

(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2011-88866

(P2011-88866A)

(43) 公開日 平成23年5月6日(2011.5.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18	4H045
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 545A	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2009-244840 (P2009-244840)	(71) 出願人	309035040 有限会社中嶋アソシエイツ 群馬県前橋市南町3丁目33-2
(22) 出願日	平成21年10月23日 (2009.10.23)	(71) 出願人	504446892 株式会社フロンティア研究所 北海道石狩市新港西1丁目777-12
		(72) 発明者	中嶋克行 群馬県前橋市南町3丁目47-4
		(72) 発明者	小平司 北海道札幌市北区麻生町4丁目8-17
		(72) 発明者	加藤美穂子 北海道札幌市厚別区西2条3丁目8-2
		Fターム(参考)	4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 EA50 FA74 GA00

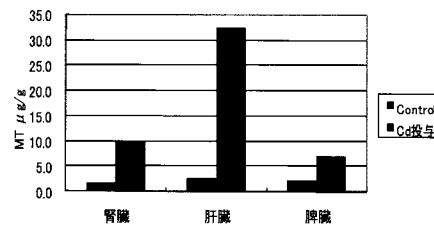
(54) 【発明の名称】 生体成分中（血中、尿中その他組織中）の微量メタロチオネイン濃度測定のために開発された、高感度メタロチオネイン測定用酵素免疫定量法（ELISA）キットの発明

(57) 【要約】

【課題】ヒト並びにマウス、ラット、家兎、その他の哺乳動物のMT1,2と特異的に反応するポリクロナール抗体を作製し、これを利用して生体成分中(血液、尿、組織)の微量MTを、正確に測定することのできる測定系を提供すること。特に今まで測定不可であった血中の低濃度MTの測定を可能にする。それにより新しい診断法が確立する。

【解決手段】MT と特異的に反応することを特徴とするポリクロナール抗体およびこの抗体を利用したMTの高感度測定法、測定キットを開発した。

【選択図】 図6



重さ50gのマウスの腹くう内にCdCl<sub>2</sub> 500μgを投与し、24時間後各組織を取り出した。コントロールには生理食塩水を投与した。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒト並びにマウス、ラット、家兎その他哺乳動物のメタロチオネイン(以下MTと略)1, 2と特異的に反応することを特徴とするポリクローナル抗体。

## 【請求項2】

MT蛋白1, 2のN末端7アミノ酸ペプチド(末端アセチル化)とのみ交差する抗体である請求項1記載のポリクローナル抗体。

## 【請求項3】

ラットMT2に、スカシ貝ヘモシアニン(KLH)およびウシ血清アルブミン(BSH)を結合させ、当該結合物で動物を免疫し、当該動物から得られる抗血清を、さらにグロブリン分画に精製をすることにより得られたものである請求項1記載のポリクローナル抗体。

10

## 【請求項4】

検体に、請求項1ないし3の何れかに記載のポリクローナル抗体を作用させ、生体試料中(血液、尿、組織)のMTを測定することを特徴とする、高感度MTの酵素免疫定量法。

## 【請求項5】

請求項1ないし3の何れかに記載のポリクローナル抗体を含有することを特徴とする各種哺乳動物の生体試料中MTの測定キット

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

本発明は酵素免疫定量法を用いた、簡便性、再現性、安定性に優れた高感度メタロチオネイン測定用キット

## 【背景技術】

## 【0002】

従来技術によりメタロチオネイン(以下MTと略)の血中濃度の測定を目的としたRIA(非特許文献1, 2), ELISA(非特許文献3, 4)が報告されているが、いずれも不十分で現在一般に使用されていない。

## 【0003】

従来法はMT1, MT2をそれぞれ別に測定しており、血中MT濃度で正常値領域以下の低濃度域の測定を可能にしたMT-ELISAは報告されていない。

30

## 【0004】

これらの従来法では、動物並びにヒト血中MT濃度測定を、同一キットにより測定することは不可能であった。特にヒトMT低下症の検出を可能にする高感度メタロチオネインELISAは、現在までに開発されていない

## 【0005】

従ってこのことを可能にする特異的な抗MT抗体を作成し、低濃度から高濃度のヒト並びに動物血中並びに尿中MT濃度の測定できるELISAの開発が求められていた。

## 【0006】

メタロチオネイン“MT”とは、生体成分として生体防御に働く低分子蛋白で、タンパク質のシステイン及びシスチン部のスルヒドリル基(-SH)ジスルフィド基(-S-S)が、金属イオンと結合して出来た化合物という意味でつくられた用語である(非特許文献5)

40

## 【0007】

金属元素を無機塩の型で経口的に摂取した場合、肝臓及び腎臓に多く集まるが、その際、金属元素と親和性の強いタンパク質が誘発的に生成されて、金属イオンとタンパク質からなる有機金属化合物のメタロチオネインが生体内で合成され、それが生体の毒物などに対する制御作用物質として働く。

## 【0008】

例えば、少量のカドミウムイオンを経口的に与えておくと、動物のカドミウムイオンによ

50

る通常の致死量を超えても死なない。これは、生体内でカドミウムチオネインが生成されたことによる、免疫効果の結果と考えられている。実際、カドミウムイオンを含む塩類を経口的に動物に与えると、肝臓・腎臓・腸・脾臓などにメタロチオネイン（この場合はカドミウムチオネイン）が著明に増加し、その増加量はカドミウムの投与量にほぼ比例する（木村優著「微量元素の世界」より）

【0009】

メタロチオネインの主な生理機能は以下の通りである。

1. 必須微量元素の恒常性維持、あるいは過剰な重金属の解毒

分子中に金属を取り込む性質に由来し、生物にとって必須ではあるが、その反応性の高さ故に毒性も有する重金属種の管理を行っている。さらに、代謝や転写を司る酵素に亜鉛含有酵素が多く存在することから、それらの酵素への亜鉛提供による代謝および転写調節の働きも示唆されている。

10

【0010】

2. 活性酸素種などのラジカルやアルキル化剤の消去

システイン残基のチオール基がラジカル種と容易に反応する性質に由来する。すなわち、金属と結合していないチオールが毒性を有するラジカル種を消去している。また、メタロチオネインは20残基のシステインを有することから、この消去能は高く、酸化に対する防御因子として高い能力を持っている。さらに、サイトカインなどの生理活性物質や四肢緊縛、紫外線などの外的ストレスでも誘導されることから、抗炎症作用などの生体防御物質としての働きも注目されている(非特許文献6)

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Bremner I et al, Metallothionein II1987:507-17

【非特許文献2】Hamer DH, Ann Rev Biochem 1986; 55: 913-51

【非特許文献3】Grider a, eta l. L Lab Clin Med 1989; 113:221- 28

【非特許文献4】Akintola DF et al, J Lab Clin Med 1995; 125: 119-27

【非特許文献5】Margoshes M J Am Chem Soc 1957; 79:4813-4

【非特許文献6】Thornally PJ et al, Biochim Biophys Acta 1985; 827:36-44)。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

生体成分中に微量に存在するMT蛋白濃度を、簡便迅速、再現性よく測定することを目的とする。特にヒトにおけるMTの臨床的意義並びにその診断的有用性の確立のために、血中微量MT濃度の再現性の高い、簡便な高感度MT測定法が求められていた。

【0013】

しかしながらこの目的を満たすための、特異性、親和性の高いMT抗体の作成が困難であり、1 ng/mL以下の濃度の測定を可能にする高感度ELISA法の確立が難しかった。

【0014】

従って本発明はそのような点を解決すべく、特異性、親和性の高いMT抗体を作成し、試料の特殊な前処理を行うことにより、1 ng/mL以下の血中MT濃度をはじめ、体液、組織のMT濃度を、簡便かつ再現性の良いELISA法の確立を課題とした。

40

【0015】

またMT1単独でなく、MT2も同時に測定でき、かつヒトMT以外の哺乳動物のMT測定も同時に測定が可能なMT-ELISAの確立を目的とした。

【課題を解決するための手段】

【0016】

1) 抗MTポリクローナル抗体の作成 と、それを用いたELISA法 ( Competitive Enzyme-linked Immunoassay ) の確立。

本発明はラットMT2をKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH)に結合したものを抗原として

50

、家兎に免疫して作成したポリクロナール抗体を用いた。作成したMT抗体とアミコンにて前処理をした試料サンプルを用いて、プレートに個相化したMT抗原との競合反応を利用したELISA法を確立した。

【発明の効果】

【0017】

従来のMT測定法の検出限界値は5 ng/ml以上であり、ヒト血中濃度の正常域より低濃度のMTを測定することができなかつたため、ヒト血中MT濃度の測定法として十分ではなかつた。本発明のMT-ELISA測定法は、500pg/mlレベルの測定感度を有することから、低MT血症の検出も可能になり、疾病との関連を検討することが可能となった。また、試料の前処理法を工夫することにより、血中並びに尿中MTの濃度測定を妨害する物質を除去し、MTの検出が可能となった。

10

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】家兎への5回のMT抗原の免疫スケジュール

【図2】抗体の認識部位の検討：MTフラグメントの抗体との反応性。本抗体はN末端ペプチドでアセチル化されたもののみと反応。

【図3】MT-ELISAの操作法の実際

【図4】MT測定の標準曲線(0.1ng/mLから10、000ng/mLまでの測定域)

【図5】カドミウム投与によるマウス血中MT濃度の変化。投与後24時間で著明な血中MT濃度の上昇が認められた

20

【図6】カドミウム投与によるマウス組織のMT濃度変化。投与後24時間で著明な各組織のMT濃度の上昇が認められた

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例に何ら制限されるものではない。

【実施例1】

【0020】

図1に示したスケジュールにて、MTポリクロナール抗体作成を行った。つまりラットMT2のメタロチオネイン各2mgを1mLのPBSに溶解後、等量のフロイントのアジュバントと混合し、ウサギに初回MT100µg/匹の量を皮下に投与した。その後2週間間隔でMT100µg/匹の免疫を行い、5回免疫後力価の測定を行った

30

【0021】

図2に示したように、本抗体はアセチル基を持つMTのN末端ペプチド(7アミノ酸)とのみ、交差反応が認められた。従ってリコンビナントMTとは反応しない。またヒトとおなじMTのN末端構造をもつマウス、ラット、家兎等において、同じ反応性が認められた。

【0022】

作成したMT抗体を用いて、以下のような競合反応を用いたMT-ELISA測定系を確立した。

【0023】

図2に0.1ng/mLから10µg/mLまでのMT標準曲を示した。

40

従ってヒト、実験動物の血中MT 0.5ng/mL濃度から1,000ng/mLまでの濃度域の測定が可能である

【0024】

生体試料のMT濃度の測定

表1にヒト血中MT濃度の測定結果を示した

【表 1】

表 1 血漿中メタロチオネイン濃度

検体	直接測定 (ng/mL)	限外ろ過後 (ng/mL)
人血漿 1	53.8	28.6
人血漿 2	under	31.6
人血漿 3	62.6	42.5
人血漿 4	under	52.9
ウサギ血漿	under	0.58

10

20

ヒト血清中のMT濃度測定に当たり、血清をそのまま反応系に加えても反応しないところから、分子量10万カットのアミコン限外濾過チューブにて分画し、遠心分離（12,000 r.p.m 30分）後、ろ液中のMT濃度を測定する。

【0025】

30

それ以外の前処理法として、血清をPBSにて4倍希釈後、10分間オープンにて煮沸し、遠心分離後、上澄を測定する方法や、99%アルコール、3%ズルフォサリチル酸等による除蛋白法も可能である。

【0026】

なお血中にて添加したMTの回収試験の結果、100-138%の回収率が得られた。同様の処理により、図5にカドミウム投与によるマウス血中MT濃度の変化を示した。カドミウム投与によりMT濃度が増加することが知られているが、血中にもその結果を反映している。

【0027】

表2に実験動物の組織中MT濃度の測定結果を示した。カドミウム投与により臓器中のMT濃度が増加することが知られているが、その結果を反映している。

40

## 【表 2】

表 2 ラットの組織中メタロチオネインの測定

臓器	重量	希釈倍率	測定値 (ng/mL)	μg/g組織
脾臓	70mg	x10	17.6	0.25
肝臓	141mg	x10	846.4	6.0
		x100	747.2	5.3
腎臓	125mg	x10	1654.4	13.2
		x100	1128.5	9.0

10

20

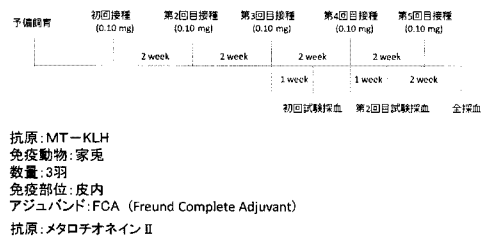
## 【産業上の利用可能性】

## 【0028】

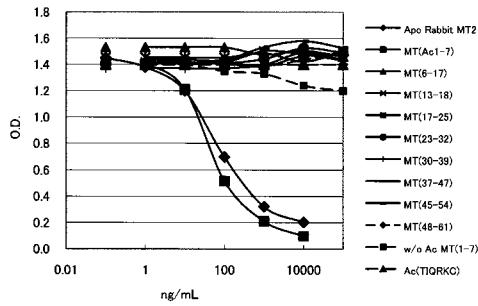
本発明のポリクローナル抗体は、MT 1,2 と特異的に反応するため、ヒトをはじめとしてマウス、ラット、ウサギ等実験動物の、血中、尿中、組織等のMT濃度測定に利用できる。

30

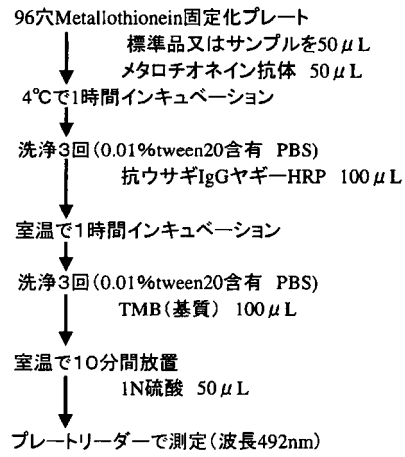
【 図 1 】



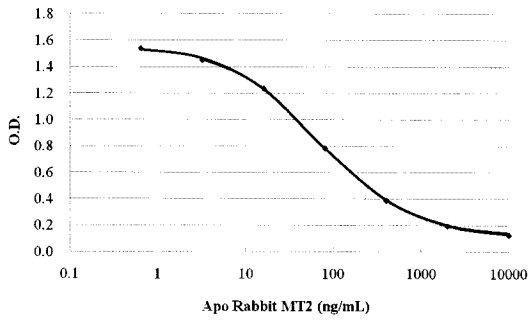
【 図 2 】



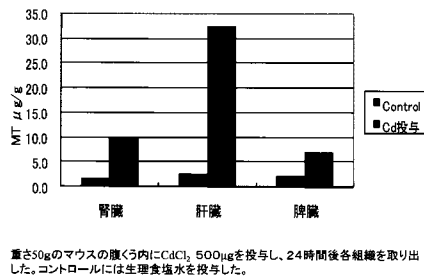
【 図 3 】



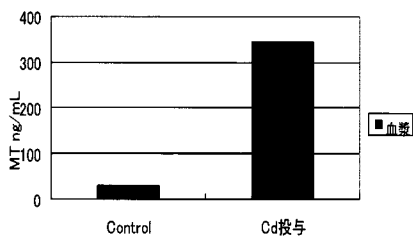
【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 5 】



重さ50gのマウスの腹くう内にCdCl<sub>2</sub> 500μgを投与し、24時間後EDTA採血した。コントロールには生理食塩水を投与した。

专利名称(译)	用于高灵敏度金属硫蛋白测量的酶免疫测定 ( ELISA ) 试剂盒的发明，用于测量生物成分 ( 血液，尿液和其他组织中 ) 中的痕量金属硫蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011088866A</a>	公开(公告)日	2011-05-06
申请号	JP2009244840	申请日	2009-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	中岛联合协会 边疆研究所		
申请(专利权)人(译)	有限公司中岛准 有限公司边疆研究所		
[标]发明人	中嶋克行 小平司 加藤美穗子		
发明人	中嶋克行 小平司 加藤美穗子		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/543.545.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA00		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：制备一种多克隆抗体，与人，小鼠，大鼠，家兔和其他哺乳动物的MT ( 金属硫蛋白 ) 1,2特异性反应，提供一种精确测量极少量MT的测量系统。使用多克隆抗体生物组分 ( 血液，尿液或组织 ) 并建立一种新的诊断方法，能够测量血液中的低浓度MT，特别是直到现在才能测量。ZSOLUTION：多克隆抗体与MT特异性反应。高灵敏度MT测量方法包括使用抗体。开发了测量套件。Z

