

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5749947号  
(P5749947)

(45) 発行日 平成27年7月15日(2015.7.15)

(24) 登録日 平成27年5月22日(2015.5.22)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 4 5 A
<b>C 1 2 N 5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 7 5
<b>CO 7 K 16/18</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 4 1 B
<b>GO 1 N 33/531</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 8 1 A

請求項の数 6 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-54493 (P2011-54493)  
 (22) 出願日 平成23年3月11日(2011.3.11)  
 (65) 公開番号 特開2012-189503 (P2012-189503A)  
 (43) 公開日 平成24年10月4日(2012.10.4)  
 審査請求日 平成26年2月13日(2014.2.13)

微生物の受託番号 FERM P-22051  
 微生物の受託番号 FERM P-22052

(73) 特許権者 598041566  
 学校法人北里研究所  
 東京都港区白金5丁目9番1号  
 (73) 特許権者 000135036  
 ニプロ株式会社  
 大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号  
 (74) 代理人 110001195  
 特許業務法人深見特許事務所  
 (72) 発明者 星 史雄  
 神奈川県相模原市南区北里一丁目15番1号 学校法人北里研究所内

審査官 三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ネコ由来 $\alpha$ 1 ミクログロブリンの測定方法および測定キット、ならびに、そのための抗体および抗体産生細胞株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号: FERM P-22051) により産生された第1の抗体と、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号: FERM P-22052) により産生された第2の抗体とを用いて、酵素免疫測定法(サンドイッチ法)、蛍光免疫測定法(サンドイッチ法)、放射性同位体免疫測定法(サンドイッチ法)、免疫比濁法およびラテックス免疫比濁法からなる群より選択されるいずれかの方法により、検体中のネコ由来  $\gamma_1$  ミクログロブリン濃度を測定する方法。

【請求項2】

細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号: FERM P-22051) により産生された第1の抗体と、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号: FERM P-22052) により産生された第2の抗体とを含む、ネコ由来  $\gamma_1$  ミクログロブリン濃度測定用キット。

【請求項3】

細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号: FERM P-22051)。

【請求項4】

細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号: FERM P-22052)。

【請求項5】

配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質を抗原とし、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号: FERM P-22051) により産生されたものである、ネ

10

20

コ由来 1ミクログロブリンに特異的に結合する抗体。

【請求項6】

配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質を抗原とし、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号: FERM P-22052) により産生されたものである、ネコ由来 1ミクログロブリンに特異的に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ネコ由来の 1ミクログロブリンの測定方法および測定キット、ならびに、そのための抗体および抗体産生細胞株に関する。

10

【背景技術】

【0002】

近年、少子化に伴い、ペットを飼う世帯は増加の一途をたどっている。しかしながら、ペットの性質に即した飼い方がなされていないケースも少なくはない。特に、偏食の結果、ペットが糖尿病などの成人病的症状を引き起こしてしまい、ペットを獣医に通院させるケースまで見られる。

【0003】

このような現状から、近年はペットの診断に関する事業が拡大しつつある。仮に、ペットの腎症を早期に発見することができれば、獣医師は、飼い主によるペットの飼い方、特に食事の与え方について改善を指導できるようになる。一般に、腎症のマーカーの1つとして、1ミクログロブリン ( $\gamma_1$ -m) が挙げられる。

20

【0004】

1ミクログロブリンは、たとえばヒト由来の場合には、ヒトの全身の細胞で産生されており、細胞内外の環境変化にはほとんど影響を受けないで一定の産生量で細胞外に分泌され、近年では、糖尿病性腎症などの早期診断の指標として有用であるとする報告例がみられる。

【0005】

しかしながら、ネコ由来の 1ミクログロブリンに関しては、当該タンパクに特異的な抗体が存在しないどころ、当該タンパクのアミノ酸配列すら解明されていないのが現状である。

30

【0006】

本発明者は、ネコ由来の 1ミクログロブリンのアミノ酸配列を解明すると共に、当該タンパクに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生することに成功し、特許出願を行っている(特願2010-033676、本明細書中において「先願」と呼称する)。

【0007】

しかしながら、これらの抗体は、高感度でネコ由来の 1ミクログロブリンの濃度を測定するには十分ではなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

40

【非特許文献1】Journal of Veterinary Internal Medicine. 22(5):1111-1117, 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、より高感度でネコ由来の 1ミクログロブリンに特異的な抗体の組み合わせによる測定方法およびキット、ならびに、そのための抗体および抗体産生細胞株を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

50

本発明者は、鋭意研究の結果、この抗体を産生する細胞の取得における、マウスの取得箇所等により、ネコ由来の 1 ミクログロブリンの抗体への結合力が異なる点を発見し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下のとおりである。

【0011】

本発明は、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号：FERM P-22051) により産生された第1の抗体と、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号：FERM P-22052) により産生された第2の抗体とを用いて酵素免疫測定法(サンドイッチ法)により検体中のネコ由来 1 ミクログロブリン濃度を測定する方法を提供する。

【0012】

本発明は、さらに、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号：FERM P-22051) により産生された第1の抗体と、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号：FERM P-22052) により産生された第2の抗体とを含む、ネコ由来 1 ミクログロブリン濃度を測定するキットについても提供する。

10

【0013】

また本発明は、新規な抗体産生細胞株である細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号：FERM P-22051)、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号：FERM P-22052) についても提供する。

【0014】

本発明はさらに、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質を抗原とし、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号：FERM P-22051) または細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号：FERM P-22052) により産生されたものである、ネコ由来 1 ミクログロブリンに特異的に結合する抗体についても提供する。

20

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、より確実に検体中のネコ由来 1 ミクログロブリン濃度を高感度で測定することができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】参考例1におけるGST融合タンパク発現後のSDS - PAGEの結果を示す写真である。

【図2】参考例1におけるHPLCの結果得られたクロマトパターンを示すグラフであり、左側の縦軸は波長220nmでの吸光度、右側の縦軸はアセトニトリル濃度(%)、横軸は時間(分)を示している。

30

【図3】実施例1および2の酵素免疫測定法(サンドイッチ法)による測定結果を示すグラフであり、左側の縦軸は吸光度を示している。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明によれば、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3 (受託番号：FERM P-22051) により産生された第1の抗体と、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4 (受託番号：FERM P-22052) により産生された第2の抗体とを用いて酵素免疫測定法(サンドイッチ法)により、検体中のネコ由来 1 ミクログロブリン濃度を測定する方法が提供される。

40

【0018】

ここで、検体とは、ネコ由来の血液、尿、骨髄液およびネコ由来細胞の懸濁液の他、ネコの血液透析で用いた透析液も含まれる。

【0019】

また、ネコ由来 1 ミクログロブリンとは、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をいう。本発明者は、ネコの遺伝子の中で 1 ミクログロブリンをコードする構造遺伝子(本明細書中において「 $\gamma_1$ -m遺伝子」と呼称する。)を初めて特定し、当該  $\gamma_1$ -m遺伝子によりネコ由来の 1 ミクログロブリン(本明細書中において「 $\gamma_1$ -m」と呼称する。)のアミノ酸配列も初めて解析し、特許出願をしている(特願2010-033676)。配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質が、本発明

50

者によって初めてアミノ酸配列が特定されたネコ由来の  $\gamma_1$ -mである。

【0020】

また、本発明者は、このネコ由来  $\gamma_1$  ミクログロブリンを抗原とする抗体を産生する細胞の作製に成功し、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寄託を行っている（受託番号：FERM P-21910、FERM P-21911）。本発明は、上述の抗体よりもより好感度に  $\gamma_1$ -mを測定することに成功し、改めて、平成23年1月12日付けで独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託を行ったものである（受託番号：FERM P-22051、受託番号：FERM P-22052）。本発明は、この新規な抗体産生細胞株である細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3（受託番号：FERM P-22051）、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4（受託番号：FERM P-22052）についても提供する。

10

【0021】

また本発明は、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質（ネコ由来の  $\gamma_1$ -m）を抗原とし、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb3（受託番号：FERM P-22051）により産生されたものである、ネコ由来  $\gamma_1$  ミクログロブリンに特異的に結合する抗体（第1の抗体）、ならびに、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質（ネコ由来の  $\gamma_1$ -m）を抗原とし、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\gamma_1$ -m mAb4（受託番号：FERM P-22052）により産生されたものである、ネコ由来  $\gamma_1$  ミクログロブリンに特異的に結合する抗体（第2の抗体）についても提供する。

【0022】

本発明の第1の抗体および第2の抗体は、酵素免疫測定法（サンドイッチ法）、蛍光免疫測定法（サンドイッチ法）、放射性同位体免疫測定法（サンドイッチ法）、免疫比濁法およびラテックス免疫比濁法の2つの抗体として用いられる。

20

【0023】

酵素免疫測定法（サンドイッチ法）は、タンパク定量における代表的な測定方法であり、当業者であれば容易に実践できる測定方法である。酵素免疫測定法（サンドイッチ法）は、基本的には、固相に固定する抗体（捕獲抗体）と、当該捕獲抗体に結合した抗原に対してさらに結合する抗体（一次抗体）の2種類を用いる。この上で、発色または発光反応を行うための酵素標識が一次抗体になされている。または、一次抗体に酵素標識がなされていない場合は、一次抗体にさらに結合可能な抗体であって、酵素標識がなされている抗体（二次抗体）を用いてもよい。二次抗体としては、IgGおよびIgM等が利用できる

30

【0024】

なお、ここでいう酵素標識とは、発色または発光反応に利用可能な酵素を直接一次抗体に標識する態様の他、ある特定の結合様式を介して反応時に間接的に酵素を修飾する態様も含むことは、当業者であれば常識である。特定の結合様式としては、例えば、アビジン-ビオチン結合が代表的である。より詳しく説明すると、ビオチンを修飾の一次抗体と、アビジン修飾ペルオキシダーゼの組み合わせがこの態様に該当し、アビジン-ビオチン結合という結合様式を介してペルオキシダーゼは間接的に一次抗体に修飾している。

【0025】

一次抗体等に標識される酵素は、当業者が適宜選択することができ、ペルオキシダーゼの他、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼおよび  $\beta$ -ガラクトシダーゼ等を用いることができる。酵素に用いる基質についても、用いる酵素の種類に応じて当業者が適宜選択することができ、例えば、酵素がペルオキシダーゼの場合、テトラメチルベンジリン、2,2'-アジノビス(3-エチルベゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム塩、4-アミノアンチピリン、4-アミノアンチピリン塩酸塩、5-アミノサリチル酸、2,4-ジクロロフェノール、N,N-ジメチル-m-トルイジンおよびN,N-ジメチルアニリン等が挙げられ、酵素がアルカリホスファターゼの場合、ブルーテトラゾリウム、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸2ナトリウム塩、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸p-トルイジン塩およびニトロブルーテトラゾリウム等が挙げられる、酵素がルシフェラーゼの場合、D-( )-ルシフェリンが挙げられ、酵素が

40

50



上述したような上流側プライマーおよび下流側プライマーを用いて、95 2分1サイクル、95 1分、75 1分、72 1分30サイクル、72 10分1サイクルの条件でPCRを行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動した後、アガロースゲルからDNA抽出した。DNA抽出溶液をフェノールと等量混合した後、15700×gで5分間遠心分離後、核酸が含まれる水層を分離した。分離した水層にクロロホルムを等量混合し、15700×gで5分間遠心分離した後、上清を分離した。次に、分離後の溶液に2.5倍量の100%エタノールを添加し、-80 で30分静置し、その後15700×gで5分間遠心分離した後、上清を除去し、沈渣を得た。沈渣に70%エタノールを添加し、15700×gで5分間遠心分離後、上清を除去し、PCR産物の濃縮試料を得た。PCR産物の濃縮試料に、5μlのEcoRI(タカラバイオ株式会社)、5μlのXhoI(タカラバイオ株式会社)、5μlのH.Buffer(500mM Tris-HCl, pH7.5、100mM MgCl<sub>2</sub>、10mM Dithiothreitol、1000mM NaCl)および35μlのRNase free H<sub>2</sub>Oを混和した。また、5μl(2.5μg)のpGEX6P-1(GEヘルスケアバイオサイエンス)を、5μlのEcoRI、5μlのXhoI、5μlのH.Bufferおよび30μlのRNase free H<sub>2</sub>Oと混和した。各溶液を37 で1晩インキュベートすることで制限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動を行い、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を使用して、各DNAバンドの抽出を行った。DNA Ligation Kit(タカラバイオ株式会社)を用いてライゲーションを行った。すなわち、5μlのLigation Mix、1μlの制限酵素処理された<sub>1</sub>-mのcDNA溶液および4μlのpGEX6P-1を混和し、16 で1晩静置し、<sub>1</sub>-mのcDNAをライゲーションさせたplasmid vector(pGEX-<sub>1</sub>-m)が作出された。さらに、このpGEX-<sub>1</sub>-m溶液2.5μlを、E.coli JM109 Competent Cells(タカラバイオ株式会社)25μlに添加し、氷上で30分間静置し、次に42 の恒温槽で45秒間Heat Shockを与え、直ちに2分間氷冷後SOC培地(2% tryptone、0.5% Yeast extract、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgSO<sub>4</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>、20mM glucose)250μlを緩やかに加え、37 1時間保温した。pGEX-<sub>1</sub>-mがトランスフェクトされた大腸菌溶液100μlをアンピシリン加LB培地にそれぞれ塗布し、37 で1晩静置後、コロニーを釣菌し、アンピシリン加LB液体培地1.2mlに混和後、37 で1晩培養した。培養後の液体培地は、13400×gで1分間遠心分離後、上清を完全に除去し、得られた沈渣から、QIAPrep Spin Mini Kit50(QIAGEN)を用いて、pGEX-<sub>1</sub>-mの抽出を行った。このpGEX-<sub>1</sub>-mを、アガロースゲル電気泳動法により確認した。また、pGEX-<sub>1</sub>-mのサブクローニングの成否は、T7プライマーを用いてDye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems)およびApplied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を使用した塩基配列解析により行った。

#### 【0033】

##### (3) His-Tag付きGST融合タンパク発現の確認

pGEX-<sub>1</sub>-mがトランスフェクトされた大腸菌を、37 、1晩LB培地で培養後、100μlをIsopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG:0.1mM)20μlと混和し、30 で約2時間振盪培養(BR40-LF、TAITEC)した。振盪培養後の大腸菌溶液を、15700×gで1分間遠心分離後、上清を除去し、沈渣に可溶化液(50μlの50mM Tris-HCl、100μlの1×RIPA Lysis Buffer(Up State)、140μlのProtease Inhibitor、710μlのH<sub>2</sub>O)30μlを加え可溶化後、15700×gで5分遠心分離し、上清と沈渣とに分けた。上清30μlに、30μlの2×SB溶液(2% SDS、40% Glycerol、0.6% BPB、25mM Tris-HCl Buffer(pH6.8、20 ))および1μlの2MEを加え、95 で3分間加温した。沈渣にSB溶液20μlを加え、超音波破碎机(UR-20P、TOMY SEIKO CO,LTD)で5秒間破碎後、95 で3分間加温した。その後、上清および沈渣について、SDS-PAGEにてHis-Tag付きGST融合タンパク発現の確認およびHis-Tag付きGST融合タンパクの大腸菌での可溶性を確認した。

#### 【0034】

##### (4) SDS-PAGE法

SDS-PAGEは、コンパクトPAGE(AE-7300、ATTO)を用いてLaemmliの方法に準拠し、これに以下に示す修正を加え実施した。すなわち、分離ゲルの組成は、15% Acrylamide、0.2% N,N-Methylene-bis-Acrylamide、0.1% SDS、375mM Tris-HCl buffer(pH8.8、20 )とした。ゲルは2・4連ゲル作製器(AE-7344、ATTO)を用いて作製した。電極緩衝液の

組成は、0.1% SDS、129mM glycine、25mM Tris (pH8.3、20 )とした。泳動用試料 (SB )の組成は、1% SDS、20% Glycerol、0.3% BPB、12.5mM Tris-HCl Buffer (pH6.8、20 )とした。また、マーカーとして、プレステインドSDS - PAGEスタンダード (Broad) マーカー (BIO-RAD) もしくはSDS - PAGEスタンダード (Broad) マーカー (BIO-RAD) を用いた。泳動は、Tris-Gly / PAGE Highモードで30分泳動した後、Tris-Gly / PAGE Lowモードにして、下部イオン界面がゲル下端から1~2mm上方の位置に移動したときに終了した。SDS - PAGE終了後のゲルについて、Oakle法に準拠した銀染色法を実施した。具体的には、ゲルを30% ethanol、10% acetic acid溶液にて固定後、洗浄し、20% ethanolに5分間2回浸漬した。20% ethanol除去後、5% glutaraldehyde溶液にて4分間反応させ、純水で洗浄後、20% ethanolに4分間2回浸漬した。その後、純水で洗浄し、アンモニア性硝酸銀溶液にて5分間反応させ、純水で洗浄後、0.005% citric acid、0.019% formaldehyde溶液で発色させた。発色確認後のゲルについて、20% ethanol、10% acetic acid溶液にて5分間固定し、20% ethanolに5分間2回浸漬後、写真を撮影した。なお、銀染色法はすべて遮光条件下にて実施した。

10

#### 【 0 0 3 5 】

##### ( 5 ) His - Tag付きGST融合タンパクの発現誘導と単離

His - Tag付きGST融合タンパクの発現が確認された大腸菌を、アンピシリン加LB寒天培地に塗布し、コロニーを釣菌後、3mlのアンピシリン加LB液体培地に加え1晩37 で振盪培養した。続いて、その培養液3mlを、アンピシリン加LB液体培地250mlに加え、37 で約150分振盪培養後、2.5mlの0.1mM IPTGを添加し、約2時間、25 で振盪培養した。His - Tag付きGST融合タンパク発現誘導後の培養液を6000 x gで15分間遠心分離した沈渣を、20mlの0.5mM EDTA、0.4M NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、5% グリセロール、0.5mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1mM Dithiothreitol (DTT) および1mg/ml リゾチーム加50mM Tris-HCl (pH8.0) に懸濁し、4 で1時間静置後、凍結融解を2回行った。続いて、Nonidet P-40を0.5% 添加し、超音波破砕機で20秒間 x 5回破砕後、9300 x gで20分間遠心分離し、上清と沈渣をSDS - PAGEにて分析した。泳動の結果、His - Tag付きGST融合タンパクは上清に含まれていることが分かった (図1)。

20

#### 【 0 0 3 6 】

##### ( 6 ) アフィニティークロマトグラフィー法

上記で得られた上清をニッケルアフィニティークラム (Bio-Scale Mini IMAC Profinity, Bio Rad) の結合buffer (20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、10mMイミダゾール、pH7.4) にて透析後、カラムに添加され結合バッファーでよく洗浄し、溶出バッファー (20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、300mMイミダゾール、pH7.4) で溶出した。溶出はペリスタポンプ (SJ-1211L、ATTO) を用いて流速0.5ml/minで行った。また、溶出液の吸光度は紫外吸光度モニター (AC-5100L、ATTO) を用いて吸光波長220nmでモニターし、記録計 (R-01A、RIKADENKI) で記録した。溶出液のSDS - PAGE像は図1に示されたとおり、His - Tag付きGST融合タンパクをメインバンドとして複数のバンドが確認された。得られたHis - Tag付きGST融合タンパク溶出液2mlを、濃度が1mMになるようにDTTを添加し混和後、分子量13kDaカットの透析膜 (UC30-32-100、三光純薬株式会社) に入れられ150mM NaCl、1mM EDTA加50mM Tris-HCl (pH7.5) 2 Lを用いて約6時間透析した。透析後のHis - Tag付きGST融合タンパク溶出液は、DC Protein Assay (Bio-Rad) を用いてタンパク定量後、タンパク量200 µgに対し、PreScission Protease (GEヘルスケアバイオサイエンス) が1 µlを添加して混和後、4 で6時間以上反応させた。酵素切断後のSDS - PAGE像では、切断されたGSTとネコの組み替え型<sub>1</sub>-mが確認された。さらに、この溶液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用の試料とした。

30

40

#### 【 0 0 3 7 】

##### ( 7 ) HPLC法

HPLCシステムは、システムコントローラー (SCL-10A VP、Shimadzu)、送液ユニット (LC-10AD VP、Shimadzu)、紫外部分光高度計 (SPD-10A VP、Shimadzu)、カラムオープン (CTO-10A VP、Shimadzu) および脱気ユニット (DGU-14A、Shimadzu) から構成され、カ

50

ラムはMightysil RP-18 GP250-4.6 (関東化学) を使用した。HPLCの分離条件は、移動相の流速を1ml/min、試料添加量を400  $\mu$ lとし0.1% trifluoroacetic Acid (TFA) 溶液で平衡化させたカラムに、0.1% TFA加acetonitrile溶液を用いてacetonitrile濃度0~80%のライナーグラジエントにして行った。なお、溶出液は、吸光波長220nmで吸光度をモニターし、検出されたピークを分取し、濃縮遠心機 (CC-181、TOMY) にて1時間遠心分離後、凍結乾燥機 (FDU-540、EYELA) にて乾燥させた後-20  $^{\circ}$ Cで保存した。クロマトパターンは、図2に示すとおりで、だいたい8個のピークに分離され、それぞれの溶出された分画のタンパク組成は、SDS-PAGE法により分析された。分析の結果、f分画に単独で溶出された。このタンパクを組み替え型ネコ  $\gamma_1$ -m (rFe  $\gamma_1$ -m) の抗原としてモノクローナル抗体の作成を行った。

10

#### 【0038】

<参考例2：抗体産生ハイブリドーマ、抗rFe  $\gamma_1$ -m抗体の作製>

参考例1で合成したタンパクを組み替え型ネコ  $\gamma_1$ -m (rFe  $\gamma_1$ -m) の抗原としてモノクローナル抗体を作製するにあたり、まずは抗体産生ハイブリドーマを作製した。

#### 【0039】

(1) 抗体産生ハイブリドーマの作製

(1-1) 免疫法

免疫法は、精製rFe  $\gamma_1$ -mを抗原としてBalb/cマウスの後肢肉球 (footpad) の皮下に注射することにより行った。免疫は5日間隔で4回行い、初回から第3回目までの免疫は抗原溶液100  $\mu$ l (1mg/ml) とアジュバントを等量混合させてエマルジョン化させた抗原液200  $\mu$ l (50  $\mu$ g/foot) を、また、最終免疫では抗原溶液20  $\mu$ l (10  $\mu$ g/foot) のみを用いて行った。また、アジュバントは初回免疫ではAdjuvant Complete Freund (和光純薬工業株式会社) を、第2回目から第3回目の免疫ではAdjuvant Incomplete Freund (和光純薬工業株式会社) を用いた。

20

#### 【0040】

(1-2) 細胞融合

最終免疫から3日後、膝窩リンパ節を摘出し、リンパ球を回収後、GenomONE-CF (石原産業株式会社) を用いて、細胞融合を行った。また、ミエローマ細胞としてはP3X63-Ag.8.653 (大日本住友製薬株式会社) を用いた。融合方法は添付のプロトコールに従って行った。具体的には、まず、リンパ球とミエローマ細胞とを細胞数が5:1の比率になるように混合し、1000rpm、4  $^{\circ}$ Cで5分間遠心した後、上清を除去した。そこに、氷冷した融合用緩衝液をリンパ球 $10^8$  cellsあたり1ml添加し、均一に懸濁した後、氷冷したHVJ-Envelope懸濁液を細胞混合液1mlあたり25  $\mu$ l添加した。細胞懸濁液を氷上で5分間静置した後、1000rpm、4  $^{\circ}$ Cで5分間遠心し、上清を除去せずに細胞がペレット化した状態のまま37  $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。

30

#### 【0041】

インキュベート終了後、37  $^{\circ}$ Cに加温した増殖用培地をリンパ球 $10^8$  cellsあたり50ml加え、懸濁後、96穴プレート (96 Well Cell Culture Plate: Greiner bio-one) に100  $\mu$ l/wellで播種した。なお、増殖用培地としてRPMI1640 (Invitrogen) にペニシリンG (PG; 明治製薬株式会社) 10万IU/ml、ストレプトマイシン (SM; 明治製薬株式会社) 100mg/ml、7.5% Bri Clone (IL-6、ヒト、ブライクローン; Cat. No. BR-001、大日本住友製薬株式会社)、10% 非働化ウシ胎仔血清 (FBS; 株式会社ニチレイ) を加えたものを用い、添加、懸濁の際は穏やかに操作した。24時間培養後、培養培地を上記の増殖用培地に2% HAT (Invitrogen) を添加したHAT培地に交換した。

40

#### 【0042】

(2) 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

得られたハイブリドーマについて、細胞融合から1週間後にELISA法を用いた一次スクリーニングを行い、この結果、反応陽性となったwellのハイブリドーマのみをWestern blotting法を用いた二次スクリーニングで確認した。

#### 【0043】

50

## (2-1) 一次スクリーニング

rFe<sub>1</sub>-mを抗原としたELISA法を用いて、抗体産生ハイブリドーマの一次スクリーニングを行った。ELISAプレートとしては、96 Well ELISA Microplate (Greiner bio-one) を使用した。また、プレートの洗浄には自動洗浄機 (Auto Mini Washer AMW-8、バイオテック株式会社) を用い、洗浄液としてはPBS (1.37M NaCl、27mM KCl、100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、18mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4、25℃) を使用した。固相として、PBSで3μg/mlに調整したrFe<sub>1</sub>-mを50μl/wellでプレートに添加し、4℃で一晩反応させた。固相反応終了後、プレートの抗原液を捨て、ブロッキング液として0.5% Bovine Serum Albumin (BSA; 和光純薬工業株式会社) を添加したPBSを150μl/wellで加え、37℃で60分間反応させた。ブロッキング反応終了後、プレートを1回洗浄し、一次抗体として各ハイブリドーマ培養の培養上清を50μl/wellで加え、37℃で60分間反応させた。一次抗体反応終了後、プレートを1回洗浄し、二次抗体として0.1% BSAを添加したPBSで1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (SIGMA-ALDRICH) を50μl/wellで加え、37℃で60分間反応させた。二次抗体反応終了後、プレートを3回洗浄し、基質液として0.04% o-フェニレンジアミン、0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加したPBSを150μl/wellで加え、室温、遮光下で30~60分間反応された。基質反応終了後、3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を反応停止液として50μl/wellで加え、1分間振盪後、Microplate Reader (Model 550、BIO-RAD) で波長490nmにおける吸光度を測定した。吸光度の高かった陽性wellの細胞を、24穴プレート (24 Well Cell Culture Plate; Greiner bio-one) に移して培養した。

【0044】

## (2-2) 二次スクリーニング

rFe<sub>1</sub>-mを抗原としたWestern blotting法で確認し、抗体産生ハイブリドーマの二次スクリーニングを行った。Lowryの方法に基づき、DC Protein Assay Kit (BIO-RAD) を用いて、Microplate Readerで波長655nmにおける吸光度を測定し、タンパク質を定量した。検量線はBSAを用いて作製した。Western blotting法はTowbinらの方法に準拠し、以下のように実施した。転写膜はポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (BIO-RAD) を使用した。PVDF膜は100% methanolに10秒間、さらに転写用電極buffer (25mM Tris-HCl (pH8.3、20℃)、192mM glycine、5% methanol) に30分間浸潤し、泳動に供した。転写装置の組み立ては、陽極電極板上に下から順に濾紙 (BIO-RAD)、PVDF膜、SDS-PAGE終了後のゲル、濾紙を重ね、その上に陰極電極板を固定した。なお、濾紙は予め電極bufferに2~3分浸しておいた。転写条件は1.9mA/cm<sup>2</sup>の定電流で60分間とした。転写終了後のPVDF膜は10mM Tris-HCl (pH7.5、20℃)、140mM NaCl、0.01% Tween20 (TBST) に0.5% BSAを加え、室温で60分間振盪し、ブロッキング操作を行った。ブロッキング終了後、TBSTで5分間、2回振盪洗浄し、一次抗体として細胞の培養上清を用い、室温で90分振盪反応させた。一次抗体反応終了後、TBSTで5分間、2回振盪洗浄した後、TBSTで1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を、室温で60分間振盪反応させた。二次抗体反応終了後、TBSTで5分間、2回振盪洗浄し、0.06% 3,3-diaminobenzidine tetra-hydrochloride、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、50mM Tris-HCl (pH7.6、20℃) を基質反応液として使用し、1~5分間反応させた。基質反応終了後、水洗し反応を停止させた後、乾燥して保存した。反応陽性を示したハイブリドーマについては後述する限界希釈法によりクローニングを行った。

【0045】

## (3) クローニング

ハイブリドーマのクローニングには限界希釈法を用いた。具体的には、スクリーニング後のハイブリドーマを2cells/100μlとなるようにHAT培地で希釈し、100μl/wellで96穴プレートに播種した。ハイブリドーマはセミコンフルエントになったところで24穴プレートに拡大培養し、再びセミコンフルエントになるまで培養した後、二次スクリーニングと同様にrFe<sub>1</sub>-mを抗原としたWestern blotting法で確認した。このクローニング操作を2回行った。また、ハイブリドーマを長期間継代培養することにより抗体産生能が減少するのを防ぐため、クローニング毎に細胞凍結保存液 (セルバンカー (BLC-1)、十慈フィールド株式会社) を用いて保存した。

## 【 0 0 4 6 】

( 4 ) 抗体産生ハイブリドーマの大量培養および抗 $\alpha_1$ -m $\cdot$ mAbの採取と精製

クローニングが終了したハイブリドーマを、浮遊細胞培養フラスコ(フィルタートップ SCフラスコ250ml 75cm<sup>2</sup>; Greiner bio-one)を用いて大量培養した。なお、培養は37℃、5% CO<sub>2</sub>、5日間、CO<sub>2</sub>インキュベーター(十慈フィールド株式会社)で行い、培地としてはHAT培地を用いた。大量培養されたハイブリドーマを無血清RPMIで懸濁し、ヌードマウス(Balb/c-nu)の腹腔内に2×10<sup>7</sup> cells/headで投与した。投与してから10~20日後、腹水を採取した。ヌードマウスから採取した腹水を室温で1時間、あるいは4℃で一晩静置した後、3000rpm、4℃で5分間遠心し、腹水中のフィブリン、ハイブリドーマ、赤血球などを除去した。分離した上清を50%の硫酸で塩析させた。具体的には、氷上で攪拌しながら上清と等量の飽和硫酸アンモニウム溶液を徐々に滴下し、滴下後さらに1時間攪拌した。これを10000rpm、4℃で10分間遠心し、沈殿物を20mM リン酸ナトリウムbuffer (pH7.0)に溶解した。塩析後のグロブリン溶液を、20mM リン酸ナトリウムbuffer (pH7.0)で平衡化したSephadex G-25 Fine (GEヘルスケアバイオサイエンス)カラム(内径1.5cm、長さ30cm)を用いて脱塩した。クロマトグラフィーの流速をペリスタポンプ(SJ-1211L、ATTO)で0.5ml/minに調節した。脱塩後のグロブリン溶液を、エコカラム(内径2.5cm、長さ10.0cm: BIO-RAD)に充填したProtein G Sepharose 4 Fast Flow (GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いたアフィニティークロマトグラフィー法により精製した。具体的には、脱塩後のグロブリン溶液を20mM リン酸ナトリウムbuffer (pH7.0)で平衡化されたカラムに流速0.5ml/minで添加し、その後カラムを100mM glycine (pH3.0)で溶出させた。溶出液は直ちに10分の1量の1M Tris-HCl (pH9.0)で中和した。精製後の溶出液を50mM 酢酸アンモニウム (pH7.0)で平衡化させたSephadex G-25 Fineカラム(内径2cm、長さ30cm)で脱塩させた後、Freeze Dryer (FDU540、EYELA東京理化学器械株式会社)を用いて凍結乾燥し、-20℃で保存した。

## 【 0 0 4 7 】

< 実施例 1 および 2 >

後述する実験例に用いる実施例 1 および 2 の抗体の組み合わせを表 1 に示す。

## 【 0 0 4 8 】

【 表 1 】

	捕捉抗体	一次抗体
実施例 1	$\alpha_1$ -m mAb3 産生抗体	$\alpha_1$ -m mAb4 産生抗体
実施例 2	$\alpha_1$ -m mAb4 産生抗体	$\alpha_1$ -m mAb3 産生抗体

## 【 0 0 4 9 】

表 1 中、 $\alpha_1$ -m mAb3産生抗体は、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\alpha_1$ -m mAb3 (受託番号: FERM P-22051)により産生された抗体を指し、 $\alpha_1$ -m mAb4産生抗体は、細胞株Mouse-Mouse hybridoma  $\alpha_1$ -m mAb4 (受託番号: FERM P-22052)により産生された抗体を指す。

## 【 0 0 5 0 】

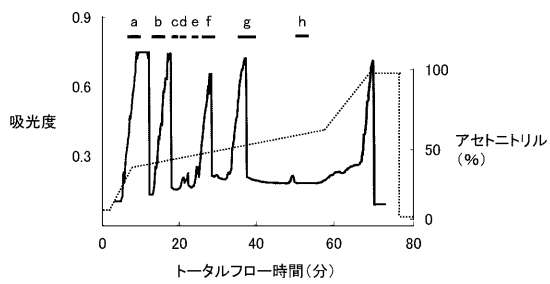
< 実験例 >

酵素免疫測定法(サンドイッチ法)により、実施例 1 および 2 の評価を行った。具体的には、1匹の健常なネコの尿中の $\alpha_1$ -mの測定を行った。具体的には、捕捉抗体を0.5mg/wellで固相し、ブロッキングした後、1匹の健常なネコの尿を2時間反応させた。洗浄後、ビオチン標識した一次抗体を2時間反応させた後、アビジンペルオキシダーゼを1時間反応させ、tetramethylbenzidineを用いて基質反応を行い、450nmにおける吸光度の測定を行った。図 3 はその結果を示すグラフであり、縦軸は吸光度である。図 3 から明らかなように、実施例 1、2 の抗体の組み合わせによる吸光度は、十分高かった。この結果から、本発明の抗体の組み合わせは、ネコ $\alpha_1$ -mに対してより高い結合力を示すことが明らかであり、高感度のネコ $\alpha_1$ -mの測定が可能であることを示した。

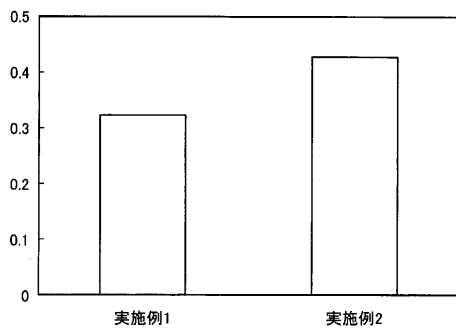
## 【 0 0 5 1 】

今回開示された実施の形態および実験例はすべての点で例示であって制限的なものではないと考えられるべきである。本発明の範囲は上記した説明ではなくて特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲と均等の意味および範囲内でのすべての変更が含まれることが意図される。

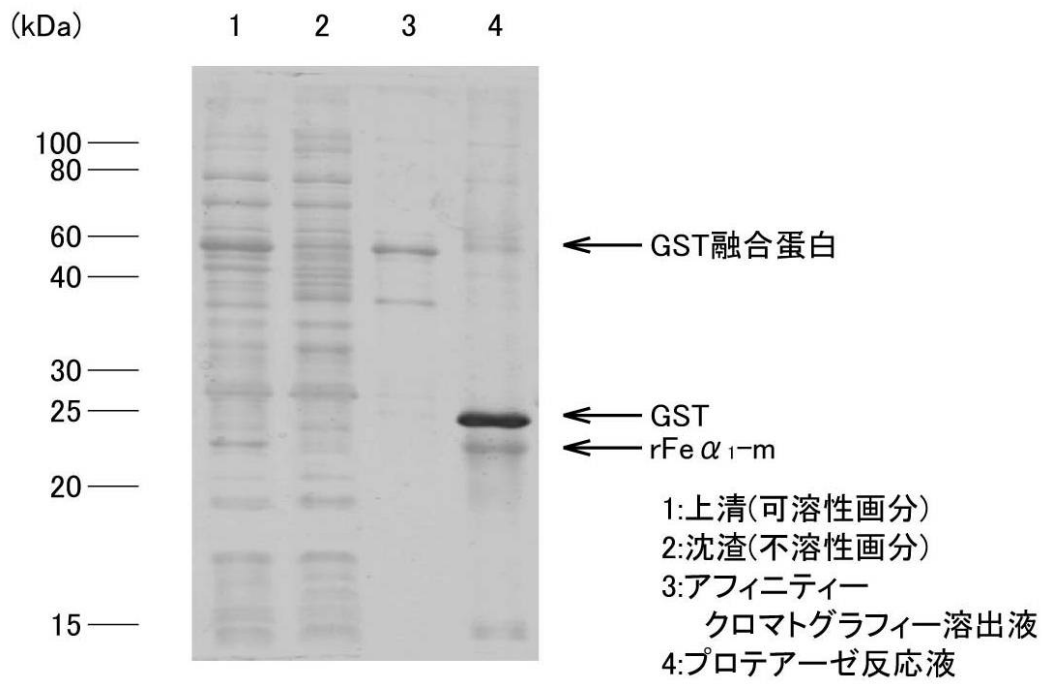
【図2】



【図3】



【 図 1 】



【 配列表 】

0005749947000001.app

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
			C 0 7 K	16/18 Z N A
			G 0 1 N	33/531 A
			C 1 2 N	15/00 A

(56)参考文献 特開2008-107333(JP,A)  
 特開平04-244099(JP,A)  
 米国特許第06153192(US,A)  
 国際公開第2009/013839(WO,A1)  
 国際公開第2011/074651(WO,A1)  
 日本獣医学会学術集会講演要旨集,2008年,Vol.146th Page.257 HS-32  
 Vet Immunol Immunopathol,2011年 1月,Vol.139 No.1 Page.79-82

## (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3  
 C 0 7 K 1 6 / 1 8  
 C 1 2 N 5 / 1 0  
 G 0 1 N 3 3 / 5 3 1  
 G 0 1 N 3 3 / 5 4 3  
 C 1 2 N 1 5 / 0 9  
 C a p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

专利名称(译)	用于测量猫源性α1微球蛋白的方法和测定试剂盒，以及用于其的抗体和抗体产生细胞系		
公开(公告)号	<a href="#">JP5749947B2</a>	公开(公告)日	2015-07-15
申请号	JP2011054493	申请日	2011-03-11
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所 尼普洛株式会社		
申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所 尼普洛株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所 尼普洛株式会社		
[标]发明人	星史雄		
发明人	星史雄		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12N5/10 C07K16/18 G01N33/531 C12N15/09		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N33/543.541.B G01N33/543.581.A C12N5/00.102 C07K16/18.ZNA G01N33/531.A C12N15/00.A C12N15/06.100 C12N15/13 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA03 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2012189503A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

以提供根据特异于抗体的组合的测定方法和试剂盒α1微球蛋白衍生的猫更敏感A. 一种细胞系，小鼠 - 小鼠杂交瘤α 1 和由-m mAb3的产生的第一抗体，细胞系小鼠 - 小鼠杂交瘤α 1 -m MAB4使用由酶免疫测定（三明治法），荧光免疫测定法（三明治法），放射性同位素免疫测定法（三明治法），免疫比浊法和免疫胶乳产生的第二抗体被选自比浊法的组中选择任何方法，测量在试样猫衍生α1微球蛋白浓度，以及细胞系小鼠 - 小鼠杂交瘤α的方法 1 -m mAb3的第一抗体和细胞系小鼠 - 小鼠杂交瘤α 1 通过-m MAB4并制作所生产，猫来源的α1微球蛋白浓度测定试剂盒的第二抗体。点域

(21) 出願番号	特願2011-54493 (P2011-54493)	(73) 特許権者	598041566 学校法人北里研究所
(22) 出願日	平成23年3月11日 (2011. 3. 11)		東京都港区白金5丁目9番1号
(65) 公開番号	特開2012-189503 (P2012-189503A)	(73) 特許権者	000135036 ニプロ株式会社
(43) 公開日	平成24年10月4日 (2012. 10. 4)		大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号
審査請求日	平成26年2月13日 (2014. 2. 13)	(74) 代理人	110001195 特許業務法人深見特許事務所
微生物の受託番号	FERM P-22051	(72) 発明者	星史雄 神奈川県相模原市南区北里一丁目15番1号 学校法人北里研究所内
微生物の受託番号	FERM P-22052	審査官	三木隆