

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/022107

発行日 平成27年3月5日 (2015.3.5)

(43) 国際公開日 平成25年2月14日 (2013.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531	B
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 4 5 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

出願番号	特願2013-528089 (P2013-528089)	(71) 出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2012/070570	(71) 出願人	504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島1-5-4 5
(22) 国際出願日	平成24年8月10日 (2012.8.10)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	特願2011-176272 (P2011-176272)	(72) 発明者	佐々木 成 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立 大学法人東京医科歯科大学内
(32) 優先日	平成23年8月11日 (2011.8.11)	(72) 発明者	大本 安一 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大 塚製薬株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質を含む生体試料の前処理方法

## (57) 【要約】

生体試料に含まれるタンパク質を免疫学的方法を用いて測定する場合の、生体試料の前処理方法を提供する。

生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する場合の生体試料の前処理方法であって、下記工程を有することを特徴とする方法：

- (1) 生体試料を-80 以上より高い温度条件、特に-70 以上の温度条件で凍結処理する、
- (2) 凍結した生体試料を解凍する、及び
- (3) 生体試料を界面活性剤を用いて可溶化する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体試料に含まれるタンパク質を免疫学的方法を用いて測定する場合の生体試料の前処理方法であって、下記工程を有することを特徴とする方法：

- (1) 生体試料を-80 より高い温度条件で凍結処理する、
- (2) 凍結した生体試料を解凍する、及び
- (3) 生体試料を界面活性剤を用いて可溶化する。

## 【請求項 2】

生体試料に含まれるタンパク質を免疫学的方法を用いて測定する場合の生体試料の前処理方法であって、下記工程を有することを特徴とする方法：

- (2') -80 より高い温度条件で凍結処理された生体試料を解凍する、及び
- (3) 生体試料を界面活性剤を用いて可溶化する。

10

## 【請求項 3】

生体試料が、ヒトを含む動物の体液である請求項 1 または 2 に記載する前処理方法。

## 【請求項 4】

上記体液が尿である請求項 3 に記載する前処理方法。

## 【請求項 5】

(3) の可溶化工程で使用する界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載する前処理方法。

## 【請求項 6】

上記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルである請求項 5 に記載する前処理方法。

20

## 【請求項 7】

免疫学的方法が E L I S A 法である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載する前処理方法。

## 【請求項 8】

タンパク質が膜タンパク質である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載する前処理方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項の方法で前処理された生体試料を用いて、当該生体試料に含まれるタンパク質を免疫学的方法を用いて測定する方法。

30

## 【請求項 10】

上記免疫学的方法が E L I S A 法である、請求項 9 に記載する測定方法。

## 【請求項 11】

上記生体試料が、尿である請求項 9 または 10 に記載する測定方法。

## 【請求項 12】

上記タンパク質が膜タンパク質である、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載する測定方法。

## 【請求項 13】

上記タンパク質がアクアポリンである請求項 12 に記載する測定方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、生体試料に含まれるタンパク質を免疫学的方法を用いて測定する場合の、生体試料の前処理方法に関する。また本発明は、当該方法によって前処理された生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、各種疾患の診断のために有益な情報を得るための方法のひとつとして、バイオマーカーを測定する方法が用いられている。「バイオマーカー」とは、通常の生物学的過程

50

、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され且つ評価される特性 ("a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.") を意味する (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP: BIOMARKERS AND SURROGATE ENDPOINTS: PREFERRED DEFINITIONS AND CONCEPTUAL FRAMEWORK. CLIN PHARMACOL THER 2001;69:89-95.)。より具体的には、血清や尿などの体液および組織などの生体試料に含まれる生体由来の物質で、生体内の生物学的変化を定量的に把握するための指標となるものである。バイオマーカーの測定には、ELISA (酵素免疫測定法)、RIA (ラジオイムノアッセイ)、及び免疫クロマトグラフィー法等の免疫学的方法が用いられており、当該免疫学的方法は測定キットを使用することで簡便に実施することができる。

10

## 【0003】

一方、バイオマーカーを測定する際には、擬陽性または擬陰性が問題になることがある。特に、膜タンパク質をバイオマーカーとして測定する場合、検出用の抗体が認識する部位が膜に包まれており、抗体と十分に反応しない場合がある。このため、上記測定キット等を用いた簡便方法では、精度よくバイオマーカーを検出することができず、これを解消する方法が求められていた。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

本発明の目的は、生体試料に含まれるタンパク質、特に上記問題のある膜タンパク質を免疫学的方法を用いて測定する場合の、生体試料の前処理方法を提供することである。より好ましくは、本発明の目的は、生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する場合に生じ得る擬陽性または擬陰性等の問題を解消し、測定精度またはノ及び測定感度を向上させるための生体試料の前処理方法を提供することである。

20

## 【0005】

また、本発明の目的は、上記方法によって前処理された生体試料に含まれるタンパク質、特に膜タンパク質を、免疫学的方法を用いて測定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】

## 【0006】

タンパク質の中でも不溶性蛋白質、特に膜タンパク質を含む生体試料を、例えばバイオマーカーとして免疫学的測定方法に供するためには、多くの場合、その前に、対象とするタンパク質を、界面活性剤を用いて可溶化することが行われる。本発明者らは、当該生体試料の免疫学的測定方法における上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねていたところ、タンパク質、特に膜タンパク質等の不溶性タンパク質を含む生体試料を、一旦、-80 よりも高い温度条件、特に -70 以上の温度条件で凍結し、その後、解凍処理することにより、免疫学的方法を用いてタンパク質を測定する場合に生じる上記問題が解消し、測定精度またはノ及び測定感度が向上することを見出した。

30

## 【0007】

本発明はかかる知見に基づいて、さらに検討を重ねて完成したものであり、下記の実施態様を包含するものである。

40

## 【0008】

## (I) タンパク質を含む生体試料の前処理方法

(1-1) 生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する場合の生体試料の前処理方法であって、下記工程を有することを特徴とする方法：

- (1) 生体試料を -80 よりも高い温度条件、特に -70 以上の温度条件で凍結処理する、
- (2) 凍結した生体試料を解凍する、及び
- (3) 生体試料を界面活性剤を用いて可溶化する。

## 【0009】

(1-2) 生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する場合の生体

50

試料の前処理方法であって、下記工程を有することを特徴とする方法：

(2') -80 よりも高い温度条件、特に-70 以上の温度条件で凍結処理された生体試料を解凍する、及び

(3) 生体試料を界面活性剤を用いて可溶化する。

【0010】

(1-3) 生体試料が、ヒトを含む動物の体液である(1-1)または(1-2)に記載する前処理方法。

(1-4) 上記体液が尿である(1-3)に記載する前処理方法。

(1-5) (3)の可溶化工程で使用する界面活性剤が非イオン性界面活性剤である(1-1)~(1-4)のいずれかに記載する前処理方法。

10

【0011】

(1-6) 上記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルである(1-5)に記載する前処理方法。

(1-7) 免疫学的方法がELISA法である、(1-1)~(1-6)のいずれかに記載する前処理方法。

(1-8) タンパク質が膜タンパク質である、(1-1)~(1-7)のいずれかに記載する前処理方法。

(1-9) 膜タンパク質がアクアポリンである、(1-8)に記載する前処理方法。

【0012】

(11) 生体試料に含まれるタンパク質の免疫学的方法

20

(11-1) (1-1)~(1-9)のいずれかの方法で前処理された生体試料を用いて、当該生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する方法。

(11-2) 上記タンパク質が膜タンパク質である(11-1)に記載する方法。

(11-3) 上記タンパク質がアクアポリンである(11-1)または(11-2)に記載する方法。

(11-4) 上記免疫学的方法がELISA法である(11-1)~(11-3)のいずれかに記載する方法。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、生体試料に含まれるタンパク質、特に膜タンパク質を免疫学的方法により測定する際に、十分な免疫反応が起こるように、生体試料を前処理する方法を提供することができる。このため、本発明の方法によれば、従来の方法では免疫学的方法によって十分な測定精度または/及び測定感度が得られなかった生体試料に含まれる膜タンパク質を、精度よくまたは感度よく測定することが可能になる。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 ヒトAQP2遺伝子(hAQP2)、及びそれをPCRするために使用したhAQP2/前半部分のプライマー(hAQP2N-F、hAQP2N-R)とhAQP2/後半部分のプライマー(hAQP2C-F、hAQP2C-R)の関係を示す図である(参考製造例1(2))。

【図2】 参考製造例1(2)においてクローンされたhAQP2N(86-749)プラスミドNos.1,2,3,5,6及びhAQP2C(562-901)プラスミドNos.1,2,3,4,6の配列と、ワイルドタイプ(Wild type)のヒトAQP2遺伝子について、遺伝子の長さや領域を対比した図である。

40

【図3】 参考製造例1(4)において、2種類の大腸菌(No.2及びNo.8)について、IPTG前(誘発前)とIPTG後(誘発後)、そして誘発後の大腸菌を可溶化して不溶性画分と可溶性画分に分け、ヒトAQP2合成ペプチド抗体(抗ヒトAQP2ウサギ血清、PherMingen)を用いて、SDS-PAGE/CBB染色(上段図)とウェスタン分析に供した結果を示す。

【図4】 参考製造例2において行った昆虫細胞Sf-9に発現したHis tag付きヒトAQP2(hAQP2/His/Sf-9)製造の概略(1)と、その結果(2)を示す。

【図5】 参考製造例3において、3回免疫後の血清(OPP21401-21404)及び対照血清(NRS:Normal Rabbit Serum)について、(A)免疫抗原(hAQP2/Trx)に対する抗体価、及び(B)Sf-9細胞発現hAQP2(hAQP2/Trx/Sf-9)に対する抗体価を示す。

50

【図6】参考製造例3において、7回免疫後の血清(OPP21401 - OPP 21404)及び対照血清(NRS:Normal Rabbit Serum)について、(A)免疫抗原(hAQP2/Trx)に対する抗体価、及び(B)Sf-9細胞発現hAQP2(hAQP2/Trx/Sf-9)に対する抗体価を示す。

【図7】参考製造例3において、得られたポリクローナル抗体(OPP21401 - OPP 21404)と対照血清(NRS:Normal Rabbit Serum)について、ウエスタンブロッティング法により各種抗原(hAQP2/Trx、hAQP2/Trx/Sf-9、Trx/His control)との反応性を調べた結果を示す。

【図8】参考製造例4において、得られたモノクローナル抗体(OPM21401、OPM 21402)と対照血清(NMS:Normal Mouse Serum)について、ウエスタンブロッティング法により各種抗原(hAQP2/Trx、hAQP2/Trx/Sf-9、Trx/His control)との反応性を調べた結果を示す。

【図9】実験例1(1)(1-1)において、種々の可溶化剤(Urea、Triton X-100、NP-40、Tween-20、塩酸グアニジン(GuCl)、SDS)を用いて、AQP2を膜から可溶化し、かつ測定系に影響のない条件を検討した結果を示す。

【図10】実験例1(1)(1-2)において、1st緩衝液(0.2% BSA / 10 mM EDTA / 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0))に添加する安定剤(Urea、Triton X-100、NP-40、Tween-20、塩酸グアニジン(GuCl)、SDS)の検討を行った結果を示す。

【図11】参考製造例1に記載する方法で製造した「Trx融合AQP2蛋白(AQP2/Trx)」、及び参考製造例2に記載する方法で製造した「AQP2/Sf9」を、標準タンパク質として使用して、モノクローナル抗体(OPM21401)を用いてELISA測定を行い、標準曲線を作成した結果を示す(実験例1(1)(1-4))。なお、横軸上段に記載する希釈倍率は、AQP2/Sf9をPBSに懸濁し、等量の可溶化剤で可溶化した溶液(AQP2/Sf9 lysate)を原液とし、この原液を2~1458K(2~1458 x 1000倍)希釈したことを意味する。

【図12】被験試料として、健常人ボランティアの尿試料4検体(No.4,5,6、及び9)を段階的に希釈したものを使用し、ELISA測定を行った結果を、標準タンパク質(Trx融合AQP2蛋白)による標準曲線とともに示した図である(実験例1(1)(1-5))。

【図13】(A)健常人ボランティア10名の尿について、ヒトAQP2に対するモノクローナル抗体(OPM21401)(参考製造例3)を用いて、ウエスタンブロッティングにより尿中のヒトAQP2量を測定した結果を示す。(B)同じ健常人ボランティア10名の尿について、上記ELISA測定系で測定した尿中のヒトAQP2量を示す(実験例1(1)(1-6))。

【図14】参考製造例2に記載する方法で製造した「AQP2/Sf9」を標準タンパク質としてELISA測定を行った標準検量線を示す。

【図15】実験例2における1st試験、2nd試験、3rd試験、4th試験及び5th試験の結果を示す。

【図16】 $-20 \pm 5$  の温度条件で、0~56日間にわたって凍結保存したヒト尿について、尿中のAQP2量を実験例1で確立したヒトAQP2 ELISA法を用いて測定し、凍結保存期間とヒト尿中のAQP2量との関係を調べた結果を示す(実験例3)。

【図17】2週間(14日間)、各温度(-80、-30、-28、-26、-20、4)で暗所保存した、健常人2名から採取した尿(Nos.1及び2)について、尿中のAQP2量を実験例1で確立したヒトAQP2 ELISA法を用いて測定し、凍結温度とヒト尿中のAQP2量との関係を調べた結果を示す(実験例3)。

【発明を実施するための形態】

【0015】

(I)タンパク質を含む生体試料の前処理方法

本発明の方法は、生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する場合の生体試料の前処理方法である。

【0016】

ここで免疫学的方法とは、抗原と抗体の反応を利用して、被験試料における標的物質(本発明ではタンパク質)の存在やその程度を測定する生化学的試験法であり、例えば酵素標識免疫学的検定法(Enzyme Immunoassay, EIA)、放射免疫測定(Radioimmunoassay, R

10

20

30

40

50

IA)、酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)、凝集法、比濁法、混濁度測定法、ウエスタンブロット法等を制限なく挙げることができる。好ましくはELISAである。

【0017】

本発明が対象とする生体試料は、タンパク質を含み、免疫学的測定方法に供されるものであればよく、その限りにおいて由来や種類は特に制限されない。例えば、動物または植物から得られる生体試料を挙げることができる。

【0018】

ここで動物としては、制限はされないが、好ましくはヒトを含む哺乳動物を挙げることができる。また、ヒト以外の哺乳動物としては、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、サル、イヌ、ウシ、ウマ等を例示することができる。動物として、好ましくはヒトである。これらの動物から得られる生体試料としては、具体的には、タンパク質、好ましくは膜タンパク質を含む尿、血液、唾液、汗、粘液、リンパ液、羊水、及び髄液等の体液；細胞；及び組織を挙げることができる。

10

【0019】

また植物としては、制限はされないが、種子植物及びシダ植物等の高等植物、並びに菌類、地衣類及び藻類の下等植物を挙げることができる。これらの植物から得られる生体試料としては、具体的には、タンパク質、好ましくは膜タンパク質を含む葉、茎、根、花、種子、果実、及び果皮等の各種の植物部位(抽出物などの植物部位の加工処理物を含む)；樹液等の分泌物；細胞；及び組織を挙げることができる。

20

【0020】

生体試料として、好ましくは哺乳動物、特にヒトの生体試料である。より好ましくは採取の簡便性から、哺乳動物、特にヒトの尿、唾液、及び血液であり、特に好ましくは尿である。

【0021】

なお、これらの生体試料は、測定する対象のタンパク質が失活するなど、品質が低下若しくは劣化しないものであるかぎり、採取から間もないものであっても、また採取から一定時間経過したもの、つまり採取して一定期間保存したものであってもよい。

【0022】

また生体試料の採取方法は、生体試料に含まれる目的とするタンパク質、好ましくは膜タンパク質に影響を与えない方法であればよく、特に制限されない。

30

【0023】

また採取した生体試料は、そのままの状態でも本発明の方法に供することもできるし、また採取した生体試料から目的とするタンパク質を含む部分を抽出または分画して、当該抽出物または分画物を生体試料として本発明の方法に供することもできる。

【0024】

本発明が対象とするタンパク質は、上記の動物または植物に含まれているタンパク質であればよく、特に制限されないが、好ましくは膜タンパク質である。膜タンパク質は、細胞膜または小胞膜上に存在するタンパク質であり、膜輸送タンパク質、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプ、イオンチャンネルなどがあるが、その限りにおいて特に制限されない。好ましくはアクアポリン(Aquaporin:AQP)、特にヒトが持つ13種類のAQPの一つであるAQP2を例示することができる(「細胞膜水チャンネル, アクアポリン」日医大医会誌2009; 5(2)参照)。

40

【0025】

AQPは、MIP(Major Intrinsic Proteins)ファミリーに属する主要膜タンパク質の一種である(Agre P(2006). "The aquaporin water channels". Proc Am Thorac Soc 3(1): 5-13.; Agre P, et al., (1993). "Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel" Am. J. Physiol. 265(4 Pt 2): F463-76.)。集合管管腔膜に分布し、細胞膜表面と細胞内小胞膜との間を往来する水の通過孔(水チャンネル)であり、水のみを選択的に通過させることができるため、細胞への水の取り込みに関係している(Gonen T, Walz T(2006). "The structure of aquaporins". Q. Rev. Biophys. 39(4): 361-96)。その

50

アミノ酸配列は既に公知であり、例えばヒトAQP2のアミノ酸配列はGen Bank accession No:AAB319999.1 (GI:685001) に登録されており (配列番号1)、それをコードする塩基配列もGen Bank accession No:AH007818.3 (GI:14190630) に登録されている。

#### 【0026】

本発明の方法は、下記の工程を有することを特徴とする：

- (1) 生体試料を-80 よりも高い温度条件、特に-70 以上の温度条件で凍結処理する (凍結工程)、
- (2) 凍結した生体試料を解凍する (解凍工程)、及び
- (3) 生体試料を界面活性剤を用いて可溶化する (可溶化工程)。

#### 【0027】

以下、各工程について説明する。

##### (1) 凍結工程

当該工程は、生体試料を-80 よりも高い温度条件で凍結処理する工程である。

#### 【0028】

凍結方法は、生体試料中に含まれるタンパク質に悪影響がなく、対象の生体試料を-80 よりも高い温度で凍結させる方法であれば、特に制限されない。通常、該当温度で凍結させることができる冷凍庫 (庫内温度：-80 よりも高い温度) を用いて、生体試料を凍結することができる。

#### 【0029】

凍結処理の温度は、上記するように-80 よりも高ければよく、特に制限はされないが、好ましくは-70 以上である。より好ましくは-50 以上、具体的には-50 ~ -10 : さらに好ましくは-40 以上、具体的には-40 ~ -10 である。さらにより好ましくは-40 よりも高い温度条件、具体的には-40 より高く-10 より低い温度条件であり、とりわけ-35 ~ -15、なかでも-30 ~ -20 の温度条件が好ましい。

#### 【0030】

一旦、凍結した生体試料は、ただちに次の(2)解凍工程に供することもできるが、一定期間、凍結状態に曝しておいてもよい。この一定期間は、制限されないが、好ましくは1時間~1週間、より好ましくは12時間~24時間程度を挙げることができる。

後述する実験例の結果によれば、生体試料を、一定時間 (期間) 以上凍結させておくことで、当該生体試料から求められるタンパク質の免疫学的測定値が安定する。このため、生体試料中に含まれるタンパク質をより高い精度で定量するためには、生体試料を一定時間 (期間) 以上、好ましくは2週間程度以上、凍結状態に曝しておくことが好ましい。生体試料を2週間程度以上、凍結状態にしておく場合の凍結温度条件としては、-30 ~ -20 の範囲を好適に例示することができる。

#### 【0031】

##### (2) 解凍工程

この工程は、前記の工程で凍結した生体試料を解凍する工程である。

#### 【0032】

当該解凍方法は、生体試料中に含まれるタンパク質に悪影響なく、凍結した生体試料を解凍させる方法であれば、特に制限されない。具体的には、凍結した生体試料を、容器に入れた状態で、室温条件に放置する方法、流水を掛ける方法、水に浸漬する方法、氷上に置きながら徐々に解凍する方法などを、制限なく例示することができる。

#### 【0033】

上記(1)と(2)における凍結と解凍の処理は、1回行って、また2回以上の複数回を繰り返して行ってもよい。通常は処理効率の面から凍結と解凍とを1回ずつ行えばよいが、後述する実験例で示すように、凍結と解凍 (溶解) を繰り返しても、免疫学的測定結果に有意な低下はみられず、測定するタンパク質に悪影響はないと認められるから、凍結と解凍を複数回繰り返すことに制限はない。このため、例えば、免疫学的測定に供する生体試料について、-80 よりも高い温度条件、特に-70 以上での凍結の有無が確認できない等、凍結処理の有無が不明なときは、改めて凍結と解凍を実施することができる。

10

20

30

40

50

## 【0034】

なお、予め(1)の工程が施された生体試料が入手できる場合（例えば、第三者が(1)の工程を行い、それを入手する場合等）、本発明は、(1)と(2)の工程に代えて、下記(2')の工程を行うことによって、本発明を実施することもができる：

(2') - 80 よりも高い温度条件、特に-70 以上の温度条件で凍結処理された生体試料を解凍する。

## 【0035】

このため、別の側面から、本発明は、かかる態様、つまり上記(2')の解凍工程と(3)の可溶化工程を有する、タンパク質を含む生体試料の前処理方法を提供するものでもある。なお、上記(2')における凍結温度や凍結時間の条件としては、前述する[0029]及び[0030]に記載する条件を同様に挙げることができる。

10

## 【0036】

(3)可溶化工程

当該工程は、免疫学的測定方法に供するタンパク質を含む生体試料を、界面活性剤を用いて可溶化する工程である。

## 【0037】

当該工程における可溶化は、生体試料に含まれているタンパク質、特に膜タンパク質が可溶化される状態におかれればよく、その限りにおいて界面活性剤の添加時期は特に制限されない。例えば、生体試料を解凍する時点、または解凍後に添加することができる。また界面活性剤による可溶化作用が凍結解凍によって影響されず、また凍結解凍による処理効果が界面活性剤によって影響されなければ、界面活性剤を凍結前に予め生体試料に添加しておいてもよい。

20

## 【0038】

本発明において使用される界面活性剤は、一般にタンパク質、特に膜タンパク質の可溶化処理に使用されるものであり、好ましくは、タンパク質の可溶化作用に優れ、しかも免疫学測定結果に影響しない非イオン性界面活性剤を挙げることができる。非イオン性界面活性剤として、好ましくは、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(Polyoxyethylene Octylphenyl Ether)、及びポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル(Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate)を挙げることができる。ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルとして、好ましくはPolyoxyethylene(8) Octylphenyl Ether (Triton X-114)、Polyoxyethylene(9) Octylphenyl Ether (NP-40)、及びPolyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether (Triton X-100)であり、より好ましくはPolyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether (Triton X-100)である。

30

## 【0039】

またポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステルとして、好ましくはポリオキシエチレンソルビタンモノラウリン酸エステル(特に、Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate [Tween 20])、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミチン酸エステル(特に、Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monopalmitate [Tween 40])、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアリン酸エステル(特に、Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monostearate [Tween 60])、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル(特に、Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monooleate [Tween 80])を挙げることができ、より好ましくは、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウリン酸エステル、特に、Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20)である。

40

## 【0040】

これらの界面活性剤はいずれも商業的に入手できるものであり、例えば和光純薬工業やナカライテスク(株)などから購入することができる。

## 【0041】

可溶化工程において、タンパク質を含有する生体試料に配合する界面活性剤の割合としては、使用する界面活性剤の種類によっても異なるが、処理する生体試料100重量%中の界面活性剤濃度が、通常0.0001~30重量%の範囲になるような割合を例示することができ

50

る。好ましくは0.01~10重量%、より好ましくは0.1~2重量%である。また、これを生体試料中に含まれるタンパク質の総量100重量部に対する割合に換算すると、タンパク質の総量100重量部に対して界面活性剤0.01~30000重量部、好ましくは10~10000重量部、より好ましくは100~2000重量部である。

【0042】

また可溶化工程における条件としては、目的のタンパク質、特に膜タンパク質が、測定対象とする免疫学的活性を損なわずに可溶化する条件であればよい。その限りにおいて特に制限されないが、通常、pH4~10の範囲、好ましくはpH6.5~8.5の範囲；温度0~50、好ましくは4~37の条件を挙げることができる。

【0043】

以上、(1)~(3)の工程、または(2')及び(3)の工程を行って調製された生体試料は、そのまま、または必要に応じて固液分離や任意の分画処理を施した後に、後述する免疫学的測定方法に供することができる。

【0044】

(II) 生体試料に含まれるタンパク質の免疫学的測定方法

本発明は、上記(I)の前処理を施された生体試料を用いて、当該生体試料に含まれるタンパク質、特に膜タンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する方法に関する。ここで測定とは、生体試料に含まれるタンパク質を定性的に検出する方法、及び生体試料に含まれるタンパク質の量を定量的に測定する方法のいずれもが包含される。

【0045】

ここで使用される免疫学的方法としては、慣用の酵素標識免疫学的検定法(Enzyme Immunoassay, EIA)、放射免疫測定(Radioimmunoassay, RIA)、酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)、凝集法、比濁法、混濁度測定法、ウエスタンブロット法等を制限なく挙げることができ、目的に応じて適宜選択することができる。好ましくはELISAである。

【0046】

これらの免疫学的測定方法は、いずれも公知の慣用方法であり、例えば石川栄治著「エンザイムイムノアッセイはこう開発する」(生物化学実験法)、出版社：学会出版センター(2003/07)などの教科書的な書籍や文献に従って(または準じて)、容易に実施することができる。また、免疫学的測定方法に使用する抗体(ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体)は、簡便には商業的に入手できるものを使用してもよいし、商業的に入手できない場合であっても、当業者であれば、抗体の作製に関する、例えば「タンパク質実験ハンドブック 分離・精製, 質量分析, 抗体作製, 分子間相互作用解析などの基本原理と最新プロトコール 総集編!」出版社：羊土社(2003/08)などの教科書的な書籍や文献に従って(または準じて)、調製することができる。

【0047】

本発明において、好ましくは、前述する本発明の前処理を施したヒト由来の生体試料、特に尿を対象として、当該生体試料中に含まれるタンパク質、例えば、実験例に示すようにアクアポリン(AQP)、好ましくはヒトAQP2等の膜タンパク質の量を免疫学的方法で測定する方法である。

【0048】

免疫学的測定方法として好ましくはELISA法である。例えばELISA法に使用するAQPに対する抗体は、定法に従って製造することができるし、また後述する参考製造例2及び3を参照して製造することもできる。また、尿を被験試料とするELISA法は、後述する実験例1に記載するプロトコールに従って実施することができる。実験例2に記載するように、本発明の前処理を施すことによって、尿中に含まれるAQP等の膜タンパク質の量を、高い精度でかつ効率的に検出することが可能になる。

【実施例】

【0049】

以下、本発明の構成とその効果を参考製造例及び実験例に基づいて説明する。但し、本

10

20

30

40

50

発明はかかる実験例等により何ら制限されるものではない。

【0050】

参考製造例 1 大腸菌発現Trx/His融合ヒトAQP2の製造

ヒトaquaporin 2 (AQP2) 遺伝子をクローニングし、大腸菌に発現させた。ヒトAQP2蛋白は5回膜貫通型蛋白で271アミノ酸からなる、タンパク質領域の分子量が約30kDのタンパク質である (Sasaki S, et al., Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct. Clin. Invest.. 1994;93(3):1250-1256.)。なお、ここではヒトAQP2蛋白を、N末端にTrxタグを付加した状態で大腸菌に発現させた。

【0051】

その方法を要約すると以下の通りである。

10

【0052】

まずヒトAQP2 (271アミノ酸) に相当する遺伝子を2分割して、前半プライマー対と後半プライマー対を用いてPCRクローニングした。それぞれのPCR産物をプラスミドに組み込み、大腸菌にトランスフォーメーションし、その核酸配列を決めた。その中で、ワイルドタイプの配列と同じクローン1 (前半部分) とクローン4 (後半部分) を選び、重複する共通の制限酵素サイト (BamHI) で切断し、リガーゼでつなぎ合わせ遺伝子配列を得た。次にHisタグ融合蛋白発現ベクターにAQP2遺伝子配列を挿入して、目的のHisタグ融合AQP2発現ベクター (クローン8) を得たが、十分量のAQP2蛋白を発現しなかったため、N端部分を欠いたNcoI-BamHI核酸断片を切出し、Thioredoxin (Trx) 融合ベクターに組み込んだ。このTrx融合AQP2発現ベクター (クローン2と8) を大腸菌に入れ、培養し、IPTG誘導したところ、Trx融合AQP2蛋白が大量に発現させることが判った。

20

【0053】

このヒトAQP蛋白は市販のヒトC端合成ペプチドで作成された抗体で確認した。

【0054】

(1) ヒトAQP2遺伝子のPCR増幅とクローン化について

ヒトcDNAライブラリー (QUICK-Clone cDNA Human cDNA, CLONTECH) から、ヒトAQP2遺伝子を前半部分 (AQP2N:86-749) と後半部分 (AQP2C:562 - 901) に分割して、各領域に特異的なプライマーを用いて増幅した。

【0055】

具体的には、ヒトAQP2遺伝子のPCRは、図1に示すように、ヒトAQP2蛋白 (271アミノ酸) をコードする領域 (86-901) をBamHIサイト (position 609) でN端とC端に2分割してPCRを行った。ヒトAQP2遺伝子N端部分 (hAQP2/前半部分、以下「hAQP2N」という) のPCRプライマーは、開始コドンから22塩基 (86-107) をForwardプライマーに (hAQP2N-F: 配列番号2)、728-749の22塩基をReverseプライマーに用いた (hAQP2N-R: 配列番号3)。また、ヒトAQP2遺伝子C端部分 (hAQP2/後半部分、以下「hAQP2C」という) は562-583の22塩基をForwardプライマーに (hAQP2C-F: 配列番号4)、ストップコドンまでの21塩基 (881-901) をReverseプライマーに用いた (hAQP2C-R: 配列番号5)。hAQP2N-F およびhAQP2C-Rの5'末端には、発現ベクターに挿入する際の制限酵素サイトをそれぞれ付加した (hAQP2N-F; SphI, hAQP2C-R; HindIII)。AQP2遺伝子と前半部分と後半部分に分けたプライマーの設定を図1に示した。PCRの結果、推定される884bp (hAQP2N部分) と340bp (hAQP2C部分) のPCR産物が得られた。

30

40

【0056】

AQP2N(86-749)のPCR産物をpT7クローニングベクターに組み込み、大腸菌にトランスフォームして、大腸菌のコロニーNos.1, 2, 3, 5, 6を得た。この大腸菌コロニーからプラスミドDNAを抽出して、特異的な前半プライマー (NF/NR) を用いてPCRを行い、大腸菌のコロニーNos.1, 3, 5に目的のAQP2N(86-749)の配列が挿入されていることを確認した。更に、5種類のプラスミドに2種類の制限酵素を作用させて切出し、核酸断片がAQP2遺伝子由来の大きさであることを確認した。

【0057】

同様にAQP2C(562 - 901)も特異的な後半プライマーを用いて増幅し、大腸菌コロニーNos.1

50

~6を調べ、すべてのコロニーに遺伝子が挿入されていることが判った。そのうち、No5を除く、Nos.1, 2, 3, 4, 6のプラスミドを抽出し、2種類の制限酵素も用いて、挿入遺伝子の大きさを調べた。5種類のプラスミドから、制限酵素で切出された核酸断片の大きさが推定される2200bpであったので、AQP22C(562-901)を含む遺伝子がプラスミドに組み込まれていると判断した。

#### 【0058】

Beckman-Coulter社のCEQ2000を用いて、AQP2N(86-749)プラスミドNos.1,2,3,5,6とAQP2C(562-901)プラスミドNos.1,2,3,4,6計10種類の核酸配列を決め、各プラスミドの核酸配列とそれに対応するワイルドタイプを比較した(図2)。図2から判るように、ワイルドタイプと同じ配列を持つAQP2N(86-749)プラスミドNo.1とAQP2C(562-901)プラスミドNo.4を選び、両プラスミドをつなぎ合わせて発現用のベクターを作成することにした。

10

#### 【0059】

##### (2) Hisタグ融合ヒトAQP2発現ベクターの構築について

AQP2N(86-749)プラスミドNo.1からSphI-BamHIフラグメント、AQP2C(562-901)プラスミドNo.4からBamHI-HindIIIフラグメントを切出し、リガーゼを用いてSphIとHindIII部位で開環したHisタグ融合発現ベクター(pGL80L)に組み込んだ。F2/Rプライマー対を用いてコロニーPCRして、大腸菌コロニーNos.2, 8に挿入されていることを確認した。

#### 【0060】

大腸菌コロニーNo.2とNo.8からプラスミドを抽出して、AQP2遺伝子に特異的な2種類の制限酵素を用いて、所定の大きさの核酸断片(SphI-HindIII:664bp, SphI-BamHI:514bp, BamHI-HindIII:340bp)があるかどうかを検定した。その結果、No.8に同一の核酸断片があり、AQP2遺伝子が挿入されていることを確認した。再度、No.8をBeckman-Coulter社のCEQ2000を用いて核酸配列を調べ、配列の置換や欠落のないことを確認した。

20

#### 【0061】

##### (3) Trx融合N端欠損AQP2発現ベクターの構築について

上記(2)で目的のHisタグ融合AQP2発現ベクター(クローン8)を得たが、十分量のAQP2蛋白を発現しなかった。そこで、Hisタグ融合AQP2発現プラスミドNo.8から、ヒトAQP2蛋白のN端部分を欠いたNcoI-BamHIフラグメントを切出し、リガーゼを用いてNcoIとHindIII部位で開環したTrx融合発現ベクター(pET32b)に組み込んだ。F2/Rプライマー対を用いてコロニーPCRして、大腸菌コロニーNos.2, 8に挿入されていることを確認した。

30

#### 【0062】

大腸菌コロニーNo.2とNo.8からプラスミドを抽出して、AQP2遺伝子に特異的な2種類の制限酵素を用いて、所定の大きさの核酸断片(NcoI-HindIII:686bp)があるかどうかを検定した。No.2とNo.8に686bp核酸断片があり、N端部分を欠いたAQP2遺伝子が挿入されていることを確認した。

#### 【0063】

##### (4) 大腸菌でTrx融合N端欠損AQP2蛋白の発現について

Trx融合N端欠損AQP2発現ベクターNo.2とNo.8の配列に間違いがなかったので、各大腸菌を前培養し、100mLのLB培地の中に入れ、IPTG(Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside:b-ガラクトシダーゼの誘導物質でLacプロモーターやtacプロモーターを持つ発現ベクターの発現誘導剤として用いる。)で室温一夜誘導して、Trx融合N端欠損AQP2蛋白を大腸菌体内で産生させた。

40

#### 【0064】

大腸菌は2種類(No.2とNo.8)培養し、IPTG前(誘発前)、IPTG後(誘発後)そして誘発後の大腸菌を可溶化して不溶性画分と可溶性画分に分け、SDS-PAGE/CBB染色とウェスタン用に調整し、検出は市販のヒトAQP2合成ペプチド抗体(抗ヒトAQP2ウサギ血清、PherMingen)を用いた。図3から判るようにIPTG誘発前2)、7)には発現が確認できなかったが、IPTG誘発後3)、8)には、大量のTrx融合N端欠損AQP2蛋白が確認できた。この融合蛋白は大腸菌の可溶性画分5)、10)より不溶性画分4)、9)に存在していることからインクルジョンボディとして存在することが判った。

50

## 【 0 0 6 5 】

以上、ヒトAQP2遺伝子をヒトcDNAからPCR法によりクローニングし、得られたヒトAQP2遺伝子はワイルドタイプと完全に一致することを確認した。さらに、当該ヒトAQP2遺伝子を用いて、ヒトAQP2蛋白のN端の約30アミノ酸を欠損するTrx融合ヒトAQP2蛋白を効率的に発現させることが出来た。

## 【 0 0 6 6 】

以下、このタンパク質を「大腸菌発現Trx/His融合ヒトAQP2蛋白」または「Trx融合ヒトAQP2蛋白」という。

## 【 0 0 6 7 】

参考製造例 2 昆虫細胞Sf-9に発現したHis tag付きヒトAQP2 (hAQP2/His/Sf-9)の製造 (図4(1)参照)

AQP2の5'末端にHisタグ配列を付加したcDNAをDonor Plasmid pFastBac1のマルチクローニングサイトにインサートした(pFastBac1-AQP2)。大腸菌DH10Bac competent cellsをpFastBac1-AQP2でトランスフォーメーションした。Bluo-galおよびIPTG添加agar plate上で白色を示すクローンについて、PCRにてAQP2のBacmidへのインサートを確認した(Recombinant AQP2 Bacmid)。Recombinant AQP2 Bacmidを抽出・精製し、CELLFECTIN (インビトロジェン)を用いてSf-9細胞へTransfectionした。Transfection後、72時間の培養上清液を回収し、Recombinant Baculovirus (rBaculovirus-AQP2)とした。培養上清液中に十分なrBaculovirus-AQP2のTiterが得られるまで、rBaculovirus-AQP2のSf-9細胞への感染・増幅・回収・再感染を繰り返した。Sf-9細胞にrBaculovirus-AQP2を感染させ、2-4日間培養した後、細胞を回収した。細胞をSDS-PAGEし、AQP2抗体を用いたウエスタンブロッティングにより発現を確認した。その結果を、図4(2)に示す。

## 【 0 0 6 8 】

参考製造例 3 ヒトAQP2に対するウサギポリクローナル抗体

参考製造例1で製造したTrx融合ヒトAQP2蛋白を精製して、ウサギ(種/系統: Rabbit/New Zealand White、性別: 雌、体重: 3-3.5kg、入手先: 北山ラベス)に免疫し、ポリクローナル抗体を作製した。

## 【 0 0 6 9 】

(1) 免疫抗原の調製

免疫抗原として、参考製造例1において、ヒトAQP2発現が確認された大腸菌から、Ni-NTA agarose gelで精製したTrx融合ヒトAQP2蛋白(hAQP2/Trx)を使用した。免疫に際して、当該免疫抗原(hAQP2/Trx)をPBS(-)で200 µg/mLになるように調製した。この免疫抗原2.5 mLを、三方活栓で連結した2本のガラスシリンジを用いて等量のComplete Freund adjuvant (DIFCO, Cat No. 263810)と混合し、エマルジョンを作製した。

## 【 0 0 7 0 】

(2) ポリクローナル抗体の調製

(2-1) 免疫

上記で調製した免疫抗原(hAQP2/Trx)を、2週間おきにウサギの背部皮内に1 mL/bodyで多点免疫した。3回目の免疫の1週間後に耳朶より部分採血を行い、下記(2-2)に記載するELISA法で抗体価をチェックした。さらに追加免疫を行い、7回目の免疫の1週間後に頸動脈より全採血を行った。採取した血液を3,000 rpm, 10分間室温で遠心分離し、血清を回収した。この抗血清の抗体価を下記(2-2)に記載するELISA法でチェックし、ウエスタンブロッティングでの反応性を検討した。

## 【 0 0 7 1 】

(2-2) ELISAによる抗体価の測定

PBS(-)で1 µg/mLに調製した免疫抗原(hAQP2/Trx)を96ウエルプレートに100 µL/wellまき、室温で2時間以上静置する。一方、hAQP2/His発現Sf-9細胞(hAQP2/His/Sf-9)(参考製造例2)については、8M Urea/50 mM Tris-HCl (pH8.0)に溶解したhAQP2/His発現Sf-9細胞(hAQP2/His/Sf-9)を10 µL/well、96ウエルプレートにまき、100 µL/wellのPBS(-)を加えて室温で2時間以上静置する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 2 】

プレートから免疫抗原溶液を除去し、0.1% BSA/PBS(-)を400  $\mu$ L/wellまいて室温で1時間以上ブロッキングする(免疫抗原コーティングプレート、hAQP2/His/Sf-9コーティングプレート)。

## 【 0 0 7 3 】

部分採血あるいは全採血した抗血清を0.1% BSA/PBS(-)で1,000倍に希釈し、公比3にて8段階希釈する(希釈系列:1,000倍~2,187,000倍)。対照血清としてNormal Rabbit Serum (NRS)を同様に希釈・調製した(希釈系列:1,000倍~2,187,000倍)。

## 【 0 0 7 4 】

96ウエルプレートからブロッキング溶液を除去し、上記抗血清またはNRSの希釈系列を100  $\mu$ L/well添加し、室温で一晩反応させる。

## 【 0 0 7 5 】

翌日、96ウエルプレートを洗浄液(0.05% Tween-20/0.9% NaCl)で3回洗浄した後、0.05% Tween-20/0.1% BSA/PBS(-)で10,000倍に希釈したHorseradish peroxidase (HRP) -goat anti rabbit IgG (Biosource, Cat. No. ALI3404)を100  $\mu$ L/well添加し、室温で2時間反応させる。次に、プレートを洗浄液で5回洗浄し、基質希釈用溶液(クエン酸一水和物 7 g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 23.89 g/L, 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に1 mg/mLとなるようOPDタブレット(Sigma, Cat. No. P8287)を溶解した発色液を100  $\mu$ L/well添加して、室温で5 - 10分間発色させる。100  $\mu$ L/wellの2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止し、iEMS Reader MF (Lab systems)で492 nmの吸光度を測定する。

## 【 0 0 7 6 】

## (2-3) ウエスタンプロティングでの反応性の検討

免疫抗原(hAQP2/Trx)およびTrx/His control(AQP2部分をPKD2蛋白のC端部743-968に入れ替えたもの、つまりPKD2にTrx/His タグが付加されたもの)を、2-mercaptoethanol添加電気泳動用lysis bufferで10  $\mu$ g/mLに希釈し、100、5分間加熱処理した。この抗原溶液および分子量マーカー(Bio-Rad, Cat. No. 161-0373)を15%アクリルアミドゲルに10  $\mu$ L/wellアプライし、25 mA/gelで電気泳動した。

## 【 0 0 7 7 】

電気泳動終了後、1ゲルはCBB G-250ステイン(Bio-Rad, Cat. No. 161-0786)で染色し、残りのゲルはセミドライプロッターを用いて0.45  $\mu$ mニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad, Cat. No. 162-0115)に200 mA、1時間で転写した。転写後、メンブレンを5% skim milk/50 mM Tris-HCl (pH 8.0)に浸して室温で1時間以上ブロッキングした。各抗血清およびNRSを0.1% BSA/PBS(-)で1,000倍に希釈し、それぞれメンブレンと室温で一晩反応させた。

## 【 0 0 7 8 】

翌日、メンブレンを洗浄液で洗浄し、0.05% Tween-20/0.1% BSA/PBS(-)で3,000倍に希釈したHRP-goat anti rabbit IgG (Biosource, Cat. No. ALI3404)と室温で2時間反応させた。メンブレンを洗浄液で洗浄し、発色液に浸して発色させた。発色液は、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン4.84 g、塩化ナトリウム5.84 g、濃塩酸3.36 mLをH<sub>2</sub>Oに溶解して全量を1 Lとし、用時、この発色液100 mLに0.3% 4-chloro-1-naphtohl/methanol 20 mL、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60  $\mu$ Lを加えて混合した。

## 【 0 0 7 9 】

## (2-4) ポリクローナル抗体調製の結果

図5に、3回免疫後に部分採血を行い、血清の希釈系列(1,000倍 - 2,187,000倍)をhAQP2/TrxあるいはSf-9細胞発現hAQP2(hAQP2/Trx/Sf-9)を固相化した96ウエルプレートを用いてELISAを行った結果を示す。(A)は、免疫抗原(hAQP2/Trx)に対する抗体価を示し、(B)はSf-9細胞発現hAQP2(hAQP2/Trx/Sf-9)に対する抗体価を示す。この結果からわかるように、ウサギへの3回の免疫で、免疫抗原に対する抗体価が十分上昇することが確認された。

## 【 0 0 8 0 】

10

20

30

40

50

また、図6に、7回目の免疫後全採血した後、同様にELISA測定を行った結果を示す。(A)は、免疫抗原(hAQP2/Trx)に対する抗体価を示し、(B)はSf-9細胞発現hAQP2(hAQP2/Trx/Sf-9)に対する抗体価を示す。このとき得られたポリクローナル抗体を、それぞれOPP21401, OPP21402, OPP21403およびOPP21404と命名した。抗血清量はそれぞれ50 mL, 52 mL, 50 mL, および68 mLだった。また、最終的な抗体価をELISAで確認したところ、OPP21403が最も高い抗体価を示した。

【0081】

また、各ポリクローナル抗体について、ウエスタンブロッティング法により各種抗原(hAQP2/Trx, hAQP2/Trx/Sf-9, Trx/His control)との反応性を検討した。具体的には、ニトロセルロースメンブレンにトランスファーした各抗原(hAQP2/Trx, hAQP2/Trx/Sf-9, Trx/His control)と1,000倍希釈した抗血清とを反応させ、4-chloro-1-naphtohl法にて発色させた。結果を図7に示す。これに示すように、何れの抗体(OPP21401, OPP21402, OPP21403およびOPP21404)も、hAQP2/TrxだけでなくhAQP2/His/Sf-9とも反応していた。hAQP2/His/Sf-9との反応は、OPP21403が最も強かった。

【0082】

このことから、上記で得られた4種類のポリクローナル抗体のうち、Sf-9細胞に発現させたhAQP2との反応が最も強かったOPP21403が、生体由来検体からのAQP2検出に適していると思われる。

【0083】

【表1】

抗体名	免疫抗原	免疫動物	形状	反応性		
				hAQP2/Trx	hAQP2/His/Sf-9	Trx/His control
OPP21401	大腸菌発現 Trx/His 融合 ヒト AQP2	ウサギ	血清	+	+	-
OPP21402	大腸菌発現 Trx/His 融合 ヒト AQP2	ウサギ	血清	+	+	-
OPP21403	大腸菌発現 Trx/His 融合 ヒト AQP2	ウサギ	血清	+	+	-
OPP21404	大腸菌発現 Trx/His 融合 ヒト AQP2	ウサギ	血清	+	+	-

参考製造例4 ヒトAQP2に対するマウスモノクローナル抗体

参考製造例1で製造したTrx融合ヒトAQP2蛋白(hAQP2/Trx)を精製して、マウス(種/系統: Mouse/Balb/c、性別: 雌及び雄、入手先: SLC)の腹腔内に免疫し、マウス骨髄腫細胞(細胞株名: P3U1、入手先: ATCC)と細胞融合してモノクローナル抗体を作製した。

【0084】

(1)モノクローナル抗体の調製

(1-1)免疫

参考製造例3(1)で調製した免疫抗原(hAQP2/Trx)1 mLを、2週間おきに3回、マウス(種/系統: Mouse/Balb/c、性別: 雌及び雄、入手先: SLC)10匹の腹腔内に免疫した。細胞融合の3日前に、最終免疫としてアジュバントを使わずに約20 µg/bodyのhAQP2を投与した。

【0085】

(1-2)細胞融合

細胞融合の1週間以上前にマウス骨髄腫細胞(細胞株名: P3U1、入手先: ATCC)を起こし、10% FCS/RPMI1640で培養した。細胞融合の当日、十分なviabilityであることを顕微

鏡下に確認した。

【0086】

上記(1-1)で免疫したマウス(雌性)1匹をエーテル麻酔し、70%エタノールで消毒した後、spleenを無菌的に取り出した。これをはさみで細かくきざみ、約10 mLのRPMI1640中でスチールメッシュを通し、裏漉しした。この懸濁液を15 mLの遠沈管にとり、遠心した後、上清を捨て、沈渣を指でタッピングしてよくほぐした。沈渣に0.747% NH<sub>4</sub>Clを4 mL加え、軽くピペティングして不要な赤血球を溶血させた後、RPMI1640を6-7 mL加えて遠心した。さらにもう一度細胞をRPMI1640で洗浄し、約10 mLのRPMI1640に再浮遊させた。

【0087】

10

一方、50-100 mLのP3U1培養液を50 mLの遠沈管に採り、遠心して細胞を集め、RPMI1640で一度洗浄した後、RPMI1640に再浮遊させた。spleen cellの浮遊液とP3U1の浮遊液を併せて液量を約30 mLにして遠心した。上清を捨て、沈渣を指でタッピングしてよくほぐした。沈渣に50% PEG Solution (Sigma, Cat. No. P7181) 2 mLをよく攪拌しながら30秒かけて加え、さらに30秒間ピペティングした。そのうえに2分かけて5 mLのRPMI1640を加え、さらに5 mLのRPMI1640を加えて3分間、37 °Cで静置した後、遠心した。

【0088】

上清を捨て、細胞を約100 mLのHAT (ICN, Cat. No. 1680849) 添加10% FCS/RPMI1640に再浮遊させ、24ウエル培養用プレート4枚に全量をまいて37 °C, 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>インキュベーター; SANYO, MCO-17A1C) で培養した。なお、遠心条件は全て室温, 1200 rpm, 5分間で行った。

20

【0089】

(1-3) 抗体のスクリーニング

細胞融合の1週間から10日後、形成されたコロニーがプレートの底部から目で確認できるようになった時点で、各ウエルから培養上清の一部を採って抗体のスクリーニングを行った。1stスクリーニングでは培養上清の原液を使用し、2ndスクリーニング以降は培養上清を0.1% BSA/PBS(-)で2.5倍に希釈して使用した。

【0090】

参考製造例3(2)(2-2)に記載する方法と同様にして作製した免疫抗原コーティングプレートおよびhAQP2/His/Sf-9コーティングプレートからブロッキング溶液を除去し、培養上清を100 μL/well添加して室温で一晩反応させた。

30

【0091】

翌日、プレートを洗浄液で3回洗浄した後、0.05% Tween-20/0.1% BSA/PBS(-)で5,000倍に希釈したHRP-goat anti mouse IgG (Bio-Rad, Cat. No. 170-6516) を100 μL/well添加し、室温で2時間反応させた。次に、プレートを洗浄液で5回洗浄し、参考製造例3(2)(2-2)に記載する方法と同様の方法で調製したOPDタブレット溶解発色液を100 μL/well添加して、室温で10-30分間発色させた。100 μL/wellの2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止し、iEMS Reader MF (Lab systems) で492 nmの吸光度を測定した。

【0092】

免疫抗原コーティングプレート、hAQP2/His/Sf-9コーティングプレートともpositiveであるウエルを選び、クローニングを行った。

40

【0093】

(1-4) ハイブリドーマのクローニング

ハイブリドーマのクローニングは限界希釈法で行った。

【0094】

エーテル麻酔した免疫マウス(雄性)を70%エタノールで消毒した後、spleenを無菌的に取り出した。上記(1-2)に記載するspleen cell調製方法と同様に操作して、フィーダー細胞を調製した。マウス1匹分のspleen cellを約40 mLの10% FCS/RPMI1640に再浮遊させ、96ウエル培養プレート4枚に100 μL/wellまいた。上記(1-3)でpositiveであったウエルの細胞を細胞数に応じて段階希釈し、フィーダー細胞をまいた96ウエル培養プレート

50

に100  $\mu$ L/well播種して37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>で培養した。

【0095】

クローニングとスクリーニングを数回繰り返し、スクリーニングがpositiveであり顕微鏡での観察でsingle cloneであるウエルを選択した。このcloneをもう一度限界希釈でクローニングし、次のスクリーニングで、細胞が存在する全てのウエルがpositive、細胞が存在しないウエルがnegativeであることを確認した。このプレートからsingle cloneを選択し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマとした。

【0096】

確立されたハイブリドーマを10% FBS/RPMI1640で段階的に拡大培養し、約50 mLの細胞培養液（ハイブリドーマ培養液）とした。このうち約40 mLを50 mL遠沈管に採り、室温、1200 rpm, 5分間で遠心して細胞（ハイブリドーマ）を回収した。この細胞をセルバンカー（十慈フィールド, Cat. No. BLC-1）3 mLに懸濁し、クライオチューブ3本に1 mLずつ分注して液体窒素中に保存した。遠心後の上清は一部を4  $^{\circ}$ Cで保存し、抗体のタイピングとウエスタンブロッティングに供した。

10

【0097】

（1-5）腹水採取

ELISA測定系を作製するために使用する精製抗体を得るため、上記で取得したハイブリドーマをマウスに投与して、抗体を大量に含む腹水を採取した。

【0098】

具体的には、(3-4)で調製した細胞培養液（ハイブリドーマ培養液）約10 mLを室温、1200 rpm, 5分間で遠心して細胞（ハイブリドーマ）を回収した。PBS(-)で一度洗浄した細胞を1.5 mLのPBS(-)に再浮遊させ、雄性マウス3匹の腹腔内に0.5 mLずつ投与した。マウスは予め、細胞投与の3日以上前に0.5 mL / bodyのプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン; Sigma, Cat. No. T7640）を腹腔内投与しておいた。

20

【0099】

細胞を投与したマウスの腹部が最も大きくなった頃に腹水を採取した。1匹分は無菌的に採り、室温で1200rpm, 5分間遠心して上清を回収した後、フィーダー細胞調製時と同様に、0.747% NH<sub>4</sub>Clで沈渣の赤血球を溶血させた。細胞をRPMI1640で洗浄後、セルバンカー3 mLに懸濁し、クライオチューブ3本に1 mLずつ分注して液体窒素中に保存した。他の2匹分の腹水は室温で3000 rpm, 10分間遠心して上清を回収し、3匹分を併せて4  $^{\circ}$ Cで保存した。

30

【0100】

（1-6）抗体のタイピング

得られた抗体を、抗マウスIg（IgG1, G2a, G2b, G3, M, k鎖, l鎖）（BIONETICS）抗血清を用いてサブクラスおよびL鎖をタイピングした。

【0101】

参考製造例3（2）(2-2)と同様に作製した免疫抗原コーティングプレートからブロッキング溶液を除去し、(1-4)で取得した培養上清を100  $\mu$ L/well添加して室温で一晩反応させた。翌日、プレートを洗浄液で3回洗浄した後、0.1% BSA/PBS(-)でそれぞれ1,000倍に希釈した抗マウスIg（IgG1, G2a, G2b, G3, M, k鎖, l鎖）抗血清を100  $\mu$ Lずつウエルに加えた。室温で2時間反応後、プレートを洗浄液で3回洗浄し、0.05% Tween-20/0.1% BSA/PBS(-)で10,000倍に希釈したHRP-goat anti rabbit IgGを100  $\mu$ L/well添加して室温で2時間反応させた。次に、プレートを洗浄液で5回洗浄し、参考製造例3（2）(2-2)と同様に調製したOPDタブレット溶解発色液を100  $\mu$ L/well添加して、室温で10分間発色させた。100  $\mu$ L/wellの2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止し、iEMS Reader MF (Lab systems)で492 nmの吸光度を測定した。

40

【0102】

最も強く反応したものをこの抗体のサブクラスおよびL鎖とした。

【0103】

（1-7）ウエスタンブロッティングによる抗体の特異性の検討

50

参考製造例 3 ( 2 ) (2-3)と同様にウエスタンブロッティングを行い、ブロッキングしたメンブレンを(1-4)で取得した培養上清と室温で一晩反応させた。翌日、メンブレンを洗浄液で洗浄し、0.05% Tween-20/0.1% BSA/PBS(-)で3,000倍に希釈したHRP-goat anti mouse IgGと室温で2時間反応させた。メンブレンを洗浄液で洗浄し、参考製造例 3 ( 2 ) (2-2)に記載されている方法と同様に発色させた。

【 0 1 0 4 】

( 2 ) モノクローナル抗体調製の結果

以上の操作からhAQP2/Trx免疫マウス10匹から、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ2クローンを確立した。このハイブリドーマをOPH21401およびOPH21402、当該ハイブリドーマから産生される抗体をOPM21401およびOPM21402と命名した。OPM21401、OPM21402ともサブクラスはIgG1, L鎖は chainであった。

【 0 1 0 5 】

これらの抗体の特異性をウエスタンブロッティングで検討したところ、図 8 に示すように、どちらもhAQP2/TrxとhAQP2/His/Sf-9の両方に反応し、Trx/His controlとは反応しなかった。このことから上記で得られた2種類のモノクローナル抗体はヒトAQP2に特異的な抗体であると考えられる。

【 0 1 0 6 】

【表 2】

抗体名	免疫抗原	免疫動物	形状	反応性		
				hAQP2/Trx	hAQP2/His/Sf-9	Trx/His control
OPM21401	大腸菌発現 Trx/His 融合 ヒト AQP2	マウス	腹水	+	+	-
OPM21402	大腸菌発現 Trx/His 融合 ヒト AQP2	マウス	腹水	+	+	-

( 3 ) モノクローナル抗体の精製

上記 ( 1 ) (1-5) で採取したマウス腹水2 mLに対してBinding Buffer (3.3 M NaCl/1.5 M glycine, NaOH 8.5 g/L) 4 mLを加え、室温で2時間放置した後、3,000 rpm, 30分, 4 の条件で遠心し、上清を回収した。この上清を0.45 μmのフィルターで濾過し、予め上記のBinding Buffer で平衡化しておいたProtein-A Sepharoseカラムにアブライした。Binding Bufferでカラムを洗浄後、Elution Buffer (Bio-Rad, Cat. No. 153-6162) で溶出し、直ちに2 M Trisで中和した。溶出液を0.1 M NaHCO<sub>3</sub>に対して透析した後、波長280 nmにおける吸光度を測定して、下記の計算式でIgG濃度を求めた。

【 0 1 0 7 】

$IgG濃度 (mg/mL) = IgG溶液のOD_{280}値 \times 0.714$  。

【 0 1 0 8 】

実験例 1 アクアポリン 2 ( AQP2 ) ELISAの確立

Polycystic kidney disease (PKD) 病態を迅速にモニターするために、そのバイオマーカーの候補蛋白の一つとしてaquaporin 2 (AQP2)を用い、それに対する抗体を用いた測定系 (ELISA) を確立し、実際にPKD病態のモニターが可能であることを検証した。

【 0 1 0 9 】

なお、ELISAには、ヒトAQP2遺伝子をクローニングし、N末端にTrxタグを付加して大腸菌に発現・産生させた「Trx融合AQP2蛋白」(参考製造例 1 参照)をウサギとマウスにそれぞれ免疫して作製したポリクローナル抗体 (抗体名: OPP21403) (参考製造例 3 参照) 及びモノクローナル抗体 (抗体名: OPM21401) (参考製造例 4 参照) を用いた。

【 0 1 1 0 】

またELISAの標準タンパク質として、大腸菌で発現させた「GST融合hAQP2蛋白」を使用

し、コントロールとして、昆虫細胞Sf-9で発現させたHisタグ付きヒトAQP2蛋白「hAQP2-His/Sf-9」（参考製造例2参照）を使用した。

【0111】

（1）ELISA確立のための試験

（1-1）被験試料の処理条件の検討

AQP2は膜に埋もれている膜タンパク質であることから種々の可溶化剤（Urea、Triton X-100、NP-40、Tween-20、塩酸グアニジン、SDS）を用いて、AQP2を膜から可溶化し、かつ測定系に影響のない条件を検討した。

【0112】

具体的には、ヒトAQP2タンパク質が昆虫細胞の膜に埋もれている「hAQP2-His/Sf-9」をPBSに懸濁した液（hAQP2-His/Sf-9懸濁液）を各種の可溶化剤（Urea、Triton X-100、NP-40、Tween-20、塩酸グアニジン、SDS）と等量混合し、さらに、これを10% FBS/0.1% BSA/PBSで10倍希釈してELISAを行い、その発色を波長492 nmにおける吸光度で測定した。

【0113】

結果を図9に示す。

【0114】

この結果からわかるように、可溶化剤として、Ureaや塩酸グアニジンを使用するよりも、界面活性剤であるTriton X-100、NP-40、Tween-20（以上、非イオン性界面活性剤）、またはドデシル硫酸ナトリウム（SDS、陰イオン性界面活性剤）を使用するほうが、膜からAQP2を効率的かつ収率高く可溶化することができることが確認できた。

【0115】

（1-2）ELISA測定系における安定化剤の検討

可溶化した被験タンパク質（AQP2）をELISAにて安定して測定できるように、一次抗体との反応時に使用する1st 緩衝液の検討を行った。

【0116】

具体的には、1st 緩衝液（0.2% BSA / 10 mM EDTA / 0.2M Tris-HCl (pH 8.0)）に添加する安定剤が、ELISA測定系の発色に悪影響を及ぼさないかどうかを、上記1st 緩衝液に各種安定化剤（Urea、Triton X-100、NP-40、Tween-20、塩酸グアニジン、SDS）を各種の濃度（1%濃度に対する希釈率1倍、1/2倍、1/4倍、1/8倍、1/16倍、1/32倍、1/64倍、1/128倍）で添加し、被験タンパク質（AQP2）の波長492 nmにおける吸光度を測定した。

【0117】

なお、被験タンパク質としては、ヒトAQP2タンパク質が昆虫細胞の膜に埋もれているhAQP2/Sf-9の懸濁液を、前述する可溶化剤SDSで完全に可溶化し、これを0.1% BSA/PBSでSDSの影響のない2,000倍まで希釈したものを使用した。

【0118】

結果を図10に示す。図10に示すように、1st 緩衝液に添加する安定化剤として、Triton X-100、NP-40、及びTween-20等の非イオン性界面活性剤は0.063%（希釈率 1/16）以上の濃度で測定感度を上昇させたが、Urea、塩酸グアニジン、及びSDSは発色を低下させた。以上のことより、1st 緩衝液に添加する安定化剤として1% Triton X-100が好ましいこと、つまり、ELISA測定に使用する1st 緩衝液として、0.2% BSA / 10 mM EDTA / 2% Triton X-100 / 0.2M Tris-HCl (pH 8.0)が好ましいと判断された。

【0119】

（1-3）サンドイッチELISAによるヒトAQP2測定系

後述の（1-4）～（1-6）において、ELISAの標準タンパク質の検討、被験試料の検討、ウエスタンブロット法との比較検討をするにあたり、下記のELISA測定系を使用した。

【0120】

<ヒトAQP2のELISA測定系>

0.1 M NaHCO<sub>3</sub>で5 μg/mL濃度になるように調製したモノクローナル抗体（第一抗体；OPM21403）を、96ウエルマイクロプレート（NUNC）の各ウエルに100 μL加え、蓋をして室温で2時間放置する。第一抗体溶液をプレートから除去し、ブロッキング溶液（0.1% BSA/

10

20

30

40

50

PBS(-))を400  $\mu\text{L}$ /well撒いて室温で1時間以上ブロッキングする。次いで、ブロッキング溶液を、第一抗体を固相化したプレートから除去し、各ウエルに100  $\mu\text{L}$ の1st 緩衝液(0.2% BSA/2% Triton(登録商標)X-100/10 mM EDTA/200 mM Tris-HCl (pH8.0))を加えた後、0.1% BSA/PBS(-)で各濃度に調製した標準タンパク質または被験試料を50  $\mu\text{L}$ 加え、シールで密封して室温で一晩振盪する。

#### 【0121】

翌日、プレートを洗浄液(0.05% Tween-20/0.9% NaCl)で3回洗浄した後、10% porcine serum/0.05% Tween-20/0.1 M Tris-HCl (pH8.0)で5000倍に希釈したポリクローナル抗体(第二抗体; OPP21403)を各ウエルに100  $\mu\text{L}$ 加え、蓋をして室温で振盪する。2時間反応後、洗浄液でプレートを3回洗浄した後、0.05% Tween-20/0.1% BSA/PBS(-)で10,000倍に希釈したHorseradish peroxidase (HRP) -goat anti rabbit IgG (Biosource, Cat. No. ALI3404)をプレートの各ウエルに100  $\mu\text{L}$ 加え、蓋をして室温で振盪する。2時間後、洗浄液でプレートを5回洗浄した後、TMB発色液(ScyTek, Cat. No. TM4999)を各ウエルに100  $\mu\text{L}$ 加え、室温で発色させる。10分後、プレートの各ウエルにTMB Stop Buffer(ScyTek, Cat. No. TSB999)を100  $\mu\text{L}$ 加え、反応を停止させる。プレートの底面の汚れや水分を柔らかなペーパータオルできれいにふき取った後、各ウエルの波長450 nmにおける吸光度をマイクロプレート用吸光度計(iEMS Reader MF, LABSYSTEMS)で測定する。

10

#### 【0122】

標準タンパク質の吸光度の値から、標準曲線を作成し、また当該標準曲線から被験試料中に含まれるAQP2の濃度を求める。

20

#### 【0123】

##### (1-4) 標準タンパク質の検討

標準タンパク質として、大腸菌由来のAQP2と昆虫細胞由来のAQP2のどちらがELISA測定の標準タンパク質として適切かどうかを、上記(1-3)のELISA測定系を用いて評価した。なお、大腸菌由来のAQP2として、参考製造例1に記載する方法で製造した「Trx融合AQP2蛋白」を使用し、また昆虫細胞由来のAQP2として参考製造例2に記載する方法で製造した「AQP2-His/Sf9」を可溶化剤で可溶化した可溶化物を使用した。

#### 【0124】

標準タンパク質として上記の各タンパク質を使用して上記(1-3)に記載するELISA測定を行い、標準曲線を作成した結果を図11に示す。図11に示すように、標準タンパク質として、「Trx融合AQP2蛋白」を使用した場合も、また「AQP2/Sf9」の可溶化物を使用した場合も、いずれも濃度(量)依存的に測定吸光度と相関関係が認められ、両曲線は並行になることから、いずれのタンパク質も、ヒトAQP2のELISA測定の標準タンパク質として使用できることが判明した。

30

#### 【0125】

##### (1-5) 被験試料の検討

被験試料として、健常人ボランティアの尿試料4検体(No.4,5,6,及び9)を段階的に希釈したものを使用し、上記(1-3)に記載するELISA測定を行った。その結果を、標準タンパク質として「Trx融合AQP2蛋白」を使用して作成した標準曲線と一緒にプロットした結果を、図12に示す。

40

#### 【0126】

図12に示すように、被験試料として使用した尿は、4検体とも希釈倍率と測定吸光度との間に標準曲線と同様の相関関係が認められた。このことから、尿を被験試料とすることで当該尿中に含まれるAQP2が上記ELISA測定系により検出並びに定量可能であることが確認できた。また、健常人ボランティア10名の尿について、同様にヒトAQP2の測定を行ったところ、尿中のヒトAQP2濃度は0.93-8.84ng/mLの範囲であった。また、上記ELISA測定系における検出限界は0.01ng/mLであることが確認された。

#### 【0127】

なお、図13の(A)に、健常人ボランティア10名の尿について、ヒトAQP2に対するモノクローナル抗体(OPM21401)(参考製造例3)を用いて、ウエスタンブロッティングに

50

より尿中のヒトAQP2量を測定した結果を示す。また、図13の(B)に、同じ健常人ボランティア10名の尿について、上記ELISA測定系で測定した尿中のヒトAQP2量を示す。これらの結果から、本発明のELISA測定系で測定された尿中のヒトAQP2量は、ウエスタンブロッティング結果とほぼ相関していることが確認された。なお、ウエスタンブロッティングの結果から、ヒト由来のAQP2には、糖鎖が付加されたAQP2と糖鎖が付加されていないAQP2が存在していることが判明した。

【0128】

#### (2) AQP2 ELISAのプロトコール

以上の検討から、各のプロトコールを有するAQP2 ELISA法を確立した。

1. 抗AQP2抗体(モノクローナル抗体:OPM21401)を5 $\mu$ g/mLになるように0.1M NaHCO<sub>3</sub>で希釈し、各ウエルに100 $\mu$ Lずつ分注して、室温で2時間以上放置する。 10
2. ウエルから抗AQP2抗体溶液を除き、350 $\mu$ LのBlocking溶液(0.1% BSA/PBS(-))を加え、使用時まで4 で保管する。
3. 抗体固相化プレートのBlocking溶液を除き、1<sup>s</sup>Buffer(0.2% BSA / 10 mM EDTA / 2% Triton X-100 / 0.2M Tris-HCl (pH 8.0))を各ウエルに100 $\mu$ L加える。 4. 8段階(0、0.01、0.04、0.12、0.37、1.1、3.3、10ng/ml)のヒトAQP2標準品と、測定する被験試料(好ましくは尿)を所定のウエルにそれぞれ50 $\mu$ l加え、室温で2時間以上、室温でプレートを振とうさせる。
5. プレートを洗浄し、各ウエルに抗AQP2抗体(ポリクローナル抗体:OPP21403)溶液(5000倍希釈)を100 $\mu$ l加え、室温で2時間振とうさせる。 20
6. プレートを洗浄し、各ウエルにHRP標識抗ウサギIgGを1万倍に希釈した溶液を100 $\mu$ l加え、室温で2時間反応させる。
7. プレートを洗浄し、各ウエルにTMB溶液を100 $\mu$ l加え、10分間反応させた後、2N硫酸を加えて停止させる。
8. 吸光度計でOD450の値を求め、ヒトAQP2標準品により作成した標準検量線(図14参照)から、被験試料中のAQP2濃度を求める。

【0129】

#### 実験例2 被験試料の前処理条件の検討(1)

実験例1で確立したヒトAQP2蛋白の免疫学的測定法(ELISA法)に供する被験試料の前処理条件を検討するために、被験試料として尿を使用して下記の実験を行った。なお、尿は、健常人ボランティア1名から採取した新鮮尿を使用した。 30

【0130】

#### (1) 1st試験とその結果

新鮮尿を、10mL容量のチューブ5本に、5mlずつ分注し、それぞれ37、23、4、-30、及び-80の条件下(暗所)で、24時間、保存した。保存後、各試料を室温条件下に放置して室温に戻した。

【0131】

これを被験試料として、実験例1で確立したAQP2 ELISA法を行い、尿中のヒトAQP2の量を測定した。またコントロールとして、上記新鮮尿の一部を用いて、保存することなく採取後速やかに、上記AQP2 ELISA法を行い、尿中のヒトAQP2の量を測定した。 40

【0132】

上記対照試料について得られたヒトAQP2の量を100として、各保存試料について得られたヒトAQP2の量の相対比を求めた。

【0133】

その結果、図15に示すように、37、23、4、及び-80の条件下(暗所)で保存した尿中のヒトAQP2量は、対照試料中のヒトAQP2量と比べて著しく低下していたのに対して、-30で保存していた尿中のヒトAQP2量は、対照試料中のヒトAQP2量と同一であり、量の低下は全く認められなかった。

【0134】

#### (2) 2nd試験とその結果

1st試験で、37、23、4、-30及び-80の条件下(暗所)で保存し、室温に戻した各尿試料を、それぞれ3本のチューブに分け、これをそれぞれ4、-30、及び-80の条件下(暗所)で、24時間、保存した。保存後、各試料を室温条件下に放置して室温に戻した。

【0135】

これを被験試料として、上記と同様にして尿中のヒトAQP2の量を測定し、1st試験で-30で保存した被験試料から得られたヒトAQP2の量を100として、保存試料について得られたヒトAQP2の量の相対比を求めた。

【0136】

その結果、図15に示すように、1st試験で-30で保存した被験試料は、2nd試験で-30で保存しても、また-30以外の温度条件(4、-80)で保存しても、尿中のヒトAQP2量の変化は殆ど見られず一定であった。また、1st試験で-30以外の温度条件(37、23、4、-80)で保存した被験試料であっても、2nd試験で-30で保存すると、尿中のヒトAQP2量のほぼ100となり、一度、-30で保存することがAQP2測定に重要なことがわかった。

10

【0137】

(3) 3rd試験、4th試験及び5th試験とそれらの結果

2nd試験で、4の条件下(暗所)で保存し、室温に戻した各尿試料を、それぞれ3本のチューブに分け、これを再び4の条件下(暗所)で、24時間、保存した。保存後、各試料を室温条件下に放置して室温に戻した。次いで、各試料から一部を取り出した(3nd試験)。また、同様にして、4th試験、及び5th試験を行った。

20

【0138】

これらの試験後(3nd試験、4th試験、5th試験)の尿試料を被験試料として、上記と同様にして尿中のヒトAQP2の量を測定し、1st試験で-30で保存した被験試料から得られたヒトAQP2の量を100として、上記被験試料について得られたヒトAQP2の量の相対比を求めた。

【0139】

その結果、図15に示すように、保存条件が37、23、4、-80であればAQP2値は相対比5以下で、AQP2が検出できず、-30の条件を1回でも処置するとAQP2は検出できるようになる。1st試験で-30で保存した被験試料は、2nd試験~5th試験の期間中、-30で保存しても、また-30以外の温度条件(4、-80)で保存しても、尿中のヒトAQP2量の低下は殆ど見られず、安定していた。また、1st試験や2nd試験で-30以外の温度条件(37、23、4、-80)で保存した被験試料であっても、2nd試験以後または3th試験以後に、-30で保存すると、尿中のヒトAQP2量の低下が顕著に抑制できることが確認された。

30

【0140】

これらの結果は、被験試料、特に尿をヒトAQP2蛋白の免疫学的測定法(ELISA法)に供する場合、少なくとも1回は当該被験試料を-80よりも高い温度条件、具体的には-70~0の温度条件、特に-30またはその付近(-35~-15)の温度に凍結する処置を施すことで、ヒトAQP2を高い収率で精度高く測定することができることを示している。

40

【0141】

実験例3 被験試料の前処理条件の検討(その2)

実験例1で確立したヒトAQP2蛋白の免疫学的測定法(ELISA法)に供する被験試料の前処理条件を検討するために、被験試料として尿を使用して下記の実験を行った。なお、尿は、健常人ボランティアから採取した新鮮尿を使用した。

【0142】

健常人ボランティアから採取した新鮮尿を、7本のエッペンドルフチューブに0.5mLずつ分注し、-20±5の温度条件下(暗所)で、それぞれ1日、3日、7日、15日、21日、28日、56日間、凍結保存した。保存後、各試料を室温条件下に放置して室温に戻し、これを被験試料として、実験例1で確立したAQP2 ELISA法を行い、尿中のヒトAQP2蛋白の量を測

50

定した。

【0143】

結果を図16に示す。図16に示すように、 $-20 \pm 5$  の温度条件下で3日、7日、15日、21日、28日、56日間、凍結保存していた尿中のヒトAQP2量は、いずれもELISA法で測定することができた。またその測定値は、尿（生体試料）を2週間程度の一定期間以上凍結状態に置くことで、一定の値となり安定することが確認された。これらの結果は、被験試料、特に尿をヒトAQP2蛋白の免疫学的測定（ELISA法）に供する場合、当該生体試料を2週間程度以上凍結状態に曝しておくことで、生体試料中のヒトAQP2蛋白を精度高く定量的に測定することができることを示している。

【0144】

上記の結果をもとに、凍結期間を2週間に設定し、凍結温度（ $-80$ 、 $-30$ 、 $-28$ 、 $-26$ 、 $-20$ 、 $4$ ）の影響を調べた。

具体的には、健常人ボランティア2名から採取した新鮮尿（Nos.1及び2）を、それぞれ6本のエッペンドルフチューブに0.5mLずつ分注し、それぞれ $-80$ 、 $-30$ 、 $-28$ 、 $-26$ 、 $-20$ 、 $4$ の条件下（暗所）で、2週間保存した。保存後、各試料を室温条件下に放置して室温に戻した。これを被験試料として、実験例1で確立したAQP2 ELISA法を行い、尿中のヒトAQP2蛋白の量を測定した。

【0145】

結果を図17に示す。図17に示すように、 $-80$ 及び $4$ の条件下（暗所）で2週間保存した尿中のAQP2量は、測定限界以下であったのに対して、 $-30$ 、 $-28$ 、 $-26$ 、及び $-20$ の条件下（暗所）で2週間保存した尿中のAQP2量は、いずれもELISA法で測定することができた。

【0146】

これらの結果から、尿をヒトAQP2蛋白の免疫学的測定（ELISA法）に供する場合の尿の凍結処理条件として、凍結期間を2週間程度以上に設定し、且つ凍結温度を $-30 \sim -20$ 程度に設定することで、尿中のヒトAQP2蛋白の量を高い収率で精度良く測定することができることが確認された。

【配列表フリーテキスト】

【0147】

配列番号2及び3は、ヒトAQP2遺伝子N端部分（hAQP2/前半部分、hAQP2N）をPCRで増幅するために使用したForwardプライマー（hAQP2N-F）及びReverseプライマー（hAQP2N-R）の塩基配列である。配列番号4及び5は、ヒトAQP2遺伝子C端部分（hAQP2/後半部分、hAQP2C）をPCRで増幅するために使用したForwardプライマー（hAQP2C-F）及びReverseプライマー（hAQP2C-R）の塩基配列である。

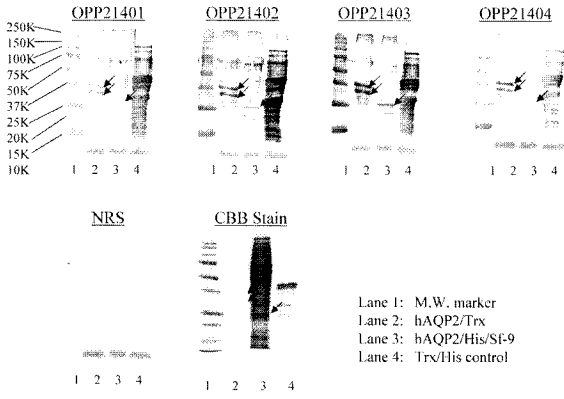
10

20

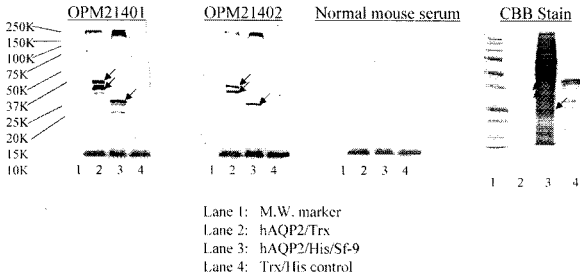
30



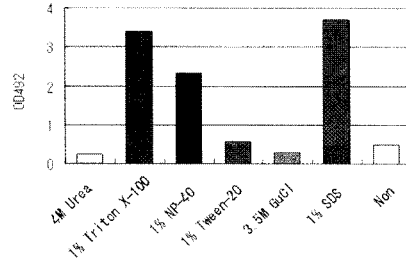
【 図 7 】



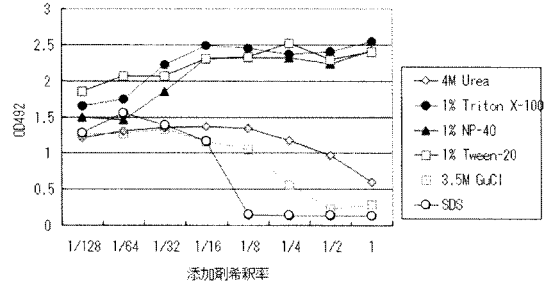
【 図 8 】



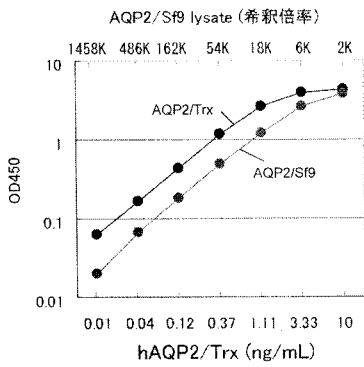
【 図 9 】



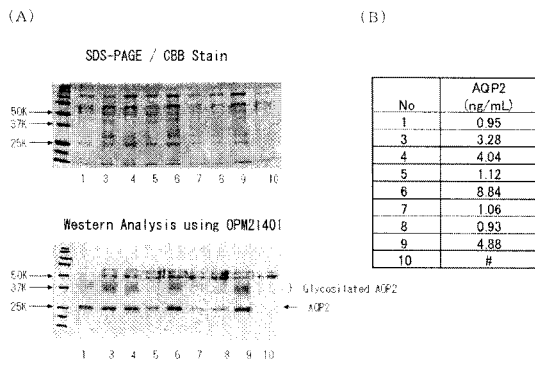
【 図 10 】



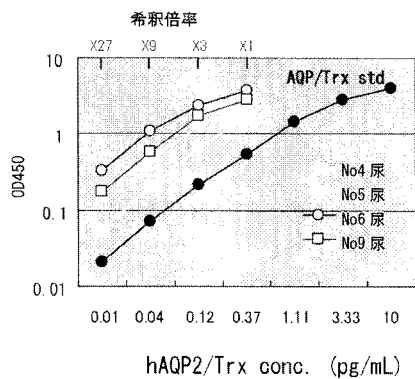
【 図 11 】



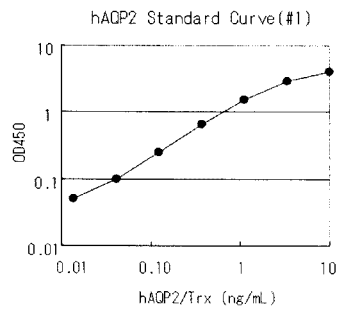
【 図 13 】



【 図 12 】



【 図 14 】



【 図 1 5 】

1st		2nd		3rd		4th		5th	
保存温度		4°C保管		4°C保管		4°C保管		4°C保管	
A	A: 37°C 5>	A	1.0		8.0		6.5		10.4
B	B: 23°C 5>	B	0.7		1.1		1.2		2.5
C	C: 4°C 5>	C	0.7		1.4		0.0		1.4
D	D: -30°C 100	D	100		100		100		100
E	E: -80°C 5>	E	4.3		5.6		3.6		5.5

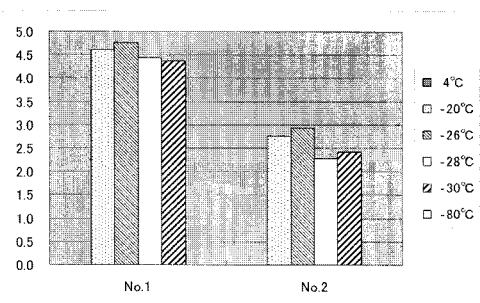
  

-30°C保管		-30°C保管		-30°C保管		-30°C保管	
A	103.5	A	100.8	A	104.3	A	80.6
B	88.6	B	95.1	B	119.0	B	94.6
C	78.2	C	91.7	C	95.3	C	82.8
D	99.6	D	103.6	D	90.3	D	82.2
E	72.8	E	91.7	E	92.1	E	85.7

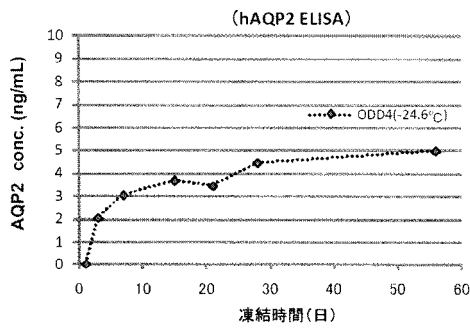
  

-80°C保管		-30°C保管		-30°C保管		-30°C保管	
A	9.4	A	100.4	A	108.6	A	90.9
B	0.9	B	97.5	B	113.8	B	101.0
C	1.9	C	97.2	C	106.8	C	100.4
D	90.6	D	102.3	D	114.8	D	104.9
E	3.9	E	100.7	E	103.9	E	86.0

【 図 1 7 】



【 図 1 6 】



【 配列表 】

2013022107000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/070570
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/543(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, G01N1/28, G01N33/48, G01N33/53  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-178924 A (Tokuyama Corp.), 12 July 1996 (12.07.1996), abstract (Family: none)	1-13
Y	JP 7-267987 A (Behringwerke AG.), 17 October 1995 (17.10.1995), claims & US 6160097 A & EP 670331 A1 & DE 4407386 A & DE 59510818 D & AU 1361095 A & CA 2143898 A & AT 253592 T & ES 2204924 T & AU 696191 B	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 August, 2012 (27.08.12)		Date of mailing of the international search report 04 September, 2012 (04.09.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/070570

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-60600 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 02 March 1999 (02.03.1999), abstract; paragraphs [0026], [0027] (Family: none)	1-13
Y	WO 2005/093415 A1 (Shibayagi Co., Ltd.), 06 October 2005 (06.10.2005), page 4, lines 11 to 23 & US 2007/0207505 A1 & EP 1744159 A1 & CN 1957255 A	1-13
Y	JP 2005-539228 A (Syn.x Pharma, Inc.), 22 December 2005 (22.12.2005), paragraph [0066] & US 2003/0064416 A1 & US 2002/0160425 A1 & US 6451547 B1 & GB 2380546 A & EP 1540349 A & EP 1381866 A & EP 1467212 A1 & WO 2004/027429 A1 & WO 2002/088706 A2 & DE 60200615 D & DE 60200615 T & CA 2498881 A & NZ 538669 A & AU 2003266881 A & NO 20034786 A	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 0 5 7 0									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543, G01N1/28, G01N33/48, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	JP 8-178924 A (株式会社トクヤマ) 1996.07.12, 【要約】 (ファミリーなし)	1-13									
Y	JP 7-267987 A (ベーリングヴェルケ・アクチエンゲゼルシャフト) 1995.10.17, 【特許請求の範囲】 & US 6160097 A & EP 670331 A1 & DE 4407386 A & DE 59510818 D & AU 1361095 A & CA 2143898 A & AT 253592 T & ES 2204924 T & AU 696191 B	1-13									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 27.08.2012		国際調査報告の発送日 04.09.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 隆	2 J 3 3 1 2								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 0 5 7 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 11-60600 A (栄研化学株式会社) 1999.03.02, 【要約】【0026】【0027】 (ファミリーなし)	1-13
Y	WO 2005/093415 A1 (株式会社シバヤギ) 2005.10.06, 4ページ11行～23行 & US 2007/0207505 A1 & EP 1744159 A1 & CN 1957255 A	1-13
Y	JP 2005-539228 A (シン. クス ファーマ、インコーポレイテッド) 2005.12.22, 【0066】 & US 2003/0064416 A1 & US 2002/0160425 A1 & US 6451547 B1 & GB 2380546 A & EP 1540349 A & EP 1381866 A & EP 1467212 A1 & WO 2004/027429 A1 & WO 2002/088706 A2 & DE 60200615 D & DE 60200615 T & CA 2498881 A & NZ 538669 A & AU 2003266881 A & NO 20034786 A	1-13

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 森 豊樹

大阪府大阪市中央区道修町 1 - 7 - 1 大塚製薬株式会社内

(72)発明者 岩田 房子

大阪府大阪市中央区道修町 1 - 7 - 1 大塚製薬株式会社内

(72)発明者 村口 正宏

大阪府大阪市中央区道修町 1 - 7 - 1 大塚製薬株式会社内

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	含有蛋白质的生物样品的预处理方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2013022107A1</a>	公开(公告)日	2015-03-05
申请号	JP2013528089	申请日	2012-08-10
申请(专利权)人(译)	大塚制药有限公司 国立大学法人东京医科齿科大学		
[标]发明人	佐々木成 大本安一 森豊樹 岩田房子 村口正宏		
发明人	佐々木 成 大本 安一 森 豊樹 岩田 房子 村口 正宏		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N1/42 G01N33/6872		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/53.D G01N33/543.545.A		
优先权	2011176272 2011-08-11 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种在生物样品中所含蛋白质的免疫测定中对生物样品进行预处理的方法。该方法包括以下步骤：(1)在高于-80°C，特别是在-70°C或更高的温度下冷冻生物样品；(2)解冻冷冻的生物样品；(3)使用表面活性剂增溶生物样品。

(19) 日本国特許庁(JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2013/022107
発行日 平成27年3月5日(2015.3.5)	(43) 国際公開日 平成25年2月14日(2013.2.14)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531 B	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)		
出願番号 特願2013-528089(P2013-528089)	(71) 出願人 000206956	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/070570	大塚製薬株式会社	
(22) 国際出願日 平成24年8月10日(2012.8.10)	東京都千代田区神田司町2丁目9番地	
(31) 優先権主張番号 特願2011-176272(P2011-176272)	(71) 出願人 504179255	
(32) 優先日 平成23年8月11日(2011.8.11)	国立大学法人 東京医科歯科大学	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	東京都文京区湯島1-5-4 5	
	(74) 代理人 110000796	
	特許業務法人三枝国際特許事務所	
	(72) 発明者 佐々木 成	
	東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立	
	大学法人東京医科歯科大学内	
	(72) 発明者 大本 安一	
	大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大	
	塚製薬株式会社内	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 タンパク質を含む生体試料の前処理方法