

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6482237号
(P6482237)

(45) 発行日 平成31年3月13日(2019.3.13)

(24) 登録日 平成31年2月22日(2019.2.22)

(51) Int.Cl. F I
C O 7 K 16/16 (2006.01) C O 7 K 16/16
C O 7 K 16/02 (2006.01) C O 7 K 16/02
A 2 3 G 4/00 (2006.01) A 2 3 G 4/00
A 2 4 B 15/20 (2006.01) A 2 4 B 15/20
A 2 4 D 3/14 (2006.01) A 2 4 D 3/14

請求項の数 8 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-223550 (P2014-223550)
 (22) 出願日 平成26年10月31日(2014.10.31)
 (65) 公開番号 特開2016-88873 (P2016-88873A)
 (43) 公開日 平成28年5月23日(2016.5.23)
 審査請求日 平成29年10月2日(2017.10.2)

(73) 特許権者 508198535
 オーストリッチファーマ株式会社
 京都府相楽郡精華町光台1丁目7 けいは
 んなプラザ・ラボ棟410
 (74) 代理人 100118924
 弁理士 廣幸 正樹
 (72) 発明者 塚本 康浩
 大阪府高槻市真上町4丁目1番27号
 審査官 坂崎 恵美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タバコ抽出液に対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

タバコ抽出液を抗原として雌ダチョウに免疫し、前記雌ダチョウが産卵した卵の卵黄から得た卵黄抗体であって、

ニコチン、ベンゾピレン、メチルエチルニトロソアミンおよびタールに結合する卵黄抗体。

【請求項2】

請求項1の抗体を有するタバコフィルター。

【請求項3】

請求項1の抗体を有するマスク。

【請求項4】

請求項1の抗体を用いた検査キット。

【請求項5】

請求項1の抗体を用いた飲み薬。

【請求項6】

請求項1の抗体を用いた注射薬。

【請求項7】

請求項1の抗体を用いたガム。

【請求項8】

請求項1の抗体を用いた歯磨剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

タバコ抽出液に含まれるニコチン、ベンゾピレン、メチルエチルニトロソアミン、タールを含むタバコ抽出液に含まれる低分子化合物に結合する抗体とその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

タバコおよびタバコの煙には多くの化学物質が含まれており、発ガン性物質とされるものもあるとされている。これらの化学物質は、分子量が小さい。そのため、喫煙によって血中に移行すると、脳の血液脳関門 (Blood - Brain Barrier) を通過し、神経細胞にさまざまな生理活性作用を与える。これがさまざまな中毒に発展する。

10

【0003】

このようなタバコ中の化学物質を検知し、無力化しようとする提案はすでにされている。特許文献1には、アフラトキシン、ベンゾピレンと特異的に結合するモノクロナール抗体で、これらのトキシンを無力化することが開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特表2003-516723号公報

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

タバコに含まれる化学物質は、分子量が小さいために血液脳関門を通過する。しかし、これらの化学物質により大きな分子量の物が結合すれば、血液脳関門を通過できず、化学物質の影響を抑制することが可能になる。

【0006】

ここで、タバコの化学物質に結合するものとして抗体は非常に効果的であると考えられる。しかし、特許文献1に開示されているようなモノクロナール抗体では、タバコに含まれる多くの化学物質を対象とすることは難しい。また、モノクロナール抗体を大量に作製するには大規模な設備が必要となる。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は上記の課題に鑑みて想到されたもので、タバコに含まれる複数の化学物質に結合するタバコ抗体を提供する。

【0008】

より具体的に本発明に係るタバコ抗体は、タバコ抽出液を抗原として雌ダチョウに免疫し、前記雌ダチョウが産卵した卵の卵黄から得た卵黄抗体であって、ニコチン、ベンゾピレン、メチルエチルニトロソアミンおよびタールに結合することを特徴とする。

【発明の効果】

【0009】

40

本発明に係るタバコ抗体の製造方法は、タバコ抽出液を抗原としてダチョウを含む雌性鳥類に免疫し、産卵された卵の卵黄から抗体 (IgY) を得る。したがって、均質で大量の抗体を得ることができる。また、得られた抗体はポリクロナール抗体であって、タバコ抽出液中の複数の化学物質に結合することができる。

【0010】

したがって、タバコ中の化学物質を検知し、取り去ることができる。また後述するように本発明に係るタバコ抗体が結合した化学物質は、血液脳関門の通過を抑制されるので、タバコの脳への影響を抑制することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

50

【図1】免疫前ダチョウ抗体と抗タバコダチョウ抗体が結合したニコチンの血液脳関門の通過量を測定したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下本発明に係る抗体について説明する。なお、以下の説明は本発明の一実施形態を示すものであり、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、以下の実施形態および実施例は変更されてもよい。

【0013】

本発明はタバコの抽出液を抗原として用いる。この抽出液中には、多くの化学物質が含まれている。したがって、この抗原から得られる抗体は、複数の化学物質に対して結合することができると考えられる。ここでは、ニコチン、ベンゾピレン、メチルエチルニトロソアミン、タールについて効果が確認された。

10

【0014】

ニコチンは、タバコの依存性を高めるものとして知られている。これはタバコの煙中にも残存し、副流による受動喫煙によっても体内に取り込まれる。また、タールは、PM2.5と呼ばれるエアロゾル中にも含まれる。PM2.5は、空気中に浮遊する粒子（エアロゾル）の中で大きさが2.5 μm以下のものを指す。

【0015】

ベンゾピレンは5つのベンゼン環が結合した多環芳香族炭化水素で、発癌性があると言われている。メチルエチルニトロソアミンも発癌性があると言われている。

20

【0016】

雌性鳥類に対して免疫する工程では、公知の方法を利用することができる。免疫の際は、抗原とともに各種アジュバンドを利用することができる。また、免疫も初回免疫の後、追加免疫してもよい。

【0017】

利用できる鳥類としては、ウズラ、ニワトリ、ダチョウ等が利用できる。特に、体の大きなダチョウが好適に利用できる。タバコの抽出液は、基本的に毒性を有するので、体型の小さな鳥類は、免疫した際に死亡する場合もあるからである。

【0018】

免疫後の鳥類から得られた卵から抗体(IgY)を回収する工程では、公知の方法で抗体を回収することができる。回収された抗体は、タバコの抽出液中の化学物質に結合する。この結合によってタバコ中の化学物質を検知し、捕獲することができる。また、タバコ抗体が結合した化学物質は血液脳関門の通過が抑制される。したがって、これらの化学物質の脳への生理活性を抑制することができる。

30

【0019】

得られたタバコ抗体は、タバコのフィルタ、飲み薬、注射薬、ガムや歯磨剤に混入させることができる。また、タバコの葉自体に混入させておいてもよい。タバコ抗体は、いわゆるフィルタ付き巻きタバコのフィルタに含ませておくことで、喫煙時に体内に流れる煙中の化学物質を捕獲することができる。

【0020】

また、飲み薬や注射薬にすることで、体内に取り込まれたタバコの化学物質が脳内の神経細胞に作用することを抑制することができる。また、ガムや歯磨剤に混入させることで、喫煙後に口腔内に残留した化学物質に結合し、これらの物質が脳内の神経細胞に作用することを抑制する。

40

【0021】

さらに、タバコの葉自体に混入させると、フィルタ無し（いわゆる両切りタバコ）を喫煙する場合であっても、化学物質の体内への取り込みを抑制することができる。

【実施例】

【0022】

<抗原>

50

市販のフィルタ無しタバコの1本から、タバコの葉のみを取り出し、1 mLのPBSで十分にホモジネートし、40,000 RPMで30分遠心分離後、上澄みを回収した。得られた液をタバコ抽出液とした。

【0023】

<抗体の製造方法>

成熟したメス鳥（ダチョウ、ニワトリ、ウズラ）を用いた。タバコ抽出液（原液）0.2 mLをそれぞれフロイントの完全アジュバント0.2 mLと混和し、ダチョウ、ニワトリ、ウズラに初回免疫した。各抗原を個別に5羽のダチョウ、5羽のニワトリ、5羽のウズラに接種した。したがって、ダチョウもニワトリもウズラも同量の抗原を接種したことになる。初回免疫後、2週目と4週目に0.2 mLの各抗原とフロイントの不完全アジュバントの混和液を、各鳥に追加免疫した。ダチョウは全羽生存したが、鶏は途中で4羽死亡、ウズラも4羽死亡した。

10

【0024】

初回免疫後8週目に得られた各鳥からの卵の卵黄より卵黄抗体（IgY）を精製した。得られた卵黄抗体の反応性をELISAにより検証した。具体的には、まず、得られた卵の卵黄に5倍量のTBS（20 mMのTris-HCl、0.15 MのNaCl、0.5% NaN₃）と同量の10%デキストラン硫酸/TBSを加え20分攪拌した。

【0025】

次に1 MのCaCl₂/TBSを卵黄と同量加え攪拌し、12時間静置した。その後、15000 rpmで20分遠心し上清を回収した。そして、最終濃度が40%になるように硫酸アンモニウムを加え4で12時間静置した。

20

【0026】

12時間の静置後、15000 rpmで20分遠心し、沈殿物を回収した。最後に、卵黄と同量のTBSに再懸濁し、TBSにて透析した。以上の方法で、各卵から純度90%の抗体（IgY）が回収できた。

【0027】

<ELISA法>

各卵黄から得られたタバコ抗体のタバコの化学物質に対する反応性はELISAにより検証した。具体的には、まず96穴ELISAプレートの各穴にニコチン、ベンゾピレン、メチルエチルニトロソアミン、タールをそれぞれ別々に5 µgを固層化した（室温で4時間）。

30

【0028】

その後、ダチョウ抗体（各5羽のダチョウ）、ニワトリ抗体（生存した1羽のニワトリ）、ウズラ抗体（生存した1羽のウズラ）の段階希釈液（原液は2 mg/mL）を各穴に滴下し、室温で1時間反応させた。洗浄後、各抗体に対するHRP標識2次抗体を室温で1時間反応させた。十分な洗浄後、ペルオキシダーゼ用発色キット（S-Bio SUMILON）を用いてプレートリーダーにて吸光度（450 nm）を測定した。免疫前の各鳥種の卵黄抗体の2倍以上の吸光度値を示す最大希釈倍率をELISA値として示した。結果を表1に示す。

【0029】

40

【表1】

抗原	各鳥類から作製した卵黄抗体のELISA値		
	ダチョウ	ニワトリ	ウズラ
ニコチン	809,600	253	127
ベンゾ(a)ピレン	404,800	253	127
メチルエチルニトロソアミン	202,400	253	127
タール	404,800	506	127

【0030】

50

ダチョウ、ニワトリ、ウズラにおいて、ニコチン、ベンゾピレン、メチルエチルニトロソアミンに対する卵黄抗体が作製されることが判明した。特に、各鳥種類には同量の抗原を免疫したにもかかわらず、巨大なダチョウが最も反応性が高い抗体が産生されていた。これは、ダチョウを使うことで、少量の抗原でも高感度の抗体が産生できることを示している。

【0031】

次に、タバコ抽出液を免疫して作製したダチョウ抗体（抗タバコダチョウ抗体）を用いて、ニコチンの脳内拡散防止の効果について確認した。

【0032】

血液脳関門の *in vitro* モデルとしては、ファーマコセル社製 BBB キット（以下単に「BBB キット」と呼ぶ。）を用いた。

【0033】

まず、BBB キットの *well* 上層部にニコチン（最終濃度 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と免疫前ダチョウ抗体（最終濃度 $1 \text{mg}/\text{mL}$ ）を 37°C 1 時間反応させたものを添加した。2 日後に *well* の下部チャンバー（下層）に透過したニコチン量を液クロマトグラフィーにて測定した。免疫前ダチョウ抗体とは、タバコ抽出液を免疫する前のダチョウが産卵した卵の卵黄から上記に示した方法で得た抗体（IgY）である。

【0034】

一方で、ニコチン $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ に抗タバコダチョウ抗体（最終濃度 $1 \text{mg}/\text{mL}$ ）を 1 時間 37°C 反応させたものも別 *well* に添加し、同様に下層に透過したニコチン量を測定した。結果を図 1 に示す。図 1 は、横軸に免疫前ダチョウ抗体と抗タバコダチョウ抗体を示す。また縦軸は、BBB キットによるニコチン透過量（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示す。図 1 を参照して、抗タバコダチョウ抗体はニコチンの脳血管関門の通過を抑制することが判明した。このことは、ニコチンの脳内拡散を防止することが可能であることを示す。

【産業上の利用可能性】

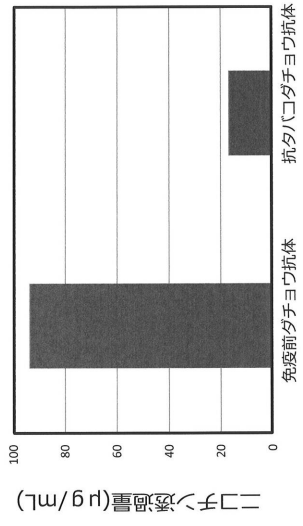
【0035】

本発明に係る抗タバコダチョウ抗体は、検査キットを始め、タバコのフィルタ、飲み薬、注射薬、ガムや歯磨きとともに利用することができる。

10

20

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	25/34	(2006.01)	A 6 1 P	25/34	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
G 0 1 N	33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/531	A

(56)参考文献 特開2011-020927(JP,A)
 特開2010-013361(JP,A)
 国際公開第2013/130393(WO,A1)
 特表2011-504893(JP,A)
 Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2001年, Vol.68, No.1, p.87-92
 Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2009年, Vol.93, No.2, p.105-111
 Drug Metabolism and Disposition, 2005年, Vol.33, No.7, p.1056-1061

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 / 1 6
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 G 0 1 N 3 3 / 5 3 1
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	抗烟草提取物的抗体		
公开(公告)号	JP6482237B2	公开(公告)日	2019-03-13
申请号	JP2014223550	申请日	2014-10-31
申请(专利权)人(译)	鸵鸟制药社		
当前申请(专利权)人(译)	鸵鸟制药社		
[标]发明人	塚本康浩		
发明人	塚本 康浩		
IPC分类号	C07K16/16 C07K16/02 A23G4/00 A24B15/20 A24D3/14 A61P25/34 A61K39/395 G01N33/531		
FI分类号	C07K16/16 C07K16/02 A23G4/00 A24B15/20 A24D3/14 A61P25/34 A61K39/395.D G01N33/531.A A23G3/30 A23G4/06 A23L1/30.A A23L33/10		
F-TERM分类号	4B014/GB13 4B014/GK12 4B014/GL08 4B018/LB10 4B018/MD20 4B018/ME08 4B018/MF01 4B043/BC06 4B043/BC25 4B043/BC39 4B045/BB10 4C085/AA13 4C085/CC26 4C085/DD88 4C085/FF01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/CA30 4H045/DA75 4H045/EA01 4H045/EA20 4H045/FA71		
代理人(译)	广幸 正树		
其他公开文献	JP2016088873A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

烟草中含有的化学物质因其分子量小而穿过血脑屏障。但是，如果大分子量物质与这些化学物质结合，则它们不能通过血脑屏障，并且可以抑制化学物质的影响。本发明提供了一种生产烟草抗体的方法，包括步骤：用烟草提取物作为抗原免疫雌鸟；和从雌鸟放置的卵的蛋黄中获得抗体。到。根据本发明产生的抗烟草鸵鸟抗体结合有害化学物质并抑制化学物质通过血脑屏障，从而减轻烟草依赖。[选图]图1

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6482237号 (P6482237)
(45) 発行日 平成31年3月13日(2019.3.13)	(24) 登録日 平成31年2月22日(2019.2.22)	
(51) Int. Cl. F 1		
C 0 7 K 1 6 / 1 6 (2006.01)	C 0 7 K 1 6 / 1 6	
C 0 7 K 1 6 / 0 2 (2006.01)	C 0 7 K 1 6 / 0 2	
A 2 3 G 4 / 0 0 (2006.01)	A 2 3 G 4 / 0 0	
A 2 4 B 1 5 / 2 0 (2006.01)	A 2 4 B 1 5 / 2 0	
A 2 4 D 3 / 1 4 (2006.01)	A 2 4 D 3 / 1 4	
請求項の数 8 (全 7 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-223550(P2014-223550)	(73) 特許権者 508198535	
(22) 出願日 平成28年10月31日(2014.10.31)	オーストリッチファーマ株式会社	
(65) 公開番号 特開2016-88873(P2016-88873A)	京都府相楽郡精華町光台1丁目7 けいはんなプラザ・ラボ棟410	
(43) 公開日 平成28年5月23日(2016.5.23)	100118924	
審査請求日 平成29年10月2日(2017.10.2)	(74) 代理人 弁理士 廣幸 正樹	
	(72) 発明者 塚本 康浩	
	大阪府高槻市真上町4丁目1番27号	
	審査官 坂崎 恵美子	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 タバコ抽出液に対する抗体		