

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/140063

発行日 平成29年12月14日 (2017.12.14)

(43) 国際公開日 平成28年9月9日 (2016.9.9)

(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 B	4 B 0 2 9
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	4 H 0 4 5
CO 7 K 7/16 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	CO 7 K 7/16 Z N A	
	C 1 2 M 1/34 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)		

出願番号 特願2017-503405 (P2017-503405)	(71) 出願人 000120456 栄研化学株式会社 東京都台東区台東4丁目19番9号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/054529	
(22) 国際出願日 平成28年2月17日 (2016.2.17)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-42163 (P2015-42163)	(74) 代理人 110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(32) 優先日 平成27年3月4日 (2015.3.4)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 荒川 秀俊 神奈川県横浜市金沢区長浜1丁目10番4号
	(72) 発明者 大熊 博 栃木県下都賀郡野木町野木 143 栄研 化学株式会社野木事業所内
	Fターム(参考) 4B029 AA07 BB15 CC02 CC08 FA12 4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 BA41 BA50 CA40 DA34 EA50 FA50
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オキシトシンの高感度測定法

(57) 【要約】

【課題】新規の標識されたオキシトシン(Oxytocin) / バソプレシン(Vasopressin)ファミリーペプチド及びその標識されたペプチドを用いた免疫測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、標識されたオキシトシン / バソプレシンファミリーペプチド；該標識ペプチドを用いた試料内オキシトシン / バソプレシンファミリーペプチドを検出する方法；並びにこれらに用いるキットに関する。

本発明の標識されたオキシトシン / バソプレシンファミリーペプチドを用いれば、試料内オキシトシン / バソプレシンファミリーペプチドを特異的に測定することが可能であり、自閉症などの診断や臨床検査の分野において極めて有効である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(X a a) n - (配列番号 1 又は 2)

で表されるオキシトシン又はバソプレシンの N 末端にアミノ酸残基が結合した修飾ペプチドの N 末端に標識が結合した標識体

[ここで、 X a a は任意のアミノ酸を示し、 n は 1 , 2 , 3 , 4 又は 5 の整数を表し、修飾ペプチドの C 末端はアミド化されている]。

【請求項 2】

X a a が L y s であることを特徴とする請求項 1 に記載の標識体。

【請求項 3】

修飾ペプチドが配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 で表される請求項 1 又は 2 に記載の標識体。

【請求項 4】

標識がビオチンである請求項 1 から 3 のいずれかに記載の標識体。

【請求項 5】

標識が酵素である請求項 1 から 3 のいずれかに記載の標識体。

【請求項 6】

前記修飾ペプチドの N 末端にビオチンが結合しており、前記酵素がアビジン又はストレプトアビジンと結合しており、ビオチン - (ストレプト) アビジン結合を介して、酵素が修飾ペプチドに結合している、請求項 5 に記載の標識体。

【請求項 7】

前記酵素が、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、イクオリン、またはルシフェラーゼである請求項 5 又は 6 のいずれかに記載の標識体。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の標識体を用いて、免疫測定法により検体中のオキシトシンまたはバソプレシンを検出する方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の検出方法に用いるためのキットであって、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の標識体を構成成分として含む検体中のオキシトシンまたはバソプレシンの測定キット。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) 請求項 1 から 7 のいずれかに記載の標識体；

(2) 抗オキシトシン抗体、または抗バソプレシン抗体

を構成成分として含むキット；

【請求項 11】

抗オキシトシン抗体、または抗バソプレシン抗体が固相支持体に固相化されている、請求項 10 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標識されたオキシトシン (Oxytocin : 以下、 O X T と略) / バソプレシン (Vasopressin : 以下、 V P と略) ファミリーペプチド；該標識ペプチドを用いた試料内 O X T / V P を検出する方法；並びにこれらに用いるキットに関する。

本発明の標識された O X T / V P ファミリーペプチドを用いれば、試料内 O X T / V P ファミリーペプチドを特異的に測定することが可能であり、自閉症などの診断や臨床検査の分野において極めて有効である。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

OXTとVPはペプチド性の下垂体後葉ホルモンである。OXTは子宮収縮活性因子として、VPは血圧上昇因子として同定された。

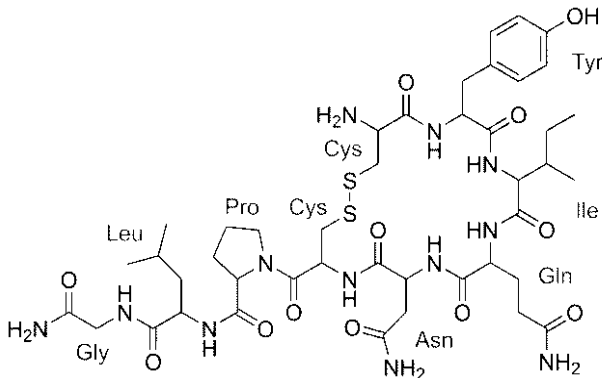
共に9アミノ酸残基よりなる。その構造は極めて似ており、進化的にも極めてよく保存され、脊椎動物だけでなく、新口無脊椎動物（ウニやナメクジウオ）や旧口動物（タコやミジンコ）にも、OXT/VP類似のペプチドホルモンが存在する。

【0003】

OXTの一次構造はCys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-CONH₂（配列番号：1）であり（末端Glyのカルボニル基はアミド化している）、Cyt₁とCyt₆がS-S結合（ジスルフィド結合）により結合し、以下の2次構造を有している。かかる構造はホルモンとして機能する上で必須である（非特許文献1及び2）。

10

【化1】



20

【0004】

一方、VPの一次構造はCys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-CONH₂（配列番号：2）であり（末端Glyのカルボニル基はアミド化している）、OXT同様、Cyt₁とCyt₆がS-S結合（ジスルフィド結合）により結合している。このCyt₁とCyt₆とのS-S結合（ジスルフィド結合）は種を超えて保存され、上記新口無脊椎動物や旧口動物のOXT/VP類似のペプチドホルモンにも保存されている。

【0005】

OXT/VPファミリーペプチドは生体内で極めて重要な意味を持ち、とりわけ様々な病態との関連性が示唆されている。

30

VPは、血圧上昇作用以外に利尿を妨げる働きをする。

OXTは、末梢組織では主に平滑筋の収縮に関与し、分娩時に子宮収縮させる。また乳腺の筋線維を収縮させて乳汁分泌を促すなどの働きを持つ。このため臨床では子宮収縮薬や陣痛促進剤をはじめとして、さまざまな医学的場面で使用されている。また、視床下部の室傍核（PVN）や視索上核（SON）にあるニューロンから分泌され、下垂体後葉をはじめ様々な脳の部位に作用し機能を調節している。OXTは良好な対人関係が築かれているときに分泌され、闘争欲や遁走欲、恐怖心を減少させる。

【0006】

さらに最近、自閉症スペクトラム（Autistic spectrum disorder：ASD）とOXTとの関連性を示唆する報告がなされ（特許文献1及び非特許文献3～6）、今まで以上に高感度の定量アッセイ系の開発が必要となっている。検出方法としてはその簡便さから、競合イムノアッセイ法（competitive immunoassay method）がよく用いられているものの、放射性同位体元素を用いたRIA（ラジオイムノアッセイ）以外において、その分子量の小ささ及びその2次構造の安定性を考慮し、非特異的な標識方法で標識された標識体を用いることが多かった（特許文献2及び非特許文献7）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許第4905901号公報

50

【特許文献2】特開昭59-211861号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】臨床検査47巻8号p861-870

【非特許文献2】Conformation of oxytocin studied by laser raman spectroscopy. Anthony T.Tu, Jon B.Bjarnason & Victor J.Hruby, Biochim Biophys Acta Vol.533, No.2, p530-533 1978

【非特許文献3】Oxytocin increases trust in humans. Michael Kosfeld, Markus Heinrichs, Paul J.Zak, Urs Fischbacher & Ernst Fehr, Nature 435,673-676, 2 June 2005

【非特許文献4】Neuropsychopharmacology 2003.1.28

10

【非特許文献5】Plasma oxytocin levels in autistic children. Charlotte Modahl, Lee Anne Green, Deborah Fein, Mariana Morris, Lynn Waterhouse, Carl Feinstein & Harriet Levin, Biol Psychiatry, Vol.43, No.4, p270-277, 15 Feb 1998

【非特許文献6】Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. Eric Hollander, Sherie Novotny, Margaret Hanratty, Rona Yaffe, Concetta M DeCaria, Bonnie R Aronowitz & Serge Mosovich, Neuropsychopharmacology, 28,p193-198, 2003

【非特許文献7】Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin. Angela Szeto, Philip M.McCabe, Daniel A.Nation, Benjamin A.Tabak, Maria A.Rossetti, Michael E.McCullough, Neil Schneiderman & Armando J.Mendez, Psychosom Med.,Vol.75,No.5,p393-400,Jun 2011

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

かかる問題に鑑み、本発明は、標識されたOXT/V Pファミリーペプチド；該標識ペプチドを用いた試料内OXT/V Pファミリーペプチドを検出する方法；該標識ペプチドを用いたOXT/V Pファミリーペプチドの新規アナログ分子（アゴニスト・アンタゴニスト）探索；並びにこれらに用いるキットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

30

上記課題を解決するため、本願発明者らは、試行錯誤の末、あえてOXT/V Pの1次構造だけでなく、その高次構造を壊す可能性を度外視し、OXT/V PファミリーペプチドのN端のCysのさらに5'端にアミノ酸であるLysをリンカーとして結合させた。その結果、驚くべきことに、そのLysの先に標識を結合させても、上記[化1]で示される天然の高次構造（S-S結合を含む）を維持でき、かつその標識体を競合イムノアッセイ法（competitive immunoassay method）に用いた場合、極めて検出感度の高い測定系となることを新たに発見し、本願発明を完成するにいたしました。

【0011】

即ち、本発明の構成は以下の[1]から[14]の通りである。

[1] (Xaa)_n-（配列番号1又は2）

40

で表されるOXT又はVPのN末端にアミノ酸残基が結合した修飾ペプチドのN末端に標識が結合した標識体

[ここで、Xaaは任意のアミノ酸を示し、nは1, 2, 3, 4又は5の整数を表し、修飾ペプチドのC末端はアミド化されている]。

[2] XaaがLysであることを特徴とする[1]に記載の標識体。

[3] 修飾ペプチドが配列番号3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11又は12で表される[1]又は[2]に記載の標識体。

[4] 標識がビオチンである[1]から[3]のいずれかに記載の標識体。

[5] 標識が酵素である[1]から[3]のいずれかに記載の標識体。

[6] 前記修飾ペプチドのN末端にビオチンが結合しており、前記酵素がアビジン又は

50

ストレプトアビジンと結合しており、ビオチン - (ストレプト)アビジン結合を介して、酵素が修飾ペプチドに結合している、[5]に記載の標識体。

[7] 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、イクオリン、またはルシフェラーゼである [5] 又は [6] のいずれかに記載の標識体。

【 0 0 1 2 】

[8] [1] から [7] のいずれかに記載の標識体を用いて、免疫測定法により検体中の O X T または V P を検出する方法。

【 0 0 1 3 】

[9] [8] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、[1] から [7] のいずれかに記載の標識体を構成成分として含む検体中の O X T または V P の測定キット。

10

[1 0] [8] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) [1] から [7] のいずれかに記載の標識体；

(2) 抗 O X T 抗体、または抗 V P 抗体

を構成成分として含むキット。

[1 1] 抗 O X T 抗体、または抗 V P 抗体が固相支持体に固相化されている、[1 0] に記載のキット。

【 0 0 1 4 】

[1 2] 免疫測定法が競合 E L I S A 法である、[8] に記載の方法；

[1 3] 免疫測定法が生物発光酵素免疫測定法である、[8] に記載の方法。

【 0 0 1 5 】

20

[1 4] [1 2] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) [1] から [7] のいずれかに記載の標識体；

(2) 固相支持体；および

(3) 抗 O X T / 抗 V P 抗体を構成成分として含むキット；

[1 5] [1 3] に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

(1) [4] に記載の標識体；

(2) ストレプトアビジンに結合したルシフェラーゼ；

(3) ルシフェリン；

(4) A T P ；及び

(5) M g 塩；

30

を構成成分として含むキット。

【発明の効果】

【 0 0 1 6 】

本発明によって、生体試料中の O X T / V P ファミリーペプチドを効率よく検出定量することが可能であり、様々な疾患の診断の一助とすることが出来る。

また別態様として、本発明の標識体を応用して従来よりも免疫応答が良好な免疫原を製作することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】 Biotin-OXT と Biotin-Lys(n)-OXT conjugate の比較 B0 値

40

【図 2】 Biotin-OXT と Biotin-Lys(5)-OXT conjugate の比較検量線 (E L I S A 法と B L E I A 法)

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 8 】

本発明の標識体を用いた免疫測定法によって検体中の O X T / V P ファミリーペプチドを高感度で且つ特異的に検出することができる。対象となる検体試料としては、採取、分離された血液 (全血) 、血清、血漿、唾液、尿、髄液、培養上清、ミルク等が挙げられる。

以下に本発明について詳細に説明する。

【 0 0 1 9 】

50

「標識」とは、本願発明に係る標識体の標識部分を意味し、それ自体が蛍光、発光、あるいは発色する物質であってもよいが、基質と反応して蛍光、発光、あるいは発色を生じる酵素であってもよい。

さらに、「標識」は、「蛍光、発光、あるいは発色する物質」又は「基質と反応して蛍光、発光、あるいは発色を生じる酵素」と特異的に結合できる分子であってもよい。

たとえば該「酵素」としては、ルシフェラーゼを用いてよい。「酵素」がホタルルシフェラーゼの場合、基質はホタル・ルシフェリンなどであってもよい。「酵素」はウミホタルルシフェラーゼ（基質（Luciferin）=イミダゾピラジノン誘導体）、夜光虫ルシフェラーゼ（基質=夜光虫Luciferin）、オワンクラゲイクオリン（基質=セレンテラジン）、ウミシイタケルシフェラーゼ（基質=セレンテラジン）、バクテリアルシフェラーゼ（基質=フラビンモノヌクレオチド）などであってもよい。

該「酵素」としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を用いてよい。この場合「基質」は、*o*-フェニレンジアミン（発色）；テトラメチルベンチジン（TMBZ）（発色）；ルミノール（化学発光）などであってもよい。

該「酵素」としては、アルカリホスファターゼ（ALP）を用いてもよい。この場合、その「基質」は、*p*-ニトロフェニルホスファート（発色）やAMP-PD（登録商標）（3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy) phenyl-1,2-dioxetane disodium salt）（化学発光）などが選択できる。

「基質と反応して蛍光、発光、あるいは発色を生じる酵素」がストレプトアビジンと結合した酵素の場合、「標識」はビオチンであってもよい。

【0020】

「任意のアミノ酸」とは、生体のタンパク質の構成ユニットとなる「 α -アミノ酸」であるアラニン（Ala）、アルギニン（Arg）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、システイン（Cys）、グルタミン（Gln）、グルタミン酸（Glu）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、リジン（Lys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、トレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）、又はバリン（Val）を含む。

脂肪族アミノ酸には、分枝鎖アミノ酸（バリン；イソロイシン；ロイシン）；メチオニン；アラニン；プロリン及びグリシンが含まれる。

芳香族アミノ酸にはフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンが含まれる。

塩基性アミノ酸にはリジン，アルギニン，ヒスチジン，トリプトファンが含まれる。その他では，オルニチンなどもこれにあたる。

酸性アミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、チロシンが含まれる。

親水性の高いアミノ酸には、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジンなどが含まれる。

【0021】

「標識」と「アミノ酸」は「アミノ酸」のアミノ基を介して結合している。より好ましくはアミノ酸（ $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ）の末端アミノ（ NH_2 ）基である。「アミノ酸」と「OXT/V Pファミリーペプチド」の結合は通常のペプチド結合で結合されている。たとえば、「Lys」と「OXT」であれば、配列番号3～7で表され、「Lys」と「VP」であれば、配列番号8～12で表される。

【0022】

本発明に係る標識体は化学合成で作製できるだけでなく、「標識」が酵素の場合、分子生物学的手法（「酵素」-「アミノ酸」*n*-「OXT/V Pファミリーペプチド」をコードする塩基配列を適当な発現ベクターに組み込み、宿主の中で合成させる態様を含む）で合成されてもよい。

【0023】

10

20

30

40

50

「免疫測定法」とは抗原と抗体の反応を利用して、生物学的試料の中に含まれる物質のレベルを測定する生化学的試験測定法を意味する。標識に用いる物質によって、放射免疫測定 (RIA)、酵素免疫測定 (EIA)、蛍光免疫測定 (FIA) に大別される。EIA (Enzyme Immunoassay) 法には以下の「ELISA法」や「生物発光酵素免疫測定法 (Bioluminescent Enzyme Immunoassay: BLEIA)」が含まれ、さらに化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) も含まれる。なお、BLEIA (登録商標) は栄研化学株式会社の登録商標である。

【0024】

「ELISA法 (Enzyme-Linked Immunosorbent-assay)」は、試料中に含まれる物質の濃度を酵素反応を用いて検出定量する方法を指す。酵素反応に基づく発色をシグナルに用いることで対象を検出測定する。

「競合ELISA法」とは「標識した抗原」と「試料中の存在する抗原」が、競合条件下でどの割合で抗体に結合するかを測定するELISA法を意味する。本発明に係る標識体を「標識した抗原」として用いて、「検体中のOXT/VP」を「試料中の存在する抗原」として測定する。

【0025】

「生物発光酵素免疫測定法」とは、ホタルのルシフェリン・ルシフェラーゼ反応に基づく生物発光酵素免疫測定法である。磁性微粒子に抗体 (または抗原) を固定化し、標識にルシフェラーゼ標識抗原 (または抗体) を用いる。ルシフェラーゼ複合体の酵素活性をルシフェリンを用いた生物発光で検出し、検体中の物質を測定あるいは検出する方法である。

【0026】

「固相支持体」とは免疫測定中、抗OXT抗体や抗VP抗体を固定 (immobilized) させるものを意味する。これに限定されないが、ガラス、ナイロンメンブレン、半導体ウェハー、マイクロビーズ、磁気ビーズ、磁性微粒子、プラスチックプレートなどを意味する。固定の方法は公知の技術を用いて、直接抗OXT抗体や抗VP抗体をガラス等の表面に物理的に又は化学結合を介して固定してもよいし、ビオチン-アビジンなどの結合を介して、あるいはリンカー分子を介して間接的に固定させてもよい。リンカー分子としては抗OXT抗体や抗VP抗体を認識結合する2次抗体であってもよい。

具体的には抗OXTウサギ抗体の場合、2次抗体は抗ウサギIgGヤギ抗体であってよく、抗ウサギIgGヤギ抗体は抗体のNH₂基と磁性微粒子のTosyl基の化学結合を介して、磁性微粒子に結合し、その抗ウサギIgGヤギ抗体を介して、抗OXTウサギ抗体は磁性微粒子に固定されていてよい。

【0027】

「抗OXT/VPファミリーペプチド抗体」とはOXT/VPファミリーペプチドを構成するメンバーのいずれかと特異的に結合する抗体を意味し、抗体の活性断片 (あるいは断片抗体: Fab、F(ab')₂ など) でもよい。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体であってもよい。

【0028】

本発明の測定方法を実施するときは、OXT/VPファミリーペプチドを免疫測定するためのキットであって、(1)本発明に係る標識体；(2)固相支持体；および(3)「抗OXT/VPファミリーペプチド抗体」を含むキットを用いて行える。

このキットにおいては、(2)固相支持体；および(3)「抗OXT/VPファミリーペプチド抗体」に関しては、固相支持体と抗体溶液とを別々に作製しておき、OXT/VPファミリーペプチドを測定する際、抗体を固相支持体に吸着させてもよく、あらかじめ、抗体を固相支持体に吸着させた状態で提供してもよい。

【0029】

本発明のキットには、必要に応じ、検体希釈液を加えて含むこともできる。検体希釈液としては、例えば、トリス等の緩衝液を使用できる。その緩衝液には、必要に応じて、EDTA・2Na等のキレート剤、食塩等の無機塩を加えてもよい。

また、検量線作成のための濃度の決められたOXT/VPファミリーペプチドを含んで

10

20

30

40

50

いてもよい。

【0030】

本発明においては、本発明の標識体を用いた競合ELISA法により、OXT/VPFファミリーペプチドを測定することもできる。

具体例は以下の通りである。まず抗OXT抗体を固相支持体、例えば、プレートに吸着させ、検体（例えば、血清中のOXT）と反応させ、次いで/あるいは同時に標識された標識体を反応させる。その後、固相支持体を洗浄し、次いで、吸着した標識体を「標識」を指標に検出する。標識体がビオチンで標識されている場合には、ストレプトアビジンで標識されたペルオキシダーゼやルシフェラーゼを反応させ、酵素反応を行い、発色や発光を検出することにより、検体内のOXTを検出測定する。

この場合、本発明に係るキット以外にも、公知のキットの構成試薬を流用することも出来る。このようなキットとして、ENZO(Assay designs)社、abcam社、Alpco社、MyBioSource社、Arbor Assays社などから購入できる。

【0031】

本発明においては、本発明の標識体を用いた生物発光酵素免疫測定法(BLEIA法)により、OXT/VPFファミリーペプチドを測定することもできる。

具体例は以下の通りである。まず抗OXT抗体を磁性微粒子に固定し、検体（例えば、血清中のOXT）と反応させ、次いで/あるいは同時に標識された標識体を反応させる。その後、磁性微粒子を洗浄し、次いで、吸着した標識体を「標識」を指標に検出する。標識体がビオチンで標識されている場合、(ストレプト)アビジンに結合したホタルルシフェラーゼをビオチンで標識された標識体と結合させ、ホタルのルシフェリン/ATP/Mgイオンなどを含む基質により生じる生物発光を検出することにより、検体中のOXTを検出測定する。

【0032】

本発明の標識体を応用して、抗体作製の免疫原とすることもできる。酵素の代わりに牛血清アルブミンやスカシ貝ヘモシアニン等のキャリア蛋白質とOXTやVPを結合させて、従来よりも免疫応答が良好な免疫原を作製することが可能である。この免疫原を用いて動物を免疫して抗体を産生すれば、血清からOXTやVPに対するポリクローナル抗体を得ることができる。また、マウスやラット等を免疫し、抗体産生細胞を細胞融合させることにより、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる。

【0033】

上記ハイブリドーマは以下の方法によって得ることができる。免疫原を、フロイントの完全、不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、百日咳アジュバント等の既に公知のものを用いて共に混和し、免疫用アジュバント液を作製して数回に分けてマウス、ラット等の動物に1~3週間おきに腹腔内皮下、または尾静脈投与することによって免疫する。抗原量は1 μ g~100mgの間とされているが、一般的には50 μ g程度が好ましい。免疫回数は2~7回が一般的であるがさまざまな方法が知られている。次いで脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞(ミエローマ細胞)等の試験管内で増殖能力を有する細胞とを融合する。抗体産生細胞はマウス、ヌードマウス、ラットなどの脾臓等より得ることができる。

上記融合法としては、既にそれ自体公知であるケーラーとミルスタインの定法(Nature.256,495.1975)によってポリエチレングリコール(PEG)を用いることで融合できる。センダイウイルス、電気融合法によっても融合を行うことができる。

【0034】

上記融合した細胞から免疫原であるOXT/VPFファミリーペプチドを認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択する方法としては以下のようにして行うことができる。即ち、上記融合した細胞から限界希釈法によってHAT培地およびHT培地で生存している細胞により作られるコロニーからハイブリドーマを選択する。96穴マイクロタイタープレートなどにまかれた融合細胞からできたコロニー培養上清中にOXT/VPFファミリーペプチドに対する抗体が含まれている場合には、OXT/VPFあるいは、本発明の標識体をプレ

10

20

30

40

50

ート上に固定化したアッセイプレート上に上清をのせ、反応後に抗マウスイムノグロブリン-HRP標識抗体等の2次標識抗体を反応させるELISA法により、OXT/V Pファミリーペプチドに対するモノクローナル抗体産生クローンを選択できる。標識抗体の標識物質にはHRPの他、アルカリホスファターゼなどの酵素、蛍光物質、放射性物質等を用いることができる。またコントロールとしてブロッキング剤であるBSAのみを結合したアッセイプレートによるELISAを同時に行うことでOXT/V Pファミリーペプチド特異的抗体のスクリーニングができる。つまりOXT/V Pファミリーペプチドプレートで陽性であり、BSAによるELISAで陰性のクローンを選択できる。

【実施例】

【0035】

10

以下の実施例、比較例及び参考例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0036】

<実施例1> B L E I A 法によるOXTの測定

(1) $1 \times 10^{-9} \text{M}$ Streptavidin (R o c h e) と $1 \times 10^{-10} \text{M}$ Biotinyl-luciferase (キッコマンバイオケミファ) を 1 : 1 で混合し、室温で30分反応させて、Streptavidin-Biotinyl-luciferase complexを作製する(100mmol/L リン酸buffer (PB), 1mmol/L EDTA・2Na, 2mmol/L 2-Mercaptoethanol, 0.1%BSA, pH7.4)。

DynaBeadsM280T (磁性微粒子) (ライフテクノロジーズ社) に抗ウサギIgGヤギ精製抗体(EIKEN)を結合させ(1%濃度)を希釈して0.15%Beads(50mMPB, 0.05%BSA, 0.09% NaN_3)の2nd antibody-immobilized magnetic particlesを作製する。

20

(2) 上記(1)で調製した2nd antibody-immobilized magnetic particles 20 μL にOXT (Oxytocin acetate salt hydrate) (SIGMA)をAssay buffer (100mmol/Lリン酸buffer (PB), 2mmol/L EDTA・2Na, 0.2%BSA, 0.05% NaN_3 , pH7.4)で希釈したものを100 μL (1~100,000pg/ml (0.1~10,000pg/assay))と抗-Oxytocin Rabbit IgG抗体(Affinity Purify) ((株)免疫生物研究所委託作製)50 μL (1:1000~1:3000希釈)を加え、4で一晚反応させる。

(3) Biotin-(Lys(n))-OXT 標識体 (n=0,1,2,3,4,5,6) ((株)免疫生物研究所による委託合成品 (20ng/ml) を50,000倍希釈)を50 μL 加え、4で一時間反応させる。

(4) Washing Buffer (100mmol/L PB, 0.15mol/L NaCl, 0.05%Tween20 (登録商標), pH 7.4) 1000 μL で3回洗浄する(磁性粒子洗浄分離機(MW-50):柴崎製作所(株))。

30

(5) 上記(1)で調製したStreptavidin-Biotinyl-luciferase complexを200 μL 加えて、室温で30分反応させる。

(6) Washing Buffer (100mmol/L PB, 0.15mol/L NaCl, 0.05%Tween20 (登録商標), pH 7.4) 1000 μL で3回洗浄する(磁性粒子洗浄分離機(MW-50):柴崎製作所(株))。

(7) Suspension buffer (50mmol/L Tris-HCl, pH8.5) 100 μL とBL substrate solution (Luciferase substrate powder (EIKEN)1瓶を H_2O 24mlにて溶解したもの)100 μL を加え、発光測定器(SHE:柴崎製作所(株))で発光を検出する(5秒)。

【0037】

生物発光酵素免疫測定法による「Lys」の長さの数の影響を調べた(図1)。その結果、Biotin-Lys(n)-OXT 標識体(Lys0 (n=0)、Lys1 (n=1)、Lys2 (n=2)、Lys3 (n=3)、Lys4 (n=4)、Lys5 (n=5))を用いた場合、Lysの数が多くなるほど、検出の B_0 値(発光強度)が大きくなることがわかった。一方、さらにLysの長さを長くすると(検出の B_0 値(発光強度)は小さくなってしまった(Lys6 (n=6))。

40

【0038】

生物発光酵素免疫測定法によるBiotin-OXT (Lys0)とBiotin-(Lys)5-OXT (Lys5)を用いた場合のOXTの検量線を作成した(図2)。検量線より IC_{50} を算出した所、5,490pg/ml (Lys0)と1,000pg/ml (Lys5)であった。Lys5を用いた場合、用いる抗体の量を減らすと、検出感度があがり、 IC_{50} の値は小

50

さくなくなった (800pg/ml)。

【 0 0 3 9 】

< 実施例 2 > E L I S A 法による O X T の測定

(1) 2nd antibody-immobilized plate (抗ウサギIgG (H+L) ヤギ血清 ((株) シバヤギ) をコ - ティングしたプレート) にOXT (Oxytocin acetate salt hydrate) (SIGMA) を Assay buffer (10mmol/L リン酸buffer (PB), 0.15M NaCl, 0.1%BSA, pH7.4) で希釈したものを100 μ L (1 ~ 100,000pg/mL (0.1 ~ 10,000pg/assay)) と抗-Oxytocin Rabbit IgG抗体 (Affinity Purify) ((株) 免疫生物研究所委託作製) 50 μ L (1:1000 ~ 1:3000希釈) を加え、4 で一晩反応させる。

(2) Biotin-(Lys(n))-OXT 標識体 (n=0,1,2,3,4,5,6 : (株) 免疫生物研究所による委託合成品 (20ng/ml) を50,000倍希釈) を50 μ L加え、4 で一時間反応させる。

(3) Streptavidin-HRP (Thermo) (500ng/ml) 200 μ Lを加え、室温で1時間反応させる。

(4) Washing Buffer (10mmol/L PB, 0.15mol/L NaCl, 0.1%Tween20 (登録商標), pH7.4) 350 μ Lで3回洗浄する。

(5) OPD (o-フェニレンジアミン二塩酸塩) 溶液 (542 μ g/mL ; 50mmol/L citrate buffer, 0.015% H_2O_2 , pH5.5) を加え、室温で一時間反応後、停止溶液 (2M Sulfuric acid) を50 μ L添加後、吸光光度計 (WALLAC ARVO SXd 1420 MULTILABEL COUNTER (PerkinElmer)) で (492nm) で発色を検出した。

【 0 0 4 0 】

E L I S A 法による「L y s」の数の影響を調べた (図 2)。生物発光酵素免疫測定法と同様に検量線を作成し、その $I C_{50}$ を算出した (表 1)。

【表 1】

IC50	pg/ml
Lys0	6050
Lys1	2700
Lys2	1850
Lys3	1230
Lys4	1150
Lys5	860
Lys6	1700

【 0 0 4 1 】

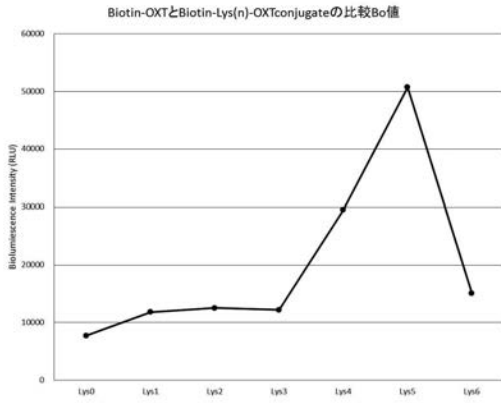
その結果、生物発光酵素免疫測定法の結果と同様に L y s 5 を上限として L y s の数が多いほど検出感度が上がることがわかった。

【産業上の利用可能性】

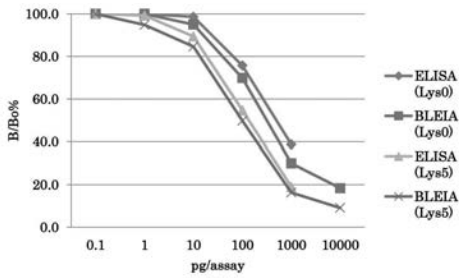
【 0 0 4 2 】

以上に詳細に説明した通り、本発明の標識体及び免疫測定法では、測定対象目的物質を特異的に精密測定することを可能にする。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

2016140063000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/054529
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, C07K7/16(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K16/26(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, C07K7/16, C12Q1/26, C12Q1/34, G01N33/543, C07K16/26 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 59-211861 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 30 November 1984 (30.11.1984), entire text (Family: none)	1-11
Y	JP 56-030647 A (Ajinomoto Co., Inc.), 27 March 1981 (27.03.1981), entire text (Family: none)	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 May 2016 (11.05.16)		Date of mailing of the international search report 24 May 2016 (24.05.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054529

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-517885 A (RWTH Aachen), 29 May 2008 (29.05.2008), entire text; particularly, claims; paragraphs [0012], [0027] to [0029] & US 2010/0221240 A1 claims; paragraphs [0012], [0027] to [0029] & WO 2006/042745 A2 & EP 1805215 A2 & DE 102004051014 A1	1-11
A	JP 2010-535714 A (Pharmain Corp.), 25 November 2010 (25.11.2010), entire text & JP 2014-62127 A & JP 2014-62128 A & JP 2015-110662 A & US 2009/0088387 A1 & US 2011/0207662 A1 & US 2014/0051628 A1 & US 2015/0307578 A1 & WO 2009/020934 A1 & EP 2185170 A1	1-11
A	JP 61-289097 A (Alpha 1 Biomedicals, Inc.), 19 December 1986 (19.12.1986), entire text & JP 10-152500 A & US 4855407 A & EP 200404 A2	1-11
A	JP 2010-117232 A (Shiseido Co., Ltd.), 27 May 2010 (27.05.2010), entire text (Family: none)	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 4 5 2 9									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C07K7/16(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, C07K16/26(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, C07K7/16, C12Q1/26, C12Q1/34, G01N33/543, C07K16/26											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2016年										
日本国実用新案登録公報	1996-2016年										
日本国登録実用新案公報	1994-2016年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	JP 59-211861 A (住友化学工業株式会社) 1984.11.30, 全文等参照 (ファミリーなし)	1-11									
Y	JP 56-030647 A (味の素株式会社) 1981.03.27, 全文等参照 (ファミリーなし)	1-11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 11.05.2016		国際調査報告の発送日 24.05.2016									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 草川 貴史	2 J 4 0 7 5								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 4 5 2 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-517885 A (アールヴェーテハー アーヘン) 2008.05.29, 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落[0012]、[0027]-[0029]等参照 & US 2010/0221240 A1, [特許請求の範囲]、段落[0012]、[0027]-[0029] & WO 2006/042745 A2 & EP 1805215 A2 & DE 102004051014 A1	1-11
A	JP 2010-535714 A (ファーマイン コーポレーション) 2010.11.25, 全文等参照 & JP 2014-62127 A & JP 2014-62128 A & JP 2015-110662 A & US 2009/0088387 A1 & US 2011/0207662 A1 & US 2014/0051628 A1 & US 2015/0307578 A1 & WO 2009/020934 A1 & EP 2185170 A1	1-11
A	JP 61-289097 A (アルファー1・バイオメディカルズ・インコーポレーテッド) 1986.12.19, 全文等参照 & JP 10-152500 A & US 4855407 A & EP 200404 A2	1-11
A	JP 2010-117232 A (株式会社資生堂) 2010.05.27, 全文等参照 (ファミリーなし)	1-11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	催产素的高灵敏度测量方法		
公开(公告)号	JPWO2016140063A1	公开(公告)日	2017-12-14
申请号	JP2017503405	申请日	2016-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社		
[标]发明人	荒川秀俊 大熊博		
发明人	荒川 秀俊 大熊 博		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 C07K7/16 C12M1/34		
CPC分类号	C07K7/16 C07K16/26 C12Q1/26 C12Q1/34 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/53.U G01N33/536.C C07K7/16.ZNA C12M1/34.F		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA12 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA41 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA34 4H045/EA50 4H045/FA50		
优先权	2015042163 2015-03-04 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 解决的问题：提供一种新颖的标记催产素/加压素家族肽，以及使用该标记肽的免疫测定方法。本发明涉及标记的催产素/加压素家族肽；使用该标记的肽检测样品中的催产素/加压素家族肽的方法；以及用于该试剂盒的试剂盒。如果使用本发明的标记的催产素/加压素家族肽，则可以特异性地测定样品中的催产素/加压素家族肽，在自闭症等诊断和临床试验领域中极为有效。。[选择图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2016/140063
発行日 平成29年12月14日 (2017.12.14)	(43) 国際公開日 平成28年9月9日 (2016.9.9)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	B 4B029
G01N 33/536 (2006.01)	G01N 33/53	U 4H045
C07K 7/16 (2006.01)	G01N 33/536	C
C12M 1/34 (2006.01)	C07K 7/16	ZNA
	C12M 1/34	F
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全16頁)	
出願番号 特願2017-503405 (P2017-503405)	(71) 出願人 000120456	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/054529	栄研化学株式会社	
(22) 国際出願日 平成28年2月17日 (2016.2.17)	東京都台東区台東4丁目19番9号	
(31) 優先権主張番号 特願2015-42163 (P2015-42163)	(74) 代理人 110000855	
(32) 優先日 平成27年3月4日 (2015.3.4)	特許業務法人浅村特許事務所	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 荒川 秀俊	
	神奈川県横浜市金沢区長浜1丁目10番4号	
	(72) 発明者 大熊 博	
	栃木県下都賀郡野木町野木 143 栄研化学株式会社野木事業所内	
	Fターム(参考) 4B029 AA07 BB15 CC02 CC08 FA12	
	4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 BA41	
	BA50 CA40 DA34 EA50 FA50	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 オキシトシンの高感度測定法		