

(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2002 - 88100

(P2002 - 88100A)

(43)公開日 平成14年3月27日 (2002.3.27)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
16/18		16/18	4 B 0 6 4
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
// C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 15/00	ZNA A
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 10数)			

(21)出願番号 特願2000 - 279724(P2000 - 279724)

(22)出願日 平成12年9月14日(2000.9.14)

(71)出願人 597096105

株式会社 矢内原研究所

静岡県富士宮市粟倉2480番地の1

(72)発明者 矢内原 昇

静岡県富士宮市粟倉2480番地の1 株式会社

矢内原研究所内

(72)発明者 菅野 富夫

静岡県富士宮市粟倉2480番地の1 株式会社

矢内原研究所内

(74)代理人 100068618

弁理士 萢 経夫 (外 3 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原、抗体およびそれを使用した測定方法

(57)【要約】

【課題】 ウマ C g A の測定・検出方法並びにそれに用いる抗原および抗体を提供する。

【解決手段】 アミノ酸配列：D E E E D D P D R S M K L S F R A R A Y G F R G P G L Q L R R のペプチド、または該アミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸が欠失、置換または追加されたアミノ酸配列からなりかつ該アミノ酸配列のペプチドと同等の抗原活性を示すペプチドからなる抗原；該抗原を温血動物に免疫して産生することにより取得されるウマ・クロモグラニン A に特異的な反応性を有する抗体；および該抗体を使用してイムノアッセイを行うウマ・クロモグラニン A およびその関連物質を特異的に測定および/または検出する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次のアミノ酸配列(I)

DEEEDDPDRSMKLSFRARAYGFRGPG
GLQLRR

を有するペプチド、またはアミノ酸配列(I)において1ないし数個のアミノ酸が欠失、置換または追加されたアミノ酸配列からなりかつアミノ酸配列(I)を有するペプチドと同等の抗原活性を示すペプチドからなる抗原。

【請求項2】 次のアミノ酸配列(II)

DPDRSMKLSFRARAYGFRGPGGLQLRR

を有するペプチドである、請求項1記載の抗原。

【請求項3】 請求項1または2に記載の抗原をウマおよびヒトを除く温血動物に免疫して産生することにより取得されることを特徴とする、ウマ・クロモグラニンAに特異的な反応性を有する抗体。

【請求項4】 請求項3に記載の抗体を使用してイムノアッセイを行うことを特徴とする、ウマ・クロモグラニンAおよびその関連物質を特異的に測定および/または

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗原、抗体およびそれを使用した測定方法に関する。より詳しくは、本発明はウマ・クロモグラニンA(以下、CgAと表記する。)のアミノ酸配列の一部と同一のアミノ酸配列を有するペプチド、または該アミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸が欠失、置換または追加されたアミノ酸配列を有するペプチドからなる抗原、該抗原を用いて産生したウマCgAに特異的な反応性を有する抗体、および該抗体を用いたウマCgAおよびその関連物質の測定および/または検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】CgAは、可溶性酸性タンパク質であるクロモグラニン類の一種であり、そしてクロム親和性細胞内に見出される。またCgAはカテコールアミンおよびペプチドホルモンを分泌する様々なニューロンおよびパラニューロン中の分泌腺細胞中に貯蔵されており、内臓の刺激にตอบสนองしてアドレナリンおよびノルアドレナリンと共に放出される。さらに、激しい運動が血漿中のCgA濃度を増加させることも知られている。

【0003】CgAの有する上記の性質に基づき、ウマにおいて分泌されるウマCgAの濃度を測定することによって、ウマのストレス指数を決定しようとする試みがなされている。しかしながら、現在に至るまでウマCgAを有効に測定する方法は知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、ウマCgAおよびその関連ペプチドを特異的にかつ

高感度で測定・検出する方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者等は上記の要求に鑑み鋭意研究を行った結果、ウマCgAのアミノ酸配列の一部と同一なアミノ酸配列を有する特定のペプチドを抗原として用いて免疫させることにより、ウマCgAに対して特異的に反応する抗体を得ることができ、そしてさらに該抗体を使用してイムノアッセイを行うことにより、ウマCgAおよびその関連物質を特異的にかつ高感度で測定・検出することができることを見出し本発明を完成させた。

【0006】従って本発明は、第一の観点として、次のアミノ酸配列(I)

DEEEDDPDRSMKLSFRARAYGFRGPG
GLQLRR

を有するペプチド、またはアミノ酸配列(I)において1ないし数個のアミノ酸が欠失、置換または追加されたアミノ酸配列を有しかつアミノ酸配列(I)を有するペプチドと同等の抗原活性を示すペプチドからなる抗原に関する。アミノ酸配列(I)において1ないし数個のアミノ酸が欠失、置換または追加されたアミノ酸配列を有しかつアミノ酸配列(I)を有するペプチドと同等の抗原活性を示すペプチドの例としては、次のアミノ酸配列(II)

DPDRSMKLSFRARAYGFRGPGGLQLRR

を有するペプチドが挙げられる。なお上記のペプチドを構成するアミノ酸残基の立体配置はD、LまたはDLであることができるが、該ペプチドは通常はL体である。

【0007】また本発明の第二の観点は、上記の抗原をウマ、ヒトを除く温血動物に免疫して産生することにより取得されることを特徴とする、ウマCgAに特異的な反応性を有する抗体に関する。上記の免疫とは体液性免疫を意味する。また得られる抗体には、抗血清、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびIgY等の一般の抗体が包含される。そしてこれらの抗体は、各種のイムノアッセイにより、ウマの組織中、血液中、尿中、脊髄液中および唾液中等のウマCgAを測定・検出するための有効な手段となり得る。また本発明の抗体は、ウマCgAの測定・検出のみならず、ウマにおけるCgAの刺激-分泌機構の解明等の研究のための有用な試薬としても役立つ。

【0008】さらに本発明の第三の観点は、上記の抗体を使用してイムノアッセイを行うことを特徴とする、ウマCgAおよびその関連物質を特異的に測定および/または検出する方法に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の抗原である特定のアミノ酸配列を有するペプチドは以下のようにして見出した。

【0010】1. total-RNAの抽出

ウマの副腎髄質組織を死亡直後の成熟したサラブレッド(2歳)から入手した。そしてその後該組織を液体窒素中、-80℃で冷凍した。該組織からtotal-RNAを、グアニジニウム/塩化セシウム超遠心分離によって該組織から抽出し、以下のRT-PCRに使用した。

【0011】2. ウマCgAのcDNAのクローニングおよび配列決定

ウマCgA遺伝子を増幅するために、ウシおよびヒト由来のCgAの配列から誘導した変性プライマーを使用するRT-PCRを、ジーンAmp・PCRシステム2400(パーキンエルマー社製)を使用して上記total-RNAについて行った。PCR生成物をpGEM-Tイーザーベクター(プロメガ社製)中にサブクローニングした。cDNA配列をサンガー法に従って、ALF自動シーケンサー(ファルマシア・バイオテック社製)、蛍光標識配列プライマー(M4およびRV-M、宝酒造社製)、およびオートシーケンサー・コアキット(東洋紡社製)を用いて決定した。完全なcDNA配列を得るために、5'および3'末端のcDNA末端高速増殖法(RACE)を5'/3'RACEキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して行った。別のPCRプライマーは、RT-PCR生成物を使用して識別したcDNA配列に基づいて作成した。使用した各々のプライマーの方向および位置を図1に示す。5'-および3'-RACEのPCR生成物を同様にpGEM-Tイーザーベクター中に導入し、そしてDNA配列を決定した。

【0012】3. ウマCgAのcDNA配列およびアミノ酸配列の解析

上記で得られたcDNA配列は、全部で1828bpのcDNAからなり、78bpの5'末端未翻訳領域と、ウマCgAのアミノ酸448残基をエンコードする1347bpのオープン・リーディング・フレームと、および403bpの3'末端未翻訳領域を含んでいた。得られたアミノ酸配列を配列分析ソフトウェア(DNASIS-Mac、日立ソフトウェアエンジニアリング社製)により、ウシ、ブタ、ヒト、マウス、ラットおよびカエルのCgAのアミノ酸配列と比較した。比較結果を図2に示す。図2は、ウシ、ブタ、ヒト、マウス、ラットおよびカエルのCgAのアミノ酸配列とウマCgAアミノ酸配列を併記したものであり、黒丸はウマCgAのアミノ酸と同じ残基を表し、また横棒はウマCgA配列と最も良く合致させるために挿入されたものを表す。図2より明らかなように、CgAのアミノ酸配列がN末端およびC末端において各動物間で非常に良く保存されている。ウマCgAのアミノ酸配列の類似度は、アミノ酸残基番号1~77のN末端において、ウシ、ブタ、ヒト、マウス、ラットおよびカエルの配列に対して各々94.8%、93.5%、92.2%、81.8%、83.1%および66.2%であり、アミノ酸残基番号314~

430番のC末端においては各々90.6%、81.4%、90.6%、80.5%、83.3%および39.0%であった。しかしながらウマCgAのアミノ酸配列の中央部分(アミノ酸残基番号78~313)は保存されておらず、この部分の類似性は各々52.5%、49.1%、38.9%、26.6%、27.9%および6.2%であった。

【0013】4. 抗原として用いるペプチド配列の決定
上記のようにCgAのN末端およびC末端において存在する保存された配列は、タンパク質加水分解部位または生体活性ペプチドに相当する部位を含むことが知られている。なかんずく、ウシCgAのアミノ酸残基番号344~364の配列は、カテコールアミン放出を抑制するペプチドであるカテスタチンに相当する。従って、該ウシCgAのアミノ酸配列に対応しさらにその前後のアミノ酸残基を含むウマCgAのアミノ酸配列、即ちウマCgAのアミノ酸残基番号335~365の配列と同じ次のアミノ酸配列(I)

DEEEDDPDRSMKLSFRARAYGFRGPG
LQLRR

を有するペプチドを抗原として用いると、ウマCgAを有効に測定するイムノアッセイのための抗体を産生することができることを見出した。

【0014】なお本発明の抗原は、アミノ酸配列(I)を有するペプチドのみならず、アミノ酸配列(I)において1ないし数個のアミノ酸が欠失、置換または追加されたアミノ酸配列からなりかつアミノ酸配列(I)を有するペプチドと同等の抗原活性を示すペプチドからなる抗原をも含む。そのような抗原としては、アミノ酸配列(I)のN末端側の5残基を除いた次のアミノ酸配列(II)

DPDRSMKLSFRARAYGFRGPG
LQLRR

であって、ウマCgAのアミノ酸残基番号340~365に相当する配列を有するペプチドからなる抗原が挙げられる。

【0015】本発明の抗体を含む抗血清は、例えば次のアミノ酸配列(III)

H-DEEEDDPDRSMKLSFRARAYGFR
GPG
LQLRR-OH

または(IV)

H-DPDRSMKLSFRARAYGFRGPG
LQLRR-OH

を有するペプチドを抗原として用い、ウサギ、ヒツジおよびモルモット等の温血動物に免疫することにより産生し、そして該温血動物の血液より取得することができる。得られた抗血清は上記アミノ酸配列(III)または(IV)を有するペプチドに特異的な反応性を有するのは勿論のこと、ウマCgAに対して特異的な反応性を有するものである。

【0016】上記の抗血清を含めて、本発明の抗体は例えば次の手順により得ることができる。

(1) 先ず、上記アミノ酸配列(I)および(II)を有するペプチドを固相法または液相法により合成し、続いて得た粗生成物を逆相クロマトグラフィーにより95%以上の純度に精製する。ペプチドの合成のためには、固相法に従って合成すべきペプチドのアミノ酸をカルボキシル末端のアミノ酸残基から1残基ずつ導入し、ペプチド鎖を逐次延長する方法が好ましく採用され得る。この場合、ペプチド合成装置を利用することが大変好都合である。なお上記の合成において、反応に関与しないカルボキシル基の保護基として、トリチルクロリド基、第三ブチルエステル基等が利用され、反応に関与しないアミノ基の保護基として、第三ブチルオキシカルボニル基等が利用されることができ

【0017】(2) 続いて、上記の精製したペプチドを例えば以下の(i)ないし(iii)の方法に従って、免疫をなすための抗原に調製する。

(i) 水溶性カルボジミド、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミド塩酸塩(EDCI)またはジメチルスベルイミデート(DMS)のような縮合剤の作用によって、ペプチドを血清蛋白等の担体に結合させ、これを抗原として使用する方

法。
(ii) グルタルアルデヒド、ビス-ジアゾ化ベンジジンまたはp-ジアゾニウムフェニル酢酸のような二官能性試薬を用いてペプチドと担体との間に架橋を形成し、高分子の抗原に調整してこれを抗原として使用する方

法。
(iii) ペプチドを炭素またはポリビニルピロリドンのような不活性ポリマーからなる微粒子上に吸着させ、これを抗原として使用する方

法。
【0018】(3) 次に、上記のようにして得られた抗原を温血動物に免疫することにより、抗体を該温血動物の血液等の体液内または該温血動物が産卵した卵内に産生させ、そしてそれらより抗体を取得する。例えば該温血動物がウサギ、ヒツジ、モルモット等の場合には、上記の抗原を通常のフロイント完全アジュバントと共に複数回免疫することにより、該温血動物に抗血清を産生させ、そしてその血液を採取して常法に従い抗血清を取得する。また該温血動物がニワトリである場合には、上記の抗原を複数回免疫することにより、該ニワトリが産卵する鶏卵にIgYを産生させ、そして該鶏卵の卵黄より常法に従い粗IgYを採取し、続いて精製を行ってIgYを取得する。あるいは、上記の抗原をフロイント完全アジュバントと共に複数回免疫をなすことによりマウスに抗体を産生させると共に、細胞融合法に従い該抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合してクローニングを行い、そして目的とする抗体を産生する単クローン細胞を分離することによりモノクローナル抗体を取得することも

可能である。

【0019】上記の手順により得られた本発明の抗体である抗血清、IgYおよびモノクローナル抗体は、上記アミノ酸配列(I)の全部または一部を有するペプチド並びにウマCgAに特異的に反応する性質を有する。それ故、該性質に基づいてアミノ酸配列(I)の全部または一部を有するウマCgA関連ペプチドおよびウマCgAを標的とするイムノアッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)、ラジオイムノメトリックアッセイ(RIMA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、酵素イムノメトリックアッセイ(ELISA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)、レーザーを利用するイムノアッセイ等に使用することができ、高感度の測定・検出が可能となる。

【0020】

【実施例】以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明する。しかしながら、これらの実施例は非制限的なものであり、本発明はこれらの実施例によって制限して解釈されるべきではない。なお、以下の実施例において、特に記載がない限り、アミノ酸残基の立体配置はL体である。また次の略号を使用する。

Fmoc: 9-フルオレニルメトキシカルボニル基

tBoc: 第三ブトキシカルボニル基

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

Pbf: 2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル基

OtBu: 第三ブチルエーテル基

tBu: 第三ブチル基

Trt: トリチル基

HATU: 7-アザベンゾトリアゾール-1-イル-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェイド

【0021】実施例1: 次のアミノ酸配列を有するペプチドの合成

H-DEEEDDPDRSMKLSFRARAYGFRGPGQLRR-OH上記のペプチドを、ペプチド合成装置を用いて固相法に従う自動操作により以下のように行った。先ず、ペプチド合成装置(9050プラス・ペプシンセサイザー)の反応器にFmoc-L-Arg(Pbf)-ポリエチレングリコール樹脂0.72gを入れ、これに順次アミノ酸を1残基ずつ結合させて目的とするペプチド鎖を合成した。合成の1サイクルは次の操作手順よりなる。

1) DNFによる洗浄(1分間)、

2) Fmoc基の脱離(7分間)、

3) DNFによる洗浄(7分間)、

4) HATUによるFmoc-アミノ酸の活性化、

5) Fmoc-アミノ酸のカップリング(縮合)反応(60分間)、および

6) DNFによる洗浄(4分間)。

合成の際の反応器の内部は、空気による酸化を最小限にするために、窒素でパージして窒素雰囲気下に保持した。手順2)でのFmoc保護基の脱離は、DMF中の20%ピペリジン溶液中で6分間処理することにより行った。手順4)および5)については、各Fmoc-アミノ酸0.4mMの連続的カップリングをHATU0.4mMの存在下DMF中で60分間行った。その際のFmoc-アミノ酸としては、次の保護アミノ酸を使用した。Fmoc-Ala、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Met、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Asp(OtBu)、Fmoc-Gln(Trt)、Fmoc-Glu(OtBu)、Fmoc-Leu、Fmoc-Lys(tBoc)、Fmoc-Gly、Fmoc-Phe、Fmoc-Pro、Fmoc-Ser(tBu)およびFmoc-Tyr(tBu)。以上の合成により、目的の保護ペプチド樹脂1.20gを得た。合成後、保護ペプチド樹脂0.98gを、m-クレゾール0.6mL、エタンジチオール1.8mL、チオアニソール3.6mLおよびトリフルオロ酢酸24.0mLの混合物の存在下で室温で2時間処理し、その後該樹脂を濾過により除去し、次いでトリフルオロ酢酸を減圧下で留去した。蒸留物に乾燥ジエチルエーテルを加えて、ペプチドを沈殿させた。さらに0で遠心分離し、沈殿したペプチドをジエチルエーテルで洗浄した。上記の一連の操作を繰り返すことにより、粗ペプチド261mgを得た。得られた粗ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製した。カラムについてはYMC-パック-D-ODS-5(20×250mm)を使用した。また溶出は0.01N・HCl/CH₃CNの濃度比82/18から78/22への直線濃度勾配(流速:7mL/分、検出波長230nm)の条件下で行った。得られた精製ペプチドについて、分析用逆相HPLCにより純度の検定を行った。該検定の実施条件は次の通りである。

カラム: YMC-パック-D-ODS-5(4.6×250mm)

溶媒: 0.01N・HCl/CH₃CN

直線濃度勾配: 95/5から40/60への勾配

流速: 1.0mL/分

検出波長: 210nm

目的の精製ペプチドは13.8分に鋭い単一ピークとして溶出した。また該精製ペプチドのアミノ酸配列をシーケンサー(4774A型、アプライドバイオシステム社製)によって検定し、得られたペプチドが上記アミノ酸配列(I)を有することを確認した。該ペプチドを以下ペプチド(I)と呼ぶ。

【0022】実施例2: 次のアミノ酸配列を有するペプチドの合成

H-DPDRSMKLSFRARAYGFRGPGQLRR-OH

上記のペプチドを実施例1と同様に、ペプチド合成装置を用いて固相法に従う自動操作により合成した。即ち、ペプチド合成装置の反応器にFmoc-L-Arg(Pbf)-ポリエチレングリコール樹脂を入れ、これに順次アミノ酸を1残基ずつ結合させて目的とするペプチド鎖を合成した。合成サイクルの操作手順、各合成の条件および使用した保護アミノ酸は実施例1の場合と同様である。以上の合成により、目的の保護ペプチド樹脂1.30gを得た。合成後、保護ペプチド樹脂1.00gを、m-クレゾール0.6mL、エタンジチオール1.8mL、チオアニソール3.6mLおよびトリフルオロ酢酸24.0mLの混合物の存在下で室温で2時間処理し、その後該樹脂を濾過により除去し、次いでトリフルオロ酢酸を減圧下で留去した。蒸留物に乾燥ジエチルエーテルを加えて、ペプチドを沈殿させた。さらに0で遠心分離し、沈殿したペプチドをジエチルエーテルで洗浄した。上記の一連の操作を繰り返すことにより、粗ペプチド190mgを得た。得られた粗ペプチドを実施例1と同じ条件に従い逆相HPLCにより精製した。得られた精製ペプチドについて、分析用逆相HPLCにより純度の検定を行った。該検定の実施条件は実施例1に準じた。目的の精製ペプチドは14.8分に鋭い単一ピークとして溶出した。また該精製ペプチドのアミノ酸配列を実施例1と同様にして検定し、得られたペプチドが上記アミノ酸配列(II)を有することを確認した。該ペプチドを以下ペプチド(II)と呼ぶ。

【0023】実施例3: 次のアミノ酸配列を有するピオチン化ペプチドの合成

GG-DEEEDDPDRSMKLSFRARAYGFRGPGQLRR-OH

実施例1におけるペプチド(I)の合成過程で生じた保護ペプチド樹脂0.15gを出発原料として用いて、実施例1の方法および条件に従ってペプチド合成装置による自動操作により、最初にFmoc基を除去し、続いてFmoc-Gly(0.05mM)を2回連続カップリングし、その後ピオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用いてピオチン化を行った。以上の合成により、目的のピオチン化保護ペプチド樹脂0.16gを得た。合成後、ピオチン化保護ペプチド樹脂0.16gを、m-クレゾール0.15mL、エタンジチオール0.45mL、チオアニソール0.9mLおよびトリフルオロ酢酸14.0mLの混合物の存在下で室温で2時間処理し、その後該樹脂を濾過により除去し、次いでトリフルオロ酢酸を減圧下で留去した。以降、実施例1と同様な操作を行うことにより、粗ペプチド40mgを得た。得られた粗ペプチドを逆相HPLCにより精製した。カラムについてはYMC-パック-D-ODS-5(20×250mm)を使用した。また溶出は0.01N・HCl/CH₃CNの濃度比80/20から76/24への直線濃度勾配(流速:7mL/分、検出波長2

30 nm) の条件下で行った。得られた精製ペプチドについて、分析用逆相 HPLC により純度の検定を行った。該検定の実施条件は次の通りである。

カラム：YMC - パック - D - ODS - 5 (4.6 × 250 mm)

溶媒：0.01 N・HCl / CH₃CN

直線濃度勾配：95 / 5 から 40 / 60 への勾配

流速：1.0 mL / 分

検出波長：210 nm

目的の精製ペプチドは 14.4 分に鋭い単一ピークとして溶出した。また該精製ペプチドのアミノ酸配列を実施例 1 と同様に検定し、得られたペプチドが上記のアミノ酸配列を有することを確認した。該ペプチドを以下ペプチド (I I I) と呼ぶ。

【0024】実施例 4：抗血清の取得 1

実施例 1 で得られたペプチド (I) 2.0 mg を分子量 5000 のポリビニルピロリドン (PVP) の 50% 水溶液 1.5 mL に溶解し、その後フロイント完全アジュバント 1.6 mL を加え、そして該混合物をホモゲナイザーにより氷冷下で 30 分間攪拌した。得られた乳液 1.5 mL をイエウサギ (体重：2.0 ~ 2.2 kg) に皮下注射した。追加免疫を最初の注射量の 1 / 2 の投与量で 2 週間毎に繰り返すことよって行った。その後、イエウサギの血液を常法に従い全採血し、続いて該血液を 37 °C で 1 時間および 4 °C で一晩放置し、その後回転数 3000 rpm で遠心分離して血清を取得して冷凍保存した。実施例 2 で得られたペプチド (I I) を用いて、上記と同様な手順により免疫用抗原を調整し、そしてイエウサギに免疫し、その後常法に従い抗血清を取得した。

【0025】実施例 5：抗血清の取得 2

実施例 1 で得られたペプチド (I) 9.0 mg を、0.1 M 重炭酸ナトリウム水溶液中で担体：キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KHH) 1.0 mL に縮合剤：ジメチルスベルイミデート (DMS・2HCl) 5 mg の存在下で結合させた。反応混合液を透析することにより、実施例 1 で得られたペプチドと K L H の複合物 18 mg を得た。その後該複合物 3.6 mg を 50% PVP 水溶液 3.0 mL に溶解し、続いてフロイント完全アジュバント 3.6 mL を加え、そしてホモゲナイザーにより混和した。得られた乳液を 2 等分し、等分した乳化物を実施例 4 と同様に 2 匹のイエウサギ注射免疫した。その後、イエウサギの血液を常法に従い全採血し、実施例 4 と同様に血清を取得して冷凍保存した。実施例 2 で得られたペプチド (I I) を用いて、上記と同様な手順により免疫用抗原を調整し、そしてイエウサギに免疫し、その後常法に従い抗血清を取得した。

【0026】実施例 6：モノクローナル抗体の取得

1. モノクローナル抗体の作製

(動物への免疫) 実施例 1 で得られたペプチド (I) を

5 匹の健常マウス (BALB / C) に、常法に従い 3 週間毎に 3 回腹腔内投与した。その後、投与したマウスの抗体力価を測定し、抗体力価が最も高いマウスを選択して細胞融合に利用した。

(細胞融合) 無菌下において、上記で選択したマウスより脾臓を取り出し、これより抗体産生細胞としてリンパ球を常法に従い採取した。得られたリンパ球をミエローム (骨髄腫) 細胞と混合し、続いて細胞融合促進物質として 4.5% ポリエチレングリコール (PEG) を添加することにより該細胞同士を融合させた。この際の培地としては、RPMI 培地 1640 (ギブコ社製) を使用した。促進剤としては上記のものに加えて、リゾレシチン、グリセロールオレイン酸エステル等を利用することも可能である。

(スクリーニングおよびクローニング) 融合した細胞を HAT 選択培地において培養し、そして培養した細胞を ELISA 法に従ってスクリーニングして、ペプチド (I) の特異抗体を産生し得る抗体産生ハイブリドーマを選択し、続いて該ハイブリドーマのクローニングを限界希釈法に従って行った。クローンをある程度増殖させた段階で再び同様のスクリーニングを行い、スクリーニングとクローニングとを単一クローンが得られるまで同様に繰り返した。

(腹水の作製) 上記より得られた単一クローン (モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ) を大量に培養増殖し、そしてそれを予めプリスタンしたヌードマウス (BALB / C) に腹腔内投与し、その後投与したマウスから生成した腹水を採取した。

2. モノクローナル抗体の精製

得られた腹水中のモノクローナル抗体を、プロテイン A (バイオ・ラッド) アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。その際、免疫グロブリンの含有量は波長 280 nm の吸光度により算出した。

3. 抗体力価の検定

精製したモノクローナル抗体を、ELISA 法に従ってスクリーニングし、続いてペプチド (I) に対するモノクローナル抗体の力価を検定した。検定は以下の手順に従って行った。

(プレートへの注入) 濃度 0.1 μg / mL のペプチド (I) 溶液を固相化プレート：96 ウエルマイクロプレート (マスキソープ・ヌンク・イムノ・プレート (ヌンク 442404)) の各ウエルに注入し、その後該プレートを 4 °C で一晩放置した。

(第一反応) 濃度が異なる上記の精製したモノクローナル抗体溶液 0.1 mL を上記プレートの各ウエルに添加し、その後該プレートを室温で 3 時間放置して反応させた。

(第二反応) 第一反応後、西洋ワサビ過酸化酵素 (HRP) 標識抗マウス IgG (バイオ・ラッド) の 5000 倍希釈溶液を、各ウエル毎に 0.1 mL 添加し、そして

上記プレート室温で2時間放置して反応させた。
 (第三反応)第二反応後、o-フェニレンジアミン溶液を基質溶液として各ウエル毎に0.1mL添加し、続いて室温で10分間反応させて発色させた。その後、該反応を2N・H₂SO₄の添加によって停止させて、そして速やかにマイクロプレート光度計を用いて各ウエルの吸光度測定を行った。上記のごとくモノクローナル抗体の力価を検定した結果、得られた抗体濃度と吸光度とのグラフには良好な直線性が認められ、また上記モノクローナル抗体はペプチド(I)に対する高い結合活性を有することが確認された。

【0027】実施例7：標識抗原の作製

実施例1で得られたペプチド(I)を、ハンターおよびグリーンウッドが考案したクロラミンT法(ハンターおよびグリーンウッド、Nature、194、495~496頁(1962))に従って¹²⁵I化した。¹²⁵I化は以下の手順に従って行った。実施例1で合成したペプチド(I)2.6μgを0.01N・HCl溶液2.5μLに溶解し、そして該溶液に1Mリン酸緩衝液(pH7.3)40μL、¹²⁵I Na溶液(200μCi、アマシャム社製)1μLおよび精製水20μLに溶解したクロラミンT・10μgの溶液を連続的に添加した。続いて該混合物を20秒間振盪し、そして精製水20μLに溶解したメタ重亜硫酸ナトリウム20μgおよび10%ヨウ素カリウム10μL溶液を添加して反応を停止させた。その後、該混合物を0.1%ウシ血清アルブミンを含む1M酢酸を溶離液とするプレパックしたカラム(NAP-10、ファルマシア・バイオテック社製)で精製した。

【0028】実施例8：ラジオイムノアッセイ(RIA)1

実施例4で得られたペプチド(I)に対する抗血清を用いてラジオイムノアッセイを行い、試料中のウマCgA濃度を測定した。該ラジオイムノアッセイでは、希釈剤として、ウシ血清アルブミン(0.5%W/V)、0.025Mエチレンジアミンテトラアセテート(EDTA)および0.14M・NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.4)を、並びに標準品として、実施例1で合成したペプチド(I)を使用した。希釈剤0.4mL、ウマCgA含有試料(または標準品)0.1mL、最終的に8500倍に希釈した実施例4で得られたペプチド(I)に対する抗血清0.1mLおよび標識抗原(5000~10000cpm)0.1mLを培養チューブ中で混合した。培養チューブとしてはハウ素シリコン化ガラスチューブ(チェース・インストルメント社製)を使用した。得られた混合物を4で48時間培養し、その後希釈正常ウサギ血清(1:50、第一ラジオアイソトープ研究所社製)0.05mL、希釈ヤギ抗ウサギIgG血清(1:10、第一ラジオアイソトープ研究所社製)0.05mLおよび10%(W/V)ポリエ

チレングリコール6000(分子量7500)0.5mLを添加した。得られた混合物をさらに3時間培養し、その後4で30分間遠心分離(回転数3000rpm)した。遠心分離後、該混合物から上澄液を採取し、上澄液の放射線量をガンマー計数管を用いて測定した。上記の測定を濃度が異なるいくつかの標準品について行い、各標準品についての放射線量の測定値から検量線を作成した。そしてウマCgA含有試料についての放射線量を測定し、測定値から該検量線に基づいて試料中のウマCgA濃度を決定した。その結果、試料中のウマCgA濃度は、ラジオイムノアッセイを用いて本発明の測定方法により非常に高感度で測定することができた。

【0029】実施例9：ラジオイムノアッセイ(RIA)2

実施例4で得られたペプチド(II)に対する抗血清を用いたことを除いて、実施例8と同様な方法でラジオイムノアッセイを行い、試料中のウマCgA濃度を測定した。その結果、試料中のウマCgA濃度は、実施例4で得られたペプチド(I)に対する抗血清を用いた場合と同様に、本実施例のラジオイムノアッセイによっても非常に高感度で測定することができた。

【0030】実施例10：酵素イムノメトリックアッセイ(ELISA)

実施例4で得られたペプチド(I)に対する抗血清を用いて酵素イムノメトリックアッセイを行い、試料中のウマCgA濃度を測定した。該酵素イムノメトリックアッセイでは、ヤギ抗ウサギIgGを固定化した96ウエルマイクロプレートをも、また標準品として、実施例1で合成したペプチド(I)を7種の異なる濃度に調製したものを使用した。測定を行う試料としてはウマの唾液およびウマの血漿を用い、唾液および血漿の各々について希釈無し(1倍希釈)、3倍希釈および9倍希釈の希釈列試料を調製して測定を行った。まず、該プレートの各々のウエルを0.9%NaClおよび0.05%トウイン20を含む洗浄液により良く洗浄し、続いて0.4%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液(pH7.4)300μLを各ウエル毎にそれぞれ注入した。その後、該プレートを密封し、そして室温で2時間保存した。保存終了後、各ウエル中の液体を流去させ、そして上記洗浄液を用いて3回洗浄をした。次に、各ウエルに0.025M・EDTAと0.5%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液50μLを注入し、続いて測定すべきウマCgA含有試料(または標準品)10μLおよび実施例4で得られたペプチド(I)に対する抗血清の溶液を添加した。加えて、実施例3で合成したピオチン化ペプチド(III)の溶液50μLおよび実施例4で得られたペプチド(I)に対する抗血清の溶液100μLをウエル毎に添加した。添加後、該プレートを密封し、プレート振盪器を用いてゆっくりと振盪しながら室温で16~20時間反応させた。反応終了後、各ウエル中の液体

を流去させ、そして上記洗浄液を用いて3回洗浄した。その後、各ウエルに0.1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液(pH7.4)中に溶解させたストレプトゾシン-西洋ワサビ過酸化酵素(HRP)の溶液100μLを注入した。注入後、該プレートを密封し、室温で2時間振盪して反応させた。反応終了後、各ウエル中の液体を流去させ、そして上記洗浄液を用いて洗浄した。続いて、0-フェニレンジアミン(1mg/mL)含有0.015%過酸化水素を含む0.1Mリン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液(pH7.4)中に溶解させた酵素

10 基質の溶液100μLを各ウエルに添加した。添加後、該プレートを密封し、室温で30分間ゆっくりと振盪して反応させた。反応終了後、酵素反応停止液として2N・H₂SO₄100μLを添加した。以上のように反応させた該プレートの各ウエルについて、マイクロプレート吸光度計を用いて波長492nmの吸光度を測定した。先ず、各標準品について測定を行い、測定された吸光度から検量線を作成した。そしてウマCgA含有試料についての吸光度を測定し、測定値から該検量線に基づいて試料中のウマCgA濃度を決定した。結果を図3に図示

20 する。図3のグラフにおいて縦軸は492nmでの吸光度であり、また横軸はウマCgAの濃度である。そして黒丸は標準品についての測定結果を示し、また黒三角はウマの唾液、そして白丸はウマの血漿についての測定結果を示す。グラフから明らかなように標準品によって作成した検量線は略直線であり、酵素イムノメトリックア*

*ッセイにおける吸光度とウマCgA濃度との間には高い相関性が見られる。またこのことは、ウマの唾液およびウマの血漿の希釈列試料についての測定結果からも確認することができる。また本発明の測定・検出方法は、0.10pモル/mL以下のような低濃度に至るまで非常に高感度で測定することができることがわかる。

【0031】

【発明の効果】本発明の抗原を使用することにより、ウマCgAおよびその関連物質に特異的な反応性を有する抗体を産生することが可能となる。そして、該抗体を使用する本発明の測定および/または検出方法に従うと、ウマCgAおよびその関連物質をイムノアッセイにより非常に高感度に測定・検出することが可能となり、その結果、ウマ中で分泌されるウマCgAの濃度測定によるウマのストレス指数の決定に道が開かれる。また本発明の抗体は、ウマCgAの濃度測定についての利用のみならず、刺激-分泌機構の解明等の研究に有用な試薬としても役立つことが期待される。

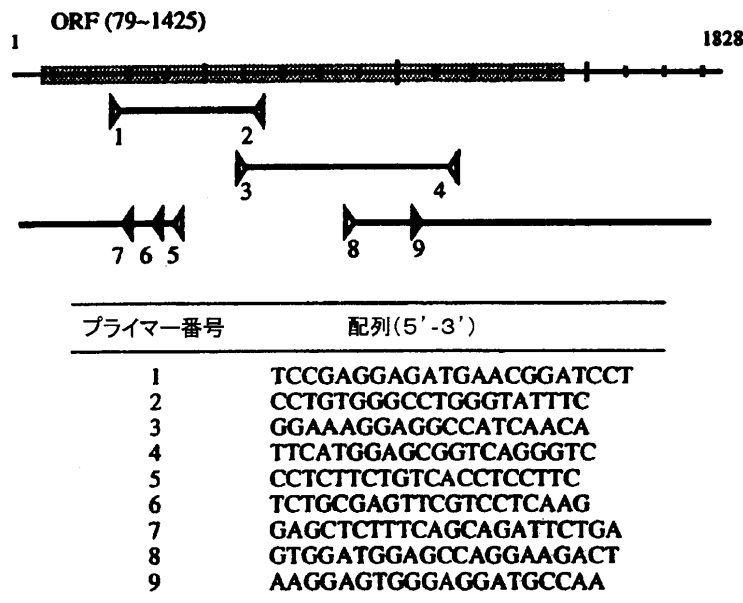
【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ウマCgAのcDNAの配列決定のために使用したプライマーを表す模式図である。

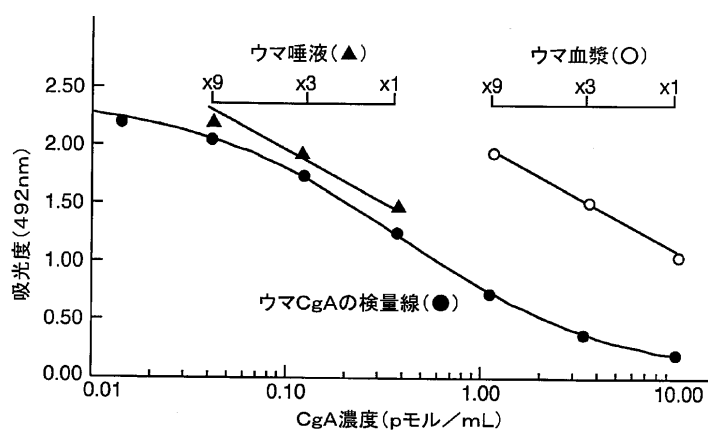
【図2】 図2は、ウマCgAアミノ酸配列を他の動物のCgAアミノ酸配列と比較した図である。

【図3】 図3は、本発明の酵素イムノメトリックアッセイの測定結果について、縦軸を492nmでの吸光度としかつ横軸をウマCgAの濃度としたグラフである。

【図1】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 加藤 郁夫
 静岡県富士宮市栗倉2480番地の1 株式会
 社矢内原研究所内

(72)発明者 長澤 晋吾
 静岡県富士宮市栗倉2480番地の1 株式会
 社矢内原研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 CA04 GA03 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA18 CA40
 DA75 DA76 DA86 EA50 FA34
 FA58 FA59 FA72 GA25 HA03
 HA05

专利名称(译)	抗原，抗体和使用其的测量方法		
公开(公告)号	JP2002088100A	公开(公告)日	2002-03-27
申请号	JP2000279724	申请日	2000-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社 矢内原研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社 矢内原研究所		
[标]发明人	矢内原 昇 菅野 富夫 加藤 郁夫 長澤 晋吾		
发明人	矢内原 昇 菅野 富夫 加藤 郁夫 長澤 晋吾		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA58 4H045/FA59 4H045/FA72 4H045/GA25 4H045/HA03 4H045/HA05		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种测量和检测马CgA的方法，以及用于该方法的抗原和抗体。氨基酸序列：DEEEDDPDRSMKLSFRARAYGFRGPGQLRR肽，或由氨基酸序列组成的肽，其中氨基酸序列中缺失，取代或添加了一个至几个氨基酸，并且具有与该氨基酸序列的肽相同的抗原活性 与马嗜铬粒蛋白A具有特异性反应性的抗原，该抗原是通过用抗原免疫温血动物而获得的；马嗜铬粒蛋白A和使用该抗体的免疫测定。一种专门测量和/或检测相关物质的方法。

【图1】

