

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5743550号
(P5743550)

(45) 発行日 平成27年7月1日(2015.7.1)

(24) 登録日 平成27年5月15日(2015.5.15)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	Z N A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	K	
G O 1 N 33/57 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D	
請求項の数 5 (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2010-542027 (P2010-542027)
 (86) (22) 出願日 平成21年12月10日 (2009.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/006768
 (87) 国際公開番号 W02010/067611
 (87) 国際公開日 平成22年6月17日 (2010.6.17)
 審査請求日 平成24年6月26日 (2012.6.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-316173 (P2008-316173)
 (32) 優先日 平成20年12月11日 (2008.12.11)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11187
 微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11188
 微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11189
 微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11190
 微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11191

(73) 特許権者 390037327
 積水メディカル株式会社
 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹
 (74) 代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘモグロビンβ鎖のN末端領域に対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

N末端にアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1)を有し、N末端バリンが修飾されていないペプチドのN末端及びヘモグロビンβ鎖のN末端と反応し、ヘモグロビンA0と反応し、当該ペプチド又はヘモグロビンのN末端バリンが修飾されたペプチド及びヘモグロビンと反応せず、ヘモグロビンA1cと反応しない抗体。

【請求項2】

N末端にアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1)を有さないヘモグロビンと反応しないものである請求項1記載の抗体。

【請求項3】

モノクローナル抗体である請求項1又は2記載の抗体。

【請求項4】

N末端にアミノ酸配列VHL (配列番号2)を有し、N末端バリンが修飾されていないペプチド又はヘモグロビンを免疫原として用いる請求項1~3のいずれか1項記載の抗体の製造法。

【請求項5】

請求項1~3のいずれか1項記載の抗体を用いて試料中のヘモグロビンA0量を測定し、抗ヘモグロビンA1c抗体を用いて前記試料中のヘモグロビンA1c量を測定し、次式(1)

$$\text{ヘモグロビンA1c含有率(\%)} = (\text{ヘモグロビンA1c量} / (\text{ヘモグロビンA1c量} + \text{ヘモグロビンA0量})) \times 100$$

+ヘモグロビンA0量))×100

から試料中のヘモグロビンA1c含有率(%)を算出することを特徴とする試料中のヘモグロビンA1c含有率の測定法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、未修飾のヘモグロビン鎖のN末端領域を認識する抗体及び当該抗体を用いたヘモグロビンA1cの測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血中のヘモグロビン(以下、「Hb」という)に糖が結合した糖化ヘモグロビンのうち、ヘモグロビン鎖のN末端バリン残基がグルコースで糖化されたヘモグロビンA1c(以下、「HbA1c」という)は、臨床的に過去1~2ヶ月の平均血糖値を反映することから、糖尿病の診断や糖尿病の経過観察に適した指標として広く使用されている。

【0003】

HbA1cの測定法としては、HPLC法及び免疫学的測定法が用いられているが、HPLCのカラムの種類や試薬メーカー間によって、測定対象が微妙に異なっており、測定の標準化が求められている。かかる観点から、IFCC(International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)のHbA1c標準化のワーキンググループは、基準測定法(以下、「IFCC準拠法」という)を定めた(非特許文献1)。その方法は、赤血球溶血液をプロテアーゼで消化してヘモグロビン鎖のN末端ヘキサペプチド(VHLTP E)(配列番号1)を抽出し、その抽出物中のHbA1cの鎖N末端の糖化ヘキサペプチド(f-VHLTP E)と、ヘモグロビンA0(以下、「HbA0」という)の鎖N末端の修飾されていないヘキサペプチド(VHLTP E)(配列番号1)の量を求め、下記式によりHbA1c含有率(%)を算出するというものである。

【0004】

$$\text{HbA1c含有率}(\%) = (\text{f-VHLTP E量} / (\text{f-VHLTP E量} + \text{VHLTP E量})) \times 100 = (\text{HbA1c量} / (\text{HbA1c量} + \text{HbA0量})) \times 100$$

【0005】

しかしながら、この方法における糖化ヘキサペプチド含量の測定法は、HPLC-MS又はHPLC-キャピラリー電気泳動を用いるものであることから、高価な装置を必要とし、特定の施設でしか測定することができない。また、この測定値は、従来法のHbA1c値と大きく変わるという問題がある(非特許文献2)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Clin. Chem. Lab. Med. 2002; 40(1): 78-89

【非特許文献2】糖尿病46巻9号(2003), 775~778頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って本発明の課題は、IFCC準拠法と同様のHbA1c含有率(%)を測定できる汎用の手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

そこで本発明者は、HPLC-MSやHPLC-キャピラリー電気泳動法に代わるIFCC準拠法を開発すべく検討した結果、Hb鎖N末端のヘキサペプチドVHLTP E(配列番号1)に特異的に反応し、このヘキサペプチドが修飾されたペプチドには反応しない抗体の作製に初めて成功した。この抗体とHbA1c抗体とを用いれば、HbA1cとHbA0とが正確かつ簡便に定量でき、簡便な免疫学的手段でIFCC準拠法によるHb

10

20

30

40

50

A 1 c 含有率 (%) が測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、N末端にアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1) を有するペプチド又はタンパク質と反応し、当該ペプチド又はタンパク質のN末端バリンが修飾されたペプチド又はタンパク質と反応しない抗体を提供するものである。

また、本発明は、上記抗体を用いて試料中のHbA0量を測定し、抗HbA1c抗体を用いて前記試料中のHbA1c量を測定し、次式(1)

$$\text{HbA1c 含有率 (\%)} = (\text{HbA1c 量} / (\text{HbA1c 量} + \text{HbA0 量})) \times 100 \quad (1)$$

から試料中のHbA1c含有率 (%) を算出することを特徴とする試料中のHbA1c含有率の測定法を提供するものである。

【発明の効果】

【0010】

本発明の抗体を用いれば、試料中のHbA0量が正確かつ簡便に測定できることから、試料中のHbA0量とHbA1c量とを基準とするIFCC準拠法によるHbA1c含有率 (%) が簡便かつ正確に測定可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】イムノクロマト法によるHbA1cの測定法概略図を示す。

【図2】イムノクロマト法によるHbA1cの測定法概略図を示す。

【図3】抗原固相化ELISA法にてマウス抗血清中の抗体価を測定した結果を示す。

【図4】競合ELISA法にて本発明抗体のヘモグロビン鎖N末端ペプチド(VHLTP E) (配列番号1) 及びその糖化ペプチド(f-VHLTP E) に対する反応性を調べた結果を示す。

【図5】競合ELISA法にて本発明抗体のヘモグロビン鎖N末端ペプチド(VHLTP E) (配列番号1) 及び鎖N末端ペプチド(VLSPAD) (配列番号10) に対する反応性を調べた結果を示す。

【図6】抗原固相化ELISA法にて本発明抗体及び抗ヘモグロビン抗体のHbA1c及びHbA0に対する反応性を調べた結果を示す。

【図7】抗原固相化ELISA法にて本発明抗体、抗ヘモグロビン抗体、及び抗HbA1c抗体のHPLCで分離したヘモグロビン亜分画に対する反応性を調べた結果を示す。

【図8】サンドイッチELISAによるHbA1c濃度測定系、及びHbA0濃度測定系における検量線を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の抗体は、N末端にアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1) を有し、N末端バリンが修飾されていないペプチド又はタンパク質と反応し、当該ペプチド又はタンパク質のN末端バリンが修飾されたペプチド又はタンパク質と反応しない抗体である。

N末端にアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1) を有し、N末端バリンが修飾されていないペプチドとしては、アミノ酸配列VHLTP E (配列番号1) からなるオリゴペプチド、及びアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1) を含むポリペプチドが挙げられる。N末端にアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1) を有し、N末端バリンが修飾されていないタンパク質としては、正常な成人の主要なHbであって、Hb鎖を有するヘモグロビンA0、及びHb鎖を有するヘモグロビンA2 (以下、「HbA2」という) のうち鎖N末端が修飾されていないものが挙げられるが、HbA2は、非常に微量な成分である。従って、本発明抗体と反応する主要なHbとしては、HbA0が挙げられる。

一方、前記N末端バリンが修飾されたペプチド又はタンパク質としては、N末端にアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1) を有し、そのN末端バリンが糖修飾されたペプチド又はHbが挙げられる。当該タンパク質としては、HbA1cが挙げられる。

従って、本発明の抗体の好ましい形態としては、N末端にアミノ酸配列VHLTP E (

10

20

30

40

50

配列番号1)を有し、N末端バリンが修飾されていないペプチド又はHbと反応し、当該ペプチド又はHbのN末端バリンが修飾されたペプチド又はHbと反応しない抗体が挙げられる。さらに好ましい形態としては、HbA0と反応し、HbA1cと反応しない抗体である。

さらに、本発明の抗体は、Hb以外のタンパク質とは反応せず、さらにアミノ酸配列VHLTP E (配列番号1)を有さないHb、例えばHbFとは反応しないものであるのが好ましい。

【0013】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であるのが特に好ましい。

10

【0014】

本発明の抗体は、HbA0が鎖N末端にVHL (配列番号2)を有することから、アミノ酸配列VHL (配列番号2)を有するペプチド又はタンパク質を免疫原として用い、常法により作製することができる。免疫原の例としては、VHLC (配列番号3)、VHLTC (配列番号4)、VHLTPC (配列番号5)、VHLTPEC (配列番号6)、VHL (配列番号2)、VHLT (配列番号7)、VHLTP (配列番号8)、VHLTP E (配列番号1)、及びこれらのペプチドとキャリアタンパクとが結合した抗原が挙げられる。キャリアタンパクとしてはオボアルブミン (以下、「OVA」という)、ウシ血清アルブミン (以下、「BSA」という)、陽イオン化BSA (以下、「cBSA」という)、スカシ貝ヘモシアニン (以下、KLHという)等が挙げられる。ペプチドとキャリアタンパクとの結合方法は、MBS法 (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide esterを用いる方法)及びEDC法 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochlorideを用いる方法)等が挙げられる。

20

【0015】

本発明のモノクローナル抗体は、例えばAntibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)に記載の方法に準じて作製することができる。

【0016】

免疫に用いる動物は特に限定されないが、例えばマウス、ラットなどが挙げられる。免疫方法は、一般的な手法に従って行うことができる。例えば、免疫原を通常の緩衝液や生理食塩水に懸濁させたもの、あるいは免疫原と完全フロイントアジュバンドなどの補液との混合物を、動物の皮下、皮内、腹腔などに投与して一時刺激後、必要に応じて同様の操作を繰り返し行う。抗原の投与量は投与経路、動物種に応じて適宜決定されるが、通常の投与量は1回当たり10 μ g~1mg程度が好ましい。

30

【0017】

細胞融合に用いる免疫細胞は、最終免疫の3~4日後に摘出した脾臓細胞が好適である。また、前記免疫細胞と融合させる骨髓腫細胞 (以下、「ミエローマ細胞」という)としては、既に確立されている公知の各種細胞株が好ましく、例えばマウスにおけるNS1 (P3/NSI/I-Ag4-1) [Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976)], SP2/O-Ag14 [Nature 276: 269 (1978)], P3-X63-Ag8.653 [J. Immunol. 123: 1548 (1979)], P3-X63-Ag8U.1 [Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 1 (1978)]等や、ラットにおけるY3-Ag1.2.3. [Nature 277: 131-133 (1979)], YB2/O (YB2/3HL/P2.G11.16Ag.20) [Methods Enzymol. 73B: 1 (1981)]等が挙げられる。

40

【0018】

細胞融合には、通常用いられるポリエチレングリコール (以下、「PEG」という)、センダイウイルス (HVJ)等を使用することができる。細胞融合の手法は通常の方法と

50

同様であり、例えばミエローマ細胞とミエローマ細胞に対して約1～10倍の免疫細胞との混合ペレットに、平均分子量1000～6000のPEGを30～60%の濃度で滴下し、混合する。ハイブリドーマの選択は、通常を選択培地、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン（以下、「HAT」という）を含む培地を使用する。HAT培地で培養して得られたハイブリドーマを用いて、通常限界希釈法により、目的とする抗体産生株の検索及び単一クローン化を行えばよい。

【0019】

目的とする抗体産生株は、例えばELISA法、RIA法等により、VHLP（配列番号1）を有するペプチド又はタンパク質に反応し、当該ペプチド又はタンパク質のN末端バリンが修飾されたペプチド又はタンパク質と反応しない抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより得られる。

10

具体的には、まず培養上清中のモノクローナル抗体を、固相化した精製HbA0抗原と反応させ、次いで標識抗IgG抗体を反応させる。抗原固相化ELISA法により、HbA0に対し高い反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする。得られたハイブリドーマの培養上清について、さらに、精製HbA0抗原を固相化したプレートを用い、VHLP（配列番号1）又は糖化VHLP（f-VHLP）との間で競合ELISA法を行い、VHLP（配列番号1）に反応し、f-VHLPに反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する。

【0020】

20

当該モノクローナル抗体は、常法に従いハイブリドーマを培養し、培養上清から分離する方法、前記ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳類動物に投与し、腹水として回収する方法により製造できる。

【0021】

このようにして得られる本発明のモノクローナル抗体は、Hb鎖N末端が修飾されていないペプチド又はタンパク質と反応し、かつHb鎖のN末端が修飾されたペプチド又はタンパク質とは反応しないことから、HbA0と反応し、HbA1cと反応しない抗体である。従って、HbA0をHbA1cと区別して免疫測定するための抗体として有用である。

【0022】

30

本発明の抗体を用いれば、IFCC準拠法と同様のHbA1c測定が可能になる。すなわち、本発明の抗体を用いて試料中のHbA0量を測定し、抗HbA1c抗体を用いて前記試料中のHbA1c量を測定し、次式（1）

$$HbA1c \text{ 含有率} (\%) = (HbA1c \text{ 量} / (HbA1c \text{ 量} + HbA0 \text{ 量})) \times 100 \quad (1)$$

から試料中のHbA1c含有率（%）を算出すれば、試料中のHbA1c含有率が測定できる。

【0023】

また、前記式（1）は、本発明モノクローナル抗体の認識部位を考慮すれば、次式（2）で表わすこともできる。

40

$$HbA1c \text{ 含有率} (\%) = (f\text{-VHLP量} / (f\text{-VHLP量} + VHLP量)) \times 100 \quad (2)$$

【0024】

本発明方法における、HbA0の測定法及びHbA1cの測定法は、通常免疫学的測定法であればいずれも採用できる。ここで免疫学的測定法としては、サンドイッチELISA法、競合ELISA法、イムノクロマト法、ラテックス凝集法、競合ラテックス凝集法等が挙げられる。

【0025】

従来の任意の免疫学的測定法に本発明のモノクローナル抗体を適用することにより、HbA0とHbA1cとをそれぞれ測定することができる。

50

例えば、サンドイッチ E L I S A 法で測定する場合には、精製した H b A 0、又は H b A 1 c を標準品として次のような方法で H b A 0 又は H b A 1 c を定量できる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体又は抗 H b A 1 c 抗体を固定化した E L I S A プレートに、希釈した検体試料を添加し反応させた後、酵素標識した抗ヘモグロビン抗体（以下、「抗 H b 抗体」という）を反応させ、発色後の吸光度の変化から試料中に存在する H b A 0 又は H b A 1 c を特異的に定量できる。

ラテックス凝集法で測定する場合には、精製した H b A 0 又は H b A 1 c を標準品として次のような方法で定量することができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体又は抗 H b A 1 c 抗体の少なくとも 1 種を不溶性担体であるラテックス粒子に感作し、検体試料及び抗 H b モノクローナル抗体に接触させることにより、試料中の H b A 0 又は H b A 1 c を介して抗体感作ラテックス粒子同士が架橋し凝集を生じるため、この凝集度の変化から当該 H b A 0 又は H b A 1 c を特異的に定量できる。

あるいは競合ラテックス凝集法で測定する場合には、精製した H b A 0 又は H b A 1 c を標準品として次のような方法で定量することができる。すなわち、V H L T P E（配列番号 1）又は f - V H L T P E の少なくとも 1 種を不溶性担体であるラテックス粒子に感作し、検体試料、及び本発明のモノクローナル抗体又は抗 H b A 1 c 抗体の少なくとも 1 種を接触させることにより、ペプチド感作ラテックス粒子と抗体による凝集反応に対して検体試料中の H b A 0 又は H b A 1 c が競合阻害を示すため、この競合阻害の変化から当該 H b A 0 又は H b A 1 c を特異的に定量できる。

検体試料としては、H b A 0 又は H b A 1 c を含有するヒト体液であれば特に制限されず、例えば血液、赤血球画分等が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

ラテックス凝集法等におけるラテックス粒子としては、ラテックス凝集反応を利用した免疫学的凝集反応及び凝集阻止反応において、一般的に用いられている微粒子の担体であれば特に制限されないが、工業的に大量生産することができる有機系微粒子が好ましい。このような有機系微粒子としては、例えば、スチレン、塩化ビニル、アクリロニトリル、酢酸ビニル、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル等のビニル系モノマーの単独重合体又は共重合体；スチレン - ブタジエン共重合体、メチルメタクリレート - ブタジエン共重合体等のブタジエン系共重合体等が挙げられる。また、このような有機系微粒子に、カルボキシル基、第一級アミノ基、カルバモイル基、水酸基、アルデヒド基等の官能基が結合した反応性有機系微粒子も好ましく使用することができる。上記のラテックス粒子の中では、抗原又は抗体の吸着性に優れ、生物学的活性を長期間安定に保持できる点から、ポリスチレン、スチレン - ブタジエン共重合体等のポリスチレン系ラテックス粒子が好ましい。

【 0 0 2 7 】

ラテックス粒子の形状は特に制限されないが、その平均粒子径は、ラテックス粒子表面の蛋白質と測定対象物質との凝集反応の結果生じる凝集体が肉眼又は光学的に検出できるに十分な大きさが望ましい。好ましい平均粒子径としては 0 . 0 2 ~ 1 . 6 μ m であり、特に 0 . 0 3 ~ 0 . 5 μ m が好ましい。

【 0 0 2 8 】

ラテックス粒子に本発明のモノクローナル抗体又は抗 H b A 1 c 抗体を感作する方法は、特に制限されず、公知の方法が使用できる。例えば、ラテックス粒子表面に物理的に吸着させる方法、官能基を有するラテックス粒子表面に共有結合させる方法、及び免疫学的結合によって感作する方法などが挙げられる。

【 0 0 2 9 】

イムノクロマト法で測定する場合には、H b A 0 と H b A 1 c とが同時に測定できるので特に好適である。例えば図 1 に示す如く、本発明モノクローナル抗体及び抗 H b A 1 c 抗体とをそれぞれ別の部位（A ライン及び B ライン）に固定化したイムノクロマト支持体を用いる。図 1 中の露出化処理には、グアニジン又はその塩と非イオン性界面活性剤、グアニジン又はその塩と亜硝酸塩、グアニジン又はその塩と非イオン性界面活性剤と亜硝酸

10

20

30

40

50

塩、もしくは従来公知のグアニジン、チオシアン酸、チオシアン酸リチウム、フェリシアニド、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等を用いることができる。エピトープが露出化されたHbA0及びHbA1c含有試料をサンプルパットに滴下する。滴下された試料は、毛細管現象により展開され、Aラインに到達すると試料中のHbA0のみが反応し、Bラインに到達すると試料中のHbA1cのみが反応する。その他のヘモグロビンは反応せずにエンドパッドまで移動する。Aライン及びBラインの色の濃さ、反射強度、又は吸光度等をイムノクロマトリーダーで測定すれば、試料中のHbA0及びHbA1cがそれぞれ定量できる。ここで、HbA0の定量値をA、HbA1cの定量値をBとすると、 $HbA1c(\%) = (B / (A + B)) \times 100$ として、HbA1c(%)を求めることも出来る。

10

【0030】

また、上記イムノクロマト支持体において、予めサンプルパッド上にカラーラテックス結合抗Hb抗体を含浸させておく(図2)。図2中の露出化処理は、上記と同じものが用いられる。露出化処理されたHbA1c含有試料をサンプルパットに滴下する。滴下された試料中のHb(図2中だ円で示す)が抗Hb抗体と反応し、支持体上を移動する。Aラインにおいては、抗Hb抗体-HbA0-本発明抗体のサンドイッチ複合体が形成される。一方、Bラインにおいては、抗Hb抗体-HbA1c-抗HbA1c抗体のサンドイッチ複合体が形成される。その他のHbと抗Hb抗体との結合物はエンドパッドまで移動する。形成された前記のサンドイッチ複合体量を、Aライン及びBラインの色の濃さ、反射強度、又は吸光度等をイムノクロマトリーダーで測定すれば、試料中のHbA0及びHbA1cがそれぞれ定量できる。ここで、HbA0の定量値をA、HbA1cの定量値をBとすると、 $HbA1c(\%) = (B / (A + B)) \times 100$ として、HbA1c(%)を求めることも出来る。

20

なお、カラーラテックスの代わりに金コロイド粒子等も使用可能である。

【0031】

ここで抗HbA1c抗体としては、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、例えば特許文献(特開昭61-172064号公報、特開平6-66796号公報)記載のもの等が使用可能である。

【0032】

なお、上記免疫学的測定法を実施するにあたって、本発明の抗体を使用して製造された当該抗体を含む免疫学的測定用キットを用いることができる。当該キットは、免疫学的測定法に用いる一般的な構成要素、例えば、標識物、担体、支持体、緩衝液、安定化剤、反応器等を含んでいてもよい。

30

【実施例】

【0033】

次に実施例を挙げ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(ハイブリドーマの作製と抗体の獲得)

(I) 材料と方法

40

(1) 精製HbA0及び精製HbA1cの調製

ヒト赤血球溶血液を非特許文献(Melissenda J. McDonald et al、JBC、253(7)、2327-2332、1978)記載のBio-Rex70(バイオラッド社)を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより、HbA0及びHbA1cを精製し、以降の実験に用いた。

【0035】

(2) 各種ペプチド及び糖化ペプチドの調製

各配列のペプチドは、ペプチド自動合成装置を用いFmoc法により合成、及び精製した。各ペプチドの純度はHPLCで、95%以上であることを確認した。また、分子量は、質量分析装置(MALDI-TOF)にて理論値と同じであることを確認した。糖化ペ

50

プチドは、特許文献（特開昭61-172064号公報）記載の方法にて合成及び精製した。すなわち、各配列のペプチドとグルコースを無水ピリジン中で反応させHPLCで精製した。各糖化ペプチドの分子量は、質量分析装置（MALDI-TOF）で理論値、すなわち各ペプチドの分子量に162を加算した分子量と同じであることを確認した。

【0036】

（3）抗Hb抗体、及び抗HbA1c抗体の調製

抗Hb抗体は、上記（1）の精製HbA0を免疫原として定法にて作製したマウスモノクローナル抗体を使用した。抗HbA1c抗体は、特許文献（特開昭61-172064号公報）記載の方法にて作製したマウスモノクローナル抗体を使用した。すなわち、上記（2）で合成した糖化ペプチド（f-VHLTPPEEKYYC）（配列番号9）をKLHに結合させ、これを免疫原とした。ハイブリドーマのスクリーニングでは、抗原固相化ELISAで精製HbA1cと反応し、且つ精製HbA0と反応しない株を選択した。

10

【0037】

（4）免疫用抗原の調製

a. ヒトヘモグロビン 鎖N末端ペプチドのC末端側にシステインを結合させた各配列のペプチド（VHLC（配列番号3）、VHLC（配列番号4）、VHLTPC（配列番号5）、VHLTPEC（配列番号6））を上記（2）のように調製した。これらを0.15mol/L NaCl含有20mmol/Lリン酸緩衝液pH7.2（以下、「PBS」という）に5mg/mLの濃度で溶解した。

b. 市販（PIERCE社製）のマレイミド活性型の各キャリアタンパク（OVA、BSA、cBSA、KLH）を精製水に5mg/mLの濃度で溶解した。

20

c. 上記ペプチド溶液とキャリアタンパク溶液を1対1で混和後、室温で緩やかに回転させながら2時間インキュベートした。

d. その後、4で2日間、PBS中にて透析を行った。

e. 透析後の液を回収し、各免疫用抗原として使用した。

【0038】

（5）免疫と試験採血

前記免疫用抗原をアジュバントと1:1で混合後、連結シリンジを用いてエマルジョンを作製した。これを雌のBALB/cマウスの背部皮下に注入した（1匹当たり20~50μg）。この操作（免疫）を2週間毎に5回繰り返した。免疫開始6週間後に各マウスの眼底からマウス抗血清を採取し、後述する抗原固相化ELISA法にて該抗血清中の抗体価を確認した。なお、いずれのELISA法においても、免疫していないマウスの眼底から採取した血清をコントロールとして用いた。

30

【0039】

（6）細胞融合

前記試験採血にて高い抗体価が確認されたマウスから脾臓を摘出し、50%-PEG1450（シグマ社製）を用いた常法により細胞融合を行った。ミエローマ細胞はSP2/Oを用いた。得られた融合細胞は、脾臓細胞として 2.5×10^6 /mLになるようにHAT及び15%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地に懸濁し、96穴培養プレートに0.2mLずつ分注した。これを5%CO₂インキュベーター中で37にて培養した。

40

【0040】

（7）スクリーニング

細胞融合10日後に1次スクリーニングとして、培養上清を用いて後記抗原固相化ELISA法を行い、精製HbA0に対し高い反応性を示したwellを1次陽性wellとして選別した。該1次陽性well中の細胞は、24穴プレートにおいて継代した。

継代2日後、2次スクリーニングとして、培養上清を用いて後記競合ELISA法を行い、ヒトヘモグロビン 鎖N末端ペプチド（VHLTPPE）（配列番号1）に対し高い反応性を示し、且つ同じアミノ酸配列の糖化ペプチド（f-VHLTPPE）に反応を示さなかったwellを2次陽性wellとして選択した。

50

【0041】

(8) クローニング及びイムノグロブリン(抗体)採取

2次スクリーニングで選別した5株のハイブリドーマを、限界希釈法にてクローニングした。次いで、各ハイブリドーマが産生するイムノグロブリン(抗体)を採取するため、2週間前にプリスタン0.5mLを腹腔内に注射しておいた12週齢の雌BALB/cマウスに、ハイブリドーマを細胞数 0.5×10^6 個の量で腹腔内に投与した。14日後に腹水を採取し、遠心処理して上清を得た。上清を等量の吸着用緩衝液(3mol/L NaCl、1.5mol/L Glycine-NaOH緩衝液、pH8.5)と混和後、ろ過した。該ろ液を、吸着用緩衝液で平衡化したプロテインAセファロースカラムに通し、ろ液中の抗体をカラムに吸着させた後、0.1mol/Lクエン酸緩衝液(pH3.0)で溶出させた。該溶出液を、1mol/L Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で中和後、PBSで透析を行い、抗体を採取した。

10

【0042】

(9) ELISA用プレートの作製

PBSに溶解して $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製した精製HbA0をスクリーニング用抗原として、 $50 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ96穴プレートに固相化し、4℃で一晩静置した。0.05%Tween20含有PBS(以下、「PBST」という) $400 \mu\text{L}/\text{well}$ で3回洗浄後、1%BSA含有PBST(以下、「1%BSA-PBST」という)を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で1時間静置してブロッキングを行い、ELISA用プレートを作製した。該ELISA用プレートは、PBSTで3回洗浄後、各試薬を添加して実施例記載の各ELISA法試験に用いた。

20

【0043】

(10) 抗原固相化ELISA法

a. ELISA用プレートに、1%BSA-PBSTにより段階希釈した各マウス抗血清、あるいは融合細胞の培養上清を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。

b. PBSTで3回洗浄後、HRP-GtF(ab')₂-Anti-Mouse Ig'g's(Biosource社製)を1%BSA-PBSTで5000倍希釈した溶液を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。

c. PBSTで3回洗浄後、オルトフェニレンジアミン塩酸塩を含む発色液(オルトフェニレンジアミン塩酸塩(東京化成社製)を $2 \text{mg}/\text{mL}$ 、過酸化水素を0.02%の濃度でpH5.0のクエン酸緩衝液に溶解)(以下、「OPD発色液」という)を分注し($50 \mu\text{L}/\text{well}$)、室温で10分間静置した。

30

d. $0.75 \text{mol}/\text{L}$ 硫酸を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注して反応を停止した後、プレートリーダーで492nmの吸光度を測定した。

【0044】

(11) 競合ELISA法

a. ELISA用プレートにヒトヘモグロビン鎖N末端ペプチド(VHLTPE)(配列番号1)、又は同じアミノ酸配列の糖化ペプチド(f-VHLTPE)を1%BSA-PBSTで適当な濃度に希釈した溶液を $25 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注した。

40

b. 次いで、1%BSA-PBSTで適当な濃度に希釈した融合細胞の培養上清を $25 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。

以降の操作は、前記(10)抗原固相化ELISA法の工程イ~エと同様に行った。

【0045】

(II) 結果

(1) 試験採血における抗原固相化ELISA法試験の結果

試験採血を行い、抗原固相化ELISA法により各マウス抗血清中抗体の精製HbA0に対する反応性を調べた結果、6種のマウス抗血清全てにおいてHbA0に対する反応性が確認された(図3)。本実施例で得られた各マウス抗血清は、免疫用抗原であるヒトヘモグロビン鎖N末端ペプチドとキャリアタンパクの複合体、及びスクリーニング用抗原

50

であるHbA0中の共通部分であるHb鎖のN末端配列を特異的に認識する抗体を含むと考えられた。

【0046】

(2)スクリーニング

1次スクリーニングで固相化された精製HbA0に高い反応性を示した株を選択し、さらにその選択株について2次スクリーニングを実施した結果、5種の抗体(85201、85202、85203、85204、及び85206)は、ヒトヘモグロビン鎖N末端ペプチド(VHLTPE)(配列番号1)に対し高い反応性を示し、且つ同じアミノ酸配列の糖化ペプチド(f-VHLTPE)に反応性を示さないことが判明した。

【0047】

(3)クローニング及びイムノグロブリン(抗体)採取

2次スクリーニングで選択された5種についてクローニングを実施し、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを独立行政法人産業技術総合研究所(2008年11月28日付け、日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1中央第6)に寄託した。受託番号は以下のとおりである。

【0048】

抗体番号：受託番号

85201	: FERM	BP-11187
85202	: FERM	BP-11188
85203	: FERM	BP-11189
85204	: FERM	BP-11190
85206	: FERM	BP-11191

【0049】

実施例2(各ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の特異性評価)

(I)材料と方法

(1)試薬の調製

評価に用いた各抗原及び各抗体は、実施例1の(1)から(4)と同様の操作で調製した。また、HPLCフラクションは、ヒト赤血球溶血液を東ソー社製のTSK-gel G1ycosilカラムを用いたK0500法により分離し、フラクションコレクターを用い回収した各フラクションを用いた。抗原固相化ELISAに添加するとき、各フラクションをPBSで6倍希釈して使用した。

【0050】

(2)特異性の評価

実施例1の抗原固相化ELISA及び競合ELISA法と同様に行った。但し、用いた抗体は精製IgG(モノクローナル抗体:0.2µg/mL)である。

【0051】

(II)結果

(1)ペプチド及び糖化ペプチドに対する反応性

まず、図4に示すように、競合ELISAにおいて試験に用いた特異抗体(85201、85202)はともにヒトヘモグロビン鎖N末端ペプチド(VHLTPE)(配列番号1)に対してのみに反応し、同じアミノ酸配列の糖化ペプチド(f-VHLTPE)には反応しないことが確認された。また、図5に示すように、ヒトヘモグロビン鎖N末端ペプチド(VLSPAD)には反応しないことが確認された。他の3種の特異抗体(85203、85204、85206)についても同様に試験した結果、VHLTPE(配列番号1)に対してのみ反応し、且つf-VHLTPE及びVLSPAD(配列番号10)には反応しないことが確認された。

(2)精製HbA0及び精製HbA1cに対する反応性

図6に示すように、抗原固相化ELISAにおいて、まず、対照として用いた抗Hb抗体は精製HbA0及び精製HbA1cに対し同等に反応した。これに対し、試験に用いた特異抗体(85201)はHbA1cには反応せず、HbA0に対してのみ反応した。他

10

20

30

40

50

の4種の特異抗体(85202、85203、85204、及び85206)についても同様に試験した結果、精製HbA0に対してのみ反応し、精製HbA1cには反応しないことが確認された。

(3) HPLCフラクションに対する反応性

図7に示すように、抗原固相化ELISAにおいて、まず、対照として用いた抗Hb抗体は、HbA1c及びHbA0の両方に反応し、また、同じく対照として用いた抗HbA1c抗体は、HbA1cのピークのみ反応しHbA0のピークには反応しなかった。これに対し、試験に用いた3種の特異抗体(85201、85202、85206)はHbA1cには反応せず、HbA0に対してのみ反応した。他の2種の特異抗体(85203、85204)についても同様に試験した結果、HbA0に対して反応し、HbA1cには反応しないことが確認された。

10

【0052】

以上の結果から、試験に用いた5種の特異抗体はHbA1cには反応せず、HbA0に対してのみ反応すること、また、これらの抗体は、ヘモグロビン鎖N末端ヘキサペプチド配列(VHLTP E)(配列番号1)を検出できることが確認された。

【0053】

実施例3(ELISAによるHbA1c値の測定)

(I) 材料と方法

(1) 抗HbA1c抗体、及び抗Hb抗体の調製

測定に用いた抗HbA1c抗体及び抗Hb抗体は、実施例1の(I)(3)と同様に調製した。

20

【0054】

(2) ビオチン標識抗Hb抗体の調製

上記(1)の抗Hb抗体を市販のビオチン標識試薬(PIERCE社、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin)を用い、次のように標識した。10mg/mLの濃度でPBSに溶解したビオチン標識試薬0.05mLを1mg/mLの濃度の抗Hb抗体液1mLに添加し、室温で2時間反応させた。反応後、PBSで透析し測定に使用した。

【0055】

(3) 検体及び標準試料の調製

社内ボランティアよりEDTA-2Na入りの真空採血管(積水メディカル社製)に採血し、遠心分離により赤血球を分離した。この赤血球4 μ Lと抗原処理液(1%Tween 20-10mmol/L NaNO₂-3mol/L グアニジン塩酸塩-5mmol/L MES、pH6.0)0.2mLを混和した。25 $^{\circ}$ Cで10分間放置後、その混合液を3%スキムミルク-PBSTで段階希釈し、下記サンドイッチELISAの検体として使用した。尚、標準試料は、下記HPLC法により予めHbA1c濃度及びHbA0濃度を求めておいた別人の検体を用いた。

30

【0056】

(4) サンドイッチELISAによるHbA0量(濃度)の測定

a. 実施例1で獲得した特異抗体(85201)をPBSで5 μ g/mLの濃度に希釈した。これをELISAプレートに50 μ L/wellずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで1夜静置した。

40

b. PBST(350 μ L/well)で3回洗浄後、1%BSA-PBSTを100 μ L/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

c. PBSTで3回洗浄後、上記(3)で処理した標準試料又は検体を50 μ L/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

d. PBSTで3回洗浄後、1%BSA-PBSTで1 μ g/mLの濃度に希釈したビオチン標識抗Hb抗体を50 μ L/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

e. PBSTで3回洗浄後、1%BSA-PBSTで1 μ g/mLの濃度に希釈したHRP-Streptavidin(PIERCE社製)を50 μ L/wellずつ分注し

50

、室温で30分間静置した。

f. P B S Tで3回洗浄後、O P D発色液を分注し(50 μ L / w e l l)、室温で10分間静置した。

g. 0.75 mol / L硫酸を50 μ L / w e l lずつ分注して反応を停止した後、プレートリーダーで492 nmの吸光度を測定した。

h. 各濃度の標準試料の吸光度をもとに検量線を作成し、それを用い検体の濃度を求めた。

【0057】

(5) サンドイッチE L I S AによるH b A 1 c量(濃度)の測定

上記(4)と同様の方法で、特異抗体(85201)の代わりに抗H b A 1 c抗体を用いH b A 1 c濃度を測定した。

【0058】

(6) H b A 1 c値の算出

上記(4)及び(5)で求めたH b A 0濃度及びH b A 1 c濃度をもとに下記式よりH b A 1 c値(H b A 1 cの含有率)を求めた。

【0059】

$$\text{H b A 1 c 含有率}(\%) = (\text{H b A 1 c 量}(\text{濃度}) / (\text{H b A 1 c 量}(\text{濃度}) + \text{H b A 0 量}(\text{濃度}))) \times 100$$

【0060】

(7) H P L C法によるH b A 1 c値の測定

東ソー自動グリコヘモグロビン分析計H L C - 7 2 3 G 8を用い、全ヘモグロビン中のH b A 1 cの含有率を測定した。

【0061】

(I I) 結果

(1) 検量線

標準試料を用い、H b A 0濃度測定系、及びH b A 1 c濃度測定系の検量線を作成した。図8に示すように、両測定系ともに各抗原濃度依存的に吸光度の上昇が確認された。

(2) H P L C法による測定値との比較

本発明抗体を用い上記サンドイッチE L I S Aで求めたH b A 1 c値とH P L C法で求めたH b A 1 c値を比較した。健常者5名より採取した検体を用い両方法でそれぞれH b A 1 c値を求めた。その結果、表1に示すように、両方法で求めたH b A 1 c値は概ね同じような値を示した。

【0062】

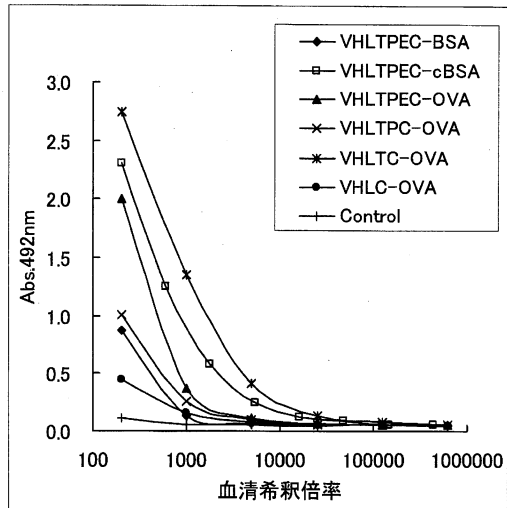
【表1】

No.	H b A 1 c (%)	
	東ソーH P L C	サンドイッチE L I S A
1	5.2	5.3
2	5.2	4.5
3	4.8	4.4
4	4.8	5.2
5	5.0	5.5

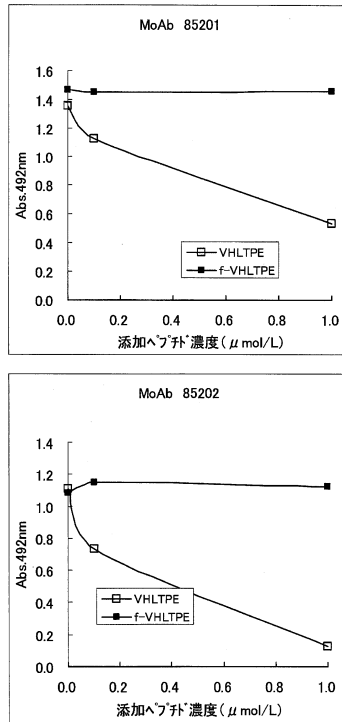
【0063】

以上の結果から、本発明の抗体がH b A 0量(濃度)、H b A 1 c量(濃度)、及びH b A 1 c値(H b A 1 cの含有率)の定量測定に使用できることが確認された。

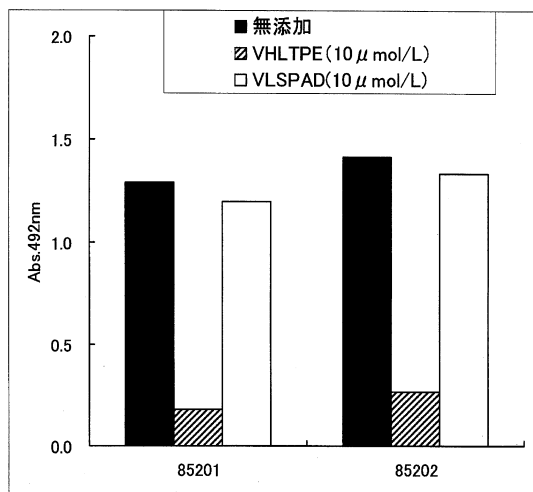
【 図 3 】



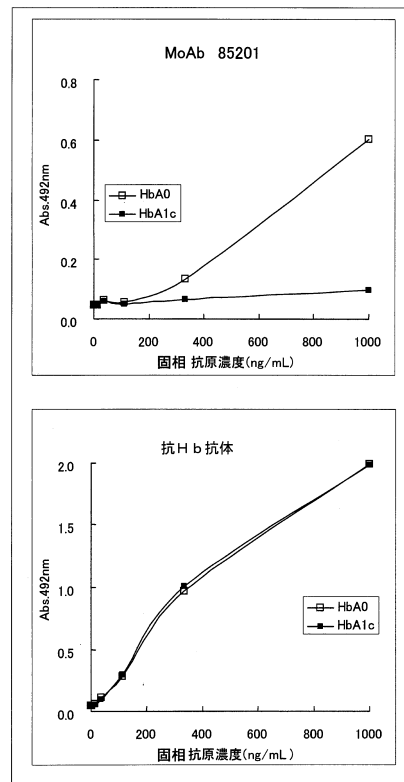
【 図 4 】



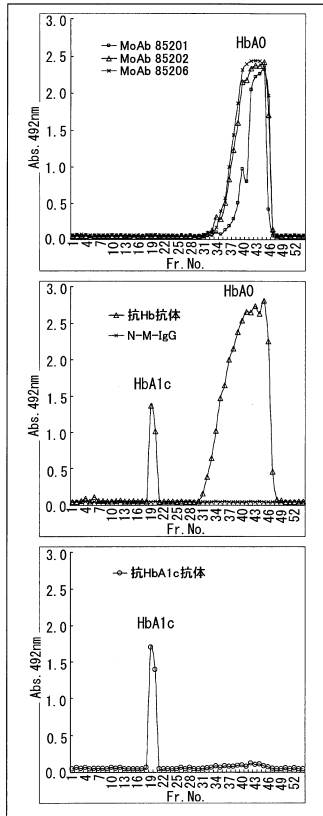
【 図 5 】



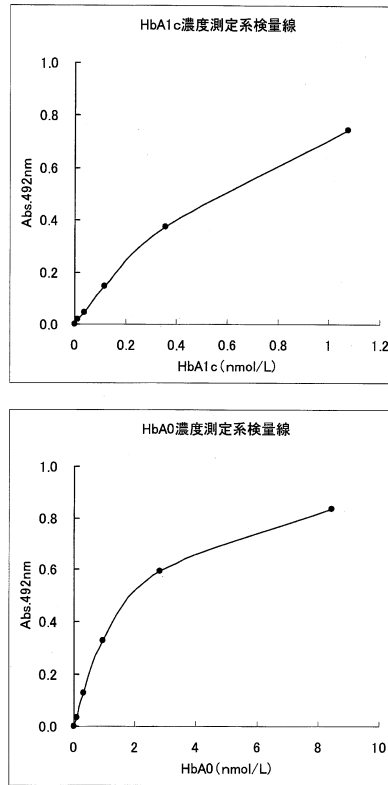
【 図 6 】



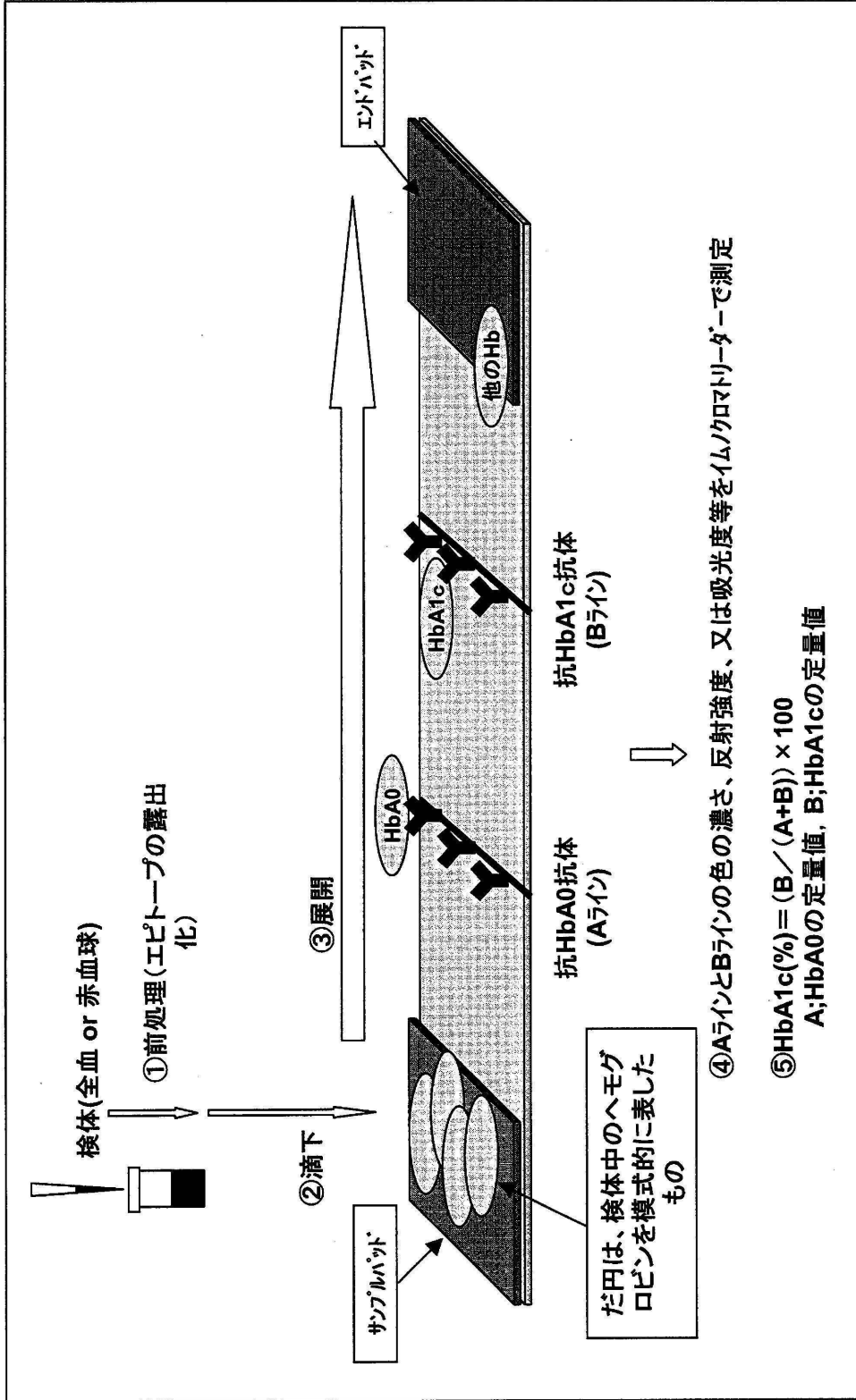
【 図 7 】



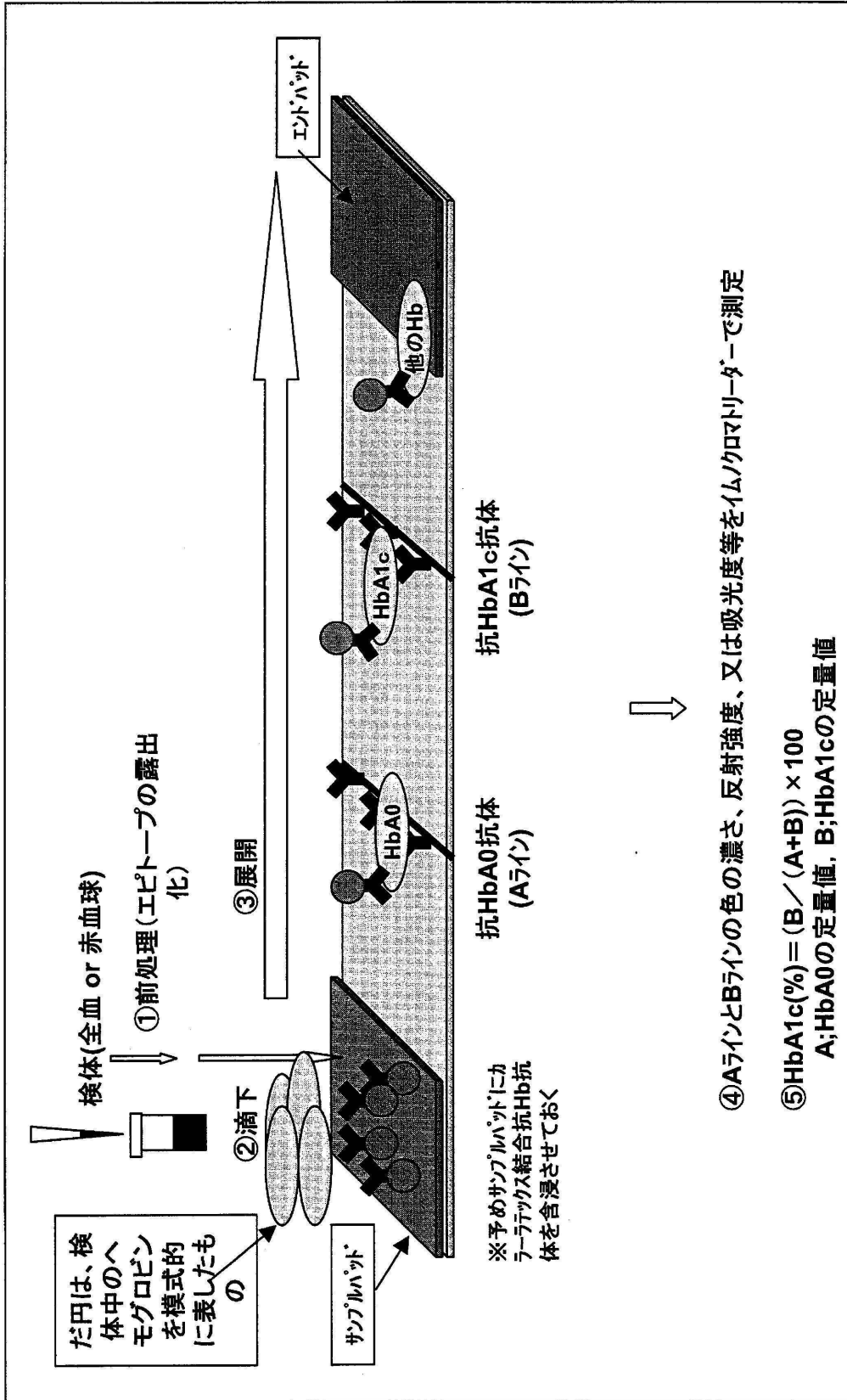
【 図 8 】



【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

0005743550000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
 C 0 7 K 7/06 (2006.01) G 0 1 N 33/577 B
 C 0 7 K 7/06

前置審査

(72) 発明者 宮崎 修
 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
 (72) 発明者 田久保 耕平
 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
 (72) 発明者 藏下 俊祐
 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

審査官 松原 寛子

(56) 参考文献 特開2004-059477(JP,A)
 特開昭61-172064(JP,A)
 特開平06-066796(JP,A)
 JEPPSSON, J.O. et al., Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood., Clin. Chem. Lab. Med., 2002年 1月, Vol.40, No.1, pp.78-89
 富永真琴他, 糖尿病関連検査の標準化に関する委員会: ヘモグロビンA1c標準物質JDSLot2のIFCC値について, 糖尿病, 2003年 9月, Vol.46, No.9, pp.775-8

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 / 1 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 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)

专利名称(译)	针对血红蛋白β链的N-末端区域的抗体		
公开(公告)号	JP5743550B2	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	JP2010542027	申请日	2009-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	宫崎修 田久保耕平 藏下俊祐		
发明人	宫崎 修 田久保 耕平 藏下 俊祐		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/577 C07K7/06		
CPC分类号	C07K16/18 C07K14/805 C07K2317/14 C07K2317/33 C07K2317/34 C12N5/163 G01N33/531 G01N33/721 G01N33/723		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 C12N15/00.C G01N33/53.K G01N33/53.D G01N33/577.B C07K7/06		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2008316173 2008-12-11 JP		
其他公开文献	JPWO2010067611A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

它提供了一种测量HbA1c含量的通用方法，类似于IFCC合规法。一种抗体，其在N-末端具有氨基酸序列VHLTPE (SEQ ID NO : 1) 并与其中N-末端缬氨酸未被修饰的肽或蛋白质反应，并且不与其中多肽或蛋白质的N-末端缬氨酸被修饰的肽或蛋白质反应。

(21) 出願番号	特願2010-542027 (P2010-542027)	(73) 特許権者	390037327
(86) (22) 出願日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		积水メディカル株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/006768		東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(87) 国際公開番号	W02010/067611	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成22年6月17日 (2010.6.17)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	平成24年6月26日 (2012.6.26)	(74) 代理人	100077562
(31) 優先権主張番号	特願2008-316173 (P2008-316173)		弁理士 高野 登志雄
(32) 優先日	平成20年12月11日 (2008.12.11)	(74) 代理人	100096736
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11187		弁理士 村田 正樹
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11188	(74) 代理人	100111028
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11189		弁理士 山本 博人
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11190		
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11191		