

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-127472

(P2007-127472A)

(43) 公開日 平成19年5月24日(2007.5.24)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		D
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577		B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2005-319140 (P2005-319140)	(71) 出願人	000205627
(22) 出願日	平成17年11月2日 (2005.11.2)		大阪府 大阪府大阪市中央区大手前2丁目1番22号
		(71) 出願人	000138277
			株式会社三菱化学ヤトロン 東京都新宿区西五軒町13番1号
		(74) 代理人	100090251
			弁理士 森田 憲一
		(74) 代理人	100139594
			弁理士 山口 健次郎
		(72) 発明者	馬場 都
			大阪府大阪市東成区1丁目3番3号 大阪府立成人病センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリシル化ガストリン (glycine-extended gastrin) の分析方法

(57) 【要約】

【課題】 生体試料中のグリシル化ガストリンに関連する類縁物質（例えば、ガストリン、グリシル化CCK-8、又はCCK-8）の量に影響を受けることなく、簡便かつ正確に測定することができるグリシル化ガストリンの免疫学的分析方法を提供する。

【解決手段】 (1) ガストリンとは反応しないが、グリシル化ガストリンとは反応する第1のモノクローナル抗体又はそのフラグメントと、(2) 前記第1モノクローナル抗体とは別の領域を認識してグリシル化ガストリンと反応する第2のモノクローナル抗体又はそのフラグメントとを使用する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) ガストリンとは反応しないが、グリシル化ガストリンとは反応する第 1 のモノクローナル抗体又はそのフラグメントと、
 (2) 前記第 1 モノクローナル抗体とは別の領域を認識してグリシル化ガストリンと反応する第 2 のモノクローナル抗体又はそのフラグメントと
 を使用することを特徴とする、グリシル化ガストリンの免疫学的分析方法。

【請求項 2】

前記免疫学的分析方法がサンドイッチ法又は凝集法である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(1) (a) 請求項 1 に記載の第 1 モノクローナル抗体若しくはそのフラグメント、又は請求項 1 に記載の第 2 モノクローナル抗体若しくはそのフラグメントのいずれか一方のモノクローナル抗体若しくはそのフラグメントを固定化した不溶性担体、(b) 残る一方のモノクローナル抗体若しくはそのフラグメントに標識を付した標識抗体、及び(c) グリシル化ガストリンを含む可能性のある被検試料を接触させる工程、並びに
 (2) 前記不溶性担体上に形成される、固定化抗体とグリシル化ガストリンと標識抗体との複合体の前記標識からの信号を分析する工程
 を含むことを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

(1) ガストリンとは反応しないが、グリシル化ガストリンとは反応する第 1 のモノクローナル抗体又はそのフラグメントと、
 (2) 前記第 1 モノクローナル抗体とは別の領域を認識してグリシル化ガストリンと反応する第 2 のモノクローナル抗体又はそのフラグメントと
 を含むことを特徴とする、グリシル化ガストリンの免疫学的分析用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グリシル化ガストリン (glycine-extended gastrin) の分析方法に関する。より具体的には、モノクローナル抗体を用いてグリシル化ガストリンを特異的かつ高感度に測定する免疫学的分析方法に関する。なお、本明細書において、用語「分析」には、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」と、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」との両方が含まれる。

【背景技術】

【0002】

ヒト・グリシル化ガストリンは、配列番号 1 で表される 18 個のアミノ酸残基からなるペプチドで、ヒト・ガストリン (配列番号 2) の C 末端側にグリシンが付加したペプチドである。ガストリンは、主として胃幽門前庭部に存在する内分泌細胞 (G 細胞) から 101 個のアミノ酸残基からなるプレプロガストリンとして生合成され、プロテアーゼによるプロセッシングと アミデーションを受け、グリシル化ガストリンを経て、17 個のアミノ酸残基からなるガストリンとなる。すなわち、グリシル化ガストリンは、最終的に C 末端がアミド化されるガストリンの最終中間体として生成される [非特許文献 1]。

【0003】

グリシル化ガストリンは 2 個の 3 価鉄イオンと結合することにより、生物活性を示すことが知られており [非特許文献 2]、ガストリンの受容体ではない別の受容体を介して [非特許文献 3]、ガストリンにはない種々の生物活性を示すことが知られている。従って、グリシル化ガストリンはガストリンの単なる中間体ではなく、それ自身が別のペプチドホルモンであるとも言える。

【0004】

グリシル化ガストリンの生物活性としては、例えば、インビトロで膵臓がん細胞の増殖を促進すること [非特許文献 4]、マウスにおいて過剰発現させると肺癌細胞の増殖が促

10

20

30

40

50

進されること [非特許文献 5]、同じくマウスにおいて過剰発現させると大腸の増殖が促進されること [非特許文献 6]、インビトロでヒト大腸癌細胞の浸潤を促進すること [非特許文献 7]、インビトロでヒト大腸癌細胞のメタロプロテイナーゼ (metalloproteinase) 1 及び 3 の発現を促進すること [非特許文献 8]、インビトロでヒト肝臓癌細胞の増殖を促進すること [非特許文献 9] などの報告があり、ガストリンにはこれらの生物活性はない。

【 0 0 0 5 】

上記のようなインビトロの生物活性から、インビボ、すなわち、ヒトの生体においてのグリシル化ガストリンの機能を調べることは、種々の病態、特に癌の増殖や転移との関連において重要であると思われるが、簡便かつ特異的な測定法がないため、十分な解明がされて

10

【 0 0 0 6 】

正確に生体試料中のグリシル化ガストリンのみを測定するには、血液中に多量に存在するガストリンや存在する可能性が高いグリシル化 C C K - 8 (コレシストキニン) との交叉反応のない測定系が必要である。しかしながら、ガストリンは、グリシル化ガストリンと C 末端アミノ酸が 1 つ違うだけであり、グリシル化 C C K - 8 は、グリシル化ガストリンと C 末端アミノ酸配列 (6 アミノ酸残基) が全く同じであり、そのような測定系の作製は容易ではない。なお、C C K は、十二指腸粘膜の I 細胞より分泌される消化管ホルモンで、ガストリンと同様に、プロペプチドとして生合成され、プロセッシングと アミデー

20

【 0 0 0 7 】

通常、低分子ペプチドの免疫学的測定のためには、ポリクローナル抗体を作製することが多い。しかし、低分子ペプチドの場合、ポリクローナル抗体同士でペプチド抗原を挟み込む (いわゆるサンドイッチ) 測定系を作製することは、立体障害の点で難しく、ペプチド自身をラジオアイソトープ標識し、被検試料中の抗原と競合させ測定するラジオイムノアッセイが多い。グリシル化ガストリンについても、実際そのような系が報告されている [非特許文献 1 0 及び非特許文献 1 1]。しかしながら、被検試料に存在する可能性のある関連物質との交叉反応を否定することができるものではなく、また、ラジオアイソト

30

【 0 0 0 8 】

一方、モノクローナル抗体を用いる場合、ガストリンに反応せず、グリシル化ガストリンに特異的なモノクローナル抗体を作製すると、両者の違いである C 末端のグリシン又はそれを含むアミノ酸配列を認識する抗体をスクリーニングすることになるため、結果として、C 末端アミノ酸配列が全く同じグリシル化 C C K - 8 と反応してしまう抗体を選択してしまうということになる。従って、これまでにグリシル化ガストリンに特異的なモノク

40

ローナル抗体は作製されていない。
前記のような理由により、グリシル化ガストリンは生体内で重要な機能を持つと推測されるにも拘わらず、特異的な測定系は作製されていない。

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 「レギュレイトリー・ペプチド (Regulatory Peptide) 」 (オランダ) , 1991年 , 36巻 , p. 323-343

【 非特許文献 2 】 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry) 」 , (米国) , 2002年 , 277巻 , p. 48602-48609

【 非特許文献 3 】 「ジャーナル・オブ・エンドクリノロジー (Journal of Endocrinology) 」 , (英国) , 2004年 , 181巻 , p. 315-325

50

【非特許文献4】「インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー (International Journal of Cancer)」, (米国), 1996年, 66巻, p. 653-658

【非特許文献5】「キャンサー・リサーチ (Cancer Research)」, (米国), 2004年, 64巻, p. 196-201

【非特許文献6】「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)」, (米国), 1999年, 103巻, p. 1119-1126

【非特許文献7】「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochemical and Biophysical Research Communication)」, (米国), 2001年, 285巻, p. 136-141

【非特許文献8】「インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー (International Journal of Cancer)」, (米国), 2004年, 111巻, p. 23-31 10

【非特許文献9】「ダイジェスティブ・ディーズ・アンド・サイエンス (Digestive Diseases and Science)」, (独国), 2001年, 46巻, p. 1356-1366

【非特許文献10】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 1985年, 260巻, p. 11724-11729

【非特許文献11】「アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)」, (米国), 1986年, 152巻, p. 119-126

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、生体試料中のグリシル化ガストリンに関連する類縁物質（例えば、ガストリン、グリシル化CCK-8、又はCCK-8）の量に影響を受けることなく、簡便かつ正確に測定することができるグリシル化ガストリンの免疫学的分析方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

低分子ペプチドを測定する免疫学的測定には、通常、ポリクローナル抗体が用いられることが多く、前述のように、ラジオイムノアッセイが多い。低分子ペプチド測定のためのサンドイッチ測定系では、通常、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体との組み合わせは用いられるが、立体障害の点でポリクローナル抗体同士の組合せは用いられない。また、モノクローナル抗体同士の組合せも、以下の理由により、通常、用いられない。すなわち、モノクローナル抗体同士によるサンドイッチ測定系は、18アミノ酸残基のような低分子ペプチドについては、抗体の認識部位が近いため、いわゆるサンドイッチすることができないと考えるのが通例であり、実際、グリシル化ガストリンのような低分子ペプチドでそのような測定系の報告はない。

【0012】

本発明者は、グリシル化ガストリンに対する種々のモノクローナル抗体を作製し、グリシル化ガストリンが低分子のペプチドであるにもかかわらず、そのC末端を認識するモノクローナル抗体とN末端を認識するモノクローナル抗体とを組み合わせることにより、意外にもサンドイッチすることができることを見出し、本発明を完成した。

【0013】

すなわち、本発明は、(1)ガストリンとは反応しないが、グリシル化ガストリンとは反応する第1のモノクローナル抗体又はそのフラグメントと、(2)前記第1モノクローナル抗体とは別の領域を認識してグリシル化ガストリンと反応する第2のモノクローナル抗体又はそのフラグメントとを使用することを特徴とする、グリシル化ガストリンの免疫学的分析方法に関する。

【0014】

本発明の免疫学的分析方法の好ましい態様によれば、前記免疫学的分析方法がサンドイッチ法又は凝集法である。

【0015】

20

30

40

50

また、本発明の免疫学的分析方法の別の好ましい態様によれば、(1)(a)請求項1に記載の第1モノクローナル抗体若しくはそのフラグメント、又は請求項1に記載の第2モノクローナル抗体若しくはそのフラグメントのいずれか一方のモノクローナル抗体若しくはそのフラグメントを固定化した不溶性担体、(b)残る一方のモノクローナル抗体若しくはそのフラグメントに標識を付した標識抗体、及び(c)グリシル化ガストリンを含む可能性のある被検試料を接触させる工程、並びに(2)前記不溶性担体上に形成される、固定化抗体とグリシル化ガストリンと標識抗体との複合体の前記標識からの信号を分析する工程を含む。

【0016】

また、本発明は、(1)ガストリンとは反応しないが、グリシル化ガストリンとは反応する第1のモノクローナル抗体又はそのフラグメントと、(2)前記第1モノクローナル抗体とは別の領域を認識してグリシル化ガストリンと反応する第2のモノクローナル抗体又はそのフラグメントとを含むことを特徴とする、グリシル化ガストリンの免疫学的分析用キットに関する。

10

【発明の効果】

【0017】

本発明の免疫学的分析方法によれば、生体試料中のグリシル化ガストリンに関連する類縁物質(例えば、ガストリン、グリシル化CCK-8、又はCCK-8)の量に影響を受けることなく、グリシル化ガストリンを簡便かつ正確に測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0018】

本発明では、2種類のモノクローナル抗体又はそのフラグメントを使用する。第1のモノクローナル抗体は、ガストリンとは反応しないが、グリシル化ガストリンと反応する。また、第2のモノクローナル抗体は、前記第1モノクローナル抗体とは別の領域を認識してグリシル化ガストリンと反応する。

【0019】

本発明で用いる第1モノクローナル抗体は、グリシル化ガストリンのC末端のグリシン又はそれを含むC末端のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体である。ヒト・グリシル化ガストリンのアミノ酸配列(配列番号1;18アミノ酸)と、ヒト・ガストリンのアミノ酸配列(配列番号2;17アミノ酸)とは、グリシル化ガストリンのC末端にグリシンが付加されていることを除いて、一致する。また、ヒト・グリシル化ガストリンのアミノ酸配列と、グリシル化CCK-8のアミノ酸配列とは、C末端アミノ酸配列(6アミノ酸残基)が一致する。従って、前記第1モノクローナル抗体は、グリシル化ガストリン及びグリシル化CCK-8と反応するが、ガストリン及びCCK-8とは反応しない。

30

【0020】

前記第1モノクローナル抗体は、常法[例えば、続生化学実験講座(日本生化学会編)又は免疫生化学研究法(日本生化学会編)に記載の方法]に従って調製することができる。例えば、グリシル化ガストリンの全長ペプチド、あるいは、そのC末端の部分ペプチド(例えば、C末端のグリシン残基を含む5~12個のアミノ酸残基からなるペプチド)を免疫原として使用し、グリシル化ガストリンの全長ペプチド及び/又はC末端部分ペプチド(例えば、前記免疫原)、並びに、ガストリンの全長ペプチド及び/又はそのN末端部分ペプチドを用いてスクリーニングを実施することによって、所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを調製することができ、そのハイブリドーマから前記第1モノクローナル抗体を調製することができる。

40

【0021】

本発明で用いる第2モノクローナル抗体は、前記第1モノクローナル抗体とは別の領域(好ましくは、グリシル化ガストリンのN末端領域)を認識してグリシル化ガストリンと反応する。前記第2モノクローナル抗体が認識するグリシル化ガストリンのN末端領域は、前記第1モノクローナル抗体と一緒に用いることにより、グリシル化ガストリン特異的な免疫学的分析系(特にはサンドイッチ測定系)を構築可能な領域である限り、特に限定

50

されるものではないが、例えば、N末端から数えて1番～12番（好ましくは1番～8番、より好ましくは1番～6番）のアミノ酸残基からなるN末端アミノ酸配列、あるいは、その部分配列であって、アミノ酸残基5～11個（好ましくは6～8個）からなる部分アミノ酸配列を挙げることができる。前記第2モノクローナル抗体は、グリシル化ガストリン及びガストリンと反応するが、グリシル化CCK-8及びCCK-8とは反応しない。

【0022】

前記第2モノクローナル抗体は、常法に従って調製することができる。例えば、免疫原として、グリシル化ガストリンの全長ペプチド、あるいは、そのN末端の部分ペプチド（例えば、N末端のグルタミン酸残基を含む5～12個のアミノ酸残基からなるペプチド）を使用し、スクリーニング用抗原として、グリシル化ガストリンの全長ペプチド及び/又はN末端部分ペプチド（例えば、前記免疫原）、並びに、ガストリンの全長ペプチド及び/又はそのN末端部分ペプチドを用いること以外は、通常のモノクローナル抗体調製法に従って、調製することができる。

10

【0023】

本発明の免疫学的分析方法では、前記の第1モノクローナル抗体又はそのフラグメント及び前記の第2モノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いて免疫分析系を構築することができる。前記フラグメントは、その元となるモノクローナル抗体の反応特異性を有する抗体フラグメントである限り、特に限定されるものではなく、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv等が含まれる。これらのフラグメントは、例えば、元となるモノクローナル抗体を常法によりタンパク質分解酵素によって消化し、続いて、タン

20

【0024】

本発明の免疫学的分析方法には、種々の免疫学的分析方法、例えば、サンドイッチ法、凝集法などが含まれる。また、前記の第1モノクローナル抗体又はそのフラグメント及び前記の第2モノクローナル抗体又はそのフラグメントは、前記の各種免疫学的分析方法に用いることのできる、本発明の免疫学的分析用キットの構成試薬としても有用である。

【0025】

本発明の免疫学的分析方法に用いる被検試料は、グリシル化ガストリンを含む可能性のある試料であれば特に限定されるものでないが、例えば、生体試料〔例えば、血液、血漿、血清、尿、細胞、組織（正常組織又は癌組織）、又は器官〕又はその処理物（例えば、

30

【0026】

サンドイッチ法を利用する本発明の免疫学的分析方法は、例えば、
(1) (a) 前記の第1モノクローナル抗体若しくはそのフラグメント、又は前記の第2モノクローナル抗体若しくはそのフラグメントのいずれか一方のモノクローナル抗体若しくはそのフラグメントを固定化した不溶性担体、(b) 残る一方のモノクローナル抗体若しくはそのフラグメントに標識を付した標識抗体、及び(c) グリシル化ガストリンを含む可能性のある被検試料を接触させる工程、並びに
(2) 前記不溶性担体上に形成される、固定化抗体とグリシル化ガストリンと標識抗体との複合体の前記標識からの信号を分析する工程

40

【0027】

更に具体的には、サンドイッチ法を利用する本発明の免疫学的分析方法は、例えば、前記の第1モノクローナル抗体又はそのフラグメントを不溶性担体に固定化し、この抗体固定化不溶性担体とグリシル化ガストリンを含む可能性のある被検試料とを接触させ、続いて、前記の第2モノクローナル抗体又はそのフラグメントに標識を付した抗体と接触させ、不溶性担体上に、固定化第1抗体とグリシル化ガストリンと標識第2抗体とからなるサンドイッチ状複合体を形成させ、第2抗体の標識の信号を検出するか、あるいは、前記の第2モノクローナル抗体又はそのフラグメントを不溶性担体に固定化した後、グリシル化ガストリンを含む可能性のある被検試料と接触させ、続いて、前記の第1モノクローナル

50

抗体又はそのフラグメントに標識を付した抗体と接触させ、不溶性担体上に、固定化第2抗体とグリシル化ガストリンと標識第1抗体とからなるサンドイッチ状複合体を形成させ、第1抗体の標識からの信号を検出することができる。

【0028】

本発明のサンドイッチ法による免疫学的分析方法に使用することのできる不溶性担体は特に限定されるものでなく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子、その他ニトロセルロース、紙、アガロース及びこれらの組み合わせ等を例示することができる。

【0029】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、又は発光物質を使用するのが有利である。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ等、また、蛍光物質としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート等、また、発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステル、ルシフェリン等を使用することができる。

10

【0030】

凝集反応を利用する本発明の免疫学的分析方法は、例えば、不溶性担体に固定化された前記の第1モノクローナル抗体又はそのフラグメントと、不溶性担体に固定化された前記の第2モノクローナル抗体又はそのフラグメントとを、被検試料存在下に接触させ、凝集反応を観察する。スライド板を用いる場合には目視的に、又は反応セルを用いる場合には特定の波長を用いて分光学的に凝集反応を測定し、被検試料中のグリシル化ガストリン濃度を定量することができる。

20

【0031】

凝集反応を利用する本発明の免疫学的分析方法において、不溶性担体としては、一般に抗原抗体反応の凝集反応を利用する免疫学的分析方法において用いられる任意の不溶性担体を用いることができ、例えば、ラテックス粒子（特には、ポリスチレンラテックス粒子）を挙げることができる。モノクローナル抗体を不溶性担体に固定化させるには、公知の方法、例えば、化学結合法（架橋剤としてカルボジイミド、グルタルアルデヒド等を用いる）又は物理吸着法を用いることができる。こうして、モノクローナル抗体と不溶性担体との複合体（抗体/担体複合体）を形成し、これを本発明の免疫学的分析方法に用いることができる。

30

【0032】

本発明の免疫学的測定方法（凝集法）においては、例えば、第1モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）及び第2モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）を、それぞれ別々に、不溶性担体に担持させることもできるし、あるいは、第1モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）及び第2モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）を混合物として不溶性担体に担持させることもできる。前者の場合は、第1モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）担持不溶性担体と、第2モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）担持不溶性担体とを組み合わせ使用し、後者の場合は、第1モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）及び第2モノクローナル抗体（又はそのフラグメント）担持不溶性担体を使用する。

40

【実施例】

【0033】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0034】

《実施例1：合成ペプチドの作製》

ペプチド自動合成装置（アプライド・バイオシステム社製）を用いて固相法により、配列番号1で表されるグリシル化ガストリン（18アミノ酸）のN末にシステイン（Cys）を付加した19アミノ酸からなる合成ペプチド（CEGPWLEEEEA YGWMD

50

F - G l y ; 配列番号 3) を作製した。ポリマー性の固相支持体へ、前記ペプチドの C 末端側から、そのアミノ酸残基に対応した L 体のアミノ酸を、順次ペプチド結合によって結合した。そのようにして得られた合成ペプチドは、トリフルオロメタンスルホン酸を用いて固相支持体から切断した後、アミノ酸側鎖の保護基を除去し、逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (H P L C) で精製した。合成ペプチドの精製純度は約 9 5 % で、そのアミノ酸配列は、アミノ酸シーケンサー (アプライド・バイオシステム社製) により確認した。

【 0 0 3 5 】

《 実施例 2 : 合成ペプチドとキャリアタンパク質との架橋 》

合成ペプチドは、ハプテンとして、キャリアタンパク質との架橋物にして免疫抗原とした。キャリアタンパク質として、キーホールリンペットヘモシアニン (Keyhole limpet hemocyanin ; 以下、 K L H と略称する) を使用した。その架橋方法は、合成ペプチドの N 末端側にある C y s 残基を利用した。スルホ (s u l f o) - S M C C (succinimidy l 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) を用いて、K L H に S H 基反応性のマレイミド基を導入し、活性化し、次に、その活性化されたマレイミド基と C y s - S H 基を反応させ、架橋した。

10

【 0 0 3 6 】

《 実施例 3 : 合成ペプチドに対する抗体の作製 》

実施例 2 で作製した免疫原である合成ペプチド 5 0 μ g を P B S (リン酸緩衝液 , p H 7 . 4) 2 5 0 μ L に溶解し、フロイントの完全アジュバンド 2 5 0 μ L と充分混合してエマルジョンとした。このエマルジョンを B a l b / C マウス (雌) の四肢皮下及び腹腔内に投与した。

20

更に、2週間後、新たに前記の半量の合成ペプチド (2 5 μ g) をフロイントの不完全アジュバンドと充分混合してエマルジョンとし、皮下及び腹腔内に投与した (2 回目投与) 。

更に、2週間後、新たに前記 2 回目投与と同量の合成ペプチド (2 5 μ g) をフロイントの完全アジュバンドと充分混合してエマルジョンとし、マウス腹腔内に投与した (3 回目投与) 。

最終免疫 4 日後に、眼底静脈より採血を行い、免疫抗原ペプチドに対する力価を測定しながら、同量 (2 5 μ g) を同間隔 (2 週間) で免疫を実施した。

30

【 0 0 3 7 】

《 実施例 4 : 抗血清力価評価 》

採血した血清中に含有された抗体と、免疫原として使用した合成ペプチドとの抗原抗体の反応を、次に示す E L I S A 法 (エンザイム・イムノソルベント・アッセイ) で検討した。

まず、96 ウェル平底 E L I S A プレートの各ウェルに、合成ペプチド溶液 (1 μ g / m L 炭酸緩衝液 , p H 9 . 6) を 5 0 μ L ずつ分注し、4 で一晩静置した。この処置により合成ペプチドは、各ウェルの接触面に非特異的に吸着する。

【 0 0 3 8 】

次に、それらの各ウェルを洗浄液 (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 含有のホウ酸緩衝液 , p H 8 . 3) で洗浄した後、1 . 0 % ウシ血清アルブミン溶液 (0 . 0 5 % N a N ₃ 含有の P B S , p H 7 . 2) を各ウェルに 5 0 μ L ずつ分注し、室温で 1 時間静置した。これらの各ウェルを同洗浄液で洗浄し、50 倍 ~ 1 0 0 , 0 0 0 倍に希釈 (0 . 0 5 % T w e e n 2 0 含有の P B S , p H 7 . 2) した抗血清を、各ウェルに 5 0 μ L ずつ分注し、室温で 1 時間静置した。次に、前記の各ウェルを同洗浄液で洗浄し、マウス免疫グロブリンに対する西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体液を、各ウェルに 5 0 μ L ずつ分注し、室温で 1 時間静置した。そして、これらの各ウェルを同洗浄液で洗浄後、o - フェニレンジアミン溶液 [o - フェニレンジアミン 2 0 m g 及び 3 5 % H ₂ O ₂ 1 0 μ L を 0 . 0 5 m o l / L クエン酸緩衝液 (p H 5 . 0) 5 0 m L に溶解] を 5 0 μ L ずつ分注し、室温で 1 5 分間反応後、2 m o l / L - H ₂ S O ₄ を 5 0 μ L ずつ分注して西洋ワサビペルオキ

40

50

シダーゼの反応を停止し、このELISAプレートの各ウエルの492nmにおける吸光度を測定した。対照の陰性血清と比較し、100,000倍希釈抗血清にて抗原ペプチドとの反応を確認することができたマウスについて、以下の細胞融合を実施した。

【0039】

《実施例5：細胞融合》

100,000倍希釈にて抗原ペプチドとの反応性がELISA法で確認することができたマウスについて、最終免疫より2週間後に、免疫抗原(25 μ g)を更に腹腔内に免疫した。4日後、脾臓を摘出してほぐした後、RPMI1640培地によく洗浄した。この洗浄した脾細胞(10⁸個)と、同様によく洗浄したマウスミエローマP3-X-63-Arg-U1(10⁷個)とを混ぜ、50(W/V)%PEG4000を徐々に滴下し、細胞融合させた。RPMI1640を徐々に加えることによりPEGを希釈し、反応を停止した。これを1100回転にて5分間遠心して細胞を集め、HAT培地[10⁻⁴mol/Lヒポキサンチン、4 \times 10⁻⁷mol/Lアミノプテリン、及び1.6 \times 10⁻⁵mol/Lチミジンを含む10%FBS(ウシ胎児血清)-RPMI1640培地]に懸濁し、96穴マイクロプレートの各ウエルに0.1mLずつ分注し、5%CO₂存在下にて37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。融合後、4日目及び8日目にHT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いたもの)0.2mLで置換した。

10

【0040】

《実施例6：融合細胞の選別とクローン化》

実施例4に記載した抗血清力価測定と同様の方法(抗原ペプチド固相ELISA法)にて、96穴マイクロプレート各ウエルの培養上清の抗原ペプチドに対する反応性を評価した。まず、96ウエル平底ELISAプレートの各ウエルに合成ペプチド溶液(1 μ g/mL炭酸緩衝液, pH9.6)を50 μ Lずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。この処置により合成ペプチドは、各ウエルの接触面に非特異的に吸着する。次に、それらの各ウエルを洗浄液(0.05%Tween-20含有のホウ酸緩衝液, pH8.3)で洗浄した後、1.0%ウシ血清アルブミン溶液(0.05%NaN₃含有のPBS, pH7.2)を各ウエルに50 μ Lずつ分注し、室温で1時間静置した。これらの各ウエルを同洗浄液で洗浄し、細胞融合実施後12日目の培養中の96穴マイクロプレートの各ウエル培養上清を、各ウエルに50 μ Lずつ分注し、室温で1時間静置した。次に、前記の各ウエルを同洗浄液で洗浄し、マウス免疫グロブリンに対する西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体液を、各ウエルに50 μ Lずつ分注し、室温で1時間静置した。そして、これらの各ウエルを同洗浄液で洗浄後、o-フェニレンジアミン溶液[o-フェニレンジアミン20mg及び35%H₂O₂10 μ Lを0.05mol/Lクエン酸緩衝液(pH5.0)50mLに溶解]を50 μ Lずつ分注し、室温で15分間反応後、2mol/L-H₂SO₄を50 μ Lずつ分注して西洋ワサビペルオキシダーゼの反応を停止し、このELISAプレートの各ウエルの492nmにおける吸光度を測定した。対照(HAT培地)をブランクとし、492nmにおける吸光度が0.5以上のウエルを選び出し、限界希釈法によりクローニングを繰り返し行い、安定したモノクローナル抗体産生細胞を確立した。

20

30

【0041】

《実施例7：免疫抗原合成ペプチド特異性の確認》

実施例4で使用したELISAプレートを同様に使用した。一定の濃度に希釈した培養上清に5種類の合成ペプチド、すなわち、免疫抗原ペプチド、ガストリン、CCK-8、グリシル化CCK-8、又はガストリンのN末端ペプチド(EGPWLEEEEA; 配列番号4)をそれぞれ0.13 μ g/mL~100 μ g/mL添加し、4 $^{\circ}$ Cで1晩静置した。ELISAプレートをウシ血清アルブミン処理後、前記の希釈抗血清を各ウエルに50 μ Lずつ分注した。以下、実施例4と同様の操作を行い、5種類のペプチドによる間接阻害ELISAを行うことにより、特異性を確認した。

40

【0042】

本発明で用いる第1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして、クローン2C6、1G6、3E7、4H4、及び9B11が得られ、本発明で用いる第2モノクロー

50

ナル抗体を産生するハイブリドーマとして、クローン3D2及び2C9が得られた。前記第1抗体は、グリシル化ガストリン又はグリシル化CCK-8と反応したが、ガストリン又はCCK-8とは全く反応しなかった。前記第2抗体は、グリシル化ガストリン、ガストリン、又はガストリンのN末端ペプチドと反応したが、グリシル化CCK-8又はCCK-8とは全く反応しなかった。

【0043】

《実施例8：サンドイッチELISA測定における類縁物質との交叉反応性の確認》

第1の抗体として、IgG(クローン番号：3D2)を5µg/mLの濃度となるように150mmol/L-NaCl含有50mmol/L-Tris(pH7.5)溶液で希釈し、96ウエル平底ELISAプレートの各ウエルに50µL分注し、4で一晚静置した。この処置により、第1の抗体は、各ウエルの接触面に非特異的に吸着する。

10

【0044】

第1の抗体溶液を吸引除去した後、ブロッキング剤[22.5mg/mLスキムミルク, 25%-Super Block Blocking Buffer in TBS(PIERCE社), 150mmol/L-NaCl, 及び50mmol/L-Tris(pH7.5)]を300µLずつ分注し、室温で1時間静置した。ブロッキング剤を取り除いた後、各種類縁ペプチド溶液を50µLずつ分注し、室温で2時間静置した。類縁ペプチド溶液は、グリシル化ガストリンについては0~500pg/mLとなるように、ガストリン、CCK-8(PEPTIDE INSTITUTE, INC, Code 4087-V)及びグリシル化CCK-8(キアゲン)については0~10µg/mLとなるように、希釈液[11.25mg/mLスキムミルク, 12.5%-Super Block Blocking Buffer in TBS, 0.05%Tween20, 150mmol/L-NaCl, 及び50mmol/Lトリス緩衝液(pH7.5)]で希釈調整した。

20

【0045】

反応後、洗浄液[0.02%Tween20含有PBS(-)]で洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識した第2の抗体(クローン番号：2C6)のF(ab')₂を5µg/mLになるように希釈液で希釈し、50µLずつ分注し、室温で1時間静置した。洗浄液[0.02%Tween20含有PBS(-)]で洗浄し、基質溶液[75µg/mLテトラメチルベンジジン(TMBZ)及び0.006%H₂O₂含有0.1mol/L酢酸Na緩衝液(pH5.5)]100µLを分注し、室温で10分間静置した。0.5mol/L-H₂SO₄を100µLずつ分注し、西洋ワサビペルオキシダーゼの反応を停止し、ELISAプレートの各ウエルの492nmにおける吸光度を測定した。

30

【0046】

結果を図1に示す。この測定系では、グリシル化ガストリンにのみ特異的に反応し、類縁物質は全く反応性を示さなかった。

【0047】

《実施例9：モノクローナル抗体結合ラテックスの調製と前記ラテックスによるグリシル化ガストリンの測定》

第1のモノクローナル抗体(クローン番号：3D2)IgGを1.0mg/mLの濃度で含有する50mmol/L-Tris(pH8.0)溶液2mLと、ラテックス溶液(2%ポリスチレンラテックス、JSR社製、粒径0.310µm)2mLとを混合し、マグネチックスターラーにて2時間攪拌し、抗体をラテックス粒子上に固定化した。遠心分離(20,000g、20分間)した後、沈殿を0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む50mmol/L-Tris(pH8.0)溶液に懸濁し、1時間攪拌した。遠心分離を繰り返すことにより、50mmol/L-Tris(pH8.0)溶液で沈殿を3回洗浄した後、沈殿を、0.05%アジ化ナトリウムを含む50mmol/L-Tris(pH8.0)溶液に懸濁させ、モノクローナル抗体3D2結合ラテックス含有液を得た。第2のモノクローナル抗体(クローン番号：2C6)IgGも3D2と同様にしてモノクローナル抗体2C6結合ラテックスを得た。得られた2種のモノクローナル抗体結合ラテックス含有液を等量混合し、使用するまで4で保存した。

40

【0048】

50

2種のモノクローナル抗体結合ラテックス含有液に、種々の濃度のグリシル化ガストリン又は類縁ペプチド溶液を加えて混合し、全自動免疫血清検査システムLPIA-NV7(三菱化学ヤトロン社製)を用いて、凝集の反応速度を測定した。

【0049】

結果を図2に示す。この測定系では、グリシル化ガストリンにのみ特異的なラテックス凝集が認められ、類縁物質では全く凝集は認められなかった。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明の免疫学的分析方法は、種々の病態、特に癌の増殖や転移との関連において重要である、グリシル化ガストリンの分析の用途に適用することができる。

10

【配列表フリーテキスト】

【0051】

配列表の配列番号4の配列で表されるアミノ酸配列は、合成ペプチド配列である。

【図面の簡単な説明】

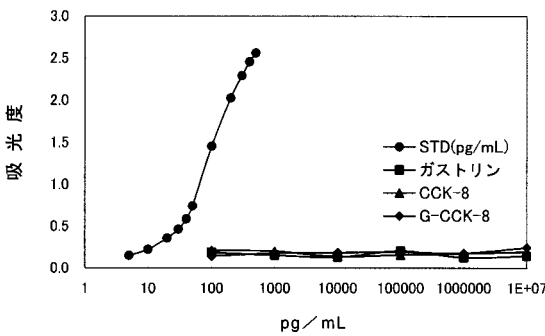
【0052】

【図1】本発明のサンドイッチ免疫測定法により、グリシル化ガストリン標準品(STD)、ガストリン(ガストリン1)、CCK-8、及びグリシル化CCK-8(G-CCK-8)を測定した結果を示すグラフである。

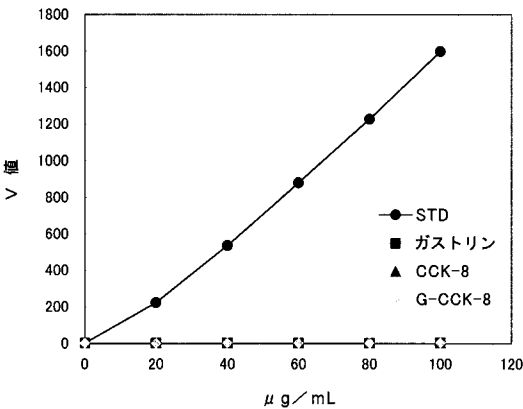
【図2】本発明のラテックス凝集測定法により、グリシル化ガストリン標準品(STD)、ガストリン(ガストリン1)、CCK-8、及びグリシル化CCK-8(G-CCK-8)を測定した結果を示すグラフである。

20

【図1】



【図2】



【配列表】

2007127472000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 伊藤 和幸
大阪府大阪市東成区1丁目3番3号 大阪府立成人病センター内
- (72)発明者 檜原 啓之
大阪府大阪市東成区1丁目3番3号 大阪府立成人病センター内
- (72)発明者 田中 英之
東京都新宿区西五軒町13番1号 株式会社三菱化学ヤトロン内
- (72)発明者 大澤 満
東京都新宿区西五軒町13番1号 株式会社三菱化学ヤトロン内
- (72)発明者 水戸部 優樹
東京都新宿区西五軒町13番1号 株式会社三菱化学ヤトロン内
- (72)発明者 細谷 雅千
東京都新宿区西五軒町13番1号 株式会社三菱化学ヤトロン内

专利名称(译)	甘氨酸延长胃泌素的分析方法		
公开(公告)号	JP2007127472A	公开(公告)日	2007-05-24
申请号	JP2005319140	申请日	2005-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	大阪府 株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	大阪府 三菱化学Yatoron		
[标]发明人	馬場都 伊藤和幸 榎原啓之 田中英之 大澤満 水戸部優樹 細谷雅千		
发明人	馬場 都 伊藤 和幸 榎原 啓之 田中 英之 大澤 満 水戸部 優樹 細谷 雅千		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/577.B		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：在不受生物样品中与甘氨酸化胃泌素相关的相关物质（例如，胃泌素，甘氨酸化CCK-8或CCK-8）的量的影响的情况下，容易且准确地测量甘氨酸本发明提供了纯化胃泌素的免疫分析方法。解决方案：（1）第一种单克隆抗体或其片段，其不与胃泌素反应但与糖化胃泌素反应，和（2）识别不同于第一单克隆抗体和糖化物的区域使用与胃泌素反应的第二种单克隆抗体或其片段。【选择图】无

【 図 2 】

