

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

**特開2003 - 161732**

**(P2003 - 161732A)**

(43)公開日 平成15年6月6日(2003.6.6)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53	ZNA	G 0 1 N 33/53	ZNA D 4 H 0 4 5
			U
// C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 14数)

(21)出願番号 特願2001 - 363152(P2001 - 363152)

(22)出願日 平成13年11月28日(2001.11.28)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年11月5日  
日本比較内分泌学会発行の「第26回日本比較内分泌学  
会及びシンポジウム プログラム・講演要旨」に発表

(71)出願人 000118497

伊藤ハム株式会社

兵庫県神戸市灘区備後町3丁目2番1号

(72)発明者 松田 恒平

富山県富山市黒瀬北町2丁目15番地5 信開

クレパール黒瀬605号

(72)発明者 尾上 誠良

茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1丁目2番

伊藤ハム株式会社中央研究所内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経ペプチドの定量方法

(57)【要約】

【課題】 放射性同位元素を用いず、なおかつ簡便、高  
感度な下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチ  
ド ( PACAP ) および血管作動性腸管ポリペプチド ( VIP )  
の超微量測定方法を提供する。

【解決手段】 ビオチンを N 末端に結合させたPACAPま  
たはVIPを用いる酵素免疫検定法を行うことを特徴とす  
る、PACAP及びVIPの定量方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビオチンをN末端に結合させた下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)を用いる酵素免疫検定法を行うことを特徴とする、PACAPの定量方法。

【請求項2】 ビオチンをN末端に結合させた血管作動性腸管ポリペプチド(VIP)を用いる酵素免疫検定法を行うことを特徴とする、VIPの定量方法。

【請求項3】 PACAPが配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 PACAPが配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 VIPが配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項6】 酵素免疫検定法により、PACAP27を選択的に定量する方法。

【請求項7】 酵素免疫検定法により、PACAP38を選択的に定量する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)類の定量方法、詳しくはPACAP27、PACAP38並びに魚類をはじめとする多くの各種動物種のPACAP類と血管作動性腸管ポリペプチド(VIP)類の免疫抗体定量方法に関するものであり、簡便かつ高感度なアッセイシステムを提供する。

## 【0002】

【従来の技術】Harrisにより提唱された「腺性下垂体は、視床下部で産生され門脈を介して下垂体前葉に運ばれる体液性因子によりコントロールされる」という仮説に基づき、過去30年の間に甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)、成長ホルモン分泌抑制ホルモン(ソマトスタチン)、成長ホルモン放出因子(GRH)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRH)といった視床下部ホルモンが同定されてきた。これらの物質は神経伝達物質や神経機能調節因子として作用する神経ペプチドであり、視床下部からの放出後、下垂体に作用し、各種刺激に応じたホルモンの分泌の促進や抑制を行う。しかし、上記物質ですべての神経ペプチドが同定されたかどうかは議論のあるところである。そこで有村らは、従来の神経ペプチドに対する分離・同定の戦略を変え、分離のための指標として下垂体前葉細胞中の細胞内情報伝達系(特に、CRH、GRHによるGH、ACTHの分泌に重要であるcAMP系)の活性化を指標とし、視床下部から新たな神経ペプチドの分離を試み、最終的にそれを同定した(Miyata Aら、Biochem Biophys Res Commun (1989) 164 567-574)。そして、このペプチドは下

垂体のアデニレートシクラーゼ(adenylate cyclase)の活性化を指標として分離されたことから、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide、以下、PACAPと称する)と名付けられた。哺乳類PACAPには38個のアミノ酸より構成されるPACAP38とC末端側11個のアミノ酸が欠如したPACAP27の2種類が同定されており、PACAP38の組織含有量はPACAP27の約10倍多いが、組織によりその含有率の変動が見られる。一方、哺乳類以外の動物種においてもPACAP類が同定されているものの、分子種の数、種類など不明な点が多い。

【0003】また、PACAPよりも先に天然より見出された神経ペプチドとして血管作動性腸管ポリペプチド(Vasoactive Intestinal Polypeptide、以下、VIPと称する)がある。VIPは腸管から分泌される神経ペプチドの一種であり、消化管平滑筋弛緩の作用を有する。PACAPのN末端側からの27個のアミノ酸配列はVIPと極めて類似した構造を有している。

【0004】VIPとPACAPは、ペプチドの長さ、シーケンス及びC末端がアミド化されているという点でセクレチン、グルカゴン等と共通点が多いことから、一般にグルカゴン-セクレチンファミリーに属している。これらは当初に発見された臓器だけでなく体内各所に存在することが判明しつつあり、これらの生体内における生理的役割は実に多種多様である。それ故、これらの物質はその生体内分布、生体応答反応、そして関連物質探索等基礎研究の対象となるに留まらず、臨床応用に至るまで多大な注目が注がれていることはよく知られている。従って、これらの基礎研究および応用研究をより推進するためには、確実かつ簡便な微量定量手段が必要不可欠なのは疑う余地の無いところである。PACAP27とPACAP38の識別は、例えばこれらの血中動態検討における生体内PACAP類との比較を容易にする。また、新規PACAP関連化合物を探索するうえで、両者を識別可能なアッセイ系の存在によって、標的化合物の有無、そしてその具体的な量を即座に情報として与えることが可能である。

【0005】一般的な微量定量方法としては赤血球凝集反応や免疫拡散法などの古典的方法、抗原抗体反応により生じた免疫複合体を光散乱により測定するネフェロメトリー、ルミネッセントや放射性同位元素または酵素などで抗体もしくは抗原を標識し、抗原もしくは抗体を測定する標識免疫測定法などが広く一般に用いられている。とりわけ、放射性同位元素を用いた免疫測定法(以下RIAと称する)は、高感度の分析法として広く実用的に利用されているが、放射性同位元素を取り扱うためには特別な設備を必要とし、なおかつ被爆の危険が伴うこととなる。従って、RIAに代替する高感度測定法の開発が求められている。

【0006】酵素免疫検定法(Enzyme Immunoassay System、以下EIAと称する)は放射性物質を使用しないとい

う利点に加え、条件次第ではRIAよりも高感度測定が可能になるということが明らかになるにつれ、医学、薬学分野を中心に種々の物質の特異的かつ高感度な定量手段として広く活用されている。特に最近検査の自動化が進み、ますます広範囲に利用されてきている。

【0007】EIAは一般的に原理的に二つの方法に大別される。一つは競合法であり、抗原もしくは抗体である被測定物質を含む測定試料液と、前もって酵素などの標識剤で標識しておいた既知濃度の被測定物質を混合し、そこに抗体もしくは抗原を混合し反応させると抗原-抗体複合物ができるが、複合物または複合物を形成しなかった遊離物質には標識された被測定物質と標識されていない被測定物質が含まれており、その比率を酵素化学的に測定することで検体中の被測定物質の定量を行う方法である。

【0008】他の一つの方法である非競合法のサンドイッチ法は、被測定物質と特異的に結合するパートナー（抗原あるいは抗体）を固定化しておいた固相と、別に用意した被測定物質と特異的に反応しうる物質（抗原あるいは抗体）を酵素などで標識して得た結合物質とで被測定物質をサンドイッチした後、固相もしくは液相中の標識物質の測定を行うことにより、被測定物質の定量を行うものである。

【0009】このEIAによる測定においては一般的には抗体を酵素で標識した酵素標識抗体を用いる場合が多く、酵素標識抗体の品質が測定系全体の性能に大きく影響を及ぼしている。抗体を酵素で標識する方法としてはグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法など多くの方法が試みられているが、いずれの場合も標識反応後のサンプルは酵素と未標識抗体、および結合率の異なる数種の酵素標識抗体の混在した酵素標識抗体の混合物となっている非特異的吸着を抑え測定感度を上げるためには、この混合物から目的とする結合率の酵素標識抗体だけを分取して用いる必要がある。ところが、一般的に知られたゲル濾過法にて目的とする結合率の酵素標識抗体だけを分離しようとすれば難しく、その他にも有効で簡便な分離手段はほとんど知られていない。また特開平 2-002937 号にて示されているハイドロキシアパタイトを利用した標識サンプルの精製においても未標識抗体と酵素を分離するだけで、得られた酵素標識抗体は結合率の異なる数種の酵素標識抗体の混合物であり、EIAに使用した際にはその測定感度が不十分、かつ保存安定性も充分満足できるものではなかった。そこで抗体に何らかの標識を施すのではなく、その対象とするリガンドに直接何らかの標識、例えば酵素、蛍光物質、発光物質などを結合するケースも少なくない。

【0010】PACAPやVIPの測定においてこの標識リガンドを用いる場合、大きすぎる標識物はリガンドの特異性を損なうだけではなく、なおかつその結合能をも低下させることが容易に推測される。また、ペプチドに酵素標

識する際には幾分か自己消化もやむを得ないケースもあり、さらにはそれによる影響で構造の変化が起こり、抗体に対する特異性が著しく損なわれることがあり、これは微量定量の感度と信頼性において大きな問題となっている。そこで、抗体との強い結合特異性を維持し、なおかつ放射性同位元素標識ではなく人体に安全な物質にて標識し、さらにアッセイを簡便に実施できる手法開発が望まれている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、放射性同位元素を用いず、なおかつ簡便、高感度なPACAPおよびVIPの超微量測定方法を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、抗体との結合特異性を保持しているビオチン標識リガンドの発見と、それを応用した再現性の極めて良好なアッセイ方法を開発するに至った。

【0013】すなわち、本発明は、(1)ビオチンをN末端に結合させた下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)を用いる酵素免疫検定法を行うことを特徴とする、PACAPの定量方法、及び(2)ビオチンをN末端に結合させた血管作動性腸管ポリペプチド(VIP)を用いる酵素免疫検定法を行うことを特徴とする、VIPの定量方法を提供する。本発明は更に、(3)PACAPが配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする、上記(1)に記載の方法、(4)PACAPが配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする、上記(1)に記載の方法、(5)VIPが配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする、上記(2)に記載の方法、を提供する。

【0014】本発明の好適な実施形態は、下記式

(I)：

Biotin-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH<sub>2</sub> (配列番号1)

で示されるペプチドを標識リガンドとして競合法にてPACAPを酵素免疫化学的に定量する分析方法である。

【0015】また、本発明の別の実施形態は、下記式

(II)：

Biotin-His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH<sub>2</sub> (配列番号2)

で示されるペプチドを標識リガンドとして競合法にてPACAPを酵素免疫化学的に定量する分析方法である。

【0016】また、本発明の別の実施形態は、下記式

(III)：

Biotin-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr

-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub> (配列番号3)

で示されるペプチドを標識リガンドとして競合法にてVIPを酵素免疫化学的に定量する分析方法である。

【0017】本発明は更に、(6)酵素免疫検定法により、PACAP27を選択的に定量する方法、及び(7)酵素免疫検定法により、PACAP38を選択的に定量する方法を提供する。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の測定対象となるPACAP及びVIPのアミノ酸配列は、種々の動物種において公知であり、それぞれ Pharmacological Reviews (2000) 52, 269-324 にて確認することができる。本発明において、PACAP27、PACAP38、PACAP44等は、それぞれ上記PACAPのN末端側の27個、38個、44個のアミノ酸からなるペプチドであるが、その分布については生物種によって異なっている。また、ヒトVIPも先述の論文にてその配列が明記されている。当業者であれば、測定対象の種によって、そのPACAPまたはVIPの配列を特定し、そのN末端の5~44個のアミノ酸配列を含むペプチドを合成し、本発明に利用することができる。

【0019】本発明の神経ペプチド類の微量定量に使用するペプチドは、公知のペプチド合成の常法に従って合成できる。例えば、「ザ・ペプチド(The Peptides)」第1巻(1966年) [Schreder and Luhke 著、Academic Press, New York, U. S. A.]、あるいは「ペプチド合成」[泉屋ら著、丸善株式会社(1975年)]の記載に従い、具体的には、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法(P-ニトロフェニルエステル法、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル法、シアノメチルエステル法など)、ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボイミダゾール法、酸化還元法、DCC-アディティブ(HONB、HOBt、HONSu)法など、各種の方法により合成することができる。これらの方法は、固相合成及び液相合成のいずれにも適用できる。

【0020】本発明におけるペプチド合成は、上記のような一般的なポリペプチドの合成法、例えば、末端アミノ酸に順次1個ずつアミノ酸を縮合させるいわゆるステップワイズ法、または数個のフラグメントに分けてカップリングさせていく方法によって行われる。例えば、ステップワイズ法による固相合成は、具体的には、メリフィールド(Merrifield, R. B.)の方法 [Solid phase peptide synthesis, J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149-2159 (1963)]に従い、以下のようにして行うことができる。まず、C末端アミノ酸(アミノ基を保護したものを)をそのカルボキシル基によって不溶性樹脂に結合させ、その後、該C末端アミノ酸のアミノ基の保護基を除去する。次いで、得られたこの遊離の反応性アミノ基

に、目的とするペプチドのアミノ酸配列に従って、アミノ基を保護したアミノ酸の反応性カルボキシル基を縮合反応により順次結合させる。このようにして一段階ずつ全配列を合成した後、ペプチドを不溶性樹脂からははずす。

【0021】上記の固相合成において用いられる不溶性樹脂は、反応性カルボキシル基との結合性を有するものであればいずれをも使用できる。例えば、クロロメチル樹脂、オキシメチル樹脂、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂(PAM樹脂)、ベンズヒドリルアミン樹脂(BHA樹脂)、アミノメチル樹脂、メチルベンズヒドリル樹脂(MBHA樹脂)、4-アミノメチルフェノキシメチル樹脂、4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル樹脂などが挙げられる。

【0022】また、アミノ基の保護基として9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基(Fmoc)を使用する場合は、4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル樹脂など、トリフルオロ酢酸(TFA)によって樹脂から脱離できるものがよく、t-ブトキシカルボニル基(Boc)を使用する場合には、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂(PAM樹脂)など、フッ化水素などによって樹脂から脱離できるものがよい。樹脂1g当りのペプチド濃度は0.5mmole以下とすることが好ましい。

【0023】上記の方法においては、アミノ酸のペプチド結合に關与するアミノ基への保護基の結合及び該保護基の脱離、並びにアミノ酸のペプチド結合に關与するカルボキシル基の活性化が必要である。アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル(Z)、t-ブトキシカルボニル(Boc)、t-アミノオキシカルボニル(Aoc)、イソボニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロル-ベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、o-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィンチオイルなどの基が挙げられる。

【0024】また、アミノ酸の中で、側鎖に官能基を有するもの、例えば、His、Tyr、Thr、Lys、Asp、Arg及びSerは、その側鎖の官能基を保護しておくのが好ましい。官能基の保護は、下記のような保護基を通常用いられている方法で上記アミノ酸に結合させ、反応終了後、該保護基は脱離される。Hisのイミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシメチル(Bom)、p-トルエンシルボニル(Tos)、ベンジル(Bzl)、ベンジルオキシカルボニル(Z)、トリチル基などが挙げられる。

【0025】Ser及びThrの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができるが、この保護は必須ではない。エステル化に適する基としては、アセチルなどの低級アルカノイル基、ベンゾイルなどのアロイル基、ベンゾイルオキシカルボニル、エチルオキシカルボニルなどの炭酸から誘導される基などが挙

げられる。また、エーテル化に適する基としては、ベンジル(Bzl)、テトラヒドロピラニル、tert-ブチル基などが挙げられる。

【0026】Tyrの水酸基の保護基としては、例えば、ベンジル(Bzl)、プロモベンジルオキシカルボニル(Br-Z)、ジクロロベンジル(Cl<sub>2</sub>-Bzl)、ベンジルオキシカルボニル(Z)、アセチル、p-トルエンシルホニル(Tos)基などが挙げられる。Lysのアミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル(Z)、クロロベンジルオキシカルボニル(Cl-Z)、ジクロロベンジル(Cl<sub>2</sub>-Bzl)、t-ブトキシカルボニル基(Boc)、p-トルエンシルホニル(Tos)基などが挙げられる。

【0027】Argのグアニジノ基の保護基としては、例えば、p-トルエンシルホニル(Tos)、ニトロ、ベンジルオキシカルボニル(Z)、t-アミルオキシカルボニル(Aoc)基などが挙げられる。Aspのカルボキシル基の保護は、例えば、ベンジルアルコール、メタノール、エタノール、tert-ブタノール、シクロヘキシル(cHex)などによるエステル化により行われる。

【0028】その他のアミノ酸の保護基として、Trpのインドリル基の保護基としては、例えば、ホルミル、カルボベンゾキシル、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンシルホニル、2,2,2-トリクロロエチルオキシカルボニルなどが挙げられるが、この保護は必須ではない。Metのチオメチル基の保護基としては、予めメチルスルホキシドにしておき、後に還元する方法があるが、この保護は必須ではない。

【0029】一方、カルボキシル基の活性化は、従来公知の方法にて行うことができ、用いられる試薬なども公知のものから適宜選択し得る。例えば、カルボキシル基の活性化は、該カルボキシル基と種々の試薬とを反応させ、対応する酸クロライド、酸無水物または混合酸無水物、アジド、活性エステル(ペンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N-ヒドロキシベンズトリアゾール、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等とのエステル)などを形成させることにより行う。

【0030】上記の固相における反応性アミノ基と反応性カルボキシル基との縮合反応(ペプチド結合形成反応)に用いる溶媒としては、ペプチド結合形成に使用できるものであればいずれでもよい。例えば、無水または含水のジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ピリジン、クロロホルム、ジオキサソ、ジクロロメタン(DCM)、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチル、N-メチルピロリドン、ヘキサメチリン酸トリアミド(HMPA)などを単独で、あるいは2種以上の混合溶媒として使用することができる。

【0031】また、上記縮合反応は、縮合剤、例えばジシクロヘキシルカルボキシイミド(DCC)、カルボジイミダゾールなどのカルボジイミド試薬やテトラエチルピロ

ホスフェイト、ベンズトリアゾール-N-ヒドロキシトリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩(Bop試薬)などの存在下に行うこともできる。

【0032】得られたペプチドは、通常の方法に従い脱塩、精製することができる。例えば、DEAE-セルロースなどのイオン交換クロマトグラフィー、セファデックスLH-20、セファデックスG-25などの分配クロマトグラフィー、シリカゲルなどの順相クロマトグラフィー、ODS-シリカゲルなどの逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0033】本発明において使用されるペプチドは、そのカルボキシ末端が-OHであっても、-NH<sub>2</sub>であっても良いが、生体由来サンプル測定時におけるカルボキシペプチダーゼに対する耐性のために-NH<sub>2</sub>の方が好ましい。尚、ピオチンは合成時にペプチドのN末端に先に付加し、その後精製することが好ましい。

【0034】上記のようにして調製したピオチン標識ペプチドは、上記合成手法上N末のみにピオチンを化学的に導入しており、酵素標識や他の多くの導入方法と異なり、極めて特異的な導入方法であるため、常に高い純度で、あくまでも単一ピオチン標識リガンドとして得ることが可能である。仮にVIPペプチドを出発物質とし、これに対してピオチン標識を行う場合には、分子中に3つ存在するLys残基の-アミノ基に対して全てあるいは部分的にピオチン標識を行ってしまい、標識化合物の特異性に大きな疑問がもたれると共に、アッセイ系の再現性が懸念される。なおかつ、このような単一物質の製造はロット間のバラツキを排除することが極めて容易で、これはデータの再現性及び高い感受性を得る上で実に重要な要因であることは疑う余地もない。

【0035】本発明により、N末端にピオチンを結合したVIPおよびPACAPIは、測定検体中の未標識リガンドとの極めて強力な競合的結合を可能にすることが明らかになった。その二次構造において、N末端にピオチンを結合したVIPおよびPACAPIは未結合VIPおよびPACAPとそれほど大きく変化することはないものと思われる。このことはこれらペプチドのN末に何らかの低分子化合物を導入した場合においても、その多くが活性または受容体との結合能を保持していることから支持されている [Peptide Chemistry 1990 (1990) 239-244]。このように標識リガンドと測定対象との構造を同様にしておくことによって結合特異性を向上し、測定系の感度を向上させることが出来る。

【0036】本発明の方法は、上記のようにして得られるN末端ピオチン標識PACAPまたはVIPを用いる酵素免疫検定法を行うことを特徴とする、PACAP及びVIPの定量方法である。本発明において使用する酵素免疫検定法(EIA)としては、上記した競合法及び非競合法のいずれをも使用することができるが、簡便に施行できるため、競合法が特に好ましい。

【0037】本発明の方法を用いたPACAPまたはVIPの定量の一例を具体的に説明すると、測定対象となる PACAP あるいは VIP を含有する被験試料と本発明のN末端ビオチン標識PACAP あるいは N 末端ビオチン標識 VIP とを混合し、抗PACAP抗体あるいは VIP 抗体を添加して抗原抗体反応を生じさせ、これに抗PACAP抗体あるいは VIP 抗体に対する二次抗体を添加して免疫沈降させる。これにアビジン溶液を添加し、その後ビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲートを加え、免疫沈降物中のビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲート量を測定する。

【0038】本発明の方法で用いる抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のどちらもが対象となり得るが、より完全な分離を得るためには分子として均一であるモノクローナル抗体がより好ましい。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリ、ヤギなどの免疫動物にPACAPまたはVIPを抗原として投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバントと共に行ってよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。PACAPまたはVIPを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。

【0039】また、本発明は特に抗体が IgG である場合に特に有効である。抗体を得るために免疫する抗原としては様々な動物種から見出されている PACAP および VIP を使用することができるが、望ましいのは測定対象とする種から見出された PACAP および VIP である。

【0040】競合法においては、本発明で得られた抗 PACAP 抗体（或いは抗 VIP 抗体）と、被験試料および標識化 PACAP（あるいは標識化 VIP）とを競合的に反応させた後に、抗体に結合した標識化 PACAP（あるいは標識化 VIP）の割合を測定することにより、被験試料中の PACAP（あるいはVIP）を定量する。このとき標識化合物であるビオチンを検出するためには、最初にアビジンを反応させ、その後に酵素または蛍光標識ビオチンもしくは

は発光剤結合ビオチンを結合させることもできるし、最初から酵素または蛍光標識アビジンもしくは発光剤結合アビジンを結合させることもできる。アビジンに標識する酵素としては安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば -ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることが出来、特にセイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ (HRP) が好ましく用いられる。発光剤としては化学発光剤や生物発光剤の両方を使用することが出来る。化学発光剤としては、ルミノール、イソルミノール、ロフィン、ルシゲニンなどがあるが、発光の際の安定性、操作性を考慮するとルミノール、イソルミノールおよびその誘導体が好ましい。生物発光剤にはルシフェリンなどがあり、ルシフェリンルシフェラーゼや補酵素、例えば ATP を添加し、測定する。化学発光剤の場合には触媒の存在下に酸化剤を加えて反応させ、酸化剤としては例えば過酸化酸素、次亜塩素酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム、過硼酸ナトリウム、ヨウ素、過ヨウ素酸ナトリウム、分子状酸素、過酸化カリウム、過マンガン酸カリウムなどを使用できる。触媒は一般に金属化合物で、例えば赤血球、ヘモグロビン、ヘマチン、ヘミン、フェリチン、ポルフィリン、塩化第一コバルト、酢酸銅、チトクロームC などをはじめ、ニッケル、マンガン、クロムなどの塩類、錯塩類および有機金属化合物を使用することが出来る。本発明の方法を用いて測定する被験試料としては、特に限定されるものではないが、PACAPまたはVIPが存在することが予想される種々の動物種由来の試料、例えば脳抽出物、精巣抽出物、副腎抽出物、消化管抽出物等が挙げられる。

【0041】上記したように、本発明の方法によって被験試料中のPACAP及びVIPを非常に高感度に検出することができるが、特にN末端をビオチンで標識したPACAP27は、PACAP(1-10)NH<sub>2</sub>及びPACAP38との反応性を示さず、極めて高い特異性を有することが明らかになった。従って、この標識ポリペプチドを利用することで、試料中のPACAP27のみを特異的に検出することができると共に、N末端ビオチン標識PACAP38との併用により、PACAP38のみを特異的に検出することも可能となった。具体的には、N末端ビオチン標識PACAP38で検出されたPACAP27とPACAP38の総量から、N末端ビオチン標識PACAP27で検出されたPACAP27の量を差し引くことにより、PACAP38の量が求められる。

【0042】

【実施例】以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。尚、以下の実施例において用いた各ペプチドのアミノ酸配列を表1に示す。

【0043】

【表1】



分)にて免疫沈降物を得た。これにアビジン溶液を添加し、その後にビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲートを加えた。発色はo-フェニレンジアミンジヒドロクロライドを用い、30分間の反応後、2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて酵素反応を停止し、免疫沈降物を可溶化して吸光値(450 nm)を測定した。本検討においては、対象サンプルをミシマオコゼPACAP27(配列番号5の1~27番のアミノ酸、American Peptide Company社)、ヒトPACAP27(配列番号2、ペプチド研究所社)、ミシマオコゼPACAP38(配列番号5の1~38番のアミノ酸、American Peptide Company社)、ヒトPACAP38(配列番号1、ペプチド研究所社)、グルカゴン(配列番号6、ペプチド研究所社)、セクレチン(配列番号7、ペプチド研究所社)、VIP(配列番号3、ペプチド研究所社)、PACAP(1-10)NH<sub>2</sub>(配列番号1及び2の1~10番のアミノ酸、伊藤ハム株式会社)、PACAP(1-15)NH<sub>2</sub>(配列番号1及び2の1~15番のアミノ酸、静岡県立大学・生物薬品化学教室より提供)とした。その結果を図3に示す。

【0049】図3に示すように、本発明の方法により、ヒトおよびミシマオコゼ由来のPACAP27について極めて高い選択性を示しており、いずれのPACAP38、PACAP(1-10)NH<sub>2</sub>およびその他のセクレチンファミリーのペプチド(グルカゴン、セクレチン、VIP)とも交差性を示さなかった。

【0050】[実施例5] N末端ビオチン標識PACAP27を用いた生体内PACAP測定

ミシマオコゼから取り出し、速やかに液体窒素にて凍結保存した脳に0.5 M酢酸を組織100 mg当たり500 μL加え、15分間煮沸する。氷冷下、酸処理した組織をホモジネートし、遠心して上清を抽出サンプルとした。これについて実施例4と同様にビオチン標識PACAP27を用いてEIAを行った。その結果を図4に示す。対象サンプルがμg~mgオーダーのPACAP27を含有しているのに対して、検量線はngオーダーであり、希釈サンプルにおいても十分測定可能であり、本アッセイ系が実用に耐えうることを示された。

【0051】[実施例6] N末端ビオチン標識PACAP38を用いたEIAの特異性

抗PACAP抗体100 μLと実施例1で作製したビオチン標識PACAP38(50 nM in 1% BSA-PBS、0.01% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 100 μL、そして検量線用スタンダードあるいは各濃度の対象サンプル100 μLを2日間静置し、その後ヤギ抗ウサギIgG抗血清を加え、遠心分離(3500 rpm、15分)にて免疫沈降物を得た。これにアビジン溶液を添加し、その後にビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲートを加えた。発色はo-フェニレンジアミンジヒドロクロライドを用い、30分間の反応後、2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて酵素反応を停止し、免疫沈降物を可溶化して吸光値(450 nm)を測定した。本検討においては、対象サンプルをミシマオ

コゼPACAP27(配列番号5の1~27番のアミノ酸、American Peptide Company社)、ヒトPACAP27(配列番号2、ペプチド研究所社)、ミシマオコゼPACAP38(配列番号5の1~38番のアミノ酸、American Peptide Company社)、ヒトPACAP38(配列番号1、ペプチド研究所社)、アカエイ(stingray)PACAP44(配列番号4、American Peptide Company社)、グルカゴン(配列番号6、ペプチド研究所社)、セクレチン(配列番号7、ペプチド研究所社)、VIP(配列番号3、ペプチド研究所社)とした。その結果を図5に示す。

【0052】図5に示すように、ビオチン-PACAP27を使用したアッセイ系と異なり、グルカゴン、セクレチン、VIPとの反応は見られなかったが、使用した全てのACAPに対して有効な検出・定量系であることが示された。すなわち、本アッセイ系と実施例4にて示した系を組み合わせれば、PACAP27とPACAP38を区別して定量することが可能であることが明らかとなった。

【0053】[実施例7] N末端ビオチン標識PACAP38を用いた生体内PACAP測定

ミシマオコゼから取り出し、速やかに液体窒素にて凍結保存した脳に0.5 M酢酸を組織100 mg当たり500 μL加え、15分間煮沸する。氷冷下、酸処理した組織をホモジネートし、遠心して上清を抽出サンプルとした。これについて実施例5と同様にビオチン標識PACAP38を用いてEIAを行った。その結果を図6に示す。対象サンプルにはμg~mgオーダーの組織PACAPが存在するのに対し、検量線がngオーダーであり、希釈サンプルにおいても十分測定可能であり、本アッセイ系が実用に耐えうることを示された。

【0054】[実施例8] 抗VIP抗体の作製  
VIPはハプテン分子であるため、それ自体の抗原性は非常に低い。従って、同ペプチドとキーホールリンペットヘモシアニン(Sigma社)をdimethylsuberimidate-2HCl(Sigma社)によりカップリングさせ、抗原性を示す複合体を作製した。この複合体500 μgをPBS(1 mL)に溶解し、同量の完全フロインドアジュバントを加えた。5 mLのガラスシリンジに吸い上げ、空気を可能な限り抜いた後に、コネクターを介してもう一本のシリンジに結合した。ピストンを交互に押し攪拌し免疫用抗原エマルジョンを作製し、ウサギに背部皮下注射により免疫した。2週間毎に追加免疫を行い、抗血清を得た。

【0055】[実施例9] 抗VIP抗体価の測定  
実施例8において得られた抗血清から単離した抗VIP抗体を任意に希釈した溶液100 μLとビオチン標識VIP(50 nM in 1% BSA-PBS、0.01% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 100 μLを1日間静置し、その後ヤギ抗ウサギIgG抗血清を加え、遠心分離(3500 rpm、15 min)にて免疫沈降物を得た。これにアビジン溶液を添加し、その後にビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲートを加えた。発色はo-フェニレンジアミンジヒドロクロライド(OPD)を用い、30分

間の反応後、2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて酵素反応を停止および免疫沈降物を可溶化し吸光値(450 nm)を測定した。それぞれの結果を図7に示す。

【0056】[実施例10] ビオチンVIPを用いたEIAの特異性

抗VIP抗体100 μLとビオチン標識VIP(50 nM in 1% BSA-PBS、0.01% NaN<sub>3</sub>)100 μL、そして検量線用スタンダードあるいは各濃度の対象サンプル100 μLを適当な時間静置し、その後ヤギ抗ウサギIgG抗血清を加え、遠心分離(3500 rpm、15 min)にて免疫沈降物を得た。これにアビジン溶液を添加し、その後にビオチン-ペルオキシダーゼコンジュゲートを加えた。発色はo-フェニレンジアミンジヒドロクロライド(OPD)を用い、30分間の反応後、2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて酵素反応を停止および免疫沈降物を可溶化し吸光値(450 nm)を測定した。本検討においては、対象サンプルをVIP(配列番号3、ペプチド研究所社)、サケカルシトニン(配列番号9、伊藤ハム株式会社)、グルカゴン(配列番号6、伊藤ハム株式会社)、グルタチオン(伊藤ハム株式会社)、ブタインスリン(配列番号8、伊藤ハム株式会社)、PACAP(1-10)NH<sub>2</sub>(配列番号1及び2の1~10)\*

\*番のアミノ酸、伊藤ハム株式会社)、PACAP(1-15)NH<sub>2</sub>(配列番号1及び2の1~15番のアミノ酸、静岡県立大学・生物薬品化学教室より提供)、PACAP27(配列番号2、ペプチド研究所社)、PACAP38(配列番号1、ペプチド研究所社)、そしてセクレチン(配列番号7、ペプチド研究所社)とした。その結果を図8に示す。本アッセイ系はVIPに対して極めて高い特異性を示し、PACAP27およびPACAP38に対してはVIPより2~3オーダー低い極めて弱い特異性を示した。その他のセクレチンファミリーペプチドおよび無関係なペプチドは本アッセイ系では検出されず、本アッセイ系の高い特異性が示唆された。

【0057】

【発明の効果】以上記載したように、本発明によって、被験試料中に含まれるPACAP及びVIPを、放射性同位元素を用いることなく、簡便かつ高感度に測定することができる。また、PACAP27及びPACAP38を識別して検出することができる。

【0058】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```

<110> ITOHAM FOODS INC.
<120> A Method of quantification of neuropeptides
<130> P01-0700
<160> 9
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide
<400> 1
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr
Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val
Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30
Gln Arg Val Lys Asn Lys
35
<210> 2
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide
<400> 2

```

20 25  
 <210> 3  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: Synthetic Peptide  
 <400> 3  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr  
 Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile  
 Leu Asn  
 20 25  
 <210> 4  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: Synthetic Peptide  
 <400> 4  
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr  
 Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val  
 Leu Gly Lys Arg Tyr Lys  
 20 25 30  
 Pro Lys Arg Arg Asn Ser Gly Arg Arg Val  
 Phe Tyr  
 35 40  
 <210> 5  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: Synthetic Peptide  
 <400> 5  
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr  
 Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Val Gln Lys Tyr Leu Ala Ala Val  
 Leu Gly Arg Arg Tyr Arg  
 20 25 30  
 Gln Arg Val Arg Asn Lys  
 35  
 <210> 6  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: Synthetic Peptide  
 <400> 7  
 His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Glu Leu  
 Ser Arg Leu Arg Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Gly Leu  
 Val  
 20 25

<210> 8  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: Synthetic Peptide  
 <400> 8  
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile  
 Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Asn Phe Val Asn Gln His  
 Leu Cys Gly Ser His Leu  
 20 25 30  
 Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 Arg Gly Phe Phe Tyr Thr  
 35 40 45  
 Pro Lys  
 50

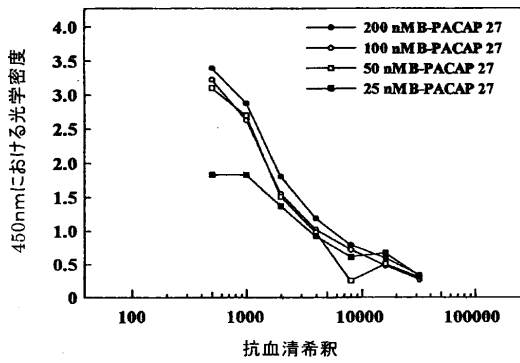
<210> 9  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 17 18

【0059】 <220>  
 【配列表フリーテキスト】 Description of Artificial  
 配列番号1：合成ペプチド Sequence: Synthetic Peptide  
 配列番号2：合成ペプチド  
 配列番号3：合成ペプチド Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gln  
 配列番号4：合成ペプチド Leu Ser Gln Glu Leu  
 配列番号5：合成ペプチド 5  
 配列番号6：合成ペプチド Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn  
 配列番号7：合成ペプチド Gly Ser Gly Thr Pro  
 配列番号8：合成ペプチド 20  
 配列番号9：合成ペプチド  
 【図面の簡単な説明】

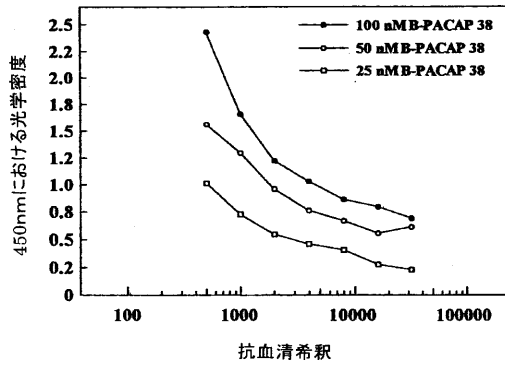
【図1】 PACAP27抗血清の滴定曲線を示す。  
 【図2】 PACAP38抗血清の滴定曲線を示す。  
 【図3】 N末端ビオチン標識PACAP27を用いたEIAの反応  
 特異性を示す。  
 【図4】 N末端ビオチン標識PACAP27を用いたEIAによる  
 生体内PACAPの検出を示す。  
 【図5】 N末端ビオチン標識PACAP38を用いたEIAの反応  
 特異性を示す。  
 【図6】 N末端ビオチン標識PACAP38を用いたEIAによる  
 生体内PACAPの検出を示す。  
 【図7】 VIP抗血清の滴定曲線を示す。  
 【図8】 N末端ビオチン標識VIPを用いたEIAの反応特異

性を示す。

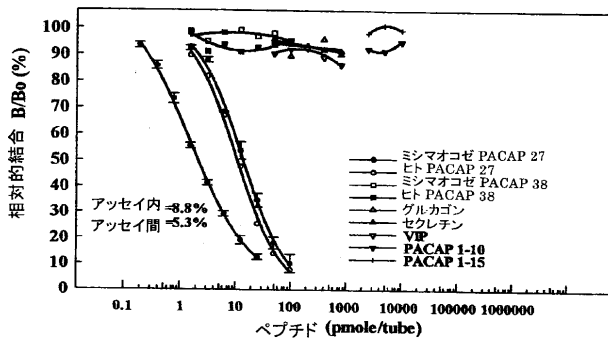
【図1】



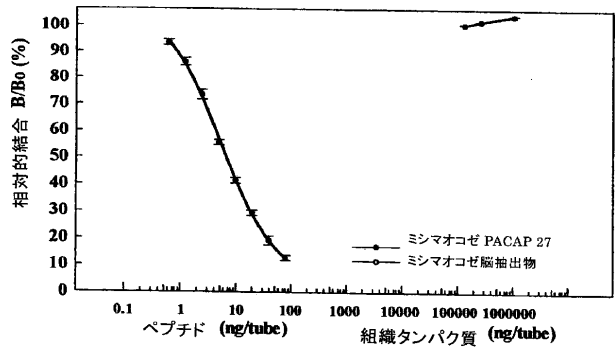
【図2】



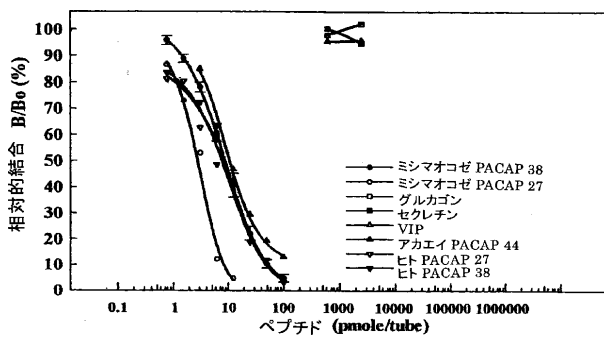
【図3】



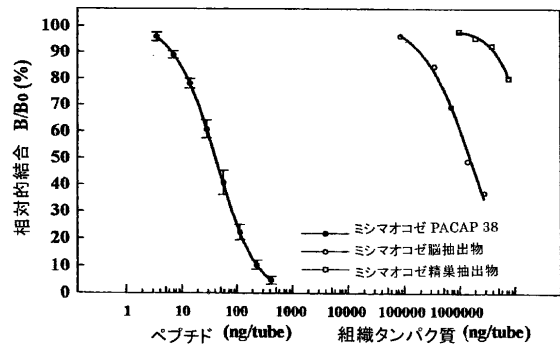
【図4】



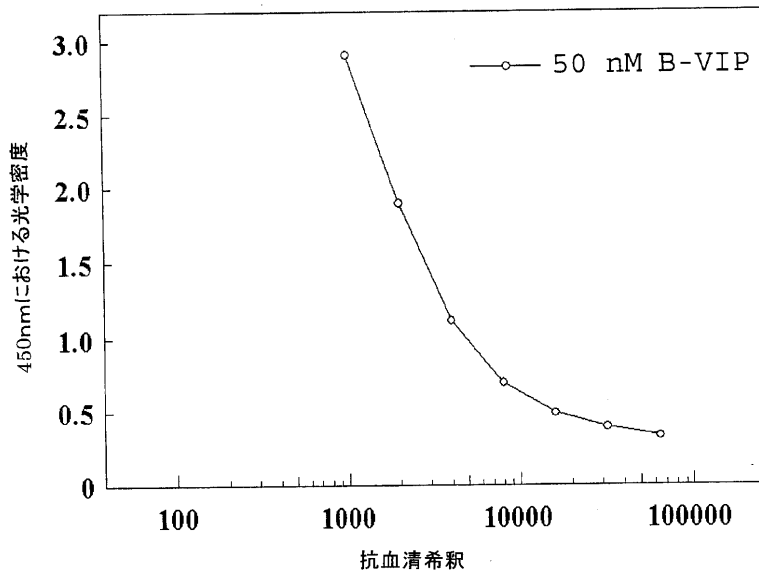
【図5】



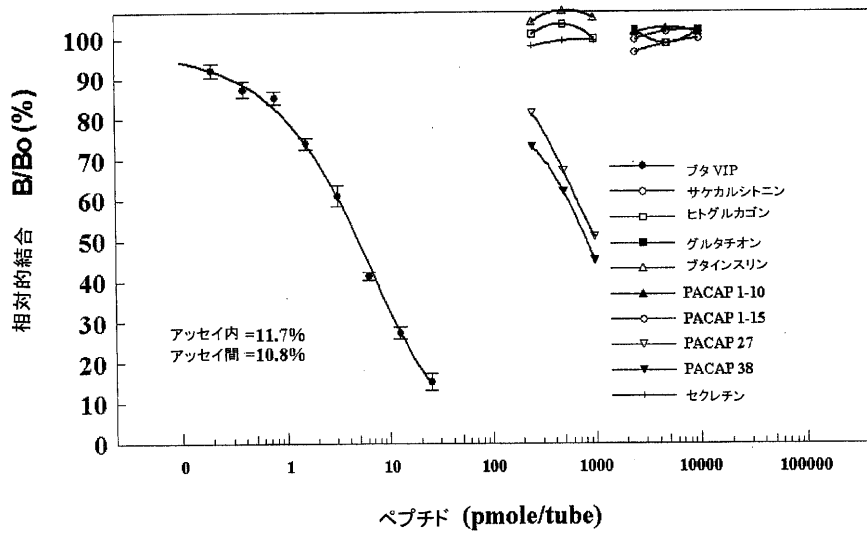
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 榎本 和久  
 茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1丁目2番  
 伊藤ハム株式会社中央研究所内

(72)発明者 有村 章  
 アメリカ合衆国 ルイジアナ州 ベレチャ  
 セー70037 チューレン大学 ユーエスジ  
 ャパンバイオメディカルリサーチラボラト  
 リーズ内

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA50  
FA74

