

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02014/147873**

発行日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)

(43) 国際公開日 **平成26年9月25日 (2014. 9. 25)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18 ZNA	4B064
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4H045
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 SO1N	
<b>GO1N 33/577 (2006.01)</b>	GO1N 33/577 B	
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 71 頁)

出願番号 特願2015-506540 (P2015-506540)	(71) 出願人 000131474 株式会社シノテスト 東京都千代田区神田神保町一丁目5番地
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/076177	
(22) 国際出願日 平成25年9月19日 (2013. 9. 19)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-57088 (P2013-57088)	(71) 出願人 504258527 国立大学法人 鹿児島大学 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号
(32) 優先日 平成25年3月19日 (2013. 3. 19)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔
	(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 節
	(74) 代理人 100101904 弁理士 島村 直己

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HMGB1の分解産物と特異的に結合する抗体、並びにHMGB1の分解産物の測定方法及び測定試薬

## (57) 【要約】

HMGB1分解産物に対する特異性が高い抗体、並びにHMGB1分解産物のみを正確に定量測定することができる測定方法及び測定試薬を提供する。

HMGB1のトロニン又はトロニン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、HMGB1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍である、HMGB1のトロニン又はトロニン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体；並びに前記抗体、及びHMGB1のトロニン又はトロニン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体であって、HMGB1のトロニン又はトロニン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が高い抗体を使用するHMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、H M G B 1 に対する親和性と比較して、少なくとも 1 . 5 倍である、H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体。

## 【請求項 2】

H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、H M G B 2 に対する親和性及び H M G B 2 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性とそれぞれ比較して、各々少なくとも 1 0 倍である、請求項 1 記載の H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体。

10

## 【請求項 3】

H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 又は 2 記載の H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体。

## 【請求項 4】

試料に含まれる H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物の免疫学的測定方法であって、次の ( a ) の抗体及び ( b ) の抗体を使用する測定方法。

20

( a ) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

( b ) H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体であって、H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が高い抗体。

## 【請求項 5】

請求項 4 における ( b ) の抗体が、当該抗体の濃度が 0 . 6 2 5 ~ 2 . 5 n g / m L の範囲の少なくともいずれかの濃度において、H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化した E L I S A 法で、

(イ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が 0 . 5 以上となる抗体、又は

30

(ロ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマ M D 7 8 ( F E R M P - 1 8 4 0 5 ) より産生される抗体における当該吸光度の値の 6 倍以上となる抗体である、請求項 4 記載の測定方法。

## 【請求項 6】

( a ) の抗体が、請求項 2 記載の抗体である、請求項 4 又は 5 記載の測定方法。

## 【請求項 7】

( a ) の抗体及び ( b ) の抗体がモノクローナル抗体である、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

## 【請求項 8】

固相化抗体及び標識抗体を用いるものであって、( a ) の抗体及び ( b ) の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用される、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

40

## 【請求項 9】

試料に含まれる H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物の免疫学的測定試薬であって、次の ( a ) の抗体及び ( b ) の抗体を含有する測定試薬。

( a ) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

( b ) H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体であって、H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジ

50

ユリン複合体による分解産物に対する親和性が高い抗体。

【請求項 10】

請求項 9 における (b) の抗体が、当該抗体の濃度が 0.625 ~ 2.5 ng/mL の範囲の少なくともいずれかの濃度において、HMGB1 のトロニン又はトロニン・トロジモジュリン複合体による分解産物を固相化した ELISA 法で、

(イ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が 0.5 以上となる抗体、又は

(ロ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマ MD78 (FERM P-18405) より産生される抗体における当該吸光度の値の 6 倍以上となる抗体

である、請求項 9 記載の測定試薬。

10

【請求項 11】

(a) の抗体が、請求項 2 記載の抗体である、請求項 9 又は 10 記載の測定試薬。

【請求項 12】

(a) の抗体及び (b) の抗体がモノクローナル抗体である、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の測定試薬。

【請求項 13】

固相化抗体及び標識抗体を含有するものであって、(a) の抗体及び (b) の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用される、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の測定試薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HMGB1 に比べ細胞障害性が低減した HMGB1 の分解産物と特異的に結合する抗体、並びに HMGB1 の分解産物の測定方法及び測定試薬に関するものである。

本発明は、臨床検査、臨床病理学、免疫学及び医学などの生命科学分野、並びに分析化学などの化学分野等において有用なものである。

【背景技術】

【0002】

HMGB (ハイモビリティグループボックスプロテイン; High Mobility Group Box Protein) は、以前、HMG (ハイモビリティグループプロテイン; High Mobility Group Protein) と呼ばれていたが、これはクロマチン構造に含まれる大量の非ヒストンタンパク質として 1964 年に発見され、すべての高等動植物に普遍的に含まれるタンパク質であり、種族間で一次構造の保存性は極めて高い。

30

また、核内ばかりではなく、細胞質内にも豊富に存在することが分かっている。

生理作用ははっきりとは分かっていないが、HMGB は DNA と結合する際に二重らせん構造を緩めることから、転写反応の際に DNA の高次構造を最適構造に変化させて転写活性を高めるといふ、極めて広範囲の転写促進因子及びヌクレオソーム弛緩因子として機能すると考えられている。

40

HMGB には、いくつかの種類が存在する。

例えば、HMGB1 (ハイモビリティグループボックスプロテイン 1)、HMGB2 (ハイモビリティグループボックスプロテイン 2)、HMGB3 (ハイモビリティグループボックスプロテイン 3)、HMGB8 (ハイモビリティグループボックスプロテイン 8)、HMGB17 (ハイモビリティグループボックスプロテイン 17)、HMGB I (ハイモビリティグループボックスプロテイン I)、HMGB Y (ハイモビリティグループボックスプロテイン Y)、HMGB I (Y) (ハイモビリティグループボックスプロテイン I (Y))、HMGB I-C (ハイモビリティグループボックスプロテイン I-C) 等を挙げることができる。

50

なお、本発明者らが、遺伝情報処理ソフトウェア「GENETYX」(SOFTWARE DEVELOPMENT社)を使用してアミノ酸配列の相同性の解析を行ったところ、ヒトのHMGB1に対して、ウシHMGB1の相同性は98.6%であり、ブタHMGB1の相同性は99.1%であった。

また、同様に、ヒトのHMGB1に対して、ヒトのHMGB2の相同性は81.2%であり、ウシHMGB2との相同性は72.3%であり、ブタのHMGB2との相同性は79.4%であった。

ワング(Wang)らは1999年に、HMGB1自体を免疫原として調製したポリクローナル抗体を使用したウエスタンブロット法により、初めて血清中(血液中)のHMGB1の定量測定を行った。

その結果、ワングらは、HMGB1が敗血症のマーカーとなりうることを示した。

そして、敗血症の患者において、生き残る患者と、死に至る患者を判別することが、精密に血液中のHMGB1を測定することによって可能であることを示した(非特許文献1参照)。

なお、先に、HMGB1の測定に用いる抗体、即ちHMGB1に結合する抗体については、パーキネン(Parkkinen)らや、レップ(Lepp)らによって調製可能なことが示されていた(非特許文献2及び非特許文献3参照)。

この抗体を用いてレップらはHMGB1に関して固相酵素免疫測定法(Solid-phase Enzyme Immunoassay)が可能であることを述べている。

また、カバート(Cabart)らにより、ヒトHMGB1及びヒトHMGB2の調製方法が示されていた(非特許文献4参照)。

また、HMGB1は、炎症でも誘導され、このことが各種サイトカインの大量分泌の原因と考えられるという文献も発表されている(非特許文献5参照、非特許文献6参照及び非特許文献7参照)。

なお、本発明者らは、先に、ヒトHMGB1には結合するが、ヒトHMGB2には結合しない抗体、及びHMGB2を測り込むことなく、誤差を含まない正確な測定値を得ることができるヒトHMGB1の免疫学的測定試薬及び免疫学的測定方法を開発した(特許文献1参照)。

また、本発明者らは、先に、ヒトHMGB1との結合能力が高い高力価の抗体であって、かつ当該抗体を高い確率で取得することができる抗ヒトHMGB1抗体、試料中にごく微量に含まれるヒトHMGB1までも正確に測定することができる高感度な試料中のヒトHMGB1の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬等を開発した(特許文献2参照)。

ところで、本発明者らは、トロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体により、ヒトHMGB1の10番目のアルギニン(R10)-11番目のグリシン(G11)が切断され、このHMGB1のN末端の「MGKGDPKKPR」の10のアミノ酸残基よりなるペプチドが分離して、新たに露呈したN末端「GKMSS・・・」を有するHMGB1の分解産物が生じることを見出した。(本発明者らは、このヒトHMGB1の分解産物を「des-HMGB1」と名付けた。)

本発明者らの検討の結果、このHMGB1の分解産物は、HMGB1に比べその細胞障害性が低いものであることが分かった。

このことより、HMGB1の細胞障害性を減じるため、トロンビンやトロンビン・トロンボモジュリン複合体を用いて、HMGB1を前記の通り分解(切断)して、より細胞障害性の低いHMGB1の分解産物に変換することが発想された。

そして、このトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体によるHMGB1の分解の効果を把握するため、このHMGB1の分解産物の定量測定が求められ、測定方法が検討されたが、従来の方法は、このHMGB1の分解産物と共にHMGB1等も測り込んでしまうものであって、HMGB1の分解産物だけを特異的に測定することはできないものであった(非特許文献8参照)。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

## 【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2003-96099号公報

【特許文献2】国際公開第2008/075788号

## 【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】H. Wang *et al.*, SCIENCE, 285巻, 9号, 248~251頁, 1999年発行【非特許文献2】J. Parkkinen *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, 268巻, 26号, 19726~19738頁, 1993年発行 10【非特許文献3】W. A. Lepp *et al.*, Journal of Immunoassay, 10巻, 4号, 449~465頁, 1989年発行【非特許文献4】P. Cabart *et al.*, Cell Biochemistry and Function 13, 125~133頁, 1995年発行【非特許文献5】Andersson, U *et al.*, J. Exp. Med., 192巻, 565~570頁, 2000年発行【非特許文献6】Scaffidi *et al.*, Nature, 418巻, 191~195頁, 2002年発行【非特許文献7】Park *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, 279巻, 27号, 2004年発行 20【非特許文献8】Ito *et al.*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 28巻, 1825~1830頁, 2008年発行

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0005】

前述のように、HMGB1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を正確に定量測定することが求められた。

しかしながら、従来抗体は、前記HMGB1の分解産物に対する特異性が高いものではなく、前記HMGB1分解産物に対する親和性とHMGB1に対する親和性が同程度のものであった。 30

そして、従来測定方法及び測定試薬も、前記HMGB1分解産物に対する特異性が高いものではなく、前記HMGB1分解産物を測定するのみならず、HMGB1等も測り込んでしまうものであり、すなわちその測定値がHMGB1等に由来する正の誤差を含んでしまうものであった。

また、HMGB1の分解産物の全アミノ酸配列は、HMGB1中に存在するため、当該分解産物に対する親和性がHMGB1に対する親和性よりも高い抗体を得ることは困難であると予想された。

しかしながら、本発明者らは、前記課題の解決を目指して検討を重ねた結果、目的とする抗体を得ることに成功し、更に当該抗体と、特定の抗体を組み合わせることにより、前記HMGB1分解産物のみを正確に定量測定することができることを見出し、本発明を完成するに至った。 40

## 【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) HMGB1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、HMGB1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍である、HMGB1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体。 50

(2) H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、H M G B 2 に対する親和性及び H M G B 2 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性とそれぞれ比較して、各々少なくとも 10 倍である、前記 (1) 記載の H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体。

(3) H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体がモノクローナル抗体である、前記 (1) 又は (2) 記載の H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体。

(4) 試料に含まれる H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物の免疫学的測定方法であって、次の (a) の抗体及び (b) の抗体を使用する測定方法。

(a) 前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の抗体。

(b) H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体であって、H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が高い抗体。

(5) 前記 (4) における (b) の抗体が、当該抗体の濃度が 0.625 ~ 2.5 ng / mL の範囲の少なくともいずれかの濃度において、H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化した E L I S A 法で、

(イ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が 0.5 以上となる抗体、又は

(ロ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマ M D 7 8 ( F E R M P - 1 8 4 0 5 ) より産生される抗体における当該吸光度の値の 6 倍以上となる抗体である、前記 (4) 記載の測定方法。

(6) (a) の抗体が、前記 (2) 記載の抗体である、前記 (4) 又は (5) 記載の測定方法。

(7) (a) の抗体及び (b) の抗体がモノクローナル抗体である、前記 (4) ~ (6) のいずれかに記載の測定方法。

(8) 固相化抗体及び標識抗体を用いるものであって、(a) の抗体及び (b) の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用される、前記 (4) ~ (7) のいずれかに記載の測定方法。

(9) 試料に含まれる H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物の免疫学的測定試薬であって、次の (a) の抗体及び (b) の抗体を含有する測定試薬。

(a) 前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の抗体。

(b) H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体であって、H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が高い抗体。

(10) 前記 (9) における (b) の抗体が、当該抗体の濃度が 0.625 ~ 2.5 ng / mL の範囲の少なくともいずれかの濃度において、H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化した E L I S A 法で、

(イ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が 0.5 以上となる抗体、又は

(ロ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマ M D 7 8 ( F E R M P - 1 8 4 0 5 ) より産生される抗体における当該吸光度の値の 6 倍以上となる抗体である、前記 (9) 記載の測定試薬。

(11) (a) の抗体が、前記 (2) 記載の抗体である、前記 (9) 又は (10) 記載の測定試薬。

10

20

30

40

50

(12) (a)の抗体及び(b)の抗体がモノクローナル抗体である、前記(9)~(11)のいずれかに記載の測定試薬。

(13) 固相化抗体及び標識抗体を含有するものであって、(a)の抗体及び(b)の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用される、前記(9)~(12)のいずれかに記載の測定試薬。

【発明の効果】

【0007】

本発明の抗体は、HMGB1のトロニン又はトロニン・トロポモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、HMGB1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍高い抗体であり、すなわち、前記HMGB1分解産物に対する特異性が高い抗体である。

10

また、本発明の測定方法及び測定試薬は、HMGB1のトロニン又はトロニン・トロポモジュリン複合体による分解産物に対する特異性が高いものであって、HMGB1等の測り込みが抑制され、すなわちHMGB1等に由来する正の誤差が生じることが抑制され、前記HMGB1分解産物のみを正確に定量測定することができるものである。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1はHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、前記HMGB2分解産物をそれぞれ泳動したときのゲルの写真である。レーン1は分子量マーカー、レーン2はHMGB1、レーン3は前記HMGB1分解産物、レーン4はHMGB2、レーン5は前記HMGB2分解産物、レーン6はトロニンを示す。

20

【図2】図2は抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、前記HMGB2分解産物それぞれとの反応性(親和性)を確かめたウエスタンブロット法の写真である。レーン1は分子量マーカー、レーン2はHMGB1、レーン3は前記HMGB1分解産物、レーン4はHMGB2、レーン5は前記HMGB2分解産物を示す。

【図3】図3は本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、前記HMGB2分解産物それぞれとの反応性(親和性)を確かめたウエスタンブロット法の写真である。レーン1は分子量マーカー、レーン2はHMGB1、レーン3は前記HMGB1分解産物、レーン4はHMGB2、レーン5は前記HMGB2分解産物を示す。

30

【図4A】図4Aはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(2D4)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4B】図4Bはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(4F12)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4C】図4Cはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(8H4)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

40

【図4D】図4Dはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(2H6)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4E】図4Eはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(5D1)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4F】図4Fはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(2A10)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4G】図4Gはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等へ

50

の抗体(6H3)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4H】図4Hはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(MD78)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4I】図4Iはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(MD77)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4J】図4Jはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(4C3)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4K】図4Kはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(J2E1)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図4L】図4Lはマイクロタイタープレートに固定化した前記HMGB1分解産物等への抗体(HAP46.5)の反応性を確認した図である。横軸は試料として用いた各抗体溶液中の抗体の濃度、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図5】図5は、前記HMGB1分解産物に結合する抗体及び他のHMGB1に結合する抗体等を用いELISA法(サンドイッチ法)により、HMGB1、前記HMGB1分解産物をそれぞれ測定したときの結果を示す図である。横軸の上段は当該測定に使用したPOD標識抗体液の抗体の産生細胞株を表す文字を示し、横軸の下段は当該測定に使用した抗体固相化マイクロプレートの抗体の産生細胞株を表す文字を示し、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図6】図6は従来試薬・方法のELISA法(サンドイッチ法)により、HMGB1、前記HMGB1分解産物をそれぞれ測定したときの検量線を示す図である。横軸は試料中のHMGB1、又は前記HMGB1分解産物の濃度(0~80ng/mL)、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図7】図7は本発明にしたがってELISA法(サンドイッチ法)により、HMGB1、前記HMGB1分解産物をそれぞれ測定したときの検量線を示す図である。横軸は試料中のHMGB1、又は前記HMGB1分解産物の濃度(0~80ng/mL)、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図8】図8は本発明にしたがって抗体(a)として本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)、抗体(b)として抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)を用いてELISA法(サンドイッチ法)により、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、前記HMGB2分解産物をそれぞれ測定したときの検量線を示す図である。横軸は試料中のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、又は前記HMGB2分解産物の濃度(0~100ng/mL)、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度の値を示す。

【図9】図9は本発明にしたがって抗体(a)として本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)、抗体(b)として抗HMGB1分解産物等抗体(2A10)を用いてELISA法(サンドイッチ法)により、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、前記HMGB2分解産物をそれぞれ測定したときの検量線を示す図である。横軸は試料中のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、又は前記HMGB2分解産物の濃度(0~80ng/mL)、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度差の値を示す。

【図10】図10は本発明にしたがって抗体(a)として本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)、抗体(b)として抗HMGB1分解産物等抗体(6H3)を用いてELISA法(サンドイッチ法)により、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、前記HMGB2分解産物をそれぞれ測定したときの検量線を示す図である。横軸は試料中のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、又は前記HMGB2分解産物の濃度(0~80ng/mL)、縦軸はELISA法で測定したときの吸光度差の値を示す。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 9 】

## 〔 I 〕 抗 H M G B 1 分解産物抗体

## ( 1 ) 本発明の抗 H M G B 1 分解産物抗体

本発明の抗体は、「H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、H M G B 1 に対する親和性と比較して、少なくとも 1 . 5 倍である、H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体」である。(なお、この本発明の抗体を、以下、「本抗 H M G B 1 分解産物抗体」ということがある。)

なお、H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、H M G B 1 に対する親和性と比較して、「少なくとも 1 . 5 倍」とは、当該抗体の濃度が 0 . 6 2 5 ~ 5 n g / m L の範囲の少なくともいずれかの濃度(好ましくは当該範囲のすべての濃度)において、後述の「親和性の測定方法」で測定した時の親和性が少なくとも 1 . 5 倍であることをいう。

この本抗 H M G B 1 分解産物抗体としては、H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、H M G B 2 に対する親和性及び H M G B 2 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性とそれぞれ比較して、各々少なくとも 1 0 倍であるものが好ましい。(抗体濃度: 0 . 6 2 5 ~ 5 n g / m L の範囲の少なくともいずれかの濃度(好ましくは当該範囲のすべての濃度))

また、この本抗 H M G B 1 分解産物抗体としては、モノクローナル抗体が好ましい。

なお、本抗 H M G B 1 分解産物抗体は、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体を含む抗血清、モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント(F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> 又は F a b ' など)等のいずれのものであってもよい。

## ( 2 ) H M G B 1 分解産物

本発明における「H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物」はトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体によりヒト H M G B 1 が加水分解されることによって生じたタンパク質又はペプチドであるが、本発明においては、特に、トロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体により、ヒト H M G B 1 の 1 0 番目のアルギニン(R 1 0) - 1 1 番目のグリシン(G 1 1) が切断され、この H M G B 1 の N 末端の「M G K G D P K K P R」の 1 0 のアミノ酸残基よりなるペプチドが分離することにより生じる、新たに露呈した N 末端「G K M S S . . . . .」を有する H M G B 1 の分解産物のことをいう。

ヒト H M G B 1 のアミノ酸配列を配列番号 1 として、また、前記のヒト H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物のアミノ酸配列を配列番号 2 として、配列表に示した。

なお、本発明において、前記のヒト H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物としては、前記の配列番号 2 として示したアミノ酸配列に 1 ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加若しくは修飾を施すことにより得られるアミノ酸配列よりなるタンパク質、あるいはこのタンパク質に糖類又は脂質などが結合したものであってもよい。

なお、前記のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加又は修飾におけるアミノ酸残基数は、通常 1 ~ 4 個、好ましくは 1 ~ 3 個、更に好ましくは 1 ~ 2 個、特に好ましくは 1 個である。

また、本発明において、前記のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体としては、ヒトの体内に存在するトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体はもちろんのこと、遺伝子組換え体などの人工的に調製されたもの又は人工的に単離されたもの等も含むものである。

(なお、以上述べた「H M G B 1 のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物」を、以下、「前記 H M G B 1 分解産物」ということがある。)

## ( 3 ) 親和性の測定方法

本抗HMG B 1分解産物抗体は、前記の通り、前記HMG B 1分解産物に対する親和性が、HMG B 1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍であるものである。

この抗体の親和性の測定方法は、特に限定されるものではないが、例えば、次のように行うことができる。

〔A〕測定試薬の調製

(i) HMG B 1分解産物等固相化マイクロプレート

HMG B 1、前記HMG B 1分解産物、HMG B 2、及びHMG B 2のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物（以下、「前記HMG B 2分解産物」ということがある。）のそれぞれをリン酸緩衝生理食塩水により1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるように調製したものを、各々96穴マイクロタイタープレート〔Thermo Fisher Scientific Inc.社（米国・イリノイ州）〕のウェルに100  $\mu\text{L}$ 注入し、25℃で18時間静置し、前記のHMG B 1、前記HMG B 1分解産物、HMG B 2、及び前記HMG B 2分解産物のそれぞれを、前記マイクロタイタープレートのウェルに固相化した。

次に、このマイクロタイタープレートのウェル中の液を除去した後、0.5%カゼイン及び0.1%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩水（TBS）〔pH 8.0〕の250  $\mu\text{L}$ ずつを各ウェルに分注し、ブロッキング処理を行った。

この後、各ウェルの上をプレートシールで封をし、蒸発しないようにして、使用時まで冷蔵保存した。

これを、HMG B 1分解産物等固相化マイクロプレートとした。

(ii) POD標識抗マウスIg G抗体液

POD標識抗マウスIg G抗体〔Dako Cytomation社（デンマーク国）〕を、0.5%カゼインナトリウム、及び100 mM塩化ナトリウムを含む50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）によって1000倍希釈した。

これをPOD標識抗マウスIg G抗体液とした。

(iii) 洗浄液

0.05%のTween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水を、洗浄液とした。

(iv) 希釈液

0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含む50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）を、希釈液とした。

(v) 発色液

0.2 mMのEDTA・2ナトリウムを含む0.045%の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩水溶液（pH 2.0）を、発色液とした。

(vi) 基質液

5 mM過酸化水素、41 mMクエン酸、0.2 mMのEDTA・2ナトリウムを含む60 mMリン酸二ナトリウム水溶液（pH 4.3）を、基質液とした。

(vii) 発色基質

前記の発色液と基質液を使用前に室温に戻した上で、使用時に等量混合し、発色基質とした。

(viii) 反応停止液

0.7 N硫酸を、反応停止液とした。

〔B〕試料

HMG B 1、前記HMG B 1分解産物、HMG B 2、及び前記HMG B 2分解産物のそれぞれとの親和性を測定しようとする抗体を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び5 ng/mLとなるように前記〔A〕の(iv)の希釈液により希釈して、前記4濃度の抗体溶液をそれぞれ調製した。

〔C〕測定

(i) 前記〔A〕の(i)のHMG B 1分解産物等固相化マイクロプレートの各ウェルを、前記〔A〕の(iii)の洗浄液の400  $\mu\text{L}$ で3回洗浄した。

(ii) 次に、前記〔B〕の4濃度の抗体溶液それぞれの100  $\mu\text{L}$ を試料として各ウ

10

20

30

40

50

エルに分注した後、25 で2時間静置し、これらの各濃度の抗体溶液に含まれていた抗体を、このHMGB1分解産物等固相化マイクロプレートのウェルに固相化された前記のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物の各々と、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

(iii) 次に、各ウェルを、前記〔A〕の(iii)の洗浄液の400 $\mu$ Lで3回洗浄した。

(iv) 次に、前記〔A〕の(ii)のPOD標識抗マウスIgG抗体液の100 $\mu$ Lを各ウェルに分注し、25 で1時間静置し、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

(v) 次に、各ウェルを、前記〔A〕の(iii)の洗浄液の400 $\mu$ Lで3回洗浄した。

(vi) 次に、各ウェルに、前記〔A〕の(vii)の発色基質を100 $\mu$ L分注し、室温で20分間静置し、標識酵素であるパーオキシダーゼ(POD)による発色反応を行わせた。

(vii) 次に、各ウェルに、前記〔A〕の(viii)の反応停止液を100 $\mu$ L分注し、発色反応を停止させた。

(viii) 次に、各ウェルの液の吸光度(主波長:450nm、副波長:550nm)を測定し、前記の4濃度の抗体溶液それぞれを試料として測定した場合の吸光度を得た。

そして、この吸光度の値を前記の親和性を測定しようとする抗体の前記のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物のそれぞれとの親和性を示す値とした。

例えば、親和性を測定しようとする抗体の溶液(例えば、2.5ng/mLの濃度)を試料として、前記の通り測定を行ったときに、前記HMGB1分解産物を固相化したウェルで得られた前記吸光度差の値が1.35であり、前記のHMGB1を固相化したウェルで得られた前記吸光度差の値が0.9であった場合には、この抗体は、前記HMGB1分解産物に対する親和性が、HMGB1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍である、といえる。

すなわち、この場合、この抗体は、本抗HMGB1分解産物抗体である。

#### (4) 免疫原

本抗HMGB1分解産物抗体を取得するための免疫原について、以下説明を行う。

本抗HMGB1分解産物抗体を取得するための免疫原としては、例えば、ヒトHMGB1、ヒトHMGB1のアミノ酸配列との相同性が高い動物(例えば、ウシ又はブタ等)のHMGB1、又は前記HMGB1分解産物の全体又は一部等を挙げることができる。

なお、前記HMGB1分解産物の一部としては、例えば、この前記HMGB1分解産物のN末端の「GKMS SYAFFVQTCREEHKKK」の20のアミノ酸残基よりなるペプチド等を挙げることができる。

また、本抗HMGB1分解産物抗体を取得するための免疫原としては、これまで述べた免疫原としてのタンパク質又はペプチドについて、1ないし数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加又は修飾を施すことにより得られるタンパク質又はペプチドであってもよい。

なお、前記のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、付加又は修飾におけるアミノ酸残基数は、通常1~4個、好ましくは1~3個、更に好ましくは1~2個、特に好ましくは1個である。

また、本抗HMGB1分解産物抗体を取得するために動物等に免疫するものとしては、これまで述べた免疫原としてのタンパク質又はペプチドについて、担体(キャリア)を結合させたものであってもよい。

特に、前記の免疫原としてのタンパク質又はペプチドが低分子量のものである場合には、担体との結合により抗体産生能が向上するので、担体を結合させたものを免疫原として用いることが好ましい。

なお、この担体としては、例えば、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ウシ血清ア

10

20

30

40

50

ルブミン ( B S A )、ヒト血清アルブミン ( H S A )、ニワトリ血清アルブミン、ポリ - L - リシン、ポリアラニルリシン、ジバルミチルリシン、破傷風トキソイド又は多糖類等の担体として公知なものを用いることができる。

( 5 ) 本抗 H M G B 1 分解産物抗体の免疫原等の取得方法

本抗 H M G B 1 分解産物抗体を取得するために動物等に免疫する免疫原等の取得方法について、以下説明を行う。

本抗 H M G B 1 分解産物抗体を取得するための免疫原であるが、前記 ( 4 ) に記載したヒト H M G B 1、又はヒト H M G B 1 のアミノ酸配列との相同性が高い動物の H M G B 1 は、例えば、ヒト又はヒトの H M G B 1 のアミノ酸配列と相同性が高いヒト以外の哺乳類動物 ( ブタ、ウシ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス又はラットなど ) 等の体液、細胞、組織又は臓器等より、公知の方法等により抽出、精製等して、取得することができる。

また、前記 H M G B 1 分解産物は、例えば、ヒト H M G B 1、又はヒト H M G B 1 のアミノ酸配列との相同性が高い動物 ( 例えば、ウシ又はブタ等 ) の H M G B 1 を、前記のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体に接触させて、加水分解し、そして、これについて、公知の方法等により抽出、精製等して、取得することができる。

また、前記の免疫原は、液相法及び固相法等のペプチド合成の方法により合成することができ、更にペプチド自動合成装置を用いてもよい。

例えば、日本生化学会編「生化学実験講座 1 タンパク質の化学 I V」, 東京化学同人, 1975年; 泉屋ら「ペプチド合成の基礎と実験」, 丸善, 1985年; 又は日本生化学会編「続生化学実験講座 2 タンパク質の化学 下」, 東京化学同人, 1987年等に記載された方法に従い合成することができる。

更に、前記の免疫原は、対応する核酸塩基配列を持つ D N A 又は R N A より遺伝子工学技術を用いて調製してもよく、日本生化学会編「続生化学実験講座 1 遺伝子研究法 I」, 東京化学同人, 1986年; 日本生化学会編「続生化学実験講座 1 遺伝子研究法 I I」, 東京化学同人, 1986年; 又は日本生化学会編「続生化学実験講座 1 遺伝子研究法 I I I」, 東京化学同人, 1987年等を参照して調製すればよい。

例えば、前記の配列番号 1 で示されるヒト H M G B 1 のアミノ酸配列、若しくは前記の配列番号 2 で示される前記 H M G B 1 分解産物のアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部に対応する遺伝子をクローニングし、得られた遺伝子をプラスミド等の発現ベクターへ組み込む。

次に、この発現ベクターを大腸菌等の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養することにより、前記のアミノ酸配列又はその一部よりなるタンパク質又はペプチドを発現させることができる。

なお、遺伝子の塩基配列をクローニングする方法としては、例えば、P C R 法、リコンビナント P C R 法、ライゲーション法、又はリンカーライゲーション法等を挙げることができる。

ところで、免疫原が低分子物質の場合には、免疫原に担体 ( キャリア ) を結合させたものを動物等に免疫するのが一般的ではあるが、アミノ酸数 5 のペプチドを免疫原としてこれに対する特異抗体を産生させたとの報告 ( 木山ら, 「日本薬学会第 1 1 2 回年会講演要旨集 3」, 122 頁, 1992 年発行 ) もあるので、担体を使用することは必須ではない。

なお、前記のタンパク質又はペプチドに担体を結合させたものを動物等に免疫する場合の担体としては、スカシガイのヘモシアニン ( K L H )、ウシ血清アルブミン ( B S A )、ヒト血清アルブミン ( H S A )、ニワトリ血清アルブミン、ポリ - L - リシン、ポリアラニルリシン、ジバルミチルリシン、破傷風トキソイド又は多糖類等の担体として公知なものを用いることができる。

前記のタンパク質又はペプチドと担体との結合法は、グルタルアルデヒド法、1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド法、マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシサクシニミドエステル法、ビスジアゾ化ベンジジン法又は N - サクシミジル - 3 - ( 2 - ピリジルジチオ ) プロピオン酸法等の公知の結合法を用いることができる。

また、ニトロセルロース粒子、ポリビニルピロリドン又はリポソーム等の担体に前記のタンパク質又はペプチドを吸着させたものも、本抗HMG B 1分解産物抗体の取得のため、前記の動物等への免疫に用いることができる。

(6) 本抗HMG B 1分解産物抗体(ポリクローナル抗体)の取得方法

本抗HMG B 1分解産物抗体において、ポリクローナル抗体又は抗血清は、以下の操作により取得することができる。

(i) まず、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を哺乳動物(マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウマ等)又は鳥類(ニワトリ等)等に免疫する。

この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により決められるものであるが、例えば、ウサギの場合にはウサギ一匹当たり一回につき10 $\mu$ g~数十mgの前記免疫原、又は前記免疫原と担体の結合物を免疫注射する。

なお、この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントと添加混合して免疫注射することが好ましい。

アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知のものを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、2~3週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を追加免疫注射する。この場合も、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら全採血を行い、血清を分離して本抗HMG B 1分解産物抗体を含む抗血清を得る。

この抗血清を、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法又はアフィニティークロマトグラフィー等の方法、あるいはこれらの方法を組み合わせて抗体の精製を行い、ポリクローナル抗体を得る。

(ii) ここで得られたポリクローナル抗体は、前記HMG B 1分解産物に対する親和性がHMG B 1に対する親和性と比較して少なくとも1.5倍である抗体(本抗HMG B 1分解産物抗体)と、前記HMG B 1分解産物に対する親和性がHMG B 1に対する親和性と比較して1.5倍未満である抗体(従来の抗体)の両方を含むものであるので、更に、これをHMG B 1をリガンドとして固相に固定化したアフィニティークロマトグラフィーのカラムに通し接触させる。

前記の従来の抗体は、このカラムのリガンド(HMG B 1)を介して固相に結合し、捕集される。

これに対して、本抗HMG B 1分解産物抗体は、このカラムのリガンド(HMG B 1)に結合し難く、このカラムを素通りするものが多いので、素通りした画分を得ることにより、本抗HMG B 1分解産物抗体を取得することができる。

なお、これを、前記HMG B 1分解産物をリガンドとして固相に固定化したアフィニティークロマトグラフィーのカラムに通し接触させ、本抗HMG B 1分解産物抗体をこのカラムのリガンド(前記HMG B 1分解産物)を介して固相に結合させるとともに、他の抗体等は、このカラムを素通りさせて分離し、その後、この固相に結合させていた本抗HMG B 1分解産物抗体をリガンド(前記HMG B 1分解産物)から分離し、このカラムから流出する画分を得ることにより、更に純度の高い本抗HMG B 1分解産物抗体を取得することができる。

(iii) なお、免疫原と担体の結合物を用いて動物等に免疫した場合には、得られた抗血清又はポリクローナル抗体中に、この担体に対する抗体が存在するので、このような担体に対する抗体の除去処理を行うことが好ましい。

この除去処理方法としては、担体を、得られたポリクローナル抗体又は抗血清の溶液中

に添加して生成した凝集物を取り除くか、担体を不溶化固相に固定化してアフィニティークロマトグラフィーにより除去する方法等を用いることができる。

(7) 本抗HMG B1分解産物抗体(モノクローナル抗体)の取得方法

本抗HMG B1分解産物抗体において、モノクローナル抗体は、以下の操作により取得することができる。

モノクローナル抗体は、ケラーらの細胞融合法(G. Koehlerら, Nature, 256巻, 495~497頁, 1975年発行)によるハイブリドーマ、又はエプスタン-パーウイルス等のウイルスによる腫瘍化細胞等の抗体産生細胞により得ることができる。

細胞融合法によるモノクローナル抗体の調製は、以下の操作により行うことができる。

まず、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を、哺乳動物(マウス、ヌードマウス、ラットなど、例えば近交系マウスのBALB/c)又は鳥類(ニワトリなど)等に免疫する。

この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により適宜決められるものであるが、例えば、マウスの場合には一匹当たり一回につき0.1µg~5mgの前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を免疫注射するのが好ましい。

なお、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して免疫注射することが好ましい。

アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知なものをを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、1~2週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を追加免疫注射する。

この追加免疫注射の回数としては2~6回が一般的である。

この場合も前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)に溶解したものを静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。

この最終免疫の3~5日後に、免疫動物の脾細胞、リンパ節細胞又は末梢リンパ球等の抗体産生能を有する細胞を取得する。

この免疫動物より得られた抗体産生能を有する細胞と哺乳動物等(マウス、ヌードマウス、ラットなど)の骨髓腫細胞(ミエローマ細胞)とを細胞融合させるのであるが、ミエローマ細胞としてはヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ(HGPRT)又はチミジンキナーゼ(TK)等の酵素を欠損した細胞株のものが好ましく、例えば、BALB/cマウス由来のHGPRT欠損細胞株である、P3-X63-Ag8株(ATCC TIB9)、P3-X63-Ag8-U1株(癌研究リサーチソースバンク(JCRB)9085)、P3-NS1-1-Ag4-1株(JCRB 0009)、P3-X63-Ag8・653株(JCRB 0028)又はSP2/O-Ag-14株(JCRB 0029)等を用いることができる。

細胞融合は、各種分子量のポリエチレングリコール(PEG)、リボソームもしくはセンダイウイルス(HVJ)等の融合促進剤を用いて行うか、又は電気融合法により行うことができる。

ミエローマ細胞がHGPRT欠損株又はTK欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選別用培地(HAT培地)を用いることにより、抗体産生能を有する細胞とミエローマ細胞の融合細胞(ハイブリドーマ)のみを選択的に培養し、増殖させることができる。

10

20

30

40

50

このようにして得られたハイブリドーマの培養上清を、前記の免疫原、前記の免疫原と担体の結合物、又は前記HMG B 1分解産物等を用いてELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法により測定することにより、本抗HMG B 1分解産物抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

また、前記のハイブリドーマの培養上清を、HMG B 1等を用いてELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法により測定することにより、HMG B 1等には結合しない抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

この2種類のハイブリドーマ選択方法と限界希釈法等の公知のクローニングの方法を組み合わせることで、本抗HMG B 1分解産物抗体(モノクローナル抗体)、即ち「HMG B 1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、HMG B 1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍である、HMG B 1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に結合する抗体」(モノクローナル抗体)の産生細胞株を単離して得ることができる。

このモノクローナル抗体産生細胞株を適当な培地で培養して、その培養上清から本抗HMG B 1分解産物抗体(モノクローナル抗体)を得ることができるが、培地としては無血清培地又は低濃度血清培地等を用いてもよく、この場合は抗体の精製が容易となる点で好ましく、DMEM培地、RPMI 1640培地又はASF培地103等の培地を用いることができる。

また、モノクローナル抗体産生細胞株を、これに適合性がありプリスタン等であらかじめ刺激した哺乳動物の腹腔内に注入し、一定期間の後、腹腔にたまった腹水より本抗HMG B 1分解産物抗体(モノクローナル抗体)を得ることもできる。

このようにして得られたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法又はアフィニティークロマトグラフィーなどの方法、あるいはこれらの方法を組み合わせること等により、精製された本抗HMG B 1分解産物抗体(モノクローナル抗体)を得ることができる。

〔II〕試料に含まれるHMG B 1分解産物の免疫学的測定方法

(1) 総論

本発明の試料に含まれるHMG B 1分解産物の免疫学的測定方法(以下、「本発明の免疫学的測定方法」又は「本発明の測定方法」ということがある。)は、次の(a)の抗体及び(b)の抗体を使用する測定方法である。

(a) 本抗HMG B 1分解産物抗体。

(b) 前記HMG B 1分解産物に結合する抗体であって、前記HMG B 1分解産物に対する親和性が高い抗体。

前記の(b)の抗体としては、当該抗体の濃度が0.625~2.5ng/mLの範囲の少なくともいずれかの濃度(好ましくは当該範囲のすべての濃度)において、HMG B 1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化したELISA法で、

(イ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が0.5以上となる抗体、又は

(ロ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマMD78(FERM P-18405)より産生される抗体における当該吸光度の値の6倍以上となる抗体が好ましい。

前記の(a)の抗体(本抗HMG B 1分解産物抗体)としては、HMG B 1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、HMG B 2に対する親和性及びHMG B 2のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性とそれぞれ比較して、各々少なくとも10倍であるものが好ましい。(抗体濃度: 0.625~5ng/mLの範囲の少なくともいずれかの濃度(好ましくは当該範囲のすべての濃度))

また、前記の(a)の抗体(本抗HMG B 1分解産物抗体)、及び/又は前記の(b)

の抗体が、モノクローナル抗体であることが好ましい。

なお、前記の ( a ) の抗体 ( 本抗 H M G B 1 分解産物抗体 )、及び / 又は前記の ( b ) の抗体は、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体を含む抗血清、モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント ( F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> 又は F a b ' など ) 等のいずれのものであってもよい。

また、本発明の測定方法は、固相化抗体及び標識抗体を用いるものであって、前記の ( a ) の抗体及び前記の ( b ) の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用されるものであってもよい。

本発明の測定方法は、前記の ( a ) の抗体及び前記の ( b ) の抗体を使用することにより、前記 H M G B 1 分解産物に対する特異性が高く、前記 H M G B 1 分解産物のみを正確に定量測定することができる。

なお、前記の ( a ) の抗体は、前記の通りの抗体であれば特に制限なく使用することができる。

また、前記の ( b ) の抗体は、前記の通りの抗体であれば特に制限なく使用することができる。

なお、前記の ( a ) の抗体及び前記の ( b ) の抗体はそれぞれ、1種類のものだけではなく、複数種類のを同時に使用してもよい。

( 2 ) 前記の ( a ) の抗体

前記の ( a ) の抗体、すなわち本抗 H M G B 1 分解産物抗体の詳細については、前記の「 [ I ] 抗 H M G B 1 分解産物抗体」の項などに記載した通りである。

( 3 ) 前記の ( b ) の抗体

( i ) 前記の ( b ) の抗体は、「前記 H M G B 1 分解産物に結合する抗体であって、前記 H M G B 1 分解産物に対する親和性が高い抗体」である。

なお、前記の ( b ) の抗体としては、当該抗体の濃度が 0 . 6 2 5 ~ 2 . 5 n g / m L の範囲の少なくともいずれかの濃度 ( 好ましくは当該範囲のすべての濃度 ) において、H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化した E L I S A 法で、

( イ ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が 0 . 5 以上となる抗体、又は

( ロ ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマ M D 7 8 ( F E R M P - 1 8 4 0 5 ) より産生される抗体における当該吸光度の値の 6 倍以上となる抗体が好ましい。

( i i ) 親和性の測定方法

前記の ( b ) の抗体は、前記の通り、前記 H M G B 1 分解産物に結合する抗体であって、前記 H M G B 1 分解産物に対する親和性が高い抗体である。

なお、前記の ( b ) の抗体としては、当該抗体の濃度が 0 . 6 2 5 ~ 2 . 5 n g / m L の範囲の少なくともいずれかの濃度 ( 好ましくは当該範囲のすべての濃度 ) において、H M G B 1 のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化した E L I S A 法で、

( イ ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が 0 . 5 以上となる抗体、又は

( ロ ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマ M D 7 8 ( F E R M P - 1 8 4 0 5 ) より産生される抗体における当該吸光度の値の 6 倍以上となる抗体が好ましい。

( i i - 1 ) 前記抗体 ( イ ) における吸光度の測定方法

前記抗体 ( イ ) における吸光度の測定方法は、特に限定されるものではないが、例えば、次のように行うことができる。〔本発明における「抗体の親和性の測定方法」と同じ。

〕

10

20

30

40

50

## 〔 A 〕測定試薬の調製

## 〔 i 〕HMGB1分解産物固相化マイクロプレート

前記HMGB1分解産物をリン酸緩衝生理食塩水により $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるように調製したものを、各々96穴マイクロタイタープレート〔Thermo Fisher Scientific Inc.社(米国・イリノイ州)〕のウェルに $100\mu\text{L}$ 注入し、25℃で18時間静置し、前記HMGB1分解産物を、前記マイクロタイタープレートのウェルに固相化した。

次に、このマイクロタイタープレートのウェル中の液を除去した後、0.5%カゼイン及び0.1%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩水(TBS)〔pH8.0〕の $250\mu\text{L}$ ずつを各ウェルに分注し、ブロッキング処理を行った。この後、各ウェルの上をプレートシールで封をし、蒸発しないようにして、使用時まで冷蔵保存した。これを、HMGB1分解産物固相化マイクロプレートとした。

10

## 〔 ii 〕POD標識抗マウスIgG抗体液

POD標識抗マウスIgG抗体〔DakoCytomation社(デンマーク国)〕を、0.5%カゼインナトリウム、及び $100\text{mM}$ 塩化ナトリウムを含む $50\text{mM}$ トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)によって1000倍希釈した。これをPOD標識抗マウスIgG抗体液とした。

## 〔 iii 〕洗浄液

0.05%のTween20を含むリン酸緩衝生理食塩水を、洗浄液とした。

## 〔 iv 〕希釈液

0.5%カゼインナトリウム、 $100\text{mM}$ 塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含む $50\text{mM}$ トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を、希釈液とした。

20

## 〔 v 〕発色液

$0.2\text{mM}$ のEDTA・2ナトリウムを含む0.045%の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩水溶液(pH2.0)を、発色液とした。

## 〔 vi 〕基質液

$5\text{mM}$ 過酸化水素、 $41\text{mM}$ クエン酸、 $0.2\text{mM}$ のEDTA・2ナトリウムを含む $60\text{mM}$ リン酸二ナトリウム水溶液(pH4.3)を、基質液とした。

## 〔 vii 〕発色基質

前記の発色液と基質液を使用前に室温に戻した上で、使用時に等量混合し、発色基質とした。

30

## 〔 viii 〕反応停止液

0.7N硫酸を、反応停止液とした。

## 〔 B 〕試料

前記抗体(b)のそれぞれを、その濃度が各々、 $0.625\text{ng}/\text{mL}$ 、 $1.25\text{ng}/\text{mL}$ 、及び/又は $2.5\text{ng}/\text{mL}$ となるように前記〔 A 〕の〔 iv 〕の希釈液により希釈して、前記3濃度の抗体溶液をそれぞれ調製した。

## 〔 C 〕測定

〔 i 〕前記〔 A 〕の〔 i 〕のHMGB1分解産物固相化マイクロプレートの各ウェルを、前記〔 A 〕の〔 iii 〕の洗浄液の $400\mu\text{L}$ で3回洗浄した。

40

〔 ii 〕次に、前記〔 B 〕の3濃度の抗体溶液それぞれの $100\mu\text{L}$ を試料として各ウェルに分注した後、25℃で2時間静置し、これらの各濃度の抗体溶液に含まれていた前記の抗体(b)を、このHMGB1分解産物固相化マイクロプレートのウェルに固相化された前記HMGB1分解産物と、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

〔 iii 〕次に、各ウェルを、前記〔 A 〕の〔 iii 〕の洗浄液の $400\mu\text{L}$ で3回洗浄した。

〔 iv 〕次に、前記〔 A 〕の〔 ii 〕のPOD標識抗マウスIgG抗体液の $100\mu\text{L}$ を各ウェルに分注し、25℃で1時間静置し、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

〔 v 〕次に、各ウェルを、前記〔 A 〕の〔 iii 〕の洗浄液の $400\mu\text{L}$ で3回洗浄した。

50

〔v i〕 次に、各ウェルに、前記〔A〕の〔v i i〕の発色基質を100 $\mu$ L分注し、室温で20分間静置し、標識酵素であるパーオキシダーゼ（POD）による発色反応を行わせた。

〔v i i〕 次に、各ウェルに、前記〔A〕の〔v i i i〕の反応停止液を100 $\mu$ L分注し、発色反応を停止させた。

〔v i i i〕 次に、各ウェルの液の吸光度（主波長：450nm、副波長：550nm）を測定し、前記の3濃度の前記の抗体（b）の抗体溶液それぞれを試料として測定した場合の吸光度を得た。

そして、この吸光度の値を前記の抗体（b）の前記HMGB1分解産物との親和性を示す値とした。

例えば、親和性を測定しようとする抗体の溶液（例えば、2.5ng/mLの濃度）を試料として、前記の通り測定を行ったときに、前記HMGB1分解産物を固相化したウェルで得られた前記吸光度差の値が1.25であった場合には、 $1.25 \div 2.5 \text{ ng/mL} = 0.5 \text{ (ng/mL)}^{-1}$ となり、この抗体は、『当該抗体の濃度が0.625~2.5ng/mLの範囲において、HMGB1のトロニン又はトロニン・トロポモジュリン複合体による分解産物を固相化したELISA法で、当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が0.5以上となる抗体である』、といえる。

すなわち、この場合、この抗体は、前記の（b）の抗体である。

（i i - 2） 前記抗体（ロ）における吸光度の測定方法

前記抗体（ロ）における吸光度の測定方法は、特に限定されるものではないが、例えば、前記「（i i - 1） 前記抗体（イ）における吸光度の測定方法」における〔A〕~〔C〕と同様にして行うことができる。〔本発明における「抗体の親和性の測定方法」と同じ。〕

例えば、親和性を測定しようとする抗体の濃度が0.625~2.5ng/mLの範囲において、前記の通り測定を行ったときに、前記HMGB1分解産物を固相化したウェルで得られた当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られた前記吸光度差の値が1.2であり、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマMD78（FERMP-18405）より産生される抗体における当該吸光度の値が0.2あった場合には、 $1.2 \div 0.2 = 6$ となり、この抗体は、『当該抗体の濃度が0.625~2.5ng/mLの範囲において、HMGB1のトロニン又はトロニン・トロポモジュリン複合体による分解産物を固相化したELISA法で、当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、前記の基準とする抗体産生細胞より産生される抗体における当該吸光度の値の6倍以上となる抗体である』、といえる。

すなわち、この場合、この抗体は、前記の（b）の抗体である。

（i i i） 免疫原

前記の（b）の抗体を取得するための免疫原としては、例えば、前記の「〔I〕抗HMGB1分解産物抗体」の「（4）免疫原」に記載の免疫原等を用いることができる。

（i v） 前記の（b）の抗体の免疫原等の取得方法

前記の（b）の抗体を取得するために動物等に免疫する免疫原等の取得方法については、例えば、前記の「〔I〕抗HMGB1分解産物抗体」の「（5）本抗HMGB1分解産物抗体の免疫原等の取得方法」に記載の取得方法等を用いることができる。

（v） 前記の（b）の抗体（ポリクローナル抗体）の取得方法

前記の（b）の抗体において、ポリクローナル抗体又は抗血清は、以下の操作により取得することができる。

（A） まず、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を哺乳動物（マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウマ等）又は鳥類（ニワトリ等）等に免疫する。

この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により決められるものであるが、例えば、ウサギの場合にはウサギ一匹当たり一回につき10 $\mu$ g~数十mgの前記免疫原、又は前記免疫原と担体の結合物を免疫注射

10

20

30

40

50

する。

なお、この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントと添加混合して免疫注射することが好ましい。

アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知のものを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、2～3週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を追加免疫注射する。この場合も、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら全採血を行い、血清を分離して前記の(b)の抗体を含む抗血清を得る。

この抗血清を、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法又はアフィニティークロマトグラフィー等の方法、あるいはこれらの方法を組み合わせて抗体の精製を行い、ポリクローナル抗体を得る。

(B) ここで得られたポリクローナル抗体について、前記(ii)の記載のように抗体の親和性を測定し、前記HMGB1分解産物に対する親和性が高い抗体を選択することにより、前記の(b)の抗体を取得することができる。

例えば、前記(ii)の記載のようにして、この抗体の親和性の測定を行ったときに、親和性を測定しようとする抗体の濃度が0.625～2.5ng/mLの範囲の少なくともいずれかの濃度(好ましくは当該範囲のすべての濃度)において、HMGB1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化したELISA法で、

(イ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が0.5以上となる抗体、又は

(ロ) 当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマMD78(FERM P-18405)より産生される抗体における当該吸光度の値の6倍以上となる抗体

は、前記HMGB1分解産物に対する親和性が高い、といえる。

なお、これを、前記HMGB1分解産物をリガンドとして固相に固定化したアフィニティークロマトグラフィーのカラムに通し接触させ、前記の(b)の抗体をこのカラムのリガンド(前記HMGB1分解産物)を介して固相に結合させるとともに、他の抗体等はこのカラムを素通りさせて分離し、その後、この固相に結合させていた前記の(b)の抗体をリガンド(前記HMGB1分解産物)から分離し、このカラムから流出する画分を得ることにより、更に純度の高い前記の(b)の抗体を取得することができる。

(C) なお、免疫原と担体の結合物を用いて動物等に免疫した場合には、得られた抗血清又はポリクローナル抗体中に、この担体に対する抗体が存在するので、このような担体に対する抗体の除去処理を行うことが好ましい。

この除去処理方法としては、担体を、得られたポリクローナル抗体又は抗血清の溶液中に添加して生成した凝集物を取り除くか、担体を不溶化固相に固定化してアフィニティークロマトグラフィーにより除去する方法等を用いることができる。

(vi) 前記の(b)の抗体(モノクローナル抗体)の取得方法

前記の(b)の抗体において、モノクローナル抗体は、以下の操作により取得することができる。

モノクローナル抗体は、ケラーらの細胞融合法(G. Koehlerら, Nature, 256巻, 495～497頁, 1975年発行)によるハイブリドーマ、又はエプスタン-パーウイルス等のウイルスによる腫瘍化細胞等の抗体産生細胞により得ることができる。

10

20

30

40

50

細胞融合法によるモノクローナル抗体の調製は、以下の操作により行うことができる。

まず、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を、哺乳動物（マウス、ヌードマウス、ラットなど、例えば近交系マウスのBALB/c）又は鳥類（ニワトリなど）等に免疫する。

この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により適宜決められるものであるが、例えば、マウスの場合には一匹当たり一回につき0.1 µg ~ 5 mgの前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を免疫注射するのが好ましい。

なお、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して免疫注射することが好ましい。

アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知なものをを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、1 ~ 2週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を追加免疫注射する。

この追加免疫注射の回数としては2 ~ 6回が一般的である。

この場合も前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解したものを静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。

この最終免疫の3 ~ 5日後に、免疫動物の脾細胞、リンパ節細胞又は末梢リンパ球等の抗体産生能を有する細胞を取得する。

この免疫動物より得られた抗体産生能を有する細胞と哺乳動物等（マウス、ヌードマウス、ラットなど）の骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）とを細胞融合させるのであるが、ミエローマ細胞としてはヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPR T）又はチミジンキナーゼ（TK）等の酵素を欠損した細胞株のものが好ましく、例えば、BALB/cマウス由来のHGPR T欠損細胞株である、P3-X63-Ag8株（ATCC TIB9）、P3-X63-Ag8-U1株（癌研究リサーチソースバンク（JCRB）9085）、P3-NS1-1-Ag4-1株（JCRB 0009）、P3-X63-Ag8・653株（JCRB 0028）又はSP2/O-Ag-14株（JCRB 0029）等を用いることができる。

細胞融合は、各種分子量のポリエチレングリコール（PEG）、リポソームもしくはセンダイウイルス（HVJ）等の融合促進剤を用いて行うか、又は電気融合法により行うことができる。

ミエローマ細胞がHGPR T欠損株又はTK欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選別用培地（HAT培地）を用いることにより、抗体産生能を有する細胞とミエローマ細胞の融合細胞（ハイブリドーマ）のみを選択的に培養し、増殖させることができる。

このようにして得られたハイブリドーマの培養上清を、前記の免疫原、前記の免疫原と担体の結合物、又は前記HMG B1分解産物等を用いてELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法により測定することにより、前記HMG B1分解産物に対する親和性が高い抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

そして、このようにして選択したハイブリドーマの培養上清について、前記(i i)の記載のように抗体の親和性を測定し、前記HMG B1分解産物に対する親和性が高い抗体を選択することにより、前記の(b)の抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

これらのハイブリドーマ選択方法と限界希釈法等の公知のクローニングの方法を組み合

10

20

30

40

50

わせて行うことにより、前記の ( b ) の抗体 ( モノクローナル抗体 ) 、即ち「前記 H M G B 1 分解産物に結合する抗体であって、前記 H M G B 1 分解産物に対する親和性が高い抗体」 ( モノクローナル抗体 ) の産生細胞株を単離して得ることができる。

このモノクローナル抗体産生細胞株を適当な培地で培養して、その培養上清から前記の ( b ) の抗体 ( モノクローナル抗体 ) を得ることができるが、培地としては無血清培地又は低濃度血清培地等を用いてもよく、この場合は抗体の精製が容易となる点で好ましく、D M E M 培地、R P M I 1 6 4 0 培地又は A S F 培地 1 0 3 等の培地を用いることができる。

また、モノクローナル抗体産生細胞株を、これに適合性がありプリスタン等であらかじめ刺激した哺乳動物の腹腔内に注入し、一定期間の後、腹腔にたまった腹水より前記の ( b ) の抗体 ( モノクローナル抗体 ) を得ることもできる。

このようにして得られたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法又はアフィニティークロマトグラフィーなどの方法、あるいはこれらの方法を組み合わせること等により、精製された前記の ( b ) の抗体 ( モノクローナル抗体 ) を得ることができる。

#### ( 4 ) 免疫学的測定方法

本発明の免疫学的測定方法は、試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法であって、前記の ( a ) の抗体 [ 本抗 H M G B 1 分解産物抗体 ] 及び前記の ( b ) の抗体を使用するものであれば、特にその測定原理は限定されるものではなく、所期の効果を奏するものである。

この免疫学的測定方法としては、例えば、酵素免疫測定法 ( E L I S A 、 E I A ) 、蛍光免疫測定法 ( F I A ) 、放射免疫測定法 ( R I A ) 、発光免疫測定法 ( L I A ) 、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法、赤血球凝集反応法、粒子凝集反応法、特開平 9 - 2 2 9 9 3 6 号公報及び特開平 1 0 - 1 3 2 8 1 9 号公報などに記載された測定対象物質 ( 被検物質 ) に対する特異的結合物質が固定され、これで被覆された面を有する担体、及び測定対象物質 ( 被検物質 ) に対する特異的結合物質が固定された粒子を用いる測定法、又は D a h l b e a c k らが示した E L S A 法 ( E n z y m e - l i n k e d L i g a n d s o r b e n t A s s a y ) ( T h r o m b . H a e m o s t . , 7 9 巻 , 7 6 7 ~ 7 7 2 頁 , 1 9 9 8 年発行 ; W O 9 8 / 2 3 9 6 3 ) 等を挙げることができる。

そして、前記の免疫学的測定方法においては、サンドイッチ法、競合法又は均一系法 ( ホモジニアス系法 ) 等のいずれの手法においても、本発明の免疫学的測定方法を適用することができる。

また、本発明の免疫学的測定方法における測定は、用手法により行ってもよいし、又は分析装置等の装置を用いて行ってもよい。

#### ( 5 ) 試料

本発明の免疫学的測定方法における試料としては、ヒトの血液、血清、血漿、尿、精液、髄液、唾液、汗、涙、腹水若しくは羊水などの体液 ; 大便 ; 血管若しくは肝臓などの臓器 ; 組織 ; 細胞 ; 又は大便、臓器、組織若しくは細胞などの抽出液等、前記 H M G B 1 分解産物が含まれる可能性のある生体試料等の試料であれば対象となる。

#### ( 6 ) 標識抗体を用いた免疫学的測定方法

本発明の免疫学的測定方法を、標識物質を抗体 ( 若しくは抗原 ) に結合した標識抗体 ( 若しくは標識抗原 ) 、及び抗体 ( 若しくは抗原 ) を固相担体に固相化した固相化抗体 ( 若しくは固相化抗原 ) を用いる、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の免疫学的測定方法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法等により行うことができるが、サンドイッチ法により実施することが好ましい。

本発明の免疫学的測定方法を、前記のサンドイッチ法により実施する時には、前記の ( a ) の抗体及び前記の ( b ) の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用されるものであってもよい。

前記の免疫学的測定方法に用いる固相化抗体 ( 若しくは固相化抗原 ) に使用する固相担

10

20

30

40

50

体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ラテックス、リポソーム、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、セラミックス、金属又は磁性体等の材質よりなる、マイクロカプセル、ビーズ、マイクロプレート（マイクロタイプレート）、試験管、スティック又は試験片等の形状の固相担体を使用することができる。

固相化抗体（若しくは固相化抗原）は、前記の（a）の抗体若しくは前記の（b）の抗体等の抗体又は抗原と固相担体とを物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により吸着、結合させて調製することができる。

物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体（若しくは抗原）と固相担体を緩衝液などの溶液中で混合し接触させたり、又は緩衝液などに溶解した抗体（若しくは抗原）と固相担体を接触させること等により行うことができる。

また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」，臨床病理刊行会，1983年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」，東京化学同人，1991年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体（若しくは抗原）と固相担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体（若しくは抗原）と固相担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基などと反応させること等により行うことができる。

また、更に非特異的反応や固相担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要があるれば、抗体（若しくは抗原）を固相化させた固相担体の表面又は内壁面に、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチン若しくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、固相担体のブロッキング処理（マスキング処理）を行ってもよい。

標識物質としては、酵素免疫測定法の場合には、例えば、パーオキシダーゼ（POD）、アルカリホスファターゼ（ALP）、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素又はアミラーゼ等を用いることができる。

また、蛍光免疫測定法の場合には、例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート又はジクロロトリアジンイソチオシアネート等を用いることができる。

そして、放射免疫測定法の場合には、例えば、トリチウム、ヨウ素125又はヨウ素131等を用いることができる。

また、発光免疫測定法においては、例えば、NADH - FMNH<sub>2</sub> - ルシフェラーゼ反応系、ルミノール - 過酸化水素 - POD反応系、アクリジニウムエステル反応系、又はジオキセタン化合物反応系などの反応系に係わる物質等を用いることができる。

前記の（a）の抗体又は前記の（b）の抗体等の抗体（若しくは抗原）と酵素等の標識物質との結合法は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」，臨床病理刊行会，1983年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」，東京化学同人，1991年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体（若しくは抗原）と標識物質をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体（若しくは抗原）と標識物質のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより結合を行うことができる。

前記の酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の免疫学的測定方法における測定の操作法は公知の方法（日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」，臨床病理刊行会，1983年発行；石川榮治ら編「酵素免疫測定法」，第3版，医学書院，1987年発行；北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」，共立出版，1987年発行）等により行うことができる。

10

20

30

40

50

例えば、固相化抗体（「固相担体 - 抗体」）と試料を反応させ、同時に標識抗体（「抗体 - 標識物質」）を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させることにより、「固相担体 - 抗体」 = 「前記 H M G B 1 分解産物」 = 「抗体 - 標識物質」の複合体を形成させる。

そして、未結合の標識抗体を洗浄分離して、「固相担体 - 抗体」 = 「前記 H M G B 1 分解産物」 = 「抗体 - 標識物質」の結合により固相担体に間接的に結合した標識抗体の量又は未結合の標識抗体の量を測ることにより試料に含まれていた前記 H M G B 1 分解産物の量（濃度）を測定することができる。

具体的には、酵素免疫測定法の場合は、抗体に標識した酵素に、その至適条件下等で基質を反応させ、その酵素反応生成物の量を光学的方法等により測定する。

また、蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を測定する。

そして、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。

更に、発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定する。

#### （ 7 ）凝集反応法による免疫学的測定方法

本発明の免疫学的測定方法を、免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、又は目視的に測ることにより、試料に含まれていた前記 H M G B 1 分解産物の量（濃度）を測定する、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫学的測定方法によっても実施することができる。

前記の（ a ）の抗体及び / 又は前記の（ b ）の抗体を固相担体に固相化させて用いる場合には、固相担体としては、例えば、ポリスチレン、スチレン - スチレンスルホン酸塩共重合体、アクリロニトリル - ブタジエン - スチレン共重合体、塩化ビニル - アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル - アクリル酸共重合体、ポリアクロレイン、スチレン - メタクリル酸共重合体、スチレン - グリシジル（メタ）アクリル酸共重合体、スチレン - ブタジエン共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、赤血球、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、セラミックス、金属又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。

前記の（ a ）の抗体及び / 又は前記の（ b ）の抗体を固相担体に固相化させる方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により行うことができる。

物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体と固相担体を緩衝液等の溶液中で混合し接触させたり、又は緩衝液等に溶解した抗体と固相担体を接触させること等により行うことができる。

また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第 5 3 号 臨床検査のためのイムノアッセイ - 技術と応用 - 」，臨床病理刊行会，1983 年発行；日本生化学会編「新生化学実験講座 1 タンパク質 I V 」，東京化学同人，1991 年発行等に記載の公知の方法に従い、抗体と固相担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル又はマレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体と固相担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させること等により行うことができる。

また、更に非特異的反応や固相担体の自然凝集等を抑制するために処理を行う必要がある場合は、前記の（ a ）の抗体及び / 又は前記の（ b ）の抗体を固相化させた固相担体の表面又は内壁面に、ウシ血清アルブミン（ B S A ）、ヒト血清アルブミン（ H S A ）、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチン若しくはその塩などのタンパク質、界面活性剤又は脱脂粉乳等を接触させ被覆させること等の公知の方法により処理して、固相担体のブロッキング処理（マスキング処理）を行ってもよい。

なお、ラテックス比濁法を測定原理とする場合、固相担体として用いるラテックス粒子の粒径については、特に制限はないものの、ラテックス粒子が前記の（ a ）の抗体又は前記の（ b ）の抗体及び測定対象物質（前記 H M G B 1 分解産物）を介して結合し、凝集塊を生成する程度、及びこの生成した凝集塊の測定の容易さ等の理由より、ラテックス粒子

10

20

30

40

50

の粒径は、その平均粒径が、 $0.04 \sim 1 \mu\text{m}$ であることが好ましい。

また、ラテックス比濁法を測定原理とする場合、前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体を固相化させたラテックス粒子を含ませる濃度については、試料中に含まれる前記HMG B 1分解産物の濃度、前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体のラテックス粒子表面上での分布密度、ラテックス粒子の粒径、試料と測定試薬の混合比率等の各種条件により最適な濃度は異なるので一概にいうことはできない。

しかし、通常は、試料と測定試薬が混合され、ラテックス粒子に固相化された前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体と試料中に含まれていた「前記HMG B 1分解産物」との抗原抗体反応が行われる測定反応時に、前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体を固相化させたラテックス粒子の濃度が、反応混合液中において $0.005 \sim 1\%$ (w/v)となるようにするのが一般的であり、この場合、反応混合液中においてこのような濃度になるような濃度の「前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体を固相化させたラテックス粒子」を測定試薬に含ませる。

また、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の間接凝集反応法を測定原理とする場合、固相担体として用いる粒子の粒径については、特に制限はないものの、その平均粒子径が $0.01 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲内にあることが好ましく、 $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲内にあることがより好ましい。

そして、これらの粒子の比重は、 $1 \sim 10$ の範囲内にあることが好ましく、 $1 \sim 2$ の範囲内にあることがより好ましい。

なお、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の間接凝集反応法を測定原理とする場合の測定に使用する容器としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリメタクリレートなどからなる、試験管、マイクロプレート(マイクロタイタープレート)又はトレイ等を挙げることができる。

これらの容器の溶液収容部分(マイクロプレートのウェル等)の底面は、U型、V型又はUV型等の底面中央から周辺にかけて傾斜を持つ形状であることが好ましい。

本発明の免疫学的測定方法を、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫学的測定方法により実施する場合には、溶媒として、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

前記の免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫学的測定方法における測定の操作法は、公知の方法等により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と前記の「前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体」、又は試料と固相担体に固相化させた「前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体」を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光や散乱光を測定する。

また、目視的に測定する場合には、プレートやマイクロプレート等の前記容器中で、試料と固相担体に固相化させた「前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体」を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。

なお、この目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

〔III〕試料に含まれるHMG B 1分解産物の免疫学的測定試薬

(1) 総論

本発明の試料に含まれるHMG B 1分解産物の免疫学的測定試薬(以下「本発明の免疫学的測定試薬」又は「本発明の測定試薬」ということがある。)は、次の(a)の抗体及び(b)の抗体を含有する測定試薬である。

(a) 本抗HMG B 1分解産物抗体。

(b) 前記HMG B 1分解産物に結合する抗体であって、前記HMG B 1分解産物に対する親和性が高い抗体。

前記の(b)の抗体としては、当該抗体の濃度が $0.625 \sim 2.5 \text{ ng/mL}$ の範囲

10

20

30

40

50

の少なくともいずれかの濃度（好ましくは当該範囲のすべての濃度）において、H M G B 1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物を固相化したE L I S A法で、

（イ）当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値を当該抗体の濃度の値で除したときの値が0.5以上となる抗体、又は

（ロ）当該分解産物に結合する当該抗体の量を測定するときに得られる吸光度の値が、基準とする抗体産生細胞であるハイブリドーマM D 7 8（F E R M P - 1 8 4 0 5）より産生される抗体における当該吸光度の値の6倍以上となる抗体が好ましい。

前記の（a）の抗体（本抗H M G B 1分解産物抗体）としては、H M G B 1のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性が、H M G B 2に対する親和性及びH M G B 2のトロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物に対する親和性とそれぞれ比較して、各々少なくとも10倍であるものが好ましい。（抗体濃度：0.625～5 ng/mLの範囲の少なくともいずれかの濃度（好ましくは当該範囲のすべての濃度））

また、前記の（a）の抗体（本抗H M G B 1分解産物抗体）、及び/又は前記の（b）の抗体が、モノクローナル抗体であることが好ましい。

なお、前記の（a）の抗体（本抗H M G B 1分解産物抗体）、及び/又は前記の（b）の抗体は、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体を含む抗血清、モノクローナル抗体、又はこれらの抗体のフラグメント（F a b、F（a b'）<sub>2</sub>又はF a b'など）等のい

ずれのものであってもよい。

また、本発明の測定試薬は、固相化抗体及び標識抗体を用いるものであって、前記の（a）の抗体及び前記の（b）の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用されるものであってもよい。

本発明の測定試薬は、前記の（a）の抗体及び前記の（b）の抗体を使用することにより、前記H M G B 1分解産物に対する特異性が高く、前記H M G B 1分解産物のみを正確に定量測定することができる。

なお、前記の（a）の抗体は、前記の通りの抗体であれば特に制限なく使用することができる。

また、前記の（b）の抗体は、前記の通りの抗体であれば特に制限なく使用することができる。

なお、前記の（a）の抗体及び前記の（b）の抗体はそれぞれ、1種類のものだけではなく、複数種類のを同時に使用してもよい。

（2）前記の（a）の抗体

前記の（a）の抗体、すなわち本抗H M G B 1分解産物抗体の詳細については、前記の「〔I〕抗H M G B 1分解産物抗体」の項などに記載した通りである。

（3）前記の（b）の抗体

前記の（b）の抗体の詳細については、前記の「〔II〕試料に含まれるH M G B 1分解産物の免疫学的測定方法」の「（3）前記の（b）の抗体」の項などに記載した通りである。

（4）免疫学的測定試薬

本発明の免疫学的測定試薬においては、その測定原理として、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法若しくは発光免疫測定法などの標識物質を用いる免疫学的測定方法（サンドイッチ法又は競合法等）のもの、又は免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法若しくは粒子凝集反応法などの免疫複合体凝集物の生成を測定する免疫学的測定方法のもの等、特に制限なく適用することができる。

例えば、酵素免疫測定法（E L I S A法）、蛍光免疫測定法又は発光免疫測定法等におけるサンドイッチ法を測定原理とする免疫学的測定試薬においては、前記の（a）の抗体及び前記の（b）の抗体のうち、いずれか一方の抗体が固相化抗体として使用され、他の一方の抗体が標識抗体として使用されるものであってもよい。

10

20

30

40

50

また、例えば、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等を測定原理とする免疫学的測定試薬においては、ラテックス粒子等の固相担体に固相化させる抗体が前記の(a)の抗体及び/又は前記の(b)の抗体であればよく、また、免疫比濁法を測定原理とする測定試薬においては、抗体として前記の(a)の抗体及び前記の(b)の抗体を用いればよい。

なお、本発明の免疫学的測定試薬は、前記の(a)の抗体及び前記の(b)の抗体を含有することを特徴とするものであるので、本発明の免疫学的測定試薬に含有させる「前記の(a)の抗体」の詳細は前記の「〔I〕抗HMG B 1分解産物抗体」の項などに記載した通りであり、また、本発明の免疫学的測定試薬に含有させる「前記の(b)の抗体」の詳細は前記の「〔II〕試料に含まれるHMG B 1分解産物の免疫学的測定方法」の「(3)前記の(b)の抗体」の項などに記載した通りであり、本発明の免疫学的測定試薬の測定原理などの詳細は前記の「〔II〕試料に含まれるHMG B 1分解産物の免疫学的測定方法」の項などに記載した通りである。

#### (5) その他の試薬成分

本発明の免疫学的測定試薬において、溶媒としては、各種の水系溶媒を用いることができる。

この水系溶媒としては、例えば、精製水、生理食塩水、又は、トリス緩衝液、リン酸緩衝液若しくはリン酸緩衝生理食塩水などの各種緩衝液等を挙げることができる。

この緩衝液のpHについては、適宜適当なpHを選択して用いればよく、特に制限はないものの、通常は、pH 3 ~ 12の範囲内のpHを選択して用いることが一般的である。

また、本発明の免疫学的測定試薬には、前記の(a)の抗体若しくは前記の(b)の抗体などの抗体を固相担体に固相化した「固相化抗体」、及び/又は前記の(b)の抗体若しくは前記の(a)の抗体などの抗体と酵素などの標識物質を結合させた「標識抗体」等の試薬成分の他に、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)、卵白アルブミン、カゼイン、ゼラチン若しくはその塩などのタンパク質；各種塩類；各種糖類；脱脂粉乳；正常ウサギ血清などの各種動物血清；アジ化ナトリウム若しくは抗生物質などの各種防腐剤；活性化物質；反応促進物質；ポリエチレングリコールなどの感度増加物質；非特異的反応抑制物質；又は、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤などの各種界面活性剤等の1種又は2種以上を適宜含有させてもよい。

そして、これらを測定試薬に含有させる際の濃度は特に限定されるものではないが、0.001 ~ 10% (w/v)が好ましく、特に0.01 ~ 5% (w/v)が好ましい。

なお、前記の界面活性剤としては、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、デカグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステロール、フィトスタノール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油、硬化ヒマシ油若しくはポリオキシエチレンラノリンなどの非イオン性界面活性剤；酢酸ベタインなどの両性界面活性剤；アミン塩若しくは第4級アンモニウム塩などの陽イオン性界面活性剤；又は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩若しくはポリオキシエチレンアルキルエーテル酢酸塩などの陰イオン性界面活性剤等を挙げることができる。

#### (6) 測定試薬の構成

本発明の免疫学的測定試薬は、そのもの単独にて、試料に含まれる前記HMG B 1分解産物の測定に使用することができる。そして、そのもの単独にて、販売することができる。

また、本発明の免疫学的測定試薬は、他の試薬と組み合わせて、試料に含まれる前記HMG B 1分解産物の測定に使用することもできる。そして、他の試薬と組み合わせて、販売することもできる。

前記の他の試薬としては、例えば、緩衝液、試料希釈液、試薬希釈液、標識物質を含有

10

20

30

40

50

する試薬、発色などのシグナルを生成する物質を含有する試薬、発色などのシグナルの生成に關与する物質を含有する試薬、校正（キャリブレーション）を行うための物質を含有する試薬、又は精度管理を行うための物質を含有する試薬等を挙げることができる。

そして、前記の他の試薬を第1試薬とし、本発明の免疫学的測定試薬を第2試薬としたり、又は本発明の免疫学的測定試薬を第1試薬とし、前記の他の試薬を第2試薬としたりして、適宜様々な組合せにて使用、及び販売を行うことができる。

また、本発明の免疫学的測定試薬は、第1試薬及び第2試薬、又は前記のその他の試薬などの複数の構成試薬等からなる測定試薬キットであってもよい。

#### 【実施例】

##### 【0010】

以下、実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

〔参考例1〕（HMGB1、HMGB1分解産物、HMGB2、及びHMGB2分解産物の調製）

HMGB1、HMGB1のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物、HMGB2、及びHMGB2のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解産物それぞれの調製を下記のようにして行った。

##### 〔1〕 HMGB1及びHMGB2の調製

（1） まず、ウシの胸腺500gを、140mMの塩化ナトリウム及び0.5mMのPMSEを含む600mLの緩衝液中で破碎を行った。

（2） 次に、この破碎物を遠心分離機で遠心分離を行い、その上澄み液を除去した。

（3） これに、140mMの塩化ナトリウム及び0.5mMのPMSEを含む緩衝液を加えて攪拌した後、遠心分離機で遠心分離を行い、その上澄み液を除去した。この洗浄操作を2回繰り返して行った。

（4） 次に、得られた沈殿物に、0.75Mの過塩素酸の300mLを加えた。

そして、遠心分離機で遠心分離した後、上澄み液を分取した。残った沈殿物に0.75Mの過塩素酸の400mLを加えた。これについても、遠心分離機で遠心分離した後、上澄み液を分取した。この上澄み液と先に分取した上澄み液とを合わせた。なお、沈殿物は廃棄した。

（5） 前記の合わせた上澄み液に0.75Mの過塩素酸を加えて、全体の容量を1,000mLとした。次に、遠心分離機で遠心分離した後、上澄み液をグラスフィルター（グレード4）で濾過した。

（6） 前記の濾過の濾液に、3,500mLのアセトンと21mLの濃塩酸の混合液を加えた。濁りが生じてくるので、遠心分離機で遠心分離して、上澄み液を分取した。この上澄み液に、アセトン2,500mLを加えた。そして、再度、濁りが生じてくるので、これを遠心分離機で遠心分離して、上澄み液を分離し、残った沈殿物を集めた。

（7） この集めた沈殿物を室温で自然乾燥させた。以上の操作により、HMGB1及びHMGB2を含むタンパク質画分が、およそ200mg得られた。

（8） 前記のHMGB1及びHMGB2を含むタンパク質画分を、200mM塩化ナトリウムを含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）の10mLに溶解した後、この200mM塩化ナトリウムを含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）で十分に透析を行った。

（9） この透析の後、7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）で平衡化しておいたCM-セファデックスC25のカラムに添加した。そしてその後、200mM塩化ナトリウムを含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）により溶出させて、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。

（10） ここで溶出した各画分を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、その易動度よりHMGB1を含む画分、及びHMGB2を含む画分を各々特定した。

以上の操作により、HMGB1及びHMGB2をそれぞれ調製した。

##### 〔2〕 HMGB1のトロンビン又はトロンビン・トロンボモジュリン複合体による分解

10

20

30

40

50

## 産物の調製

H M G B 1 の トロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物の調製を次のようにして行った。

( 1 ) 前記〔 1 〕において調製した H M G B 1 ( 3 0 0 μ g / m L ) に、トロンピン〔 G E H e a l t h c a r e B i o - S c i e n c e s 社 ( スウェーデン国 ) 〕を 1 0 0 U / m L となるように添加し〔場合により更に、遺伝子組み換え可溶性トロンボモジュリン ( 旭化成ファーマ社〔日本国〕) を含んでもよい〕、37 で 3 時間インキュベートした。

( 2 ) 前記 ( 1 ) の反応により、H M G B 1 の 1 0 番目のアルギニン ( R 1 0 ) と 1 1 番目のグリシン ( G 1 1 ) の間を切断し、新たに露呈した N 末端「 G K M S S . . . . . 」を有する H M G B 1 の分解産物を生成させ、すなわち前記 H M G B 1 分解産物を調製した。

〔 3 〕 H M G B 2 の トロンピン又はトロンピン・トロンボモジュリン複合体による分解産物の調製

前記〔 1 〕において調製した H M G B 2 について、前記〔 2 〕の記載の通りに操作を行い、前記 H M G B 2 分解産物の調製を行った。

〔参考例 2〕 ( 調製した H M G B 1 分解産物等の確認 )

前記参考例 1 で調製した H M G B 1、前記 H M G B 1 分解産物、H M G B 2、及び前記 H M G B 2 分解産物を、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で確認した。

## 1 . 試薬

次の ( 1 ) ~ ( 4 ) の試薬をそれぞれ調製又は用意した。

( 1 ) S D S - ポリアクリルアミドゲル

F u n a k o s h i E a s y - G e l ( I I I ) プリキャスト・ゲル ( 1 5 % ) ( フナコシ社〔日本国〕) を使用した。

( 2 ) 泳動槽用緩衝液

トリス ( ヒドロキシメチル ) アミノメタン〔 T r i s 〕 1 . 5 g、ドデシル硫酸ナトリウム〔 S D S 〕 0 . 5 g、及びグリシン 7 . 2 g を純水に添加、混合した後 5 0 0 m L とし、泳動槽用緩衝液〔 0 . 1 % S D S - 1 9 2 m M グリシン - 2 5 m M トリス緩衝液〕を調製した。

( 3 ) クマシーブリリアントブルー染色液

Q u i c k - C B B ( 和光純薬工業社〔日本国〕) を使用した。

( 4 ) 試料処理液

ドデシル硫酸ナトリウム〔 S D S 〕 0 . 4 g、2 - メルカプトエタノール 1 . 2 m L、1 M のトリス ( ヒドロキシメチル ) アミノメタン〔 T r i s 〕 - 塩酸緩衝液 ( p H 6 . 8 ) の 1 m L、及びグリセリン 2 m L を純水に添加、混合した後 1 0 m L とし、試料処理液〔 4 % S D S - 1 2 % 2 - メルカプトエタノール - 2 0 % グリセリン - 1 0 0 m M トリス緩衝液〕を調製した。

## 2 . 試料

次の前記参考例 1 の〔 1 〕 ~〔 3 〕で調製した H M G B 1、前記 H M G B 1 分解産物、H M G B 2、及び前記 H M G B 2 分解産物をそれぞれ試料とした。また、次の分子量マーカー及びトロンピンも試料とした。

( a ) 分子量マーカー〔 P r e c i s i o n P l u s P r o t e i n A l l B l u e S t a n d a r d s マーカー ; マーカー分子量 1 0 K D a、1 5 K D a、2 0 K D a、2 5 K D a、3 7 K D a、5 0 K D a、7 5 K D a、1 0 0 K D a、1 5 0 K D a 及び 2 5 0 K D a ; B I O - R A D L a b o r a t o r i e s 社 ( 米国 ) 〕

( b ) H M G B 1

( c ) 前記 H M G B 1 分解産物

( d ) H M G B 2

( e ) 前記 H M G B 2 分解産物

( f ) トロンピン〔 G E H e a l t h c a r e B i o - S c i e n c e s 社 ( スウェーデン国 ) 〕

10

20

30

40

50

ーデン国) ]

### 3. 電気泳動

前記1で調製した試薬を使用し、前記2の試料のそれぞれについて、次の操作によりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法での電気泳動を行った。

(1) 前記2の(b)~(f)の試料のそれぞれについて、前記1の(4)の試料処理液と1:1の量比で混合し、100 で5分間処理した。

(2) 下部泳動槽に前記1の(2)の泳動槽用緩衝液を入れた。次に、前記1の(1)のゲルを泳動槽にセットした。そして次に、上部泳動槽に前記1の(2)の泳動槽用緩衝液を入れた。

(3) 前記(1)の処理を行った各試料の10 $\mu$ L及び前記2の(a)の分子量マーカーの試料2 $\mu$ Lのそれぞれについて、前記(2)のゲルのコウム穴に注入した。

なお、このゲルに注入した前記(1)の処理を行った試料及び前記2の(a)の分子量マーカーの試料であるが、レーン1に前記の「分子量マーカー」を、その右側のレーン2に前記の「HMGB1」を、その右側のレーン3に前記の「前記HMGB1分解産物」を、その右側のレーン4に前記の「HMGB2」を、その右側のレーン5に前記の「前記HMGB2分解産物」を、そしてその右側のレーン6に前記の「トロニン」を注入した。

(4) 次に、20mAの電流で90分間泳動を行った。

(5) 前記(4)の泳動を終了した後、ゲルを前記1の(3)のQuick-CBBを用いて染色した。

### 4. 結果

前記3の(5)で染色したゲルを図1に示した。

このゲルの電気泳動像において、「前記HMGB1分解産物」(「3」と表記したレーン)のバンドは「HMGB1」(「2」と表記したレーン)のバンドよりも低分子量側に存在し、そして、「前記HMGB2分解産物」(「5」と表記したレーン)のバンドは「HMGB2」(「4」と表記したレーン)のバンドよりも低分子量側に存在することが分かる。

すなわち、「前記HMGB1分解産物」及び「前記HMGB2分解産物」をそれぞれ調製できていることが確認できた。

〔実施例1〕(HMGB1分解産物に結合する抗体の調製-1)

前記HMGB1分解産物に結合する抗体の調製を下記のようにして行った。

(1) 前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1(全体長のもの)を免疫原として用いた。

この免疫原としての前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1(全体長のもの)の溶液の1容量に対して、化学合成アジュバントとしてのFREUND完全アジュバント(DIFCO LABORATORIES社)を1容量の割合で混合して、HMGB1溶液とFREUND完全アジュバントとの混合物を調製した。

また、この免疫原としての前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1(全体長のもの)の溶液の1容量に対して、化学合成アジュバントとしてのFREUND不完全アジュバント(DIFCO LABORATORIES社)を1容量の割合で混合して、HMGB1溶液とFREUND不完全アジュバントとの混合物を調製した。

(2) 次に、マウス(BALB/c)の腹腔内に免疫原として、300~500 $\mu$ g/匹/回の前記のHMGB1溶液とFREUND完全アジュバントとの混合物を注射し、2週間後及び4週間後に、マウスの腹腔内に前記のHMGB1溶液とFREUND不完全アジュバントとの混合物を注射した。

(3) 最終免疫より4週間後に、前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1(全体長のもの)の原液を300 $\mu$ g/匹によりブースターを行い、その翌日に、免疫したマウスの脾臓の細胞と、ミエロマ細胞(P3U1)を1対1から10対1の割合で混合し、一般的な方法でポリエチレングリコール〔PEG1500; Roche社(スイス国)〕を加えて細胞融合させ、生育したハイブリドーマコロニーを選別した。

具体的には、細胞融合は次のように行った。

混合した前記脾臓細胞とミエローマ細胞（P3U1）を遠心して上清を除き、室温でポリエチレングリコール〔PEG1500；Roche社（スイス国）〕1mLに1分間かけて懸濁した後、37℃で1分間撹拌した。

血清不含培地1mLを1分間かけて加える操作を2回行い、その後、血清不含培地7mLを2分間かけて加えた。

細胞を数回洗浄した後、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン含有培地に懸濁して96穴マイクロタイタープレートに分注して、37℃において5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

生育したモノクローナル抗体産生細胞株（融合細胞株）の選別の方法としては、細胞融合から7～14日後、前記の参考例1で調製したHMGB1（全体長のもの）を固相化し、融合細胞培養上清を一次抗体としたELISA法の系にて行った。

このELISA法は具体的には、次のように行った。

(i) 前記の参考例1で調製したHMGB1、及びHMGB2のそれぞれをリン酸緩衝生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）により1μg/mLの濃度となるように調製したもの、又は対照としてのリン酸緩衝生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）を、各々96穴マイクロタイタープレート〔Thermo Fisher Scientific Inc.社（米国・イリノイ州）〕のウェルに100μL注入し、5℃、16～24時間（又は37℃、2時間）静置し、前記のHMGB1、及びHMGB2のそれぞれを、前記マイクロタイタープレートのウェルに固相化し、更に1%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水にて5℃で16～24時間（又は37℃、2時間）静置し、ブロッキングした。

(ii) 次に、前記(i)のマイクロタイタープレートの各ウェルを洗浄液〔0.05%のTween20を含有するリン酸緩衝生理食塩水〕で3回洗浄した。

(iii) 次に、前記(ii)で洗浄を行ったマイクロタイタープレートのウェルに、これらの融合細胞培養上清溶液のそれぞれを試料として100μL注入し、37℃で2時間静置し、前記マイクロタイタープレートのウェルに固相化された前記のHMGB1、及びHMGB2のそれぞれと、前記の各融合細胞培養上清溶液に含まれるモノクローナル抗体とを各々反応させた。

(iv) 次に、前記(iii)のマイクロタイタープレートの各ウェルを前記の洗浄液で3回洗浄した。

(v) 次に、前記(iv)で洗浄を行ったマイクロタイタープレートの各ウェルに、1%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水によって1000倍希釈したPOD標識抗マウスIgG抗体〔DakoCytomation社（デンマーク国）〕を100μL注入し、37℃で2時間静置し、反応を行わせた。

(vi) 次に、前記(v)のマイクロタイタープレートの各ウェルを前記の洗浄液で3回洗浄した。

(vii) 次に、0.2mMのEDTA・2ナトリウムを含む0.045%の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩水溶液（pH2.0）よりなる発色液と、5mM過酸化水素、41mMクエン酸、0.2mMのEDTA・2ナトリウムを含む60mMリン酸二ナトリウム水溶液（pH4.3）よりなる基質液とを、1:1で混合して調製した発色基質液の100μLを、前記(vi)で洗浄を行ったマイクロタイタープレートの各ウェルに注入し、室温にて5～30分間静置し、反応を行わせ、発色させた。その後、0.7N硫酸よりなる反応停止液を各ウェルに100μL分注し、発色反応を停止させた。

(viii) 次に、前記(vii)のマイクロタイタープレートの各ウェルについて、分光光度計を用いて、主波長450nm及び副波長550nmにおける吸光度を測定した。前記の測定により、HMGB1に結合する抗体を産生する融合細胞株を選別し、そして、生育した融合細胞株の中から1つのクローンを確立し、2H6株と命名した。

(4) この選別したモノクローナル抗体産生細胞株からIgG（免疫グロブリンG）を次のように精製した。このモノクローナル抗体産生細胞株を、PFHM-1I（GIBC

10

20

30

40

50

〇社)を用いてCO<sub>2</sub>インキュベータ内37℃で培養した。培養後、上清中のIgGをプロテインAカラム〔GE Healthcare Bio-Sciences社(スウェーデン国)〕に結合させた。結合させたIgGを、100mMクエン酸水溶液(pH3.0)で溶出した。溶出液1容量に対して、0.5Mリン酸緩衝液(pH7.5)緩衝液1容量を添加し、精製IgGとして、前記のHMGB1に結合する抗体を前記のモノクローナル抗体産生細胞株より取得した。

この抗体は、前記HMGB1分解産物に結合する抗体であった。すなわち、2H6株のモノクローナル抗体産生細胞株から前記HMGB1分解産物に結合する抗体(モノクローナル抗体)〔以下、「本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)」という〕を得ることができた。

なお、この本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)は、後述するように、前記HMGB1分解産物に対する親和性が、HMGB1に対する親和性と比較して、1.5倍以上であった。

また、この本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)は、これも後述するように、前記HMGB1分解産物に対する親和性が、HMGB2に対する親和性及び前記HMGB2分解産物に対する親和性とそれぞれ比較して、各々10倍以上であった。

すなわち、この本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)は、本発明の前記HMGB1分解産物の測定方法及び測定試薬における(a)の抗体である。

なお、この「本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)」のモノクローナル抗体産生細胞株である2H6株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センター(日本国千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目5番8号)に、「受領番号:NITE AP-1570」として2013年3月15日付けにて受領されている。

〔実施例2〕(HMGB1分解産物に結合する抗体の調製-2)

前記HMGB1分解産物に結合する抗体の調製に当たり、前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1(全体長のもの)を免疫原として用いた。

以下、前記実施例1の(1)~(4)の記載の通りに操作を行い、前記HMGB1分解産物に結合する抗体の調製を行った。

その結果、生育した融合細胞株の中から1つのクローンを確立し、5D1株と命名した。そして、5D1株のモノクローナル抗体産生細胞株から前記HMGB1分解産物に結合する抗体(モノクローナル抗体)〔以下、「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」という〕を得ることができた。なお、この抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)は、後述するように、前記HMGB1分解産物に対する親和性が高い抗体であった。すなわち、この抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)は、本発明の前記HMGB1分解産物の測定方法及び測定試薬における(b)の抗体である。

なお、この「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」のモノクローナル抗体産生細胞株である5D1株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センター(日本国千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目5番8号)に、「受領番号:NITE AP-1571」として2013年3月15日付けにて受領されている。

〔実施例3〕(HMGB1分解産物に結合する抗体の調製-3)

前記HMGB1分解産物に結合する抗体の調製に当たり、前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1(全体長のもの)を免疫原として用いた。

以下、前記実施例1の(1)~(4)の記載の通りに操作を行い、前記HMGB1分解産物に結合する抗体の調製を行った。

その結果、生育した融合細胞株の中から1つのクローンを確立し、2A10株と命名した。そして、2A10株のモノクローナル抗体産生細胞株から前記HMGB1分解産物に結合する抗体(モノクローナル抗体)〔以下、「抗HMGB1分解産物等抗体(2A10)」という〕を得ることができた。なお、この抗HMGB1分解産物等抗体(2A10)は、後述するように、前記HMGB1分解産物に対する親和性が高い抗体であった。すなわち、この抗HMGB1分解産物等抗体(2A10)は、本発明の前記HMGB1分解産物の測定方法及び測定試薬における(b)の抗体である。

10

20

30

40

50

なお、この「抗HMGB1分解産物等抗体(2A10)」のモノクローナル抗体産生細胞株である2A10株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センター(日本国千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目5番8号)に、「受領番号:NITE AP-1572」として2013年3月15日付けにて受領されている。

〔実施例4〕(HMGB1分解産物に結合する抗体の調製-4)

前記HMGB1分解産物に結合する抗体の調製に当たり、前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1(全体長のもの)を免疫原として用いた。

以下、前記実施例1の(1)~(4)の記載の通りに操作を行い、前記HMGB1分解産物に結合する抗体の調製を行った。

その結果、生育した融合細胞株の中から1つのクローンを確立し、6H3株と命名した。そして、6H3株のモノクローナル抗体産生細胞株から前記HMGB1分解産物に結合する抗体(モノクローナル抗体)〔以下、「抗HMGB1分解産物等抗体(6H3)」という〕を得ることができた。なお、この抗HMGB1分解産物等抗体(6H3)は、後述するように、前記HMGB1分解産物に対する親和性が高い抗体であった。すなわち、この抗HMGB1分解産物等抗体(6H3)は、本発明の前記HMGB1分解産物の測定方法及び測定試薬における(b)の抗体である。

なお、この「抗HMGB1分解産物等抗体(6H3)」のモノクローナル抗体産生細胞株である6H3株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センター(日本国千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目5番8号)に、「受領番号:NITE AP-1573」として2013年3月15日付けにて受領されている。

〔実施例5〕(HMGB1分解産物に結合する抗体の反応性の確認)

前記実施例1、及び実施例2において取得した、HMGB1分解産物に結合する抗体の各々について、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物それぞれとの反応性を確認した。

〔1〕抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)

前記実施例2において取得した「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」について、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物それぞれとの反応性を以下の通り確かめた。

1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

(1) 試薬

次の(a)~(c)の試薬をそれぞれ調製した。

(a) SDS-ポリアクリルアミドゲル

Funakoshi Easy-Gel(III) プリキャスト・ゲル(15%)(フナコシ社〔日本国〕)を使用した。

(b) 泳動槽用緩衝液

前記参考例2の1の(2)の記載の通りに調製を行い、泳動槽用緩衝液〔0.1% SDS-192mMグリシン-25mMトリス緩衝液〕を調製した。

(c) 試料処理液

ドデシル硫酸ナトリウム〔SDS〕0.1g、2-メルカプトエタノール0.1mL、500mMのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン〔Tris〕-塩酸緩衝液(pH6.8)の1mL、及びグリセリン2mLを純水に添加、混合した後10mLとして、試料処理液〔1% SDS-1% 2-メルカプトエタノール-20%グリセリン-50mMトリス緩衝液〕を調製した。

(2) 試料

前記参考例1の〔1〕~〔3〕で調製した、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物のそれぞれを試料(標準試料)として用いた。

また、分子量マーカー〔Precision Plus Protein All Blue Standardsマーカー; マーカー分子量 10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、37kDa、50kDa、75kDa、100kDa、150kDa及び250kDa; BIO-RAD Laboratories社(米国)〕も試料と

10

20

30

40

50

して用いた。

### (3) 電気泳動

前記(1)で調製した試薬を使用し、前記(2)の試料のそれぞれについて、次の操作によりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法での電気泳動を行った。

(a) 前記(2)の試料のそれぞれについて、前記(1)の(c)の試料処理液により試料濃度が $1\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調製し、100で5分間、煮沸処理を行った。

(b) 下部泳動槽に前記(1)の(b)の泳動槽用緩衝液を入れた。次に、前記(1)の(a)のSDS-ポリアクリルアミドゲルを泳動槽にセットした。そして次に、上部泳動槽に前記(1)の(b)の泳動槽用緩衝液を入れた。

(c) 前記(a)の処理を行った試料の $10\mu\text{L}$ ( $10\text{ng}$ )を前記(b)のゲルのコウム穴に注入した。また、前記(2)の分子量マーカーの試料の $2\mu\text{L}$ を前記(b)のゲルのコウム穴に注入した。

なお、このゲルに注入した前記の試料及び分子量マーカーであるが、向かって左側のレーンより、次の「1」の「分子量マーカー」、「2」の「HMGB1」、「3」の「前記HMGB1分解産物」、「4」の「HMGB2」、及び「5」の「前記HMGB2分解産物」を順に注入した。

「1」：「分子量マーカー」

「2」：「HMGB1」

「3」：「前記HMGB1分解産物」

「4」：「HMGB2」

「5」：「前記HMGB2分解産物」

(d) 次に、 $20\text{mA}$ の電流で90分間泳動を行った。

(e) 前記(d)の泳動を終了した後、ゲルをガラスプレートより取り出した。

以上の操作により、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物のそれぞれを、その分子量に従ってゲル中に位置させ、このゲルを取得した。

### 2. ウエスタンブロッティング法

(1) 抗体希釈液〔0.5%のカゼイン、 $100\text{mM}$ の塩化ナトリウム、及び0.1%のアジ化ナトリウムを含有する $50\text{mM}$ のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液〔Tris緩衝液〕(pH8.0)〕により $2\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、実施例2で取得した「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」を希釈し、この抗体の溶液を調製した。

(2) 前記1の(3)の(e)で取得したゲルの転写を、トランスプロットSDセル(BIO-RAD Laboratories社〔米国〕)を用いて、その使用説明書に従い、セミドライ方式で行った。

まず、前記1の(3)の(e)で取得したゲルを転写用装置上に置いた。

次に、このゲルの上に、 $9\text{cm}\times 9\text{cm}$ のポリビニルジフルオライド膜(BIO-RAD Laboratories社〔米国〕)を重ね、 $48\text{mM}$ トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン〔Tris〕、 $39\text{mM}$ グリシン、及び20%(V/V)メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流 $100\text{mA}$ で1時間転写を行い、その分子量に従ってゲル中に位置している前記のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物等のタンパク質を前記ゲルより前記ポリビニルジフルオライド膜に転写した。

(3) この前記の各々のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物等のタンパク質の転写を行ったポリビニルジフルオライド膜を、ブロッキング液〔0.5%のカゼイン、 $100\text{mM}$ の塩化ナトリウム、及び0.1%のアジ化ナトリウムを含有する $50\text{mM}$ のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液〔Tris緩衝液〕(pH8.0)〕の $20\text{mL}$ に室温で一晩浸漬して、ブロッキングを行った。

(4) 次に、前記(1)で調製した「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」の溶液

に、前記(3)のポリビニルジフルオライド膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

これにより、ポリビニルジフルオライド膜に転写された、前記の各々のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物と、前記の「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」とを反応させた。

(5) 前記(4)の操作を行ったポリビニルジフルオライド膜を、20mLの洗浄液(0.05%のTween20を含むリン酸緩衝生理食塩水)の中で5分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

(6) 次に、POD標識抗マウスIgG抗体[DakoCytomation社(デンマーク国)]を、標識抗体希釈液(0.5%のカゼイン、及び100mMの塩化ナトリウムを含有する50mMのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液[Tris緩衝液](pH8.0))により1000倍に希釈して調製した溶液に、前記(5)のポリビニルジフルオライド膜を室温で90分間浸漬して反応させた。

(7) 前記(6)の操作を行ったポリビニルジフルオライド膜を、20mLの前記洗浄液中で5分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。

(8) 0.025%の3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び0.01%過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水の20mLに、前記(7)のポリビニルジフルオライド膜を室温で15分間浸漬して発色させた。

これにより、このポリビニルジフルオライド膜において、前記の「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」が認識し結合した、前記の各々のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、又は前記HMGB2分解産物の分子量に応じた位置に、発色を生じさせた。

このポリビニルジフルオライド膜上の発色の有無及びその発色した位置(分子量)より、前記の「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」について、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物のそれぞれとの反応性を確認した。

### 3. 結果

(1) 前記2の(8)で発色させたポリビニルジフルオライド膜を図2に示した。

この図において、左側のレーンより順に、「分子量マーカー」のレーン(「1」と表記)、HMGB1のレーン(「2」と表記)、前記HMGB1分解産物のレーン(「3」と表記)、HMGB2のレーン(「4」と表記)、及び前記HMGB2分解産物のレーン(「5」と表記)を表す。

(2) この図より、「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」においては、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物をそれぞれ示す位置において発色が認められることが分かる。

このことより、「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」は、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物のいずれをも認識し結合することが確かめられた。

#### (2) 本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)

前記実施例1において取得した「本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)」について、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物それぞれとの反応性を確かめた。

すなわち、「抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)」に代えて、前記実施例1において取得した「本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)」を用いること以外は、前記(1)の記載の通りに操作を行い、「本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)」のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物それぞれとの反応性を確かめた。

この反応性を確かめた結果である、発色させたポリビニルジフルオライド膜を図3に示した。

この図において、左側のレーンより順に、「分子量マーカー」のレーン(「1」と表記)、HMGB1のレーン(「2」と表記)、前記HMGB1分解産物のレーン(

10

20

30

40

50

「3」と表記)、「HMGB2」のレーン(「4」と表記)、及び「前記HMGB2分解産物」のレーン(「5」と表記)を表す。

この図より、「本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)」においては、前記HMGB1分解産物を示す位置において濃い発色が認められるものの、HMGB1を示す位置においては極めて薄い発色らしきものが見られるにすぎない。そして、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物をそれぞれ示す位置においては、発色は認められない。

このことより、「本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)」は、前記HMGB1分解産物を特異性高く認識し結合することが確かめられた。そして、HMGB1とはわずかに結合し、HMGB2及び前記HMGB2分解産物とは結合しないことが確かめられた。

〔実施例6〕(HMGB1分解産物に結合する抗体の親和性の確認)

前記実施例1~実施例4において取得したHMGB1分解産物に結合する抗体及び他のHMGB1に結合する抗体等の各々について、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物それぞれとの親和性を、酵素免疫測定法(ELISA法)により確認した。

#### 1. 測定試薬

##### (1) HMGB1分解産物等固相化マイクロプレート

前記参考例1の〔1〕~〔3〕で調製した、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物のそれぞれをリン酸緩衝生理食塩水により1µg/mLの濃度となるように調製したものを、各々96穴マイクロタイタープレート〔Thermo Fisher Scientific Inc.社(米国・イリノイ州)〕のウェルに100µL注入し、25℃で18時間静置し、前記のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物のそれぞれを、前記マイクロタイタープレートのウェルに固相化した。

次に、このマイクロタイタープレートのウェル中の液を除去した後、0.5%カゼイン及び0.1%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩水(TBS)〔pH8.0〕の250µLずつを各ウェルに分注し、ブロッキング処理を行った。この後、各ウェルの上をプレートシールで封をし、蒸発しないようにして、使用時まで冷蔵保存した。これを、HMGB1分解産物等固相化マイクロプレートとした。

##### (2) POD標識抗マウスIgG抗体液

POD標識抗マウスIgG抗体〔DakoCytomation社(デンマーク国)〕を、0.5%カゼインナトリウム、及び100mM塩化ナトリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)によって1000倍希釈した。これをPOD標識抗マウスIgG抗体液とした。

##### (3) 洗浄液

0.05%のTween20を含むリン酸緩衝生理食塩水を、洗浄液とした。

##### (4) 希釈液

0.5%カゼインナトリウム、100mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を、希釈液とした。

##### (5) 発色液

0.2mMのEDTA・2ナトリウムを含む0.045%の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩水溶液(pH2.0)を、発色液とした。

##### (6) 基質液

5mM過酸化水素、41mMクエン酸、0.2mMのEDTA・2ナトリウムを含む60mMリン酸二ナトリウム水溶液(pH4.3)を、基質液とした。

##### (7) 発色基質

前記の発色液と基質液を使用前に室温に戻した上で、使用時に等量混合し、発色基質とした。

##### (8) 反応停止液

0.7N硫酸を、反応停止液とした。

#### 2. 試料

10

20

30

40

50

H M G B 1、前記 H M G B 1 分解産物、H M G B 2、及び前記 H M G B 2 分解産物それぞれとの親和性を確認する抗体の溶液を、次の通り調製し、試料として用いた。

(1) 抗 H M G B 1 等抗体 (2 D 4)

モノクローナル抗体産生細胞株の 2 D 4 株から産生される H M G B 1 等に結合する抗体 (モノクローナル抗体) [以下、「抗 H M G B 1 等抗体 (2 D 4)」という] を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の抗 H M G B 1 等抗体 (2 D 4) の抗体溶液を調製した。

(2) 抗 H M G B 1 等抗体 (4 F 1 2)

モノクローナル抗体産生細胞株の 4 F 1 2 株から産生される H M G B 1 等に結合する抗体 (モノクローナル抗体) [以下、「抗 H M G B 1 等抗体 (4 F 1 2)」という] を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の抗 H M G B 1 等抗体 (4 F 1 2) の抗体溶液を調製した。

(3) 抗 H M G B 1 等抗体 (8 H 4)

モノクローナル抗体産生細胞株の 8 H 4 株から産生される H M G B 1 等に結合する抗体 (モノクローナル抗体) [以下、「抗 H M G B 1 等抗体 (8 H 4)」という] を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の抗 H M G B 1 等抗体 (8 H 4) の抗体溶液を調製した。

(4) 本抗 H M G B 1 分解産物抗体 (2 H 6)

本抗 H M G B 1 分解産物抗体 (2 H 6) を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の本抗 H M G B 1 分解産物抗体 (2 H 6) の抗体溶液を調製した。

(5) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (5 D 1)

抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (5 D 1) を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (5 D 1) の抗体溶液を調製した。

(6) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (2 A 1 0)

抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (2 A 1 0) を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (2 A 1 0) の抗体溶液を調製した。

(7) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (6 H 3)

抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (6 H 3) を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (6 H 3) の抗体溶液を調製した。

(8) 抗 H M G B 1 等抗体 (M D 7 8)

モノクローナル抗体産生細胞株の M D 7 8 株 (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 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に F E R M P - 1 8 4 0 5 として平成 1 3 年 7 月 4 日付けにて寄託されている。) から産生される H M G B 1 等に結合する抗体 (モノクローナル抗体) [以下、「抗 H M G B 1 等抗体 (M D 7 8)」という] を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び 5 ng/mL となるように前記 1 の (4) の希釈液により希釈して、各濃度の抗 H M G B 1 等抗体 (M D 7 8) の抗体溶液を調製した。

(9) 抗 H M G B 1 等抗体 (M D 7 7)

モノクローナル抗体産生細胞株の M D 7 7 株 (独立行政法人産業技術総合研究所特許生

10

20

30

40

50

物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にFERM P-18404として平成13年7月4日付けにて寄託されている。）から産生されるHMGB1等に結合する抗体（モノクローナル抗体）〔以下、「抗HMGB1等抗体（MD77）」という〕を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び5 ng/mLとなるように前記1の（4）の希釈液により希釈して、各濃度の抗HMGB1等抗体（MD77）の抗体溶液を調製した。

（10）抗HMGB1等抗体（4C3）

モノクローナル抗体産生細胞株の4C3株から産生されるHMGB1等に結合する抗体（モノクローナル抗体；商品名：Anti-HMGB1 antibody [4C3]（Abcam社））〔以下、「抗HMGB1等抗体（4C3）」という〕を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び5 ng/mLとなるように前記1の（4）の希釈液により希釈して、各濃度の抗HMGB1等抗体（4C3）の抗体溶液を調製した。

10

（11）抗HMGB1等抗体（J2E1）

モノクローナル抗体産生細胞株のJ2E1株から産生されるHMGB1等に結合する抗体（モノクローナル抗体；商品名：HMGB-1 Antibody (J2E1) : sc-135809（Santa cruz biotechnology, Inc.社））〔以下、「抗HMGB1等抗体（J2E1）」という〕を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び5 ng/mLとなるように前記1の（4）の希釈液により希釈して、各濃度の抗HMGB1等抗体（J2E1）の抗体溶液を調製した。

20

（12）抗HMGB1等抗体（HAP46.5）

モノクローナル抗体産生細胞株のHAP46.5株から産生されるHMGB1等に結合する抗体（モノクローナル抗体；商品名：Mouse monoclonal [HAP46.5] to HMGB1（Abcam社））〔以下、「抗HMGB1等抗体（HAP46.5）」という〕を、その濃度が各々、0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、及び5 ng/mLとなるように前記1の（4）の希釈液により希釈して、各濃度の抗HMGB1等抗体（HAP46.5）の抗体溶液を調製した。

3. 測定

（1）前記1の（1）のHMGB1分解産物等固相化マイクロプレートの各ウェルを、前記1の（3）の洗浄液の400 μLで3回洗浄した。

30

（2）次に、前記2の（1）の4濃度の抗HMGB1等抗体（2D4）の溶液それぞれの100 μLを試料として各ウェルに分注した後、25 で2時間静置し、これらの各濃度の抗HMGB1等抗体（2D4）を、このHMGB1分解産物等固相化マイクロプレートのウェルに固相化された前記のHMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物の各々と、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

（3）次に、各ウェルを、前記1の（3）の洗浄液の400 μLで3回洗浄した。

（4）次に、前記1の（2）のPOD標識抗マウスIgG抗体液の100 μLを各ウェルに分注し、25 で1時間静置し、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

（5）次に、各ウェルを、前記1の（3）の洗浄液の400 μLで3回洗浄した。

40

（6）次に、各ウェルに、前記1の（7）の発色基質を100 μL分注し、室温で20分間静置し、標識酵素であるパーオキシダーゼ（POD）による発色反応を行わせた。

（7）次に、各ウェルに、前記1の（8）の反応停止液を100 μL分注し、発色反応を停止させた。

（8）次に、各ウェルの液の吸光度（主波長：450 nm、副波長：550 nm）を測定し、前記の4濃度の抗HMGB1等抗体（2D4）の溶液それぞれを試料として測定した場合の吸光度を得た。

（9）前記（2）における4濃度の抗HMGB1等抗体（2D4）の溶液の代わりに、前記2の（2）～（12）の各抗体の抗体溶液（各々4濃度ずつ）をそれぞれ試料として用いる以外は、前記（1）～（8）の記載の通りに行い、これらの各抗体の抗体溶液それ

50

それを試料として測定した場合の吸光度を得た。

#### 4. 測定結果

(1) 前記3における測定結果、すなわち、前記の各抗体について、HMGB1、前記HMGB1分解産物、HMGB2、及び前記HMGB2分解産物それぞれとの親和性を確認した結果を、図4A～Lに示した。

これらの図において、図の上方に当該親和性を確認した抗体の産生細胞株を表す文字を示した。

また、これらの図において、横軸は試料として用いた抗体溶液中の抗体濃度 (ng/mL) を示し、縦軸は測定により得られた吸光度〔主波長 (450nm) における吸光度から副波長 (550nm) における吸光度を差し引いたもの〕を示す。

また、これらの図において、「」はHMGB1を固相化したウェルにおける測定値 (前記の吸光度) を示し、「」は前記HMGB1分解産物を固相化したウェルにおける測定値 (前記の吸光度) を示し、「」はHMGB2を固相化したウェルにおける測定値 (前記の吸光度) を示し、そして「」は前記HMGB2分解産物を固相化したウェルにおける測定値 (前記の吸光度) を示す。

(2) また、前記3における測定結果の測定値を、表1に示した。

【表 1】

抗体濃度 (ng/mL)	2D4		4F12		8H4		5D1		2A10		6H3		4C3		
	HMGB1 産物	HMGB1分解産物/抗体濃度	HMGB2 産物	HMGB2分解産物	HMGB1 産物	HMGB1分解産物/抗体濃度	HMGB2 産物	HMGB2分解産物	HMGB1 産物	HMGB1分解産物/抗体濃度	HMGB2 産物	HMGB1 産物	HMGB1分解産物/抗体濃度	HMGB2 産物	HMGB2分解産物
5	2.30	0.35	0.02	0.02	0.59	0.44	0.02	0.02	1.46	1.11	0.02	1.46	1.11	0.22	0.02
2.5	1.27	0.37	0.02	0.02	0.30	0.25	0.02	0.02	0.72	0.58	0.02	0.72	0.58	0.23	0.02
1.25	0.58	0.42	0.02	0.02	0.16	0.13	0.02	0.02	0.36	0.29	0.02	0.36	0.29	0.23	0.02
0.625	0.24	0.31	0.03	0.02	0.09	0.08	0.05	0.02	0.18	0.16	0.02	0.18	0.16	0.26	0.02
5	0.95	0.36	0.03	0.04	3.30	3.27	3.38	3.38	3.10	2.93	3.12	3.10	2.93	0.59	3.05
2.5	0.43	0.34	0.02	0.03	2.71	2.59	2.78	2.67	2.22	1.87	2.22	2.22	1.87	0.75	2.06
1.25	0.19	0.31	0.02	0.02	1.74	1.60	1.78	1.67	1.27	0.99	1.24	1.27	0.99	0.79	1.14
0.625	0.09	0.32	0.02	0.02	0.97	0.87	0.97	0.89	0.67	0.50	0.66	0.67	0.50	0.80	0.59
5	2.97	0.56	3.03	2.89	0.35	0.38	0.29	0.30	0.50	0.01	0.02	0.50	0.01	0.00	0.02
2.5	2.09	0.71	2.06	1.90	0.18	0.19	0.15	0.15	0.24	0.01	0.03	0.24	0.01	0.01	0.01
1.25	1.17	0.76	1.16	1.04	0.10	0.10	0.09	0.08	0.13	0.02	0.02	0.13	0.02	0.01	0.02
0.625	0.63	0.79	0.62	0.55	0.06	0.07	0.07	0.06	0.08	0.02	0.02	0.08	0.02	0.03	0.02
5	0.05	0.02	0.03	0.02	0.11	0.11	0.02	0.02	1.43	1.22	2.58	1.43	1.22	0.24	2.50
2.5	0.03	0.02	0.02	0.01	0.06	0.12	0.01	0.01	0.67	0.59	1.49	0.67	0.59	0.24	1.42
1.25	0.02	0.03	0.02	0.01	0.04	0.07	0.02	0.02	0.32	0.28	0.74	0.32	0.28	0.22	0.70
0.625	0.02	0.05	0.02	0.02	0.03	0.04	0.02	0.02	0.15	0.14	0.35	0.15	0.14	0.22	0.34

10

20

30

40

これらの表において、表の上方に当該親和性を確認した抗体の産生細胞株を表す文字を示した。

50

また、これらの表において、左側の欄には試料として用いた抗体溶液中の抗体濃度（ $\text{ng/mL}$ ）を示し、そしてウェルに固相化した物ごとに測定により得られた吸光度〔主波長（ $450\text{nm}$ ）における吸光度から副波長（ $550\text{nm}$ ）における吸光度を差し引いたもの〕を示した。

なお、これらの表においては、前記HMGB1分解産物を固相化したウェルにおける測定値（前記の吸光度）を試料として用いた抗体溶液中の抗体濃度（ $\text{ng/mL}$ ）値で除したときの値を示した欄（ウェルに固相化した物ごとに左から3番目の欄）も設けた。

## 5. まとめ

(1) 前記の酵素免疫測定法の結果である図4及び表1より、前記測定により当該親和性を確認した各抗体は、次の(i)～(iii)の3種類のものに分けることができること

10

ことが分かる。  
(i) 前記HMGB1分解産物に結合する抗体であって、前記HMGB1分解産物に対する親和性が、HMGB1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍である抗体（抗体濃度： $0.625\text{ng/mL} \sim 5\text{ng/mL}$ ）：「本抗HMGB1分解産物抗体（2H6）」

〔なお、前記HMGB1分解産物に対する親和性において、HMGB2に対する親和性及び前記HMGB2分解産物に対する親和性とそれぞれ比較して、各々少なくとも10倍である。（抗体濃度： $0.625\text{ng/mL} \sim 5\text{ng/mL}$ ）〕

〔本発明の試料に含まれる前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び測定試薬における、(a)の抗体〕

20

(ii) 前記HMGB1分解産物に結合する抗体であって、前記HMGB1分解産物に対する親和性が高い抗体：「抗HMGB1分解産物等抗体（5D1）」、「抗HMGB1分解産物等抗体（2A10）」、及び「抗HMGB1分解産物等抗体（6H3）」

〔なお、前記HMGB1分解産物を固相化したウェルにおける測定値（前記の吸光度）を試料として用いた抗体溶液中の抗体濃度（ $\text{ng/mL}$ ）値で除したときの値が0.5以上である。（抗体濃度： $0.625\text{ng/mL} \sim 5\text{ng/mL}$ ）〕

〔また、前記HMGB1分解産物を固相化したウェルにおける測定値（前記の吸光度）が、基準とする抗体産生細胞（「MD78」）より産生される抗体における当該吸光度の値の6倍以上である。（抗体濃度： $0.625\text{ng/mL} \sim 5\text{ng/mL}$ ）〕

〔本発明の試料に含まれる前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び測定試薬における、(b)の抗体〕

30

(iii) 前記(i)及び(ii)以外の抗体：「抗HMGB1等抗体（2D4）」、「抗HMGB1等抗体（4F12）」、「抗HMGB1等抗体（8H4）」、「抗HMGB1等抗体（MD78）」、「抗HMGB1等抗体（MD77）」、「抗HMGB1等抗体（4C3）」、「抗HMGB1等抗体（J2E1）」、及び「抗HMGB1等抗体（HAP46.5）」

(2) これらのことより、「本抗HMGB1分解産物抗体（2H6）」は、前記HMGB1分解産物に結合する抗体であって、前記HMGB1分解産物に対する親和性が、HMGB1に対する親和性と比較して、少なくとも1.5倍である抗体であることが確かめられた。

40

また、「抗HMGB1分解産物等抗体（5D1）」、「抗HMGB1分解産物等抗体（2A10）」、及び「抗HMGB1分解産物等抗体（6H3）」はそれぞれ、前記HMGB1分解産物に結合する抗体であって、前記HMGB1分解産物に対する親和性が高い抗体であることが確かめられた。

〔実施例7〕（HMGB1分解産物の測定の確認）

前記実施例1～実施例4において取得したHMGB1分解産物に結合する抗体及び他のHMGB1に結合する抗体等を用い、本発明によるHMGB1分解産物の測定が可能であることを確認した。

## 1. 測定試薬

(1) 抗体固相化マイクロプレート

50

下記の ( i ) ~ ( v ) の 5 種類 の 抗体 の 各々 について、プロテイン A を用いて精製し、これらの抗体をリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) でその濃度が  $2.5 \mu\text{g} / \text{mL}$  となるようにそれぞれ希釈した。

- ( i ) 本抗 H M G B 1 分解産物抗体 ( 2 H 6 )
- ( i i ) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 ( 5 D 1 )
- ( i i i ) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 ( 2 A 1 0 )
- ( i v ) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 ( 6 H 3 )
- ( v ) 抗 H M G B 1 等抗体 ( M D 7 7 )

次に、これらの抗体溶液の各々を、マイクロタイタープレート ( マイクロプレート ) [ N u n c 社、商品名 : M a x i s o r p ] の各ウェルに  $100 \mu\text{L}$  ずつ分注し、25 で一晩静置し、これらの抗体のそれぞれを個別にマイクロプレートのウェルに固相化した。

次に、マイクロプレートのウェル中の液を除去し、0.5% カゼインナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩水 ( T B S ) [ p H 8.0 ] の  $250 \mu\text{L}$  ずつを各ウェルに分注し、各ウェルの上をプレートシールで封をし、蒸発しないようにして、使用時まで冷蔵保存した。

これを、前記の ( i ) ~ ( v ) の 5 種類 の 抗体 の 各々 についての抗体固相化マイクロプレートとした。

## ( 2 ) P O D 標識抗体液

下記の ( A ) ~ ( F ) の 6 種類 の 抗体 の 各々 について、それぞれ「パーオキシダーゼラベリングキット - N H 2 」 ( 同仁化学社 ) により所定の方法にて、6 種類 の パーオキシダーゼ標識抗体を調製し、これらを P O D 標識抗体液とした。

- ( A ) 本抗 H M G B 1 分解産物抗体 ( 2 H 6 )
- ( B ) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 ( 5 D 1 )
- ( C ) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 ( 2 A 1 0 )
- ( D ) 抗 H M G B 1 分解産物等抗体 ( 6 H 3 )
- ( E ) 抗 H M G B 1 等抗体 ( M D 7 7 )
- ( F ) 抗 H M G B 1 等抗体 ( 0 4 ) [ モノクローナル抗体産生細胞株の 0 4 株から産生される H M G B 1 等に結合するマウス抗体 ( モノクローナル抗体 ) [ 以下、「抗 H M G B 1 等抗体 ( 0 4 ) 」という ]。 ]

## ( 3 ) 洗浄液

0.05% の T w e e n 2 0 を含むリン酸緩衝生理食塩水を、洗浄液とした。

## ( 4 ) 希釈液

0.5% カゼインナトリウム、100mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含む 50mM トリス - 塩酸緩衝液 ( p H 8.0 ) を、希釈液とした。

## ( 5 ) 発色液

0.2mM の E D T A ・ 2 ナトリウムを含む 0.045% の 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン塩酸塩水溶液 ( p H 2.0 ) を、発色液とした。

## ( 6 ) 基質液

5mM 過酸化水素、41mM クエン酸、0.2mM の E D T A ・ 2 ナトリウムを含む 60mM リン酸二ナトリウム水溶液 ( p H 4.3 ) を、基質液とした。

## ( 7 ) 発色基質

前記の発色液と基質液を使用前に室温に戻した上で、使用時に等量混合し、発色基質とした。

## ( 8 ) 反応停止液

0.7N 硫酸を、反応停止液とした。

## 2. 試料

### ( 1 ) 試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 )

前記参考例 1 の [ 2 ] で調製した前記 H M G B 1 分解産物を、0.5% カゼインナトリウム、100mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含む 50mM トリス - 塩酸緩衝液 ( p H 8.0 ) により、 $16 \text{ng} / \text{mL}$  の濃度となるように調製したものを試

10

20

30

40

50

料（前記HMGB1分解産物）とした。

（2）試料（HMGB1）

前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1を、0.5%カゼインナトリウム、100mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）により、16ng/mLの濃度となるように調製したものを試料（HMGB1）とした。

（3）試料（試薬盲検）

対照としての試薬盲検（試薬ブランク）測定のための、0.5%カゼインナトリウム、100mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）〔前記HMGB1分解産物及びHMGB1の濃度が0ng/mL〕を、試料（試薬盲検）とした。

10

3. 測定

（1）前記1の（1）の（i）～（v）の5種類の抗体の各々についての抗体固相化マイクロプレートそれぞれの各ウェルを、前記1の（3）の洗浄液の400μLで3回洗浄した。

（2）次に、前記2の（1）の試料（前記HMGB1分解産物）の100μLを各ウェルに分注した後、37℃で一晩静置し、この試料（前記HMGB1分解産物）に含まれる前記HMGB1分解産物を、それぞれの抗体固相化マイクロプレートのウェルに固相化された前記の5種類の抗体の各々と、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

（3）次に、各ウェルを、前記1の（3）の洗浄液の400μLで5回洗浄した。

20

（4）次に、前記1の（2）の（A）の抗体をパーオキシダーゼ標識したPOD標識抗体液の100μLを各ウェルに分注し、37℃で90分間静置し、それぞれ抗原抗体反応を行わせた。

（5）次に、各ウェルを、前記1の（3）の洗浄液の400μLで5回洗浄した。

（6）次に、各ウェルに、前記1の（7）の発色基質を100μL分注し、室温で30分間静置し、標識酵素であるパーオキシダーゼ（POD）による発色反応を行わせた。

（7）次に、各ウェルに、前記1の（8）の反応停止液を100μL分注し、発色反応を停止させた。

（8）次に、各ウェルの液の吸光度（450nm）を測定し、前記の試料（前記HMGB1分解産物）を測定した場合の吸光度を得た。

30

（9）前記（2）における試料（前記HMGB1分解産物）の代わりに、前記2の（2）の試料（HMGB1）、及び前記2の（3）の試料（試薬盲検）をそれぞれ試料として用いる以外は、前記（1）～（8）の記載の通りに行い、これらの各試料を測定した場合の吸光度を得た。

（10）前記（4）における「前記1の（2）の（A）の抗体をパーオキシダーゼ標識したPOD標識抗体液」の代わりに、「前記1の（2）の（B）の抗体をパーオキシダーゼ標識したPOD標識抗体液」、「前記1の（2）の（C）の抗体をパーオキシダーゼ標識したPOD標識抗体液」、「前記1の（2）の（D）の抗体をパーオキシダーゼ標識したPOD標識抗体液」、「前記1の（2）の（E）の抗体をパーオキシダーゼ標識したPOD標識抗体液」、及び「前記1の（2）の（F）の抗体をパーオキシダーゼ標識したPOD標識抗体液」をそれぞれPOD標識抗体液として用いる以外は、前記（1）～（9）の記載の通りに行い、各試料を測定した場合の吸光度を得た。〔なお、測定に使用した抗体固相化マイクロプレートとPOD標識抗体液の組み合わせは、図5及び表2に示した通りである。〕

40

4. 測定結果

（1）前記3における測定結果、すなわち、前記実施例1～実施例4において取得した前記HMGB1分解産物に結合する抗体及び他のHMGB1に結合する抗体等を用い、酵素免疫測定法（ELISA法）により、前記HMGB1分解産物及びHMGB1の測定を行った結果を、図5に示した。

この図において、横軸の上段は当該測定に使用したPOD標識抗体液の抗体の産生細胞

50

株を表す文字を示し、横軸の下段は当該測定に使用した抗体固相化マイクロプレートの抗体の産生細胞株を表す文字を示し、縦軸は測定により得られた吸光度（450nm）を示す。

また、この図（棒グラフ）において、各々の棒は、当該測定に使用したPOD標識抗体液及び抗体固相化マイクロプレート毎に、左側より順に、試料（HMGB1）について測定したときの測定値（前記の吸光度）、試料（前記HMGB1分解産物）について測定したときの測定値（前記の吸光度）、及び試料（試薬盲検）について測定したときの測定値（前記の吸光度）をそれぞれ示す。

（2） また、前記3における測定結果の測定値を、表2に示した。

【表2】

抗体		試料		
固相化抗体	標識抗体	試料(HMGB1)	試料(HMGB1分解産物)	試料(試薬盲検)
MD77	2A10	0.048	0.034	0.033
	2H6	0.059	0.023	0.025
	5D1	0.082	0.054	0.062
	6H3	0.055	0.037	0.036
	04	0.035	0.029	0.025
2H6	MD77	0.074	0.048	0.051
	5D1	2.167	2.901	0.11
	04	0.626	0.63	0.045
2A10	MD77	0.076	0.06	0.058
	2H6	1.524	2.333	0.055
5D1	MD77	0.811	0.754	0.748
	2H6	0.629	1.981	0.052
6H3	MD77	0.073	0.058	0.063
	2H6	1.481	2.462	0.055

この表においては、左側より順に、当該測定に使用した抗体固相化マイクロプレートの抗体の産生細胞株を表す文字、当該測定に使用したPOD標識抗体液の抗体の産生細胞株を表す文字、試料（HMGB1）について測定したときの測定値（前記の吸光度）、試料（前記HMGB1分解産物）について測定したときの測定値（前記の吸光度）、及び試料（試薬盲検）について測定したときの測定値（前記の吸光度）をそれぞれ示した。

## 5. まとめ

（1） 前記の酵素免疫測定法による測定の結果である図5及び表2より、次のことが分かる。

すなわち、「本抗HMGB1分解産物抗体（2H6）」と、「抗HMGB1分解産物等抗体（5D1）」、「抗HMGB1分解産物等抗体（2A10）」又は「抗HMGB1分解産物等抗体（6H3）」を組み合わせる測定に使用した場合には、HMGB1の測定値（吸光度）は低いものであるのに対し、前記HMGB1分解産物の測定値（吸光度）は高いことが分かる。また、この場合、試薬盲検（試薬ブランク）はいずれも低いものであることも分かる。

つまり、「前記実施例6の5の（1）の（i）の抗体」（本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬における（a）の抗体）と、「前記実施例6の5の（1）の（ii）の抗体」（本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬における（b）の抗体）を組み合わせる測定に使用した場合には、試料に含まれるHMGB1の測り込みを抑制することができ、そして試料に含まれる前記HMGB1分解産物を感度高く測定できることが分かる。

（2） これに対して、「抗HMGB1等抗体（MD77）」又は「抗HMGB1等抗体（04）」を測定に使用した場合には、前記HMGB1分解産物の測定値（吸光度）が極めて低いものであったり、又は前記HMGB1分解産物の測定値（吸光度）とHMGB1の測定値（吸光度）が同程度のものであって殆ど差がないものであることが分かる。

つまり、「前記実施例6の5の（1）の（iii）の抗体」（前記実施例6の5の（1

10

20

30

40

50

)の(i)及び(ii)以外の抗体)を測定に使用した場合には、試料に含まれる前記HMG B 1分解産物を感度高くかつ特異性高く測定することができないことが分かる。

(3) 従って、本実施例における検討結果より、本発明の「試料に含まれる前記HMG B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬」における「(a)の抗体」と「(b)の抗体」を組み合わせて測定に使用することにより、試料に含まれるHMG B 1の測り込みを抑制することができ、そして試料に含まれる前記HMG B 1分解産物を感度高く測定できることが分かった。

〔実施例8〕(HMG B 1分解産物の免疫学的測定方法及び測定試薬 - 1)

本発明の前記HMG B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬、並びに従来の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬により、試料に含まれる前記HMG B 1分解産物及び試料に含まれるHMG B 1の測定を行った。

〔1〕従来の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬による測定

#### 1. 測定試薬

固相化抗HMG B 1ポリクローナル抗体、及びパーオキシダーゼ(POD)標識抗HMG B 1、2モノクローナル抗体によるELISA・サンドイッチ法を測定原理とする、HMG B 1の測定試薬(研究用試薬)である「HMG B 1 ELISA Kit II」(シノテスト社〔日本国〕)を、従来の免疫学的測定試薬として用いた。

#### 2. 試料

(1) 試料(前記HMG B 1分解産物)

前記参考例1の〔2〕で調製した前記HMG B 1分解産物を、0.5%カゼインナトリウム、100mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、及び80ng/mLの濃度となるように調製したものをそれぞれ試料(前記HMG B 1分解産物)とした。

また、0.5%カゼインナトリウム、100mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、前記HMG B 1分解産物の濃度が0ng/mLの試料(前記HMG B 1分解産物)とした。

(2) 試料(HMG B 1)

前記参考例1の〔1〕で調製したHMG B 1を、0.5%カゼインナトリウム、100mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、及び80ng/mLの濃度となるように調製したものをそれぞれ試料(HMG B 1)とした。

また、0.5%カゼインナトリウム、100mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、HMG B 1の濃度が0ng/mLの試料(HMG B 1)とした。

#### 3. 測定

(1) 前記2の(1)の試料(前記HMG B 1分解産物)〔計7濃度〕のそれぞれ、及び前記2の(2)の試料(HMG B 1)〔計7濃度〕のそれぞれについて、前記1の従来の免疫学的測定試薬である「HMG B 1 ELISA Kit II」(シノテスト社〔日本国〕)を用いて、その添付文書の記載の通りに測定の操作を行った。

(2) 前記(1)の測定により、各試料の測定の結果として、それぞれ吸光度(450nm)を得た。

#### 4. 測定結果

(1) 前記3における測定結果、すなわち、従来の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬により、試料に含まれる前記HMG B 1分解産物及び試料に含まれるHMG B 1の測定を行った結果を、図6に示した。

なお、この図において、横軸は試料に含まれる前記HMG B 1分解産物又は試料に含まれるHMG B 1の濃度(ng/mL)を示し、縦軸は測定により得られた吸光度(450nm)を示す。

10

20

30

40

50

また、この図において、「 $\square$ 」は前記2の(1)の試料(前記HMGB1分解産物)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示し、「 $\triangle$ 」は前記2の(2)の試料(HMGB1)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示す。

(2) また、前記3における測定結果の測定値を、表3に示した。

【表3】

(i) 濃度(ng/mL)	(ii) 試料(HMGB1)	(iii) 吸光度差(試料 (HMGB1))	(iv) 「(vi)/(iii)」	(v) 試料(HMGB1 分解産物)	(vi) 吸光度差(試料 (HMGB1分解産 物))
80	0.907	0.876	0.792	0.724	0.694
40	0.472	0.441	0.763	0.367	0.337
20	0.245	0.215	0.737	0.189	0.158
10	0.128	0.098	0.754	0.104	0.074
5	0.077	0.046	0.717	0.064	0.033
2.5	0.052	0.021	0.738	0.046	0.016
0	0.031			0.031	

10

なお、この表においては、左側より順に、「(i) 試料に含まれる前記HMGB1分解産物又は試料に含まれるHMGB1の濃度(ng/mL)」、「(ii) 前記2の(2)の試料(HMGB1)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(450nmにおける吸光度)」、「(iii) 前記(ii)の測定値から試薬盲検の値〔HMGB1の濃度が0ng/mLの試料(HMGB1)における当該測定値(450nmにおける吸光度)〕を差し引いた値(吸光度差)」、「(iv) 後記(vi)の試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を前記(iii)の試料(HMGB1)における値(吸光度差)で除した値」、「(v) 前記2の(1)の試料(前記HMGB1分解産物)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(450nmにおける吸光度)」、「(vi) 前記(v)の測定値から試薬盲検の値〔前記HMGB1分解産物の濃度が0ng/mLの試料(前記HMGB1分解産物)における当該測定値(450nmにおける吸光度)〕を差し引いた値(吸光度差)」をそれぞれ示した。

20

30

〔2〕本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬による測定

#### 1. 測定試薬

##### (1) 抗体固相化マイクロプレート(5D1)

前記実施例2の抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)をプロテインAを用いて精製し、これをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でその濃度が2.5 $\mu$ g/mLとなるように希釈した。

次に、これを、マイクロタイタープレート(マイクロプレート)〔Nunc社、商品名:Maxisorp〕の各ウェルに100 $\mu$ Lずつ分注し、25 $^{\circ}$ Cで一晩静置し、前記の抗HMGB1分解産物等抗体(5D1)をマイクロプレートのウェルに固相化した。

40

次に、マイクロプレートのウェル中の液を除去し、0.5%カゼインナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩水(TBS)〔pH8.0〕の250 $\mu$ Lずつを各ウェルに分注し、各ウェルの上をプレートシールで封をし、蒸発しないようにして、使用時まで冷蔵保存した。

これを、抗体固相化マイクロプレート(5D1)とした。

##### (2) ビオチン標識抗体液(2H6)

前記実施例1の本抗HMGB1分解産物抗体(2H6)を、Sulfo-NHS-LC-Biotin(Pierce社、商品コード番号:21335)を用いてビオチン標識を行った。

50

このビオチン標識抗体を、100 mM塩化ナトリウム、0.5%カゼインナトリウム、2 mMのEDTA・2ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、及び10%マウス血清を含む50 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)に、2 µg/mLの濃度となるように溶解し、これをビオチン標識抗体液(2H6)とした。

(3) ストレプトアビジン-パーオキシダーゼコンジュゲート液

Streptavidin-PolyHRP40 (Stereospecific Detection Technologies社〔ドイツ国〕；商品コード番号：SP40C)を、100 mM塩化ナトリウム、0.5%カゼイン(ビタミンフリー)及び0.5 mM塩化カルシウムを含む100 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)で10,000倍に希釈した。

10

これを、ストレプトアビジン-パーオキシダーゼコンジュゲート液とした。

(4) 洗浄液

0.05%のTween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水を、洗浄液とした。

(5) 希釈液

100 mM塩化ナトリウム、0.5%カゼインナトリウム、2 mMのEDTA・2ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、及び10%マウス血清を含む100 mMのCHES緩衝液(pH 9.5)を、希釈液とした。

(6) 発色液

0.2 mMのEDTA・2ナトリウムを含む0.045%の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩水溶液(pH 2.0)を、発色液とした。

20

(7) 基質液

5 mM過酸化水素、41 mMクエン酸、0.2 mMのEDTA・2ナトリウムを含む60 mMリン酸二ナトリウム水溶液(pH 4.3)を、基質液とした。

(8) 発色基質

前記の発色液と基質液を使用前に室温に戻した上で、使用時に等量混合し、発色基質とした。

(9) 反応停止液

0.7 N硫酸を、反応停止液とした。

2. 試料

(1) 試料(前記HMGB1分解産物)

前記〔1〕の2の(1)の記載の通りに、前記HMGB1分解産物の濃度がそれぞれ、0 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、及び80 ng/mLの試料(前記HMGB1分解産物)を調製した。

30

(2) 試料(HMGB1)

前記〔1〕の2の(2)の記載の通りに、HMGB1の濃度がそれぞれ、0 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、及び80 ng/mLの試料(HMGB1)を調製した。

3. 測定

(1) 前記1の(1)の抗体固相化マイクロプレート(5D1)の各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の250 µLで3回洗浄した。

40

(2) 次に、各ウェルに、前記1の(5)の希釈液の100 µLを分注した。

(3) 次に、前記2の(1)の計7濃度の試料(前記HMGB1分解産物)それぞれの10 µLを各ウェルに分注した後、各ウェルの上をプレートシールで封をし、5 で一晩静置し、このマイクロプレートのウェルに固相化された抗体と試料に含まれていた前記HMGB1分解産物との抗原抗体反応を行わせた。

(4) 次に、各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の400 µLで5回洗浄した。

(5) 次に、前記1の(2)のビオチン標識抗体液(2H6)の100 µLを各ウェルに分注し、25 で2時間静置し、前記の固相化抗体に結合した前記HMGB1分解産物とビオチン標識抗体との抗原抗体反応を行わせた。

(6) 次に、各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の400 µLで5回洗浄した。

50

(7) 次に、各ウェルに、前記1の(3)のストレプトアビジン - パーオキシダーゼコンジュゲート液を100 $\mu$ L分注し、25 で1時間静置し、「ビオチン - ストレプトアビジン」の結合反応を行わせた。

(8) 次に、各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の400 $\mu$ Lで5回洗浄した。

(9) 次に、各ウェルに、前記1の(8)の発色基質を100 $\mu$ L分注し、室温で20分間静置し、標識酵素であるパーオキシダーゼによる発色反応を行わせた。

(10) 次に、各ウェルに、前記1の(9)の反応停止液を100 $\mu$ L分注し、発色反応を停止させた。

(11) 次に、各ウェルの液の吸光度(450nm)を測定し、前記の計7濃度の試料(前記HMGB1分解産物)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

10

(12) 前記(3)における計7濃度の試料(前記HMGB1分解産物)の代わりに、前記2の(2)の計7濃度の試料(HMGB1)を用いる以外は、前記(1)~(11)の記載の通りに行い、前記の計7濃度の試料(HMGB1)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

#### 4. 測定結果

(1) 前記3における測定結果、すなわち、本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬により、試料に含まれる前記HMGB1分解産物及び試料に含まれるHMGB1の測定を行った結果を、図7に示した。

なお、この図において、横軸は試料に含まれる前記HMGB1分解産物又は試料に含まれるHMGB1の濃度(ng/mL)を示し、縦軸は測定により得られた吸光度(450nm)を示す。

20

また、この図において、「 $\square$ 」は前記2の(1)の試料(前記HMGB1分解産物)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示し、「 $\triangle$ 」は前記2の(2)の試料(HMGB1)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示す。

(2) また、前記3における測定結果の測定値を、表4に示した。

【表4】

(i) 濃度(ng/mL)	(ii) 試料(HMGB1)	(iii) 吸光度差[試料 (HMGB1)]	(iv) 「(vi)/(iii)」	(v) 試料(HMGB1 分解産物)	(vi) 吸光度差[試料 (HMGB1分解産 物)]
80	0.199	0.111	13.271	1.555	1.467
40	0.137	0.049	12.186	0.680	0.591
20	0.108	0.019	12.842	0.333	0.244
10	0.102	0.014	8.519	0.204	0.115
5	0.093	0.004	14.875	0.148	0.060
2.5	0.090	0.002	14.000	0.110	0.021
0	0.089			0.089	

30

なお、この表においては、左側より順に、「(i) 試料に含まれる前記HMGB1分解産物又は試料に含まれるHMGB1の濃度(ng/mL)」、「(ii) 前記2の(2)の試料(HMGB1)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(450nmにおける吸光度)」、「(iii) 前記(ii)の測定値から試薬盲検の値〔HMGB1の濃度が0ng/mLの試料(HMGB1)における当該測定値(450nmにおける吸光度)〕を差し引いた値(吸光度差)」、「(iv) 後記(vi)の試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を前記(iii)の試料(HMGB1)における値(吸光度差)で除した値」、「(v) 前記2の(1)の試料(前記HMGB1分解産物)〔計7濃度〕について測定したときの測定値(450nmにおける吸光度)」、「(vi) 前記(v)の測定値から試薬盲検の値〔前記HMGB1分解産物の濃度が0ng/

40

50

m L の試料（前記 H M G B 1 分解産物）における当該測定値（450 nm における吸光度）を差し引いた値（吸光度差）」をそれぞれ示した。

〔3〕まとめ

（1）前記〔1〕における測定結果である図6及び表3、並びに前記〔2〕における測定結果である図7及び表4より、次のことが分かる。

すなわち、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料（前記 H M G B 1 分解産物）〔2.5 ~ 80 ng / mL〕のいずれにおいても、試料（前記 H M G B 1 分解産物）における値（吸光度差）を試料（H M G B 1）における値（吸光度差）で除した値は、約 8.5 ~ 14.9 の範囲にあった。

10

つまり、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、H M G B 1 の測定値（吸光度差）は大変低いものであり、試料に含まれる H M G B 1 の測り込みが非常に抑制されていることが分かる。

これに対して、前記 H M G B 1 分解産物の測定値（吸光度差）は高く、試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物を特異性高く測定できていることが分かる。

また、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、当該測定の検量線のグラフである図7より、この検量線が試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物の濃度に比例してほぼ直線的に伸びており、試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物を低濃度域から高濃度域までの広い範囲にわたって定量的に測定できていることも分かる。

20

（2）これに対して、従来免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料（前記 H M G B 1 分解産物）〔2.5 ~ 80 ng / mL〕のいずれにおいても、試料（前記 H M G B 1 分解産物）における値（吸光度差）を試料（H M G B 1）における値（吸光度差）で除した値は、約 0.72 ~ 0.79 の範囲にあった。

つまり、従来免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、いずれの濃度においても、同じ濃度における前記 H M G B 1 分解産物の測定値（吸光度差）よりも H M G B 1 の測定値（吸光度差）の方が高いことが分かる。

すなわち、従来免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、試料に含まれる H M G B 1 の方をより高感度に測り込んでしまうものであり、この H M G B 1 に由来する正の誤差による影響が非常に大きいものであり、試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物を特異性高く測定することが不可能なものであることが分かる。

30

（3）従って、本実施例における検討結果より、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬は、前記 H M G B 1 分解産物に対する特異性が高いものであって、H M G B 1 の測り込みが抑制され、すなわち H M G B 1 に由来する正の誤差が生じることが抑制され、前記 H M G B 1 分解産物のみを特異性高く、正確かつ高感度に定量測定することができるものであることが確かめられた。

〔実施例9〕（H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び測定試薬 - 2）

本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬により、試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物、試料に含まれる H M G B 1、試料に含まれる前記 H M G B 2 分解産物、及び試料に含まれる H M G B 2 の測定を行った。

40

1. 測定試薬

（1）抗体固相化マイクロプレート（5D1）

前記実施例8の〔2〕の1の（1）の記載の通りに調製し、これを、抗体固相化マイクロプレート（5D1）とした。

（2）ビオチン標識抗体液（2H6）

前記実施例8の〔2〕の1の（2）の記載の通りに調製し、これを、ビオチン標識抗体液（2H6）とした。

（3）ストレプトアビジン - パーオキシダーゼコンジュゲート液

前記実施例8の〔2〕の1の（3）の記載の通りに調製し、これを、ストレプトアビジン - パーオキシダーゼコンジュゲート液とした。

50

## (4) 洗浄液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (4) の記載の通りに調製し、これを、洗浄液とした。

## (5) 希釈液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (5) の記載の通りに調製し、これを、希釈液とした。

## (6) 発色液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (6) の記載の通りに調製し、これを、発色液とした。

## (7) 基質液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (7) の記載の通りに調製し、これを、基質液とした。

## (8) 発色基質

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (8) の記載の通りに調製し、これを、発色基質とした。

10

## (9) 反応停止液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (9) の記載の通りに調製し、これを、反応停止液とした。

。

## 2. 試料

## (1) 試料 (前記 HMGB 1 分解産物)

前記参考例 1 の〔2〕で調製した前記 HMGB 1 分解産物を、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々 1.5 ng/mL、3.1 ng/mL、6.2 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、及び 100 ng/mL の濃度となるように調製したものをそれぞれ試料 (前記 HMGB 1 分解産物) とした。

20

また、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、前記 HMGB 1 分解産物の濃度が 0 ng/mL の試料 (前記 HMGB 1 分解産物) とした。

## (2) 試料 (HMGB 1)

前記参考例 1 の〔1〕で調製した HMGB 1 を、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々 1.5 ng/mL、3.1 ng/mL、6.2 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、及び 100 ng/mL の濃度となるように調製したものをそれぞれ試料 (HMGB 1) とした。

30

また、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、HMGB 1 の濃度が 0 ng/mL の試料 (HMGB 1) とした。

## (3) 試料 (前記 HMGB 2 分解産物)

前記参考例 1 の〔3〕で調製した前記 HMGB 2 分解産物を、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々 1.5 ng/mL、3.1 ng/mL、6.2 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、及び 100 ng/mL の濃度となるように調製したものをそれぞれ試料 (前記 HMGB 2 分解産物) とした。

40

また、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、前記 HMGB 2 分解産物の濃度が 0 ng/mL の試料 (前記 HMGB 2 分解産物) とした。

## (4) 試料 (HMGB 2)

前記参考例 1 の〔1〕で調製した HMGB 2 を、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々 1.5 ng/mL、3.1 ng/mL、6.2 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、及び 100 ng/mL の濃度となるように調製したものをそれぞれ試料 (HMGB 2) とした。

また、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、HMGB 2 の濃度が 0 ng/mL の試料 (HMGB 2) とした。

50

### 3. 測定

(1) 前記1の(1)の抗体固相化マイクロプレート(5D1)の各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の250 $\mu$ Lで3回洗浄した。

(2) 次に、各ウェルに、前記1の(5)の希釈液の100 $\mu$ Lを分注した。

(3) 次に、前記2の(1)の計8濃度の試料(前記HMG B1分解産物)それぞれの10 $\mu$ Lを各ウェルに分注した後、各ウェルの上をプレートシールで封をし、5 で一晚静置し、このマイクロプレートのウェルに固相化された抗体と試料に含まれていた前記HMG B1分解産物との抗原抗体反応を行わせた。

(4) 次に、各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の400 $\mu$ Lで5回洗浄した。

(5) 次に、前記1の(2)のビオチン標識抗体液(2H6)の100 $\mu$ Lを各ウェルに分注し、25 で2時間静置し、前記の固相化抗体に結合した前記HMG B1分解産物とビオチン標識抗体との抗原抗体反応を行わせた。

(6) 次に、各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の400 $\mu$ Lで5回洗浄した。

(7) 次に、各ウェルに、前記1の(3)のストレプトアビジン-パーオキシダーゼコンジュゲート液を100 $\mu$ L分注し、25 で1時間静置し、「ビオチン-ストレプトアビジン」の結合反応を行わせた。

(8) 次に、各ウェルを、前記1の(4)の洗浄液の400 $\mu$ Lで5回洗浄した。

(9) 次に、各ウェルに、前記1の(8)の発色基質を100 $\mu$ L分注し、室温で20分間静置し、標識酵素であるパーオキシダーゼによる発色反応を行わせた。

(10) 次に、各ウェルに、前記1の(9)の反応停止液を100 $\mu$ L分注し、発色反応を停止させた。

(11) 次に、各ウェルの液の吸光度(主波長:450nm、副波長:550nm)を測定し、前記の計8濃度の試料(前記HMG B1分解産物)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

(12) 前記(3)における計8濃度の試料(前記HMG B1分解産物)の代わりに、前記2の(2)の計8濃度の試料(HMG B1)を用いる以外は、前記(1)~(11)の記載の通りに行い、前記の計8濃度の試料(HMG B1)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

(13) 前記(3)における計8濃度の試料(前記HMG B1分解産物)の代わりに、前記2の(3)の計8濃度の試料(前記HMG B2分解産物)を用いる以外は、前記(1)~(11)の記載の通りに行い、前記の計8濃度の試料(前記HMG B2分解産物)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

(14) 前記(3)における計8濃度の試料(前記HMG B1分解産物)の代わりに、前記2の(4)の計8濃度の試料(HMG B2)を用いる以外は、前記(1)~(11)の記載の通りに行い、前記の計8濃度の試料(HMG B2)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

### 4. 測定結果

(1) 前記3における測定結果、すなわち、本発明の前記HMG B1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬により、試料に含まれる前記HMG B1分解産物、試料に含まれるHMG B1、試料に含まれる前記HMG B2分解産物、及び試料に含まれるHMG B2それぞれの測定を行った結果を、図8に示した。

この図において、図の上方に、測定に使用した固相化抗体及び標識抗体それぞれの産生細胞株を表す文字を示した。

なお、この図において、横軸は試料に含まれる前記HMG B1分解産物、試料に含まれるHMG B1、試料に含まれる前記HMG B2分解産物、又は試料に含まれるHMG B2の濃度( $ng/mL$ )を示し、縦軸は測定により得られた吸光度〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕を示す。

また、この図において、「 $\square$ 」は前記2の(1)の試料(前記HMG B1分解産物)〔計8濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示し、「 $\square$ 」は前記2の(2)の試料(HMG B1)〔計8濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)

10

20

30

40

50

を示し、「」は前記2の(3)の試料(前記H M G B 2分解産物)〔計8濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示し、「」は前記2の(4)の試料(H M G B 2)〔計8濃度〕について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示す。

(2) また、前記3における測定結果の測定値を、表5に示した。

【表5】

(i) 濃度(ng/mL)	(ii) 試料(HMGB1)	(iii) 吸光度差[試料 (HMGB1)]	(iv) 「(ii)／(iii)」	(v) 試料(HMGB1 分解産物)	(vi) 吸光度差[試料 (HMGB1分解産 物)]	(vii) 試料(HMGB2)	(viii) 吸光度差[試料 (HMGB2)]	(ix) 「(vii)／(viii)」	(x) 試料(HMGB2 分解産物)	(xi) 吸光度差[試料 (HMGB2分解産 物)]	(xii) 「(xi)／(xii)」
100	0.298	0.101	12.436	1.459	1.256	0.232	0.033	38.646	0.237	0.034	37.493
50	0.249	0.052	9.096	0.676	0.473	0.218	0.019	25.588	0.217	0.013	36.385
25	0.224	0.027	7.241	0.399	0.196	0.211	0.012	17.000	0.198	-0.006	-32.583
12.5	0.200	0.003	30.400	0.279	0.076	0.202	0.003	30.400	0.205	0.001	76.000
6.2	0.195	-0.003	-10.400	0.229	0.026	0.193	-0.006	-4.333	0.197	-0.007	-3.714
3.1	0.193	-0.005	-1.778	0.211	0.008	0.191	-0.008	-1.000	0.194	-0.010	-0.800
1.5	0.197	-0.001	-3.000	0.205	0.001	0.196	-0.004	-0.429	0.203	-0.001	-3.000
0	0.197			0.203		0.199			0.204		

10

20

30

40

この表において、表の左上方に、測定に使用した固相化抗体及び標識抗体それぞれの産生細胞株を表す文字を示した。

なお、この表においては、左側より順に、「(i) 試料に含まれる前記H M G B 1分

50

解産物、試料に含まれるHMGB1、試料に含まれる前記HMGB2分解産物、又は試料に含まれるHMGB2の濃度(ng/mL)」、「(ii) 前記2の(2)の試料(HMGB1)〔計8濃度〕について測定したときの測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕」、「(iii) 前記(ii)の測定値から試薬盲検の値〔HMGB1の濃度が0ng/mLの試料(HMGB1)における当該測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕を差し引いた値(吸光度差)」、「(iv) 後記(vi)の試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を前記(ii)の試料(HMGB1)における値(吸光度差)で除した値」、「(v) 前記2の(1)の試料(前記HMGB1分解産物)〔計8濃度〕について測定したときの測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕」、「(vi) 前記(v)の測定値から試薬盲検の値〔前記HMGB1分解産物の濃度が0ng/mLの試料(前記HMGB1分解産物)における当該測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕を差し引いた値(吸光度差)」、「(vii) 前記2の(4)の試料(HMGB2)〔計8濃度〕について測定したときの測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕」、「(viii) 前記(vii)の測定値から試薬盲検の値〔HMGB2の濃度が0ng/mLの試料(HMGB2)における当該測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕を差し引いた値(吸光度差)」、「(ix) 前記(vi)の試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を前記(viii)の試料(HMGB2)における値(吸光度差)で除した値」、「(x) 前記2の(3)の試料(前記HMGB2分解産物)〔計8濃度〕について測定したときの測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕」、「(xi) 前記(x)の測定値から試薬盲検の値〔前記HMGB2分解産物の濃度が0ng/mLの試料(前記HMGB2分解産物)における当該測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕を差し引いた値(吸光度差)」、「(xii) 前記(vi)の試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を前記(xi)の試料(前記HMGB2分解産物)における値(吸光度差)で除した値」をそれぞれ示した。

5. まとめ

(1) 前記3における測定結果である図8及び表5より、次のことが分かる。

すなわち、本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、試料(前記HMGB1分解産物)〔濃度: 12.5~100ng/mL〕において、試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を試料(HMGB1)における値(吸光度差)で除した値は、約7~30の範囲にあった。

また、本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、試料(前記HMGB1分解産物)〔濃度: 12.5~100ng/mL〕において、試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を試料(HMGB2)における値(吸光度差)で除した値は、約17~39の範囲にあった。

そして、本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、試料(前記HMGB1分解産物)〔濃度: 12.5~100ng/mL〕において、試料(前記HMGB1分解産物)における値(吸光度差)を試料(前記HMGB2分解産物)における値(吸光度差)で除した値は、約-33~76の範囲にあった。

つまり、本発明の前記HMGB1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、HMGB1の測定値(吸光度差)、前記HMGB2分解産物の測定値(吸光度差)、及びHMGB2の測定値(吸光度差)はいずれも大変低いものであり、試料に含まれるHMGB1、前記HMGB2分解産物、及びHMGB2それぞれの測り込みが非常に抑制されていることが分かる。

これに対して、前記HMGB1分解産物の測定値(吸光度差)は高く、試料に含まれる

10

20

30

40

50

前記 H M G B 1 分解産物を特異性高く測定できていることが分かる。

また、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、当該測定の検量線のグラフである図 8 より、この検量線が試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物の濃度に比例してほぼ直線的に伸びており、試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物を低濃度域から高濃度域までの広い範囲にわたって定量的に測定できていることも分かる。

(2) 従って、本実施例における検討結果からも、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬は、前記 H M G B 1 分解産物に対する特異性が高いものであって、H M G B 1 等の測り込みが抑制され、すなわち H M G B 1 等に由来する正の誤差が生じることが抑制され、前記 H M G B 1 分解産物のみを特異性高く、正確かつ高感度に定量測定することができるものであることが確かめられた。

10

〔実施例 10〕(H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び測定試薬 - 3)

本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬により、試料に含まれる前記 H M G B 1 分解産物、試料に含まれる H M G B 1、試料に含まれる前記 H M G B 2 分解産物、及び試料に含まれる H M G B 2 の測定を行った。

#### 1. 測定試薬

##### (1) 抗体固相化マイクロプレート

##### (i) 抗体固相化マイクロプレート (2 A 1 0)

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (1) における抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (5 D 1) の代わりに、前記実施例 3 の抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (2 A 1 0) を用いる以外は、前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (1) の記載の通りに調製を行い、これを、抗体固相化マイクロプレート (2 A 1 0) とした。

20

##### (i i) 抗体固相化マイクロプレート (6 H 3)

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (1) における抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (5 D 1) の代わりに、前記実施例 4 の抗 H M G B 1 分解産物等抗体 (6 H 3) を用いる以外は、前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (1) の記載の通りに調製を行い、これを、抗体固相化マイクロプレート (6 H 3) とした。

##### (2) ビオチン標識抗体液 (2 H 6)

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (2) の記載の通りに調製し、これを、ビオチン標識抗体液 (2 H 6) とした。

30

##### (3) ストレプトアビジン - パーオキシダーゼコンジュゲート液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (3) の記載の通りに調製し、これを、ストレプトアビジン - パーオキシダーゼコンジュゲート液とした。

##### (4) 洗浄液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (4) の記載の通りに調製し、これを、洗浄液とした。

##### (5) 希釈液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (5) の記載の通りに調製し、これを、希釈液とした。

##### (6) 発色液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (6) の記載の通りに調製し、これを、発色液とした。

##### (7) 基質液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (7) の記載の通りに調製し、これを、基質液とした。

40

##### (8) 発色基質

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (8) の記載の通りに調製し、これを、発色基質とした。

##### (9) 反応停止液

前記実施例 8 の〔2〕の 1 の (9) の記載の通りに調製し、これを、反応停止液とした。

。

#### 2. 試料

##### (1) 試料 (前記 H M G B 1 分解産物)

前記参考例 1 の〔2〕で調製した前記 H M G B 1 分解産物を、0.5% カゼインナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食

50

塩水により、各々2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、及び80 ng/mLの濃度となるように調製したものをそれぞれ試料（前記HMGB1分解産物）とした。

また、0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、前記HMGB1分解産物の濃度が0 ng/mLの試料（前記HMGB1分解産物）とした。

（2）試料（HMGB1）

前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB1を、0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、及び80 ng/mLの濃度となるように調製したものをそれぞれ試料（HMGB1）とした。

10

また、0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、HMGB1の濃度が0 ng/mLの試料（HMGB1）とした。

（3）試料（前記HMGB2分解産物）

前記参考例1の〔3〕で調製した前記HMGB2分解産物を、0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、及び80 ng/mLの濃度となるように調製したものをそれぞれ試料（前記HMGB2分解産物）とした。

20

また、0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、前記HMGB2分解産物の濃度が0 ng/mLの試料（前記HMGB2分解産物）とした。

（4）試料（HMGB2）

前記参考例1の〔1〕で調製したHMGB2を、0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水により、各々2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、及び80 ng/mLの濃度となるように調製したものをそれぞれ試料（HMGB2）とした。

30

また、0.5%カゼインナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を、HMGB2の濃度が0 ng/mLの試料（HMGB2）とした。

3. 測定

（1）前記1の（1）の（i）の抗体固相化マイクロプレート（2A10）の各ウェルを、前記1の（4）の洗浄液の400 µLで3回洗浄した。

（2）次に、各ウェルに、前記1の（5）の希釈液の100 µLを分注した。

（3）次に、前記2の（1）の計7濃度の試料（前記HMGB1分解産物）それぞれの10 µLを各ウェルに分注した後、各ウェルの上をプレートシールで封をし、5 で一晩静置し、このマイクロプレートのウェルに固相化された抗体と試料に含まれていた前記HMGB1分解産物との抗原抗体反応を行わせた。

40

（4）次に、各ウェルを、前記1の（4）の洗浄液の400 µLで5回洗浄した。

（5）次に、前記1の（2）のビオチン標識抗体液（2H6）の100 µLを各ウェルに分注し、25 で2時間静置し、前記の固相化抗体に結合した前記HMGB1分解産物とビオチン標識抗体との抗原抗体反応を行わせた。

（6）次に、各ウェルを、前記1の（4）の洗浄液の400 µLで5回洗浄した。

（7）次に、各ウェルに、前記1の（3）のストレプトアビジン-パーオキシダーゼコンジュゲート液を100 µL分注し、25 で1時間静置し、「ビオチン-ストレプトアビジン」の結合反応を行わせた。

（8）次に、各ウェルを、前記1の（4）の洗浄液の400 µLで5回洗浄した。

50

(9) 次に、各ウェルに、前記1の(8)の発色基質を100 $\mu$ L分注し、室温で20分間静置し、標識酵素であるパーオキシダーゼによる発色反応を行わせた。

(10) 次に、各ウェルに、前記1の(9)の反応停止液を100 $\mu$ L分注し、発色反応を停止させた。

(11) 次に、各ウェルの液の吸光度(主波長:450nm、副波長:550nm)を測定し、前記の計7濃度の試料(前記HMG B1分解産物)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

(12) 前記(3)における計7濃度の試料(前記HMG B1分解産物)の代わりに、前記2の(2)の計7濃度の試料(HMG B1)を用いる以外は、前記(1)~(11)の記載の通りに行い、前記の計7濃度の試料(HMG B1)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。 10

(13) 前記(3)における計7濃度の試料(前記HMG B1分解産物)の代わりに、前記2の(3)の計7濃度の試料(前記HMG B2分解産物)を用いる以外は、前記(1)~(11)の記載の通りに行い、前記の計7濃度の試料(前記HMG B2分解産物)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

(14) 前記(3)における計7濃度の試料(前記HMG B1分解産物)の代わりに、前記2の(4)の計7濃度の試料(HMG B2)を用いる以外は、前記(1)~(11)の記載の通りに行い、前記の計7濃度の試料(HMG B2)をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。

(15) 前記(1)における抗体固相化マイクロプレート(2A10)の代わりに、前記1の(1)の(ii)の抗体固相化マイクロプレート(6H3)を用いる以外は、前記(1)~(14)の記載の通りに行い、前記の試料(前記HMG B1分解産物)[計7濃度]、試料(HMG B1)[計7濃度]、試料(前記HMG B2分解産物)[計7濃度]、及び試料(HMG B2)[計7濃度]をそれぞれ測定した場合の吸光度を得た。 20

#### 4. 測定結果

(1) 前記3における測定結果、すなわち、本発明の前記HMG B1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬により、試料に含まれる前記HMG B1分解産物、試料に含まれるHMG B1、試料に含まれる前記HMG B2分解産物、及び試料に含まれるHMG B2それぞれの測定を行った結果を、図9〔抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート(2A10)を使用した場合の測定の結果〕及び図10〔抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート(6H3)を使用した場合の測定の結果〕に示した。 30

これらの図において、図の上方に、測定に使用した固相化抗体及び標識抗体それぞれの産生細胞株を表す文字を示した。

なお、これらの図において、横軸は試料に含まれる前記HMG B1分解産物、試料に含まれるHMG B1、試料に含まれる前記HMG B2分解産物、又は試料に含まれるHMG B2の濃度(n g / m L)を示し、縦軸は測定により得られた吸光度〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕を示す。

また、これらの図において、「 $\square$ 」は前記2の(1)の試料(前記HMG B1分解産物)[計7濃度]について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示し、「 $\square$ 」は前記2の(2)の試料(HMG B1)[計7濃度]について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示し、「 $\square$ 」は前記2の(3)の試料(前記HMG B2分解産物)[計7濃度]について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示し、「 $\square$ 」は前記2の(4)の試料(HMG B2)[計7濃度]について測定したときの測定値(前記の吸光度)を示す。 40

(2) また、前記3における測定結果の測定値を、表6〔抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート(2A10)を使用した場合の測定の結果〕及び表7〔抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート(6H3)を使用した場合の測定の結果〕に示した。

【表 6】

2A10/2H6 (i) 濃度 (ng/mL)	(ii) 試料(HMG B1)	(iii) 吸光度差[試 料(HMGB 1)]	(iv) 「(vi) / (iii)」	(v) 試料(HMG B1分解産 物)	(vi) 吸光度差[試 料(HMGB1 分解産物)]	(vii) 試料(HMG B2)	(viii) 吸光度差[試 料(HMGB 2)]	(ix) 「(vi) / (viii)」	(x) 試料(HMG B2分解産 物)	(xi) 吸光度差[試 料(HMGB2 分解産物)]	(xii) 「(vi) / (x i)」
80	0.581	0.318	3.928	1.511	1.247	0.306	0.043	29.341	0.364	0.100	12.470
40	0.408	0.144	3.792	0.810	0.546	0.257	-0.007	-78.000	0.283	0.019	28.737
20	0.346	0.083	3.885	0.584	0.321	0.275	0.011	29.136	0.282	0.019	17.324
10	0.299	0.035	3.614	0.390	0.127	0.244	-0.020	-6.487	0.273	0.010	13.316
5	0.276	0.012	6.042	0.336	0.073	0.272	0.008	9.062	0.267	0.003	24.167
2.5	0.265	0.002	15.333	0.287	0.023	0.253	-0.011	-2.091	0.260	-0.004	-5.750
0	0.264			0.264		0.264			0.264		

10

20

30

40

【表 7】

6H3/2H6	(i) 濃度 (ng/mL)	(ii) 試料(HMG B1)	(iii) 吸光度差[試 料(HMGB 1)]	(iv) 「(vi) / (iii)」	(v) 試料(HMG B1分解産 物)	(vi) 吸光度差[試 料(HMGB1 分解産物)]	(vii) 試料(HMG B2)	(viii) 吸光度差[試 料(HMGB 2)]	(ix) 「(vi) / (viii)」	(x) 試料(HMG B2分解産 物)	(xi) 吸光度差[試 料(HMGB2 分解産物)]	(xii) 「(vi) / (x i)」
	80	0.594	0.329	4.022	1.589	1.324	0.300	0.035	37.567	0.343	0.343	3.866
	40	0.411	0.146	5.809	0.850	0.850	0.269	0.004	226.533	0.264	-0.001	-679.600
	20	0.347	0.082	3.991	0.593	0.328	0.268	0.003	119.364	0.269	0.004	77.235
	10	0.314	0.049	3.133	0.418	0.153	0.262	-0.003	-47.000	0.250	-0.015	-10.356
	5	0.290	0.025	3.257	0.347	0.082	0.267	0.002	36.556	0.255	-0.010	-8.024
	2.5	0.276	0.011	3.889	0.309	0.044	0.256	-0.009	-5.000	0.249	-0.016	-2.692
	0	0.265			0.265		0.265			0.265		

10

20

30

40

50

これらの表において、表の左上方に、測定に使用した固相化抗体及び標識抗体それぞれの産生細胞株を表す文字を示した。

なお、これらの表においては、左側より順に、「(i) 試料に含まれる前記HMG B 1分解産物、試料に含まれるHMG B 1、試料に含まれる前記HMG B 2分解産物、又は試料に含まれるHMG B 2の濃度(ng/mL)」、「(ii) 前記2の(2)の試料(HMG B 1)〔計7濃度〕について測定したときの測定値〔主波長(450nm)における吸光度から副波長(550nm)における吸光度を差し引いたもの〕」、「(iii

) 前記 ( i i ) の測定値から試薬盲検の値 [ H M G B 1 の濃度が 0 n g / m L の試料 ( H M G B 1 ) における当該測定値 [ 主波長 ( 4 5 0 n m ) における吸光度から副波長 ( 5 5 0 n m ) における吸光度を差し引いたもの ] ] を差し引いた値 ( 吸光度差 ) 、 「 ( i v ) 後記 ( v i ) の試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) を前記 ( i i i ) の試料 ( H M G B 1 ) における値 ( 吸光度差 ) で除した値」、 「 ( v ) 前記 2 の ( 1 ) の試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) [ 計 7 濃度 ] について測定したときの測定値 [ 主波長 ( 4 5 0 n m ) における吸光度から副波長 ( 5 5 0 n m ) における吸光度を差し引いたもの ]」、 「 ( v i ) 前記 ( v ) の測定値から試薬盲検の値 [ 前記 H M G B 1 分解産物の濃度が 0 n g / m L の試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) における当該測定値 [ 主波長 ( 4 5 0 n m ) における吸光度から副波長 ( 5 5 0 n m ) における吸光度を差し引いたもの ] ] を差し引いた値 ( 吸光度差 )」、 「 ( v i i ) 前記 2 の ( 4 ) の試料 ( H M G B 2 ) [ 計 7 濃度 ] について測定したときの測定値 [ 主波長 ( 4 5 0 n m ) における吸光度から副波長 ( 5 5 0 n m ) における吸光度を差し引いたもの ]」、 「 ( v i i i ) 前記 ( v i i ) の測定値から試薬盲検の値 [ H M G B 2 の濃度が 0 n g / m L の試料 ( H M G B 2 ) における当該測定値 [ 主波長 ( 4 5 0 n m ) における吸光度から副波長 ( 5 5 0 n m ) における吸光度を差し引いたもの ] ] を差し引いた値 ( 吸光度差 )」、 「 ( i x ) 前記 ( v i ) の試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) を前記 ( v i i i ) の試料 ( H M G B 2 ) における値 ( 吸光度差 ) で除した値」、 「 ( x ) 前記 2 の ( 3 ) の試料 ( 前記 H M G B 2 分解産物 ) [ 計 7 濃度 ] について測定したときの測定値 [ 主波長 ( 4 5 0 n m ) における吸光度から副波長 ( 5 5 0 n m ) における吸光度を差し引いたもの ]」、 「 ( x i ) 前記 ( x ) の測定値から試薬盲検の値 [ 前記 H M G B 2 分解産物の濃度が 0 n g / m L の試料 ( 前記 H M G B 2 分解産物 ) における当該測定値 [ 主波長 ( 4 5 0 n m ) における吸光度から副波長 ( 5 5 0 n m ) における吸光度を差し引いたもの ] ] を差し引いた値 ( 吸光度差 )」、 「 ( x i i ) 前記 ( v i ) の試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) を前記 ( x i ) の試料 ( 前記 H M G B 2 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) で除した値」をそれぞれ示した。

10

20

5. まとめ

[ a ] 抗体固相化マイクロプレート ( 2 A 1 0 ) を使用した場合

( 1 ) 前記 3 における測定結果である図 9 及び表 6 [ いずれも抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート ( 2 A 1 0 ) を使用した場合の測定の結果 ] より、次のことが分かる。

30

すなわち、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) [ 2 . 5 ~ 8 0 n g / m L ] のいずれにおいても、試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) を試料 ( H M G B 1 ) における値 ( 吸光度差 ) で除した値は、約 3 . 6 ~ 1 5 の範囲にあった。

また、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) [ 2 . 5 ~ 8 0 n g / m L ] のいずれにおいても、試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) を試料 ( H M G B 2 ) における値 ( 吸光度差 ) で除した値は、約 - 7 8 ~ 2 9 の範囲にあった。

40

そして、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) [ 2 . 5 ~ 8 0 n g / m L ] のいずれにおいても、試料 ( 前記 H M G B 1 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) を試料 ( 前記 H M G B 2 分解産物 ) における値 ( 吸光度差 ) で除した値は、約 - 5 ~ 2 9 の範囲にあった。

つまり、本発明の前記 H M G B 1 分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、H M G B 1 の測定値 ( 吸光度差 ) 、前記 H M G B 2 分解産物の測定値 ( 吸光度差 ) 、及び H M G B 2 の測定値 ( 吸光度差 ) はいずれも大変低いものであり、試料に含まれる H M G B 1 、前記 H M G B 2 分解産物、及び H M G B 2 それぞれの測り込みが非常に抑制されていることが分かる。

これに対して、前記 H M G B 1 分解産物の測定値 ( 吸光度差 ) は高く、試料に含まれる

50

前記H M G B 1分解産物を特異性高く測定できていることが分かる。

また、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、当該測定の検量線のグラフである図9より、この検量線が試料に含まれる前記H M G B 1分解産物の濃度に比例してほぼ直線的に伸びており、試料に含まれる前記H M G B 1分解産物を低濃度域から高濃度域までの広い範囲にわたって定量的に測定できていることも分かる。

(2) 従って、本実施例における検討結果〔抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート(2A10)を使用した場合の測定の結果〕からも、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬は、前記H M G B 1分解産物に対する特異性が高いものであって、H M G B 1等の測り込みが抑制され、すなわちH M G B 1等に由来する正の誤差が生じることが抑制され、前記H M G B 1分解産物のみを特異性高く、正確かつ高感度に定量測定することができるものであることが確かめられた。

10

〔b〕抗体固相化マイクロプレート(6H3)を使用した場合

(1) 前記〔1〕における測定結果である図10及び表7〔いずれも抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート(6H3)を使用した場合の測定の結果〕より、次のことが分かる。

すなわち、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料(前記H M G B 1分解産物)〔2.5~80ng/mL〕のいずれにおいても、試料(前記H M G B 1分解産物)における値(吸光度差)を試料(H M G B 1)における値(吸光度差)で除した値は、約3.1~5.8の範囲にあった。

20

また、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料(前記H M G B 1分解産物)〔2.5~80ng/mL〕のいずれにおいても、試料(前記H M G B 1分解産物)における値(吸光度差)を試料(H M G B 2)における値(吸光度差)で除した値は、約-47~227の範囲にあった。

そして、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、測定を行った試料(前記H M G B 1分解産物)〔2.5~80ng/mL〕のいずれにおいても、試料(前記H M G B 1分解産物)における値(吸光度差)を試料(前記H M G B 2分解産物)における値(吸光度差)で除した値は、約-680~77の範囲にあった。

30

つまり、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、H M G B 1の測定値(吸光度差)、前記H M G B 2分解産物の測定値(吸光度差)、及びH M G B 2の測定値(吸光度差)はいずれも大変低いものであり、試料に含まれるH M G B 1、前記H M G B 2分解産物、及びH M G B 2それぞれの測り込みが非常に抑制されていることが分かる。

これに対して、前記H M G B 1分解産物の測定値(吸光度差)は高く、試料に含まれる前記H M G B 1分解産物を特異性高く測定できていることが分かる。

また、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬においては、当該測定の検量線のグラフである図10より、この検量線が試料に含まれる前記H M G B 1分解産物の濃度に比例してほぼ直線的に伸びており、試料に含まれる前記H M G B 1分解産物を低濃度域から高濃度域までの広い範囲にわたって定量的に測定できていることも分かる。

40

(2) 従って、本実施例における検討結果〔抗体固相化マイクロプレートとして抗体固相化マイクロプレート(6H3)を使用した場合の測定の結果〕からも、本発明の前記H M G B 1分解産物の免疫学的測定方法及び免疫学的測定試薬は、前記H M G B 1分解産物に対する特異性が高いものであって、H M G B 1等の測り込みが抑制され、すなわちH M G B 1等に由来する正の誤差が生じることが抑制され、前記H M G B 1分解産物のみを特異性高く、正確かつ高感度に定量測定することができるものであることが確かめられた。

〔配列表〕

## SEQUENCE LISTING

<110> Shino-test corporation

<120> Antibody Specifically Binding to HMGB1 Degradation Product, and Assay Method and Assay Reagent for HMGB1 Degradation Product

<130> PCT13-03-257

10

<150> JP 2013-057088

<151> 2013-03-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
1 5 10 15

30

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
35 40 45

40

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro  
65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys  
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys  
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val  
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu  
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Asp  
 210 215

<210> 2

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

20

30

40

&lt;400&gt; 2

Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu  
 1 5 10 15

His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser  
 20 25 30

10

Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly  
 35 40 45

Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu  
 50 55 60

20

Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys  
 65 70 75 80

Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys  
 85 90 95

30

Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile  
 100 105 110

Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala  
 115 120 125

Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys  
 130 135 140

40

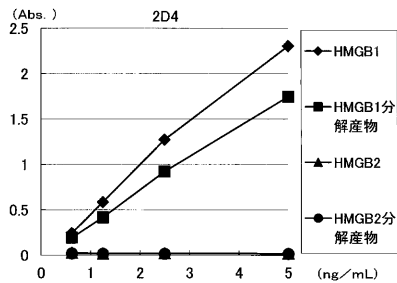
Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala  
 145 150 155 160

Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu  
 165 170 175

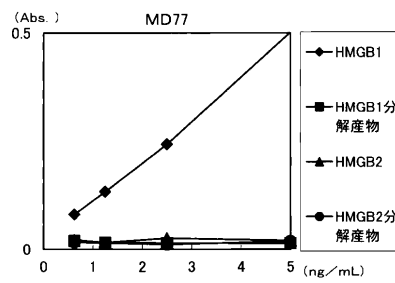
Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp  
 180 185 190

Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Asp  
 195 200 205

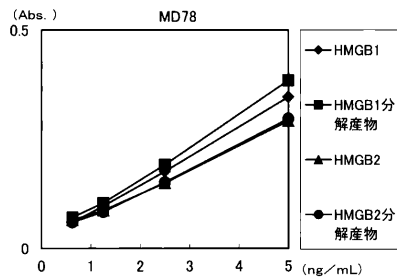
【 図 4 A 】



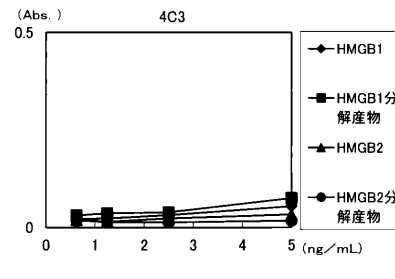
【 図 4 I 】



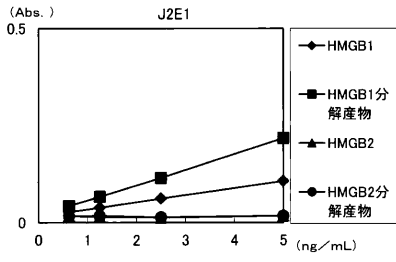
【 図 4 H 】



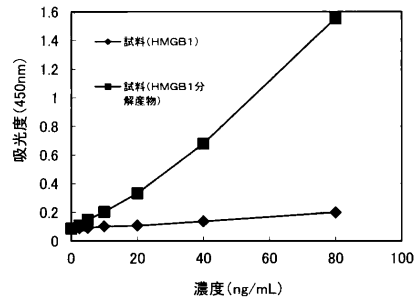
【 図 4 J 】



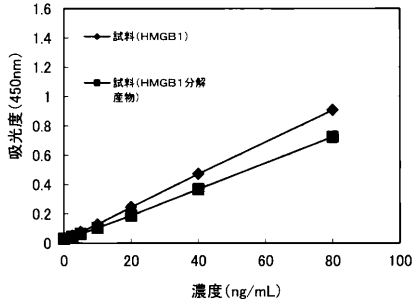
【 図 4 K 】



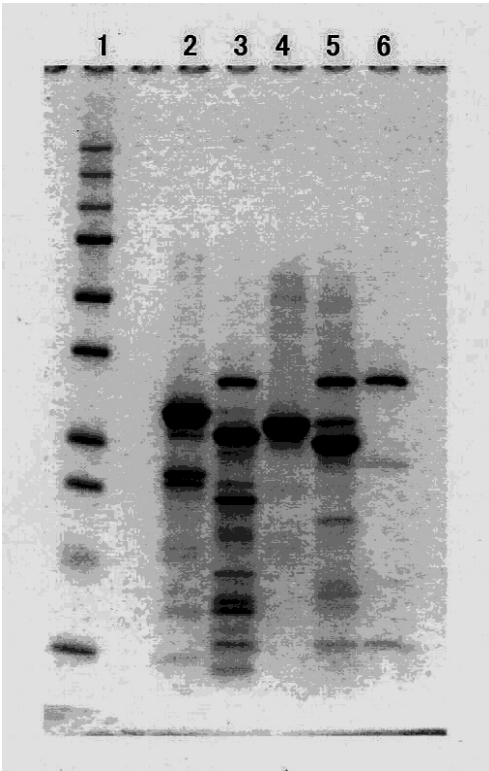
【 図 7 】



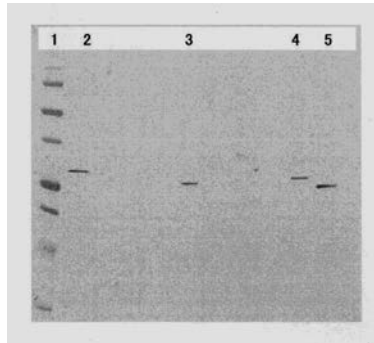
【 図 6 】



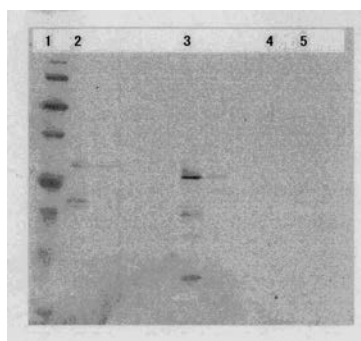
【 図 1 】



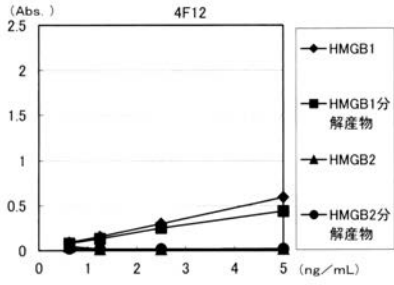
【 図 2 】



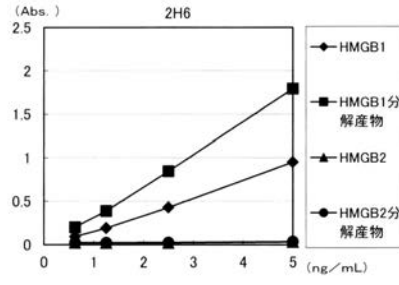
【 図 3 】



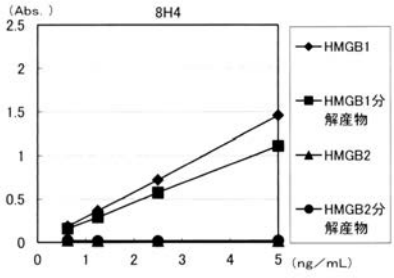
【 図 4 B 】



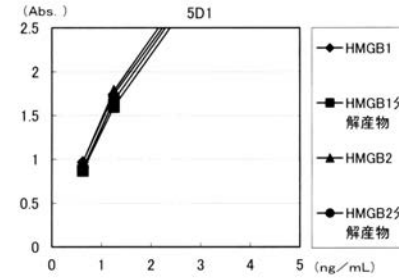
【 図 4 D 】



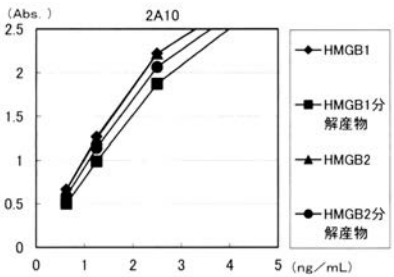
【 図 4 C 】



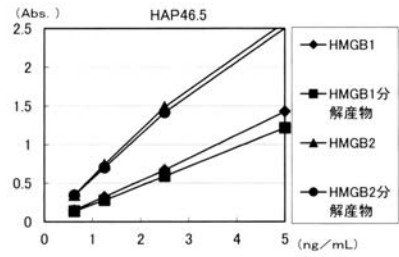
【 図 4 E 】



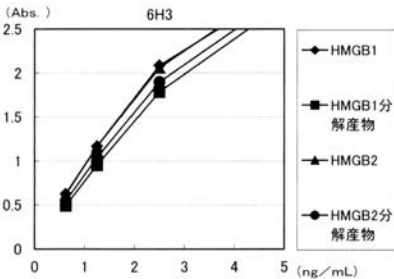
【 図 4 F 】



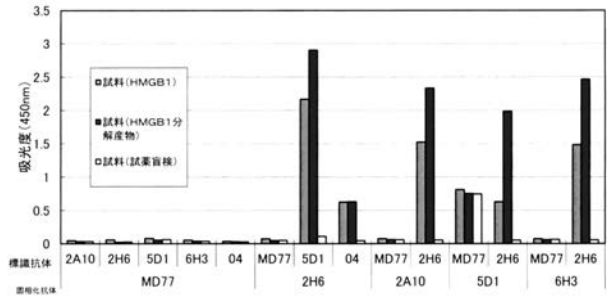
【 図 4 L 】



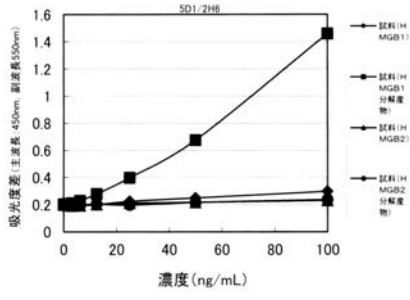
【 図 4 G 】



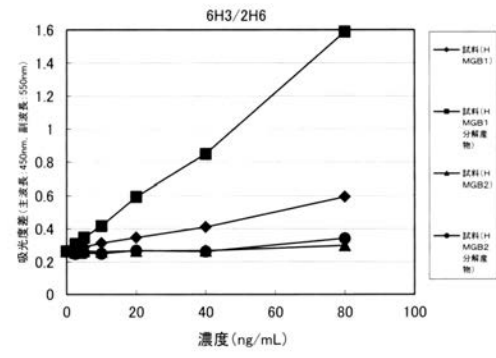
【 図 5 】



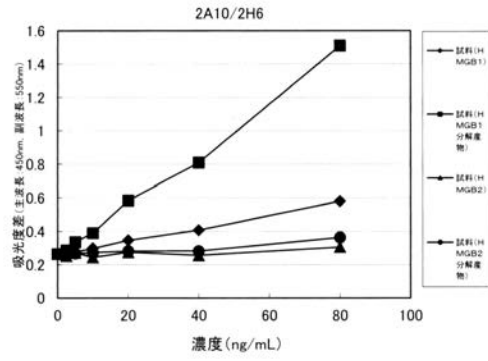
【 図 8 】



【 図 10 】



【 図 9 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/076177

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n		
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) C07K16/00-16/46, C12N15/00-15/90, G01N33/48-33/98		
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 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	HMGB1 monoclonal antibody, clone J2E1, [online], 04 March 2013 (04.03.2013), Abnova, [retrieval date 21 November 2013 (21.11.2013)], Internet <URL: <a href="http://www.abnova.com/PDFServer/outputs/MAB1771.pdf">http://www.abnova.com/PDFServer/outputs/ MAB1771.pdf</a> >	1-3 4-13
X A	ONO T. et al., "Elevated High Morbidity Group Box Protein 1 on Pathological Findings in Subclinical Interstitial Pneumonia During Early Phase of Thoracic Surgery", Akita J. Med., 2010, 37(2), pp.75-84	1-3 4-13
X A	WO 2012/170742 A2 (UNIVERSITY OF HAWAII), 13 December 2012 (13.12.2012), paragraph [0048] & WO 2012/170740 A2	1-3 4-13
<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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 21 November, 2013 (21.11.13)		Date of mailing of the international search report 03 December, 2013 (03.12.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/076177

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ITO T. et al., "Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes", <i>Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.</i> , 2008, 28(10), pp.1825-1830	1-13
A	US 2011/0268738 A1 (DAVORKA M.), 03 November 2011 (03.11.2011), abstract & US 2013/0115217 A1 & EP 1899376 A2 & EP 2364998 A1 & WO 2006/138429 A2	1-13
A	JP 2008-520552 A (Medimmune, Inc.), 19 June 2008 (19.06.2008), abstract; claims & US 2006/0099207 A1 & US 2009/0169546 A1 & US 2010/0061987 A1 & US 2011/0287023 A1 & EP 1812065 A2 & WO 2007/001422 A2 & CA 2585043 A & KR 10-2007-0090890 A & CN 101132811 A & AU 2005333602 A & CN 102731654 A	1-13
A	JP 2009-50269 A (Shino-Test Corp.), 12 March 2009 (12.03.2009), abstract & JP 2003-96099 A	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2013/076177	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
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. C07K16/00-16/46, C12N15/00-15/90, G01N33/48-33/98			
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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) CPlus (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
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	
X A	HMGB1 monoclonal antibody, clone J2E1, [online]、2013年3月4日、Abnova、[2013年11月21日検索]、インターネット <URL: http://www.abnova.com/PDFServer/outputs/MAB1771.pdf>	1-3 4-13	
X A	ONO T. et al., "Elevated High Morbidity Group Box Protein 1 on Pathological Findings in Subclinical Interstitial Pneumonia During Early Phase of Thoracic Surgery", Akita J. Med., 2010, 37(2), pp.75-84	1-3 4-13	
<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 21.11.2013		国際調査報告の発送日 03.12.2013	
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) 三原 健治	4B 5082
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 7 6 1 7 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
X A	WO 2012/170742 A2 (UNIVERSITY OF HAWAII) 2012.12.13, [0048] & WO 2012/170740 A2	1-3 4-13
A	ITO T. et al., "Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes", Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2008, 28(10), pp.1825-1830	1-13
A	US 2011/0268738 A1 (DAVORKA M.) 2011.11.03, 要約 & US 2013/0115217 A1 & EP 1899376 A2 & EP 2364998 A1 & WO 2006/138429 A2	1-13
A	JP 2008-520552 A (メディミューン, インコーポレーテッド) 2008.06.19, 要約、特許請求の範囲 & US 2006/0099207 A1 & US 2009/0169546 A1 & US 2010/0061987 A1 & US 2011/0287023 A1 & EP 1812065 A2 & WO 2007/001422 A2 & CA 2585043 A & KR 10-2007-0090890 A & CN 101132811 A & AU 2005333602 A & CN 102731654 A	1-13
A	JP 2009-50269 A (株式会社シノテスト) 2009.03.12, 要約 & JP 2003-96099 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, KM, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

特許法第30条第2項適用申請有り 電子通信回線での発表電子通信回線掲載日：平成24年9月20日掲載アドレス：<http://hdl.handle.net/10232/14804>

(72) 発明者 東 義則

神奈川県相模原市南区大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト 相模原事業所内

(72) 発明者 山田 晋吾

神奈川県相模原市南区大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト 相模原事業所内

(72) 発明者 小野 幸恵

神奈川県相模原市南区大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト 相模原事業所内

(72) 発明者 丸山 征郎

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内

(72) 発明者 伊藤 隆史

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内

Fターム(参考) 4B064 AG27 BJ12 CA11 CA20 CC15 CC24 CE12 DA13

4H045 AA11 CA42 DA76 EA50 FA71 FA74 GA26

(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)	特异性结合HMGB1降解产物的抗体，测定HMGB1降解产物的方法和测定试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2014147873A1</a>	公开(公告)日	2017-02-16
申请号	JP2015506540	申请日	2013-09-19
申请(专利权)人(译)	株式会社シノテスト 国立大学法人鹿児島大学		
[标]发明人	東義則 山田晋吾 小野幸恵 丸山征郎 伊藤隆史		
发明人	東 義則 山田 晋吾 小野 幸恵 丸山 征郎 伊藤 隆史		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/6875 C07K16/24		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D G01N33/543.501.N G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA11 4B064/CA20 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2013057088 2013-03-19 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**

本发明提供对HMGB1降解产物具有高特异性的抗体，以及仅能够准确地定量测定HMGB1降解产物的测定方法和测定试剂。一种通过凝血酶或凝血酶-凝血调节蛋白复合物与HMGB1的降解产物结合的抗体，其对凝血酶或凝血酶-凝血调节蛋白复合物对HMGB1的降解产物具有亲和力，该亲和力至少是对HMGB1的亲合力的1.5倍；使用抗体和结合HMGB1凝血酶或凝血酶-凝血调节蛋白复合物的降解产物的抗体对HMGB1降解产物进行免疫，其中该抗体对HMGB1凝血酶或凝血酶-凝血调节蛋白复合物的降解产物具有高亲和力。方法和免疫试剂。

(19) 日本国特許庁(JP)		<b>再公表特許(A1)</b>		(11) 国際公開番号 <b>WO2014/147873</b>	
発行日 平成29年2月16日(2017.2.16)		(43) 国際公開日		平成26年9月25日(2014.9.25)	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード(参考)	
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>		C07K 16/18 ZNA		4B064	
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>		GO1N 33/53 D		4H045	
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>		GO1N 33/543 SO1N			
<b>GO1N 33/577 (2006.01)</b>		GO1N 33/577 B			
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>		C12P 21/08			
		審査請求 有		予備審査請求 未請求 (全71頁)	
出願番号 特願2015-506540(P2015-506540)		(71) 出願人 000131474		株式会社シノテスト	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/076177		(71) 出願人 504258527		東京都千代田区神田神保町一丁目5番地	
(22) 国際出願日 平成25年9月19日(2013.9.19)		(71) 出願人 国立大学法人 鹿児島大学		鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号	
(31) 優先権主張番号 特願2013-57088(P2013-57088)		(74) 代理人 100091096		弁理士 平本 祐輔	
(32) 優先日 平成25年3月19日(2013.3.19)		(74) 代理人 100118773		弁理士 藤田 勝	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)		(74) 代理人 100101904		弁理士 島村 直己	

(54) 【発明の名称】 HMGB1の分解産物と特異的に結合する抗体、並びにHMGB1の分解産物の測定方法及び測定試薬

最終頁に続く