

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-59477
(P2004-59477A)

(43) 公開日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/36	C07K 16/36	4B064
C12P 21/08	C12P 21/08	4H045
G01N 33/53	G01N 33/53	D
G01N 33/577	G01N 33/53	V
	G01N 33/577	B
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)		

(21) 出願番号	特願2002-218755 (P2002-218755)	(71) 出願人	000224123 藤倉化成株式会社 東京都板橋区蓮根三丁目20番7号
(22) 出願日	平成14年7月26日(2002.7.26)	(71) 出願人	598143169 株式会社ユーエムエー 静岡県沼津市大岡2297-6
		(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100108578 弁理士 高橋 詔男
		(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100101465 弁理士 青山 正和
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 非グリコシル化ヘモグロビン、グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体、その製造方法、並びにそれを用いた非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロ

(57) 【要約】

【課題】本発明は、非グリコシル化ヘモグロビン、グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体、その製造方法、並びにそれを用いた非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明の非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法は、免疫原としてヒト非グリコシル化ヘモグロビン、アジュバントとしてポリリジンを用いる。本発明のグリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法は、免疫原としてヒトグリコシル化ヘモグロビン、アジュバントとしてポリバリンを用いる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫原としてヒト非グリコシル化ヘモグロビン、アジュバントとしてポリリジンを用いることを特徴とする非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 2】

免疫原としてヒトグリコシル化ヘモグロビン、アジュバントとしてポリバリンを用いることを特徴とするグリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の製造方法により得られる非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 4】

請求項 2 記載の製造方法により得られるグリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 5】

1 つの試料中に含有される非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンを測定する方法であって、

前記試料と請求項 4 に記載のモノクローナル抗体を含有する抗体試薬 (i) とを接触させ、試料中のグリコシル化ヘモグロビンへの抗体試薬 (i) の結合量を測定する第 1 の測定工程と、

更に、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体を含有する抗体試薬 (i i) を接触させ、試料中の非グリコシル化ヘモグロビンへの抗体試薬 (i i) の結合量を測定する第 2 の測定工程とを有することを特徴とする非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、非グリコシル化ヘモグロビン、グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体、その製造方法、並びにそれを用いた非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法に関する。

【0002】**【従来技術】**

赤血球中に局在するヘモグロビンは、2本の鎖と2本の鎖からなり、酸素及び二酸化炭素の運搬を担っている。このヘモグロビンは、健康な成人の血液中において、その90%以上が非グリコシル化ヘモグロビン (H b A₀) として示される形態で存在する。これに対し、全ヘモグロビン中3~6%の範囲で、グルコースとの非酵素的反応により生じるグリコシル化ヘモグロビンが存在する (グリコシル化ヘモグロビンを H b A₁ と呼び、これらの群の最も重要なものを H b A_{1c} と呼ぶ) 。赤血球及び H b A₁ は、平均して120日間生存する。また、血中での H b A₁ 量は、血液の糖濃度に依存するものの、炭水化物の富んだ食事後の短時間の血糖値上昇には依存しないため、長時間における血糖値の変化の指標となり、特に糖尿病患者に重要である炭水化物代謝をコントロールするための良好なパラメーターを提供する。

従って、血中の H b A_{1c} 濃度を測定し、全ヘモグロビンに対する H b A_{1c} の割合を把握することは、糖尿病の診断や、病状の程度を知る手段として有効であるといえる。

【0003】

ところで、特定のタンパク質を検出する方法として、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー等による測定方法がある。しかしながら、これらの方法は、試料の調製が煩雑であるため、時間と労力がかかり作業性に問題がある。さらに、これらの機器は高価であるため、新たに機器を購入する場合、経済的負担もかかる。

10

20

30

40

50

【0004】

また、上記以外の方法として、抗原抗体反応を利用して特定のタンパク質を定量する方法がある。このような測定方法では、特定のタンパク質に特異的に結合する抗体の取得が非常に重要であり、より特異的な抗体を使用すれば、感度が良好で、精度の高い測定を実施することができる。例えば、特許第2540362号公報には、合成した免疫原を用いて、HbA_{1c}に対して高い特異性を有する抗体の取得法が記載されている。

【0005】

また、特公平7-23891号公報には、特定のタンパク質に特異的に結合する抗体試薬を接触させる前に、前記タンパク質を変性してタンパク質中の線状ペプチドエピトープを露出、あるいは露出を増加することによって、特異的な抗原抗体反応を高感度に検出する方法が記載されている。

10

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特許第2540362号公報に記載されている免疫原及び抗体の取得法では免疫原を合成する過程が必要であり、特公平7-23891号公報に記載されている免疫アッセイでは、タンパク質を変性させる前処理が必要であり、上述した方法はいずれも煩雑な工程を含んでいる。従って、安価で、より簡便に得られる特異的な抗体、その製造方法、及びそれを利用した非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法の開発が要求されていた。

【0007】

20

【課題を解決するための手段】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、本発明者らは、非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法において、ポリリジンのアジュバントとして用いること、グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法において、アジュバントとしてポリバリンを用いることによって、天然抗原を用いた場合でも、特異性の高いモノクローナル抗体を簡便に得ることができ、それらを用いて非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの定量が容易に行えることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明の非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法は、免疫原としてヒト非グリコシル化ヘモグロビン、アジュバントとしてポリリジンを用いることを特徴とする。

30

本発明のグリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法は、免疫原としてヒトグリコシル化ヘモグロビン、アジュバントとしてポリバリンを用いることを特徴とする。

本発明の非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体は上記製造方法により得られることを特徴とする。

本発明のグリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体は、上記製造方法により得られることを特徴とする。

本発明の非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法は、1つの試料中に含有される非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンを連続的に測定する方法であって、前記試料と上記グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体を含有する抗体試薬(i)とを接触させ、試料中のグリコシル化ヘモグロビンへの抗体試薬(i)の結合量を測定する第1の測定工程と、更に、上記非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体を含有する抗体試薬(ii)を接触させ、試料中の非グリコシル化ヘモグロビンへの抗体試薬(ii)の結合量を測定する第2の測定工程とを有することを特徴とする。

40

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明のモノクローナル抗体は、非グリコシル化ヘモグロビン又はグリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するものであって、非グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合する

50

モノクローナル抗体（以下、 $Anti-HbA_0$ と略す）、およびグリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体（以下、 $Anti-HbA_{1c}$ と略す）は、特定のアジュバントを用いることにより簡便に得られる。なお、本明細書において、非グリコシル化ヘモグロビンとグリコシル化ヘモグロビンとを合わせてヘモグロビンという。

【0009】

このようなモノクローナル抗体（ $Anti-HbA_0$ 及び $Anti-HbA_{1c}$ ）は、後段で述べる免疫原及びアジュバントを用い、公知の方法で動物を免疫した後、当該分野で公知、あるいはそれと類似の方法で得ることができ、例えばミルシュタインらの方法（Nature, 256; 495-497, 1975）により製造することができる。以下、免疫原の入手及び製造方法、アジュバントの使用、免疫方法、ミエローマ細胞の準備調製、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合、ハイブリドーマ（融合細胞）の選択方及びモノクローン化、モノクローナル抗体の製造方法について順次説明する。

10

【0010】

免疫原の入手

本発明に用いられる免疫原としては、ヒト赤血球から精製されたヒト非グリコシル化ヘモグロビン、またはヒトグリコシル化ヘモグロビンの天然抗原や、特許第2540362号公報等に記載の合成ペプチドや、リコンビナントの非グリコシル化ヘモグロビン、リコンビナントのヒトグリコシル化ヘモグロビンを用いることができる。これらの中でも、安価で、簡便に入手できることから、天然抗原を用いることが好ましい。

上記天然抗原の精製方法としては、例えば、“PURIFICATION OF GLYCATED HEMOGLOBIN FREE OF HEMOGLOBIN A_{1c} AND ITS USE TO PRODUCE MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR DEOXYFRUCTOSYLLSINE RESIDUES IN GLYCOHEMOGLOBIN”, Biochemical And Biophysical Research Communications 207-212, Vol. 176, No 1, 1991に記載されているように、アフィニティカラムを用いて行うことができる。

20

【0011】

アジュバントの使用

本発明において、 $Anti-HbA_0$ 、 $Anti-HbA_{1c}$ を製造する際に、免疫原と共に特定のアジュバントを用いることを特徴とする。即ち、 $Anti-HbA_0$ を製造する際には、アジュバントとして分子量3000~50000程度のポリリジンを用い、 $Anti-HbA_{1c}$ を製造する際には、アジュバントとして分子量2000~70000程度のポリバリンを用いる。

30

このように、本発明の $Anti-HbA_0$ 及び $Anti-HbA_{1c}$ は、上記免疫原と共に特定のアジュバントを用いて製造されるため、従来、特異性の高い抗体を得ることが困難であった天然抗原（免疫原）を用いた場合でも、特異性の高いモノクローナル抗体を簡便に製造することができる。

【0012】

免疫方法

動物を免疫するには、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。

40

免疫は、例えばBALB/cなどのマウスをはじめとする動物を使用して行われる。抗原（免疫原）の投与量は、例えばマウスに対して約1~400 μ g/個体で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間おきに、腹腔内、皮下、静脈内、あるいは筋肉内に追加免疫を2~10回程度反復して行う。また、必要に応じて、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認することができる。

50

なお、免疫用のマウスとしては、BALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることができる。

【0013】

ミエローム細胞の準備調製

細胞融合前に、まず使用されるミエローム細胞の調製をする必要がある。細胞融合に使用される無限増殖可能株（腫瘍細胞株）としては、免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、好ましくはマウスミエロームMOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Current topics in Microbiol. and Immunol., 81, 1-7, 1978) 以外の細胞株、例えばSP2/0-Ag14 (SP2, Nature, 276, 269-270, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256, 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979)、PAI、PAI-0などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローム細胞株はダルベッコMEM培地 (DMEM培地)、RPMI-1640培地などの通常当該分野で知られた細胞培地に、例えばペニシリン、ストレプトマイシン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清 (FCS) などを加え、さらに8-アザグアニン (例えば5~45 µg/ml) を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2~5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また、使用細胞株は、凍結保存株を約37°Cで完全に解凍したのち、RPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

10

20

【0014】

抗体産生細胞とミエローム細胞との細胞融合

上記の免疫方法に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2~5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。

こうして得られた脾細胞懸濁液と、上記の工程に従い用意されたミエローム細胞株を、例えば最小必須培地 (MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを0.5~2ml加えることができ、分子量が1,000~8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000~4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30~60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、このようなものとしては不活性化したセンダイウイルス (HVJ: Hemagglutinating virus of Japan) なども挙げられる。融合に使用する脾細胞 (リンパ球): ミエローム細胞株の割合は、例えば1:1~20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1~7:1とすることができる。融合反応を1~10分間行い、次いで、RPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後、選択用培地に移す。

30

40

【0015】

ハイブリドーマ (融合細胞) の選択方法、モノクローン化

こうして得られたハイブリドーマ (融合細胞) は目的のものが選択され、そしてさらにクローン化される。選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と当容量を翌日加え、その後1~3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというようにすることができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また、融合後8~16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1~4日ごとに培地交換をすることができ

50

る。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。

ハイブリドーマの増殖の盛んな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析 (R I A)、酵素免疫分析 (E L I S A)、蛍光免疫分析 (F I A) などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置 (F A C S) などで測定するなどしてスクリーニングする。例えば、精製抗原固相 - 培養上清 - P O D 標識抗マウス I g G の系を用いて非グリコシル化ヘモグロビン又はグリコシル化ヘモグロビン産生クローンをチェックする。そして、目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングするが、クローニングには、寒天培地中でコロニーをピックアップするか、あるいは限界希釈法によりなされうる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

10

【 0 0 1 6 】

モノクローナル抗体の製造

こうしてクローン化されたハイブリドーマ (融合細胞) は、培養されてモノクローナル抗体の製造に用いることができる。得られたハイブリドーマは、 F C S 含有 M E M 培地、 R P M I - 1 6 4 0 培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることができる。

また、ハイブリドーマを腹水化することにより、大量のモノクローナル抗体を得ることができる。この場合、ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、例えばヌードマウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることができる。

20

使用される動物は、ハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン (2 , 6 , 1 0 , 1 4 - テトラメチルペンタデカン) などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、 D E A E - セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテイン A カラムの如きアフィニティークロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは、抗原又は抗原断片 (抗体が特異的に認識する部位) を固定化したアフィニティークロマトグラフィー、プロテイン A を固定化したアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて精製する。

30

【 0 0 1 7 】

次に、上記のようにして製造されたモノクローナル抗体を含有する抗体試薬を用いた非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法について説明する。

本発明の非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法は、1つの試料中に含有される非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンを測定する方法であって、試料と A n t i - H b A _{1c} を含有する抗体試薬 (i) とを接触させ、試料中のグリコシル化ヘモグロビンへの抗体試薬 (i) の結合量を測定する第1の測定工程と、更に、 A n t i - H b A ₀ を含有する抗体試薬 (i i) を接触させ、試料中の非グリコシル化ヘモグロビンへの抗体試薬 (i i) の結合量を測定する第2の測定工程とを有する。

40

【 0 0 1 8 】

第1の測定工程では、試料と、上記のようにして得られる A n t i - H b A _{1c} をリン酸緩衝液などに分散させた抗体試薬 (i) とを接触させる。ここで、本発明で測定される試料としては、血液、あるいは血液を精製水などで溶血させた試料等が挙げられる。

このときの温度としては、 2 5 ~ 4 0 、好ましくは 3 6 ~ 3 8 とし、約 5 分間程度反応させ、例えば反応溶液の濁度などを汎用の生化学自動分析装置を用いて測定することにより、グリコシル化ヘモグロビンへの抗体試薬 (i) の結合量、即ち試料中のグリコシル

50

化ヘモグロビン量を測定することができる。

【0019】

次いで、第2測定工程では、第1の測定工程終了後の反応溶液と、上記のようにして得られるAnti-HbA₀をリン酸緩衝液などに分散させた抗体試薬(i i)とを接触させる。

このときの温度としては、25～40、好ましくは36～38とし、約5分間程度反応させ、反応溶液の濁度などを生化学自動分析装置を用いて測定する。このときの試料中の非グリコシル化ヘモグロビン量は、第2の測定工程で求めた濁度と第1の測定工程で求めた濁度との差であり、これらの測定値から容易に全ヘモグロビン中のグリコシル化されたヘモグロビンの相対比を算出できる。また、上記生化学自動分析装置の具体例としては、7170型自動分析装置(日立製作所)、MIRA(COBAS社製)等が挙げられる。

10

なお、本発明において、第1の測定工程で上記抗体試薬(i i)を用いて非グリコシル化ヘモグロビン量を測定後、第2の測定工程で抗体試薬(i)を用いてグリコシル化ヘモグロビン量を測定し、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの相対比を算出することも可能であるが、低濃度で存在するグリコシル化ヘモグロビンを第1の測定工程で測定するほうが望ましい。

【0020】

また、本発明において、例えばポリスチレンなどから作製された粒径が20～1000nm、より好ましくは50～1000nmの粒子を含有するラテックスに、予めそれぞれのモノクローナル抗体を感作させたラテックス試薬を用いることができ(ここで、Anti-HbA_{1c}を感作させたラテックス試薬をラテックス試薬(i)、Anti-HbA₀を感作させたラテックス試薬をラテックス試薬(i i)とする)、非グリコシル化ヘモグロビンに比べて低濃度で存在するグリコシル化ヘモグロビンの測定に用いられるラテックス試薬(i)は、ラテックス試薬(i i)に用いるラテックスの粒径より大きな粒径を有するラテックスを用いることが好ましい。

20

このように、モノクローナル抗体を感作したラテックス試薬によれば、抗原抗体反応の際に、ラテックスの凝集が起こり、抗原抗体反応が増感されて検出されるため、感度の良好な結果を得ることができる。そのため、精度に優れた測定を実施することが可能となる。

【0021】

このように、本発明の測定方法は、従来、汎用されている自動分析装置を用いることが可能なため、新たな設備コストを必要とせず、さらに短時間で精度に優れた結果を得ることができる。

30

【0022】

本発明の非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法によれば、約10分間程度の短時間で、全ヘモグロビンに対するグリコシル化ヘモグロビンの割合を求めることができるため、糖尿病の診断、病状の監視として非常に有用であるといえる。

【0023】

【実施例】

以下、実施例によってより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

40

【0024】

(製造例1)

ヒト赤血球から精製された非グリコシル化ヘモグロビンを免疫原とし、フロイントアジュバントをアジュバントとして用い、これをBALB/cマウスに免疫して、公知の方法により、モノクローナル抗体産生細胞を取得し、モノクローナル抗体を得た。

【0025】

(製造例2)

アジュバントとして、平均分子量6600のポリリジンを用いた以外は、製造例1と同様

50

の方法により、モノクローナル抗体 (Anti-HbA₀) を得た。

【0026】

(モノクローナル抗体の特異性の評価 (I))

ヒト赤血球から精製されたヒト非グリコシル化ヘモグロビンを生理食塩で、5 μg/ml、2.5 μg/ml、1.25 μg/ml、0.63 μg/ml、0.31 μg/ml、0.16 μg/ml、0.08 μg/mlに希釈した。これらの希釈系列それぞれ100 μlに対して、0.2 Mグリシン緩衝液 (pH 2.5) を100 μl加え、室温に5分間放置した。そこにPBS-T (0.01 Mリン酸緩衝液 pH 6.8 / 0.15 M NaCl / 0.1% Tween 20) を800 μl加え攪拌したのち、その100 μlに、製造例1又は2で得られたモノクローナル抗体 (培養上清、50倍希釈) を100 μl加え、室温に30分間放置した。

10

次いで、そのうちの100 μlを、あらかじめヒト非グリコシル化ヘモグロビンを固相化した96ウェルプレート (5 μg/ml、100 μlを96ウェルプレートに加え、4晩放置することにより固相化し、PBS-Tで4回洗浄したもの) に加え、室温で2時間反応させた。反応後、PBS-Tで洗浄4回行ない、POD (ペルオキシダーゼ) 標識抗マウスIgG抗体 (「3711-0081」、CAPPEL社製) (5000倍希釈) を100 μl加え、室温で1時間反応させた。その後、基質溶液 (0.1% o-フェニレンジアミン/リン酸-クエン酸緩衝液 (クエン酸1水和物7.3g、リン酸2ナトリウム12水和物23.9g、精製水1l / 0.003% H₂O₂) 100 μl加え、室温で30分間反応させた後、2N-硫酸を50 μl加え、酵素反応を停止させた。

20

これをイムプレートリーダー (「MR5000」、ダイナテック社製) を用いて上記酵素反応後の溶液の490 nmにおける吸光度 (OD) を求めた。この結果を表1に示す。

【0027】

(製造例3)

ヒト赤血球から精製されたグリコシル化ヘモグロビンを免疫原とし、フロイントアジュバントをアジュバントとして用い、これをBALB/cマウスに免疫して、公知の方法により、モノクローナル抗体産生細胞を取得し、モノクローナル抗体を得た。

【0028】

(製造例4)

アジュバントとして、平均分子量5900のポリバリンを用いた以外は、製造例3と同様の方法によりモノクローナル抗体 (Anti-HbA_{1c}) を得た。

30

【0029】

(モノクローナル抗体の特異性の評価 (II))

ヒト赤血球から精製されたグリコシル化ヒトヘモグロビンを生理食塩で、5 μg/ml、2.5 μg/ml、1.25 μg/ml、0.63 μg/ml、0.31 μg/ml、0.16 μg/ml、0.08 μg/mlに希釈した。これらの希釈系列それぞれ100 μlに対して、0.2 Mグリシン緩衝液 (pH 2.5) を100 μl加え、室温に5分間放置した。そこにPBS-T (0.01 Mリン酸緩衝液 pH 6.8 / 0.15 M NaCl / 0.1% Tween 20) を800 μl加え攪拌したのち、その100 μlに、製造例3又は4で得られたモノクローナル抗体 (培養上清、50倍希釈) を100 μl加え、室温に30分間放置した。

40

次いで、そのうちの100 μlを、あらかじめヒトグリコシル化ヘモグロビンを固相化した96ウェルプレート (5 μg/ml、100 μlを96ウェルプレートに加え、4晩放置することにより固相化し、PBS-Tで4回洗浄したもの) に加え、室温で2時間反応させた。反応後、PBS-Tで洗浄4回行ない、POD (ペルオキシダーゼ) 標識抗マウスIgG抗体 (「3711-0081」、CAPPEL社製) (5000倍希釈) を100 μl加え、室温で1時間反応させた。その後、基質溶液 (0.1% o-フェニレンジアミン/リン酸-クエン酸緩衝液 (クエン酸1水和物7.3g、リン酸2ナトリウム12水和物23.9g、精製水1l / 0.003% H₂O₂) 100 μl加え、室温で30分間反応させた後、2N-硫酸を50 μl加え、酵素反応を停止させた。

50

これをイムノプレートリーダー（「MR5000」、ダイナテック社製）を用いて上記酵素反応後の溶液の490nmにおける吸光度（OD）を求めた。この結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

特異性の評価（Ⅰ）		特異性の評価（Ⅱ）			
非グリコシル化 αヘプタビツ濃度 （μg/ml）	吸光度 （製造例1で得た モノクローナル抗体を使用）	吸光度 （製造例2で得た モノクローナル抗体を使用）	グリコシル化 αヘプタビツ濃度 （μg/ml）	吸光度 （製造例3で得た モノクローナル抗体を使用）	吸光度 （製造例4で得た モノクローナル抗体を使用）
0.08	1.260	1.320	0.08	1.398	1.422
0.16	1.249	1.016	0.16	1.375	1.325
0.31	1.168	0.370	0.31	1.118	1.194
0.63	0.139	0.066	0.63	1.327	0.995
1.25	0.025	0.114	1.25	1.049	0.618
2.5	0.022	0.013	2.5	0.895	0.455
5	0.013	0.008	5	0.965	0.398

10

20

30

40

【0031】

50

表1の結果から、アジュバントとしてポリリジン、ポリバリンを用いて製造されたモノクローナル抗体のほうが、従来使用されているフロイントアジュバントを用いて製造されたものに比べ、特異性が高いことが判明した。

【0032】

(試験例1)

ポリスチレンから作製された粒径110nmのラテックス粒子に、製造例4で製造されたAnti-HbA_{1c}を結合させて、これをpH7.2のリン酸緩衝液(35mMリン酸溶液に70mMのNaCl溶液を溶解した)に分散させてラテックス試薬(i)とした。日立自動分析装置7170を用いて、ラテックス試薬(i)300μlと、ヒト全血1部に精製水100部を加えて調製した試料(試料1)8μlとを37℃で5分間反応させ、主波長570nm、副波長800nmにて、エンドポイント法でグリコシル化ヘモグロビン量を測定した。

10

次いで、ポリスチレンから作製された粒径70nmのラテックス粒子に、製造例2で製造されたAnti-HbA₀を結合させて、これをpH7.2のリン酸緩衝液(35mMリン酸溶液に70mMのNaCl溶液を溶解した)に分散させたラテックス試薬(ii)100μlを加え、37℃で5分間反応させ、主波長570nm、副波長800nmにてエンドポイント法で測定し、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合(%)を算出した。この結果を表2に示す。

【0033】

(試験例2~15)

別人の14人から採血されたヒト全血を上記と同様の方法で希釈して試料(試料2~15)とした以外は、試験例1と同様の方法により、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合(%)を算出した。この結果を表2に示す。

20

【0034】

(比較試験例1)

上記試料1を用いて、HPLC法にてヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンを定量し、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合(%)を算出した。この結果を表2に示す。

【0035】

(比較試験例2~15)

別人の14人から採血されたヒト全血を上記と同様の方法で希釈して試料(試料2~15に対応)とした以外は、比較試験例1と同様の方法により、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合(%)を算出した。この結果を表2に示す。

30

【0036】

【表2】

試料No.	試験例1~15における グリコシル化ヘモグロビンの 割合 (%)	比較試験例1~15における グリコシル化ヘモグロビンの 割合 (%)
1	4.3	4.8
2	7.5	7.4
3	14.1	14.3
4	5.7	5.8
5	5.9	6.1
6	10.1	10.0
7	15.5	15.6
8	11.2	10.8
9	3.9	4.1
10	9.1	8.9
11	6.6	6.5
12	4.8	4.7
13	13.7	14.0
14	7.7	7.7
15	6.3	6.2

10

20

【0037】

表2の結果から、本発明の簡便で、且つ短時間で実施された測定の測定値（全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合（%））は、試料の調製が煩雑で、時間を要するHPLC法の測定結果と良く一致した。

30

【0038】

（試験例16）

ポリスチレンから作製された粒径80nmのラテックス粒子に、製造例4で製造されたAnti-HbA_{1c}を結合させて、これをpH7.2のリン酸緩衝液（35mMリン酸溶液に70mMのNaCl溶液を溶解した）に分散させたものをラテックス試薬（iii）とした。

日立自動分析装置7170を用いて、ラテックス試薬（iii）300μlと、ヒト全血1部に精製水100部を加えて調製した試料（試料16）8μlとを37℃で5分間反応させ、主波長570nm、副波長800nmにて、エンドポイント法でグリコシル化ヘモグロビン量を測定した。

40

次いで、ポリスチレンから作製された粒径52nmのラテックス粒子に、製造例2で製造されたAnti-HbA₀を結合させて、これをpH7.2のリン酸緩衝液（35mMリン酸溶液に70mMのNaCl溶液を溶解した）に分散させたラテックス試薬（iv）100μlを加え、37℃で5分間反応させ、主波長570nm、副波長800nmにてエンドポイント法で測定し、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合（%）を算出した。この結果を表3に示す。

【0039】

（試験例17~21）

別人の5人から採血されたヒト全血を上記と同様の方法で希釈して試料（試料17~21

50

)とした以外は、試験例 16 と同様の方法により、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合 (%) を算出した。この結果を表 3 に示す。

【 0 0 4 0 】

(比較試験例 16)

上記試料 16 を用いて、H P L C 法にてヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンを定量し、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合 (%) を算出した。この結果を表 3 に示す。

【 0 0 4 1 】

(比較試験例 17 ~ 21)

別人の 5 人から採血されたヒト全血を上記と同様の方法で希釈して試料 (試料 17 ~ 21 に対応) とした以外は、比較試験例 16 と同様の方法により、全ヘモグロビン中のグリコシル化ヘモグロビンの割合 (%) を算出した。この結果を表 3 に示す。

【 0 0 4 2 】

【表 3】

試料No.	試験例16~21における グリコシル化ヘモグロビンの 割合 (%)	比較試験例16~21における グリコシル化ヘモグロビンの 割合 (%)
16	3.8	3.9
17	3.8	3.8
18	7.8	8.0
19	13.7	14.0
20	12.3	11.9
21	10.4	10.8

【 0 0 4 3 】

表 2 の結果と同様に、本発明による測定結果と H P L C 法による測定結果とが良く一致した。

【 0 0 4 4 】

【発明の効果】

本発明のモノクローナル抗体の製造方法によれば、天然抗原を用いた場合でも、特異性の高いモノクローナル抗体を簡便に得ることができる。

本発明の非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法によれば、従来、汎用されている自動分析装置を用いることが可能なため、新たな設備コストを必要とせず、さらに短時間で精度に優れた結果を得ることができる。

また、本発明の非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法によれば、全ヘモグロビンに対するグリコシル化ヘモグロビンの割合を容易に求めることができるため、糖尿病の診断、病状の監視として非常に有用である。

フロントページの続き

(74)代理人 100094400

弁理士 鈴木 三義

(74)代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(72)発明者 黒田 英行

埼玉県北葛飾郡鷺宮町桜田5丁目13番1号 藤倉化成株式会社開発研究所内

(72)発明者 多々納 俊雄

静岡県沼津市大岡2297-6

(72)発明者 飯塚 佳彦

群馬県館林市尾曳町4-7

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13

4H045 AA11 CA42 DA76 DA86 EA50 FA72

(54)【発明の名称】非グリコシル化ヘモグロビン、グリコシル化ヘモグロビンに特異的に結合するモノクローナル抗体、その製造方法、並びにそれを用いた非グリコシル化ヘモグロビン及びグリコシル化ヘモグロビンの測定方法

专利名称(译)	特异性结合非糖基化血红蛋白的单克隆抗体，糖基化血红蛋白，其制备方法，以及使用该单克隆抗体测定非糖基化血红蛋白和糖基化血红蛋白的方法		
公开(公告)号	JP2004059477A	公开(公告)日	2004-02-26
申请号	JP2002218755	申请日	2002-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社 Yuemue		
申请(专利权)人(译)	藤仓化成株式会社 株式会社ユ一エム工一		
[标]发明人	黒田英行 多々納俊雄 飯塚佳彦		
发明人	黒田 英行 多々納 俊雄 飯塚 佳彦		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/36 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/36 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.V G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
其他公开文献	JP4215462B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供与非糖基化血红蛋白，糖基化血红蛋白特异性结合的单克隆抗体，其制备方法，以及使用该单克隆抗体测定非糖基化血红蛋白和糖基化血红蛋白的方法。 解决方案：用于产生特异性结合本发明的非糖基化血红蛋白的单克隆抗体的方法使用人非糖基化血红蛋白作为免疫原和聚赖氨酸作为佐剂。在制备特异性结合本发明糖基化血红蛋白的单克隆抗体的方法中，人糖基化血红蛋白用作免疫原，多缬氨酸用作佐剂。【选择图】无

糖基化		糖基化		糖基化		糖基化		糖基化	
非糖基化 (μg/ml)	糖基化 (μg/ml)	非糖基化 (μg/ml)	糖基化 (μg/ml)	非糖基化 (μg/ml)	糖基化 (μg/ml)	非糖基化 (μg/ml)	糖基化 (μg/ml)	非糖基化 (μg/ml)	糖基化 (μg/ml)
0.06	1.260	0.06	1.320	0.06	1.380	0.06	1.442	0.06	1.422
0.16	1.249	0.16	1.016	0.16	1.375	0.16	1.325	0.16	1.325
0.31	1.168	0.31	0.300	0.31	1.118	0.31	1.194	0.31	1.194
0.66	0.139	0.66	0.666	0.66	1.327	0.66	0.995	0.66	0.995
1.25	0.025	1.25	0.114	1.25	1.049	1.25	0.618	1.25	0.618
2.5	0.022	2.5	0.013	2.5	0.855	2.5	0.455	2.5	0.455
5	0.013	5	0.008	5	0.965	5	0.398	5	0.398