

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 4 月 2 日(02.04.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/046444 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/075667
- (22) 国際出願日: 2014 年 9 月 26 日(26.09.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-200745 2013 年 9 月 27 日(27.09.2013) JP
- (71) 出願人: 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 太田 英樹(OHTA, Hideki); 〒5610825 大阪府豊中市二葉町 3 丁目 1 番 1 号 塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP). 山内 晃(YAMAUCHI, Akira); 〒5610825 大阪府豊中市二葉町 3 丁目 1 番 1 号 塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP). 瀬月 内 健一(SETSUKINAI, Ken-ichi); 〒5610825 大阪府豊中市二葉町 3 丁目 1 番 1 号 塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP). 岡本 博之(OKAMOTO, Hiroyuki); 〒5610825 大阪府豊中市二葉町 3 丁目 1 番 1 号 塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 高山 裕貢, 外(TAKAYAMA, Hirotsugu et al.); 〒5610825 大阪府豊中市二葉町 3 丁目 1 番 1 号 塩野義製薬株式会社 知的財産部 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ANTIALDOSTERONE ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗アルドステロン抗体

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a monoclonal antibody capable of binding specifically to aldosterone. The present invention therefore provides a monoclonal antibody having high affinity and low cross-reactivity with aldosterone.

(57) 要約: 本発明は、アルドステロンに対して特異的に結合することができるモノクローナル抗体を提供することを目的とする。そのため、本発明は親和性が高く、交差反応性が小さいアルドステロンに対するモノクローナル抗体を提供する。



WO 2015/046444 A1

明 細 書

発明の名称：抗アルドステロン抗体

技術分野

[0001] 本発明は、アルドステロン（ALD）を認識するモノクローナル抗体またはその断片、これらを用いたアッセイ方法または診断方法、およびこれらを含むキットに関する。

背景技術

[0002] 高血圧は、日本における代表的な生活習慣病であり、総患者数は約4400万人とも報告されている。全高血圧の約90%は本態性高血圧であり、約10%は二次性高血圧が占める。この二次性高血圧のほとんどは、原発性アルドステロン症（Primary Aldosteronism; PA）と呼ばれる疾患であり日本人の推定患者数は、220～440万人とされる。

[0003] この疾患は、副腎皮質からの自律的アルドステロンの過剰分泌に起因する。この過剰分泌によって腎におけるナトリウム再吸収とカリウム排出が亢進する結果、循環血漿量が増加し、高血圧、低カリウム血症、血漿レニン活性（PRA）の抑制が引き起こされる。また、患者が脳卒中や心筋梗塞になる確率は、本態性高血圧の4～6倍にいたる。

[0004] 原発性アルドステロン症の診断には、血漿アルドステロン濃度（Plasma Aldosterone Concentration; PAC）を測定して、血漿アルドステロン濃度と血漿レニン活性の比（血漿アルドステロン濃度／血漿レニン活性：plasma Aldosterone-Renin Ratio; ARR）を求めることが臨床上推奨されている（原発性アルドステロン症の診断治療ガイドライン、日本内分泌学会、2010年）

[0005] モノクローナル抗体を用いたアルドステロンの測定方法に関しては多くの報告が存在している（例えば、非特許文献1～5）。一方、アルドステロンについては、生体内には類似体が数多く存在することから、これら類似体との交差反応を回避できる特異性の高いモノクローナル抗体の取得が試みられて

きた（特許文献1、非特許文献6～7）。

[0006] アルドステロンの体外診断薬はRIA（Radioimmunoassay）製品しかなく、設備の整っていない医療機関では簡便に測定・診断が出来ないという問題がある。non-RIAタイプのアルドステロン測定キットは販売されているが、精度の担保不足やアルドステロンに対する特異性が低いなどの問題がある。このような事実は、アルドステロンが関与する疾患が見過ごされ、効果の無い治療薬が投薬されている可能性を示唆する。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：旧東ドイツ特許公開264024号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Steroids（2009）、74（4-5）、456-462

非特許文献2：Journal of Endocrinology（2008）、196（2）、215-224

非特許文献3：Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence（1990）、5（1）、49-52

非特許文献4：Clinical Biochemistry（1989）、22（4）、289-292

非特許文献5：Clinical Chimica Acta（1987）、164（1）、71-82

非特許文献6：Steroids（1987）、49（6）、581-7

非特許文献7：Journal of Steroid Biochemistry（1987）、28（5）、459-63

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の目的は、アルドステロンに対して特異的に結合することができるモノクローナル抗体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは尿中または血中のアルドステロンを測定するために、親和性が高く、交差反応性が小さいモノクローナル抗体を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、

(1) (A) 下記アミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

T S D Y A W N (配列番号3)、Y I N Y S G R T G Y N P S L K S (配列番号4)、およびR P Y S Y G P T Y G F T Y (配列番号5)、あるいは、これらの3つのCDRのうちの1つ以上のCDRにおいて1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる3つのCDR、および

(B) 下記アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

R S S T G P V T T S N Y A N (配列番号6)、G L I G G I N K R A P (配列番号7)、およびA L W Y S N H W L (配列番号8)、あるいは、これらの3つのCDRのうちの1つ以上のCDRにおいて1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる3つのCDR、を有する、アルドステロンに対するモノクローナル抗体またはその抗体断片、

(2) (A) 配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、あるいは配列番号1のアミノ酸配列のうち配列番号3、配列番号4および配列番号5で示されるCDR以外の部分において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸を有する重鎖可変領域；および

(B) 配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、あるいは配列番号2のアミノ酸配列のうち配列番号6、配列番号7および配列番号8で示されるCDR以外の部分において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸を有する軽鎖可変領域、を有する、アルドステロン

に対するモノクローナル抗体またはその抗体断片、

(3) 標識されたものである前記(1)および(2)のいずれかに記載の抗体またはその抗体断片、

(4) 前記(1)～(3)のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片を含むキット、

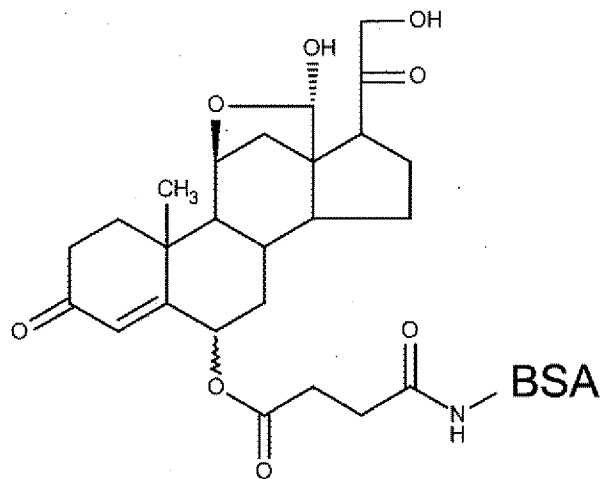
(5) 前記(1)～(3)のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いたアッセイ方法、

(6) 前記(1)～(3)のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた、アルドステロンが関与する疾患に罹患している被験者由来の試料の選別方法、および

(7)

以下の式(I)で示される化合物を、BALB/cマウスに皮下免疫する工程を含むアルドステロンに対するモノクローナル抗体の製造方法。

[化1]



に関する。

発明の効果

[0011] 本発明のモノクローナル抗体は、アルドステロンを特異的に認識し、高い親和性をもって結合するため、当該アルドステロンの特異的検出に有用である。かかる本発明のモノクローナル抗体、その一部またはこれらの標識物（またはこれらのいずれかを含むアルドステロン検出試薬）並びにそれを利用し

たアルドステロンの特異的検出法によれば、アルドステロンの発現（発現亢進、発現不全／減少）に関連して生じる種々の疾患や病態を、免疫化学的または免疫組織学的に診断することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、免疫用抗原および抗体スクリーニング用抗原の調製法を示したものである。

[図2]図2は、抗体のスクリーニング方法（A）とアルドステロン測定方法（B）を示したものである。

[図3A]図3Aは、KLHコンジュゲート、A/Jマウスおよび腹腔投与を組み合わせた場合の抗体価の推移を示したものである。

[図3B]図3Bは、BSAコンジュゲート、A/Jマウスおよび皮下投与を組み合わせた場合の抗体価の推移を示したものである。

[図3C]図3Cは、BSAコンジュゲート、BALB/cマウスおよび皮下投与を組み合わせた場合の抗体価の推移を示したものである。

[図4]図4は、アルドステロン測定の標準曲線を示したものである。比較対象の対外診断薬（スパック-S-アルドステロンキット）の標準曲線も示した。

[図5]図5は、アルドステロンおよびその類似物に対する交差反応性を調べたものである。

[図6]図6は、本抗体の交差反応性を調べたものである（濃度範囲は、0.1 nM～100 μM）。

[図7A]本発明のモノクローナル抗体の交差反応性を調べたものである。

[図7B]市販のアルドステロンキット（A社：Alpco社）の交差反応性を調べたものである。

[図7C]市販のアルドステロンキット（C社：Cayman Chemical社）の交差反応性を調べたものである。

発明を実施するための形態

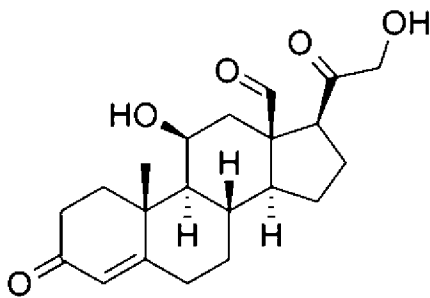
[0013] 1. モノクローナル抗体、及びその製造方法

以下、本発明で用いられる各種用語の意味を明らかにすることにより、本発

明のモノクローナル抗体、およびその製造方法を詳細に説明する。

[0014] 本発明において「アルドステロン」とは、以下の化学式で示される。アルドステロンは、副腎皮質球状層で生成・分泌される鉱質コルチコイドであり、電解質の恒常性・循環血液量・血圧の維持に重要な役割を果たしている。健康人における血漿濃度は $35 - 240 \text{ pg/ml}$ であるとされている。このアルドステロンが関与する高値の疾患としては原発性アルドステロン症、バーター症候群などが、また低値の疾患としてはアジソン病、先天性副腎皮質酵素欠損、低レニン性低アルドステロン症などが疑われる。

[化2]



[0015] 本発明の「モノクローナル抗体」とは、このアルドステロンに特異的に結合するモノクローナル抗体である。特異的に結合できるとは、類似物質に対して交差反応性が少ないことを意味する。

[0016] 「交差反応性」は、免疫交差反応性のことをいう。ある抗原で免疫することにより得られた抗体が別の抗原（関連抗原）とも結合反応を示すときに、この反応を交差反応という。目的とする抗原とその抗体の反応量を基準とした場合に関連抗原とその抗体との反応量の程度を交差反応性として示すことができる。交差反応性の値が小さいほど、目的の抗原に対して特異性を有することを示す。

[0017] アルドステロンに対する抗体については、アルドステロンがその生合成原料の 18-ヒドロキシコルチコステロン とその構造が類似していることにより交差反応が起きやすいと考えられる。本発明にかかるモノクローナル抗体はアルドステロンと特異的に結合するモノクローナル抗体であり、アルドステロンに対する反応性を 100% とした場合、 18-ヒドロキシコルチコステ

ロンに対する交差反応性が0.01%以下であった。

[0018] 本発明のモノクローナル抗体は、アルドステロンに対して高い親和性を有していることをもうひとつの特徴として挙げられる。「親和性 (a f f i n i t y)」とは抗原抗体間の結合力をいう。本明細書中においては、抗体に対する標識したアルドステロンの結合量を50%阻害するアルドステロンの濃度 (I C 5 0 値) を指標として親和性を示した。I C 5 0 値は l o g i s t i c 曲線による回帰モデル (R o d b a r d ら、S y n p o s i u m o n R I A a n d r e l a t e d p r o c e d u r e s i n m e d i c i n e, P 1 6 5, I n t. A t o m i c E n e r g y A g e n c y, 1 9 7 4) で算出した。

[0019] 原発性アルドステロン症などの診断には、アルドステロン濃度およびアルドステロン／レニン活性が用いられる。このアルドステロン／レニン活性を調べるためにも、正確なアルドステロン濃度の測定が必要とされる。

一方で、アルドステロンの正常値は、随時： 36～240 pg/mL、臥位： 30～159 pg/mL、立位： 39～307 pg/mLであり、正常値を正確に測定可能な感度が要求される（原発性アルドステロン症診断マニュアル（診断と治療社、48ページ））。

この要求を満たすためには、アルドステロン抗体として、25 pg/mL以下の最小検出感度、親和性として5 nM (I C 5 0 %) が必要である。本抗体は、親和性が1 nM (I C 5 0 %)、最小検出限界は5 pg/mLであり上記の要求を満たす抗体であり、血液検体中のアルドステロンを直接測定するのに有用である。

[0020] 本発明のモノクローナル抗体において、好ましい形態としては、配列中に相補性決定領域である、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含み、a) C D R 1 はアミノ酸配列 T S D Y A W N (配列番号3) を有し、C D R 2 はアミノ酸配列 Y I N Y S G R T G Y N P S L K S (配列番号4) を有し、C D R 3 はアミノ酸配列 R P Y S Y G P T Y G F T Y (配列番号5) を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域 (V_H) そして b) C D R 1 はアミノ酸配列 R S

STGPVTTSNYAN（配列番号6）を有し、CDR2はアミノ酸配列GLIGGINKRAP（配列番号7）を有し、CDR3はアミノ酸配列ALWYSNHWL（配列番号8）を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）を含む抗体を挙げることができる。上記のCDR領域の配列は、本発明の所望する活性（例えば、親和性または特異性）が保持される範囲内であれば、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された改変体も本発明のモノクローナル抗体に含まれる。この抗体の免疫グロブリンクラスはIgG₁（λ）に属する。

[0021] 本発明のモノクローナル抗体として、抗体遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carllら、THE THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES、1990年発行）。

[0022] 具体的には、目的とする抗体の可変領域（V領域）をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体の定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。本発明で使用される抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー／プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

[0023] 抗体遺伝子の発現は、抗体の重鎖（H鎖）または軽鎖（L鎖）を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主を形質転換させてもよい（例えば、特許第3559795号参照）。

[0024] 他に、本発明のモノクローナル抗体は、常法に従っても製造できる（Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497. (1975) 参照）。免疫原で免疫した哺乳動

物の形質細胞（免疫細胞）と哺乳動物の形質細胞腫細胞（ミエローマ細胞）との融合細胞（ハイブリドーマ）を作製し、これよりアルドステロンを認識するモノクローナル抗体を産生するクローンをスクリーニングし、選択されたクローンを培養する。

[0025] 免疫原には、アルドステロンを用いて調製することができる。アルドステロンは、合成によって取得してもよく、生体試料から精製してもよい。合成方法は、例えば、*Journal of the Chemical Society, Perkin transactions 1* (1975)、第22巻、2243-51ページ、に記載されている。アルドステロンは、低分子化合物であるため単独で免疫原として抗体を産生することは難しいと考えられることから、キャリアタンパクと複合体を調製することが望ましい。

[0026] キャリアタンパクには、抗原性を高めることが知られている各種のタンパクをいずれも使用できる。その例としては、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、ウシチオグロブリン（BTG）、カギアナカサガイのヘモシアニン（KLH）などの高分子物質のほかに合成ポリペプチドなどを例示できる。

[0027] アルドステロンとキャリアタンパクとの結合は、例えば、活性エステル法を用いれば可能である。その他にカルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、ジアゾ法なども免疫原の作製に用いることができる。*Antibodies: A Laboratory Manual*, (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0028] 免疫原で免疫される哺乳動物としては、一般には、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラットなどが用いられる。

[0029] 免疫方法は一般的方法により、例えば免疫原を哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射などにより投与することにより行い得る。より具体的には、例えば免疫原を生理食塩水含有リン酸緩衝液（PBS）、生理食塩水などで適当濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2～3週間間隔で数回投与する。マウスを用いる場合は、一回の投与量を一

匹あたり50～100 μ g程度とする。ここで前記アジュバントとは抗原と共に投与したとき、非特異的に抗原に対する免疫反応を増強する物質をいう。通常用いられるアジュバントとしては、百日咳ワクチン、フロインドアジュバントなどを例示できる。最終免疫後3～10日目に哺乳動物から形質細胞（免疫細胞）を採取することができる。

[0030] 得られた免疫細胞からハイブリドーマを得るには、例えば、「分子細胞生物学基礎実験法」（南江堂 堀江武一ら 1994）等に記載されている方法により、継体培養可能な細胞とすることを目的として、例えば、センダイウイルスやポリエチレングリコール存在下、形質細胞腫細胞と抗体を産生する免疫細胞とを融合させて、ハイブリドーマを得ることができる。ここで用いられる形質細胞腫細胞は、同じ恒温動物でも同種の恒温動物由来の形質細胞腫細胞を用いることが望ましく、例えばマウスを免疫動物として得られた脾臓細胞と融合させる場合、マウスミエローマ細胞を用いることが好ましい。形質細胞腫細胞はp3 $\times$ 63-Ag8、U1などの公知のものを利用できる。

[0031] ハイブリドーマは、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミン添加培地）により選択し、コロニーが確認された段階で、培養上清に分泌される抗体と抗原との結合を調べる（スクリーニングする）ことにより、目的の抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

[0032] スクリーニングする方法としては、例えば、スポット法、凝集反応法、ウェスタンブロット法、ELISA法などの一般に抗体の検出に用いられている種々の方法が挙げられるが、好ましくは、アルドステロンとの反応性を指標とするELISA法に従い実施される。このスクリーニングによって、アルドステロンと特異的に反応する抗体産生株をスクリーニングすることができる。

[0033] スクリーニングの結果得た抗体産生株のクローニングは、通常の限界希釈法、軟寒天法などにより実施できる。クローニングされたハイブリドーマは、必要に応じて、血清培地または無血清培地で大量培養することができる。この培養によれば、比較的高純度の抗体を培養上清として得ることができる。

また、ハイブリドーマと適合性のある哺乳動物、例えばマウスなどの腹腔に、ハイブリドーマを接種して抗体をマウス腹水として大量に回収することもできる。

[0034] 抗体を含有する培養上清およびマウスの腹水は、常法に従って、硫酸アンモニウム分画、塩析、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー法などにより、精製することができる。

[0035] 本発明において「モノクローナル抗体の断片」とは、前述する本発明のモノクローナル抗体の一部であって、当該モノクローナル抗体と同様にアルドステロンに特異的な結合性を保持する領域を意味する（以下、これを単に「抗体断片」ともいう）。

[0036] かかる抗体断片としては、Fab (fragment of antigen binding)、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体 (single chain Fv; 以下、「scFv」と表記する)、2量体V領域断片（以下、Diabodyと表記する）、ジスルフィド安定化抗体 (disulfide stabilized Fv; 以下、「dsFv」と表記する)、dAd (single domain antibody)、CDRを含むペプチド等を挙げることができる（エキスパート・オピニオン・オン・テラピューティック・パテンツ、第6巻、第5号、第441～456頁、1996年）。

[0037] 1.1. 本発明の抗体の用途

上記のように抗体を用いてアッセイを行うにあたって、通常は抗体の挙動を検出可能とするため抗体そのものが種々の物質で標識されうる。抗体を標識するには、例えば「分子細胞生物学基礎実験法」（南江堂 堀江武一ら1994年）等に記載されている常法を用いることにより行うことができる。種々の物質としては化学発光物質、酵素、蛍光物質、着色ビーズ、放射性同位元素、元素、金属類、ビオチンが挙げられる。以下に具体例を示すがこれらに限定されるものではない。化学発光物質とは例えばルミノールやアクリジニウムエステルなどをさす。酵素とは例えばβ-ガラクトシダーゼやアルカリ

ホスファターゼやペルオキシダーゼなどをさす。蛍光物質とは例えばユウロピウムクリプテートやF I T C (f l u o r e s c e i n i s o t h i o c y a n a t e) や R I T C (t e t r a m e t h y l r h o d a m i n e i s o t h i o c y a n a t e) などをさす。着色ビーズとは例えばプロテインAビーズ、wheat germ agglutinin (WGA) ビーズ、ストレプトアビジンビーズなどをさす。放射性同位元素とは例えば¹⁴Cや¹²⁵Iや³Hなどをさす。元素とは例えばユウロピウムなどのランタニド元素をさす。金属類とは例えばフェリチンや金コロイドなどをさす。

[0038] 本発明には上記のように標識したものであってもなくても、アルドステロンの抗体を用いたアッセイを含むものとする。抗体を用いたアッセイには競合的な測定でも非競合的な測定でも良い。また、ホモジニアスアッセイ法（均一系による測定）でもヘテロジニアスアッセイ法（不均一系による測定）でもよい。具体的には、例えば、酵素免疫測定法（E I A）、固相酵素免疫測定法（E L I S A）、蛍光免疫測定法（F I A）、放射線免疫測定法（R I A）、時間分解蛍光免疫測定（T R - F I A）、化学発光免疫測定法、イムノブロット法、ウエスタンブロット法、免疫染色法などの常法に従うことができる。なお、アッセイには治療剤・予防剤の開発を目的とする薬物スクリーニングを含むものとする。また疾患の診断に関するものも含むものとする。

[0039] 本発明抗体を用いるアッセイの好ましい具体的方法としては、E L I S A法が挙げられる。E L I S A法とは、酵素で標識された抗体または抗原を用い、抗体または抗原の量を標識酵素の活性度により定量する方法である。酵素で標識された抗原抗体結合物と遊離型の標識抗原、または抗体を分離するのに固相化された抗体や抗原が用いられる。固相はアガロース、マイクロタイタープレートの内面、ラテックス粒子等が利用できる。E L I S A法として具体的には競合法イムノアッセイや2抗体サンドイッチイムノアッセイなどが挙げられる。また標識酵素としては西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ（以下H R Pともいう）やアルカリホスファターゼ等が挙げられるが好ましく

は西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼである。

[0040] 本発明が提供する好適なアルドステロン検出用キットは、アルドステロンに特異的に結合する2つのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA用のキットである。当該キットには、少なくとも、固体支持体に固定化されてなる本発明のモノクローナル抗体またはその断片、前述した標識剤で標識されてなる本発明のモノクローナル抗体またはその断片、および当該標識剤と反応して発色、発蛍光または発光する基質が含まれている。この場合、標識剤として、好ましくは前述する酵素、特にアルカリホスファターゼ（ALP）を挙げることができ、また基質として、好ましくはAP5-5を挙げることができる。かかるサンドイッチELISAによれば、より高い感度でアルドステロンを検出することができる。

[0041] 本発明のキットには、上記本発明のモノクローナル抗体、その抗体断片またはこれら標識物のほか、免疫電気泳動法または免疫測定法などその用途に応じて、更に適当な反応液、希釈液、洗浄液、アルドステロンの標準液、転写溶液、泳動溶液、反応停止液、抗体検出試薬、標識活性測定試薬、染色液、反応プレート、ニトロセルロースフィルター、ポリアクリルアミドゲル等が含まれていてもよい。なお、ここで抗体検出試薬としては、本発明のモノクローナル抗体と結合する二次抗体、例えば放射性物質や酵素などで標識した抗IgG抗体やプロテインA等を挙げることができる。

[0042] 本発明のモノクローナル抗体、抗体断片またはこれらの標識物を結合または検出試薬として含む上記試薬キットを利用することにより、一般の免疫電気泳動法及び免疫測定法に従い、アルドステロンを簡便に、特異的にかつ高感度に検出及び測定することができる。

[0043] 本発明のモノクローナル抗体、その抗体断片およびこれらの標識物は、アルドステロンを特異的に認識して高い親和性で結合するため、当該抗体を含む上記キットを利用したアルドステロンの測定法は、被験試料（例えば、血液、尿等）や各種組織中のアルドステロンの特異的検出や定量、アルドステロン発現組織の分布測定、及びアフィニティを利用したアルドステロンの精製

に利用されるほか、アルドステロンの発現の増加を伴う（またはアルドステロン発現の増加に起因する）種々の疾患の免疫化学的及び免疫組織学的診断に有用である。

[0044] 以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない

実施例 1

[0045] [モノクローナル抗体の調製]

(抗原の調製)

以前報告した特許文献（公開特許 昭63-60996）に従い、Aldosterone-6-hemisuccinate NHS esterを調製した。これをBSA [Bovine Serum Albumin] あるいはKLH [Keyhole Limpet Hemocyanin] のアミノ基に結合させ、ハプテン抗原を調製した（図1）。

[0046] また、上記のAldosterone-6-hemisuccinate NHS esterにAmine-PEG2-Biotinを結合させ、ビオチン化アルドステロンを調製した（図1）。

[0047] (モノクローナル抗体の調製)

アルドステロンのハプテン抗原を、等量のTiterMax Gold [TiterMax USA, Inc.] と混和することにより乳剤を調製し免疫原とした。乳剤については、初回免疫には完全アジュバントと、2回目以降は不完全アジュバントと等量混和することによっても調製できる。

[0048] モノクローナル抗体は、K. Watanabe et al., Vasoactive peptides as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis, J. Clin. Invest. 114 (2004), 898-907に記載した方法で作製した。即ち、5週齢の雌BALB/c系マウスあるいはA/J系マウスに、投与1回につき、一匹当たり50 µgのハプテン抗原を皮下あるいは腹腔内に等量に分けて投与した。そ

の後、5回目の免疫後に、最終のブースター（細胞融合の4日前）を行ったマウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。脾細胞とミエローマ細胞（P3U1）との細胞融合は、K. Watanabe et al., Vasoactive as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis, J. Clin. Invest. 114 (2004)、898-907に記載した方法で行った。

[0049] 抗血清とハイブリドーマ上清の抗体価の評価は、下記に記述するDELFA法（図2A）にて行った。即ち、ヤギ抗マウスIgG抗体を固相した96穴マイクロプレートに、抗血清あるいはハイブリドーマ上清を添加し、さらにビオチン化アルドステロンとEu標識ストレプトアビジンを混合攪拌後、室温で2時間あるいは4℃で終夜反応させた。反応後、洗浄液（0.01% Tween20と0.1% ProClin 150を含む生理食塩水）にて3回洗浄を行い、100μL増強試薬を加え、攪拌後5分間静置し、615nmにおける時間分解蛍光をARVO MX（Perkin Elmer）にて測定し、抗血清やハイブリドーマを未添加の場合に得られるシグナルの3倍を超えるシグナル強度を示す場合を陽性と判断した。

[0050] 当初、免疫は、アルドステロン-KLHコンジュゲートとA/Jマウスを用い、腹腔免疫にて行った。しかしながら、2回目の免疫後に高い抗体価が認められたものの、3回目免疫後より抗体価の低下を示すマウスが多く、4回目免疫後のアルドステロンに対する親和性も悪かった（>400nM）。これは、（1）アルドステロン-KLHの組み合わせでは抗原性が高すぎることで、それに加え、（2）免疫応答が高いA/Jを用いたこと、さらに（3）腹腔免疫では、マウスへの抗原性が強くなること、これらの3つが重なり、免疫の脱感作の状態が生じたと推察した。

[0051] そこで、通常とは逆に抗原性や免疫応答を下げるように免疫を行った。即ち、（1）アルドステロン-BSAコンジュゲートを抗原に使用、（2）免疫応答の低いBALB/cマウスを用い、（3）皮下免疫にて免疫を行った。そ

の結果、免疫回数を重ねる毎に抗体価の上昇が認められ、非常に高い親和性（6 nM）と高い抗体価を有するマウスも取得することができた（図3）。

[0052] この様にして、抗体価および親和性の高い抗血清を有するマウスを得ることができ、ミエローマ細胞との細胞融合により親和性の高いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ取得することができた。モノクローナル抗体は、抗体産生ハイブリドーマの無血清培地あるいはハイブリドーマをマウスに投与して得られた腹水より、プロテインAカラム（MAPS IIキット、Bio-Rad Laboratories Inc.）を用いて精製した。

[0053] 以下の表1に、得られたモノクローナル抗体の特性について記載した。取得した抗体は、競合アッセイにおける50%阻害率（IC50%）は、0.5 nMであり、低分子化合物の抗体としては非常に高い親和性を有していた。この様な抗体が取得できたのは、上記の様な通常とは逆の方法、即ち抗原性を下げるなどの創意工夫することにより成し得た結果であり、単に常法に従った抗体作製法では得ることは出来ない。

[0054] [表1]

クローン名	15G7
サブクラス	IgG1、 λ
親和性（IC50%, nM）	0.5

実施例 2

[0055] [モノクローナル抗体の感度確認]

上述のAldosterone-6-hemisuccinate NHS esterとアルカリフォスファターゼ（ALP）を5：1で反応させ、ALP標識アルドステロンを調製した（図4）。このALP標識アルドステロンを用い、アルドステロン測定系を構築した。アッセイ緩衝液（1 mM MgCl₂、0.1 mM ZnCl₂、0.05% Tween 20、0.05% Proclin 150を含む50 mM Tris-HCl, pH 7.4）25

μL 、ALP標識アルドステロン (0.1 pg/mL) $25 \mu\text{L}$ 、標準アルドステロン $25 \mu\text{L}$ 、および抗体希釈液 (2 ng/mL) $25 \mu\text{L}$ を、図2Bに示したように抗マウスIgG抗体固相96穴プレートに添加し、室温にて3時間反応させた。反応後、洗浄液で洗浄後基質溶液 (CDP-Star) を $100 \mu\text{L}$ 添加し、攪拌後20分間静置し、化学発光のシグナルをARVO MX (Perkin Elmer) にて測定した。

[0056] その結果を図5に示した。 5 pg/mL 濃度で0濃度と有意に区別可能であり、体外診断薬 (スパック-ス-アルドステロンキット) に比べ高感度であった。

実施例 3

[0057] [抗体の特異性の確認]

得られたモノクローナル抗体がアルドステロン以外のステロイドホルモンと交差反応性を示すかどうか調べた。

[0058] 調べたステロイド化合物は、以下の通りである。コルチゾール、コルチゾン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、プロゲステロン、エストラジオール、プレドニゾロン、18-ヒドロキシコルチコステロン、スピラロノラクトン、プレドニゾン、トランスデヒドロアンドロステロン、アルドステロン。

[0059] アッセイ方法を以下に示す。抗マウスIgG抗体固相プレートに、上記に記載の通り、アッセイ緩衝液、アルドステロン標準液あるいは類似のステロイドホルモン溶液 ($0.1 \text{ nM} \sim 1000 \mu\text{M}$)、ALP標識アルドステロン、抗体溶液を加え、攪拌後、室温3時間反応させた。洗浄液にて洗浄後、基質溶液を添加し、20分後に化学発光のシグナルを検出した。

[0060] その結果を図6に示す。18-ヒドロキシコルチコステロンは、アルドステロンの生合成基質であり、アルドステロンと構造式が非常に似ているにもかかわらず、交差反応性は0.01%以下と低かった。それ以外のステロイド化合物との交差反応性は、全て0.00008%を下回るほど非常に低かった。

[0061] 特に、コルチゾールはアルドステロンに比べ血中濃度が100～5000倍程度高いため、アルドステロン測定系には、その影響を回避する必要がある。今回得た抗体は、コルチゾールとの交差反応性が0.000012%以下と低く、コルチゾールのアルドステロン測定系への影響は回避できる。

実施例 4

[0062] 〔市販キットとの交差反応性の比較〕

本抗体を用いたアルドステロン測定系と2種類の市販のアルドステロン測定キットを同時に比較した。方法は、上記に記載のアッセイ方法で行った。また、市販キットに関しては、添付の方法に従ってアッセイを行った。比較したステロイド化合物は、以下の通りである。コルチゾール、コルチゾン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、プロゲステロン、エストラジオール、プレドニゾロン、18-ヒドロキシコルチコステロン、スピラロノラクトン、プレドニゾン、トランスデヒドロアンドロステロン、アルドステロン。濃度は、アルドステロンは、それぞれの測定キットの濃度を使用し、他の化合物は0.1 nM～10 μMの濃度で使用した。

[0063] その結果、本抗体は0.1 nM～10 μMの間では生合成基質（約0.01%の交差反応性）以外は、阻害されないのに対し、2つの市販キットとも幾つかの化合物に反応性を示した（図6、表2）市販キットでは特に、アルドステロンの生合成基質18-ヒドロキシコルチコステロンやコルチコステロン、プロゲステロンとの交差反応性が高い。

[0064]

[表2]

Crossreactivity (%)						
	15G7	研究用試薬 (ALPC社)	研究用試薬 (Cayman社)	診断薬 (スパックス アルドステロン)		
Cortisol	<0.00012	0.004	0.008	0.0002		
Cortisone	<0.00012	0.005	0.002	<0.0003		
Corticosterone	0.00008	0.094	1.667	0.03		
Deoxycorticosterone	<0.00012	0.018	0.002	0.05		
Progesterone	0.00004	0.033	0.139	0.008		
Estradiol	<0.00012	0.002	0.005	not tested		
Prednisolone	<0.00012	0.015	0.001	<0.00003		
18-Hydroxycorticosterone	0.00964	0.500	0.476	0.01		
Spirolactone	0.00003	<0.001	0.008	0.0004		
Prednisone	<0.00012	0.001	<0.001	not tested		
trans-Dehydroandrosterone	<0.00012	0.003	0.020	not tested		
Aldosterone	100.0	100.0	100.0	100.0		

[0065] 血中には、アルドステロンに比べ、コルチコステロンやプロゲステロン（女

性の場合)が多く存在することから、市販キットではアルドステロンを正確に測定出来ない可能性が考えられる。

[0066] また、前述のように、コルチゾールはアルドステロンよりも血中濃度が非常に高い(100～5000倍)。市販キットでは、コルチゾールとの交差反応性が0.004～0.008%と、本抗体に比べ2オーダー以上交差反応性が高いことから、本抗体による測定系に比べてアルドステロン測定への影響が大きい。

産業上の利用可能性

[0067] 本発明のモノクローナル抗体またはその断片を用いれば、他のステロイドホルモンの妨害を受けることなく、高感度でアルドステロンの定量が可能となる。そのため原発性アルドステロン症などのアルドステロン量と関係する各種疾患の患者に由来する試料の選別に、本発明のモノクローナル抗体は有用である。

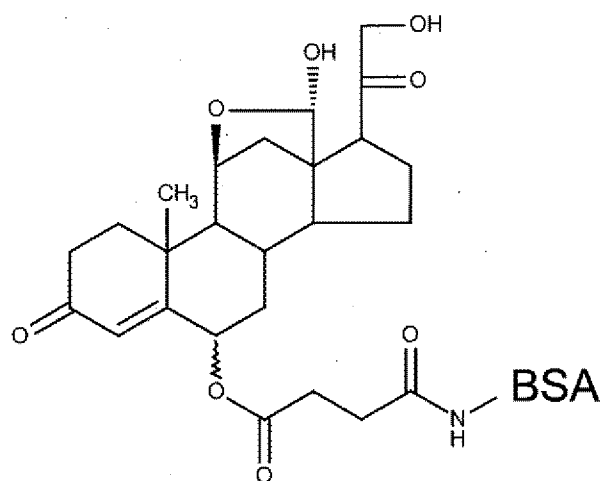
請求の範囲

- [請求項1] (1) 下記アミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
TSDYAWN（配列番号3）、YINYSGRGTGYNPSLKS（配列番号4）、およびR
PYSYGPTYGFTY（配列番号5）、あるいは、これらの3つのCDRのうち
の1つ以上のCDRにおいて1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換も
しくは付加されたアミノ酸配列からなる3つのCDR、ならびに

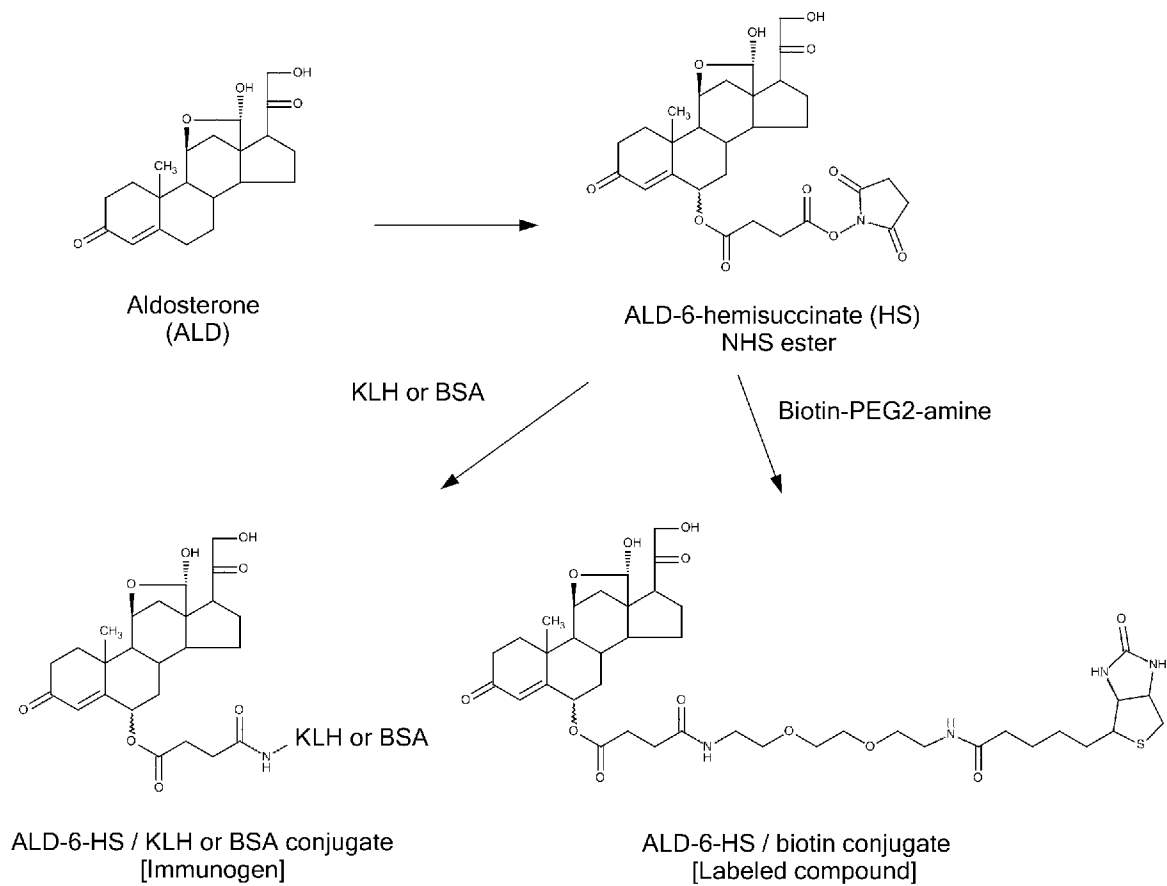
 (2) 下記アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
RSSTGPVTTSNYAN（配列番号6）、GLIGGINKRAP（配列番号7）、およ
びALWYSNHWL（配列番号8）、あるいは、これらの3つのCDRのうちの
1つ以上のCDRにおいて1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もし
しくは付加されたアミノ酸配列からなる3つのCDR、
を有する、アルドステロンに対するモノクローナル抗体またはその抗
体断片。
- [請求項2] (1) 配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、あるいは配
列番号1のアミノ酸配列のうち配列番号3、配列番号4および配列番
号5で示されるCDR以外の部分において、1もしくは数個のアミノ酸
が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸を有する重鎖可変領域；な
らびに

 (2) 配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、あるいは配
列番号2のアミノ酸配列のうち配列番号6、配列番号7および配列番
号8で示されるCDR以外の部分において、1もしくは数個のアミノ酸
が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸を有する軽鎖可変領域、
を有する、アルドステロンに対するモノクローナル抗体またはその抗
体断片。
- [請求項3] 標識されたものである請求項1または2に記載の抗体またはその抗体
断片。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗体
断片を含むキット。

- [請求項5] 請求項1～3のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いたアッセイ方法。
- [請求項6] 請求項1～3のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた、アルドステロンが関与する疾患に罹患している被験者由来の試料の選別方法。
- [請求項7] 以下の式 (I) で示される化合物を、BALB/cマウスに皮下免疫する工程を含むアルドステロンに対するモノクローナル抗体の製造方法
[化1]

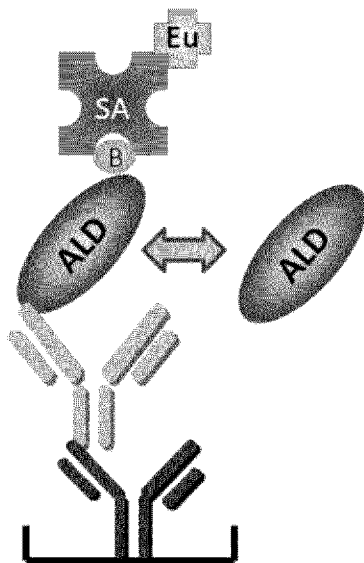


[図1]

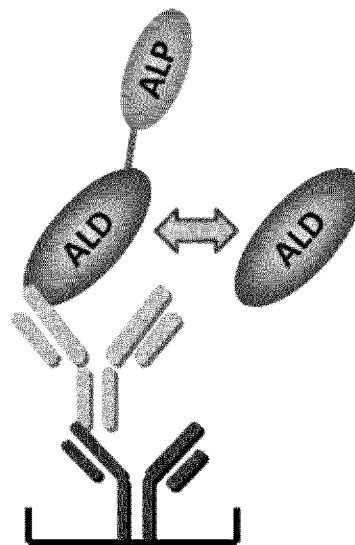


[図2]

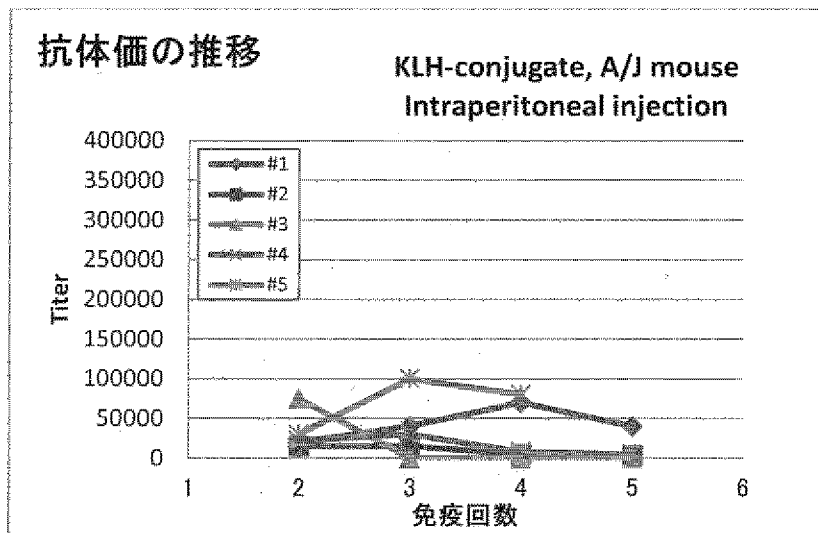
A



B

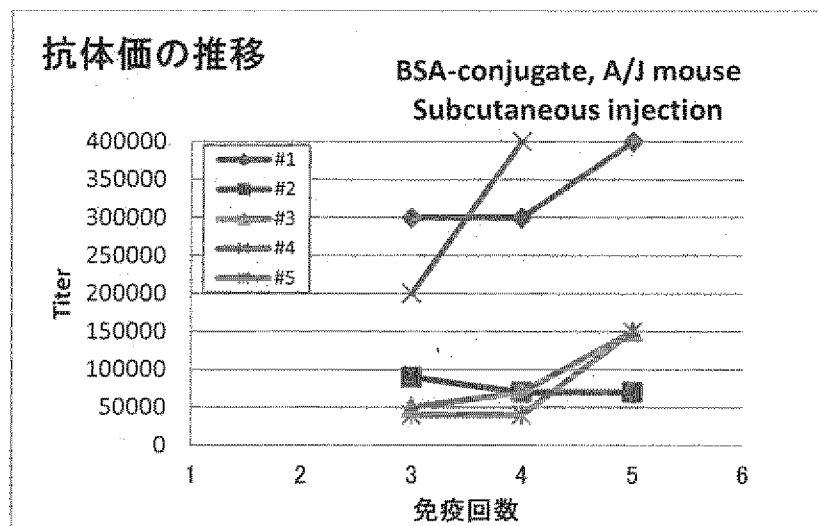


[図3A]



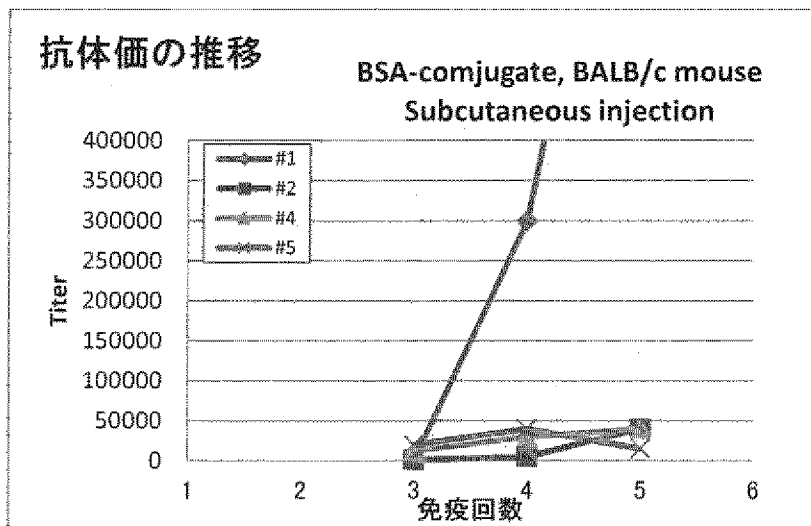
mouse No	Titer				Affinity (nM)
	2nd	3rd	4th	5th	
#1	20000	40000	70000	40000	400
#2	15000	15000	5000	3000	400
#3	75000	<250	<250	<250	700
#4	22000	30000	8000	5000	400
#5	30000	100000	80000	death	not determined

[図3B]



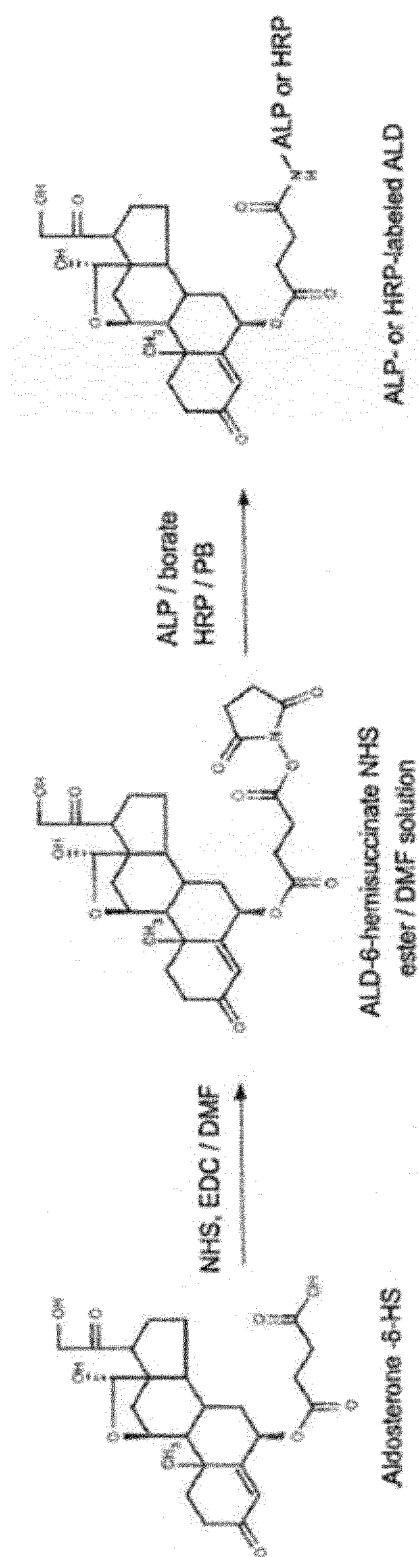
mouse No	Titer				Affinity (nM)
	2nd	3rd	4th	5th	
#1		300000	300000	400000	30
#2		90000	70000	70000	300
#3		50000	70000	150000	700
#4		200000	400000	600000	35
#5		40000	40000	150000	200

[図3C]

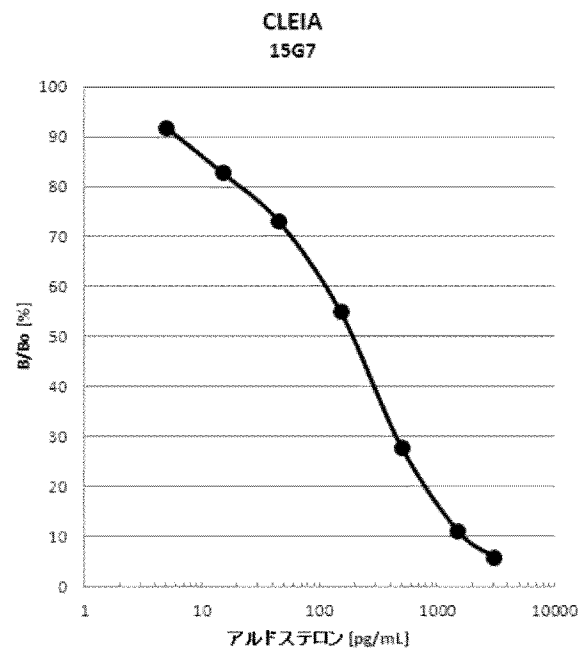


mouse No	Titer				Affinity (nM)
	2nd	3rd	4th	5th	
#1		1000	300000	1000000	6
#2		1000	5000	40000	50
#4		12000	30000	40000	70
#5		20000	40000	15000	60

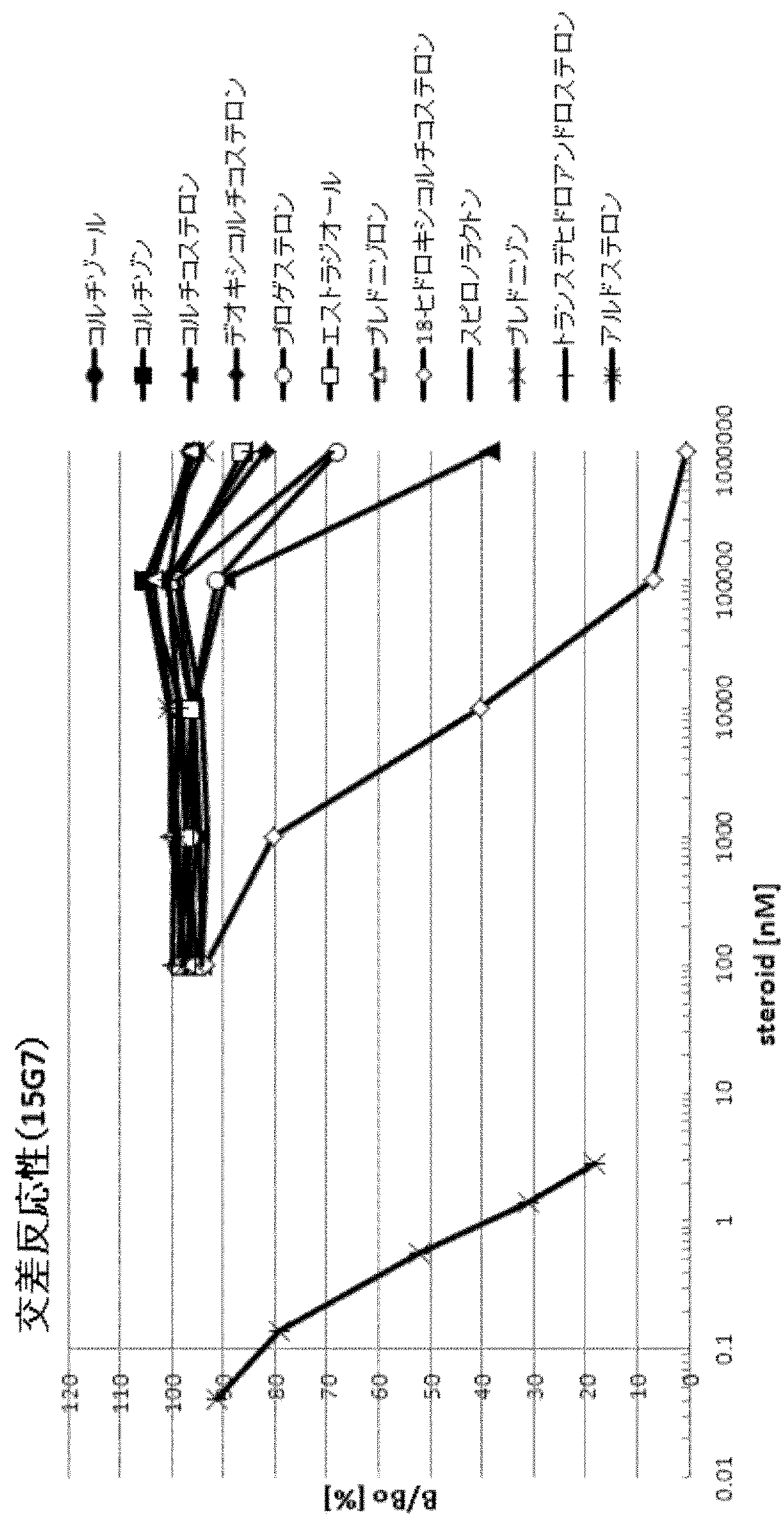
[図4]



[図5]



[図6]



[図7B]

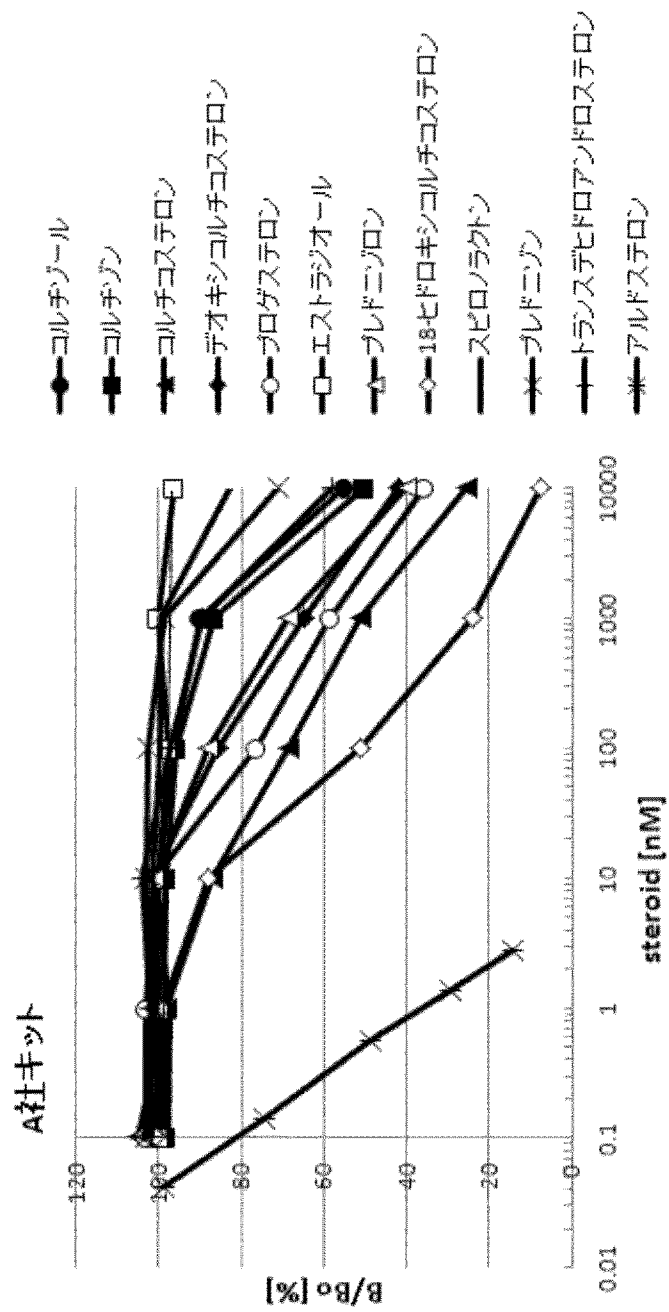


Figure 1 is a line graph showing the B/B0 [%] of various steroids in C57BL/6 mice. The y-axis represents B/B0 [%] from 0 to 140. The x-axis represents steroid concentration in nM on a logarithmic scale from 0.01 to 10000. The legend includes: Corticosterone (filled circle), Cortisol (filled square), Corticosterone (filled triangle), Deoxycorticosterone (filled diamond), Progesterone (open circle), Estradiol (open square), Pregnenolone (open triangle), 18-OH corticosterone (open diamond), Spironolactone (solid line), and Aldosterone (asterisk). The graph shows that most steroids increase B/B0 [%] with increasing concentration, while Aldosterone shows a significant decrease at low concentrations.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/075667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K16/26(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(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)

C12N15/09, C07K16/26, G01N33/53, G01N33/577, C12P21/08

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq, BIOSIS/MEDLINE/(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	de LAUZON SJ., ET AL, Murine monoclonal antibody against aldosterone: production, characterization and use for enzyme immunoassay., Steroid Biochem., 1987, Vol.28, No.5, p.459-463, EXPERIMENTAL, Fig.2	1, 3-7/2
Y/A	BROCHU M., ET AL, Highly sensitive and rapid radioimmunoassay for aldosterone in plasma and cell culture medium., Clin. Biochem., 1989, Vol.22, No.4, p.289-292, Introduction	3-6/2
Y/A	JP 63-60996 A (Shionogi & Co., Ltd.), 17 March 1988 (17.03.1988), page 2, upper right column, 5th paragraph to page 6, upper right column (Family: none)	7/2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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 December, 2014 (11.12.14)

Date of mailing of the international search report
22 December, 2014 (22.12.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K16/26(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i,
C12P21/08(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（I P C））

Int.Cl. C12N15/09, C07K16/26, G01N33/53, G01N33/577, C12P21/08

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 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), UniProt/GeneSeq, BIOSIS/MEDLINE/(STN)

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/A	de LAUZON S.J., ET AL, Murine monoclonal antibody against aldosterone: production, characterization and use for enzymeimmunoassay., Steroid Biochem., 1987, Vol.28, No.5, p.459-463, EXPERIMENTAL、Fig.2	1,3-7/2
Y/A	BROCHU M., ET AL, Highly sensitive and rapid radioimmunoassay for aldosterone in plasma and cell culture medium., Clin. Biochem., 1989, Vol, 22, No.4, p.289-292, Introduction	3-6/2

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

1 1 . 1 2 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 2 . 1 2 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

柴原 直司

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

3 5 3 4

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/A	JP 63-60996 A (塩野義製薬株式会社) 1988. 03. 17, 第 2 頁右上欄第 5 段落-第 6 頁右上欄 (ファミリーなし)	7/2