

(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 - 243737

(P2002 - 243737A)

(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	S 4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/577	B 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/577		C 1 2 N 5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 34031(P2001 - 34031)

(22)出願日 平成13年2月9日 (2001.2.9)

(71)出願人 000231394

株式会社アズウェル

大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号

(72)発明者 河瀬 護

大阪府高槻市塚原三丁目14 - 10 - 509

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 稔 (外2名)

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03 HA15

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24

4B065 AA92X AB05 BA30 CA25 CA46

4H045 AA11 AA30 DA76 EA50 FA72

(54)【発明の名称】 抗スフィンゴ脂質モノクローナル抗体

(57)【要約】

【課題】 セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン - 1 - リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質を測定する免疫学的測定法を提供する。

【解決手段】 本発明の免疫学的測定法は、セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン - 1 - リン酸と特異的に反応し、他のスフィンゴ脂質とは交差反応しないモノクローナル抗体を使用することを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質を測定する免疫学的測定法であって、該一種のスフィンゴ脂質と特異的に反応し、他のスフィンゴ脂質とは交差反応しないモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、免疫学的測定法。

【請求項2】 生物学的試料中のセラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質を測定する免疫学的測定法であって、生物学的試料を採取し、該生物学的試料に含まれる総脂質を抽出し、次いで該一種のスフィンゴ脂質と特異的に反応し、他のスフィンゴ脂質とは交差反応しないモノクローナル抗体を使用するTLC酵素免疫測定法を行い、いずれかの抗体で染色されるスポットを検出することを特徴とする方法。

【請求項3】 セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質と特異的に反応し、他のスフィンゴ脂質とは交差反応しないモノクローナル抗体。

【請求項4】 セラミドと特異的に反応し、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸、スフィンゴミエリン、リゾスフィンゴミエリン、セブレロシド、グルコシルセラミド、セラミド-1-リン酸、ホスファチジルセリン、リゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルエタノールアミンとは交差反応しない請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 受託番号FERM P-18183のハイブリドーマの特性を有するハイブリドーマ細胞系によって産生される請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 スフィンゴシンと特異的に反応し、スフィンゴシン-1-リン酸、スフィンゴミエリン、セラミド、セブレロシド、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよびリゾホスファチジルエタノールアミンとは交差反応しない*

スフィンゴ脂質の化学構造

-Xに付加	スフィンゴ脂質	リゾスフィンゴ脂質
-OH	セラミド(Cer)	スフィンゴシン(Sph)
-PO ₄	セラミド-1-リン酸	スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)
-ホスホコリン	スフィンゴミエリン	リゾスフィンゴミエリン
-糖鎖	スフィンゴ糖脂質	リゾスフィンゴ糖脂質

*請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】 受託番号FERM P-18185のハイブリドーマの特性を有するハイブリドーマ細胞系によって産生される請求項6記載のモノクローナル抗体。

【請求項8】 スフィンゴシン-1-リン酸と特異的に反応し、スフィンゴシン、スフィンゴミエリン、リゾスフィンゴミエリン、セラミド、セブレロシド、セラミド-1-リン酸、ホスファチジルセリン、リゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルエタノールアミンとは交差反応しない請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項9】 受託番号FERM P-18184のハイブリドーマの特性を有するハイブリドーマ細胞系によって産生される請求項8記載のモノクローナル抗体。

【請求項10】 請求項3記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項11】 請求項3から9までのいずれかに記載のモノクローナル抗体を構成試薬として含む、セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質を特異的に測定するための試薬キット。

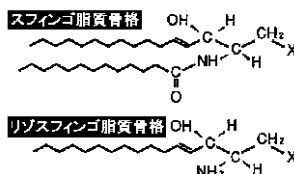
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はスフィンゴ脂質を認識する抗体および該抗体を利用する免疫学的測定方法に関する。広義のスフィンゴ脂質は長鎖塩基であるスフィンゴイドを持つ脂質の総称であり、狭義のスフィンゴ脂質とリゾスフィンゴ脂質とに分類される。狭義のスフィンゴ脂質にはセラミド、およびその類縁体であるスフィンゴ糖脂質、スフィンゴリン脂質(スフィンゴホスホノリピドを含む)があり、リゾスフィンゴ脂質にはスフィンゴシン(Sph)などがある。

【0002】

【化1】



広義のスフィンゴ脂質はスフィンゴイドのアミノ基に不均一な鎖長の長鎖脂肪酸が酸アミド結合したセラミド構造を共通骨格として持ち、下等動物から高等動物まで広く分布している。スフィンゴ脂質は近年、細胞表層の構成成分であるだけでなく、細胞の増殖、分化誘導、アポトーシス等の生物活性において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

【0003】セラミド(Cer)、スフィンゴシン(Sph)およびその生理学的に活性な誘導体であるスフィンゴシ

ン-1-リン酸(S1P)における細胞および血清のような生物学的試料中での動態を知ることは、生体内情報伝達システムの解明に役立つばかりでなく、種々の疾病の病態解明の糸口になる可能性がある。例えばCer量の変化は白血病などの造血器腫瘍や変性神経系疾患の病態に関与している可能性があり(Int. J. Hematol. 65,40(1997))、Sphは高濃度で非特異的毒性をもちネクロシスを誘導する(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92,8970-74(1995))。また、S1Pに特異的な5種類のG蛋白質共役型細

胞膜受容体が各細胞に発現していることが報告されており、各受容体とその下流の情報伝達の解析が行われている。

【0004】

【従来の技術】このようにCer、SphおよびS1Pの重要性は認識されているものの、それらが生物学的試料中に微量にしか存在しないため、これらを測定することは困難であった。これまでに存在するCerを検出し定量する方法として、ESI-MS/MS(Electro Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry, J. Lipid. Res. 40,1539-46(1999))やHPLC(Anal. Biochem. 276,242-50(1999))を用いた方法、および疎水性の強いCerを大腸菌由来のジアシルグリセロールキナーゼ(diacylglycerol kinase, DGK)と[⁻³²P]ATPを用いてリン酸化し、得られた放射能標識セラミド-1-リン酸を基に微量のCerを定量することが知られている(Biochem. Mol. Biol. Int. 36,21-30(1995))。一方、SphまたはS1Pを検出し測定する方法として、LC/MS/MS(Liquid Chromatography/Ionspray tandem mass spectrometry, Anal. Biochem. 244,291-300(1997))やHPLC(Anal. Biochem. 276,242-50(1999)前出)を用いた方法や、放射能標識した無水酢酸を用いてN-アセチル化することにより微量のSphおよびS1Pを定量する方法が知られている(Anal. Biochem. 222,489-494(1994)、同誌230,315-320(1995)、特表平11-513110)。

【0005】しかしながら、ESI-MS/MSやLC/MS/MSは非常に高価な装置が必要であるうえ、取り扱いには専門的知識が必要である。またHPLCでは測定範囲がnmolレンジと感度が低く比較的大量の試料を必要とする。またDGK法やN-アセチル化による放射能標識法はその処理が煩雑であるばかりでなく、一連の操作に少なくとも二日間以上を要する。このため簡単な操作でかつ短時間に生物学的試料中のスフィンゴ脂質を検出し定量する手段が求められていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】免疫学的測定法は、簡便な操作で高い感度と精度を達成することができる優れた分析手段であり、生体内のスフィンゴ脂質動態の研究をさらに進めるためにスフィンゴ脂質の免疫学的な測定を実現することが強く望まれている。スフィンゴ脂質を認識する抗体はその研究を進める上で重要なツールとなり、抗体が提供されればそれらスフィンゴ脂質の免疫測定、あるいは組織・細胞染色等に有用である。しかしながら、スフィンゴ脂質のうちスフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸に対する抗体は未だ報告されていない。またセラミドに対するモノクローナル抗体は既に市販されているが(ALEXIS BIOCHEMICALS, Monoclonal Antibody to Ceramide (MID 15B4))、このものはセラミドとの構造類似体であるグルコシルセラミドと交差反応してしまい、特異性が十分ではない。そのためセラミドの免疫学的な測定方法は現在のところ実現していな

い。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明はセラミド(Cer)、スフィンゴシン(Sph)およびスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)をそれぞれ特異的に認識する抗体および該抗体を利用する免疫学的測定方法を提供する。よって本発明は、Cer、SphおよびS1Pをそれぞれ特異的に認識する新規な抗体の提供を通じ、たとえば酵素免疫学的測定法のような簡便かつ高感度なCer、SphおよびS1Pの定量系の実現を可能とする。

【0008】即ち、本発明は、

(1) セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質を測定する免疫学的測定法であって、該一種のスフィンゴ脂質と特異的に反応し、他のスフィンゴ脂質とは交差反応しないモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、免疫学的測定法；

(2) 生物学的試料中のセラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質を測定する免疫学的測定法であって、生物学的試料を採取し、該生物学的試料に含まれる総脂質を抽出し、次いで該一種のスフィンゴ脂質と特異的に反応し、他のスフィンゴ脂質とは交差反応しないモノクローナル抗体を使用するTLC酵素免疫測定法を行い、いずれかの抗体で染色されるスポットを検出することを特徴とする方法。

【0009】(3) セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質と特異的に反応し、他のスフィンゴ脂質とは交差反応しないモノクローナル抗体、好ましくはセラミドと特異的に反応し、スフィンゴシン(Sph)、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)、スフィンゴミエリン(SM)、リゾスフィンゴミエリン(LSM)、セレブロシド(CB)、グルコシルセラミド(Glu-Cer)、セラミド-1-リン酸(C1P)、ホスファチジルセリン(PS)、リゾホスファチジルコリン(LPC)およびリゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)とは交差反応しないモノクローナル抗体、スフィンゴシンと特異的に反応し、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)、スフィンゴミエリン(SM)、セラミド(Cer)、セレブロシド(CB)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)およびリゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)とは交差反応しないモノクローナル抗体、あるいはスフィンゴシン-1-リン酸と特異的に反応し、スフィンゴシン(Sph)、スフィンゴミエリン(SM)、リゾスフィンゴミエリン(LSM)、セラミド(Cer)、セレブロシド(CB)、セラミド-1-リン酸(C1P)、ホスファチジルセリン(PS)、リゾホスファチジルコリン(LPC)およびリゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)とは交差反応しないモノクローナル抗体であり、より好ましくは受託番号FERM P-1

8183、受託番号FERM P-18184または受託番号FERM P-18185のハイブリドーマの特性を有するハイブリドーマ細胞系によって産生されるモノクローナル抗体；

【0010】(4) 本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ；および

(5) 本発明のモノクローナル抗体を構成試薬として含む、セラミド、スフィンゴシンおよびスフィンゴシン-1-リン酸から選択される一種のスフィンゴ脂質を特異的に測定するための試薬キット、に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】1)モノクローナル抗体 Cer抗体、Sph抗体およびS1P抗体の作製は、抗原となる脂質自体が低分子量であるうえに、蛋白質等のような種による差がないため、その抗原性が低く抗体を得ることが困難であるという問題があった。本発明者らは、リン脂質抗体等の作製で用いられているリポソーム免疫法によって抗原性を上昇させ、Cer、SphおよびS1Pそれぞれに対し特異的に結合する各モノクローナル抗体の作製に成功した。

【0012】このような本発明抗体はリポソームを利用する免疫方法等、当業者に周知の手法によって調製することができる。目的スフィンゴ脂質をリポソームに組み込んで免疫原とする方法は例えば、Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85,9057-9061(1988)またはVaccine,14,898-404(1996)に詳細が説明されている。

【0013】これらを適当な免疫動物に免疫し、抗体価の上昇を確認したところでモノクローナル抗体を作製する。モノクローナル抗体は、抗体産生細胞をクローニングすることにより得ることができる。一般的には、免疫動物から回収した抗体産生細胞をF0等のマウス由来のミエローマ細胞と細胞融合させることによってハイブリドーマとし、産生される抗体の活性を指標としてスクリーニングを行う。HAT選択法によって選択されたハイブリドーマは、まずその培養上清中に含まれる抗体の目的のスフィンゴ脂質に対する結合活性を指標としてスクリーニングを行う。次いで目的スフィンゴ脂質への結合活性を持つ抗体について他の脂質に対する交差反応性の試験を行い、目的脂質に対する結合活性が他の脂質に対する結合活性に比べて有意に高い抗体を培養上清に含むハイブリドーマを選択する。さらに限界希釈法によるクローニングを行い、クローンが産生する抗体について他の脂質抗原への交差反応性を調査し、許容できる交差反応性を示す抗体を産生するクローンを選択する。許容できる交差反応性とは、目的とする抗体の用途において、無視しうる程度の交差反応性を意味する。たとえば、免疫学的な測定に用いるためのモノクローナル抗体であれば、最終的な測定系において交差反応によるシグナルがバックグラウンドレベルに抑えられれば、事実上交差反応しないということができる。

【0014】目的スフィンゴ脂質への抗体の結合活性を

10 確認するには、ドットプロット法を利用する。ドットプロット法では96穴丸型ウェルのドットプロットング装置を用いると、ELISA法と同様の操作が行えて有利である。ドットプロット法では反応を観察すべき脂質抗原を感作したPVDF(ポリビニリデンフルオライド)膜を、ドットプロットング装置に装着し、これにハイブリドーマの培養上清を適当に希釈した試料を加えて反応させる。十分に反応させた後に膜を洗浄し、免疫グロブリンに対する二次抗体をさらに反応させる。最終的に膜に結合した二次抗体を測定すれば、培養上清中に存在する抗体の抗原に対する結合活性を定量的に知ることができる。

【0015】交差反応性を確認すべき脂質には、構造的に類似するスフィンゴ脂質を挙げることができる。あるいは、部分構造が共通な類似物質についても交差反応性を確認しておくが良い。詳細は実施例を参照。交差反応性を確認する手段としては、上記ドットプロット法の他に、一般に脂質分析に用いられるTLCを用いたTLC酵素免疫測定法が有効である。TLC酵素免疫測定法に用いる薄層板としては、プラスチックにシリカゲルを吸着させた、POLYGRAM SIL G(MACHERY-NAGEL社:805013)等がガラス板プレートの薄層板に比べ、プレート、吸着層ともに薄く取り扱いが有利である。TLC酵素免疫測定法では反応を観察すべき脂質をスポットし、適当な展開溶媒を用いて脂質を展開する。これにハイブリドーマの培養上清を適当に希釈した試料を加えて反応させる。十分に反応させた後にTLCを洗浄し、免疫グロブリンに対する二次抗体をさらに反応させる。最終的にTLC上の脂質存在部位に結合した二次抗体を測定すれば、培養上清中に存在する抗体の抗原に対する結合活性を知ることができる。

【0016】2)免疫学的測定法

細胞、組織および血清などの生物学的試料中の目的スフィンゴ脂質を本発明モノクローナル抗体により測定するには例えばTLC酵素免疫測定法を使用する。TLC酵素免疫測定法としては、まず生物学的試料より抽出した脂質画分をTLC上にスポットし、適当な展開溶媒を用いて分離した後に、本発明抗体と反応させる。十分に反応させた後にTLCを洗浄し、免疫グロブリンに対する二次抗体をさらに反応させる。最終的にTLC上の脂質存在部位に結合した二次抗体を測定すれば、試料中に存在する抗原に対する本発明抗体の結合活性を定量的に知ることができる。たとえば化学発光法により前記二次抗体を測定する際に、ルミイメジャー(ロシュ社:1901800)を用いることで定量することも可能である。ルミイメジャーはマイクロプレートでも膜等でも測定できる。免疫学的測定法のための生物学的試料は、液状のもののみならず固体試料であっても良い。たとえば、組織標本を対象として、免疫染色を行ってCer、SphやS1Pの局在を観察することができる。

【0017】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0018】実施例1

セラミド(Cer)特異的モノクローナル抗体の作製
Cer特異的モノクローナル抗体の作製にあたり、市販品のセラミド(Doosan Serdary Reserch Laboratories, "Cermides, Natural mixture, bovine brain" code:A-45)を用い、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,9057-9061(1988)を参考にDMPC、コレステロール、リポドAとともにリポソームを調製して免疫原とする。DMPC:コレステロール:リポドA: Cer=1:1.5:0.08:1のモル比となるように各脂質液をガラス試験管内で混合し、窒素気流下で乾固した。次いで、Cer250 μ gを含む混合脂質(一回分)にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、超音波処理により作製したリポソームを免疫原とした。

【0019】この免疫原をマウス(Balb/c)の皮下、腹腔とフットパット(初回のみ)に2週間おきに数ヶ月免疫し、抗体価の上昇したマウスについて、その脾臓細胞をミエローマ細胞P3-X63-Ag8と融合しハイブリドーマを作製した。HAT選択後、生存しているハイブリドーマの培養上清中に含まれる抗体の、Cerに対する結合活性を以下のドットプロット法により測定し、それを指標にスクリーニングを行った。まず、ポリビニリデンフルオライド(PVDF)膜をクロロホルム:メタノール1:2の割合に調製した溶媒で、Cerを200 μ g/mlになるように調製した抗原液に浸して乾燥させる。十分に乾燥させた後に、3%スキムミルク、1% PVP-25(ポリビニルピロリドン25:ナカライテスク,code283-16)を含むPBSでブロッキングを室温で2時間行った。

【0020】抗原感作膜をドットプロット装置であるバイオドット(BIO-RAD社:170-6545)に装着し、各ウエルにハイブリドーマの培養上清50 μ lを加え、室温で1時間インキュベートした。反応液を除去し、PVDF膜をバイオドットより取り外し、0.05% Tween20含有PBS(pH7.4)で洗浄して、二次抗体(アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG+IgM(H+L)(ヤギ由来、Jackson Immuno Reserch Laboratories, Inc.:code JIR 115-055-068)を1%BSA/PBSで1/7000に希釈したものを加え、室温で30分間インキュベートした。二次抗体の反応後、未反応の抗体を除去して再度Tween20含有PBSで洗浄し、BCIP-NBT(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート-4-ニトロ・ブルー・テトラゾリウム・クロライド:ナカライテスク)溶液を加えて、膜上に残ったアルカリホスファターゼの活性を検出した。次いで、結合活性が陽性であったハイブリドーマについて、その培養上清中に含まれる抗体の他の脂質との交差反応性をドットプロット法により調べた。S1PおよびDG(ジアシルグリセロール、卵由来、DOOSAN SERDARY RESEARCH LABORATORIES; code SRL A-22)と

の反応性を調べ、Cerに対する結合活性が他の脂質に比べて有意に高いものを選択し、限界希釈法によるクローニングを行った。このスクリーニングの結果、Cerのみに反応する抗体を産生する1クローンを樹立し、このクローンをNHCER-2と命名した。クローンNHCER-2は、茨城県つくば市東1丁目1番3号に住所を有する産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM P-18183(寄託日:平成13年1月26日)として寄託されている。クラス分析により、クローンNHCER-2が産生するCerに特異的なモノクローナル抗体(以下、特に断りのない限り、抗体NHCER-2という)はIgMクラスに属することが判明した。

【0021】試験例1 Cer特異的モノクローナル抗体NHCER-2の特異性検討

実施例1にて得られた抗体NHCER-2について、TLC酵素免疫測定法によりさらにその反応性を詳細に検討した。検討に先立って、ハイブリドーマNHCER-2を大量培養し、その培養上清から硫酸画分により免疫グロブリンを精製し、モノクローナル抗体NHCER-2を調製した。特異性検定に用いた脂質は以下の通りである。

スフィンゴシン(Sph)(ウシ脳由来):
スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)(合成品):
スフィンゴミエリン(SM)(ウシ脳由来):
リゾスフィンゴミエリン(LSM)(ウシ脳由来):
セレブロシド(CB)(ウシ脳由来):
グルコシルセラミド(Glu-Cer)(Gaucher病患者の脾臓細胞由来):
セラミド-1-リン酸(C1P)(ウシ脊髄由来):
ホスファチジルセリン(PS)(ウシ脳由来):
リゾホスファチジルコリン(LPC)(ブタ肝臓由来):
リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)(ブタ肝臓由来):

【0022】プラスチックでコートした耐水性TLCプレートに上記の各脂質を500ngずつスポットし、展開後に0.4%ポリ(イソブチルメタクリレート)(PIM)のヘキサン溶液に浸しポリマー化を行った。このポリマー化操作は、抗体溶液や洗浄液に浸している間に脂質がTLCプレートから溶け出さないようにするのが主な目的である。1%卵製アルブミン、1% PVP-25を含むPBSでブロッキングを行い、濃度30 μ g/mlの抗体NHCER-2液と室温にて1時間反応させた。0.1%Tween20含有トリス緩衝生理食塩水(pH7.4,以下TBS)で十分洗浄した後、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgM(μ CHAIN)(ヤギ由来、ICN Pharmaceuticals, Inc.: code 59295)を1%卵製アルブミン/0.1%Tween20/TBSで1/5000に希釈した溶液と室温1時間反応させた。0.1%Tween20含有TBSで十分洗浄した後、基質液(BCIP-NBT)を加え、発色反応を行った。同時に別のTLCプレートに上記の各脂質を2 μ gずつスポットし、同一条件にて展開後、モリブデン-硫酸試薬により発色反応を行い、各脂質の移動位置を確認した。その

結果、TLC酵素免疫染色において、Cerのみが発色したスポットとして検出された。得られた結果を図1および図2に示す。

【0023】抗体NHCER-2がCerと反応していることは図1(1)および(2)に示されている。図1および図2は、Cerと構造が類似しているC1P(Cerにリン酸が結合した脂質)、Glu-Cer(Cerにグルコースが結合した脂質)およびCB(Cerにガラクトースが結合した脂質)が全く染色されず[図1(2)および(3)参照]、抗体NHCER-2がこれらとは交差反応しないことを示している。またSph[図2参照]、S1P、SMおよびLSMという天然スフィンゴ脂質とも反応しなかった[図1(1)参照]。さらにLPC、LPEおよびPSという天然リン脂質とも反応しなかった[図1(1)参照]。

【0024】各脂質の展開条件は以下の通りである。
(1) S1P, SM, LSM, PS, LPC, LPE: Cerはこれらの脂質とも物理的性質が異なるため、以下の一次元多重展開を行った。

一回目: C/M/W = 85/15/1 Cer以外はほとんど移動しない

二回目: C/M/W = 65/35/7 Cer以外を移動させるため

(2) C1P, Glu-Cer, CB: C/M/W = 85/15/1
(3) Cerと構造が最も類似するC1Pについて、(2)の展開条件では十分な分離が得られていないので、以下の展開溶媒にてC1Pのみを展開し、交差性を調べた。Cerはこの条件では溶媒と共に移動し、昇天してしまう。

C/アセトン/M/酢酸/W = 10/4/3/2/1

(4) Sph: 一次元では十分な分離を行えなかったため、二次元にて展開した。

一次元方向: クロロホルム(C)/メタノール(M)/水(W) = 85/15/1(vol/vol)

二次元方向: C/M/W = 80/20/1

ただし、SphはCerと物理的性質が異なるため、この条件では両者を同一プレート上にて展開できなかった。よってSphとの反応性のみのデータとなっている。

【0025】試験例2 Cer特異的モノクローナル抗体NHCER-2を用いた生物学的試料中のCerの検出

生物学的試料として血球を用い、血球0.5g中に含まれる総脂質を常法に従い抽出し、その抽出物総量の1/50および対照としてセラミド1μgをプラスチックでコートしたTLCプレートにスポットした後、一次元多重展開により脂質を分離した。不要な部分を削除した後、PIMのヘキササン溶液に浸してポリマー化を行った。1%卵製アルブミン、1% PVP-25を含むPBSでブロッキングを行い、濃度30μg/mlの抗体NHCER-2液を室温で1時間反応させた。0.1%Tween20含有TBSで十分洗浄した後、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgM(μCHAIN)(ヤギ由来、ICN Pharmaceuticals, Inc.: code 59295)を1%卵製アルブミン/0.1%Tween20/TBSで1/5000に希釈した溶液と室温1時間

反応させた。0.1%Tween20を含んだTBSで十分洗浄した後、基質液(BCIP-NBT)を加えるとCerが発色したスポットとして検出された。得られた結果を図3に示す。TLCによる分離条件は以下の通りである。

一~四回目: クロロホルムのみ 大量に存在するコレステロールを除くため

五回目: C/M/W = 95/5/0.5 コレステロールをさらに移動させるため

六回目: C/M/W = 85/15/1 Cerを移動させるため

【0026】比較例1 市販品の特異性試験
市販品であるALEXIS社製のCer抗体の性能を評価した。評価時の抗体濃度はALEXIS社の製品データシートに記載された推奨濃度20μg/mlを用いた。比較した脂質は以下の通りである。

セレブロシド(CB)(ウシ脳由来):

グルコシルセラミド(Glu-Cer)(Gaucher病患者の脾臓細胞由来):

セラミド-1-リン酸(C1P)(ウシ脊髄由来):

20 プラスチックでコートされた耐水性TLCプレートに各脂質を500ngずつスポットし、試験例1に記載の方法に実質的に従い、交差反応性を試験した。得られた結果を図4に示す。各脂質の展開条件は以下の通りである: C/M/W = 85/15/1。図4は、CerとGlu-Cerが発色したスポットとして検出されたことを示している。これは市販の抗体が交差反応することを意味する。なお、ここでは抗体濃度20μg/mlを使用し、試験例1では抗体濃度30μg/mlを用いている。試験例1にて試験した本発明抗体はこの市販抗体よりも高濃度にて特異性試験を行ったにもかかわらず、交差反応を示していない。これは試験例1の結果が特記すべき結果であることを示している。

【0027】比較例2 市販品の結合性試験

市販品であるALEXIS社製のCer抗体の結合性能を評価した。評価時の抗体濃度はALEXIS社の製品データシートに記載された推奨濃度20μg/mlを用いた。プラスチックでコートされた耐水性TLCプレートにセラミドを50,100,200,400,800,1000ngずつスポットする以外は、試験例1記載の操作に実質的に従い、試験した。得られた結果を図5に示す。(1)は脂質の移動位置を示すモリブデン-硫酸試薬による結果である。(2)はALEXIS社製Cer抗体による染色結果、(3)は本発明抗体による染色結果である。図5は、本発明抗体では50ngまで検出できたが、ALEXIS社製抗体では100ngまでであることを示している。

脂質の展開条件は以下の通りである: C/M/W = 85/15/1。

【0028】実施例2

S1P特異的モノクローナル抗体の作製

S1P抗体の作製にあたり、市販品のS1P(BIOMOL Research

h Laboratories, Inc. Sphingosine-1-phosphate, code: SL-140) を用い、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9057-9061 (1988) を参考にしDMPC, コレステロール, リピドAとともにリポソームを調製して免疫原とした。DMPC: コレステロール: リピドA: S1P=1:1.5:0.08:1のモル比となるように各脂質液をガラス試験管内で混合し、窒素気流下で乾固した。S1P 250 μgを含む混合脂質(一回分)にリン酸緩衝生理食水(PBS)を加え、超音波処理により作製したリポソームを免疫原とした。この免疫原をマウス(Balb/c)の皮下、腹腔とフットパット(初回のみ)に2週間おきに数ヶ月免疫し、抗体価の上昇したマウスについて、その脾臓細胞をミエローマ細胞P3-X63-Ag8と融合しハイブリドーマを作製した。HAT選択後、生存しているハイブリドーマの培養上清中に含まれる抗体の、S1Pに対する結合活性を実施例1と同様にドットプロット法により測定し、それを指標にスクリーニングを行った。

【0029】次いで、結合活性が陽性であったハイブリドーマについて、その培養上清中に含まれる抗体の他の脂質との交差反応性をドットプロット法により調べた。Sph, Cerとの反応性を調べ、S1Pに対する結合活性が他の脂質に比べて有意に高いものを選択し、限界希釈法によるクローニングを行った。このスクリーニングの結果、S1Pのみに反応する抗体を産生する1クローンを樹立し、このクローンをNHS1Pと命名した。クローンNHS1Pは、茨城県つくば市東1丁目1番3号に住所を有する産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM P-18184(寄託日:平成13年1月26日)として寄託されている。クラス分析により、クローンNHS1Pが産生するS1Pに特異的なモノクローナル抗体(以下、特に断りのない限り、抗体NHS1Pという)はIgMクラスに属することが判明した。

【0030】試験例3 S1Pモノクローナル抗体NHS1Pの特異性検討

実施例2で得られた抗体NHS1Pについて、TLC酵素免疫測定法により特異性の検討を行った。検討に先立って、ハイブリドーマNHS1Pを大量培養し、その培養上清から硫酸安分により免疫グロブリンを精製し、モノクローナル抗体NHS1Pとした。特異性検定に用いた脂質は以下の通りである。

スフィンゴシン(Sph)(ウシ脳由来):
スフィンゴミエリン(SM)(ウシ脳由来):
リゾスフィンゴミエリン(LSM)(ウシ脳由来):
セラミド(Cer)(ウシ脳由来):
セラミド-1-リン酸(C1P)(ウシ脊髄由来):
ホスファチジルセリン(PS)(ウシ脳由来):
リゾホスファチジルコリン(LPC)(ブタ肝臓由来):
リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)(ブタ肝臓由来):

【0031】TLC酵素免疫測定法は実質的に試験例1記載の操作に従った。得られた結果を図6に示す。抗体NH

S1PがS1Pと反応しているのは図6(1)および(2)に示されている。図6は、S1Pと構造が類似しているC1P(Cerにリン酸が結合した脂質)およびSph(S1Pからリン酸が除かれた脂質)が全く染色されず、抗体NHS1Pが交差反応しないことを示している[図6(2)参照]。またSM、LSMという天然スフィンゴ脂質とも反応していない[図6(2)および(3)参照]。さらにLPC、LPE、PSという天然リン脂質とも反応していない[図6(3)参照]。

【0032】各脂質の展開条件は以下の通りである。

(1) Cer:
一次元方向: クロロホルム(C)/メタノール(M) = 95 / 5 (vol/vol)

二次元方向: C / M / アンモニア水(Aw) = 90 / 10 / 1

(2) Sph, SM, C1P:

一次元方向: C / M / W = 85 / 15 / 1

二次元方向: C / M / Aw = 65 / 25 / 4

(3) PS, LPE, LPC, LSM:

一次元方向: C / M / W = 65 / 35 / 7

二次元方向: C / M / Aw = 65 / 25 / 4。

【0033】実施例3

Sph特異的モノクローナル抗体の作製

S1P抗体の作製にあたり、市販品のS1P(BIOMOL Research Laboratories, Inc. Sphingosine-1-phosphate, code: SL-140)を用い、Vaccine, 14, 898-404(1996)を参考にしDPPC, PS, リピドAとともにリポソームを調製して免疫原とした。DPPC:PS:リピドA:S1P=1:0.4:0.08:1のモル比になるように各脂質液をガラス試験管内で混合し、窒素気流下で乾固した。S1P 250 μgを含む混合脂質(一回分)にリン酸緩衝生理食水(PBS)を加え、超音波処理により作製したリポソームを免疫原とした。この免疫原をマウス(Balb/c)の皮下、腹腔とフットパット(初回のみ)に2週間おきに数ヶ月免疫し、抗体価の上昇したマウスについて、その脾臓細胞をミエローマ細胞F0と融合しハイブリドーマを作製した。HAT選択後、生存しているハイブリドーマの培養上清中に含まれる抗体の、S1Pに対する結合活性を実施例1と同様にドットプロット法により測定し、それを指標にスクリーニングを行った。

【0034】次いで、結合活性が陽性であったハイブリドーマについて、その培養上清中に含まれる抗体の他の脂質との交差反応性をドットプロット法により調べた。Sph, Cerとの反応性を調べたが、S1Pに対する結合活性が他の脂質に比べて有意に高いハイブリドーマはなく、Sphに対する結合活性が有意に高いハイブリドーマが存在した。そこでそのハイブリドーマを選択し、限界希釈法によるクローニングを行った。このスクリーニングの結果、Sphのみに反応する抗体を産生する1クローンを樹立し、このクローンをNHSphと命名した。クローンNHSphは、茨城県つくば市東1丁目1番3号に住所を有する産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託番号FE

RM P-18185 (寄託日:平成13年1月26日)として寄託されている。クラス分析により、クローンNHSpHが産生するSphに特異的なモノクローナル抗体(以下、特に断りのない限り、抗体NHSpHという)はIgMクラスに属することが判明した。なお、ここではS1P, DPPC, PS等からなるリポソーム免疫法によりSphに特異的なモノクローナル抗体が得られた。これはリポソーム内のS1Pが生体内で代謝を受け、結果的にSphに対する抗体ができたものと推測される。

【0035】試験例4 Sph特異的モノクローナル抗体NHSpHの特異性検討

実施例3で得られた抗体NHSpHについて、TLC酵素免疫測定法によりさらに検討を行った。検討に先立って、ハイブリドーマNHSpHを大量培養し、その培養上清から硫酸画分により免疫グロブリンを精製し、モノクローナル抗体NHSpHとした。特異性検定に用いた脂質は以下の通りである。

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P): 合成品

スフィンゴミエリン(SM): ウシ脳由来

セラミド(Cer): ウシ脳由来

セレブロシド(CB): ウシ脳由来

ホスファチジルセリン(PS): ウシ脳由来

ホスファチジルコリン(PC): 卵黄由来

抗セラミド抗体NHSpH-CER-2

	脂質	反応性
★	セラミド	+++
☆	スフィンゴシン	-
☆	スフィンゴシン-1-リン酸	-
	スフィンゴミエリン	-
	リゾスフィンゴミエリン	-
	セレブロシド	-
	グルコシルセラミド	-
	セラミド-1-リン酸	-
	リン脂質 PS, LPE, LPC	-

【0038】

【発明の効果】本発明は、本発明モノクローナル抗体によってCer、SphおよびS1Pの免疫学的な測定方法を実現するものである。従来、Cer、SphおよびS1Pに特異的な抗体そのものが提供されておらず、免疫学的な測定方法

*ホスファチジルエタノールアミン(PE): ウシ肝臓由来
リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE): ブタ肝臓由来

【0036】試験例1に記載されている操作に実質的に従い、TLC酵素免疫測定法を行った。得られた結果を図7に示す。抗体NHSpHがスフィンゴシンと反応していることは図7(1)に示されている。図7は、抗体NHSpHがCer, S1P, SM, CBという天然スフィンゴ脂質と反応せず[図7(1)参照]、さらにPC、PE、LPE、PSという天然リン脂質とも反応しないことを示している[図7(2)参照]。各脂質の展開条件は以下の通りである。

(1) Cer, S1P, SM, CB:

一次元方向: クロロホルム(C) / メタノール(M) / 水(W) = 85 / 15 / 1 (vol/vol)

二次元方向: C / M / アンモニア水(Aw) = 65 / 25 / 4

(2) PS, LPE, LPC:

一次元方向: C / M / W = 65 / 35 / 7

二次元方向: C / M / Aw = 65 / 25 / 4

20 【0037】上記試験例1、3および4の結果をまとめると以下の表のようになる。

【表1】

抗スフィンゴシン抗体NHSpH

	脂質	反応性
☆	セラミド	-
★	スフィンゴシン	+++
☆	スフィンゴシン-1-リン酸	-
	スフィンゴミエリン	-
	セレブロシド	-
	リン脂質 PS, LPE, PC, PE	-

抗スフィンゴシン-1-リン酸抗体NHSpH-S1P

	脂質	反応性
☆	セラミド	-
☆	スフィンゴシン	-
★	スフィンゴシン-1-リン酸	+++
	スフィンゴミエリン	-
	リゾスフィンゴミエリン	-
	セレブロシド	-
	セラミド-1-リン酸	-
	リン脂質 PS, LPE, LPC	-

は不可能であった。本発明の各抗体はそれぞれSph, S1P, Cerに対する特異性に優れ、それぞれの脂質の免疫学的測定方法を実現する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Cer特異的モノクローナル抗体NHSpH-CER-2のTLC

酵素免疫測定法による特異性の検討結果を示すクロマトグラフの図面に代わる写真である。(1)はS1P, SM, LSM, PS, LPC, LPEとの交差反応性、(2)はC1P, Glu-Cer, CBとの交差反応性、(3)はC1Pとの交差反応性を示している。それぞれ、右側プレートはモリブデン-硫酸試薬による結果、左側プレートは本発明抗体による染色結果である。左右プレートとも各脂質のスポット位置の順番は同じであるので、両者同じ位置に各脂質は移動しており、右側プレートのモリブデン-硫酸試薬による結果にて左側プレートにおける各脂質の移動位置が確認できる。

【図2】 Cer特異的モノクローナル抗体NH CER-2のTLC酵素免疫測定法による特異性の検討結果を示すクロマトグラフの図面に代わる写真である。(4)はSphとの交差反応性を示している。他は図1と同様。

【図3】 Cer特異的モノクローナル抗体NH CER-2を用いたTLC酵素免疫測定法によって血球より抽出したセラミドを検出した結果を示すクロマトグラフの図面に代わる写真である。

【図4】 TLC酵素免疫測定法による市販抗体の特異性試験の結果を示すクロマトグラフの図面に代わる写真である。左側プレートは脂質の移動位置を示すモリブデン-硫酸試薬による結果、右側プレートは市販抗体による染色結果である。

【図5】 Cer特異的モノクローナル抗体NH CER-2および市販抗体におけるTLC酵素免疫測定法による結合性の比較結果を示すクロマトグラフの図面に代わる写真であ

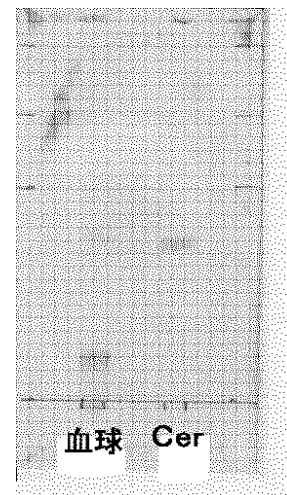
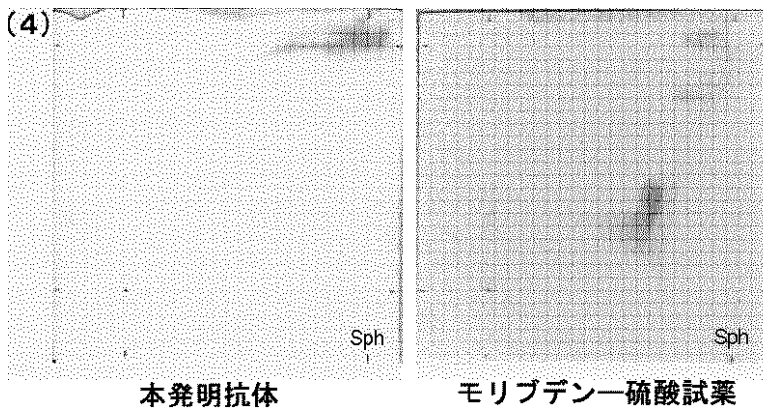
*る。(1)は脂質の移動位置を示すモリブデン-硫酸試薬による結果である。(2)は市販抗体による染色結果、(3)は本発明抗体による染色結果である。

【図6】 S1P特異的モノクローナル抗体NHS1PのTLC酵素免疫測定法による特異性の検討結果を示すクロマトグラフの図面に代わる写真である。(1)はCerとの交差反応性、(2)はSph, SM, C1Pとの交差反応性、(3)はPS, LPE, LPC, LSMとの交差反応性を示している。それぞれ、右側プレートはモリブデン-硫酸試薬による結果、左側プレートは本発明抗体による染色結果である。左右プレートとも各脂質のスポット位置の順番は同じであるので、両者同じ位置に各脂質は移動しており、右側プレートのモリブデン-硫酸試薬による結果にて左側プレートにおける各脂質の移動位置が確認できる。

【図7】 Sph特異的モノクローナル抗体NH SphのTLC酵素免疫測定法による特異性の検討結果を示すクロマトグラフの図面に代わる写真である。(1)はCer, S1P, SM, CBとの交差反応性、(2)はPS, LPE, PC, PEとの交差反応性を示している。それぞれ、(1)の上側プレートはモリブデン-硫酸試薬による結果、(2)の上側プレートはモリブデン-硫酸試薬およびニンヒドリン試薬による結果、(1)および(2)の下側プレートは本発明抗体による染色結果である。上下プレートとも各脂質のスポット位置の順番は同じであるので、両者同じ位置に各脂質は移動しており、上側プレートのモリブデン-硫酸試薬およびニンヒドリン試薬による結果にて下側プレートにおける各脂質の移動位置が確認できる。

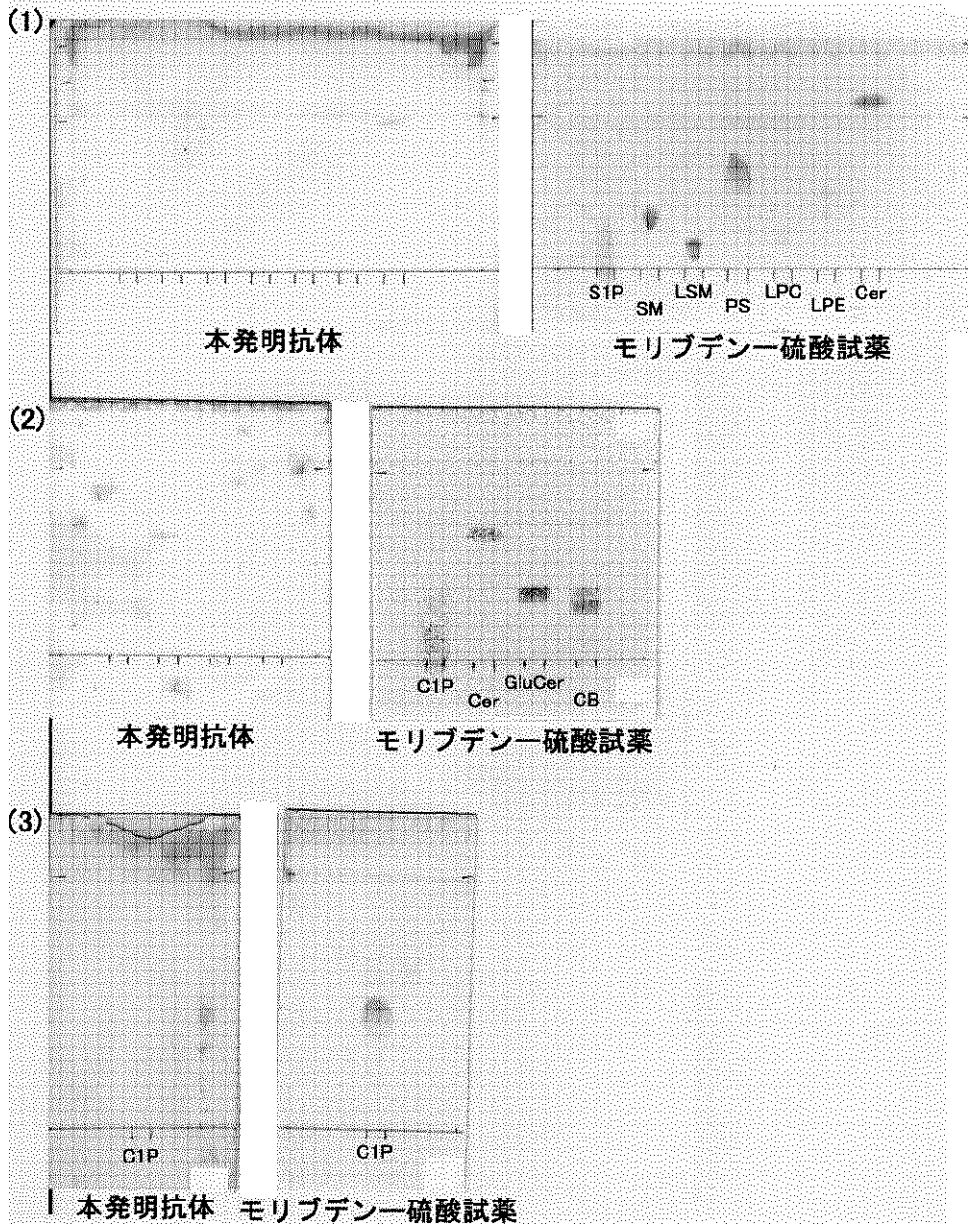
【図2】

【図3】



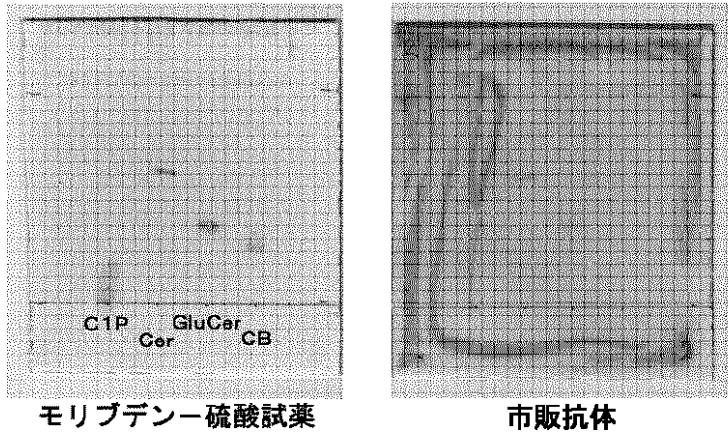
【図1】

本発明セラミド抗体の特異性検討結果



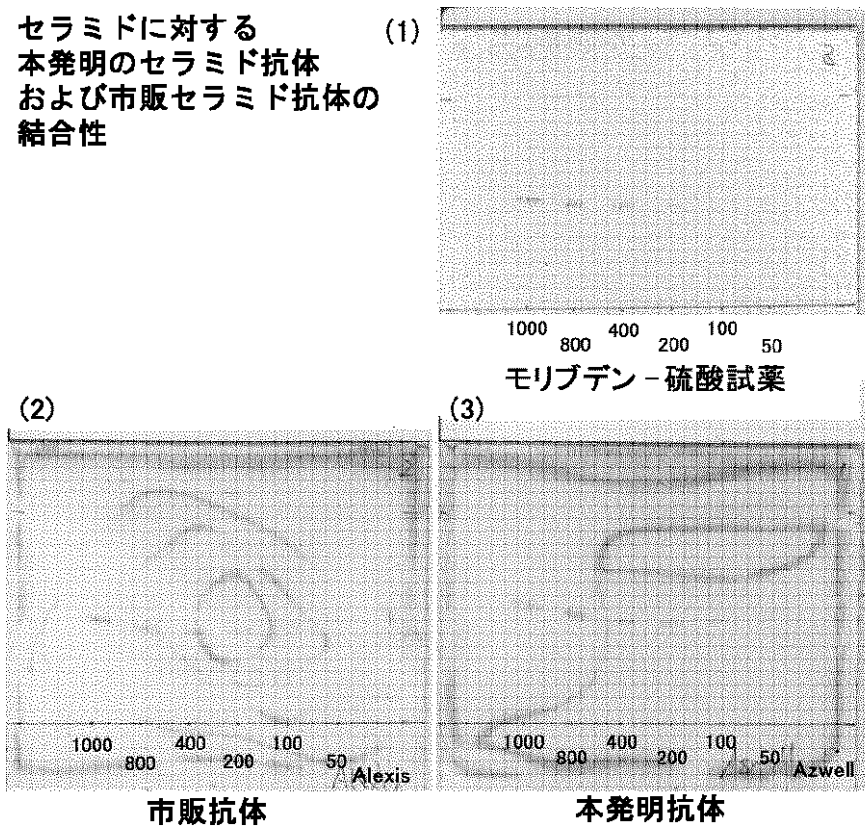
【図4】

市販セラミド抗体の特異性



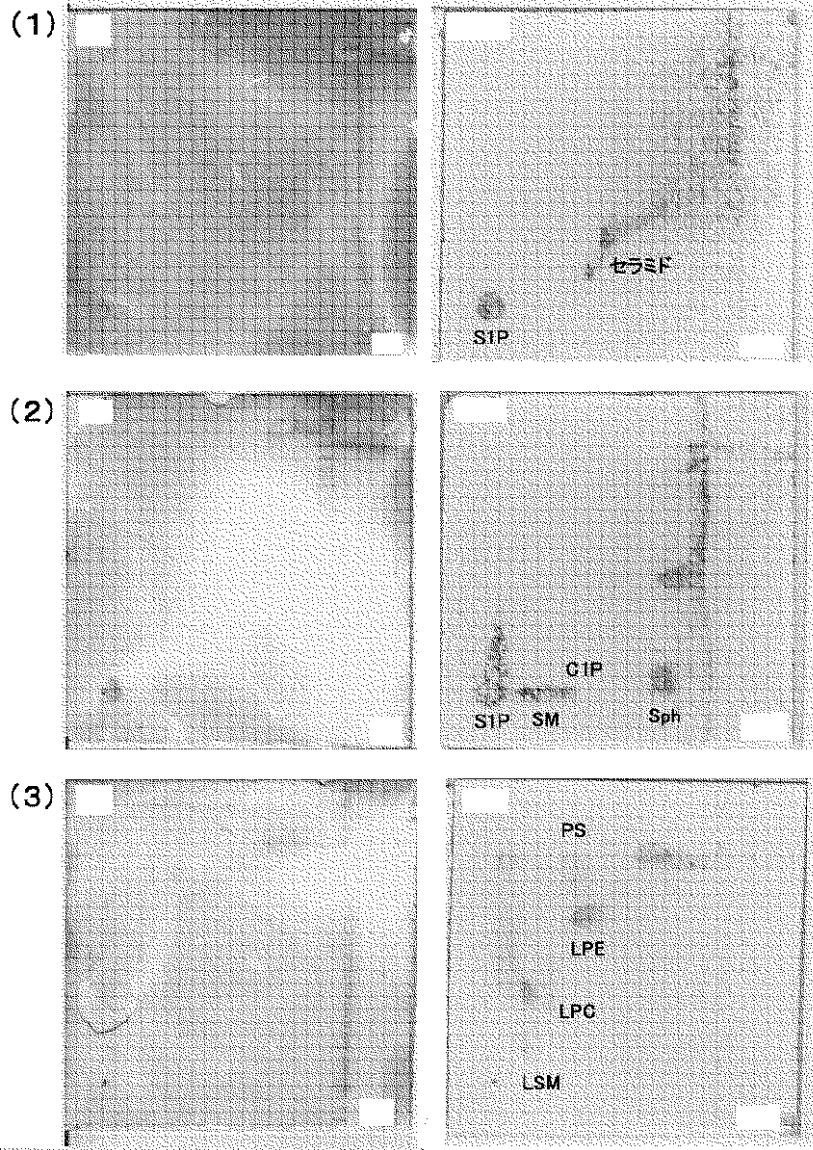
【図5】

セラミドに対する
本発明のセラミド抗体
および市販セラミド抗体の
結合性



【図6】

本発明スフィンゴシン-1-リン酸抗体の特異性

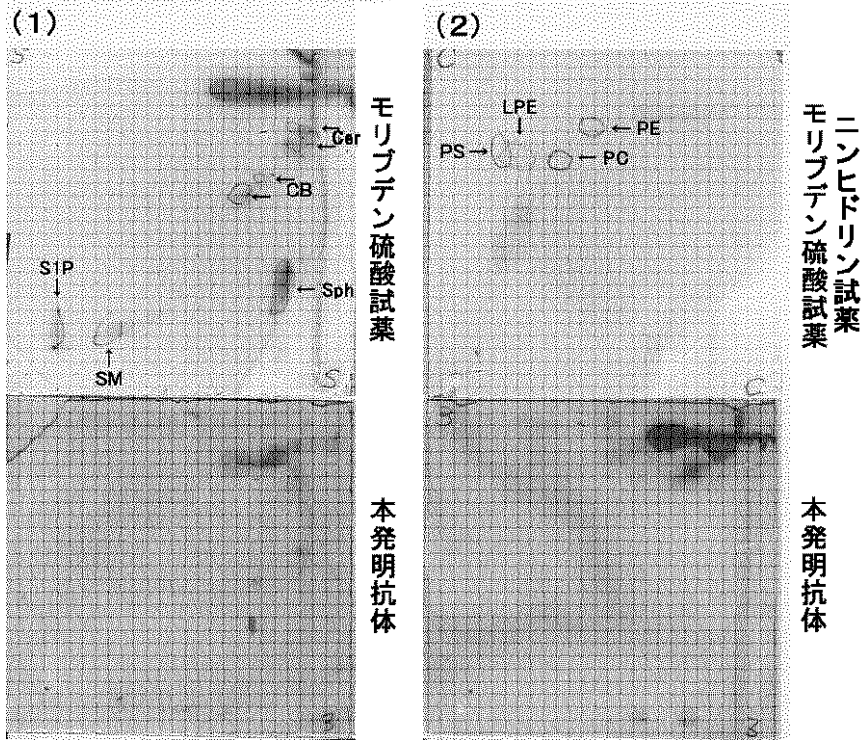


本発明抗体

モリブデン-硫酸試薬

【図7】

本発明スフィンゴシン抗体の特異性検討



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷
// C 1 2 N 15/02

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

テ-マコード (参考)
C

专利名称(译)	抗鞘脂单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2002243737A	公开(公告)日	2002-08-28
申请号	JP2001034031	申请日	2001-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	AZUERU		
申请(专利权)人(译)	株式会社アズウエル		
[标]发明人	河瀬 護		
发明人	河瀬 護		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.S C07K16/44 C12P21/08 G01N33/577.B C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA30 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于测定选自神经酰胺，鞘氨醇和鞘氨醇-1-磷酸鞘氨醇的鞘氨醇的免疫测定方法。本发明的免疫测定方法的特征在于，使用与神经酰胺，鞘氨醇和鞘氨醇-1-磷酸特异性反应，并且不与其他鞘脂交叉反应的单克隆抗体。