、5%のBSA溶液、または0.5%のカゼイン溶液を使用した。

30

【0044】

アッセイの定量性を検証するために、0.1% BSAを含むPBS中で、精製BBIを異なる濃度で希釈したものを調製した。これらのサンプル希釈液、またはアッセイ対象となるBBI含有試料を、それぞれのウェルに100 µlずつ滴下し、37で1時間インキュベートすることにより、キャプチャー抗体に結合させた。上記サンプル希釈液またはBBI含有試料をウェルから除去し、洗浄液で4回ウェルを洗浄した。

40

【0045】

検出用の一次抗体 (実施例2のウサギ由来抗BBIポリクローナル抗体を含む抗血清) を、0.1%ゼラチンを含むPBSで2500倍希釈し、これを各ウェルに100 µlずつ滴下し、37で1時間インキュベートして反応させた。一次抗体希釈液を除去し、洗浄液で4回ウェルを洗浄した。二次抗体として、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体 (Sigma社、A-3687) を、0.1%ゼラチンを含むPBSで10000倍希釈し、これを各ウェルに100 µlずつ滴下し

50

、37 で0.5時間インキュベートして反応させた。二次抗体希釈液を除去し、洗浄液で4回ウェルを洗浄した。発色基質（比色測定の場合はパラ-ニトロフェニルホスフェート（PNP）、蛍光測定の場合はAtto-Phos（登録商標）（プロメガ社））の溶液を各ウェルに50 μ lずつ滴下し、37 で0.5~2時間インキュベートして酵素反応に付した。マイクロプレートリーダーで吸光度（405 nm）または蛍光強度（励起波長：435 nm、蛍光波長：555 nm）を測定した。

【0046】

図4~6は、BBI測定用ELISA法を確立するための予備的な諸実験の結果を示している。いずれの実験でも、サンプル中のBBI量の増加に応じて検出シグナルの直線的な上昇が観察されており、本発明の抗BBI抗体を使用したELISA法によりBBIタンパク質の定量的解析を行えることが示されている。

10

【0047】

キャプチャー抗体を固相化させる際の抗体濃度については、試験されたいずれの抗体濃度でもアッセイの定量性が確保されたが、30 μ g/mlとした場合にもっとも良好であった（図4）。また、キャプチャー抗体を固相化させる際の緩衝液の種類については、試験されたいずれのものでも良好な定量性が得られたが、pH 7.5のPBSを使用した場合に高濃度域の定量性が特に優れていた（図5）。ブロッキング液の種類については、試験されたいずれのものでも良好な定量性が得られたが、1%ゼラチンを使用した場合に低濃度域の定量性が特に優れていた（図6）。

【0048】

20

[実施例5：大豆中のBBI含量の測定]

実施例4で新たに構築したBBI検出測定用ELISA法で各大豆種のBBI含量を測定したところ、1~2%の範囲の数値（総タンパク質量に対する割合）が得られ、以前から報告されているBBI含量と一致することがわかった（図7）。従って、本発明のELISA法は、生物学的試料中のBBIタンパク質の定量に適していると考えられる。

【0049】

[実施例6：血清存在下におけるBBIタンパク質の定量化]

次に、上記ELISA法を用いて、ヒト血清中のBBIタンパク質を定量化する実験を行ったところ（図8）、血清非存在下ではBBI検出限界は10 fmol/mLであったのに対し、血清存在下では検出限界が300 fmol/mLまで悪化し、検出感度が低下することが明らかとなった。そこで、血清中のBBIの検出感度および測定精度を高める方法を探索したところ、血清試料を加熱処理（本実施例では80、15分間）することにより、BBIの検出限界が30 fmol/mLまで改善することがわかった。これは、血清中に含まれる阻害成分（血清タンパク質等）は加熱処理により変性し阻害活性を失うのに対し、BBIは熱に対して比較的安定であることによると考えられる。従って、試料の加熱処理は、血清に限らずあらゆる試料においてBBIの検出感度を上げるために有効となり得る。

30

【0050】

上記実施例で示されたように、ウサギおよびマウスという異なる動物種を用いて独立に作成された抗体が、いずれもBBIタンパク質に対する高い特異性を示した。また、サンドイッチELISAが有効に機能するためにはキャプチャー抗体と一次抗体との各々が特異的抗原に対する定量的結合能を有することが必要であるところ、上記サンドイッチELISAの良好な結果は、両抗体がそれぞれこれらの特性を有していることを示している。以上の結果は、本発明の免疫原が、産生する抗体の品質という点において高い再現性・信頼性を有していることを示している。

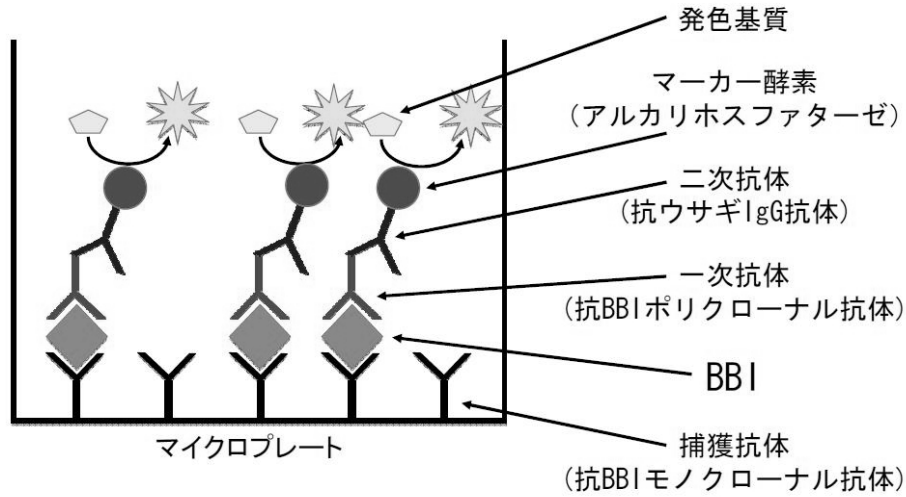
40

【産業上の利用可能性】

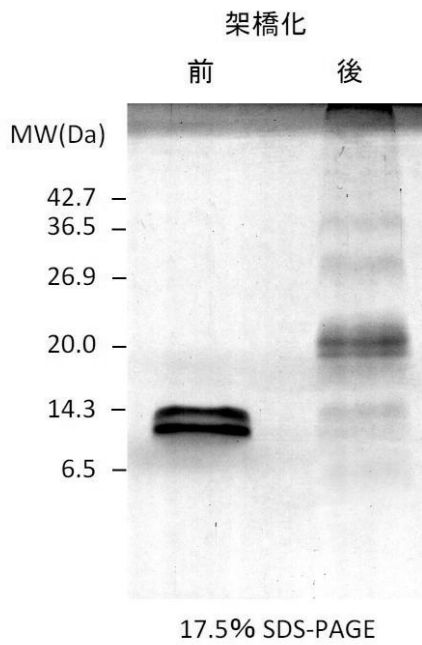
【0051】

本発明の免疫原を用いて作成された抗体は、疾病の診断、治療、予防、および研究にかかる医学・獣医学・薬学分野のほか、食品分野、バイオテクノロジー分野等において有用である。

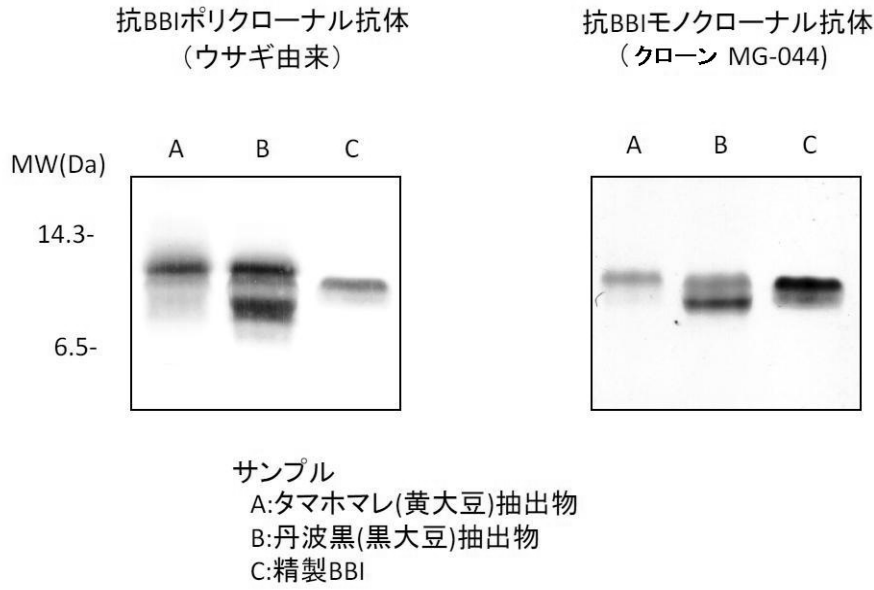
【 図 1 】



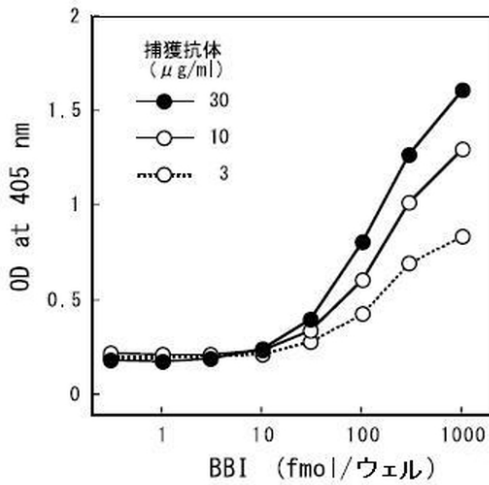
【 図 2 】



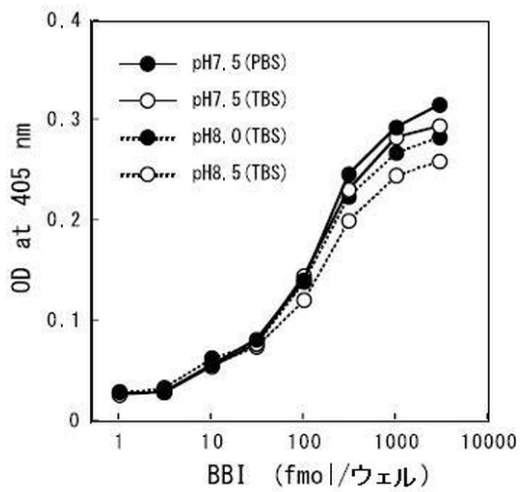
【 図 3 】



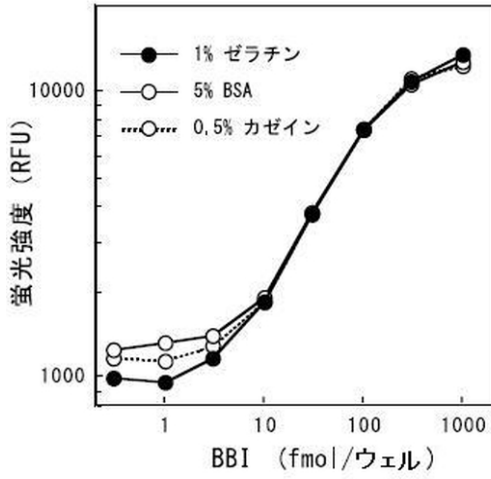
【 図 4 】



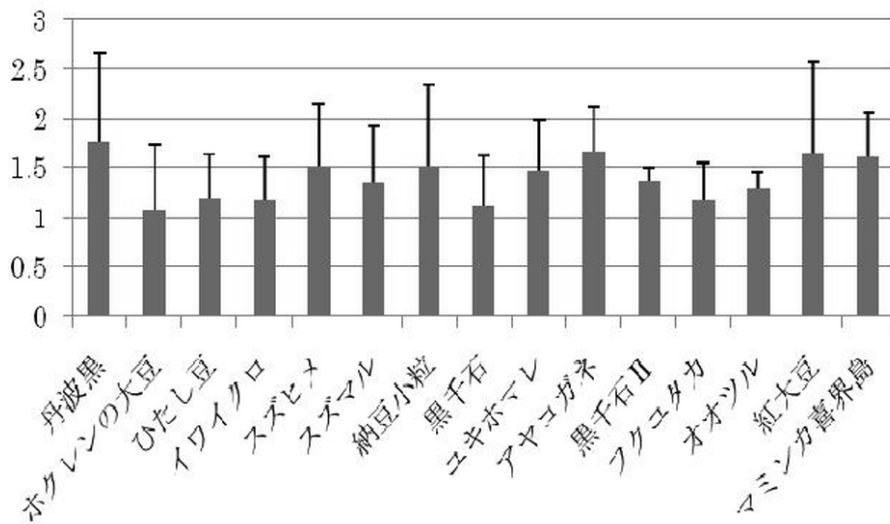
【 図 5 】



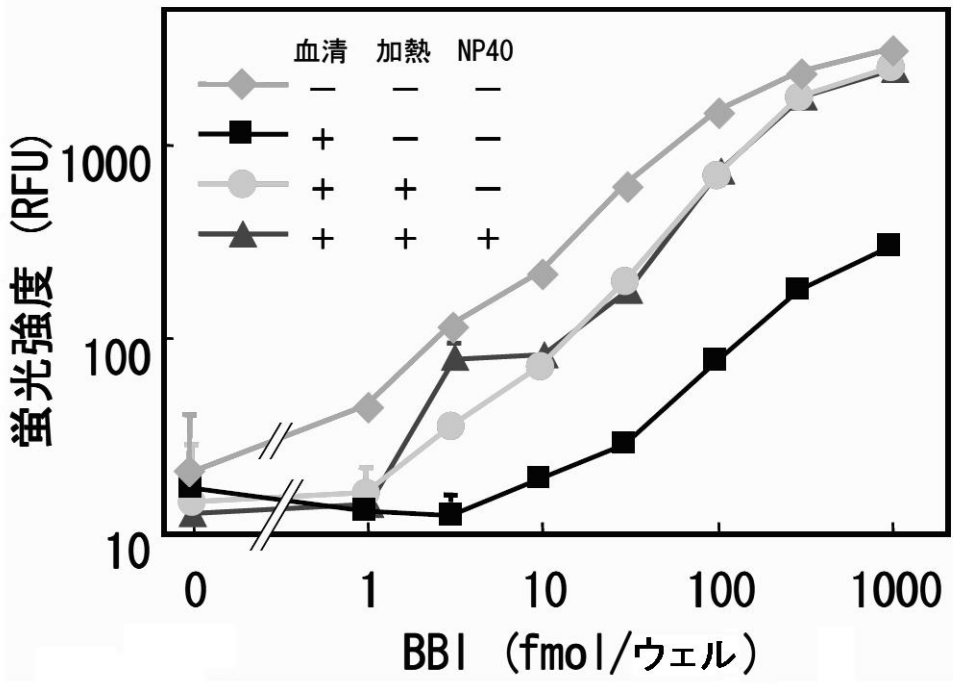
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 0 1 A	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
C 0 7 K 1/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/48 B	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 0 7 K 1/00	
C 0 7 K 16/16 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
C 0 7 D 307/60 (2006.01)	C 0 7 K 16/16	
	C 0 7 D 307/60 Z	

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA47 BA80 DA02 GA05 HA15
 4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
 4C037 KA01
 4C085 AA13 AA14 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA33 CA40 DA75 DA76 DA86 EA20
 EA28 EA50 FA65 FA72 GA26

专利名称(译)	制备用于制备抗BBI抗体的免疫原		
公开(公告)号	JP2014227396A	公开(公告)日	2014-12-08
申请号	JP2013109694	申请日	2013-05-24
申请(专利权)人(译)	学校法人东洋大学		
[标]发明人	矢野友啓 矢野善久		
发明人	矢野 友啓 矢野 善久		
IPC分类号	C07K14/415 C12P21/08 A61K39/395 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/48 C07K1/00 C12N15/02 C07K16/16 C07D307/60		
FI分类号	C07K14/415 C12P21/08 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 G01N33/53.D G01N33/543.501. A G01N33/577.B G01N33/48.B C07K1/00 C12N15/00.C C07K16/16 C07D307/60.Z C12N15/06.100 C12N15/13		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA26 2G045/CA26 2G045/CB20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/ FB07 2G045/FB15 4B024/AA01 4B024/BA47 4B024/BA80 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C037/KA01 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA33 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/ FA65 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	三好秀 高桥俊		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供具有优异的特异性，定量性和检测灵敏度的抗BBI蛋白抗体。通过用交联剂交联BBI蛋白来制备同型缀合物，并使用该抗体作为免疫原来制备抗体。点域8

